

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193171** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.04.22

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.05.19

(54) **КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ИНГИБИТОРА Mcl-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/850,098

(32) 2019.05.20

(33) US

(86) PCT/US2020/033602

(87) WO 2020/236817 2020.11.26

(88) 2020.12.30

(71) Заявитель:

**НОВАРТИС АГ (CH); ЛЕ
ЛАБОРАТУАР СЕРВЬЕ (FR)**

(72) Изобретатель:

**Бургер Мэттью Т. (US), Шанрион
Майя, Коллан Фредерик (FR),
Чекеи Мартон (HU), Делакур Леа
(LU), Дезо Патрис, Женест Оливье,
Энлэн Жан-Мишель, Костова
Везела (FR), Котшчи Андраш
(HU), Мараньо Ана Летисия (FR),
Макнейлл Эрик, Палермо Марк Г.
(US), Роккетти Франческа, Старк
Жером (FR), Юй Бин, Чжан Цян (US),
Просеньяк Агнеш, Шипош Сабольч
(HU), Чэнь Чжолян, Накадзима
Кацумаса, Д'Алессеи Джозеф Энтони,
Блэнкеншип Джон Уилльям (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны анти-CD74 конъюгаты антитело-лекарственное средство. Анти-CD74 конъюгаты антитело-лекарственное средство содержат группу лекарственного средства ингибитор Mcl-1 и анти-CD74 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает антиген-мишень, например антиген, экспрессированный на опухоли или другой раковой клетке. Описание дополнительно относится к способам и композициям для лечения рака путем введения конъюгатов антитело-лекарственное средство, представленных в настоящем документе. Также описаны конъюгаты линкер-лекарственное средство, содержащие фрагмент лекарственного средства ингибитора Mcl-1, и способы их получения.

A1

202193171

202193171

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571617EA/23

КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ИНГИБИТОРА Mcl-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННАЯ ЗАЯВКА

Эта заявка испрашивает преимущество и приоритет даты подачи согласно 35 U.S.C. §119(e) предварительной заявки США № 62/850,098, поданной 20 мая 2019, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее описание относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), содержащим ингибитор Mcl-1 и анти-CD74 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает антигенную мишень, например антиген, экспрессируемый на опухоли или другой раковой клетке. Описание также относится к способам и композициям, применимым для лечения и/или диагностики рака, которые экспрессируют антиген-мишень CD74 и/или поддаются лечению путем модулирования экспрессии и/или активности Mcl-1, а также к способам получения этих композиций. Также описаны конъюгаты линкер-лекарственное средство, содержащие лекарственную часть ингибитора Mcl-1, и способы их получения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Апоптоз, или запрограммированная смерть клеток является физиологическим процессом, который имеет решающее значение для эмбрионального развития и поддержания тканевого гомеостаза. Гибель клеток апоптотического типа обычно включает морфологические изменения, такие как конденсация ядра и фрагментация ДНК, а также биохимические изменения, такие как активация каспаз, которые могут вызывать повреждение ключевых структурных компонентов клетки. Регулирование апоптоза является сложным и обычно включает активацию или репрессию нескольких внутриклеточных сигнальных путей (Cory et al. (2002) Nature Review Cancer 2:647-656).

Нарушение регуляции апоптоза связано с определенными патологиями. Например, повышенный апоптоз связан с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и ишемия. И наоборот, дефицит апоптоза может играть роль в развитии рака и химиорезистентности, аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и вирусных инфекций. Отсутствие апоптоза является одним из фенотипических признаков рака (Hanahan et al. (2000) Cell 100:57-70). Анти-апоптотические белки семейства Bcl-2 связаны с многочисленными типами рака, такими как рак толстой кишки, рак груди, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак простаты, хронический лимфолейкоз, лимфома, миелома и рак поджелудочной железы.

Лейкоз миелоидных клеток 1 (Mcl-1), анти-апоптотический член семейства Bcl-2, является регулятором выживаемости клеток. Амплификация гена Mcl-1 и/или сверхэкспрессия белка Mcl-1 наблюдается при нескольких типах рака и обычно участвует

в развитии опухоли (Beroukhim et al. (2010) Nature 463(7283):899-905). Mcl-1 является одним из наиболее часто амплифицируемых генов рака человека, а также является критическим фактором выживания, который, как было показано, опосредует лекарственную резистентность к множеству противораковых агентов.

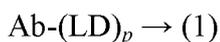
Считается, что Mcl-1 способствует выживанию клеток за счет связывания и нейтрализации вызывающей гибель активности проапоптотических белков, таких как Bim, Noxa, Bak и Bax. Ингибирование Mcl-1 высвобождает эти проапоптотические белки, что часто приводит к индукции апоптоза в опухолевых клетках, зависящих от Mcl-1 для выживания. Следовательно, терапевтическое таргетирование Mcl-1 или белков выше и/или ниже него в апоптотическом сигнальном пути может представлять многообещающие стратегии для лечения различных злокачественных новообразований и преодоления лекарственной резистентности при определенных раках человека.

CD74 (DHLA6) является установленной и привлекательной мишенью для конъюгатов антитело-лекарственное средство из-за его ограниченной экспрессии в нормальных тканях и значительной активации в ряде гематологических злокачественных новообразований. CD74 действует как шаперон, который необходим для сборки и транспортировки комплексов МНС класса II, а также как рецептор для рецептора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF). В онкологии общепризнано, что CD74 значительно активируется как на уровне РНК, так и на уровне белка в ряде злокачественных новообразований В-клеток и миелоидных клеток, включая острый миелоидный лейкоз, множественную миелому и диффузную В-крупноклеточную лимфому. Кроме того, известно, что CD74 быстро интернализируется при взаимодействии антител и перемещении в лизосомы, а также быстро восстанавливают популяцию на поверхности опухолевых клеток после интернализации. Ранее было показано, что антитела и конъюгаты антитело-лекарственное средство, нацеленные на CD74, демонстрируют противоопухолевую активность на доклинических моделях рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание частично относится к новым соединениям конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) с биологической активностью против раковых клеток. Соединения могут замедлять, ингибировать и/или обращать вспять рост опухоли у млекопитающих и/или могут быть полезны для лечения больных раком людей. Настоящее описание более конкретно относится, в некоторых вариантах осуществления, к соединениям ADC, которые способны связывать и убивать раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления, соединения ADC, описанные в настоящем документе, содержат линкер, который присоединяет ингибитор Mcl-1 к полноразмерному анти-CD74 антителу или антигенсвязывающему фрагменту. В некоторых вариантах осуществления, соединения ADC также способны интернализироваться в клетку-мишень после связывания.

В некоторых вариантах осуществления, соединения ADC могут быть представлены Формулой (1):



где Ab является анти-CD74 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который таргетирует раковую клетку;

D является ингибитором Mcl-1;

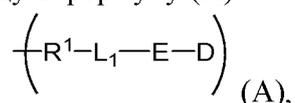
L является линкером, который ковалентно присоединяет Ab к D; и

p является целым числом от 1 до 16.

В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления, p равно 2. В некоторых вариантах осуществления, p равно 4. В некоторых вариантах осуществления, p определяется методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС).

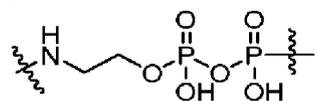
В некоторых вариантах осуществления, линкер (L) содержит группу присоединения, по меньшей мере, одну спейсерную группу и, по меньшей мере, одну расщепляемую группу. В некоторых случаях, расщепляемая группа включает пирофосфатную группу и/или саморазрушающуюся группу. В конкретных вариантах осуществления, L содержит группу присоединения; по меньшей мере, одну мостиковую разделительную группу; и, по меньшей мере, одну расщепляемую группу, содержащую пирофосфатную группу и/или саморазрушающуюся группу.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит группу линкер-лекарственное средство (или «линкер-полезная нагрузка») -(L-D), имеющую формулу (A):



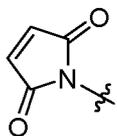
где R^1 является группой присоединения, L_1 является мостиковой спейсерной группой и E является расщепляемой группой.

В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая группа содержит пирофосфатную группу. В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая группа содержит:



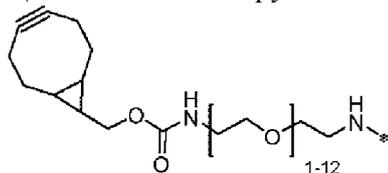
В некоторых вариантах осуществления, мостиковая спейсерная группа содержит полиоксиэтиленовую (PEG) группу. В некоторых случаях, PEG группа может быть выбрана из PEG1, PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, PEG14 и PEG15. В некоторых вариантах осуществления, мостиковая спейсерная группа может содержать: -CO-CH₂-CH₂-PEG12-. В других вариантах осуществления, мостиковая спейсерная группа содержит бутаноильную, пентаноильную, гексаноильную, гептаноильную или октаноильную группу. В некоторых вариантах осуществления, мостиковая спейсерная группа содержит гексаноильную группу.

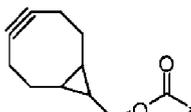
В некоторых вариантах осуществления, группа присоединения образована из, по меньшей мере, одной реакционноспособной группой, выбранной из малеимидной группы, тиольной группы, циклооктиновой группы и азидогруппы. Например, малеимидная группа может иметь структуру:



Азидогруппа может иметь структуру: $-N=N^+=N^-$.

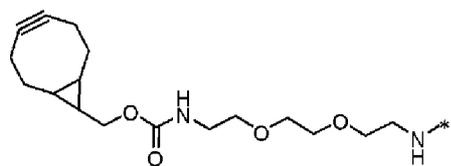
Циклооктиновая группа может иметь структуру:



или  и где $—*$ является связью с

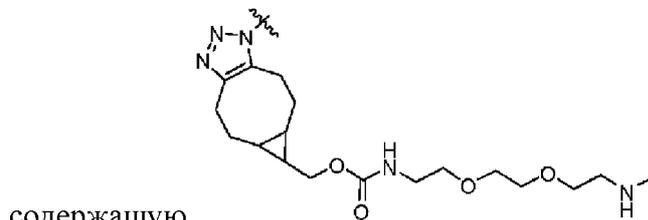
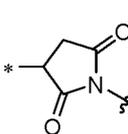
антителом.

В некоторых случаях, циклооктиновая группа имеет структуру:

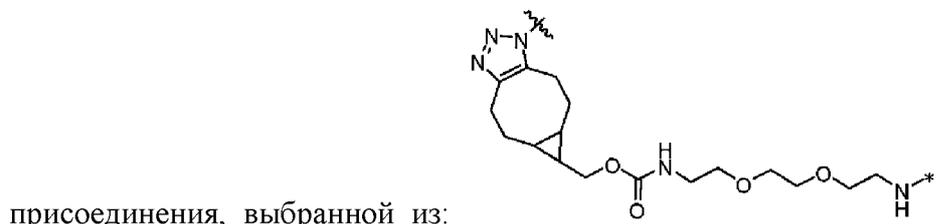
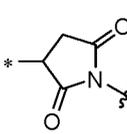


и где $—*$ является связью с антителом.

В некоторых вариантах осуществления, группа присоединения имеет формулу,

содержащую  или  и где $—*$ является связью с антителом.

В некоторых вариантах осуществления, антитело соединено с линкером (L) группой

присоединения, выбранной из:  и , где $—*$ является связью с антителом и где  является связью с мостиковой спейсерной группой.

В некоторых вариантах осуществления, мостиковая спейсерная группа соединена с расщепляемой группой.

В некоторых вариантах осуществления, мостиковой спейсерной группой является $-CO-CH_2-CH_2-PEG12-$.

В некоторых вариантах осуществления, расщепляемой группой является -

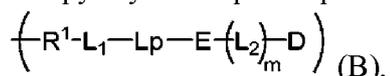
пирофосфат-CH₂-CH₂-NH₂-.

В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая группа соединена с ингибитором Mcl-1 (D).

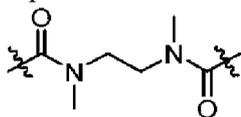
В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая группа соединена с группой ингибитора Mcl-1 (D) через фенил-пиримидинильную группу.

В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит: группу присоединения, по меньшей мере, одну мостиковую спейсерную группу, пептидную группу и, по меньшей мере, одну отщепляемую группу.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит группу линкер-лекарственное средство, -(L-D) формулы (B):



где R¹ является группой присоединения, L₁ является мостиковым спейсером, L_p является пептидной группой, содержащей 1-6 аминокислотных остатков, E является расщепляемой группой, L₂ является мостиковым спейсером, m равно 0 или 1; и D является ингибитором Mcl-1. В некоторых случаях, m равно 1 и мостиковый спейсер содержит:



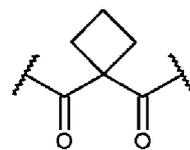
В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один мостиковый спейсер содержит PEG группу. В некоторых случаях, PEG группа выбрана из PEG1, PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, PEG14 и PEG15. В некоторых случаях, по меньшей мере, один мостиковый спейсер выбран из *-C(O)-CH₂-CH₂-PEG1-**, *-C(O)-CH₂-PEG3-**, *-C(O)-CH₂-CH₂-PEG12**, *-NH-CH₂-CH₂-PEG1-**, полигидроксиалкильной группы и *-C(O)-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-C(O)-**, где ** означает точку прямого или косвенного присоединения, по меньшей мере, одного мостикового спейсера к группе присоединения и * означает точку прямого или косвенного присоединения, по меньшей мере, одного мостикового спейсера к пептидной группе.

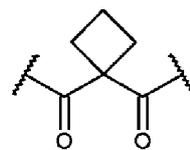
В некоторых вариантах осуществления, L₁ выбран из *-C(O)-CH₂-CH₂-PEG1-**, *-C(O)-CH₂-PEG3-**, *-C(O)-CH₂-CH₂-PEG12**, *-NH-CH₂-CH₂-PEG1-** и полигидроксиалкильной группы, где ** означает точку прямого или косвенного присоединения L₁ к R¹ и * означает точку прямого или косвенного присоединения L₁ к L_p.

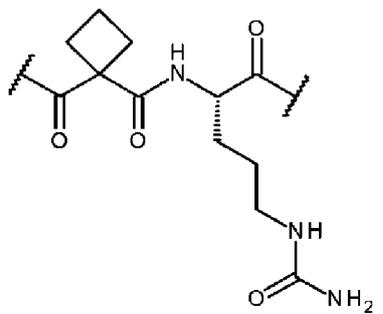
В некоторых вариантах осуществления, m равно 1 и L₂ является -C(O)-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-C(O)-.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 1-12 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа (L_p) содержит 1-10 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа (L_p) содержит 1-8 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа (L_p) содержит 1-6 аминокислотных остатков. В

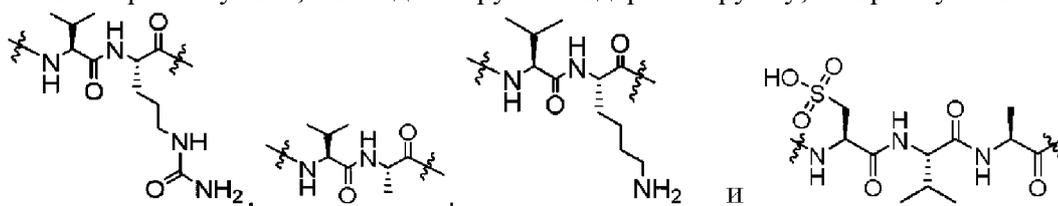
некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 1-4 аминокислотных остатка. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 1-3 аминокислотных остатка. В некоторых вариантах осуществления пептидная группа содержит 1-2 аминокислотных остатка. В некоторых случаях, аминокислотные остатки выбраны из L-глицина (Gly), L-валина (Val), L-цитруллина (Cit), L-цистеиновой кислоты (сульфо-Ala), L-лизина (Lys), L-изолейцина (Ile), L-фенилаланина (Phe), L-метионина (Met), L-аспарагина (Asn), L-пролина (Pro), L-аланина (Ala), L-лейцина (Leu), L-триптофана (Trp) и L-тирозина (Tyr). Например, пептидная группа может содержать Val-Cit, Val-Ala, Val-Lys и/или сульфо-Ala-Val-Ala. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа (Lp)



содержит 1 аминокислотный остаток, связанный с группой . В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа (Lp) содержит группы, выбранную из:

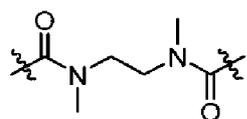


В некоторых случаях, пептидная группа содержит группу, выбранную из:

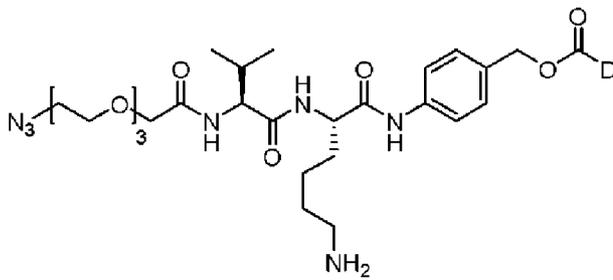
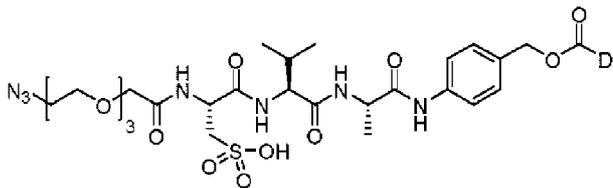
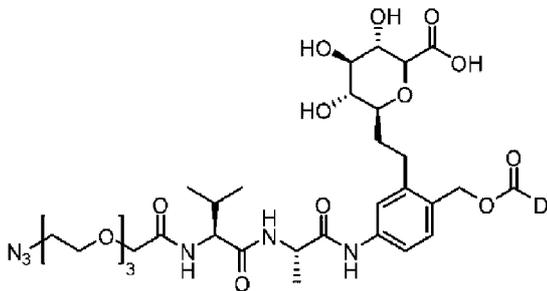
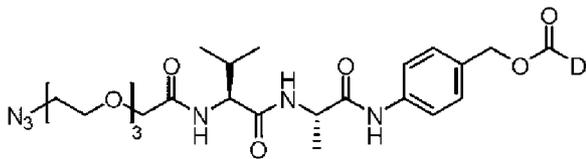
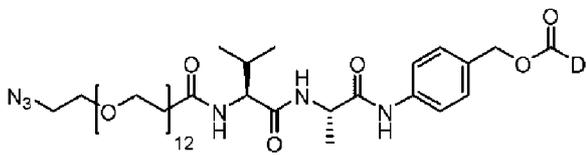
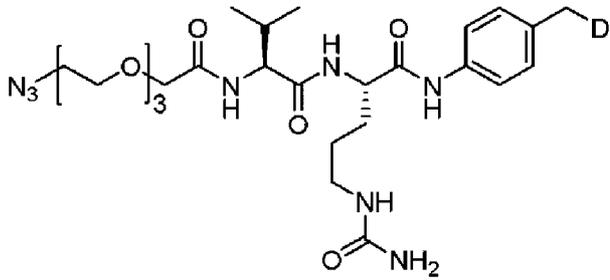
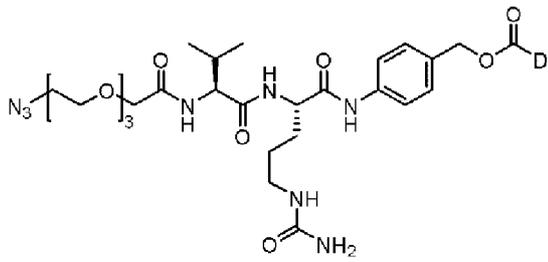


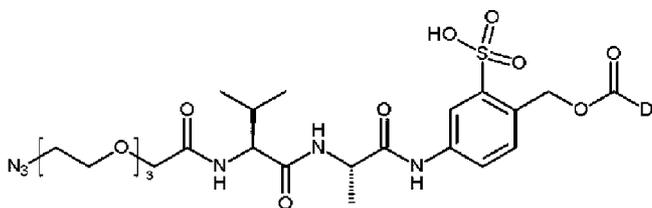
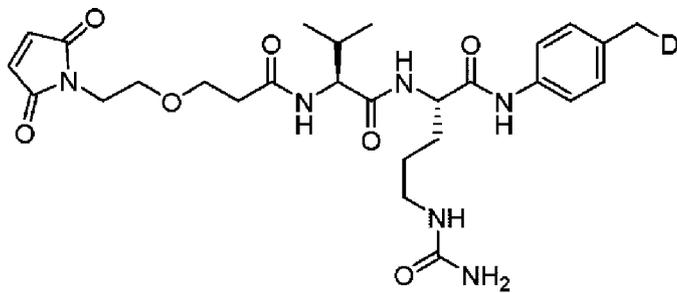
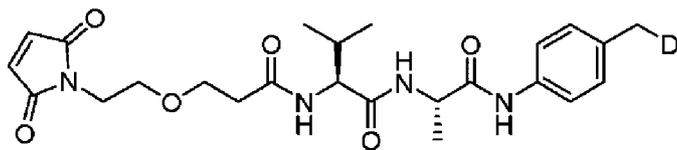
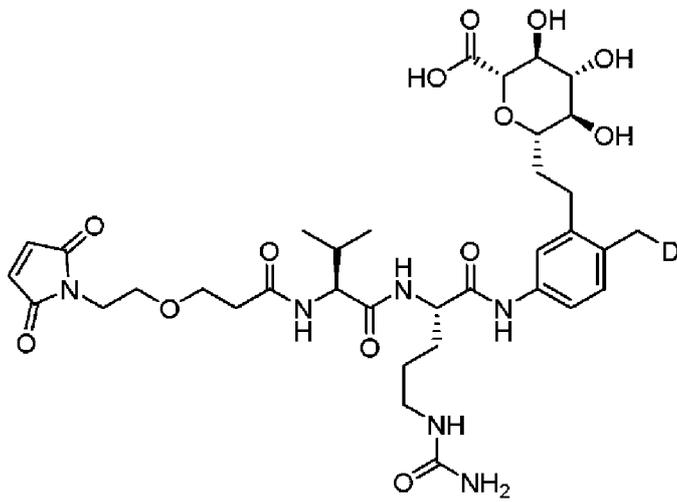
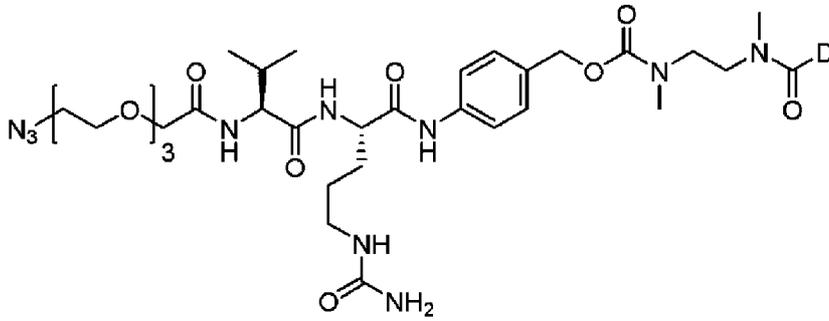
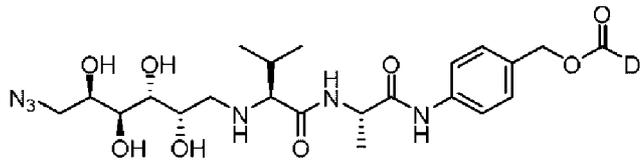
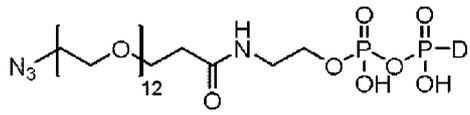
В некоторых вариантах осуществления, саморасщепляющаяся группа содержит пара-аминобензил-карбамат, пара-аминобензил-аммоний, пара-амино-(сульфо)бензил-аммоний, пара-амино-(сульфо)бензил-карбамат, пара-амино-(алкокси-PEG-алкил)бензил-карбамат, пара-амино-(полигидроксикарбокситетрагидропиранил)алкил-бензил-карбамат, or пара-амино-(полигидроксикарбокситетрагидропиранил)алкил-бензил-аммоний.

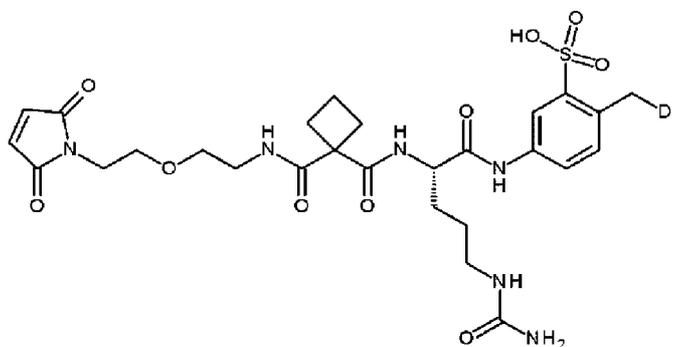
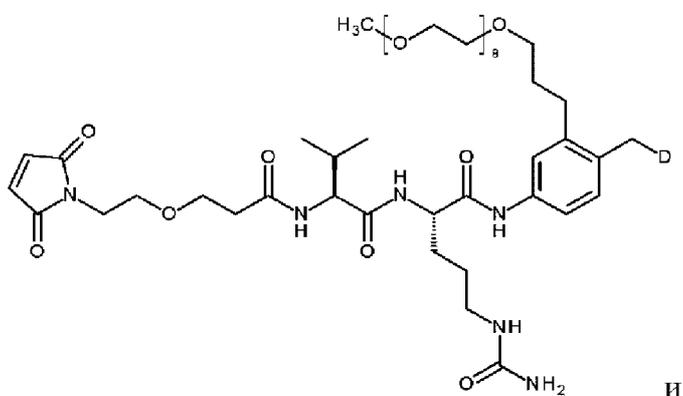
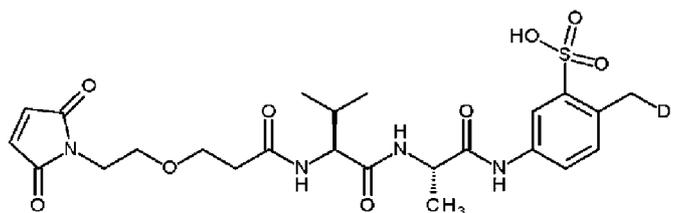
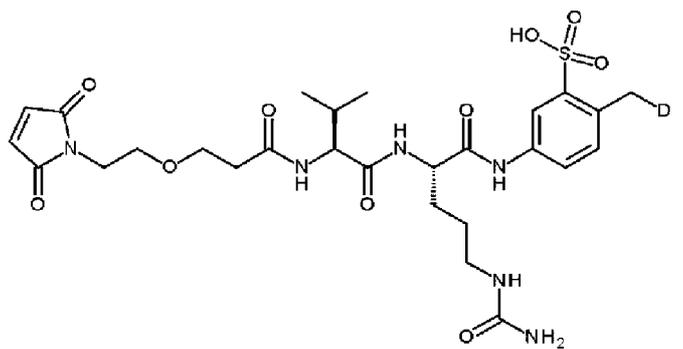
В некоторых вариантах осуществления, m равно 1 и мостиковый спейсер содержит



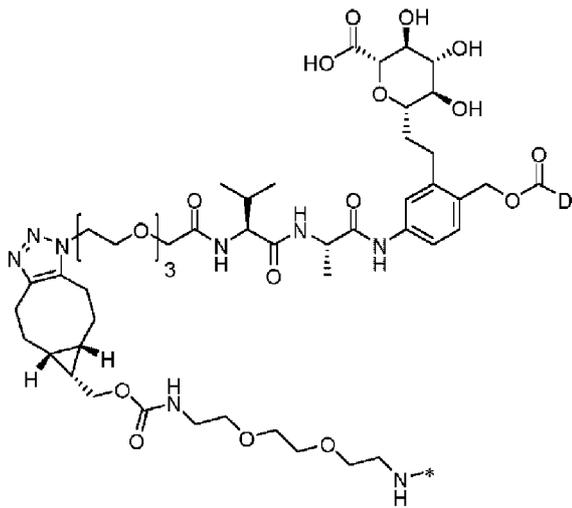
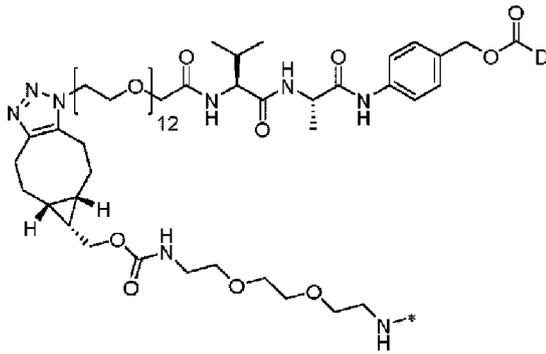
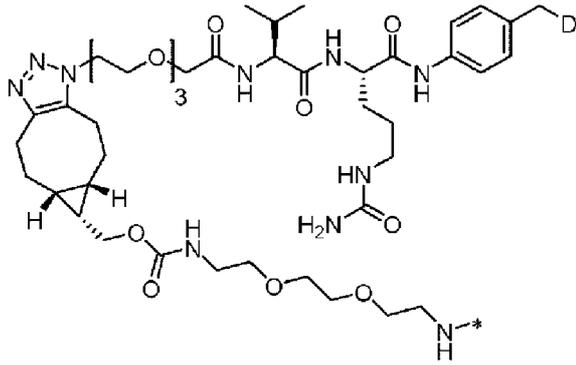
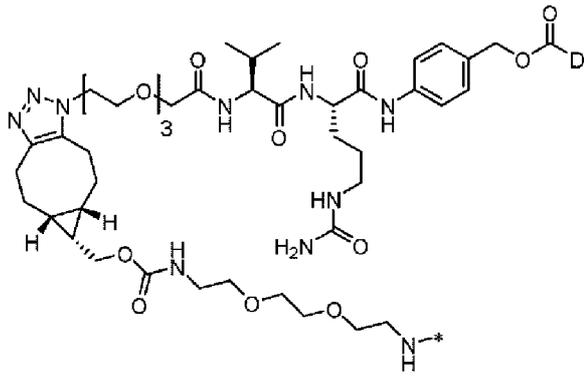
В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство, -(L-D), образована из соединения, выбранного из:

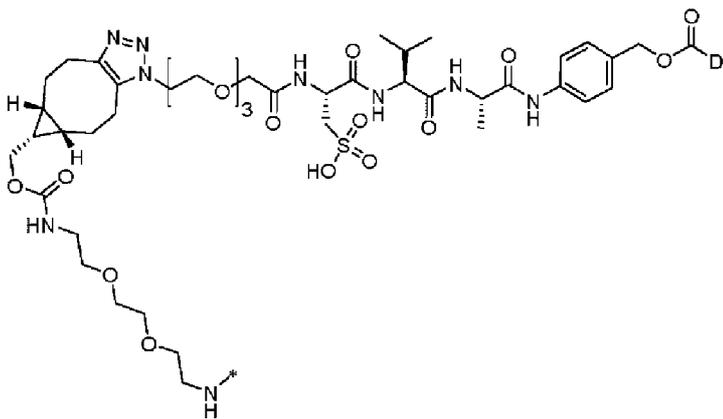
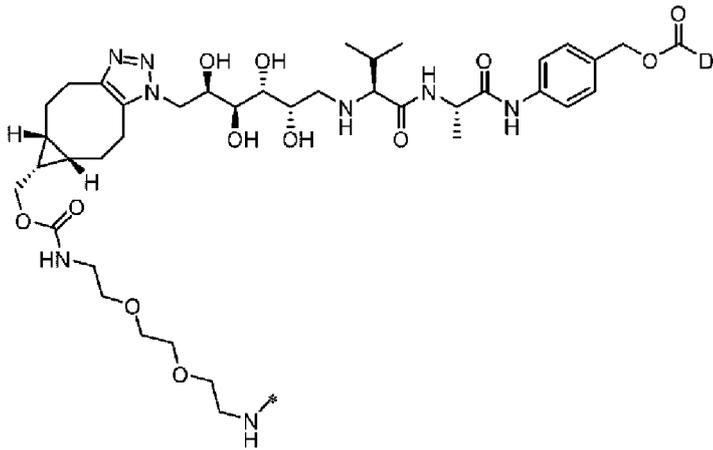
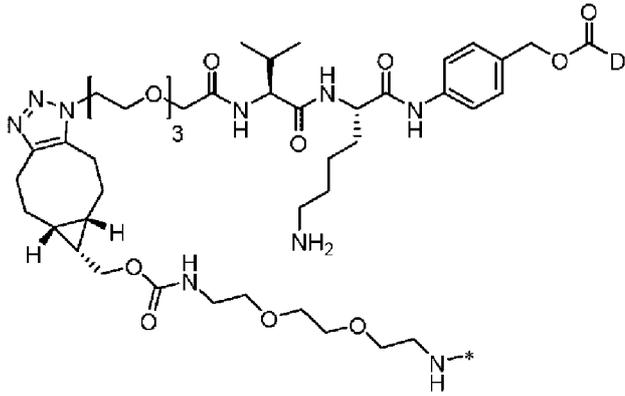
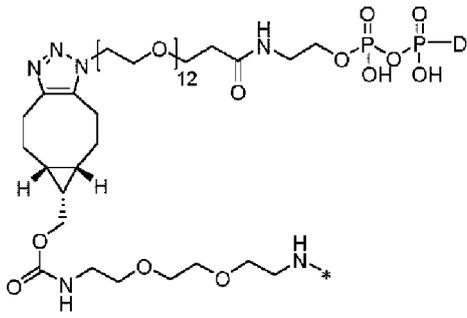


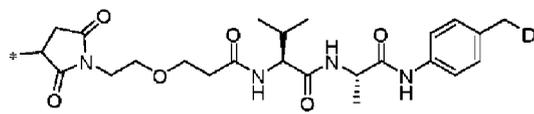
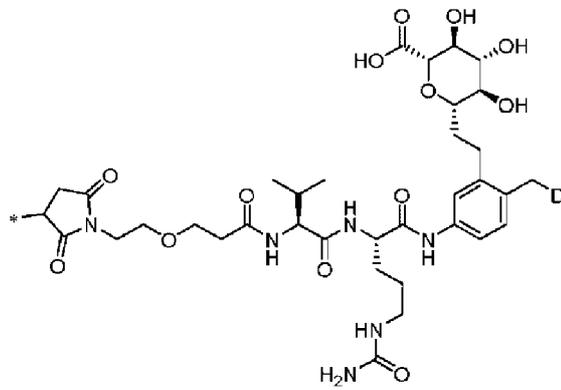
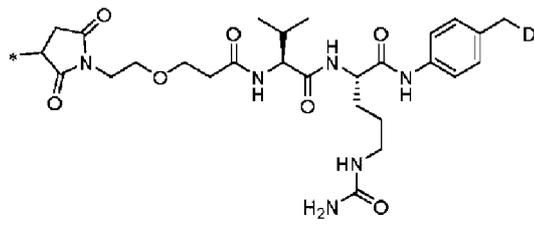
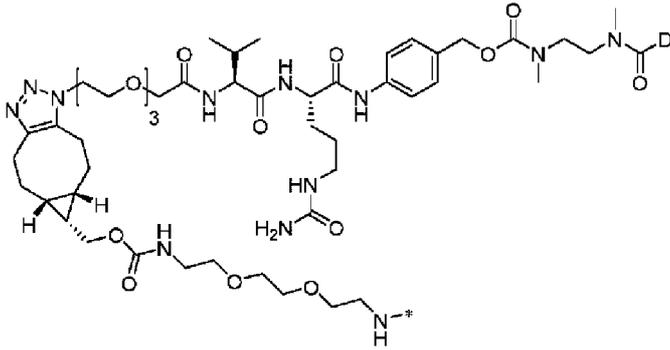
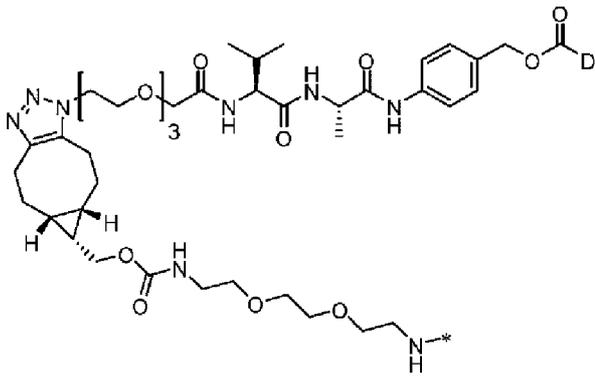


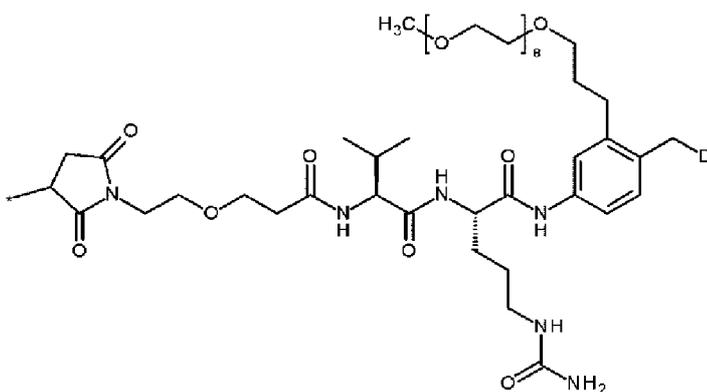
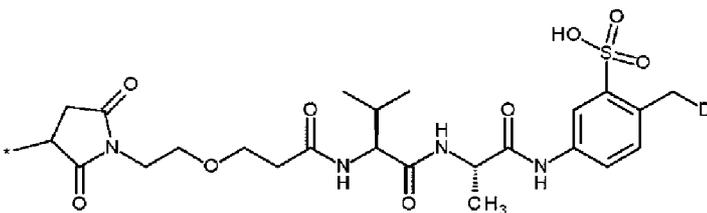
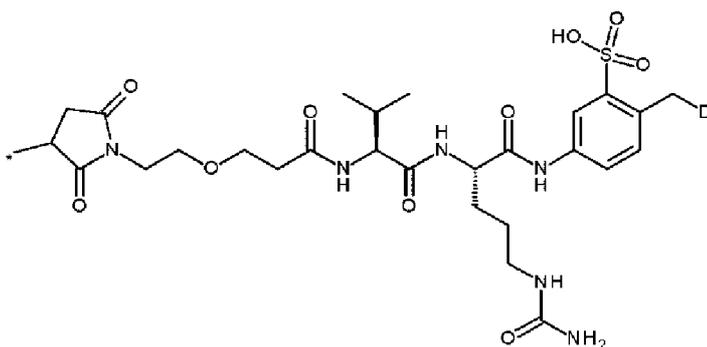
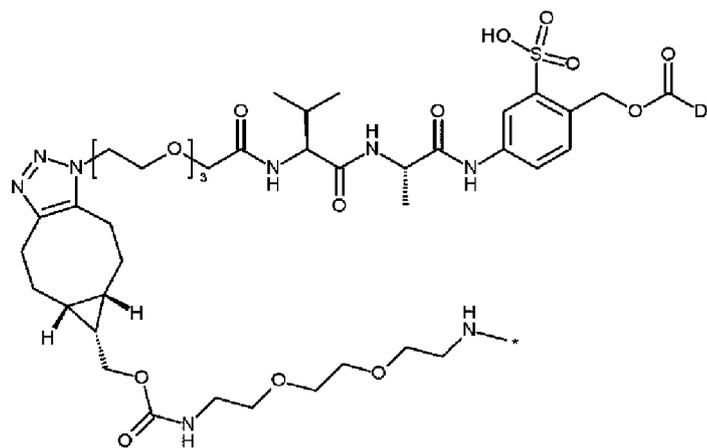


В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит группу линкер-лекарственное средство, -(L-D), которая содержит формулу, выбранную из:





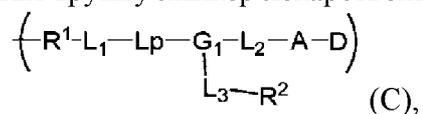




и где —* является связью с

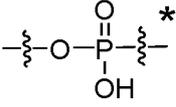
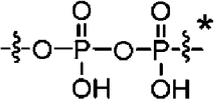
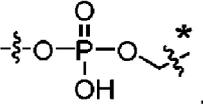
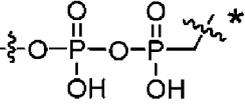
антителом.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит группу линкер лекарственное средство, -(L-D), которая имеет формулу (C):

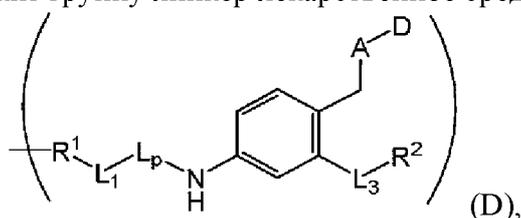


где: R¹ является группой присоединения, L₁ является мостиковым спейсером; L_p является пептидной группой, содержащей 1-6 аминокислот; D является ингибитором Mcl-

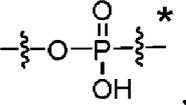
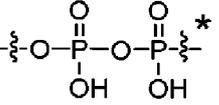
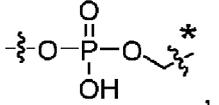
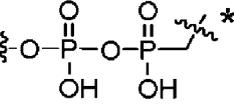
1; G₁-L₂-A является саморасщепляющимся спейсером; L₂ является связью, метиленом,

неопентиленом или C₂-C₃ алкениленом; А является связью, -OC(=O)-*, , , , , -OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-* или -OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкил и * из А означает точку присоединения к D; L₃ является спейсерной группой; и R² является гидрофильной группой.

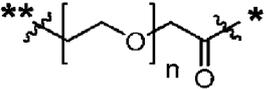
В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство содержит группу линкер лекарственное средство, -(L-D), имеющую формулу (D):

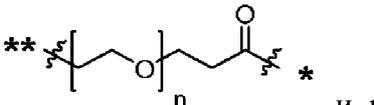


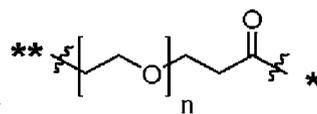
где: R¹ является группой присоединения; L₁ является мостиковым спейсером; L_p является пептидной группой, содержащей 1-6 аминокислот; А является связью, -OC(=O)-*,

, , , , -OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-* или -OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила и * из А означает точку присоединения к D; L₃ является спейсерной группой; и R² является гидрофильной группой.

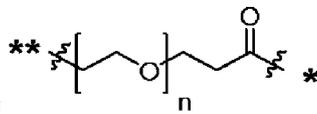
В некоторых вариантах осуществления, L₁ содержит:

 или *-CH(OH)CH(OH)CH(OH)CH(OH)-**, где каждый n является целым числом от 1 до 12, где * в L₁ означает точку прямого присоединения к L_p и ** в L₁ означает точку прямого присоединения к R¹.

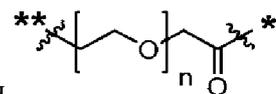
В некоторых вариантах осуществления, L₁ является  и n является целым числом от 1 до 12 где * из L₁ означает точку прямого присоединения к L_p и ** из L₁ означает точку прямого присоединения к R¹.



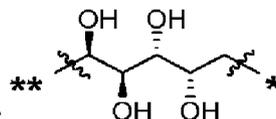
В некоторых вариантах осуществления, L_1 является 1 , где $*$ из L_1 означает точку прямого присоединения к L_p и $**$ из L_1 означает точку прямого присоединения к R^1 .



В некоторых вариантах осуществления, L_1 является 12 , где $*$ из L_1 означает точку прямого присоединения к L_p и $**$ из L_1 означает точку прямого присоединения к R^1 .



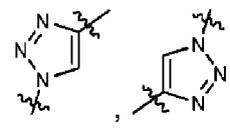
В некоторых вариантах осуществления, L_1 является целым числом от 1 до 12 , где $*$ из L_1 означает точку прямого присоединения к L_p и $**$ из L_1 означает точку прямого присоединения к R^1 .

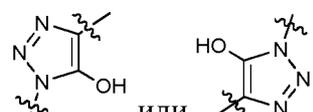


В некоторых вариантах осуществления, L_1 содержит OH , где $*$ из L_1 означает точку прямого присоединения к L_p и $**$ из L_1 означает точку прямого присоединения к R^1 .

В некоторых вариантах осуществления, L_1 является мостиковым спейсером, содержащим:

$*-C(=O)(CH_2)_mO(CH_2)_m-^{**}$; $*-C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n-^{**}$; $*-C(=O)(CH_2)_m-^{**}$; $*-C(=O)NH((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n-^{**}$; $*-C(=O)O(CH_2)_mSSC(R^3)_2(CH_2)_mC(=O)NR^3(CH_2)_mNR^3C(=O)(CH_2)_m-^{**}$; $*-C(=O)O(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m-^{**}$; $*-C(=O)(CH_2)_mNH(CH_2)_m-^{**}$; $*-C(=O)(CH_2)_mNH(CH_2)_n-^{**}$; $*-C(=O)(CH_2)_mX_1(CH_2)_m-^{**}$; $*-C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-^{**}$; $*-C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_n-^{**}$; $*-C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-^{**}$; $*-C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-^{**}$; $*-C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-^{**}$; $*-C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_m-^{**}$; $*-C(=O)(CH_2)_mC(R^3)_2-^{**}$ или $*-C(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m-^{**}$, где $*$ из L_1 означает точку прямого присоединения к L_p и $**$ из L_1 означает точку прямого присоединения к R^1 , где X_1 является



или ; и каждый m независимо выбран из $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ и 10 ; каждый n независимо выбран из $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$ и 10 ; и каждый t независимо выбран из $1, 2, 3,$

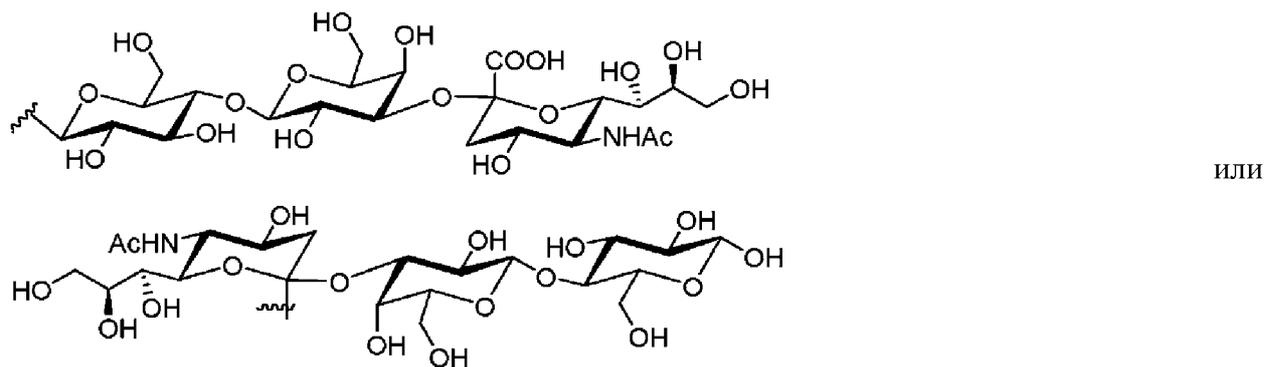
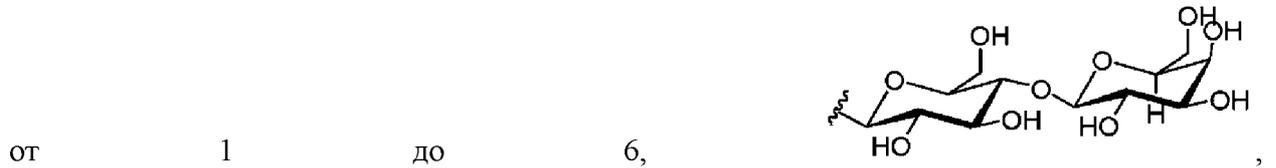
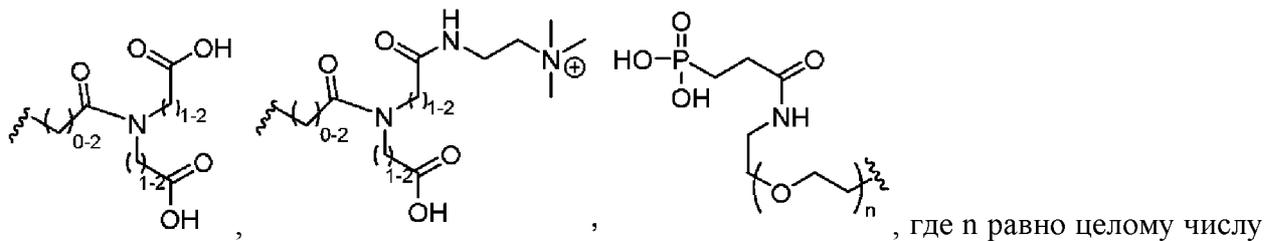
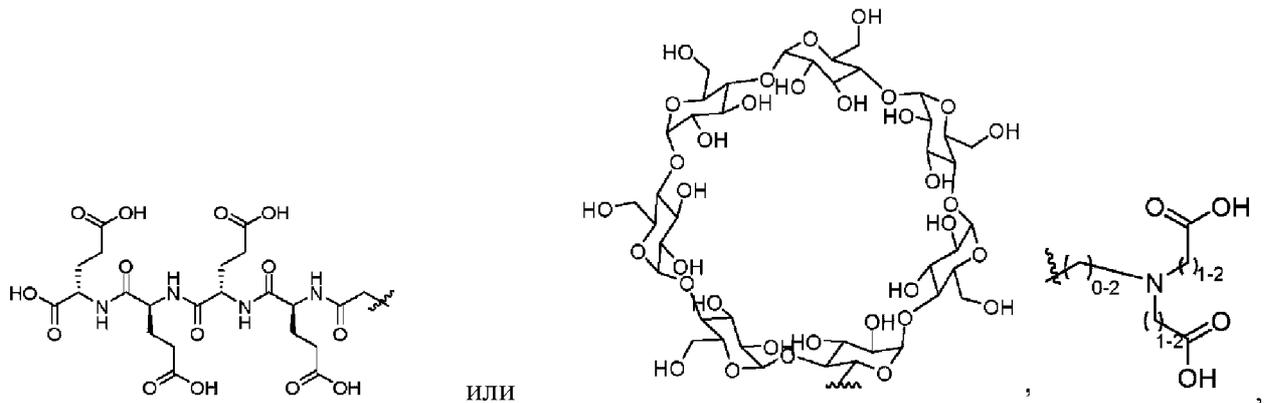
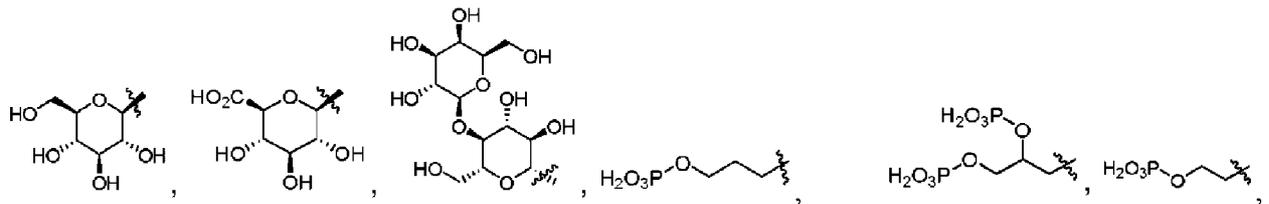
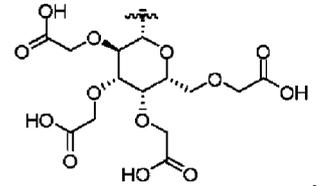
4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30.

В некоторых вариантах осуществления, R^2 является гидрофильной группой, содержащей полиэтиленгликоль, полиалкиленгликоль, полиол, полисаркозин, сахар,

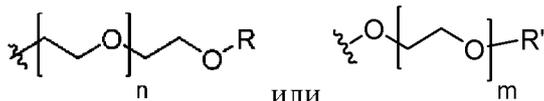
олигосахарид, полипептид или C_2 - C_6 алкил замещенный 1-3



группами. В некоторых вариантах осуществления, R^2 является

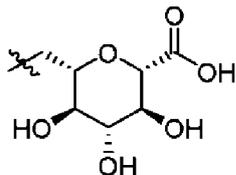


В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит

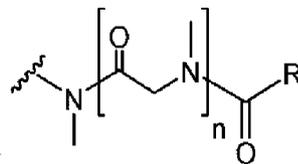


полиэтиленгликоль формулы: где R является H, -CH₃, -CH₂CH₂NHC(=O)OR_a, -CH₂CH₂NHC(=O)R_a или -CH₂CH₂C(=O)OR_a, R' является OH, -OCH₃, -CH₂CH₂NHC(=O)OR_a, -CH₂CH₂NHC(=O)R_a или -OCH₂CH₂C(=O)OR_a, где R_a является H или C₁₋₄ алкилом, необязательно замещенным либо OH, либо C₁₋₄ алкоксилем, и каждый из m и n равно целому числу от 2 до 25 (например, от 3 до 25).

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит



полисаркозин, например, со следующей группой , где n равно целому числу от 3 до 25; и R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

В некоторых вариантах осуществления, L₃ является спейсерной группой, имеющей структуру $\text{---} \frac{\xi}{\xi} \text{---W---X---} \frac{\xi}{\xi} \text{---}$,

где:

W является -CH₂-, -CH₂O-, -CH₂N(R^b)C(=O)O-, -NHC(=O)C(R^b)₂NHC(=O)O-, -NHC(=O)C(R^b)₂NH-, -NHC(=O)C(R^b)₂NHC(=O)-, -CH₂N(X-R²)C(=O)O-, -C(=O)N(X-R²)-, -CH₂N(X-R²)C(=O)-, -C(=O)NR^b-, -C(=O)NH-, -CH₂NR^bC(=O)-, -CH₂NR^bC(=O)NH-, -CH₂NR^bC(=O)NR^b-, -NHC(=O)-, -NHC(=O)O-, -NHC(=O)NH-, -OC(=O)NH-, -S(O)₂NH-, -NHS(O)₂-, -C(=O)-, -C(=O)O- или -NH-, где каждый R^b независимо выбран из H, C₁-C₆алкила и C₃-C₈ циклоалкила; и

X является связью, триазилом или -CH₂-триазилом.

В некоторых вариантах осуществления, L₃ является спейсерной группой, имеющей структуру $\text{---} \frac{\xi}{\xi} \text{---W---X---} \frac{\xi}{\xi} \text{---}$,

где:

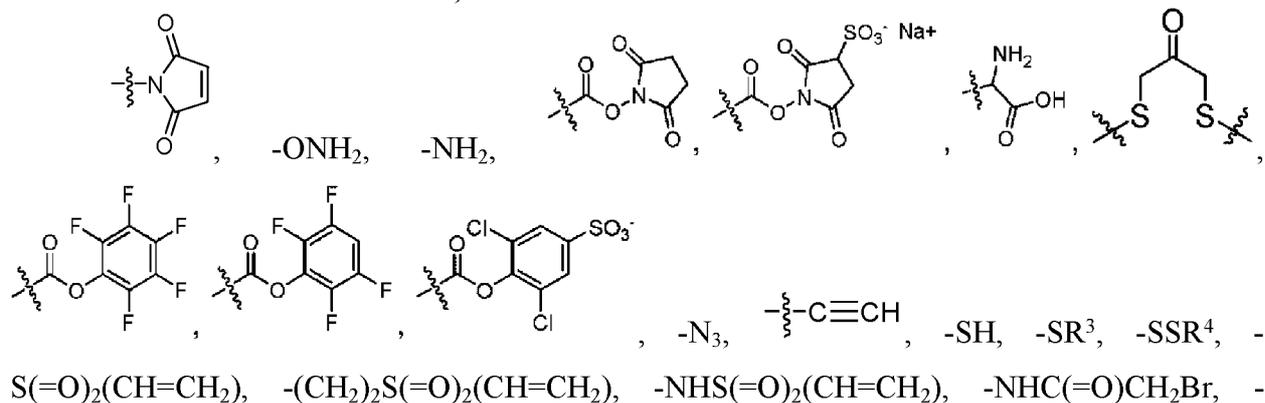
W является -CH₂-, -CH₂O-, -CH₂N(R^b)C(=O)O-, -NHC(=O)C(R^b)₂NHC(=O)O-, -NHC(=O)C(R^b)₂NH-, -NHC(=O)C(R^b)₂NHC(=O)-, -CH₂N(X-R²)C(=O)O-, -C(=O)N(X-R²)-, -CH₂N(X-R²)C(=O)-, -C(=O)NR^b-, -C(=O)NH-, -CH₂NR^bC(=O)-, -CH₂NR^bC(=O)NH-, -CH₂NR^bC(=O)NR^b-, -NHC(=O)-, -NHC(=O)O-, -NHC(=O)NH-, -OC(=O)NH-, -S(O)₂NH-, -NHS(O)₂-, -C(=O)-, -C(=O)O- или -NH-, где каждый R^b независимо выбран из H, C₁-C₆алкила и C₃-C₈ циклоалкила; и

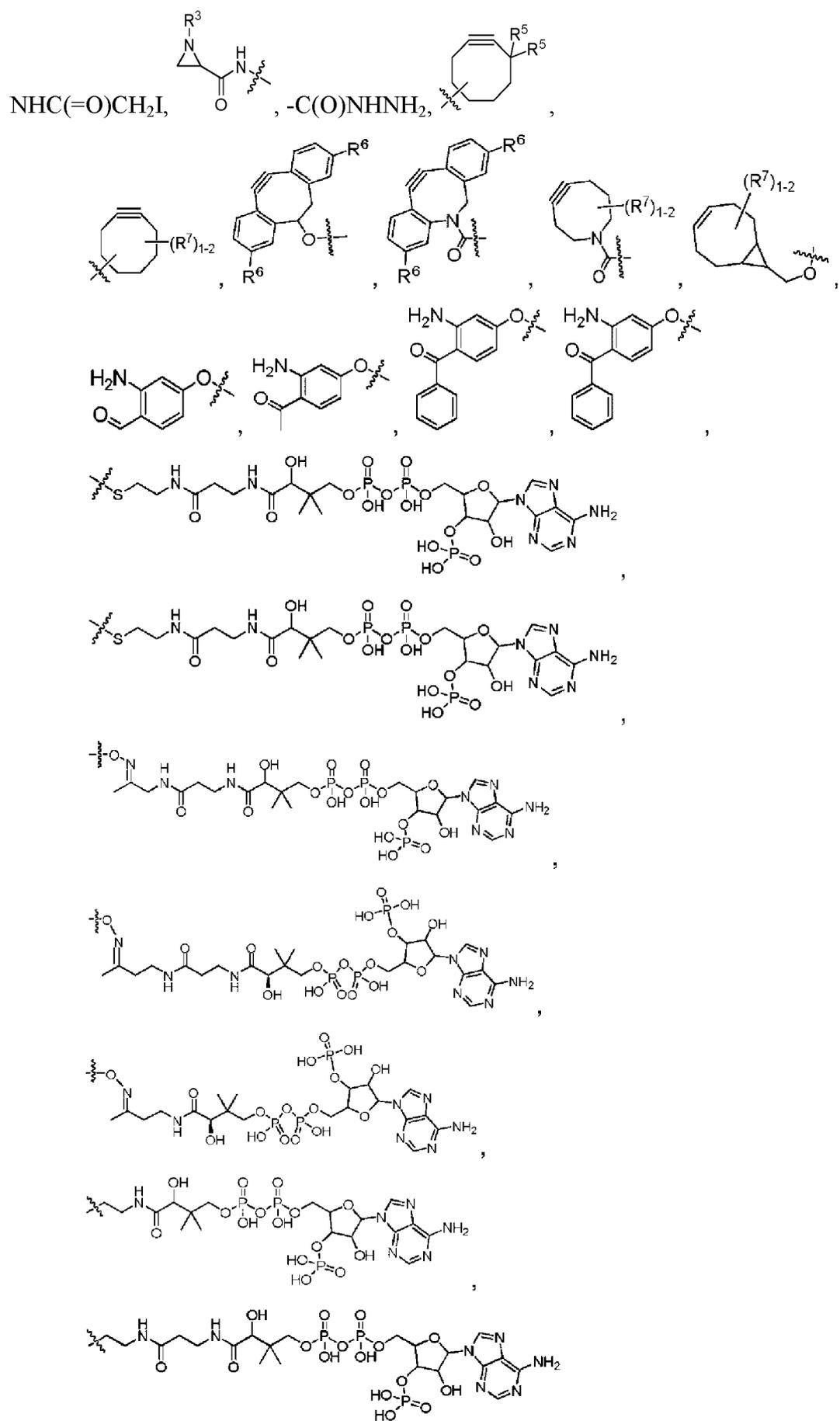
X является $-\text{CH}_2\text{-триазалил-}\text{C}_{1-4}\text{-алкилен-OC(O)NHS(O)}_2\text{NH-}$, $-\text{C}_{4-6}\text{-циклоалкилен-OC(O)NHS(O)}_2\text{NH-}$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{NH-}$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{NH-}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-}$ или $-\text{CH}_2\text{-триазалил-}\text{C}_{1-4}\text{-алкилен-OC(O)NHS(O)}_2\text{NH-}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-}$, где каждый n независимо равен 1, 2 или 3.

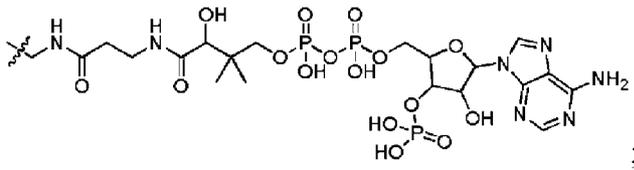
В некоторых вариантах осуществления группа присоединения образуется реакцией, включающей, по меньшей мере, одну реакционноспособную группу. В некоторых случаях, группа присоединения образуется путем реакции: первой реакционноспособной группы, которая присоединена к линкеру, и второй реакционноспособной группы, которая присоединена к антителу или является аминокислотным остатком антитела.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна из реакционноспособных групп содержит:

тиол,
 малеимид,
 галоацетамид,
 азид,
 алкин,
 циклооктен,
 триарилфосфин,
 оксаноборнадиен,
 циклооктин,
 диарилтетразин,
 моноарилтетразин,
 норборнен,
 альдегид,
 гидроксилламин,
 гидразин,
 $\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-}$,
 кетон,
 винилсульфон,
 азиридин,
 аминокислотный остаток,







где:

каждый R^3 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

каждый R^4 является 2-пиридилом или 4-пиридилом;

каждый R^5 независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^6 независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ и -OH;

каждый R^7 независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, фтора, бензилокси, замещенного $-C(=O)OH$, бензила, замещенного $-C(=O)OH$, C_{1-4} алкокси, замещенного $-C(=O)OH$ и C_{1-4} алкила, замещенного $-C(=O)OH$.

В некоторых вариантах осуществления, первая реакционноспособная группа и вторая реакционноспособная группа содержат:

тиол и малеимид,

тиол и галогенацетамид,

тиол и винилсульфон,

тиол и азиридин,

азид и алкин,

азид и циклооктин,

азид и циклооктен,

азид и триарилфосфин,

азид и оксаноборнадиен,

диарилтетразин и циклооктен,

моноарилтетразин и нонборнен,

альдегид и гидроксилламин,

альдегид и гидразин,

альдегид и $NH_2-NH-C(=O)-$,

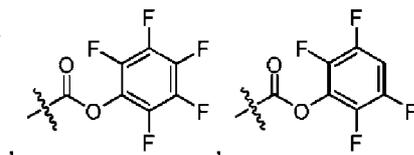
кетон и гидроксилламин,

кетон и гидразин,

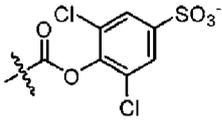
кетон и $NH_2-NH-C(=O)-$,

гидроксилламин и

амин и

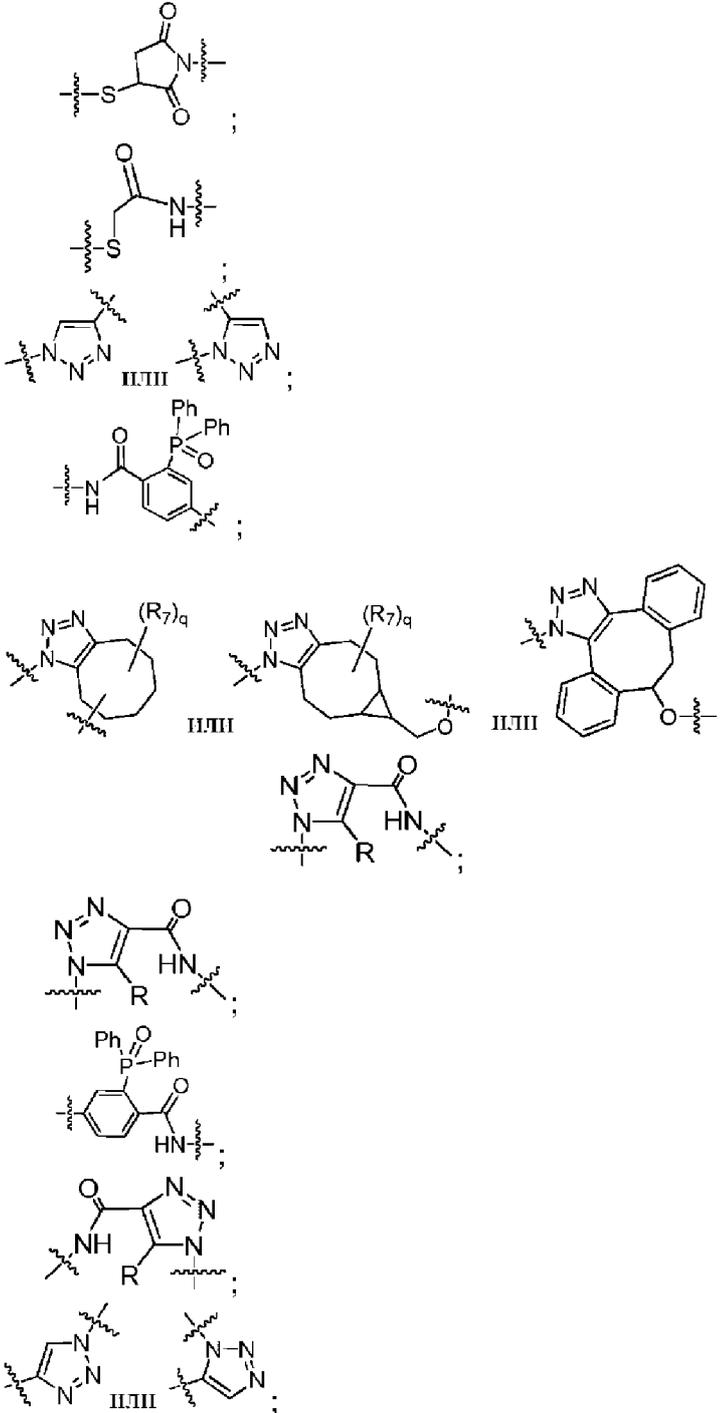


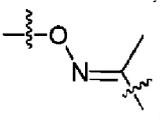
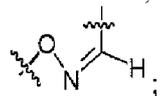
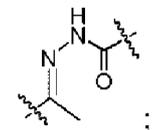
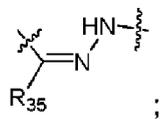
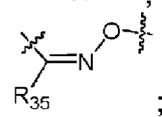
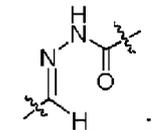
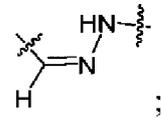
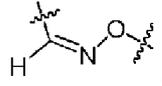
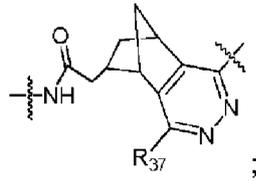
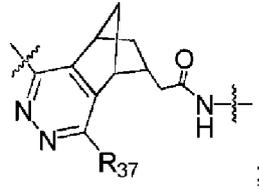
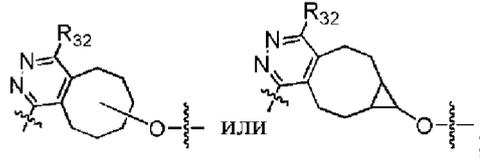
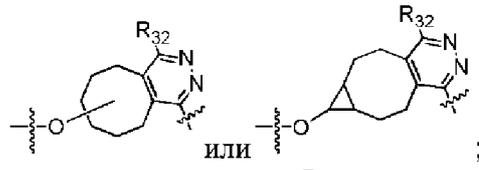
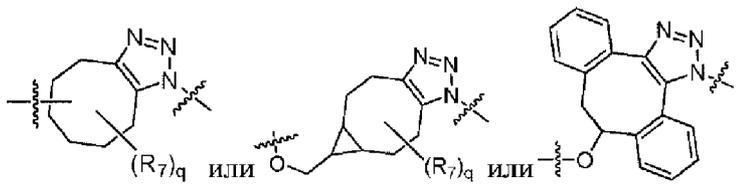
или

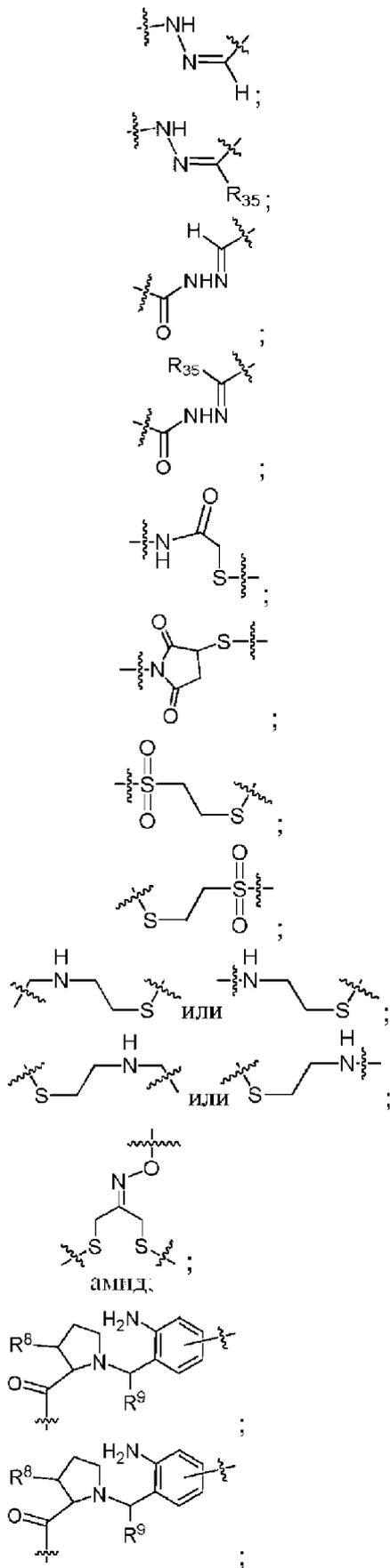


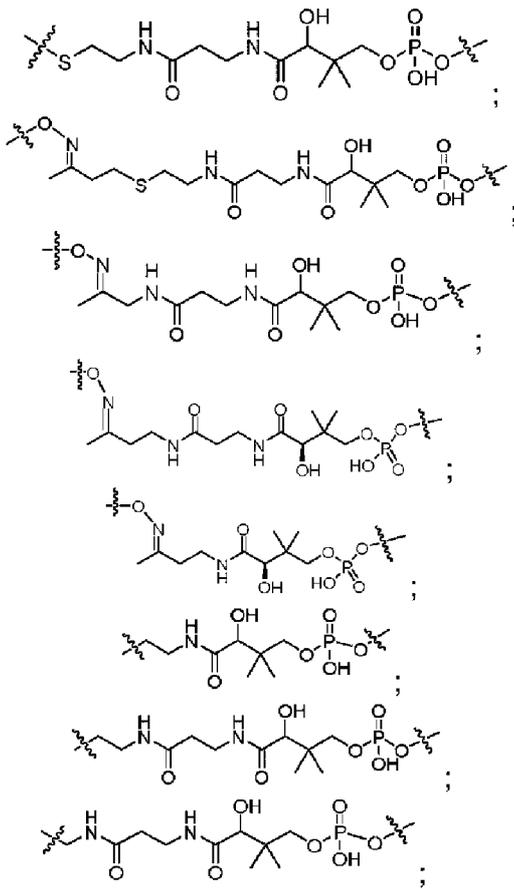
CoA или аналог CoA и сериновый остаток.

В некоторых вариантах осуществления, группа присоединения содержит группу, выбранную из:









дисульфид,

где:

R^{32} является H, C_{1-4} алкилом, фенилом, пиримидином или пиридином;

R^{35} является H, C_{1-6} алкилом, фенилом или C_{1-4} алкилом, замещенным 1-3 -ОН группами;

каждый R^7 независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)OH, бензила, замещенного -C(=O)OH, C_{1-4} алкокси, замещенного -C(=O)OH и C_{1-4} алкила, замещенного -C(=O)OH;

R^{37} независимо выбран из H, фенила и пиридина;

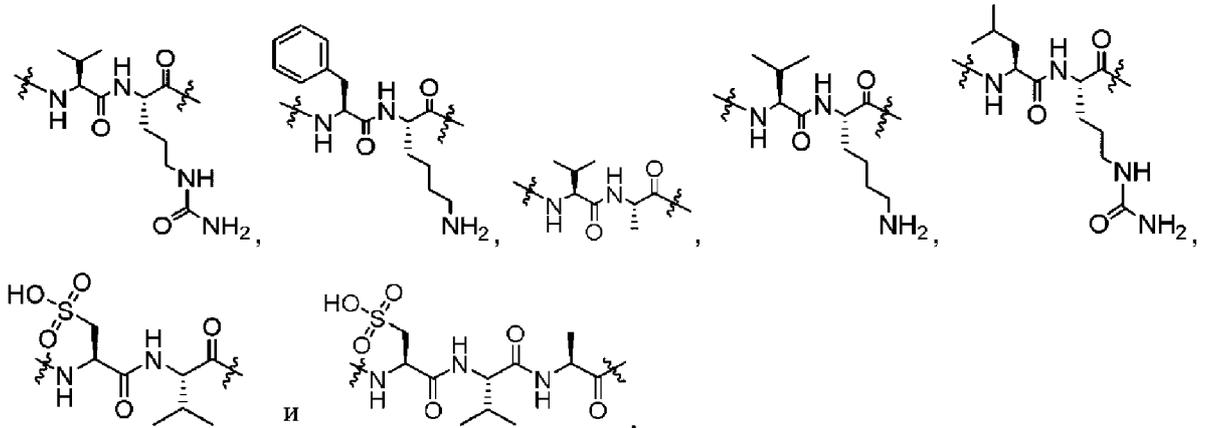
q равно 0, 1, 2 или 3;

R^8 является H или метилом; и

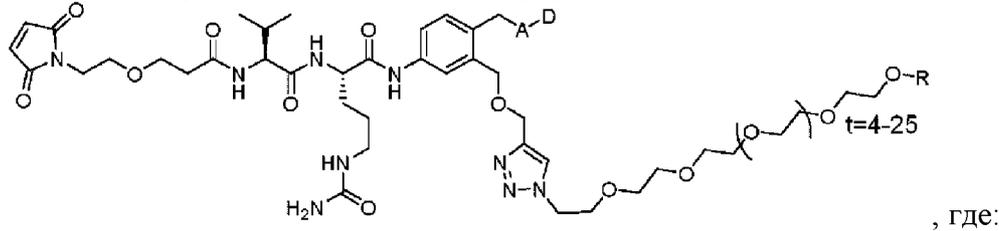
R^9 является H, -CH₃ или фенилом.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа (Lp) содержит 1-6 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа (Lp) содержит 1-4 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 1-3 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 1-2 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные остатки выбраны из L-глицина (Gly), L-валина (Val), L-цитруллина (Cit), L-цистеиновой кислоты (сульфо-Ala), L-лизина (Lys), L-изолейцина (Ile), L-фенилаланина (Phe), L-метионина (Met), L-аспарагина (Asn), L-пролина (Pro), L-аланина (Ala), L-лейцина (Leu), L-триптофана (Trp) и L-тирозина (Tyr). В некоторых вариантах

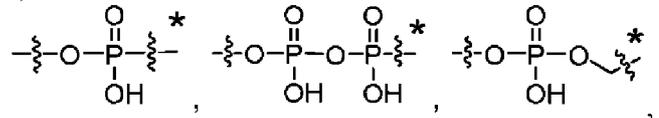
осуществления, пептидная группа содержит Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala, Val-Lys, Leu-Cit, сульфо-Ala-Val и/или сульфо-Ala-Val-Ala. В некоторых вариантах осуществления, Lp выбран из:



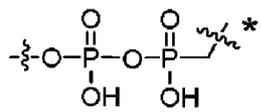
В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:



R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;



A является связью, -OC(=O)-*,



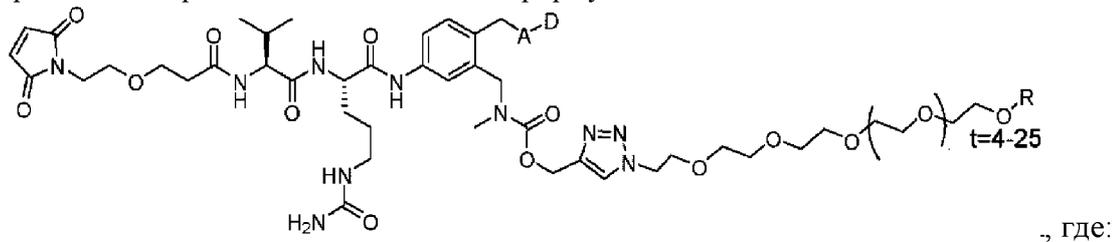
-OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-*

или

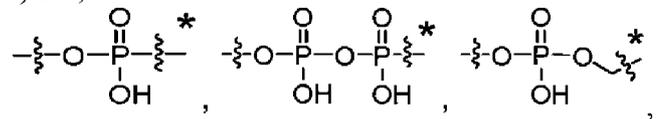
OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила и * из A означает точку присоединения D; и

D является ингибитором Mcl-1.

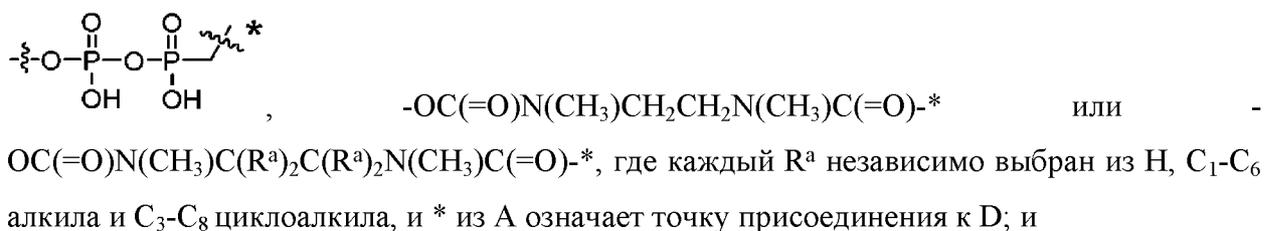
В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:



R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;

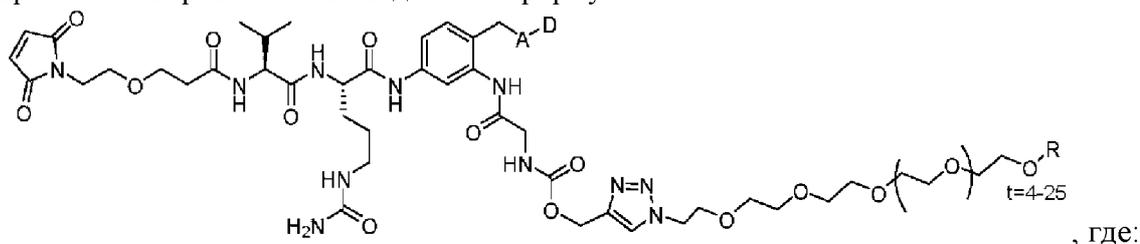


A является связью, -OC(=O)-*,

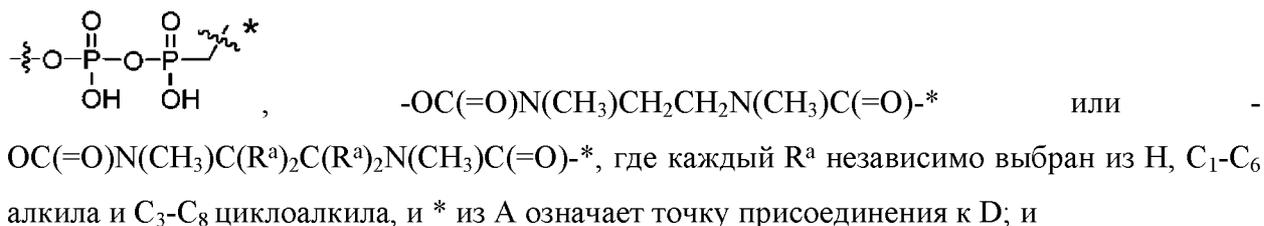
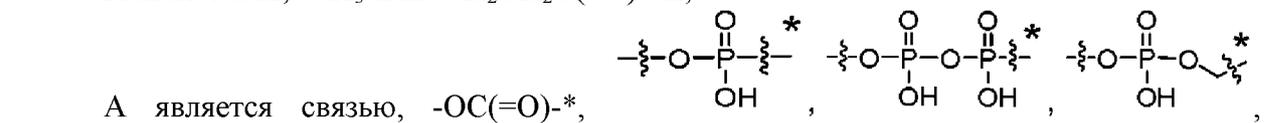


D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:

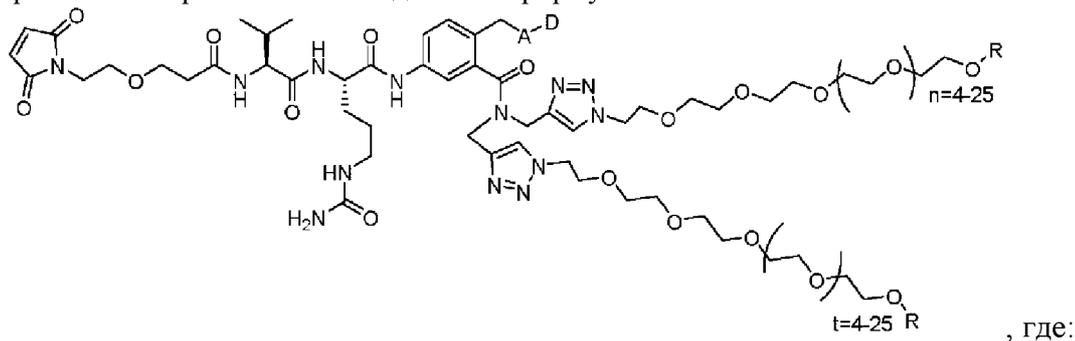


R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;

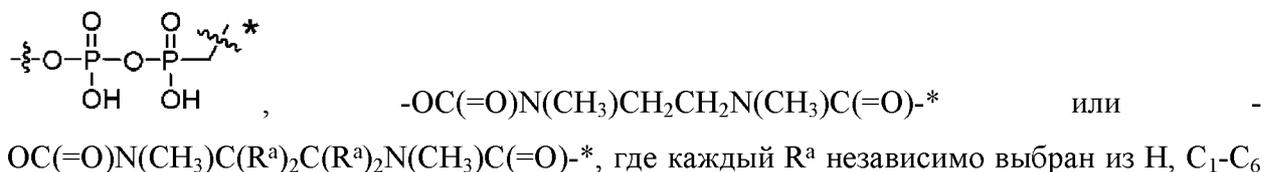
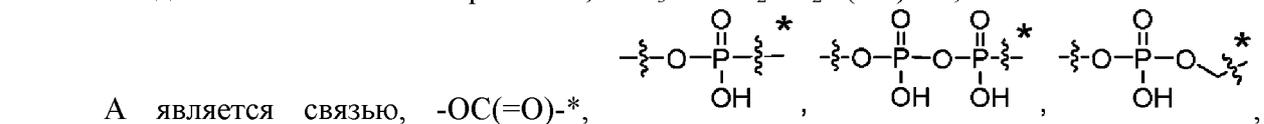


D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:



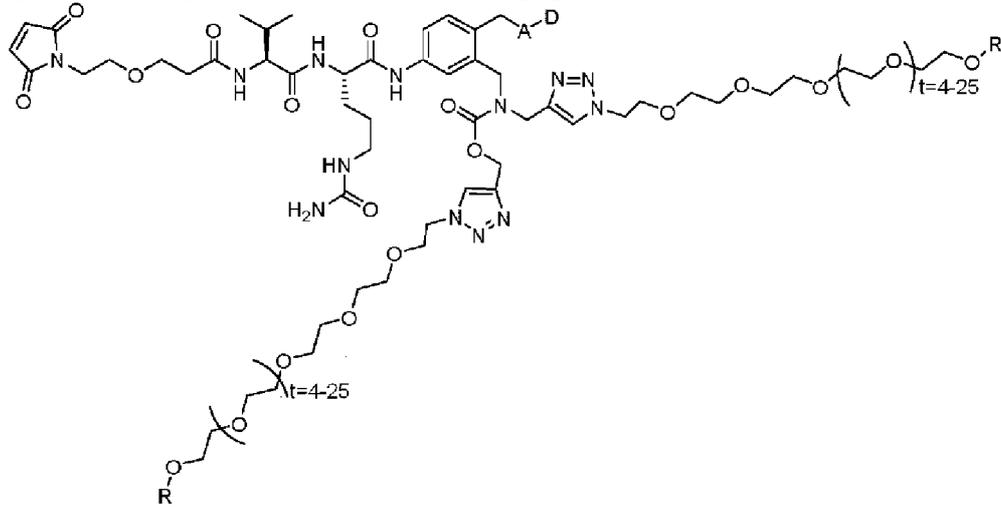
каждый R независимо выбран из H, -CH₃ и -CH₂CH₂C(=O)OH;



алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из А означает точку присоединения к D; и

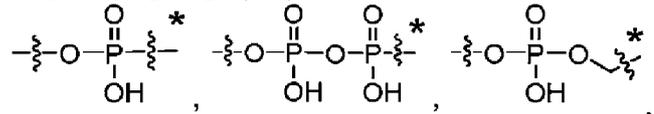
D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:

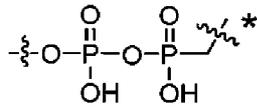


, где:

каждый R независимо выбран из H, -CH₃ и -CH₂CH₂C(=O)OH;



A является связью, -OC(=O)-*,



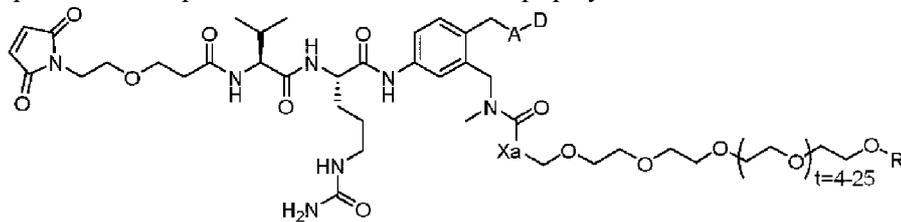
-OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-*

или

-OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из А означает точку присоединения к D; и

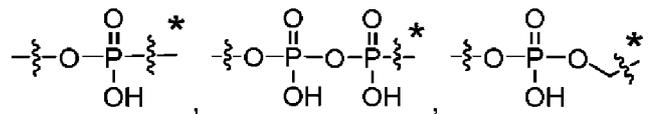
D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:

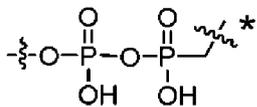


, где:

Xa является -CH₂-, -OCH₂-, -NHCH₂- или -NRCH₂- и каждый R независимо равен H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;



A является связью, -OC(=O)-*,



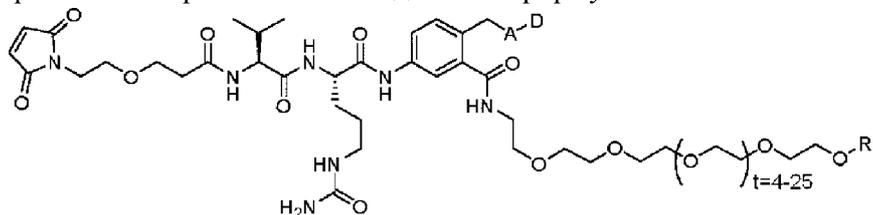
-OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-*

или

$OC(=O)N(CH_3)C(R^a)_2C(R^a)_2N(CH_3)C(=O)-*$, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D; и

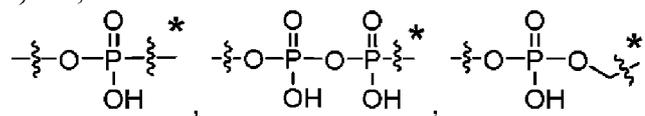
D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:

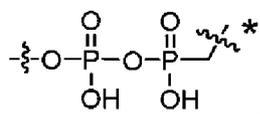


, где:

R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;



A является связью, -OC(=O)-*,



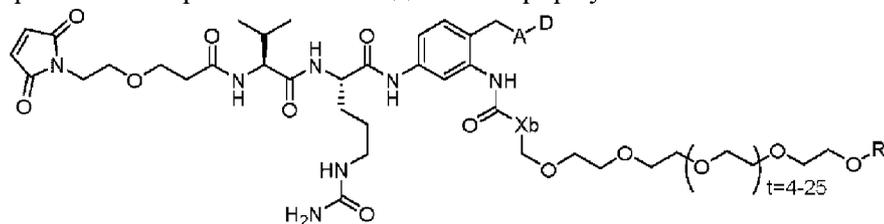
-OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-*

или

$OC(=O)N(CH_3)C(R^a)_2C(R^a)_2N(CH_3)C(=O)-*$, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D; и

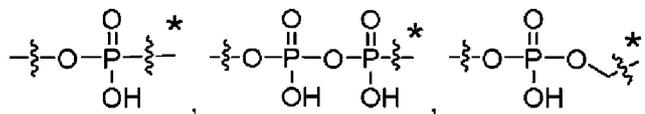
D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:

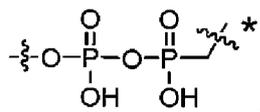


, где:

Xb является -CH₂-, -OCH₂-, -NHCH₂- или -NRCH₂-, и каждый R независимо равен H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;



A является связью, -OC(=O)-*,



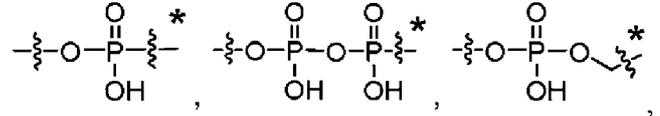
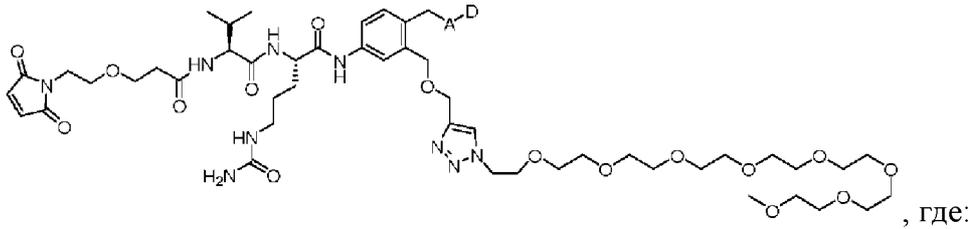
-OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-*

или

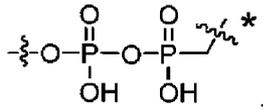
$OC(=O)N(CH_3)C(R^a)_2C(R^a)_2N(CH_3)C(=O)-*$, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:



A является связью, $-\text{OC}(=\text{O})-\ast$,



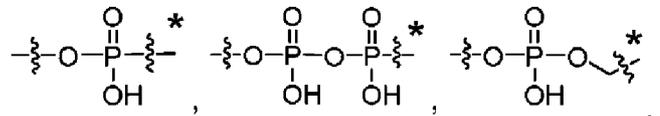
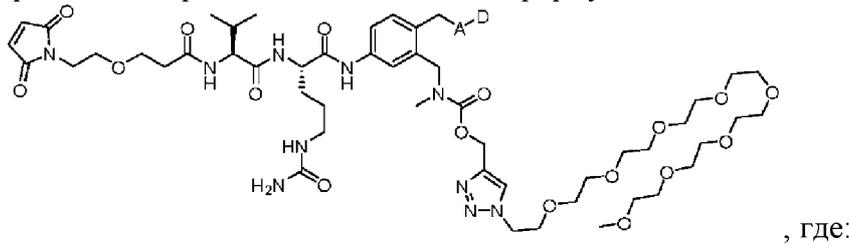
$-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\ast$

или

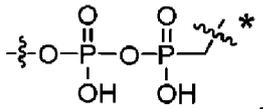
$\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\ast$, где каждый R^a независимо выбран из H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила и $\text{C}_3\text{-C}_8$ циклоалкила, и \ast из A означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:



A является связью, $-\text{OC}(=\text{O})-\ast$,



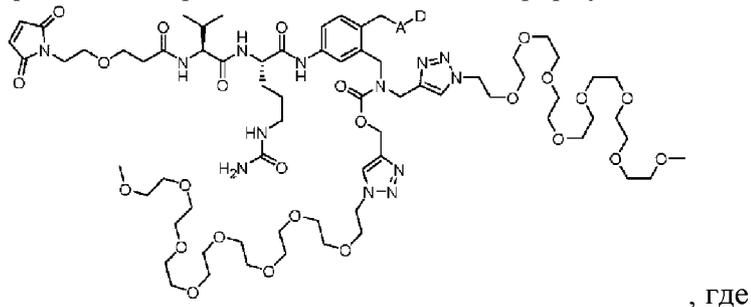
$-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\ast$

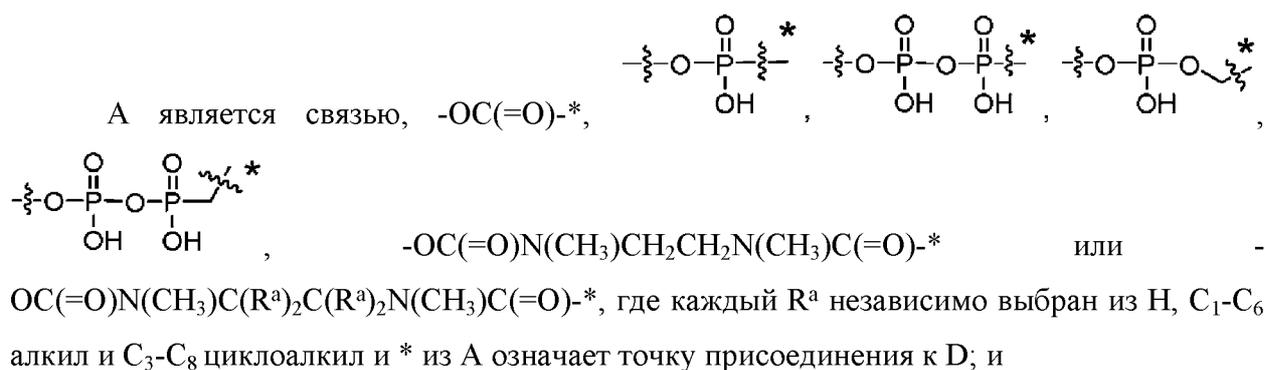
или

$\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\ast$, где каждый R^a независимо выбран из H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила и $\text{C}_3\text{-C}_8$ циклоалкила, и \ast из A означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1.

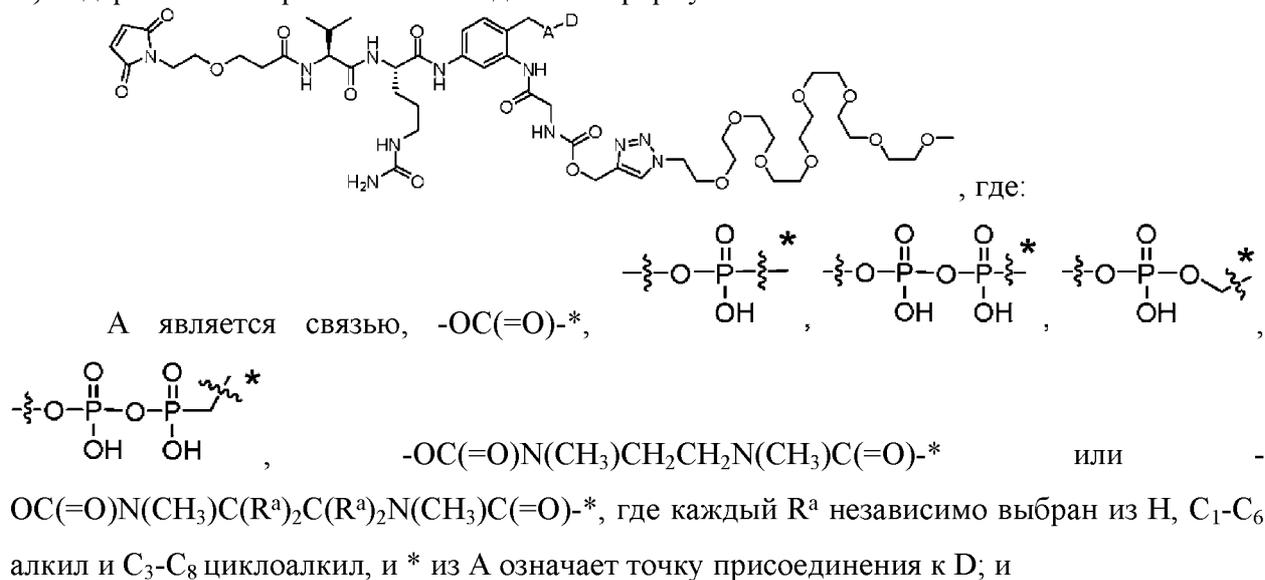
В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:





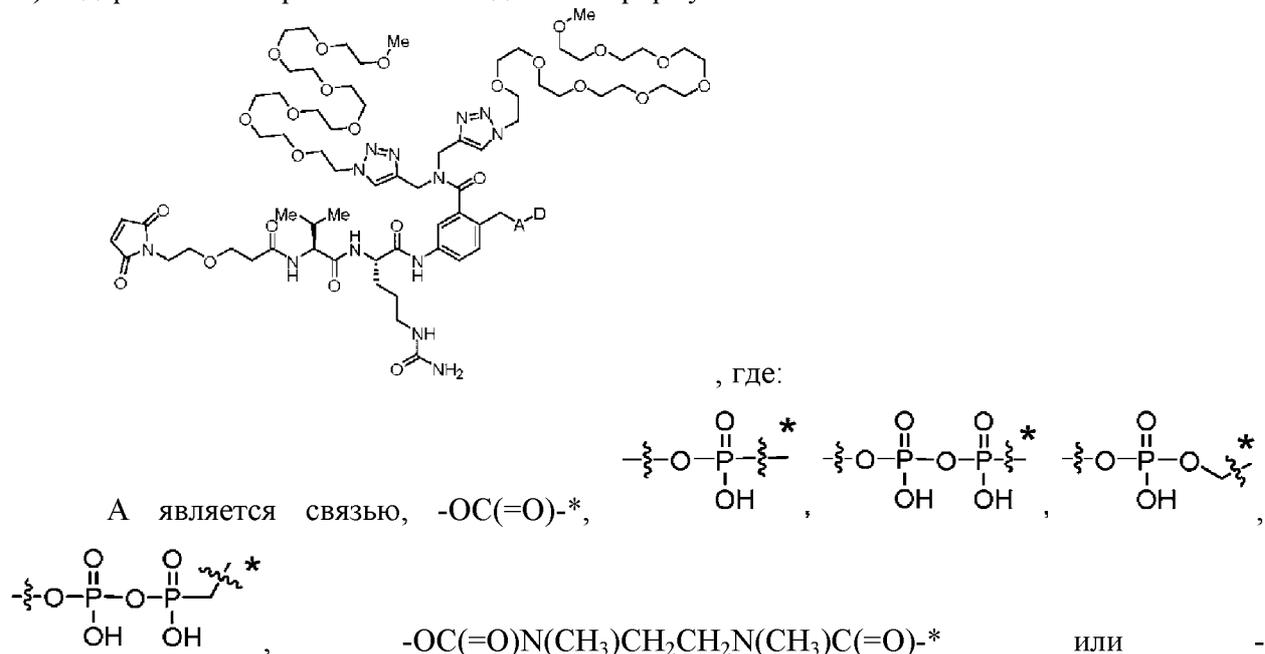
D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:



D является ингибитором Mcl-1.

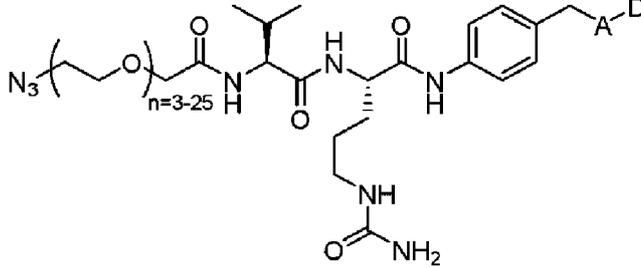
В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:



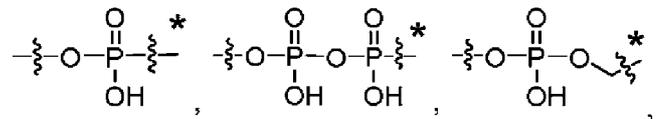
$\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\ast$, где каждый R^a независимо выбран из H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила и $\text{C}_3\text{-C}_8$ циклоалкила, и \ast из А означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1.

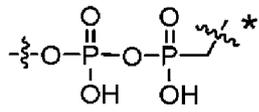
В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:



, где:



A является связью, $-\text{OC}(=\text{O})-\ast$,

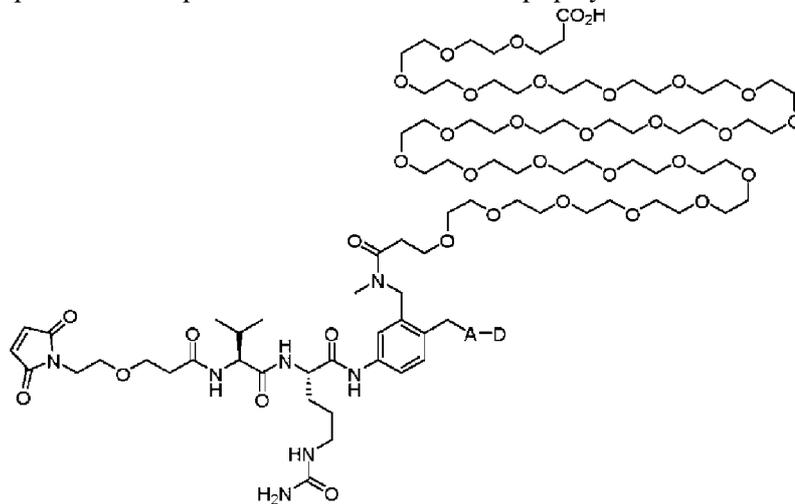


$-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\ast$ или

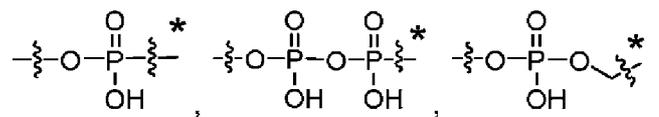
$\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\ast$, где каждый R^a независимо выбран из H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила и $\text{C}_3\text{-C}_8$ циклоалкила, и \ast из А означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1.

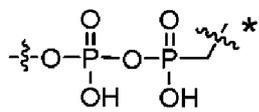
В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:



, где:



A является связью, $-\text{OC}(=\text{O})-\ast$,



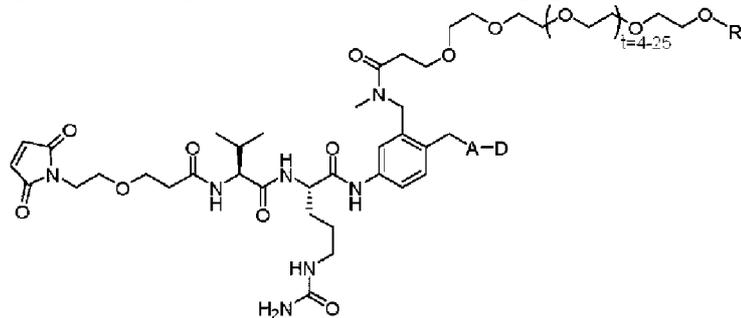
$-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\ast$ или

$\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\ast$, где каждый R^a независимо выбран из H , $\text{C}_1\text{-C}_6$

алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из А означает точку присоединения к D; и

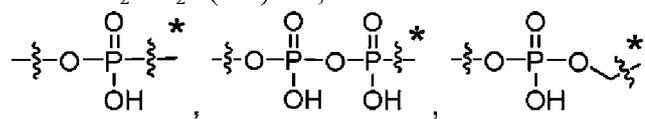
D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:

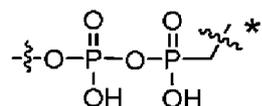


, где:

каждый R независимо равен H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;



A является связью, -OC(=O)-*,



-OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-*

или

OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*,

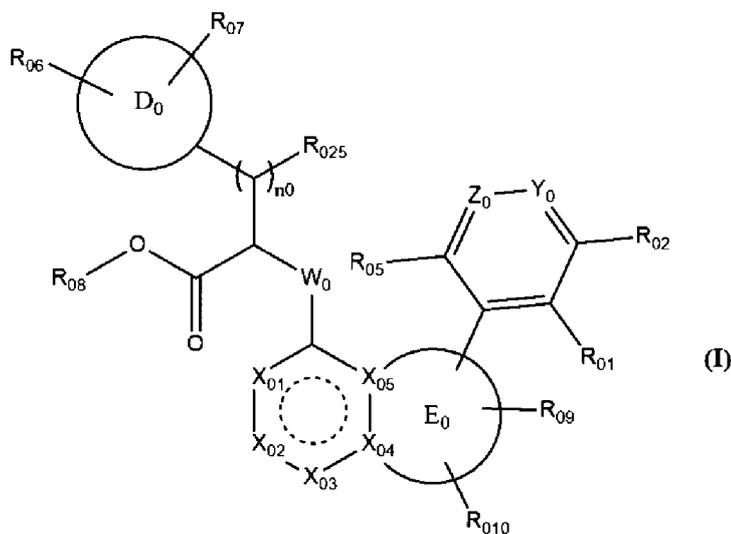
где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из А означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1.

В некоторых вариантах осуществления, А является связью.

В некоторых вариантах осуществления, R является -CH₃.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор Mcl-1 (D) содержит соединение формулы (I):



где:

Кольцо D_0 является циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой,

Кольцо E_0 является фурильным, тиенильным или пирролильным кольцом,

X_{01} , X_{03} , X_{04} и X_{05} независимо друг от друга являются атомом углерода или атомом азота,

X_{02} является $C-R_{026}$ группой или атомом азота,



означает, что кольцо является ароматическим,

Y_0 является атомом азота или $C-R_{03}$ группой,

Z_0 является атомом азота или $C-R_{04}$ группой,

R_{01} является атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)галоалкильной группой, гидроксигруппой, гидроксид(C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-Cu_{08}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{012} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

R_{02} , R_{03} , R_{04} и R_{05} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейным или разветвленным (C_1-C_6)галоалкилом, гидроксигруппой, гидроксид(C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-Cu_{01}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- Cu_{01} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- Cu_{01} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- Cu_{01} , $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{031} , $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{012} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

или пара (R_{01} , R_{02}), (R_{02} , R_{03}), (R_{03} , R_{04}) или (R_{04} , R_{05}) вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено 1 или 2 группами, выбранными из галогена, линейного или разветвленного (C_1-C_6)алкила, (C_0-C_6)алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{013}R_{013}'$, $-(C_0-C_6)$ алкил- Cu_{01} или оксо,

R_{06} и R_{07} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)галоалкил, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-Cu_{01}$, $-(C_0-$

C_6 алкил- Cy_{01} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- Cy_{01} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- Cy_{01} , $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{012} , $-C(O)-OR_{11}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{11}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

или пара (R_{06} , R_{07}), конденсированная с двумя соседними атомами углерода, вместе с атомами углерода, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой, $-NR_{013}R_{013}'$, $-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{01} или оксо,

W_0 является $-CH_2-$ группой, $-NH-$ группой или атомом кислорода,

R_{08} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_8) алкильной группой, $-CHR_{0a}R_{0b}$ группой, арильной группой, гетероарильной группой, арил (C_1-C_6) алкильной группой или гетероарил (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{09} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6) алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6) алкинильной группой, $-Cy_{02}$, $-(C_1-C_6)$ алкил- Cy_{02} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- Cy_{02} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- Cy_{02} , $-Cy_{02}-Cy_{03}$, $-(C_2-C_6)$ алкинил- $O-Cy_{02}$, $-Cy_{02}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{03} , атомом галогена, цианогруппой, $-C(O)-R_{014}$ или $-C(O)-NR_{014}R_{014}'$,

R_{010} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6) алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6) алкинильной группой, арил (C_1-C_6) алкильной группой, (C_1-C_6) циклоалкилалкильной группой, линейным или разветвленным (C_1-C_6) галоалкилом или $-(C_1-C_6)$ алкил- $O-Cy_{04}$,

или пара (R_{09} , R_{010}), сконденсированная с двумя соседними атомами углерода, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N,

R_{011} и R_{011}' независимо друг от друга, являются атомом водорода, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой или $-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{01} ,

или пара (R_{011} , R_{011}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где атом азота может быть замещен 1 или 2 группами, выбранными из атома водорода и линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группы, и где один или несколько атомов углерода линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группы необязательно дейтерированы,

R_{012} является $-Cy_{05}$, $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-Cy_{06}-O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{07} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} , $-NH-C(O)-NH-R_{011}$, $-Cy_{05}-(C_0-$

C_6)алкил- NR_{011} -(C_0 - C_6)алкил- Cy_{09} , $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}R_{011}'$, $-OR_{011}$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- OR_{011} , $-SO_2-R_{011}$ и $-C(O)-OR_{011}$,

R_{013} , R_{013}' , R_{014} и R_{014}' независимо друг от друга являются атомом водорода или необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой,

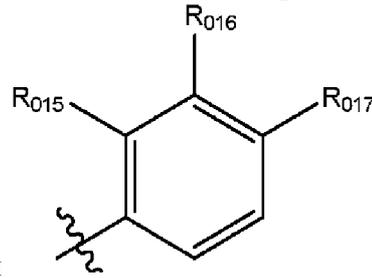
R_{0a} является атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой,

R_{0b} является $-O-C(O)-O-R_{0c}$ группой, $-O-C(O)-NR_{0c}R_{0c}'$ группой или $-O-P(O)(OR_{0c})_2$ группой,

R_{0c} и R_{0c}' независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1 - C_8)алкильной группой, циклоалкильной группой, (C_1 - C_6)алкокси(C_1 - C_6)алкильной группой или (C_1 - C_6)алкоксикарбонил(C_1 - C_6)алкильной группой,

или пара (R_{0c} , R_{0c}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют не ароматическое кольцо, состоящее из 5-7 членов кольца, которое может содержать, в дополнение в атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из кислорода и азота, где азот необязательно замещен линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой,

Cy_{01} , Cy_{02} , Cy_{03} , Cy_{04} , Cy_{05} , Cy_{06} , Cy_{07} , Cy_{08} и Cy_{010} независимо друг от друга, являются циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой, каждая из которых необязательно замещена,



Cy_{09} является

или Cy_{09} является гетероарильной группой, которая замещена группой, выбранной из $-O-P(O)(OR_{020})_2$; $-O-P(O)(O^+M^+)_2$; $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$; гидрокси; гидрокси(C_1 - C_6)алкила; $-(CH_2)_{r0}-U_0-(CH_2)_{s0}$ -гетероциклоалкила; и $-U_0-(CH_2)_{q0}-NR_{021}R_{021}'$,

R_{015} является атомом водорода; $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$ группой; линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкокси(C_1 - C_6)алкильной группой; $-U_0-(CH_2)_{q0}-NR_{021}R_{021}'$ группой; или $-(CH_2)_{r0}-U_0-(CH_2)_{s0}$ -гетероциклоалкильной группой,

R_{016} является атомом водорода; гидроксигруппой; гидрокси(C_1 - C_6)алкильной группой; $-(CH_2)_{r0}-U_0-(CH_2)_{s0}$ -гетероциклоалкильной группой; $(CH_2)_{r0}-U_0-V_0-O-P(O)(OR_{020})_2$ группой; $-O-P(O)(O^+M^+)_2$ группой; $-O-S(O)_2OR_{020}$ группой; $-S(O)_2OR_{020}$ группой; $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$ группой; $-(CH_2)_{p0}-O-C(O)-NR_{022}R_{023}$ группой; или $-U_0-(CH_2)_{q0}-NR_{021}R_{021}'$ группой,

R_{017} является атомом водорода; $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$ группой; $-CH_2-P(O)(OR_{020})_2$ группой; $-O-P(O)(OR_{020})_2$ группой; $-O-P(O)(O^+M^+)_2$ группой; гидроксигруппой; гидрокси(C_1 - C_6)алкильной группой; $-(CH_2)_{r0}-U_0-(CH_2)_{s0}$ -гетероциклоалкильной группой; $-U_0-(CH_2)_{q0}-NR_{021}R_{021}'$ группой; или алдоновой кислотой,

M^+ является фармацевтически приемлемым одновалентным катионом,

U_0 является связью или атомом кислорода,

V_0 является $-(CH_2)_{s0}$ - группой или $-C(O)$ - группой,

R_{018} является атомом водорода или (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{019} является атомом водорода или гидрокси (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{020} является атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{021} и R_{021}' независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой или гидрокси (C_1-C_6) алкильной группой,

или пара (R_{021}, R_{021}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{022} является (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкильной группой, $-(CH_2)_{p0}-NR_{024}R_{024}'$ группой или $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$ группой,

R_{023} является атомом водорода или (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкильной группой,

или пара (R_{022}, R_{023}) вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-18 членов кольца, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-5 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой или гетероциклоалкильной группой,

R_{024} и R_{024}' независимо друг от друга являются атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой,

или пара (R_{024}, R_{024}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, состоящее из 5-7 членов кольца, которое может содержать, в дополнение в атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N и где полученное кольцо необязательно замещено атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{025} является атомом водорода, гидроксигруппой или гидрокси (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{026} является атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой или цианогруппой,

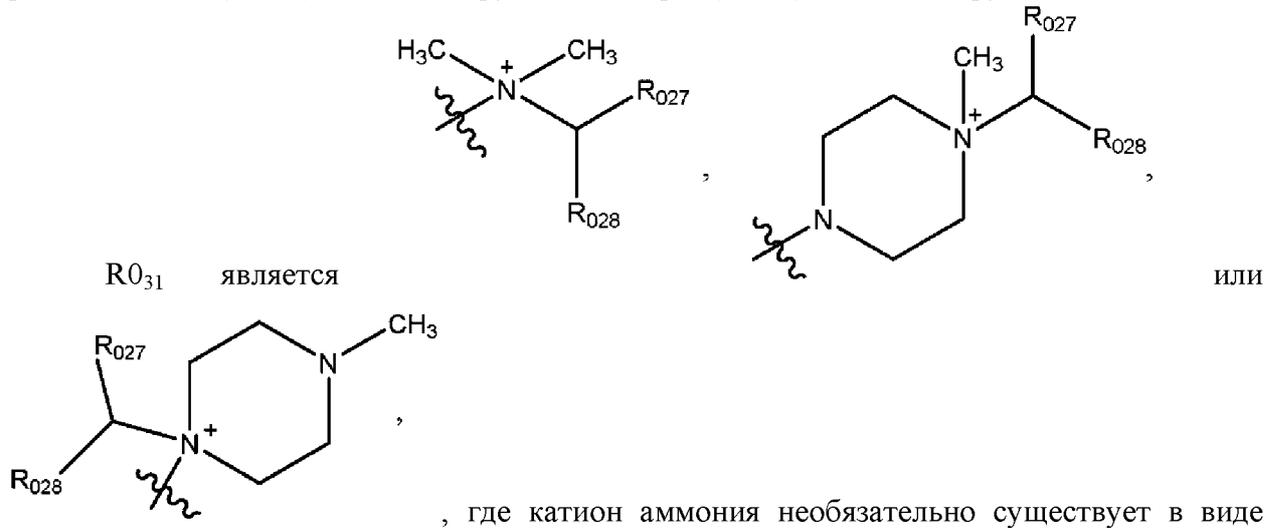
R_{027} является атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{028} является $-O-P(O)(O^{\cdot})(O^{\cdot})$ группой, $-O-P(O)(O^{\cdot})(OR_{030})$ группой, $-O-P(O)(OR_{030})(OR_{030}')$ группой, $-(CH_2)_{p0}-O-SO_2-O-$ группой, $-(CH_2)_{p0}-SO_2-O-$ группой, $-(CH_2)_{p0}-O-SO_2-OR_{030}$ группой, $-Cy_{010}$, $-(CH_2)_{p0}-SO_2-OR_{030}$ группой, $-O-C(O)-R_{029}$ группой, $-O-C(O)-OR_{029}$ группой или $-O-C(O)-NR_{029}R_{029}'$ группой;

R_{029} и R_{029}' независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой или линейной или разветвленной амино $(C_1-$

C₆)алкильной группой,

R₀₃₀ и R_{030'} независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или разветвленной (C₁-C₆)алкильной группой или арил(C₁-C₆)алкильной группой,



цвиттерионной формы или имеет одновалентный анионный противоион,

p₀ является целым числом, равным 0 или 1,

r₀ является целым числом, равным 0, 1, 2 или 3,

q₀ является целым числом, равным 1, 2, 3 или 4,

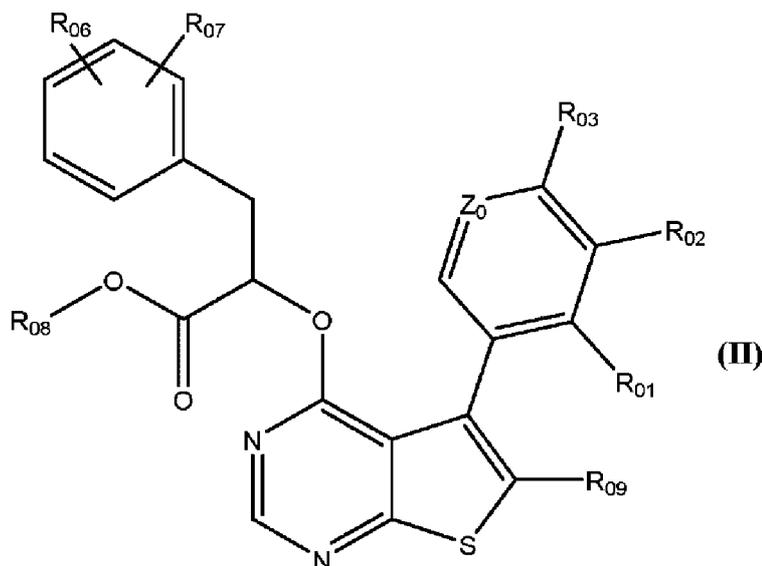
г₀ и s₀ независимо являются целым числом, равным 0 или 1;

где, как максимум, одна из R₀₃, R₀₉ или R₀₁₂ групп, если присутствуют, ковалентно присоединены к линкеру, и где валентность атома не превышает посредством одного или нескольких заместителей, связанных с ним,

или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, C_{y01}, C_{y02}, C_{y03}, C_{y04}, C_{y05}, C_{y06}, C_{y07}, C_{y08} и C_{y010}, независимо друг от друга, является циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой, каждая из которых необязательно замещена одной или несколькими группами, выбранными из галогена; -(C₁-C₆)алкокси; -(C₁-C₆)галоалкила; -(C₁-C₆)галоалкокси; -(CH₂)_{p0}-O-SO₂-OR₀₃₀; -(CH₂)_{p0}-SO₂-OR₀₃₀; -O-P(O)(OR₀₂₀)₂; -O-P(O)(O⁻M⁺)₂; -CH₂-P(O)(OR₀₂₀)₂; -(CH₂)_{p0}-O-(CHR₀₁₈-CHR₀₁₉-O)_{q0}-R₀₂₀; гидроксид; гидроксид(C₁-C₆)алкила; -(CH₂)_{r0}-U₀-(CH₂)_{s0}-гетероциклоалкила; или -U₀-(CH₂)_{q0}-NR₀₂₁R_{021'}.

В некоторых вариантах осуществления, D содержит соединение формулы (II):



где:

Z_0 является атомом азота или $C-R_{04}$ группой,

R_{01} является атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)галоалкильной группой, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, $-C_{y08}$, $-NR_{011}R_{011}'$,

R_{02} , R_{03} и R_{04} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)галоалкил, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алокси группой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-C_{y01}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- C_{y01} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- C_{y01} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- C_{y01} , $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{031} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

или пара (R_{02} , R_{03}) или (R_{03} , R_{04}) вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где кольцо необязательно замещено группой, выбранной из линейного или разветвленного (C_1-C_6)алкила, $-NR_{013}R_{013}'$, $-(C_0-C_6)$ алкил- C_{y01} и оксо,

R_{06} и R_{07} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)галоалкил, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алокси группой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-C_{y01}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- C_{y01} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- C_{y01} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- C_{y01} , $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{012} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, -

$\text{NR}_{011}\text{-C(O)-R}_{011}$ ', $\text{-NR}_{011}\text{-C(O)-OR}_{011}$ ', $\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкил-NR}_{011}\text{-C(O)-R}_{011}$ ', $\text{-SO}_2\text{-NR}_{011}\text{R}_{011}$ ' или $\text{SO}_2\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкилом}$,

или пара (R_{06} , R_{07}), конденсированные с двумя соседними атомами углерода, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, и где полученное кольцо необязательно замещено группой, выбранной из линейной или разветвленной ($\text{C}_1\text{-C}_6$)алкильной группы, $\text{-NR}_{013}\text{R}_{013}$ ', $\text{-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-Cy}_{01}$ и оксо,

R_{08} является атомом водорода, линейной или разветвленной ($\text{C}_1\text{-C}_8$)алкильной группой, арильной группой, гетероарильной группой, арил-($\text{C}_1\text{-C}_6$)алкилгруппой или гетероарил($\text{C}_1\text{-C}_6$)алкильной группой,

R_{09} является линейной или разветвленной ($\text{C}_1\text{-C}_6$)алкильной группой, линейной или разветвленной ($\text{C}_2\text{-C}_6$)алкенильной группой, линейной или разветвленной ($\text{C}_2\text{-C}_6$)алкинильной группой, -Cy_{02} , $\text{-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкил-Cy}_{02}$, $\text{-(C}_2\text{-C}_6\text{)алкенил-Cy}_{02}$, $\text{-(C}_2\text{-C}_6\text{)алкинил-Cy}_{02}$, $\text{-Cy}_{02}\text{-Cy}_{03}$, $\text{-(C}_2\text{-C}_6\text{)алкинил-O-Cy}_{02}$, $\text{-Cy}_{02}\text{-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-O-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-Cy}_{03}$, атомом галогена, цианогруппой, -C(O)-R_{014} , $\text{-C(O)-NR}_{014}\text{R}_{014}$ ',

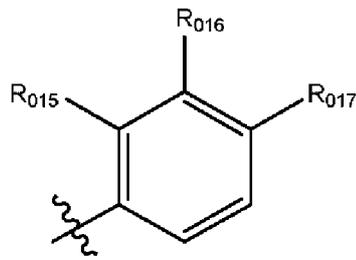
R_{011} и R_{011} ' независимо друг от друга являются атомом водорода, необязательно замещенной линейной или разветвленной ($\text{C}_1\text{-C}_6$)алкильной группой или $\text{-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-Cy}_{01}$,

или пара (R_{011} , R_{011} ') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где атом N необязательно замещен линейной или разветвленной ($\text{C}_1\text{-C}_6$)алкильной группой и где один или несколько атомов углерода линейной или разветвленной ($\text{C}_1\text{-C}_6$)алкильной группы необязательно дейтерированы,

R_{012} является -Cy_{05} , $\text{-Cy}_{05}\text{-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-Cy}_{06}$, $\text{-Cy}_{05}\text{-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-O-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-Cy}_{06}$, $\text{-Cy}_{05}\text{-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-NR}_{011}\text{-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-Cy}_{06}$, $\text{-Cy}_{05}\text{-Cy}_{06}\text{-O-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-Cy}_{07}$, $\text{-Cy}_{05}\text{-(C}_0\text{-C}_6\text{)алкил-Cy}_{09}$, $\text{-NH-C(O)-NH-R}_{011}$, $\text{-C(O)-NR}_{011}\text{R}_{011}$ ', $\text{-NR}_{011}\text{R}_{011}$ ', -OR_{011} , $\text{-NR}_{011}\text{-C(O)-R}_{011}$ ', $\text{-O-(C}_1\text{-C}_6\text{)алкил-OR}_{011}$, $\text{-SO}_2\text{-R}_{011}$ или -C(O)-OR_{011} ,

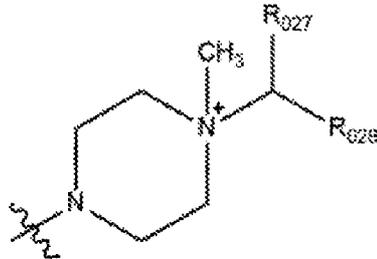
R_{013} , R_{013} ', R_{014} и R_{014} ' независимо друг от друга являются атомом водорода или необязательно замещенной линейной или разветвленной ($\text{C}_1\text{-C}_6$)алкильной группой,

Cy_{01} , Cy_{02} , Cy_{03} , Cy_{05} , Cy_{06} , Cy_{07} и Cy_{08} независимо друг от друга, являются необязательно замещенной циклоалкильной группой, необязательно замещенной гетероциклоалкильной группой, необязательно замещенной арильной группой или необязательно замещенной гетероарильной группой,



S_{y09} является
для формулы (I),

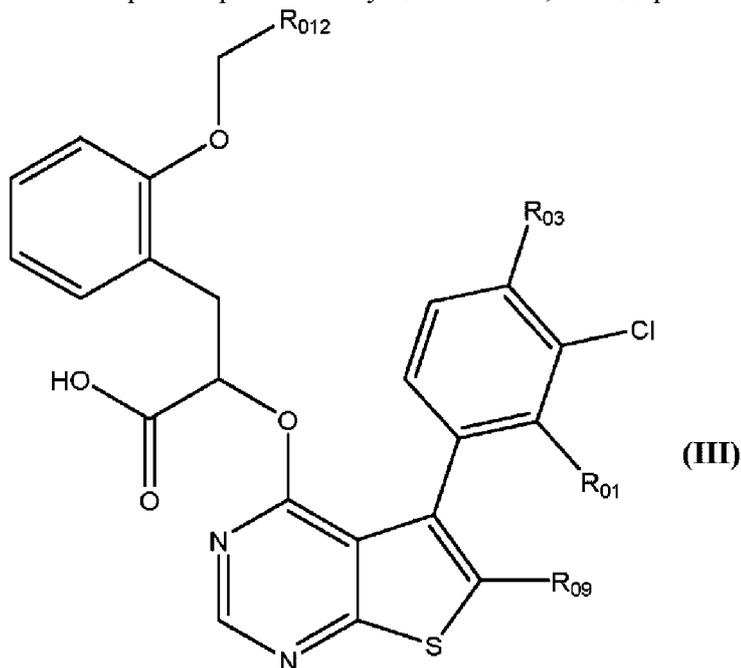
, где R_{015} , R_{016} и R_{017} такие, как определены



R_{031} является , где R_{027} и R_{028} такие, как определены для формулы (I), где, как максимум, одна из R_{03} , R_{09} или R_{012} групп, если присутствует, ковалентно присоединена к линкеру,

или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, D содержит соединение формулы (III):

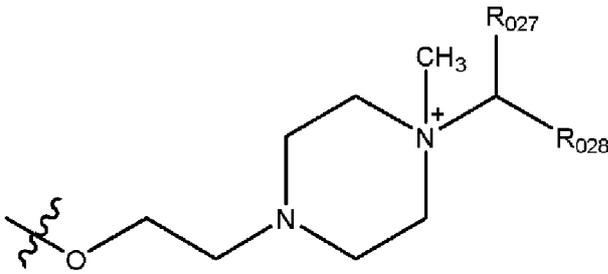


где:

R_{01} является линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой,

R_{03} является $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$

или



где R_{011} и R_{011}' независимо друг от друга являются атомом водорода, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или $-(C_0-C_6)$ алкил- Su_{01} ;

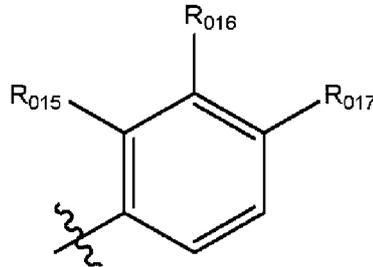
или пара (R_{011}, R_{011}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где атом N может быть замещен 1 или 2 группами, выбранными из атома водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

и где R_{027} является атомом водорода и R_{028} является $-(CH_2)_{p0}-O-SO_2-O-$ группой или $-(CH_2)_{p0}-SO_2-OR_{030}$ группой,

R_{09} является линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкильной группой или $-Su_{02}$,

R_{012} является $-Su_{05}$, $-Su_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Su_{06} или $-Su_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Su_{09} ,

Su_{01} , Su_{02} , Su_{05} и Su_{06} независимо друг от друга, являются циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой, каждый из которых необязательно замещен,



Su_{09} является

R_{015} , R_{016} и R_{017} такие, как определены для формулы (I),

где, как максимум, одна из R_{03} , R_{09} или R_{012} групп, если присутствуют, ковалентно присоединены к линкеру,

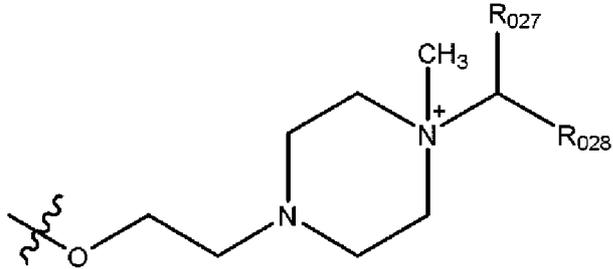
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, Su_{01} , Su_{02} , Su_{05} , Su_{06} , независимо друг от друга, являются циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой, каждая из которых необязательно замещена одной или несколькими группами, выбранными из галогена; $-(C_1-C_6)$ алкокси; $-(C_1-C_6)$ галоалкила; $-(C_1-C_6)$ галоалкокси; $-(CH_2)_{p0}-O-SO_2-OR_{030}$; $-(CH_2)_{p0}-SO_2-OR_{030}$; $-O-P(O)(OR_{020})_2$; $-O-P(O)(O^-M^+)_2$; $-CH_2-P(O)(OR_{020})_2$; $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$; гидроксид; гидроксид(C_1-C_6)алкила; $-(CH_2)_{r0}-U_0-(CH_2)_{s0}$ -гетероциклоалкила; или $-U_0-(CH_2)_{q0}-NR_{021}R_{021}'$.

В некоторых вариантах осуществления, R_{01} является метилом или этилом.

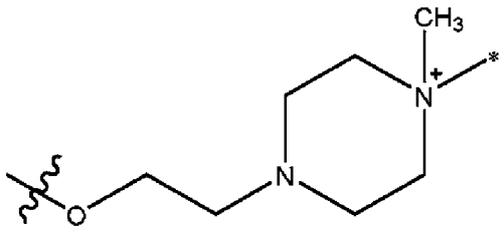
В некоторых вариантах осуществления, R_{03} является $-O-CH_2-CH_2-NR_{011}R_{011}'$ в котором R_{011} и R_{011}' образуют, вместе с атомом азота, несущим их, пиперазинильную группу, которая может быть замещена атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой.

В некоторых вариантах осуществления, R_{03} содержит формулу:



, где R_{027} является атомом водорода и R_{028} является $-(CH_2)_{p_0}-O-SO_2-OR_{030}$ группой, p_0 является целым числом, равным 0, 1, 2 или 3; и где R_{030} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или арил(C_1-C_6)алкильной группой.

В некоторых вариантах осуществления, R_{03} содержит формулу:



где —* является связью с линкером.

В некоторых вариантах осуществления, S_{y01} , S_{y02} , S_{y03} , S_{y04} , S_{y05} , S_{y06} , S_{y07} , S_{y08} и S_{y010} независимо друг от друга, являются необязательно замещенной циклоалкильной группой, необязательно замещенной гетероциклоалкильной группой, необязательно замещенной арильной группой или необязательно замещенной гетероарильной группой, где необязательные заместители выбирают из необязательно замещенного линейного или разветвленного (C_1-C_6)алкила, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группы, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группы, необязательно замещенного линейного или разветвленного (C_1-C_6)алкокси, необязательно замещенного (C_1-C_6)алкил-S-, гидрокси, оксо (или N-оксида, где применимо), нитро, циано, $-C(O)-OR_0'$, $-O-C(O)-R_0'$, $-C(O)-NR_0'R_0''$, $-NR_0'R_0''$, $-(C=NR_0')$ - OR_0'' , линейного или разветвленного (C_1-C_6) галоалкила, трифторметокси или галогена, где R_0' и R_0'' каждый независимо является атомом водорода или необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой и где один или несколько из атомов углерода линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группы необязательно дейтерированы.

В некоторых вариантах осуществления, R_{09} является S_{y02} группой, предпочтительно, арильной группой, более предпочтительно, фенильной группой. В некоторых вариантах осуществления, S_{y02} является необязательно замещенной арильной

группой.

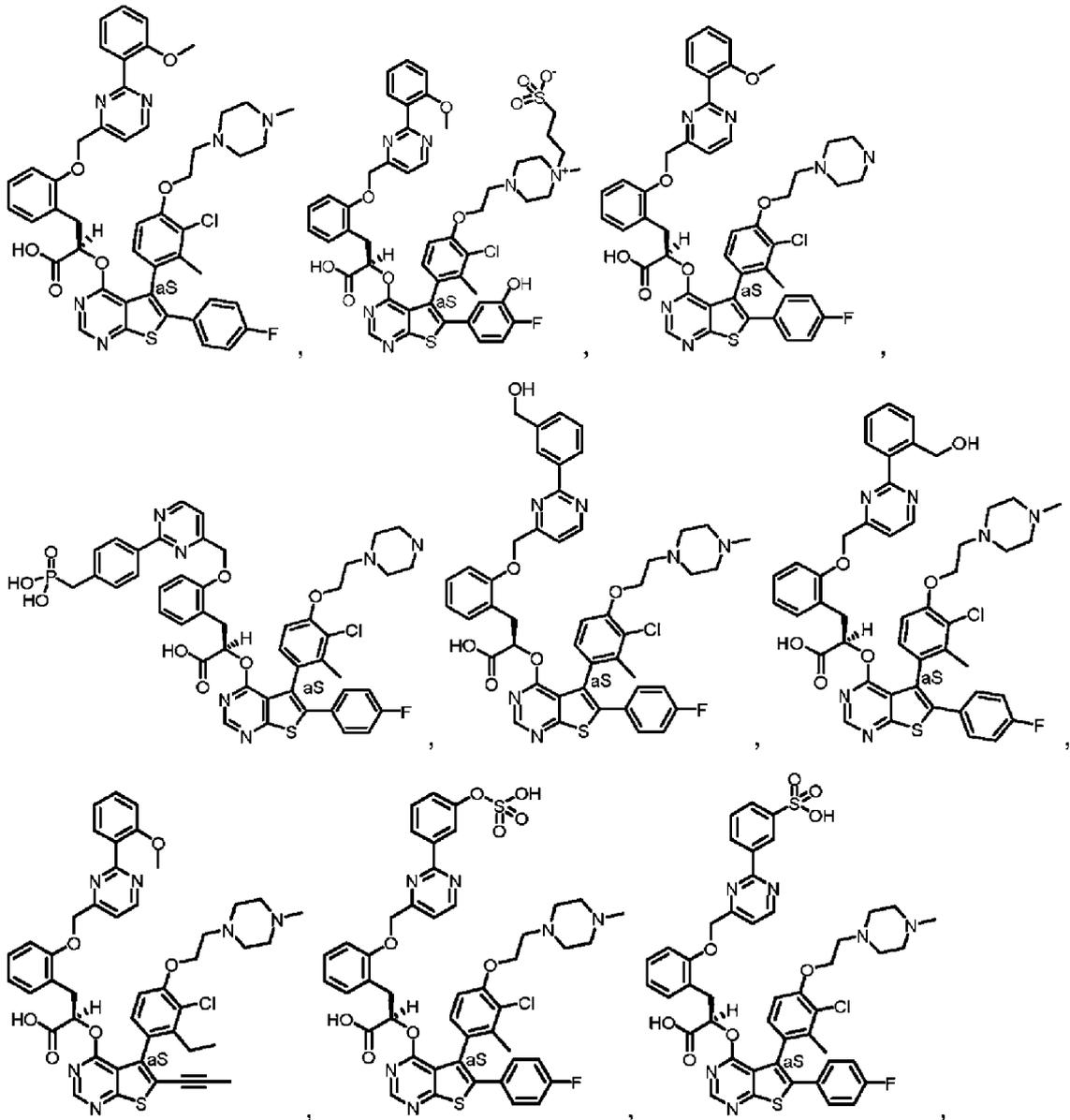
В некоторых вариантах осуществления, Su_{05} содержит гетероарильную группу, выбранную из пиразолильной группы и пиримидинильной группы.

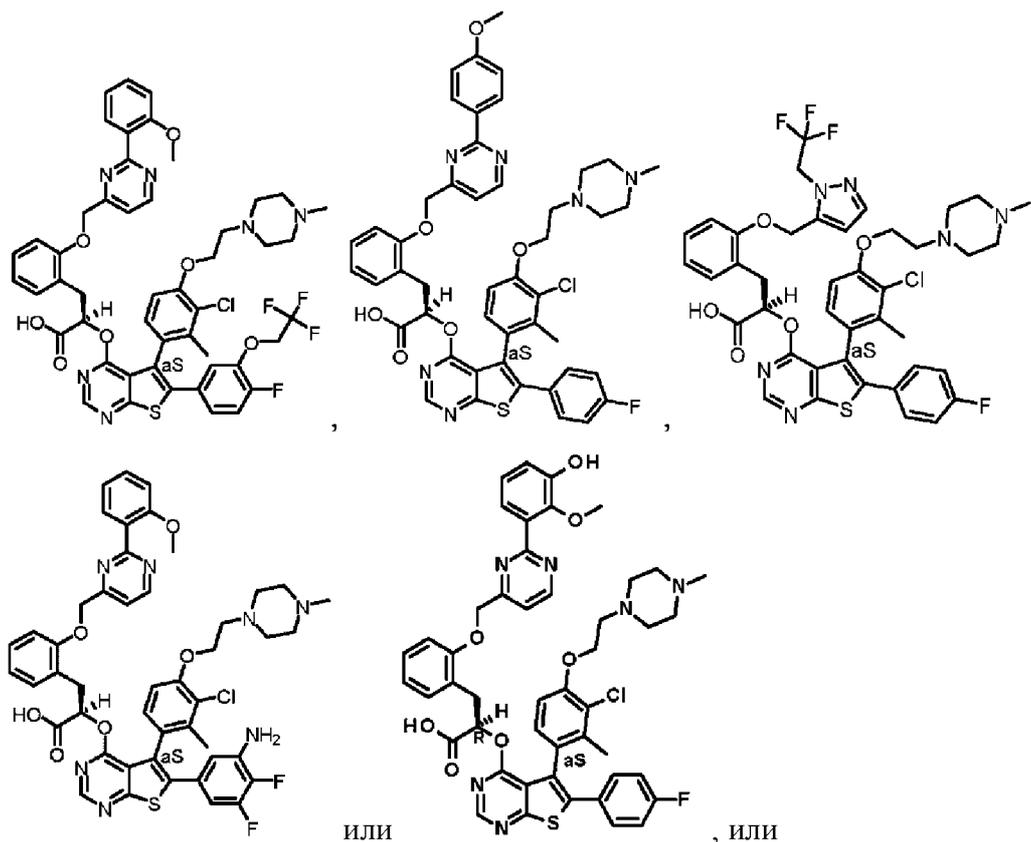
В некоторых вариантах осуществления, Su_{05} является пиримидинильной группой.

В некоторых вариантах осуществления, Su_{05} является пиримидинильной группой и Su_{06} является фенильной группой.

В некоторых вариантах осуществления, линкер (L) присоединен к D ковалентной связью от L к R_{03} формул (I), (II) или (III). В некоторых вариантах осуществления, линкер (L) присоединен к D ковалентной связью от L к R_{09} формул (I), (II) или (III).

В некоторых вариантах осуществления, D содержит:

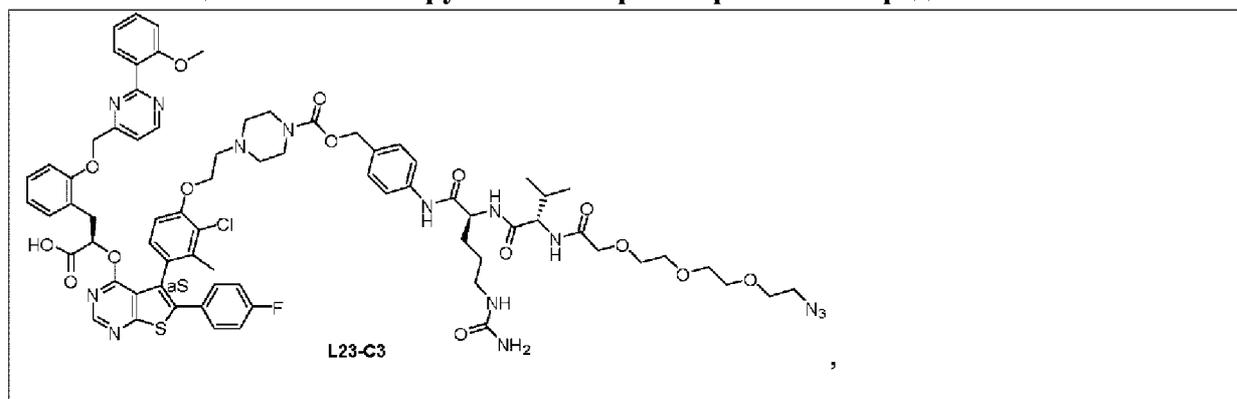


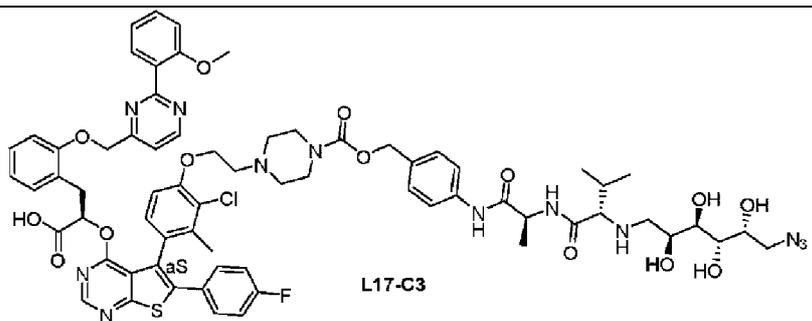
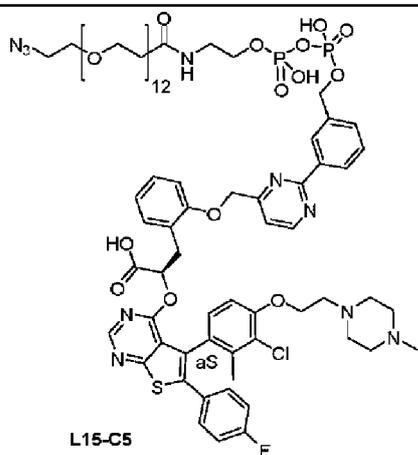
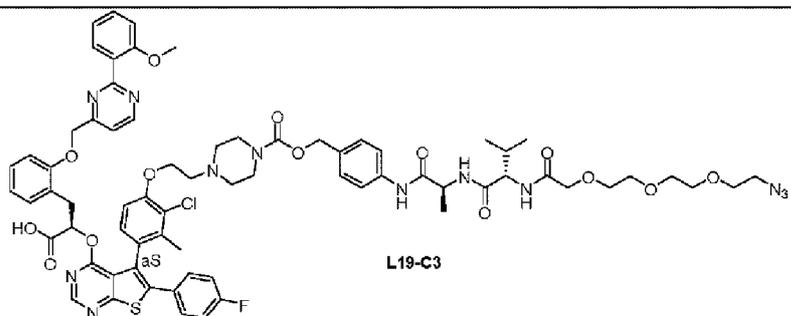
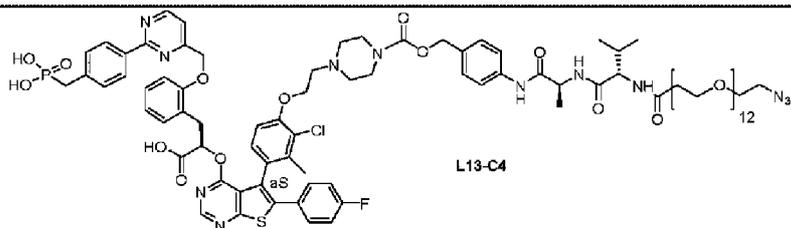
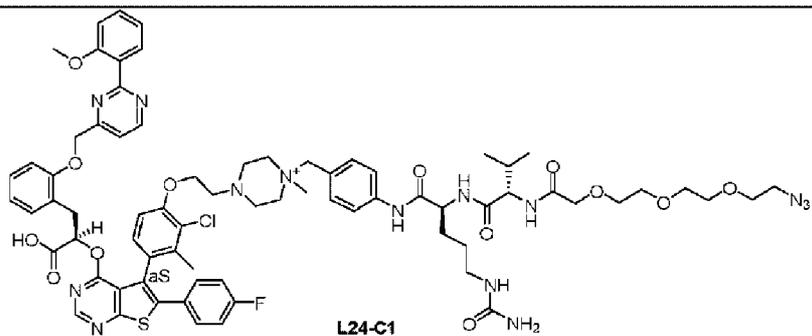


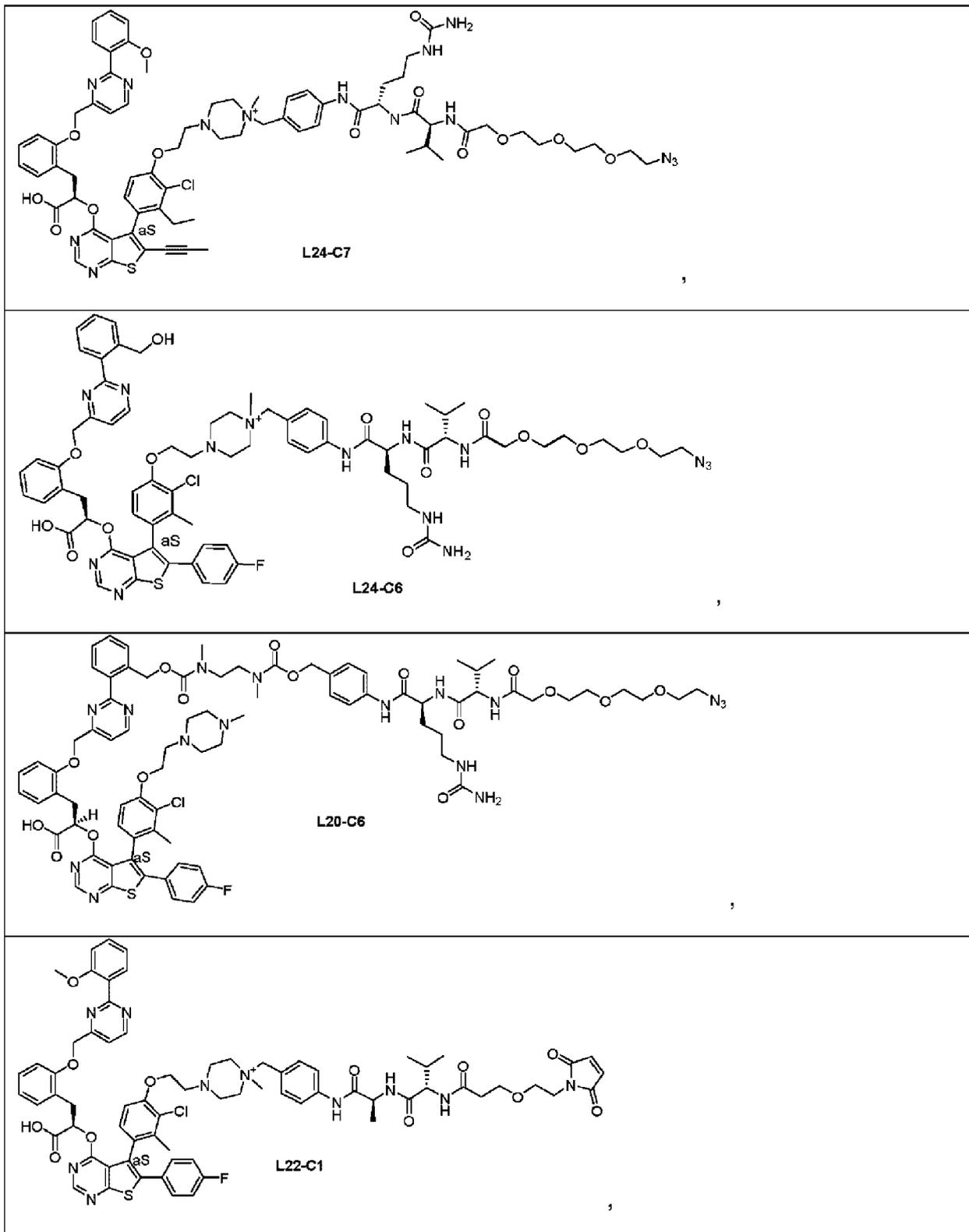
энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

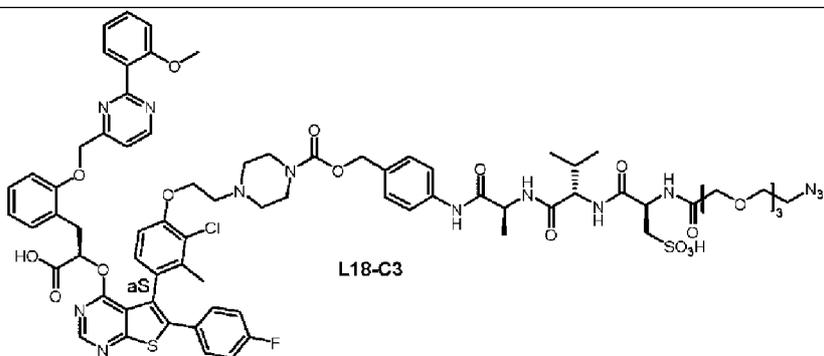
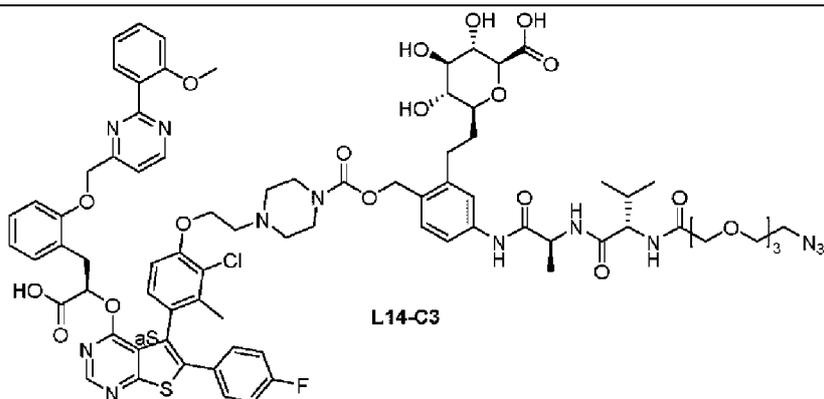
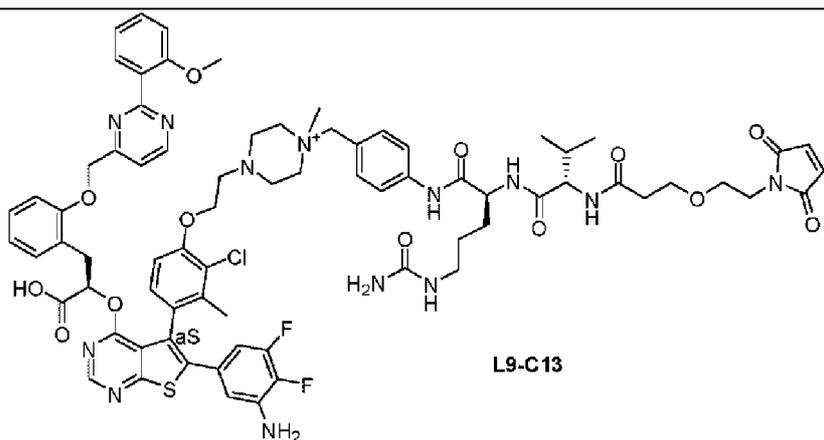
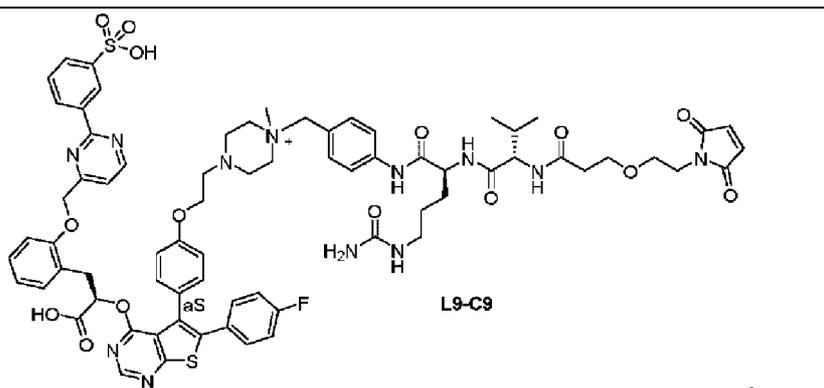
В некоторых вариантах осуществления, -(L-D) образован из соединения, выбранного из таблицы А или его энантиомера, диастереоизомера, атропоизомера, дейтерированного производного и/или фармацевтически приемлемой соли. Для соединений в таблице А, в зависимости от их электронного заряда, эти соединения могут содержать один фармацевтически приемлемый одновалентный анионный противоион M_1^- . В некоторых вариантах осуществления, одновалентный анионный противоион M_1^- может быть выбран из бромида, хлорида, йодида, ацетата, трифторацетата, бензоата, мезилата, тозилата, трифлата, формиата или подобных. В некоторых вариантах осуществления, одновалентным анионным противоионом M_1^- является трифторацетат или формиат.

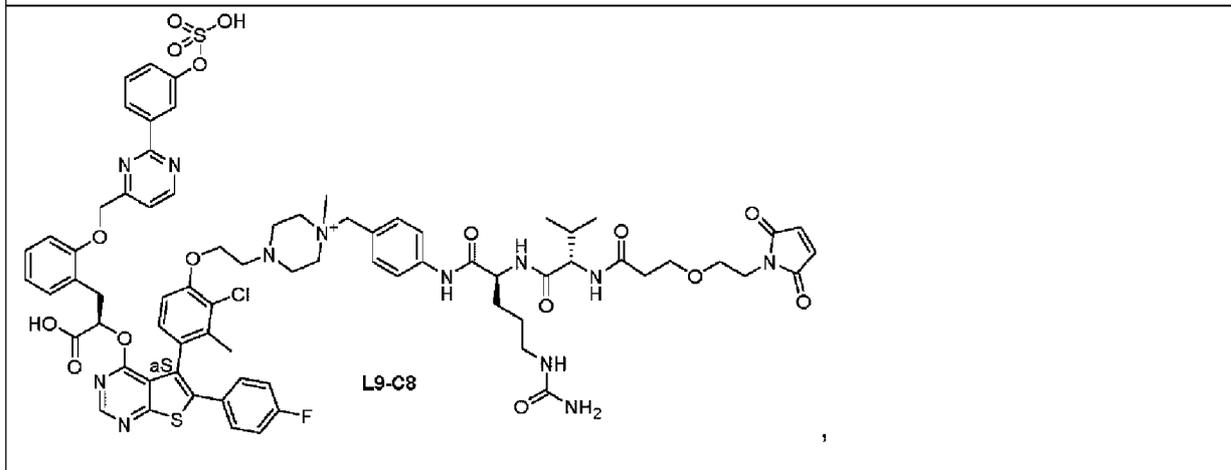
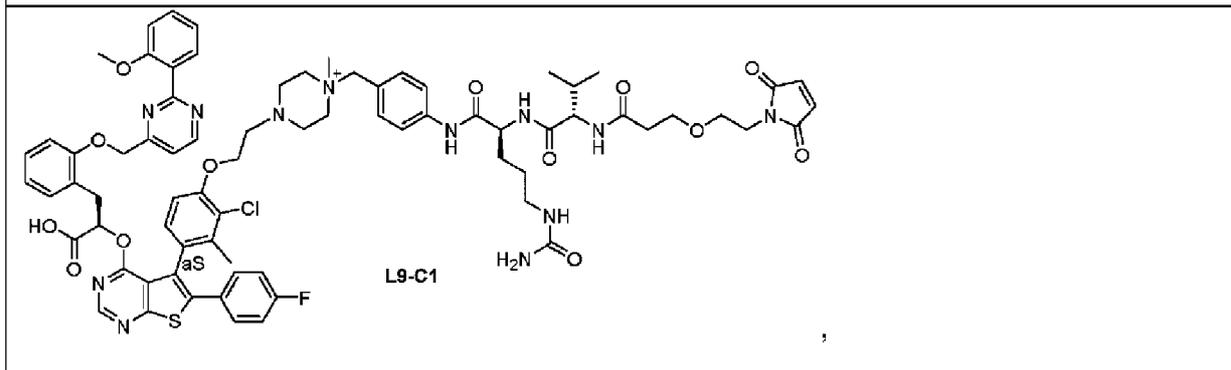
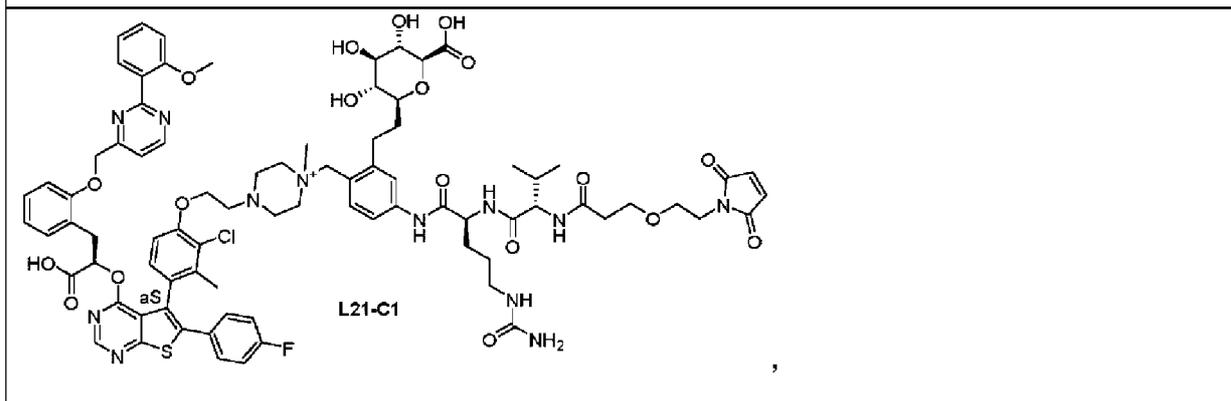
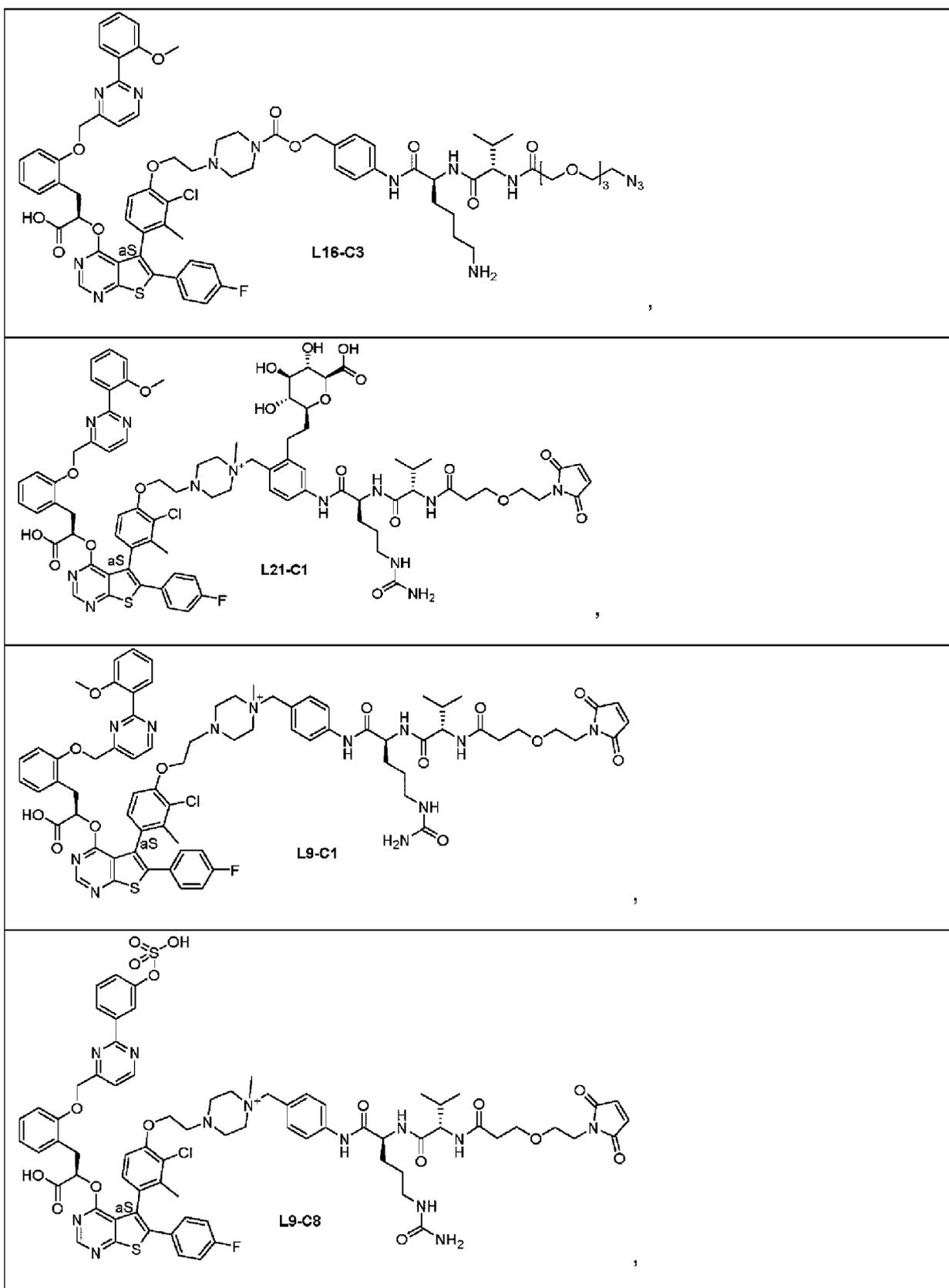
Таблица А. Типовые группы линкер-лекарственное средство

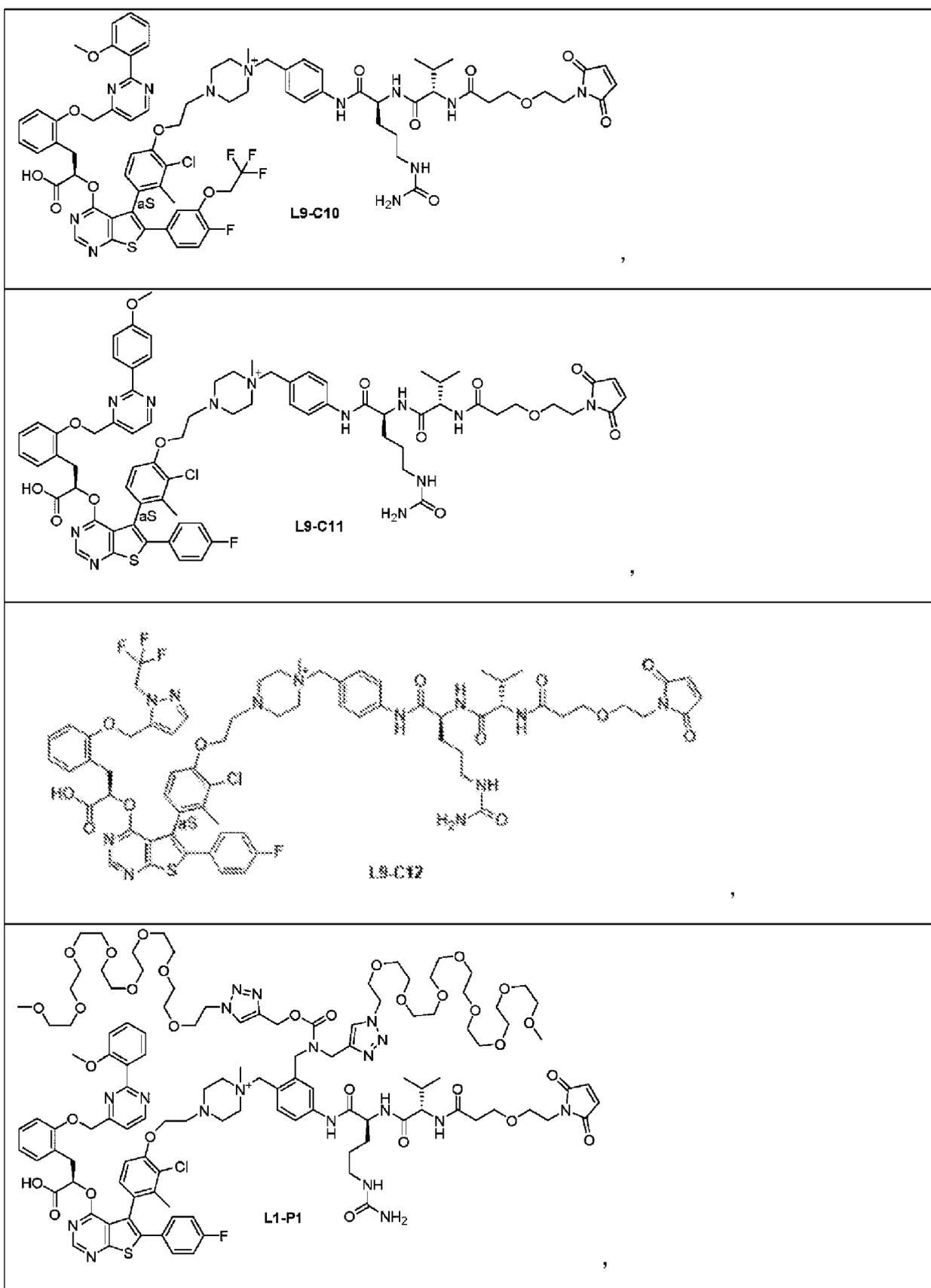


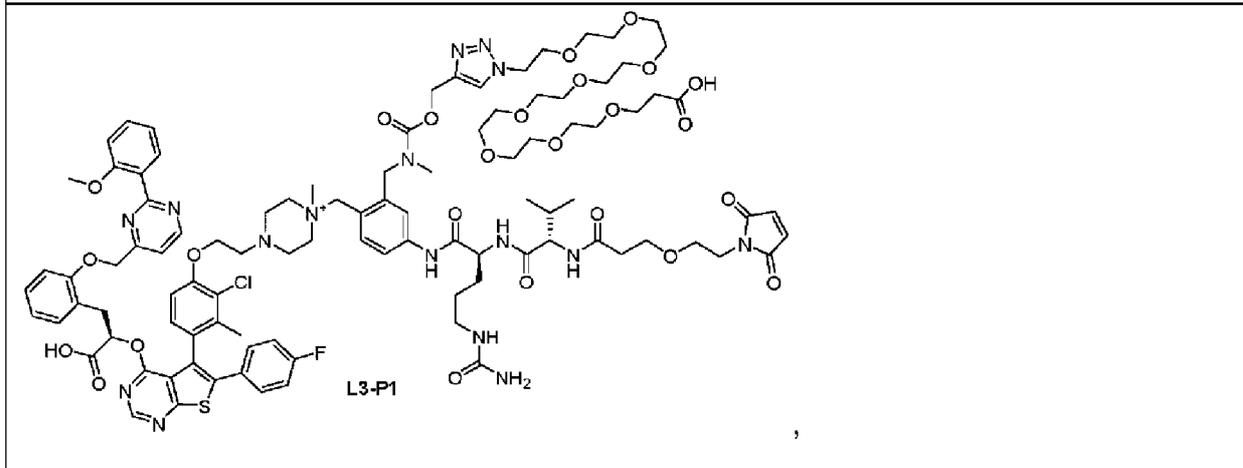
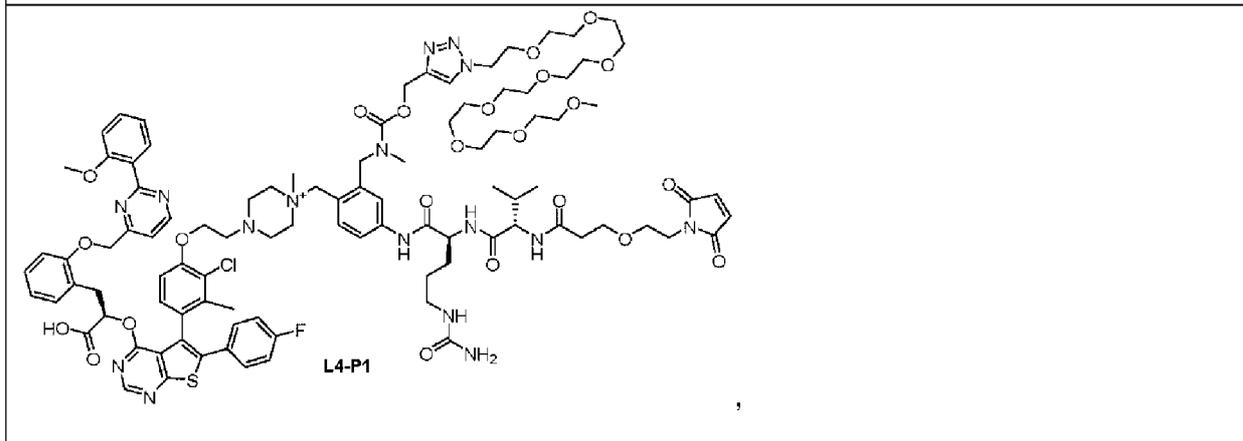
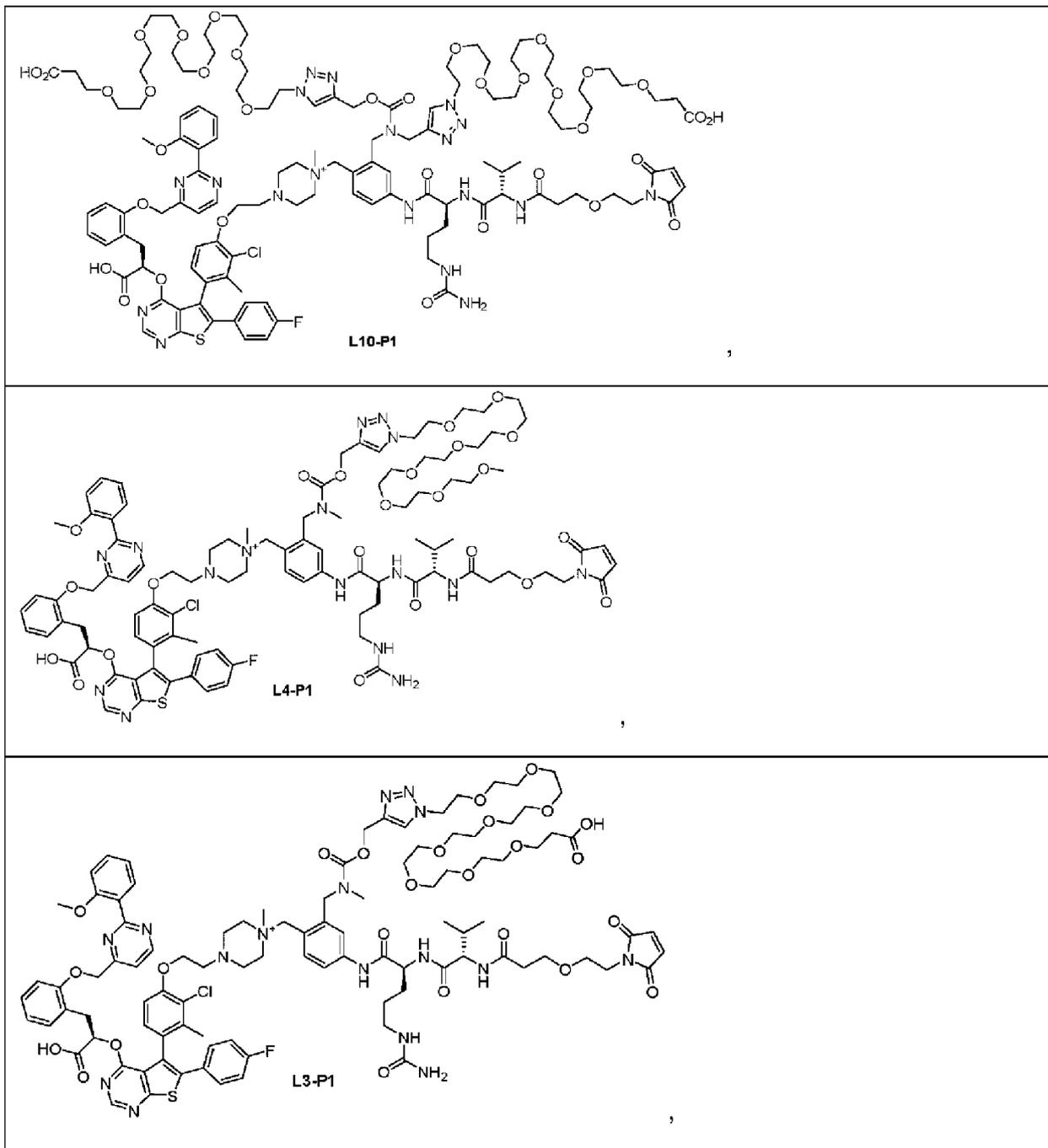


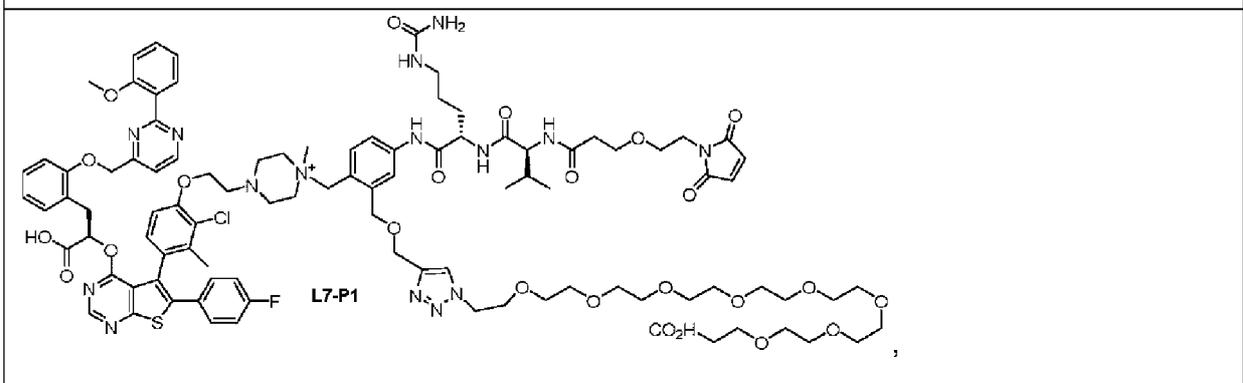
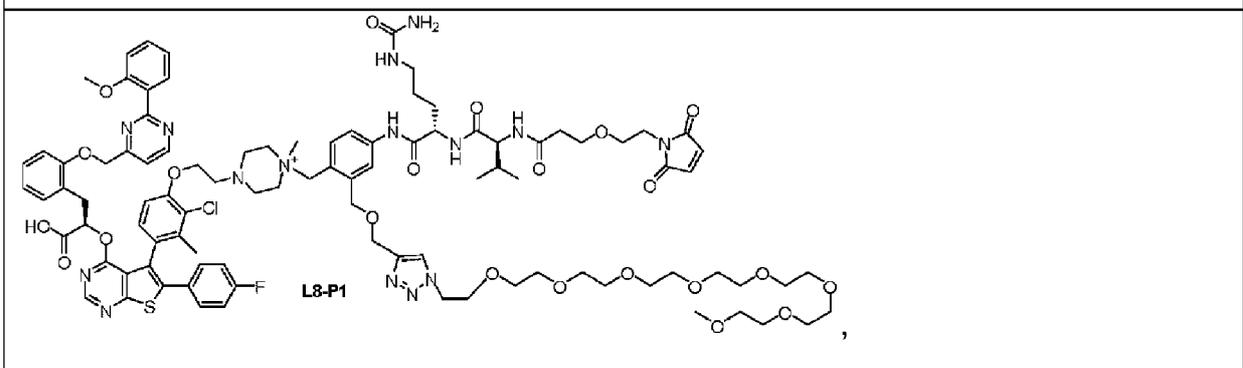
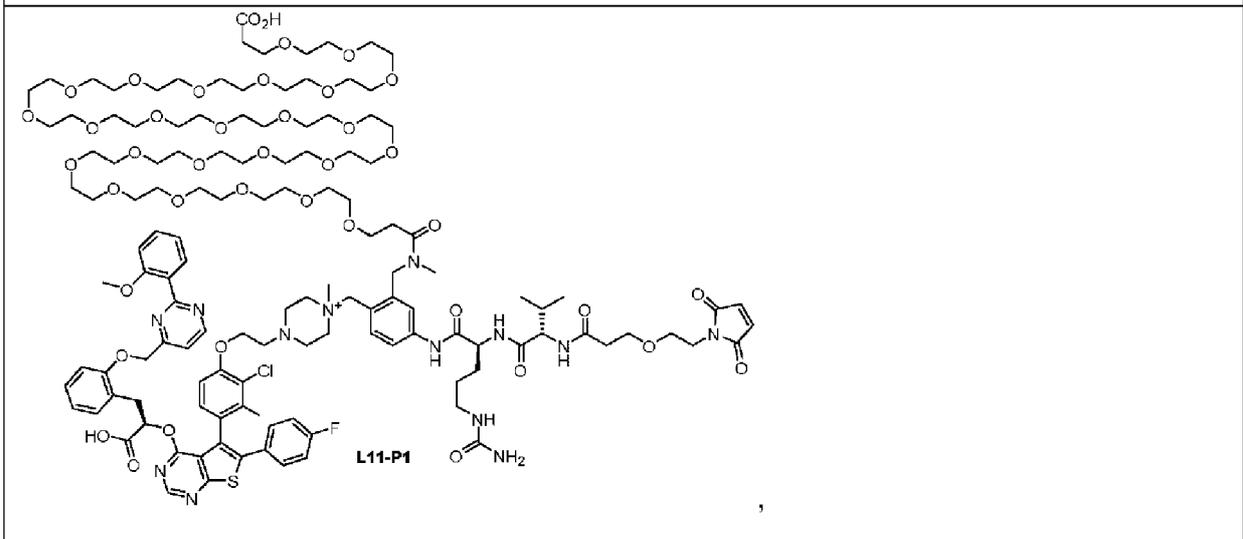
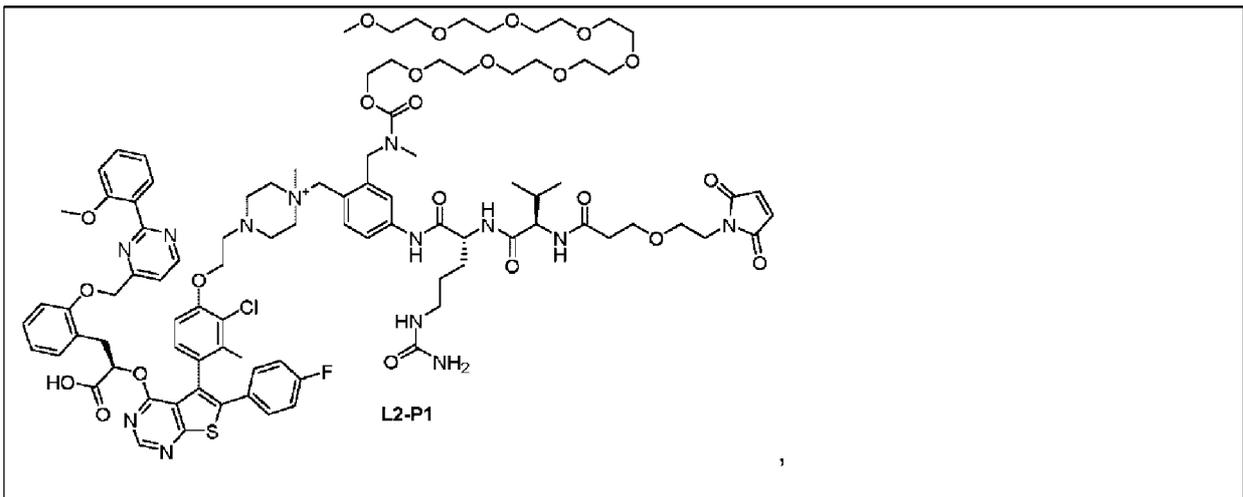


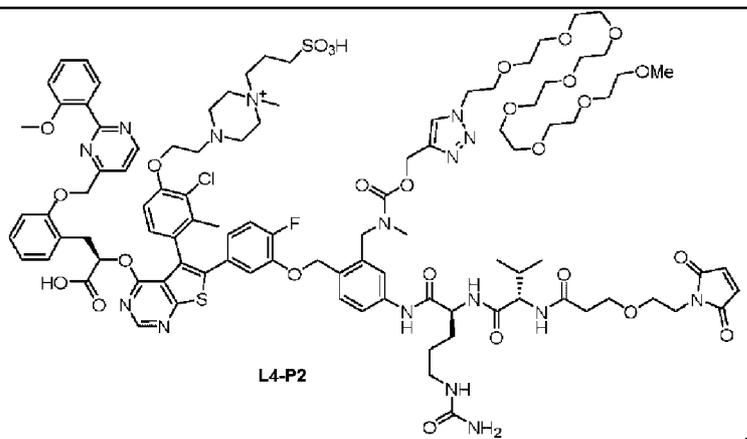
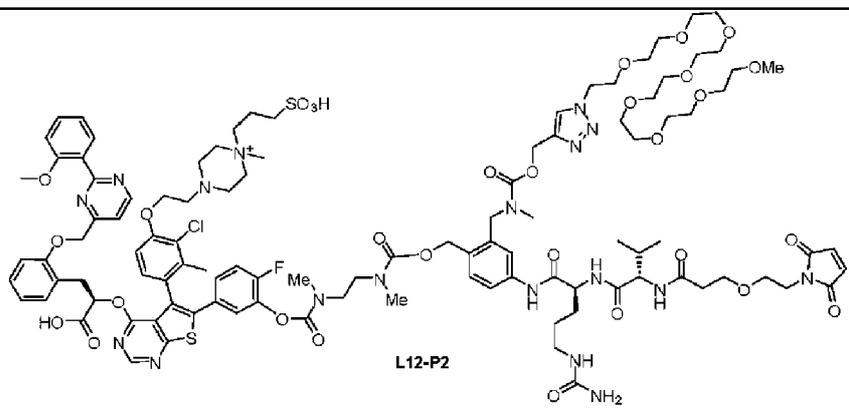
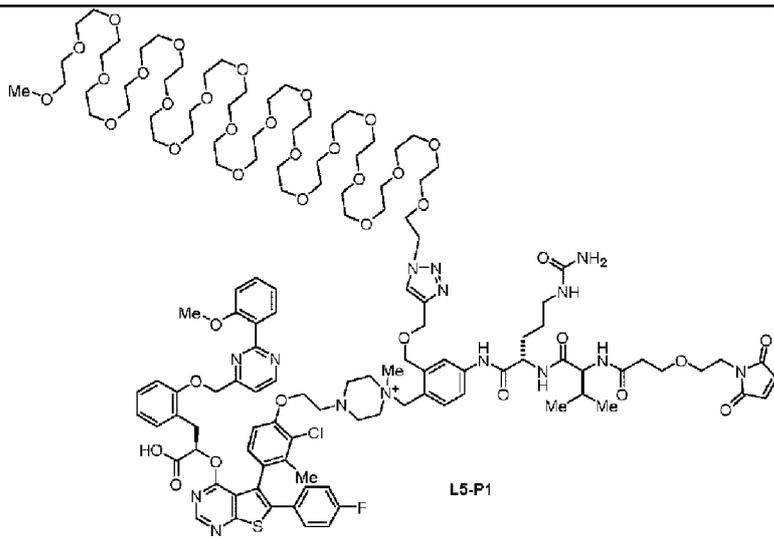


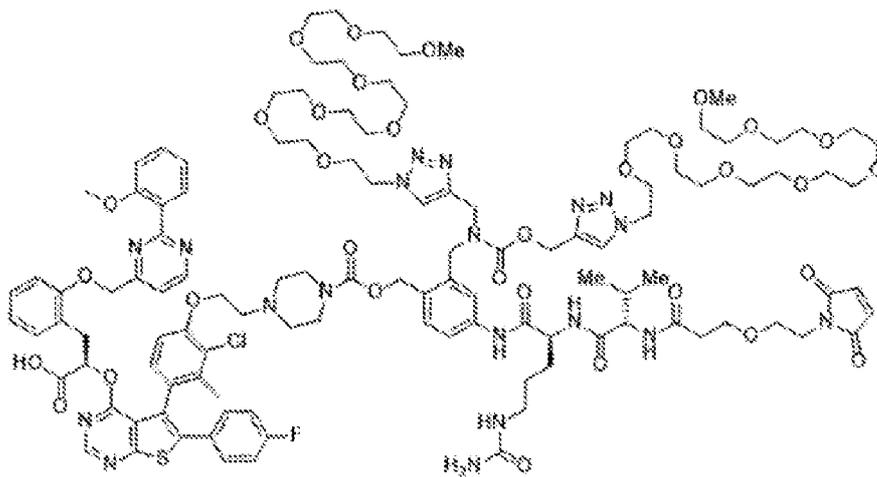




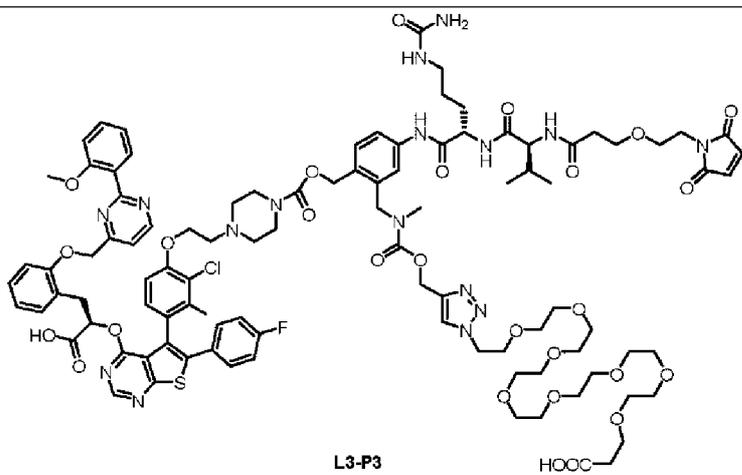






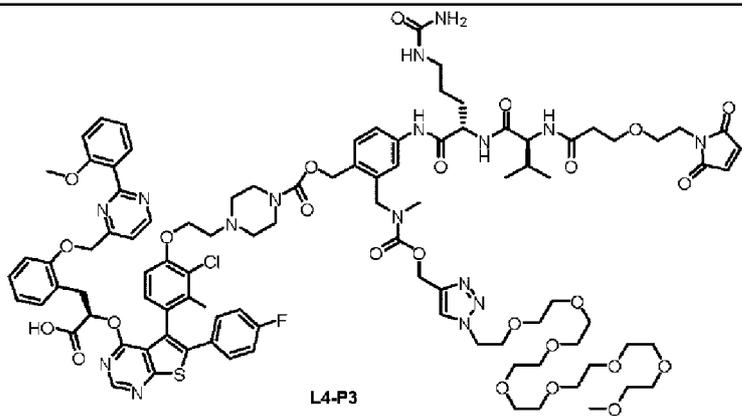


L1-P3,

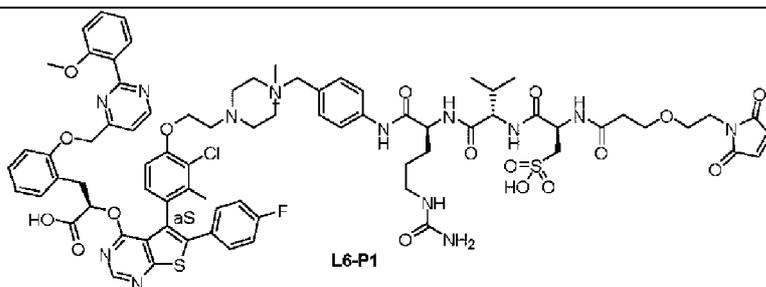


L3-P3

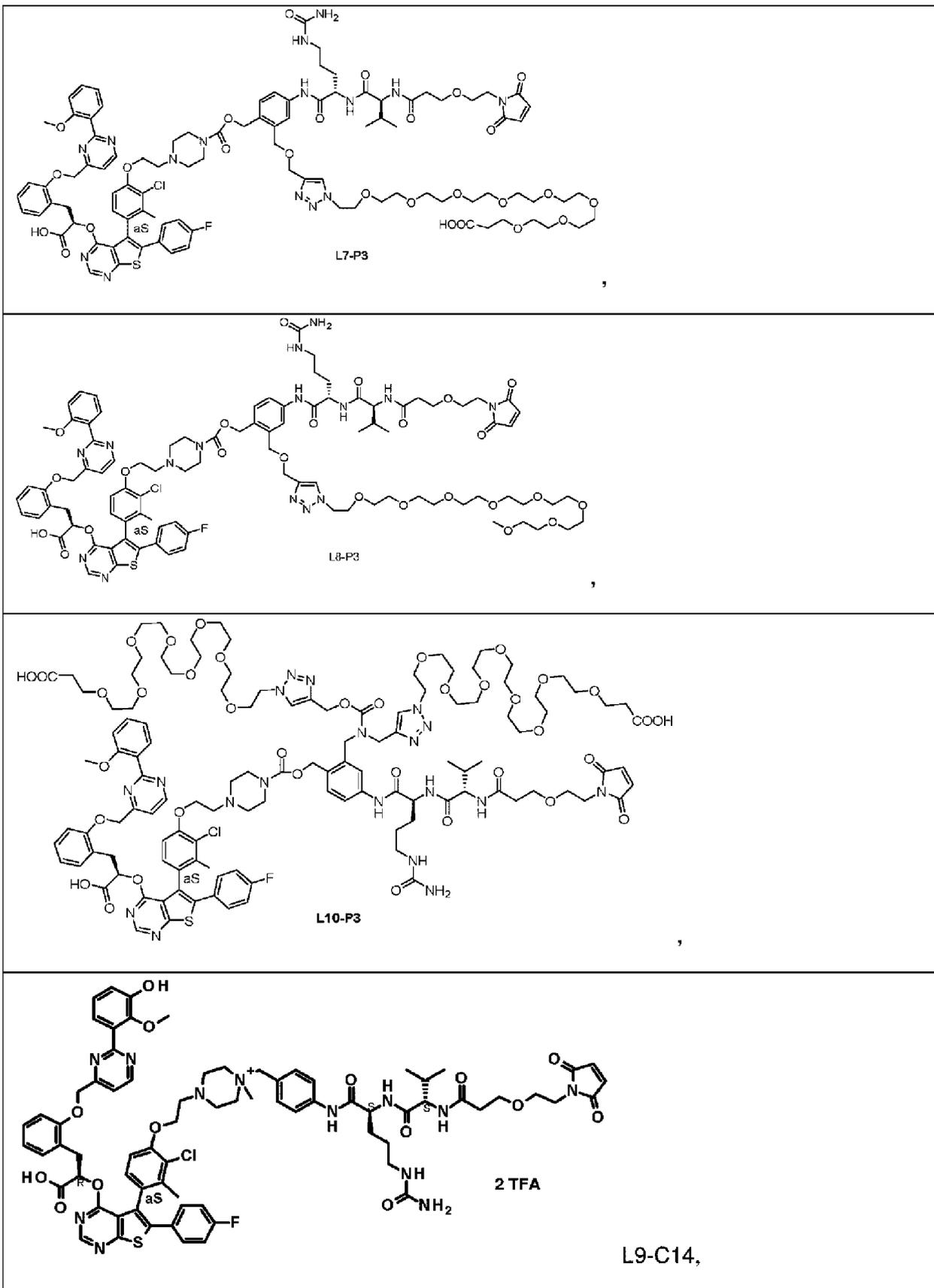
HOOC

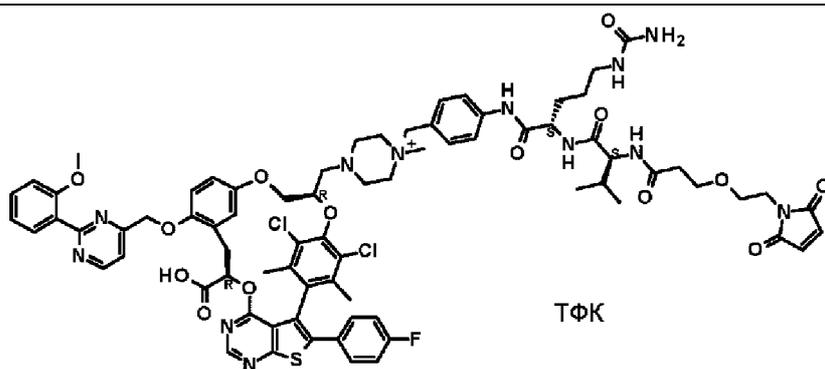


L4-P3

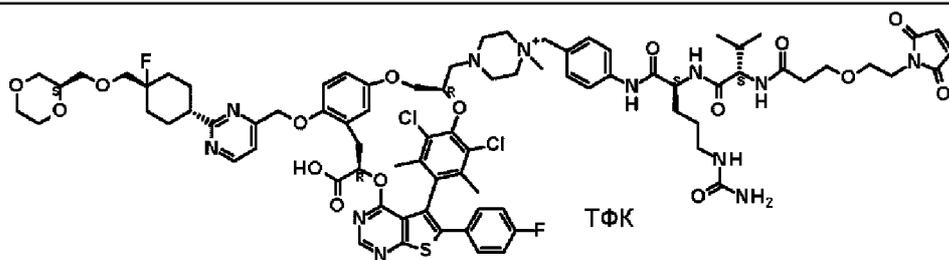


L6-P1

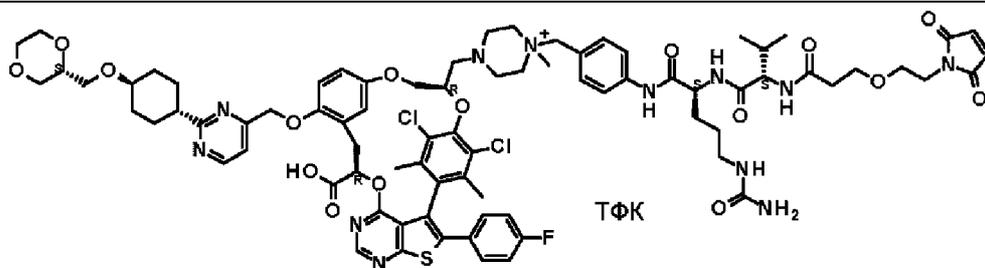




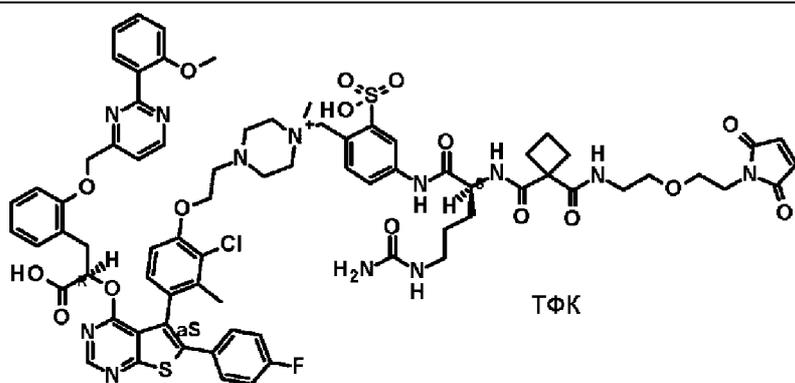
L9-P15,



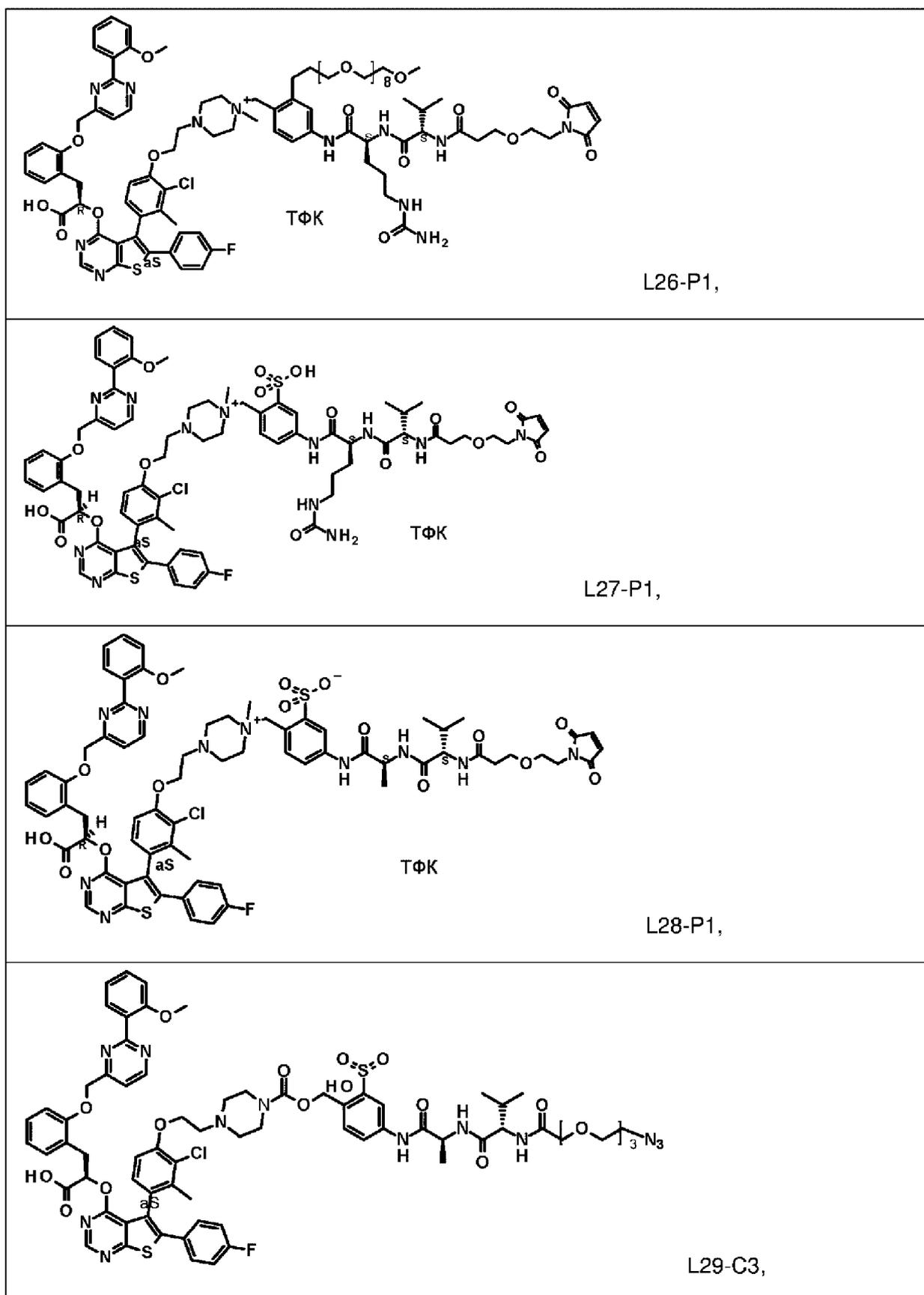
L9-P16,

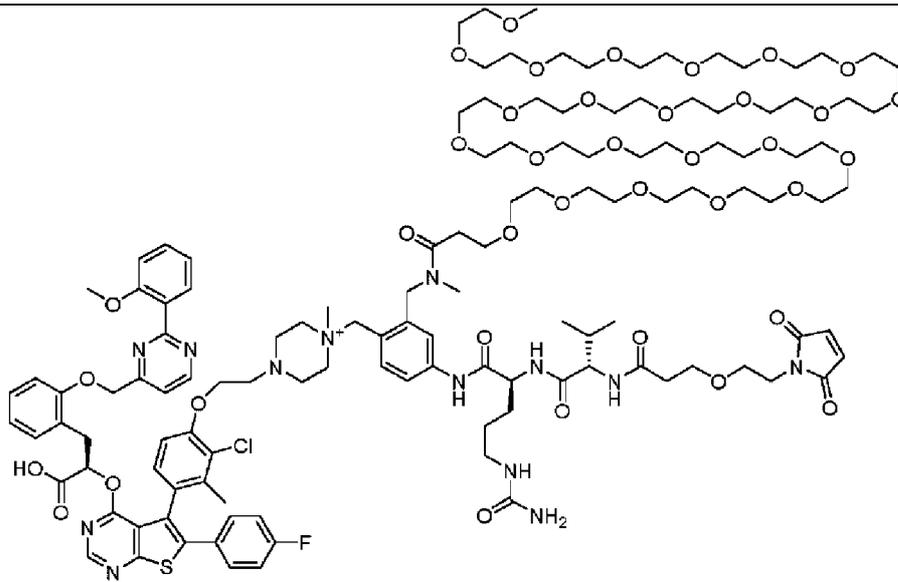


L9-P17,

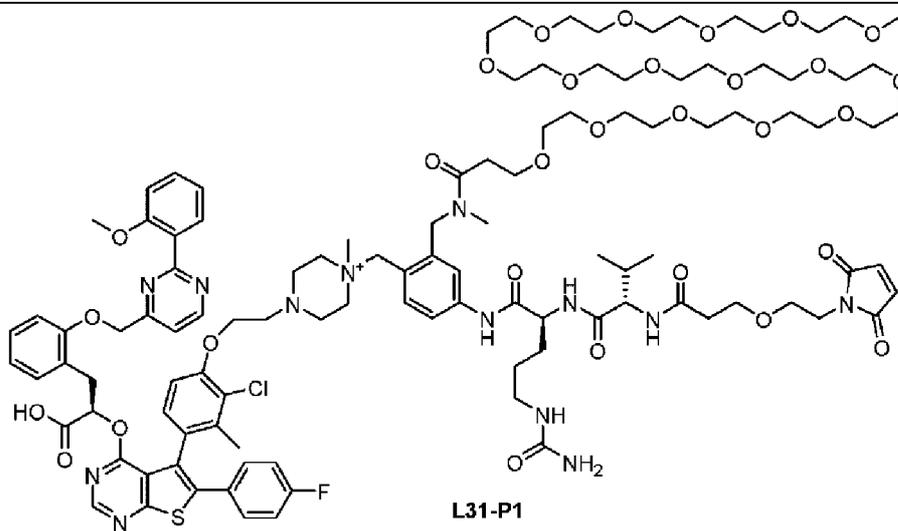


L25-P1.

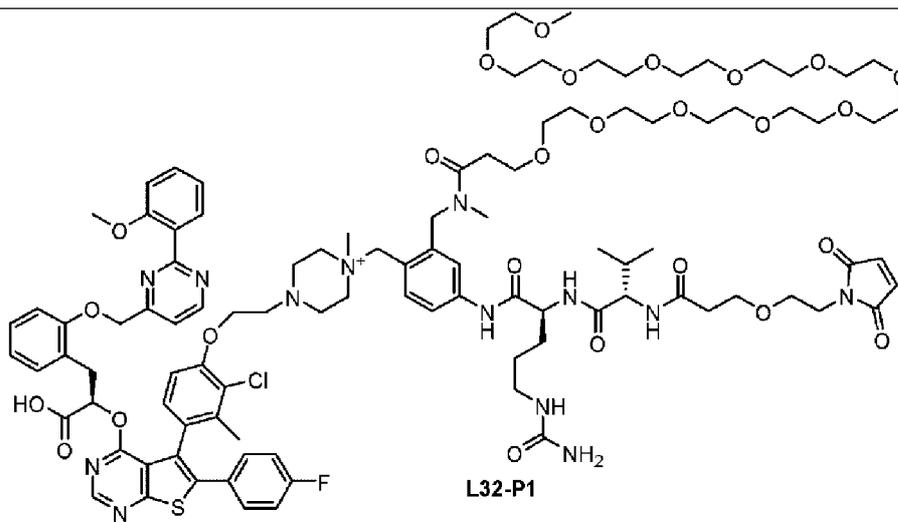




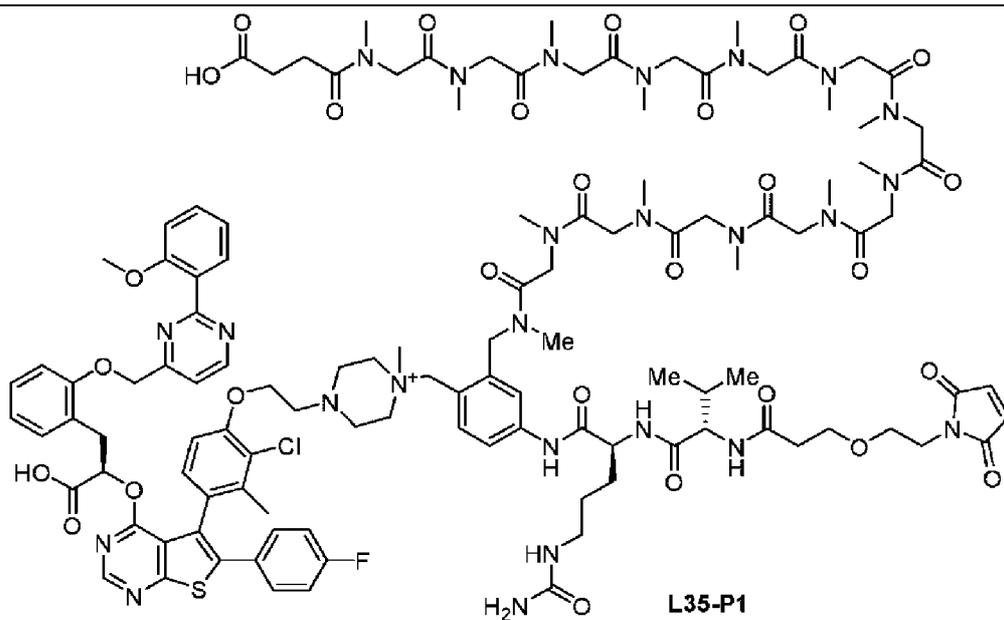
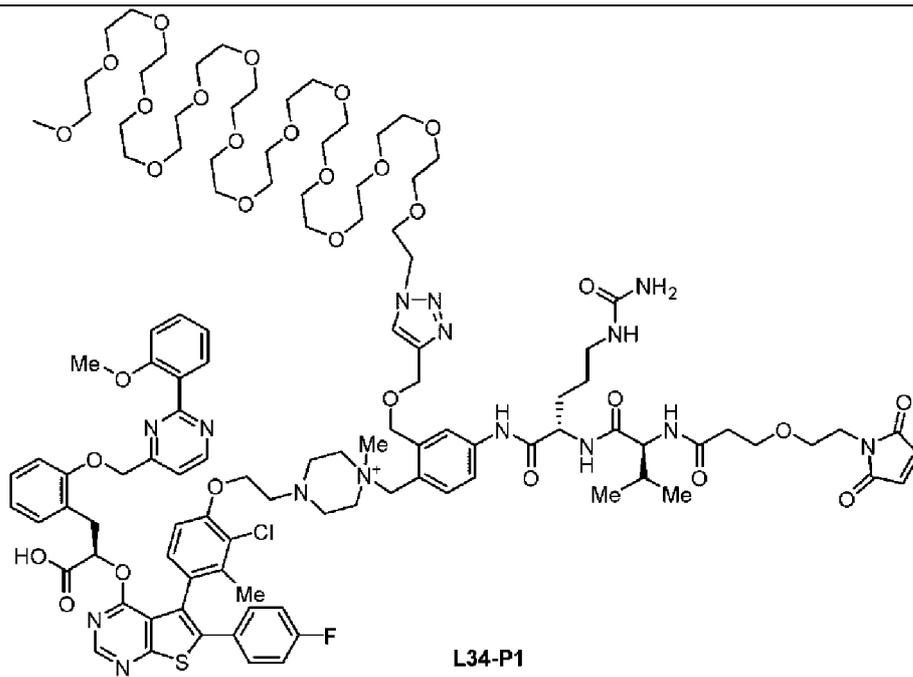
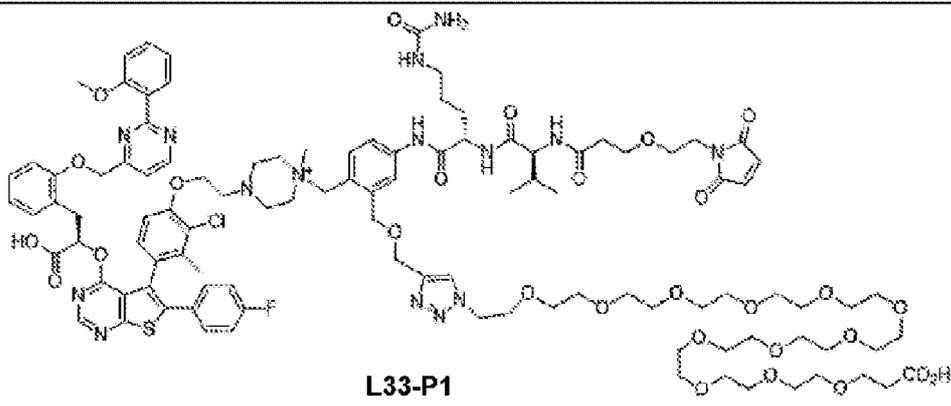
L30-P1

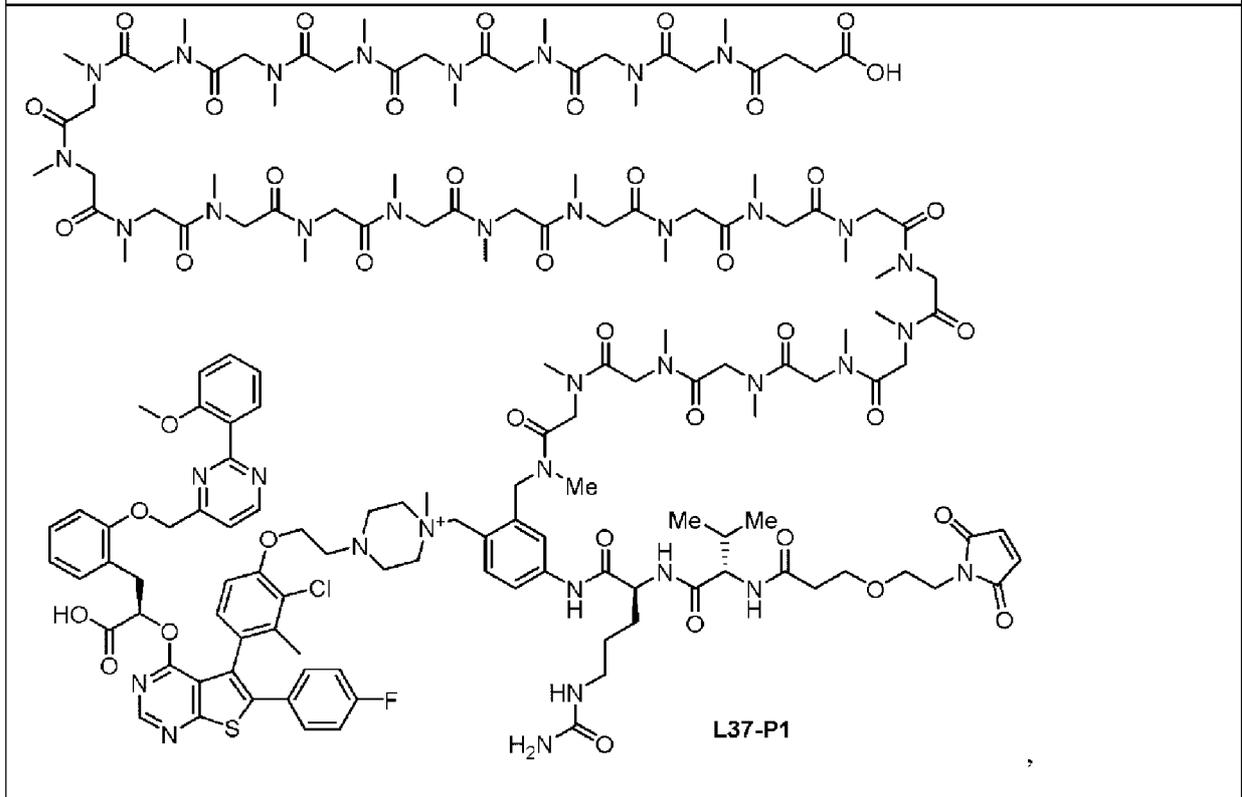
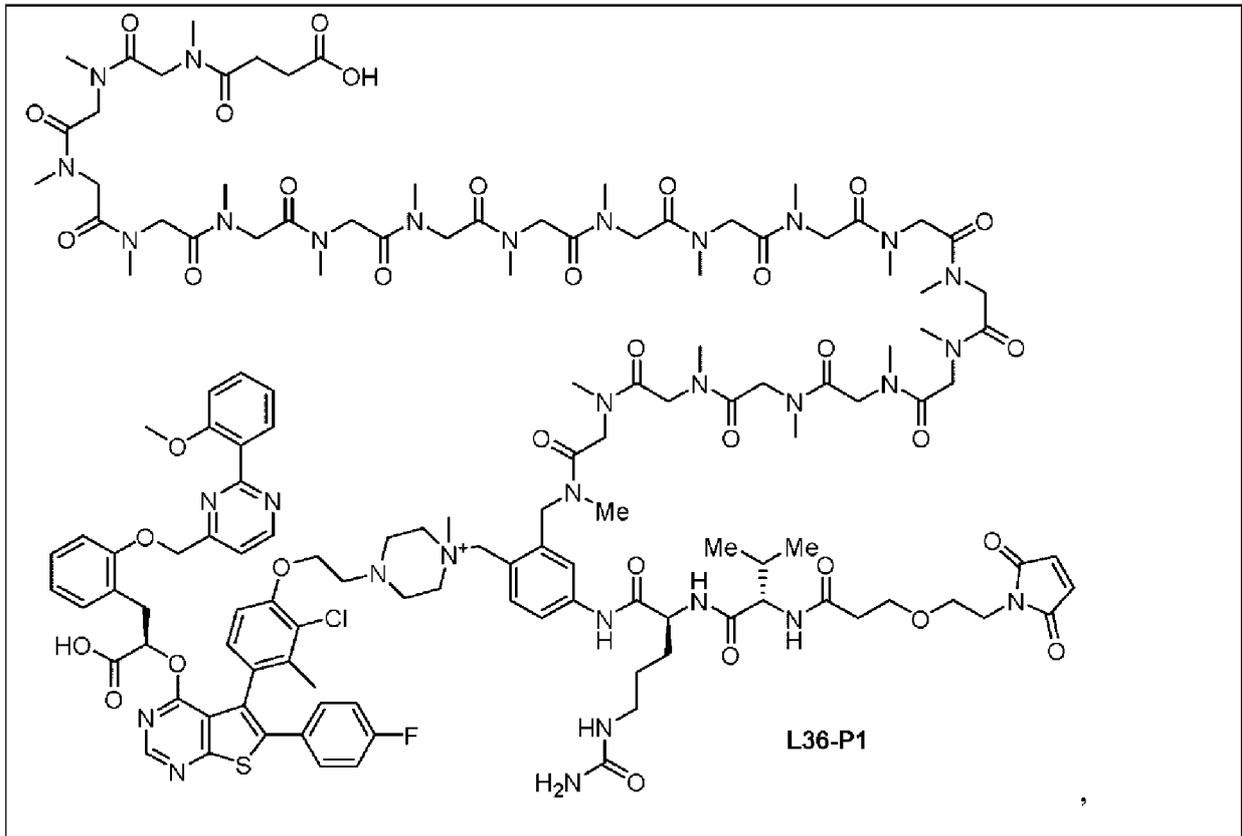


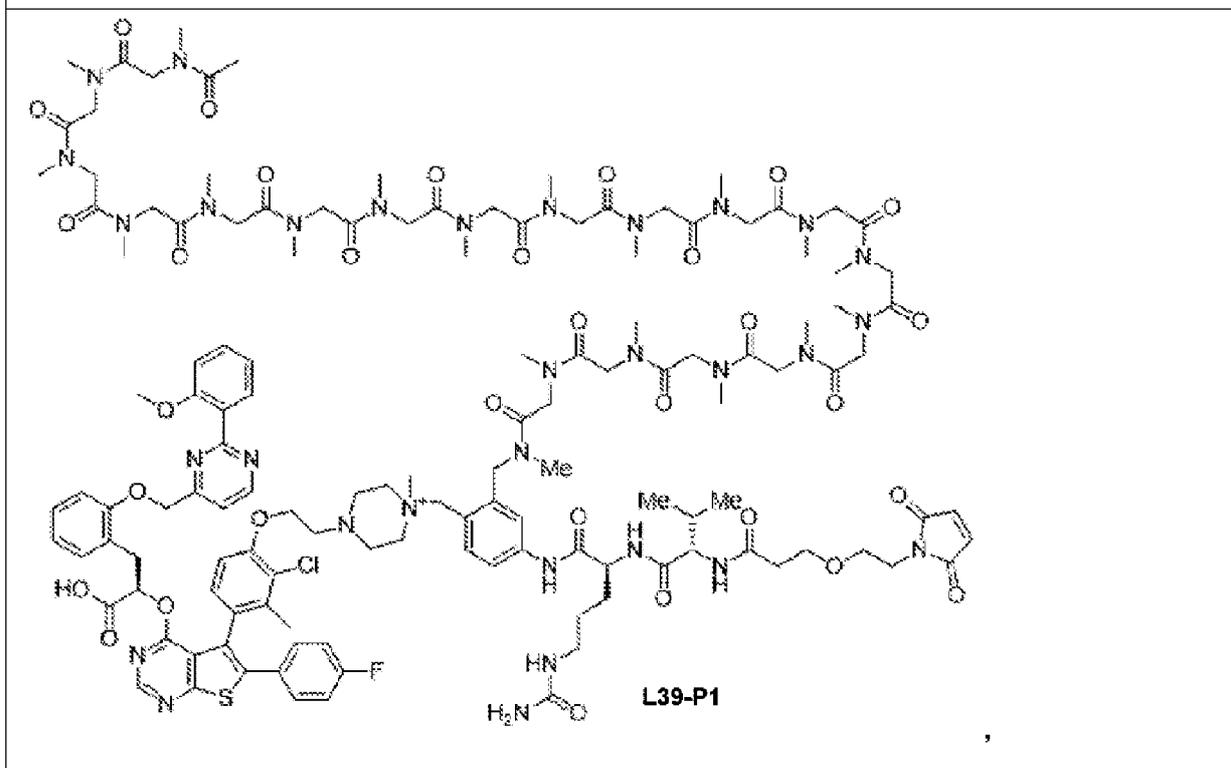
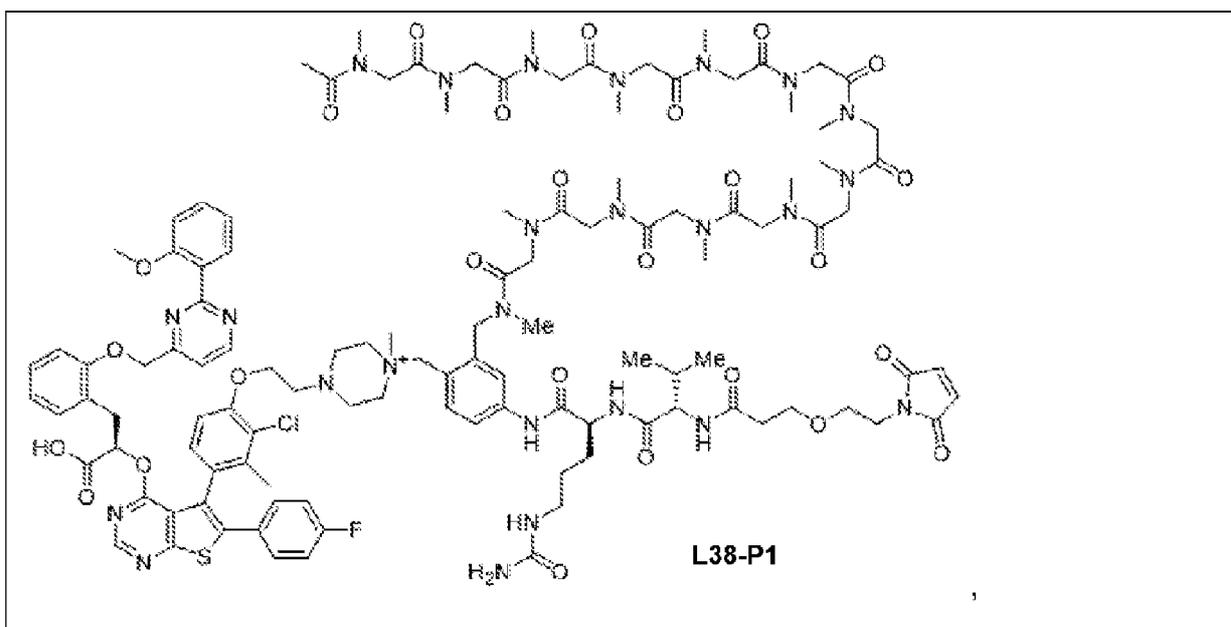
L31-P1

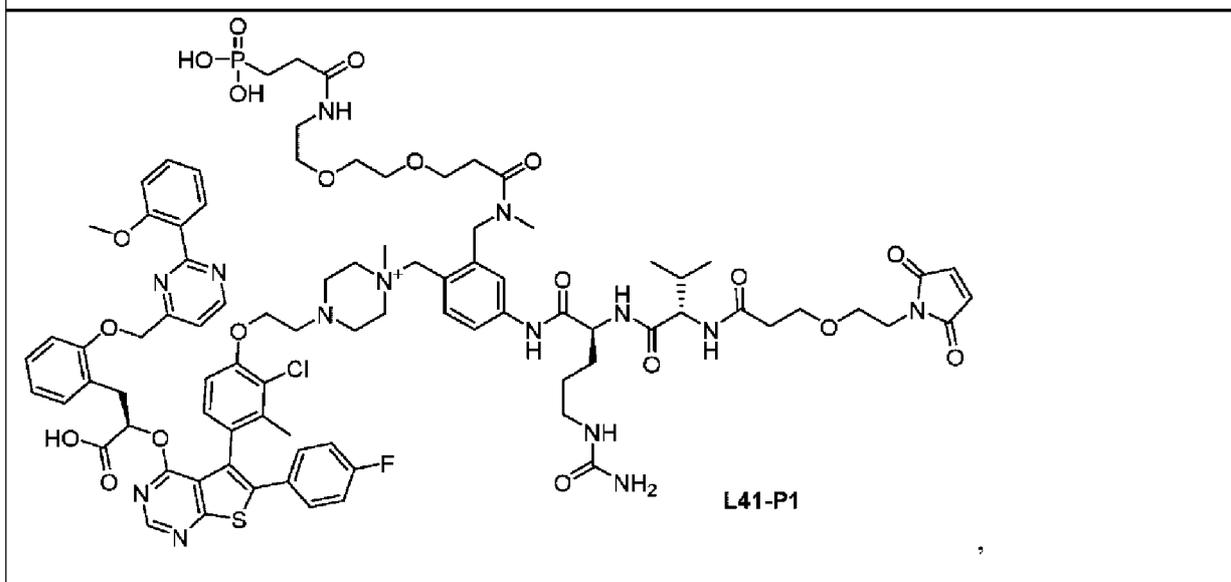
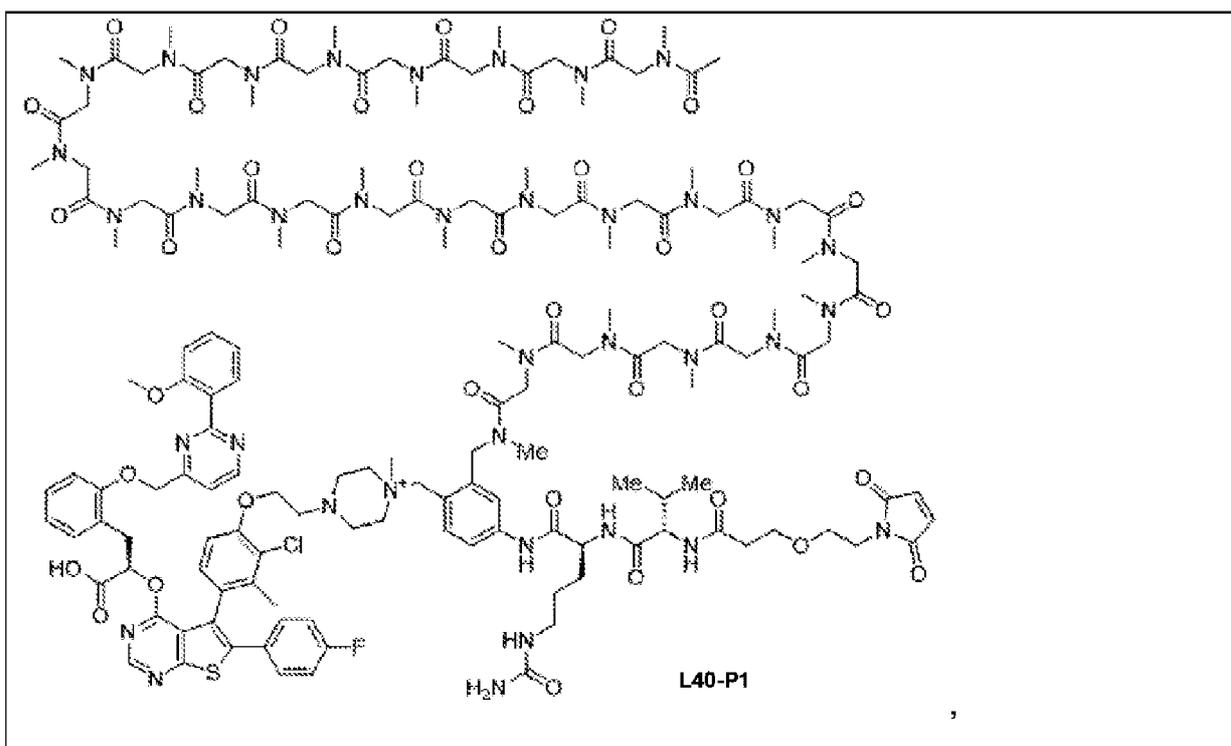


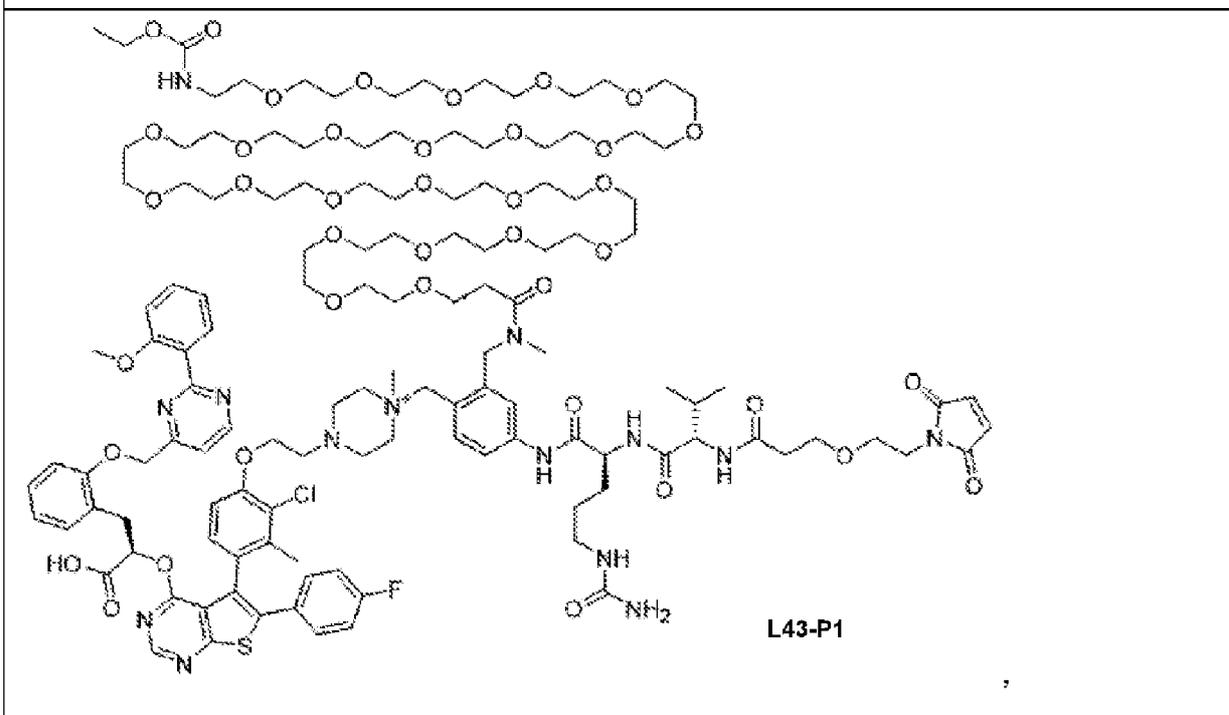
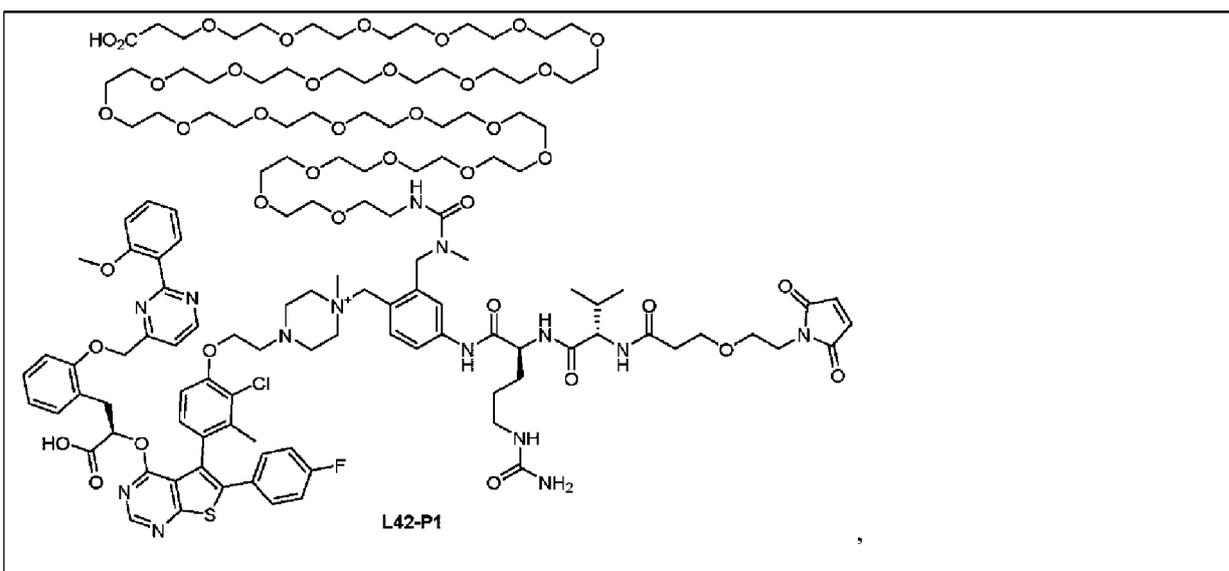
L32-P1

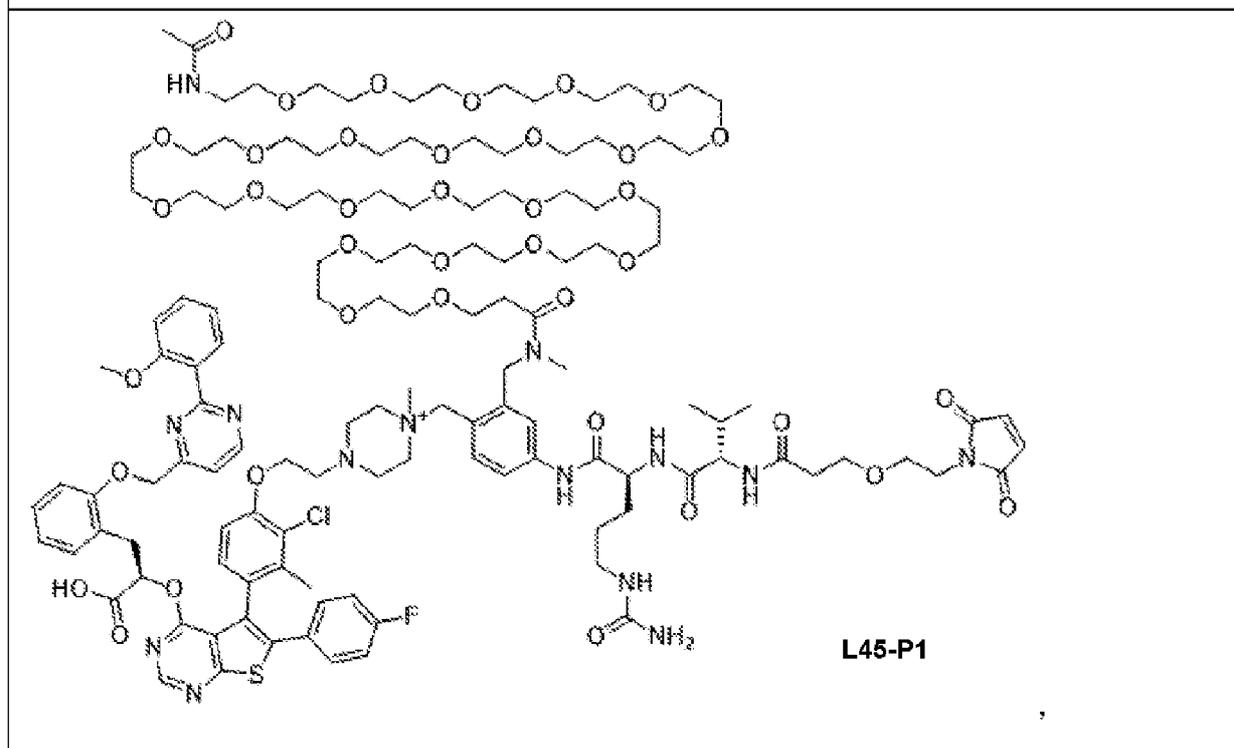
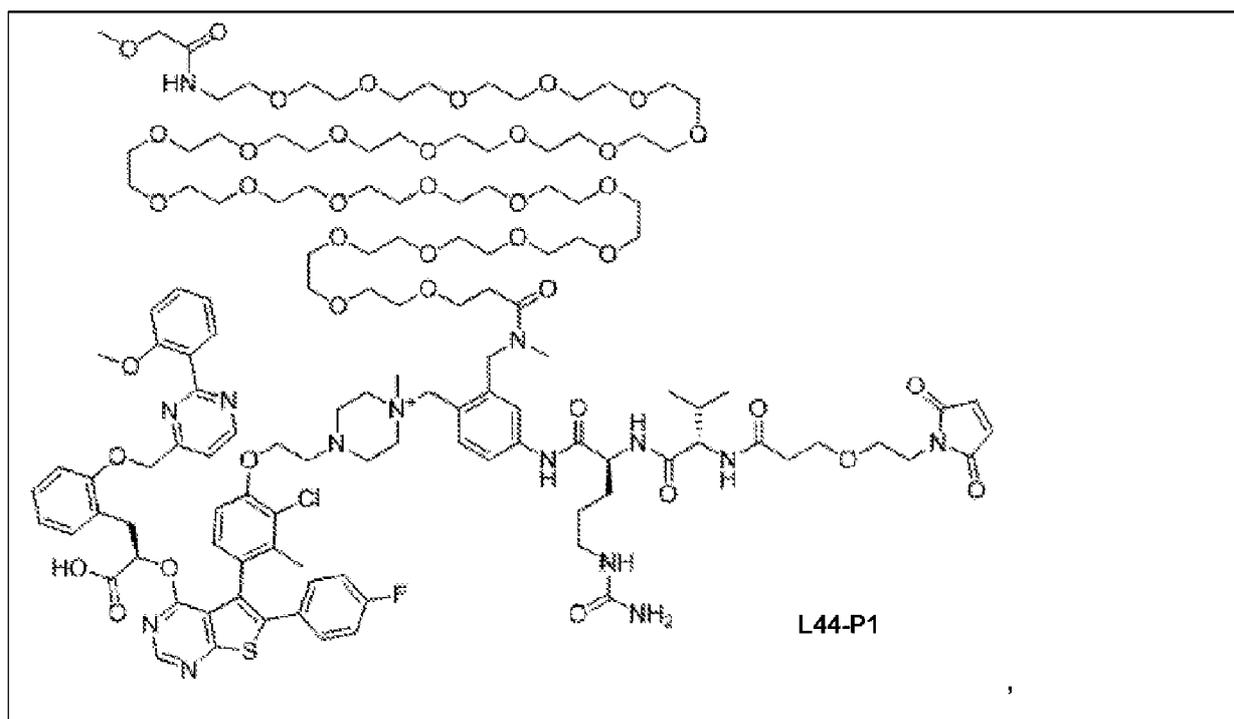


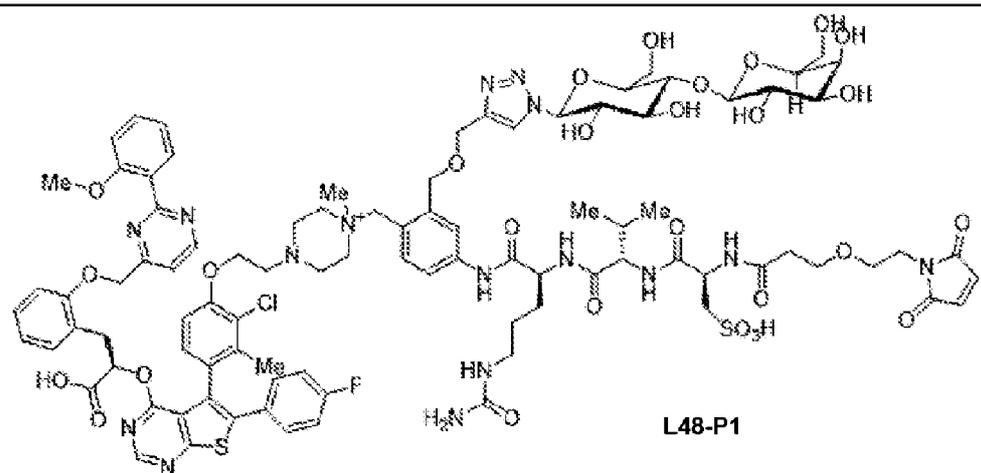
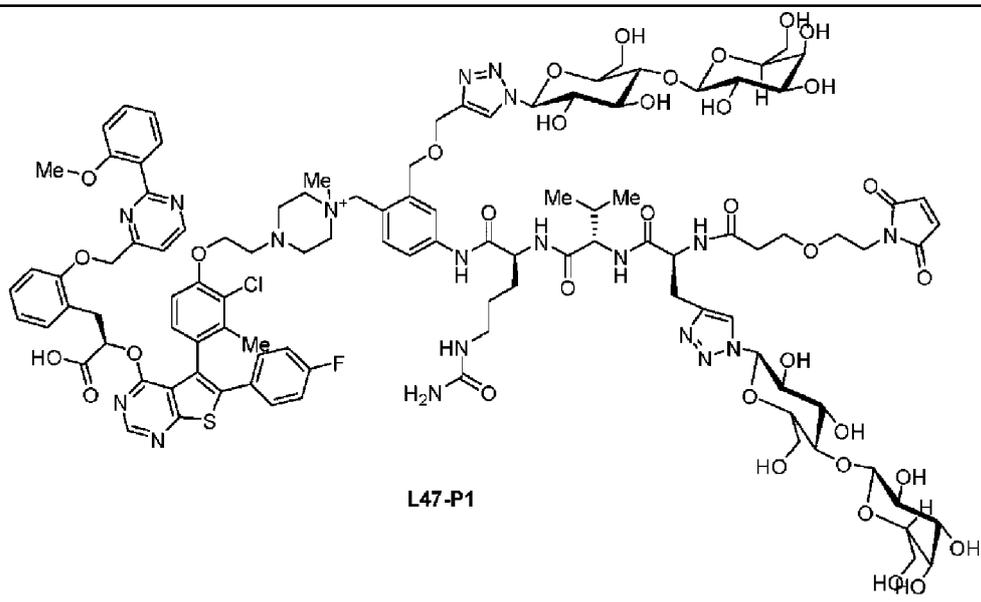
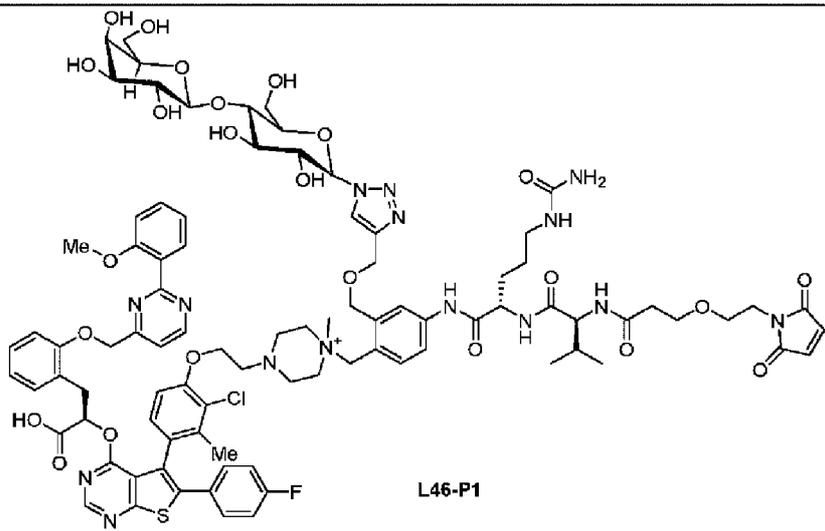


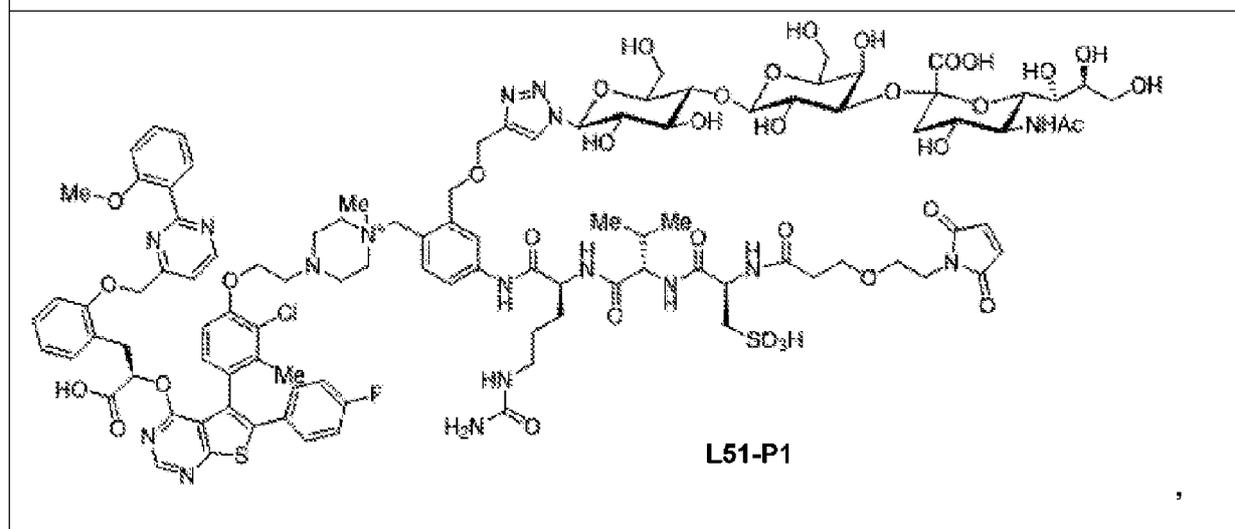
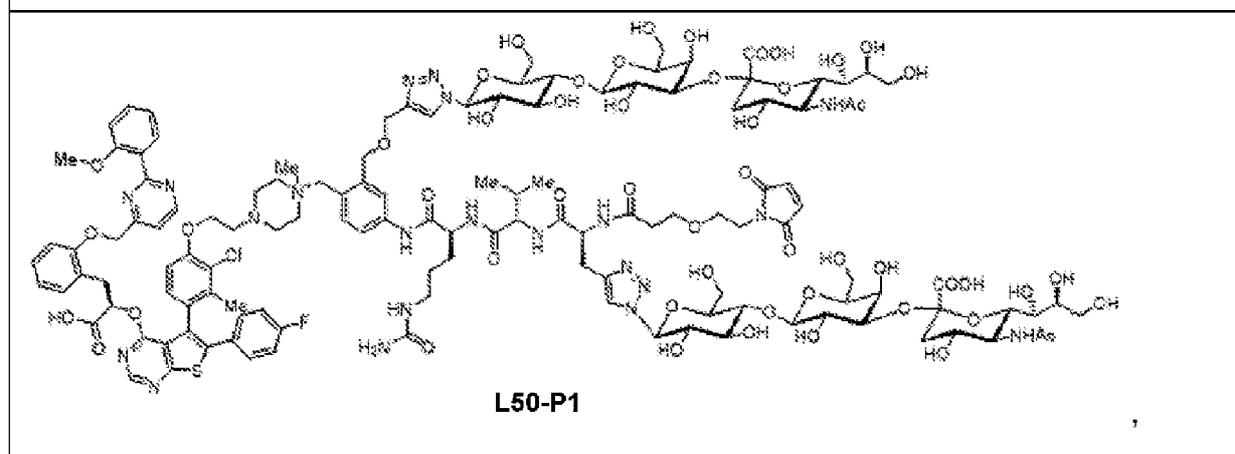
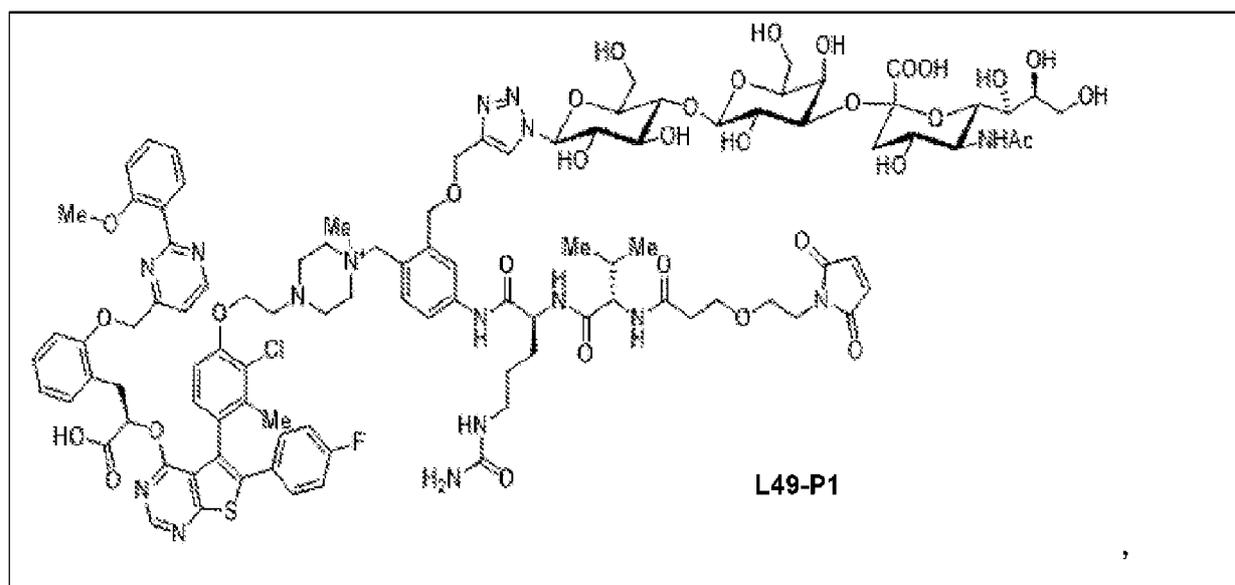


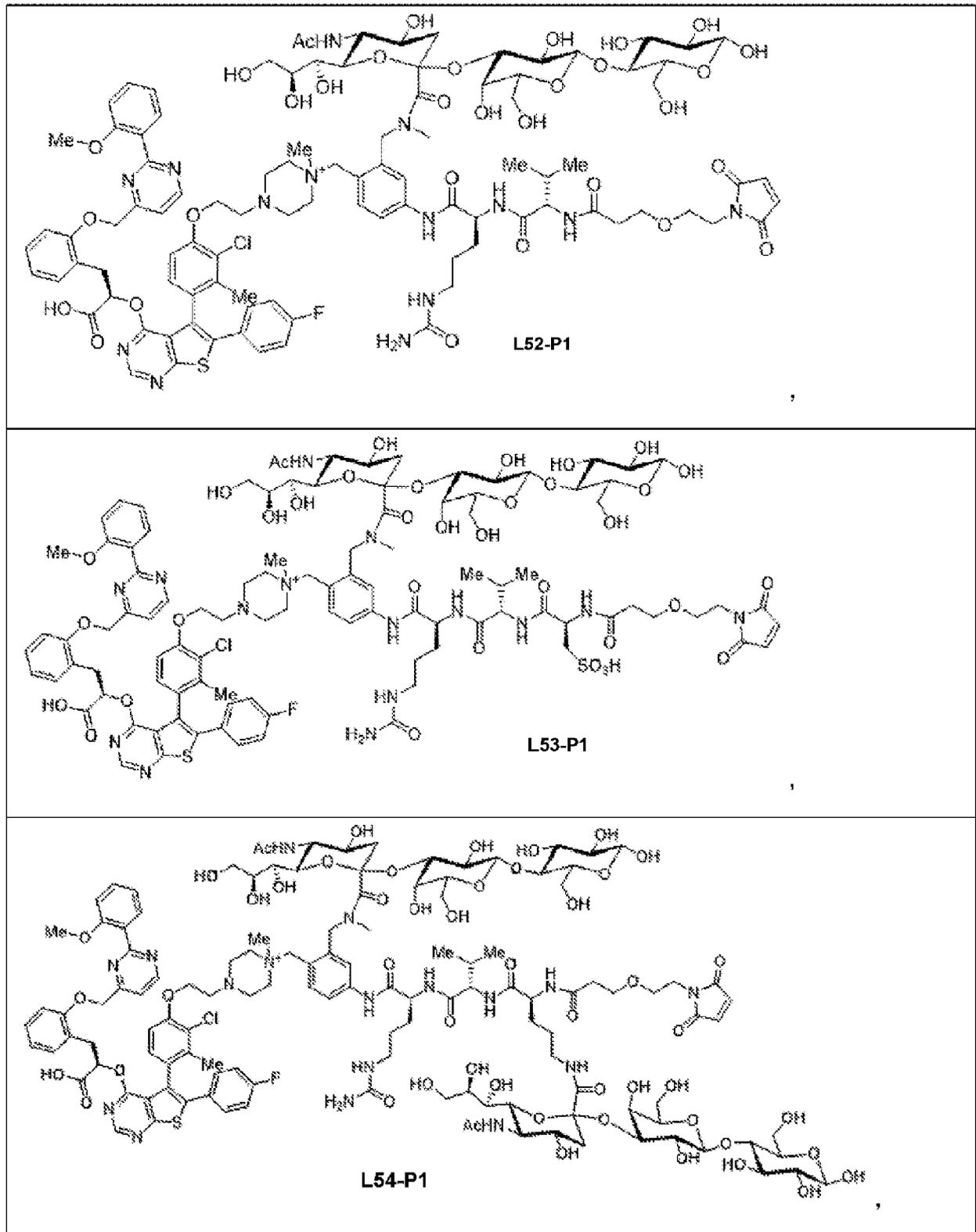


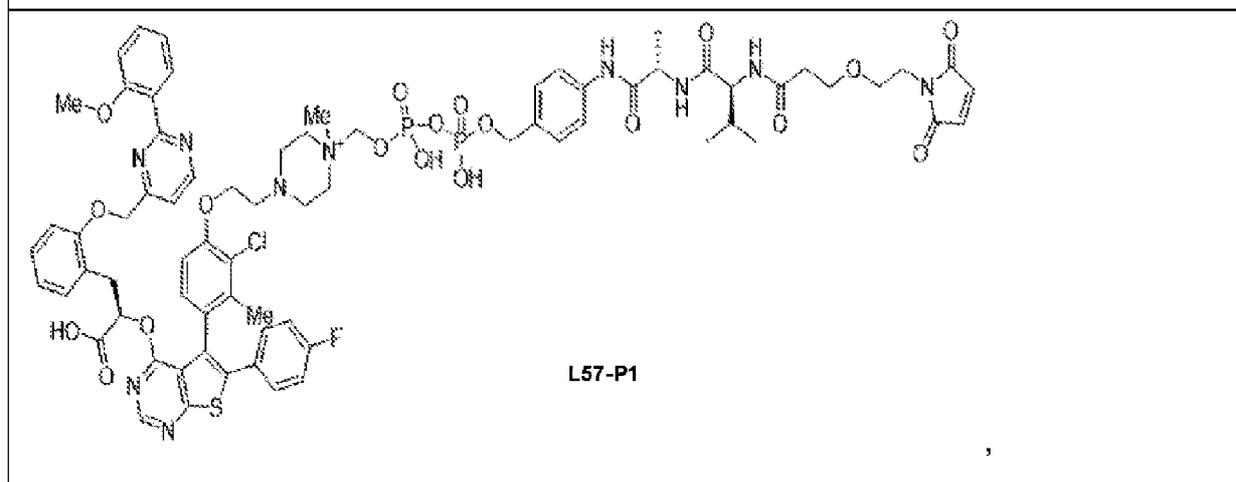
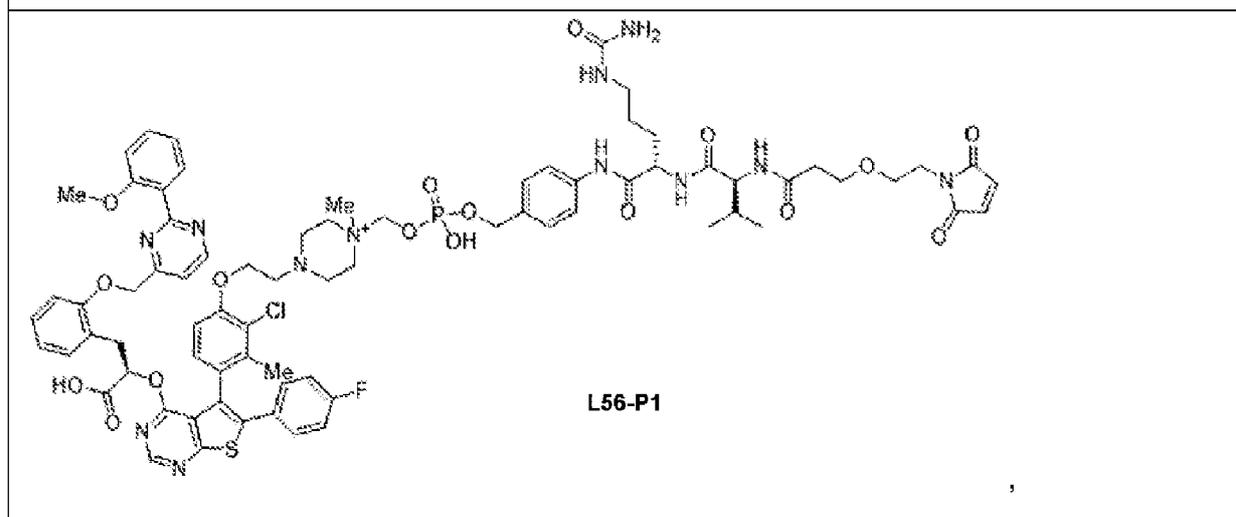
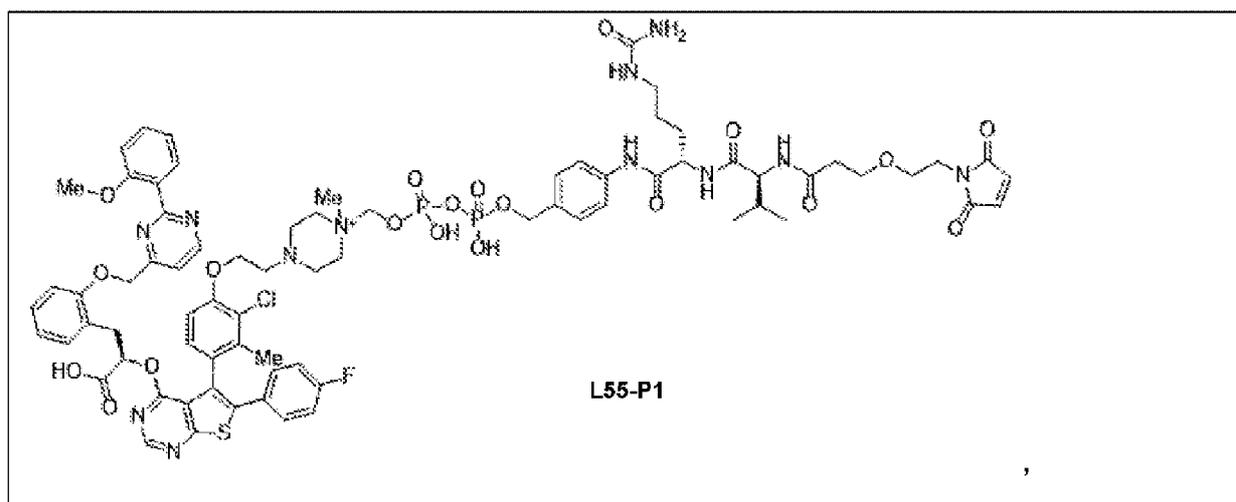


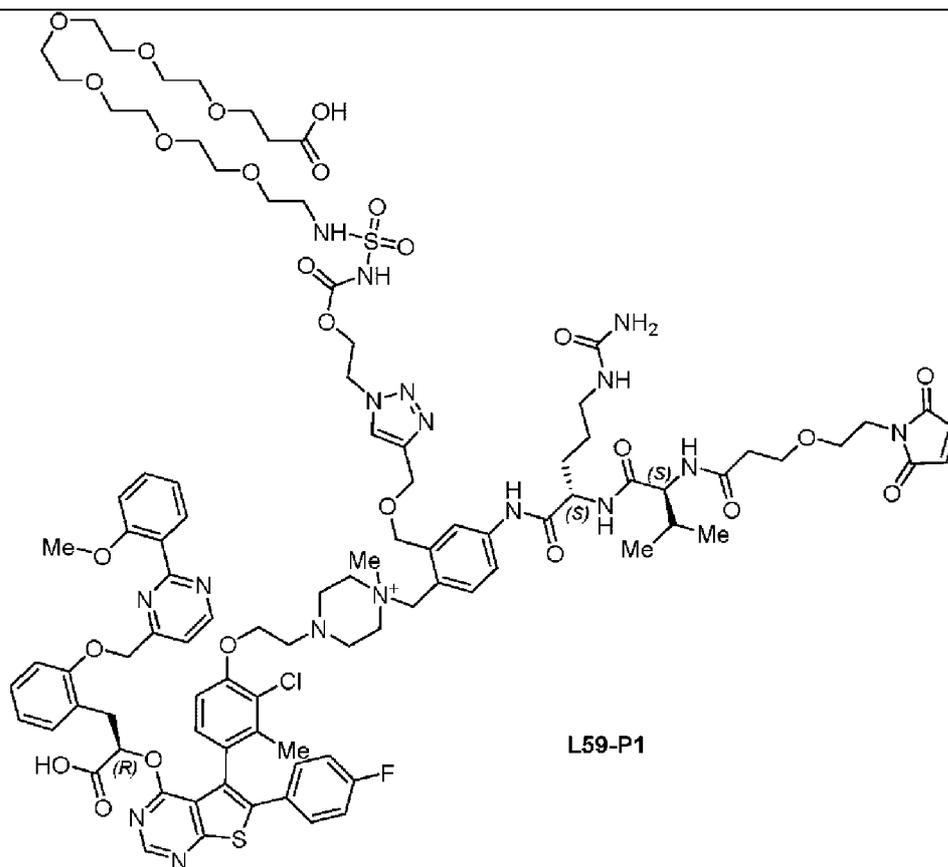
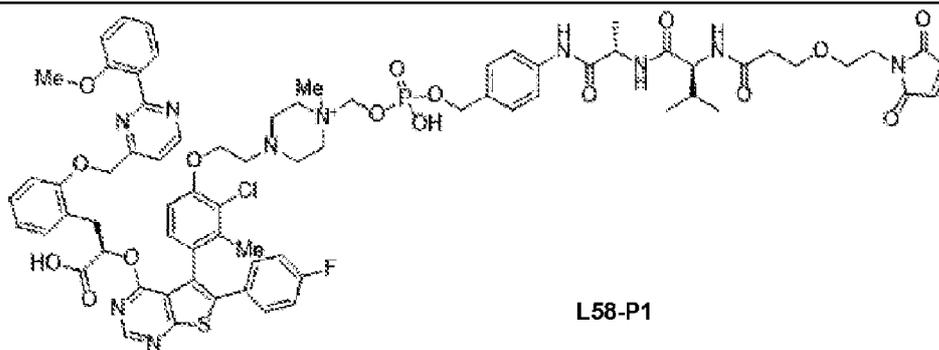


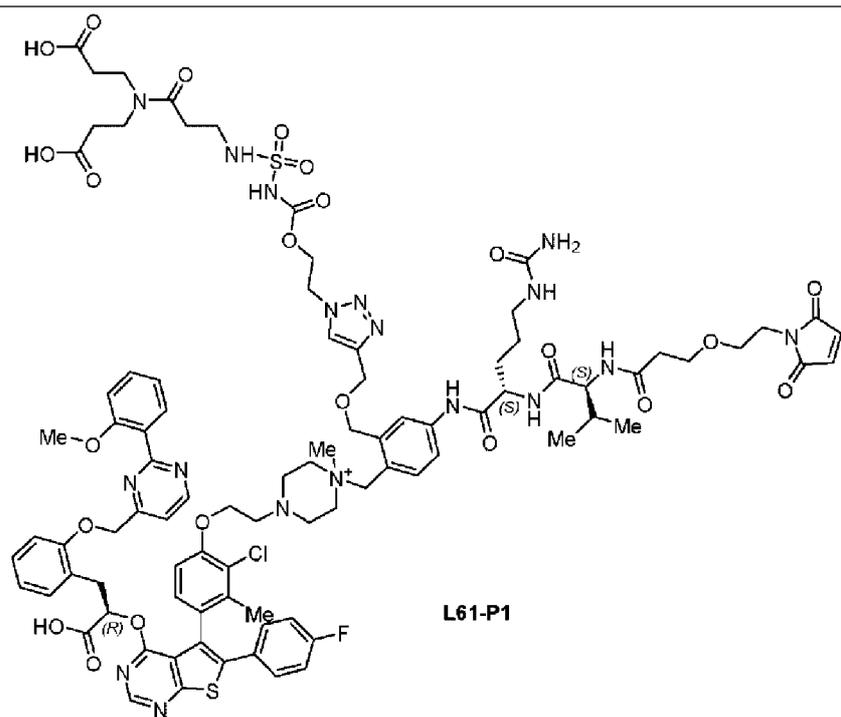
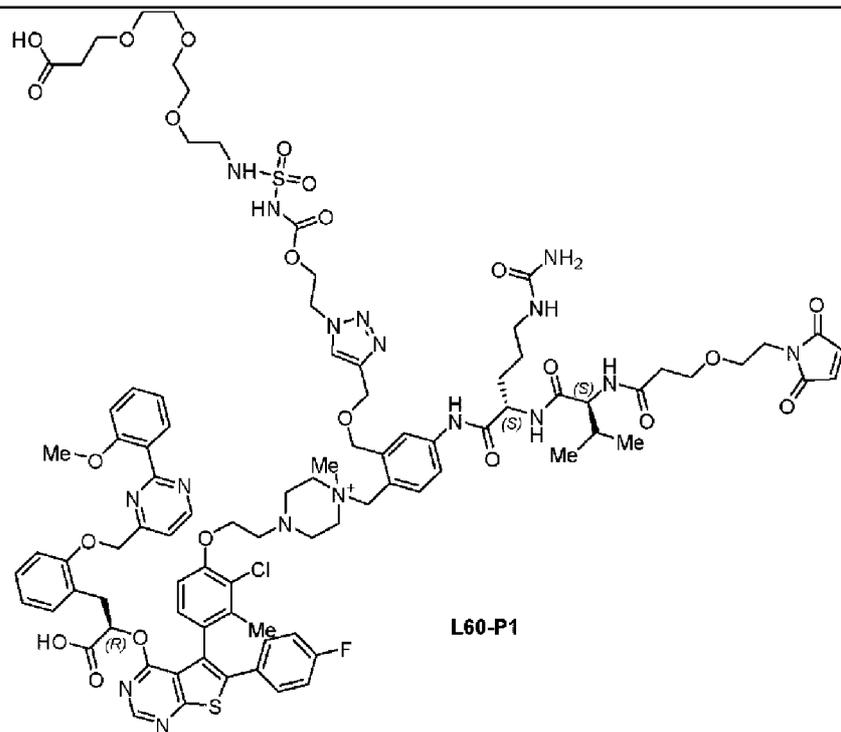


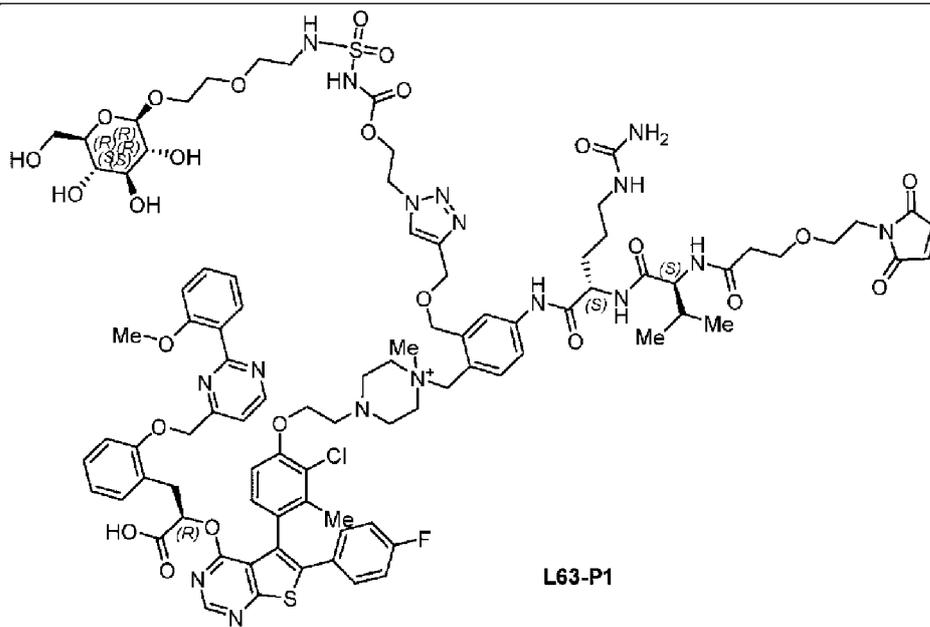
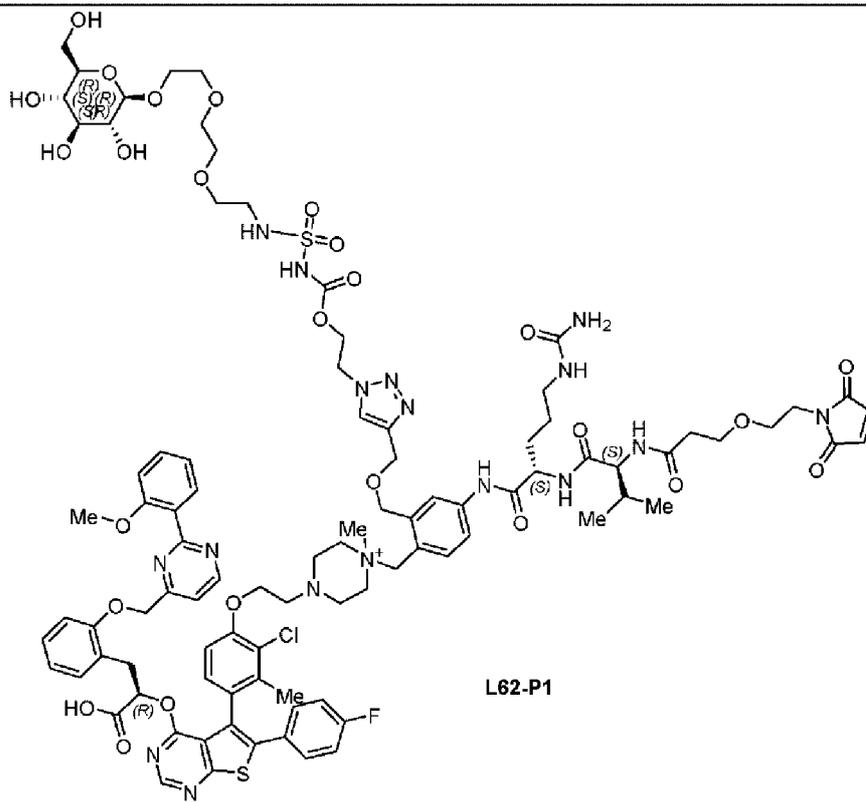


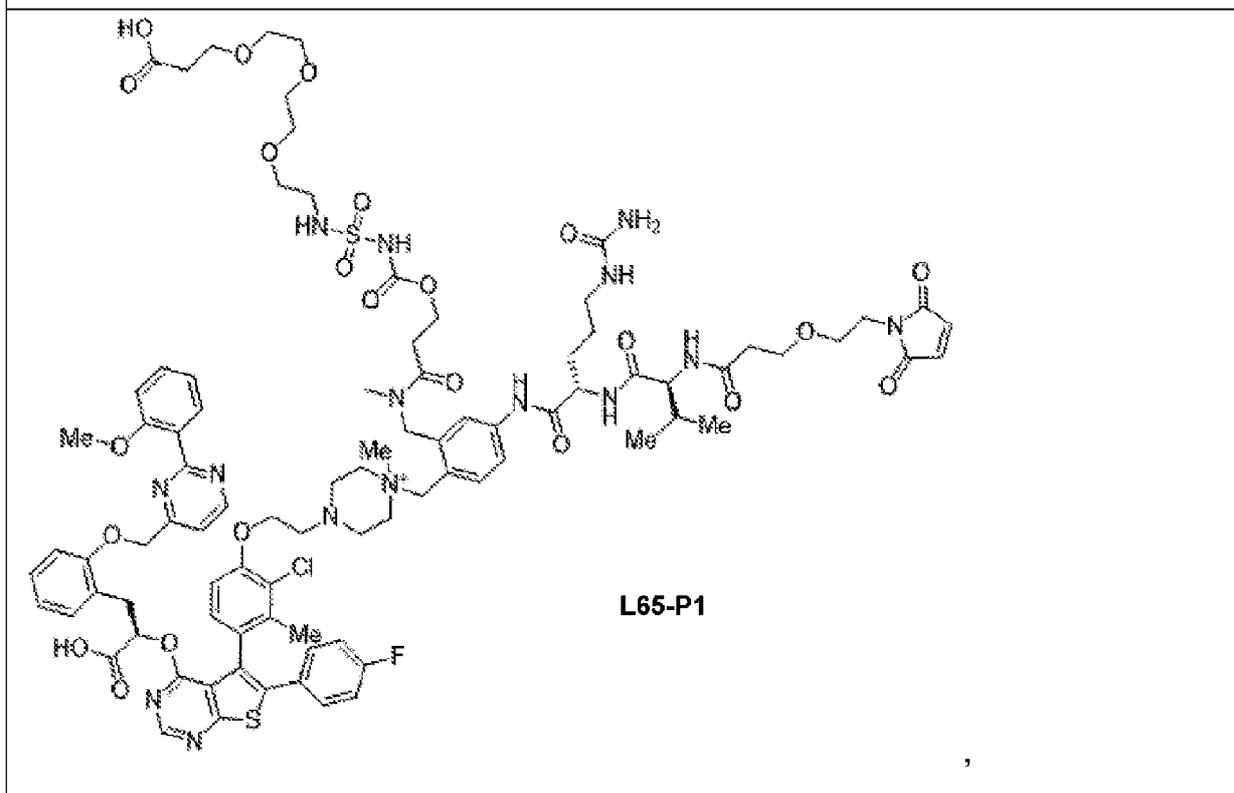
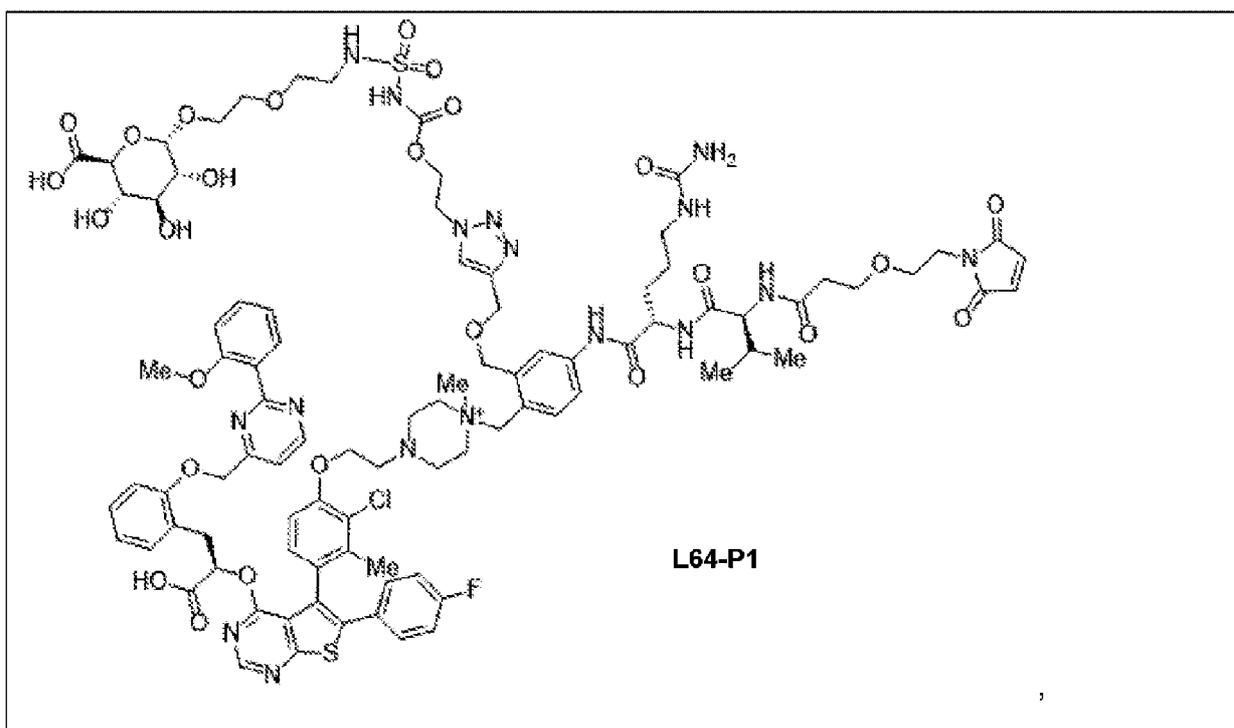


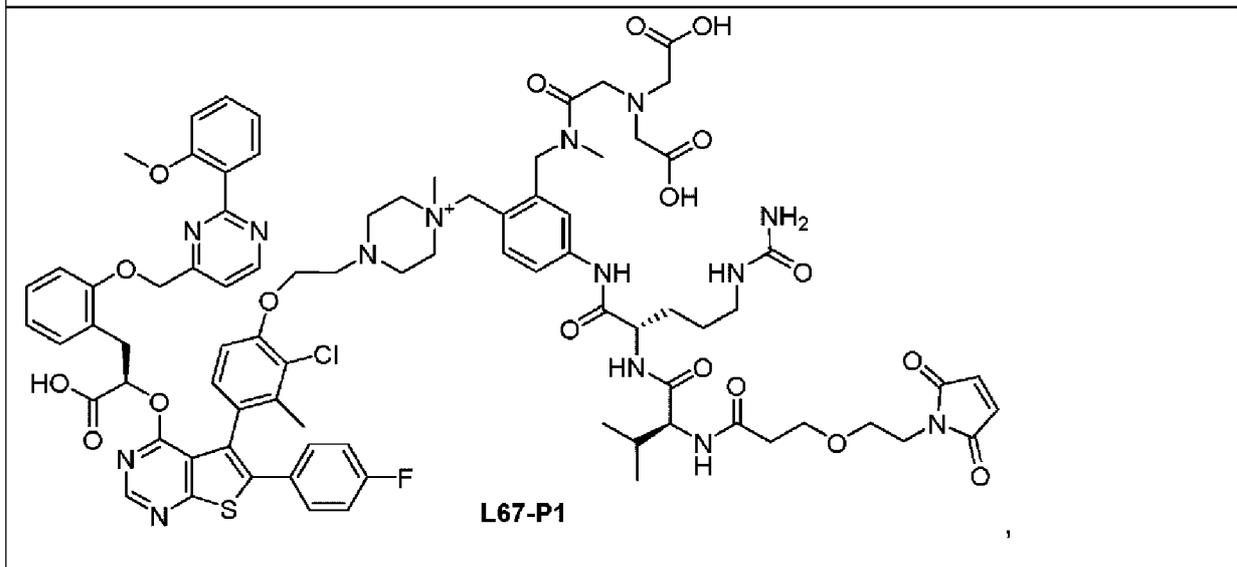
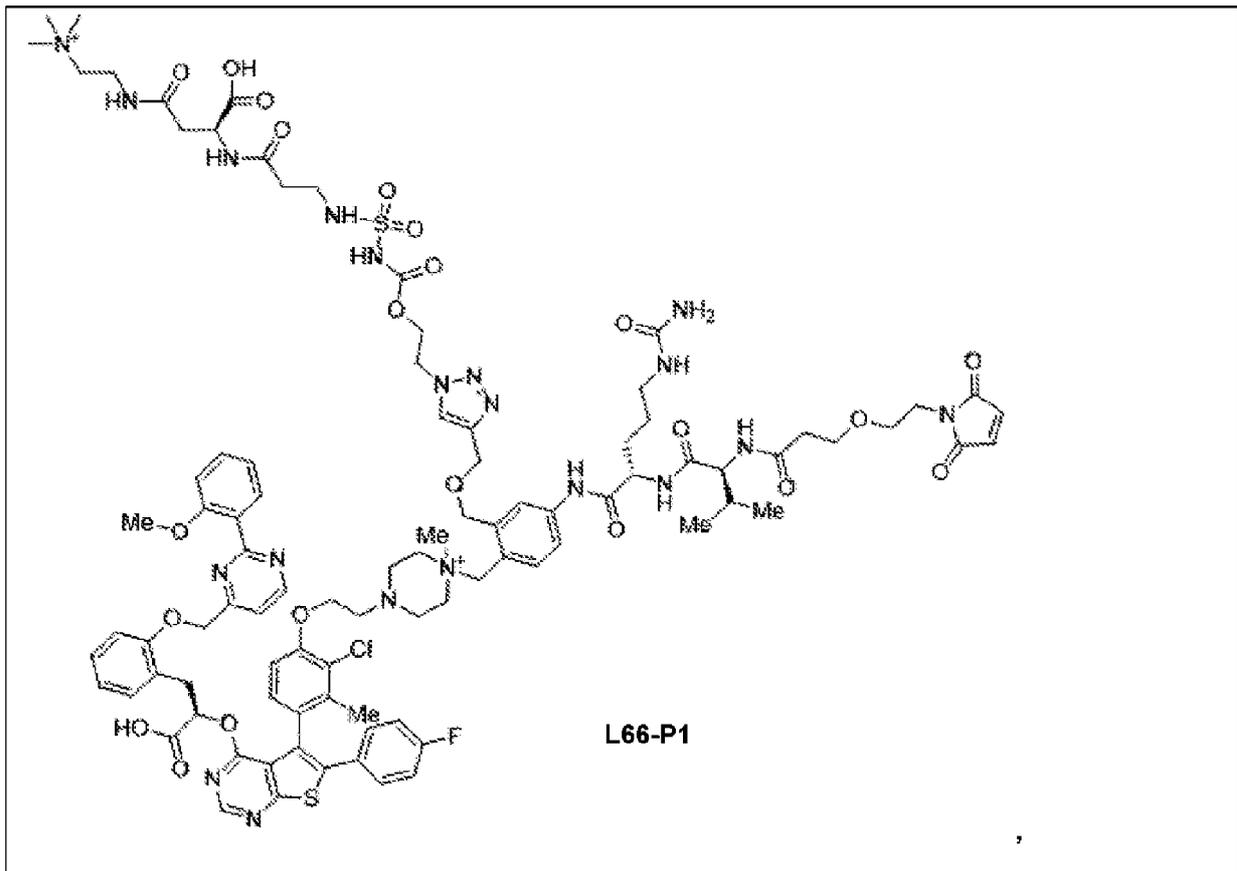


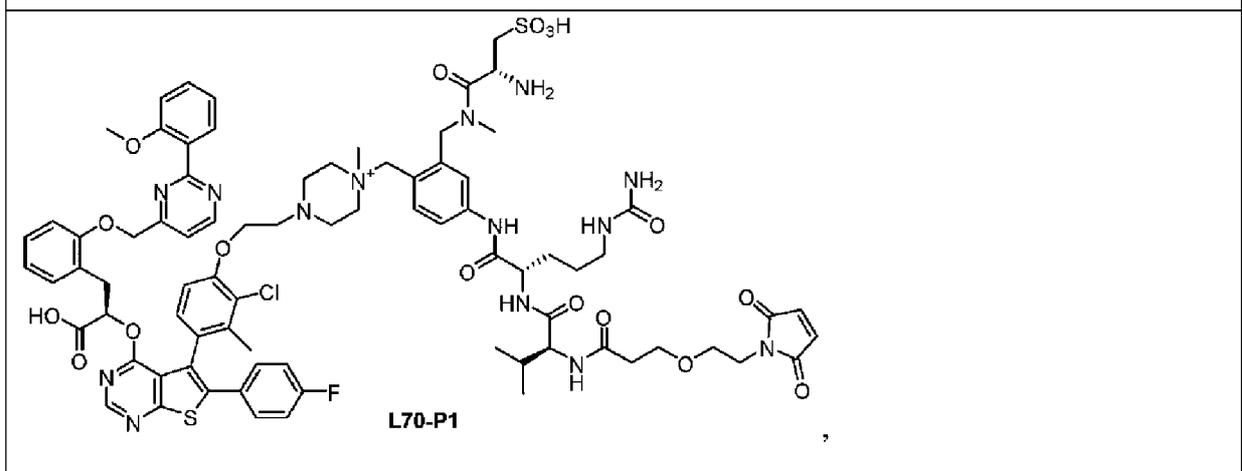
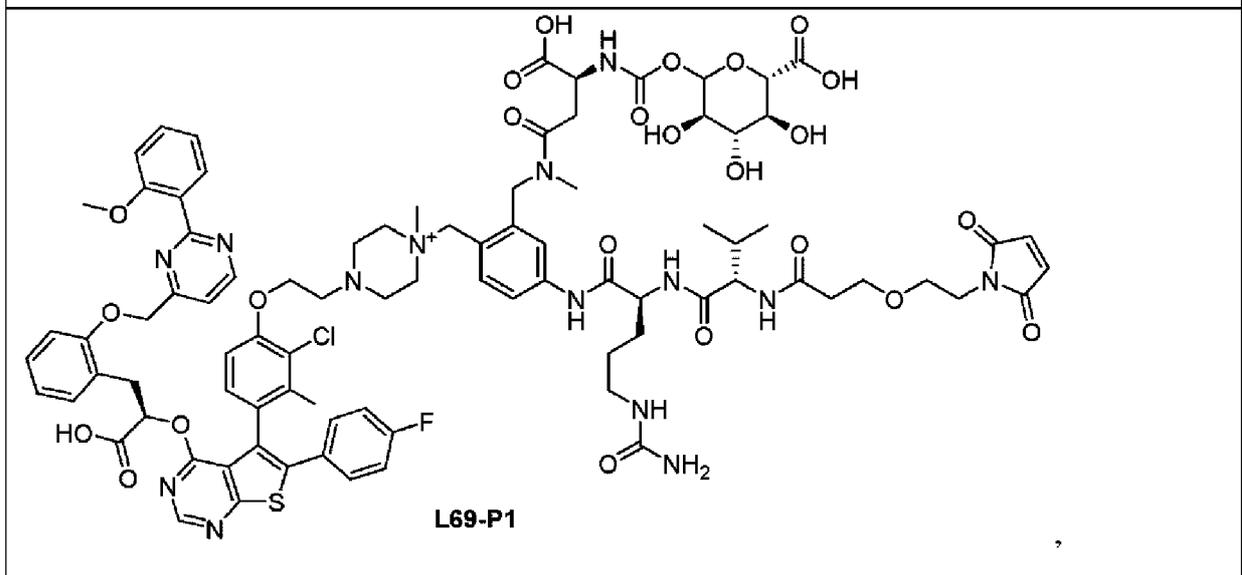
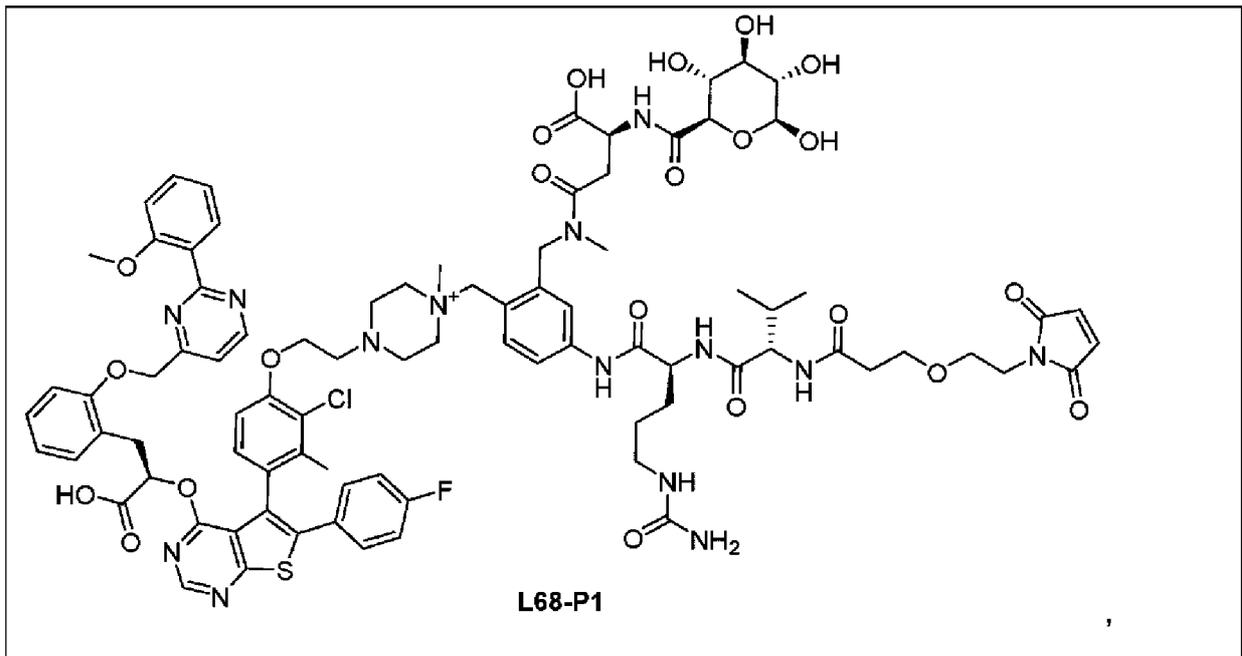


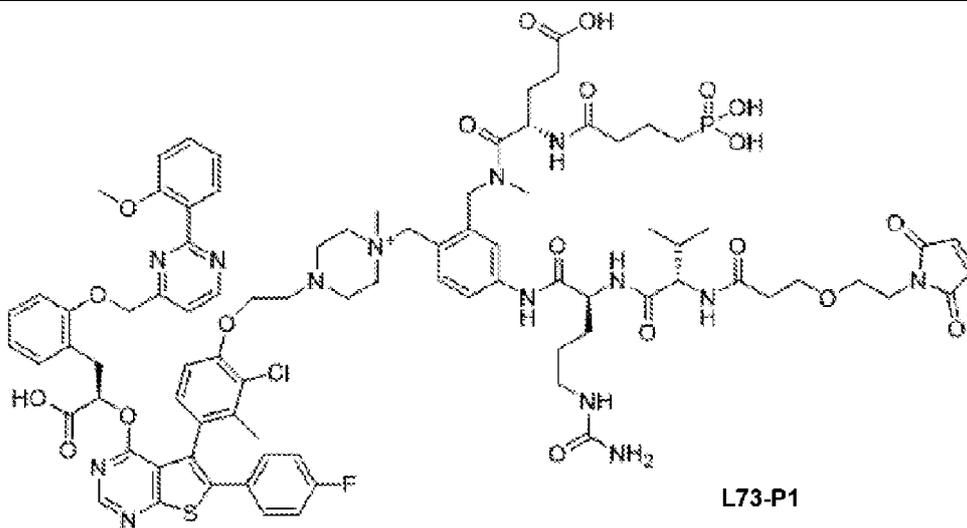
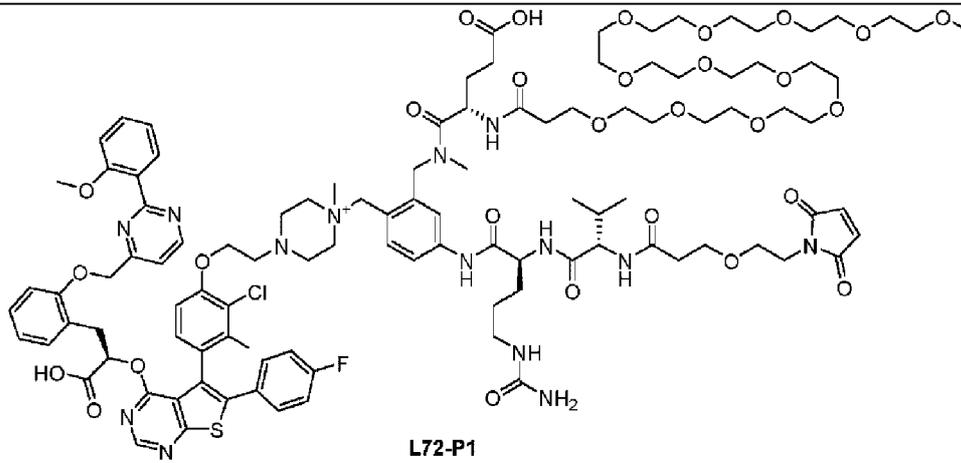
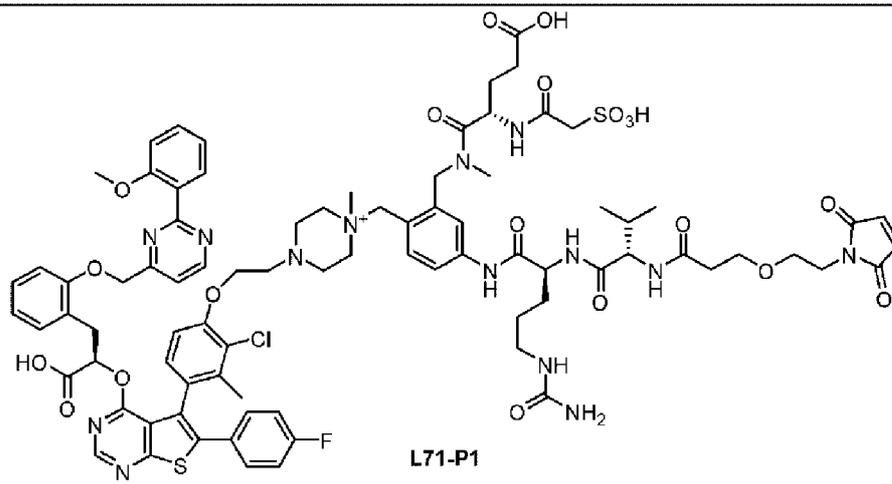


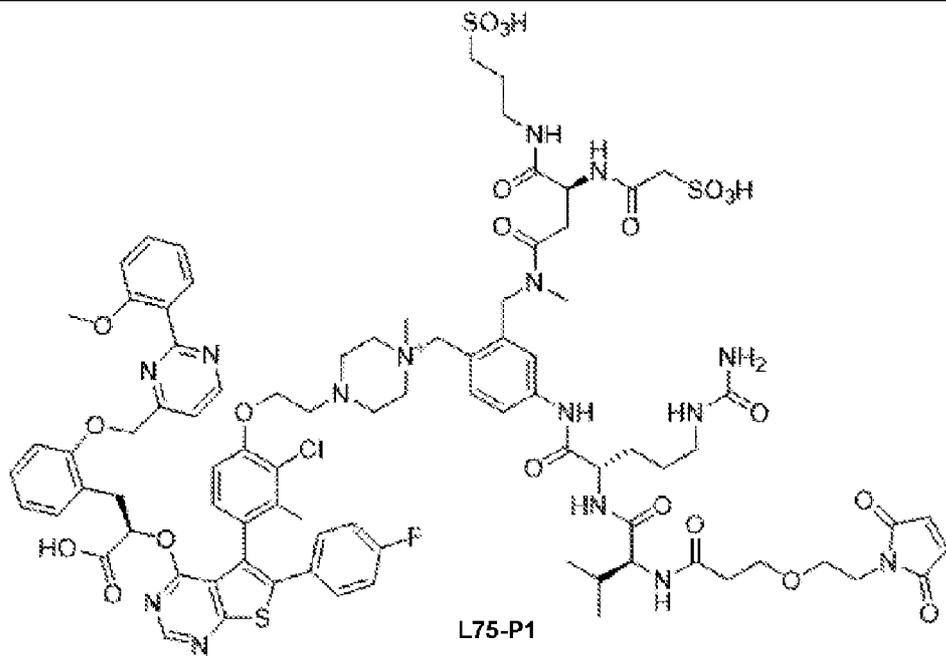
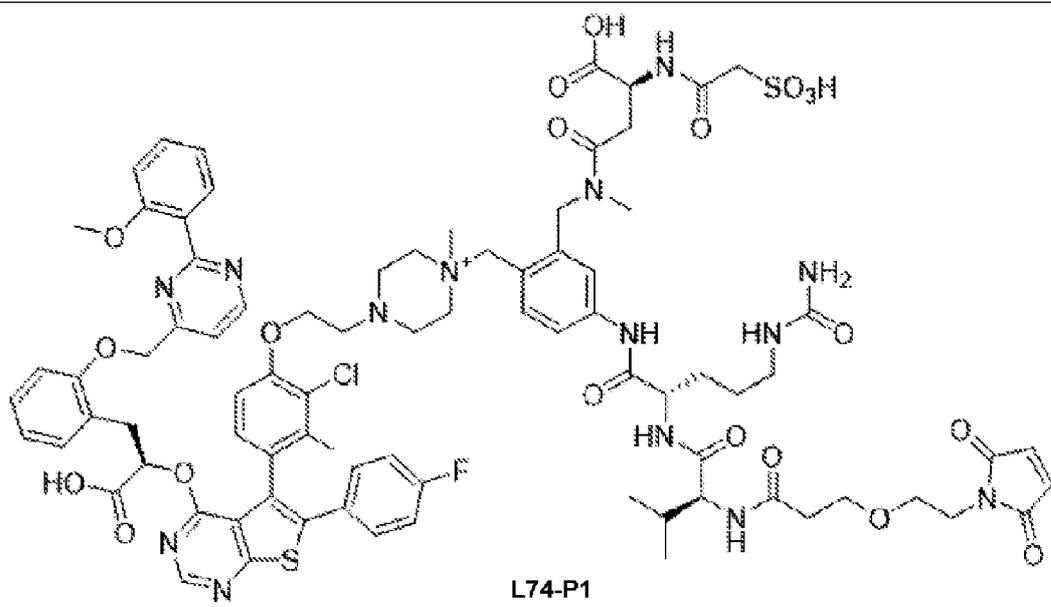


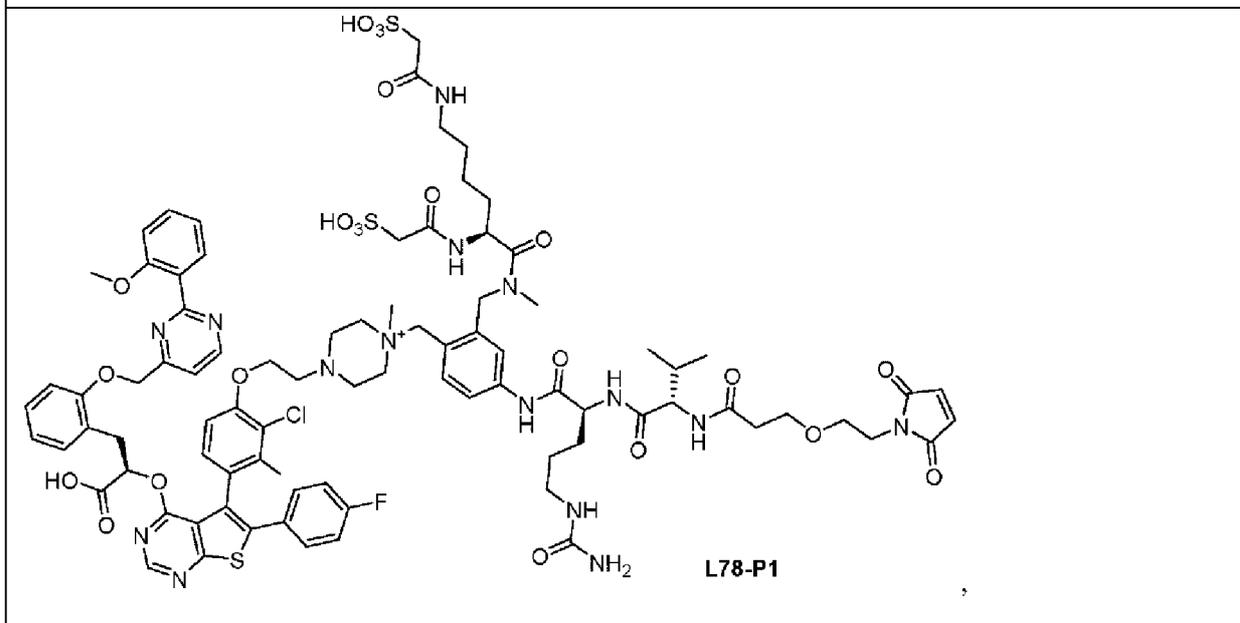
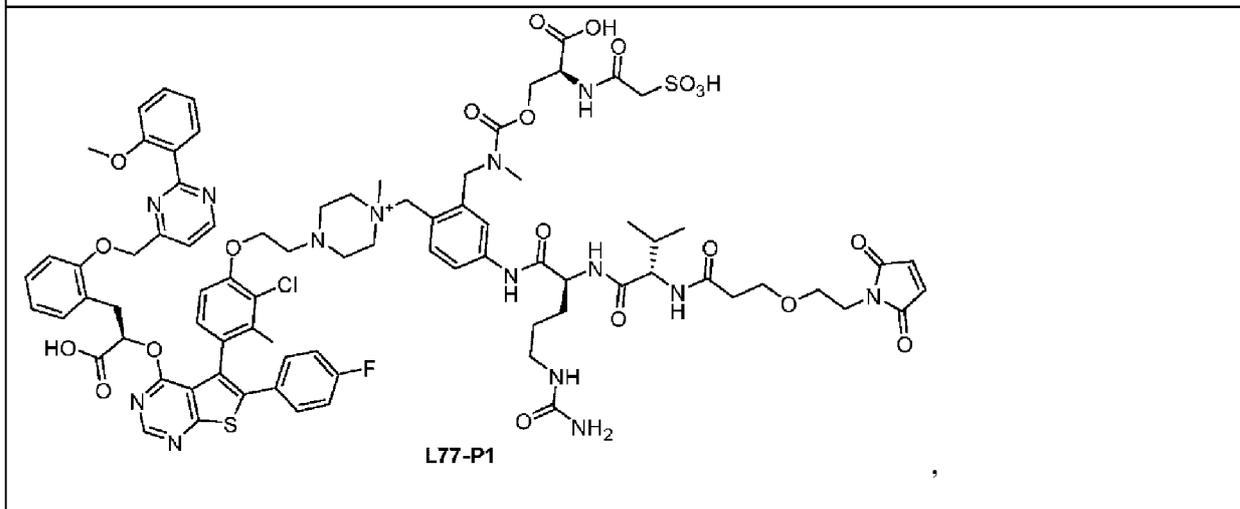
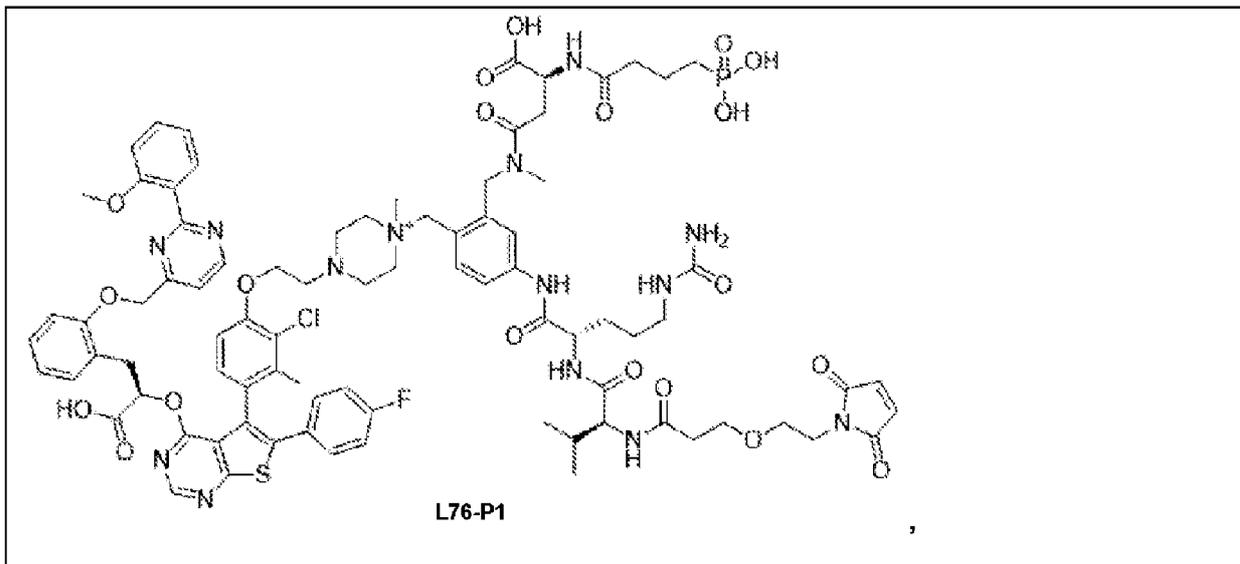


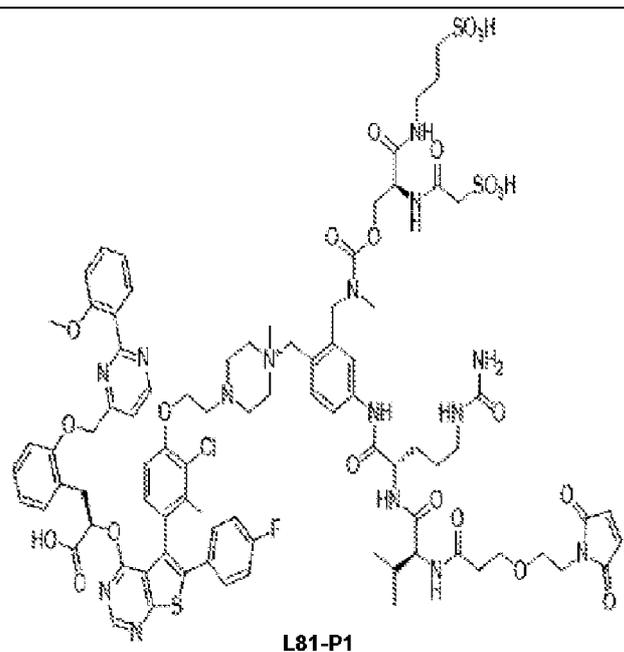
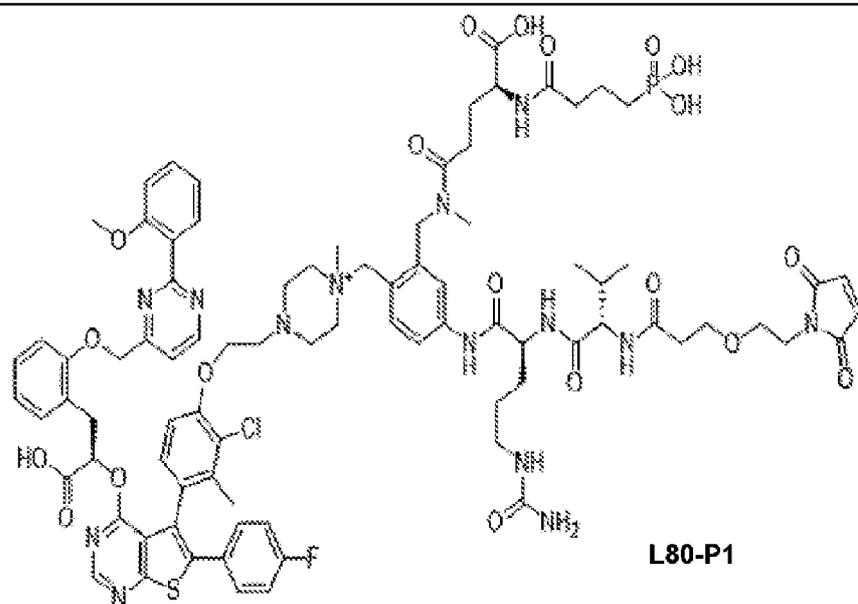
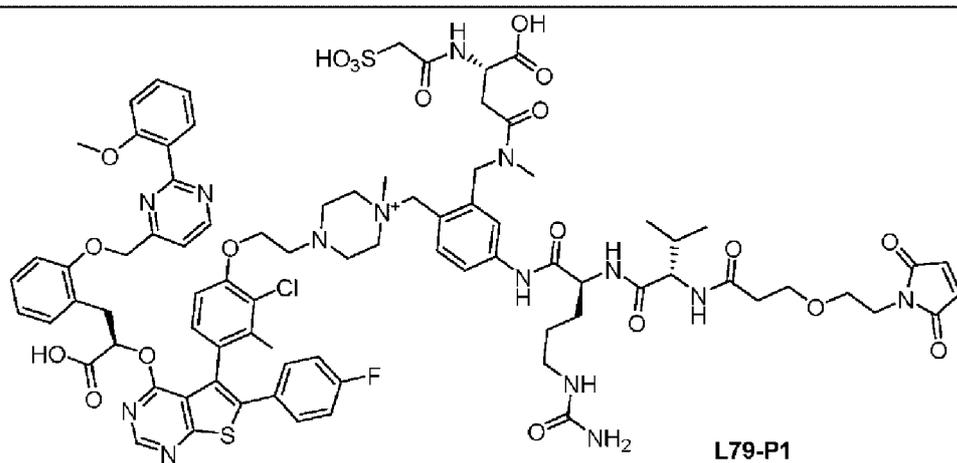


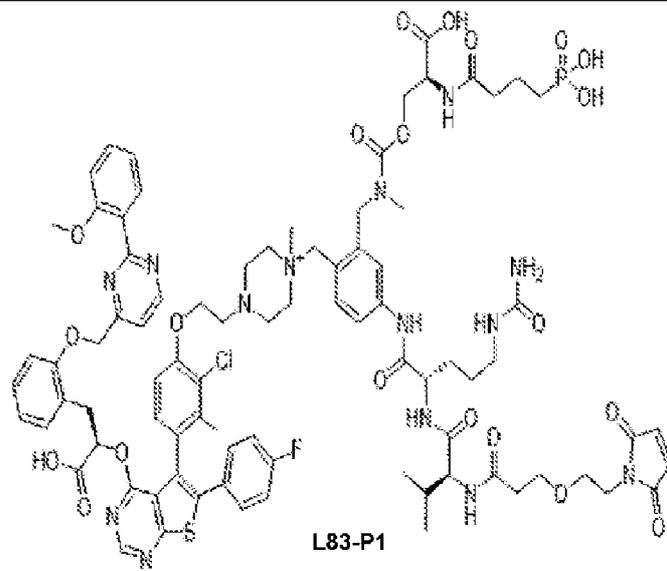
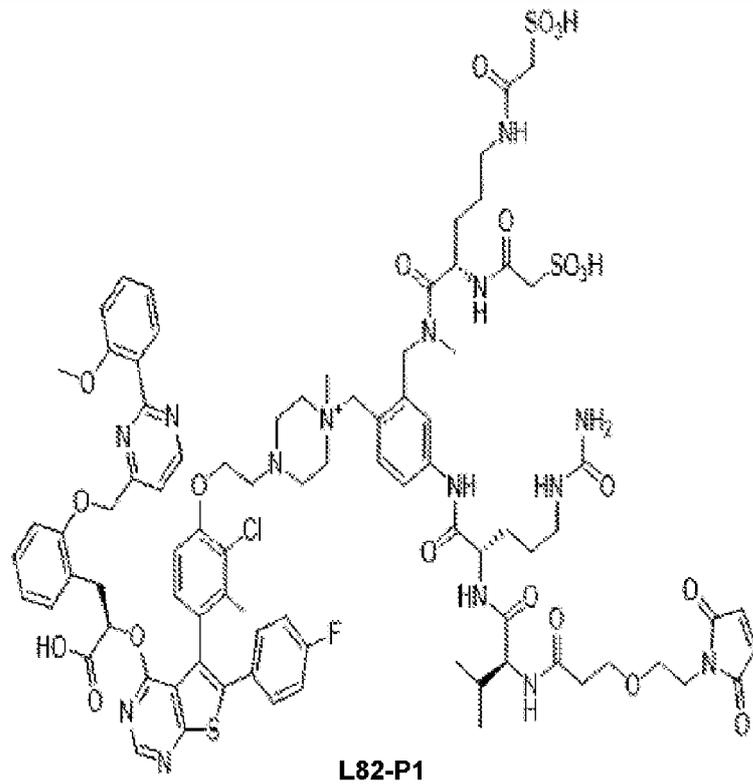


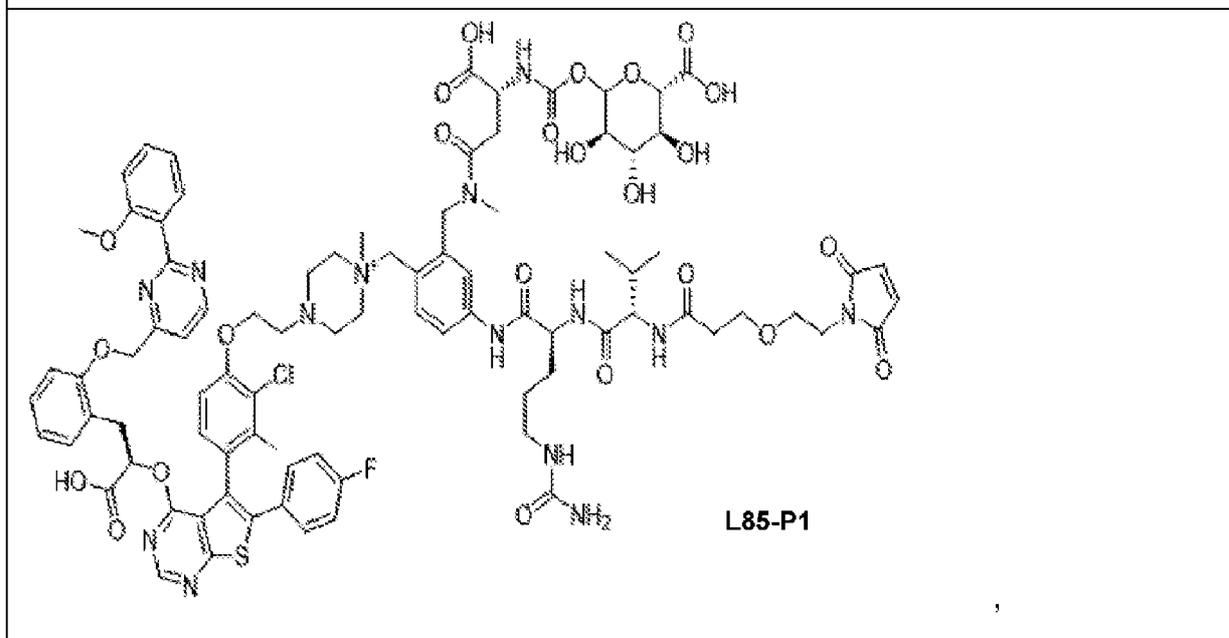
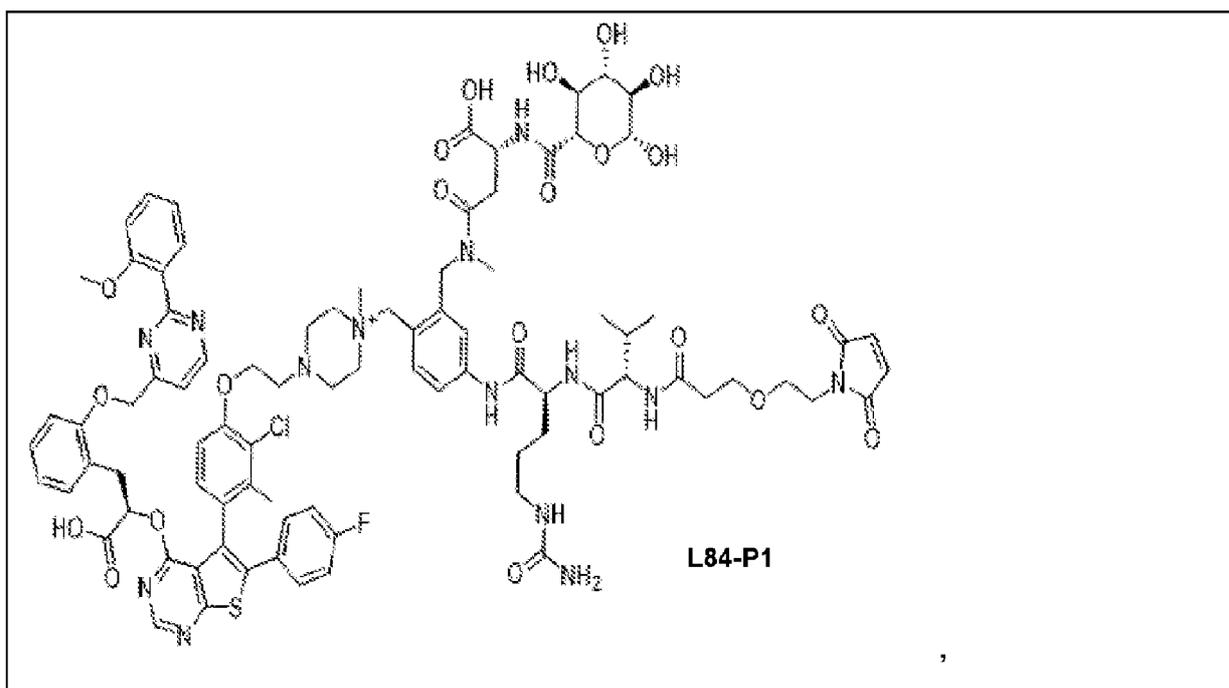


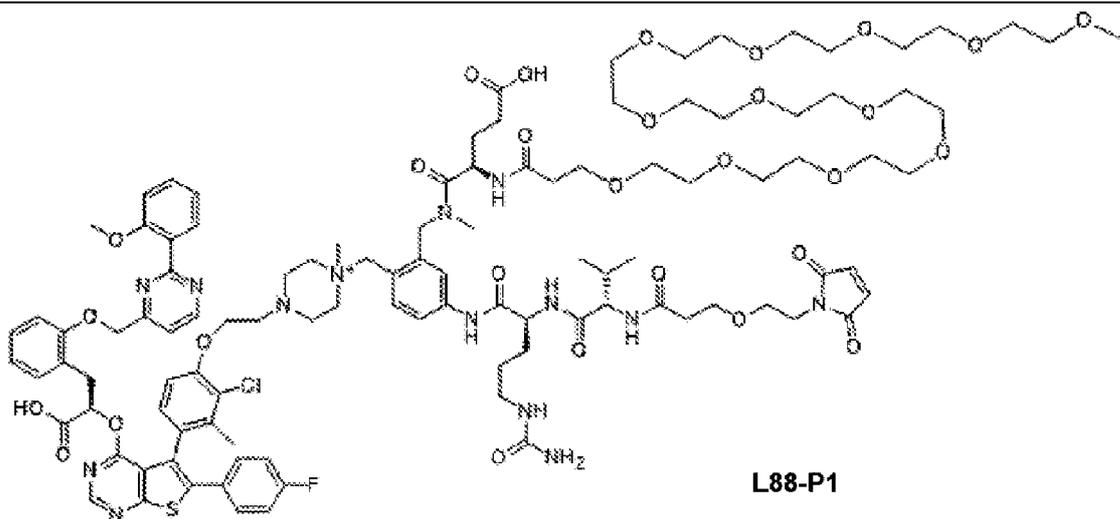
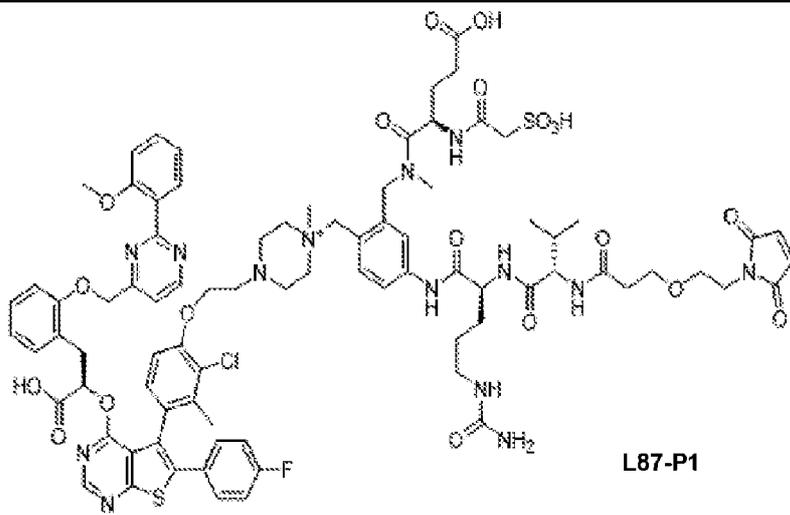
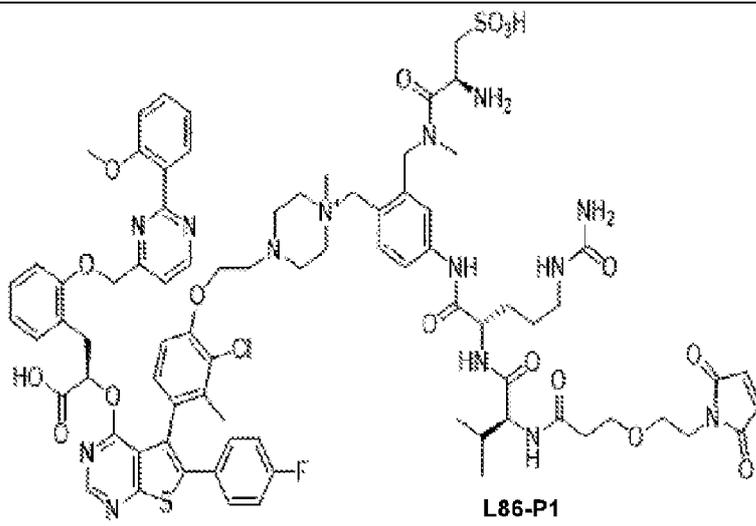


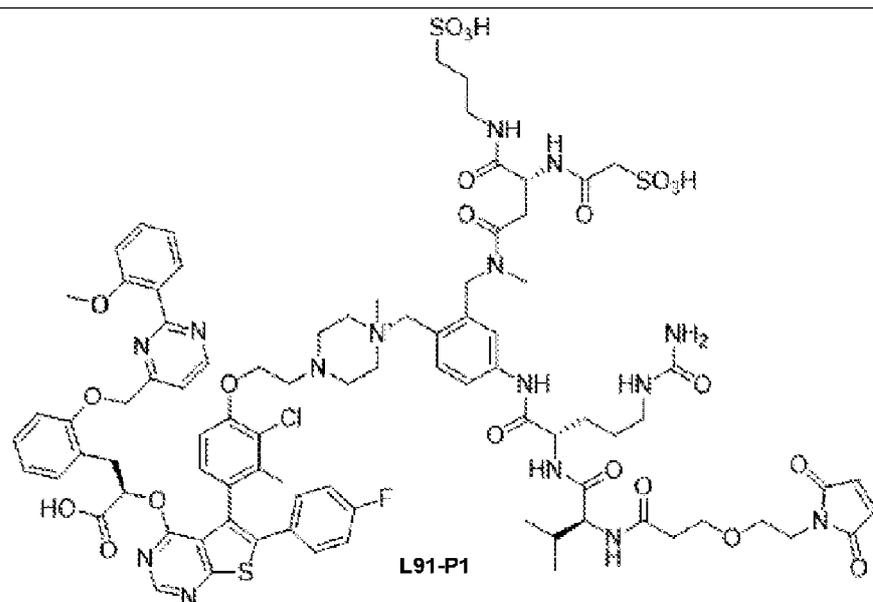
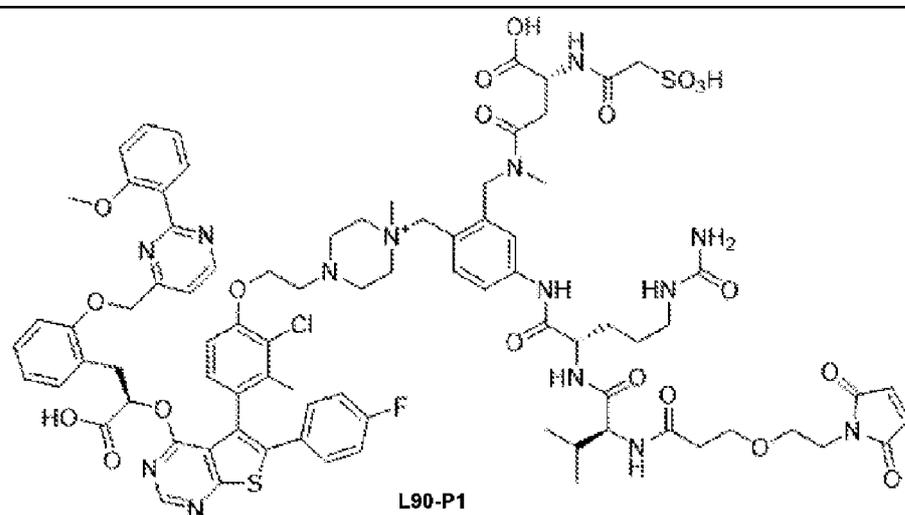
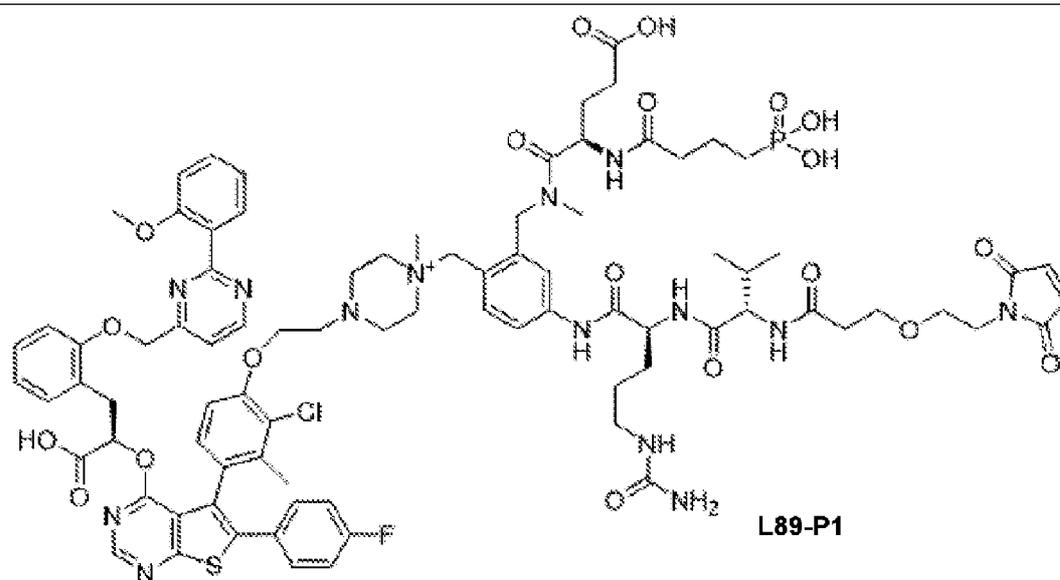


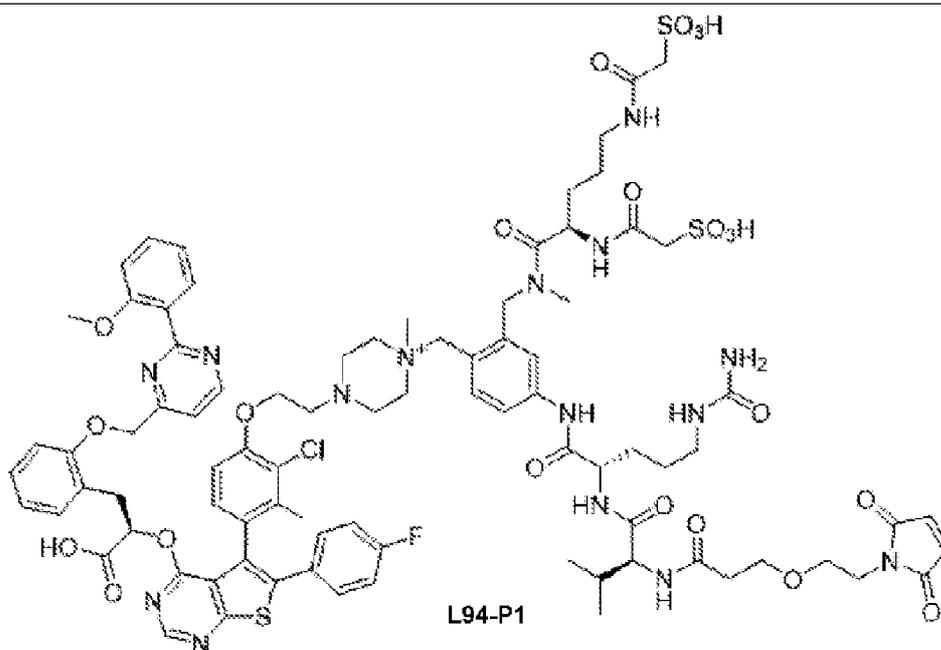
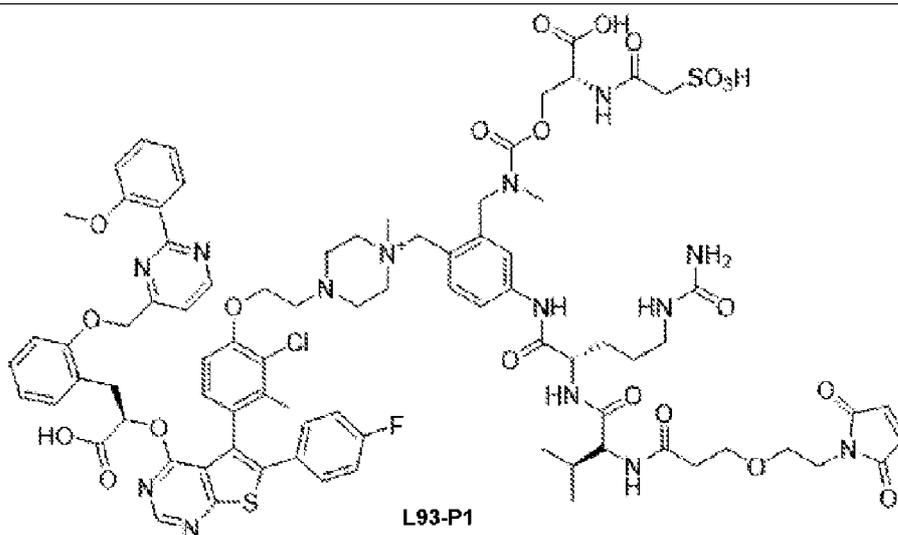
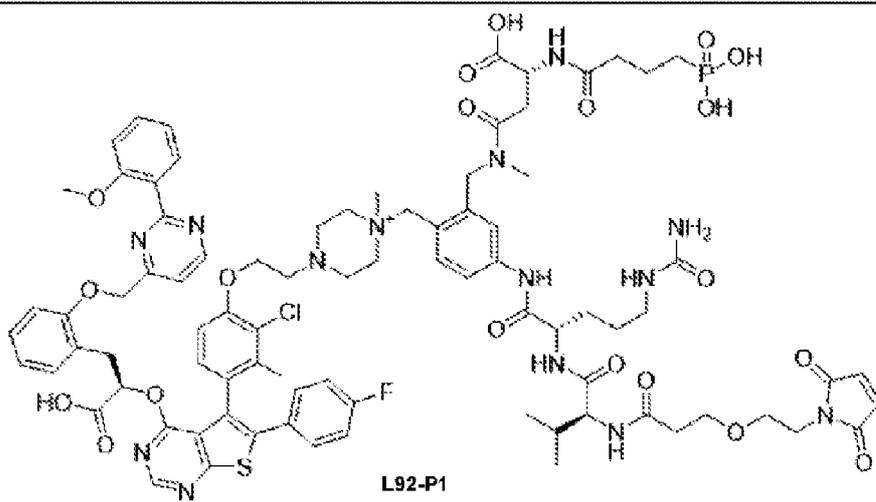


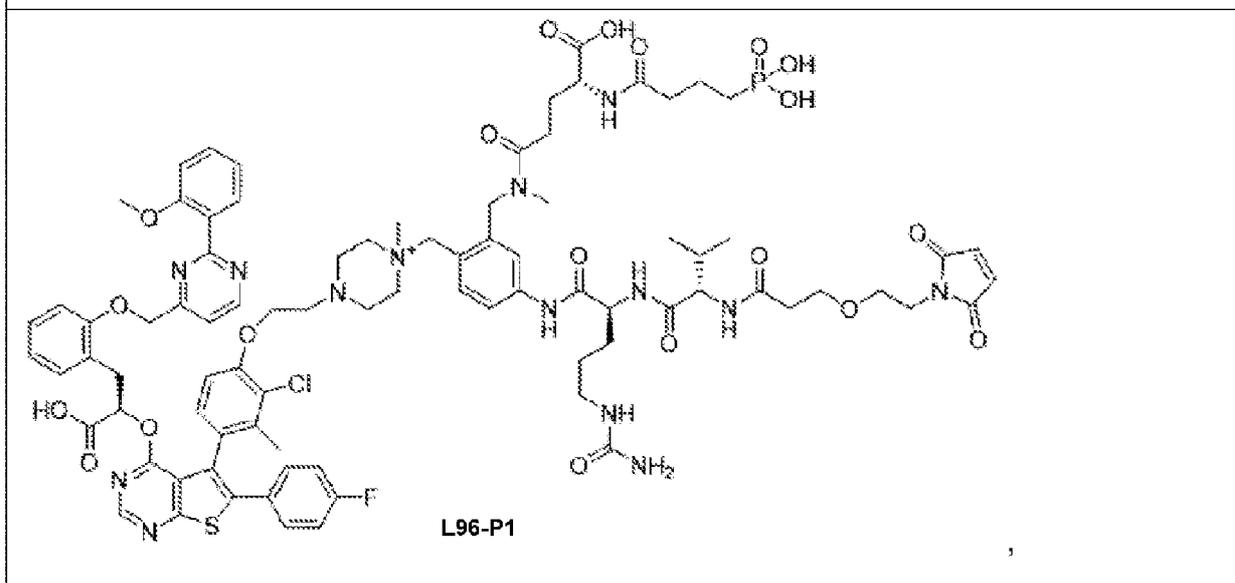
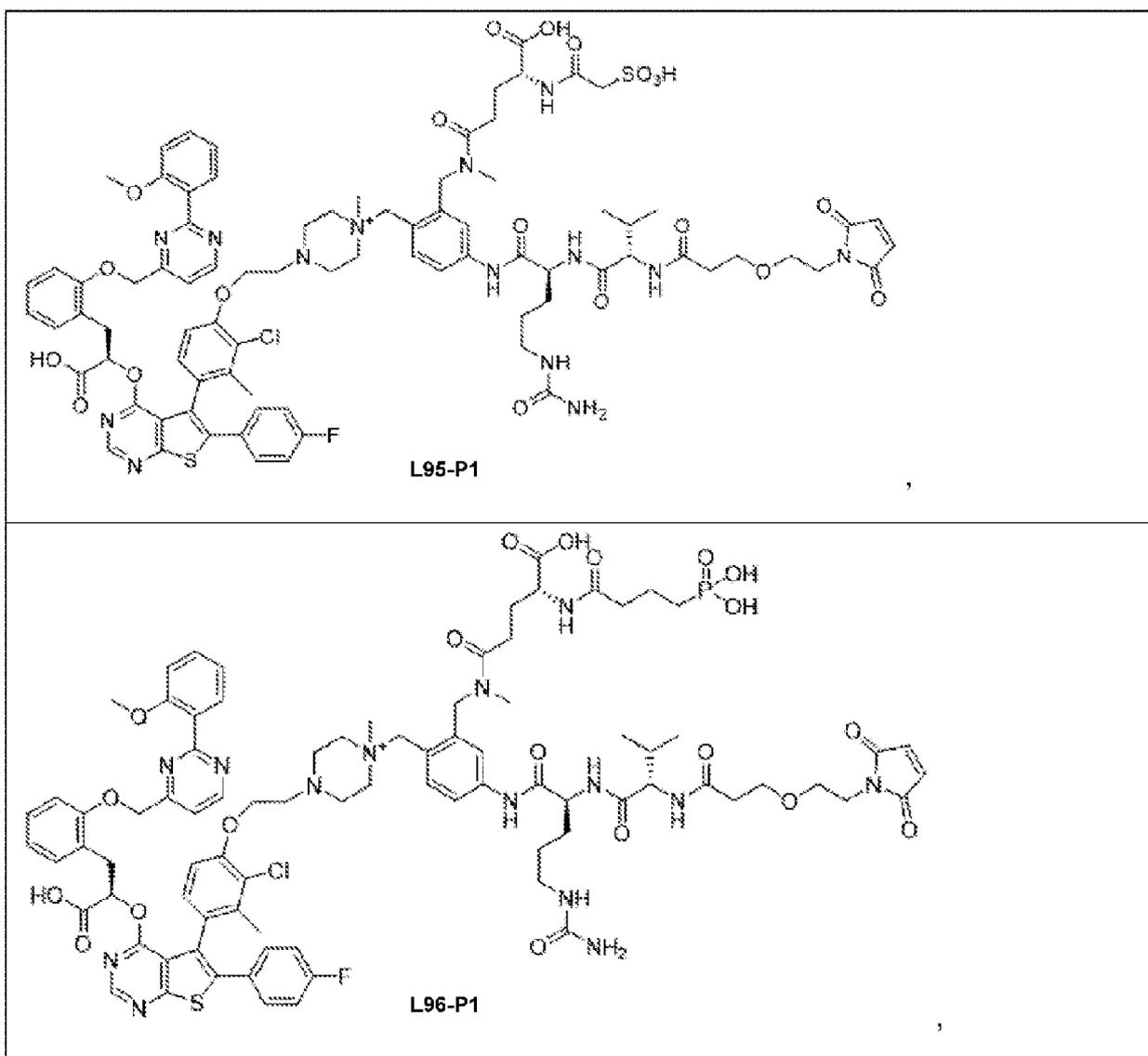


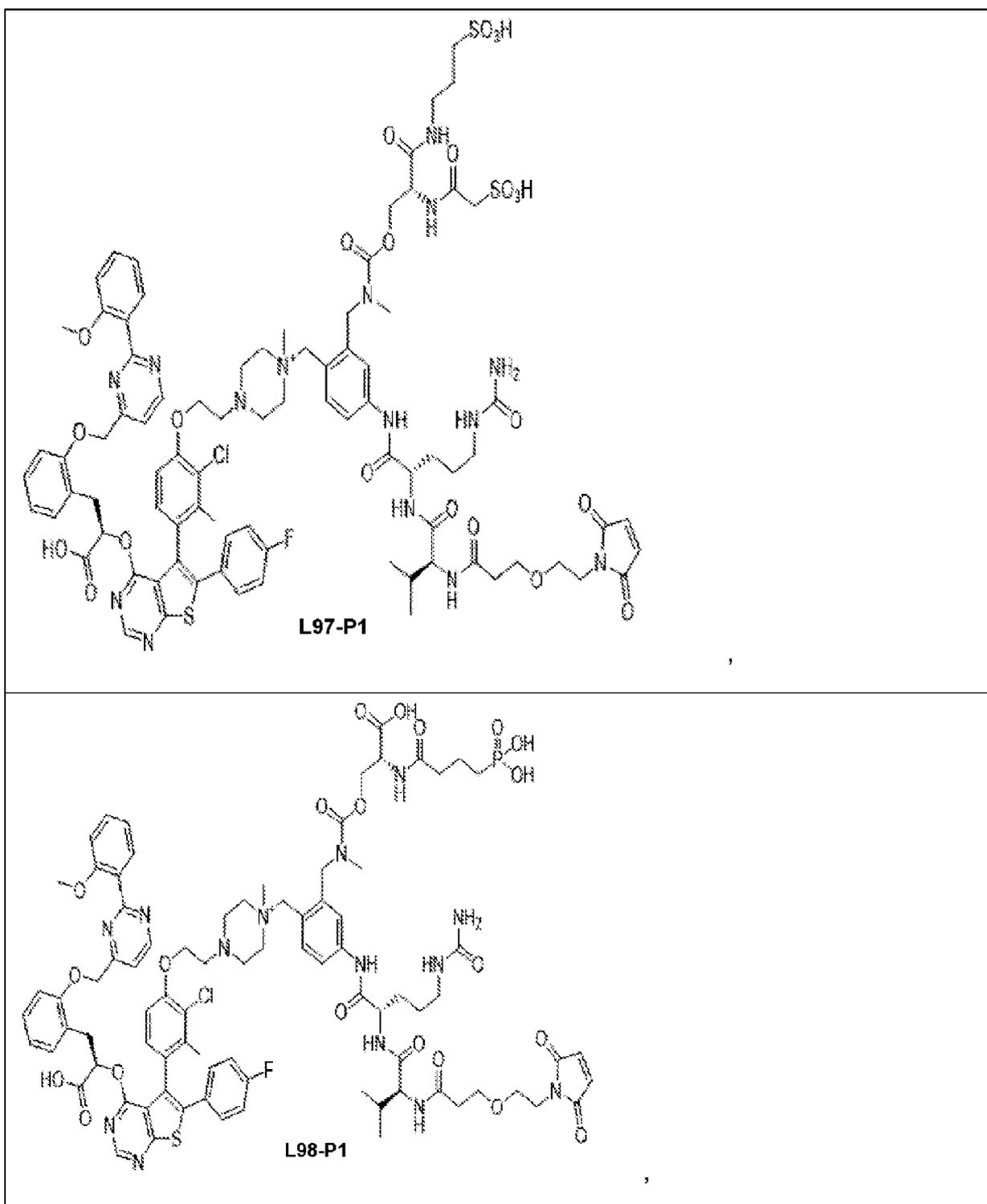


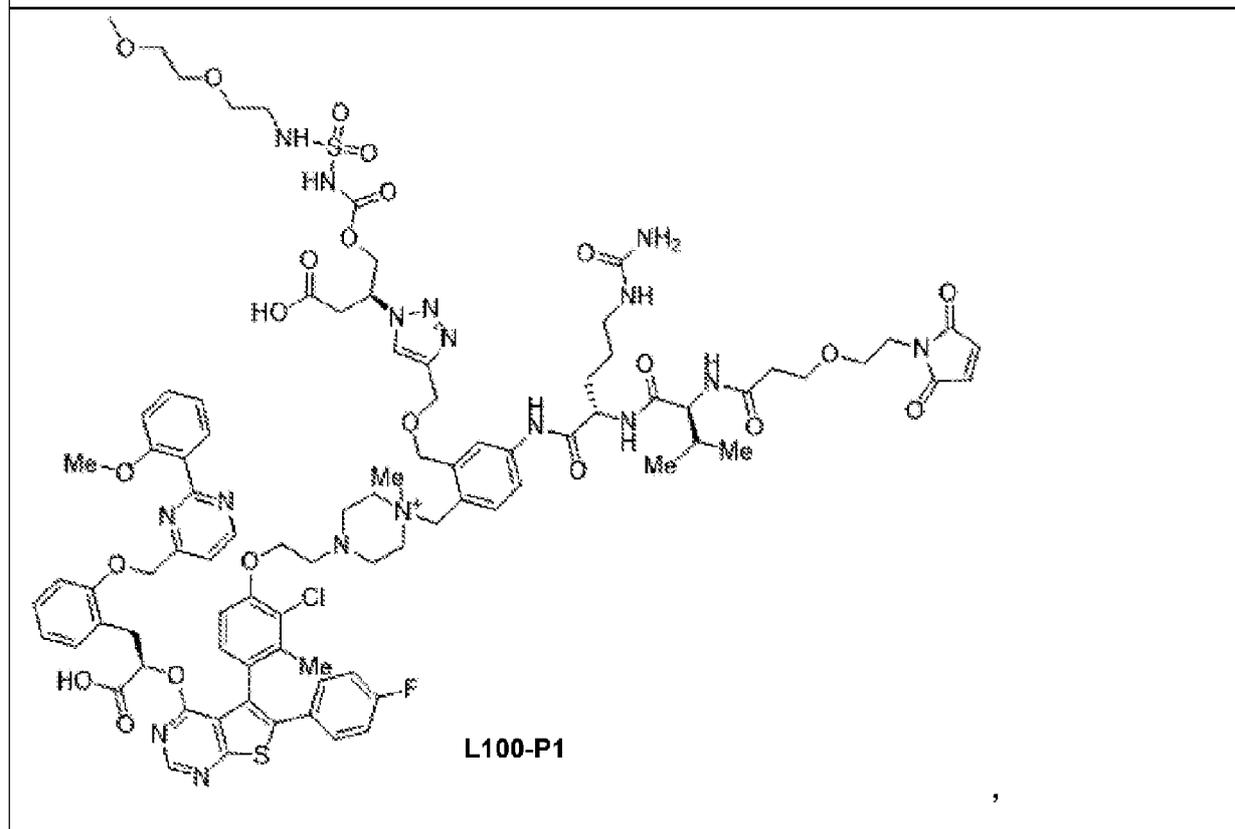
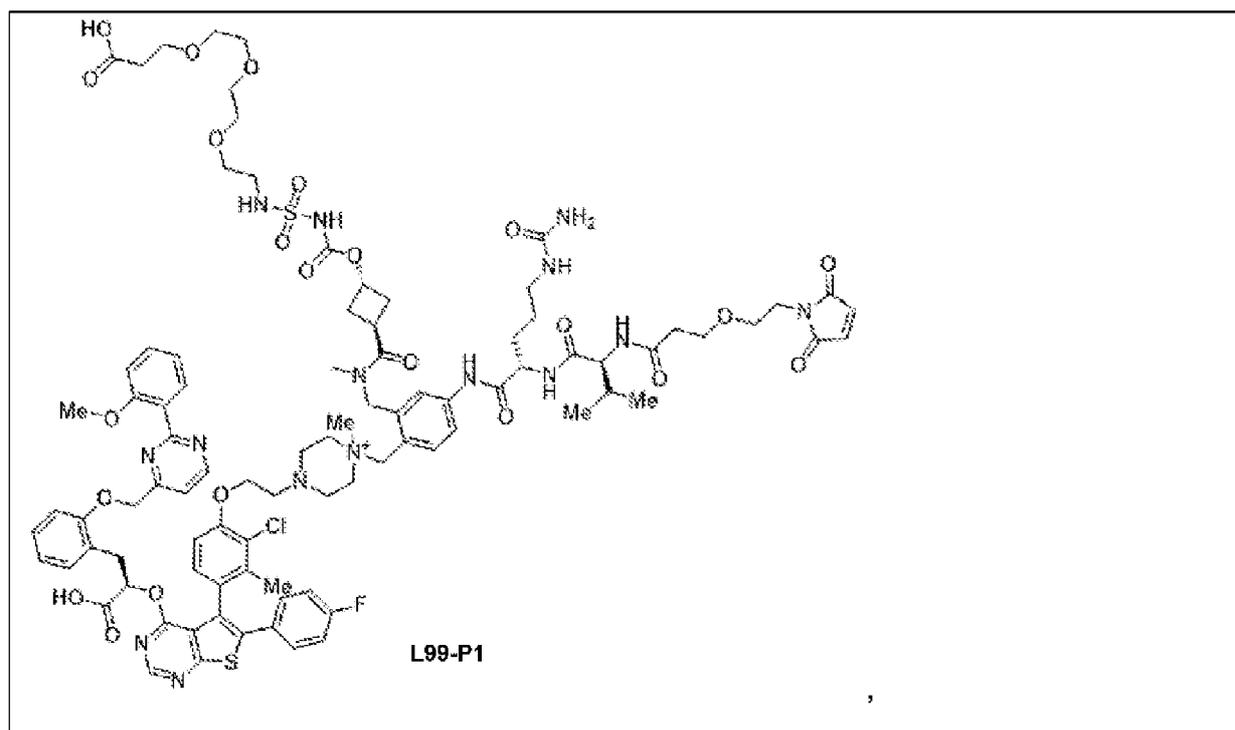


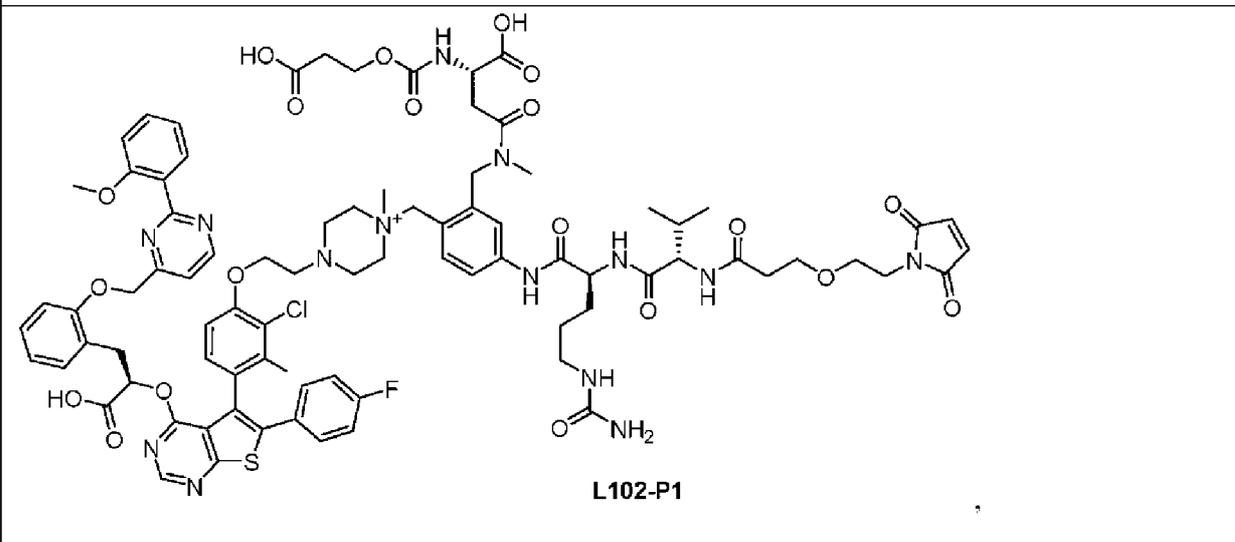
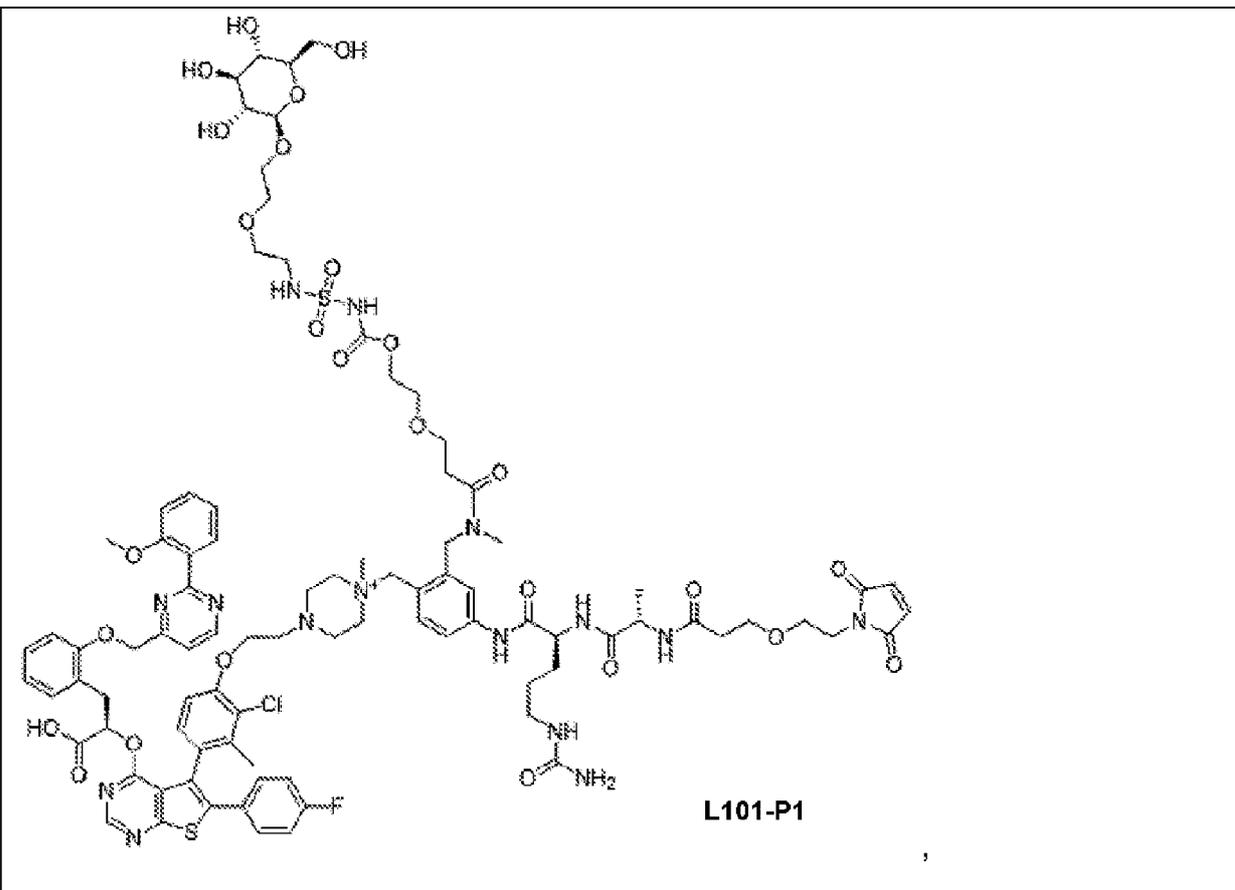


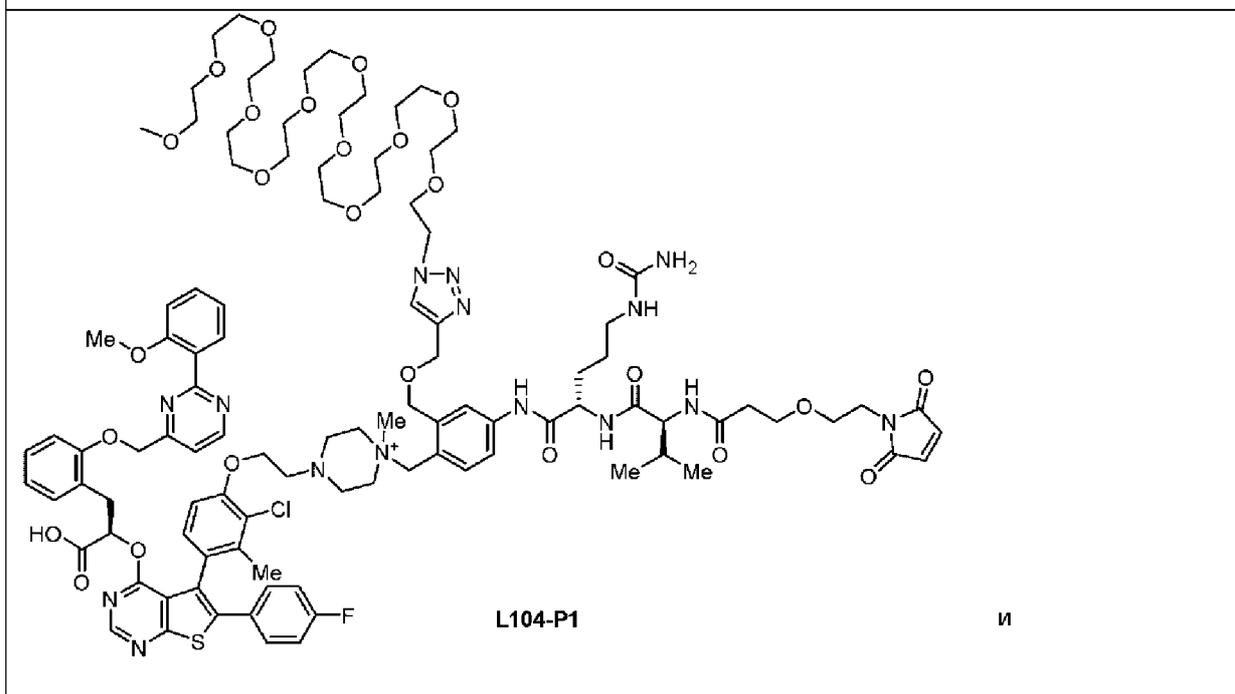
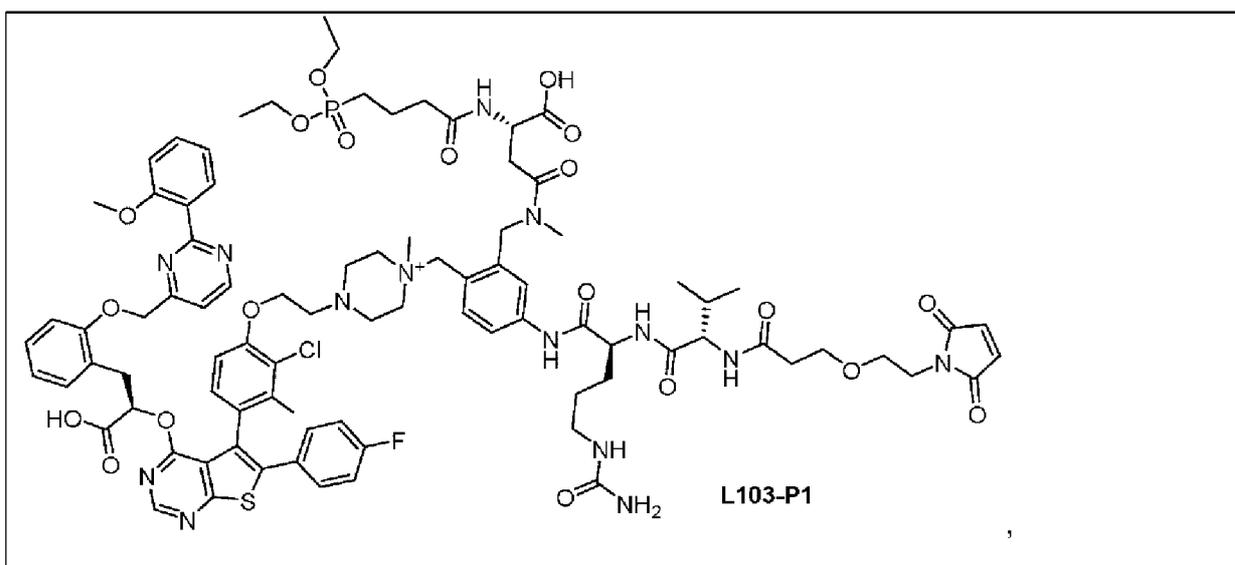


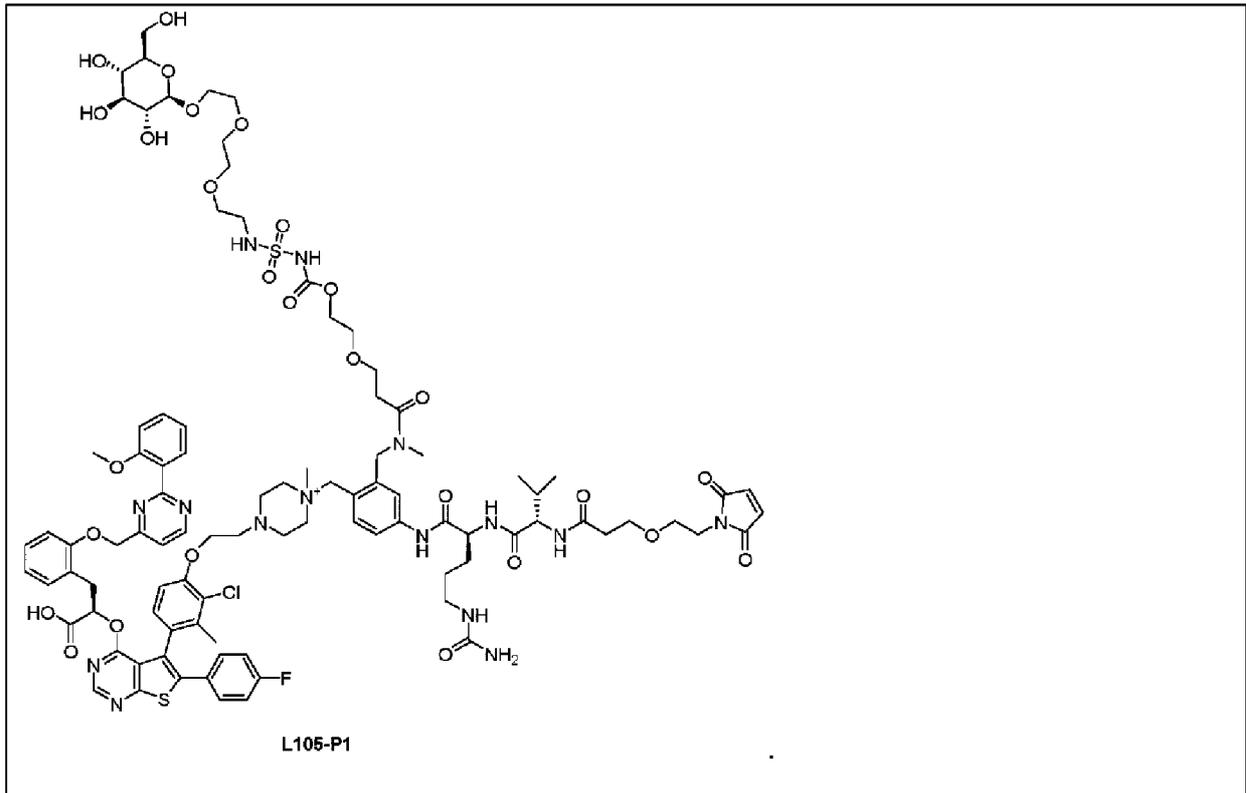








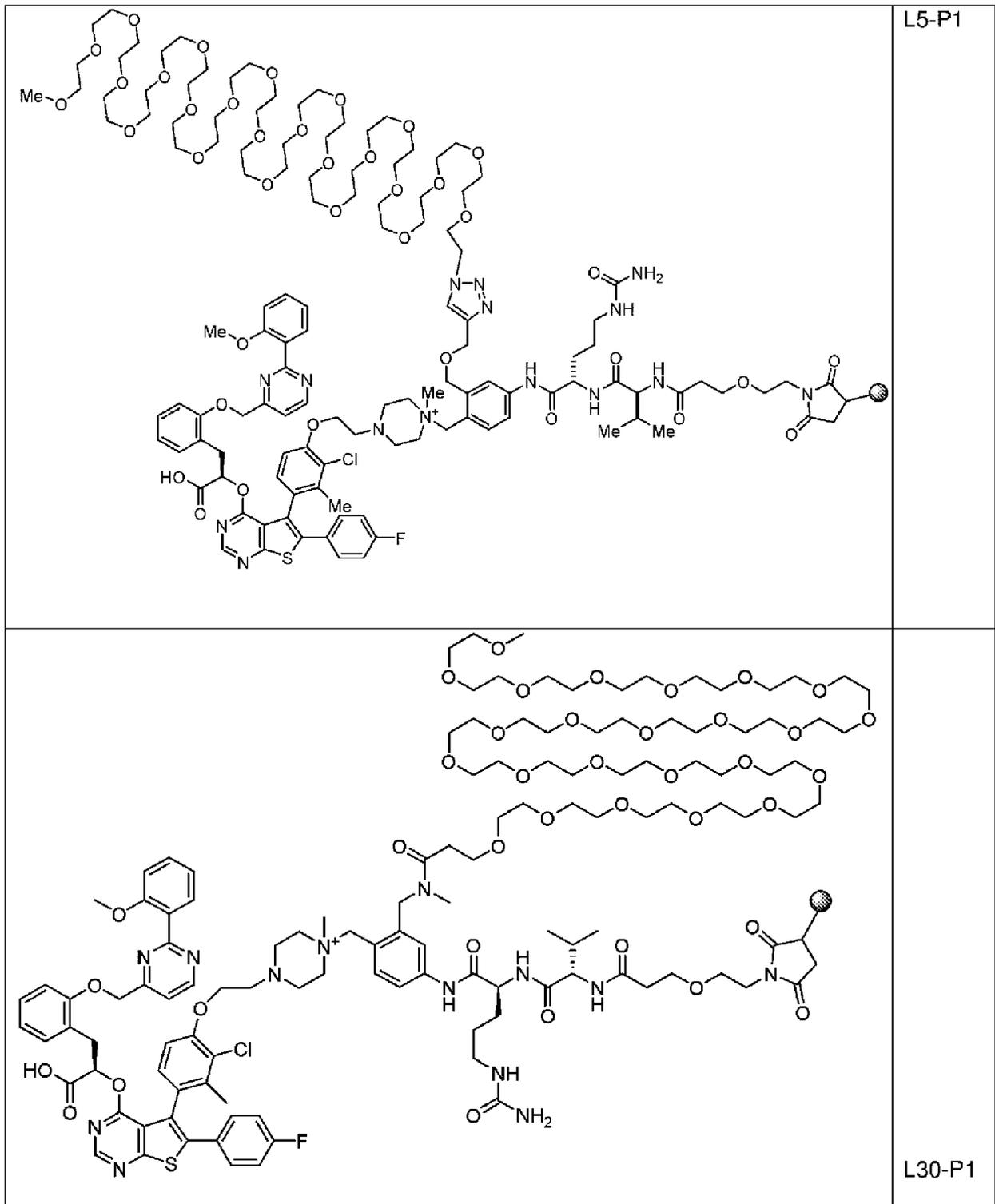


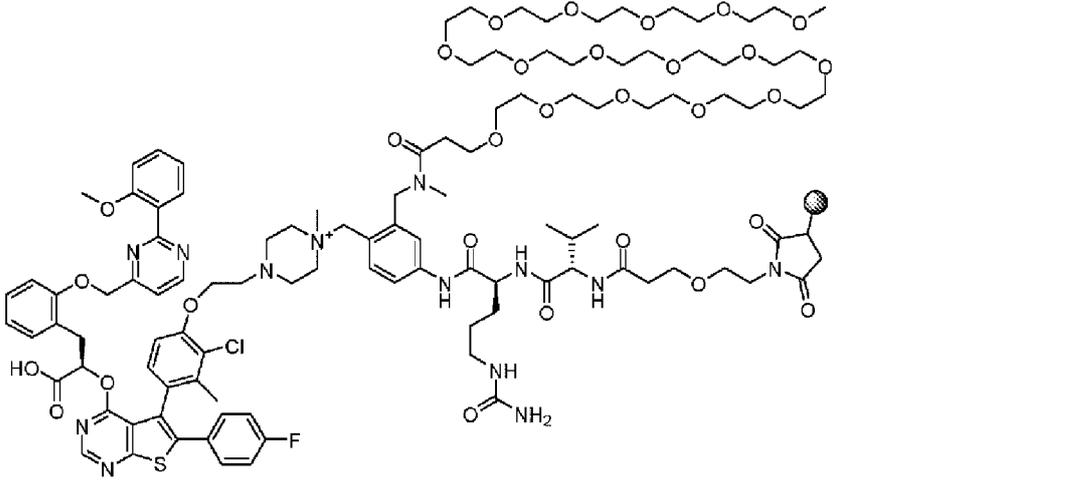
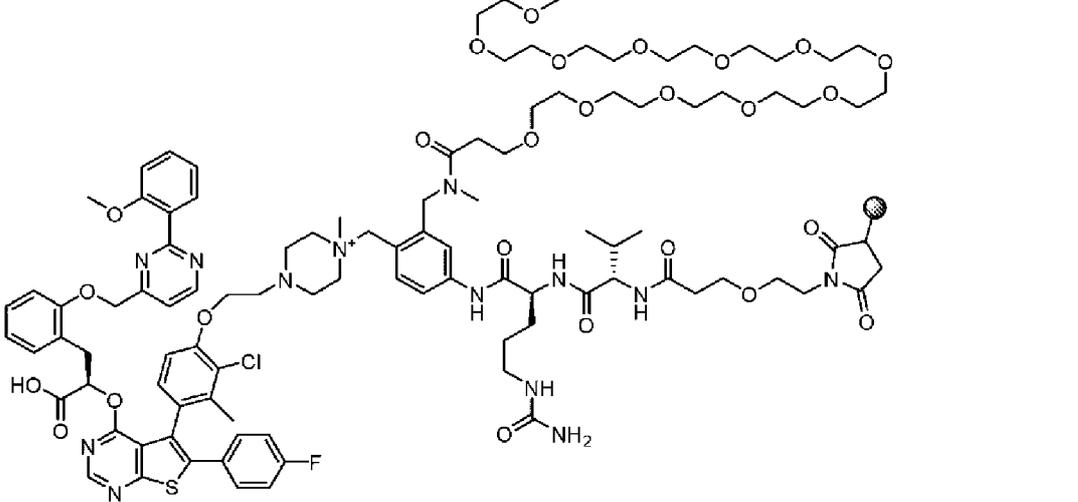
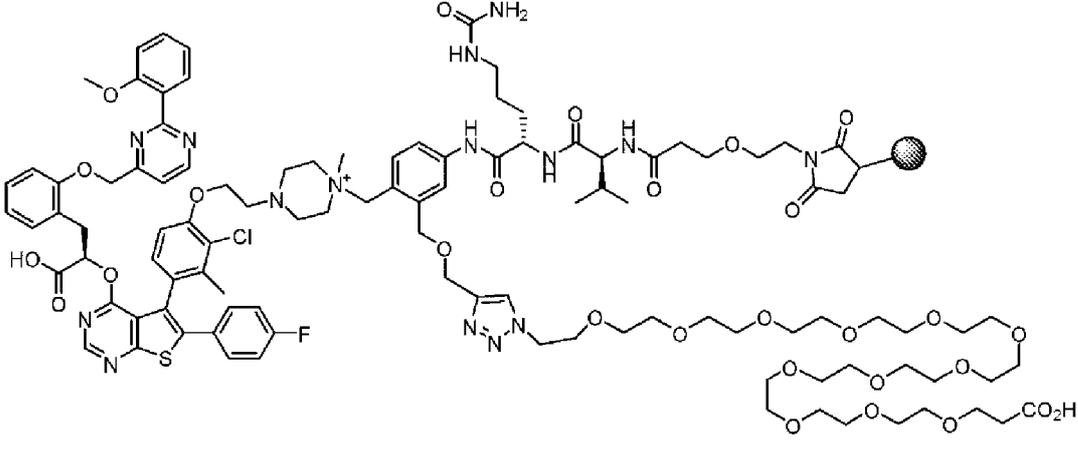


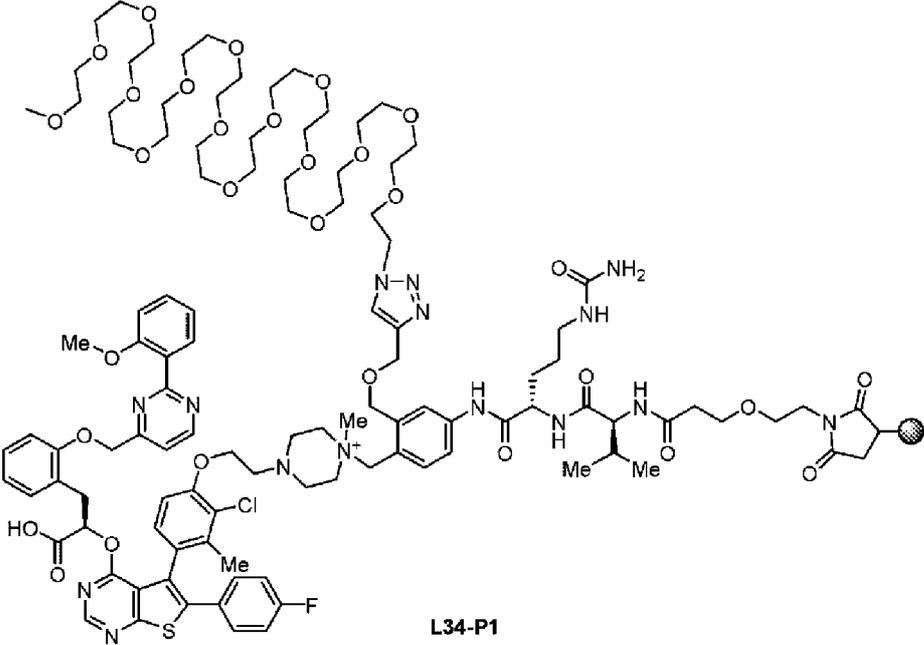
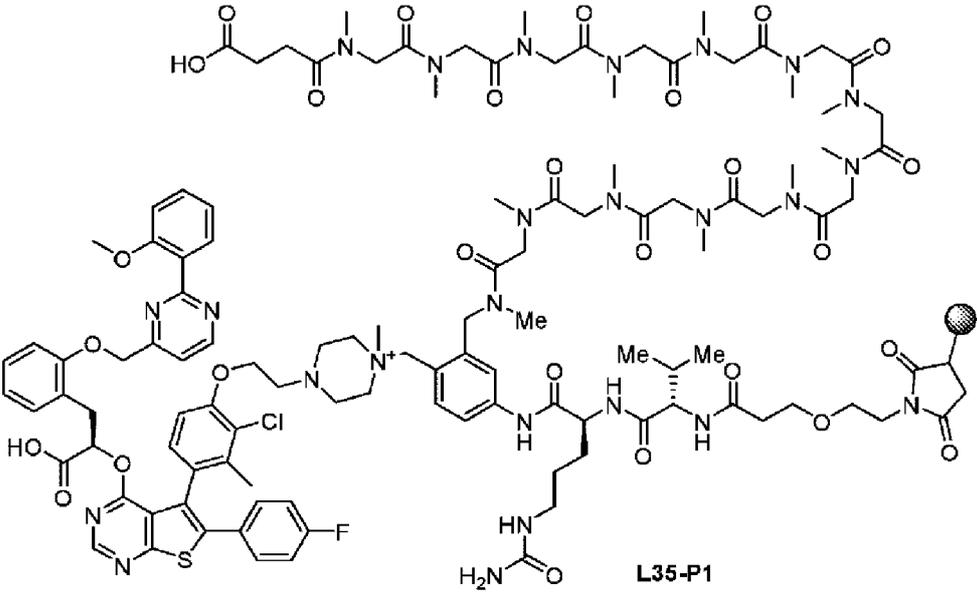
В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу согласно любой из структур, показанных в таблице В.

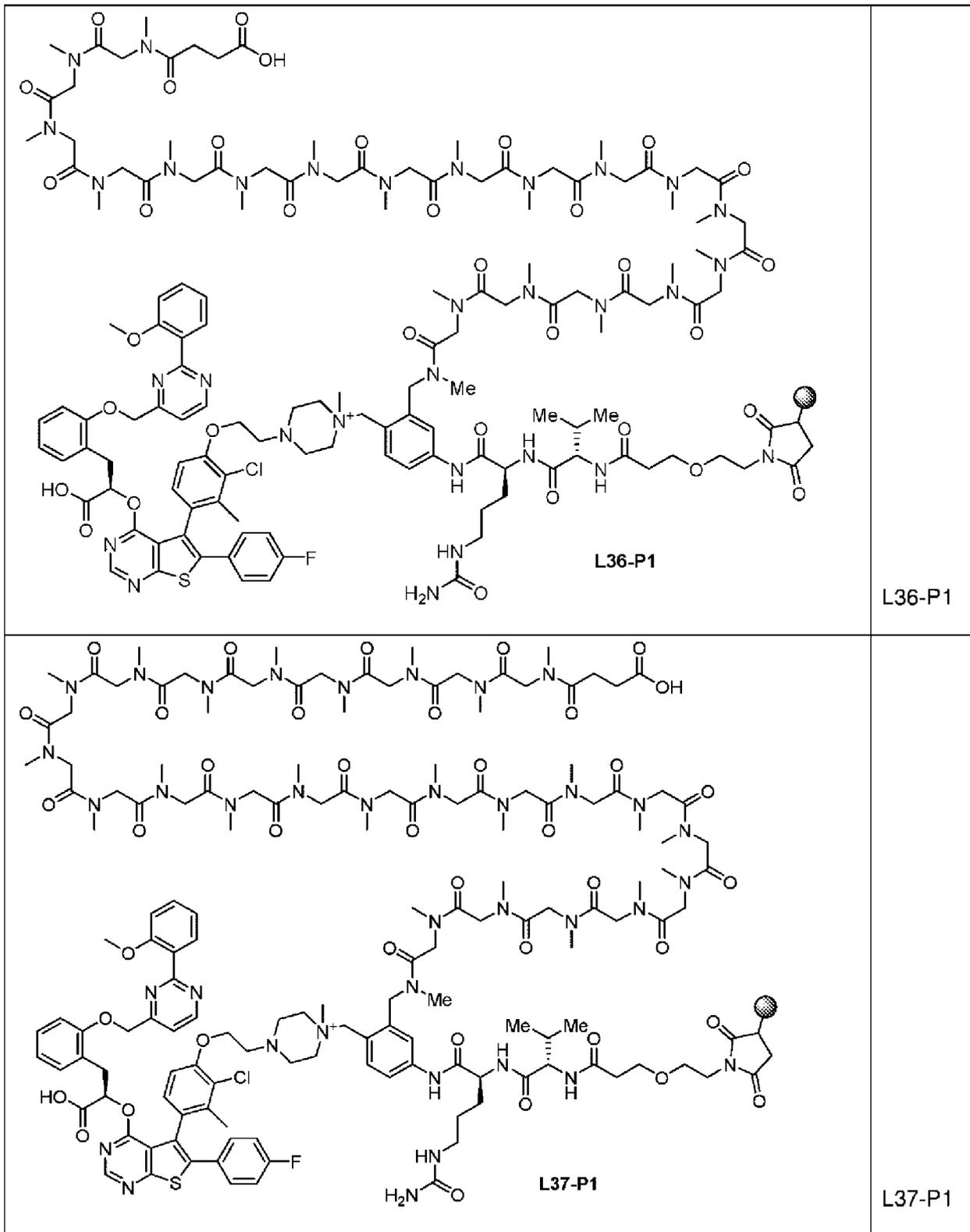
Таблица В. Структуры ADC

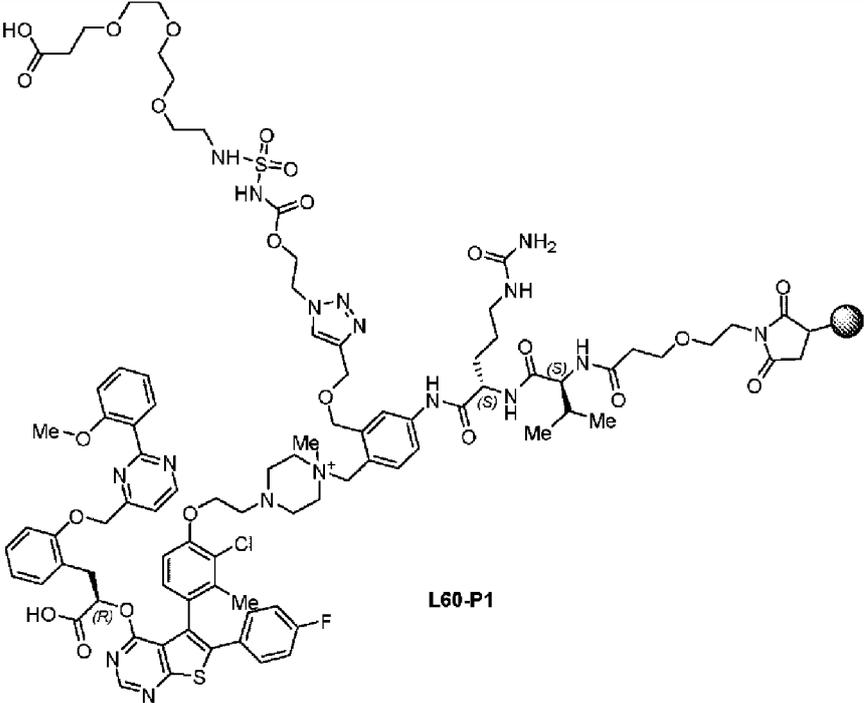
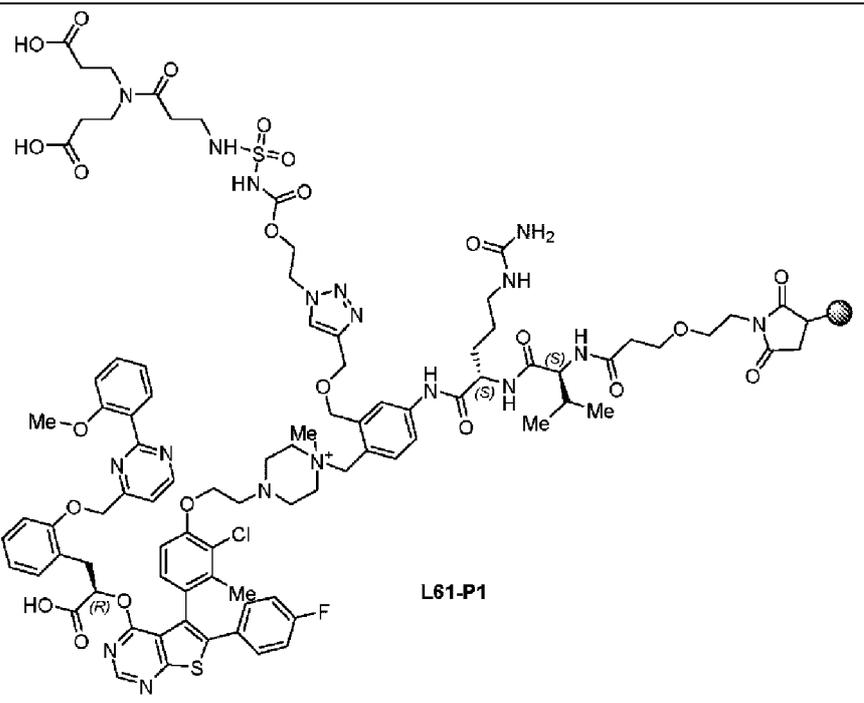
Структура ADC	Наименование L/P
<p style="text-align: center;">ТФК</p>	L9-P16

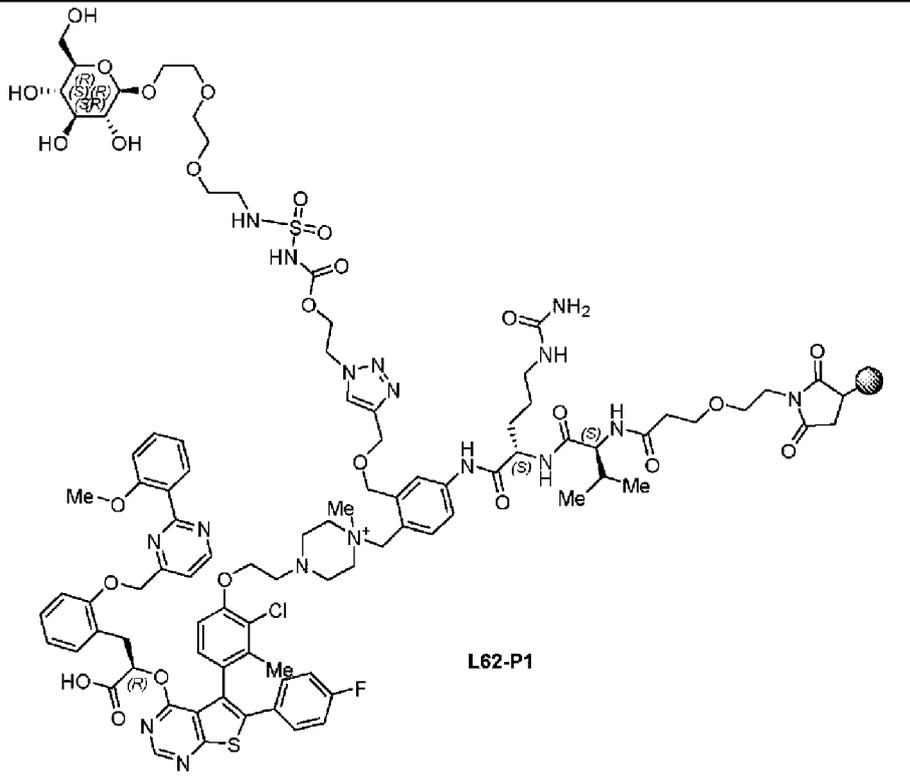
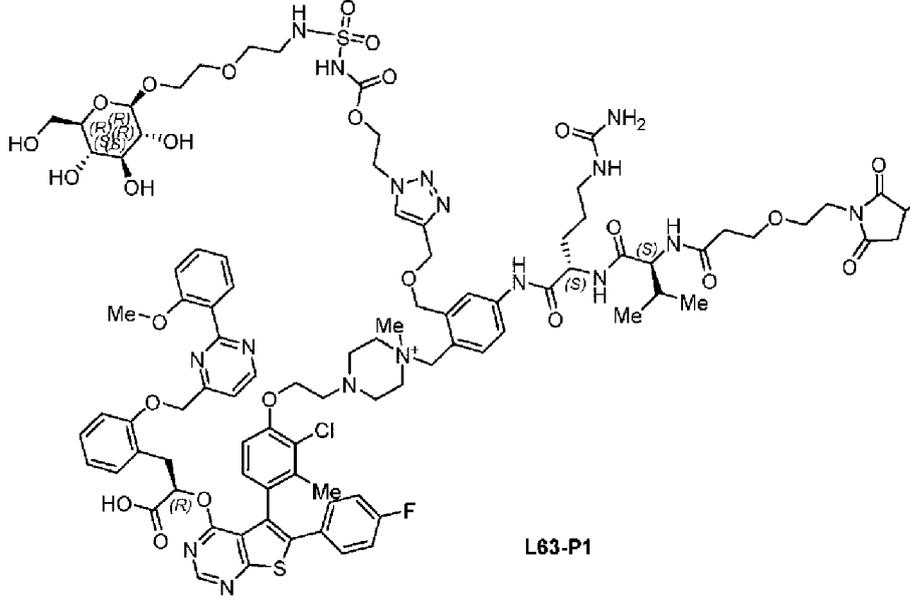


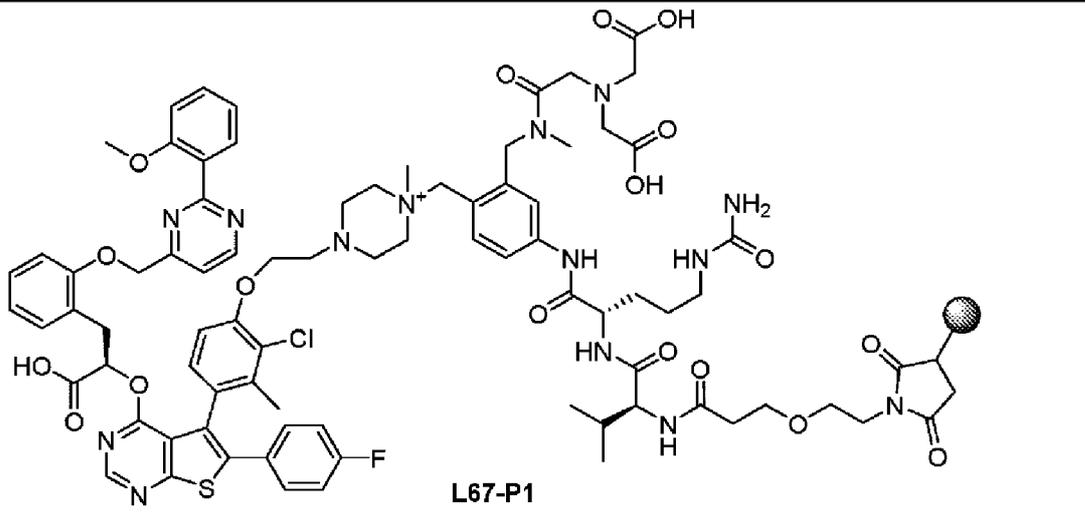
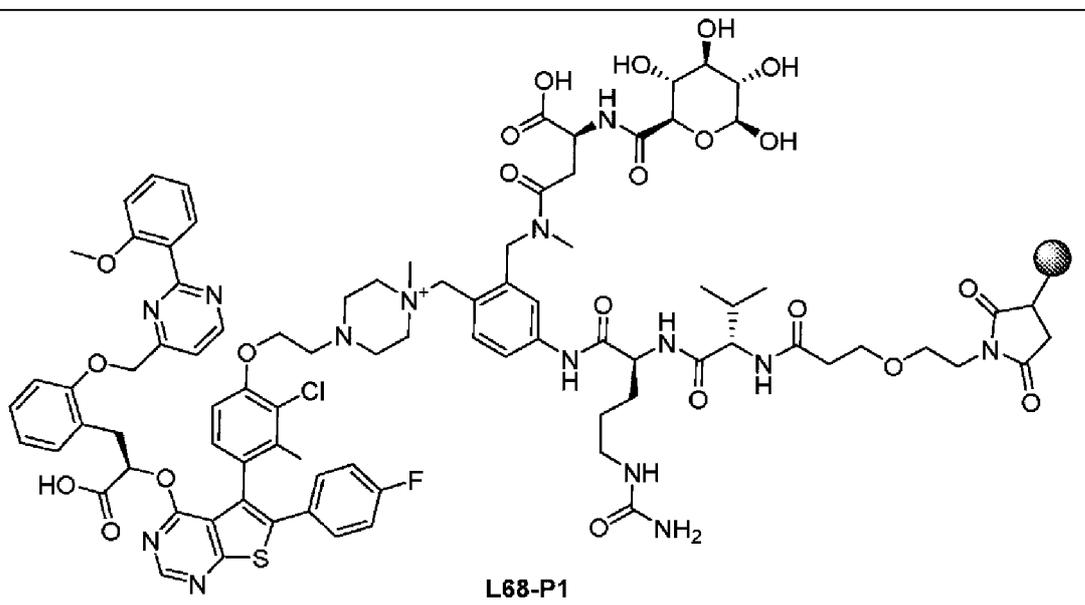
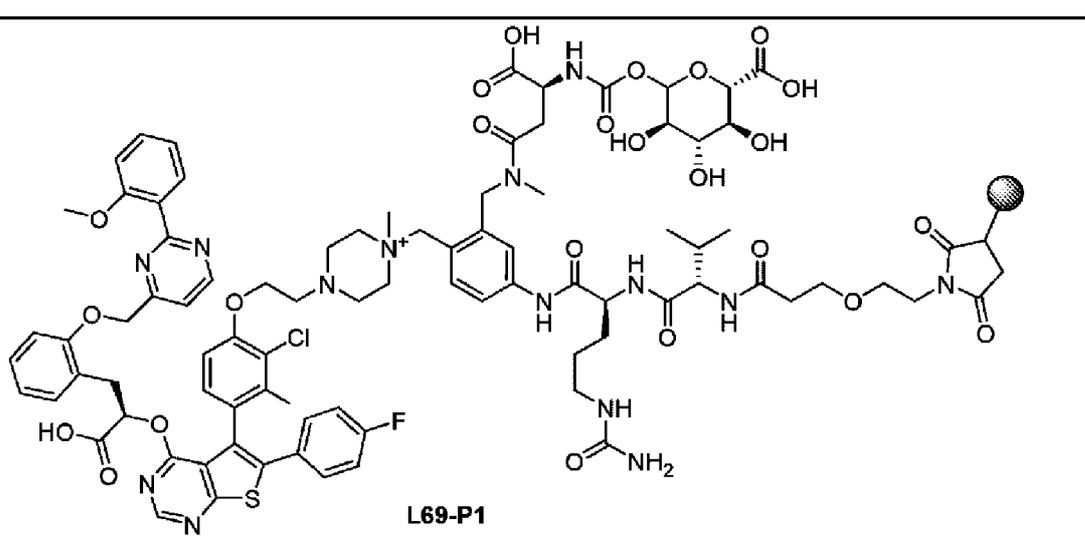
 <p>Chemical structure L31-P1: A complex molecule featuring a central benzene ring substituted with a piperazine ring, a dimethylamino group, and a long poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The piperazine ring is further substituted with a 4-methoxyphenyl group and a 4-chlorophenyl group. The benzene ring is also substituted with a 4-fluorophenyl group and a 4-methoxyphenyl group. The molecule includes a carboxylic acid group, a primary amide, and a secondary amide.</p>	L31-P1
 <p>Chemical structure L32-P1: A complex molecule similar to L31-P1, but with a different substitution pattern on the piperazine ring and a different PEG chain configuration. It features a central benzene ring substituted with a piperazine ring, a dimethylamino group, and a long PEG chain. The piperazine ring is substituted with a 4-methoxyphenyl group and a 4-chlorophenyl group. The benzene ring is substituted with a 4-fluorophenyl group and a 4-methoxyphenyl group. The molecule includes a carboxylic acid group, a primary amide, and a secondary amide.</p>	L32-P1
 <p>Chemical structure L33-P1: A complex molecule similar to L31-P1 and L32-P1, but with a different substitution pattern on the piperazine ring and a different PEG chain configuration. It features a central benzene ring substituted with a piperazine ring, a dimethylamino group, and a long PEG chain. The piperazine ring is substituted with a 4-methoxyphenyl group and a 4-chlorophenyl group. The benzene ring is substituted with a 4-fluorophenyl group and a 4-methoxyphenyl group. The molecule includes a carboxylic acid group, a primary amide, and a secondary amide.</p>	L33-P1

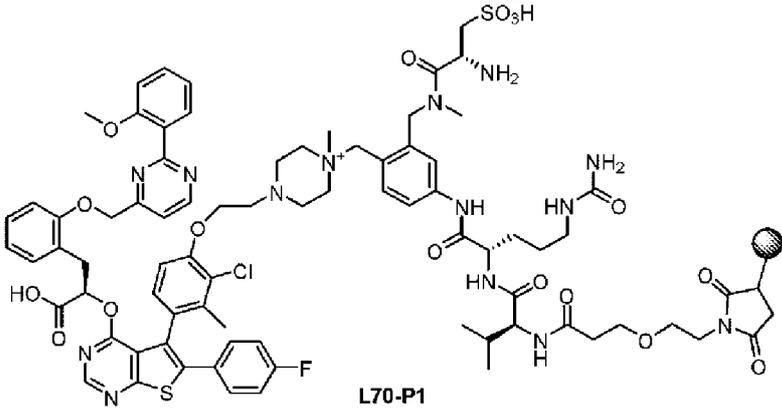
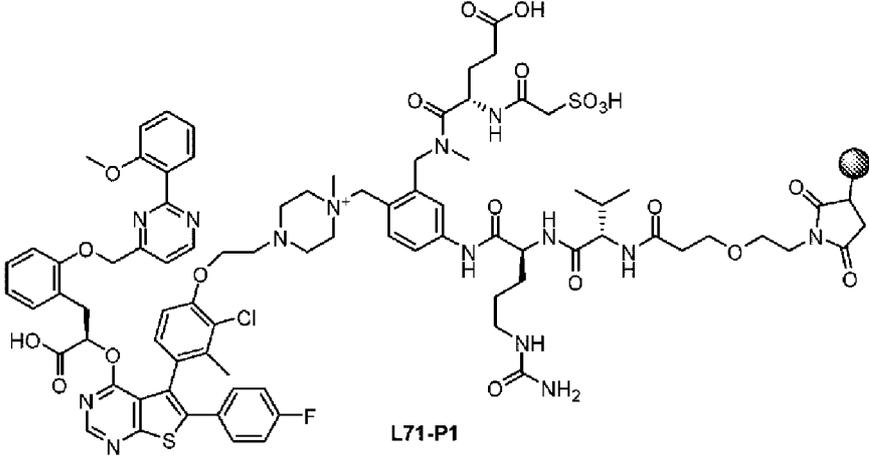
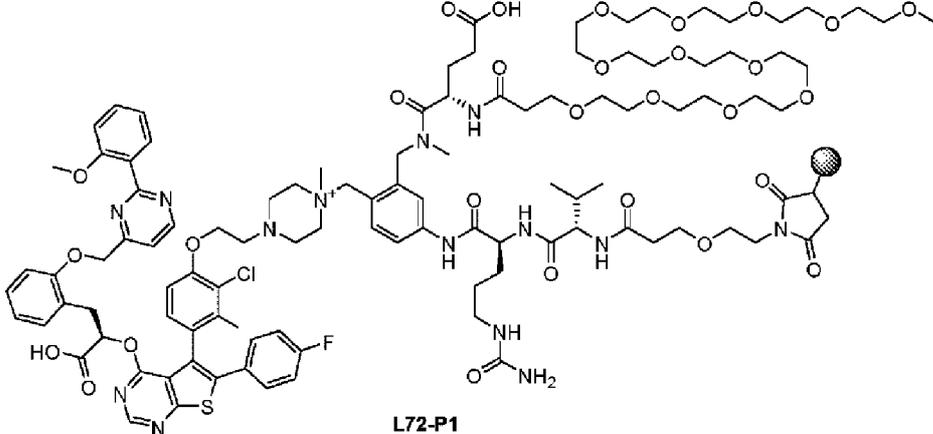
 <p>Chemical structure of L34-P1, a complex molecule featuring a central benzimidazole core. The structure includes a piperazine ring substituted with a long polyether chain (top), a 4-methoxyphenyl group, and a 4-fluorophenyl group. The benzimidazole core is further substituted with a 4-chlorophenyl group, a 4-methylphenyl group, and a 4-(4-fluorophenyl)phenyl group. The central benzimidazole ring is linked to a chain of amide and urea groups, including a terminal amide group (NH₂) and a terminal urea group (NH₂).</p> <p>L34-P1</p>	L34-P1
 <p>Chemical structure of L35-P1, a complex molecule featuring a central benzimidazole core. The structure includes a piperazine ring substituted with a long polyether chain (top), a 4-methoxyphenyl group, and a 4-fluorophenyl group. The benzimidazole core is further substituted with a 4-chlorophenyl group, a 4-methylphenyl group, and a 4-(4-fluorophenyl)phenyl group. The central benzimidazole ring is linked to a chain of amide and urea groups, including a terminal amide group (NH₂) and a terminal urea group (NH₂).</p> <p>L35-P1</p>	L35-P1

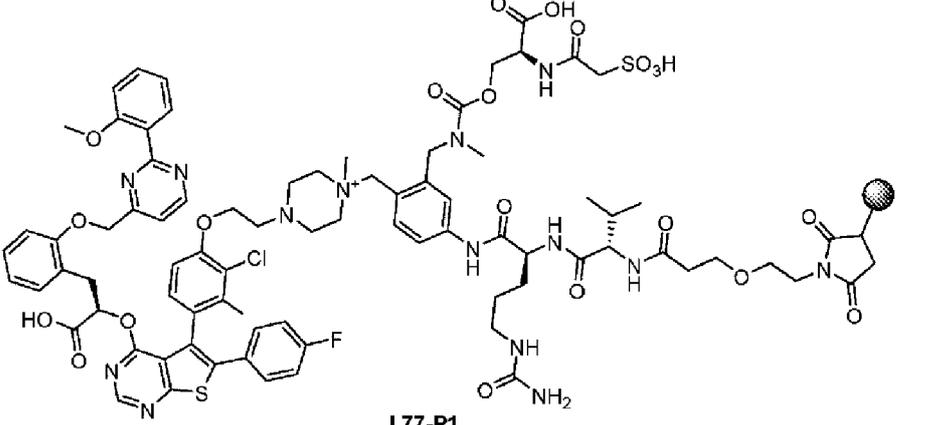
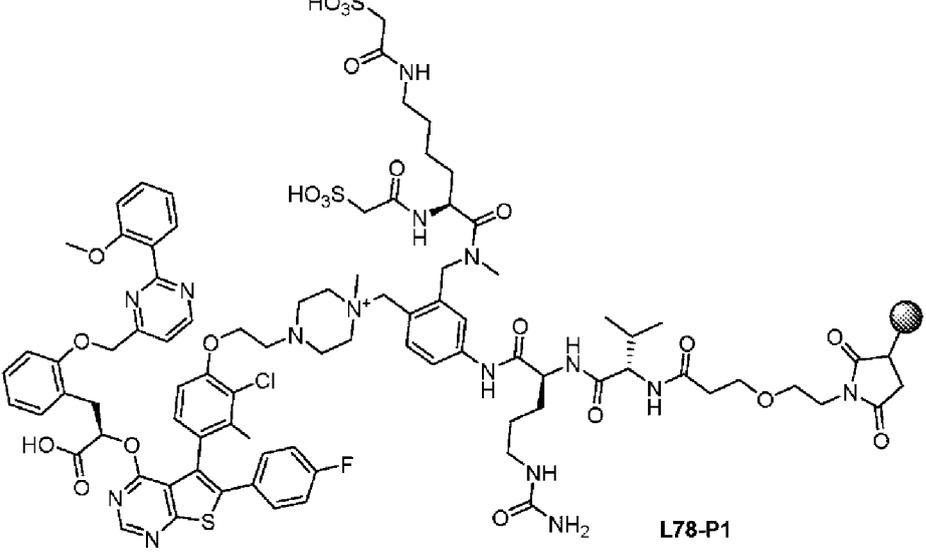
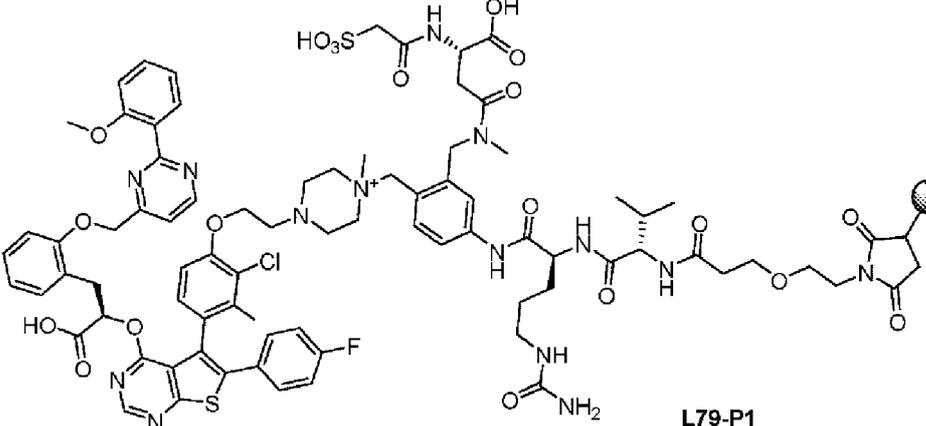


 <p>The chemical structure of L60-P1 is a complex molecule. It features a central benzothiazole core substituted with a 4-fluorophenyl group, a 2-chlorophenyl group, and a 4-methylphenyl group. A chiral center is marked with (R). This core is linked via a methylene group to a piperazine ring. The piperazine ring is further connected to a 4-(4-methoxyphenyl)phenyl group. A triazole ring is attached to the piperazine ring and is linked to a 4-aminophenyl group. This 4-aminophenyl group is connected to a chiral center marked with (S), which is part of a chain containing a primary amide, a secondary amide, and a methyl group. This chain is further linked to another chiral center marked with (S), which is part of a chain containing a secondary amide, a methyl group, and a 2-oxo-1,3-dioxolane ring. A long, flexible polyether chain is attached to the primary amide group, ending in a carboxylic acid group.</p> <p>L60-P1</p>	L60-P1
 <p>The chemical structure of L61-P1 is very similar to L60-P1. It features the same central benzothiazole core and piperazine ring system. However, instead of a long polyether chain, it has a diethyl malonate derivative chain attached to the primary amide group. The rest of the molecule, including the triazole ring, the 4-aminophenyl group, and the chiral centers (S), is identical to L60-P1.</p> <p>L61-P1</p>	L61-P1

 <p>The chemical structure of L62-P1 is a complex molecule. It features a central benzothiazine core substituted with a 4-chlorophenyl group, a 2-methyl-5-fluorophenyl group, and a 2-(4-methoxyphenyl)ethyl group. This core is linked via a piperazine ring to a 4-(2-methoxyphenyl)phenyl group. A 1,2,4-triazole ring is attached to the piperazine, which is further connected to a 4-aminobenzamide moiety. This benzamide is linked to a chiral amino acid derivative (L-proline) with methyl groups at the 2 and 3 positions. The proline is connected to a 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-5H-pyridin-5-yl group. A long chain of three ethyleneoxy units connects the proline to a 2-hydroxyethyl group, which is attached to a ribose sugar. The ribose sugar has hydroxyl groups at the 2, 3, and 4 positions and is labeled with stereochemical configurations (R) and (S).</p> <p style="text-align: center;">L62-P1</p>	L62-P1
 <p>The chemical structure of L63-P1 is nearly identical to L62-P1, but it lacks the 4-methoxyphenyl substituent on the benzothiazine core. The rest of the molecule, including the piperazine, triazole, benzamide, chiral amino acid, and sugar moieties, remains the same.</p> <p style="text-align: center;">L63-P1</p>	L63-P1

 <p>Chemical structure of L67-P1, a complex molecule featuring a central benzimidazole core substituted with a 4-methoxyphenyl group, a 4-chlorophenyl group, and a 4-fluorophenyl group. The benzimidazole is linked via an ether bridge to a piperazine ring, which is further connected to a benzene ring. This benzene ring is substituted with a dimethylamino group, a dimethylaminoethylamide group, and a dimethylaminoethylamide group linked to a dipeptide chain. The dipeptide chain consists of a proline residue and a leucine residue, which is further linked to a dipeptide chain ending in a proline residue. The proline residue is substituted with a methyl group.</p> <p>L67-P1</p>	L67-P1
 <p>Chemical structure of L68-P1, a complex molecule featuring a central benzimidazole core substituted with a 4-methoxyphenyl group, a 4-chlorophenyl group, and a 4-fluorophenyl group. The benzimidazole is linked via an ether bridge to a piperazine ring, which is further connected to a benzene ring. This benzene ring is substituted with a dimethylamino group, a dimethylaminoethylamide group, and a dimethylaminoethylamide group linked to a dipeptide chain. The dipeptide chain consists of a proline residue and a leucine residue, which is further linked to a dipeptide chain ending in a proline residue. The proline residue is substituted with a methyl group. The molecule also features a glucose moiety attached to the dipeptide chain.</p> <p>L68-P1</p>	L68-P1
 <p>Chemical structure of L69-P1, a complex molecule featuring a central benzimidazole core substituted with a 4-methoxyphenyl group, a 4-chlorophenyl group, and a 4-fluorophenyl group. The benzimidazole is linked via an ether bridge to a piperazine ring, which is further connected to a benzene ring. This benzene ring is substituted with a dimethylamino group, a dimethylaminoethylamide group, and a dimethylaminoethylamide group linked to a dipeptide chain. The dipeptide chain consists of a proline residue and a leucine residue, which is further linked to a dipeptide chain ending in a proline residue. The proline residue is substituted with a methyl group. The molecule also features a glucose moiety attached to the dipeptide chain.</p> <p>L69-P1</p>	L69-P1

 <p>Chemical structure of L70-P1, a complex molecule featuring a central benzimidazole core substituted with a 4-methoxyphenyl group, a 4-chlorophenyl group, and a 4-fluorophenyl group. The benzimidazole is linked via an ether bridge to a piperazine ring, which is further connected to a benzene ring. This benzene ring is substituted with a dimethylamino group and a side chain containing a primary amide, a secondary amide, and a sulfonic acid group. The side chain also includes a chiral center with an isopropyl group and a terminal group consisting of a carbonyl, an ether, and a cyclic amide.</p> <p>L70-P1</p>	L70-P1
 <p>Chemical structure of L71-P1, similar to L70-P1 but with a different side chain configuration. It features the same benzimidazole core and piperazine linkage. The side chain contains a primary amide, a secondary amide, and a sulfonic acid group, but the chiral center is substituted with a methyl group instead of an isopropyl group. The terminal group is identical to L70-P1.</p> <p>L71-P1</p>	L71-P1
 <p>Chemical structure of L72-P1, similar to L71-P1 but with a different terminal group. It features the same benzimidazole core and piperazine linkage. The side chain contains a primary amide, a secondary amide, and a sulfonic acid group, with a methyl group at the chiral center. The terminal group is a long, flexible polyether chain.</p> <p>L72-P1</p>	L72-P1

 <p>Chemical structure of L77-P1, a complex molecule featuring a central benzimidazole core substituted with a 4-methoxyphenyl group, a 4-chlorophenyl group, and a 4-fluorophenyl group. The core is linked via a piperazine ring to a 4-(dimethylamino)phenyl group, which is further connected to a chain containing a primary amide, a secondary amide, a tertiary amide, and a terminal cyclic amide. A side chain includes a carboxylic acid group and a sulfonic acid group.</p> <p>L77-P1</p>	L77-P1
 <p>Chemical structure of L78-P1, similar to L77-P1, but with a different side chain configuration. It features a primary amide, a secondary amide, and a tertiary amide, but lacks the carboxylic acid group. The sulfonic acid group is present on a different part of the side chain.</p> <p>L78-P1</p>	L78-P1
 <p>Chemical structure of L79-P1, similar to L77-P1, but with a different side chain configuration. It features a primary amide, a secondary amide, and a tertiary amide, and includes a carboxylic acid group. The sulfonic acid group is present on a different part of the side chain.</p> <p>L79-P1</p>	L79-P1

	L86-P1
<p>● =анти-CD74 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент</p> <p>ADC, изображенные выше, также могут быть представлены следующей формулой:</p> $Ab-(L-D)_p,$ <p>где ● является анти-CD74 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, ковалентно связанным с линкером-полезной нагрузкой (L/P), изображенным выше; p является целым числом 1-16. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом 1-8. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом 1-5. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом 2-4. В некоторых вариантах осуществления, p равно 2. В некоторых вариантах осуществления, p равно 4. В некоторых вариантах осуществления, p определен жидкостной хроматографией-масс спектрометрией (ЖХ-МС).</p>	

В настоящем описании, «L/P» относится к линкеру-полезной нагрузке, линкеру-лекарственному средству или линкеру-соединению, раскрытым в настоящем документе, а термины «L#-P#» и «L#-C#» используются взаимозаменяемо для обозначения конкретного линкера-лекарственного средства, раскрытого в настоящем документе, в то время как коды «P#» и «C#» используются взаимозаменяемо для обозначения конкретного соединения, если не указано иное. Например, оба «L1-C1» и «L1-P1» относятся к одной и той же структуре линкер-полезная нагрузка, описанной в данном документе, в то время как «C1» и «P1» обозначают одно и то же соединение, раскрытое в данном документе, включая энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном-мишенью CD74 на раковой клетке. В некоторых вариантах осуществления, CD74 представляет собой изоформу CD74 человека. В

некоторых вариантах осуществления, изоформой CD74 человека является изоформа 1 (NP_001020330.1), имеющая аминокислотную последовательность:

MHRRRSRSCREDQKPVMDQDRLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFS
ILVTLLLAGQATTAYFLYQQQGRDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPKPVSKMRMATP
LLMQALPMGALPQGPMQNATKYGNMTEHDVHMLLQNADPLKVYPPLKGSFPENLRHL
KNTMETIDWKVFESWMHWHLLFEMSRHSLEQKPTDAPPKVLTKCQEEVSHIPAVHPGS
FRPKCDENGNYLPLQCYGSIGYCWCVFPNGTEVPNTRSRGHHNCSESLELEDPSGLGV
TKQDLGPVPM (SEQ ID NO:61).

В некоторых вариантах осуществления, изоформой CD74 человека является изоформа 2 (NP_004346.1), имеющая аминокислотную последовательность:

MHRRRSRSCREDQKPVMDQDRLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYTGFS
ILVTLLLAGQATTAYFLYQQQGRDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPKPVSKMRMATP
LLMQALPMGALPQGPMQNATKYGNMTEHDVHMLLQNADPLKVYPPLKGSFPENLRHL
KNTMETIDWKVFESWMHWHLLFEMSRHSLEQKPTDAPPKESLELEDPSGLGVTKQDL
GPVPM (SEQ ID NO:62).

В настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, также представлены композиции, содержащие несколько копий конъюгата антитело-лекарственное средство (например, любого из типовых конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления среднее p конъюгата антитело-лекарственное средство в композиции составляет от примерно 2 до примерно 4.

Также в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, представлены фармацевтические композиции, содержащие конъюгат антитело-лекарственное средство (например, любой из типовых конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных в настоящем документе) или композицию (например, любую из типовых композиций, описанных в настоящем документе) и фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, представлены терапевтические применения описанных соединений и композиций ADC, например, при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание представляет способы лечения рака (например, рака, который экспрессирует антиген CD74, таргетируемый антителом или антигенсвязывающим фрагментом ADC). В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание представляет способы уменьшения или замедления роста популяции раковых клеток у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание представляет способы определения того, будет ли субъект, страдающий раком или имеющий подозрение на рак, реагировать на лечение соединением или композицией ADC, раскрытыми в настоящем документе.

Типовым вариантом осуществления является способ лечения субъекта, имеющего рак или подозрение на него, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственного средства, композиции или

фармацевтической композиции (например, любого из типовых конъюгатов антитело-лекарственное средство, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, рак экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, раком является собой опухоль или гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак груди, множественная миелома, плазмноклеточная миелома, лейкоз, лимфома, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярная лимфома, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланома, миелогенный лейкоз, миелома, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, хронический лимфолейкоз, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома или рак желудка.

Другим типовым вариантом осуществления является способ уменьшения или ингибирования роста опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции (например, любого из типовых конъюгатов антитело-лекарственное средство, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, опухоль экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, опухолью является рак груди, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, меланома, рак ротовой полости, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, опухолью является рак желудка. В некоторых вариантах осуществления, введение конъюгата антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции снижает или ингибирует рост опухоли, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на по меньшей мере, примерно на 95% или, по меньшей мере, примерно на 99%.

Другим типовым вариантом осуществления является способ уменьшения или замедления роста популяции раковых клеток у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции (например, любого из типовых конъюгатов антитело-лекарственное средство, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, популяция раковых клеток экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, популяция раковых клеток происходит из опухоли или гематологического

рака. В некоторых вариантах осуществления, популяция раковых клеток происходит из рака груди, множественной миеломы, плазмноклеточной миеломы, лейкоза, лимфомы, рака желудка, острого миелоидного лейкоза, рака мочевого пузыря, рака мозга, рака костного мозга, рака шейки матки, хронического лимфолейкоза, колоректального рака, рака пищевода, гепатоцеллюлярного рака, лимфобластного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфоидных злокачественных новообразований Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланомы, миелогенного лейкоза, миеломы, рака полости рта, рака яичников, немелкоклеточного рака легких, хронического лимфоцитарного лейкоза, рака простаты, мелкоклеточного рака легких или рака селезенки. В некоторых вариантах осуществления, популяция раковых клеток происходит из лимфомы или рака желудка. В некоторых вариантах осуществления, введение конъюгата антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции уменьшает популяцию раковых клеток, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95% или, по меньшей мере, примерно на 99%. В некоторых вариантах осуществления, введение конъюгата антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции замедляет рост популяции раковых клеток, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95% или, по меньшей мере, примерно на 99%.

Другим типовым вариантом осуществления является конъюгат антитело-лекарственное средство, композиция или фармацевтическая композиция (например, любой из типовых конъюгатов антитело-лекарственное средство, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе) для применения при лечении субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии рака. В некоторых вариантах осуществления, рак экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, раком является опухоль или гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак груди, множественная миелома, плазмноклеточная миелома, лейкоз, лимфома, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярная лимфома, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланома, миелогенный лейкоз, миелома, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, хронический лимфолейкоз, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома или рак желудка.

Другим типовым вариантом осуществления является применение конъюгата антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции (например, любого из типовых конъюгатов антитело-лекарственное средство, композиций или фармацевтических композиций, описанных в данном документе) при лечении субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии рака. В некоторых вариантах осуществления, рак экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, раком является опухоль или гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак груди, множественная миелома, плазмноклеточная миелома, лейкоз, лимфому, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярная лимфома, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланома, миелогенный лейкоз, миелома, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, хронический лимфолейкоз, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома или рак желудка.

Другим типовым вариантом осуществления является использование конъюгата антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции (например, любого из типовых конъюгатов антитело-лекарственное средство, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе) в способе производства лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего раком или подозреваемого в его наличии. В некоторых вариантах осуществления, рак экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, раком является опухоль или гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак груди, множественная миелома, плазмноклеточная миелома, лейкоз, лимфома, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярная лимфома, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланома, миелогенный лейкоз, миелома, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, хронический лимфоцитарный лейкоз, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома или рак желудка.

Другим типовым вариантом осуществления является способ определения того, будет ли субъект, страдающий или подозреваемый в наличии рака, реагировать на лечение конъюгатом антитело-лекарственное средство, композицией или фармацевтической композицией (например, любым из типовых конъюгатов антитело-лекарственное средство, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе) путем предоставления биологического образца от субъекта; контакта образца с конъюгатом антитело-лекарственное средство; и обнаружения связывания конъюгата антитело-

лекарственное средство с раковыми клетками в образце. В некоторых вариантах осуществления, раковые клетки в образце экспрессируют антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, рак экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, раком является опухоль или гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления, раком является опухоль или гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак груди, множественная миелома, плазмноклеточная миелома, лейкоз, лимфома, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярная лимфома, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланомы, миелогенный лейкоз, миелома, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, хронический лимфоцитарный лейкоз, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома или рак желудка. В некоторых вариантах осуществления, образцом является образец биопсии ткани, образец крови или образец костного мозга.

Также описаны способы получения описанных соединений и композиций ADC. Типовым вариантом осуществления является способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство путем взаимодействия антитела или антигенсвязывающего фрагмента с расщепляемым линкером, присоединенным к ингибитору Mcl-1, в условиях, допускающих конъюгацию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1А показывает *in vitro* активность CD74-L7-P1 и P1 полезной нагрузки в клеточных линиях DLBCL (СТГ 72 ч).

ФИГ. 1В показывает *in vitro* активность CD74-L7-P1, IgG-L7-P1 и P1 полезной нагрузки к клеточных линиях DLBCL (СТГ 72 ч).

ФИГ. 2 показывает *in vitro* активность разных CD74 ADC и соответствующих полезных нагрузок в клеточной линии Monomac1 (СТГ 72ч).

ФИГ. 3 показывает *in vitro* активность CD74 MCL-1 конъюгата антитело-лекарственное средство CD74-L7-P1, изотип IgG-L7-P1 ADC, и не содержащей MCL-1 полезной нагрузки P1 против эндогенных раковых клеточных линий, включая KMS-21BM, KMS-20, MONO-MAC-1, NOMO-1, Kasumi-6 и EOL-1.

ФИГ. 4 показывает *in vitro* активность CD74 MCL-1 конъюгата антитело-лекарственное средство CD74-L5-P1, изотип IgG-L5-P1 ADC, и не содержащей MCL-1 полезной нагрузки P1, отдельно или в комбинации с венетоклаксом, против MONO-MAC-1, NOMO-1 и EOL-1.

ФИГ. 5 показана *in vitro* активность CD74 MCL-1 конъюгата антитело-лекарственное средство CD74-L5-P1, изотип IgG-L5-P1 ADC, и не содержащей MCL-1 полезной нагрузки P1, отдельно или в комбинации с соединением A1, против MONO-MAC-1, NOMO-1 и EOL-1.

ФИГ. 6 показывает объем опухоли (мм³) самок мышей SCID с прививкой Nom01 при лечении IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc, анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 (30 мг/кг, однократное ВВ введение), отдельно или в комбинации с венетоклаксом (50 мг/кг, введение 4ON/3OFF/4ON ПО) (n=6). Треугольники и ромбы означают схемы лечения венетоклаксом и антителами, соответственно.

ФИГ. 7 показывает % потери массы тела самок мышей SCID с прививкой Nom01 при лечении IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc, анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 (30 мг/кг, однократное ВВ введение), отдельно или в комбинации с венетоклаксом (50 мг/кг, введение 4ON/3OFF/4ON ПО) (n=6).

ФИГ. 8 показывает объем опухоли (мм³) самой мышей NSG с прививкой Karpas422 при лечении IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc, анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 (30 мг/кг, однократное ВВ введение), отдельно или в комбинации с венетоклаксом (50 мг/кг, введение 4ON/3OFF/4ON ПО) (n=6). Треугольники и ромбы означают схемы лечения венетоклаксом и антителами, соответственно.

ФИГ. 9 показывает % изменения массы тела мышей NSG с прививкой Karpas422 при лечении IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc, анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 (30 мг/кг, однократное ВВ введение), отдельно или в комбинации с венетоклаксом (50 мг/кг, введение 4ON/3OFF/4ON ПО) (n=6)

ФИГ. 10 показывает объем опухоли (мм³) самок мышей SCID с прививкой Monoma1 при лечении IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc, анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 (30 мг/кг, однократное ВВ введение), отдельно или в комбинации с венетоклаксом (50 мг/кг, введение 2ON/2OFF/5ON/2OFF/4ON ПО) (n=6). Треугольники и ромбы означают схемы лечения венетоклаксом и антителами, соответственно.

ФИГ. 11 показывает % потери массы тела самок мышей SCID с прививкой Monoma1 при лечении IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc, анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 (30 мг/кг, однократное ВВ введение), отдельно или в комбинации с венетоклаксом (50 мг/кг, введение 2ON/2OFF/5ON/2OFF/4ON ПО) (n=6).

ФИГ. 12 показывает объем опухоли (мм³) самок мышей SCID с прививкой EOL1 острого миелоидного (эозинофильного) лейкоза человека при лечении CD74-L5-P1 с молчащей Fc в комбинации с венетоклаксом вместе с разными контрольными группами.

ФИГ. 13 показывает % потери массы тела самок мышей SCID с прививкой EOL1 острого миелоидного (эозинофильного) лейкоза человека при лечении CD74-L5-P1 с молчащей Fc в комбинации с венетоклаксом вместе с разными контрольными группами.

ФИГ. 14 показывает объем опухоли (мм³) самок мышей SCID с прививкой EOL1

острого миелоидного (эозинофильного) лейкоза человека при лечении CD74-ADCs с разными линкерами-полезными нагрузками (L5-P1, L30-P1, L31-P1, L32-P1, L33-P1 и L34-P1).

ФИГ. 15 показывает % потери массы тела самок мышей SCID с прививкой EOL1 острого миелоидного (эозинофильного) лейкоза человека при лечении CD74-ADCs с разными линкерами-полезными нагрузками (L5-P1, L30-P1, L31-P1, L32-P1, L33-P1 и L34-P1).

ФИГ. 16 показывает типовое сайт-специфическое конъюгирование антитела с применением бактериальной трансглутаминазы (BTG).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Описанные композиции и способы можно легче понять, обратившись к нижеследующему подробному описанию, взятому вместе с сопровождающими фигурами, которые составляют часть этого описания.

В настоящем тексте описания относятся к композициям и способам использования композиций. Если в описании описан или заявлен признак или вариант осуществления, связанный с композицией, такой признак или вариант осуществления в равной степени применимы к способам использования композиции. Аналогичным образом, если в описании описан или заявлен признак или вариант осуществления, связанный со способом использования композиции, такой признак или вариант осуществления в равной степени применимы к композиции.

Когда указывается диапазон значений, он включает варианты осуществления, использующие любое конкретное значение в пределах диапазона. Кроме того, ссылка на значения, указанные в диапазонах, включает каждое значение в этом диапазоне. Все диапазоны включают их конечные точки и могут быть объединены. Когда значения указаны в виде приближений с использованием предшествующего «примерно», следует понимать, что конкретное значение образует другой вариант осуществления. Ссылка на конкретное числовое значение включает, по меньшей мере, это конкретное значение, если контекст явно не диктует иное. Использование «или» будет означать «и/или», если конкретный контекст его использования не диктует иное. Все ссылки, цитируемые здесь, включены посредством ссылок для любых целей. Если ссылка и спецификация противоречат друг другу, спецификация имеет преимущественную силу.

Если контекст описания не указывает иное, например, при отсутствии символов, указывающих на конкретную точку (точки) связи, когда структура или фрагмент структуры нарисованы, они могут использоваться сами по себе или присоединяться к другим компонентам ADC, и это может происходить с любой ориентацией, например, с антителом, присоединенным в любой подходящей точке присоединения к химическому фрагменту, такому как линкер-лекарственное средство. Однако там, где это указано, компоненты ADC прикреплены в ориентации, показанной в данной формуле. Например, если формула (1)

описана как $Ab-(L-D)_p$, а группа «-(LD)» описана как $\left(R^1-L_1-E-D \right)$, тогда разработанной структурой формулы (1) является $Ab-\left(R^1-L_1-E-D \right)_p$. Она не является $Ab-\left(D-E-L_1-R_1 \right)_p$.

Следует принимать во внимание, что некоторые признаки описанных композиций и способов, которые для ясности описаны в настоящем документе в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предоставлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки описанных композиций и способов, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены отдельно или в любой под-комбинации.

В контексте настоящей заявки, конъюгат антитело-лекарственное средство можно идентифицировать с использованием соглашения об наименованиях в общем формате «антиген-мишень/антитело-линкер-полезная нагрузка». Например, только если конъюгат антитело-лекарственное средство называется «мишень X-L0-P0», такой конъюгат будет содержать антитело, которое связывает мишень X, линкер, обозначенный как L0, и полезную нагрузку, обозначенную как P0. Альтернативно, если конъюгат антитело-лекарственное средство называется «анти-мишень X-L0-P0», такой конъюгат может содержать антитело, которое связывает мишень X, линкер, обозначенный как L0, и полезную нагрузку, обозначенную как P0. В другом варианте, если конъюгат антитело-лекарственное средство называется «AbX-L0-P0», такой конъюгат может содержать антитело, обозначенное как AbX, линкер, обозначенный как L0, и полезную нагрузку, обозначенный как P0. Контрольный конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий неспецифическое, контрольное изотипическое антитело, может называться «изотипический контроль IgG1-L0-P0» или «IgG1-L0-P0».

Любая приведенная здесь формула также предназначена для обозначения не меченых форм, а также меченых изотопами форм соединений. Меченые изотопами соединения имеют структуры, изображенные формулами, приведенными в настоящем документе, за исключением того, что один или несколько атомов заменены атомом, имеющим выбранную атомную массу или массовое число. Изотопы, которые могут быть включены в соединения по настоящему изобретению, включают, например, изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фтора и хлора, такие как 3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F и ^{36}Cl . Соответственно, следует понимать, что настоящее описание включает соединения, которые включают один или несколько из любых вышеупомянутых изотопов, включая, например, присутствуют радиоактивные изотопы, такие как 3H и ^{14}C , или те, в которых присутствуют не радиоактивные изотопы, такие как 2H и ^{13}C . Такие меченые изотопами соединения полезны в исследованиях метаболизма (с ^{14}C), исследованиях кинетики реакций (например, с 2H или 3H), в способах обнаружения или визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (СПЕКТ), включая анализ распределения лекарственного средства или субстрата в тканях,

или при радиоактивном лечении пациентов. В частности, ^{18}F или меченое соединение может быть особенно желательным для исследований ПЭТ или SPECT. Меченые изотопами соединения обычно могут быть получены обычными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием подходящих меченых изотопами реагентов вместо ранее использованного не меченого реагента.

Определения

В описании и формуле изобретения используют различные термины, относящиеся к аспектам описания. Таким терминам следует придавать их обычное значение в данной области техники, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины следует толковать в соответствии с определениями, приведенными в настоящем документе.

Используемые здесь формы единственного числа включают формы множественного числа, если контекст явно не диктует иное. Термины «содержащий», «имеющий», «имеющий», как в «имеющий химическую формулу», «включающий» и «содержащий», должны толковаться как открытые термины (т.е. означающие «включая, но не ограничиваясь этим») если не указано иное. Кроме того, всякий раз, когда «содержащий» или другой открытый термин используют в варианте осуществления, следует понимать, что тот же вариант осуществления может быть более узко заявлен с использованием промежуточного термина «состоящий по существу из» или закрытого термина «состоящий из».

Термин «примерно» или «приблизительно» при использовании в контексте числовых значений и диапазонов относится к значениям или диапазонам, которые приблизительно или близки к указанным значениям или диапазонам, так что вариант осуществления может осуществляться так, как предполагалось, как очевидно для специалиста в данной области техники из приведенных здесь инструкций. В некоторых вариантах осуществления, примерно означает плюс или минус 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5% или 0,1% от числового значения. В одном варианте осуществления, термин «примерно» относится к диапазону значений, которые на 10% больше или меньше указанного значения. В другом варианте осуществления, термин «примерно» относится к диапазону значений, которые на 5% больше или меньше указанного значения. В другом варианте осуществления, термин «примерно» относится к диапазону значений, которые на 1% больше или меньше указанного значения.

Термины «конъюгат антитело-лекарственное средство», «конъюгат антитела», «конъюгат», «иммуноконъюгат» и «ADC» используются взаимозаменяемо и относятся к одному или нескольким терапевтическим соединениям (например, ингибитору Mcl-1), которые являются связаны с одним или несколькими антителами или антигенсвязывающими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления, ADC определяется общей формулой: $\text{Ab}-(\text{LD})_p$ (Формула 1), где Ab=антитело или антигенсвязывающий фрагмент, L=линкерная группа, D=группа лекарственного средства (например, группа лекарственного средства ингибитора Mcl-1) и p =количество фрагментов лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В ADC,

содержащих фрагмент лекарственного средства ингибитора Mcl-1, «р» относится к количеству соединений ингибитора Mcl-1, связанных с антителом или антигенсвязывающим фрагментом.

Термин «антитело» используют в самом широком смысле для обозначения молекулы иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, углевод, полинуклеотид, липид или их комбинации, по меньшей мере, через один антигенраспознающий сайт в варибельной области молекулы иммуноглобулина. Антитело может быть поликлональным или моноклональным, много- или одноцепочечным или интактным иммуноглобулином и может быть получено из природных источников или из рекомбинантных источников. «Интактное» антитело представляет собой гликопротеин, который обычно содержит, по меньшей мере, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (сокращенно VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гиперварибельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino конца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варибельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Антителом может быть моноклональное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, антитело верблюдовых или химерное антитело. Антитела могут быть любого изотипа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. Антитело может быть интактным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Термин «фрагмент антитела», или «антигенсвязывающий фрагмент», или «функциональный фрагмент антитела» в контексте настоящего описания относится, по меньшей мере, к одной части антитела, которая сохраняет способность специфически взаимодействовать с (например, путем связывания, пространственного затруднения, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) эпитопом антигена (например, CD74). Антигенсвязывающие фрагменты также могут сохранять способность интернализироваться в антиген-экспрессирующую клетку. В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающие фрагменты также сохраняют иммунную эффекторную активность. Термины «антитело», «фрагмент антитела»,

«антигенсвязывающий фрагмент» и подобные предназначены для охвата использования связывающих доменов из антител в контексте более крупных макромолекул, таких как ADC. Было показано, что фрагменты полноразмерного антитела могут выполнять антигенсвязывающую функцию полноразмерного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')₂, фрагменты Fv, фрагменты антител scFv, дисульфидно-связанные Fv (sdFv), фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (VL или VH), домены VHH верблюжьих, мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител, таких как двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, и выделенный CDR или другие эпитопсвязывающие фрагменты антитела. Антигенсвязывающий фрагмент также может быть включен в однодоменные антитела, макситела, минитела, нанотела, интратела, диатела, триатела, тетратела, конструкции биспецифических или мультиспецифических антител, ADC, v-NAR и bis-scFv (см., например, Holliger and Hudson (2005) *Nat Biotechnol.* 23(9):1126-36). Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть привиты к каркасам на основе полипептидов, таким как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6,703,199, в котором описаны минитела полипептидов фибронектина). Термин «scFv» относится к слитому белку, содержащему, по меньшей мере, один антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, и, по меньшей мере, один антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, где вариабельные области легкой и тяжелой цепей связаны непрерывно, например, через синтетический линкер, например, короткий гибкий полипептидный линкер, и способные экспрессироваться как одноцепочечный полипептид, и где scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. Если не указано иное, scFv может иметь вариабельные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-конца и C-конца полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL. Антигенсвязывающие фрагменты получают с использованием обычных методик, известных специалистам в данной области техники, и связывающие фрагменты подвергают скринингу на применимость (например, аффинность связывания, интернализация) таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие фрагменты, например, могут быть получены расщеплением интактного белка, например, протеазой или химическим расщеплением.

Термин «определяющая комплементарность область» или «CDR» в контексте настоящего описания относится к последовательностям аминокислот в вариабельных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и аффинность связывания. Например, в общем, имеется три CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи (например, HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3). Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR могут быть определены с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991) "Sequences of Proteins

of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации «Kabat»); Al-Lazikani et al. (1997) *J Mol Biol.* 273(4):927-48 (схема нумерации «Chothia»); нумерацию ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc (2001) *Nucleic Acids Res.* 29(1):207-9; Lefranc et al. (2003) *Dev Comp Immunol.* 27(1):55-77) (схема нумерации «IMGT»); или их комбинацию. В комбинированной схеме нумерации Kabat и Chothia для данной области CDR (например, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 или LC CDR3) в некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют аминокислотным остаткам, которые определены как часть CDR Kabat вместе с аминокислотными остатками, которые определены как часть CDR Chothia. В данном контексте CDR, определенные в соответствии со схемой нумерации «Chothia», также иногда называют «гипервариабельными петлями».

В некоторых вариантах осуществления, согласно Kabat, аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене тяжелой цепи (VH) пронумерованы 31-35 (HCDR1) (например, вставка(и) после положения 35), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене легкой цепи (VL) пронумерованы 24-34 (LCDR1) (например, вставка(и) после положения 27), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с Chothia, аминокислоты CDR в VH пронумерованы 26-32 (HCDR1) (например, вставка(и) после положения 31), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки в VL пронумерованы 26-32 (LCDR1) (например, вставка(и) после положения 30), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). Путем объединения определений CDR Kabat и Chothia, в некоторых вариантах осуществления, CDR содержат или состоят, например, из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH человека, и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL человека. В некоторых вариантах осуществления, согласно IMGT, аминокислотные остатки CDR в VH пронумерованы приблизительно 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) и 93-102 (CDR3), и аминокислотные остатки CDR в VL пронумерованы приблизительно 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) и 89-97 (CDR3). В некоторых вариантах осуществления, по IMGT, области CDR антитела могут быть определены с использованием программы IMGT/DomainGap Align.

Используемый здесь термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одного антигенного эпитопа. Напротив, препараты обычных (поликлональных) антител обычно включают множество антител, направленных против (или специфичных для) различных эпитопов. Определение «моноклональное» указывает на характер антитела, поскольку оно получено из по существу гомогенной популяции антител и не должно толковаться как требующее получения антитела каким-либо конкретным методом. Например, моноклональные антитела, которые будут использоваться в соответствии с настоящим описанием, могут

быть получены гибридным способом, впервые описанным Kohler et al. (1975) Nature 256:495, или могут быть получены способами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4,816,567). Моноклональные антитела также можно выделить из библиотек фаговых антител с использованием методик, описанных у Clackson et al. (1991) Nature 352:624-8 и Marks et al. (1991) J Mol Biol. 222:581-97, например. Термин также включает препараты молекул антител с одномолекулярным составом. Композиция моноклональных антител демонстрирует единственную специфичность связывания и сродство к конкретному эпитопу.

Описанные в настоящем документе моноклональные антитела могут быть не человеческими, человеческими или гуманизированными. Термин конкретно включает «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепь(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они специфически связываются с антигеном-мишенью и/или проявляют желаемую биологическую активность.

Используемый здесь термин «антитело человека» относится к антителу, продуцируемому человеком, или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность антитела, продуцируемого человеком. Термин включает антитела, имеющие переменные области, в которых как каркасная область, так и области CDR происходят из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также происходит из таких последовательностей человека, например, последовательности зародышевой линии человека или мутированных версий последовательностей зародышевой линии человека или антител, содержащих консенсусные каркасные последовательности, полученные из анализа последовательностей каркасной области человека, например, как описано в Knappik et al. ((2000) J Mol Biol. 296(1):57-86). Структуры и расположение переменных доменов иммуноглобулина, например CDR, могут быть определены с использованием хорошо известных схем нумерации, например, схемы нумерации Kabat, схемы нумерации Chothia или комбинации Kabat и Chothia и/или нумерации ImMunoGenTics (IMGT). Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro*, или соматической мутацией *in vivo*, или консервативной заменой для улучшения стабильности или продуцирования). Однако используемый здесь термин «антитело человека» не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к каркасным последовательностям человека.

Термин «рекомбинантное антитело человека» в контексте настоящего описания относится к антителу человека, которое получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такими как антитела, выделенные из животного (например, мыши), которые являются трансгенными или трансхромосомными для генов иммуноглобулина человека, или гибридома, полученная из них, антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела человека, например, из трансфектомы, антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг всех или части последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные области, в которых области каркаса и CDR происходят из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления, однако, такие рекомбинантные антитела человека могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* (или, когда используется животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотными последовательностями областей VH и VL рекомбинантных антител являются последовательности, которые, хотя и происходят из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека и связаны с ними, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Используемый здесь термин «химерное антитело» относится к антителам, в которых аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит от двух или нескольких видов. В некоторых случаях, вариабельные области как тяжелой, так и легкой цепей соответствуют вариабельным областям антител, происходящих от одного вида, с желаемой специфичностью, аффинностью и активностью, в то время как константные области гомологичны антителам, полученным от другого вида (например, человека) чтобы свести к минимуму иммунный ответ у последних видов.

Используемый здесь термин «гуманизированное антитело» относится к формам антител, которые содержат последовательности не человеческих (например, мышинных) антител, а также антитела человека. Такие антитела представляют собой тип химерного антитела, которое содержит минимальную последовательность, полученную из не человеческого иммуноглобулина. В общем, гуманизированное антитело будет включать практически все, по меньшей мере, один и обычно два вариабельных домена, в которых все или практически все гипервариабельные петли соответствуют петлям не человеческого иммуноглобулина, и все или практически все каркасные области (FR) являются участками последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело можно дополнительно модифицировать заменой остатков или в каркасной области Fv, и/или в замененных не человеческих остатках, чтобы уточнить и оптимизировать

специфичность, аффинность и/или активность антитела.

Термин «Fc область», как используется в данном документе, относится к полипептиду, содержащему СН3, СН2 и, по меньшей мере, часть шарнирной области константного домена антитела. Необязательно, Fc область может включать домен СН4, присутствующий в некоторых классах антител. Fc область может включать всю шарнирную область константного домена антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc область и СН1 область антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc область СН3 область антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc область, СН1 область и область каппа/лямбда из константного домена антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область, например, константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, такая константная область модифицирована по сравнению с константной областью дикого типа. То есть, полипептид может содержать изменения или модификации одного или нескольких из трех константных доменов тяжелой цепи (СН1, СН2 или СН3) и/или константного домена легкой цепи (CL). Примеры модификаций включают добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких доменах. Такие изменения могут быть включены для оптимизации эффекторной функции, периода полужизни и т. д.

Термин «интернализация», используемый в настоящем документе в отношении антитела или антигенсвязывающего фрагмента, относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, который способен проходить через двухслойную жировую мембрану клетки во внутренний компартмент (т.е. «интернализироваться») при связывании с клеткой, предпочтительно, в деструктивный компартмент в клетке. Например, интернализирующее анти-HER2-антитело является антителом, которое способно попадать в клетку после связывания с HER2 на клеточной мембране. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, используемые в описанных в настоящем документе ADC, таргетируют антиген клеточной поверхности (например, CD74) и являются интернализирующим антителом или интернализирующим антигенсвязывающим фрагментом (т.е. ADC проходит через клеточную мембрану после связывания антигена). В некоторых вариантах осуществления, интернализирующее антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает рецептор на поверхности клетки. Интернализирующее антитело или интернализирующий антигенсвязывающий фрагмент, который таргетирует рецептор на клеточной мембране, может вызывать рецептор-опосредованный эндоцитоз. В некоторых вариантах осуществления, интернализирующее антитело или интернализирующий антигенсвязывающий фрагмент вводят в клетку посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Термин «не интернализирующее», используемый в настоящем документе в отношении антитела или антигенсвязывающего фрагмента, относится к антителу или

антигенсвязывающему фрагменту, который остается на поверхности клетки после связывания с клеткой. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, используемые в описанных в настоящем документе ADC, таргетируют антиген клеточной поверхности и являются не интернализирующим антителом или не интернализирующим антигенсвязывающим фрагментом (т.е. ADC остается на поверхности клетки и не переносится через клеточную мембрану после связывания антигена). В некоторых вариантах осуществления, не интернализирующее антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывает не интернализирующий рецептор или другой антиген клеточной поверхности. Примеры не интернализирующих антигенов клеточной поверхности включают, но не ограничиваются ими, CA125 и CEA, и антитела, которые связываются с не интернализирующими антигенными мишенями, также известны в данной области техники (см., например, Bast et al. (1981) *J Clin Invest.* 68(5):1331-7; Scholler and Urban (2007) *Biomark Med.* 1(4):513-23; and Boudousq et al. (2013) *PLoS One* 8(7):e69613).

Используемый в настоящем документе термин «специфичность связывания» относится к способности отдельного антитела или антигенсвязывающего фрагмента предпочтительно реагировать с одной антигенной детерминантой, а не с другой антигенной детерминантой. Степень специфичности указывает на степень, в которой антитело или фрагмент предпочтительно связывается с одной антигенной детерминантой, а не с другой антигенной детерминантой. Кроме того, используемые в настоящем документе термины «специфический», «специфически связывается» и «связывается специфически» относятся к реакции связывания между антителом или антигенсвязывающим фрагментом (например, анти-CD74-антителом) и антигеном-мишенью (например, CD74) в гетерогенной популяции белков и других биопрепаратов. Антитела можно тестировать на специфичность связывания, сравнивая связывание с подходящим антигеном со связыванием с нерелевантным антигеном или смесью антигенов при заданном наборе условий. Если антитело связывается с соответствующим антигеном с, по меньшей мере, в 2, 5, 7, 10 или более раз большей аффинностью, чем с нерелевантным антигеном или смесью антигенов, то оно считается специфическим. «Специфическое антитело» или «мишень-специфическое антитело» является антителом, которое связывается только с антигеном-мишенью (например, CD74), но не связывается (или демонстрирует минимальное связывание) с другими антигенами. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает антиген-мишень (например, CD74), имеет K_D менее 1×10^{-6} М, менее 1×10^{-7} М, менее 1×10^{-8} М, менее 1×10^{-9} М, менее 1×10^{-10} М, менее 1×10^{-11} М, менее 1×10^{-12} М или менее 1×10^{-13} М. В некоторых вариантах осуществления, K_D равно от 1 до 500 пМ. В некоторых вариантах осуществления, K_D равно от 500 пМ до 1 мкМ, от 1 мкМ до 100 нМ или от 100 мМ до 10 нМ.

Используемый в настоящем документе термин «аффинность» относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в отдельных антигенных сайтах. Не будучи связанной теорией, в пределах каждого антигенсвязывающего сайта, вариабельная область «плеча» антитела взаимодействует посредством слабых не ковалентных сил с

антигеном во многих сайтах; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность. Аффинность связывания антитела представляет собой сумму сил притяжения и отталкивания, действующих между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом.

Термин « k_{on} » или « k_a » относится к константе скорости ассоциации антитела с антигеном с образованием комплекса антитело/антиген. Скорость можно определить с помощью стандартных анализов, таких как поверхностный плазмонный резонанс, биослойная интерферометрия или ИФА анализ.

Термин « k_{off} » или « k_d » относится к константе скорости диссоциации антитела от комплекса антитело/антиген. Скорость можно определить с помощью стандартных анализов, таких как поверхностный плазмонный резонанс, биослойная интерферометрия или ИФА анализ.

Термин « K_D » относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. K_D рассчитывается как k_d/k_a . Скорость можно определить с помощью стандартных анализов, таких как поверхностный плазмонный резонанс, биослойная интерферометрия или ИФА анализ.

Термин «эпитоп» относится к части антигена, способной распознаваться и специфически связываться антителом (или антигенсвязывающим фрагментом). Детерминанты эпитопа обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи углеводов или сахаров, и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Когда антигеном является полипептид, эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот или не смежных аминокислот, наложенных друг на друга путем третичной укладки полипептида. Эпитоп может быть «линейным» или «конформационным». Конформационные и линейные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп, связанный с антителом (или антигенсвязывающим фрагментом), может быть идентифицирован с использованием любого способа картирования эпитопа, известного в данной области техники, включая рентгеновскую кристаллографию для идентификации эпитопа путем прямой визуализации комплекса антиген-антитело, а также мониторинг связывания антитела с фрагментами или мутированными вариантами антигена или мониторинг доступности растворителя для различных частей антитела и антигена. Примеры стратегий, используемых для картирования эпитопов антител, включают, помимо прочего, сканирование олигопептидов на основе массива, ограниченный протеолиз, сайт-направленный мутагенез, высокопроизводительное картирование мутагенеза, водород-дейтериевый обмен и масс-спектрометрию (см., например, Gershoni et al. (2007) *BioDrugs* 21:145-56; and Hager-Braun and Tomer (2005) *Expert Rev Proteomics* 2:745-56).

Конкуренсное связывание и связывание эпитопов также можно использовать для определения антител, имеющих идентичные или перекрывающиеся эпитопы. Конкуренсное связывание можно оценить с помощью анализа перекрестного

блокирования, такого как анализ, описанный в “Antibodies, A Laboratory Manual,” Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow and Lane (1st edition 1988, 2nd edition 2014). В некоторых вариантах осуществления, конкурентное связывание идентифицируют, когда тестируемое антитело или связывающий белок снижает связывание эталонного антитела или связывающего белка с антигеном-мишенью, таким как CD74 (например, связывающий белок, содержащий CDR и/или вариабельные домены, выбранные из доменов, указанных в таблицах 3-5), по меньшей мере, около 50% в анализе перекрестного блокирования (например, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5% или более или любой другой процент между ними), и/или наоборот. В некоторых вариантах осуществления, конкурентное связывание может происходить из-за общих или сходных (например, частично перекрывающихся) эпитопов или из-за пространственного затруднения, когда антитела или связывающие белки связываются с соседними эпитопами (см., например, Tzartos, *Methods in Molecular Biology* (Morris, ed. (1998) vol. 66, pp. 55-66)). В некоторых вариантах осуществления, конкурентное связывание можно использовать для сортировки групп связывающих белков, которые имеют похожие эпитопы. Например, связывающие белки, которые конкурируют за связывание, могут быть «объединены» как группа связывающих белков, которые имеют перекрывающиеся или соседние эпитопы, в то время как те, которые не конкурируют, помещаются в отдельную группу связывающих белков, которые не имеют перекрывающихся или соседних эпитопов.

В настоящем документе термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков. Термины охватывают аминокислотные полимеры, содержащие две или несколько аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями, аминокислотные полимеры, в которых один или несколько аминокислотных остатков являются искусственными химическими миметиками соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также встречающиеся в природе аминокислотные полимеры и не встречающиеся в природе аминокислотные полимеры. Термины включают, например, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, гибридные белки, среди прочего. Термины также включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинации. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также неявно включает ее консервативно модифицированные варианты.

«Рекомбинантный» белок относится к белку (например, антителу), полученному с использованием рекомбинантных методов, например, посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

«Выделенный» белок относится к белку, не сопровождаемому, по меньшей мере, некоторым материалом, с которым он обычно связан в своем естественном состоянии. Например, встречающийся в природе полинуклеотид или полипептид, присутствующий в живом организме, не выделен, но тот же полинуклеотид или полипептид, отделенный от

некоторых или всех сосуществующих материалов в живом организме является выделенным. Это определение включает продуцирование антитела в большом количестве организмов и/или клетках-хозяевах, которые известны в данной области техники.

«Выделенное антитело», как используется в настоящем документе, является антителом, которое было идентифицировано и отделено от одного или нескольких (например, большинства) компонентов (по массе) его исходной среды, например, от компонентов культуры клеток гибридомы или другой культуры клеток, которая использовалась для его получения. В некоторых вариантах осуществления, разделение проводят таким образом, чтобы в достаточной степени удалялись компоненты, которые в противном случае могут повлиять на пригодность антитела для желаемых применений (например, для терапевтического использования). Способы получения выделенных антител известны в данной области техники и включают, без ограничения, хроматографию на белке А, анионообменную хроматографию, катионообменную хроматографию, фильтрацию с удержанием вирусов и ультрафильтрацию.

Используемый в настоящем документе термин «вариант» относится к последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, которая отличается от эталонной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, соответственно, но сохраняет одно или несколько биологических свойств эталонной последовательности. Вариант может содержать одну или несколько аминокислотных замен, делеций и/или вставок (или соответствующих замен, делеций и/или вставок кодонов) относительно эталонной последовательности. Изменения в варианте нуклеиновой кислоты могут не изменять аминокислотную последовательность пептида, кодируемого эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты, или могут приводить к аминокислотным заменам, добавлениям, делециям, слияниям и/или усечениям. В некоторых вариантах осуществления, вариант нуклеиновой кислоты, описанный в настоящем документе, кодирует последовательность аминокислот, идентичную последовательности, кодируемой не модифицированной нуклеиновой кислотой, или кодирует модифицированную последовательность аминокислот, которая сохраняет одно или несколько функциональных свойств не модифицированной аминокислотной последовательности. Изменения в последовательности вариантов пептида обычно ограничены или консервативны, так что последовательности не модифицированного пептида и варианта в целом очень похожи и во многих областях идентичны. В некоторых вариантах осуществления, вариант пептида сохраняет одно или несколько функциональных свойств не модифицированной пептидной последовательности. Вариант и не модифицированный пептид могут отличаться по аминокислотной последовательности одной или несколькими заменами, добавлениями, делециями в любой комбинации.

Вариант нуклеиновой кислоты или пептида может быть вариантом, встречающимся в природе, или вариантом, который, как известно, не встречается в природе. Варианты нуклеиновых кислот и пептидов могут быть получены методами мутагенеза, прямого синтеза или другими методами, известными в данной области техники. Вариант не

обязательно требует физических манипуляций с эталонной последовательностью. Если последовательность содержит нуклеиновую кислоту или аминокислоту, отличную от эталонной последовательности, она считается «вариантом» независимо от того, как она была синтезирована. В некоторых вариантах осуществления, вариант имеет высокую идентичность последовательности (т.е. идентичность последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности 60% или выше) по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, вариант пептида включает полипептиды, содержащие аминокислотные замены, делеции и/или вставки, при условии, что полипептид имеет по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичность аминокислотной последовательности с эталонной последовательностью или с соответствующим сегментом (например, функциональным фрагментом) эталонной последовательности, например, те варианты, которые также сохраняют одну или несколько функций эталонной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, вариант нуклеиновой кислоты включает полинуклеотиды, содержащие аминокислотные замены, делеции и/или вставки, при условии, что полинуклеотид имеет, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности нуклеиновой кислоты с эталонной последовательностью или с соответствующим сегментом (например, функциональным фрагментом) эталонной последовательности.

Термин «консервативно модифицированный вариант» применяется к последовательностям как аминокислот, так и нуклеиновых кислот. Что касается последовательностей нуклеиновых кислот, консервативно модифицированные варианты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или практически идентичные аминокислотные последовательности. Из-за вырожденности генетического кода, большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой данный белок. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислотный аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин определяется кодоном, этот кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновой кислоты представляют собой «молчащие вариации», которые представляют собой один из видов консервативно модифицированных вариаций. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в настоящем документе, которая кодирует полипептид, также описывает все возможные молчащие вариации нуклеиновой кислоты. Специалист в данной области

техники поймет, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (кроме AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с образованием функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, неявно присутствует в каждой описанной последовательности. Для полипептидных последовательностей, консервативно модифицированные варианты включают отдельные замены, делеции или добавления к полипептидной последовательности, которые приводят к замене аминокислоты на химически подобную аминокислоту. Консервативные замены, обеспечивающие функционально подобные аминокислоты, хорошо известны в данной области техники.

Термин «консервативные модификации последовательности», используемый в настоящем документе, относится к аминокислотным модификациям, которые существенно не влияют или не изменяют характеристики связывания, например, антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации можно вводить в антитело или антигенсвязывающий фрагмент стандартными методами, известными в данной области техники, такими как, например, сайт-направленный мутагенез и опосредованный ПЦР мутагенез. Консервативные аминокислотные замены являются заменами, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), не заряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько аминокислотных остатков в антителе можно заменить другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и измененное антитело можно протестировать с использованием функциональных анализов, описанных в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин «гомологичный» или «идентичность» относится к идентичности последовательности субъединицы между двумя полимерными молекулами, например, между двумя молекулами нуклеиновой кислоты, такими как две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или между двумя молекулами полипептида. Когда положение субъединицы в обеих из двух молекул занято одной и той же мономерной субъединицей; например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то они гомологичны или идентичны в этом положении. Гомология между

двумя последовательностями является прямой функцией количества совпадающих или гомологичных положений. Например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях совпадают или гомологичны, две последовательности гомологичны на 50%; если 90% положений (например, 9 из 10) совпадают или гомологичны, две последовательности гомологичны на 90%.

Доля «идентичности последовательностей» может быть определена путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, где фрагмент аминокислотной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или удаления (например, гэпы или «липкие» концы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Долю можно рассчитать, определив количество положений, в которых идентичный аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, чтобы получить количество совпадающих положений, разделив количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножив результат на 100, чтобы получить долю идентичности последовательностей. Результатом является доля идентичности субъектной последовательности по отношению к запрашиваемой последовательности. Доля идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей, с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Как правило, аминокислотная идентичность или гомология между белками, описанными в данном документе, и их вариантами, включая варианты антигенов-мишеней (таких как CD74) и варианты переменных доменов антител (включая индивидуальные варианты CDR), составляет, по меньшей мере 80% от изображенных в настоящем документе последовательностей, например, идентичность или гомологию, по меньшей мере, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, почти 100% или 100%.

Сравнение последовательностей и определение доли идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. В некоторых вариантах осуществления, долю идентичности между двумя аминокислотными последовательностями определяют с использованием алгоритма Needleman and Wunsch ((1970) J Mol Biol. 48:444-53), который включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG, с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250 с массой гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и массой длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления, долю идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями определяют с помощью программы GAP в пакете программного обеспечения GCG, с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и массы гэпа 40, 50, 60, 70 или 80 и массы длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Типовым набором параметров является оценочная матрица Blossum 62 со штрафом за гэп 12, штрафом за продолжение гэпа 4 и штрафом за сдвиг рамки гэпа 5. Долю идентичности между двумя аминокислотными или

нуклеотидными последовательностями также можно определить с использованием алгоритма Meyers and Miller ((1989) CABIOS 4:11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0) с использованием таблицы остатков массы PAM120, штрафа за продолжение гэпа 12 и штрафа за гэп 4.

Термин «агент» используется в настоящем документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы, экстракта, полученного из биологических материалов, или комбинации двух или нескольких из них. Термин «терапевтический агент» или «лекарственное средство» относится к агенту, который способен модулировать биологический процесс и/или обладает биологической активностью. Ингибиторы Mcl-1 и содержащие их ADC, как описано в настоящем документе, являются иллюстративными терапевтическими агентами.

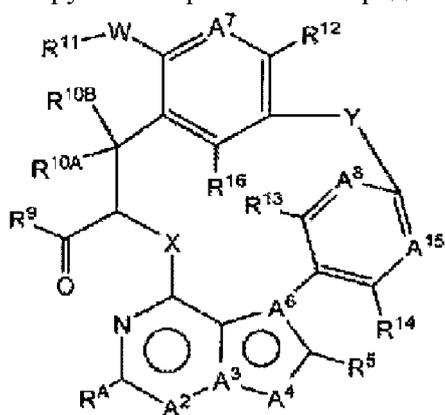
Термин «химиотерапевтический агент» или «противораковый агент» используется в настоящем документе для обозначения всех агентов, которые эффективны при лечении рака (независимо от механизма действия). Ингибирование метастазирования или ангиогенеза часто является свойством химиотерапевтического агента. Химиотерапевтические агенты включают антитела, биологические молекулы и небольшие молекулы и охватывают ингибиторы Mcl-1 и ADC, содержащие их, как описано в настоящем документе. Химиотерапевтический агент может быть цитотоксическим или цитостатическим агентом. Термин «цитостатический агент» относится к агенту, который ингибирует или подавляет рост клеток и/или размножение клеток. Термин «цитотоксический агент» относится к веществу, которое вызывает гибель клеток, прежде всего, вмешиваясь в активность экспрессии и/или функционирование клетки.

Термин «миелоидноклеточный лейкоз 1» или «Mcl-1» в настоящем документе относится к любой нативной форме Mcl-1 человека, антиапоптотического члена семейства белков Bcl-2. Термин охватывает Mcl-1 человека полной длины (например, эталонная последовательность UniProt: Q07820; SEQ ID NO: 63), а также любую форму Mcl-1 человека, которая может быть результатом клеточного процессинга. Термин также охватывает функциональные варианты или фрагменты Mcl-1 человека, включая, но не ограничиваясь ими, варианты сплайсинга, аллельные варианты и изоформы, которые сохраняют одну или несколько биологических функций Mcl-1 человека (т.е. варианты и фрагменты включены, если контекст не указывает что этот термин используется только для обозначения белка дикого типа). Mcl-1 может быть выделен от человека или может быть получен рекомбинантным или синтетическими методами.

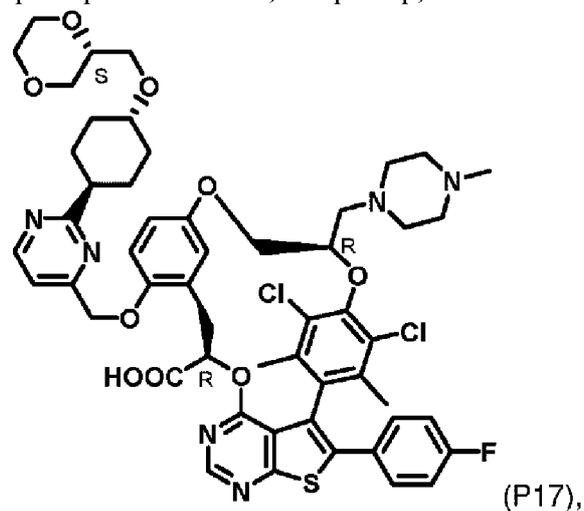
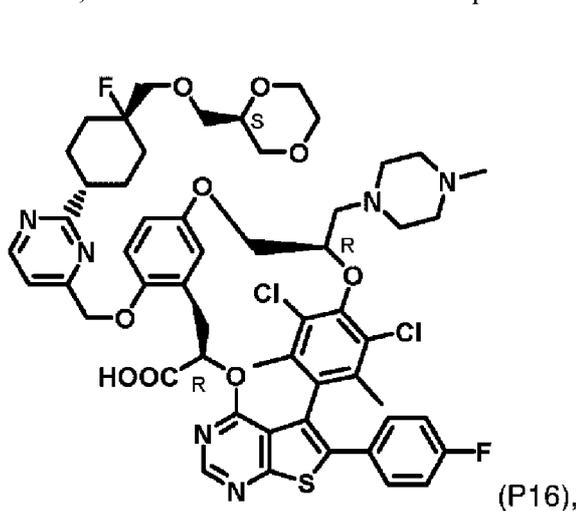
Термин «ингибировать», или «ингибирование», или «ингибирующий» в настоящем документе означает снижение биологической активности или процесса на измеримое количество и может включать, но не требует полной профилактики или ингибирования. В некоторых вариантах осуществления, «ингибирование» означает снижение экспрессии и/или активности Mcl-1 и/или одного или нескольких вышестоящих модуляторов или их нижестоящих мишеней.

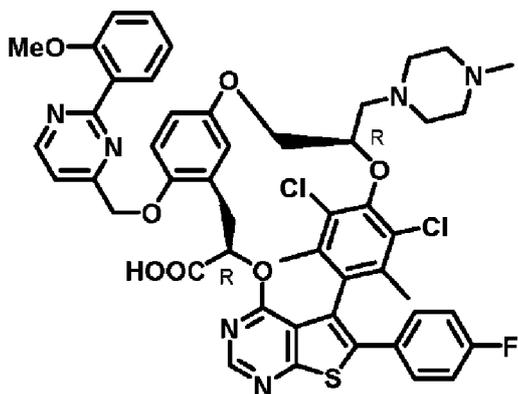
Термин «ингибитор Mcl-1» в настоящем документе относится к агенту, способному

снижать экспрессию и/или активность Mcl-1 и/или одного или нескольких вышестоящих модуляторов или их нижестоящих мишеней. Типовые модуляторы Mcl-1 (включая типовые ингибиторы Mcl-1) описаны в WO 2015/097123; WO 2016/207216; WO 2016/207217; WO 2016/207225; WO 2016/207226; WO 2017/125224; WO 2019/035899, WO 2019/035911, WO 2019/035914, WO 2019/035927, US 2019/0055264, WO 2016/033486, WO 2017/147410, WO 2018/183418 и WO 2017/182625, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в качестве типовых модуляторов Mcl-1, включая типовые ингибиторы Mcl-1, которые могут быть включены в качестве компонентов лекарственного средства в описанные ADC. Например, типовые ингибиторы Mcl-1, которые могут быть включены в качестве групп лекарственного средства в описанных ADC, имеют формулу:



где каждая переменная определена, как в WO2019/035911; WO 2019/035899; WO 2019/035914; или WO 2019/035927. Конкретные примеры включают, например,





(P15), где каждое соединение в качестве

полезной нагрузки лекарственного средства может быть конъюгировано с антителом или линкером через атом азота N-метила в пиперазинильной функциональной группе соединения. Используемые в настоящем документе термины «производное» и «аналог», когда относятся к ингибитору Mcl-1 или подобные, означают любое такое соединение, которое сохраняет по существу такую же, аналогичную или усиленную биологическую функцию или активность по сравнению с исходным соединением, но имеет измененную химическую или биологическую структуру.

В контексте настоящего описания «группа лекарственного средства ингибитора Mcl-1», «ингибитор Mcl-1» и т.п. относятся к компоненту ADC или композиции, которая обеспечивает структуру соединения ингибитора Mcl-1 или соединения, модифицированного для присоединения к ADC, которое сохраняет по существу такую же, аналогичную или усиленную биологическую функцию или активность по сравнению с исходным соединением. В некоторых вариантах осуществления, группой лекарственного средства ингибитора Mcl-1 является компонент (D) в ADC формулы (1).

Используемый в настоящем документе термин «рак» относится к наличию клеток, обладающих характеристиками, типичными для клеток, вызывающих рак, такими как неконтролируемая пролиферация, бессмертие, метастатический потенциал, быстрый рост и скорость пролиферации и/или определенные морфологические особенности. Часто раковые клетки могут быть в форме опухоли или массы, но такие клетки могут существовать отдельно внутри субъекта или могут циркулировать в кровотоке как независимые клетки, такие как клетки лейкоза или лимфомы. Термин «рак» включает все типы рака и метастазов рака, включая гематологические раковые образования, солидные опухоли, саркомы, карциномы и другие виды солидных и не солидных опухолей. Гематологические раковые заболевания могут включать злокачественные опухоли В-клеток, рак крови (лейкозы), рак плазматических клеток (миеломы, например, множественную миелому) или рак лимфатических узлов (лимфомы). Типовые В-клеточные злокачественные новообразования включают хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому и диффузную В-крупноклеточную лимфому. Лейкозы могут включать острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL),

хронический миелогенный лейкоз (СМL), хронический миеломоноцитарный лейкоз (СММL), острый моноцитарный лейкоз (АМоL) и т. д. Лимфомы могут включать лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому и т. д. Другие гематологические виды рака могут включать синдром миелодисплазии (MDS). Солидные опухоли могут включать карциномы, такие как аденокарцинома, например, рак груди, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак толстой кишки или колоректальный, рак легких, рак желудка, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичников, холангиокарциному, глиому, меланому и т. д. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак груди, множественная миелома, плазмоклеточная миелома, лейкоз, лимфома, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярную лимфому, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланому, миелогенный лейкоз, миелому, рак полости рта, рак яичников, мелкоклеточный рак легких, хронический лимфолейкоз, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома или рак желудка.

В некоторых вариантах осуществления, раком является гематологический рак, например, лейкоз, лимфома или миелома. Например, комбинация, описанная в настоящем документе, может быть использована для лечения злокачественных новообразований и родственных нарушений, включая, но не ограничиваясь ими, например, острый лейкоз, например, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз (BALL), Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз (TALL), острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфоидный лейкоз (ALL); хронический лейкоз, например, хронический миелогенный лейкоз (СМL), хронический лимфоцитарный лейкоз (СLЛ); дополнительный гематологический рак или гематологическое состояние, например, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, бластное плазмцитоподобное новообразование дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, плазмцитоподобное новообразование дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема, миелофиброз, амилоидоз легкой цепи амилоида, хронический нейтрофильный лейкоз, эссенциальную тромбоцитемию, хронический эозинофильный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, синдром Рихтера, острый лейкоз смешанного фенотипа, острый бифенотипический лейкоз и «прелейкоз», которые представляют собой разнообразный набор гематологических состояний, объединенных неэффективным продуцированием (или дисплазией) миелоидных клеток крови, и подобные.

Используемый в настоящем документе термин «опухоль» относится к любой массе

ткани, которая возникает в результате чрезмерного роста или пролиферации клеток, доброкачественных или злокачественных, включая предраковые поражения. В некоторых вариантах осуществления, опухолью является рак груди, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, меланома, рак ротовой полости, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, опухолью является рак желудка.

Термины «опухолевая клетка» и «раковая клетка» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к отдельным клеткам или всей популяции клеток, полученных из опухоли или рака, включая как не канцерогенные клетки, так и раковые стволовые клетки. Термины «опухолевая клетка» и «раковая клетка» будут модифицированы термином «не канцерогенные», если они относятся исключительно к тем клеткам, которые не обладают способностью обновляться и дифференцироваться, чтобы отличить эти клетки от раковых стволовых клеток.

Термин «отрицательный по мишени», «отрицательный по антигену-мишени» или «отрицательный по антигену» в контексте настоящего описания относится к отсутствию экспрессии антигена-мишени клеткой или тканью. Термин «положительный по мишени», «положительный по целевому антигену» или «положительный по антигену» относится к наличию экспрессии антигена-мишени. Например, клетка или клеточная линия, которые не экспрессируют антиген-мишень, могут быть описаны как отрицательные по мишени, тогда как клетка или клеточная линия, которые экспрессируют антиген-мишень, могут быть описаны как положительные по мишени.

Термины «субъект» и «пациент» используют в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения любого человека или животного, не являющегося человеком, нуждающегося в лечении. К животным, не являющимся человеком, относятся все позвоночные (например, млекопитающие и не млекопитающие), такие как любое млекопитающее. Неограничивающие примеры млекопитающих включают людей, шимпанзе, человекообразных обезьян, обезьян, крупный рогатый скот, лошадей, овец, коз, свиней, кроликов, собак, кошек, крыс, мышей и морских свинок. Неограничивающие примеры не млекопитающих включают птиц и рыб. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является человек.

Термин «субъект, нуждающийся в лечении» в настоящем документе относится к субъекту, которому лечение (например, лечение одним или несколькими типовыми описанными в настоящем документе соединениями ADC) принесет пользу с биологической, медицинской или с точки зрения качества жизни.

Используемый в настоящем документе термин «лечить», «лечение» или «лечение» относится к любому улучшению любых последствий заболевания, нарушения или состояния, такому как длительная выживаемость, снижение заболеваемости и/или уменьшение побочных эффектов от альтернативного терапевтического метода. В некоторых вариантах осуществления, лечение включает отсрочку или облегчение

заболевания, нарушения или состояния (т.е. замедление, остановку или уменьшение развития заболевания или, по меньшей мере, одного из его клинических симптомов). В некоторых вариантах осуществления, лечение включает отсрочку, облегчение или улучшение, по меньшей мере, одного физического параметра заболевания, нарушения или состояния, включая те, которые могут быть не различимы пациентом. В некоторых вариантах осуществления, лечение включает модуляцию заболевания, нарушения или состояния либо физически (например, стабилизация выраженного симптома), либо физиологически (например, стабилизация физического параметра), либо обоих. В некоторых вариантах осуществления, лечение включает введение описанного соединения или композиции ADC субъекту, например пациенту, для получения перечисленных в настоящем документе преимуществ лечения. Лечение может состоять в том, чтобы вылечить, излечить, ослабить, отсрочить, предотвратить, облегчить, изменить, вылечить, облегчить, облегчить, улучшить или повлиять на заболевание, нарушение или состояние (например, рак), симптомы заболевания, нарушения или состояния (например, рака) или предрасположенность к заболеванию, нарушению или состоянию (например, раку). В некоторых вариантах осуществления, помимо лечения субъекта, страдающего заболеванием, нарушением или состоянием, композиция, описанная в настоящем документе, также может быть предоставлена профилактически для предотвращения или снижения вероятности развития этого заболевания, нарушения или состояния.

Используемый в настоящем документе термин «предотвращать», «предотвращение» или «профилактика» заболевания, нарушения или состояния относится к профилактическому лечению заболевания, нарушения или состояния; или к задержке начала или прогрессирования заболевания, нарушения или состояния.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату композиции, например, соединению или композиции ADC, в дополнение к, по меньшей мере, еще одному (и, необязательно, более чем одному другому) компоненту, подходящему для введения субъекту, такому как фармацевтически приемлемый носитель, стабилизатор, разбавитель, диспергирующий агент, суспендирующий агент, загуститель и/или эксципиент. Предлагаемые в настоящем документе фармацевтические композиции находятся в такой форме, которая позволяет введение и впоследствии обеспечивает заданную биологическую активность активного ингредиента(ов) и/или для достижения терапевтического эффекта. Фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, предпочтительно не содержат дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому препарат будет вводиться.

Используемые в настоящем документе термины «фармацевтически приемлемый носитель» и «физиологически приемлемый носитель», которые могут использоваться взаимозаменяемо, относятся к носителю или разбавителю, который не вызывает значительного раздражения у субъекта и не отменяет биологическую активность и свойства вводимого соединения ADC или композиции и/или любого дополнительного

терапевтического агента в композиции. Фармацевтически приемлемые носители могут усиливать или стабилизировать композицию или могут использоваться для облегчения приготовления композиции. Фармацевтически приемлемые носители могут включать растворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты), изотонические агенты, агенты, замедляющие абсорбцию, соли, консерванты, стабилизаторы лекарственных средств, связующие, эксципиенты, разрыхлители, смазывающие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители и подобные и их комбинации, известные специалистам в данной области техники (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289- 1329). За исключением случаев, когда любой обычный носитель несовместим с активным ингредиентом, предполагается его использование в терапевтических или фармацевтических композициях. Носитель может быть выбран для минимизации неблагоприятных побочных эффектов у субъекта и/или для минимизации разложения активного ингредиента(ов). В любой из этих составов также может быть включен адъювант.

Используемый в настоящем документе термин «эксципиент» относится к инертному веществу, добавляемому в фармацевтическую композицию для дальнейшего облегчения введения активного ингредиента. Составы для парентерального введения могут, например, содержать эксципиенты, такие как стерильная вода или солевой раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, растительные масла или гидрогенизированные нафталины. Другие типовые эксципиенты включают, но не ограничиваются ими, бикарбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, частицы сополимера этилен-винилацетата и поверхностно-активные вещества, включая, например, полисорбат 20.

Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая не отменяет биологической активности и свойств соединений по изобретению и не вызывает значительного раздражения у субъекта, которому ее вводят. Примеры таких солей включают, но не ограничиваются ими: (а) кислотно-аддитивные соли, образованные с неорганическими кислотами, например, соляной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, фосфорной кислотой, азотной кислотой и подобными; и соли, образованные с органическими кислотами, например, уксусной кислотой, щавелевой кислотой, винной кислотой, янтарной кислотой, малеиновой кислотой, фумаровой кислотой, глюконовой кислотой, лимонной кислотой, яблочной кислотой, аскорбиновой кислотой, бензойной кислотой, дубильной кислотой, пальмитиновой кислотой, альгиновой кислотой, полиглутаминовой кислотой, нафталинсульфоновой кислотой, метансульфоновой кислотой, п-толуолсульфоновой кислотой, нафталиндисульфоновой кислотой, полигалактуроновой кислотой и подобными; и (b) соли, образованные из элементарных анионов, таких как хлор, бром и йод. См., например, Haynes et al., "Commentary: Occurrence of Pharmaceutically Acceptable Anions and Cations in the Cambridge Structural Database," J. Pharmaceutical Sciences, vol. 94, no. 10 (2005),

и Berge et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharmaceutical Sciences, vol. 66, no. 1 (1977), которые включены сюда посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, в зависимости от их электронного заряда, конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), линкеры, полезные нагрузки и линкеры-полезные нагрузки, описанные в настоящем документе, могут содержать моновалентный анионный противоион M_1^- . Можно использовать любой подходящий анионный противоион. В некоторых вариантах осуществления, одновалентным анионным противоионом является фармацевтически приемлемый одновалентный анионный противоион. В некоторых вариантах осуществления, одновалентный анионный противоион M_1^- может быть выбран из бромида, хлорида, йодида, ацетата, трифторацетата, бензоата, мезилата, тозилата, трифлата, формиата или подобных. В некоторых вариантах осуществления, одновалентным анионным противоионом M_1^- является трифторацетат или формиат.

Используемый в настоящем документе термин «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» относится к количеству соединения, описанного в настоящем документе, например, соединения ADC или композиции, описанных в настоящем документе, для достижения желаемого терапевтического результата (т.е. ингибирования активности фермента или белка, улучшения симптомов, облегчения симптомов или состояний, задержки прогрессирования заболевания, уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, профилактики метастазирования). В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество не вызывает причиняет нежелательных побочных эффектов. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество вызывает или причиняет побочные эффекты, но только те, которые приемлемы лечащим врачом с учетом состояния пациента. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество эффективно для определяемого уничтожения, уменьшения и/или ингибирования роста или распространения раковых клеток, размера или количества опухолей и/или другой меры уровня, стадии, прогрессирования и/или степени тяжести рака. Этот термин также применяется к дозе, которая будет вызывать конкретный ответ в клетках-мишенях, например, уменьшение, замедление или ингибирование роста клеток. Терапевтически эффективное количество можно определить, сначала введя низкую дозу, а затем постепенно увеличивая эту дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. Терапевтически эффективное количество также может варьироваться в зависимости от предполагаемого применения (*in vitro* или *in vivo*) или субъекта и болезненного состояния, которое лечат, например, массы тела и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и подобного, что может легко определить специалист в данной области техники. Конкретное количество может варьироваться в зависимости, например, от конкретной фармацевтической композиции, субъекта и его возраста, а также имеющегося состояния здоровья или риска для состояния здоровья, схемы дозирования, которую необходимо соблюдать, тяжести заболевания, вводится ли в

комбинации с другими агентами, времени введения, ткани, в которую они вводятся, и физической система доставки, в которой они переносятся. В случае рака, терапевтически эффективное количество ADC может уменьшить количество раковых клеток, уменьшить размер опухоли, ингибировать (например, замедлить или остановить) метастазирование опухоли, ингибировать (например, замедлить или остановить) рост опухоли и/или облегчить один или несколько симптомов.

Используемый в настоящем документе термин «профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективная доза» относится к количеству соединения, описанного в настоящем документе, например, соединения ADC или композиции, описанного в настоящем документе, которое является эффективным в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для того, чтобы добиться желаемого профилактического результата. Обычно, поскольку профилактическая доза используется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества. В некоторых вариантах осуществления, профилактически эффективное количество может предотвратить появление симптомов заболевания, включая симптомы, связанные с раком.

Термин « p », или «лекарственная нагрузка», или «соотношение лекарственное средство: антитело», или «соотношение лекарственное средство-антитело» или «DAR» относится к количеству фрагментов лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, т.е. лекарственной нагрузке или количеству групп -L-D на антитело или антигенсвязывающий фрагмент (Ab) в ADC формулы (1). В ADC, содержащих группу лекарственного средства ингибитора Mcl-1, « p » относится к количеству соединений ингибитора Mcl-1, связанных с антителом или антигенсвязывающим фрагментом. Например, если два соединения ингибитора Mcl-1 связаны с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, $p=2$. В композициях, содержащих несколько копий ADC формулы (1), «среднее p » относится к среднему количеству групп -L-D на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, и также называется «средней лекарственной нагрузкой».

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

Соединения конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему описанию включают соединения с противораковой активностью. В частности, соединения ADC включают антитело или антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные (т.е. ковалентно присоединенные линкером) с группой лекарственного средства (например, ингибитора Mcl-1), где группа лекарственного средства, когда она не конъюгирована с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, обладает цитотоксическим или цитостатическим действием. В некоторых вариантах осуществления, группа лекарственного средства, когда она не конъюгирована с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, способна снижать экспрессию и/или активность Mcl-1 и/или одного или нескольких вышестоящих модуляторов или их нижестоящих мишеней. Не будучи связанными теорией, посредством таргетирования экспрессии и/или активности

Mcl-1 в некоторых вариантах осуществления, ADC, описанные в настоящем документе, могут являться сильными противораковыми агентами. Кроме того, не ограничиваясь теорией, посредством конъюгирования группы лекарственного средства с антителом, которое связывает антиген, связанный с экспрессией в опухолевой клетке или раке, ADC может обеспечивать улучшенную активность, лучшую цитотоксическую специфичность и/или снижение гибели вне мишени по сравнению с лекарственным средством при введении отдельно.

В некоторых вариантах осуществления, поэтому, компоненты ADC выбраны для (i) сохранения одного или нескольких терапевтических свойств, проявляемых антителом и группами лекарственного средства, при выделении, (ii) поддержания специфических связывающих свойств антитела или антигенсвязывающего фрагмента; (iii) оптимизации лекарственной нагрузки и соотношения лекарственное средство-антитело; (iv) обеспечения доставки, например, внутриклеточной доставки, группы лекарственного средства посредством стабильного присоединения к антителу или антигенсвязывающему фрагменту; (v) сохранения стабильности ADC в виде интактного конъюгата до транспортировки или доставки в сайт-мишень; (vi) минимизации агрегации ADC до или после введения; (vii) проявления терапевтического эффекта, например цитотоксического эффекта, группы лекарственного средства после расщепления или другого механизма высвобождения в клеточной среде; (viii) проявления *in vivo* противораковой лечебной эффективности, сравнимой или превосходящей эффективность антитела и групп лекарственного средства при выделении; (ix) минимизации уничтожения вне мишени группой лекарственного средства; и/или (x) проявления желаемых фармакокинетических и фармакодинамических свойств, составяемости и токсикологических/иммунологических профилей. Каждое из этих свойств может дать улучшенный ADC для терапевтического использования (Ab et al. (2015) *Mol Cancer Ther.* 14:1605-13).

Соединения ADC по настоящему изобретению могут избирательно доставлять эффективную дозу цитотоксического или цитостатического агента к раковым клеткам или опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксическая и/или цитостатическая активность ADC зависит от экспрессии антигена-мишени в клетке. В некоторых вариантах осуществления, описанные ADC особенно эффективны при уничтожении раковых клеток, экспрессирующих антиген-мишень, при минимальном уничтожении вне мишени. В некоторых вариантах осуществления, описанные ADC не оказывают цитотоксическое и/или цитостатическое действие на раковые клетки, которые не экспрессируют антиген-мишень.

В некоторых аспектах, в настоящем документе представлены соединения ADC, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab), которые таргетируют раковые клетки, группу лекарственного средства ингибитора Mcl-1 (D) и линкерную группу (L), которая ковалентно присоединяет Ab к D. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с опухолеассоциированным антигеном (например, BCMA, CD33, PCAD или HER2),

например, с высокой специфичностью и высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент интернализуется в клетку-мишень при связывании, например, в компартменте деградации в клетке. В некоторых вариантах осуществления, ADC интернализуется при связывании с клеткой-мишенью, подвергаются деградации и высвобождают группу лекарственного средства ингибитор Mcl-1 для уничтожения раковых клеток. Группа лекарственного средства ингибитора Mcl-1 может высвободиться из антитела и/или линкерной группы ADC посредством ферментативного действия, гидролиза, окисления или любого другого механизма.

Типовой ADC имеет формулу (1):



где Ab=антитело или антигенсвязывающий фрагмент, L=линкерная группа, D=группа лекарственного средства ингибитора Mcl-1, и p =количество групп лекарственного средства ингибитора Mcl-1 на антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

Антитела

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент (Ab) формулы (1) включает любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с антигеном-мишенью на раковой клетке. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может связываться с антигеном-мишенью с константой диссоциации (K_D) от ≤ 1 мМ, ≤ 100 нМ или ≤ 10 нМ или любое количество между ними, по данным, например, анализа VIAcore®. В некоторых вариантах осуществления K_D составляет от 1 пМ до 500 пМ. В некоторых вариантах осуществления, K_D составляет от 500 пМ до 1 мкМ, от 1 мкМ до 100 нМ или от 100 мМ до 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, антителом или антигенсвязывающим фрагментом является четырехцепочечное антитело (также называемое иммуноглобулином, полноразмерным или интактным антителом), содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи. В некоторых вариантах осуществления, антителом или антигенсвязывающим фрагментом является антигенсвязывающий фрагмент иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, антителом или антигенсвязывающим фрагментом является антигенсвязывающий фрагмент иммуноглобулина, который сохраняет способность связывать раковый антиген-мишень и/или обеспечивать, по меньшей мере, одну функцию иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления антителом или антигенсвязывающим фрагментом является интернализирующее антитело или его интернализирующий антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, интернализирующее антитело или его интернализирующий антигенсвязывающий фрагмент связывается с раковым антигеном-мишенью, экспрессируемым на поверхности клетки, и проникает в клетку после связывания. В некоторых вариантах осуществления, группа лекарственного средства ингибитора Mcl-1 в ADC высвобождается из антитела или антигенсвязывающего фрагмента ADC после того, как ADC входит и присутствует в клетке,

экспрессирующей раковый антиген-мишень (т.е. после того, как ADC был интернализован), например, посредством расщепления, разложения антитела или антигенсвязывающего фрагмента или любого другого подходящего механизма высвобождения.

Аминокислотные последовательности типовых антител по настоящему изобретению, в дополнение к типовым антигенам-мишеням, представлены в таблицах С, D и E.

Таблица С. Аминокислотные последовательности mAb CDR

Ab	SEQ ID NO	Цепь IgG	Аминокислотная последовательность
милатузумаб	SEQ ID NO:1 (Объединенная)	HCDR1	GYTFTNYGVN
	SEQ ID NO:2 (Объединенная)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID NO: 3 (Объединенная)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:4 (Kabat)	HCDR1	NYGVN
	SEQ ID NO:2 (Kabat)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID NO: 3 (Kabat)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO: 5 (Chothia)	HCDR1	GYTFTNY
	SEQ ID NO:6 (Chothia)	HCDR2	NPNTGE
	SEQ ID NO:3 (Chothia)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:7 (IMGT)	HCDR1	GYTFTNYG
	SEQ ID NO:8 (IMGT)	HCDR2	INPNTGEP
	SEQ ID NO:9 (IMGT)	HCDR3	SRSRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:16 (Объединенная)	LCDR1	RSSQSLVHRNGNTYLH
	SEQ ID NO:17 (Объединенная)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID NO:18 (Объединенная)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID NO:16 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVHRNGNTYLH
	SEQ ID NO:17 (Kabat)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID NO:18 (Kabat)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID NO:19 (Chothia)	LCDR1	SQSLVHRNGNTY
	SEQ ID NO:20 (Chothia)	LCDR2	TVS
	SEQ ID NO:21 (Chothia)	LCDR3	SSHVPP
	SEQ ID NO:22 (IMGT)	LCDR1	QSLVHRNGNTY
	SEQ ID NO:20 (IMGT)	LCDR2	TVS
	SEQ ID NO:18 (IMGT)	LCDR3	SQSSHVPPT
Mil_HC x hzVk1a	SEQ ID NO:1 (Объединенная)	HCDR1	GYTFTNYGVN
	SEQ ID NO:2 (Объединенная)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID NO:3	HCDR3	SRGKNEAWFAY

	(Объединенная)		
	SEQ ID NO:4 (Kabat)	HCDR1	NYGVN
	SEQ ID NO:2 (Kabat)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID NO:3 (Kabat)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:5 (Chothia)	HCDR1	GYTFTNY
	SEQ ID NO:6 (Chothia)	HCDR2	NPNTGE
	SEQ ID NO:3 (Chothia)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:7 (IMGT)	HCDR1	GYTFTNYG
	SEQ ID NO:8 (IMGT)	HCDR2	INPNTGEP
	SEQ ID NO:9 (IMGT)	HCDR3	SRSRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:16 (Объединенная)	LCDR1	RSSQSLVHRNGNTYLH
	SEQ ID NO:17 (Объединенная)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID NO:18 (Объединенная)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID NO:16 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVHRNGNTYLH
	SEQ ID NO:17 (Kabat)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID NO:18 (Kabat)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID NO:19 (Chothia)	LCDR1	SQSLVHRNGNTY
	SEQ ID NO:20 (Chothia)	LCDR2	TVS
	SEQ ID NO:21 (Chothia)	LCDR3	SSHVPP
	SEQ ID NO:22 (IMGT)	LCDR1	QSLVHRNGNTY
	SEQ ID NO:20 (IMGT)	LCDR2	TVS
	SEQ ID NO:18 (IMGT)	LCDR3	SQSSHVPPT
Hcmil x LCmil_NQ	SEQ ID NO:1(Объединенная)	HCDR1	GYTFTNYGVN
	SEQ ID NO:2 (Объединенная)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID NO:3 (Объединенная)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:4 (Kabat)	HCDR1	NYGVN
	SEQ ID NO:2 (Kabat)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID NO:3 (Kabat)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:5 (Chothia)	HCDR1	GYTFTNY
	SEQ ID NO:6 (Chothia)	HCDR2	NPNTGE
	SEQ ID NO:3 (Chothia)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:7 (IMGT)	HCDR1	GYTFTNYG
	SEQ ID NO:8 (IMGT)	HCDR2	INPNTGEP
	SEQ ID NO:9 (IMGT)	HCDR3	SRSRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:35 (Объединенная)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID NO:17 (Объединенная)	LCDR2	TVSNRFS

	SEQ ID NO:18 (Объединенная)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID NO:35 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID NO:17 (Kabat)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID NO:18 (Kabat)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID NO:22 (Chothia)	LCDR1	SQSLVHRNQNTY
	SEQ ID NO:20 (Chothia)	LCDR2	TVS
	SEQ ID NO:21 (Chothia)	LCDR3	SSHVPP
	SEQ ID NO:17 (IMGT)	LCDR1	QSLVHRNQNTY
	SEQ ID NO:20 (IMGT)	LCDR2	TVS
	SEQ ID NO:18 (IMGT)	LCDR3	SQSSHVPPT
VHmil x VK1aNQ	SEQ ID NO:1 (Объединенная)	HCDR1	GYTFTNYGVN
	SEQ ID NO:2 (Объединенная)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID NO:3 (Объединенная)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:4 (Kabat)	HCDR1	NYGVN
	SEQ ID NO:2 (Kabat)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG
	SEQ ID NO:3 (Kabat)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:5 (Chothia)	HCDR1	GYTFTNY
	SEQ ID NO:6 (Chothia)	HCDR2	NPNTGE
	SEQ ID NO:3 (Chothia)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:7 (IMGT)	HCDR1	GYTFTNYG
	SEQ ID NO:8 (IMGT)	HCDR2	INPNTGEP
	SEQ ID NO:9 (IMGT)	HCDR3	SRSRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:35 (Объединенная)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID NO:17 (Объединенная)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID NO:18 (Объединенная)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID NO:35 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID NO:17 (Kabat)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID NO:18 (Kabat)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID NO:22 (Chothia)	LCDR1	SQSLVHRNQNTY
	SEQ ID NO:20 (Chothia)	LCDR2	TVS
	SEQ ID NO:21 (Chothia)	LCDR3	SSHVPP
	SEQ ID NO:17 (IMGT)	LCDR1	QSLVHRNQNTY
	SEQ ID NO:20 (IMGT)	LCDR2	TVS
	SEQ ID NO:18 (IMGT)	LCDR3	SQSSHVPPT
VHmil x VK1bNQ	SEQ ID NO:1 (Объединенная)	HCDR1	GYTFTNYGVN
	SEQ ID NO:2	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKG

	(Объединенная)		
	SEQ ID NO:3 (Объединенная)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:4 (Kabat)	HCDR1	NYGVN
	SEQ ID NO:2 (Kabat)	HCDR2	WINPNTGEPTFDDDFKGF
	SEQ ID NO:3 (Kabat)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:5 (Chothia)	HCDR1	GYTFTNY
	SEQ ID NO:6 (Chothia)	HCDR2	NPNTGE
	SEQ ID NO:3 (Chothia)	HCDR3	SRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:7 (IMGT)	HCDR1	GYTFTNYG
	SEQ ID NO:8 (IMGT)	HCDR2	INPNTGEP
	SEQ ID NO:9 (IMGT)	HCDR3	SRSRGKNEAWFAY
	SEQ ID NO:35 (Объединенная)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID NO:17 (Объединенная)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID NO:18 (Объединенная)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID NO:35 (Kabat)	LCDR1	RSSQSLVHRNQNTYLH
	SEQ ID NO:17 (Kabat)	LCDR2	TVSNRFS
	SEQ ID NO:18 (Kabat)	LCDR3	SQSSHVPPT
	SEQ ID NO:22 (Chothia)	LCDR1	SQSLVHRNQNTY
	SEQ ID NO:20 (Chothia)	LCDR2	TVS
	SEQ ID NO:21 (Chothia)	LCDR3	SSHVPP
	SEQ ID NO:17 (IMGT)	LCDR1	QSLVHRNQNTY
	SEQ ID NO:20 (IMGT)	LCDR2	TVS
	SEQ ID NO:18 (IMGT)	LCDR3	SQSSHVPPT

Таблица D. Аминокислотная последовательность и последовательности нуклеиновых кислот переменных областей mAb

Ab	SEQ ID NO	Цепь IgG	Аминокислотная последовательность
милатузумаб	10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCRSRSGKNEAWFAYWGQGLTVTVSS
	11	DNA VH	CAGGTTCACTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCAACTACGGCGTGAAGTGGATCAAGCAG GCCCTGGACAAGGCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTTCG CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC

			GATGATACCGCCGTGTACTTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCT
	23	VL	DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRN GNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYFCSQ SSHVPPTFGAGTRLEIK
	24	DNA VL	GACATTCAGCTGACACAGAGCCCTCTGAG CCTGCCTGTTACACTGGGACAGCCTGCCAG CATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGG TGCACAGAAACGGCAACACCTACCTGCAC TGGTTCAGCAGAGGCCTGGCCAGTCTCCT AGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAG ATTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGG CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATTAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCGCCGGAACCAGAC TGGAATCAAG
Mil_HC x hzVk1a	10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSRGKNEAWFAYWGQGLVTVSS
	SEQ ID NO:11	DNA VH	CAGGTTACAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCA ACTACGGCGTGA ACTGGATCAAGCAG GCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTCG CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATACCGCCGTGTACTTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCT
	SEQ ID NO:27	VL	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHR NGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYFC SQSSHVPPTFGQGTKLEIK
	SEQ ID NO:28	DNA VL	GACATTGTGATGACACAGACCCCTCTGAG CCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAG CATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGG TGCACAGAAACGGCAACACCTACCTGCAC

			TGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCT CAGCTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGA TTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGC AGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAAATCAAG
Mil_HC x hzVk1b	SEQ ID NO:10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCRSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS
	SEQ ID NO:11	DNA VH	CAGGTTACGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCAACACTACGGCGTGAACCTGGATCAAGCAG GCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTCC CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATACCGCCGTGTACTTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCT
	SEQ ID NO:31	VL	DVVMTQSPVSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHR NGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC SQSSHVPPFTFGQGTKLEIK
	SEQ ID NO:32	DNA VL	GATGTGGTTATGACACAGAGCCCTCTGAG CCTGCCTGTGACACTTGGACAGCCTGCCAG CATCAGCTGCAGATCTAGCCAGAGCCTGG TGCACAGAAACGGCAACACCTACCTGCAC TGGTATCAGCAGAGGCCCGGACAGTCTCC CAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAG ATTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGG CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGAAATCAAG
Hcmil x LCmil_NQ	SEQ ID NO:10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCRSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS

	SEQ ID NO:11	DNA VH	CAGG TTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCA ACTACGGCGTGA ACTGGATCAAGCAG GCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTTCG CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATAACCGCGTGTACTTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCT
	SEQ ID NO:36	VL	DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRN QNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSQVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQ SSHVPPTFGAGTRLEIK
	SEQ ID NO:37	DNA VL	GACATTCAGCTGACACAGAGCCCTCTGAG CCTGCCTGTTACTGTTGGACAGCCTGCCAG CATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGG TGCACAGAAACCAGAACACCTACCTGCAC TGGTTCCAGCAGAGGCCTGGCCAGTCTCCT AGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAG ATTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGG CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATTAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCGCCGGAACCAGAC TGGAATCAAG
VHmil x VK1aNQ	SEQ ID NO:10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCRSRGRKNEAWFAYWGQGLVTVSS
	SEQ ID NO:11	DNA VH	CAGG TTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCA ACTACGGCGTGA ACTGGATCAAGCAG GCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTTCG CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATAACCGCGTGTACTTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG

			TTAGCTCT
	SEQ ID NO:40	VL	DIVMTQTPLSLPVTGPASISCRSSQSLVHR NQNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC SQSSHVPPTFGQGTKLEIK
	SEQ ID NO:41	DNA VL	GACATTGTGATGACACAGACCCCTCTGAG CCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAG CATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGG TGCACCGGAACCAGAATACCTACCTGCAC TGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCT CAGCTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGA TTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGC AGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAAATCAAG
VHmil x VK1bNQ	SEQ ID NO:10	VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSRGKNEAWFAYWGQGLVTVSS
	SEQ ID NO:11	DNA VH	CAGGTTCACTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCAACACTACGGCGTGAACCTGGATCAAGCAG GCCCTGGACAAGGCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTCCG CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATACCGCCGTGACTTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCT
	SEQ ID NO:44	VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHR NQNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC SQSSHVPPTFGQGTKLEIK
	SEQ ID NO:45	DNA VL	GATGTGGTTATGACACAGAGCCCTCTGAG CCTGCCTGTGACACTTGGACAGCCTGCCAG CATCAGCTGCAGATCTAGCCAGAGCCTGG TGCACCGGAACCAGAACACATACCTGCAC TGGTATCAGCAGAGGCCCGGACAGTCTCC CAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAG ATTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGG

			CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGGAATCAAG
--	--	--	---

Таблица Е. Аминокислотная последовательность и последовательности нуклеиновых кислот IgG цепей полноразмерного mAb (все последовательности тяжелых цепей включают E152C и S375C мутации для сайт-направленного конъюгирования)

Ab	SEQ ID NO	Цепь IgG	Аминокислотная последовательность
милатузумаб	SEQ ID NO:12	Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCRSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
	SEQ ID NO:13	ДНК Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	CAGGTTCCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCAACACTACGGCGTGAACCTGGATCAAGCAG GCCCTGGACAAGGCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTCG CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATACCGCGTGTACTTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCT ACTTCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTC CTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCCTG ACAGTGTCTGGAACCTCTGGGGCTCTGACT TCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAG

			<p>CGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG AACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGA ACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTT CCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA GGA CTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGT GCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCC CCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACA CCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA CAACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
	SEQ ID NO:14	Тяжелая цепь (Молчаща я Fc DAPA)	<p>QVQLQQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGVNWKQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCRSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK</p>
	SEQ ID NO:15	Тяжелая цепь (Молчаща	<p>QVQLQQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGVNWKQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD</p>

		я Fc DANAPA)	TAVYFCSRSRGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDRKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:25	Легкая цепь	DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRN GNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSQVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQ SSHVPPTFGAGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDH KLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID NO:26	ДНК Легкая цепь	GACATTCAGCTGACACAGAGCCCTCTGAG CCTGCCTGTTACACTGGGACAGCCTGCCAG CATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGG TGCACAGAAACGGCAACACCTACCTGCAC TGGTTCAGCAGAGGCCTGGCCAGTCTCCT AGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAG ATTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGG CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATTAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCGCCGGAACCAGAC TGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGA GGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC GTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTG TACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACA GGGGCGAGTGC
Mil_HC x hzVk1a	SEQ ID NO:12	Тяжелая цепь (Fc дикого	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFLDTSVSTAYLQISSLKADD

		типа)	TAVYFCSRSRGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDRKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:13	ДНК Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	CAGGTTCAAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCAACTACGGCGTGAAGTGGATCAAGCAG GCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTCG CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATACCGCCGTGTAAGTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCT ACTTCCGGCGGAAGTCTGCTGCCCTGGGTTGC CTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTG ACAGTGTCTTGGAACTCTGGGGCTCTGACT TCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAG CGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG AACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGA ACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTT CCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGT

			GCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCC CCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACA CCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA CAACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTACAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	SEQ ID NO:14	Тяжелая цепь (Молчаща я Fc DAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:15	Тяжелая цепь (Молчаща я Fc DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:29	Легкая цепь	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHR NGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSG

			VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC SQSSHVPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD HKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
	SEQ ID NO:30	ДНК Легкая цепь	GACATTGTGATGACACAGACCCCTCTGAG CCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAG CATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGG TGCACAGAAACGGCAACACCTACCTGCAC TGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCT CAGCTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGA TTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGGC AGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCTGAA GATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCC CAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGG TGTGCCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAG CGTACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCA CCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCC TGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
Mil_HC x hzVk1b	SEQ ID NO:12	Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCRSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
	SEQ ID	ДНК	CAGGTTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGA

	NO:13	Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	<p>GCTGAAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA ССААСТАСGGCGTGAАСТGGATCAAGCAG GCCCTGGACAAGGCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTTCG CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATACCGCCGTGТАCTTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCT ACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGC CTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTG ACAGTGTCTGGAАCTCTGGGGCTCTGACT TCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAG CGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG AACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGA ACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGT CCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGT GCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCC CCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCACGGGAGCCCAGGTGTACA CCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA CAACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTACAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
--	-------	-------------------------------	--

SEQ ID NO:14	Тяжелая цепь (Молчащая Fc DAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGVNWI KQAPGQGLQW MGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSR SRGKNEAWFAYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:15	Тяжелая цепь (Молчащая Fc DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGVNWI KQAPGQGLQW MGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSR SRGKNEAWFAYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV F SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:33	Легкая цепь	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHR NGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC SQSSHVPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD HKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
SEQ ID NO:34	ДНК Легкая цепь	GATGTGGTTATGACACAGAGCCCTCTGAG CCTGCCTGTGACACTTGGACAGCCTGCCAG CATCAGCTGCAGATCTAGCCAGAGCCTGG TGCACAGAAACGGCAACACCTACCTGCAC TGGTATCAGCAGAGGCCCGGACAGTCTCC CAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAG ATTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTCCGG

			<p>CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGA GGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC GTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTG TACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACA GGGGCGAGTGC</p>
Hemil x LCmil_NQ	SEQ ID NO:12	Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	<p>QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWNPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSRGKNEAWFAYWQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</p>
	SEQ ID NO:13	ДНК Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	<p>CAGGTTACGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCAACTACGGCGTGAAGTGGATCAAGCAG GCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTCG CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATACCGCCGTGACTTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCT</p>

			<p>ACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGC CTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTG ACAGTGTCTTGGAACTCTGGGGCTCTGACT TCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAG CGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG AACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGA ACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTT CCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGT GCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCC CCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACA CCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA CAACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTTACAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
	SEQ ID NO:14	Тяжелая цепь (Молчаща я Fc DAPA)	<p>QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISLKADD TAVYFCRSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK</p>

			TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:15	Тяжелая цепь (Молчащая Fc DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:38	Легкая цепь	DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRN QNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSQVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYFCSQ SSHVPPTFGAGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDH KLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID NO:39	ДНК Легкая цепь	GACATTCAGCTGACACAGAGCCCTCTGAG CCTGCCTGTTACACTGGGACAGCCTGCCAG CATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGG TGCACAGAAACCAGAACACCTACCTGCAC TGGTTCCAGCAGAGGCCTGGCCAGTCTCCT AGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAG ATTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTCCGG CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATTAGCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCGCCGGAACCAGAC TGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGA GGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC GTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTG TACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT

			GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACA GGGGCGAGTGC
Vhmil x VK1aNQ	SEQ ID NO:12	Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSGKNEAWFAYWQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
	SEQ ID NO:13	ДНК Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	CAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCAACACTACGGCGTGAACCTGGATCAAGCAG GCCCCTGGACAAGGCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTTCG CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATACCGCCGTGTACTTCTGCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCT ACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGC CTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCCTG ACAGTGTCTGGAACCTCTGGGGCTCTGACT TCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAG CGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG AACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGA ACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTT CCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGA

			GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGT GCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCC CCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACA CCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA CAACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTACAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
	SEQ ID NO:14	Тяжелая цепь (Молчаща я Fc DAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSRGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFL SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:15	Тяжелая цепь (Молчаща я Fc DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSRGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ

			VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:42	Легкая цепь	DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVHR NQNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC SQSSHVPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD HKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE C
	SEQ ID NO:43	ДНК Легкая цепь	GACATTGTGATGACACAGACCCCTCTGAG CCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAG CATCAGCTGTAGAAGCAGCCAGAGCCTGG TGCACCGGAACCAGAATACCTACCTGCAC TGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCT CAGCTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAGA TTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTCCGGC AGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCC CAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGG TGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAG CGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCA CCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGT GTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCC TGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAAC AGGGGCGAGTGC
Vhmil x VK1bNQ	SEQ ID NO:12	Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	QVQLQQSGSELKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISLKADD TAVYFCSRSGKNEAWFAYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA

			PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFN SCSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:13	ДНК Тяжелая цепь (Fc дикого типа)	CAGGTTTCAGCTCCAGCAGTCTGGCAGCGA GCTGAAAAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTA CCAACTACGGCGTGAAGTGGATCAAGCAG GCCCCTGGACAAGGCCTCCAATGGATGGG CTGGATCAACCCCAATACCGGCGAGCCCA CCTTCGACGACGATTTCAAGGGCAGATTCC CCTTCAGCCTGGACACCTCTGTGTCCACAG CCTACCTCCAGATCAGCAGCCTGAAGGCC GATGATACCGCCGTGTAAGTCTGTCTCCAGA AGCCGGGGAAAGAACGAGGCTTGGTTTGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCG TTAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCT ACTTCCGGCGGAAGTCTGCTGCCCTGGGTTGC CTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCCTG ACAGTGTCTTGGAACTCTGGGGCTCTGACT TCCGGCGTGACACCTTCCCCGCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAG CGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG AACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGA ACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCCTGTT CCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA GGAAGTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGT GCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCC CCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACA CCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAA CAACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGG

			ACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGCAAG
	SEQ ID NO:14	Тяжелая цепь (Молчащая Fc DAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
	SEQ ID NO:15	Тяжелая цепь (Молчащая Fc DANAPA)	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT NYGVNWIQAPGQGLQWMGWINPNTGEPT FDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADD TAVYFCSRSGKNEAWFAYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
	SEQ ID NO:46	Легкая цепь	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHR NQNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYTVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFC SQSSHVPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD HKLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
	SEQ ID NO:47	ДНК Легкая	GATGTGGTTATGACACAGAGCCCTCTGAG CCTGCCTGTGACACTTGGACAGCCTGCCAG

		цепь	CATCAGCTGCAGATCTAGCCAGAGCCTGG TGCACCGGAACCAGAACACATACCTGCAC TGGTATCAGCAGAGGCCCGGACAGTCTCC CAGACTGCTGATCTACACCGTGTCCAACAG ATTCAGCGGCGTGCCCGATAGATTTTCCGG CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAA GATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGG GCGTGTACTTCTGTAGCCAGTCTAGCCACG TGCCACCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGC TGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGA GGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC GTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTG TACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACA GGGGCGAGTGC
--	--	------	---

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC, описанный в настоящем документе, может содержать любой набор переменных доменов тяжелой и легкой цепи, перечисленных в таблицах выше, или набор из шести CDR из любого набора переменных доменов тяжелой и легкой цепи, перечисленных в таблицах выше. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC, описанный в настоящем документе, может содержать аминокислотные последовательности, которые консервативно модифицированы и/или гомологичны последовательностям, перечисленным в приведенных выше таблицах, при условии, что ADC сохраняет способность связываться с его раковым антигеном-мишенью (например, с K_D менее 1×10^{-8} M) и сохраняет одно или несколько функциональных свойств ADC, описанных в настоящем документе (например, способность интернализироваться, связываться с антигеном-мишенью, например, антигеном экспрессированным на опухоли или другой раковой клетке и т. д.).

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC, описанный в настоящем документе, дополнительно содержит константные домены тяжелой и легкой цепи человека или их фрагменты. Например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент описанных ADC может содержать константный домен тяжелой цепи IgG человека (такой как IgG1) и константный домен каппа или лямбда цепи человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент описанных ADC содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина G подтипа 1 (IgG1) человека с константным доменом легкой цепи Ig каппа человека.

легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:17 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:18.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD74 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи следующим образом: CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:5, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:6, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:3; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:22, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:20 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:21.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD74 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи следующим образом: CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:7, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:8, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:9; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:17, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:20 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:18.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD74 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10 и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD74 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:23 или последовательности, которые на, по меньшей мере, 95% идентичны описанным последовательностям. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD74 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая на, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO:10 и/или аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, которая на, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98% или по меньшей мере, 99% идентична SEQ ID NO:23.

В некоторых вариантах осуществления, анти-CD74 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10 и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:27. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD74 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:10 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO:27 или последовательности, которые, по меньшей мере, 95% идентичны описанным последовательностям. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD74

остатки занимают аналогичное положение в полипептидных структурах. Аналогичные положения в двух или более полипептидах могут быть определены путем выравнивания полипептидных последовательностей на основе аминокислотной последовательности или структурного сходства. Специалисты в данной области техники понимают, что может быть необходимо ввести гэпы в любой последовательности для получения удовлетворительного выравнивания.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные замены представляют собой одиночные остатки. Вставки обычно будут порядка примерно от 1 до примерно 20 аминокислотных остатков, хотя могут быть допустимы значительно большие вставки, пока сохраняется биологическая функция (например, связывание с антигеном-мишенью). Делеции обычно составляют от 1 до 20 аминокислотных остатков, хотя в некоторых случаях делеции могут быть намного больше. Замены, делеции, вставки или любые их комбинации могут использоваться для получения конечного производного или варианта. Как правило, эти изменения выполняют для нескольких аминокислот, чтобы минимизировать изменение молекулы, особенно иммуногенность и специфичность антигенсвязывающего белка. Однако при определенных обстоятельствах могут быть допущены более крупные изменения. Консервативные замены могут быть выполнены в соответствии со следующей картой, представленной в таблице 1.

Таблица 1

Исходный остаток	Типовые замены
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr

Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

В некоторых вариантах осуществления, где в ADC используют последовательности вариантов антитела, варианты обычно проявляют одинаковую качественную биологическую активность и будут вызывать такой же иммунный ответ, хотя варианты также могут быть выбраны для модификации характеристик антигенсвязывающих белков, если это необходимо. Альтернативно, вариант может быть сконструирован таким образом, что изменяется биологическая активность антигенсвязывающего белка. Например, сайты гликозилирования могут быть изменены или удалены.

Имуноконъюгаты по изобретению могут содержать модифицированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые дополнительно содержат модификации каркасных остатков в VH и/или VL, *например*, для улучшения свойств антитела. В некоторых вариантах осуществления, модификации каркаса сделаны для снижения иммуногенности антитела. Например, один из подходов заключается в «обратной мутации» одного или нескольких остатков каркасной области в соответствующую последовательность зародышевой линии. Более конкретно, антитело, подвергнутое соматической мутации, может содержать остатки каркасной области, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, от которой происходит антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения последовательностей каркасной области антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых происходит антитело. Чтобы вернуть последовательности каркасной области к их конфигурации зародышевой линии, соматические мутации могут быть «мутированы обратно» в последовательность зародышевой линии, например, посредством сайт-направленного мутагенеза. Такие «обратно-мутировавшие» антитела также входят в объем изобретения.

Другой тип модификации каркасной области включает мутацию одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в одной или нескольких областях CDR, чтобы удалить эпитопы Т-клеток и тем самым снизить потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также называется «деиммунизацией» и более подробно описан в публикации патента США № 20030153043 Carr *et al.*

В дополнение или альтернативно модификациям, сделанным в пределах каркасной области или областей CDR, антитела по изобретению могут быть сконструированы для включения модификаций в Fc области, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc рецептора и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность (ADCC). Кроме того, антитело по изобретению может быть химически модифицировано (*например*, одна или несколько химических групп могут быть присоединены к антителу) или модифицировано для изменения его гликозилирования, опять же для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже.

В одном варианте осуществления, шарнирная область СН1 модифицирована таким

образом, что количество цистеиновых остатков в шарнирной области изменяется, *например*, увеличивается или уменьшается. Этот подход дополнительно описан в патенте США № 5,677,425 Bodmer *et al.* Количество цистеиновых остатков в шарнирной области СН1 изменяется, *например*, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, включают модифицированные или сконструированные аминокислотные остатки, *например*, один или несколько цистеиновых остатков, в качестве сайтов для конъюгации с группой лекарственного средства (Junutula JR, *et al.*, Nat Biotechnol 2008, 26:925-932). В одном варианте осуществления, изобретение представляет модифицированное антитело или фрагмент антитела, содержащий замену одной или нескольких аминокислот цистеином в положениях, описанных в настоящем документе. Сайты для замены цистеина находятся в константных областях антитела или фрагмента антитела и, таким образом, применимы к различным антителам или фрагментам антитела, и сайты выбирают для получения стабильных и гомогенных конъюгатов. Модифицированное антитело или фрагмент может иметь одну, две или несколько замен цистеина, и эти замены можно использовать в комбинации с другими методами модификации и конъюгации, как описано в настоящем документе. Способы вставки цистеина в определенные места антитела известны в данной области техники, *см.*, *например*, Lyons *et al.*, (1990) Protein Eng., 3:703-708, WO 2011/005481, WO2014/124316, WO 2015/138615. В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело содержит замену одной или нескольких аминокислот цистеином в своей константной области, выбранных из положений 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 191, 195, 197, 205, 207, 246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400 и 422 тяжелой цепи антитела, и где положения пронумерованы в соответствии с системой EU. В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену цистеином одной или нескольких аминокислот в его константной области, выбранных из положений 107, 108, 109, 114, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 197, 199 и 203 легкой цепи антитела или фрагмента антитела, где положения пронумерованы в соответствии с системой EU, и где легкой цепью является каппа легкая цепь человека. В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит комбинацию замены цистеином двух или нескольких аминокислот в его константных областях, где комбинации включают замены в положении 375 тяжелой цепи антитела, положении 152 тяжелой цепи антитела, положении 360 тяжелой цепи антитела или положении 107 легкой цепи антитела, и где положения пронумерованы в соответствии с системой EU. В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной аминокислоты на цистеин в его константных областях, где заменой является положение 375 тяжелой цепи антитела, положение 152 тяжелой цепи антитела, положение 360 тяжелой цепи антитела, положение

107 легкой цепи антитела, положение 165 легкой цепи антитела или положение 159 легкой цепи антитела, и где положения пронумерованы в соответствии с системой EU, и где легкой цепью является каппа цепь. В конкретных вариантах осуществления, модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит комбинацию замены двух аминокислот на цистеин в его константных областях, где комбинации включают замены в положениях 375 тяжелой цепи антитела и положении 152 тяжелой цепи антитела, где положения пронумерованы по системе EU. В конкретных вариантах осуществления, модифицированное антитело или его фрагмент антитела содержит замену одной аминокислоты на цистеин в положении 360 тяжелой цепи антитела, где положения пронумерованы в соответствии с системой EU. В других конкретных вариантах осуществления, модифицированное антитело или его фрагмент антитела содержит замену одной аминокислоты на цистеин в положении 107 антитела, легкой цепи, и положения пронумерованы в соответствии с системой EU, где легкой цепью является каппа цепь.

В дополнительных вариантах осуществления, антитела или фрагменты антител (*например*, антигенсвязывающий фрагмент), применяемые в иммуноконъюгатах по изобретению, включают модифицированные или сконструированные антитела, такие как антитело, модифицированное для введения одной или нескольких других реакционноспособных аминокислот (кроме цистеина), включая Pcl, пирролизин, пептидные метки (такие как S6, A1 и ybbR-метки) и не природные аминокислоты, вместо, по меньшей мере, одной аминокислоты с нативной последовательностью, тем самым обеспечивая реакционноспособный сайт на антителе или антигенсвязывающем фрагменте для конъюгации с группой лекарственного средства или группой линкер-лекарственное средство с комплементарной реакционной способностью. Например, антитела или фрагменты антител могут быть модифицированы для включения Pcl или пирролизина (W. Ou, *et al.*, (2011) PNAS 108 (26), 10437-10442; WO2014124258) или не природных аминокислот (J.Y. Axup, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 109 (2012), pp. 16101-16106; для обзора см. C.C. Liu and P.G. Schultz (2010) Annu Rev Biochem 79, 413-444; C.H. Kim, *et al.*, (2013) Curr Opin Chem Biol. 17, 412-419) в качестве сайтов для конъюгации с лекарственным средством. Аналогично, пептидные метки для способов ферментативной конъюгации могут быть введены в антитело (Strop P., *et al.*, Chem Biol. 2013, 20(2):161-7; Rabuka D., Curr Opin Chem Biol. 2010 Dec; 14(6):790-6; Rabuka D, *et al.*, Nat Protoc. 2012, 7(6):1052-67). Еще одним примером является использование 4'-фосфопантетеинилтрансфераз (PPTase) для конъюгации аналогов кофермента А (WO2013184514) и (Grünwald *et al.*, (2015) Bioconjugate Chem. 26 (12), 2554-62). Способы конъюгирования таких модифицированных или сконструированных антител с полезной нагрузкой или комбинациями линкер-полезная нагрузка известны в данной области техники.

В другом варианте осуществления, шарнирная Fc область антитела мутирована для уменьшения биологического периода полужизни антитела. Более конкретно, одну или несколько аминокислотных мутаций вводят в область интерфейса домена CH2-CH3 Fc-шарнирного фрагмента так, что антитело имеет ухудшенное связывание

стафилококцильного белка А (SpA) по сравнению со связыванием нативного Fc-шарнирного домена SpA. Этот подход более подробно описан в патенте США № 6,165,745 Ward *et al.*

В еще других вариантах осуществления, Fc область изменяют путем, по меньшей мере, замены одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторных функций антитела. Например, одна или несколько аминокислот могут быть заменены другим аминокислотным остатком так, что антитело имеет измененную аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняет антигенсвязывающую способность родительского антитела. Эффекторным лигандом, аффинность к которому изменена, может быть, например, рецептор Fc или компонент C1 комплемента. Этот подход описан, *например*, в патентах США №№ 5,624,821 и 5,648,260, оба Winter *et al.*

В другом варианте осуществления, одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, могут быть заменены другим аминокислотным остатком, так что антитело изменяет связывание C1q и/или снижает или отменяет комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Этот подход описан, *например*, в патенте США № 6,194,551, Idusogie *et al.*

В другом варианте осуществления, один или несколько аминокислотных остатков изменены, чтобы тем самым изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход описан, *например*, в публикации РСТ WO 94/29351 Bodmer *et al.* Аллотипические аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой цепи изотипа каппа, как описано Jefferis *et al.*, MAbs. 1:332-338 (2009).

В некоторых вариантах осуществления, антитела содержат мутации, которые опосредуют сниженную или отсутствующую антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимую цитотоксичность (CDC). В некоторых вариантах осуществления, эти мутации известны как мутации сайленсинг Fc, молчащая Fc или молчащая Fc. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные остатки L234 и L235 константной области IgG1 заменены на A234 и A235 (также известные как «LALA»). В некоторых вариантах осуществления, аминокислотный остаток N297 константной области IgG1 заменен на A297 (также известный как «N297A»). В некоторых вариантах осуществления, аминокислотные остатки D265 и P329 константной области IgG1 заменены на A265 и A329 (также известные как «DAPA»). Также можно использовать другие сайленс-мутации Fc антитела. В некоторых вариантах осуществления, сайленс-мутации Fc используют в комбинации, например D265A, N297A и P329A (также известные как «DANAPA»).

В другом варианте осуществления, один или несколько аминокислотных остатков изменены, чтобы тем самым изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход описан, *например*, в публикации РСТ WO 94/29351 Bodmer *et al.* В конкретном варианте осуществления, одна или несколько аминокислот антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению заменены одним или

несколькими аллотипическими аминокислотными остатками. Аллотипические аминокислотные остатки также включают, но не ограничиваются ими, константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой цепи изотипа каппа, как описано Jefferis *et al.*, MAbs. 1:332-338 (2009).

В еще одном варианте, модифицировано гликозилирование антитела. Например, может быть получено агликозилированное антитело (*m.e.* антитело, не имеющее гликозилирование). Гликозилирование может быть изменено, например, для увеличения аффинности антитела к «антигену». Такие углеводные модификации могут быть выполнены, например, путем изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть произведены одна или несколько аминокислотных замен, которые приводят к устранению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасной области переменной области, чтобы тем самым устранить гликозилирование в этом сайте. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность антитела к антигену. Такой подход описан, *например*, в патентах США №№ 5,714,350 и 6,350,861 Co *et al.*

В другом варианте осуществления, антитело модифицировано для увеличения его биологического периода полужизни. Возможны разные подходы. Например, могут быть введены одна или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6,277,375, выданном Ward. Альтернативно, для увеличения биологического периода полужизни антитело может быть изменено в области CH1 или CL так, чтобы содержать эпитоп связывания рецептора реутилизации, взятый из двух петель домена CH2 Fc области IgG, как описано в патентах США №№ 5,869,046 и 6,121,022 Presta *et al.*

Линкеры

В некоторых вариантах осуществления, линкер в ADC является внеклеточно стабильным в достаточной степени для того, чтобы быть терапевтически эффективным. В некоторых вариантах осуществления, линкер стабилен вне клетки, так что ADC остается интактной, когда присутствует во внеклеточных условиях (например, перед транспортировкой или доставкой в клетку). Термин «интактный», используемый в контексте ADC, означает, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент остается прикрепленным к группе лекарственного средства (например, ингибитор Mcl-1).

Используемый здесь термин «стабильный» в контексте линкера или ADC, содержащего линкер, означает, что не более 20%, не более примерно 15%, не более примерно 10%, не более примерно 5%, не более чем примерно 3% или не более чем примерно 1% линкеров (или любой процент между ними) в образце ADC расщепляется (или в случае всего ADC иным образом не остается интактным), когда ADC присутствует во внеклеточных условиях. В некоторых вариантах осуществления, линкеры и/или ADC, описанные в настоящем документе, стабильны по сравнению с альтернативными линкерами и/или ADC с альтернативными линкерами и/или полезной нагрузкой ингибитором Mcl-1. В некоторых вариантах осуществления ADC, описанные в настоящем

документе, могут оставаться интактными более примерно 48 часов, более 60 часов, более примерно 72 часов, более примерно 84 часов или более примерно 96 часов.

Можно определить, является ли линкер стабильным внеклеточно, например, путем включения ADC в плазму в течение заранее определенного периода времени (например, 2, 4, 6, 8, 16, 24, 48 или 72 часа), а затем количественного определения количества свободных групп лекарственного средства, присутствующих в плазме. Стабильность может дать ADC время локализоваться в раковых клетках-мишенях и предотвратить преждевременное высвобождение группы лекарственного средства, что может снизить терапевтический индекс ADC за счет неизбежного повреждения как нормальных, так и раковых тканей. В некоторых вариантах осуществления, линкер является стабильным вне клетки-мишени и высвобождает группу лекарственного средства из ADC, оказавшись внутри клетки, так что лекарственное средство может связываться со своей мишенью. Таким образом, эффективный линкер будет: (i) поддерживать специфические связывающие свойства антитела или антигенсвязывающего фрагмента; (ii) обеспечивать доставку, например, внутриклеточную доставку, группы лекарственного средства посредством стабильного присоединения к антителу или антигенсвязывающему фрагменту; (iii) оставаться стабильным и неповрежденным до тех пор, пока ADC не будет транспортирован или доставлен в сайт-мишень; и (iv) обеспечивать терапевтический эффект, например цитотоксический эффект, группы лекарственного средства после расщепления или альтернативного механизма высвобождения.

Линкеры могут влиять на физико-химические свойства ADC. Поскольку многие цитотоксические агенты являются гидрофобными по природе, связывание их с антителом с помощью дополнительной гидрофобной группы может привести к агрегации. Агрегаты ADC нерастворимы и часто ограничивают достижимую лекарственную нагрузку на антитело, что может отрицательно влиять на эффективность ADC. Белковые агрегаты биопрепаратов, как правило, также связаны с повышенной иммуногенностью. Как показано ниже, линкеры, описанные в настоящем документе, приводят к получению ADC с низкими уровнями агрегации и желательными уровнями лекарственной нагрузки.

Линкер может быть «расщепляемым» или «не расщепляемым» (Ducry and Stump (2010) *Bioconjugate Chem.* 21:5-13). Расщепляемые линкеры предназначены для высвобождения группы лекарственного средства (например, ингибитора Mcl-1) при воздействии определенных факторов окружающей среды, например, при интернализации в клетку-мишень, тогда как не расщепляемые линкеры обычно зависят от деградации самого антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Используемый здесь термин «алкил» относится к радикалу с прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящему только из атомов углерода и водорода, не содержащему ненасыщенности. Термин «C₁-C₆алкил», как используется в настоящем документе, относится к радикалу с прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящему только из атомов углерода и водорода, не содержащему ненасыщенности, имеющему от одного до шести атомов углерода и который присоединен к остальной части

молекулы посредством одинарной связи. Неограничивающие примеры «С₁-С₆алкильных» групп включают метил (С₁алкил), этил (С₂алкил), 1-метилэтил (С₃алкил), н-пропил (С₃алкил), изопропил (С₃алкил), н-бутил (С₄алкил), изобутил (С₄алкил), втор-бутил (С₄алкил), трет-бутил (С₄алкил), н-пентил (С₅алкил), изопентил (С₅алкил), неопентил (С₅алкил) и гексил (С₆алкил).

Используемый здесь термин «алкенил» относится к группе радикалов с линейной или разветвленной углеводородной цепью, состоящей только из атомов углерода и водорода, содержащей, по меньшей мере, одну двойную связь. Термин «С₂-С₆алкенил» в настоящем документе относится к группе радикалов с линейной или разветвленной углеводородной цепью, состоящей только из атомов углерода и водорода, содержащей, по меньшей мере, одну двойную связь, имеющую от двух до шести атомов углерода, которая присоединена к остатку молекулы одинарной связью. Неограничивающие примеры «С₂-С₆алкенильных» групп включают этенил (С₂алкенил), проп-1-енил (С₃алкенил), бут-1-енил (С₄алкенил), пент-1-енил (С₅алкенил), пент-4-енил (С₅алкенил), пента-1,4-диенил (С₅алкенил), гекса-1-енил (С₆алкенил), гекса-2-енил (С₆алкенил), гекса-3-енил (С₆алкенил), гекса-1,4-диенил (С₆алкенил), гекса-1,5-диенил (С₆алкенил) и гекса-2,4-диенил (С₆алкенил). Термин «С₂-С₃алкенил» в настоящем документе относится к группе радикалов с линейной или разветвленной углеводородной цепью, состоящей только из атомов углерода и водорода, содержащей, по меньшей мере, одну двойную связь, имеющую от двух до трех атомов углерода, которые присоединены к остатку молекулы одинарной связью. Неограничивающие примеры «С₂-С₃алкенильных» групп включают этенил (С₂алкенил) и проп-1-енил (С₃алкенил).

Используемый здесь термин «алкилен» относится к двухвалентному радикалу с прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящему только из атомов углерода и водорода и не содержащему ненасыщенность. Термин «С₁-С₆алкилен» в контексте настоящего описания относится к двухвалентному радикалу с прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящему только из атомов углерода и водорода, не содержащему ненасыщенность и имеющему от одного до шести атомов углерода. Неограничивающие примеры «С₁-С₆алкиленовых» групп включают метилен (С₁алкилен), этилен (С₂алкилен), 1-метилэтилен (С₃алкилен), н-пропилен (С₃алкилен), изопропилен (С₃алкилен), н-бутилен (С₄алкилен), изобутилен (С₄алкилен), втор-бутилен (С₄алкилен), трет-бутилен (С₄алкилен), н-пентилен (С₅алкилен), изопентилен (С₅алкилен), неопентилен (С₅алкилен) и гексилен (С₆алкилен).

Используемый здесь термин «алкенилен» относится к двухвалентному радикалу с прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящему только из атомов углерода и водорода и содержащему, по меньшей мере, одну двойную связь. Термин «С₂-С₆алкенилен» в контексте настоящего описания относится к группе радикалов с двухвалентной прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящей только из атомов углерода и водорода, содержащей, по меньшей мере, одну двойную связь и имеющую от двух до шести атомов углерода. Неограничивающие примеры «С₂-

С₆алкениленовых» групп включают этенилен (С₂алкенилен), проп-1-енилен (С₃алкенилен), бут-1-енилен (С₄алкенилен), пент-1-енилен (С₅алкенилен), пент-4-енилен (С₅алкенилен), пента-1,4-диенилен (С₅алкенилен), гекса-1-енилен (С₆алкенилен), гекса-2-енилен (С₆алкенилен), гекса-3-енилен (С₆алкенилен), гекса-1,4-диенилен (С₆алкенилен), гекса-1,5-диенилен (С₆алкенилен) и гекса-2,4-диенилен (С₆алкенилен). Термин «С₂-С₆алкенилен» в контексте настоящего описания относится к группе радикалов с двухвалентной прямой или разветвленной углеводородной цепью, состоящей только из атомов углерода и водорода, содержащей, по меньшей мере, одну двойную связь и имеющую от двух до трех атомов углерода. Неограничивающие примеры «С₂-С₃алкениленовых» групп включают этенилен (С₂алкенилен) и проп-1-енилен (С₃алкенилен).

Используемый здесь термин «циклоалкил» или «С₃-С₈циклоалкил» относится к насыщенной, моноциклической, конденсированной бициклической, конденсированной трициклической или мостиковой полициклической кольцевой системе. Неограничивающие примеры конденсированных бициклических или мостиковых полициклических кольцевых систем включают бицикло[1.1.1]пентан, бицикло[2.1.1]гексан, бицикло[2.2.1]гептан, бицикло[3.1.1]гептан, бицикло[3.2.1]октан, бицикло[2.2.2]октан и адамантан. Неограничивающие примеры моноциклической С₃-С₈циклоалкильной группы включают циклопропильную, циклобутильную, циклопентильную, циклогексильную, циклогептильную и циклооктильную группы.

Используемый здесь термин «галоалкил» относится к линейной или разветвленной алкильной цепи, замещенной одной или несколькими галогеновыми группами вместо атомов водорода вдоль углеводородной цепи. Примеры галогеновых групп, подходящих для замещения в галоалкильной группе, включают фтор, бром, хлор и йод. Галоалкильная группа может включать замещение несколькими галогеновыми группами вместо атомов водорода в алкильной цепи, где указанные галогеновые группы могут быть присоединены к одному и тому же атому углерода или к другому атому углерода в алкильной цепи.

В настоящем документе, алкильная, алкенильная, алкинильная, алкокси, амина, арильная, гетероарильная, циклоалкильная и гетероциклоалкильная группы могут быть необязательно замещены от 1 до 4 групп, выбранных из необязательно линейного или разветвленного (С₁-С₆)алкила, необязательно замещенной линейной или разветвленной (С₂-С₆)алкенильной группы, необязательно замещенной линейной или разветвленной (С₂-С₆)алкинильной группы, необязательно замещенного линейного или разветвленного (С₁-С₆)алкокси, необязательно замещенного (С₁-С₆)алкил-S-, гидрокси, оксо (или N-оксида, если возможно), нитро, циано, -C(O)-OR₀', -O-C(O)-R₀', -C(O)-NR₀'R₀'', -NR₀'R₀'', -(C=NR₀')-OR₀'', линейного или разветвленного (С₁-С₆)галоалкила, трифторметокси или галогена, где R₀' и R₀'' каждый независимо является атомом водорода или необязательно замещенной линейной или разветвленной (С₁-С₆)алкильной группой, и где один или несколько из атомов углерода линейной или разветвленной (С₁-С₆) алкильной группы необязательно дейтерированы.

Термин «полиоксиэтилен», «полиэтиленгликоль» или «PEG» в контексте

настоящего описания относится к линейной цепи, разветвленной цепи или звездообразной конфигурации, состоящей из групп $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_t$. В некоторых вариантах осуществления, полиэтиленом или группой PEG является $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_t^*$, где t равно 4-40, и где «-» указывает конец, направленный к саморасщепляющемуся спейсеру, и «*-» означает точку присоединения к концу группы R' , где R' является OH , OCH_3 или $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$. В других вариантах осуществления, полиэтиленом или PEG группой является $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_t^*$, где t равно 4-40 и где «-» указывает конец, направленный к саморасщепляющемуся спейсеру, и «*-» означает точку присоединения к концу группы R'' , где R'' является H , CH_3 или $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$. Например, термин «PEG12», используемый в настоящем документе, означает, что t равно 12.

Используемый в настоящем документе термин «полиалкиленгликоль» относится к линейной цепи, разветвленной цепи или звездообразной конфигурации, состоящей из групп $(\text{O}(\text{CH}_2)_m)_n$. В некоторых вариантах осуществления, полиэтиленом или группой PEG является $-(\text{O}(\text{CH}_2)_m)_t^*$, где m равно 1-10, t равно 4-40, и где «-» указывает конец, направленный к саморасщепляющемуся спейсеру и «*-» означает точку присоединения к концу группы R' , где R' является OH , OCH_3 или $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$. В других вариантах осуществления, полиэтиленовой группой или PEG является $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_t^*$, где m равно 1-10, t равно 4-40, и где «-» указывает конец, направленный к саморасщепляющемуся спейсеру и «*-» означает точку присоединения к концу группы R'' , где R'' является H , CH_3 или $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$.

Термин «реакционноспособная группа», как используется в настоящем документе, означает функциональную группу, способную образовывать ковалентную связь с функциональной группой антитела, фрагментом антитела или другой реакционноспособной группой, присоединенной к антителу или фрагменту антитела. Неограничивающие примеры таких функциональных групп включают реакционноспособные группы из Таблицы 2, представленные в настоящем документе.

Термин «группа присоединения» или «группа сочетания», как используется в данном документе, относится к двухвалентному фрагменту, который связывает мостиковый спейсер с антителом или его фрагментом. Группой присоединения или группой сочетания является двухвалентный фрагмент, образованный реакцией между реакционной группой и функциональной группой на антителе или его фрагменте. Неограничивающие примеры таких двухвалентных фрагментов включают двухвалентные химические фрагменты, приведенные в Таблице 2 и Таблице 3, представленных в настоящем документе.

Термин «мостиковый спейсер», используемый в настоящем документе, относится к одному или нескольким линкерным компонентам, которые ковалентно связаны вместе с образованием двухвалентного фрагмента, который связывает двухвалентный пептидный спейсер с реакционноспособной группой, связывает двухвалентный пептидный спейсер со связующей группой или связывает группу присоединения с, по меньшей мере, одной расщепляемой группой. В некоторых вариантах осуществления, «мостиковый спейсер» содержит карбоксильную группу, присоединенную к N-концу двухвалентного пептидного

спейсера через амидную связь.

Термин «спейсерная группа», используемый в настоящем документе, относится к одному или нескольким линкерным компонентам, которые ковалентно связаны вместе с образованием фрагмента, который связывает саморасщепляющийся спейсер с гидрофильной группой.

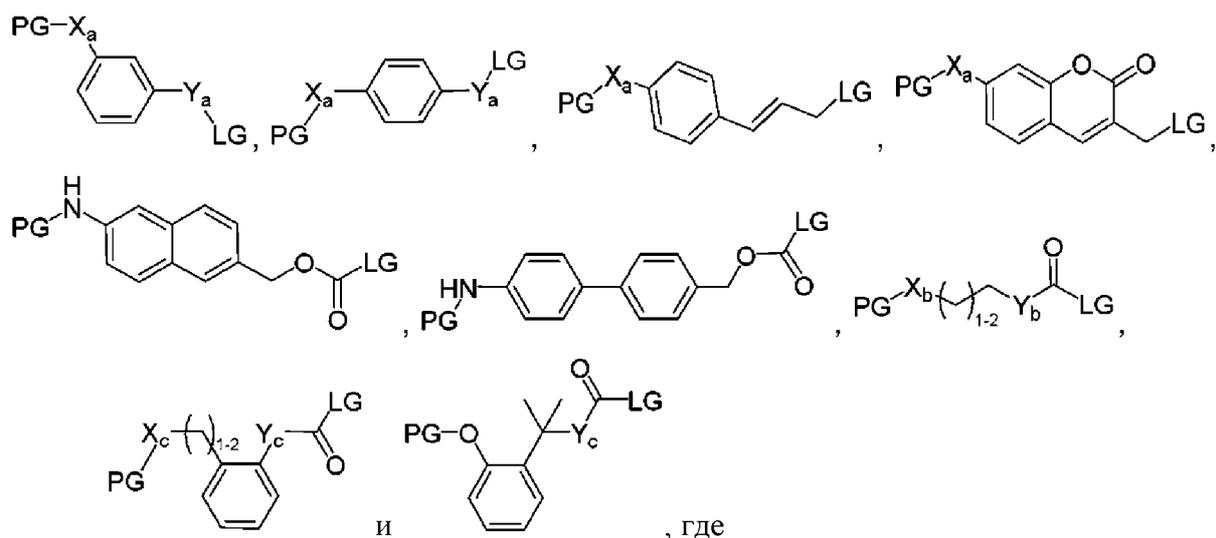
Термин «двухвалентный пептидный спейсер», используемый в настоящем документе, относится к двухвалентному линкеру, содержащему один или несколько аминокислотных остатков, ковалентно связанных вместе с образованием фрагмента, который связывает мостиковый спейсер с саморасщепляющимся спейсером. Одним или несколькими аминокислотными остатками могут быть аминокислотные остатки, выбранные из аланина (Ala), цистеина (Cys), аспарагиновой кислоты (Asp), глутаминовой кислоты (Glu), фенилаланина (Phe), глицина (Gly), гистидина (His), изолейцина (Ile), лизина (Lys), лейцина (Leu), метионина (Met), аспарагина (Asn), пролина (Pro), глутамина (Gln), аргинина (Arg), серина (Ser), треонина (Thr), валина (Val), триптофана (Trp), тирозина (Tyr), цитруллина (Cit), норвалина (Nva), норлейцина (Nle), селеноцистеина (Sec), пирролизина (Pyl), гомосерина, гомоцистеина и десметилпирролизина.

В некоторых вариантах осуществления, «двухвалентным пептидным спейсером» является комбинация от 2 до четырех аминокислотных остатков, где каждый остаток независимо выбран из аминокислотного остатка, выбранного из аланина (Ala), цистеина (Cys), аспарагиновой кислоты (Asp), глутаминовой кислоты (Glu), фенилаланина (Phe), глицина (Gly), гистидина (His), изолейцина (Ile), лизина (Lys), лейцина (Leu), метионина (Met), аспарагина (Asn), пролина (Pro), глутамина (Gln), аргинина (Arg), серина (Ser), треонина (Thr), валина (Val), триптофана (Trp), тирозина (Tyr), цитруллина (Cit), норвалина (Nva), норлейцина (Nle), селеноцистеина (Sec), пирролизина (Pyl), гомосерина, гомоцистеина и десметилпирролизина, например -ValCit*; -CitVal*; -AlaAla*; -AlaCit*; -CitAla*; -AsnCit*; -CitAsn*; -CitCit*; -ValGlu*; -GluVal*; -SerCit*; -CitSer*; -LysCit*; -CitLys*; -AspCit*; -CitAsp*; -AlaVal*; -ValAla*; -PheAla*; -AlaPhe*; -PheLys*; -LysPhe*; -ValLys*; -LysVal*; -AlaLys*; -LysAla*; -PheCit*; -CitPhe*; -LeuCit*; -CitLeu*; -IleCit*; -CitIle*; -PheArg*; -ArgPhe*; -CitTrp*; -TrpCit*; -PhePheLys*; -LysPhePhe*; -DphePheLys*; -DlysPhePhe*; -GlyPheLys*; -LysPheGly*; -GlyPheLeuGly- [SEQ ID NO:69]; -GlyLeuPheGly- [SEQ ID NO:64]; -AlaLeuAlaLeu- [SEQ ID NO:65], -GlyGlyGly*; -GlyGlyGlyGly- [SEQ ID NO:66]; -GlyPheValGly- [SEQ ID NO:67]; и -GlyValPheGly- [SEQ ID NO:68], где «-» означает точку присоединения к мостиковому спейсеру и «*» означает точку присоединения к саморасщепляющемуся спейсеру.

Термин «линкерный компонент», используемый в настоящем документе, относится к химической группе, которая является частью линкера. Примеры линкерных компонентов включают: алкиленовую группу: $-(CH_2)_n-$ которая может быть линейной или разветвленной (где в этом случае n равно 1-18); алкениленовую группу; алкиниленовую группу; алкенильную группу; алкинильную группу; этиленгликолевую единицу: $-OCH_2CH_2-$ или $-CH_2CH_2O-$; полиэтиленгликолевую единицу: $-(CH_2CH_2O)_x$ (где x в этом случае равно 2-20);

-O-; -S-; карбонил: -C(=O); сложный эфир: C(=O)-O или O-C(=O); карбонат: -OC(=O)O-; амин: -NH-; третичный амин; амид: -C(=O)-NH-, -NH-C(=O)- или -C(=O)N(C₁₋₆алкил); карбамат: -OC(=O)NH- или -NH-C(=O)O; мочевины: -NH-C(=O)-NH-; сульфонамид: -S(O)₂NH- или -NHS(O)₂; простой эфир: -CH₂O- или -OCH₂-; алкилен, замещенный одной или несколькими группами, независимо выбранными из карбокси, сульфоната, гидроксила, амина, аминокислоты, сахара, фосфата и фосфоната); алкенилен, замещенный одной или несколькими группами, независимо выбранными из карбокси, сульфоната, гидроксила, амина, аминокислоты, сахара, фосфата и фосфоната); алкинилен, замещенный одной или несколькими группами, независимо выбранными из карбокси, сульфоната, гидроксила, амина, аминокислоты, сахара, фосфата и фосфоната); C₁-C₁₀алкилен, в котором одна или несколько метиленовых групп замещена одной или несколькими -S-, -NH- или -O- группами; кольцевые системы, имеющие две доступные точки присоединения, такие как двухвалентные кольца, выбранные из фенила (включая 1,2-, 1,3- и 1,4-дизамещенные фенилы), C₅-C₆ гетероарила, C₃-C₈ циклоалкила (включая 1,1-дизамещенный циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил и 1,4-дизамещенный циклогексил) и C₄-C₈ гетероциклоалкила; остаток аминокислоты, выбранный из аланина (Ala), цистеина (Cys), аспарагиновой кислоты (Asp), глутаминовой кислоты (Glu), фенилаланина (Phe), глицина (Gly), гистидина (His), изолейцина (Ile), лизина (Lys), лейцина (Leu), метионина (Met), аспарагина (Asn), пролина (Pro), глутамина (Gln), аргинина (Arg), серина (Ser), треонина (Thr), валина (Val), триптофана (Trp), тирозина (Tyr), цитруллина (Cit), норвалина (Nva), норлейцина (Nle), селеноцистеина (Sec), пирролизина (Pyl), гомосерина, гомоцистеина и десметилпирролизина; комбинация 2 или нескольких аминокислотных остатков, где каждый остаток независимо выбран из аминокислотного остатка, выбранного из аланина (Ala), цистеина (Cys), аспарагиновой кислоты (Asp), глутаминовой кислоты (Glu), фенилаланина (Phe), глицина (Gly), гистидина (His), изолейцина (Ile), лизина (Lys), лейцина (Leu), метионина (Met), аспарагина (Asn), пролина (Pro), глутамина (Gln), аргинина (Arg), серина (Ser), треонина (Thr), валина (Val), триптофана (Trp), тирозина (Tyr), цитруллина (Cit), норвалина (Nva), норлейцина (Nle), селеноцистеина (Sec), пирролизина (Pyl), гомосерина, гомоцистеина и десметилпирролизина, например Val-Cit; Cit-Val; Ala-Ala; Ala-Cit; Cit-Ala; Asn-Cit; Cit-Asn; Cit-Cit; Val-Glu; Glu-Val; Ser-Cit; Cit-Ser; Lys-Cit; Cit-Lys; Asp-Cit; Cit-Asp; Ala-Val; Val-Ala; Phe-Lys; Lys-Phe; Val-Lys; Lys-Val; Ala-Lys; Lys-Ala; Phe-Cit; Cit-Phe; Leu-Cit; Cit-Leu; Ile-Cit; Cit-Ile; Phe-Arg; Arg-Phe; Cit-Trp; и Trp-Cit; и саморасщепляющийся спейсер, где саморасщепляющийся спейсер содержит одну или несколько защитных (хелперных) групп, которые чувствительны к кислотнo-индуцированному расщеплению, пептидаза-индуцированному расщеплению, эстераза-индуцированному расщеплению, гликозидаза-индуцированному расщеплению, фосфодиэстераза-индуцированному расщеплению, фосфатаза-индуцированному расщеплению, протеаза-индуцированному расщеплению, липаза-индуцированному расщеплению или разрыву дисульфидной связи.

Не ограничивающие примеры таких саморасщепляющихся спейсеров включают:



PG является защитной (хелперной) группой;

X_a является O, NH или S;

X_b является O, NH, NCH_3 или S;

X_c является O или NH;

Y_a является CH_2 , CH_2O или CH_2NH ;

Y_b является CH_2 , O или NH;

Y_c является связью, CH_2 , O или NH, и

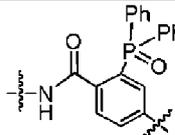
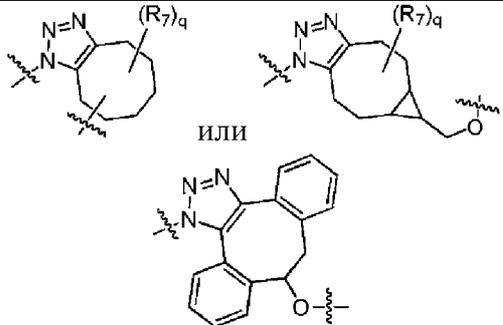
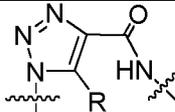
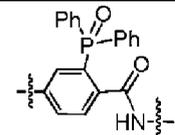
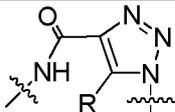
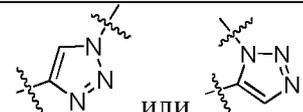
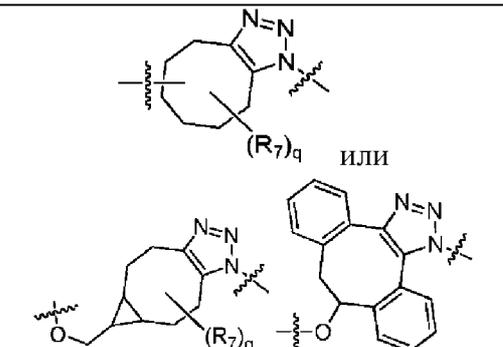
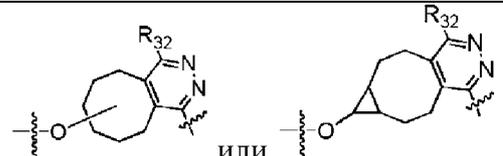
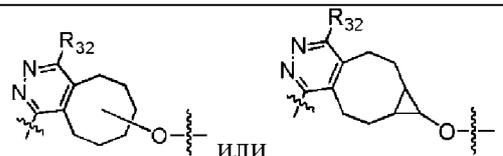
LG является уходящей группой, такой как группа лекарственного средства (D) группы линкер-лекарственное средство по изобретению.

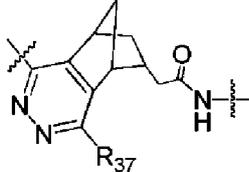
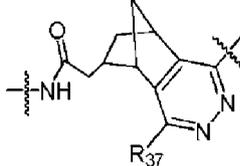
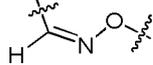
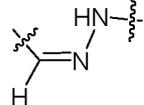
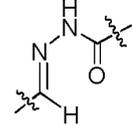
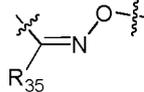
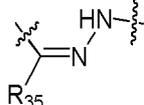
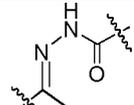
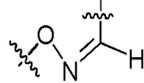
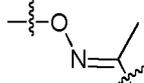
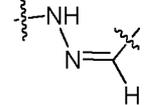
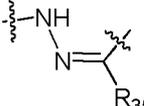
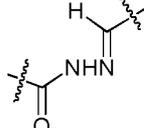
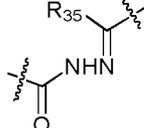
Дополнительные не ограничивающие примеры таких саморасщепляющихся спейсеров описаны в *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 7492-7509.

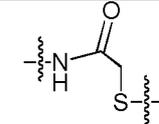
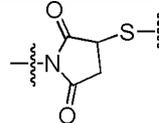
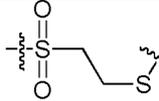
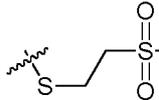
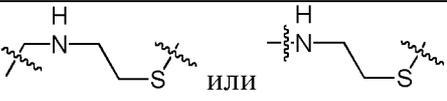
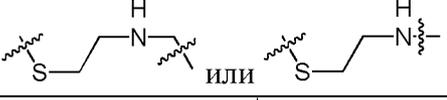
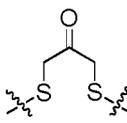
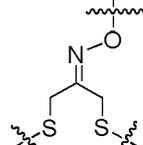
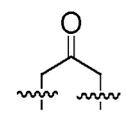
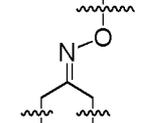
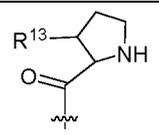
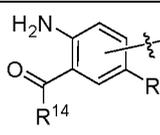
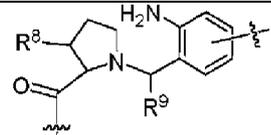
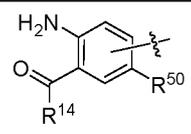
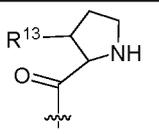
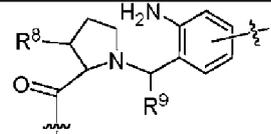
Кроме того, линкерный компонент может быть химической группой, которая легко образуется при взаимодействии между двумя реакционноспособными группами. Неограничивающие примеры таких химических групп даны в таблице 2.

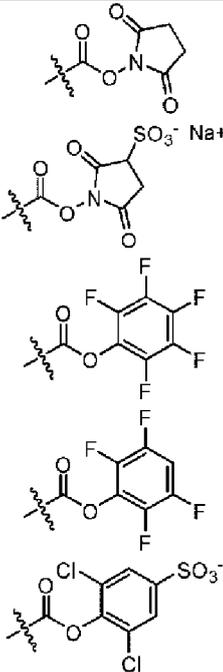
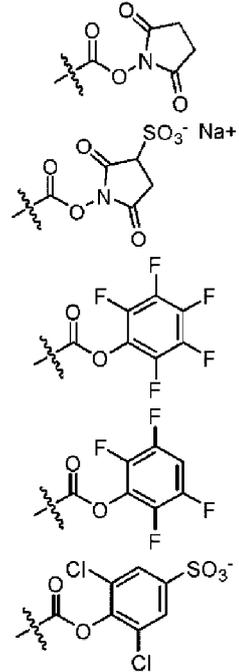
Таблица 2

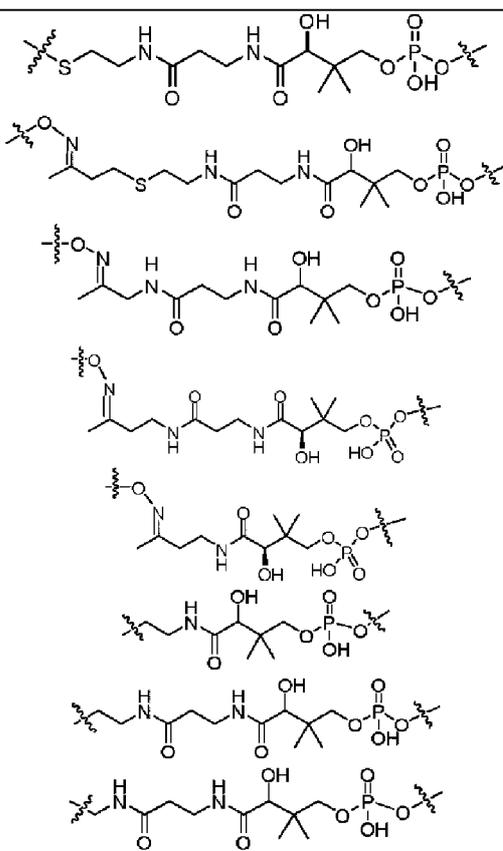
Реакционноспособная группа 1 (RG1)	Реакционноспособная группа 2 (RG2)	Химическая группа
тиол	тиол	-S-S-
тиол	малеимид	
тиол	галоацетамид	
азид	алкин	

Реакционноспособная группа 1 (RG1)	Реакционноспособная группа 2 (RG2)	Химическая группа
азид	триарилфосфин	
азид	циклооктин	
азид	оксаноборнадиен	
триарилфосфин	азид	
оксаноборнадиен	азид	
алкин	азид	
циклооктин	азид	
циклооктен	диарилтетразин	
диарилтетразин	циклооктен	

Реакционноспособная группа 1 (RG1)	Реакционноспособная группа 2 (RG2)	Химическая группа
моноарилтетразин	норборнен	
норборнен	моноарилтетразин	
альдегид	гидроксиламин	
альдегид	гидразин	
альдегид	$\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-}$	
кетон	гидроксиламин	
кетон	гидразин	
кетон	$\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-}$	
гидроксиламин	альдегид	
гидроксиламин	кетон	
гидразин	альдегид	
гидразин	кетон	
$\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-}$	альдегид	
$\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-}$	кетон	

Реакционноспособная группа 1 (RG1)	Реакционноспособная группа 2 (RG2)	Химическая группа
галоацетамид	тиол	
малеимид	тиол	
винилсульфон	тиол	
тиол	винилсульфон	
азиридин	тиол	
тиол	азиридин	
	гидроксиламин	
	гидроксиламин	
		
		

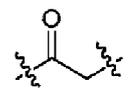
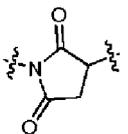
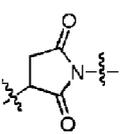
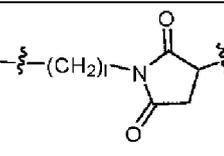
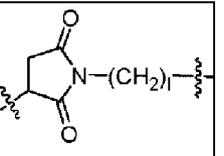
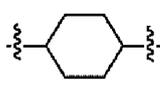
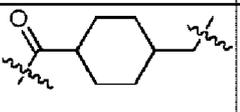
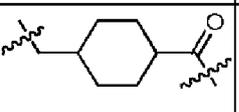
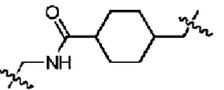
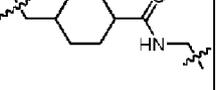
Реакционноспособная группа 1 (RG1)	Реакционноспособная группа 2 (RG2)	Химическая группа
	<p style="text-align: center;">-NH₂,</p>	<p style="text-align: center;">амид</p>
<p style="text-align: center;">-NH₂,</p>		<p style="text-align: center;">амид</p>

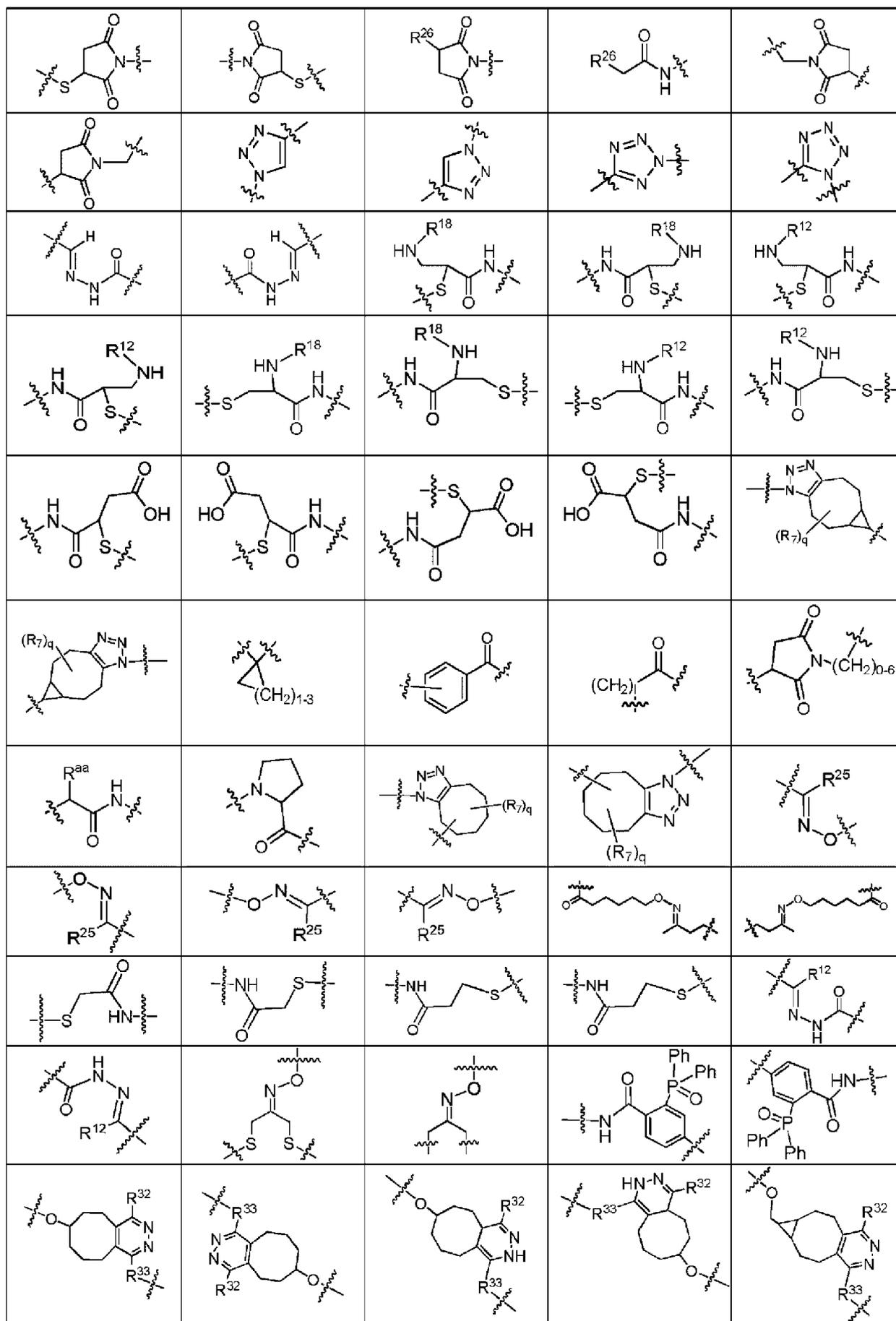
Реакционноспособная группа 1 (RG1)	Реакционноспособная группа 2 (RG2)	Химическая группа
CoA или аналог CoA	Сериновый остаток	
пиридилдитиол	тиол	дисульфид

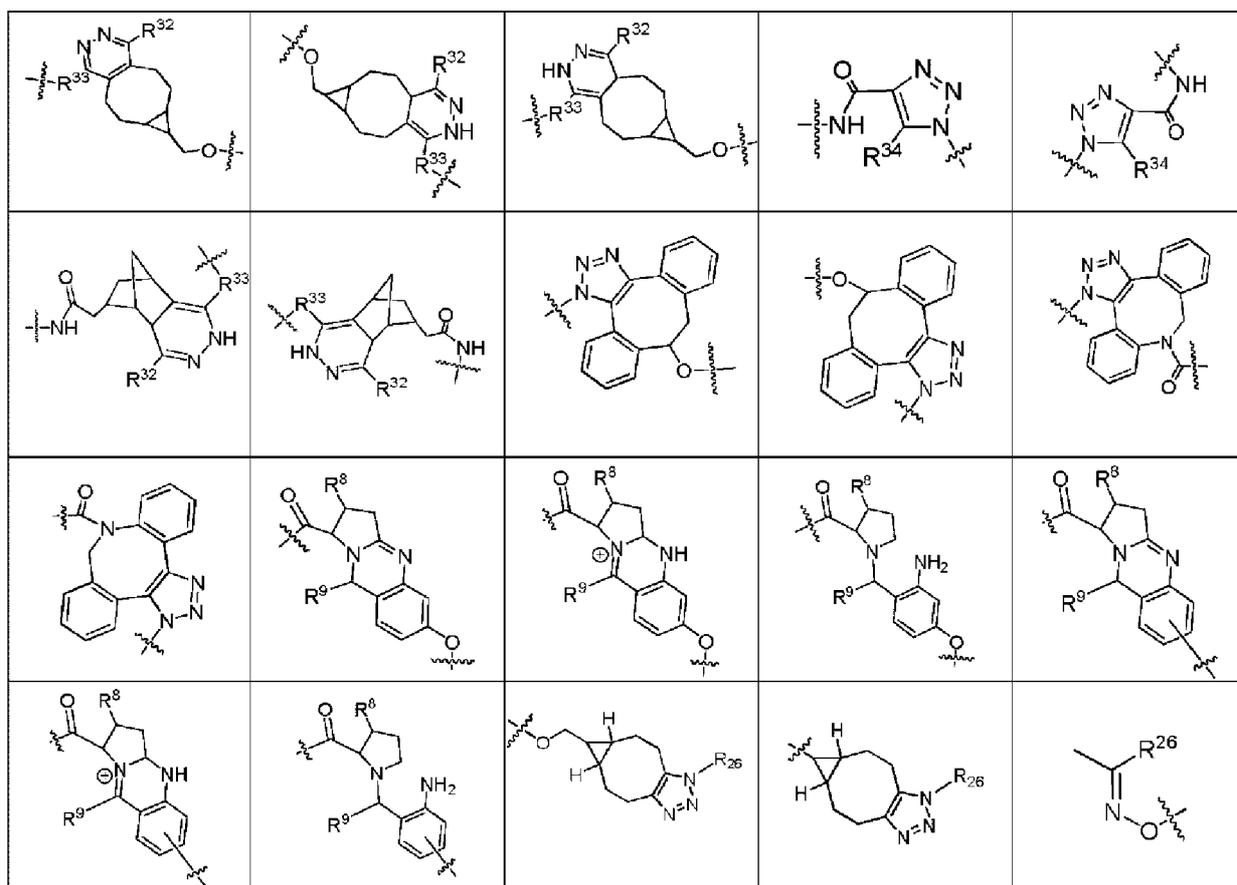
где: R^{32} в таблице 2 является H, C_{1-4} алкилом, фенилом, пиримидином или пиридином; R^{35} в таблице 2 является H, C_{1-6} алкилом, фенилом или C_{1-4} алкилом, замещенным 1-3 -ОН группами; каждый R^7 в таблице 2 независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, фтора, бензилокси, замещенный -C(=O)ОН, бензила, замещенного -C(=O)ОН, C_{1-4} алкокси, замещенного -C(=O)ОН и C_{1-4} алкила, замещенного -C(=O)ОН; R^{37} в таблице 2 независимо выбран из H, фенила и пиридина; q в таблице 2 равен 0, 1, 2 или 3; R^8 и R^{13} в таблице 2 каждый является H или метилом; и R^9 и R^{14} в таблице 2 каждый является H, -CH₃ или фенилом; R в таблице 2 является H или любым замещаемым заместителем; и R^{50} в таблице 2 является H.

Кроме того, линкерный компонент может быть группой, перечисленной в таблице 3 ниже.

Таблица 3.





каждый R^7 независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)OH, бензила, замещенного -C(=O)OH, C_{1-4} алкокси, замещенного -C(=O)OH и C_{1-4} алкила, замещенного -C(=O)OH;

каждый R^{12} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила

R^8 является H или метилом;

R^9 является H, $-CH_3$ или фенилом;

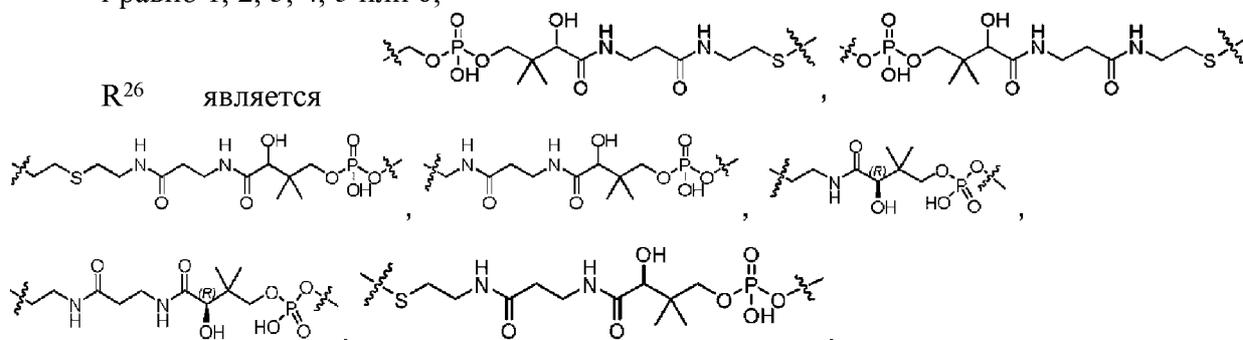
каждый R^{25} независимо выбран из H или C_{1-4} алкила;

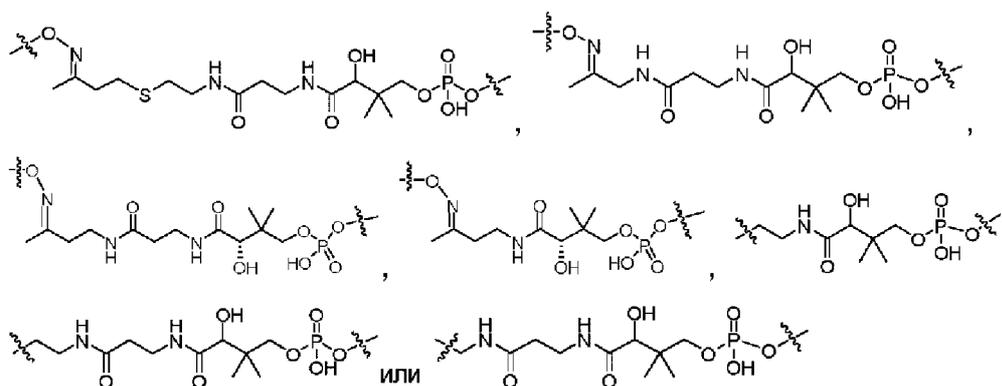
каждый R^{18} независимо выбран из C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкила, который замещен азидо, и C_{1-6} алкила, который замещен 1-5 гидроксилем;

q равно 0, 1, 2 или 3;

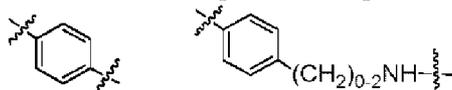
l равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

R^{26} является

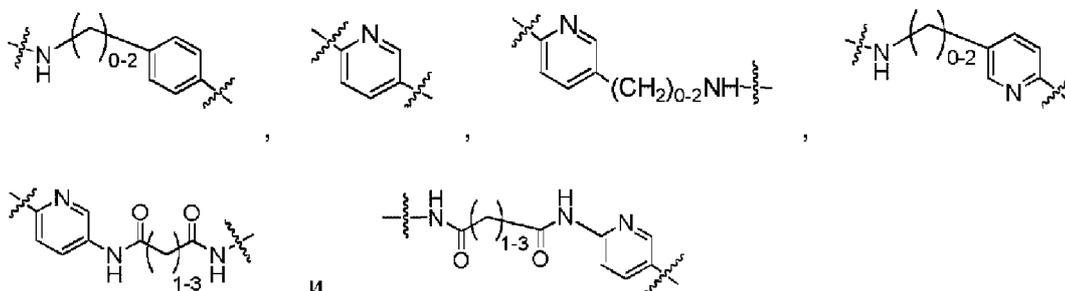




R^{32} независимо выбран из H, C_{1-4} алкила, фенила, пиримидина и пиридина;



R^{33} независимо выбран из



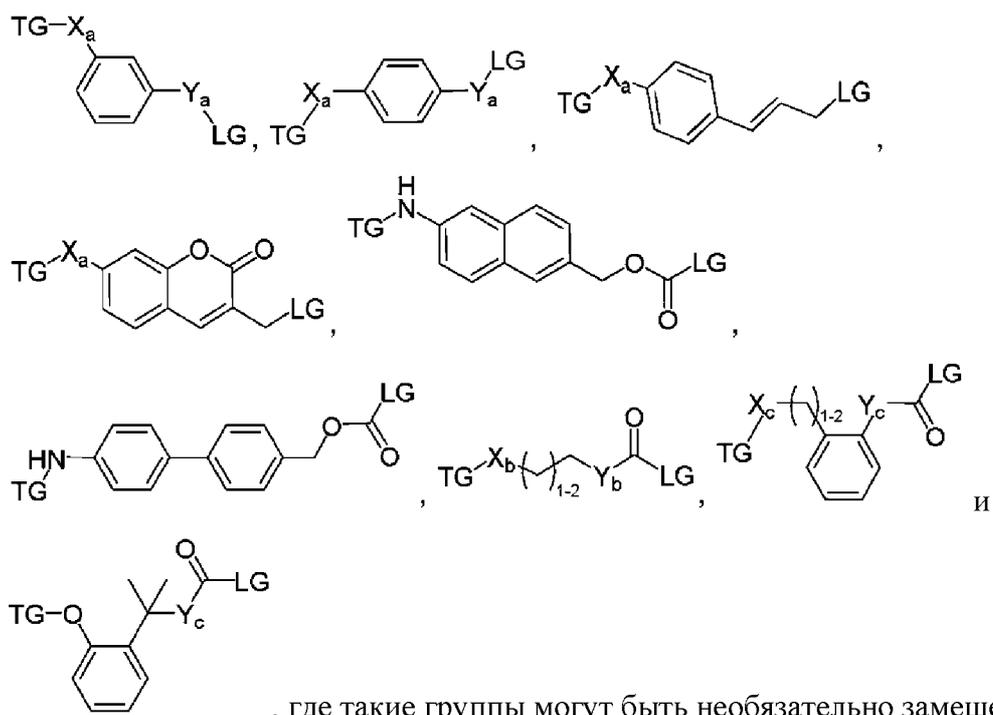
R^{34} независимо выбран из H, C_{1-4} алкила и C_{1-6} галоалкила, и

R^{aa} является боковой цепью аминокислоты.

В настоящем документе, когда проиллюстрирована частичная структура соединения, волнистая линия () указывает точку присоединения частичной структуры к остальной части молекулы.

Термины «саморасщепляющийся спейсер» и «саморасщепляющаяся группа», используемые в настоящем документе, относятся к фрагменту, включающему одну или несколько хелперных групп (TG), которые активируются кислотно-индуцированным расщеплением, пептидаза-индуцированным расщеплением, эстераза-индуцированным расщеплением, гликозидаза-индуцированным расщеплением, фосфодиэстераза-индуцированным расщеплением, фосфатаза-индуцированным расщеплением, протеаза-индуцированным расщеплением, липаза-индуцированным расщеплением или расщеплением дисульфидной связи, и после активации защитная группа удаляется, что генерирует каскад реакций разборки, ведущих к временному последовательному высвобождению уходящей группы. Такой каскад реакций может включать, но не ограничивается ими, реакции 1,4-, 1,6- или 1,8- элиминирования.

Неограничивающие примеры саморасщепляющегося спейсера или группы включают:



где:

TG является хелперной группой;

X_a является O, NH или S;

X_b является O, NH, NCH_3 или S;

X_c является O или NH;

Y_a является CH_2 , CH_2O или CH_2NH ;

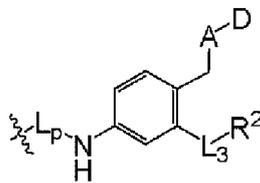
Y_b является CH_2 , O или NH;

Y_c является связью, CH_2 , O или NH, и

LG является уходящей группой, такой как группа лекарственного средства (D) группы линкер-лекарственное средство по изобретению.

Дополнительные не ограничивающие примеры саморасщепляющихся спейсеров описаны в *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 7492-7509.

В определенном варианте осуществления, саморасщепляющимся спейсером

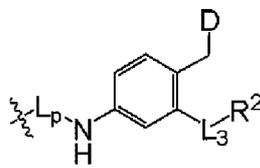


является группа, имеющая структуру

, где Lp является ферментно

отщепляемым двухвалентным пептидным спейсером, и A, D, L_3 и R^2 такие, как определены в настоящем документе.

В предпочтительном варианте осуществления, саморасщепляющимся спейсером

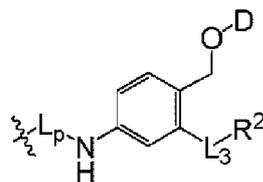


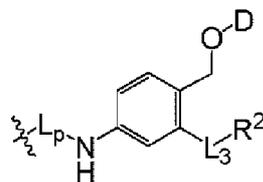
является группа, имеющая структуру

, где Lp является ферментно

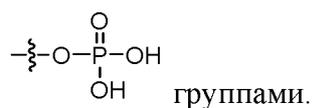
отщепляемым двухвалентным пептидным спейсером и D, L₃ и R² такие, как определены в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, D является ингибитором MCl1, содержащим кватернизованный третичный амин.

В других предпочтительных вариантах осуществления, саморасщепляющимся



спейсером является группа, имеющая структуру , где Lp является ферментно отщепляемым двухвалентным пептидным спейсером и D, L₃ и R² такие, как определены в настоящем документе.

Термин «гидрофильная группа», используемая в настоящем документе, относится к фрагменту, который обладает гидрофильными свойствами, которые увеличивают растворимость в воде группы лекарственного средства (D), когда группа лекарственного средства (D) присоединена к линкерной группе по изобретению. Примеры таких гидрофильных групп включают, но не ограничиваются ими, полиэтиленгликоли, полиалкиленгликоли, сахара, олигосахариды, полипептиды C₂-C₆алкила, замещенные 1-3



Группы лекарственного средства

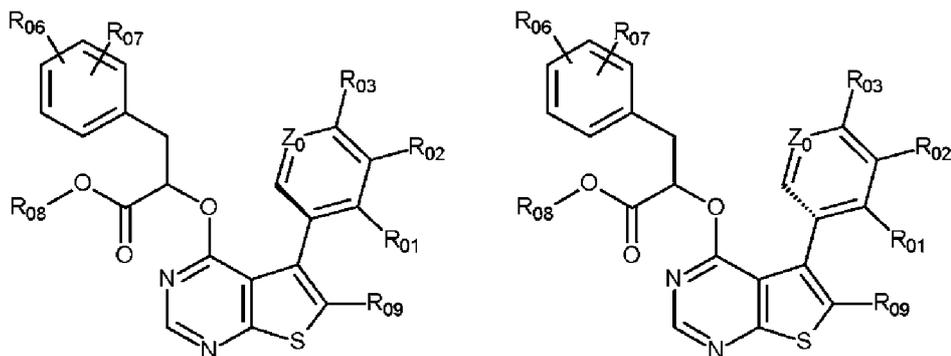
В некоторых вариантах осуществления, промежуточное соединение, которое является предшественником линкерной группы, взаимодействует с группой лекарственного средства (например, ингибитора Mcl-1) в соответствующих условиях. В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособные группы используют на лекарственном средстве и/или промежуточном соединении или линкере. Продукт реакции между лекарственным средством и промежуточным продуктом, или дериватизированное лекарственное средство (лекарственное средство плюс линкер), впоследствии взаимодействует с антителом или антигенсвязывающим фрагментом в условиях, которые облегчают конъюгацию лекарственного средства и промежуточного продукта или дериватизированного лекарственного средства и антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Альтернативно, промежуточное соединение или линкер может сначала взаимодействовать с антителом или антигенсвязывающим фрагментом или дериватизированным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, а затем взаимодействовать с лекарственным средством или дериватизированным лекарственным средством.

Доступен ряд различных реакций для ковалентного присоединения группы лекарственного средства и/или линкерной группы к антителу или антигенсвязывающему фрагменту. Это часто достигается взаимодействием одного или нескольких

аминокислотных остатков антитела или антигенсвязывающего фрагмента, включая аминовые группы лизина, группы свободной карбоновой кислоты глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, сульфгидрильные группы цистеина и различные группы ароматических аминокислот. Например, неспецифическое ковалентное присоединение может быть проведено с использованием реакции карбодиимида для связывания карбокси (или амино) группы на группе лекарственного средства с амино (или карбокси) группой на антителе или антигенсвязывающем фрагменте. Кроме того, бифункциональные агенты, такие как диальдегиды или имидоэфир, также могут быть использованы для связывания аминокислотной группы лекарственного средства с аминокислотной группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Также доступна реакция основания Шиффа для присоединения лекарственных средств (например, ингибитора Mcl-1) к связывающим агентам. Этот способ включает окисление лекарственного средства, которое содержит гликоль или гидроксигруппы, периодатом с образованием альдегида, который затем взаимодействует со связывающим агентом. Присоединение происходит через формирование основания Шиффа с аминокислотными группами связывающего агента. Изотиоцианаты также могут применяться в качестве связывающих агентов для ковалентного присоединения лекарственных средств к связывающим агентам. Другие методы известны специалистам в данной области техники и находятся в пределах объема настоящего описания. Примеры групп лекарственного средства, которые могут быть получены и связаны с антителом или антигенсвязывающим фрагментом с использованием различных химических методов, известных в данной области техники, включают ингибиторы Mcl-1, например, ингибиторы Mcl-1, описанные и проиллюстрированные в настоящем документе примерами.

Подходящие группы лекарственного средства могут включать соединение формул (I), (II), (III) или его энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или аддитивную соль с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием. Кроме того, группа лекарственного средства может включать любые соединения ингибитора Mcl-1 (D), описанные в настоящем документе.

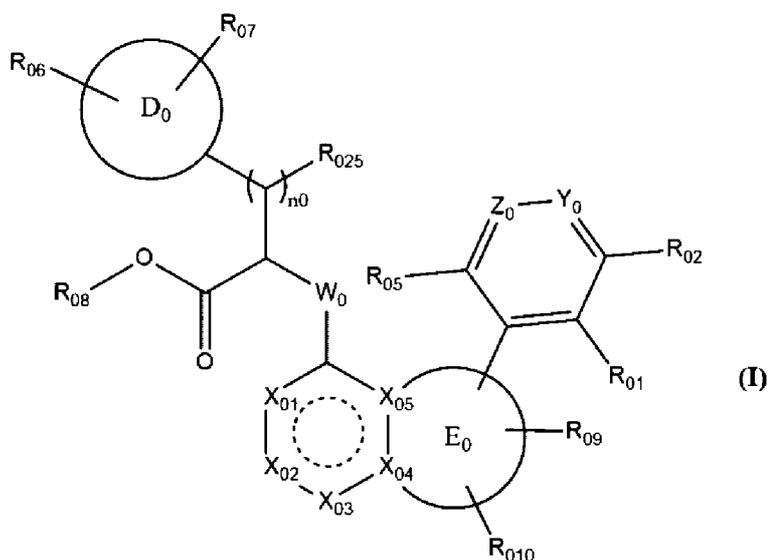
Используемые в настоящем документе «атропоизомеры» являются стереоизомерами, возникающие из-за затрудненного вращения вокруг одинарной связи, где разница в энергии из-за пространственной деформации или других факторов создает барьер для вращения, достаточно высокий, чтобы позволить выделить отдельные конформеры (Bringmann et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 5384-5427). Например, для соединения формулы (II) по изобретению, атропоизомеры могут быть следующими:



Например, предпочтительным атропоизомером может быть (5*S*_a), также названный (5*aS*).

Группой лекарственного средства по изобретению может быть одно из соединений, описанных в публикациях международных патентных заявок №№ WO 2015/097123; WO 2016/207216; WO 2016/207217; WO 2016/207225; WO 2016/207226; WO 2017/125224; WO 2019/035899; WO 2019/035911; WO 2019/035914; WO 2019/035927; WO 2016/033486; WO 2017/147410; WO 2018/183418; и WO 2017/182625 и публикация патентной заявки США № 2019/0055264, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки полностью.

В некоторых вариантах осуществления, группа лекарственного средства по описанию может содержать соединение формулы (I):



где:

кольцо D₀ является циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой,

кольцо E₀ является фурильным, тиенильным или пирролильным кольцом,

X₀₁, X₀₃, X₀₄ и X₀₅ независимо друг от друга являются атомом углерода или атомом азота,

X₀₂ является C-R₀₂₆ группой или атомом азота,



означает, что кольцо является ароматическим,

Y_0 является атомом азота или $C-R_{03}$ группой,

Z_0 является атомом азота или $C-R_{04}$ группой,

R_{01} является атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)галоалкильной группой, гидроксигруппой, гидрокси(C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-Cu_{08}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{012} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

R_{02} , R_{03} , R_{04} и R_{05} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейным или разветвленным (C_1-C_6)галоалкилом, гидроксигруппой, гидрокси(C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-Cu_{01}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- Cu_{01} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- Cu_{01} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- Cu_{01} , $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{031} , $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{012} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

или пара (R_{01} , R_{02}), (R_{02} , R_{03}), (R_{03} , R_{04}) или (R_{04} , R_{05}) вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено 1 или 2 группами, выбранными из галогена, линейного или разветвленного (C_1-C_6)алкила, (C_0-C_6) алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{013}R_{013}'$, $-(C_0-C_6)$ алкил- Cu_{01} или оксо,

R_{06} и R_{07} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейным или разветвленным (C_1-C_6)галоалкилом, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкокси группой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-Cu_{01}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- Cu_{01} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- Cu_{01} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- Cu_{01} , $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{012} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкила,

или пара (R_{06} , R_{07}), сконденсированная с двумя соседними атомами углерода, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, $-NR_{013}R_{013}'$, $-(C_0-C_6)$ алкил- Cu_{01} или

оксо,

W_0 является $-CH_2-$ группой, $-NH-$ группой или атомом кислорода,

R_{08} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_8)алкильной группой, $-CHR_{0a}R_{0b}$ группой, арильной группой, гетероарильной группой, арил(C_1-C_6)алкильной группой или гетероарил(C_1-C_6)алкильной группой,

R_{09} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, $-Cy_{02}$, $-(C_1-C_6)$ алкил- Cy_{02} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- Cy_{02} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- Cy_{02} , $-Cy_{02}-Cy_{03}$, $-(C_2-C_6)$ алкинил- $O-Cy_{02}$, $-Cy_{02}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{03} , атомом галогена, цианогруппой, $-C(O)-R_{014}$ или $-C(O)-NR_{014}R_{014}'$,

R_{010} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, арил(C_1-C_6)алкильной группой, (C_1-C_6)циклоалкилалкильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)галоалкил или $-(C_1-C_6)$ алкил- $O-Cy_{04}$,

или пара (R_{09} , R_{010}), сконденсированная с двумя соседними атомами углерода, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N,

R_{011} и R_{011}' независимо друг от друга являются атомом водорода, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или $-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{01} ,

или пара (R_{011} , R_{011}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где атом N может быть замещен 1 или 2 группами, выбранными из линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группы, и где один или несколько атомов углерода линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группы необязательно дейтерированы,

R_{012} является $-Cy_{05}$, $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-Cy_{06}-O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{07} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} , $-NH-C(O)-NH-R_{011}$, $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} , $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}R_{011}'$, $-OR_{011}$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- OR_{011} , $-SO_2-R_{011}$, $-C(O)-OR_{011}$,

R_{013} , R_{013}' , R_{014} и R_{014}' независимо друг от друга являются атомом водорода или необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

R_{0a} является атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

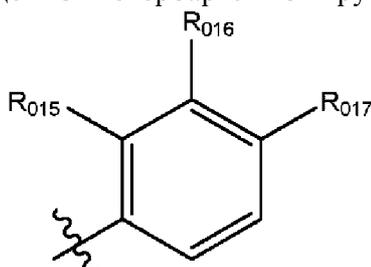
R_{0b} является $-O-C(O)-O-R_{0c}$ группой, $-O-C(O)-NR_{0c}R_{0c}'$ группой или $-O-P(O)(OR_{0c})_2$ группой,

R_{0c} и R_{0c}' независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или

разветвленной (C₁-C₈)алкильной группой, циклоалкильной группой, (C₁-C₆)алкокси(C₁-C₆)алкильной группой или (C₁-C₆)алкоксикарбонил(C₁-C₆)алкильной группой,

или пара (R_{0c}, R_{0c'}) вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют не ароматическое кольцо, состоящее из 5-7 членов кольца, которое может содержать, в дополнение в атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из кислорода и азота, где азот необязательно замещен линейной или разветвленной (C₁-C₆)алкильной группой,

Sy₀₁, Sy₀₂, Sy₀₃, Sy₀₄, Sy₀₅, Sy₀₆, Sy₀₇, Sy₀₈ и Sy₀₁₀ независимо друг от друга, являются необязательно замещенной циклоалкильной группой, необязательно замещенной гетероциклоалкильной группой, необязательно замещенной арильной группой или необязательно замещенной гетероарильной группой,



Sy₀₉ является

или Sy₀₉ является гетероарильной группой, которая замещена группой, выбранной из -O-P(O)(OR₀₂₀)₂; -O-P(O)(O⁻M⁺)₂; -(CH₂)_{p0}-O-(CHR₀₁₈-CHR₀₁₉-O)_{q0}-R₀₂₀; гидроксид; гидроксид(C₁-C₆)алкила; -(CH₂)_{t0}-U₀-(CH₂)_{s0}-гетероциклоалкила; и -U₀-(CH₂)_{q0}-NR₀₂₁R_{021'},

R₀₁₅ является атомом водорода; -(CH₂)_{p0}-O-(CHR₀₁₈-CHR₀₁₉-O)_{q0}-R₀₂₀ группой; линейной или разветвленной (C₁-C₆)алкокси(C₁-C₆)алкильной группой; -U₀-(CH₂)_{q0}-NR₀₂₁R_{021'} группой; или -(CH₂)_{t0}-U₀-(CH₂)_{s0}-гетероциклоалкильной группой,

R₀₁₆ является атомом водорода; гидроксигруппой; гидроксид(C₁-C₆)алкильной группой; -(CH₂)_{t0}-U₀-(CH₂)_{s0}-гетероциклоалкильной группой; (CH₂)_{t0}-U₀-V₀-O-P(O)(OR₀₂₀)₂ группой; -O-P(O)(O⁻M⁺)₂ группой; -O-S(O)₂OR₀₂₀ группой; -S(O)₂OR₀₂₀ группой; -(CH₂)_{p0}-O-(CHR₀₁₈-CHR₀₁₉-O)_{q0}-R₀₂₀ группой; -(CH₂)_{p0}-O-C(O)-NR₀₂₂R₀₂₃ группой; или -U₀-(CH₂)_{q0}-NR₀₂₁R_{021'} группой,

R₀₁₇ является атомом водорода; -(CH₂)_{p0}-O-(CHR₀₁₈-CHR₀₁₉-O)_{q0}-R₀₂₀ группой; -CH₂-P(O)(OR₀₂₀)₂ группой; -O-P(O)(OR₀₂₀)₂ группой; -O-P(O)(O⁻M⁺)₂ группой; гидроксигруппой; гидроксид(C₁-C₆)алкильной группой; -(CH₂)_{t0}-U₀-(CH₂)_{s0}-гетероциклоалкильной группой; -U₀-(CH₂)_{q0}-NR₀₂₁R_{021'} группой; или альдоновой кислотой,

M⁺ является фармацевтически приемлемым одновалентным катионом,

U₀ является связью или атомом кислорода,

V₀ является -(CH₂)_{s0}- группой или -C(O)- группой,

R₀₁₈ является атомом водорода или (C₁-C₆)алкокси(C₁-C₆)алкильной группой,

R₀₁₉ является атомом водорода или гидроксид(C₁-C₆)алкильной группой,

R₀₂₀ является атомом водорода или линейной или разветвленной (C₁-C₆)алкильной группой,

R₀₂₁ и R_{021'} независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или разветвленной (C₁-C₆)алкильной группой или гидроксид(C₁-C₆)алкильной группой,

или пара (R_{021}, R_{021}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

R_{022} является (C_1-C_6)алкокси(C_1-C_6)алкильной группой, $-(CH_2)_{p0}-NR_{024}R_{024}'$ группой или $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$ группой,

R_{023} является атомом водорода или (C_1-C_6)алкокси(C_1-C_6)алкильной группой,

или пара (R_{022}, R_{023}) вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-18 членов кольца, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-5 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или гетероциклоалкильной группой,

R_{024} и R_{024}' независимо друг от друга являются атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

или пара (R_{024}, R_{024}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, состоящее из 5-7 членов кольца, которое может содержать, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N и где полученное кольцо необязательно замещено атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

R_{025} является атомом водорода, гидроксигруппой или гидрокси(C_1-C_6)алкильной группой,

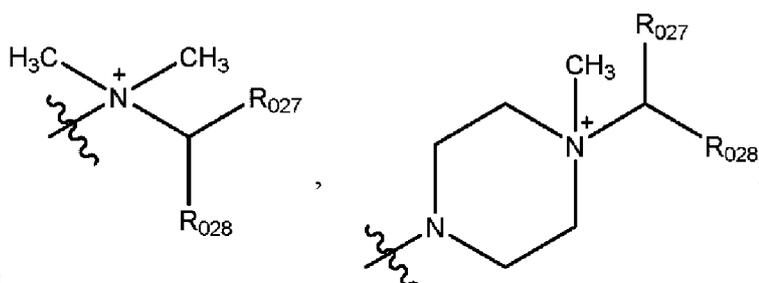
R_{026} является атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или цианогруппой,

R_{027} является атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

R_{028} является $-O-P(O)(O^{\cdot})(O^{\cdot})$ группой, $-O-P(O)(O^{\cdot})(OR_{030})$ группой, $-O-P(O)(OR_{030})(OR_{030}')$ группой, $-(CH_2)_{p0}-O-SO_2-$ группой, $-(CH_2)_{p0}-SO_2-O^{\cdot}$ группой, $-(CH_2)_{p0}-O-SO_2-OR_{030}$ группой, $-Cu_{010}$, $-(CH_2)_{p0}-SO_2-OR_{030}$ группой, $-O-C(O)-R_{029}$ группой, $-O-C(O)-OR_{029}$ группой или $-O-C(O)-NR_{029}R_{029}'$ группой;

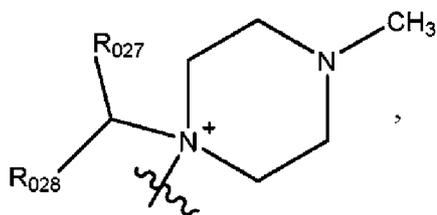
R_{029} и R_{029}' независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или линейной или разветвленной амино(C_1-C_6)алкильной группой,

R_{030} и R_{030}' независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или арил(C_1-C_6)алкильной группой,



R_{031} является

или



, где ион аммония необязательно существует в цвиттерионной форме или имеет одновалентный анионный противоион,

p_0 является целым числом, равным 0 или 1,

r_0 является целым числом, равным 0, 1, 2 или 3,

q_0 является целым числом, равным 1, 2, 3 или 4,

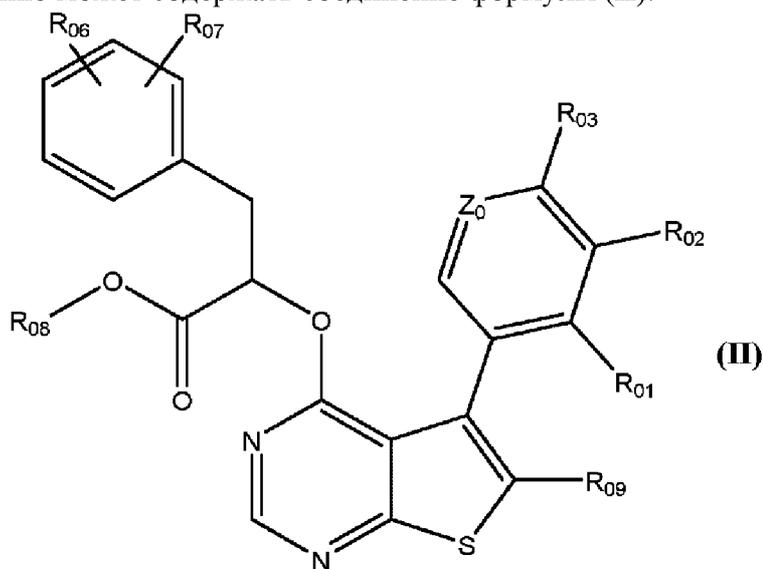
t_0 и s_0 независимо являются целым числом, равным 0 или 1;

где, как максимум, одна из R_{03} , R_{09} или R_{012} групп, если присутствуют, ковалентно присоединены к линкеру, и

где валентность атома не превышена посредством одного или нескольких заместителей, связанных с ним,

или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, группа лекарственного средства по описанию может содержать соединение формулы (II):



(II)

где:

Z_0 является атомом азота или C- R_{04} группой,

R_{01} является атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной

группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)галоалкильной группой, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, $-C_{y08}$, $-NR_{011}R_{011}'$,

R_{02} , R_{03} и R_{04} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейным или разветвленным (C_1-C_6)галоалкилом, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-C_{y01}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- C_{y01} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- C_{y01} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- C_{y01} , $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{031} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

или пара (R_{02} , R_{03}) или (R_{03} , R_{04}) вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое обязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где кольцо обязательно замещено группой, выбранной из линейного или разветвленного (C_1-C_6)алкила, $-NR_{013}R_{013}'$, $-(C_0-C_6)$ алкил- C_{y01} и оксо,

R_{06} и R_{07} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейным или разветвленным (C_1-C_6)галоалкила, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкокси группой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-C_{y01}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- C_{y01} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- C_{y01} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- C_{y01} , $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{012} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

или пара (R_{06} , R_{07}), конденсированные с двумя соседними атомами углерода, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое обязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, и где полученное кольцо обязательно замещено группой, выбранной из линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группы, $-NR_{013}R_{013}'$, $-(C_0-C_6)$ алкил- C_{y01} и оксо,

R_{08} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_8)алкильной группой, арильной группой, гетероарильной группой, арил(C_1-C_6)алкильной группой или гетероарил(C_1-C_6)алкильной группой,

R_{09} является линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, $-C_{y02}$, $-(C_1-C_6)$ алкил- C_{y02} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- C_{y02} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- C_{y02} , $-C_{y02}-C_{y03}$, $-(C_2-C_6)$ алкинил- $O-C_{y02}$, $-C_{y02}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- C_{y03} , атомом

галогена, цианогруппой, $-C(O)-R_{014}$, $-C(O)-NR_{014}R_{014}'$,

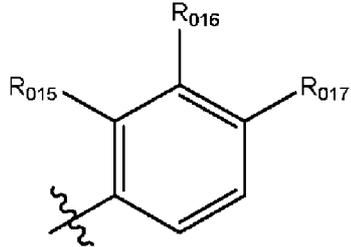
R_{011} и R_{011}' независимо друг от друга являются атомом водорода, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или $-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{01} ,

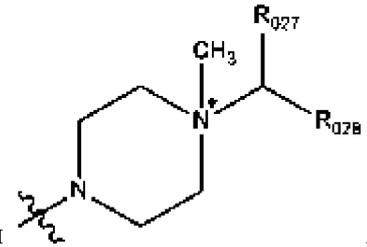
или пара (R_{011}, R_{011}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где N атом необязательно замещен линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, и где один или несколько атомов углерода линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой необязательно дейтерированы,

R_{012} является $-Cy_{05}$, $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил-O- (C_0-C_6) алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-Cy_{06}-O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{07} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} , $-NH-C(O)-NH-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}R_{011}'$, $-OR_{011}$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- OR_{011} , $-SO_2-R_{011}$ или $-C(O)-OR_{011}$,

R_{013} , R_{013}' , R_{014} и R_{014}' независимо друг от друга являются атомом водорода или необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

Cy_{01} , Cy_{02} , Cy_{03} , Cy_{05} , Cy_{06} , Cy_{07} и Cy_{08} независимо друг от друга, являются необязательно замещенной циклоалкильной группой, необязательно замещенной гетероциклоалкильной группой, необязательно замещенной арильной группой или необязательно замещенной гетероарильной группой,

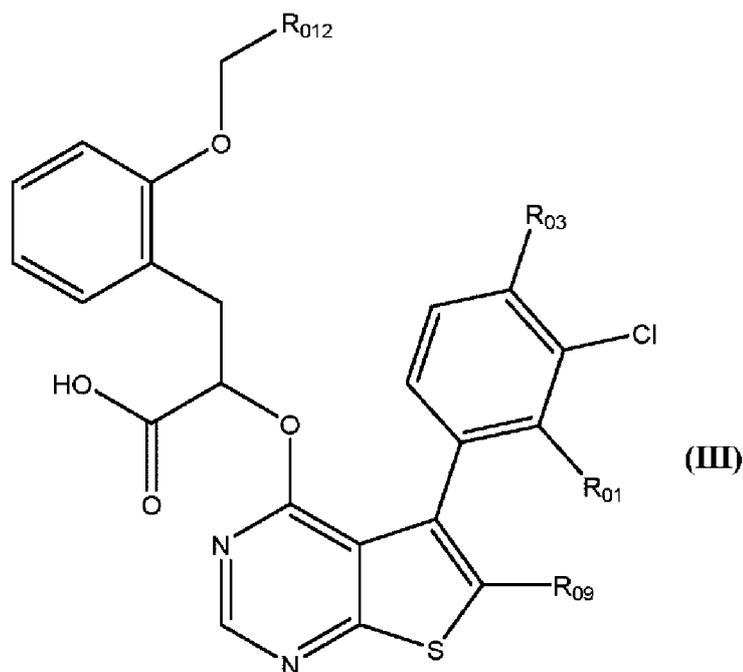
Cy_{09} является , где R_{015} , R_{016} и R_{017} такие, как определены для формулы (I),

R_{031} является , где R_{027} и R_{028} такие, как определены для формулы (I),

где, как максимум, одна из R_{03} , R_{09} или R_{012} групп, если присутствуют, ковалентно присоединены к линкеру,

или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

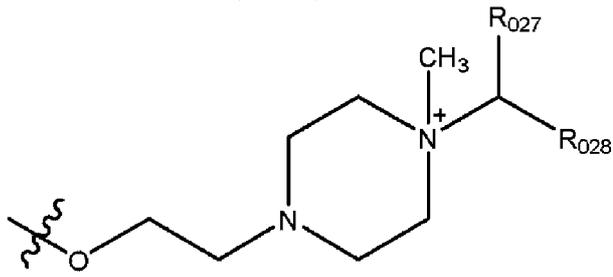
В некоторых вариантах осуществления, группа лекарственного средства по описанию может содержать соединение формулы (III):



где:

R_{01} является линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

R_{03} является $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$ или



где R_{011} и R_{011}' независимо друг от друга являются атомом водорода, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или $-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{01} ;

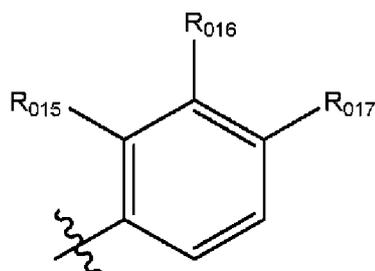
или пара (R_{011}, R_{011}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где N атом может быть замещен 1 или 2 группами, выбранными из атома водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группы,

и где R_{027} является атомом водорода и R_{028} является $-(CH_2)_{p0}-O-SO_2-O-$ группой или $-(CH_2)_{p0}-SO_2-OR_{030}$ группой;

R_{09} является линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкильной группой или $-Cy_{02}$,

R_{012} является $-Cy_{05}$, $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} или $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} ,

Cy_{01} , Cy_{02} , Cy_{05} и Cy_{06} независимо друг от друга, являются циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой, каждая из которых необязательно замещена,



Cy₀₉ является

;

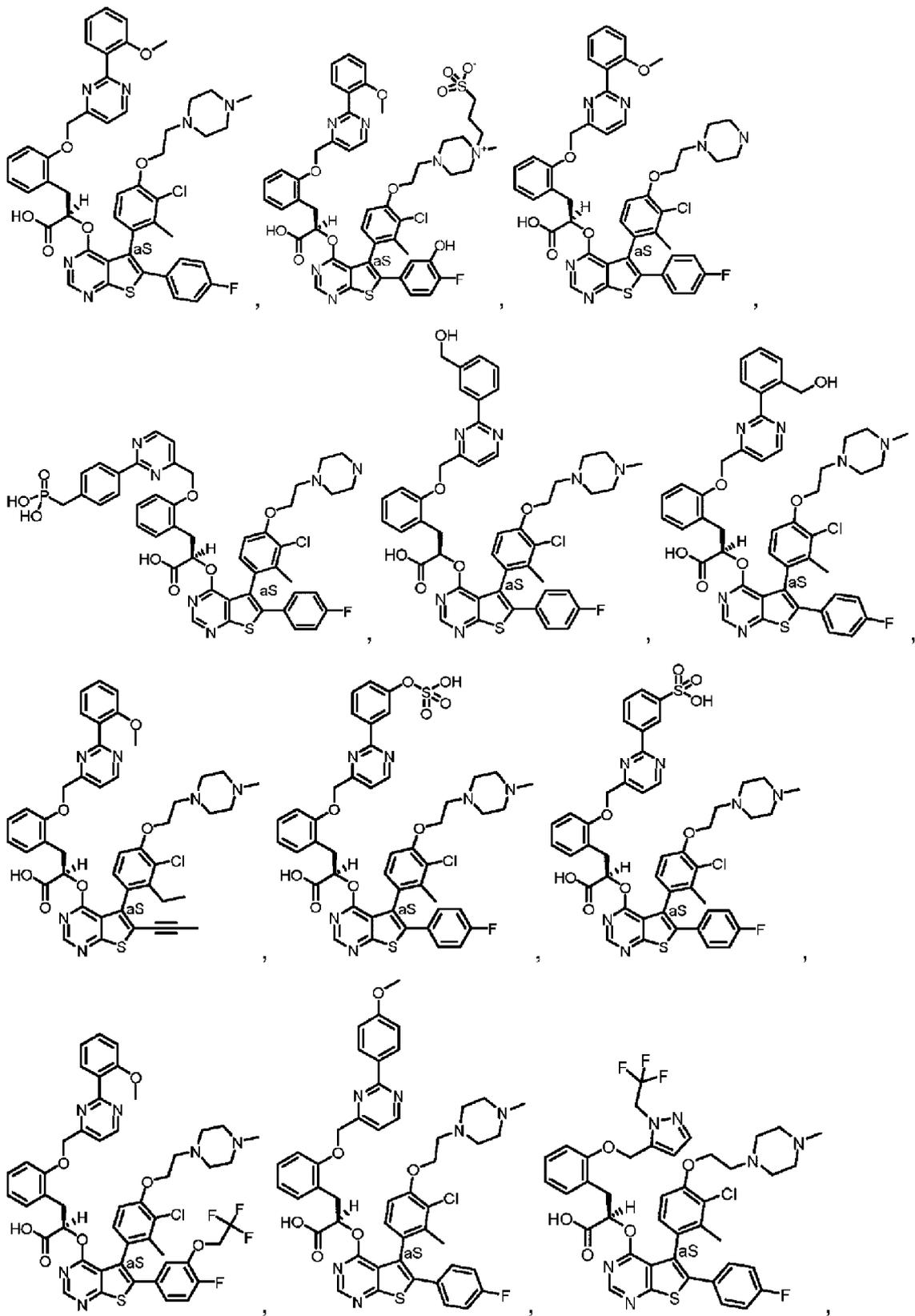
p0, R₀₁₅, R₀₁₆ и R₀₁₇ такие, как определены для формулы (I),

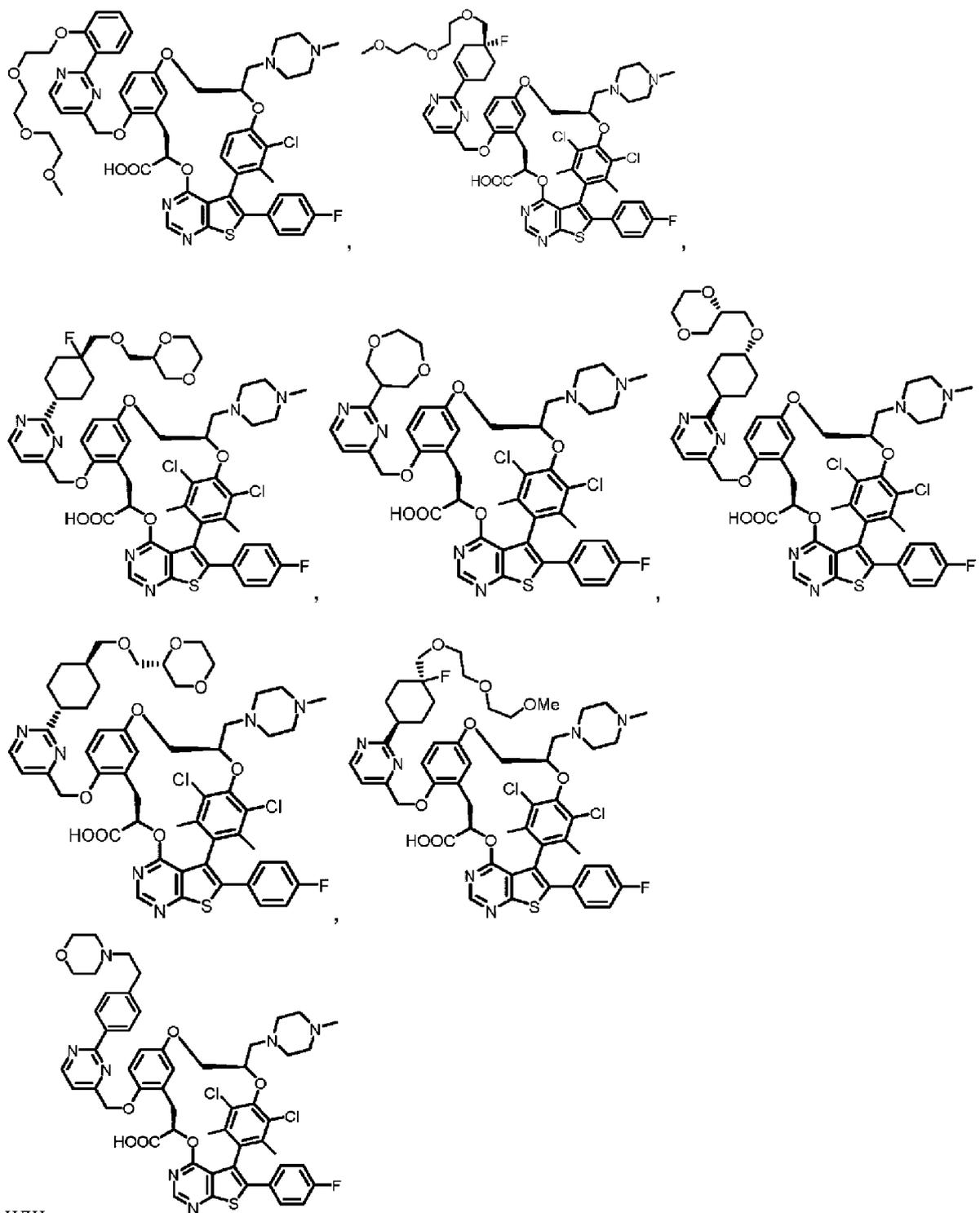
где, как максимум, одна из R₀₃, R₀₉ или R₀₁₂ групп, если присутствуют, ковалентно присоединены к линкеру,

или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления, Cy₀₁, Cy₀₂, Cy₀₃, Cy₀₄, Cy₀₅, Cy₀₆, Cy₀₇, Cy₀₈ и Cy₀₁₀ независимо друг от друга, являются необязательно замещенной циклоалкильной группой, необязательно замещенной гетероциклоалкильной группой, необязательно замещенной арильной группой или необязательно замещенной гетероарильной группой, где необязательные заместители выбирают из необязательно замещенного линейного или разветвленного (C₁-C₆)алкила, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C₂-C₆)алкенильной группы, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C₂-C₆)алкинильной группы, необязательно замещенного линейного или разветвленного (C₁-C₆)алкокси, необязательно замещенного (C₁-C₆)алкил-S-, гидроксид, оксо (или N-оксида, где это возможно), нитро, циано, -C(O)-OR₀', -O-C(O)-R₀', -C(O)-NR₀'R₀'', -NR₀'R₀'', -(C=NR₀')-OR₀'', линейного или разветвленного (C₁-C₆)галоалкила, трифторметокси или галогена, где R₀' и R₀'' каждый независимо является атомом водорода или необязательно замещенной линейной или разветвленной (C₁-C₆)алкильной группой, и где один или несколько из атомов углерода линейной или разветвленной (C₁-C₆)алкильной группы необязательно дейтерированы.

В некоторых вариантах осуществления, группа лекарственного средства (D) содержит:





В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство (или «линкер-полезная нагрузка») -(L-D) может содержать соединение, выбранное из таблицы А.

Лекарственная нагрузка

Лекарственная нагрузка представлена p и также обозначается в настоящем документе как соотношение лекарственное средство-антитело (DAR). Лекарственная нагрузка может варьироваться от 1 до 16 частей лекарственного средства на один антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, p является целым

числом от 1 до 16. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом от 1 до 16, от 1 до 15, от 1 до 14, от 1 до 13, от 1 до 12, от 1 до 11, от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом от 1 до 16. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления, p является целым числом от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления p равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления p равно 2. В некоторых вариантах осуществления p равно 4.

Лекарственная нагрузка может быть ограничена количеством сайтов прикрепления антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, линкерная группа (L) ADC присоединяется к антителу или антигенсвязывающему фрагменту через химически активную группу на одном или нескольких аминокислотных остатках на антителе или антигенсвязывающем фрагменте. Например, линкер может быть присоединен к антителу или антигенсвязывающему фрагменту через свободную амина, имино, гидроксильную, тиольную или карбоксильную группу (например, к N- или C-концу, к эпсилон аминогруппе из одного или нескольких лизиновых остатков, к группе свободной карбоксильной кислоты из одного или нескольких остатков глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты или сульфгидрильной группе одного или нескольких цистеиновых остатков). Сайт, к которому прикреплен линкер, может быть естественным остатком в аминокислотной последовательности антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или он может быть введен в антитело или антигенсвязывающий фрагмент, например, с помощью технологии рекомбинантной ДНК (например, путем введения цистеинового остатка в последовательность аминокислот) или биохимией белка (например, путем восстановления, регулирования pH или гидролиза).

В некоторых вариантах осуществления, количество групп лекарственного средства, которые можно конъюгировать с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, ограничено количеством свободных цистеиновых остатков. Например, если присоединением является тиольная группа цистеина, антитело может иметь только одну или несколько тиольных групп цистеина или может иметь только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, через которые может быть присоединен линкер. Как правило, антитела не содержат большого количества свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеина, которые могут быть связаны с группой лекарственного средства. В самом деле, большинство тиольных групп цистеиновых остатков в антителах вовлечены либо в межцепочечные, либо в внутрицепочечные дисульфидные связи. Следовательно, для конъюгации с цистеинами в некоторых вариантах осуществления может потребоваться, по меньшей мере, частичное восстановление антитела. Чрезмерное связывание линкера-токсина с антителом может дестабилизировать антитело за счет уменьшения цистеиновых остатков, способных образовывать

дисульфидные связи. Следовательно, оптимальное соотношение лекарственное средство:антитело должно увеличивать эффективность ADC (за счет увеличения количества прикрепленных фрагментов лекарственного средства на антитело) без дестабилизации антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, оптимальное соотношение может составлять 2, 4, 6 или 8. В некоторых вариантах осуществления, оптимальное соотношение может составлять 2 или 4.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент подвергают воздействию восстанавливающих условий перед конъюгацией для образования одного или нескольких свободных цистеиновых остатков. Антитело, в некоторых вариантах осуществления, может быть восстановлено восстанавливающим агентом, таким как дитиотреитол (DTT) или трис(2-карбок시에тил)фосфин (TCEP), в условиях частичного или полного восстановления, для образования реакционноспособных тиольных групп цистеина. Неспаренные цистеины могут быть образованы путем частичного восстановления ограниченными молярными эквивалентами TCEP, что может уменьшить межцепочечные дисульфидные связи, которые связывают легкую цепь и тяжелую цепь (одна пара на пару H-L) и две тяжелые цепи в шарнирной области (две пары на пару H-H в случае IgG1 человека), оставляя интактными внутрицепочечные дисульфидные связи (Stefano et al. (2013) *Methods Mol Biol.* 1045:145-71). В вариантах осуществления изобретения, дисульфидные связи в антителах восстанавливаются электрохимически, например, путем использования рабочего электрода, который прикладывает переменное восстанавливающее и окислительное напряжение. Этот подход может позволить онлайн соединение восстановления дисульфидных с аналитическим устройством (например, устройством электрохимического обнаружения, ЯМР-спектрометром или масс-спектрометром) или устройству химического разделения (например, жидкостному хроматографу (например, ВЭЖХ) или устройству для электрофореза (см., например, US 2014/0069822)). В некоторых вариантах осуществления, антитело подвергают денатурирующим условиям для выявления реакционноспособных нуклеофильных групп на аминокислотных остатках, таких как цистеин.

Лекарственная нагрузка ADC может контролироваться различными способами, например, посредством: (i) ограничения молярного избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер или линкерного реагента относительно антитела; (ii) ограничения времени или температуры реакции конъюгации; (iii) частичных или ограничивающих восстановительных условий для модификации тиола цистеина; и/или (iv) конструирования рекомбинантными методами аминокислотной последовательности антитела таким образом, чтобы количество и положение цистеиновых остатков изменялось для контроля количества и/или положения присоединений линкер-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления, свободные цистеиновые остатки вводят в последовательность аминокислоты антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Например, сконструированные антитела цистеина могут быть получены, если одна или несколько аминокислот родительского антитела заменены аминокислотой цистеином.

Любая форма антитела может быть сконструирована таким образом, т.е. мутирована. Например, фрагмент родительского Fab антитела может быть сконструирован для образования сконструированного с цистеином Fab, называемого «ThioFab». Аналогично, исходное моноклональное антитело может быть сконструировано для образования «ThioMab». Односайтовая мутация дает один сконструированный цистеиновый остаток в ThioFab, тогда как односайтовая мутация дает два сконструированных цистеиновых остатка в ThioMab из-за димерной природы IgG антитела. ДНК, кодирующая вариант последовательности аминокислоты родительского полипептида, может быть получена множеством способов, известных в данной области техники (см., например, способы, описанные в WO 2006/034488). Эти способы включают, но не ограничиваются ими, получение сайт-направленным (или опосредованным олигонуклеотидами) мутагенезом, ПЦР мутагенезом и кассетным мутагенезом ранее полученной ДНК, кодирующей полипептид. Варианты рекомбинантных антител также могут быть сконструированы с помощью манипуляций с рестрикционными фрагментами или с помощью ПЦР с перекрыванием удлинения с синтетическими олигонуклеотидами. ADC формулы (1) включают, но не ограничиваются ими, антитела, которые содержат 1, 2, 3 или 4 сконструированные аминокислоты цистеин (Lyon et al. (2012) *Methods Enzymol.* 502:123-38). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько свободных цистеиновых остатков уже присутствуют в антителе или антигенсвязывающем фрагменте без использования инженерии, и в этом случае существующие свободные цистеиновые остатки могут быть использованы для конъюгирования антитела или антигенсвязывающего фрагмента с группой лекарственного средства.

Если более одной нуклеофильной группы взаимодействует с промежуточным лекарственным средством-линкером или реагентом линкерной группы, за которым следует реагент группы лекарственного средства, в реакционной смеси, содержащей несколько копий антитела или антигенсвязывающего фрагмента и линкерной части, тогда полученный продукт может быть смесью соединений ADC с распределением одной или нескольких групп лекарственного средства, прикрепленных к каждой копии антитела или антигенсвязывающего фрагмента в смеси. В некоторых вариантах осуществления, лекарственная нагрузка в смеси ADC, полученная в результате реакции конъюгации, варьируется от 1 до 16 групп лекарственного средства, прикрепленных к антителу или антигенсвязывающему фрагменту. Среднее количество групп лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент (т.е. средняя лекарственная нагрузка или среднее p) можно рассчитать любым традиционным способом, известным в данной области техники, например, с помощью масс-спектрометрии (например, жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС)) и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии (например, ГИХ-ВЭЖХ). В некоторых вариантах осуществления, среднее количество групп лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент определяют с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС). В некоторых вариантах осуществления, среднее количество групп лекарственного средства

на антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляет от примерно 1,5 до примерно 3,5, от примерно 2,5 до примерно 4,5, от примерно 3,5 до примерно 5,5, от примерно 4,5 до примерно 6,5, от примерно 5,5 до примерно 7,5, от примерно 6,5 до примерно 8,5 или от примерно 7,5 до примерно 9,5. В некоторых вариантах осуществления, среднее количество групп лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляет от примерно 2 до примерно 4, от примерно 3 до примерно 5, от примерно 4 до примерно 6, от примерно 5 до примерно 7, от примерно 6 до примерно 8, от примерно 7 до примерно 9, от примерно 2 до примерно 8 или от примерно 4 до примерно 8.

В некоторых вариантах осуществления, среднее количество групп лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляет примерно 2. В некоторых вариантах осуществления, среднее количество групп лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляет примерно 1,5, примерно 1,6, примерно 1,7, примерно 1,8, примерно 1,9, примерно 2, примерно 2,1, примерно 2,2, примерно 2,3, примерно 2,4 или примерно 2,5. В некоторых вариантах осуществления, среднее количество групп лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляет 2.

В некоторых вариантах осуществления, среднее количество групп лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляет примерно 4. В некоторых вариантах осуществления, среднее количество групп лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляет примерно 3,5, примерно 3,6, примерно 3,7, примерно 3,8, примерно 3,9, примерно 4, примерно 4,1, примерно 4,2, примерно 4,3, примерно 4,4 или примерно 4,5. В некоторых вариантах осуществления, среднее количество групп лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент составляет 4.

В некоторых вариантах осуществления, термин «примерно», используемый в отношении среднего количества групп лекарственного средства на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, означает плюс или минус 20%, 15%, 10%, 5% или 1%. В одном варианте осуществления, термин «примерно» относится к диапазону значений, которые на 10% больше или меньше указанного значения. В другом варианте осуществления, термин «примерно» относится к диапазону значений, которые на 5% больше или меньше указанного значения. В другом варианте осуществления, термин «примерно» относится к диапазону значений, которые на 1% больше или меньше указанного значения.

Отдельные соединения ADC или «виды» могут быть идентифицированы в смеси с помощью масс-спектропии и разделены, например, УЭЖХ или ВЭЖХ, например, хроматографией с гидрофобным взаимодействием (ГИХ-ВЭЖХ). В некоторых вариантах осуществления, гомогенный или почти гомогенный продукт ADC с одним значением нагрузки может быть выделен из смеси для конъюгации, например, электрофорезом или хроматографией.

В некоторых вариантах осуществления, более высокая лекарственная нагрузка

(например, $p > 16$) может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю клеточной проницаемости некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство. Повышенная лекарственная нагрузка также может отрицательно повлиять на фармакокинетику (например, клиренс) некоторых ADC. В некоторых вариантах осуществления, более низкая лекарственная нагрузка (например, $p < 2$) может снижать эффективность определенных ADC против клеток, экспрессирующих мишень. В некоторых вариантах осуществления, лекарственная нагрузка для ADC согласно настоящему описанию составляет от примерно 2 до примерно 16, от примерно 2 до примерно 10, от примерно 2 до примерно 8; от примерно 2 до примерно 6; от примерно 2 до примерно 5; от примерно 3 до примерно 5; от примерно 2 до примерно 4; или от примерно 4 до примерно 8.

В некоторых вариантах осуществления, достигается средняя нагрузка примерно 2, например, использование частичного снижения внутрипочечных дисульфидов на антителе или антигенсвязывающем фрагменте обеспечивает полезные свойства. В некоторых вариантах осуществления, достигается средняя нагрузка примерно 4 или примерно 6 или примерно 8, например, использование частичного снижения внутрипочечных дисульфидов на антителе или антигенсвязывающем фрагменте обеспечивает полезные свойства. В некоторых вариантах осуществления, лекарственная нагрузка и/или средняя нагрузка менее примерно 2 может привести к неприемлемо высокому уровню не конъюгированных видов антител, которые могут конкурировать с ADC за связывание с антигеном-мишенью CD74 и/или обеспечивают снижение эффективности лечения. В некоторых вариантах осуществления, лекарственная нагрузка и/или средняя лекарственная нагрузка более чем примерно 16 может привести к неприемлемо высокому уровню гетерогенности продукта и/или агрегации ADC. Средняя лекарственная нагрузка более 16 может также влиять на стабильность ADC из-за потери одной или нескольких химических связей, необходимых для стабилизации антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Настоящее описание включает способы получения описанных ADC. Коротко, ADC содержат антитело или антигенсвязывающий фрагмент в качестве антитела или антигенсвязывающего фрагмента, группу лекарственного средства (например, ингибитор Mcl-1) и линкер, который соединяет группу лекарственного средства и антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, ADC могут быть получены с использованием линкера, имеющего реакционноспособные функциональные группы для ковалентного присоединения к группе лекарственного средства и к антителу или антигенсвязывающему фрагменту. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент функционализирован для получения функциональной группы, которая взаимодействует с линкером или промежуточным лекарственным средством-линкером. Например, в некоторых вариантах осуществления, тиол цистеина антитела или антигенсвязывающего фрагмента может образовывать связь с реакционноспособной функциональной группой линкера или промежуточного

лекарственного средства-линкера с образованием ADC. В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент получают с бактериальной трансклутаминой (BTG), реакционноспособными глутаминами специфически функционализированными с аминсодержащим циклооктином BCN (*N*-[(1*R*,8*S*,9*S*)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметилоксикарбонил]-1,8-диамино-3,6-диоксооктан) группы. В некоторых вариантах осуществления, сайт-специфическая конъюгация линкера или промежуточного лекарственного средства-линкера с BCN группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента происходит, например, как описано и проиллюстрировано в настоящем документе. Создание ADC может быть проведено способами, известными специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, ADC получают путем контакта антитела или антигенсвязывающего фрагмента с линкером и группой лекарственного средства (например, ингибитора Mcl-1) последовательным образом, так что антитело или антигенсвязывающий фрагмент сначала ковалентно связывают с линкером, и затем предварительно образованный промежуточный продукт антитело-линкер взаимодействует с группой лекарственного средства. Промежуточное соединение антитело-линкер может или не может подвергаться стадии очистки перед контактом с группой лекарственного средства. В других вариантах осуществления, ADC получают путем контакта антитела или антигенсвязывающего фрагмента с соединением линкер-лекарственное средство, предварительно полученным взаимодействием линкера с группой лекарственного средства. Предварительно полученное соединение линкер-лекарственное средство может или не подвергаться стадии очистки перед контактом с антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В других вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент контактирует с линкером и группой лекарственного средства в одной реакционной смеси, что делает возможным одновременное образование ковалентных связей между антителом или антигенсвязывающим фрагментом и линкером, и между линкером и группой лекарственного средства. Этот способ получения ADC может включать реакцию, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент контактирует с антителом или антигенсвязывающим фрагментом перед добавлением линкера к реакционной смеси и наоборот. В некоторых вариантах осуществления, ADC получают взаимодействием антитела или антигенсвязывающего фрагмента с линкером, присоединенным к группе лекарственного средства, такого как ингибитор Mcl-1, в условиях, допускающих конъюгацию.

ADC, полученные в соответствии с описанными выше способами, можно подвергнуть стадии очистки. Стадия очистки может включать любые биохимические способы, известные в данной области техники для очистки белков, или любую их комбинацию. Они включают, но не ограничены ими, тангенциальную проточную фильтрацию (TFF), аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, хроматографию на основе любого заряда или изоэлектрической точки, хроматографию в смешанном режиме, например, СНТ (керамический гидроксипатит), хроматографию с

гидрофобным взаимодействием, эксклюзионную хроматографию, диализ, фильтрацию, селективное осаждение или любую их комбинацию.

Терапевтическое применение и композиции

В настоящем документе описаны способы применения описанных в настоящем документе композиций, например, описанных соединений ADC и композиций, при лечении субъекта от нарушения, например рака. Композиции, например, ADC, могут быть введены отдельно или в комбинации, по меньшей мере, с одним дополнительным не активным и/или активным агентом, например, по меньшей мере, одним дополнительным терапевтическим агентом и может вводиться в любой фармацевтически приемлемой композиции, дозировке и схеме дозирования. Эффективность лечения может быть оценена на предмет токсичности, а также показатели эффективности, и соответствующим образом скорректированы. Меры эффективности включают, но не ограничиваются ими, цитостатический и/или цитотоксический эффект, наблюдаемый *in vitro* или *in vivo*, уменьшение объема опухоли, ингибирование роста опухоли и/или длительное выживание.

Способы определения того, оказывает ли ADC цитостатический и/или цитотоксический эффект на клетку, известны. Например, цитотоксическая или цитостатическая активность ADC может быть измерена, например, путем обработки клетки млекопитающих, экспрессирующие антиген-мишень CD74 ADC, в среде для культивирования клеток; культивирование клеток в течение периода от примерно 6 часов до примерно 6 дней; и измерение жизнеспособности клеток (например, с помощью теста CellTiter-Glo® (CTG) или анализа жизнеспособности клеток МТТ). Клеточные анализы *in vitro* также можно использовать для измерения жизнеспособности (пролиферации), цитотоксичности и индукции апоптоза (активации каспазы) ADC.

Для определения цитотоксичности можно измерить некроз или апоптоз (запрограммированную гибель клеток). Некроз обычно сопровождается повышенной проницаемостью клеточной мембраны, набуханием клетки и разрывом клеточной мембраны. Апоптоз можно определить количественно, например, через измерение фрагментации ДНК. Доступны коммерческие фотометрические методы количественного определения фрагментации ДНК *in vitro*. Примеры таких анализов, включая TUNEL (который определяет включение меченых нуклеотидов во фрагментированную ДНК) и анализы на основе ИФА, описаны в Biochemica (1999) 2:34-7 (Roche Molecular Biochemicals).

Апоптоз также может быть определен через измерение морфологических изменений в клетке. Например, как и в случае некроза, потерю целостности клеточной мембраны можно определить через измерение поглощения определенных красителей (например, флуоресцентного красителя, такого как, например, акридиновый оранжевый или бромид этидия). Способ измерения числа апоптотических клеток был описан Duke and Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., eds. (1992) pp. 3.17.1-3.17.16). Клетки также могут быть мечены ДНК красителем (например, акридиновым оранжевым, бромидом этидия или йодидом пропидия), и клетки наблюдают на предмет конденсации и скопления

хроматина по краю участка воспаления вдоль внутренней ядерной мембраны. В некоторых вариантах осуществления, апоптоз также можно определить путем скрининга на активность каспазы. В некоторых вариантах осуществления, анализ Caspase-Glo® можно использовать для измерения активности каспазы-3 и каспазы-7. В некоторых вариантах осуществления, анализ обеспечивает люминогенный субстрат каспазы-3/7 в реагенте, оптимизированном для активности каспазы, активности люциферазы и лизиса клеток. В некоторых вариантах осуществления, добавление реагента Caspase-Glo® 3/7 в формате «добавление-смешивание-измерение» может привести к лизису клеток с последующим расщеплением субстрата каспазой и созданием люминесцентного сигнала «типа свечения», продуцируемого люциферазой. В некоторых вариантах осуществления, люминесценция может быть пропорциональна количеству присутствующей активности каспазы и может служить индикатором апоптоза. Другие морфологические изменения, которые можно измерить для определения апоптоза, включают, например, цитоплазматическую конденсацию, повышенное пузырение мембраны и уменьшение размера клеток. Определение любого из этих эффектов на раковые клетки указывает на то, что ADC полезен при лечении рака.

Жизнеспособность клеток можно измерить, например, путем определения поглощения клетками красителя, такого как нейтральный красный, трипановый синий, кристаллический фиолетовый или синий ALAMAR™ (см., например, Page et al. (1993) Intl J Oncology 3:473-6). В таком анализе клетки инкубируют в среде, содержащей краситель, клетки промывают и оставшийся краситель, отражающий поглощение красителя клетками, измеряют спектрофотометрически.

Жизнеспособность клеток также можно измерить, например, путем количественного определения АТФ, индикатора метаболически активных клеток. В некоторых вариантах осуществления, *in vitro* эффективность и/или жизнеспособность клеток полученных ADC или соединений ингибиторов Mcl-1 можно оценить с помощью анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (CTG), как описано в примерах, представленных в настоящем документе. В этом анализе, в некоторых вариантах осуществления, один реагент (реагент CellTiter-Glo®) добавляют непосредственно к клеткам, культивируемым в среде с добавлением сыворотки. Добавление реагента приводит к лизису клеток и созданию люминесцентного сигнала, пропорционального количеству присутствующего АТФ. Количество АТФ прямо пропорционально количеству клеток, присутствующих в культуре.

Жизнеспособность клеток также можно измерить, например, путем измерения восстановления солей тетразолия. В некоторых вариантах осуществления, *in vitro* эффективность и/или жизнеспособность клеток полученных ADC или соединений ингибиторов Mcl-1 может быть оценена с использованием анализа жизнеспособности МТТ клеток, как описано в примерах, представленных в настоящем документе. В этом анализе, в некоторых вариантах осуществления, желтый тетразолий МТТ (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолийбромид) восстанавливается метаболически активными клетками,

частично под действием ферментов дегидрогеназы, с образованием восстанавливающих эквивалентов, таких как NADH и NADPH. Полученный внутриклеточный пурпурный формазан затем может быть солибилизован и количественно определен спектрофотометрическими методами.

В некоторых аспектах, настоящее описание относится к способу уничтожения, ингибирования или модуляции роста раковой клетки или ткани путем нарушения экспрессии и/или активности Mcl-1 и/или одного или нескольких вышестоящих модуляторов или их нижестоящих мишеней. Способ можно использовать с любым субъектом, у которого нарушение экспрессии и/или активности Mcl-1 обеспечивает терапевтический эффект. Субъекты, которым может быть полезно нарушение экспрессии и/или активности Mcl-1, включают, но не ограничиваются ими, тех, которые имеют или подвержены риску заболеть раком, таким как опухоль или гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак груди, множественная миелома, мантиноклеточная миелома, лейкоз, лимфома, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфолейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярную лимфому, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланому, миелогенный лейкоз, миелому, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, хронический лимфолейкоз, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома или рак желудка.

Типовые способы включают стадии контакта клетки с ADC, как описано в настоящем документе, в эффективном количестве, т.е. количестве, достаточном для уничтожения клетки. Способ можно использовать на клетках в культуре, например, *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* или *in situ*. Например, клетки, которые экспрессируют CD74 (например, клетки, собранные путем биопсии опухоли или метастатического поражения; клетки из установленной линии раковых клеток; или рекомбинантные клетки), можно культивировать *in vitro* в культуральной среде, и на стадию контактирования можно воздействовать добавлением ADC к питательной среде. Способ приводит к уничтожению клеток, экспрессирующих CD74, включая, в частности, раковые клетки, экспрессирующие CD74. Альтернативно, ADC можно вводить субъекту любым подходящим путем (например, внутривенным, подкожным или прямым контактом с опухолевой тканью) для оказания эффекта *in vivo*.

Эффект *in vivo* описанной терапевтической композиции ADC можно оценить на подходящей животной модели. Например, могут быть использованы модели ксенотрансплантата рака, где раковые эксплантаты или пассированные ткани ксенотрансплантата вводят животным с ослабленным иммунитетом, таким как голые или SCID мыши (Klein et al. (1997) *Nature Med.* 3:402-8). Эффективность можно предсказать, используя анализы, которые измеряют ингибирование образования опухоли, регрессии опухоли или метастазирования и подобные.

Также можно использовать анализы *in vivo*, которые оценивают стимулирование смерти опухоли такими механизмами, как апоптоз. В некоторых вариантах осуществления, ксенотрансплантаты от мышей с опухолью, получавших терапевтическую композицию, могут быть проверены на наличие очагов апоптоза и проведено сравнение с нелеченными контрольными мышами, несущими ксенотрансплантат. Степень, в которой очаги апоптоза обнаруживаются в опухолях обработанных мышей, указывает на терапевтическую эффективность композиции.

В настоящем документе также представлены способы лечения нарушения, например рака. Описанные в настоящем документе композиции, например, описанные в настоящем документе ADC, можно вводить не являющемуся человеком млекопитающему или человеку для терапевтических целей. Терапевтические способы включают введение субъекту, имеющему рак или имеющему подозрение на рак, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей ингибитор Mcl-1, например, ADC, где ингибитор связан с таргетирующим антителом, которое связывается с антигеном (1), экспрессированным на раковой клетке (2) доступным для связывания, и/или (3) локализованным или преимущественно экспрессированным на поверхности раковой клетки по сравнению с не раковой клеткой.

Типовым вариантом осуществления является способ лечения субъекта, имеющего рак или подозреваемого в его наличии, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, описанной в настоящем документе, например, ADC, композиции или фармацевтической композиции (например, любого из типовых ADC, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, рак экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, раком является опухоль или гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления, раком является рак груди, множественная миелома, плазмноклеточная миелома, лейкоз, лимфома, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфолейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярная лимфома, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланома, миелогенный лейкоз, миелома, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, хронический лимфолейкоз, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, раком является лимфома или рак желудка.

Другим типовым вариантом осуществления является способ доставки ингибитора Mcl-1 к клетке, экспрессирующей CD74, включающий конъюгирование ингибитора Mcl-1 с антителом, которое иммуноспецифически связывается с эпитопом CD74 и воздействие ADC на клетку. Типовые раковые клетки, которые экспрессируют CD74, для которых показаны ADC по настоящему изобретению, включают клетки множественной миеломы.

В некоторых аспектах, настоящее описание дополнительно представляет способы уменьшения или ингибирования роста опухоли (например, опухоли, экспрессирующей

CD74), включающие введение терапевтически эффективного количества ADC или композиции, содержащей ADC. В некоторых вариантах осуществления, лечение является достаточным для уменьшения или подавления роста опухоли у пациента, уменьшения количества или размера метастатических поражений, уменьшения опухолевой нагрузки, уменьшения первичной опухолевой нагрузки, уменьшения инвазивности, продления времени выживания и/или поддержания или улучшения качества жизни. В некоторых вариантах осуществления, опухоль является резистентной или рефрактерной к лечению антителом или антигенсвязывающим фрагментом ADC (например, анти-CD74 антителом) при введении отдельно, и/или опухоль является резистентной или рефрактерной к лечению группой лекарственного средства ингибитора Mcl-1 при введении отдельно.

Типовым вариантом осуществления является способ уменьшения или ингибирования роста опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ADC, композиции или фармацевтической композиции (например, любого из типовых ADC, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, опухоль экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, опухолью является рак груди, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, меланома, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, опухолью является рак желудка. В некоторых вариантах осуществления, введение ADC, композиции или фармацевтической композиции уменьшает или ингибирует рост опухоли, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95% или по меньшей мере, примерно на 99%, по сравнению с ростом без лечения.

Другим типовым вариантом осуществления является способ задержки или замедления роста опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ADC, композиции или фармацевтической композиции (например, любого из типовых ADC, композиций или фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, опухоль экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления опухолью является рак груди, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, меланома, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления, опухолью является рак желудка. В некоторых вариантах осуществления, введение ADC, композиции или фармацевтической композиции задерживает или замедляет рост опухоли по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере,

примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95% или по меньшей мере, примерно на 99%, по сравнению с ростом без лечения.

В некоторых аспектах, настоящее описание дополнительно представляет способы уменьшения или замедления роста популяции раковых клеток (например, популяции раковых клеток, экспрессирующих CD74), включающие введение терапевтически эффективного количества ADC или композиции, содержащей ADC.

Типовым вариантом осуществления является способ уменьшения или замедления роста популяции раковых клеток у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ADC, композиции или фармацевтической композиции (например, любого из типовых ADC, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, популяция раковых клеток экспрессирует антиген-мишень CD74. В некоторых вариантах осуществления, популяция раковых клеток происходит из опухоли или гематологического рака. В некоторых вариантах осуществления, популяция раковых клеток происходит из рака груди, множественной миеломы, плазмноклеточной миеломы, лейкоза, лимфомы, рака желудка, острого миелоидного лейкоза, рака мочевого пузыря, рака мозга, рака костного мозга, рака шейки матки, хронического лимфолейкоза, колоректального рака, рака пищевода, гепатоцеллюлярного рака, лимфобластного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфоидных злокачественных новообразований Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланомы, миелогенного лейкоза, миеломы, рака полости рта, рака яичников, немелкоклеточного рака легких, хронического лимфолейкоза, рака простаты, мелкоклеточного рака легких или рака селезенки. В некоторых вариантах осуществления, популяция раковых клеток происходит из лимфомы или рака желудка. В некоторых вариантах осуществления, введение ADC, композиции или фармацевтической композиции снижает популяцию раковых клеток по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95% или по меньшей мере, примерно на 99% по сравнению с популяцией при отсутствии лечения. В некоторых вариантах осуществления, введение ADC, композиции или фармацевтической композиции замедляет рост популяции раковых клеток по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95% или по меньшей мере, примерно на 99%, по сравнению с размножением без обработки.

В настоящем документе также представлены способы определения того, будет ли

субъект, имеющий рак или подозреваемый в его наличии, реагировать на лечение описанными ADC и композициями. Типовым вариантом осуществления является способ определения того, будет ли субъект, страдающий раком или подозреваемый в его наличии, реагировать на лечение ADC, композицией или фармацевтической композицией (например, любым из типовых ADC, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе), через предоставление биологического образца от субъекта; контакт образца с ADC; и обнаружение связывания ADC с раковыми клетками в образце. В некоторых вариантах осуществления, образцом является образец биопсии ткани, образец крови или образец костного мозга. В некоторых вариантах осуществления, способ включает предоставление биологического образца от субъекта; контакт образца с ADC; и обнаружение одного или нескольких маркеров гибели раковых клеток в образце (например, повышенной экспрессии одного или нескольких апоптотических маркеров, снижения роста популяции раковых клеток в культуре и т. д.).

Кроме того, в настоящем документе представлены терапевтические применения описанных ADC и композиций. Типовым вариантом осуществления является ADC, композиция или фармацевтическая композиция (например, любой из типовых ADC, композиций или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе) для использования при лечении субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии рака (например, рака, экспрессирующего CD74). Другим типовым вариантом осуществления является использование ADC, композиции или фармацевтической композиции (например, любого из типовых ADC, композиций или фармацевтических композиций, описанных в данном документе) при лечении субъекта, имеющего рак или подозреваемого в его наличии (например, рак, экспрессирующий CD74). Другим типовым вариантом осуществления является использование ADC, композиции или фармацевтической композиции (например, любого из типовых ADC, композиций или фармацевтических композиций, описанных в данном документе) в способе производства лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего или подозреваемого в наличии рака (например, рака, экспрессирующего CD74). Способы идентификации субъектов, страдающих раком, который экспрессирует целевой антиген CD74, известны в данной области техники и могут быть использованы для идентификации пациентов, подходящих для лечения описанным соединением или композицией ADC.

Более того, ADC по настоящему изобретению можно вводить не являющемуся человеком млекопитающему, экспрессирующему антиген, с которым ADC способен связываться, для ветеринарных целей или в качестве животной модели заболевания человека. Что касается последнего, такие модели на животных могут быть полезны для оценки терапевтической эффективности описанных ADC (например, тестирования дозировок и временных курсов введения).

Терапевтические композиции, используемые на практике вышеуказанных способов, могут быть включены в фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для желаемого способа доставки. Типовым вариантом

осуществления является фармацевтическая композиция, содержащая ADC по настоящему описанию и фармацевтически приемлемый носитель, например, тот, который подходит для выбранного способа введения, например, внутривенного введения. Фармацевтическая композиция также может содержать один или несколько дополнительных не активных и/или терапевтических агентов, которые подходят для лечения или профилактики, например, рака (например, стандартное средство лечения и т. д.). Фармацевтическая композиция также может содержать один или несколько компонентов носителя, наполнителя и/или стабилизатора и подобные. Способы составления таких фармацевтических композиций и подходящие составы известны в данной области техники (см., например, «Remington's Pharmaceutical Sciences,» Mack Publishing Co., Easton, PA).

Подходящие носители включают любой материал, который при объединении с терапевтической композицией сохраняет противоопухолевую функцию терапевтической композиции и обычно не реагирует с иммунной системой пациента. Фармацевтически приемлемые носители включают любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и подобные, которые являются физиологически совместимыми. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают один или несколько из следующих компонентов: вода, солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, декстроза, глицерин, этанол, мезилат и подобные, а также их комбинации. Во многих случаях, в состав включены изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно содержать небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность ADC.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить множеством способов, известных в данной области техники. Путь и/или способ введения могут варьироваться в зависимости от желаемых результатов. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический состав солюбилизован и вводится любым путем, способным доставлять терапевтическую композицию к месту рака. Потенциально эффективные пути введения включают, но не ограничиваются ими, парентеральный (например, внутривенный, подкожный), внутрибрюшинный, внутримышечный, внутриопухолевый, внутрикожный, внутриорганный, ортотопический и подобные. В некоторых вариантах осуществления, введение является внутривенным, подкожным, внутрибрюшинным или внутримышечным. Фармацевтически приемлемый носитель должен подходить для пути введения, например, внутривенного или подкожного введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения, активное соединение(я), то есть ADC и/или любое дополнительное терапевтическое средство, может быть покрыто материалом для защиты соединения(й) от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение(я). Введение может быть системным или местным.

Описанные в настоящем документе терапевтические композиции могут быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения, и могут быть в различных формах. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. В некоторых вариантах осуществления, описанные ADC могут быть включены в фармацевтическую композицию, подходящую для парентерального введения. Раствор для инъекций может состоять либо из жидкой, либо из лиофилизированной дозированной формы в кремневом или янтарном флаконе, ампуле или предварительно заполненном шприце или другом известном устройстве для доставки или хранения. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько ADC или фармацевтических композиций поставляются в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере и могут быть восстановлены (например, водой или солевым раствором) до подходящей концентрации для введения субъекту.

Обычно терапевтически эффективное количество или эффективное количество описанной композиции, например, описанного ADC, используется в фармацевтических композициях по настоящему описанию. Композиция, например, содержащая ADC, может быть составлена в фармацевтически приемлемую лекарственную форму обычными способами, известными в данной области техники. Дозировки и протоколы введения для лечения рака с использованием вышеупомянутых способов будут варьироваться в зависимости от способа и рака-мишени и, как правило, будут зависеть от ряда других факторов, принимаемых во внимание в данной области техники.

Схемы дозирования для описанных в настоящем документе композиций, например, содержащих ADC отдельно или в комбинации с одним дополнительным не активным и/или активным терапевтическим агентом, могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, один болюс одного или обоих агентов можно вводить за один раз, несколько разделенных доз можно вводить в течение заранее определенного периода времени, или доза одного или обоих агентов может быть пропорционально увеличена или уменьшена, как показано остротой терапевтической ситуации. В некоторых вариантах осуществления, лечение включает однократный болюс или повторное введение препарата ADC приемлемым путем введения. В некоторых вариантах осуществления, ADC вводят пациенту ежедневно, еженедельно, ежемесячно или в любой промежуток времени между ними. Для любого конкретного субъекта конкретные схемы дозирования могут корректироваться с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным мнением лечащего врача. Композиции для парентерального введения могут быть составлены в виде стандартной дозированной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Стандартная дозированная форма в настоящем документе относится к физически

дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для достижения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

Значения дозировки для композиций, содержащих ADC и/или любой дополнительный терапевтический агент(ы), могут быть выбраны на основе уникальных характеристик активного соединения(й) и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут. Врач или ветеринар может начинать вводить дозы ADC, используемые в фармацевтической композиции, с уровней ниже, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока желаемый эффект не будет достигнут. В общем, эффективные дозы композиций по настоящему изобретению для лечения рака могут варьироваться в зависимости от многих различных факторов, включая способы введения, сайт-мишень, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, вводимые другие лекарственные средства и то, являются ли лечение профилактическим или лечебным. Выбранный уровень дозировки может также зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного применяемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу тела, состояние, общее состояние здоровья и предыдущую медицинскую историю пациента, проходящего лечение, и аналогичные факторы. Дозировки лечения могут быть титрованы для оптимизации безопасности и эффективности.

Токсичность и терапевтическая эффективность соединений, представленных в настоящем документе, можно определить стандартными фармацевтическими процедурами в культуре клеток или на моделях животных. Например, LD50, ED50, EC50 и IC50 могут быть определены, и соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами (LD50/ED50) может быть рассчитано как терапевтический индекс. Данные, полученные с помощью анализов *in vitro* и *in vivo*, можно использовать для оценки или определения диапазона доз для применения у людей. Например, композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут первоначально быть оценены на ксеногенных моделях рака (например, на мышинной модели множественной миеломы NCI-H929).

В некоторых вариантах осуществления, ADC или композицию, содержащую ADC, вводят однократно. В других вариантах осуществления, ADC или композицию, содержащую ADC, вводят несколько раз. Интервалы между разовыми дозами могут быть, например, ежедневными, еженедельными, ежемесячными или ежегодными. Интервалы также могут быть нерегулярными, основанными на измерении уровней введенного агента (например, ADC) в крови пациента, чтобы поддерживать относительно постоянную концентрацию агента в плазме. Дозировка и частота введения ADC или композиции,

содержащей ADC, также могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических целях относительно небольшая доза может вводиться через относительно нечастые интервалы в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение всю оставшуюся жизнь. В терапевтических применениях иногда требуется относительно более высокая дозировка с относительно более короткими интервалами до тех пор, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится и, возможно, пока пациент не покажет частичное или полное улучшение одного или нескольких симптомов заболевания. После этого пациенту может быть назначен более низкая, например, профилактическая схема.

Вышеупомянутые терапевтические подходы могут быть объединены с любой из множества дополнительных схем хирургической, химиотерапевтической или лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления, ADC или композиции, описанные в настоящем документе, составлены совместно и/или вводятся совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, например, одним или несколькими химиотерапевтическими агентами, одним или несколькими стандартными агентами для конкретного состояния, которое лечат.

Также представлены наборы для использования в терапевтических и/или диагностических применениях, описанных в настоящем документе. Такие наборы могут включать носитель, упаковку или контейнер, которые разделены на отсеки для приема одного или нескольких контейнеров, таких как флаконы, пробирки и подобные, где каждый контейнер содержит один из отдельных элементов, используемых в способе, описанном в настоящем документе. Этикетка может присутствовать на или с контейнером(ами), указывающая, что ADC или композиция в наборе используется для конкретной терапии или не терапевтического применения, такого как прогностическое, профилактическое, диагностическое или лабораторное применение. Этикетка также может указывать направления для использования *in vivo* или *in vitro*, например, описанные в настоящем документе. Указания и другая информация также может быть включена во вкладыш(и) или этикетку(и), которые находятся в или на наборе. Этикетка может быть на контейнере или быть связана с ним. Этикетка может быть на контейнере, когда буквы, цифры или другие символы, образующие этикетку, отформованы или вытравлены на самом контейнере. Этикетка может быть связана с контейнером, когда он присутствует в емкости или носителе, который также удерживает контейнер, например, в виде вкладыша в упаковку. Этикетка может указывать на то, что ADC или композиция в наборе используется для диагностики или лечения состояния, такого как рак, описанный в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, набор содержит ADC или композицию, содержащую ADC. В некоторых вариантах осуществления, набор дополнительно содержит один или несколько дополнительных компонентов, включая, но не ограничиваясь ими: инструкции по применению; другие реагенты, например терапевтический агент (например, агент стандартного лечения); приспособления, контейнеры или другие материалы для

подготовки ADC для введения; фармацевтически приемлемые носители; и устройства, контейнеры или другие материалы для введения ADC субъекту. Инструкции по применению могут включать руководство по терапевтическому применению, включая предлагаемые дозировки и/или способы введения, например, для пациента, имеющего рак или подозреваемого в его наличии. В некоторых вариантах осуществления, набор содержит ADC и инструкции по применению ADC для лечения, профилактики и/или диагностики рака.

КОМБИНИРОВАННЫЕ ТЕРАПИИ

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание представляет способы лечения, при которых описанные в настоящем документе конъюгаты антитело-лекарственное средство вводят в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Примеры партнеров по комбинации описаны в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор PD-1. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PD-1 выбран из PDR001 (Novartis), Ниволумаба (Bristol-Myers Squibb), Пембролизумаба (Merck & Co), Пидилизумаба (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042 (Tesarо), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB-108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte) или AMP-224 (Amplimmune). В некоторых вариантах осуществления, ингибитором PD-1 является PDR001. PDR001 также известен как спартализумаб.

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор LAG-3. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор LAG-3 выбран из LAG525 (Novartis), BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb) или TSR-033 (Tesarо).

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор TIM-3. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором TIM-3 является MBG453 (Novartis), TSR-022 (Tesarо), LY-3321367 (Eli Lilly), Sym23 (Symphogen), BGB-A425 (Beigene), INCAGN-2390 (Agenus), BMS-986258 (BMS), RO-7121661 (Roche) или LY-3415244 (Eli Lilly).

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор PDL1. В одном варианте осуществления, ингибитор PDL1 выбран из FAZ053 (Novartis), атезолизумаба (Genentech), дурвалумаба (Astra Zeneca) или авелумаба (Pfizer).

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит агонист GITR. В некоторых вариантах осуществления, агонист GITR выбран из GWN323 (NVS), BMS-986156, MK-4166 или MK-1248 (Merck), TRX518 (Leap Therapeutics), INCAGN1876 (Incyte/Agenus), AMG 228 (Amgen) или INBRX-110 (Inhibrx).

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор IAP. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор IAP содержит LCL161 или соединение, описанное в публикации международной заявки

WO 2008/016893.

В одном из вариантов осуществления, комбинация содержит ингибитор mTOR, *например*, RAD001 (также известный как эверолимус).

В одном из вариантов осуществления, комбинация содержит ингибитор HDAC, *например*, LBH589. LBH589 также известен как панобиностат.

В одном из вариантов осуществления, комбинация содержит ингибитор IL-17, *например*, CJM112.

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит антагонист рецептора эстрогена (ER). В некоторых вариантах осуществления, антагонист рецептора эстрогена используется в комбинации с ингибитором PD-1, ингибитором CDK4/6 или обоими. В некоторых вариантах осуществления, комбинацию используют для лечения ER-положительного (ER+) рака или рака груди (*например*, ER+ рака груди).

В некоторых вариантах осуществления, антагонистом рецептора эстрогена является селективный модулятор эстрогенных рецепторов (SERD). SERD являются антагонистами рецептора эстрогена, которые связываются с рецептором и приводят, *например*, к деградации или подавлению рецептора (Boer K. *et al.*, (2017) *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 9(7): 465-479). ER представляет собой активируемый гормонами фактор транскрипции, важный для, *например*, роста, развития и физиологии репродуктивной системы человека. ER активируется, *например*, гормоном эстрогеном (17β эстрадиол). Экспрессия ER и передача сигналов вовлечены в рак (*например*, рак груди), *например*, ER положительный (ER+) рак груди. В некоторых вариантах осуществления, SERD выбран из LSZ102, фулвестранта, бриланэстранта или элацестранта.

В некоторых вариантах осуществления, SERD содержит соединение, описанное в публикации международной заявки WO 2014/130310, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, SERD содержит LSZ102. LSZ102 имеет химическое название: (E)-3-(4-((2-(2-(1,1-дифторэтил)-4-фторфенил)-6-гидроксibenzo[b]тиофен-3-ил)окси)фенил)акриловая кислота. В некоторых вариантах осуществления, SERD содержит фулвестрант (регистрационный номер CAS: 129453-61-8) или соединение, описанное в публикации международной заявки WO 2001/051056, которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления, SERD содержит элацестрант (регистрационный номер CAS: 722533-56-4) или соединение, описанное в патенте США № 7,612,114, который полностью включен посредством ссылки. Элацестрант также известен как RAD1901, ER-306323 или (6R)-6-{2-[этил({4-[2-(этиламино)этил]фенил}метил)амино]-4-метоксифенил}-5,6,7,8-тетрагидронафталин-2-ол. Элацестрант представляет собой перорально биодоступный, нестероидный, объединенный селективный модулятор эстрогенных рецепторов (SERM) и SERD. Элацестрант также описан в, *например*, Garner F *et al.*, (2015) *Anticancer Drugs* 26(9):948-56. В некоторых вариантах осуществления, SERD является бриланэстрант

(регистрационный номер CAS: 1365888-06-7) или соединение, описанное в публикации международной заявки WO 2015/136017, которая полностью включена посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, SERD выбран из RU 58668, GW7604, AZD9496, базедоксифена, пипендоксифена, арзоксифена, OP-1074 или аколбифена, *например*, как описано у McDonnell *et al.* (2015) *Journal of Medicinal Chemistry* 58(12) 4883-4887.

Другие типовые антагонисты рецепторов эстрогена описаны, *например*, в WO 2011/156518, WO 2011/159769, WO 2012/037410, WO 2012/037411 и US 2012/0071535, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор циклин-зависимых киназ 4 или 6 (CDK4/6). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CDK4/6 используется в комбинации с ингибитором PD-1, антагонистом рецептора эстрогена (ER) или обоими. В некоторых вариантах осуществления, комбинацию используют для лечения ER положительного (ER+) рака или рака груди (*например*, ER+ рака груди). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CDK4/6 выбран из рибоциклиба, абемациклиба (Eli Lilly) или палбоциклиба.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CDK4/6 содержит рибоциклиб (регистрационный номер CAS: 1211441-98-3) или соединение, описанное в патентах США №№ 8,415,355 и 8,685,980, которые полностью включены посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CDK4/6 содержит соединение, описанное в публикации международной заявки № WO 2010/020675 и патентах США №№ 8,415,355 и 8,685,980, которые полностью включены посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CDK4/6 содержит рибоциклиб (регистрационный номер CAS: 1211441-98-3). Рибоциклиб также известен как LEE011, KISQALI® или 7-циклопентил-N,N-диметил-2-((5-(пиперазин-1-ил)пиридин-2-ил)амино)-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CDK4/6 содержит абемациклиб (регистрационный номер CAS: 1231929-97-7). Абемациклиб также известен как LY835219 или N-[5-[(4-этил-1-пиперазинил)метил]-2-пиридинил]-5-фтор-4-[4-фтор-2-метил-1-(1-метилэтил)-1H-бензимидазол-6-ил]-2-пиримидинамин. Абемациклиб является ингибитором CDK, селективным в отношении CDK4 и CDK6, и описан, *например*, в Torres-Guzman R *et al.* (2017) *Oncotarget* 10.18632/oncotarget.17778.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CDK4/6 содержит палбоциклиб (регистрационный номер CAS: 571190-30-2). Палбоциклиб также известен как PD-0332991, IBRANCE® или 6-ацетил-8-циклопентил-5-метил-2-{[5-(1-пиперазинил)-2-пиридинил]амино}пиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он. Палбоциклиб ингибирует CDK4 с IC50 11 нМ и ингибирует CDK6 с IC50 16 нМ и описан, *например*, в Finn *et al.* (2009) *Breast Cancer Research* 11(5):R77.

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе

комбинация содержит ингибитор хемокинового (мотив C-X-C) рецептора 2 (CXCR2). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CXCR2 выбран из 6-хлор-3-((3,4-диоксо-2-(пентан-3-иламино)циклобут-1-ен-1-ил)амино)-2-гидрокси-N-метокси-N-метилбензолсульфонамида, данириксина, репариксина или навариксина.

В некоторых вариантах осуществления, агент, связывающий CSF-1/1R, выбран из ингибитора макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), *например*, моноклонального антитела или Fab к M-CSF (*например*, MCS110), ингибитора CSF-1R тирозинкиназы (*например*, 4-((2-(((1R,2R)-2-гидроксициклогексил)амино)бензо[d]тиазол-6-ил)окси)-N-метилпиколинамид или BLZ945), ингибитора рецепторной тирозинкиназы (RTK) (*например*, пексидартиниб) или антитела, таргетирующего CSF-1R (*например*, эмактузумаба или FPA008). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CSF-1/1R является BLZ945. В некоторых вариантах осуществления, связывающим агентом CSF-1/1R является MCS110. В других вариантах осуществления, связывающим агентом CSF-1/1R является пексидартиниб.

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор с-MET. С-MET, рецепторная тирозинкиназа, сверхэкспрессированная или мутированная во многих типах опухолевых клеток, играет ключевую роль в пролиферации, выживании, инвазии, метастазировании опухолевых клеток и ангиогенезе опухоли. Ингибирование с-MET может вызывать гибель клеток в опухолевых клетках, сверхэкспрессирующих белок с-MET или экспрессирующих конститутивно активированный белок с-MET. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор с-MET выбран из капматиниба (INC280), JNJ-3887605, AMG 337, LY2801653, MSC2156119J, кризотиниба, тивантиниба или голватиниба.

В некоторых вариантах осуществления, комбинация, описанная в настоящем документе, содержит ингибитор трансформирующего фактора роста бета (также известного как TGF- β , TGF β , TGF β или TGF-бета, взаимозаменяемо используются в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор TGF- β выбран из фрезолимумаба или ХОМА 089.

В некоторых вариантах осуществления, комбинация, описанная в настоящем документе, содержит антагонист рецептора аденозина A2a (A2aR) (*например*, ингибитор пути A2aR, *например*, ингибитор аденозина, *например*, ингибитор A2aR или CD-73). В некоторых вариантах осуществления, антагонист A2aR используется в комбинации с ингибитором PD-1 и одним или несколькими (*например*, двумя, тремя, четырьмя, пятью или всеми) ингибиторами CXCR2, связывающим агентом CSF-1/1R, ингибитором LAG-3, агонистом GITR, ингибитором с-MET или ингибитором IDO. В некоторых вариантах осуществления, комбинацию используют для лечения рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака желудка или меланомы (*например*, рефрактерной меланомы). В некоторых вариантах осуществления, антагонист A2aR выбран из PBF509 (NIR178) (Palobiofarma/Novartis), CPI444/V81444 (Corvus/Genentech), AZD4635/HTL-1071 (AstraZeneca/Heptares), Випаденанта (Redox/Juno), GBV-2034 (Globavir), AB928 (Arcus

Biosciences), теофиллина, истрадефиллина (Kyowa Hakko Kogyo), Тозаденанта/SYN-115 (Acorda), KW-6356 (Kyowa Hakko Kogyo), ST-4206 (Leadiant Biosciences/SC или Preladenden Merck/Schering). Не желая быть связанными теорией, считается, что в некоторых вариантах осуществления, ингибирование A2aR приводит к усилению регуляции IL-1b.

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор индолеамин 2,3-диоксигеназы (IDO) и/или триптофан 2,3-диоксигеназы (TDO). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор IDO используется в комбинации с ингибитором PD-1 и одним или несколькими (*например*, двумя, тремя, четырьмя или всеми) ингибиторами TGF- β , антагонистом A2aR, CSF-1/1R связывающим агентом, ингибитором с-MET или агонистом GITR. В некоторых вариантах осуществления, комбинацию используют для лечения рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака желудка или меланомы (*например*, рефрактерной меланомы). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор IDO выбран из (4E)-4-[(3-хлор-4-фторанилино)-нитрозометилиден]-1,2,5-оксадиазол-3-амин (также известного как эпикадостат или INCB24360), индоксимода (NLG8189), (1-метил-D-триптофана), α -циклогексил-5H-имидазо[5,1-a]изоиндол-5-этанола (также известного как NLG919), индоксимода, BMS-986205 (ранее F001287).

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор галектина, *например*, галектина-1 или галектина-3. В некоторых вариантах осуществления, комбинация содержит ингибитор галектина-1 и ингибитор галектина-3. В некоторых вариантах осуществления, комбинация содержит биспецифический ингибитор (*например*, молекулу биспецифического антитела), таргетирующий как галектин-1, так и галектин-3. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор галектина используется в комбинации с одним или несколькими терапевтическими агентами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор галектина выбран из молекулы анти-галектин антитела, GR-MD-02 (Galectin Therapeutics), Галектина-3C (Mandal Med), Ангинекса или OTX-008 (OncoEthix, Merck).

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор MEK. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор MEK выбран из Траметиниба, селуметиниба, AS703026, BIX 02189, BIX 02188, CI-1040, PD0325901, PD98059, U0126, XL-518, G-38963 или G02443714. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором MEK является траметиниб.

В одном варианте осуществления, описанная в настоящем документе комбинация включает ингибитор интерлейкина-1 бета (IL-1 β). В некоторых вариантах осуществления, ингибитор IL-1 β выбран из канакинумаба, гевокизумаба, анакинры или рилонасепта.

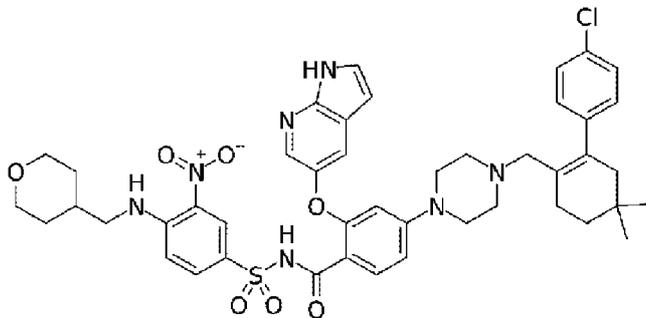
В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит комплекс IL-15/IL-15Ra. В некоторых вариантах осуществления, комплекс IL-15/IL-15Ra выбран из NIZ985 (Novartis), ATL-803 (Altor) или CYP0150 (Cytune).

В некоторых вариантах осуществления, комбинация, описанная в настоящем документе, содержит ингибитор гомолога мышинового двойного микробелка (MDM2). Человеческий гомолог MDM2 также известен как HDM2. В некоторых вариантах осуществления, описанный в настоящем документе ингибитор MDM2 также известен как ингибитор HDM2. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор MDM2 выбран из HDM201 или CGM097.

В одном из вариантов реализации, ингибитор MDM2 содержит (S)-1-(4-хлорфенил)-7-изопропокси-6-метокси-2-(4-(метил(((1 γ ,4S)-4-(4-метил-3-оксопиперазин-1-ил)циклогексил)метил)амино)фенил)-1,2-дигидроизохинолин-3(4H)-он (также известный как CGM097) или соединение, описанное в публикации РСТ № WO 2011/076786, для лечения нарушения, *например*, нарушения, описанного в настоящем документе). В одном варианте осуществления, описанный в настоящем документе терапевтический агент используется в комбинации с CGM097.

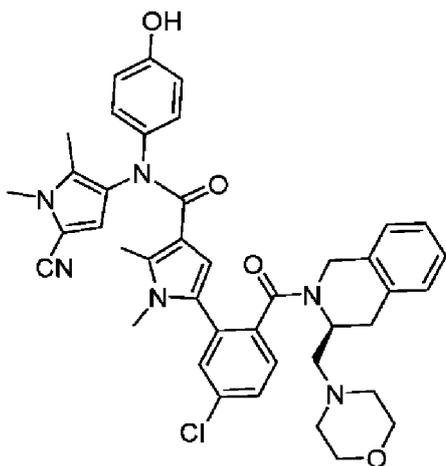
В некоторых вариантах осуществления, комбинация, описанная в настоящем документе, содержит гипометилирующий агент (HMA). В одном из некоторых вариантов осуществления, HMA выбран из децитабина или азацитидина.

В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор, действующий на белки про-выживания семейства Bcl2. В некоторых вариантах осуществления, описанная в настоящем документе комбинация содержит ингибитор Bcl-2. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором Bcl-2 является венетоклакс:



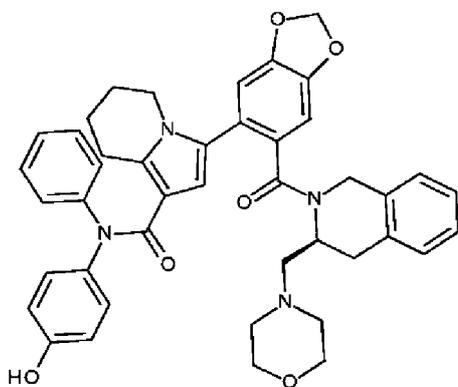
(венетоклакс).

В одном варианте осуществления, ингибитор Bcl-2 выбран из соединений, описанных в WO 2013/110890 и WO 2015/011400. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор Bcl-2 содержит навитоклакс (ABT-263), ABT-737, BP1002, SPC2996, APG-1252, мезилат обатоклакс (GX15-070MS), PNT2258, Zn-d5, BGB-11417 или облимерсен (G3139). В некоторых вариантах осуществления, ингибитором Bcl-2 является (S)-5-(5-хлор-2-(3-(морфолинометил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-2-карбонил)фенил)-N-(5-циано-1,2-диметил-1H-пиррол-3-ил)-N-(4-гидроксифенил)-1,2-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид), соединение A1:



(соединение A1). В некоторых вариантах

осуществления, ингибитором Vcl-2 является N-(4-гидроксифенил)-3-[6-[(3S)-3-(морфолинометил)-3,4-дигидро-1H-изохинолин-2-карбонил]-1,3-бензодиоксол-5-ил]-N-фенил-5,6,7,8-тетрагидроиндолизин-1-карбоксамид, соединение A2:



(соединение A2).

В одном варианте осуществления, конъюгаты антитело-лекарственное средство или комбинации, описанные в настоящем документе, подходят для лечения рака *in vivo*. Например, комбинация может использоваться для подавления роста раковых опухолей. Комбинация также может использоваться в комбинации с одним или несколькими из: стандартного лечения (*например*, при раке или инфекционных заболеваниях), вакцины (*например*, терапевтической вакцины против рака), клеточной терапии, лучевой терапии, хирургического вмешательства или любого другого терапевтического агента или средства для лечения нарушения, описанного в настоящем документе. Например, для достижения антигенспецифического повышения иммунитета, комбинацию можно вводить вместе с представляющим интерес антигеном. Описанная в настоящем документе комбинация может вводиться в любом порядке или одновременно.

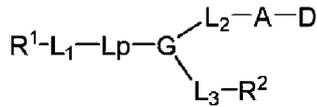
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В описании представлены следующие дополнительные варианты осуществления для групп линкер-лекарственное средство, конъюгатов антитело-лекарственное средство, линкерных групп и способов конъюгации.

Группа линкер-лекарственное средство

В некоторых вариантах осуществления, группой линкер-лекарственное средство по изобретению может быть соединение, имеющее структуру (A') или его фармацевтически

приемлемая соль:



формула (A')

где:

R¹ является реакционноспособной группой;

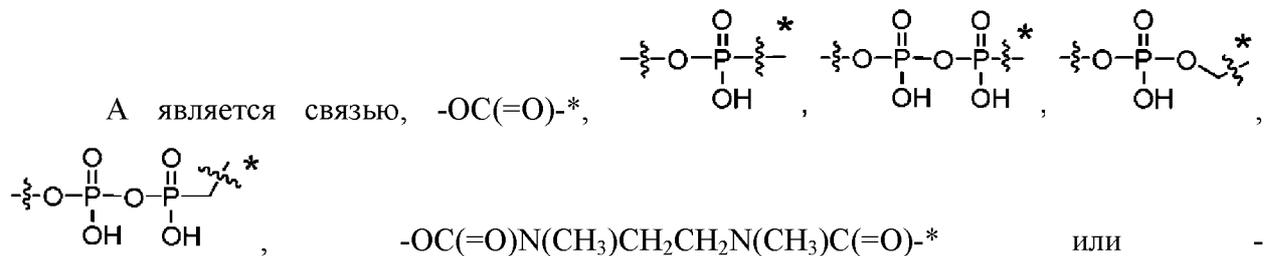
L₁ является мостиковым спейсером;

L_p является двухвалентным пептидным спейсером;

G-L₂-A является саморасщепляющимся спейсером;

R² является гидрофильной группой;

L₂ является связью, метиленом, неопентиленом или C₂-C₃алкениленом;



$\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})\text{-}^*$, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D;

L₃ является спейсерной группой; и

D является группой лекарственного средства, которая способна ингибировать активность белка MCl-1 при, например, выделении из конъюгатов антитело-лекарственное средство или иммуноконъюгатов, описанных в настоящем документе.

Некоторые аспекты и примеры группы линкер-лекарственное средство по изобретению представлены в следующем списке перечисленных вариантов осуществления. Следует понимать, что признаки, указанные в каждом варианте осуществления, могут быть объединены с другими указанными признаками для получения дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Вариант осуществления 1. Соединение формулы (A') или его фармацевтически приемлемая соль, где:

R¹ является реакционноспособной группой;

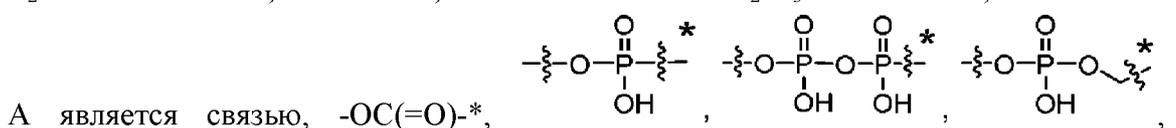
L₁ является мостиковым спейсером;

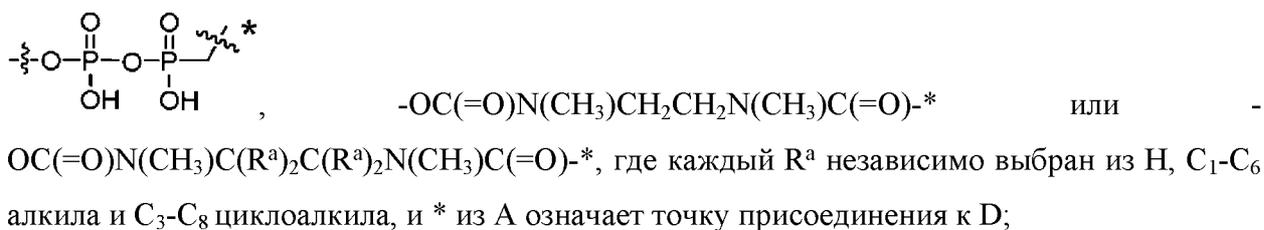
L_p является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех аминокислотных остатков;

G-L₂-A является саморасщепляющимся спейсером;

R² является гидрофильной группой;

L₂ является связью, метиленом, неопентиленом или C₂-C₃алкениленом;





L_3 является спейсерной группой; и

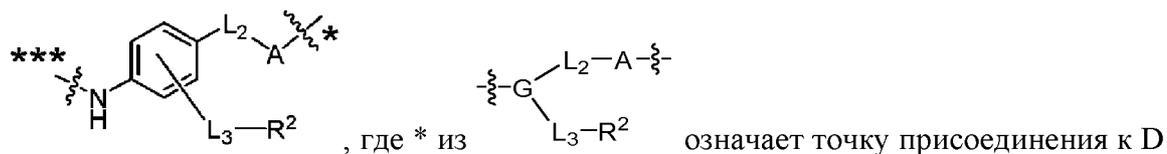
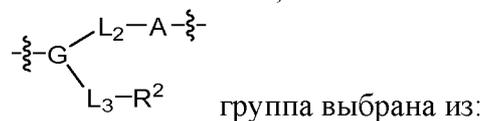
D является группой лекарственного средства, как определено в настоящем документе, например, ингибитором MCl-1 .

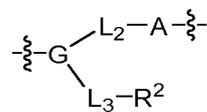
Вариант осуществления 2. Соединение формулы (A') или его фармацевтически приемлемая соль, где:

R^1 является реакционноспособной группой;

L_1 является мостиковым спейсером;

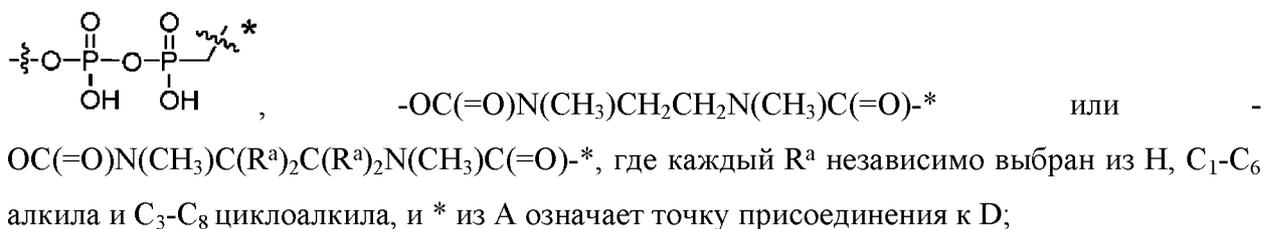
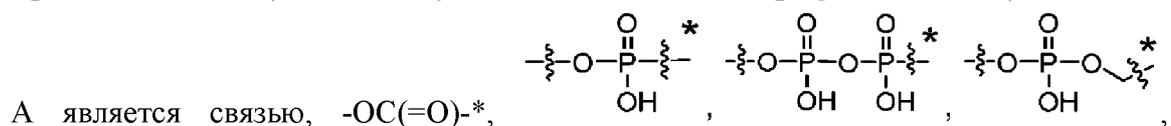
L_p является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех аминокислотных остатков;



(например, к N или O группы лекарственного средства), $\ast\ast\ast$ из  означает точку присоединения к L_p ;

R^2 является гидрофильной группой;

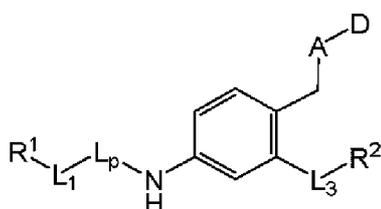
L_2 является связью, метиленом, неопентиленом или а $\text{C}_2\text{-C}_3$ алкениленом;



L_3 является спейсерной группой; и

D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе, например, ингибитора MCl-1 .

Вариант осуществления 3. Соединение формулы (A') или его фармацевтически приемлемая соль, имеющая структуру формулы (B'):



Формула (B')

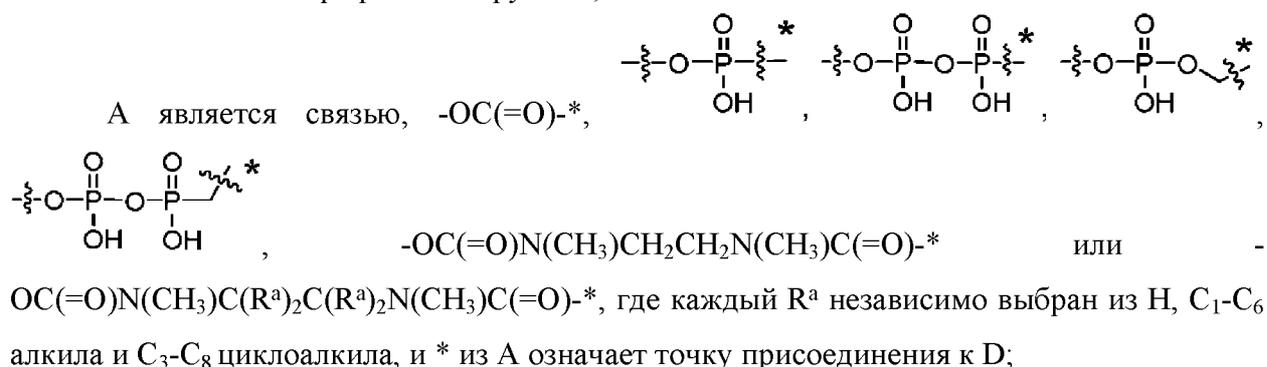
где:

R^1 является реакционноспособной группой;

L_1 является мостиковым спейсером;

L_p является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех аминокислотных остатков;

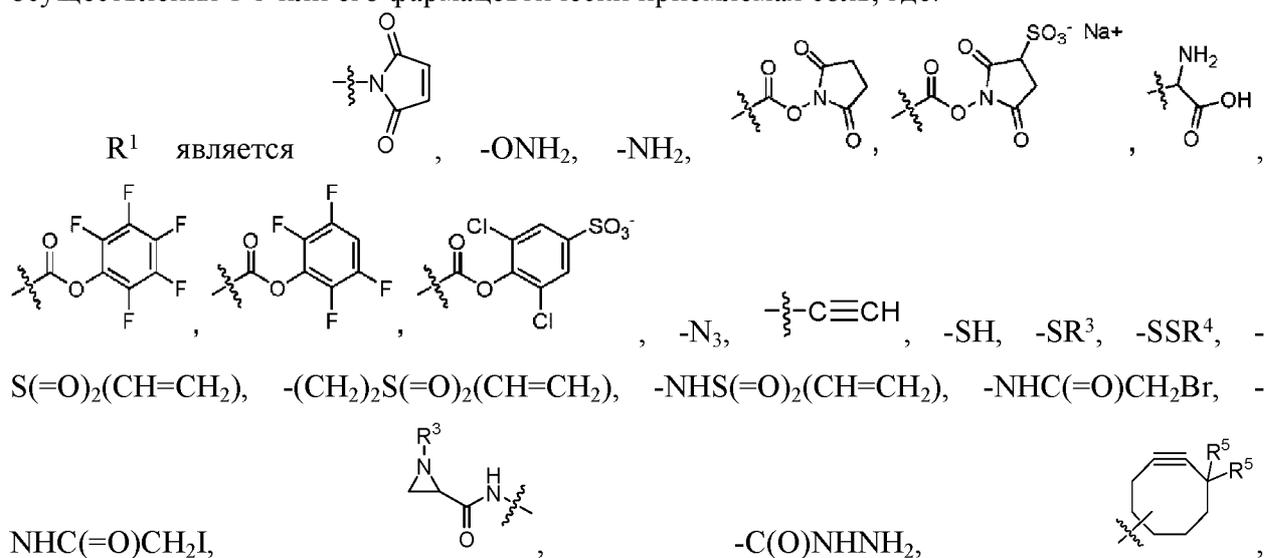
R^2 является гидрофильной группой;

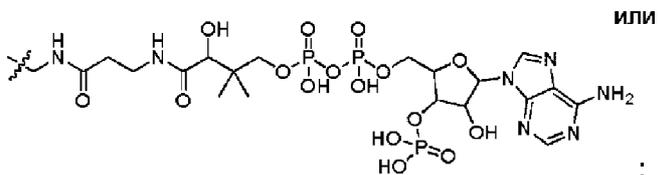
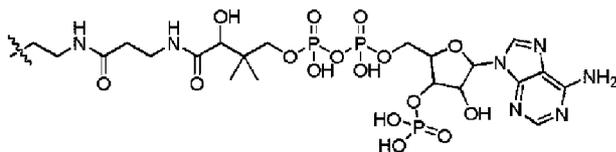
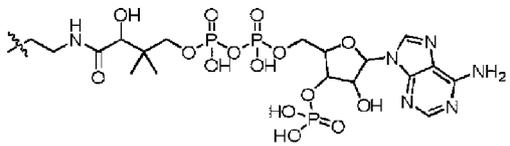
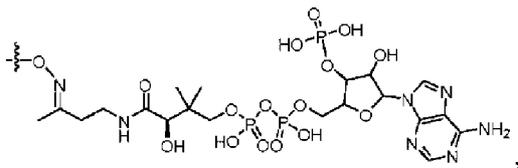
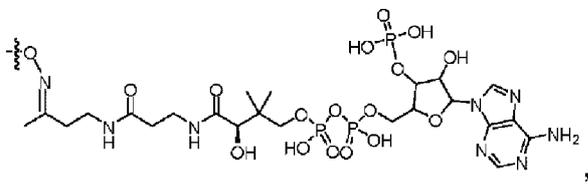
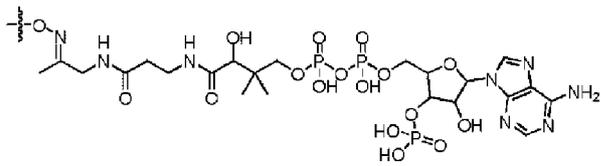
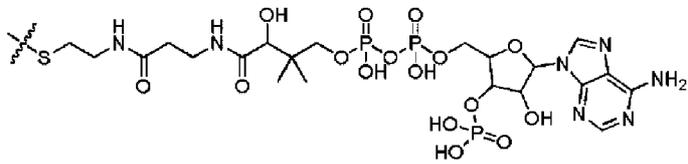
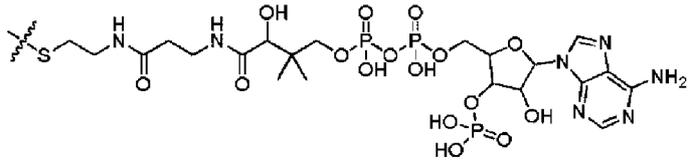
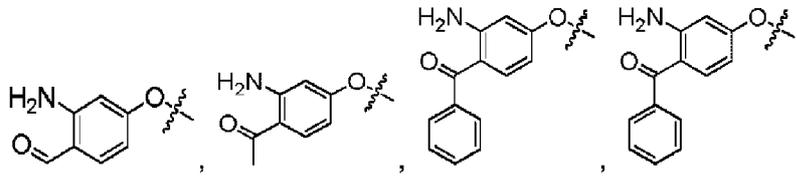
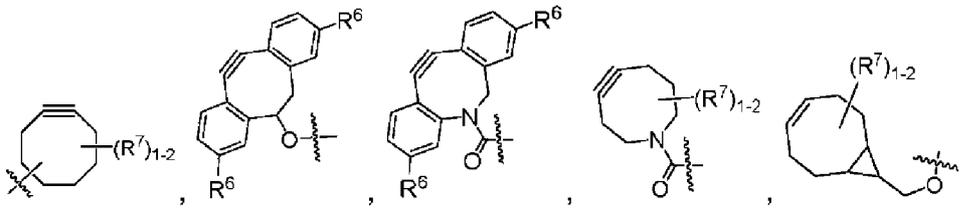


L_3 является спейсерной группой; и

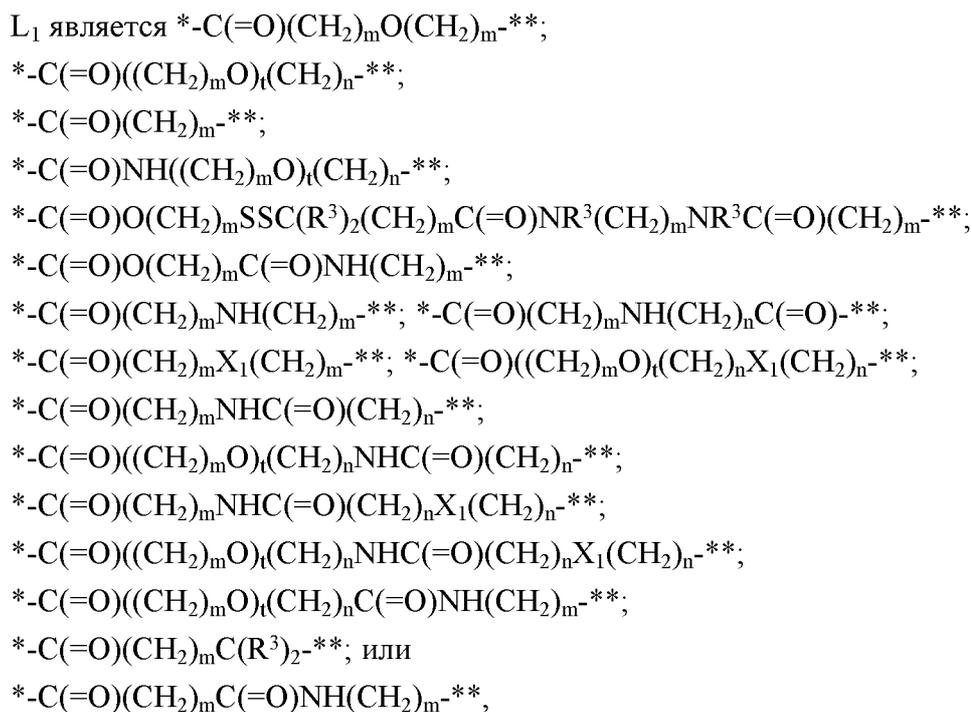
D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства.

Вариант осуществления 4. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, где:



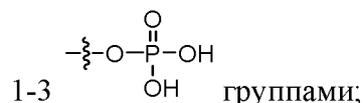


;



где * из L_1 означает точку присоединения к L_p , и ** из L_1 означает точку присоединения к R^1 ;

R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C_2 - C_6 алкила, замещенного



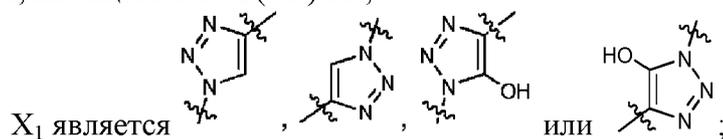
каждый R^3 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

R^4 является 2-пиридилом или 4-пиридилом;

каждый R^5 независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^6 независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$ и -OH;

каждый R^7 независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, фтора, бензилокси, замещенного $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, бензила, замещенного $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, C_{1-4} алкокси, замещенного $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ и C_{1-4} алкила, замещенного $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$;



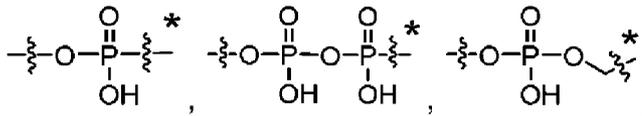
каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

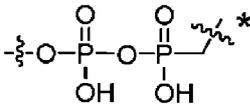
каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;

L_p является двухвалентным пептидным спейсером, содержащим аминокислотный остаток, выбранный из глицина, валина, цитруллина, лизина, изолейцина, фенилаланина, метионина, аспарагина, пролина, аланина, лейцина, триптофана и тирозина;

А является связью, $-\text{OC}(=\text{O})-$ *,





$-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ * или $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ *, где каждый R^a независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила, и * из А означает точку присоединения к D;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-\text{W}-\chi-\xi^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-$ ** , $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ** , $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ ** , $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NH}-$ ** , $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})-$ ** , $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ** , $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-$ ** , $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-$ ** , $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$ ** , $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ** , $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-$ ** , $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ** , $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$ ** , $-\text{NHC}(=\text{O})-$ ** , $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ ** , $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$ ** , $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-$ ** , $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-$ ** , $-\text{NHS}(\text{O})_2-$ ** , $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ** или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или C_3 - C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

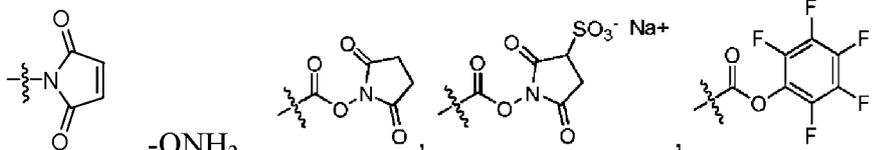
X является связью, триазилом или $***-\text{CH}_2$ -триазилил-*, где *** и X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R^2 ; и

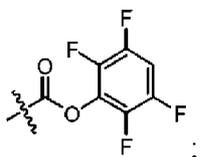
* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

и

D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с А через прямую связь от А к N или O группы лекарственного средства.

Вариант осуществления 5. Соединение формулы (А') или по любому из вариантов осуществления 1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, где:

R^1 является 



или

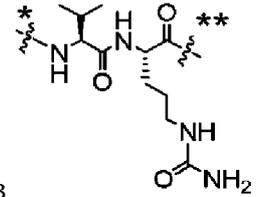
L_1 является $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_n-$ ** ; $^*-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$ ** ; $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$ ** ; или $^*-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_p , и ** из L_1 означает точку присоединения к R^1 ;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

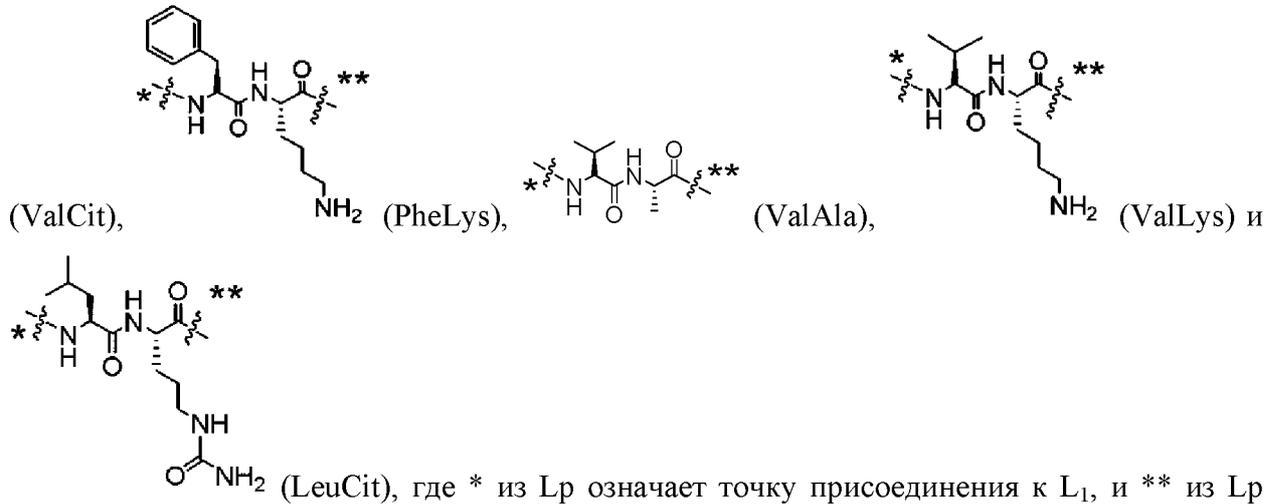
каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



Lp является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из



L₃ является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NH}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-^{**}$, $-\text{NHS}(\text{O})_2-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$ или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H, C₁-C₆алкила или C₃-C₈циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

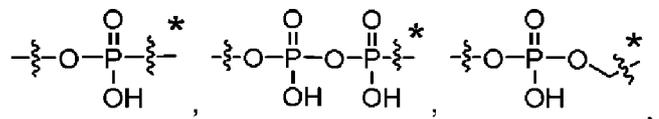
X является связью, триазолилом или $^{***}-\text{CH}_2$ -триазолил-*, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R²;

и

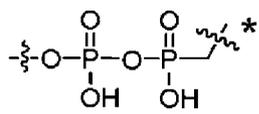
* из L₃ означает точку присоединения к R²;

R² является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C₂-C₆алкила, замещенного

1-3 $-\xi-\text{O}-\text{P}(\text{OH})_2-\text{OH}$ группами;



A является связью, $-\text{OC}(=\text{O})-^*$,



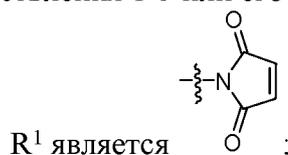
или

-

$\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\text{*}$, где каждый R^a независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D; и

D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства.

Вариант осуществления 6. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-5 или его фармацевтически приемлемая соль, где:

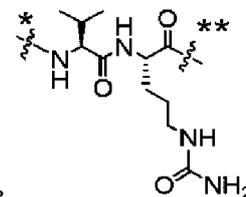


L_1 является $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_n-\text{**}$; $-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-\text{**}$; $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{**}$; или $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_p и ** из L_1 означает точку присоединения к R^1 ;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из L_p означает точку присоединения к L_1 и ** из L_p означает точку присоединения к $-\text{NH}-$ группе G;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi-\text{*}$,

где

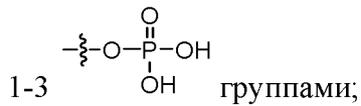
W является $-\text{CH}_2\text{O}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-\text{**}$, $-\text{NHS}(\text{O})_2-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$ или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или C_3 - C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазилилом или $-\text{**}-\text{CH}_2$ -триазилил-*, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

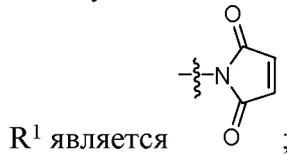
R² является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахаридов, полипептида или C₂-C₆алкила, замещенного



и

D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства.

Варианты осуществления 7. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-6 или его фармацевтически приемлемая соль, где:

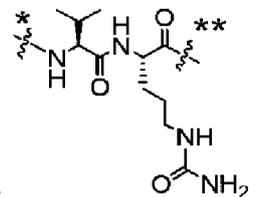


L₁ является $\ast-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_n-\ast\ast$; $\ast-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-\ast\ast$; $\ast-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-\ast\ast$; или $\ast-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$, где * из L₁ означает точку присоединения к L_p, и ** из L₁ означает точку присоединения к R¹;

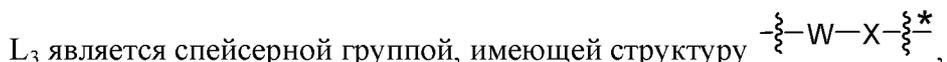
каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из L_p означает точку присоединения к L₁, и ** из L_p означает точку присоединения к -NH- группы G;



где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-\ast\ast$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-\ast\ast$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-\ast\ast$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-$

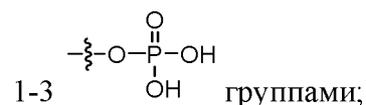
$R^2)C(=O)O-^{**}$, $-C(=O)N(X-R^2)-^{**}$, $-C(=O)NR^b-^{**}$, $-C(=O)NH-^{**}$, $-CH_2NR^bC(=O)-^{**}$, $-CH_2NR^bC(=O)NH-^{**}$, $-CH_2NR^bC(=O)NR^b-^{**}$, $-NHC(=O)-^{**}$, $-NHC(=O)O-^{**}$ или $-NHC(=O)NH-^{**}$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1-C_6 алкила или C_3-C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазолилом или $^{***}-CH_2$ -триазолил-*, где *** из X означает точку присоединения к W и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахаридов, полипептида или C_2-C_6 алкила, замещенного

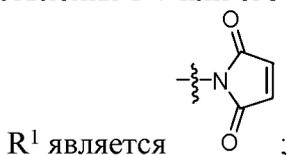


A является связью или $-OC(=O)^*$, где * означает точку присоединения к D;

и

D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства.

Вариант осуществления 8. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-7 или его фармацевтически приемлемая соль, где:

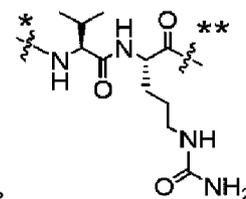


L_1 является $^*-C(=O)(CH_2)_mO(CH_2)_m-^{**}$; $^*-C(=O)((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n-^{**}$; $^*-C(=O)(CH_2)_m-^{**}$; или $^*-C(=O)NH((CH_2)_mO)_t(CH_2)_n-$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_p , и ** из L_1 означает точку присоединения к R^1 ;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из L_p означает точку присоединения к L_1 , и ** из L_p означает точку присоединения к $-NH-$ группы G;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi^*$,

где

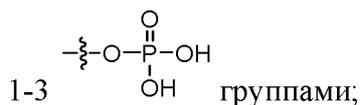
W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$ или $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или C_3 - C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является $^{***}-\text{CH}_2$ -триазилил-*, где *** из X означает точку присоединения к W и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C_2 - C_6 алкила, замещенного



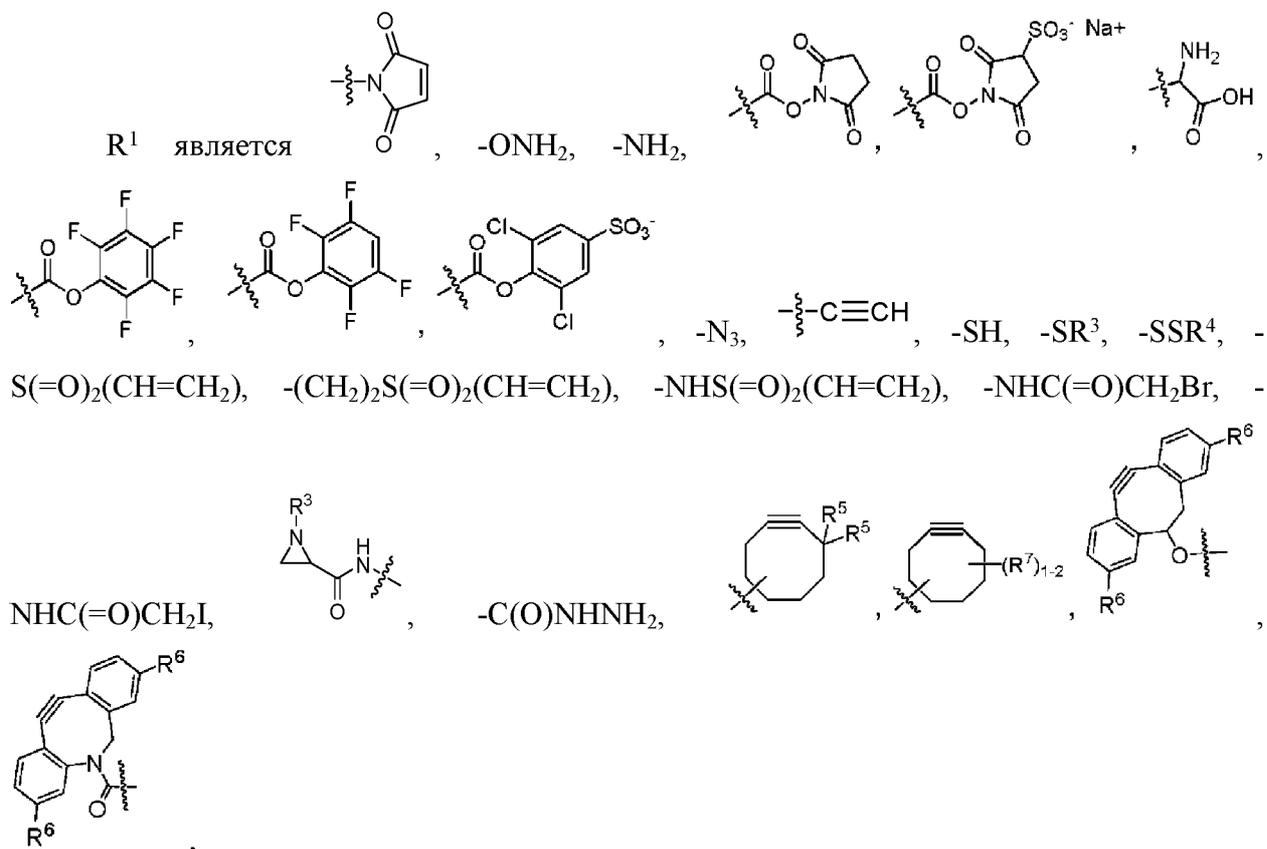
A является связью или $-\text{OC}(=\text{O})^*$, где * означает точку присоединения к D;

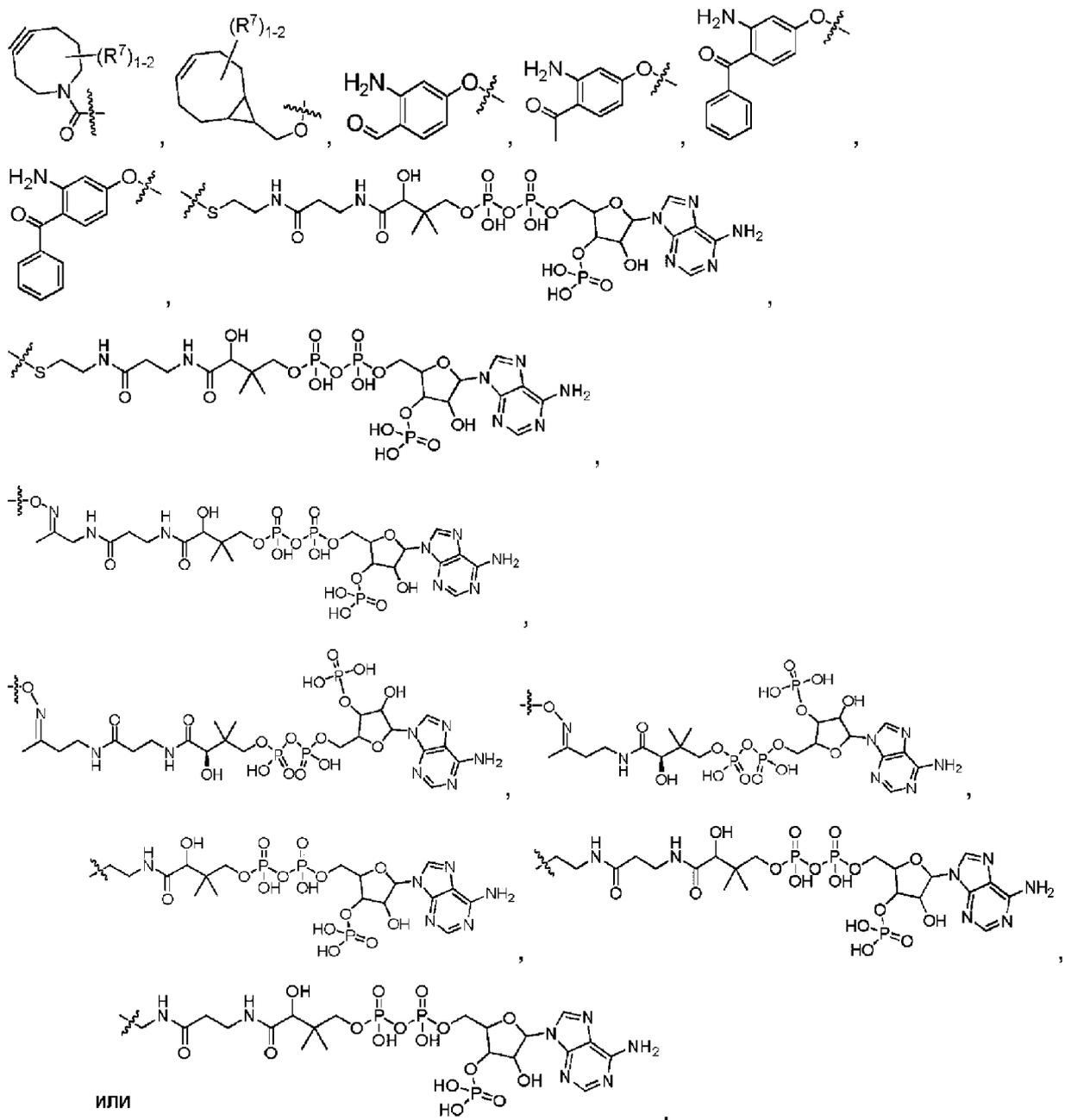
и

D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства.

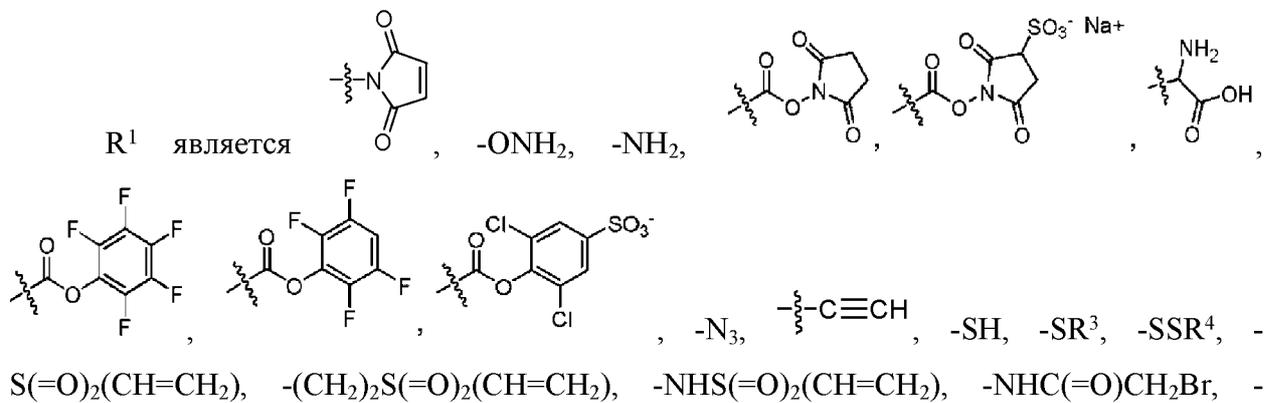
Вариант осуществления 9. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-8 или его фармацевтически приемлемая соль, где R^1 является реакционноспособной группой, выбранной из таблицы 2.

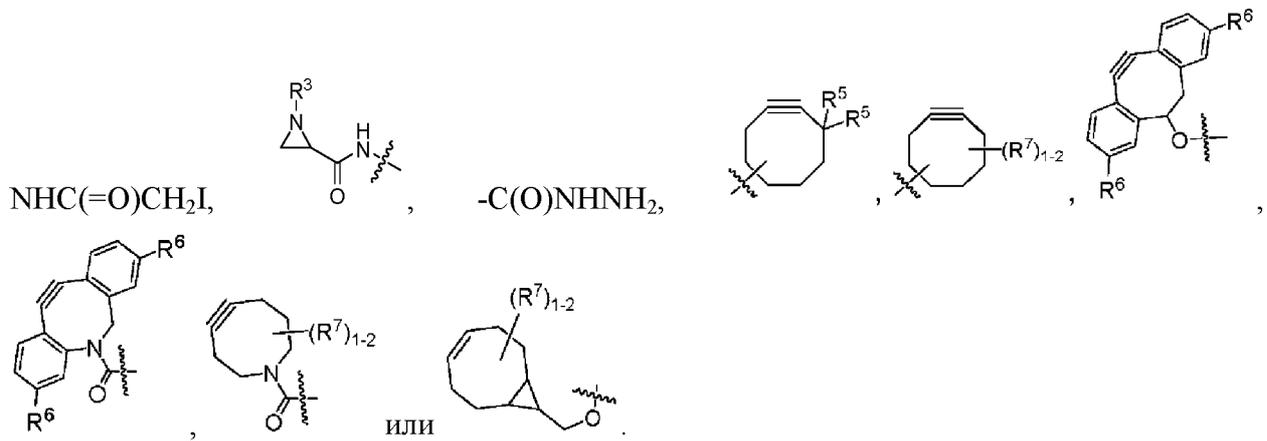
Вариант осуществления 10. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, где:



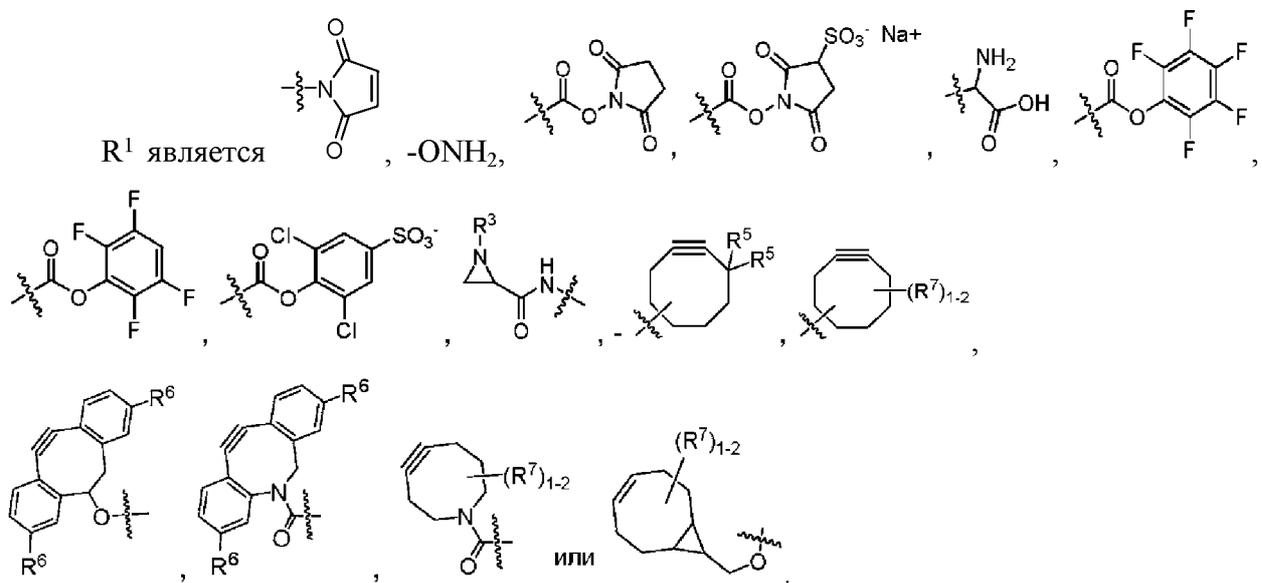


Вариант осуществления 11. Соединение формулы (А') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, где:

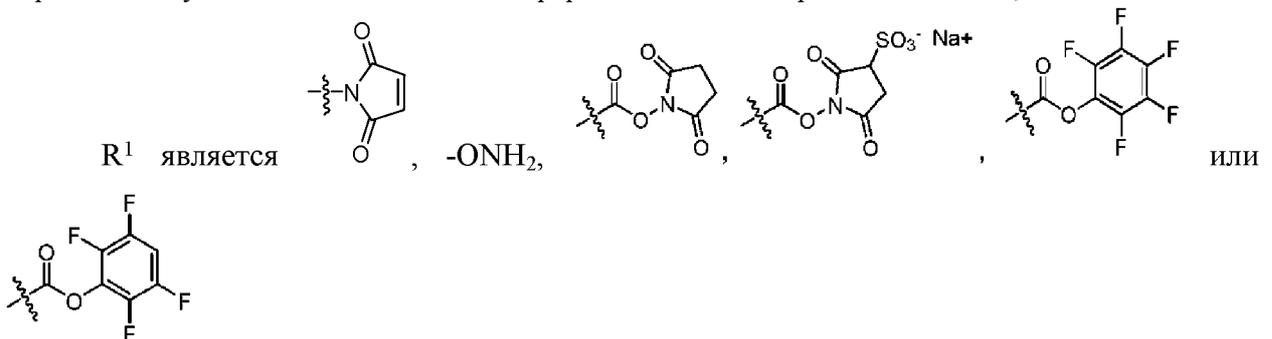




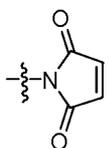
Вариант осуществления 12. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, где:



Вариант осуществления 13. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, где:

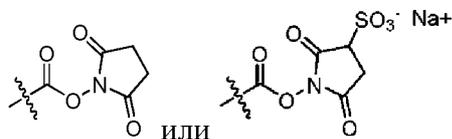


Вариант осуществления 14. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, где R^1 является

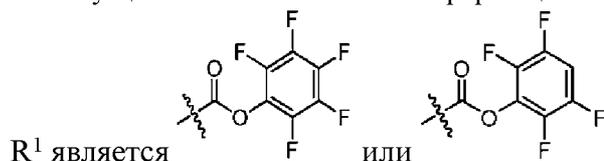


Вариант осуществления 15. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, где R¹ является -ONH₂.

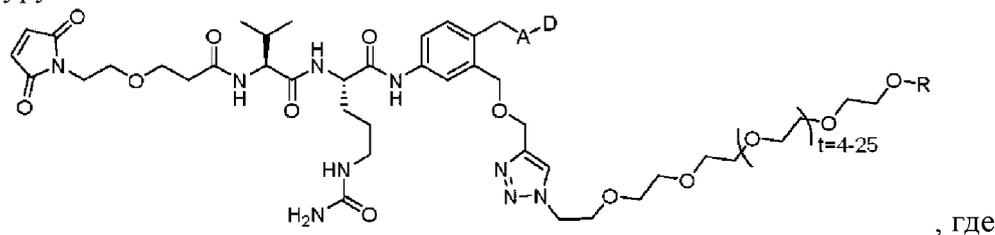
Вариант осуществления 16. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, где: R¹ является



Вариант осуществления 17. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, где:

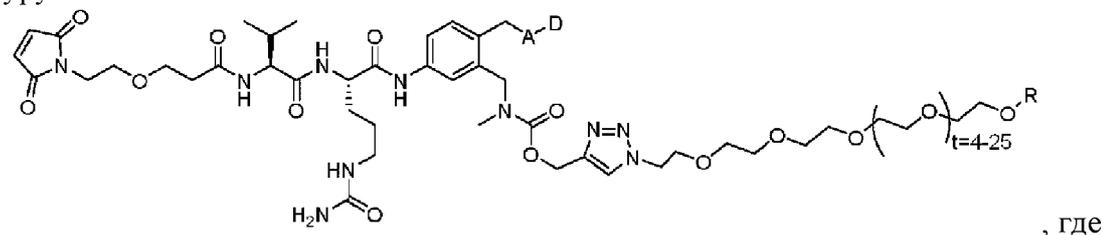


Вариант осуществления 18. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



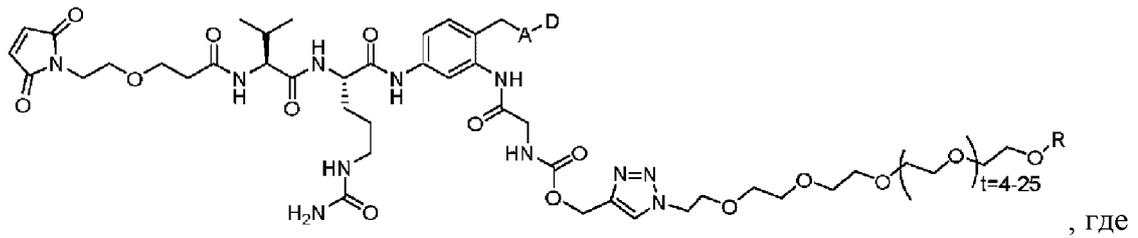
R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

Вариант осуществления 19. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



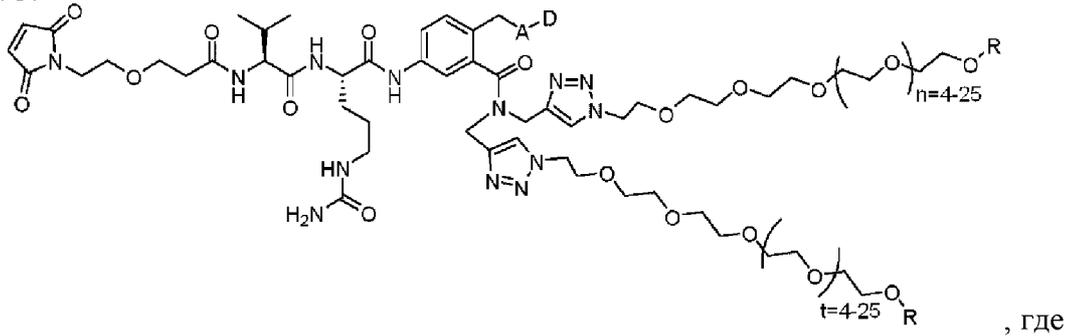
R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

Вариант осуществления 20. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



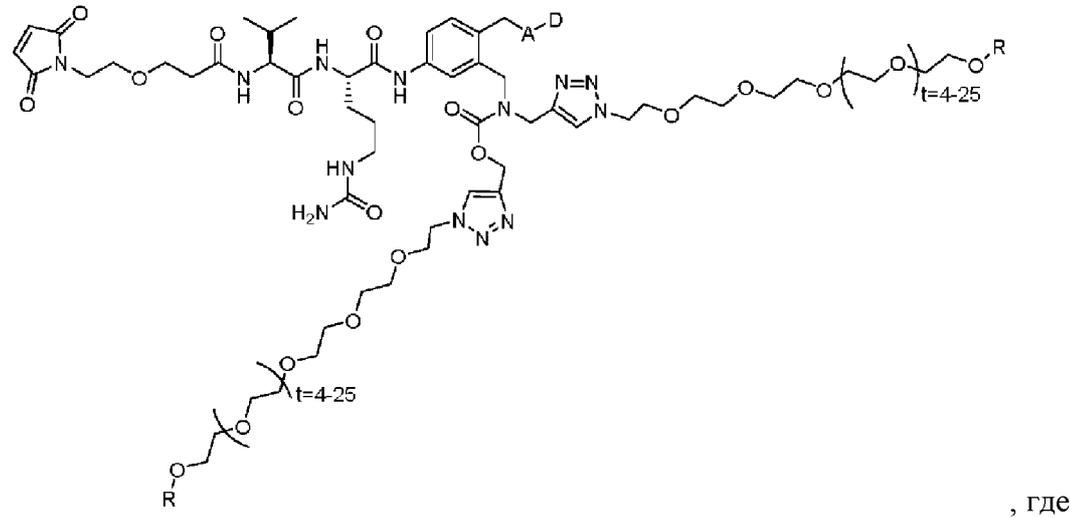
R является H, $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$.

Вариант осуществления 21. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



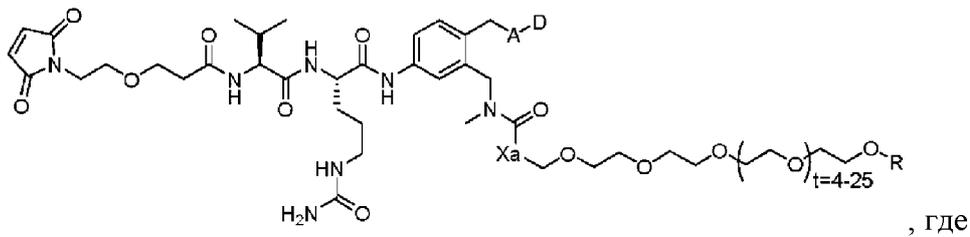
каждый R независимо выбран из H, $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$.

Вариант осуществления 22. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



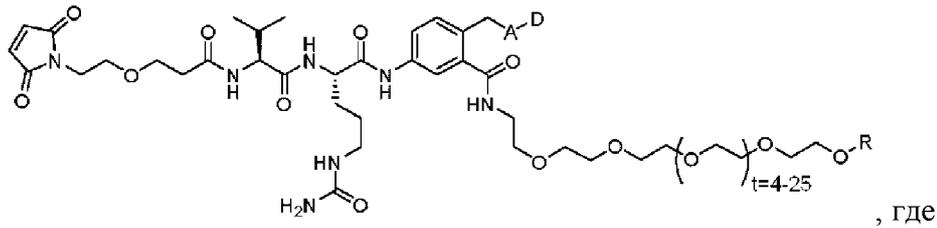
каждый R независимо выбран из H, $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$.

Вариант осуществления 23. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



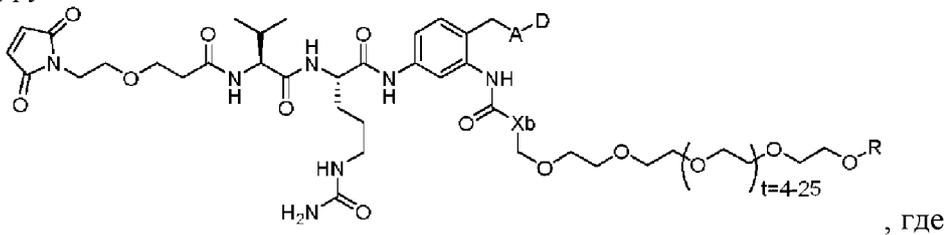
Ха является $-\text{CH}_2-$, $-\text{OCH}_2-$, $-\text{NHCH}_2-$ или $-\text{NRCH}_2-$ и каждый R независимо равен H, $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$.

Вариант осуществления 24. Соединение формулы (А') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



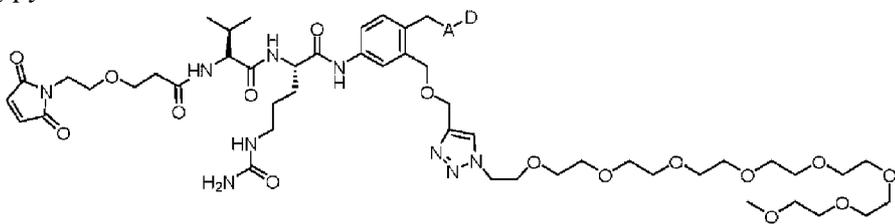
R является H, $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$.

Вариант осуществления 25. Соединение формулы (А') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:

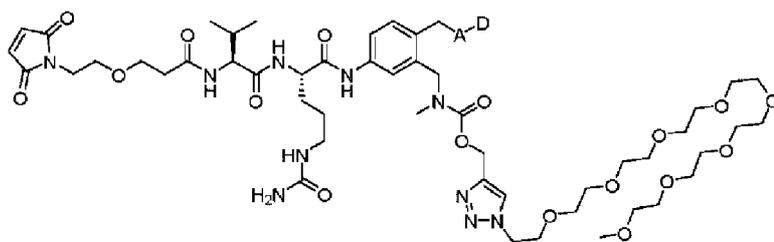


Xb является $-\text{CH}_2-$, $-\text{OCH}_2-$, $-\text{NHCH}_2-$ или $-\text{NRCH}_2-$ и каждый R независимо является H, $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$.

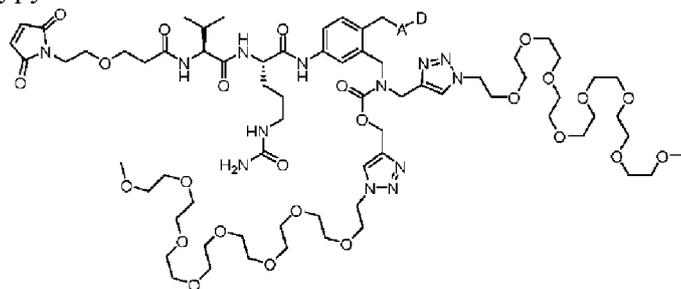
Вариант осуществления 26. Соединение формулы (А') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



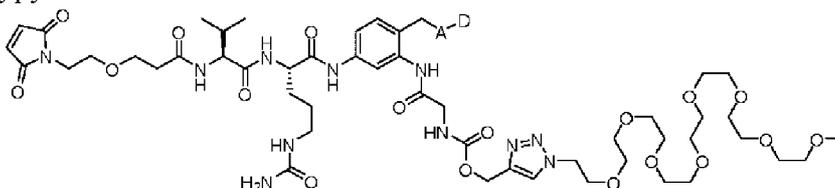
Вариант осуществления 27. Соединение формулы (А') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



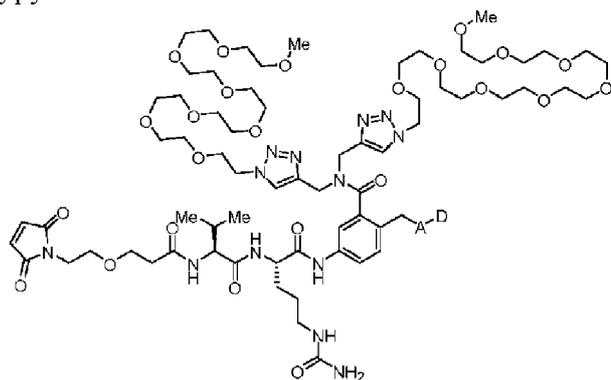
Вариант осуществления 28. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



Вариант осуществления 29. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:

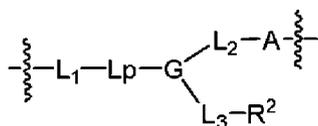


Вариант осуществления 30. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру:



Вариант осуществления 31. Соединение формулы (A') или по любому из вариантов осуществления 1-9 или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру соединения в таблице А.

Вариант осуществления 32. Линкер группы линкер-лекарственное средство формулы (A') имеющий структуру формулы (C'),



формула (С')

где

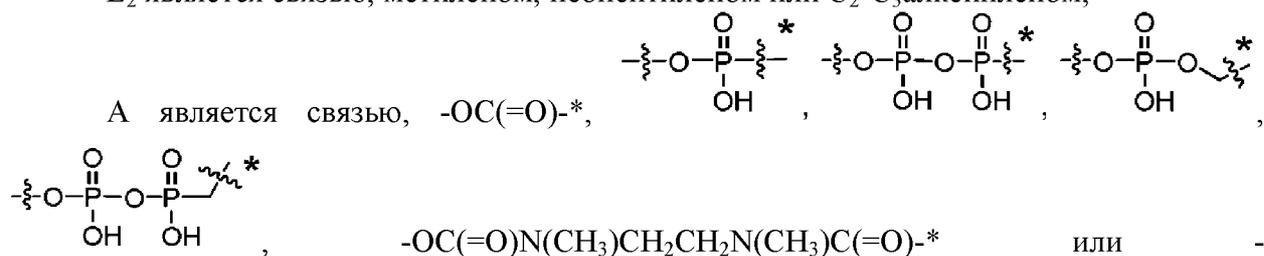
L₁ является мостиковым спейсером;

L_p является двухвалентным пептидным спейсером;

G-L₂-A является саморасщепляющимся спейсером;

R² является гидрофильной группой;

L₂ является связью, метиленом, неопентиленом или C₂-C₃алкениленом;



$\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\text{*}$, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D,

и

L₃ является спейсерной группой.

Вариант осуществления 33. Линкер по варианту осуществления 32, где:

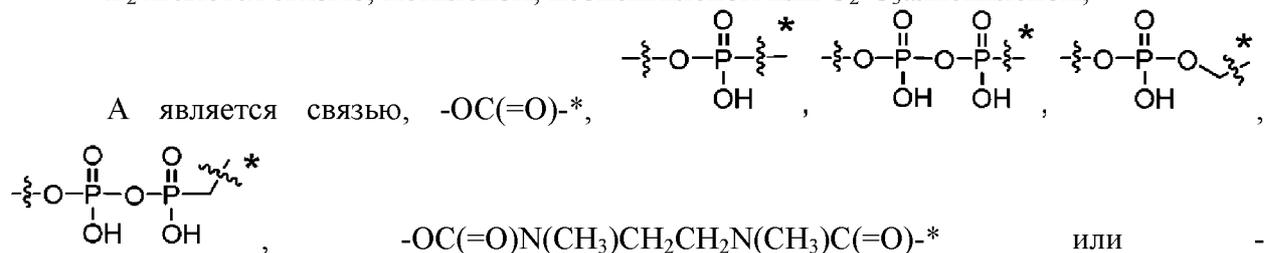
L₁ является мостиковым спейсером;

L_p является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех аминокислотных остатков;

G-L₂-A является саморасщепляющимся спейсером;

R² является гидрофильной группой;

L₂ является связью, метиленом, неопентиленом или C₂-C₃алкениленом;



$\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-\text{*}$, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D,

и

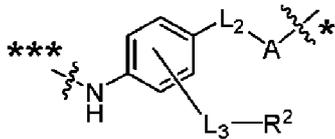
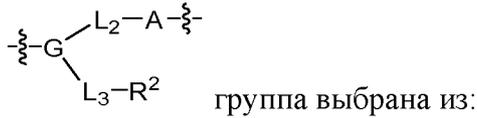
L₃ является спейсерной группой.

Вариант осуществления 34. Линкер по варианту осуществления 32 или 33, где:

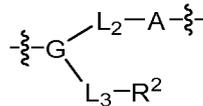
L₁ является мостиковым спейсером;

L_p является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех

аминокислотных остатков;

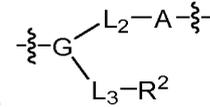


, где * из



означает точку присоединения к D

(например, к N или O группы лекарственного средства), *** из

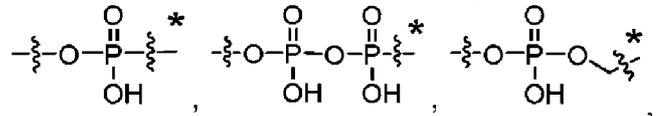


означает

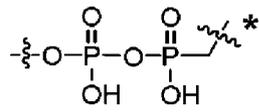
точку присоединения к Lp;

R² является гидрофильной группой;

L₂ является связью, метиленом, неопентиленом или C₂-C₃алкениленом;



A является связью, -OC(=O)-*,



-OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-*

или

OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D,

и

L₃ является спейсерной группой.

Вариант осуществления 35. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-34,

где:

L₁ является *-C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-**;

*-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-**;

*-C(=O)(CH₂)_m-**;

*-C(=O)O(CH₂)_mSSC(R³)₂(CH₂)_mC(=O)NR³(CH₂)_mNR³C(=O)(CH₂)_m-**;

*-C(=O)O(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m-**;

*-C(=O)(CH₂)_mNH(CH₂)_nC(=O)-**;

*-C(=O)(CH₂)_mNH(CH₂)_nC(=O)-**;

*-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-**;

*-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-**;

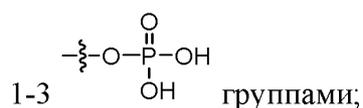
*-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-**;

*-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_m-**;

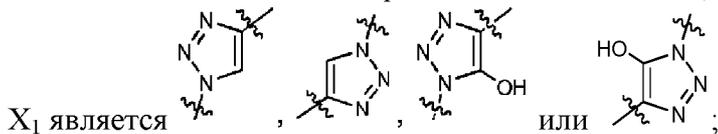
*-C(=O)(CH₂)_mC(R³)₂-** или *-C(=O)(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m-**;

где * из L₁ означает точку присоединения к Lp;

R² является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C₂-C₆алкила, замещенного



каждый R^3 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

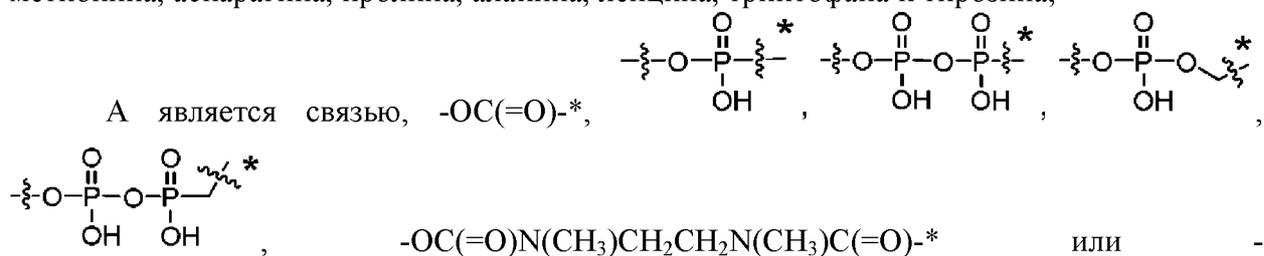


каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;

L_p является двухвалентным пептидным спейсером, содержащим аминокислотный остаток, выбранный из глицина, валина, цитруллина, лизина, изолейцина, фенилаланина, метионина, аспарагина, пролина, аланина, лейцина, триптофана и тирозина;



L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi\text{-W-X-}\xi^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O-}^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O-}^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O-}^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NH-}^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{-}^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X-R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O-}^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X-R}^2)\text{-}^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X-R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{-}^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b\text{-}^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH-}^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{-}^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH-}^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b\text{-}^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{-}^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O-}^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH-}^{**}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH-}^{**}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH-}^{**}$, $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{-}^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{-}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O-}^{**}$ или $-\text{NH-}$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или C_3 - C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазилом или $^{***}\text{-CH}_2\text{-триазилил-}^*$, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 .

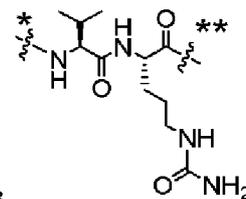
Вариант осуществления 36. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-35, где:

L_1 является $^*\text{-C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{-}^{**}$; $^*\text{-C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{-}^{**}$; $^*\text{-C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{-}^{**}$; или $^*\text{-C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{-}$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_p ;

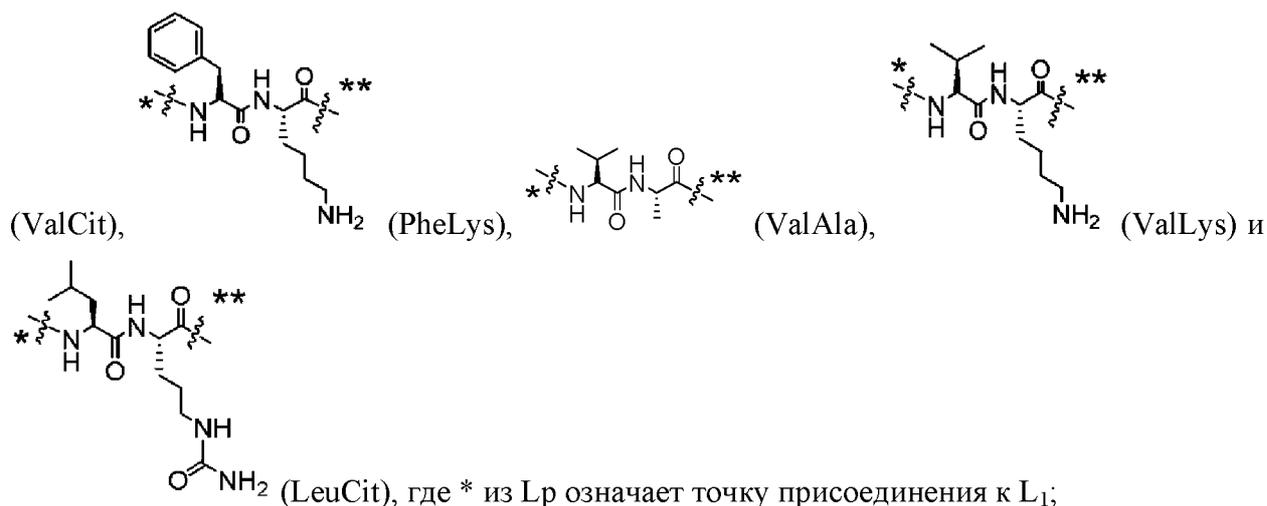
каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из



L₃ является спейсерной группой, имеющей структуру $\text{-}\overset{\text{*}}{\underset{\text{**}}{\text{X}}}\text{-W-\overset{\text{*}}{\underset{\text{**}}{\text{X}}}\text{-}$,

где

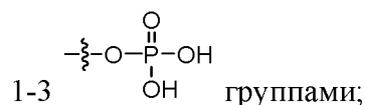
W является $\text{-CH}_2\text{O-}^{**}$, $\text{-CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C(=O)O-}^{**}$, $\text{-NHC(=O)CH}_2\text{NHC(=O)O-}^{**}$, $\text{-NHC(=O)CH}_2\text{NH-}^{**}$, $\text{-NHC(=O)CH}_2\text{NHC(=O)-}^{**}$, $\text{-CH}_2\text{N}(\text{X-R}^2)\text{C(=O)O-}^{**}$, $\text{-C(=O)N}(\text{X-R}^2)\text{-}^{**}$, $\text{-CH}_2\text{N}(\text{X-R}^2)\text{C(=O)-}^{**}$, $\text{-C(=O)NR}^b\text{-}^{**}$, -C(=O)NH-^{**} , $\text{-CH}_2\text{NR}^b\text{C(=O)-}^{**}$, $\text{-CH}_2\text{NR}^b\text{C(=O)NH-}^{**}$, $\text{-CH}_2\text{NR}^b\text{C(=O)NR}^b\text{-}^{**}$, -NHC(=O)-^{**} , -NHC(=O)O-^{**} , -NHC(=O)NH-^{**} , -OC(=O)NH-^{**} , $\text{-S(O)}_2\text{NH-}^{**}$, $\text{-NHS(O)}_2\text{-}^{**}$, -C(=O)- , -C(=O)O-^{**} или -NH- , где каждый R^b независимо выбран из H, C₁-C₆алкила или C₃-C₈циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазилилом или $\text{***-CH}_2\text{-триазилил-}^*$, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R²;

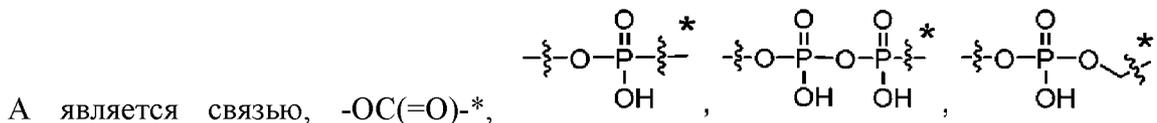
и

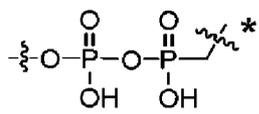
* из L₃ означает точку присоединения к R²;

R² является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C₂-C₆алкила, замещенного



и





или

-

$\text{OC(=O)N(CH}_3\text{)C(R}^a\text{)}_2\text{C(R}^a\text{)}_2\text{N(CH}_3\text{)C(=O)-}^*$, где каждый R^a независимо выбран из H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила и $\text{C}_3\text{-C}_8$ циклоалкила, и $*$ из A означает точку присоединения к D .

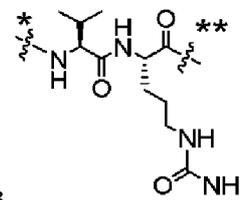
Вариант осуществления 37. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-36, где:

L_1 является $^*\text{-C(=O)(CH}_2\text{)}_m\text{O(CH}_2\text{)}_m\text{-}^{**}$; $^*\text{-C(=O)((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_t\text{(CH}_2\text{)}_n\text{-}^{**}$; $^*\text{-C(=O)(CH}_2\text{)}_m\text{-}^{**}$; или $^*\text{-C(=O)NH((CH}_2\text{)}_m\text{O)}_t\text{(CH}_2\text{)}_n\text{-}$, где $*$ из L_1 означает точку присоединения к L_p ;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где $*$ из L_p означает точку присоединения к L_1 , и $**$ из L_p означает точку присоединения к -NH- группы G ;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $\text{-}\xi\text{-W-X-}\xi\text{-}^*$,

где

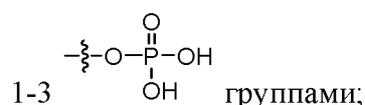
W является $\text{-CH}_2\text{O-}^{**}$, $\text{-CH}_2\text{N(R}^b\text{)C(=O)O-}^{**}$, $\text{-NHC(=O)CH}_2\text{NHC(=O)O-}^{**}$, $\text{-CH}_2\text{N(X-R}^2\text{)C(=O)O-}^{**}$, $\text{-C(=O)N(X-R}^2\text{)-}^{**}$, $\text{-CH}_2\text{N(X-R}^2\text{)C(=O)-}^{**}$, $\text{-C(=O)NR}^b\text{-}^{**}$, -C(=O)NH-^{**} , $\text{-CH}_2\text{NR}^b\text{C(=O)-}^{**}$, $\text{-CH}_2\text{NR}^b\text{C(=O)NH-}^{**}$, $\text{-CH}_2\text{NR}^b\text{C(=O)NR}^b\text{-}^{**}$, -NHC(=O)-^{**} , -NHC(=O)O-^{**} , -NHC(=O)NH-^{**} , -OC(=O)NH-^{**} , $\text{-S(O)}_2\text{NH-}^{**}$, $\text{-NHS(O)}_2\text{-}^{**}$, -C(=O)- , -C(=O)O-^{**} или -NH- , где каждый R^b независимо выбран из H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила или $\text{C}_3\text{-C}_8$ циклоалкила, и где $**$ из W означает точку присоединения к X ;

X является связью, триазолилом или $^{***}\text{-CH}_2\text{-триазолил-}^*$, где *** из X означает точку присоединения к W , и $*$ из X означает точку присоединения к R^2 ;

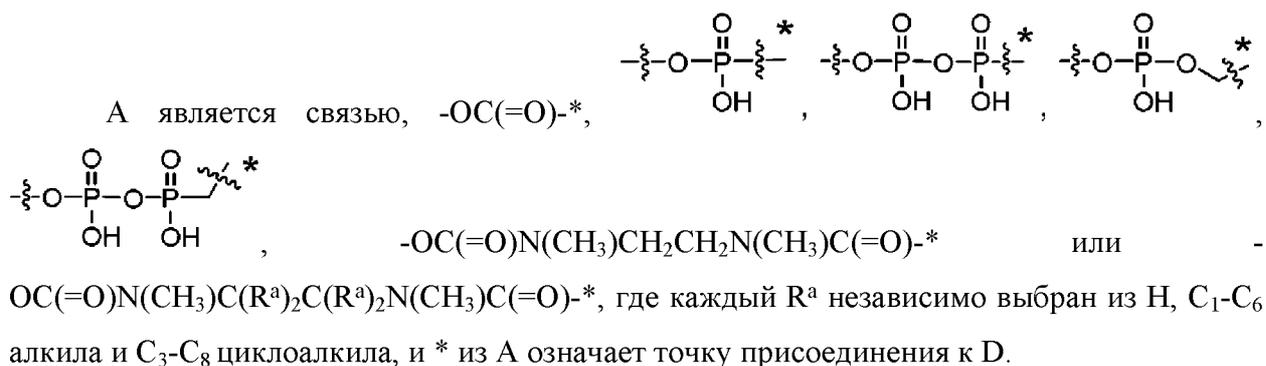
и

$*$ из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или $\text{C}_2\text{-C}_6$ алкила, замещенного

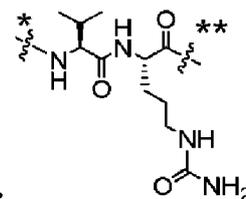


и



Вариант осуществления 38. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-37, где:

L_1 является $\text{*}-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_m-\text{**}$; $\text{*}-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-\text{**}$; $\text{*}-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{**}$; или $\text{*}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_p ; каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из L_p означает точку присоединения к L_1 ;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-\text{W}-\text{X}-\xi-\text{*}$,

где

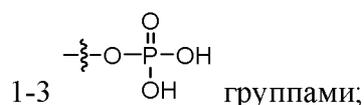
W является $-\text{CH}_2\text{O}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$ или $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, где каждый R^b независимо выбран из H , C_1-C_6 алкила или C_3-C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазолилом или $\text{***}-\text{CH}_2-\text{триазолил}-\text{*}$, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C_2-C_6 алкила, замещенного



и

A является связью или $-\text{OC}(=\text{O})-\text{*}$, где * означает точку присоединения к D.

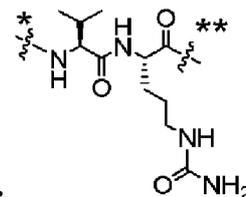
Вариант осуществления 39. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-38, где:

L_1 является $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_n-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-^{**}$; или $^*-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_p ;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из L_p означает точку присоединения к L_1 ;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\zeta^*$,

где

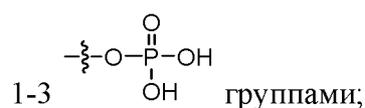
W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$ или $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, где каждый R^b независимо выбран из H , C_1 - C_6 алкила или C_3 - C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X ;

X является $^{***}-\text{CH}_2$ -триазилил- * , где *** из X означает точку присоединения к W , и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

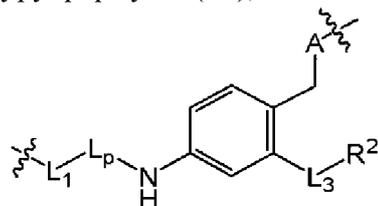
R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C_2 - C_6 алкила, замещенного



и

A является связью или $-\text{OC}(=\text{O})^*$, где * означает точку присоединения к D .

Вариант осуществления 40. Линкер формулы (C') имеющий структуру, имеющую структуру формулы (D'),



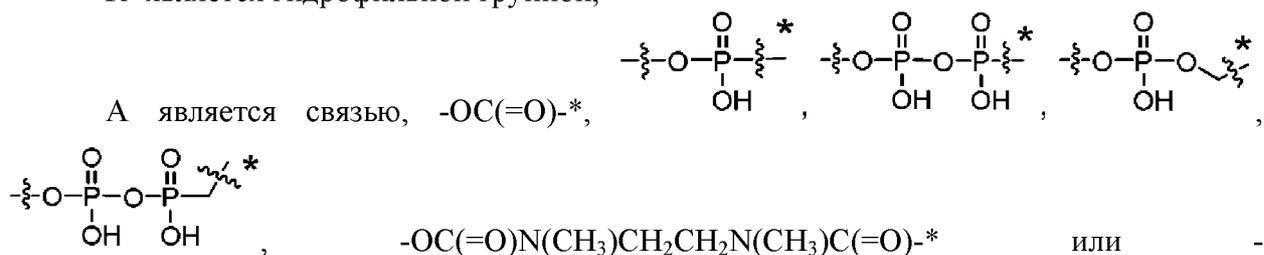
формула (D')

где

L_1 является мостиковым спейсером;

L_p является двухвалентным пептидным спейсером;

R² является гидрофильной группой;



и

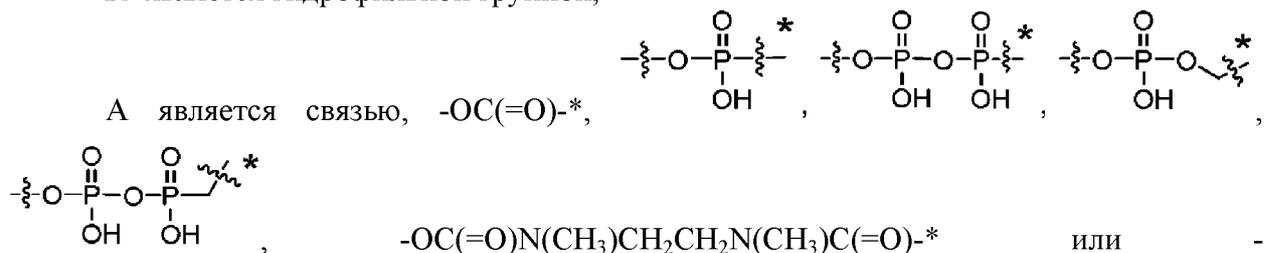
L₃ является спейсерной группой.

Вариант осуществления 41. Линкер по варианту осуществления 40, где:

L₁ является мостиковым спейсером;

L_p является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех аминокислотных остатков;

R² является гидрофильной группой;



и

L₃ является спейсерной группой.

Вариант осуществления 42. Линкер по варианту осуществления 40 или 41, где:

L₁ является $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_m-\ast\ast$; $-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-\ast\ast$;

$-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-\ast\ast$; $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-\ast\ast$;

$-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{SSC}(\text{R}^3)_2(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NR}^3(\text{CH}_2)_m\text{NR}^3\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-\ast\ast$;

$-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-\ast\ast$; $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{CH}_2)_m-\ast\ast$;

$-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})-\ast\ast$; $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{X}_1(\text{CH}_2)_m-\ast\ast$;

$-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{X}_1(\text{CH}_2)_n-\ast\ast$; $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-\ast\ast$;

$-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-\ast\ast$;

$-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{X}_1(\text{CH}_2)_n-\ast\ast$;

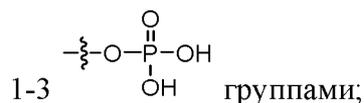
$-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{X}_1(\text{CH}_2)_n-\ast\ast$;

$-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-\ast\ast$; $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{R}^3)_2-\ast\ast$ или

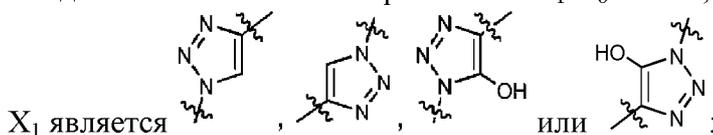
$-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-\ast\ast$, где * из L₁ означает точку присоединения к L_p;

R² является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля,

полиалкиленгликоля, сахара, олигосахариды, полипептида или C₂-C₆алкила, замещенного



каждый R³ независимо выбран из H и C₁-C₆алкила;

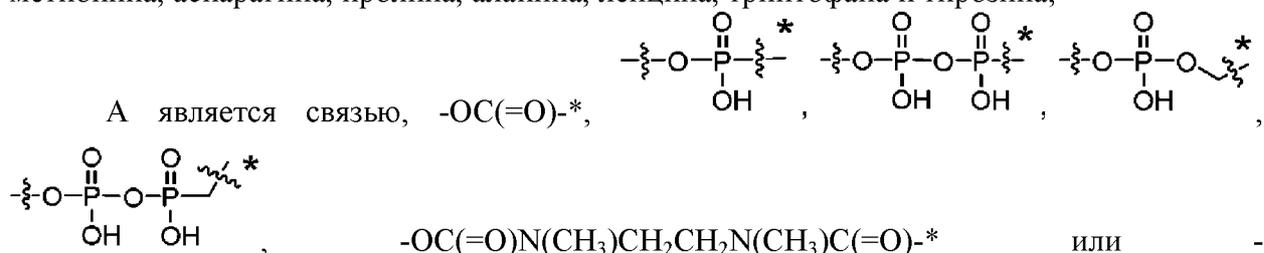


каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;

L_p является двухвалентным пептидным спейсером, содержащим аминокислотный остаток, выбранный из глицина, валина, цитруллина, лизина, изолейцина, фенилаланина, метионина, аспарагина, пролина, аланина, лейцина, триптофана и тирозина;



где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆алкила и C₃-C₈циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D;

L₃ является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi\text{-W-X-}\xi\text{*}$;

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-\text{**}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-\text{**}$, $-\text{NHS}(\text{O})_2-\text{**}$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{**}$ или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H, C₁-C₆алкила или C₃-C₈циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазилом или $-\text{**}-\text{CH}_2-\text{триазилом}-\text{*}$, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R²;

и

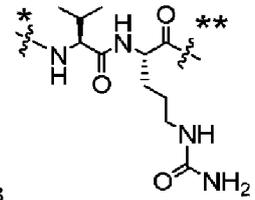
* из L₃ означает точку присоединения к R².

Вариант осуществления 43. Линкер по любому из вариантов осуществления 40-42, где:

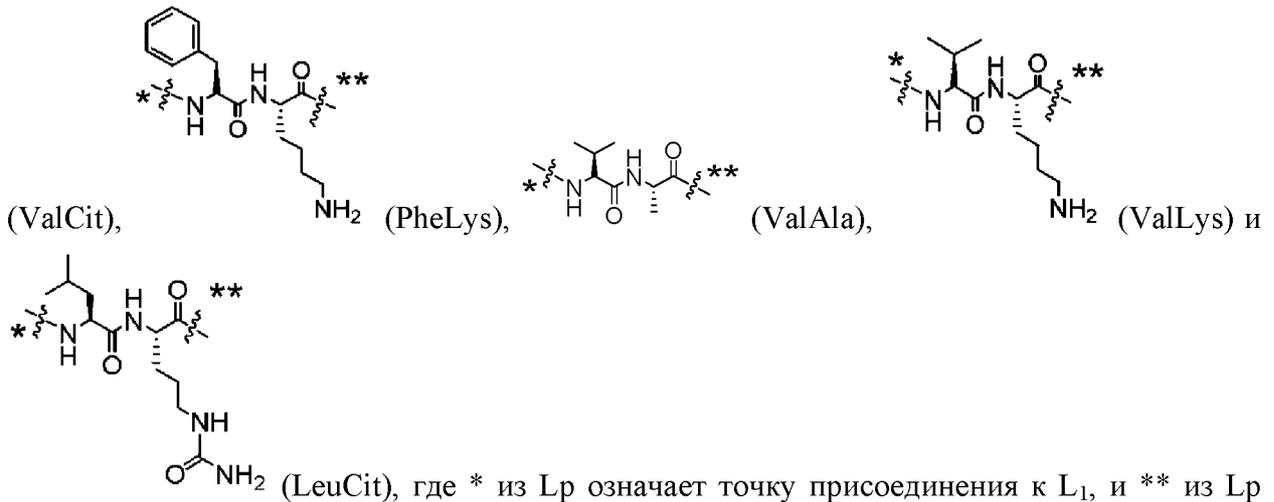
L₁ является $-\text{*}-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_m-\text{**}$; $-\text{*}-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-\text{**}$; $-\text{*}-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-\text{**}$; или $-\text{*}-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$, где * из L₁ означает точку присоединения к L_p;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;
 каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,
 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из



L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi^*$,

где

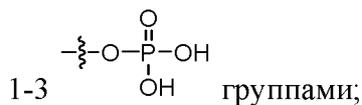
W является $-CH_2O-^{**}$, $-CH_2N(R^b)C(=O)O-^{**}$, $-NHC(=O)CH_2NHC(=O)O-^{**}$, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)O-^{**}$, $-C(=O)N(X-R^2)-^{**}$, $-CH_2N(X-R^2)C(=O)-^{**}$, $-C(=O)NR^b-^{**}$, $-C(=O)NH-^{**}$, $-CH_2NR^bC(=O)-^{**}$, $-CH_2NR^bC(=O)NH-^{**}$, $-CH_2NR^bC(=O)NR^b-^{**}$, $-NHC(=O)-^{**}$, $-NHC(=O)O-^{**}$, $-NHC(=O)NH-^{**}$, $-OC(=O)NH-^{**}$, $-S(O)_2NH-^{**}$, $-NHS(O)_2-^{**}$, $-C(=O)-$, $-C(=O)O-^{**}$ или $-NH-$, где каждый R^b независимо выбран из H , C_1-C_6 алкила или C_3-C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X ;

X является связью, триазилилом или $^{***}-CH_2$ -триазилил-*, где *** из X означает точку присоединения к W и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

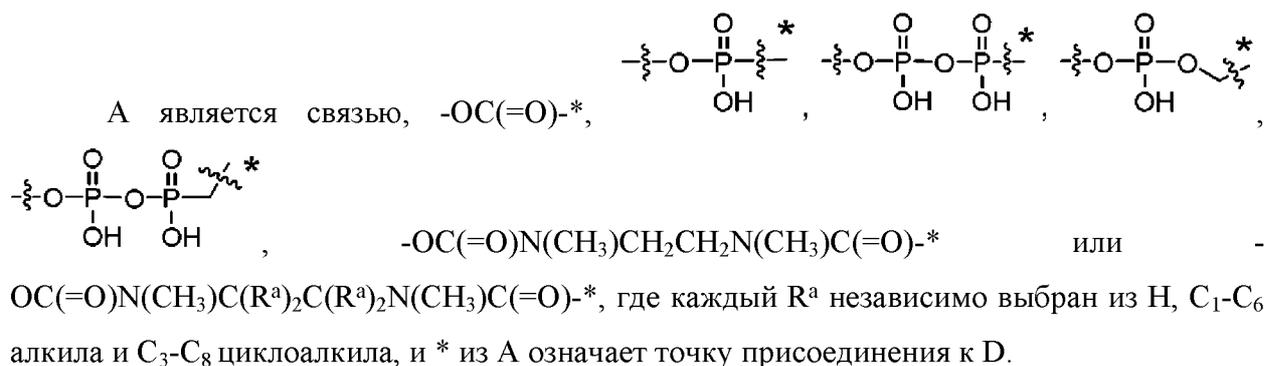
и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C_2-C_6 алкила, замещенного

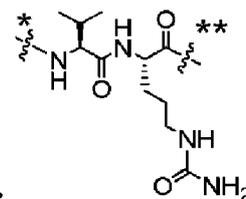


и



Вариант осуществления 44. Линкер по любому из вариантов осуществления 40-43, где:

L_1 является $^*\text{-C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{-}^{**}$; $^*\text{-C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{-}^{**}$; $^*\text{-C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{-}^{**}$; или $^*\text{-C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_p ; каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из L_p означает точку присоединения к L_1 , и ** из L_p означает точку присоединения к $-\text{NH}-$ группы G;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\text{W}-\text{X}-$ *,

где

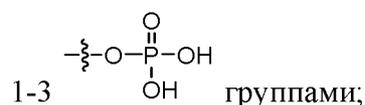
W является $-\text{CH}_2\text{O}-$ **, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ **, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ **, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ **, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-$ **, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-$ **, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$ **, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ **, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-$ **, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ **, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$ **, $-\text{NHC}(=\text{O})-$ **, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ **, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$ **, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-$ **, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-$ **, $-\text{NHS}(\text{O})_2-$ **, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ** или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или C_3 - C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазолилом или $^{***}\text{-CH}_2\text{-триазолил-}^*$, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

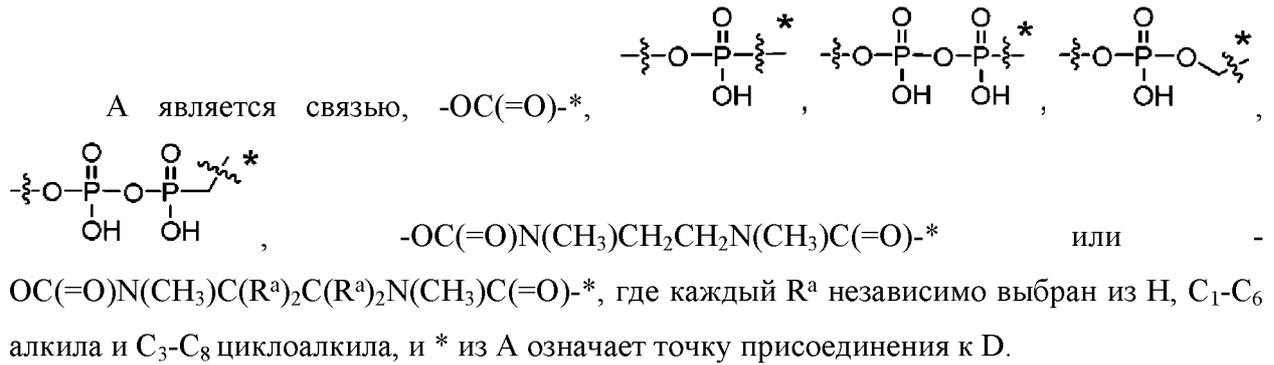
и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C_2 - C_6 алкила, замещенного

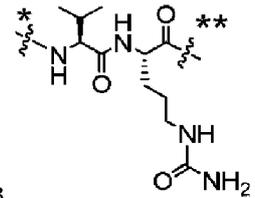


и



Вариант осуществления 45. Линкер по любому из вариантов осуществления 40-44, где:

L_1 является $^*\text{-C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_n-$ ** $;$ $^*\text{-C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$ ** $;$ $^*\text{-C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$ ** $;$ или $^*\text{-C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_p ;
 каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;
 каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;
 каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из L_p означает точку присоединения к L_1 , и ** из L_p означает точку присоединения к $-\text{NH}-$ группы G;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-\text{W}-\text{X}-\xi^*$,

где

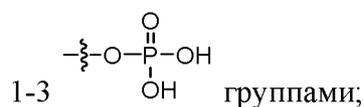
W является $-\text{CH}_2\text{O}-$ ** $;$ $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ** $;$ $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ ** $;$ $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ** $;$ $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-$ ** $;$ $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$ ** $;$ $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ** $;$ $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-$ ** $;$ $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ ** $;$ $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$ ** $;$ $-\text{NHC}(=\text{O})-$ ** $;$ $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ ** или $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$ ** $;$ где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или C_3 - C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазолилом или $***-\text{CH}_2$ -триазолил-*, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C_2 - C_6 алкила, замещенного

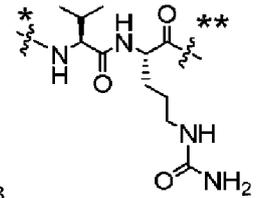


и

A является связью или $-\text{OC}(=\text{O})^*$, где * означает точку присоединения к D.

Вариант осуществления 46. Линкер по любому из вариантов осуществления 40-45, где:

L_1 является $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_m-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-^{**}$; или $^*-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$, где * из L_1 означает точку присоединения к Lp; каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



Lp является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из Lp означает точку присоединения к L_1 , и ** из Lp означает точку присоединения к $-\text{NH}-$ группы G;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi^*$,

где

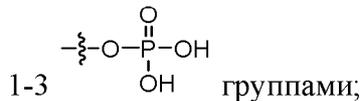
W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$ или $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или C_3 - C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является $^{***}-\text{CH}_2$ -триазолил-*, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

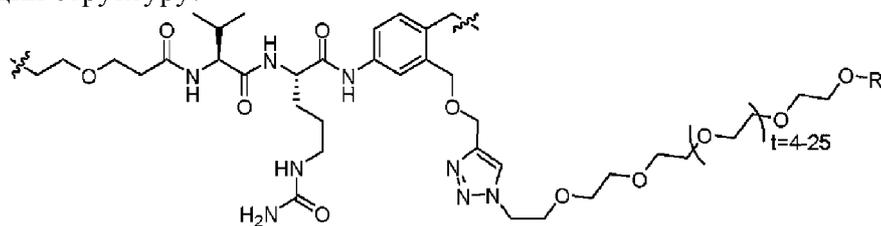
R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахаридов, полипептида или C_2 - C_6 алкила, замещенного



и

A является связью или $-\text{OC}(=\text{O})^*$, где * означает точку присоединения к D.

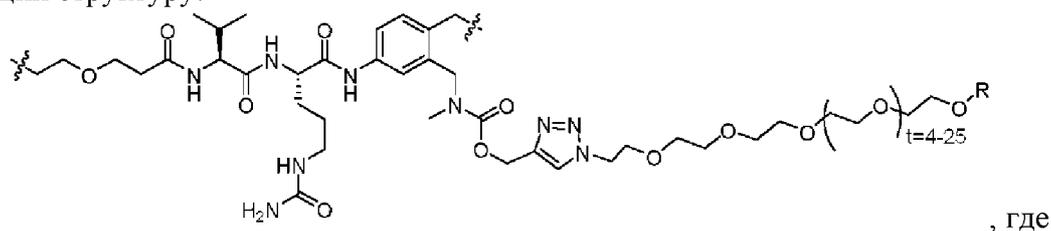
Вариант осуществления 47. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



, где

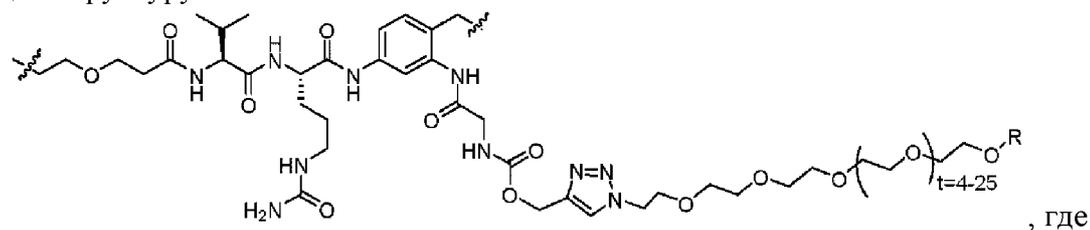
R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

Вариант осуществления 48. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



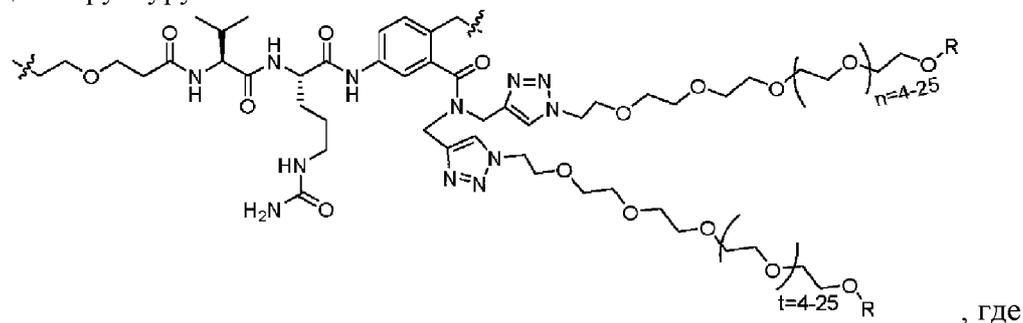
R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

Вариант осуществления 49. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



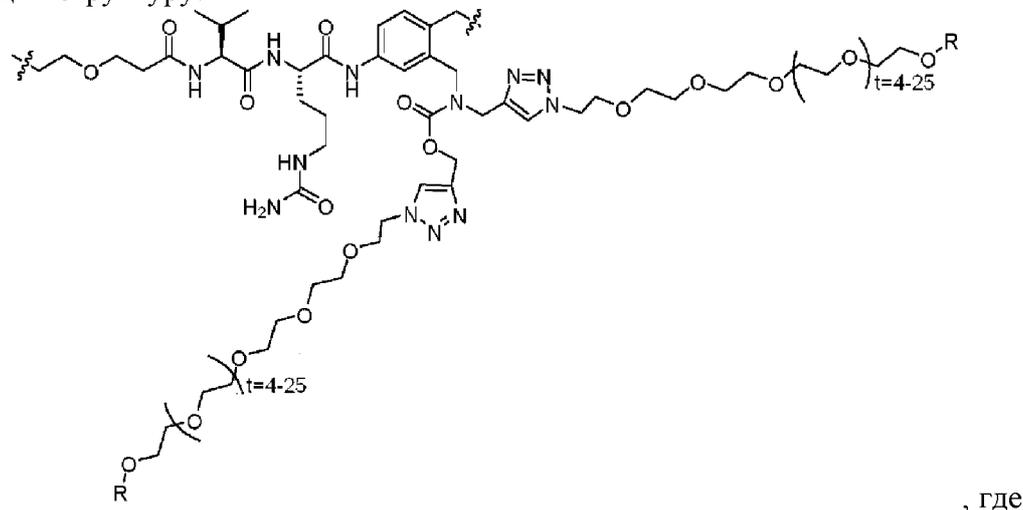
R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

Вариант осуществления 50. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



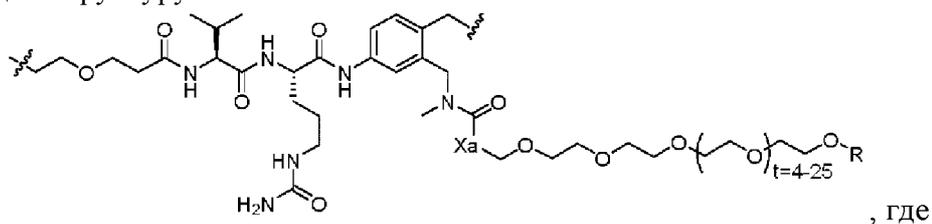
каждый R независимо выбран из H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

Вариант осуществления 51. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



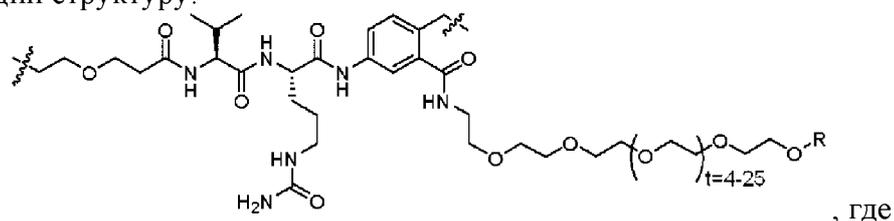
каждый R независимо выбран из H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

Вариант осуществления 52. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



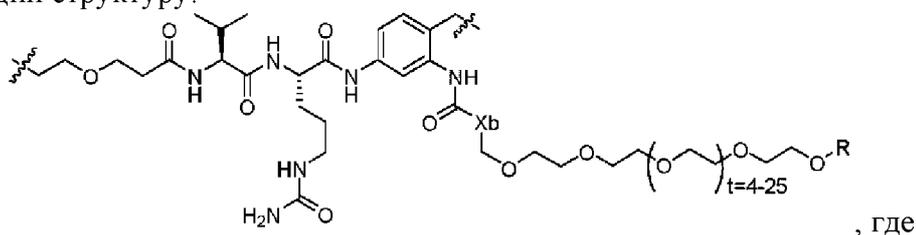
Xa является -CH₂-, -OCH₂-, -NHCH₂- или -NRCH₂- и каждый R независимо равен H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

Вариант осуществления 53. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



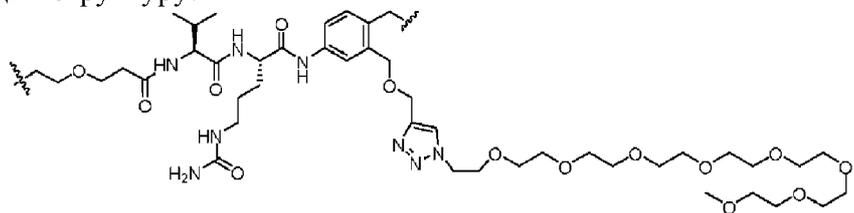
R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

Вариант осуществления 54. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:

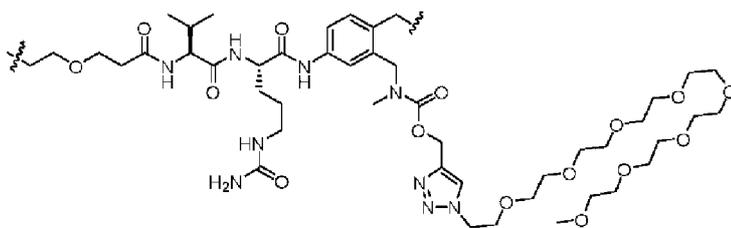


Xb является -CH₂-, -OCH₂-, -NHCH₂- или -NRCH₂- и каждый R независимо равен H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH.

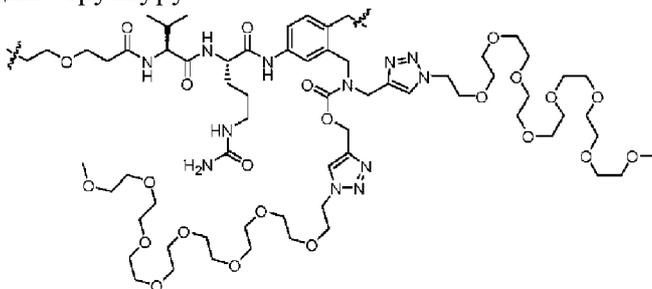
Вариант осуществления 55. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



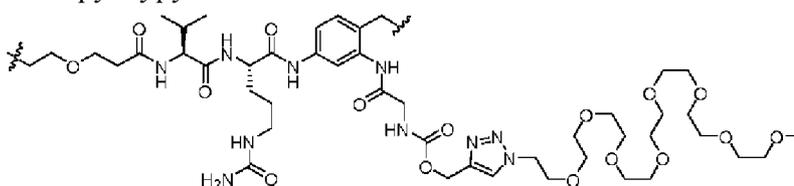
Вариант осуществления 56. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



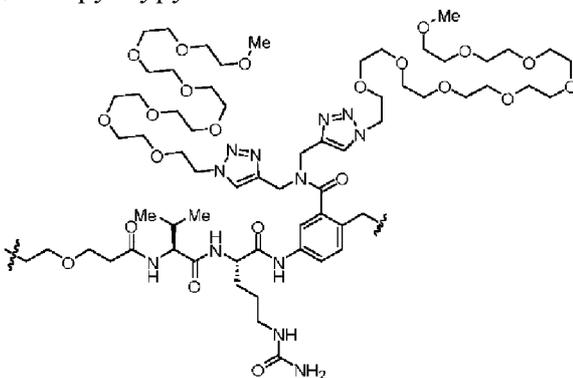
Вариант осуществления 57. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



Вариант осуществления 58. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:



Вариант осуществления 59. Линкер по любому из вариантов осуществления 32-46, имеющий структуру:

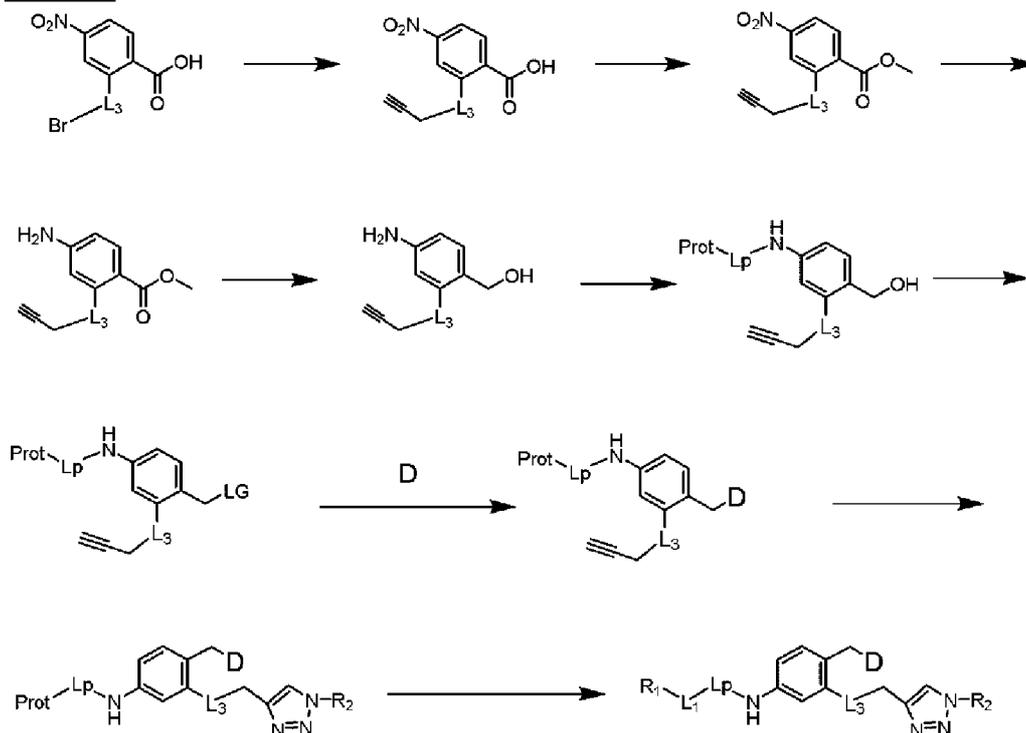


В иллюстративных целях общие схемы реакций, изображенные здесь, представляют потенциальные пути синтеза соединений по настоящему изобретению, а также ключевых промежуточных соединений. Более подробное описание отдельных стадий реакции см. в разделе «Примеры» ниже. Хотя конкретные исходные материалы и реагенты изображены на схемах и обсуждаются ниже, другие исходные материалы и реагенты могут быть легко заменены для обеспечения множества производных и/или условий реакции. Кроме того, многие соединения, полученные способами, описанными ниже, могут быть дополнительно модифицированы в свете этого описания с использованием общепринятой химии, хорошо известной специалистам в данной области техники.

В качестве примера общий синтез соединений формулы (B') показан ниже на схеме

1.

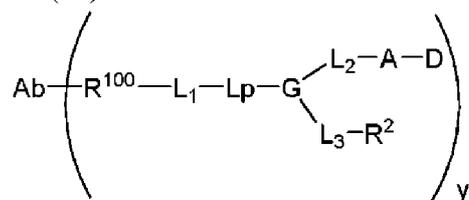
Схема 1



Конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению

Данное изобретение представляет конъюгаты антитело-лекарственное средство, также названные в настоящем документе иммуноконъюгаты, которые содержат линкеры, которые содержат одну или несколько гидрофильных групп.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению имеют структуру формулы (E'):



Формула (E')

где:

Ab является антителом или его фрагментом;

R^{100} является сочетающей группой;

L_1 является мостиковым спейсером;

Lp является двухвалентным пептидным спейсером;

G-L₂-A является саморасщепляющимся спейсером;

R^2 является гидрофильной группой;

L_2 является связью, метиленом, неопентиленом или C₂-C₃алкениленом;



L_3 является спейсерной группой;

D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе, например, ингибитором MCI-1 и может содержать N или O, где D может быть соединен с А прямой связью из А к N или O группы лекарственного средства,

и

у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Некоторые аспекты и примеры конъюгата антитело-лекарственное средство по изобретению представлены в следующем списке перечисленных вариантов осуществления. Следует понимать, что признаки, указанные в каждом варианте осуществления, могут быть объединены с другими указанными признаками для получения дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Вариант осуществления 60. Иммуноконъюгат формулы (E') где:

Ab является антителом или его фрагментом;

R^{100} является сочетающей группой;

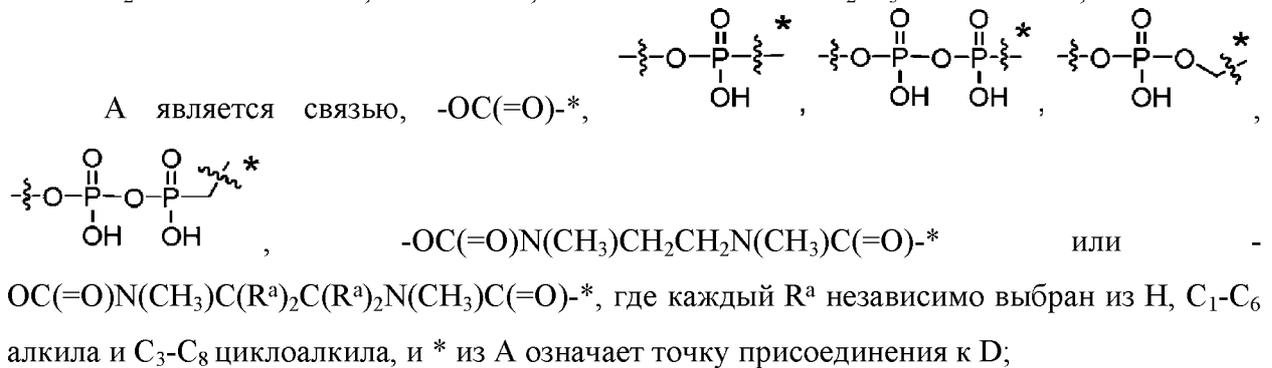
L_1 является мостиковым спейсером;

L_p является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех аминокислотных остатков;

G- L_2 -A является саморасщепляющимся спейсером;

R^2 является гидрофильной группой;

L_2 является связью, метиленом, неопентиленом или C_2 - C_3 алкениленом;



L_3 является спейсерной группой;

D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе где D соединен с А через прямую связь из А к D (например, N или O группы лекарственного средства),

и

у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

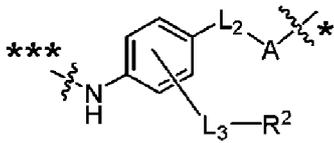
Вариант осуществления 61. Иммуноконъюгат формулы (E') или по варианту осуществления 60, где:

Ab является антителом или его фрагментом;

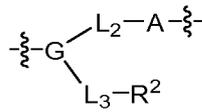
R¹⁰⁰ является сочетающей группой;

L₁ является мостиковым спейсером;

L_p является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех аминокислотных остатков;

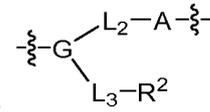


, где * из



означает точку присоединения к D

(например, к N или O группы лекарственного средства), *** из



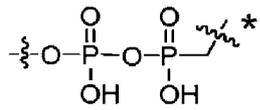
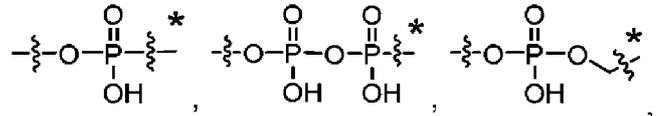
означает

точку присоединения к L_p;

R² является гидрофильной группой;

L₂ является связью, метиленом, неопентиленом или C₂-C₃алкениленом;

A является связью, -OC(=O)-*,



или

OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D;

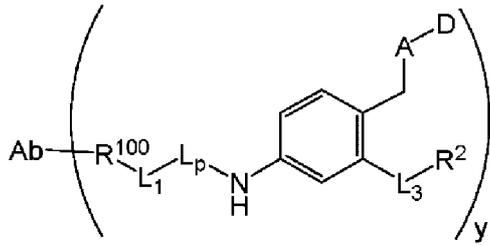
L₃ является спейсерной группой;

D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства,

и

у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 62. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-61, имеющий структуру формулы (F'),



формула (F')

где:

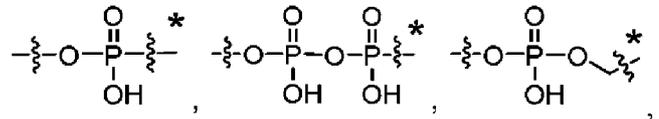
Ab является антителом или его фрагментом;

R¹⁰⁰ является сочетающей группой;

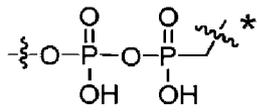
L₁ является мостиковым спейсером;

L_p является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех аминокислотных остатков;

R² является гидрофильной группой;



A является связью, -OC(=O)-*,



-OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-*

или

OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D;

L₃ является спейсерной группой;

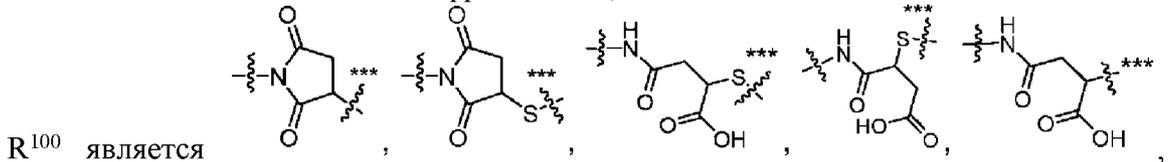
D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства,

и

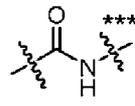
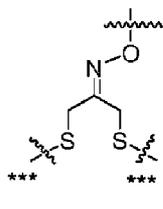
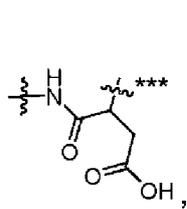
y равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 63. Иммуноконъюгат формулы (D') или любого из вариантов осуществления 60-62, где:

Ab является антителом или его фрагментом;



R¹⁰⁰ является



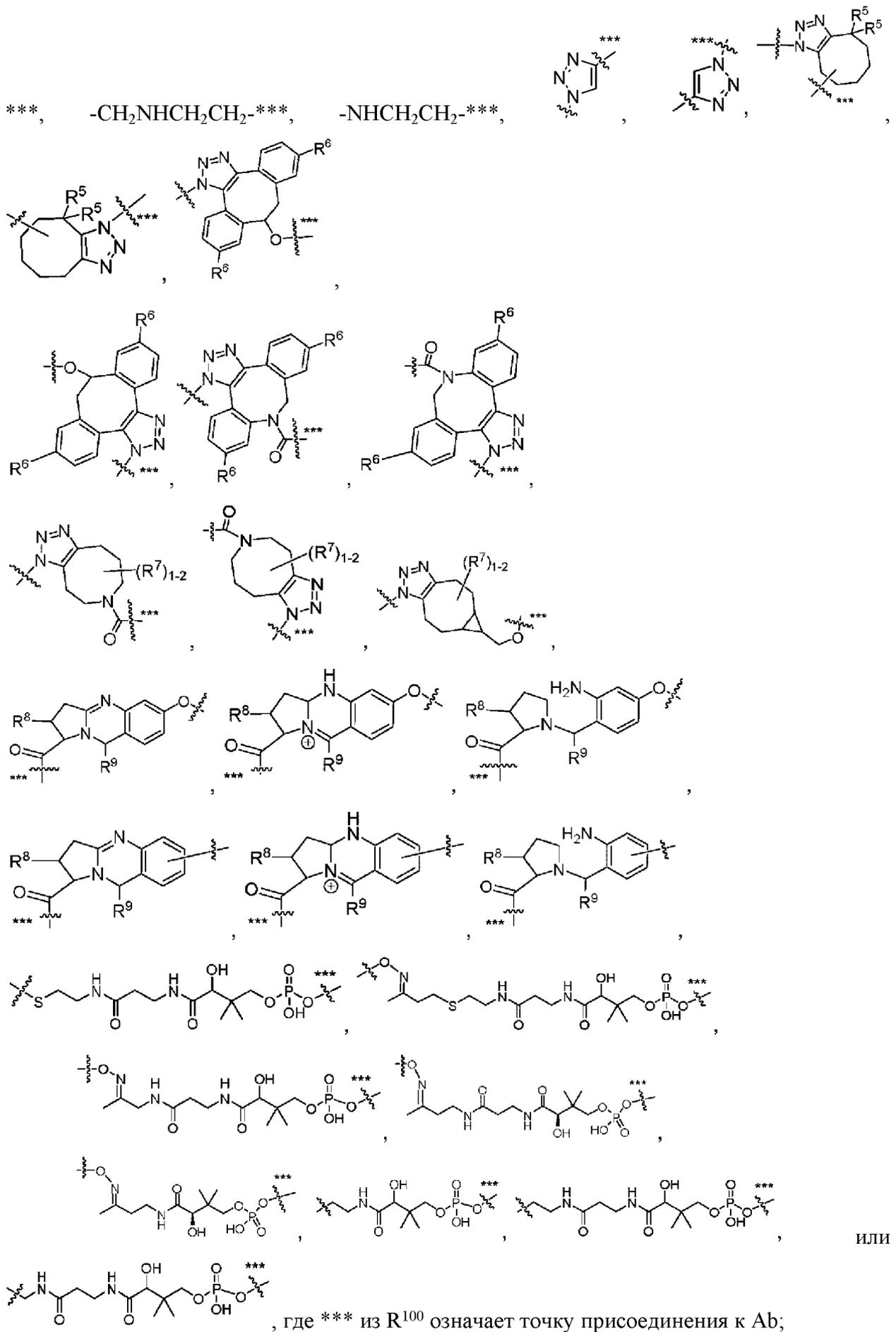
, -S-,

-C(=O)-,

-ON=***,

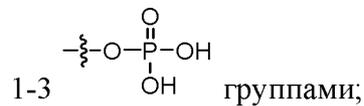
-NHC(=O)CH₂-***,

-S(=O)₂CH₂CH₂-***, -(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂-***, -NHS(=O)₂CH₂CH₂-***, -NHC(=O)CH₂CH₂-



L_1 является $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_n-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-^{**}$;
 $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-^{**}$;
 $^*-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{SSC}(\text{R}^3)_2(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NR}^3(\text{CH}_2)_m\text{NR}^3\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-^{**}$;
 $^*-\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{CH}_2)_m-^{**}$;
 $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{X}_1(\text{CH}_2)_m-^{**}$;
 $^*-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{X}_1(\text{CH}_2)_n-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-^{**}$;
 $^*-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-^{**}$;
 $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{X}_1(\text{CH}_2)_n-^{**}$;
 $^*-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{X}_1(\text{CH}_2)_n-^{**}$;
 $^*-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{R}^3)_2-^{**}$ или $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_m-^{**}$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_r и ** из L_1 означает точку присоединения к R^{100} ;

R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C_2 - C_6 алкила, замещенного



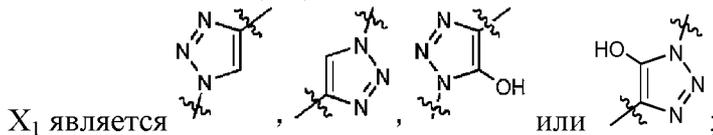
каждый R^3 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

R^4 является 2-пиридилом или 4-пиридилом;

каждый R^5 независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^6 независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$ и -OH;

каждый R^7 независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, фтора, бензилокси, замещенного $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, бензила, замещенного $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, C_{1-4} алкокси, замещенного $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ и C_{1-4} алкила, замещенного $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$;

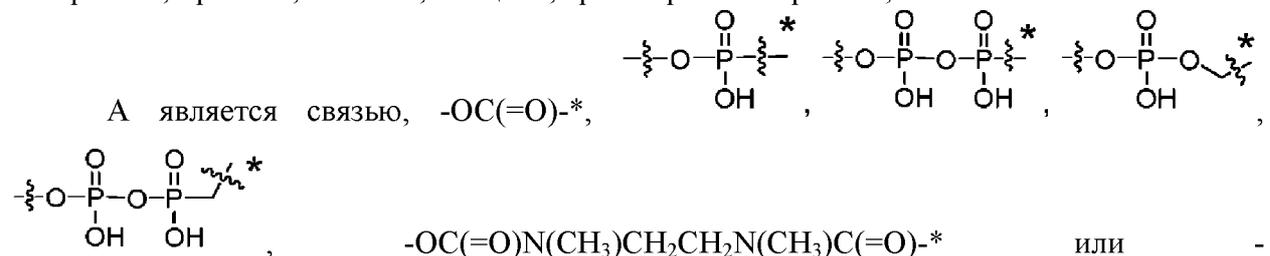


каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;

L_r является двухвалентным пептидным спейсером, содержащим аминокислотный остаток, выбранный из валина, цитруллина, лизина, изолейцина, фенилаланина, метионина, аспарагина, пролина, аланина, лейцина, триптофана и тирозина;



$\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ *, где каждый R^a независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-$ **, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ **, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ **, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NH}-$ **, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})-$ **, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ **, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-$ **, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-$ **, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$ **, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ **, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-$ **, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$ **, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$ **, $-\text{NHC}(=\text{O})-$ **, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ **, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$ **, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-$ **, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-$ **, $-\text{NHS}(\text{O})_2-$ **, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ** или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или C_3 - C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазилил или ***- CH_2 -триазилил-*, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

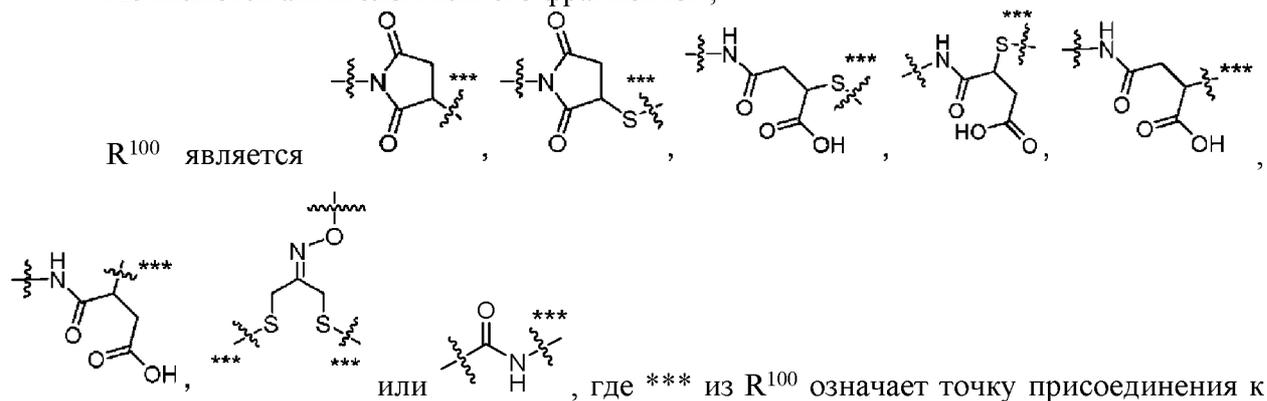
D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства,

и

у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 64. Иммуноконъюгат формулы (D') или любого из вариантов осуществления 60-63, где:

Ab является антителом или его фрагментом;



Ab;

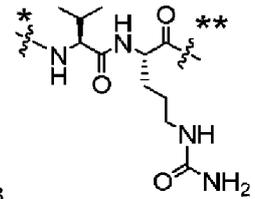
L_1 является $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_n-$ **, $-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$ **, $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-$ **, или $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_p , и ** из L_1 означает точку присоединения к R^{100} ;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

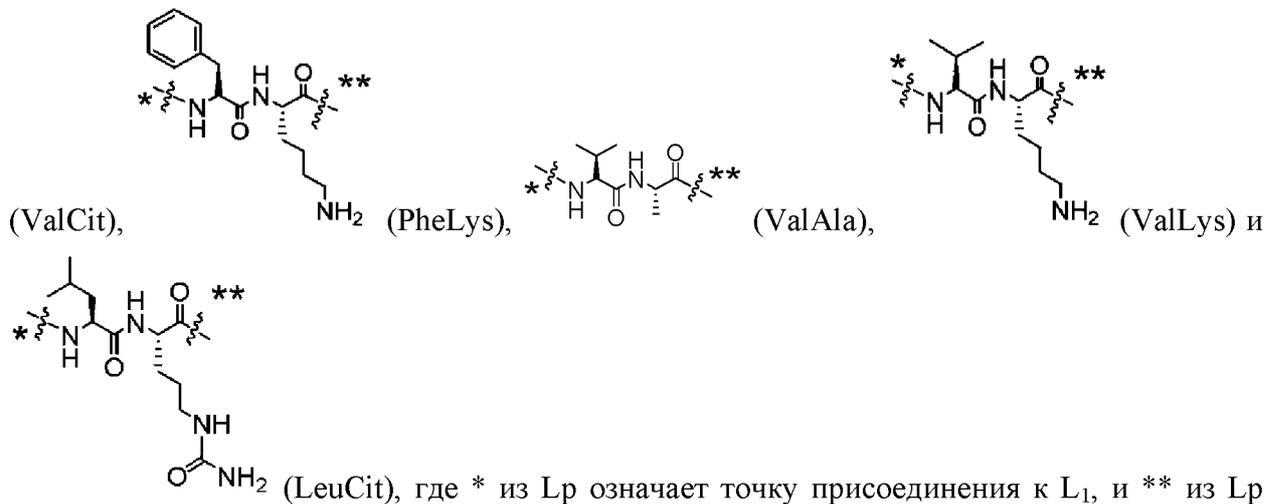
каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



Lp является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из



L₃ является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi^*$,

где

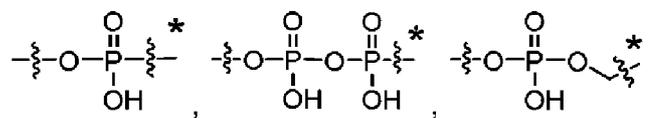
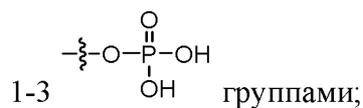
W является -CH₂O-**, -CH₂N(R^b)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH₂NHC(=O)O-**, -NHC(=O)CH₂NH-**, -NHC(=O)CH₂NHC(=O)-**, -CH₂N(X-R²)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R²)-**, -CH₂N(X-R²)C(=O)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH₂NR^bC(=O)-**, -CH₂NR^bC(=O)NH-**, -CH₂NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, -S(O)₂NH-**, -NHS(O)₂-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** или -NH-, где каждый R^b независимо выбран из H, C₁-C₆алкила или C₃-C₈циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазолилом или ***-CH₂-триазолил-*, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R²;

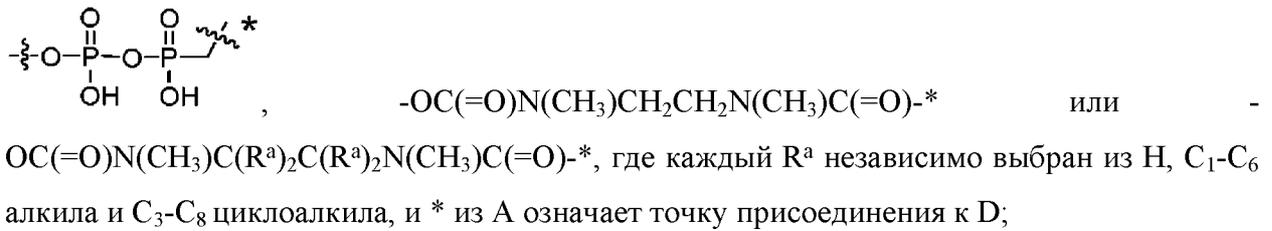
и

* из L₃ означает точку присоединения к R²;

R² является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C₂-C₆алкила, замещенного



A является связью, -OC(=O)-*,



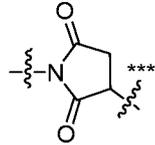
D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства,

и

у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 65. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-64, где:

Ab является антителом или его фрагментом;



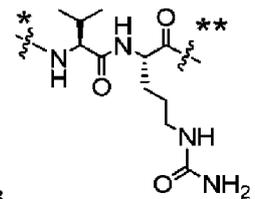
R¹⁰⁰ является , где *** из R¹⁰⁰ означает точку присоединения к Ab;

L₁ является *-C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-**, *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-**, *-C(=O)(CH₂)_m-**, или *-C(=O)NH((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-, где * из L₁ означает точку присоединения к L_p, и ** из L₁ означает точку присоединения к R¹⁰⁰;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из L_p означает точку присоединения к L₁, и ** из L_p означает точку присоединения к -NH- группы G;

L₃ является спейсерной группой, имеющей структуру $\begin{array}{c} \xi \\ | \\ \text{-}\xi\text{-W-X-}\xi^* \\ | \\ \zeta \end{array}$,

где

W является -CH₂O-**, -CH₂N(R^b)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH₂NHC(=O)O-**, -CH₂N(X-R²)C(=O)O-**, -C(=O)N(X-R²)-**, -CH₂N(X-R²)C(=O)-**, -C(=O)NR^b-**, -C(=O)NH-**, -CH₂NR^bC(=O)-**, -CH₂NR^bC(=O)NH-**, -CH₂NR^bC(=O)NR^b-**, -NHC(=O)-**, -NHC(=O)O-**, -NHC(=O)NH-**, -OC(=O)NH-**, -S(O)₂NH-**, -NHS(O)₂-**, -C(=O)-, -C(=O)O-** или -NH-, где каждый R^b независимо выбран из H, C₁-C₆алкила или C₃-C₈циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

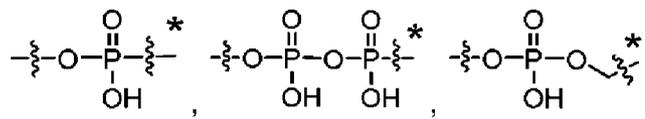
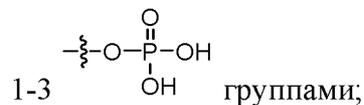
X является связью, триазилилом или ***-CH₂-триазилил-, где *** из X означает

точку присоединения к W и * из X означает точку присоединения к R²;

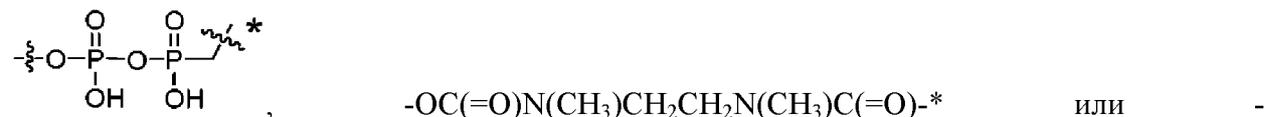
и

* из L₃ означает точку присоединения к R²;

R² является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C₂-C₆алкила, замещенного



A является связью, -OC(=O)-*,



OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*, где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила, и * из A означает точку присоединения к D;

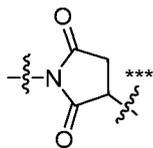
D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства,

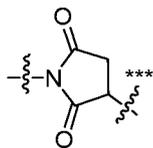
и

у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 66. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-65, где:

Ab является антителом или его фрагментом;



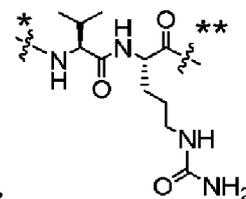
R¹⁰⁰ является , где *** из R¹⁰⁰ означает точку присоединения к Ab;

L₁ является *-C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-***, *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-***, *-C(=O)(CH₂)_m-***, или *-C(=O)NH((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-, где * из L₁ означает точку присоединения к L_p и ** из L₁ означает точку присоединения к R¹⁰⁰;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



L_p является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из L_p означает точку присоединения к L₁, и ** из L_p означает точку

присоединения к -NH- группы G;

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi^*$,

где

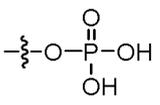
W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$ или $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или C_3 - C_8 циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазилилом или $^{***}-\text{CH}_2$ -триазилил-*, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 ;

R^2 является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C_2 - C_6 алкила, замещенного

1-3  группами;

A является связью или $-\text{OC}(=\text{O})^*$, где * означает точку присоединения к D;

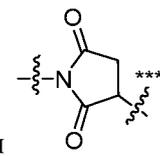
D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства,

и

у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 67. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-66, где:

Ab является антителом или его фрагментом;

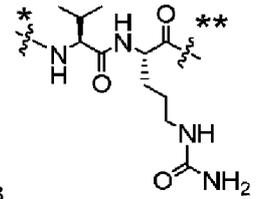
R^{100} является , где *** из R^{100} означает точку присоединения к Ab;

L_1 является $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_n-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-^{**}$; $^*-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_m-^{**}$; или $^*-\text{C}(=\text{O})\text{NH}((\text{CH}_2)_m\text{O})_t(\text{CH}_2)_n-$, где * из L_1 означает точку присоединения к L_p , и ** из L_1 означает точку присоединения к R^{100} ;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый t независимо выбран из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;



Lp является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из (ValCit), где * из Lp означает точку присоединения к L₁, и ** из Lp означает точку присоединения к -NH- группы G;

L₃ является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi^*$,

где

W является -CH₂O-**, -CH₂N(R^b)C(=O)O-**, -NHC(=O)CH₂NHC(=O)O-**, -CH₂N(X-R²)C(=O)O-** или -C(=O)N(X-R²)-**, где каждый R^b независимо выбран из H, C₁-C₆алкила или C₃-C₈циклоалкила, и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является ***-CH₂-триазилил-*, где *** из X означает точку присоединения к W, и * из X означает точку присоединения к R²;

и

* из L₃ означает точку присоединения к R²;

R² является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахарида, полипептида или C₂-C₆алкила, замещенного

1-3 $-\xi-O-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{P}}}-\text{OH}$ группами;

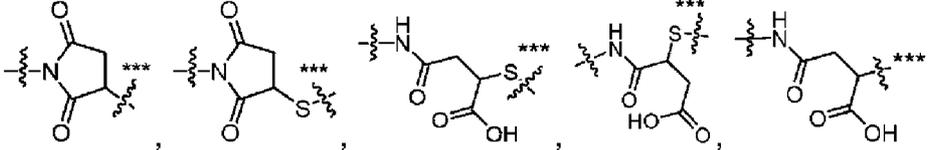
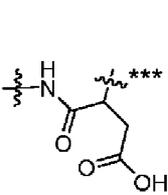
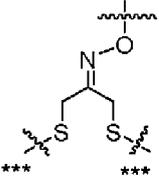
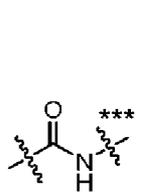
A является связью или -OC(=O)*, где * означает точку присоединения к D;

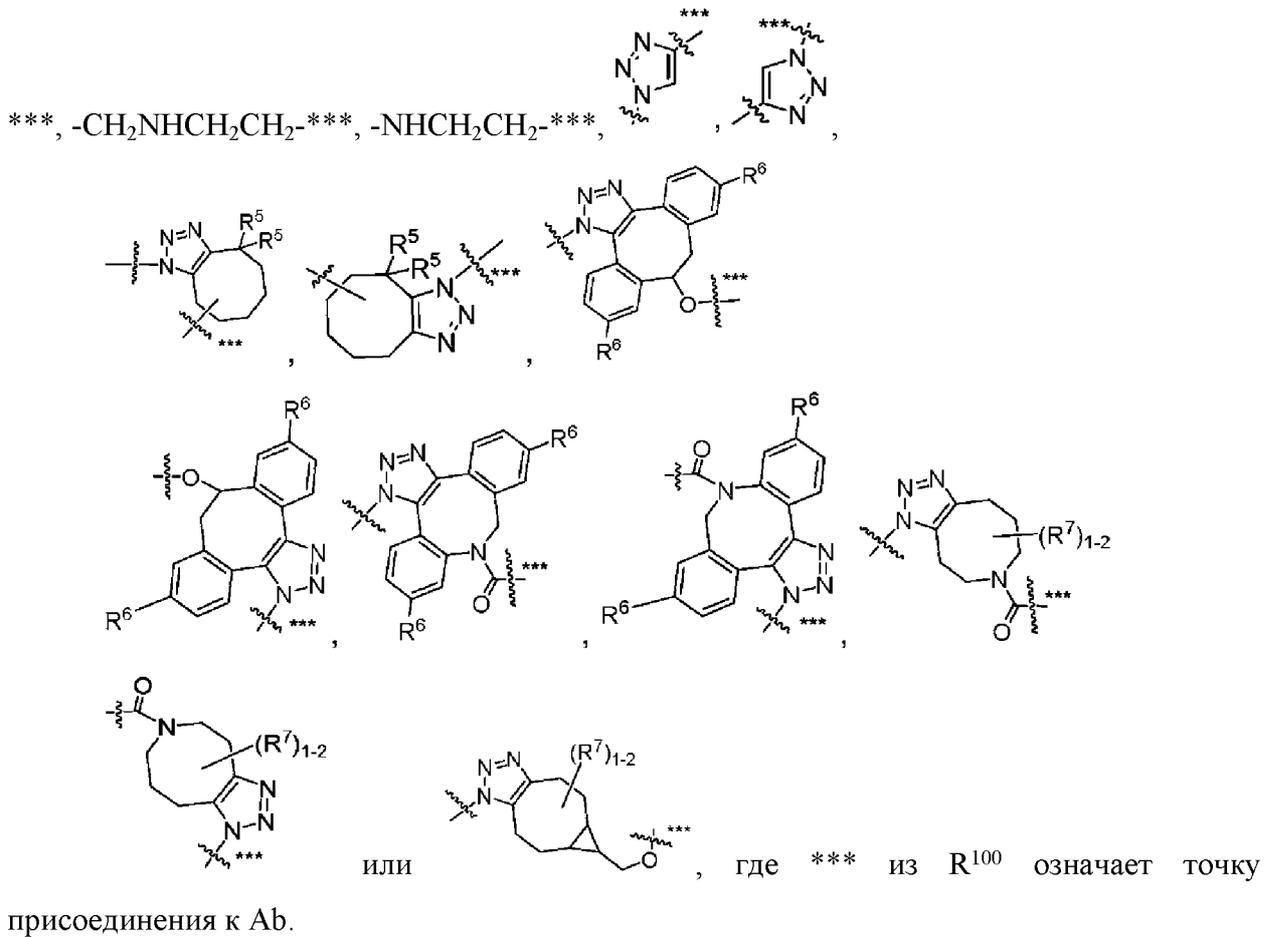
D является группой лекарственного средства как определено в настоящем документе и содержащей N или O, где D соединен с A через прямую связь от A к N или O группы лекарственного средства,

и

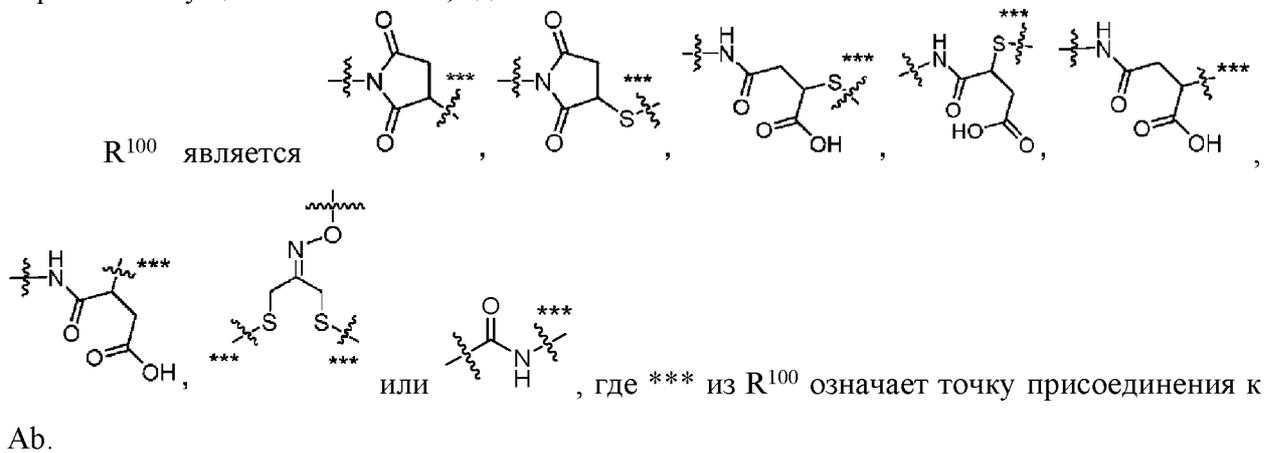
у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 68. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-63, где

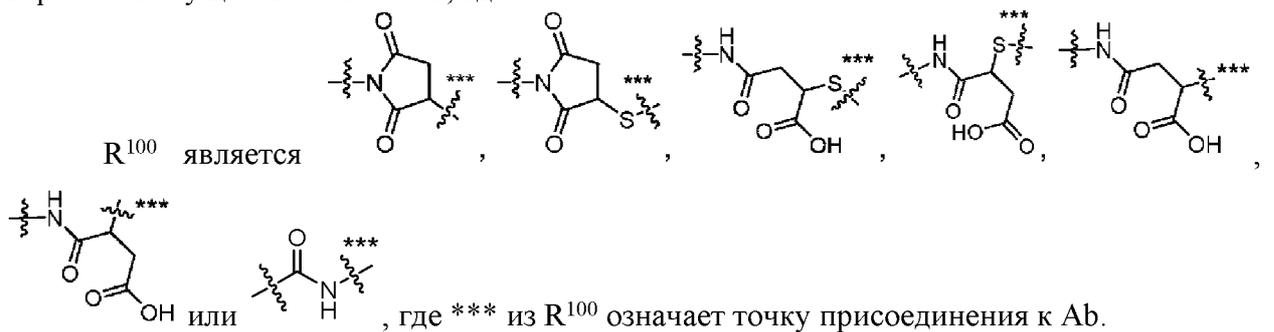
R¹⁰⁰ является , , , , -S-, -C(=O)-, -ON=***, -NHC(=O)CH₂-***, -S(=O)₂CH₂CH₂-***, -(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂-***, -NHS(=O)₂CH₂CH₂-***, -NHC(=O)CH₂CH₂-



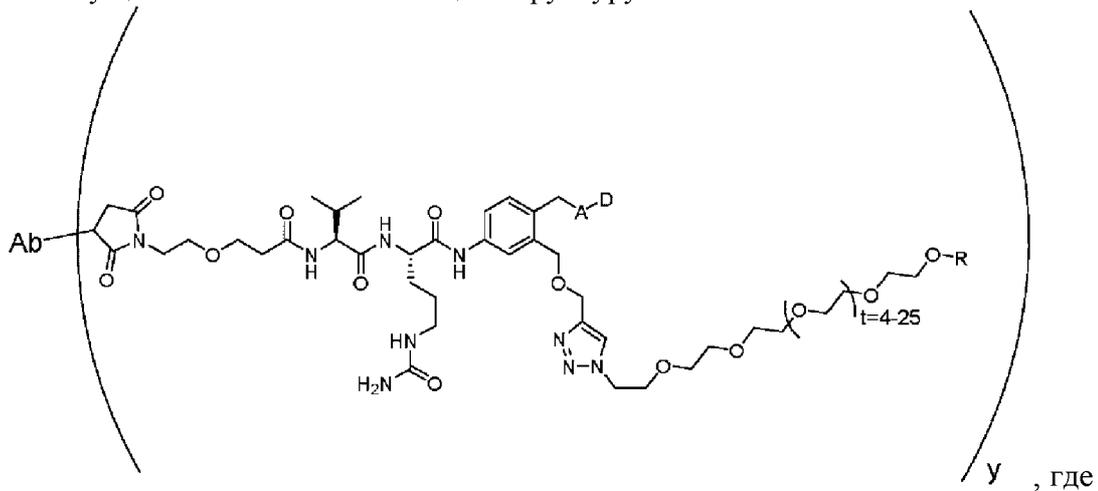
Вариант осуществления 69. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-63, где



Вариант осуществления 70. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-63, где

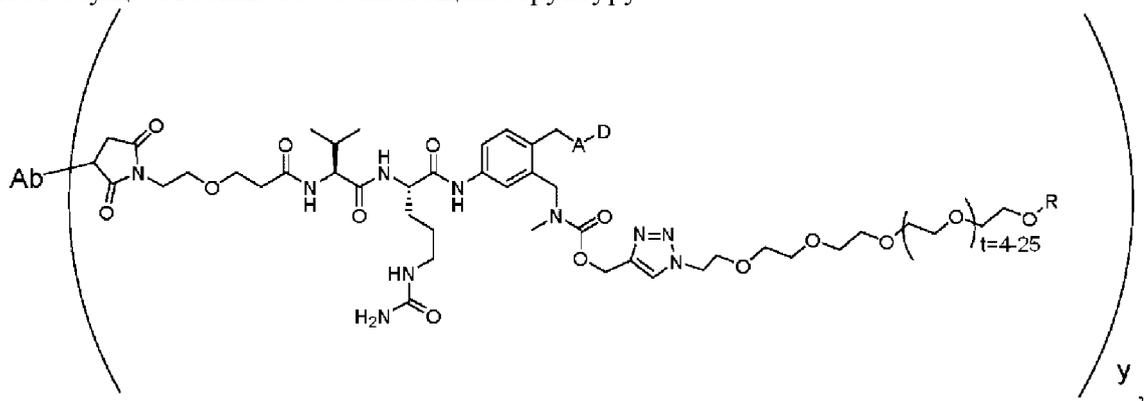


Вариант осуществления 71. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH и y равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

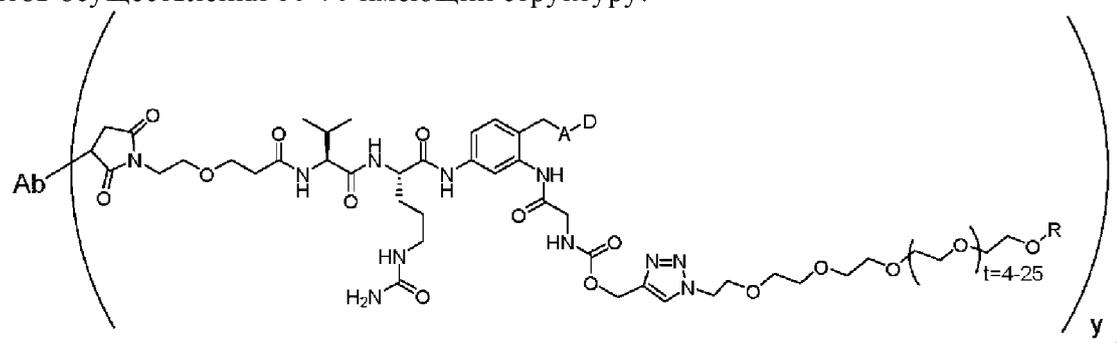
Вариант осуществления 72. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



где

R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH и y равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 73. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:

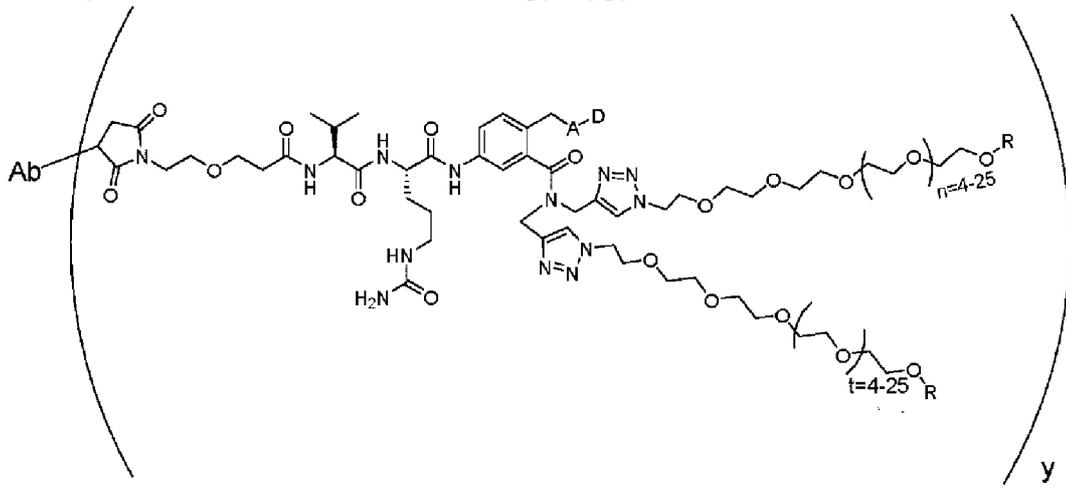


где

R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH и y равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

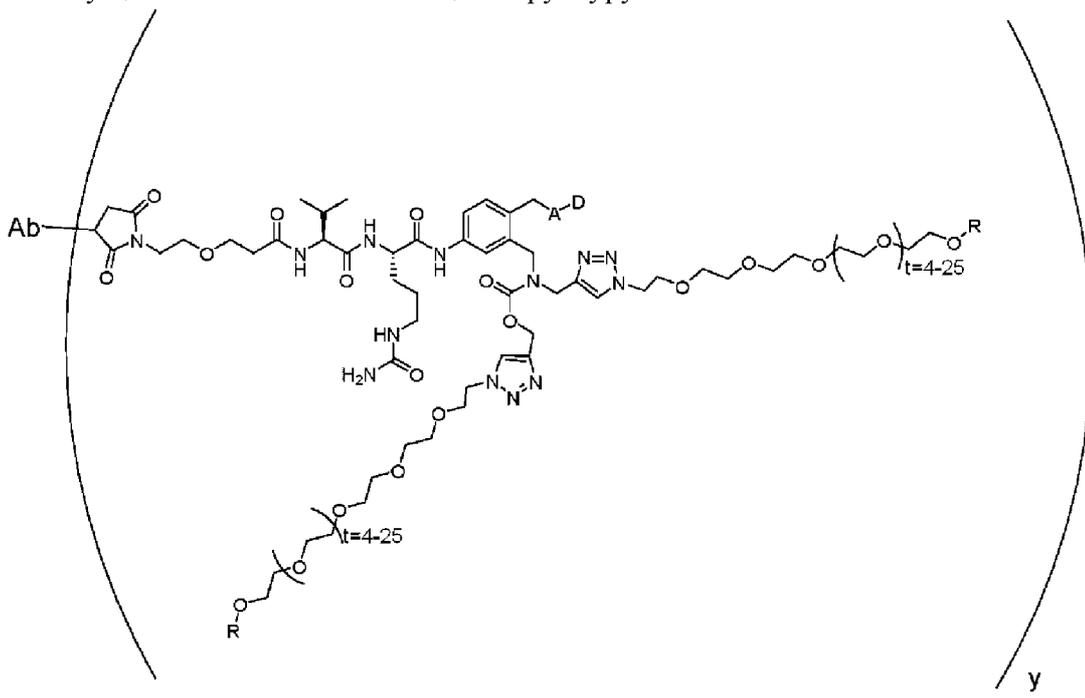
13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 74. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



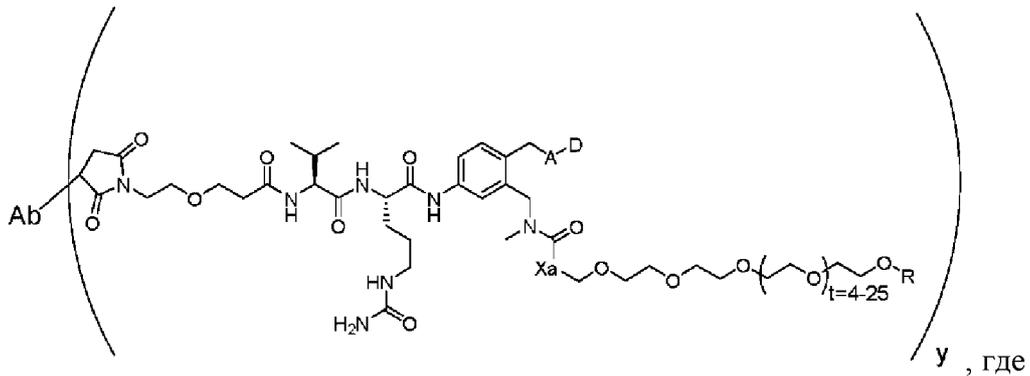
каждый R независимо выбран из H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH и y равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 75. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



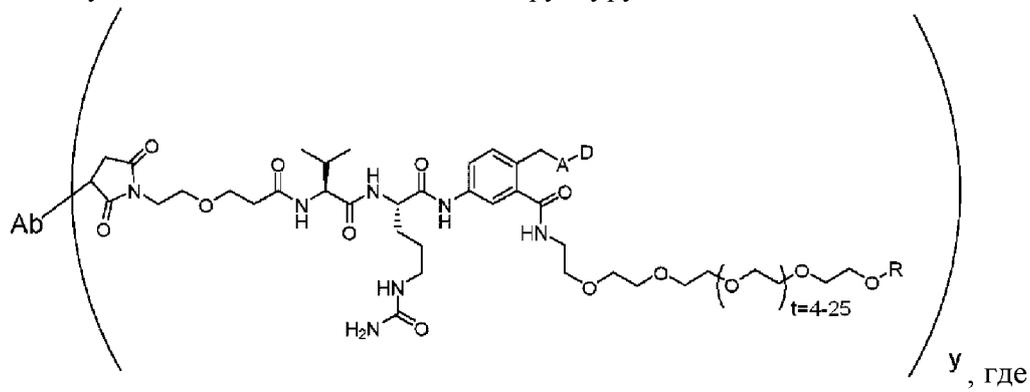
каждый R независимо выбран из H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH и y равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 76. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



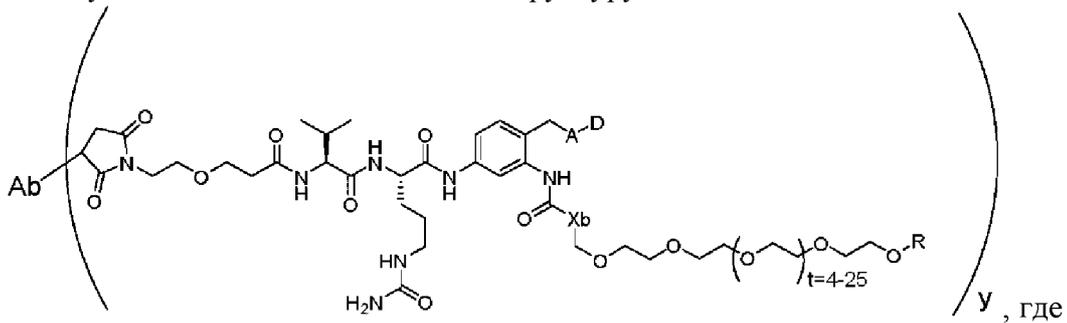
Xa является $-\text{CH}_2-$, $-\text{OCH}_2-$, $-\text{NHCH}_2-$ или $-\text{NRCH}_2-$ и каждый R независимо является H, $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ и у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 77. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



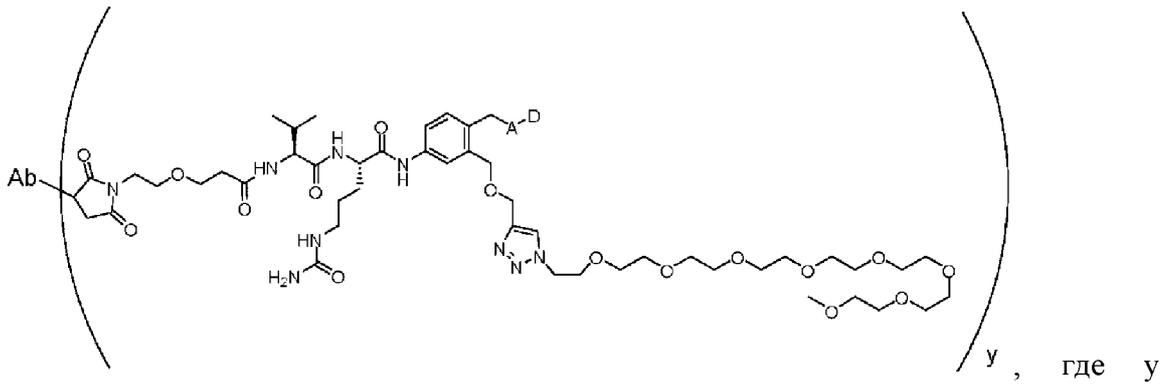
R является H, $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ и у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 78. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



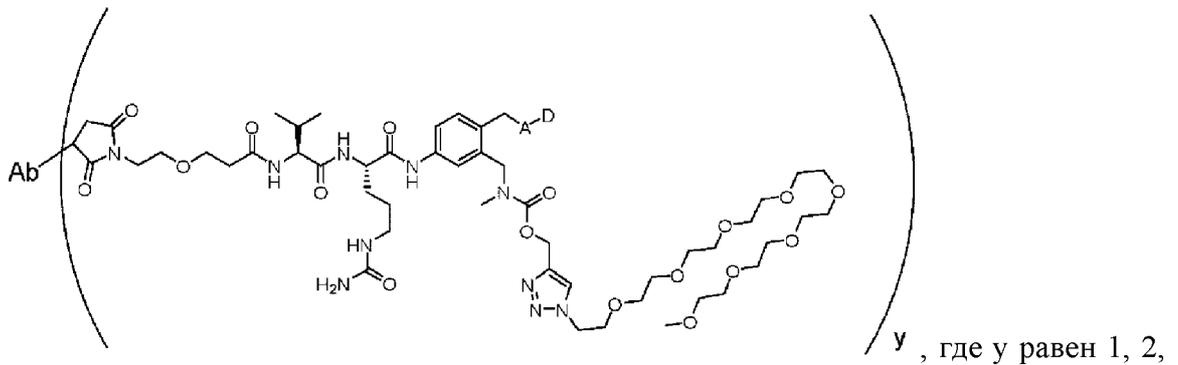
Xb является $-\text{CH}_2-$, $-\text{OCH}_2-$, $-\text{NHCH}_2-$ или $-\text{NRCH}_2-$ и каждый R независимо равен H, $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ и у равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 79. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



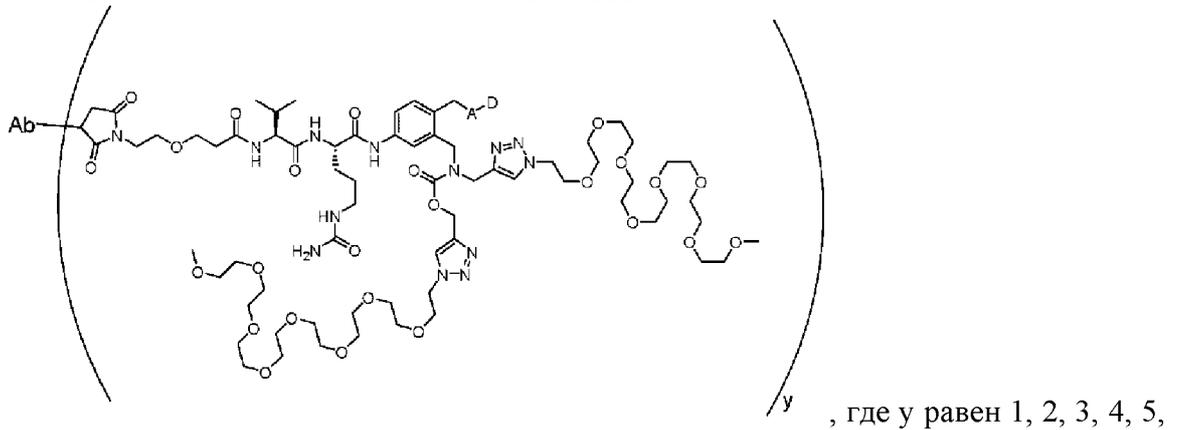
равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 80. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



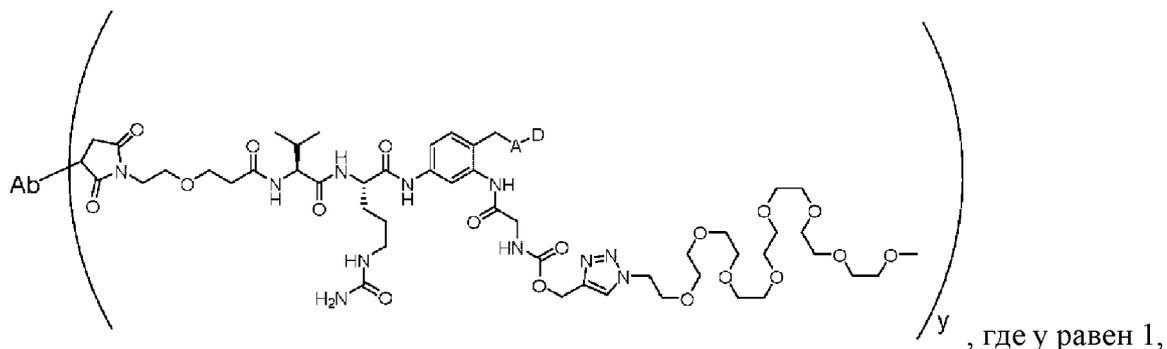
3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 81. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



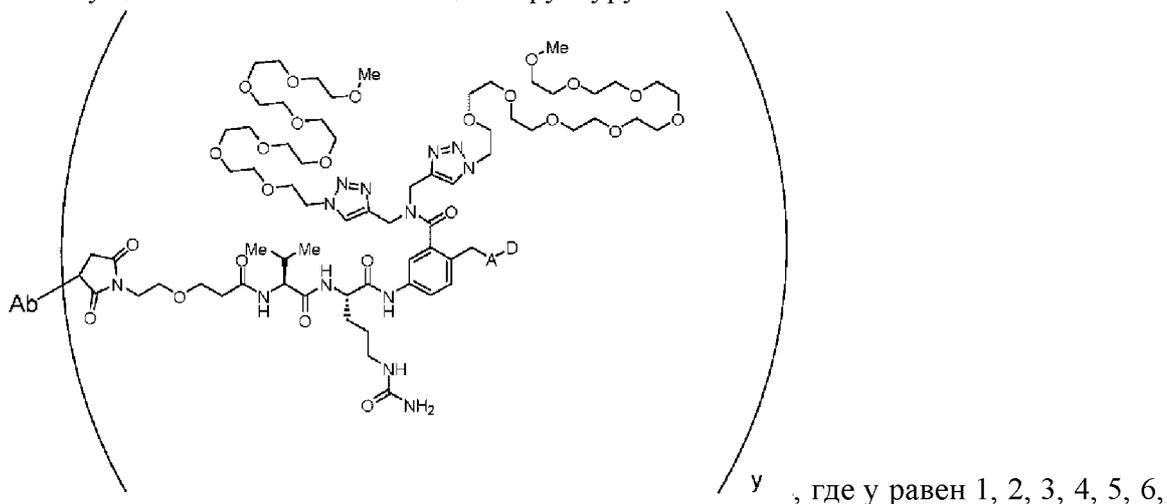
6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

Вариант осуществления 82. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

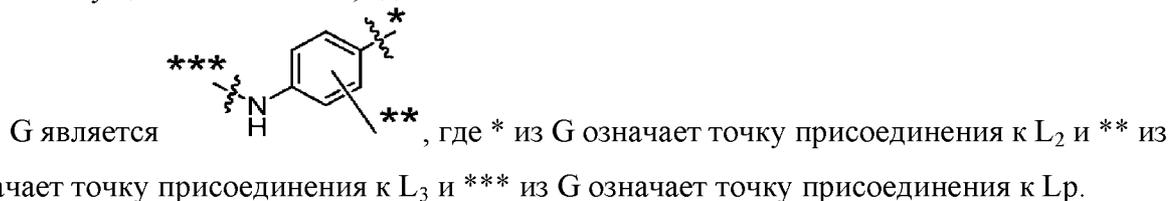
Вариант осуществления 83. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 имеющий структуру:



7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16.

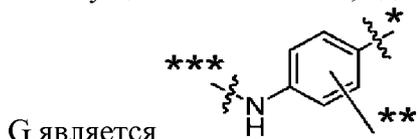
Некоторые аспекты и примеры групп линкер-лекарственное средство, линкеров и конъюгатов антитело-лекарственное средство по изобретению представлены в следующем списке дополнительных перечисленных вариантов осуществления. Следует понимать, что признаки, указанные в каждом варианте осуществления, могут быть объединены с другими указанными признаками для получения дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Вариант осуществления 84. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-2 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-39 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-61, где:



Вариант осуществления 85. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-2 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-39 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из

вариантов осуществления 60-61, где:



G является , где * из G означает точку присоединения к L₂ и ** из G означает точку присоединения к L₃ и *** из G означает точку присоединения к L_p.

Вариант осуществления 86. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70, где:

L₁ является *-C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-**, *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-**,
 *-C(=O)(CH₂)_m-**, *-C(=O)NH((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-**,
 *-C(=O)O(CH₂)_mSSC(R³)₂(CH₂)_mC(=O)NR³(CH₂)_mNR³C(=O)(CH₂)_m-**,
 *-C(=O)O(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m-**, *-C(=O)(CH₂)_mNH(CH₂)_m-**,
 *-C(=O)(CH₂)_mNH(CH₂)_nC(=O)-**, *-C(=O)(CH₂)_mX₁(CH₂)_m-**,
 *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-**, *-C(=O)(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_n-**,
 *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-**,
 *-C(=O)(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-**,
 *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-**,
 *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_m-**, *-C(=O)(CH₂)_mC(R³)₂-** или *-C(=O)(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m-**, где * из L₁ означает точку присоединения к L_p и ** из L₁ означает точку присоединения к R¹ если присутствуют или ** из L₁ означает точку присоединения к R¹⁰⁰ если присутствуют.

Вариант осуществления 87. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70, где:

L₁ является *-C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-**, *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-**, *-C(=O)(CH₂)_m-**,
 *-C(=O)NH((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-**, *-C(=O)(CH₂)_mNH(CH₂)_m-**, *-C(=O)(CH₂)_mNH(CH₂)_nC(=O)-**, *-C(=O)(CH₂)_mNHC(=O)(CH₂)_n-**, *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-**, *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_m-**, *-C(=O)(CH₂)_mC(R³)₂-** или *-C(=O)(CH₂)_mC(=O)NH(CH₂)_m-**, где * из L₁ означает точку присоединения к L_p и ** из L₁ означает точку присоединения к R¹ если присутствуют или ** из L₁ означает точку присоединения к R¹⁰⁰ если присутствуют.

Вариант осуществления 88. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70, где:

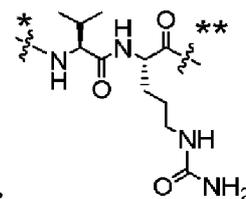
L₁ является *-C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-**, *-C(=O)((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-**, *-C(=O)(CH₂)_m-**,
 *-C(=O)NH((CH₂)_mO)_t(CH₂)_n-**, *-C(=O)(CH₂)_mNH(CH₂)_m-**, *-

Вариант осуществления 95. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-94, где Lp является двухвалентным пептидным спейсером содержащим аминокислотный остаток, выбранный из глицина, валина, цитруллина, лизина, изолейцина, фенилаланина, метионина, аспарагина, пролина, аланина, лейцина, триптофана и тирозина.

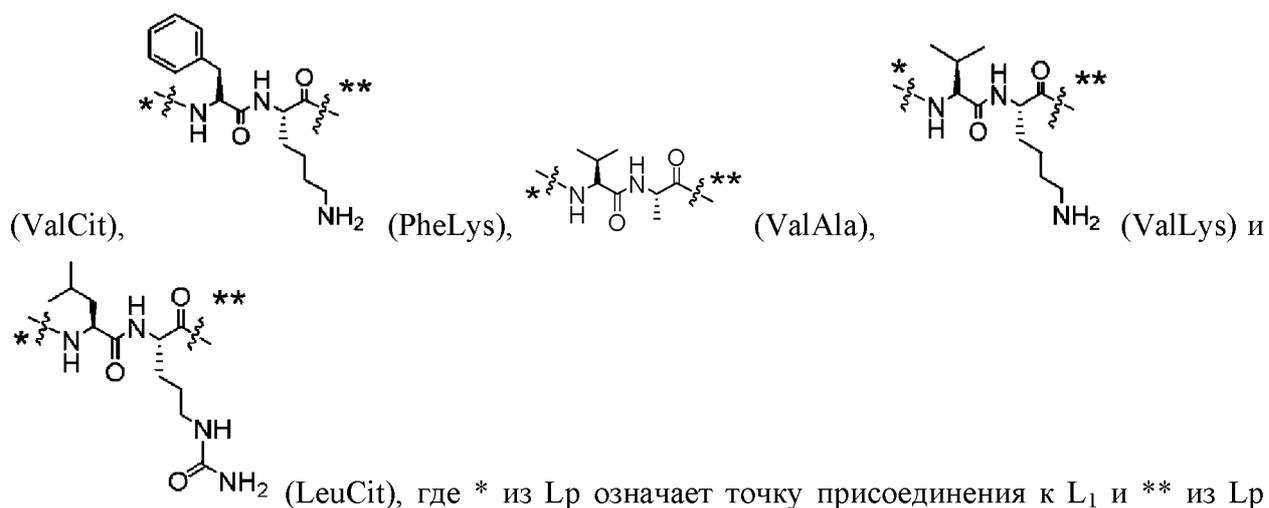
Вариант осуществления 96. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-95, где Lp является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех аминокислотных остатков.

Вариант осуществления 97. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-96, где Lp является двухвалентным пептидом, содержащим от двух до четырех аминокислотных остатков, где каждый независимо выбран из глицина, валина, цитруллина, лизина, изолейцина, фенилаланина, метионина, аспарагина, пролина, аланина, лейцина, триптофана и тирозина.

Вариант осуществления 98. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-97, где:

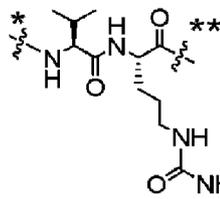


Lp является двухвалентным пептидным спейсером, выбранным из



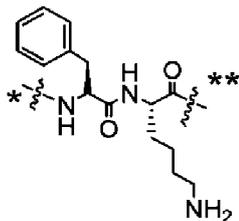
означает точку присоединения к -NH- группой формулы (B') или ** из Lp означает точку присоединения к G формулы (A').

Вариант осуществления 99. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-98, где:



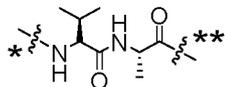
Lp является CC(C)C(=O)NCC(C)(O)C(=O)NCCN (ValCit), где * из Lp означает точку присоединения к L₁ и ** из Lp означает точку присоединения к -NH- группой формулы (B') или ** из Lp означает точку присоединения к G формулы (A').

Вариант осуществления 100. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-98, где:



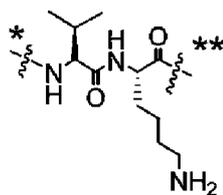
Lp является C1=CC=C(C=C1)CC(C(=O)NCCCCN)C(=O)N (PheLys), где * из Lp означает точку присоединения к L₁ и ** из Lp означает точку присоединения к -NH- группой формулы (B') или ** из Lp означает точку присоединения к G формулы (A').

Вариант осуществления 101. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-98, где:



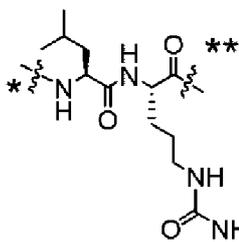
Lp является CC(C)C(=O)NCC(C)C(=O)N (ValAla), где * из Lp означает точку присоединения к L₁ и ** из Lp означает точку присоединения к -NH- группой формулы (B') или ** из Lp означает точку присоединения к G формулы (A').

Вариант осуществления 102. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-98, где:



Lp является CC(C)C(N)C(=O)NCCCCN (ValLys), где * из Lp означает точку присоединения к L₁ и ** из Lp означает точку присоединения к -NH- группой формулы (B') или ** из Lp означает точку присоединения к G формулы (A').

Вариант осуществления 103. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-98, где:



Lp является CC(C)C(N)C(=O)NCCCNC(=O)N (LeuCit), где * из Lp означает точку присоединения к L₁ и ** из Lp означает точку присоединения к -NH- группой формулы (B') или ** из Lp означает точку присоединения к G формулы (A').

Вариант осуществления 104. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-103, где L₂ является связью, метиленом или C₂-C₃алкениленом.

Вариант осуществления 105. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-104, где L₂ является связью или метиленом.

Вариант осуществления 106. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-105, где L₂ является связью.

Вариант осуществления 107. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-105, где L₂ является метиленом.

Вариант осуществления 108. Соединение формулы (A') или любого из вариантов

осуществления 1-30 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (С') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (Е') или любого из вариантов осуществления 60-83 или любого из вариантов осуществления 84-107, где:

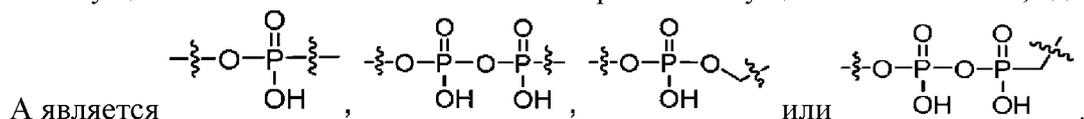
А является связью, $-\text{OC}(=\text{O})-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$, где каждый R^a независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или а C_3 - C_8 циклоалкила.

Вариант осуществления 109. Соединение формулы (А') или любого из вариантов осуществления 1-30 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (С') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (Е') или любого из вариантов осуществления 60-83 или любого из вариантов осуществления 84-107, где А является связью или $-\text{OC}(=\text{O})$.

Вариант осуществления 110. Соединение формулы (А') или любого из вариантов осуществления 1-30 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (С') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (Е') или любого из вариантов осуществления 60-83 или любого из вариантов осуществления 84-109, где А является связью.

Вариант осуществления 111. Соединение формулы (А') или любого из вариантов осуществления 1-30 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (С') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (Е') или любого из вариантов осуществления 60-83 или любого из вариантов осуществления 84-109, где А является $-\text{OC}(=\text{O})$.

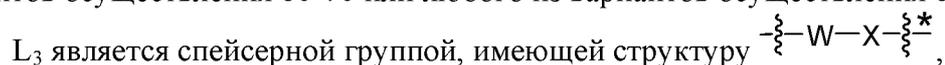
Вариант осуществления 112. Соединение формулы (А') или любого из вариантов осуществления 1-30 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (С') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (Е') или любого из вариантов осуществления 60-83 или любого из вариантов осуществления 84-107, где:



Вариант осуществления 113. Соединение формулы (А') или любого из вариантов осуществления 1-30 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (С') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (Е') или любого из вариантов осуществления 60-83 или любого из вариантов осуществления 84-107, где:

А является $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$, где каждый R^a независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила или а C_3 - C_8 циклоалкила.

Вариант осуществления 114. Соединение формулы (А') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (С') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (Е') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-113, где:



где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NH}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-^{**}$, $-\text{NHS}(\text{O})_2-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$ или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H , C_1 - C_6 алкил или C_3 - C_8 циклоалкил и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазолилом или $^{***}\text{-CH}_2\text{-триазолил-}^*$, где *** из X означает точку присоединения к W и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 .

Вариант осуществления 115. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-114, где:

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\overset{\xi}{\xi}-\text{W}-\text{X}-\overset{\xi}{\xi}^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NH}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-^{**}$, $-\text{NHS}(\text{O})_2-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$ или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H , C_1 - C_6 алкил или C_3 - C_8 циклоалкил и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 .

Вариант осуществления 116. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-115, где:

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\overset{\xi}{\xi}-\text{W}-\text{X}-\overset{\xi}{\xi}^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NH}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-^{**}$, $-\text{NHS}(\text{O})_2-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$ или $-\text{NH}-$, где каждый

R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкил или C_3 - C_8 циклоалкил и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является триазилом, где *** из X означает точку присоединения к W и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 .

Вариант осуществления 117. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-115, где:

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NH}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-^{**}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-^{**}$, $-\text{NHS}(\text{O})_2-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$ или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкил или C_3 - C_8 циклоалкил и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является $^{***}-\text{CH}_2$ -триазилил-*, где *** из X означает точку присоединения к W и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 .

Вариант осуществления 118. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-115, где:

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\xi-W-X-\xi^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкил или C_3 - C_8 циклоалкил и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью, триазилом или $^{***}-\text{CH}_2$ -триазилил-*, где *** из X означает точку присоединения к W и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 .

Вариант осуществления 119. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из

вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-115, где:

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\frac{\xi}{\xi}-W-X-\frac{\xi}{\xi}^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкил или C_3 - C_8 циклоалкил и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является связью;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 .

Вариант осуществления 120. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-115, где:

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\frac{\xi}{\xi}-W-X-\frac{\xi}{\xi}^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкил или C_3 - C_8 циклоалкил и где ** из W означает точку присоединения к X;

X является триазилом, где *** из X означает точку присоединения к W и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 .

Вариант осуществления 121. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-115, где:

L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $-\frac{\xi}{\xi}-W-X-\frac{\xi}{\xi}^*$,

где

W является $-\text{CH}_2\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-^{**}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-^{**}$, где каждый R^b независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкил или C_3 - C_8 циклоалкил и где ** из W означает точку присоединения к X;

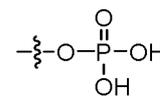
X является $^{***}-\text{CH}_2$ -триазилил-, где *** из X означает точку присоединения к W и * из X означает точку присоединения к R^2 ;

и

* из L_3 означает точку присоединения к R^2 .

Вариант осуществления 122. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из

вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-121, где R² является гидрофильной группой, выбранной из полиэтиленгликоля, полиалкиленгликоля, сахара, олигосахаридов, полипептида или C₂-C₆алкила, замещенного 1-3 группами.



Вариант осуществления 123. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где R² является сахаром.

Вариант осуществления 124. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где R² является олигосахаридом.

Вариант осуществления 125. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где R² является полипептидом.

Вариант осуществления 126. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где R² является полиалкиленгликолем.

Вариант осуществления 127. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где R² является полиалкиленгликолем, имеющим структуру $-(\text{O}(\text{CH}_2)_m)_t\text{R}'$, где R' является OH, OCH₃ или OCH₂CH₂C(=O)OH, m равно 1-10 и t равно 4-40.

Вариант осуществления 128. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где R² является полиалкиленгликолем, имеющим структуру $-((\text{CH}_2)_m\text{O})_t\text{R}''$, где R'' является H, CH₃ или CH₂CH₂C(=O)OH, m равно 1-10 и t равно 4-40.

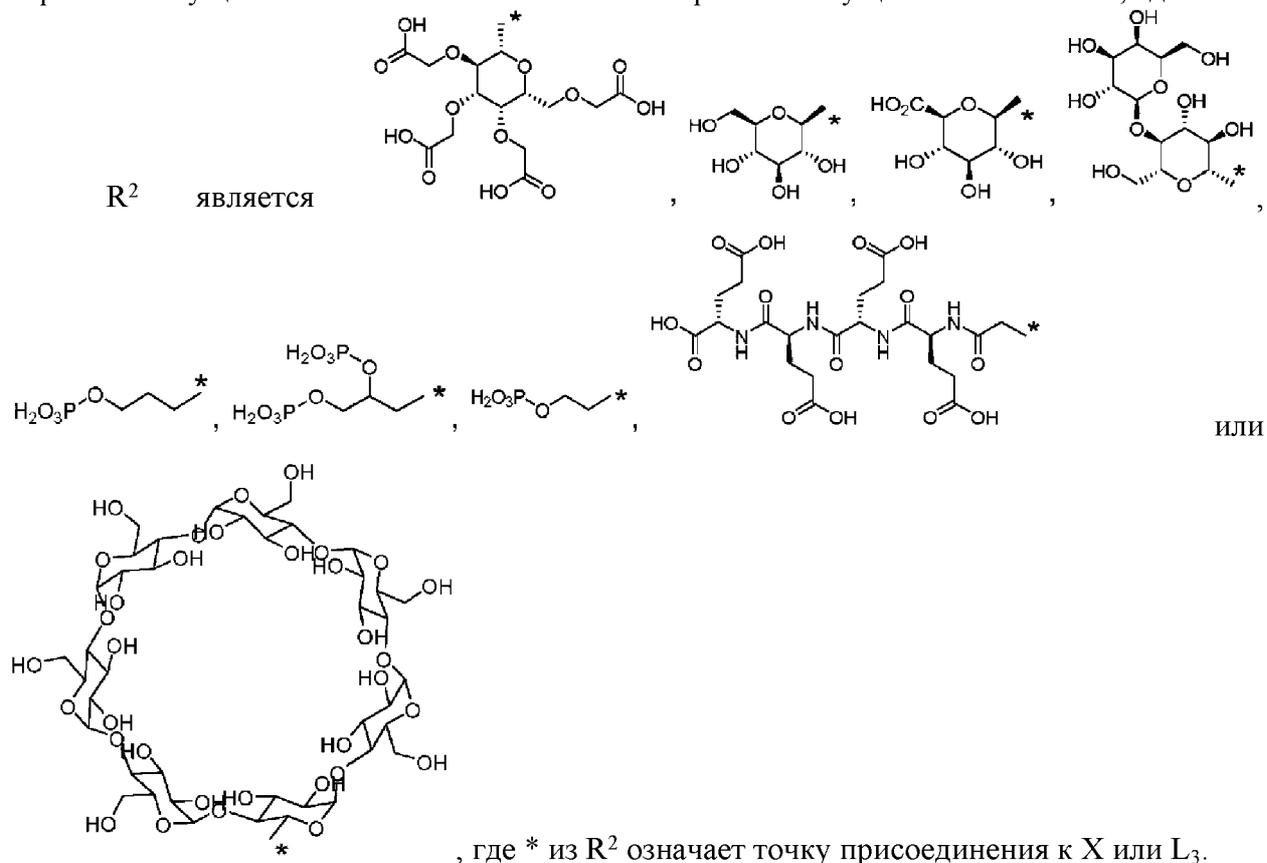
Вариант осуществления 129. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или

любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где R² является полиэтиленгликолем.

Вариант осуществления 130. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где R² является полиэтиленгликолем, имеющим структуру $-(OCH_2CH_2)_tR'$, где R' является OH, OCH₃ или OCH₂CH₂C(=O)OH и t равно 4-40,

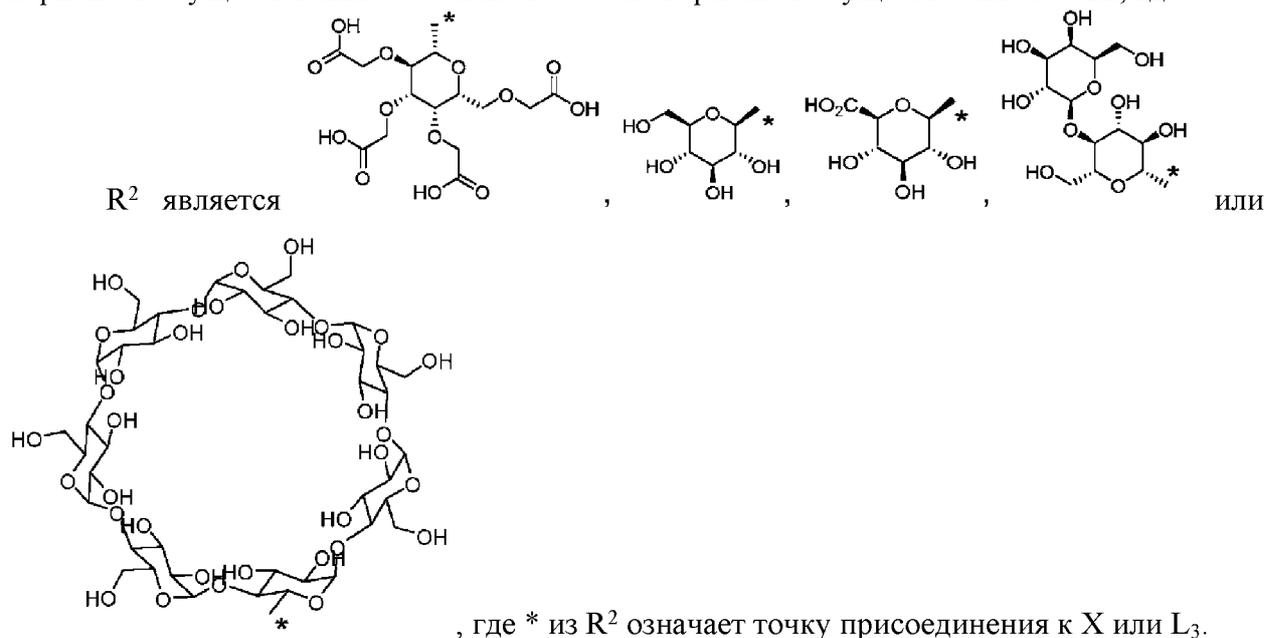
Вариант осуществления 131. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где R² является полиэтиленгликолем, имеющим структуру $-(CH_2CH_2O)_tR''$, где R'' является H, CH₃ или CH₂CH₂C(=O)OH и t равно 4-40.

Вариант осуществления 132. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где:

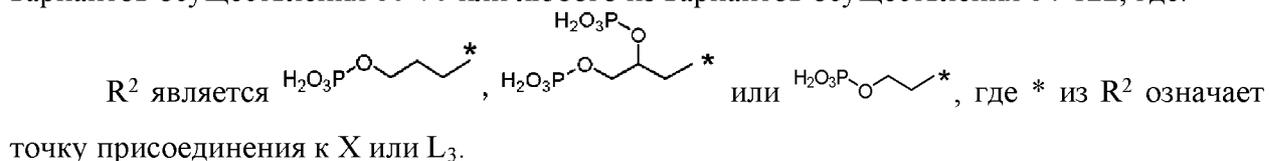


Вариант осуществления 133. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из

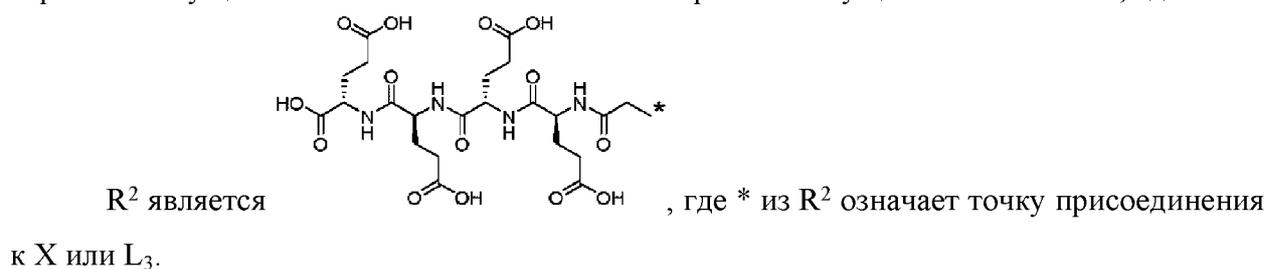
вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где:



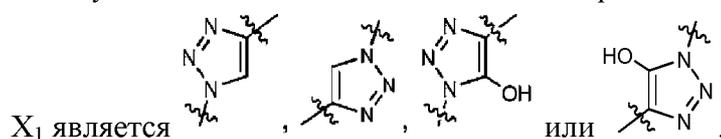
Вариант осуществления 134. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где:



Вариант осуществления 135. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-122, где:



Вариант осуществления 136. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, линкер формулы (C') или любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-135, где:



Вариант осуществления 137. Соединение формулы (A') или любого из вариантов

любого из вариантов осуществления 32-46 и иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-141, где:

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и 18.

Вариант осуществления 145. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.

Вариант осуществления 146. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

Вариант осуществления 147. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Вариант осуществления 148. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

Вариант осуществления 149. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Вариант осуществления 150. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 1, 2, 3 или 4.

Вариант осуществления 151. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 1 или 2.

Вариант осуществления 152. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 2.

Вариант осуществления 153. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 4.

Вариант осуществления 154. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 6.

Вариант осуществления 155. Иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов осуществления 84-144, где u равен 8.

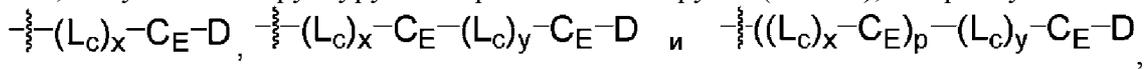
Вариант осуществления 156. Соединение формулы (A') или любого из вариантов осуществления 1-30 или его фармацевтически приемлемая соль, иммуноконъюгат формулы (E') или любого из вариантов осуществления 60-70 или любого из вариантов

осуществления 84-155, где D является ингибитором MCI-1, когда выделяется из иммуноконъюгатов.

Другие линкерные группы

Другие примеры линкерных групп, которые подходят для получения ADC или иммуноконъюгатов ингибитора MCI-1, описанных в настоящем документе, включают описанные в публикациях международных заявок, таких как WO2018200812, WO2017214456, WO2017214458, WO2017214462, WO2017214233, WO2017214282, WO2017214301, WO2017214322, WO2017214335, WO2017214339, WO2016094509, WO2016094517 и WO2016094505, содержание каждой из которых включено посредством ссылки полностью.

Например, иммуноконъюгаты ингибиторов MCI-1, описанные в настоящем документе, могут иметь структуру линкер-полезная нагрузка (“-L-D”), выбранную из:



где:

Lc является линкерным компонентом, и каждый Lc независимо выбран из линкерного компонента, описанного в настоящем документе;

x является целым числом, выбранным из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20;

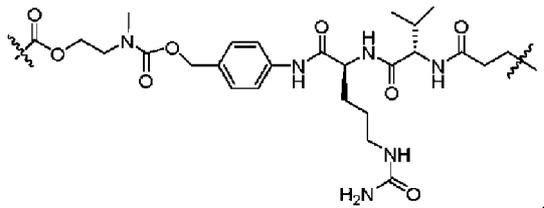
y является целым числом, выбранным из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20;

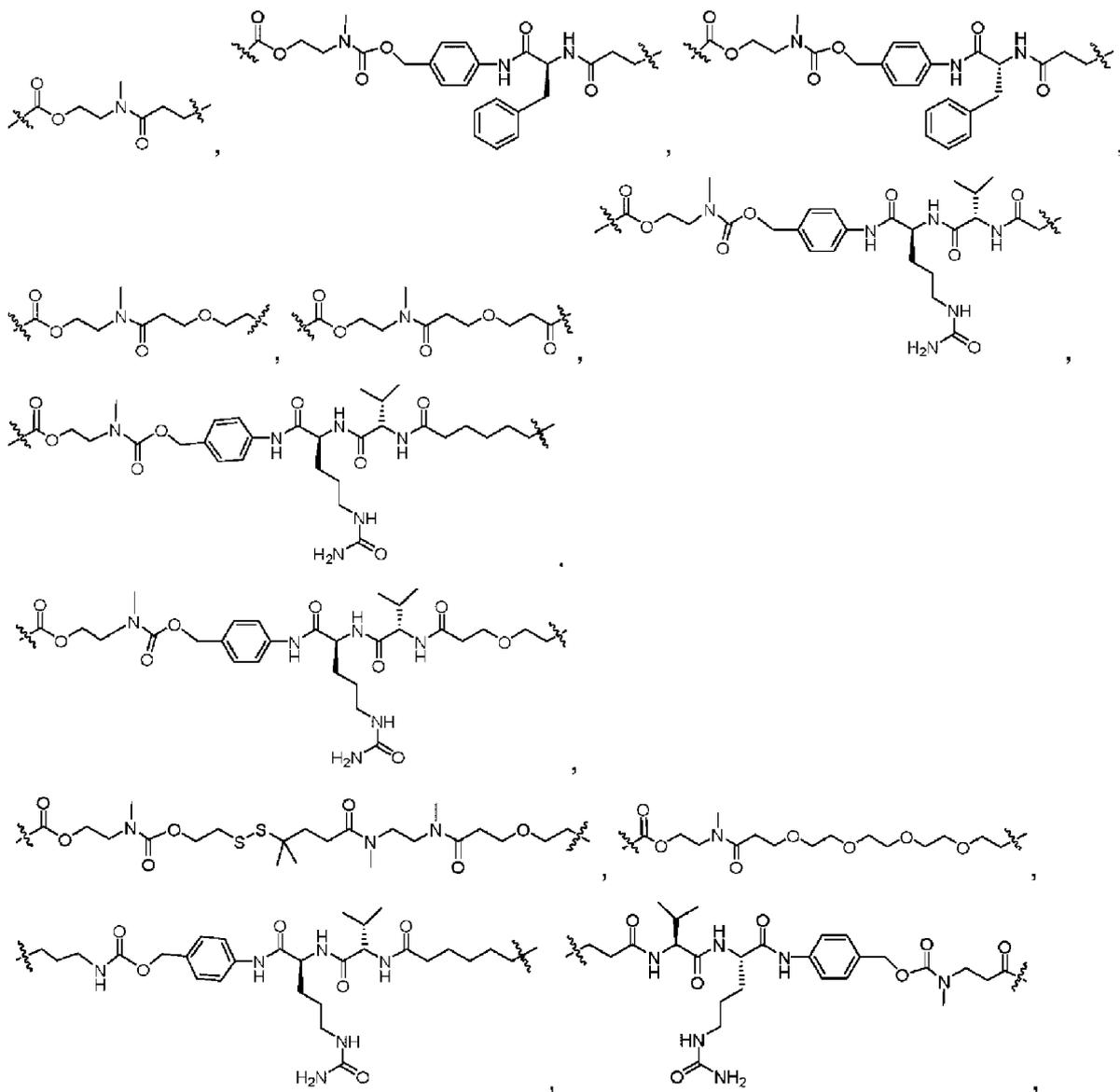
p является целым числом, выбранным из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

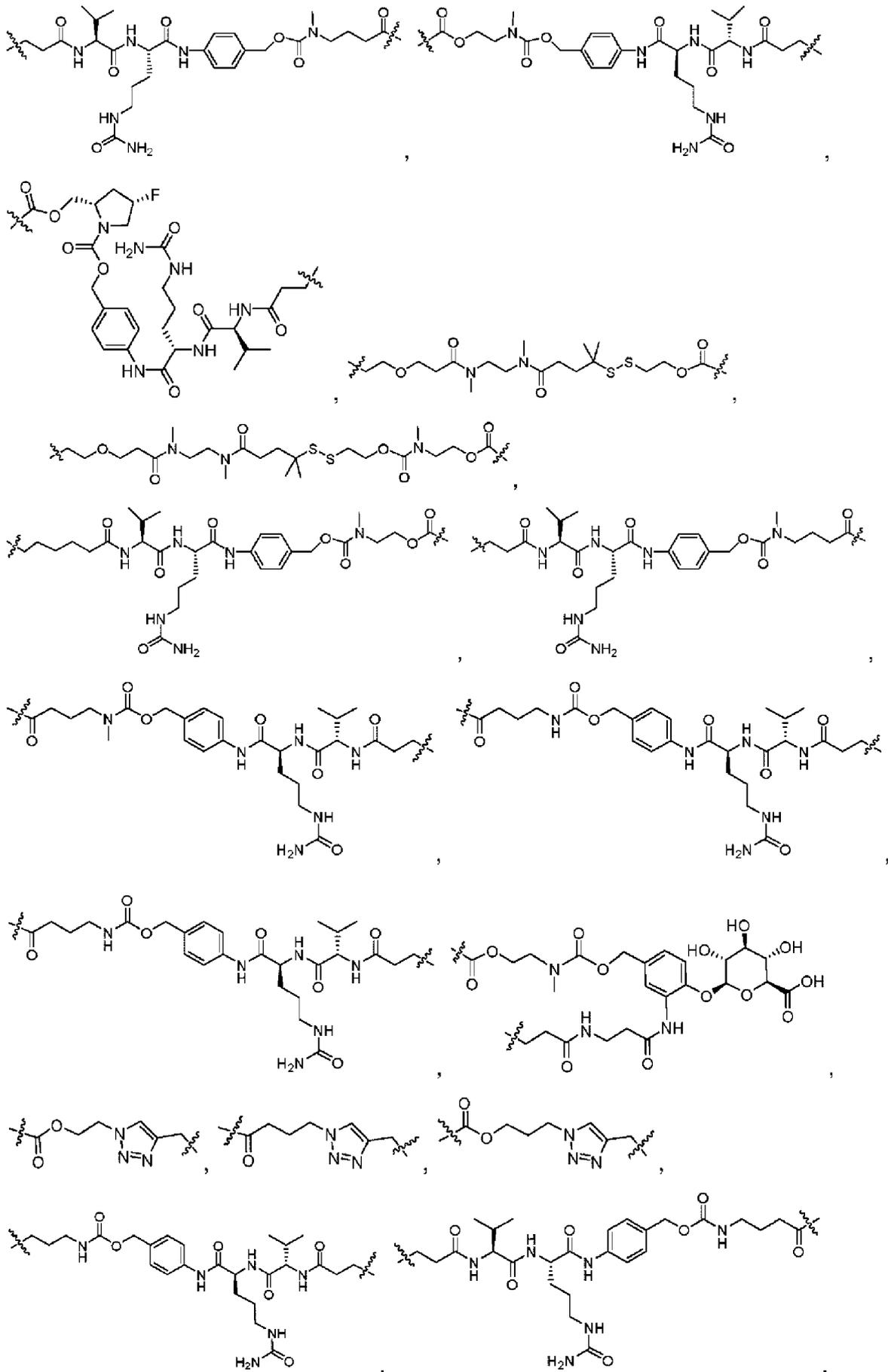
D является ингибитором MCI-1, описанным в настоящем документе;

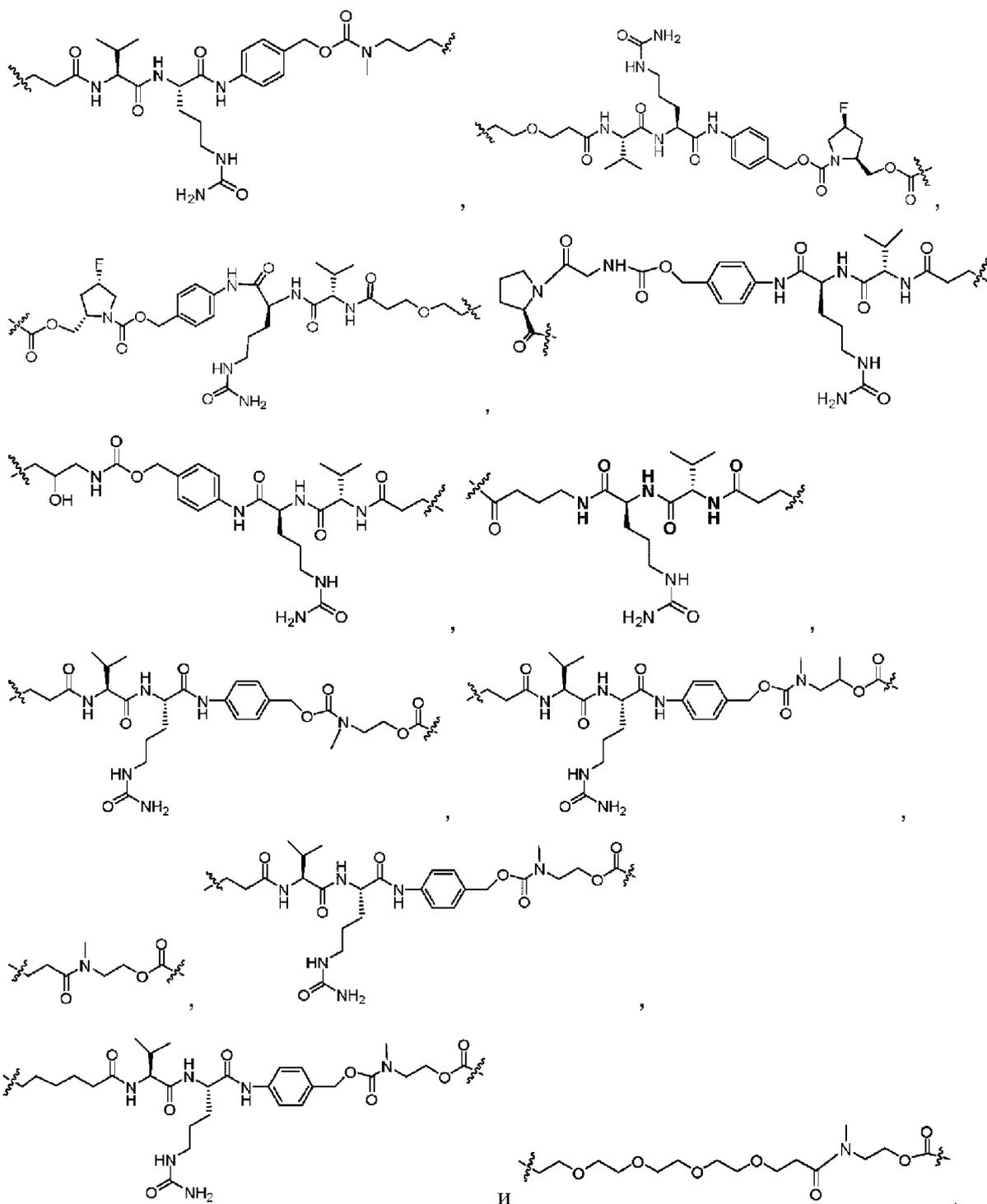
и каждый элемент расщепления (C_E) независимо выбран из саморасщепляющегося спейсера и группы, которая восприимчива к расщеплению, выбранному из кислотно-индуцированного расщепления, пептидаза-индуцированного расщепления, эстераза-индуцированного расщепления, гликозидаза-индуцированного расщепления, фосфодиэстераза-индуцированного расщепления, фосфатаза-индуцированного расщепления, протеаза-индуцированного расщепления, липаза-индуцированного расщепления или расщепление дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления, L имеет структуру, выбранную из следующих, или L содержит структурный компонент, выбранный из следующих:

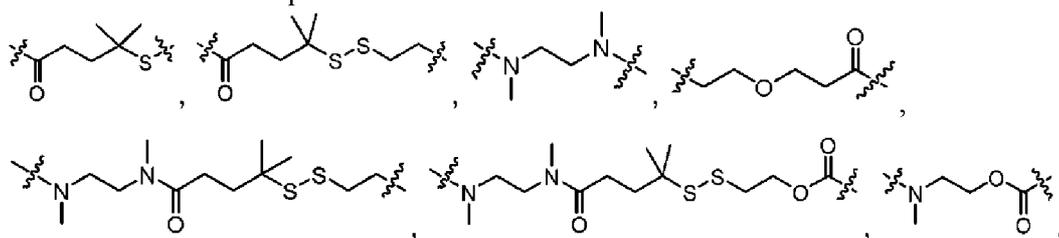


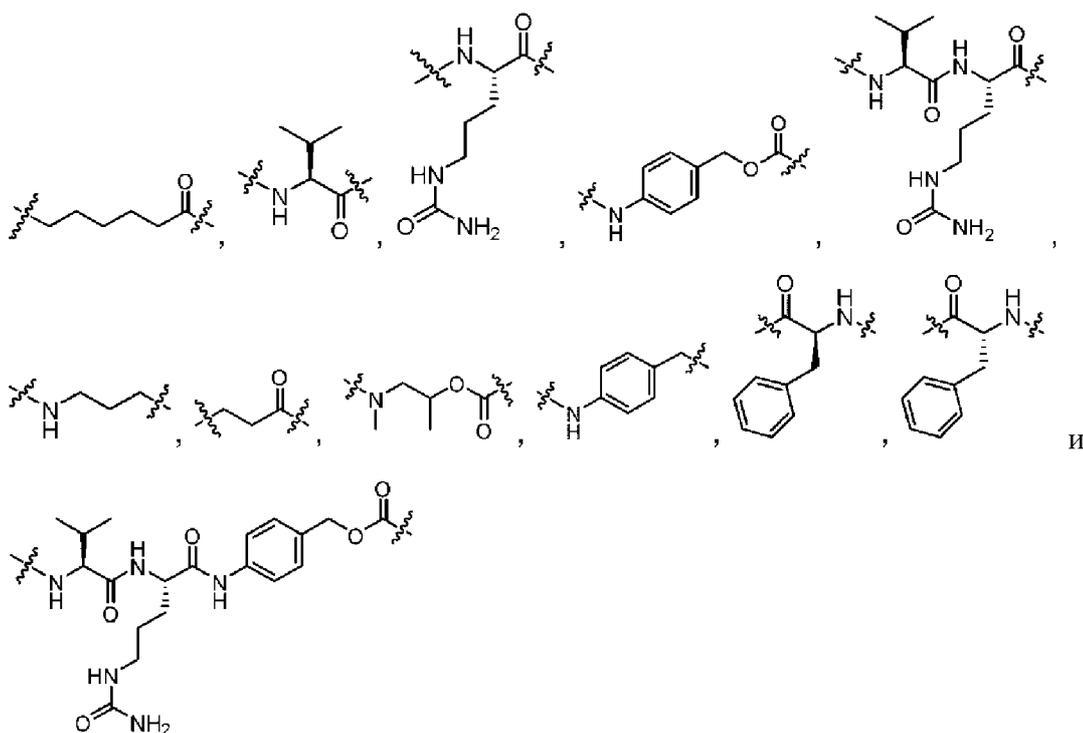






В некоторых вариантах осуществления, Lc является линкерным компонентом, и каждый Lc независимо выбран из





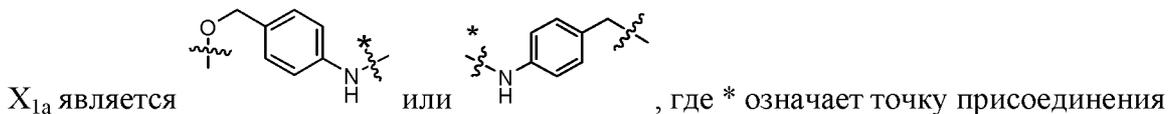
В некоторых вариантах осуществления, линкер L содержит линкерный компонент, который выбран из:

- **C(=O)O(CH₂)_mNR¹¹C(=O)(CH₂)_m-; -**C(=O)O(CH₂)_mNR¹¹C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-;
- **C(=O)O(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X_{1a}X_{2a}C(=O)(CH₂)_m-;
- **C(=O)OC(R¹²)₂(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X_{1a}X_{2a}C(=O)(CH₂)_m-;
- **C(=O)O(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X_{1a}X_{2a}C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-;
- **C(=O)O(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X_{1a}X_{2a}C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_mC(=O)-;
- **C(=O)O(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X₄C(=O)NR¹¹(CH₂)_mNR¹¹C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-;
- **C(=O)O(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X₅C(=O)(CH₂)_mNR¹¹C(=O)(CH₂)_m-;
- **C(=O)X₄C(=O)NR¹¹(CH₂)_mNR¹¹C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-;
- **C(=O)(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X_{1a}X_{2a}C(=O)(CH₂)_m-;
- **C(=O)O(CH₂)_mX₆C(=O)X_{1a}X_{2a}C(=O)(CH₂)_m-;
- **C(=O)(CH₂)_mNR¹¹C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m-
- **C(=O)O(CH₂)_mX₆C(=O)(CH₂)_m-; -**C(=O)O(CH₂)_mX₆C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-;
- **C(=O)O(CH₂)_mX₆C(=O)X_{1a}X_{2a}C(=O)(CH₂)_m-;
- **C(=O)O(CH₂)_mX₆C(=O)X_{1a}X_{2a}C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-;
- **C(=O)O(CH₂)_mX₆C(=O)X_{1a}X_{2a}C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_mC(=O)-;
- **C(=O)O(CH₂)_mX₆C(=O)X₄C(=O)NR¹¹(CH₂)_mNR¹¹C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-;
- **C(=O)X₄C(=O)X₆(CH₂)_mNR¹¹C(=O)(CH₂)_mO(CH₂)_m-;
- **C(=O)(CH₂)_mX₆C(=O)X_{1a}X_{2a}C(=O)(CH₂)_m-;
- **C(=O)O((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X₅C(=O)(CH₂)_m-;
- **C(=O)O((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X₅C(=O)(CH₂)_mNR¹¹C(=O)(CH₂)_m-;
- **C(=O)O((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X₅C(=O)(CH₂)_mX₃(CH₂)_m-;
- **C(=O)O((CH₂)_mO)_n(CH₂)_mNR¹¹C(=O)X₅C(=O)((CH₂)_mO)_n(CH₂)_m-;

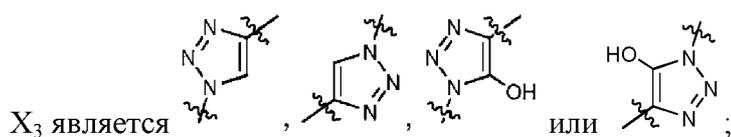
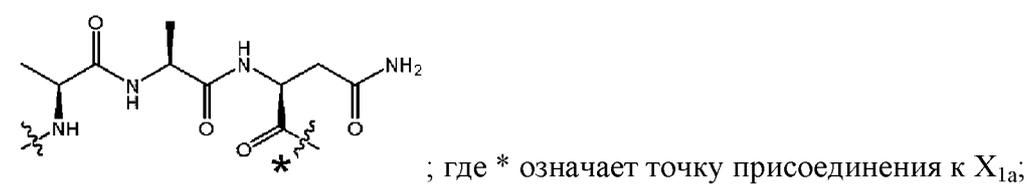
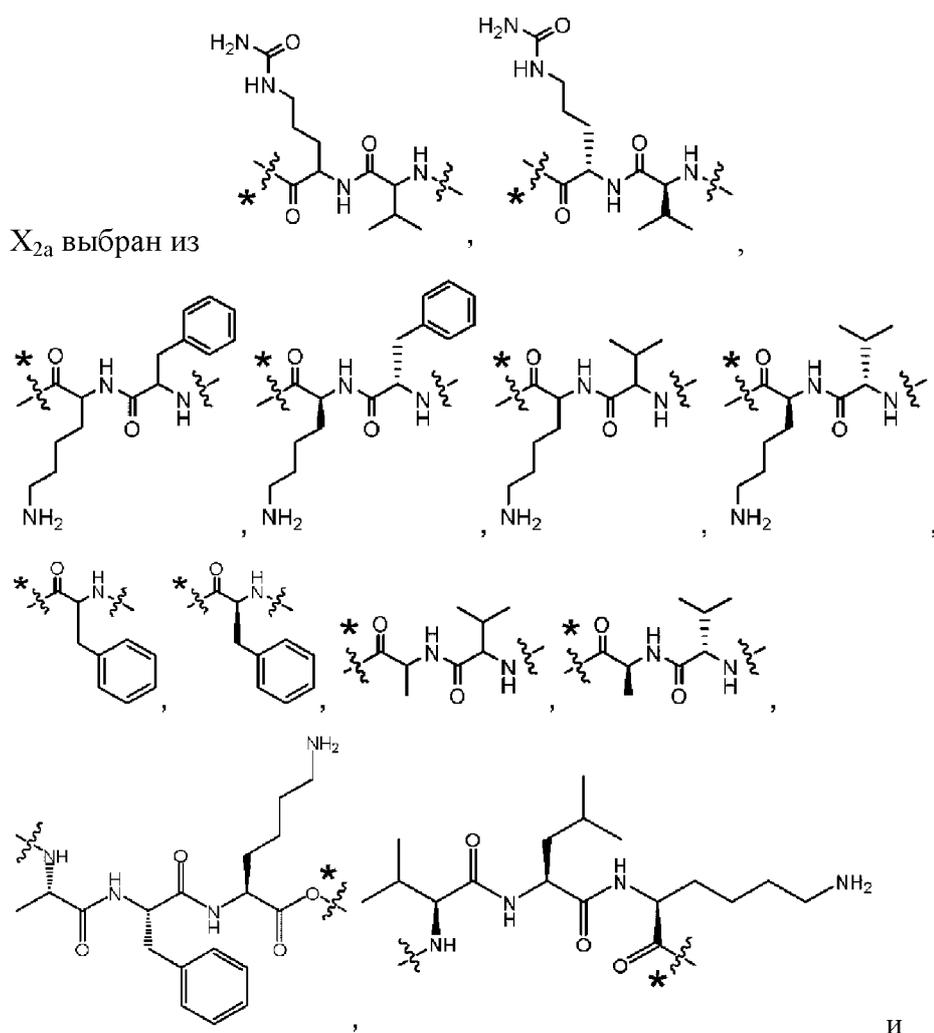


лекарственного средства (D) и другой конец может быть соединен с R¹⁰⁰, т.е. сочетающей группой, как описано в настоящем документе;

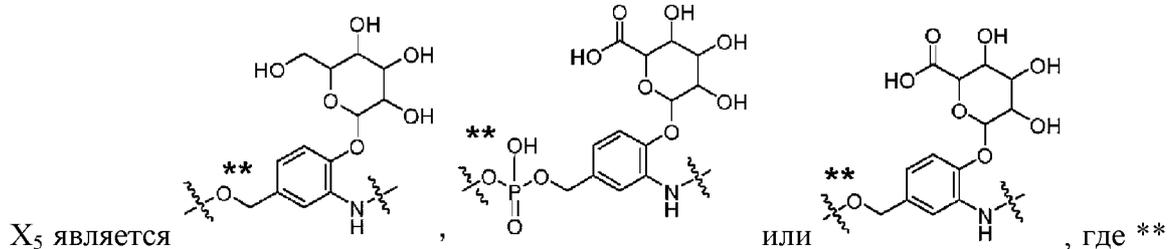
где:



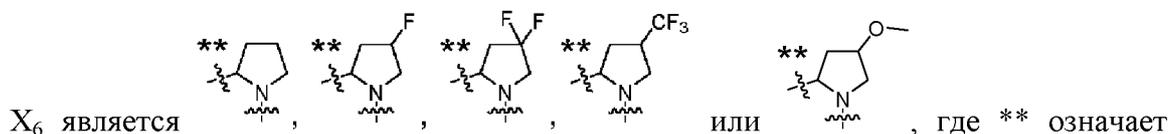
к X_{2a};



X_4 является $-(CH_2)_nSSC(R^{12})_2(CH_2)_n-$ или $-(CH_2)_nC(R^{12})_2SS(CH_2)_nO-$;



означает ориентацию в направлении группы лекарственного средства;



ориентацию в направлении группы лекарственного средства;

каждый R^{11} независимо выбран из H и C_1-C_6 алкила;

каждый R^{12} независимо выбран из H и C_1-C_6 алкила;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 и

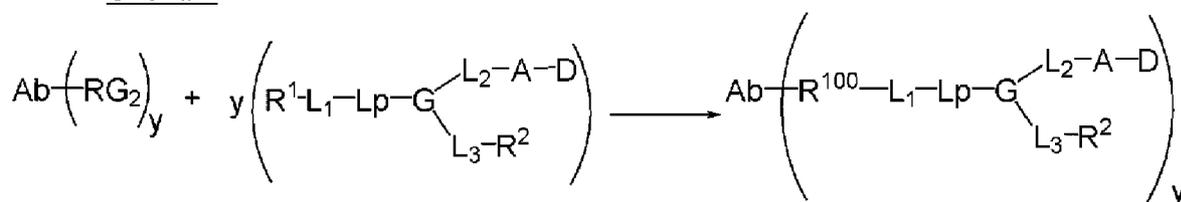
18.

Способы конъюгирования

В настоящем изобретении предлагаются различные способы конъюгирования групп линкер-лекарственное средство по изобретению с антителами или фрагментами антител для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство, которые содержат линкер, имеющий одну или несколько гидрофильных групп.

Общая схема реакции для образования конъюгата антитело-лекарственное средство формулы (E') показана на схеме 2 ниже:

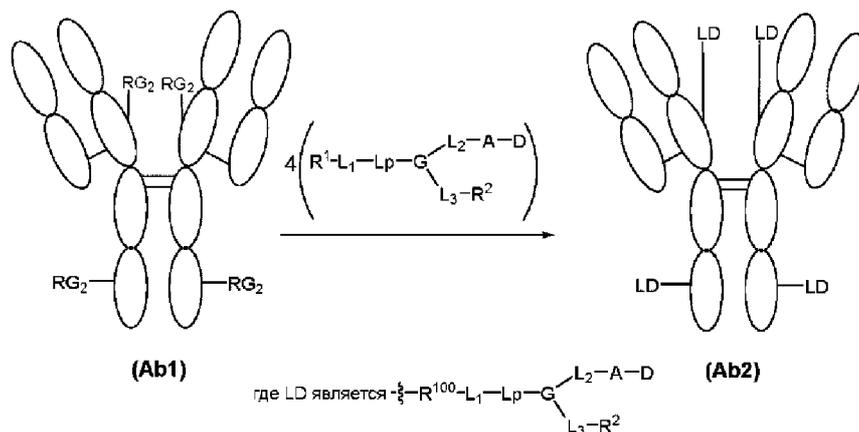
Схема 2



где: RG_2 является реакционноспособной группой, которая взаимодействует с совместимой R^1 группой с образованием соответствующей R^{100} группы (такие группы показаны в таблице 2 и таблице 3). D , R^1 , L_1 , L_p , Ab , y и R^{100} такие, как определены в настоящем документе.

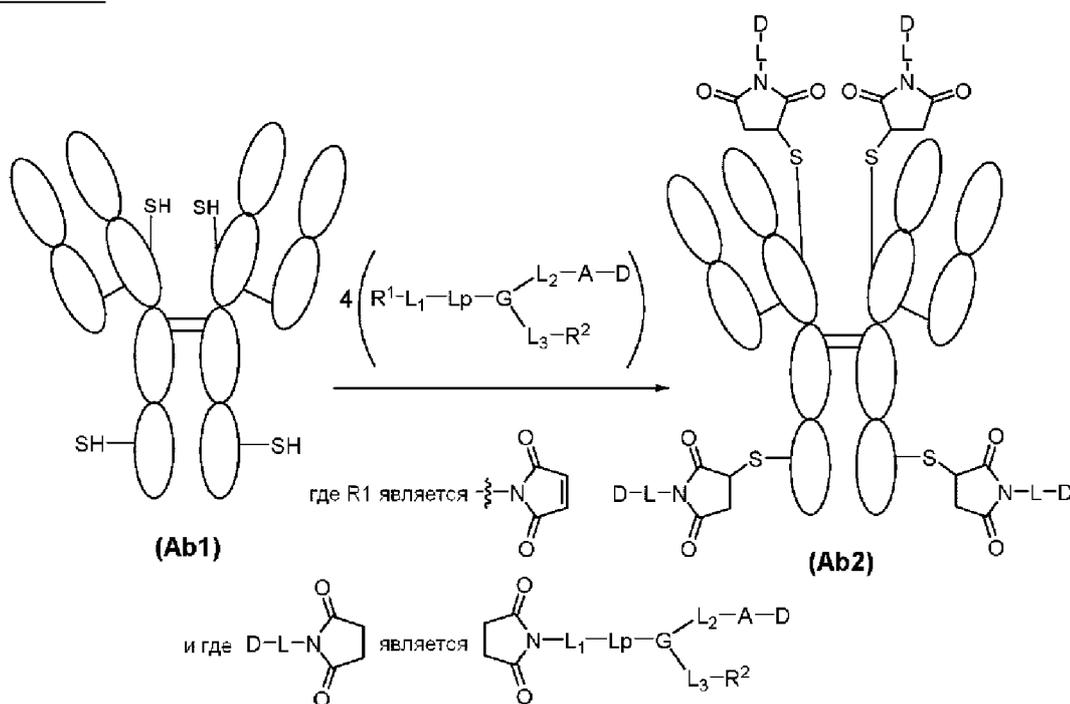
Схема 3 дополнительно иллюстрирует этот общий подход к получению конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (E'), где антитело содержит реакционноспособные группы (RG_2), которые взаимодействуют с R^1 группой (как определено в настоящем документе) для ковалентного присоединения группы линкер-лекарственное средство к антителу через R^{100} группу (как определено в настоящем документе). Только для целей иллюстрации, Схема 3 показывает антитело, имеющее четыре группы RG_2 .

Схема 3

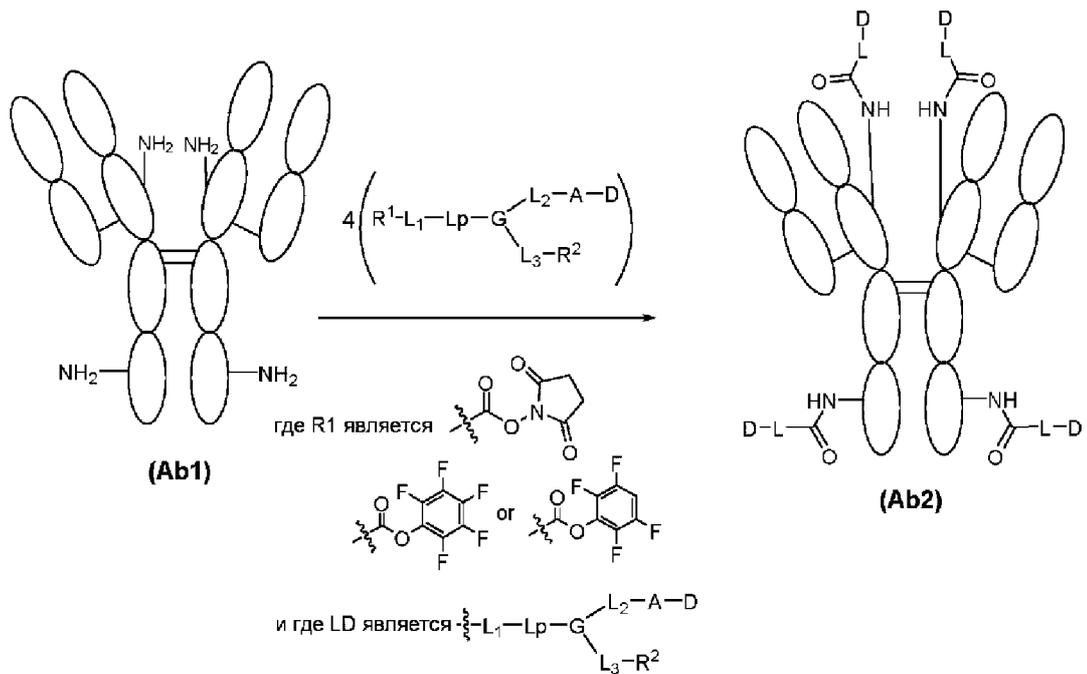


В одном аспекте, группы линкер-лекарственное средство конъюгируют с антителами через модифицированные цистеиновые остатки в антителах (см., например WO2014/124316). Схема 4 иллюстрирует этот подход к получению конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (E') где свободная тиольная группа создается из сконструированных цистеиновых остатков в антителе, взаимодействующем с R¹ группой (где R¹ является малеинимидом) для ковалентного присоединения группы линкер-лекарственное средство к антителу через R¹⁰⁰ группу (где R¹⁰⁰ является сукцинимидным кольцом). Только для целей иллюстрации, Схема 4 показывает антитело, имеющее четыре свободные тиольные группы.

Схема 4

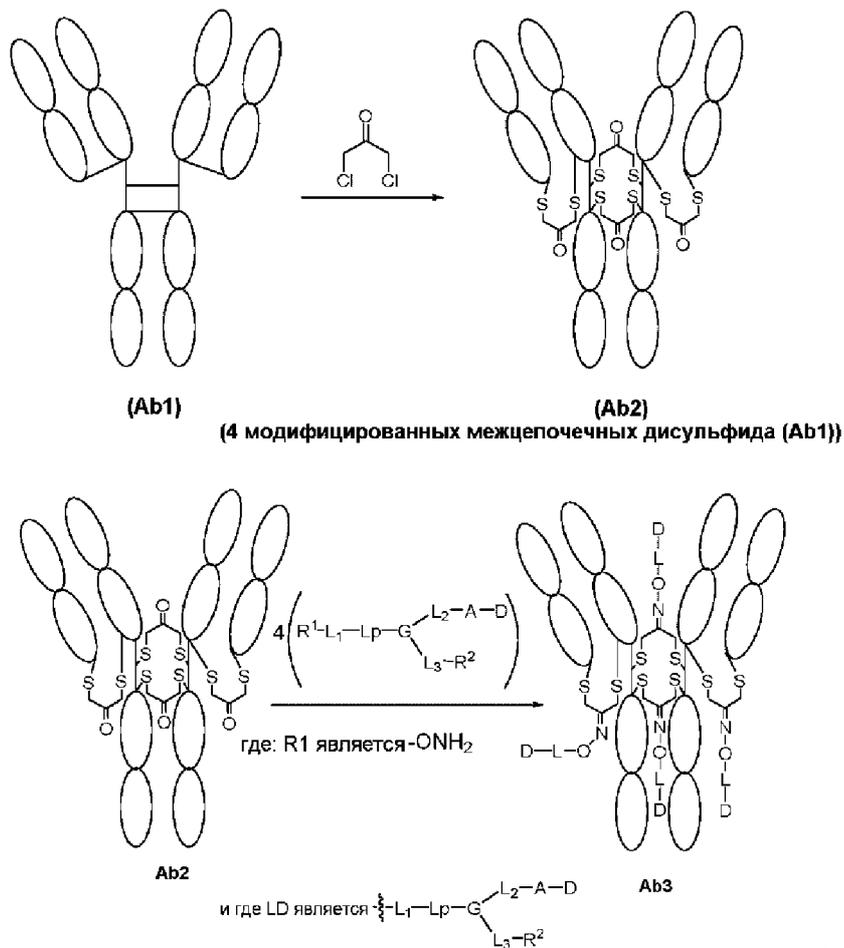


В другом аспекте, группы линкер-лекарственное средство конъюгируют с антителами через лизиновые остатки в антителах. Схема 5 иллюстрирует этот подход к получению конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (E') где свободная аминная группа из лизиновых остатков в антителе взаимодействует с R¹ группой (где R¹ является сложным эфиром NHS, пентафторфенилом или тетрафторфенилом) для ковалентного присоединения группы линкер-лекарственное средство к антителу через R¹⁰⁰ группу (где R¹⁰⁰ является амидом). Только для целей иллюстрации, Схема 5 показывает антитело, имеющее четыре аминные группы.



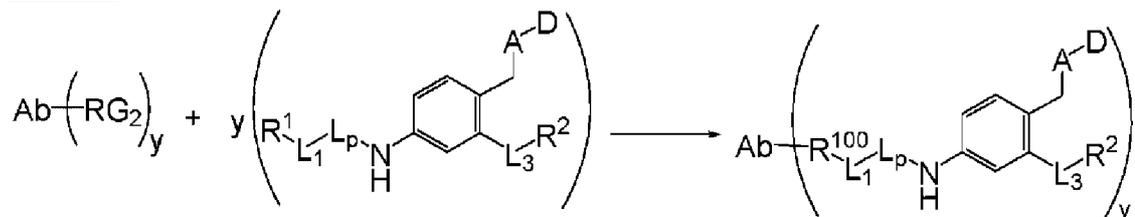
В другом аспекте, группы линкер-лекарственное средство конъюгируют с антителами через образование оксимного мостика на существующих в природе дисульфидных мостиках антитела. Оксимный мостик создают сначала образованием кетонового мостика восстановлением межцепочечного дисульфидного мостика антитела и повторным созданием мостика с применением 1,3-дигалоацетона (например, 1,3-дихлорацетона). последующая реакция с группой линкер-лекарственное средство, содержащей гидроксилламин, создает оксимную связь (оксимный мостик), который присоединяет группу линкер-лекарственное средство к антителу (см., например WO2014/083505). Схема 6 иллюстрирует подход к получению конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (E').

Схема 6



Общая схема реакции получения конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (F') показана на Схеме 7 ниже:

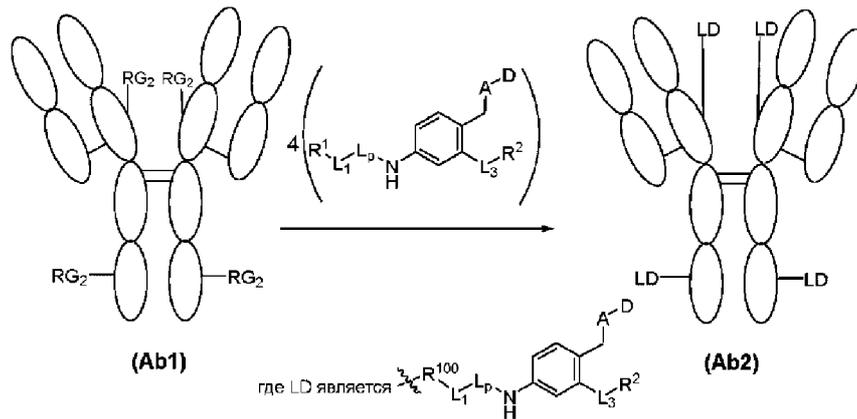
Схема 7



где: RG_2 является реакционноспособной группой, которая взаимодействует с совместимой R^1 группой с получением соответствующей R^{100} группы (такие группы показаны в таблице 2 и таблице 3). D , R^1 , L_1 , L_p , Ab , y и R^{100} такие, как определены в настоящем документе.

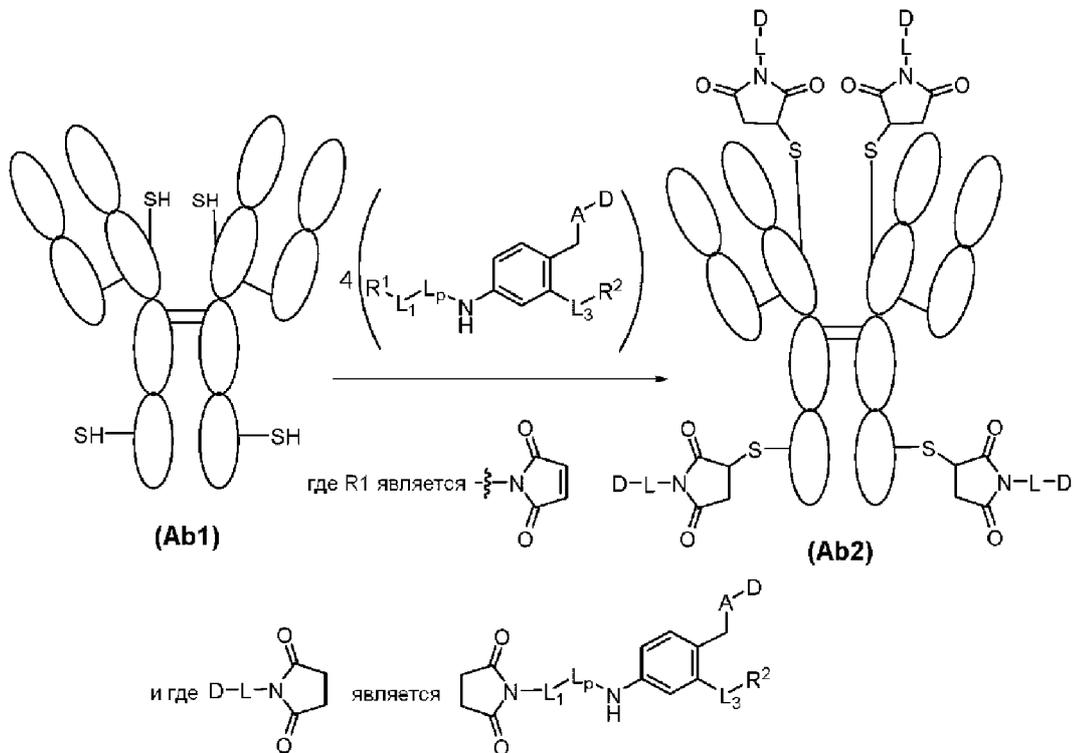
Схема 8 дополнительно иллюстрирует этот общий подход к получению конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (F'), где антитело содержит реакционноспособные группы (RG_2), которые взаимодействуют с R^1 группой (как определено в настоящем документе) для ковалентного присоединения группы линкер-лекарственное средство к антителу через R^{100} группу (как определено в настоящем документе). Только для целей иллюстрации, Схема 8 показывает антитело, имеющее четыре RG_2 группы.

Схема 8



В одном аспекте, группы линкер-лекарственное средство конъюгируют с антителами через модифицированные цистеиновые остатки в антителах (см., например WO2014/124316). Схема 9 иллюстрирует этот подход к получению конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (F') где свободная тиольная группа создается из сконструированных цистеиновых остатков в антителе, взаимодействующем с R¹ группой (где R¹ является малеинимидом) для ковалентного присоединения группы линкер-лекарственное средство к антителу через R¹⁰⁰ группу (где R¹⁰⁰ является сукцинимидным кольцом). Только для целей иллюстрации, Схема 9 показывает антитело, имеющее четыре свободные тиольные группы.

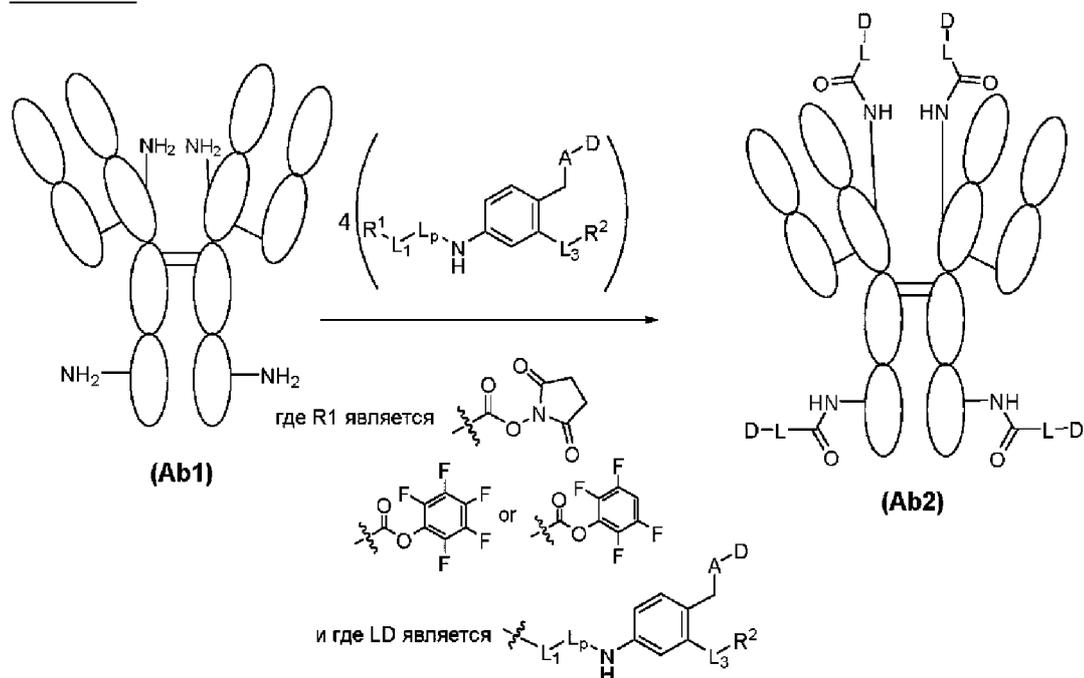
Схема 9



В другом аспекте, группы линкер-лекарственное средство конъюгируют с антителами через лизиновые остатки в антителах. Схема 10 иллюстрирует этот подход к получению конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (F') где свободная

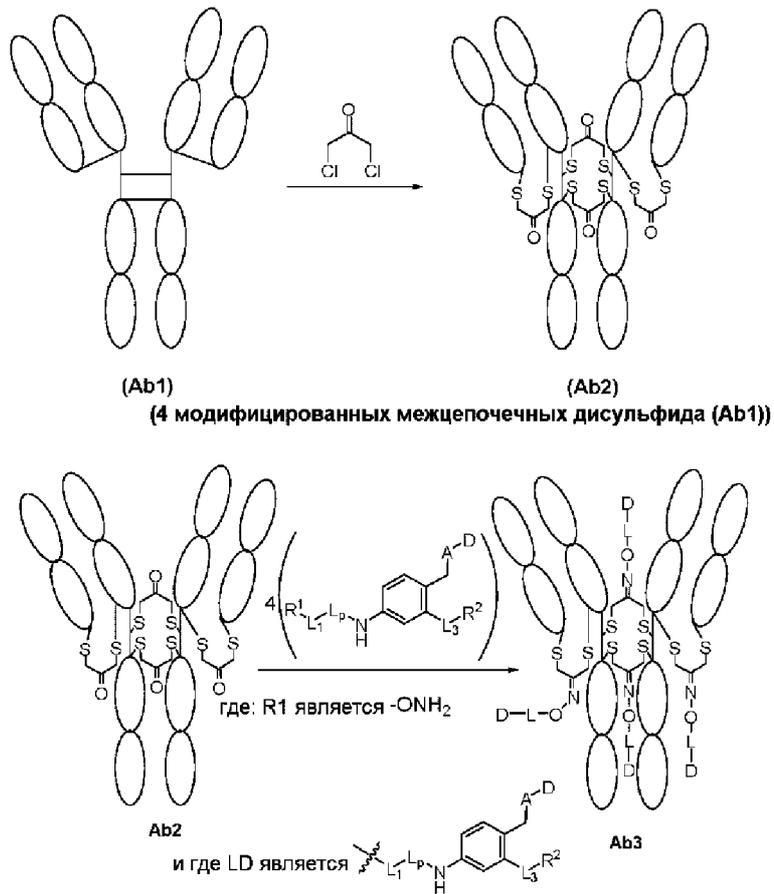
аминовая группа из лизиновых остатков в антителе взаимодействует с R^1 группой (где R^1 является сложным эфиром NHS, пентафторфенилом или тетрафторфенилом) для ковалентного присоединения группы линкер-лекарственное средство к антителу через R^{100} группу (где R^{100} является амидом). Только для целей иллюстрации, Схема 10 показывает антитело, имеющее четыре аминные группы.

Схема 10



В другом аспекте, группы линкер-лекарственное средство конъюгируют с антителами через образование оксимного мостика на существующих в природе дисульфидных мостиках антитела. Оксимный мостик создают сначала образованием кетонного мостика восстановлением межцепочечного дисульфидного мостика антитела и повторным созданием мостика с применением 1,3-дигалоацетона (например, 1,3-дихлорацетона). последующая реакция с группой линкер-лекарственное средство, содержащей гидроксилламин, создает оксимную связь (оксимный мостик), который присоединяет группу линкер-лекарственное средство к антителу (см., например WO2014/083505). Схема 11 иллюстрирует подход к получению конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы (F').

Схема 11



Предоставлены также протоколы для некоторых аспектов аналитической методологии оценки конъюгатов антител по изобретению. Такая аналитическая методология и результаты могут продемонстрировать, что конъюгаты обладают благоприятными свойствами, например, свойствами, которые облегчают их производство, упрощают введение пациентам, они более эффективны и/или потенциально более безопасны для пациентов. Одним из примеров является определение размера молекулы с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), где количество желаемых видов антитела в образце определяется относительно количества высокомолекулярных загрязняющих веществ (например, димера, мультимера или агрегированного антитела) или низкомолекулярных загрязняющих веществ (например, в образце присутствуют фрагменты антитела, продукты разложения или отдельные цепи антитела). В общем, желательно иметь более высокие количества мономера и более низкие количества, например, агрегированного антитела из-за воздействия, например, агрегатов на другие свойства образца антитела, такие как, но не ограничиваясь ими, скорость клиренса, иммуногенность и токсичность. Еще одним примером является определение гидрофобности с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), где гидрофобность образца оценивают относительно набора стандартных антител с известными свойствами. В общем, желательно иметь низкую гидрофобность из-за влияния гидрофобности на другие свойства образца антитела, такие как, но не ограничиваясь ими, агрегация, агрегация с течением времени, прилипание к поверхностям, гепатотоксичность, скорость клиренса и фармакокинетическое воздействие.

Damle, N.K., Nat Biotechnol. 2008; 26(8):884-885; Singh, S.K., Pharm Res. 2015; 32(11):3541-71. При измерении с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия более высокие значения индекса гидрофобности (т.е. более быстрое элюирование из колонки НС) отражают более низкую гидрофобность конъюгатов. Как показано в примерах ниже, большинство протестированных конъюгатов антитела показали индекс гидрофобности более 0,8. В некоторых вариантах осуществления представлены конъюгаты антитела, имеющие индекс гидрофобности 0,8 или выше, по данным хроматографии гидрофобного взаимодействия.

ПРИМЕРЫ

Следующие ниже примеры предоставляют иллюстративные варианты осуществления описания. Обычный специалист в данной области техники распознает многочисленные модификации и вариации, которые могут быть выполнены без изменения сущности или объема описания. Такие модификации и вариации входят в объем описания. Представленные примеры никоим образом не ограничивают описание.

Пример 1. Синтез и характеристика линкеров, линкеров-полезных нагрузок и их предшественников.

Типовые линкеры, линкеры-полезные нагрузки и их предшественники синтезируют с применением типовых способов, описанных в этом примере.

Сокращения:

CuI: йодид меди (I)

ДЦК: дициклогексилкарбодиимид

ДХМ: дихлорметан

DEA: N-этилэтанамин

ДИПЭА: N,N-диизопропилэтиламин

ДМФ: диметилформамид

ДМСО: диметилсульфоксид

EEDQ: этил 2-этокси-2Н-хинолин-1-карбоксилат

Fmoc-Cit-OH: (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-уреидопентановая кислота

ГБТУ: гексафторфосфат (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония

НОАт: 1-Гидрокси-7-азабензотриазол

ТГФ: тетрагидрофуран

MgSO₄: сульфат магния

NH₄Cl: хлорид аммония

NMP: N-метилпирролидон

Pd(PPh₃)₂Cl₂: дихлор-три(трифенилфосфин)палладий

PBr₃: трибромфосфан

Pt/C 10%: платина на угле 10%

SOCl₂: тионилхлорид

TBAI: йодид тетрабутиламмония

ТФК: трифторуксусная кислота

Материалы, методы и общие методики:

Все реагенты, полученные из коммерческих источников, используют без дополнительной очистки. Безводные растворители получают из коммерческих источников и используют без дополнительной сушки. Флэш-хроматографию выполняют на CombiFlash Rf (Teledyne ISCO) с предварительно упакованными картриджами с силикагелем (Macherey-Nagel Chromabond Flash). Тонкослойную хроматографию проводят на тарелках 5×10 см, покрытых силикагелем Merck Type 60 F254. Микроволновый нагрев выполняют в приборе SEM Discover®.

¹H-ЯМР измерения проводят на спектрометре Bruker Avance 400 МГц или Avance Neo 500 МГц, используя ДМСО-*d*₆ или CDCl₃ в качестве растворителя. Данные ¹H ЯМР представлены в виде значений химического сдвига, выраженных в частях на миллион (м.д.), с использованием остаточного пика растворителя (2,50 м.д. для ДМСО-*d*₆ и 7,26 м.д. для CDCl₃) в качестве внутреннего стандарта. Паттерны расщепления обозначаются как: с (синглет), д (дублет), т (триплет), кв (квартет), квинт (квинтет), м (мультиплет), шс (широкий синглет), шт (широкий триплет) дд (дублет дублетов), тд (триплет дублетов), дт (дублет триплетов), ддд (дублет дублетов дублетов). ИК измерения проводят на Bruker Tensor 27, оборудованном устройством ATR Golden Gate (SPECAC). Измерения МСВР выполняют на масс-спектрометре LTQ Orbitrap Velos Pro (ThermoFisher Scientific). Образцы растворяют в CH₃CN/H₂O (2/1: об./об.) в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,05 мг/мл приблизительно и вводят в источник инъекцией 2 мкл в потоке 0,1 мл/мин. Параметры ионизации ИЭР: капиллярный перенос ионов 3,5 кВ и 350°C. Все спектры получают в режиме положительной ионизации с разрешающей способностью 30000 или 60000 с использованием фиксированной массы.

Измерения МСВР проводят на масс-спектрометре LTQ Orbitrap Velos Pro (ThermoFisher Scientific GmbH, Bremen, Germany). Образцы растворяют в CH₃CN/H₂O (2/1: об./об.) в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,05 мг/мл приблизительно и вводят в источник инъекцией 2 мкл в потоке 0,1 мл/мин. Параметры ионизации ИЭР следующие: 3,5 кВ и 350°C капиллярный перенос ионов. Все спектры получают в режиме положительной ионизации с разрешающей способностью 30000 или 60000 с использованием фиксированной массы.

УЭЖХ®-МС:

Данные УЭЖХ®-МС получают с помощью прибора со следующими параметрами (таблица 4):

Таблица 4. Параметры УЭЖХ®-МС

Инструмент	Waters Aquity A-class с УФ датчиком с диодной матрицей «PDA» и «ZQ detector 2» массовым устройством и программой MassLinks.
ZQ датчик 2	МС сканирование от 0,15 до 6 мин и от 100 до 2372 Да
PDA датчик	от 190 до 400 нм

Колонки	Aquity UPLC ®ВЕН колонка C18, 1,7 мкм, 130 Å, 2,1×50 мм колонку используют при 40°С со скоростью потока 0,6 мл/мин
Растворитель А	вода+0,02% ТФК
Растворитель В	ацетонитрил+0,02% ТФК
градиент	от 2% В до 100% В за 5 мин, затем 0,3 мин промывка 100% В и 0,5 мин уравнивание при 2% В для следующего впрыска (всего градиент 6 мин).

Препаративная ВЭЖХ:

Данные препаративной ВЭЖХ (“преп-ВЭЖХ”) собирают с применением инструмента со следующими параметрами (таблица 5):

Таблица 5. Параметры преп-ВЭЖХ

Инструмент	Колонки Waters X-Bridge 5 или 10 мкм с размерами (скоростями потока): 19×50 мм (12 мл/мин), 19×100 мм (12 мл/мин), 30×100 мм (30-50 мл/мин), 30×250 мм (30-50 мл/мин), 50×250 мм (80-150 мл/мин); Interchim Puriflash 4100 с максимум 100 бар и максимальной скоростью потока 250 мл/мин или Interchim Puriflash 4250 с максимум 250 бар и максимальной скоростью потока 250 мл/мин; Насос для растворителя Quaternary с возможностью применять 4 растворителя одновременно в градиенте
УФ	2 длины волны для сбора от 200 до 400 нм
Колонки	Waters Xbridge 10 мкм
Сбор	8 мл или 32 мл пробирки

Примеряют три способа преп-ВЭЖХ:

Способ ТФК: растворитель: А вода+0,05% ТФК, В ацетонитрил+0,05% ТФК, градиент от 5 до 100% В за 15-30 CV

Способ NH₄HCO₃: растворитель: А вода+0,02 М NH₄HCO₃, В ацетонитрил/вода 80/20+0,02 М NH₄HCO₃, градиент от 5 до 100% В за 15-30 CV

Нейтральный способ: растворитель: А вода, В ацетонитрил, градиент от 5 до 100% В за 15-30 CV

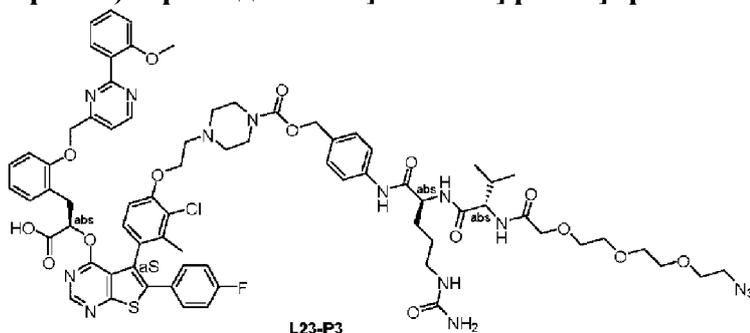
Все фракции, содержащие чистое соединение, объединяют и сушат вымораживанием с получением соединения в виде аморфного порошка.

Очистка препаративной СЖХ:

Препаративную хиральную СЖХ проводят на системе PIC solution Prep200. Образец растворяют в этаноле в концентрации 150 мг/мл. Подвижную фазу выдерживают изократно при 40% этанола/CO₂. Инструмент оборудуют колонкой Chiralpak IA и петель 3 мл. АВPR (автоматический регулятор обратного давления) устанавливают на 100 бар.

Получение L23-P3:

(2R)-2-[(5*Sa*)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[2-(2-азидоэтокси)ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота



*Стадия 1: (2*S*)-2-[[[(2*S*)-2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-*N*-[4-(гидроксиметил)фенил]-5-уреидо-пентанамид*

К раствору 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]уксусной кислоты (куплена у Broadpharm, 1,4 г, 6 ммоль) в ТГФ (20 мл) добавляют 1-гидроксипирролидин-2,5-дион (690 мг, 6 ммоль) и *N,N'*-Дициклогексилкарбодиимид (1,2 г, 6 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Осадок отфильтровывают и фильтрат концентрируют с получением (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетата (1,9 г, 6 ммоль), применяют сразу же без дальнейшей очистки.

К раствору (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетата (1,6 г; 4,85 ммоль) в ДМФ (15 мл) добавляют (2*S*)-2-[[[(2*S*)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-*N*-[4-(гидроксиметил)фенил]-5-уреидо-пентанамид (1,96 г; 5,17 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч и концентрируют. Остаток разбавляют в воде (20 мл) и ацетонитриле (5 мл) и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Смесь очищают С18 хроматографией с обращенной фазой с применением нейтрального способа с получением (2*S*)-2-[[[(2*S*)-2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-*N*-[4-(гидроксиметил)фенил]-5-уреидо-пентанамида (1,07 г, 1,8 ммоль). ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 9,95 (с, 1H), 8,3 (д, 1H), 7,55 (д, 2H), 7,46 (д, 1H), 7,22 (д, 2H), 5,98 (т, 1H), 5,4 (с, 1H), 5,08 (т, 1H), 4,43 (д, 2H), 4,4 (кв, 1H), 4,33 (дд, 1H), 3,95 (с, 2H), 3,6 (м, 10H), 3,38 (т, 2H), 3 (м, 2H), 2 (м, 1H), 1,7/1,6 (2м, 2H), 1,5-1,3 (м, 2H), 0,89/0,82 (2д, 6H).

*Стадия 2: [4-[[[(2*S*)-2-[[[(2*S*)-2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил)карбонат*

К раствору (2*S*)-2-[[[(2*S*)-2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-*N*-[4-(гидроксиметил)фенил]-5-уреидо-пентанамида (100 мг, 0,168

ммоль) в ДМФ (30 мл) добавляют ДИПЭА (32 мкл, 0,179 ммоль) и бис(4-нитрофенил)карбонат (100 мг, 0,329 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 4 ч и концентрируют досуха. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в дихлорметане) с получением 4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил)карбоната (65 мг, 0,088 ммоль), ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,95 (с, 1H), 8,3 (д, 1H), 7,55 (д, 2H), 7,46 (д, 1H), 7,22 (д, 2H), 5,98 (т, 1H), 5,4 (с, 1H), 5,08 (т, 1H), 4,43 (д, 2H), 4,4 (кв, 1H), 4,33 (дд, 1H), 3,95 (с, 2H), 3,6 (м, 10H), 3,38 (т, 2H), 3 (м, 2H), 3,02-2,95 (м, 2H), 2 (м, 1H), 1,7 (м, 1H), 1,6 (м, 1H), 0,89 (д, 3H), 0,82 (д, 3H).

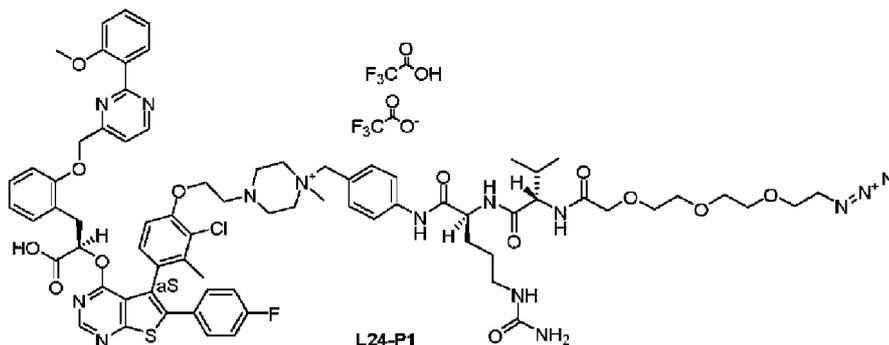
Стадия 3: (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота L23-P3

К раствору ((2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-(2-пиперазин-1-илэтокси)фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты **P3** (147 мг, 0,17 ммоль) в ДМФ (16 мл) последовательно добавляют ДИПЭА (85 мкл, 0,51 ммоль), 4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил)карбонат (136 мг, 0,179 ммоль), 2,6-лутидин (99 мкл, 0,85 ммоль) и HOAt (7 мг, 0,05 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH₄НСО₃ с получением **L23-P3** (110 мг, 0,074 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,05 (с, 1H), 8,87 (д, 1H), 8,59 (с, 1H), 8,32 (д, 1H), 7,67 (шс, 1H), 7,59 (д, 2H), 7,52 (дд, 1H), 7,45 (тд, 1H), 7,44 (д, 1H), 7,36 (дл, 1H), 7,29 (м, 2H), 7,27 (д, 2H), 7,2 (т, 2H), 7,19 (д, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,13 (т, 1H), 7,03 (т, 1H), 6,99 (д, 1H), 6,71 (т, 1H), 6,24 (дл, 1H), 5,99 (т, 1H), 5,48 (дд, 1H), 5,41 (шс, 1H), 5,23 (м, 2H), 4,97 (с, 2H), 4,39 (м, 1H), 4,32 (дд, 1H), 4,21 (м, 2H), 3,95 (м, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,65-3,50 (м, 10H), 3,34 (м, 2H), 3,02/2,95 (м, 2H), 2,73 (т, 2H), 2,49/2,3 (м, 2H), 2,45 (м, 4H), 2,3 (м, 4H), 2 (м, 1H), 1,82 (с, 3H), 1,7/1,59 (м, 2H), 1,44/1,37 (м, 2H), 0,87 (д, 3H), 0,82 (д, 3H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ 158,3, 152,9, 131,6, 131,6, 131,3, 131,3, 131, 129, 128,8, 121, 120,8, 119,5, 116,4, 116,1, 112,8, 112,4, 111,2, 74,5, 70,1, 69,3, 67,7, 66,4, 57, 56,7, 56,2, 53,7, 53,2, 50,4, 43,6, 39, 32,8, 31,6, 29,6, 27,3, 19,3, 17,7. Длина волны ИК (см⁻¹): 3500-2500, 2106, 1656. HR-ИЭР+: m/z [M+H]⁺=1479,5422/1479,5405 (измеренное/теоретическое).

Получение L24-P1:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-

метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота



Стадия 1: (2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-N-[4-(бромметил)фенил]-5-уреидо-пентанамид

К раствору (2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-N-[4-(гидроксиметил)фенил]-5-уреидо-пентанамида (330 мг, 0,55 ммоль; получен согласно стадии 1 синтеза L23-P3) в ТГФ (10 мл) добавляют по каплям при 0°C раствор трибромида фосфора 1 М в дихлорметане (1 мл, 1 ммоль). Смесь перемешивают при 0°C в течение 1 ч и добавляют тонкоизмельченный NaHCO₃ (100 мг). Через 10 мин перемешивания, реакционную смесь разбавляют этилацетатом и фильтруют. Органический слой сушат над сульфатом магния и концентрируют. Остаток (2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-N-[4-(бромметил)фенил]-5-уреидо-пентанамида (283 мг, 0,43 ммоль) применяют без дальнейшей очистки. HR-ИЭР+: m/z [M+H]⁺=595,3200/595,3198 (измеренное/теоретическое).

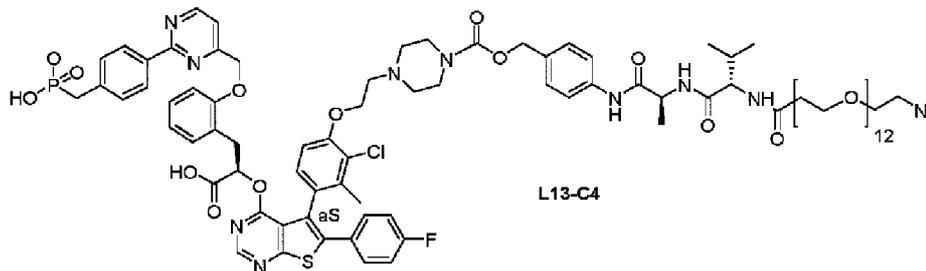
Стадия 2: ((2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота **L24-P1**

К раствору этил (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата дихлоргидрата (**P1**) (345 мг, 0,355 ммоль) в ДМФ (1 мл) последовательно добавляют (2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-N-[4-(бромметил)фенил]-5-уреидо-пентанамида (233 мг, 0,355 ммоль) и ДИПЭА (50 мкл, 0,304 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Раствор моногидрата гидроксида лития (15 мг, 3,55 ммоль) в воде (0,5 мл) добавляют, и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакционную смесь очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением Способа ТФК с получением **L24-**

P1 (80 мг, 0,054 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 13,2 (м, 1H), 10,25 (м, 1H), 8,88 (д, 1H), 8,6 (с, 1H), 8,36 (д, 1H), 7,72 (д, 2H), 7,63 (д, 1H), 7,52 (дд, 1H), 7,46 (т, 1H), 7,44 (м, 1H), 7,43 (м, 2H), 7,37 (д, 1H), 7,3 (дд, 2H), 7,21 (т, 2H), 7,2 (д, 1H), 7,15 (д, 1H), 7,15 (т, 1H), 7,03 (т, 1H), 7 (т, 1H), 6,72 (т, 1H), 6,22 (д, 1H), 6 (т, 1H), 5,52 (м, 2H), 5,49 (дд, 1H), 5,25 (дд, 2H), 4,5 (шс, 2H), 4,39 (м, 1H), 4,32 (м, 1H), 4,25 (м, 2H), 3,95 (шс, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,4/3,24 (м, 4H), 3,35 (м, 2H), 3,28/2,51 (м, 2H), 3,04/2,83 (м, 4H), 3,02/2,96 (м, 2H), 2,92 (м, 2H), 2,87 (с, 3H), 1,99 (м, 1H), 1,83 (с, 3H), 1,69/1,61 (м, 2H), 1,46/1,38 (м, 2H), 0,88/0,82 (м, 6H). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d₆): δ 134,2, 131,4, 131,3, 131,3, 131,2, 130,7, 128,7, 120,9, 120,5, 119,2, 116,3, 115,8, 112,7, 112,3, 111, 74, 70,2, 69,6, 67,8, 58,9, 56,9, 56,1, 55,4, 54, 50,5, 46,6, 44,9, 39, 32,7, 31,6, 29,8, 27,5, 19,7/18,4, 18. Длина волны ИК (см⁻¹): 3700-2200, 3000-2000, 2109, 1662, 1250-1050. HR-ИЭР+: m/z [M+Na]⁺=1473,5656/1473,5628 (измеренное/теоретическое).

Получение L13-C4:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[4-[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-[4-(фосфометил)фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота



Стадия 1: Синтез (2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноиламино]-N-[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксоэтил]-3-метил-бутанамид

К раствору (2S)-2-амино-N-[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксоэтил]-3-метил-бутанамид (0,9 г, 3,07 ммоль; получен согласно стадии 3 синтеза L18-C3) и 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропановой кислоты (куплена у Broadpharm, 2 г, 3,07 ммоль) в ДМФ (20 мл) последовательно добавляют ДИПЭА (1 мл, 6,13 ммоль), 3-(этилиминометиленамино)пропил-диметил-аммоний, хлорид (EDC) (0,65 г, 3,37 ммоль) и [диметиламино(триазоло[4,5-b]пиримидин-3-илокси)метил]-диметил-аммоний, гексафторфосфат (ГАТУ) (1,28 г, 3,37 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH₄HCO₃ с

получением (2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноиламино]-N-[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]-3-метил-бутанамида (1,64 г, 1,81 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,82 (м, 1H), 8,14 (д, 1H), 7,87 (д, 1H), 7,54 (д, 2H), 7,23 (д, 2H), 5,08 (т, 1H), 4,43 (д, 2H), 4,39 (м, 1H), 4,2 (м, 1H), 3,65-3,44 (м, 48H), 3,39 (т, 2H), 2,50-2,30 (м, 2H), 1,97 (м, 1H), 1,31 (д, 3H), 0,87/0,84 (м, 6 H). Длина волны ИК (см⁻¹): 3600-3200, 3287, 2106, 1668, 1630, 1100. HR-ИЭР+: m/z [M+H]⁺=919,5265/919,5234 (измеренное/теоретическое).

Стадия 2: [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил) карбонат

К раствору (2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноиламино]-N-[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]-3-метил-бутанамида (210 мг, 0,228 ммоль) в смеси ТГФ и дихлорметана (соответственно, 5 и 2,5 мл) последовательно добавляют пиридин (30 мкл, 0,479 ммоль) и 4-нитрофенил хлорформиат (97 мг, 0,479 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч и добавляют другие порции 4-нитрофенил хлорформиата (40 мг, 0,197 ммоль) и пиридин (30 мкл, 0,479 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 55 ч и выпаривают досуха. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (градиент MeOH в дихлорметане) с получением [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил) карбоната (118 мг, 0,110 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,00 (с, 1H), 8,31 (д, 2H), 8,19 (д, 1H), 7,88 (д, 1H), 7,64 (д, 2H), 7,58 (д, 2H), 7,41 (д, 2H), 5,25 (с, 2H), 4,39 (м, 1H), 4,21 (м, 1H), 3,63-3,47 (м, 48H), 3,39 (т, 2H), 2,50-2,35 (м, 2H), 1,98 (м, 1H), 1,31 (д, 3H), 0,89/0,85 (м, 6H). Длина волны ИК (см⁻¹): 3278, 2108, 1763, 1633, 1526, 1525, 1350, 1215, 1110.

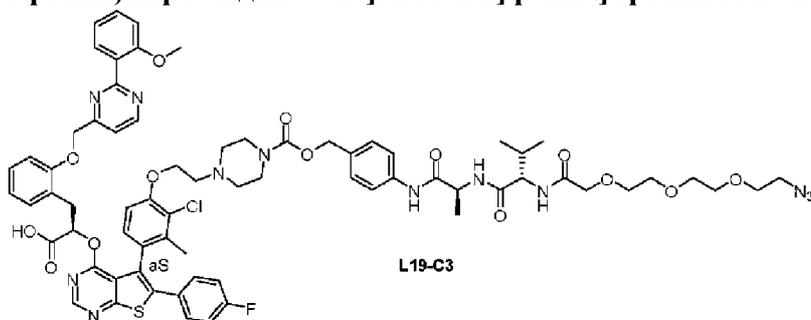
Стадия 3: (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]тиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-[4-(фосфонометил)фенил]тиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота (L13-C4)

К раствору [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил) карбоната (52 мг, 47,6 мкмоль) в ДМФ (5 мл) последовательно добавляют (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-(2-пиперазин-1-илэтокси)фенил]-6-(4-

фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-[4-(фосфонометил)фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановую кислоту **C4** (36,7 мг, 39,7 мкмоль) и ДИПЭА (26 мкл, 108 мкмоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч и очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH_4HCO_3 с получением **L13-C4** (36 мг, 19 мкмоль). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 10,1 (шс, 1H), 8,81 (шс, 1H), 8,55 (м, 1H), 8,32 (шс, 1H), 8,19 (д, 2H), 8,02 (шс, 1H), 7,66 (м, 1H), 7,58 (д, 2H), 7,37 (д, 1H), 7,29 (дд, 2H), 7,28 (д, 2H), 7,25 (д, 2H), 7,19 (т, 2H), 7,17 (д, 1H), 7,08 (т, 1H), 6,96 (д, 1H), 6,68 (т, 1H), 6,21 (д, 1H), 5,5 (м, 1H), 5,22 (м, 2H), 4,96 (с, 2H), 4,4 (м, 1H), 4,2 (дд, 1H), 4,18 (м, 2H), 3,62/3,41 (м, 24H), 3,5 (м, 4H), 3,38 (м, 2H), 3,28 (м, 4H), 2,87 (м, 2H), 2,7 (м, 2H), 2,48/2,36 (м, 2H), 2,41 (м, 4H), 1,99 (м, 1H), 1,79 (с, 3H), 1,3 (д, 3H), 0,87/0,83 (м, 6H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, DMSO-d_6): δ 130,7, 130,7, 130,6, 130,3, 129, 128,4, 127,4, 121, 119,6, 116,3, 116,1, 112,1, 70,2/67,3, 69,5, 67,5, 66,4, 58,2, 56,4, 53,2, 50,3, 49,6, 43,8, 36,3, 31, 19, 18,5, 17,8. ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6): δ -112,4. ^{31}P ЯМР (200 МГц, DMSO-d_6): δ 17,8. Длина волны ИК (cm^{-1}): 3290, 2102, 1698, 1651, 1237, 1094, 833, 756. HR-ИЭР+: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+=1867,7129/1867,7154$ (измеренное/теоретическое).

Получение L19-C3:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота



Стадия 1: [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил) карбонат

К суспензии 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (1 г, 1,66 ммоль) в смеси ТГФ/дихлорметан (соответственно, 100 и 30 мл), последовательно добавляют пиридин (269 мкл, 3,32 ммоль) и 4-нитрофенил хлорформат (670 мг, 3,30 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и добавляют еще одну порцию 4-нитрофенил хлорформата (335 мг, 1,66 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч, концентрируют и остаток очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в гептане) с получением [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-

бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил) карбоната (658 мг, 0,97 ммоль). ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 10,07 (м, 1H), 8,31 (д, 2H), 8,19 (д, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,74 (т, 2H), 7,64 (д, 2H), 7,57 (д, 2H), 7,41 (м, 2H), 7,41 (д, 2H), 7,4 (м, 1H), 7,32 (т, 2H), 5,24 (с, 2H), 4,43 (м, 1H), 4,36-4,19 (м, 3H), 3,92 (дд, 1H), 2 (м, 1H), 1,32 (д, 3H), 0,9/0,87 (м, 6 H). Длина волны ИК (см^{-1}): 3350-3200, 1760, 1690, 1670, 1630, 1523, 1290.

Стадия 2: (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-(2-пиперазин-1-илэтокси)фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты **C3** (100 мг, 0,116 ммоль) в ДМФ (1 мл) последовательно добавляют [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил) карбонат (87 мг, 0,128 ммоль) и ДИПЭА (38 мкл, 0,232 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и концентрируют. Остаток берут в воде, фильтруют с получением (2R)-2-[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (110 мг, 0,078 ммоль), применяют без дальнейшей очистки на следующей стадии. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 10,05 (шс, 1 H), 8,88 (д, 1H), 8,57 (с, 1H), 8,23 (д, 1H), 7,88 (д, 2H), 7,75 (м, 1H), 7,74 (2д, 2H), 7,58 (д, 2H), 7,53 (дд, 1H), 7,45 (м, 1H), 7,45 (д, 1H), 7,41 (м, 1H), 7,4 (м, 2H), 7,31 (м, 2H), 7,29 (м, 2H), 7,26 (д, 2H), 7,2 (т, 2H), 7,18 (м, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,11 (т, 1H), 7,03 (т, 1H), 6,98 (д, 1H), 6,69 (т, 1H), 6,2 (д, 1H), 5,46 (д, 1H), 5,22 (м, 2H), 4,97 (с, 2H), 4,42 (т, 1H), 4,26 (м, 2H), 4,21 (м, 1H), 4,2 (м, 2H), 3,91 (м, 1H), 3,75 (с, 3H), 3,35/2,45 (м, 2H), 3,29 (м, 4H), 2,73 (т, 2H), 2,44 (м, 4H), 1,99 (м, 1H), 1,8 (с, 3H), 1,29 (д, 3H), 0,88/0,85 (м, 6H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО- d_6): δ 158,3, 152,7, 131,6, 131,4, 131,3, 131,1, 131,1, 128,9, 128,5, 128, 127,6, 125,8, 120,9, 120,5, 120,5, 119,4, 116,4, 116, 112,7, 112,2, 111,1, 69,4, 67,8, 66,5, 66,1, 60,7, 56,8, 56,1, 53,2, 49,6, 47,1, 43,8, 33,3, 30,9, 19,7, 18,9, 18,1.

Стадия 3: (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-

метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (176 мг, 0,125 ммоль) в ДМФ (3 мл) добавляют по каплям при 0°С пиперидин (300 мкл, 1,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч и концентрируют. Остаток очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH_4HCO_3 с получением (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (130 мг, 0,11 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,2 (с, 1H), 8,9 (д, 1H), 8,6 (dl, 1H), 8,55 (с, 1H), 7,85 (д, 1H), 7,6 (д, 2H), 7,55 (дд, 1H), 7,45 (м, 2H), 7,25 (д, 2H), 7,25 (м, 4H), 7,2 (м, 3H), 7,15 (д, 1H), 7,1 (т, 1H), 7,05 (т, 1H), 6,95 (д, 1H), 6,65 (т, 1H), 6,15 (д, 1H), 5,4 (дд, 1H), 5,2 (м, 2H), 4,95 (с, 2H), 4,45 (м, 1H), 4,2 (м, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,4/2,35 (м, 2H), 3,3 (м, 5H), 2,6 (т, 2H), 2,4 (м, 4H), 2 (м, 3H), 1,8 (с, 3H), 1,3 (д, 3H), 0,9/0,85 (м, 6H). Длина волны ИК (см⁻¹): 3600-2500, 1678.

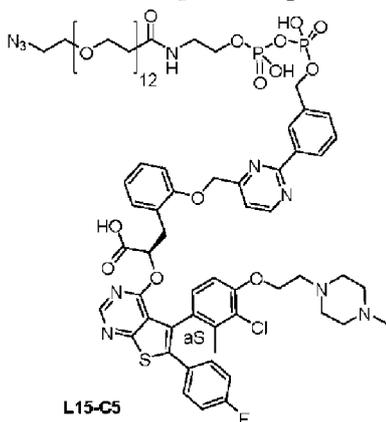
Стадия 4: (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[[2-[[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота L19-C3

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (50 мг, 0,042 ммоль) в ДМФ (0,3 мл) последовательно добавляют ДИПЭА (14мкл, 0,085 ммоль), [диметиламино(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси-метиле]-диметил-аммоний; тетрафторборат (14 мг, 0,046 ммоль) и раствор 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]уксусной кислоты (28 мг, 0,12 ммоль) в ДМФ (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч и очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH_4HCO_3 с получением **L19-C3** (22 мг, 0,016 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,02 (с, 1H), 8,88 (д, 1H), 8,4 (д, 1H), 7,72 (шс, 1H), 7,58 (с, 1H), 7,58 (д, 2H), 7,53 (д, 1H), 7,45 (д, 1H), 7,45 (т, 1H), 7,38 (д, 1H), 7,29 (дд, 2H), 7,27 (д, 2H), 7,2 (т, 2H), 7,18 (д, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,11 (т, 1H), 7,03 (т, 1H), 6,98 (д, 1H), 6,7 (т, 1H), 6,21 (д, 1H), 5,46 (дд, 1H), 5,23 (м, 2H), 4,97 (с, 2H), 4,4 (м, 1H), 4,29 (дд, 1H), 4,22 (м, 2H), 3,94 (с, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,65-3,53 (м, 10H), 3,35 (м, 2H), 3,3 (м, 4H), 3,3/2,5 (м, 2H), 2,73 (т, 2H), 2,44 (м, 4H), 2 (м, 1H), 1,81 (с, 3H), 1,3 (д, 3H), 0,88/0,82 (м, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ 158, 152,7, 131,4, 131,4, 131,3, 131,1, 131,1, 128,9, 128,6, 120,9, 120,7, 119,5, 116,2, 112,5, 112,1, 111,1, 70,4, 70,4, 69,7, 67,5, 66,2, 56,8, 56,7, 56,1, 53,3, 50,4, 49,5, 43,8, 31,7, 19,5, 0,82, 18,3, 18,2. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆): δ -112,3. Длина волны ИК (см⁻¹): 3294, 2104, 1697, 1663, 1288, 1238, 1120, 1076, 1051, 1020, 833,755. HR-

ИЭР+: m/z $[M+H]^+=1395,5083/1395,5070$ (измеренное/теоретическое).

Получение L15-C5:

(2R)-3-[2-[[2-[3-[[2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропаноиламино]этоксид-гидрокси-фосфорил]окси-гидрокси-фосфорил]оксиметил]фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксид]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-пропановой кислоты



Стадия 1: (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксид]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-[3-(фосфоноксиметил)фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; бис 2,2,2-трифторуксусная кислота

К раствору этил (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксид]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-[3-(гидроксиметил)фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (110 мг, 0,123 ммоль; получен согласно WO 2016/207216) в ТГФ (0,5 мл) добавляют по каплям при -40°C под аргоном дифосфорил хлорид (51 мкл, 0,368 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при -40°C в течение 30 мин. Еще одну порцию дифосфорил хлорида (10 мкл, 0,074 ммоль) добавляют при -40°C, и реакционную смесь перемешивают при -40°C в течение 20 мин, гасят добавлением водного насыщенного раствора карбоната калия (0,1 мл) и нагревают до комнатной температуры. рН доводят до 10 добавлением карбоната калия (порошок) и реакционную смесь перемешивают в течение 20 мин при комнатной температуре. Реакционную смесь подкисляют до рН 2 медленным добавлением водного раствора 2 М HCl при 0°C, экстрагируют дихлорметаном (4 раза). Объединенные органические слои концентрируют, разбавляют диоксаном (3 мл) и добавляют раствор моногидрата гидроксида лития (17 мг, 0,403 ммоль) в воде (0,3 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 4 дней, нейтрализуют водным раствором 4 М HCl (0,4 мл, 0,4 ммоль) и выпаривают. Остаток очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксид]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-[3-

(фосфоноксиметил)фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты; 2,2,2-трифторуксусной кислоты в виде соли 2ТФК (41 мг, 43 мкмоль). МС (ИЭР) m/z [M+2H]²⁺=487,5.

Стадия 2: 2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтоксид)этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропаноиламино]этил дигидрофосфат

К раствору 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтоксид)этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропановой кислоты (200 мг, 0,311 ммоль) в дихлорметане (2 мл) добавляют 1-гидроксипирролидин-2,5-дион (79 мг, 0,684 ммоль), 3-(этилиминометиленамино)пропил-диметил-аммоний; хлорид (107 мг, 0,56 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, разбавляют дихлорметаном, разделяют насыщенным водным раствором NaHCO₃ и экстрагируют дихлорметаном. Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли, сушат над сульфатом магния и концентрируют до приблизительно 1 мл. Остаток разбавляют ДМФ (1 мл), добавляют 2-аминоэтил дигидрофосфат (30 мг, 0,214 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при 80°C в течение ночи, разбавляют дихлорметаном, промывают водой. Водный слой отделяют и сушат вымораживанием с получением

2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтоксид)этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропаноиламино]этил дигидрофосфата (165 мг, 0,2 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 3,45-3,65 (м, 5H), 3,26-3,39 (м, 2H), 3,12 (м, 2H), 2,27 (т, 2H). HR-ИЭР+: m/z [M+H]⁺=767,3697/767,3686 (измеренное/теоретическое).

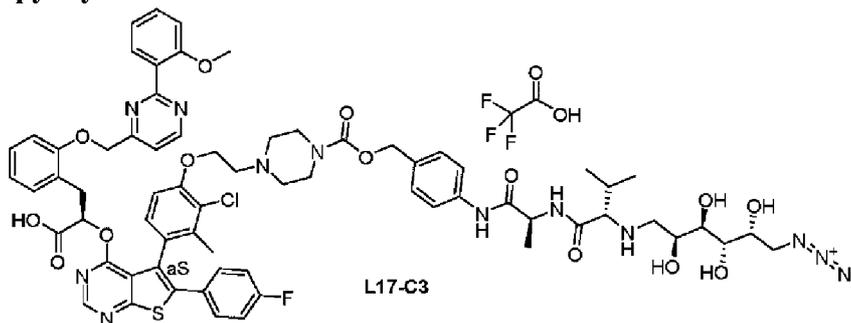
Стадия 3: (2R)-3-[2-[[[2-[3-[[[2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтоксид)этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропаноиламино]этоксид-гидрокси-фосфорил]окси-гидрокси-фосфорил]оксиметил]фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксид]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-пропановая кислота (L15-C5)

К раствору 2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-азидоэтоксид)этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропаноиламино]этил дигидрофосфата (49 мг, 0,064 ммоль) в ДМФ (0,2 мл) последовательно добавляют ди(имидазол-1-ил)метанон (11 мг, 0,066 ммоль), триэтиламин (17мкл, 0,066 ммоль) и 4Å молекулярные сита (50 мг). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч. Твердое вещество удаляют фильтрацией и фильтрат обрабатывают хлоридом цинка (23 мг, 0,172 ммоль) и (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксид]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[[2-[3-(фосфоноксиметил)фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислотой; бис 2,2,2-трифторуксусной кислотой (41 мг, 0,043 ммоль). Смесь нагревают до 50°C в течение ночи. Реакционную смесь очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH₄HCO₃ с

получением **L15-C5** (11 мг, 6 мкмоль). HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+=1703,5962/1703,5959$ (измеренное/теоретическое).

Получение **L17-C3**:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S,3R,4S,5R)-6-азидо-2,3,4,5-тетрагидрокси-гексил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторуксусной кислоты

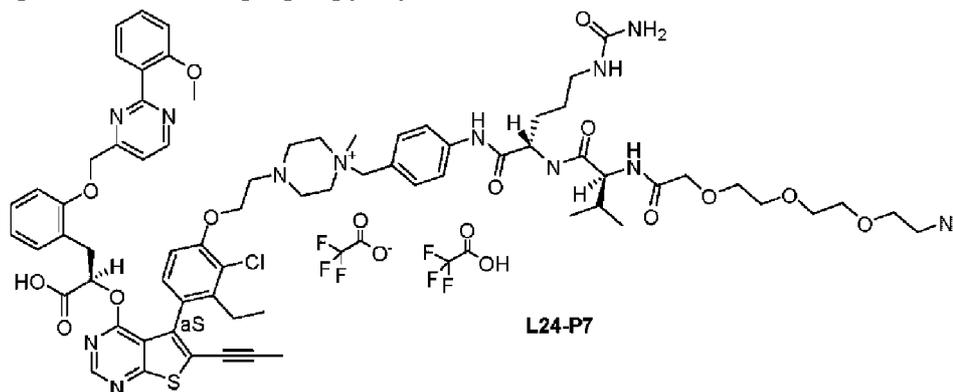


К раствору **(2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты** (230 мг, 0,194 ммоль; получена согласно стадии 5 получения **L19-C3**) и **6-деокси-6-азидо-D-галактозы** (120 мг, 0,584 ммоль; получена согласно Ekholm et al., *ChemMedChem* 2016, 11, 2501-2505) в смеси ДМСО/вода 80/20, содержащей 1% of ДИПЭА (20 мл) добавляют при комнатной температуре цианоборгидрид натрия (24 мг, 0,389 ммоль). Реакционную смесь нагревают при 65°C в течение 48 ч. Затем добавляют еще одну порцию цианоборгидрида натрия (24 мг, 0,389 ммоль) и **6-деокси-6-азидо-D-галактозы** (120 мг, 0,584 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревают при 65°C в течение еще 48 ч и очищают **S18** преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением **L17-C3** (38 мг, 28 мкмоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 13,2 (шс, 1H), 10,2 (с, 1H), 8,88 (д, 1H), 8,85 (д, 1H), 8,62 (с, 1H), 8,53 (шс, 1H), 7,63 (д, 1H), 7,59 (д, 2H), 7,52 (д, 1H), 7,45 (т, 1H), 7,42 (д, 1H), 7,33 (дд, 2H), 7,33 (д, 2H), 7,27 (д, 1H), 7,27 (д, 1H), 7,21 (т, 2H), 7,15 (т, 1H), 7,04 (т, 1H), 7,01 (д, 1H), 6,73 (т, 1H), 6,21 (д, 1H), 5,51 (д, 1H), 5,28/5,22 (м, 2H), 5,04 (шс, 2H), 4,52 (м, 1H), 4,49 (м, 2H), 4,12 (м, 1H), 3,89 (м, 1H), 3,78 (м, 1H), 3,76 (с, 3H), 3,63 (м, 6H), 3,42/3,21 (м, 2H), 3,38 (м, 1H), 3,37 (м, 1H), 3,28/2,52 (м, 2H), 3,22 (м, 4H), 2,96 (м, 2H), 2,21 (м, 1H), 1,86 (с, 3H), 1,36 (д, 3H), 1,03/0,94 (м, 6H). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d₆): δ 157,8, 152,5, 131,4, 131,3, 131,3, 130,6, 129,1, 129, 128,8, 120,8, 120,6, 119,4, 116,2, 116,1, 112,3, 111,3, 111,3, 74,2, 71,3, 70,4, 69,5, 69,2, 67,1, 65,6, 64,5, 64,5, 56,2, 54,8, 54,2, 51,9, 50,3, 49,9, 32,7, 29,4, 19,3, 18,9, 18. ¹⁹F ЯМР (470 МГц, ДМСО-d₆): δ -74,4, -112,1. Длина волны ИК (см⁻¹): 2200-3500, 2104, 1669, 1181, 1132, 798, 758, 720. HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+=1369,4918/1369,4913$

(измеренное/теоретическое).

Получение L24-P7:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-этил-фенил]-6-проп-1-инил-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота

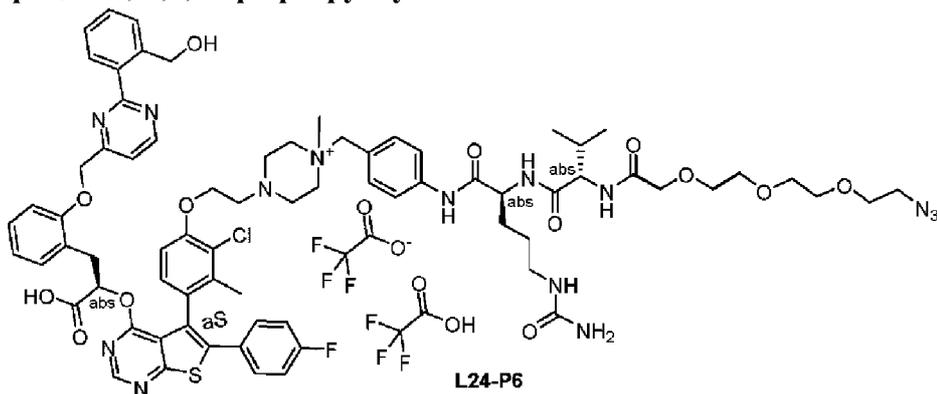


К раствору (2S)-2-[[2-(2-азидоэтокси)ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-N-[4-(бромметил)фенил]-5-уреидо-пентанамида (72 мг, 0,109 ммоль) в ТГФ (5 мл) последовательно добавляют (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-этил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-проп-1-инил-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановую кислоту **P7** (30 мг, 0,036 ммоль) и ДИПЭА (19 мкл, 0,108 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре и очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением **L24-P7** (25 мг, 18мкмоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,25 (с, 1H), 8,85 (д, 1H), 8,62 (с, 1H), 8,35 (д, 1H), 7,72 (д, 2H), 7,6 (д, 1H), 7,5 (д, 1H), 7,45 (т, 1H), 7,43 (д, 2H), 7,4 (д, 1H), 7,22 (д, 1H), 7,17 (м, 1H), 7,15 (м, 1H), 7,13 (д, 1H), 7,02 (т, 1H), 7 (д, 1H), 6,78 (т, 1H), 6,3 (д, 1H), 5,98 (шс, 1H), 5,5 (дд, 1H), 5,4 (шс, 1H), 5,28/5,2 (м, 2H), 4,5 (шс, 2H), 4,38 (м, 1H), 4,3 (дд, 1H), 4,25 (м, 2H), 3,94 (шс, 2H), 3,74 (с, 3H), 3,70/3,50 (м, 10H), 3,50 (м, 8H), 3,35 (т, 2H), 3,22/2,5 (м, 2H), 3,0 (м, 2H), 2,95 (т, 2H), 2,9 (шс, 3H), 2,55/2,4 (м, 2H), 2,0 (с, 3H), 1,98 (м, 1H), 1,70/1,30 (м, 4H), 0,88/0,82 (м, 6H), 0,72 (т, 3H). Длина волны ИК (см⁻¹): 3321, 2111, 1660, 1188, 1124, 798,756,719. HR-ИЭР+: m/z [M+H-SF₃COOH]⁺=1409,59077/1409,5903 (измеренное/теоретическое).

Получение L24-P6:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-(гидроксиметил)фенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-

трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусной кислоты

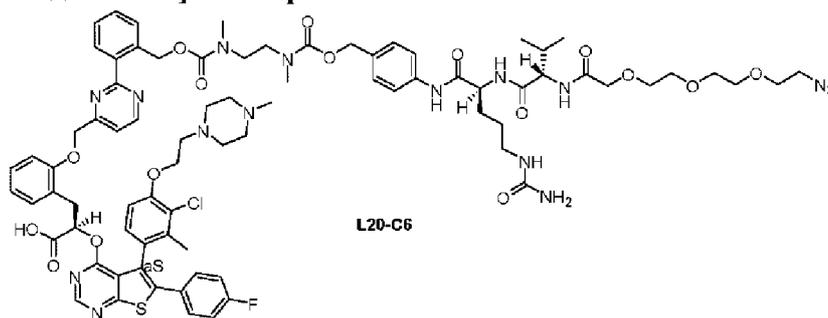


К раствору (2S)-2-[[[(2S)-2-[[[2-[2-[2-(2-азидозтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-N-[4-(бромметил)фенил]-5-уреидо-пентаноида (55,3 мг, 84 мкмоль) в ДМФ (1 мл) последовательно добавляют этил (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[[2-[2-(гидроксиметил)фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат (53,2 мг, 59 мкмоль; синтезирован согласно EP 2 886 545) и ДИПЭА (44 мкл, 0,252 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч и концентрируют при пониженном давлении. Остаток разбавляют диоксаном (1 мл) и добавляют раствор моногидрата гидроксида лития (14 мг, 0,0334 ммоль) в воде (0,3 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, нейтрализуют добавлением водного раствора 1 М HCl (0,33 мл, 0,33 ммоль), концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением **L24-P6** (47 мг, 32 мкмоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,27 (с, 1H), 8,94 (д, 1H), 8,61 (с, 1H), 8,38 (д, 1H), 7,93 (д, 1H), 7,73 (д, 2H), 7,68 (т, 1H), 7,66 (д, 1H), 7,5 (т, 1H), 7,45 (д, 1H), 7,43 (д, 2H), 7,38 (д, 1H), 7,37 (м, 1H), 7,3 (дд, 2H), 7,21 (д, 1H), 7,2 (т, 2H), 7,16 (т, 1H), 7,02 (д, 1H), 6,72 (т, 1H), 6,21 (д, 1H), 6,01 (м, 1H), 5,5 (д, 1H), 5,4 (м, 1H), 5,3 (м, 2H), 4,8 (с, 2H), 4,39 (м, 1H), 4,32 (дд, 1H), 4,25 (м, 2H), 3,95 (с, 2H), 3,57 (м, 16H), 3,42/3,26 (м, 2 H), 3,36 (м, 2H), 3,29/2,51 (м, 2H), 3,11/2,92 (м, 8H), 2,98 (м, 2H), 2,97 (м, 2H), 1,99 (м, 1H), 1,83 (с, 3H), 1,68/1,62 (м, 2H), 1,45/1,39 (м, 2H), 0,88/0,82 (м, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ 158,2, 152,1, 134,2, 131,4, 131,3, 130,9, 130,8, 130,2, 128,7, 128,1, 127, 120,8, 119,3, 116,3, 115,7, 112,2, 111, 74, 70,5, 70,1, 69,5, 67,7, 62,3, 58,8, 57,2, 55,5, 54,1, 50,5, 46,6, 38,9, 32,5, 31,5, 29,6, 27,6, 19,6, 18,6, 18,3. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆): δ -74,6, -112,5. Длина волны ИК (см⁻¹): 3303, 2104, 1730, 1662, 1182, 1124, 833, 796, 761. HR-ИЭР+: m/z [M+2H]²⁺=726,2957/726,2941 (измеренное/теоретическое).

Получение L20-C6:

(2R)-3-[2-[[[2-[2-[[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидозтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метоксикарбонил-метил-амино]этил-метил-карбамоил]оксиметил]фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-

метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-пропановая кислота



Стадия 1: этил (2R)-3-[2-[[2-[2-[[2-[трет-бутоксикарбонил(метил)амино]этил-метил-карбамоил]оксиметил]фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-пропаноат

К раствору (этил (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-[2-(гидроксиметил)фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (50 мг, 55 мкмоль; синтезирован согласно EP 2 886 545) в дихлорметане (0,5 мл) последовательно добавляют 4-нитрофенил хлорформиат (19 мг, 94 мкмоль) и ДИПЭА (69 мкл, 0,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч и добавляют трет-бутил N-метил-N-[2-(метиламино)этил]карбамат (54 мг, 0,287 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, концентрируют при пониженном давлении. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в дихлорметане) с получением этил (2R)-3-[2-[[2-[2-[[2-[трет-бутоксикарбонил(метил)амино]этил-метил-карбамоил]оксиметил]фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-пропаноата (30 мг, 27 мкмоль). ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,00 (д, 1H), 8,58 (с, 1H), 7,98 (м, 1H), 7,61 (д, 1H), 7,51 (т, 1H), 7,48 (д, 1H), 7,45 (т, 1H), 7,31 (дд, 2H), 7,31 (д, 1H), 7,22 (т, 2H), 7,18 (т, 1H), 7,17 (д, 1H), 7,02 (д, 1H), 6,76 (т, 1H), 6,32 (д, 1H), 5,52 (дд, 1H), 5,47 (шс, 2H), 5,26 (м, 2H), 4,2 (м, 2H), 4,07 (м, 2H), 3,24/3,17 (2м, 4H), 3,17/2,6 (2м, 2H), 2,77/2,64 (м, 6H), 2,7 (м, 2H), 2,49/2,28 (м, 8H), 2,12 (шс, 3H), 1,87 (с, 3H), 1,3 (3с, 9H), 1,07 (т, 3H). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d₆): δ 158,2, 152,4, 131, 130,1, 130,1, 129, 128,3, 128,2, 121,5, 121,4, 120,9, 116,3, 115,8, 112, 111,1, 74,1, 69,2, 68,1, 65,6, 61,2, 56,8, 55,2, 53,1, 46,5, 45,9, 34,5, 32,4, 28,3, 17,4, 14,9. ¹⁹F ЯМР (470 МГц, ДМСО-d₆): δ -112,2. Длина волны ИК (см⁻¹): 1750, 1693, 1221/1160/1120, 834/756.

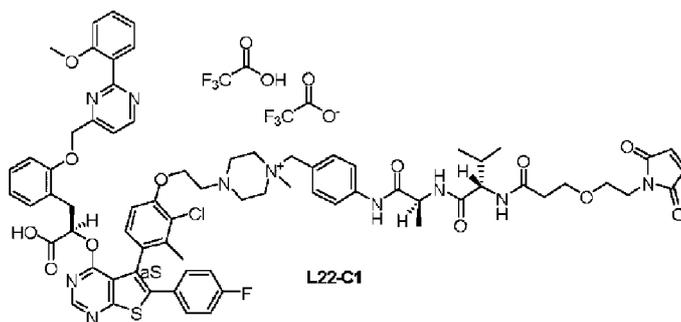
Стадия 2: 2R)-3-[2-[[2-[2-[[2-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метоксикарбонил-метил-амино]этил-метил-карбамоил]оксиметил]фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-пропановая кислота L20-C6

К раствору этил (2R)-3-[2-[[2-[2-[[2-трет-бутоксикарбонил(метил)амино]этил-метил-карбамоил]оксиметил]фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-пропаноата (25 мг, 22 мкмоль) в дихлорметане (0,5 мл) добавляют при 0°C трифторуксусную кислоту (35 мкл, 447 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 6 ч и концентрируют при пониженном давлении. Остаток разбавляют ДМФ (0,5 мл) и последовательно добавляют [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил)карбонат (20 мг, 22 мкмоль; получен согласно стадии 3 получения L23-P3) и ДИПЭА (78 мкл, 0,447 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, концентрируют при пониженном давлении, разбавляют диоксаном (0,5 мл) и добавляют раствор моногидрата гидроксида лития (3,7 мг, 89 мкмоль) в воде (0,3 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, нейтрализуют при 0°C добавлением по каплям водного раствора 1M HCl до pH7 и концентрируют при пониженном давлении.

Неочищенный продукт очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH₄HCO₃ с получением **L20-C6** (13 мг, 8 мкмоль). ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,88 (м, 1H), 8,54 (с, 1H), 7,97 (д, 1H), 7,77 (м, 1H), 7,6 (д, 2H), 7,5 (м, 1H), 7,47 (м, 1H), 7,46 (м, 1H), 7,41 (д, 1H), 7,29 (дд, 2H), 7,21 (т, 2H), 7,19 (д, 1H), 7,18 (м, 2H), 7,12 (т, 1H), 6,97 (д, 1H), 6,7 (т, 1H), 6,19 (д, 1H), 5,49 (д, 1H), 5,45 (м, 4H), 5,23 (м, 2H), 4,89 (м, 2H), 4,4 (м, 1H), 4,32 (дд, 1H), 4,22 (м, 2H), 3,94 (с, 2H), 3,56 (м, 10H), 3,39/2,44 (м, 2H), 3,34 (т, 2H), 3,28 (м, 4H), 2,99 (м, 2H), 2,75/2,7 (м, 6H), 2,73 (м, 2H), 2,5/2,37 (м, 8H), 2,18 (с, 3H), 2,04 (м, 1H), 1,81 (с, 3H), 1,74/1,62 (м, 2H), 1,46/1,38 (м, 2H), 0,86/0,8 (м, 6H). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d₆): δ 158,3, 152,9, 131,5, 131,4, 131,3, 131, 130, 128,3, 128,3, 128, 127,7, 120,8, 119,3, 116,2, 115,6, 112,1, 111,1, 75,3, 70,5, 70,2, 69,2, 67,6, 66,6, 65,4, 57,2, 56,7, 55,1/52,9, 54, 50,5, 46,5, 45,1, 39,1, 34,4, 31,5, 29,6, 27,4, 19,9, 18,2, 18. ¹⁹F ЯМР (470 МГц, ДМСО-d₆): δ -112,5. Длина волны ИК (см⁻¹): 3323, 2106, 1691, 1660, 1220, 1120, 1051, 759. HR-ИЭР+: m/z [M+H]⁺=1609,6517/1609,6500 (измеренное/теоретическое).

Получение L22-C1:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусной кислоты



Стадия 1: (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; бис-2,2,2-трифторуксусная кислота

К раствору 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат (200 мг, 0,388 ммоль) в ДМФ (20 мл) последовательно добавляют трифенилфосфин (152 мг, 0,581 ммоль) и N-бромсукцинимид (103 мг, 0,581 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи и добавляют (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановую кислоту **C1** (302 мг, 345 ммоль) и ДИПЭА (120 мкл, 0,691 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 с и добавляют диэтиламин (49 мкл, 486 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 24 ч, концентрируют при пониженном давлении и очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты; 2,2,2-трифторацетата; бис-2,2,2-трифторуксусной кислоты (253 мг, 0,220 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,4 (с, 1H), 8,89 (д, 1H), 8,75 (д, 1H), 8,61 (с, 1H), 8,08 (большой, 3H), 7,72 (д, 2H), 7,63 (д, 1H), 7,52 (д, 1H), 7,46 (т, 1H), 7,45 (д, 2H), 7,39 (д, 1H), 7,31 (дд, 2H), 7,21 (д, 1H), 7,21 (т, 2H), 7,15 (д, 1H), 7,15 (т, 1H), 7,04 (т, 1H), 7,01 (д, 1H), 6,72 (т, 1H), 6,22 (д, 1H), 5,5 (дд, 1H), 5,25 (м, 2H), 4,53 (м, 2H), 4,52 (м, 1H), 4,28 (м, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,62 (м, 1H), 3,43/3,29 (м, 4H), 3,28/2,5 (м, 2H), 3,13/2,94 (м, 4H), 3,01 (м, 2H), 2,9 (шс, 3H), 2,07 (м, 1H), 1,84 (д, 3H), 1,36 (д, 3H), 0,95 (д, 6H). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d₆): δ 253, 158,2, 134,3, 131,5, 131,4, 131,4, 131,3, 131, 128,9, 121,1, 120,6, 119,5, 116,3, 115,9, 113, 112,3, 111,1, 74,1, 69,8, 67,5, 58,7, 57,9, 56,5, 55,4, 49,8, 46,5, 45,2, 32,9, 30,4, 18,6, 18,4, 18,3. ¹⁹F ЯМР (470 МГц, ДМСО-d₆): δ -74, -112,6.

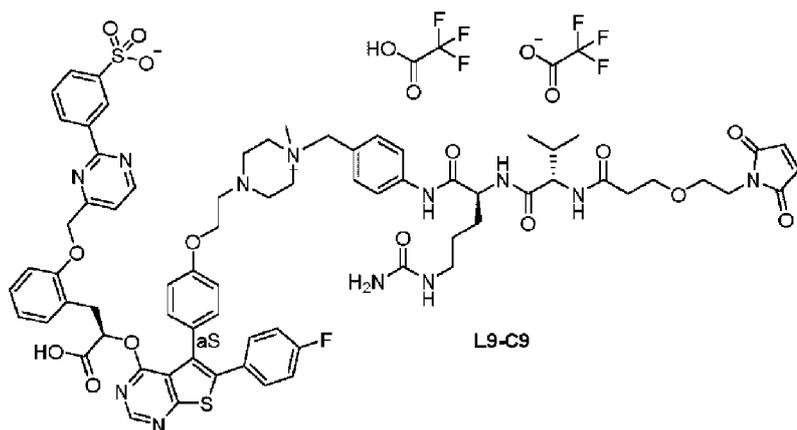
Стадия 2: (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксотиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-

*бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; бис-2,2,2-трифторуксусная кислота **L22-C1***

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты; 2,2,2-трифторацетата; бис-2,2,2-трифторуксусной кислоты (150 мг, 0,130 ммоль) в ДМФ (0,4 мл) добавляют (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноат (60 мг, 194 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч, концентрируют при пониженном давлении и очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением **L22-C1** (67 мг, 37 мкмоль). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,14 (с, 1H), 8,88 (д, 1H), 8,61 (с, 1H), 8,22 (д, 1H), 7,84 (д, 1H), 7,73 (д, 2H), 7,63 (д, 1H), 7,52 (дд, 1H), 7,45 (тд, 1H), 7,44 (д, 2H), 7,38 (д, 1H), 7,31 (дд, 2H), 7,21 (д, 1H), 7,21 (т, 2H), 7,15 (т, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,02 (т, 1H), 7,01 (д, 1H), 7 (с, 2H), 6,71 (т, 1H), 6,21 (д, 1H), 5,5 (дд, 1H), 5,25 (м, 2H), 4,53 (шс, 2H), 4,38 (м, 1H), 4,25 (м, 2H), 4,19 (дд, 1H), 3,76 (с, 3H), 3,58 (м, 2H), 3,54 (т, 2H), 3,48 (м, 2H), 3,43/3,3 (м, 4H), 3,28/2,51 (м, 2H), 3,16/2,98 (м, 4H), 3,04 (м, 2H), 2,91 (шс, 3H), 2,43/2,33 (м, 2H), 1,93 (м, 1H), 1,84 (с, 3H), 1,31 (д, 3H), 0,87/0,82 (м, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ 158, 152,8, 135,2, 134, 131,4, 131,3, 131,3, 131,2, 131, 128,9, 120,8, 120,6, 119,3, 116,3, 115,8, 112,4, 112,3, 111,1, 74,2, 69,6, 67,4, 67,4, 67,1, 67, 58,4, 57,9, 56,2, 55,2, 49,7, 46,5, 45,1, 37,1, 36,3, 32,7, 30,9, 19,6, 18,5, 18,2, 18,2. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆): δ -74,6, -112,2. Длина волны ИК (см⁻¹): 2000-3500, 1760/1705, 1733, 1668, 1180/1128, 829/798/758/720/696. HR-ИЭР+: m/z [M+H]⁺=1345,4944/1345,4954 (измеренное/теоретическое)

Получение L9-C9:

3-[4-[2-[(2R)-2-карбокси-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-этил]фенокси]метил]пиримидин-2-ил]бензолсульфонат; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота



Стадия 1: (2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-N-[4-(гидроксиметил)фенил]-5-уреидо-пентанамид

К раствору 3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропановой кислоты (855 мг, 4,01 ммоль) в ТГФ (42 мл) добавляют N,N'-дициклогексилметандиимин (1,05 г, 5,08 ммоль) и 1-гидроксипирролидин-2,5-дион (510 мг, 4,43 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 20 ч. Осадок удаляют фильтрацией и фильтрат добавляют к раствору (2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-N-[4-(гидроксиметил)фенил]-5-уреидо-пентанамида (1,27 г, 3,35 ммоль) в ДМФ (42 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 20 ч, разбавляют диэтиловым эфиром (250 мл). Твердое вещество выделяют фильтрацией с получением (2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-N-[4-(гидроксиметил)фенил]-5-уреидо-пентанамида (1,81 г; 3,15 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,87 (с, 1H), 8,05 (д, 1H), 7,82 (д, 1H), 7,53 (д, 2H), 7,21 (д, 2H), 7,00 (с, 2H), 5,95 (т, 1H), 5,39 (с, 2H), 5,07 (т, 1H), 4,41 (д, 2H), 4,34-4,40 (м, 1H), 4,18-4,22 (м, 1H), 3,42-3,65 (м, 4H), 2,88-3,02 (м, 2H), 2,73 (с, 2H), 2,28-2,45 (м, 2H), 1,91-1,99 (м, 1H), 1,53-1,75 (м, 2H), 1,30-1,147 (м, 2H), 0,85 (д, 3H), 0,81 (д, 3H). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d₆): δ 171,05, 170,83, 170,32, 170,09, 158,82, 137,49, 137,37, 134,50, 126,88, 118,81, 66,66, 66,53, 62,57, 57,49, 53,06, 36,74, 35,76, 30,51, 29,31, 26,79, 25,20, 19,16, 18,07. MS (ИЭР) m/z [M+H]⁺=575,2.

Стадия 2: (2S)-N-[4-(бромметил)фенил]-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентанамид

К раствору (2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-N-[4-(гидроксиметил)фенил]-5-уреидо-пентанамида (37,2 мг, 65 мкмоль) в ТГФ (1 мл) добавляют по каплям при 0°C под аргоном трибромид фосфора (45 мкл, 97 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 2 ч. прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС: аликвоту обрабатывают большим избытком морфолина в ацетонитриле, с последующим образованием соответствующего продукта присоединения морфолина. Реакционную смесь разбавляют ТГФ (3 мл), гасят добавлением 2 капель насыщенного раствора NaHCO₃, перемешивают в течение 5 мин при комнатной температуре, сушат над сульфатом магния

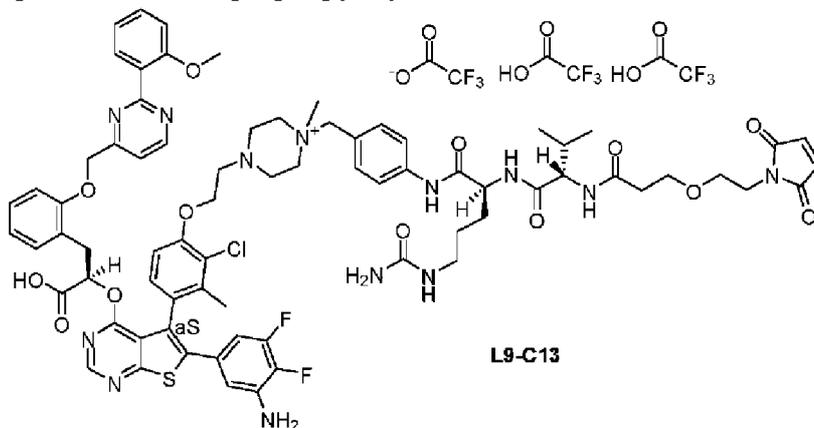
и фильтруют. Остаток, содержащий неочищенный (2S)-N-[4-(бромметил)фенил]-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентанамид (45 мг, 65 мкмоль теоретическое) применяют сразу на следующей стадии. MS (ИЭР) m/z $[M+H]^+ = 662,62$ (продукт присоединения морфолина)

Стадия 3: 3-[4-[[2-[(2R)-2-карбокси-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-этил]фенокси]метил]пиримидин-2-ил]бензолсульфонат L9-C9

К раствору (2R)-2-[[[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-(2-{[2-(3-сульфофенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановая кислота C9 (15 мг, 16 мкмоль) в ДМФ (0,8 мл) добавляют раствор (2S)-N-[4-(бромметил)фенил]-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентанамид (45 мг неочищенный, 65 мкмоль теоретическое со стадии 2) в ТГФ (1 мл) и ДИПЭА (14 мкл, 81 мкмоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре нагревают при 50°C в течение 2 ч. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением L9-C9 (5,2 мг, 3,5 мкмоль). HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+ = 1481,4917/1481,4896$ (измеренное/теоретическое).

Получение L9-C13:

(2R)-2-[6-(3-амино-4,5-дифтор-фенил)-(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота



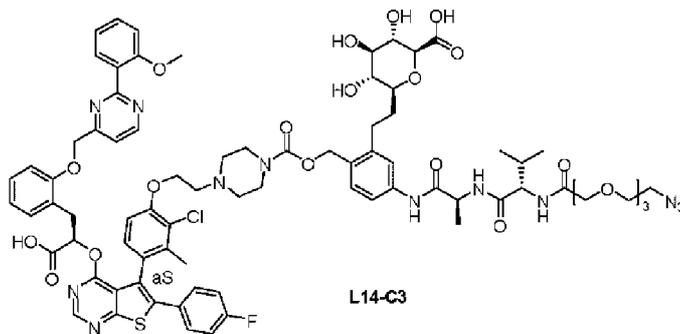
L9-C13

Методика такая же, как в способе синтеза L9-C9, заменяя C9 использованный на стадии 3 на (2R)-2-[[[(5S_a)-6-(3-амино-4,5-дифторфенил)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту C13 и с применением

способа ТФК для очистки. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 10,2 (с), 8,9 (д, 1H), 8,6 (с, 1H), 8,12 (д), 7,8 (д), 7,7 (д, 2H), 7,6 (д, 1H), 7,5 (д, 1H), 7,45 (д, 2H), 7,42 (м, 1H), 7,32 (д, 1H), 7,2 (д, 1H), 7,18 (м, 1H), 7,18 (м, 1H), 7,02 (д, 1H), 7 (с, 2H), 7 (м, 1H), 6,75 (т, 1H), 6,65 (д, 1H), 6,25 (д, 1H), 6,15 (дд, 1H), 5,98 (м, 1H), 5,48 (дд, 1H), 5,4 (шс, 1H), 5,24 (дд, 2H), 4,51 (шс, 2H), 4,38 (м, 1H), 4,28 (м, 2H), 4,22 (м, 1H), 3,80-3,40 (м, 8H), 3,75 (с, 3H), 3,26 (м, 4H), 3,1 (м, 2H), 2,98 (м, 4H), 2,9 (шс, 3H), 2,9/2,5 (2м, 2H), 2,43/2,3 (2м, 2H), 1,92 (м, 1H), 1,88 (с, 3H), 1,70-1,30 (м, 4H), 0,82 (2д, 6H). ^{19}F ЯМР (470 МГц, ДМСО- d_6): δ -74,3, -139,3, -160,4. HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+$ =1464,5482/1464,5449 (измеренное/теоретическое).

Получение L14-C3:

(2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[(5S_a)-5-[[2S)-2-[[2S)-2-[[2-(2-азидоэтокси)ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-фенокси]этил]пиперазин-1-карбонил]оксиметил]фенил]этил]-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоновая кислота



Стадия 1: 2-йод-4-нитро-бензойная кислота

К раствору 2-амино-4-нитро-бензойной кислоты (10,0 г, 54,90 ммоль) в ацетонитриле (280 мл) добавляют моногидрат п-толуолсульфоновой кислоты (32,0 г, 168,2 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 мин, затем раствор нитрита натрия (8,00 г, 115,9 ммоль) и йодид калия (24,0 г, 144,6 ммоль) в растворе в воде (140 мл) добавляют по каплям за 15 мин. Реакционную смесь перемешивают в течение 19 ч. После завершения реакции, смесь гасят тиосульфатом натрия (13,02 г, 82,36 ммоль) и подкисляют водным раствором гидрохлорида 3 М (25 мл). Водный слой экстрагируют этилацетатом (2×250 мл) и объединенные органические слои промывают водным раствором гидрохлорида 1 М (100 мл), сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха. Полученный остаток берут в дихлорметане (1 л) и промывают водным раствором HCl 1 М (100 мл). Органический слой сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха с получением 2-йод-4-нитро-бензойной кислоты (15,0 г, 51,2 ммоль) в виде оранжевого порошка. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 13,8 (шс, 1H), 8,64 (с, 1H), 8,27 (д, 1H), 7,86 (д, 1H).

Стадия 2: (2-йод-4-нитро-фенил)метанол

К раствору 2-йод-4-нитро-бензойной кислоты (5,0 г, 17,06 ммоль) в ТГФ (70 мл)

добавляют раствор борана 1 М в ТГФ (85 мл, 85,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 65°C в течение 4 ч. После завершения реакции, реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и гасят добавлением метанола (200 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин, затем концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением (2-йод-4-нитро-фенил)метанола (3,38 г, 12,11 ммоль) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 8,54 (д, 1H), 8,29 (дд, 1H), 7,70 (д, 1H), 5,82 (т, 1H), 4,47 (д, 2H).

Стадия 3: (4-амино-2-йод-фенил)метанол

К раствору (2-йод-4-нитро-фенил)метанола (3,70 г, 13,26 ммоль) в этаноле (100 мл) и воде (25 мл) последовательно добавляют железо (3,70 г, 66,25 ммоль) и хлорид аммония (800 мг, 14,96 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 3 часов при 80°C. После завершения реакции, реакционную смесь фильтруют над Celite®, промывают этанолом и концентрируют досуха. Полученный остаток берут в этилацетате (100 мл) и промывают насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (100 мл). Органический слой сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха с получением (4-амино-2-йод-фенил)метанола (2,48 г, 9,95 ммоль) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 7,02-7,10 (м, 2H), 6,57 (д, 1H), 5,16 (с, 2H), 4,97 (т, 1H), 4,28 (д, 2H).

Стадия 4: 4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-анилин

К раствору (4-амино-2-йод-фенил)метанола (3,51 г, 13,37 ммоль) в дихлорметане (150 мл) добавляют имидазол (0,95 г, 13,95 ммоль). Смесь охлаждают до 0°C, затем раствор трет-бутил-хлор-диметил-силана (2,40 мл, 13,85 ммоль) в дихлорметане (150 мл) добавляют по каплям в течение 15 минут. Ледяную баню удаляют и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч. После завершения реакции, реакционную смесь гасят метанолом (20 мл) и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением 4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-анилина (3,64 г; 10,03 ммоль; 75%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 7,05 (с, 1H), 7,03 (д, 1H), 6,55 (д, 1H), 5,24 (с, 2H), 4,46 (с, 2H), 0,88 (с, 9H), 0,06 (с, 6H).

Стадия 5: (2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропановая кислота

К раствору (2S)-2-аминопропановая кислота (3,22 г, 36,09 ммоль) в воде (90 мл) последовательно добавляют карбонат натрия (7,29 г, 68,74 ммоль) и раствор (2,5-диоксопирролидин-1-ил) (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноата (15,0 г, 34,37 ммоль) в диметоксиэтаноле (90 мл). Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре. После завершения реакции, смесь подкисляют до pH=1 водным раствором гидрохлорида 1 М, затем водный слой экстрагируют этилацетатом (3×500 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха с получением неочищенной смеси, которую растирают с диэтиловым эфиром (50 мл) с получением (2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-

флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропановой кислоты (11,25 г, 27,41 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 12,48 (с, 1H), 8,21 (д, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,72-7,79 (м, 2H), 7,28-7,46 (м, 5H), 4,15-4,32 (м, 4H), 3,90 (т, 1H), 1,90-2,02 (м, 1H), 1,28 (д, 3H), 0,86-0,90 (м, 6H).

Стадия 6: 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат

К раствору (2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропановой кислоты (1,50 г, 3,65 ммоль) в дихлорметане (18 мл) и метаноле (18 мл) последовательно добавляют 4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-анилин (1,33 г, 3,65 ммоль) и этил 2-этокси-2H-хинолин-1-карбоксилат (1,36 г, 5,48 ммоль). Бесцветную суспензию перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре. После концентрации досуха, неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетат в циклогексане) и затем C18 хроматографией (градиент метанол в воде) с получением 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (1,18 г, 1,56 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,05 (с, 1H), 8,16-8,24 (м, 2H), 7,88 (д, 2H), 7,71-7,77 (м, 2H), 7,55 (д, 1H), 7,37-7,48 (м, 3H), 7,27-7,37 (м, 3H), 4,56 (с, 2H), 4,38 (т, 1H), 4,18-4,33 (м, 3H), 3,91 (т, 1H), 2,08-2,20 (м, 1H), 1,30 (д, 3H), 0,83-0,95 (м, 15H), 0,06 (с, 6H).

Стадия 7: (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-трибензилокси-6-(бензилоксиметил)тетрагидропиран-2-он

Суспензию (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-трибензилокси-6-(бензилоксиметил)тетрагидропиран-2-ола (30,0 г, 55,49 ммоль) в ДМСО (120 мл) перемешивают в течение 30 мин при комнатной температуре (до полной солиubilизации) затем уксусный ангидрид (90 мл) добавляют по каплям при комнатной температуре в течение 15 мин. Бежевый раствор перемешивают в течение 16 ч, затем охлаждают до 0°C и водный раствор гидрохлорида 1 М (100 мл) медленно добавляют. Реакционную смесь перемешивают в течение 20 мин при комнатной температуре, затем уксусную кислоту выпаривают. Полученный остаток разбавляют водой (200 мл) и этилацетатом (200 мл). Водный слой экстрагируют этилацетатом (2×200 мл) и объединенные органические слои промывают водой (2×500 мл), насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (2×500 мл), затем сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха с получением неочищенной смеси. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-трибензилокси-6-(бензилоксиметил)тетрагидропиран-2-она (25,05 г, 46,51 ммоль) в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 7,19-7,39 (м, 20H), 4,85 (д, 1H), 4,57-4,72 (м, 5H), 4,46-4,56 (м, 3H), 4,36 (д, 1H), 3,98-4,05 (м, 1H), 3,84-3,92 (м, 1H), 3,65-3,76 (м, 2H).

Стадия 8: (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-трибензилокси-6-(бензилоксиметил)-2-(2-триметилсилилэтинил)тетрагидропиран-2-ол

К раствору триметилсилилацетилена (24 мл, 168,6 ммоль) в ТГФ (325 мл) добавляют за 20 мин при -78°C раствор бутиллития 2,5 М в гексане (59,41 мл, 148,5 ммоль). Бесцветный раствор перемешивают в течение 45 мин при -78°C и затем 45 мин при 0°C . Реакционную смесь охлаждают до -78°C , и раствор (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-трибензилокси-6-(бензилоксиметил)тетрагидропиран-2-она (25,0 г, 46,41 ммоль) в ТГФ (325 мл) добавляют по каплям в течение 45 мин. Реакционную смесь перемешивают в течение 4 ч при этой температуре, затем гасят водой (200 мл). Водный слой экстрагируют этилацетатом (2×200 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха с получением (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-трибензилокси-6-(бензилоксиметил)-2-(2-триметилсилилэтинил)тетрагидропиран-2-ола (29,56 г, 46,41 ммоль) в виде бежевого масла, содержащего два диастереомера в соотношении 4/6. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 7,13-7,43 (м, 20H), 4,87-4,99 (м, 1H), 4,65-4,83 (м, 4H), 3,43-3,57 (м, 3H), 3,70-3,85 (м, 2H), 3,55-3,68 (м, 3H), 3,43-3,53 (м, 2H), 0,11-0,22 (м, 9H).

Стадия 9: триметил-[2-[(2S,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-трибензилокси-6-(бензилоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]этинил]силан

К раствору (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-трибензилокси-6-(бензилоксиметил)-2-(2-триметилсилилэтинил)тетрагидропиран-2-ола (29,56 г, 46,42 ммоль) в ацетонитриле (83 мл) и дихлорметане (193 мл) добавляют за 20 мин при -15°C раствор триэтилсилана (44,98 мл, 278,5 ммоль) в смеси ацетонитрил/дихлорметан (37 мл/18 мл), затем раствор диэтилэфирата трифторида бора (23,53 мл, 185,7 ммоль) в ацетонитриле (37 мл) в течение 30 мин при -15°C . Бесцветный раствор перемешивают в течение 5 ч при той же температуре, затем разбавляют водой (500 мл). Водный слой экстрагируют этилацетатом (2×500 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха с получением триметил-[2-[(2S,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-трибензилокси-6-(бензилоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]этинил]силана (28,82 г, 46,41 ммоль) в виде коричневого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 7,10-7,44 (м, 20H), 4,93 (д, 1H), 4,67-4,86 (м, 4H), 4,43-4,57 (м, 3H), 4,16-4,28 (м, 1H), 3,42-3,68 (м, 6H), 0,15 (с, 9H).

Стадия 10: (2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-трибензилокси-2-(бензилоксиметил)-6-этинилтетрагидропиран

К раствору триметил-[2-[(2S,3S,4R,5R,6R)-3,4,5-трибензилокси-6-(бензилоксиметил)тетрагидропиран-2-ил]этинил]силана (28,80 г, 46,39 ммоль) в метаноле (1,12 L) и дихлорметане (240 мл) добавляют водный раствор гидроксида натрия 1 М (80 мл). Бежевый раствор перемешивают в течение 1 ч при комнатной температуре затем подкисляют до $\text{pH}=1$ водным раствором гидрохлорида 1 М и разбавляют водой (500 мл). метанол выпаривают, и затем водный слой экстрагируют этилацетатом (2×1 л). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением (2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-трибензилокси-2-(бензилоксиметил)-6-этинил-тетрагидропирана (20,00 г, 36,45 ммоль) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 3,42-3,67 (м, 7H), 4,17 (д, 1H), 4,44-

4,56 (м, 3H), 4,67-4,86 (м, 4H), 4,90 (д, 1H), 7,15-7,40 (м, 20H).

Стадия 11: (2S,3R,4R,5S,6R)-2-этинил-6-(гидроксиметил)тетрагидропиран-3,4,5-триол

К раствору (2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-трибензилокси-2-(бензилоксиметил)-6-этинил-тетрагидропирана (20,00 г, 36,45 ммоль) в этантиоле (400 мл) добавляют по каплям при комнатной температуре в течение 5 мин, диэтилэфират трифторида бора (147,8 мл, 1166 ммоль). Бежевый раствор перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре, затем охлаждают до 0°C и оборудуют газовой ловушкой, содержащей насыщенный водный раствор гипохлорита натрия. Насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия (500 мл) добавляют по каплям при 0°C за 1 ч (образование диоксида углерода). После концентрации досуха, неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в дихлорметане) с получением (2S,3R,4R,5S,6R)-2-этинил-6-(гидроксиметил)тетрагидропиран-3,4,5-триола (4,05 г, 21,52 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 5,28 (д, 1H), 4,99 (д, 1H), 4,91 (д, 1H), 4,52 (т, 1H), 3,77 (д, 1H), 3,60-3,69 (м, 1H), 3,35-3,43 (м, 1H), 3,32 (с, 1H), 2,97-3,13 (м, 4H).

Стадия 12: метил (2S,3S,4R,5R,6S)-6-этинил-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоксилат

К раствору (2S,3R,4R,5S,6R)-2-этинил-6-(гидроксиметил)тетрагидропиран-3,4,5-триола (4,05 г, 21,52 ммоль) в насыщенном водном растворе гидрокарбоната натрия (81 мл) и ТГФ (81 мл) добавляют (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил (168 мг, 1,08 ммоль). Желтую суспензию охлаждают до 0°C и 1,3-дибром-5,5-диметил-имидазолидин-2,4-дион (12,31 г, 43,04 ммоль) добавляют порциями за 30 мин. Реакционную смесь перемешивают в течение 4 ч при 0°C, затем гасят добавлением метанол (40 мл). Через 30 мин перемешивания при этой температуре добавляют насыщенный водный раствор карбоната калия (10 мл) и дихлорметан (100 мл). Органический слой экстрагируют вода (2×200 мл), затем объединенные водные слои подкисляют до pH=1 водным раствором гидрохлорида 3M и концентрируют досуха. Полученный остаток берут в метаноле (100 мл) и в водном растворе гидрохлорида 3M (20 мл). Смесь концентрируют досуха и совместно выпаривают несколько раз с метанолом (4×100 мл). Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в дихлорметане, цериевый проявитель) с получением метил (2S,3S,4R,5R,6S)-6-этинил-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоксилата (3,00 г, 13,88 ммоль) в виде бежевого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 5,46 (д, 1H), 5,32 (д, 1H), 5,18 (д, 1H), 3,93-4,00 (м, 1H), 3,75 (дд, 1H), 3,65 (с, 3H), 3,40-3,44 (м, 1H), 3,31 (с, 1H), 3,09-3,19 (м, 2H).

Стадия 13: метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-этинил-тетрагидропиран-2-карбоксилат

К раствору метил (2S,3S,4R,5R,6S)-6-этинил-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоксилата (3,00 г, 13,88 ммоль) в ДМФ (37,5 мл) и пиридине (12,5 мл) добавляют N,N-диметилпиридин-4-амин (84,8 мг, 0,693 ммоль). Реакционную смесь охлаждают до 0°C затем уксусный ангидрид (20,0 мл, 213 ммоль) добавляют по каплям за 5 мин. Бесцветный

раствор перемешивают в течение 3 ч при комнатной температуре, затем разбавляют водным раствором гидрохлорида 1 М (200 мл). Водный слой экстрагируют этилацетатом (2×200 мл). Объединенные органические слои промывают водным раствором гидрохлорида 1 М (2×200 мл), затем насыщенным водным раствором карбоната калия (200 мл), затем сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха с получением неочищенной смеси. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане, цериевый проявитель) с получением метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-этинил-тетрагидропиран-2-карбоксилата (4,60 г, 13,44 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 5,33 (т, 1H), 4,93-5,01 (м, 2H), 4,70 (д, 1H), 4,44 (д, 1H), 3,67 (с, 1H), 3,64 (с, 3H), 2,02 (с, 3H), 1,94-2,01 (м, 6H).

Стадия 14: метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-5-[[2S)-2-[[2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]этинил]тетрагидропиран-2-карбоксилат

К раствору метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-этинил-тетрагидропиран-2-карбоксилата (496 мг, 1,45 ммоль) в ДМФ (7,3 мл) последовательно добавляют 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[1S)-2-[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат (730 мг, 0,966 ммоль), ДИПЭА (738 мкл, 4,47 ммоль), йодид меди (18,4 мг, 96,6 ммоль) и дихлор-бис-(трифенилфосфин)палладий(II) (67,8 мг, 96,6 ммоль). Желтый раствор промывают аргоном, затем перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре. После разбавления водой (100 мл), водный слой экстрагируют этилацетатом (2×100 мл). Объединенные органические слои промывают водой (2×200 мл) и насыщенным водным раствором хлорида аммония (2×200 мл), затем сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетата в циклогексане) с получением метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-5-[[2S)-2-[[2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]этинил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (782 мг, 0,806 ммоль) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,09 (с, 1H), 8,20 (д, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,70-7,78 (м, 3H), 7,55 (д, 1H), 7,32-7,46 (м, 4H), 7,27-7,32 (м, 2H), 5,41 (т, 1H), 4,96-5,14 (м, 3H), 4,67 (с, 2H), 4,51 (д, 1H), 4,36-4,44 (м, 1H), 4,16-4,32 (м, 3H), 3,88-3,95 (м, 1H), 3,64 (с, 3H), 1,94-2,07 (м, 10H), 1,30 (д, 3H), 0,84-0,93 (м, 15H), 0,08 (с, 6H).

Стадия 15: метил (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-5-[[2S)-2-[[2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилат

Раствор метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-5-[[2S)-2-[[2S)-2-(9H-флуорен-9-

илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]этинил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (750 мг, 0,773 ммоль) в ТГФ (15 мл) промывают аргоном. Добавляют сухую 5% платину на угле (75 мг, 50% масс./масс.). Реакционную смесь последовательно промывают аргоном, H₂ и перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере H₂ (P атм.). Реакционную смесь фильтруют через слой Celite®, промывают ТГФ, затем концентрируют досуха. Всю последовательность действий (добавляют сухую 5% платину на угле (75 мг, 50% масс./масс.), перемешивая в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере H₂ (1 бар) и фильтруя через слой Celite®) повторяют еще 4 раза. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением метил (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (470 мг, 0,483 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,90 (с, 1H), 8,16 (д, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,70-7,78 (м, 2H), 7,37-7,49 (м, 4H), 7,27-7,32 (м, 3H), 7,23 (д, 1H), 5,29 (т, 1H), 4,95 (т, 1H), 4,78 (т, 1H), 4,60 (с, 2H), 4,34-4,44 (м, 2H), 4,16-4,32 (м, 3H), 3,88-3,95 (м, 1H), 3,72-3,79 (м, 1H), 3,64 (с, 3H), 2,69-2,78 (м, 1H), 2,50-2,60 (м, 1H), 1,92-2,03 (м, 10H), 1,55-1,75 (м, 2H), 1,30 (д, 3H), 0,84-0,93 (м, 15H), 0,05 (с, 6H).

Стадия 16: метил (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилат

К раствору метил (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (470 мг, 0,483 ммоль) в ТГФ (540 мкл) и воде (540 мкл) добавляют уксусную кислоту (1,6 мл, 28,28 ммоль). Бесцветный раствор перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре затем разбавляют водой (100 мл). Водный слой экстрагируют этилацетатом (2×100 мл). Объединенные органические слои промывают водой (2×200 мл) и насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (200 мл), затем сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением метил (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (354 мг, 0,412 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,87 (с, 1H), 8,16 (д, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,70-7,78 (м, 2H), 7,37-7,50 (м, 4H), 7,27-7,37 (м, 3H), 7,25 (д, 1H), 5,29 (т, 1H), 4,91-4,98 (м, 2H), 4,78 (т, 1H), 4,34-4,44 (м, 4H), 4,16-4,32 (м, 3H), 3,88-3,95 (м, 1H), 3,72-3,79 (м, 1H), 3,64 (с, 3H), 2,64-2,73 (м, 1H), 2,50-2,60 (м, 1H), 1,92-2,03 (м, 10H), 1,69-1,79 (м, 1H), 1,52-1,65 (м, 1H), 1,30 (д, 3H), 0,84-0,93 (м, 6H).

Стадия 17: метил (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[(4-нитрофенокси)карбонил]оксиметил]фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилат

К раствору метил (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (310 мг, 0,361 ммоль) в ТГФ (7,75 мл) последовательно добавляют пиридин (146 мкл, 1,80 ммоль) и 4-нитрофенил хлорформат (182 мг, 0,901 ммоль). Белую суспензию перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре, затем концентрируют досуха с получением неочищенной смеси. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в дихлорметане) с получением метил (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[(4-нитрофенокси)карбонил]оксиметил]фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (257 мг, 0,251 ммоль) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 10,04 (с, 1H), 8,31 (д, 2H), 8,20 (д, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,66-7,78 (м, 2H), 7,56 (д, 2H), 7,28-7,52 (м, 8H), 5,31 (т, 1H), 5,25 (с, 2H), 4,96 (т, 1H), 4,79 (т, 1H), 4,40 (д, 2H), 4,16-4,32 (м, 3H), 3,88-3,95 (м, 1H), 3,74-3,83 (м, 1H), 3,61 (с, 3H), 2,74-2,84 (м, 1H), 2,60-2,71 (м, 1H), 1,90-2,03 (м, 10H), 1,72-1,83 (м, 1H), 1,58-1,71 (м, 1H), 1,30 (д, 3H), 0,82-0,94 (м, 6H). ЖХ-МС: MS (ИЭР) m/z $[M+Na]^+=1047,6$.

Стадия 18: (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[2-[[[(2SR,3SR,4RS,5SR,6SR)-3,4,5-триацетокси-6-метоксикарбонил-тетрагидропиран-2-ил]этил]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-(2-пиперазин-1-илэтокси)фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (**C3**) (118 мг, 0,121 ммоль) в диметилформамиде (3,0 мл) последовательно добавляют раствор метил (3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[(4-нитрофенокси)карбонил]оксиметил]фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (130 мг, 0,127 ммоль) в диметилформамиде (3,0 мл) и ДИПЭА (60 мкл, 0,363 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч. (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[2-[(2SR,3SR,4RS,5SR,6SR)-3,4,5-триацетокси-6-метоксикарбонил-тетрагидропиран-2-ил]этил]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановую кислоту получают в виде раствора в диметилформамиде и применяют подобным образом на следующей стадии.

УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z $[M+H]^+=1745,6+1747,6$.

Стадия 19: (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[2-[[[(2SR,3SR,4RS,5SR,6SR)-3,4,5-триацетокси-6-метоксикарбонил-тетрагидропиран-2-ил]этил]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору 2SR,3SR,4RS,5RS,6SR)-6-[2-[(5S_a)-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-фенокси]этил]пиперазин-1-карбонил]оксиметил]фенил]этил]-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоновой кислоты (0,121 ммоль) в ДМФ (3,0 мл) со стадии 18 последовательно добавляют метанол (2 мл) и моногидрат гидроксида лития (64,0 мг, 1,52 ммоль) в растворе в воде (2 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH₄HCO₃ с получением (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[2-[[[(2SR,3SR,4RS,5SR,6SR)-3,4,5-триацетокси-6-метоксикарбонил-тетрагидропиран-2-ил]этил]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (124 мг, 0,0895 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z $[M+H]^+=1384,3+1386,3$.

Стадия 20: (2,3,4,5,6-пентафторфенил) 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]уксусной кислоты

К раствору 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]уксусной кислоты (75 мг, 0,342 ммоль) в растворе ТГФ (500 мкл) добавляют раствор 2,3,4,5,6-пентафторфенола (75,5 мг, 0,410 ммоль) в ТГФ (500 мкл) и раствор N,N'-дициклогексилмктандиимина (84,7 мг, 0,410 ммоль) в ТГФ (500 мкл). Реакционную смесь перемешивают в течение 15 ч при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. (2,3,4,5,6-пентафторфенил) 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетат получают в виде ТГФ раствора простой фильтрацией суспензии на маленькой одноразовой фритте. Этот раствор применяют без дальнейшей очистки на следующей стадии. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z $[M-N_2+H]^+=372,3$.

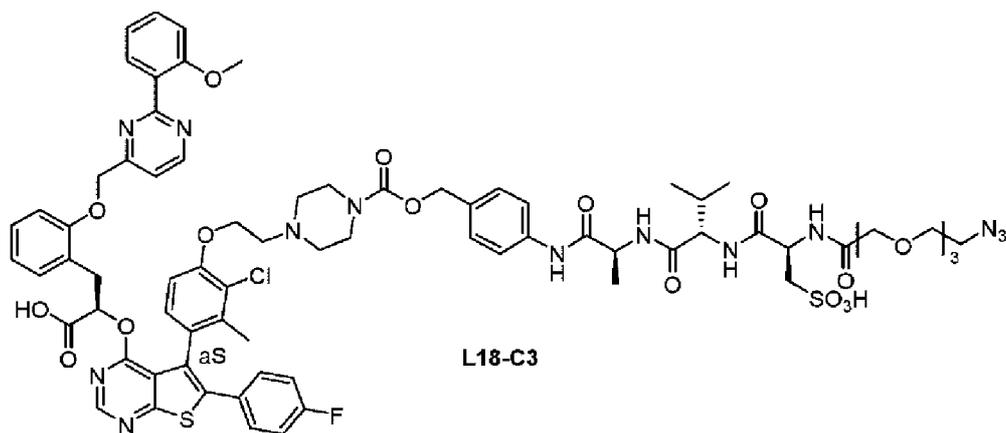
Стадия 21: (2SR,3SR,4RS,5RS,6SR)-6-[2-[(5S_a)-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-

d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-фенокси]этил]пиперазин-1-карбонил]оксиметил]фенил]этил]-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоновая кислота **L14-C3**

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[2-[(2SR,3SR,4RS,5SR,6SR)-3,4,5-триацетокси-6-метоксикарбонил-тетрагидропиран-2-ил]этил]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (118 мг, 0,085 ммоль) в ДМФ (500 мкл) последовательно добавляют раствор (2,3,4,5,6-пентафторфенил) 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетата (0,342 ммоль) в ТГФ со стадии 20 и ДИПЭА (42,2 мкл, 0,256 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH₄HCO₃ с получением **L14-C3** в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+H]⁺=1599,0+1601,2. Длина волны ИК (см⁻¹): 3263, 2105, 1652, 1600, 1284/1240/1089, 756. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,98 (с), 8,85 (д, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,38 (д, 1H), 7,93 (д, 1H), 7,56 (д, 1H), 7,5 (т, 1H), 7,49 (д, 1H), 7,47 (д, 1H), 7,44 (д, 1H), 7,42 (с, 1H), 7,3 (дд, 2H), 7,22 (д, 1H), 7,2 (т, 2H), 7,19 (т, 1H), 7,13 (д, 1H), 7,08 (т, 1H), 7,02 (т, 1H), 6,95 (д, 1H), 6,65 (т, 1H), 6,11 (д, 1H), 5,43 (д, 1H), 5,27/5,2 (м, 2H), 4,93 (шс, 2H), 4,38 (м, 1H), 4,35/4,2 (2м, 2H), 4,3 (м, 1H), 3,94 (с, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,58 (м, 10H), 3,57 (м, 1H), 3,51/2,29 (2dd, 2H), 3,35 (м, 2H), 3,25 (м, 4H), 3,2 (м, 1H), 3,2 (м, 1H), 3,06 (м, 1H), 2,96 (м, 1H), 2,75 (м, 2H), 2,72/2,5 (м, 2H), 2,41 (м, 4H), 2 (м, 1H), 1,99/1,6 (м, 2H), 1,8 (с, 3H), 1,3 (д, 3H), 0,88/0,82 (2д, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ 158,2, 152,7, 131,9, 131,4, 131,4, 131,3, 131,1, 131, 127,8, 120,6, 120,5, 120,1, 116,8, 116,3, 116, 112,6, 112, 111,6, 79,6, 79,6, 78,5, 76,8, 74,2, 73,1, 70,3, 70,3, 69,3, 66,3, 65,1, 56,8, 56,3, 56,1, 52,6, 50,3, 49,4, 43,8, 34,2, 33,5, 31,7, 28, 19,6/18,4, 18,2, 18. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆): δ -112,5. HR-ИЭР+: m/z [M+H]⁺=1599,5724 (1599,5704) (измеренное/теоретическое)

Получение L18-C3:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[2-(2-азидоэтокси)ацетил]амино]-3-сульфо-пропаноил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота



Стадия 1: 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат

К раствору (2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропановой кислоты (6,0 г, 14,6 ммоль; получен согласно стадии 5 получения **L14-C3**) в дихлорметане (70 мл) и метаноле (30 мл) последовательно добавляют (4-аминофенил)метанол (2,16 г, 17,5 ммоль) и этил 2-этокси-2H-хинолин-1-карбоксилат (5,42 г, 21,93 ммоль). Красный раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч (выпадение осадка через несколько минут). После завершения реакции, реакцию смесь разбавляют диэтиловым эфиром (70 мл). Полученный осадок отфильтровывают и сушат с получением 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (5,16 г, 10,01 ммоль) в виде бежевого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,91 (с, 1H), 8,15 (д, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,70-7,78 (м, 2H), 7,53 (д, 2H), 7,38-7,46 (м, 3H), 7,29-7,35 (м, 2H), 7,23 (д, 2H), 5,08 (т, 1H), 4,37-4,50 (м, 3H), 4,16-4,34 (м, 3H), 3,91 (т, 1H), 1,92-2,02 (м, 1H), 1,30 (д, 3H), 0,83-0,91 (м, 6H).

Стадия 2: (2S)-2-амино-N-[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]-3-метил-бутанамид

К раствору 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (5,16 г, 10,01 ммоль) в ДМФ (120 мл) добавляют пиперидин (52 мл, 525 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре затем пиперидин выпаривают и полученный раствор разбавляют вода (500 мл). Полученное твердое вещество отфильтровывают и фильтрат дважды промывают диэтиловым эфиром (2×500 мл). Водный слой концентрируют досуха с получением неочищенной реакционной смеси. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол (содержащий 7M аммиак) в дихлорметане) с получением (2S)-2-амино-N-[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]-3-метил-бутанамид (2,02 г, 6,89 ммоль) в виде бежевого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,0 (с, 1H), 8,17 (с, 1H), 7,53 (д, 2H), 7,23 (д, 2H), 5,12 (т, 1H), 4,39-4,52 (м, 3H), 2,96-3,02 (м, 1H), 1,86-1,97 (м, 1H), 1,70 (шс, 2H), 1,29 (д, 3H), 0,88 (д, 3H), 0,78 (д, 3H).

Стадия 3: [(2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-оксо-3-натрийокси-

пропил]сульфонилоксинарий

К раствору моногидрата [(2R)-2-амино-3-оксо-3-натрийокси-пропил]сульфонилоксинария (3,00 г, 12,98 ммоль) в воде (127 мл) добавляют карбонат натрия (4,13 г, 38,94 ммоль). Раствор 9H-флуорен-9-илметила карбонохлоридата (3,69 г, 14,28 ммоль) в диоксане (127 мл) добавляют по каплям за 15 мин при комнатной температуре. Смесь перемешивают при этой температуре в течение 4 ч. После завершения реакции, смесь нейтрализуют до pH=7 водным раствором HCl 1 М, разбавляют насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (50 мл) и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают С18 хроматографией с обращенной фазой с применением нейтрального способа с получением [(2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-оксо-3-натрийокси-пропил]сульфонилоксинария (4,4 г, 10,11 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 7,88 (д, 2H), 7,70 (д, 2H), 7,39-7,44 (м, 2H), 7,29-7,36 (м, 2H), 6,71 (с, 1H), 3,84-4,25 (м, 4H), 2,73-2,91 (м, 2H).

Стадия 4: [(2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-[[[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]амино]-3-оксо-пропил]сульфонилоксинарий

К раствору (2S)-2-амино-N-[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]-3-метил-бутанамида (1,19 г, 4,04 ммоль) в ДМФ (395 мл) последовательно добавляют [(2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-оксо-3-натрийокси-пропил]сульфонилоксинарий (4,40 г, 10,11 ммоль), ДИПЭА (6,01 мл, 36,38 ммоль) и ГБТУ (3,83 г, 10,11 ммоль). Белую суспензию перемешивают в течение 22 ч при комнатной температуре и затем охлаждают до 0°C. Разбавление водой (1,5 л), насыщенным раствором карбонат натрия (20 мл) и твердым хлоридом натрия, дают белую эмульсию, которую фильтруют и фильтрат концентрируют досуха с получением неочищенной смеси. Неочищенный продукт очищают С18 хроматографией с обращенной фазой (градиент метанол в воде) с получением [(2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-[[[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]амино]-3-оксо-пропил]сульфонилоксинария (936 мг, 1,36 ммоль) в виде бежевого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,39 (с, 1H), 8,25-8,31 (м, 1H), 8,11-8,17 (м, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,70 (д, 2H), 7,64 (д, 2H), 7,50-7,55 (м, 1H), 7,38-7,46 (м, 2H), 7,29-7,35 (м, 2H), 7,20 (д, 2H), 5,07 (с, 1H), 4,51 (с, 1H), 4,42 (с, 2H), 4,19-4,33 (м, 4H), 4,01 (с, 1H), 2,90-3,10 (м, 2H), 2,08-2,20 (м, 1H), 1,31 (д, 3H), 0,8-0,93 (м, 6H).

Стадия 5: (2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-[[[(1S)-2-метил-1-[[[(1S)-1-метил-2-[4-[(4-нитрофенокси)карбонил оксиметил]анилино]-2-оксо-этил]карбамоил]пропил]амино]-3-оксо-пропан-1-сульфонат

К суспензии [(2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-[[[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-(гидроксиметил)анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]амино]-3-оксо-пропил]сульфонилоксинария (600 мг, 0,87 ммоль) в ТГФ (24 мл) добавляют ДИПЭА (432 мкл, 2,61 ммоль), затем 4-нитрофенил хлорформиат (439 мг, 2,17 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 4 ч. Дополнительный 4-нитрофенил

хлорформат (439 мг, 2,17 ммоль) добавляют, и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение еще 16 ч. Дополнительный 4-нитрофенил хлорформат (439 мг, 2,17 ммоль) добавляют. Через 5 ч перемешивания при комнатной температуре, смесь концентрируют досуха и очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) и затем C18 хроматографией с обращенной фазой с применением нейтрального способа с получением (2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-[[[(1S)-2-метил-1-[[[(1S)-1-метил-2-[4-[(4-нитрофенокси)карбонил оксиметил]анилино]-2-оксо-этил]карбамоил]пропил]амино]-3-оксо-пропан-1-сульфоната (303 мг, 0,32 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,52 (с, 1H), 8,25-8,37 (м, 3H), 8,06-8,24 (м, 4H), 7,89 (д, 2H), 7,76 (д, 2H), 7,70 (д, 2H), 7,49-7,61 (м, 3H), 7,35-7,45 (м, 4H), 7,26-7,35 (м, 2H), 5,23 (с, 2H), 4,48 (с, 1H), 4,20-4,33 (м, 4H), 4,01 (с, 1H), 3,57-3,66 (м, 2H), 3,10-3,18 (м, 2H), 2,90-3,10 (м, 2H), 2,08-2,20 (м, 1H), 1,33 (д, 3H), 1,21-1,26 (м, 15H), 0,86-0,92 (м, 6H). УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M-H]⁻: 830,5.

Стадия 6: (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)бутаноил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-(2-пиперазин-1-илэтокси)фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты; 2,2,2-трифторуксусной кислоты (**C3**) (128 мг, 0,149 ммоль) в ДМФ (1,5 мл) последовательно добавляют раствор (2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-[[[(1S)-2-метил-1-[[[(1S)-1-метил-2-[4-[(4-нитрофенокси)карбонил оксиметил]анилино]-2-оксо-этил]карбамоил]пропил]амино]-3-оксо-пропан-1-сульфоната (150 мг, 0,156 ммоль) в ДМФ (1,5 мл) и ДИПЭА (77 мкл, 0,468 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)бутаноил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановую кислоту получают в виде раствора в диметилформамиде, который применяют подобным образом на следующей стадии. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+H]⁺=1553,2+1555,3.

Стадия 7: (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-аминобутаноил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-

флуорен-9-илметоксикарбониламино)бутаноил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (0,156 ммоль) в диметилформамиде (3 мл), полученной на предыдущей стадии, добавляют пиперидин (30,6 мкл, 0,312 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 ч, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH_4HCO_3 с получением (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-аминобутаноил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (148 мг=0,111 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+H]⁺=1331,4+1333,5.

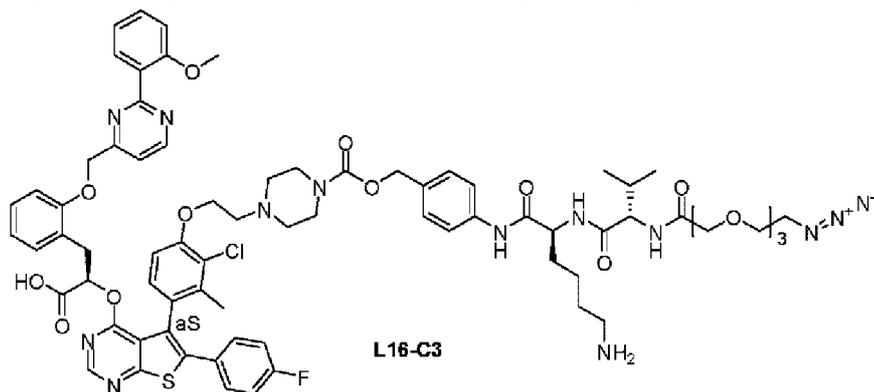
Стадия 8: (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]бутаноил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторуксусная кислота **L18-C3**

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-аминобутаноил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (148 мг, 0,111 ммоль) в ДМФ (1,5 мл) последовательно добавляют раствор (2,3,4,5,6-пентафторфенил) 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетата (0,596 ммоль; получен согласно стадии 20 получения **L14-C3**) в ТГФ (1 мл) и ДИПЭА (74 мкл, 0,447 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH_4HCO_3 с получением **L18-C3** (60 мг, 0,0389 ммоль) в виде белого порошка. Длина волны ИК (см⁻¹): 3288, 2101, 1659, 1237, 1039, 833, 755. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ (м, 10H), 9,42 (с, 1H), 8,88 (д, 1H), 8,58 (с, 1H), 8,32 (д, 1H), 8,18 (д, 1H), 8,12 (д, 1H), 7,71 (м, 1H), 7,7 (д, 2H), 7,54 (дд, 1H), 7,46 (тд, 1H), 7,39 (д, 1H), 7,29 (дд, 2H), 7,25 (д, 2H), 7,21 (т, 2H), 7,18 (д, 1H), 7,15 (д, 1H), 7,13 (т, 1H), 7,04 (т, 1H), 6,99 (д, 1H), 6,71 (т, 1H), 6,22 (д, 1H), 5,47 (м, 1H), 5,23 (AB, 2H), 4,98 (с, 2H), 4,71 (кв, 1H), 4,3 (м, 1H), 4,24/4,19 (2м, 2H), 3,97 (дд, 1H), 3,92 (м, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,37 (т, 2H), 3,31 (м, 4H), 3,12/2,97 (2дд, 2H), 2,74 (т, 2H), 2,45 (м, 4H), 2,15 (м, 1H), 1,81 (с, 3H), 1,33 (д, 3H), 0,91 (2д, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ 157,9, 152,3, 131,3, 131,2, 131,1, 131, 130,7, 128,9, 128,6, 120,7, 120,4, 119,6, 116,4, 112,7, 112,

111,3, 70,6, 70,3, 69,4, 67,5, 66,3, 59,7, 56,7, 56,1, 53,4, 52,5, 50,8, 50,4, 49,9, 44, 29,9, 19,6, 17,8, 17,6. ^{19}F ЯМР (376 МГц, ДМСО- d_6): δ м.д. 112,3. HR-ИЭР+: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+=1546,503$ (1546,5009) (измеренное/теоретическое).

Получение L16-C3:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-6-амино-2-[[2-(2-азидоэтокси)ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота



Стадия 1: (2S)-6-(трет-бутоксикарбониламино)-2-[[2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]гексановая кислота

К раствору (2S)-2-амино-6-(трет-бутоксикарбониламино)гексановой кислоты (2,96 г, 12 ммоль) и гидрокарбоната натрия (1,01 г, 12 ммоль) в воде (30 мл) добавляют раствор (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноата (5,0 г, 11,5 ммоль) в диметоксиэтаноле (30 мл), ТГФ (15 мл) добавляют для улучшения растворимости. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч. Водный раствор хлористоводородной кислоты 1 М (15 мл) добавляют, и водный слой экстрагируют этилацетатом (3×75 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха с получением неочищенного соединения. Растирание в дихлорметане/пентане при обработке ультразвуком дает (2S)-6-(трет-бутоксикарбониламино)-2-[[2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]гексановую кислоту (4,9 г, 8,63 ммоль) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 12,48 (с, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,74 (т, 2H), 7,28-7,44 (м, 6H), 6,73 (с, 1H), 4,10-4,33 (м, 5H), 3,9 (т, 1H), 2,82-2,90 (м, 2H), 1,52-1,73 (м, 2H), 1,34 (с, 9H), 1,22-1,31 (м, 4H), 0,83-0,91 (м, 6H).

Стадия 2: 9H-флуорен-9-илметил N-[1-[[[(1S)-5-(трет-бутоксикарбониламино)-1-[[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил]пентил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат

К раствору (2S)-6-(трет-бутоксикарбониламино)-2-[[2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]гексановой кислоты (1,5 г, 2,64 ммоль) в дихлорметане (19 мл) и метаноле (9,5 мл) добавляют (4-аминофенил)метанол (651,0 мг, 5,28 ммоль) в метаноле (1,5 мл). Этил 2-этокси-2H-хинолин-1-карбоксилат (1,31

г, 5,28 ммоль) затем добавляют. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч, затем концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в дихлорметане) с получением 9Н-флуорен-9-илметил N-[1-[[[(1S)-5-(трет-бутоксикарбониламино)-1-[[4-(гидрокси метил)фенил]карбамоил]пентил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (544 мг, 0,80 ммоль) в виде бледно-красного твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,93 (с, 1H), 8,01 (д, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,74 (т, 2H), 7,52 (д, 2H), 7,37-7,45 (м, 3H), 7,32 (т, 2H), 7,22 (д, 2H), 6,71 (с, 1H), 5,08 (шс, 1H), 4,43 (д, 2H), 4,21-4,40 (м, 4H), 3,92 (т, 1H), 2,83-2,91 (м, 2H), 1,94-2,01 (м, 1H), 1,55-1,74 (м, 2H), 1,21-1,42 (м, 4H), 1,33 (с, 9H), 0,87 (т, 6H).

Стадия 3: [4-[[[(2S)-6-(трет-бутоксикарбониламино)-2-[[2-(9Н-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]гексаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил) карбонат

К раствору 9Н-флуорен-9-илметил N-[1-[[[(1S)-5-(трет-бутоксикарбониламино)-1-[[4-(гидрокси метил)фенил]карбамоил]пентил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (600,0 мг, 0,892 ммоль) в ТГФ (19 мл), добавляют пиридин (361 мкл, 4,46 ммоль) затем 4-нитрофенил хлорформиат (448 мг, 2,22 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч, затем концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением [4-[[[(2S)-6-(трет-бутоксикарбониламино)-2-[[2-(9Н-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]гексаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил) карбоната (524 мг; 0,62 ммоль; 70%) в виде бледно-розового твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,13 (с, 1H), 8,31 (д, 2H), 8,1 (д, 1H), 7,89 (д, 2H), 7,74 (т, 2H), 7,63 (д, 2H), 7,57 (д, 2H), 7,28-7,45 (м, 7H), 6,72 (с, 1H), 5,24 (с, 2H), 4,35-4,42 (м, 1H), 4,27-4,33 (м, 1H), 4,22 (с, 2H), 3,92 (т, 1H), 2,83-2,91 (м, 2H), 1,96-2,00 (м, 1H), 1,58-1,73 (м, 2H), 1,20-1,30 (м, 4H), 1,33 (с, 9H), 0,86 (т, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ 171,22, 170,67, 156,1, 155,5, 155,27, 151,92, 145,15, 143,87, 143,75, 140,68, 139,34, 129,43, 129,31, 127,6, 127,03, 125,38, 125,32, 122,58, 120,07, 119,11, 77,28, 70,23, 65,67, 60,11, 54,89, 53,43, 46,67, 31,69, 30,39, 29,22, 28,23, 22,74, 19,19, 18,26. ЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+Na]⁺=837,4.

Стадия 4: (2R)-2-[[[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-6-(трет-бутоксикарбониламино)-2-[[[(2S)-2-(9Н-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору (2R)-2-[[[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-(2-пиперазин-1-илэтокси)фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты **С3** (166,3 мг, 0,170 ммоль) в ДМФ (1,5 мл) последовательно добавляют раствор [4-[[[(2S)-6-(трет-бутоксикарбониламино)-2-[[2-(9Н-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]гексаноил]амино]фенил]метил (4-нитрофенил) карбоната (150 мг, 0,179 ммоль) в ДМФ (1,5 мл) и ДИПЭА (85 мкл, 0,510 ммоль). Реакционную смесь перемешивают

в течение 1 ч при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH_4HCO_3 с получением (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-6-(трет-бутоксикарбониламино)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (134 мг, 0,0859 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+H]⁺=1559,1+1561,3, [M+Na]⁺: 1581,0+1583,2. Длина волны ИК (см⁻¹): 3309, 1698, 1238, 1162, 757, 744. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 10,05 (с, 1H), 8,87 (д, 1H), 8,6 (м, 1H), 8,06 (д, 1H), 7,88 (д, 2H), 7,74 (2д, 2H), 7,64 (м, 1H), 7,57 (д, 2H), 7,52 (дд, 1H), 7,44 (т, 1H), 7,43 (д, 1H), 7,4 (т, 2H), 7,35 (д, 1H), 7,3 (т, 2H), 7,3 (дд, 2H), 7,26 (д, 2H), 7,2 (т, 2H), 7,18 (д, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,12 (т, 1H), 7,03 (т, 1H), 6,99 (д, 1H), 6,72 (т, 1H), 6,71 (м, 1H), 6,24 (д, 1H), 5,49 (дд, 1H), 5,23 (м, 2H), 4,97 (с, 2H), 4,38 (м, 1H), 4,29/4,23 (м, 2H), 4,22 (м, 1H), 4,2 (м, 2H), 3,92 (дд, 1H), 3,74 (с, 3H), 3,29 (м, 4H), 3,29/2,5 (2дд, 2H), 2,87 (м, 2H), 2,74 (т, 2H), 2,45 (м, 4H), 1,99 (м, 1H), 1,82 (с, 3H), 1,68/1,6 (2м, 2H), 1,36/1,28 (2м, 4H), 1,32 (с, 9H), 0,86 (2д, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ 158, 131,4, 131,2, 131,2, 131, 130,8, 128,9, 128,5, 127,9, 127,5, 125,6, 120,8, 120,5, 120,4, 119,3, 116, 115,9, 112,4, 112,2, 111,2, 74,1, 69,2, 67,9, 66,7, 66,2, 60,6, 56,6, 56,2, 53,8, 53, 47,1, 43,7, 40, 32,6, 32,2, 30,6, 29,8/23,2, 28,5, 18,8, 18,1. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆): δ -112.

Стадия 5: (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-6-(трет-бутоксикарбониламино)гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-6-(трет-бутоксикарбониламино)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (134 мг, 0,0859 ммоль) в диметилформамиде (3 мл) добавляют пиперидин (17 мкл, 0,172 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 18 ч, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH_4HCO_3 с получением (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-6-(трет-бутоксикарбониламино)гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (88 мг,

0,0658 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: MS (ИЭР) m/z [M+H]⁺=1337,4+1339,4, [M+Na]⁺=1359,4+1361,4. Длина волны ИК (см⁻¹): 3307, 1683, 1290, 1238, 1162, 835, 754. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 10,23 (с, 1H), 8,88 (д, 1H), 8,53 (м, 1H), 8,47 (ш, 1H), 7,86 (д, 1H), 7,58 (д, 2H), 7,54 (д, 1H), 7,48 (д, 1H), 7,45 (т, 1H), 7,27 (дд, 2H), 7,25 (д, 2H), 7,19 (т, 2H), 7,18 (д, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,08 (т, 1H), 7,03 (т, 1H), 6,96 (т, 1H), 6,72 (т, 1H), 6,67 (т, 1H), 6,14 (д, 1H), 5,42 (д, 1H), 5,21 (м, 2H), 4,97 (с, 2H), 4,4 (м, 1H), 4,21 (м, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,42/2,35 (м, 2H), 3,29 (м, 4H), 3,24 (м, 1H), 2,87 (кв, 2H), 2,72 (т, 2H), 2,43 (м, 4H), 1,99 (м, 1H), 1,78 (с, 3H), 1,7/1,61 (2м, 2H), 1,36 (м, 2H), 1,34 (с, 9H), 1,26 (м, 2H), 0,89/0,82 (2д, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ м.д. 158,4, 131,3, 131,2, 131,1, 131, 128,4, 128, 120,8, 120,6, 120,4, 119,7, 116,1, 115,9, 112,7, 111,7, 111,2, 76,2, 69,2, 67,4, 66,3, 59,2, 56,6, 56,3, 53,6, 53,1, 43,8, 40,1, 33,2, 32,4, 31,3, 29,3, 28,8, 22,9, 19,7/17,5, 17,9. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆): δ м.д. -112,4.

Стадия 6: (2R)-2-[(5S_d)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[[2-[[2-[[2-((2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-6-(трет-бутоксикарбониламино)гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

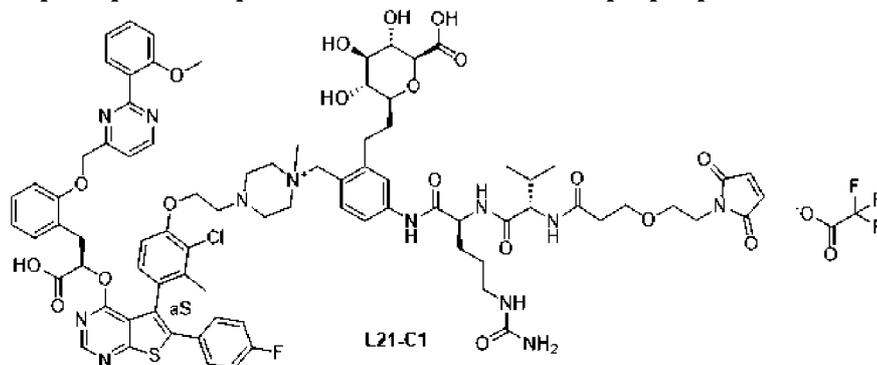
К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[[2-[[2-((2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-6-(трет-бутоксикарбониламино)гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (82 мг, 0,0613 ммоль) в ДМФ (500 мкл) последовательно добавляют раствор (2,3,4,5,6-пентафторфенил) 2-[2-[2-((2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетата (0,245 ммоль; получен согласно стадии 20 получения **L14-C3**) в ТГФ и ДИПЭА (30,4 мкл, 0,184 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH₄HCO₃ с получением (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[[2-[[2-((2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-6-(трет-бутоксикарбониламино)гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (60 мг, 0,0386 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: MS (ИЭР) m/z [M+H]⁺=1552,2+1554,2, [M+Na]⁺=1574,1+1576,3.

Стадия 7: (2R)-2-[(5S_d)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-6-амино-2-[[2-[[2-[[2-((2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота **L16-C3**

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[[2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]-6-(трет-бутоксикарбониламино)гексаноил]амино]фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (23 мг, 0,0148 ммоль) в дихлорметане (3 мл) добавляют 2,2,2-трифторуксусную кислоту (400 мкл, 4,57 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH₄HCO₃ с получением **L16-C3** (5 мг, 0,00344 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+H]⁺=1552,4+1554,5, [M+Na]⁺=1574,4+1576,4. Длина волны ИК (см⁻¹): 3250, 2250-3500, 2102, 1660, 1288, 1238, 1121, 833, 755. ¹H ЯМР(400 МГц, ДМСО-d₆): δ м.д. 10,24 (с, 1H), 8,85 (д, 1H), 8,49 (с, 1H), 8,49 (д, 1H), 7,98 (д, 1H), 7,6 (д, 2H), 7,55 (д, 1H), 7,51 (д, 1H), 7,5 (д, 1H), 7,46 (т, 1H), 7,26 (д, 2H), 7,25 (дд, 2H), 7,18 (т, 2H), 7,17 (д, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,05 (т, 1H), 7,02 (т, 1H), 6,89 (д, 1H), 6,6 (т, 1H), 6,05 (д, 1H), 5,32 (д, 1H), 5,21/5,15 (м, 2H), 5,02/4,96 (м, 2H), 4,36 (кв, 1H), 4,31 (дд, 1H), 4,2 (м, 2H), 3,94 (с, 2H), 3,77 (с, 3 H), 3,58 (м, 10 H), 3,46/2,28 (д+т, 2H), 3,34 (т, 2H), 3,29 (м, 4 H), 2,8 (м, 2H), 2,67 (т, 2H), 2,43 (м, 4 H), 2,01 (м, 1H), 1,75 (с, 3 H), 1,69/1,6 (2м, 2H), 1,51 (м, 2H), 1,31 (м, 2H), 0,86/0,8 (2д, 6 H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ м.д. 157,9, 153,7, 131,4, 131,4, 131,3, 131,1, 130,9, 129,3, 127,6, 120,9, 120,4, 119,8, 116,2, 116,1, 112,6, 111,8, 111,8, 78,1, 70,5, 70,4, 69,3, 66,6, 66,6, 56,9, 56,5, 56,3, 54, 52,3, 50,4, 44, 39, 33,8, 32,2, 31,8, 28,2, 23,1, 19,7/18,1, 18,3. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆): δ м.д. -112,6. HR-ИЭР+: m/z [M+H]⁺=1452,5661 (1452,5648) (измеренное/теоретическое).

Получение L21-C1:

(2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокситетрагидропиран-2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-фенокси]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]этил]-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоновая кислота; 2,2,2-трифторацетат



Стадия 1: трет-бутил-[(2-йод-4-нитро-фенил)метокси]-диметил-силан

К раствору (2-йод-4-нитро-фенил)метанола (172 г, 61,64 ммоль; получен согласно

стадии 2 получения **L14-C3**) в дихлорметане (300 мл) добавляют имидазол (5,04 г, 73,97 ммоль). Смесь охлаждают до 0°C, затем раствор трет-бутил-хлор-диметил-силан (11,15 г, 73,97 ммоль) в дихлорметане (300 мл) добавляют по каплям за 15 мин. Ледяную баню удаляют и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч. После завершения реакции, реакционную смесь гасят метанолом (20 мл) и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением трет-бутил-[(2-йод-4-нитро-фенил)метокси]-диметил-силана (19,65 г, 49,96 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,57 (с, 1H), 8,31 (д, 1H), 7,66 (д, 1H), 4,67 (с, 2H), 0,92 (с, 9H), 0,14 (с, 6H).

Стадия 2: метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-5-нитро-фенил]этинил]тетрагидропиран-2-карбоксилат

К раствору трет-бутил-[(2-йод-4-нитро-фенил)метокси]-диметил-силана (3,0 г, 7,63 ммоль) в ДМФ (55 мл) последовательно добавляют метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-этинил-тетрагидропиран-2-карбоксилат (3,39 г, 9,92 ммоль; получен согласно стадии 13 получения **L14-C3**), ДИПЭА (5,80 мл, 35,09 ммоль), йодид меди (145 мг, 0,763 ммоль) и дихлор-бис-(трифенилфосфин)палладий(II) (535 мг, 0,763 ммоль). Желтый раствор промывают аргоном и перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре. После разбавления водой (300 мл), водный слой экстрагируют этилацетатом (2×300 мл). Объединенные органические слои промывают водой (2×300 мл) затем сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-5-нитро-фенил]этинил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (4,01 г, 6,60 ммоль) в виде бежевого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,32 (дд, 1H), 8,19 (д, 1H), 7,75 (д, 1H), 5,45 (т, 1H), 5,16 (т, 1H), 5,02-5,07 (м, 2H), 4,82 (с, 2H), 4,55 (д, 1H), 3,65 (с, 3H), 1,98-2,07 (м, 9H), 0,92 (м, 9H), 0,14 (с, 6H).

Стадия 3: метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-(гидроксиметил)-5-нитро-фенил]этинил]тетрагидропиран-2-карбоксилат

К раствору метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-5-нитро-фенил]этинил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (4,01 г, 6,60 ммоль) в ТГФ (48 мл) и воде (48 мл) добавляют уксусную кислоту (193 мл, 3,36 моль). Бесцветный раствор перемешивают в течение 2 дней при комнатной температуре затем разбавляют водой (300 мл). Водный слой экстрагируют дихлорметаном (2×300 мл). Объединенные органические слои промывают водой (2×300 мл) и насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (400 мл), затем сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-(гидроксиметил)-5-нитро-фенил]этинил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (2,67 г, 5,41 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц,

ДМСО-d₆): δ 8,29 (дд, 1H), 8,15 (д, 1H), 7,79 (д, 1H), 5,68 (т, 1H), 5,45 (т, 1H), 5,16 (т, 1H), 5,02-5,07 (м, 2H), 4,62 (д, 2H), 4,55 (д, 1H), 3,65 (с, 3H), 1,98-2,07 (м, 9H).

Стадия 4: метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-амино-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилат

Раствор метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-(гидроксиметил)-5-нитрофенил]этинил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (2,67 г, 5,41 ммоль) в ТГФ (59 мл) промывают аргоном. Добавляют сухую 5% платину на угле (1,34 г, 50% масс./масс.). Реакционную смесь последовательно промывают аргоном, H₂ и перемешивают в течение 2 дней при комнатной температуре в атмосфере H₂ (Р атм). Реакционную смесь фильтруют через слой Celite®, промывают раствором этилацетат/метанол 9/1 (500 мл), затем концентрируют досуха. Всю последовательность действий (добавление сухой 5% платины на угле (1,34 г, 50% масс./масс.), перемешивание в течение 16 ч при комнатной температуре под H₂ (Р атм) и фильтрацию через слой Celite®), повторяют для полного превращения. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в циклогексане) с получением метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-амино-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (1,12 г, 2,40 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 6,93 (д, 1H), 6,67-6,33 (м, 2H), 5,30 (т, 1H), 4,96 (т, 1H), 4,88 (с, 2H), 4,81 (т, 1H), 4,61 (т, 1H), 4,39 (д, 1H), 4,29-4,24 (м, 2H), 3,78-3,72 (м, 1H), 3,65 (с, 3H), 2,65-2,54 (м, 2H), 2,07-1,98 (м, 9H), 1,79-1,68 (м, 1H), 1,63-1,52 (м, 1H).

Стадия 5: метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[2-(2S)-2-(трет-бутоксикарбониламино)-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилат

К раствору метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-амино-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (1,00 г, 2,14 ммоль) в ДМФ (21 мл) последовательно добавляют (2S)-2-(трет-бутоксикарбониламино)-5-уреидо-пентановую кислоту (589 мг, 2,14 ммоль), ДИПЭА (707 мкл, 4,28 ммоль) и ГБТУ (1,22 г, 3,21 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 72 часов при комнатной температуре. После завершения реакции, смесь разбавляют водой (100 мл) и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в дихлорметане) с получением метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[2-(2S)-2-(трет-бутоксикарбониламино)-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (1,05 г, 1,45 ммоль) в виде бежевого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,82 (с, 1H), 7,35-7,42 (м, 2H), 7,24 (д, 1H), 6,95 (д, 1H), 5,94 (т, 1H), 5,37 (с, 2H), 5,30 (т, 1H), 4,91-4,99 (м, 2H), 4,79 (т, 1H), 4,36-4,42 (м, 3H), 4,01-4,08 (м, 1H), 3,76 (т, 1H), 3,65 (с, 3H), 2,95-3,04 (м, 2H), 2,54-2,65 (м, 2H), 1,98-2,07 (м, 9H), 1,68-1,79 (м, 1H), 1,49-1,63 (м, 3H), 1,30-1,42 (м, 11H).

Стадия 6: метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[2-(2S)-2-[[2-(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилат

К раствору метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[[(2S)-2-(трет-бутоксикарбониламино)-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (950 мг, 1,31 ммоль) в дихлорметане (7,5 мл) добавляют, при 0°C, трифторуксусную кислоту (1,9 мл, 25,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч. После завершения реакции, реакционную смесь концентрируют досуха и совместно выпаривают с толуолом (2×50 мл) с получением неочищенного соединения.

К этому неочищенному раствору в ДМФ (13 мл) последовательно добавляют (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутановую кислоту (467 мг, 1,38 ммоль), ДИПЭА (867 мкл, 5,24 ммоль) и ГБТУ (845 мг, 2,23 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при комнатной температуре. После завершения реакции, добавляют насыщенный водный раствор гидрокарбоната (20 мл), Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, разбавляют водой (100 мл) и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в дихлорметане) и затем C18 хроматографией с обращенной фазой с применением нейтрального способа с получением метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (680 мг, 0,720 ммоль) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+H]⁺=946,3. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 9,90 (с, 1H), 8,07 (д, 2H), 7,89 (д, 2H), 7,74 (т, 2H), 7,44-7,38 (м, 3H), 7,36-7,28 (м, 3H), 7,24 (д, 1H), 5,94 (т, 1H), 5,37 (с, 2H), 5,30 (т, 1H), 4,99-4,92 (м, 2H), 4,79 (т, 1H), 4,42-4,36 (м, 4H), 4,32-4,19 (м, 3H), 3,94-3,90 (м, 1H), 3,76 (т, 1H), 3,65 (с, 3H), 2,99-2,94 (м, 2H), 2,65-2,54 (м, 2H), 2,07-1,98 (м, 10H), 1,70-1,55 (м, 4H), 1,46-1,36 (м, 2H), 0,89-0,84 (м, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ 171,19, 170,33, 169,58, 169,45, 169,27, 167,77, 158,81, 156,12, 143,89, 143,76, 140,69, 139,48, 137,54, 134,88, 128,44, 127,62, 127,06, 125,35, 120,08, 119,42, 116,65, 75,78, 74,61, 72,65, 71,20, 69,49, 65,68, 60,49, 60,10, 53,14, 52,40, 46,68, 32,32, 30,43, 29,54, 27,19, 26,77, 20,39, 20,34, 20,24, 19,22, 18,25.

Стадия 7: метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-(бромметил)-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилат

К раствору метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-(гидроксиметил)фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (154 мг, 0,163 ммоль) в ТГФ (8,2 мл) последовательно добавляют трифенилфосфин (85,4 мг, 0,326 ммоль) и 1-бромпирролидин-2,5-дион (58,0 мг, 0,326 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре. Прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС: аликвоту обрабатывают большим избытком MeOH, с последующим образованием соответствующего метилового эфира. Ожидаемое производное бромиды является стабильным в условиях УЭЖХ-МС. Через 5 ч добавляют трифенилфосфин (85,4 мг, 0,326 ммоль) и 1-бромпирролидин-2,5-дион (58,0 мг, 0,326

ммоль) и реакционную смесь перемешивают в течение 15 ч при комнатной температуре. Полученный неочищенный метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-(бромметил)-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилат применяют подобным образом на следующей стадии. УЭЖХ-МС: MS (ИЭР) m/z [M+Ome-Bn+H]⁺=960,7.

Стадия 8: (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[2-[[[(2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-метоксикарбонил-тетрагидропиран-2-ил]этил]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору метил (2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-[2-[2-(бромметил)-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]этил]тетрагидропиран-2-карбоксилата (0,167 ммоль) в ДМФ с предыдущей стадии (стадия 7) последовательно добавляют (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-метил-4-(2-пиперазин-1-илэтокси)фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановую кислоту (**C1**) (143 мг, 0,163 ммоль) и ДИПЭА (114 мкл, 0,652 ммоль) Реакционную смесь перемешивают в течение 15 ч при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС (аликвоту обрабатывают большим избытком MeOH). Неочищенный продукт очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[2-[[[(2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-метоксикарбонил-тетрагидропиран-2-ил]этил]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (21,3 мг, 0,0111 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: MS (ИЭР) m/z [M+H]⁺=1802,9+1804,9. Длина волны ИК (см⁻¹): 1755, 1672, 1226, 1201, 1130. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 13,3 (шс, 1H), 10,2 (с, 1H), 8,88 (д, 1H), 8,61 (с, 1H), 8,14 (д, 1H), 7,88 (д, 2H), 7,73 (дд, 2H), 7,65 (д, 1H), 7,63 (д, 1H), 7,62 (м, 1H), 7,54 (шс, 1H), 7,51 (дд, 1H), 7,45 (т, 1H), 7,4 (т, 2H), 7,38 (м, 1H), 7,32 (т, 2H), 7,3 (дд, 2H), 7,2 (д, 1H), 7,2 (т, 2H), 7,15 (т, 1H), 7,15 (д, 1H), 7,03 (т, 1H), 7,01 (дд, 1H), 6,72 (т, 1H), 6,22 (д, 1H), 6 (шс, 1H), 5,51 (дд, 1H), 5,34 (т, 1H), 5,3 (шс, 2H), 5,27/5,21 (м, 2H), 4,98 (т, 1H), 4,85 (т, 1H), 4,57/4,49 (м, 2H), 4,39 (м, 1H), 4,35 (д, 1H), 4,27 (м, 2H), 4,26 (м, 2H), 4,23 (м, 1H), 3,93 (т, 1H), 3,76 (с, 3H), 3,71 (м, 1H), 3,64 (с, 3H), 3,4 (м, 4H), 3,29/2,51 (2дд, 2H), 3,13/2,94 (2м, 4H), 3 (м, 2H), 2,98 (м, 2H), 2,93 (шс, 3H), 2,81 (м, 2H), 1,99/1,95 (3с, 9H), 1,98 (м, 1H), 1,84 (с, 3H), 1,77/1,59 (2м, 2H), 1,64 (2м, 2H), 1,41 (2м, 2H), 0,88/0,85 (2д, 6H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆): δ м.д. 158,1, 152,9, 135,6, 131,5, 131,4, 131,3, 131,2, 131, 128,9,

128,1, 127,5, 125,7, 120,9, 120,6, 120,4, 120,3, 117, 116, 116, 112,8, 112,2, 111,2, 75,6, 74,9, 73,8, 72,9, 71,4, 69,6, 69,4, 67,5, 66,1, 60,4, 58,3, 56, 55,4, 53,9, 52,8, 47,2, 46,2, 44,3, 39, 32,8, 32,8, 31, 29,6, 27,4, 27,2, 21,1, 19,5/18,7, 18,1. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. -74, -112.

Стадия 9: (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[(5S_a)-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-феноксид]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]фенил]этил]-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоновая кислота

К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[2-[[[(2S,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-метоксикарбонил-тетрагидропиран-2-ил]этил]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (21,3 мг, 0,0111 ммоль) в метаноле (6,0 мл) добавляют раствор моногидрата гидроксида лития (4,66 мг мкл, 0,111 ммоль) в воде (4 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 60 ч, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[(5S_a)-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-феноксид]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]фенил]этил]-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоновой кислоты (47,8 мг, 0,029 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+H]⁺=1440,6+1442,6.

Стадия 10: (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-феноксид]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]этил]-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоновая кислота; 2,2,2-трифторацетат **L21-C1**

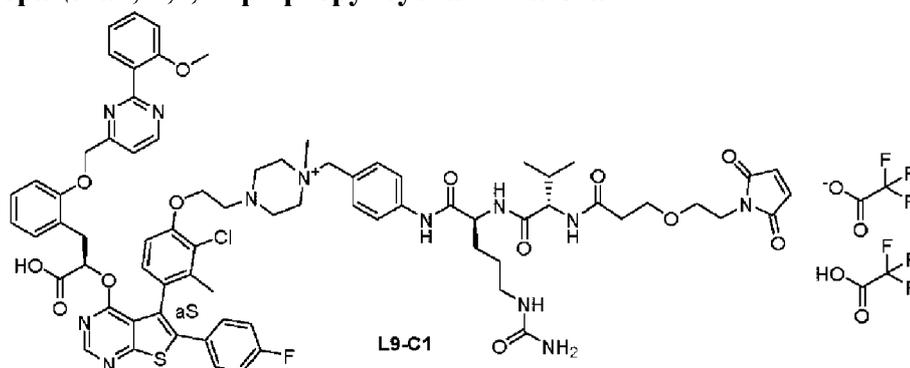
К раствору (2S,3S,4R,5R,6S)-6-[2-[(5S_a)-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-феноксид]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]фенил]этил]-3,4,5-тригидрокси-тетрагидропиран-2-карбоновой кислоты (47,1 мг, 0,0282 ммоль) в ДМФ (1,5 мл) последовательно добавляют раствор (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноата (куплен у Broadpharm, 13,1 мг, 0,0423 ммоль) в ДМФ (500 мкл) и ДИПЭА (17,2 мкл, 0,0988 ммоль).

Реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч при комнатной температуре, и

прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением **L21-C1** (65 мг, 0,0310 ммоль) в виде белого порошка. HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+=1635,6093$ (1635,6068) (измеренное/теоретическое).

Получение L9-C1:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота



Стадия 1: 9Н-флуорен-9-илметил *N*-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(бромметил)фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат
 Раствор 9Н-флуорен-9-илметил *N*-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(бромметил)фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (150 мг, 0,249 ммоль) в ТГФ (3,8 мл) охлаждают до 0°C. При 0°C добавляют по каплям трибромфосфан (1 М в дихлорметане) (374 мкл, 0,249 ммоль). Реакционную смесь перемешивают 5 мин при 0°C и 1 ч при комнатной температуре. Прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС (аликвоту обрабатывают большим избытком MeOH). Реакционную смесь разбавляют этилацетатом (3 мл) и промывают водным насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (1×6 мл). Органический слой сушат над сульфатом магния, фильтруют. Добавляют ДМФ (10 мл) и выпаривают этилацетат и ТГФ. Полученный раствор 9Н-флуорен-9-илметил *N*-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(бромметил)фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата применяют как есть на следующей стадии. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z $[M+Na]^+=686,5+688,6$.

Стадия 2: (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-(9Н-флуорен-9-илметокси)карбониламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору 9Н-флуорен-9-илметил *N*-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-

(бромметил)фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (0,249 ммоль) в ДМФ с предыдущей стадии (стадия 1) последовательно добавляют ДМФ (10 мл), (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-(2-пиперазин-1-илэтокси)фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановую кислоту (**C1**) (218 мг, 0,249 ммоль) и ДИПЭА (130 мкл, 0,748 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 15 ч при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС (аликвоту обрабатывают большим избытком MeOH). Полученный раствор (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты в ДМФ применяют как есть на следующей стадии. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+Na]⁺=1458,7+1460,7.

Стадия 3: (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; бис 2,2,2-трифторуксусная кислота

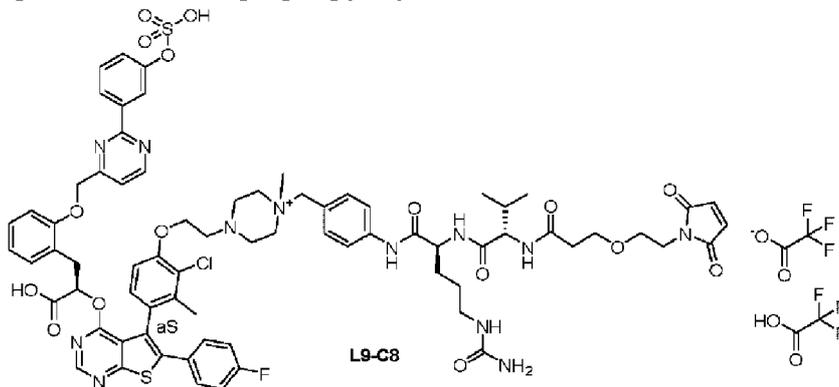
К раствору (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (0,249 ммоль) в диметилформамиде (3 мл) полученной на предыдущей стадии, (стадия 2) добавляют пиперидин (49,3 мкл, 0,499 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 5 ч, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением (2R)-2-[(5S_a)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты; 2,2,2-трифторацетата; бис 2,2,2-трифторуксусной кислоты (31,2 мг=0,0213 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+Na]⁺=1236,7+1238,7.

Стадия 4: (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксотиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота L9-C1

К раствору (2R)-2-[(5Sa)-5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этоксид]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (31,2 мг, 0,0213 ммоль) в ДМФ (1,5 мл) последовательно добавляют раствор (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этоксид]пропаноата (23,8 мг, 0,0768 ммоль) в ДМФ (500 мкл) и ДИПЭА (31,2 мкл, 0,179 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 15 ч при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением **L9-C1** (6 мг, 0,00303 ммоль) в виде белого порошка. HR-ИЭР+: m/z [M]⁺=1431,5437 (1431,5433) (измеренное/теоретическое).

Получение L9-C8:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этоксид]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этоксид]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(3-сульфооксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота



Стадия 1: (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этоксид]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(3-сульфооксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[4-(бромметил)фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (0,0230 ммоль; получен согласно стадии 1 получения **L9-C1**) в ДМФ (3 мл) последовательно добавляют ДМФ (5 мл), аммоний; [3-[4-[[2-[(2R)-2-карбокси-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксид]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-этил]феноксид]метил]пиримидин-2-ил]фенил] сульфат (**C8**) (22 мг, 0,0230 ммоль) и ДИПЭА (12 мкл, 0,069 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 15 ч при

комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС (аликвоту обрабатывают большим избытком MeOH). Полученный раствор (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты в ДМФ используют на следующей стадии. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M-SO₃H]⁺=1444,8+1446,7.

Стадия 2: (2R)-2-[(5Sa)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(3-сульфооксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; бис 2,2,2-трифторуксусная кислота

К раствору (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(3-сульфооксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (0,0230 ммоль) в диметилформамиде (3 мл), полученной на предыдущей стадии (стадия 1), добавляют пиперидин (9 мкл, 0,0920 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 5 ч, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением [3-[4-[[2-[(2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-2-карбокси-этил]феноксид]метил]пиримидин-2-ил]фенил] сульфата; бис 2,2,2-трифторуксусной кислоты (10,0 мг=0,00633 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: MS (ИЭР) m/z [M-SO₃]⁺=1224,12.

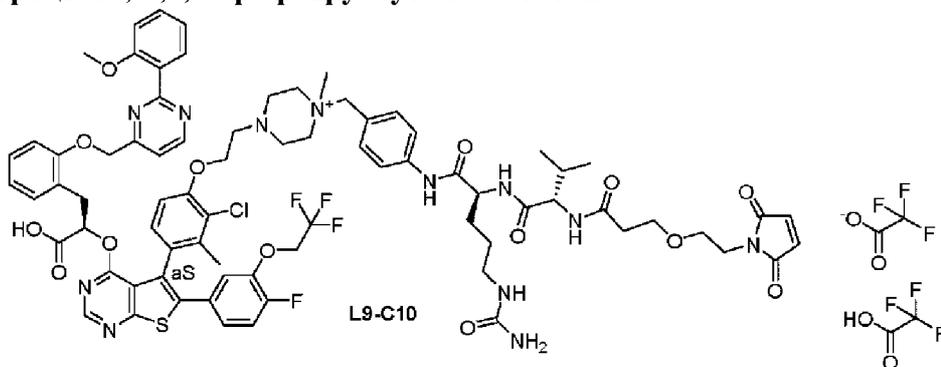
Стадия 3: (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(3-сульфооксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота

К раствору (2R)-2-[(5Sa)-5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(3-сульфооксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (10 мг, 0,00653 ммоль) в ДМФ (1 мл) последовательно добавляют раствор (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноата (3,1 мг, 0,00980 ммоль) в ДМФ (500

мкл) и ДИПЭА (4 мкл, 0,0229 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 15 ч при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа ТФК с получением **L9-C8** (6 мг, 0,00401 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z $[M+Na]^+=1519,5+1521,2$, $[M+H-SO_3]^+$ 1417,7+1419,6. HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+=1497,486$ (1497,4845) (измеренное/теоретическое).

Получение L9-C10:

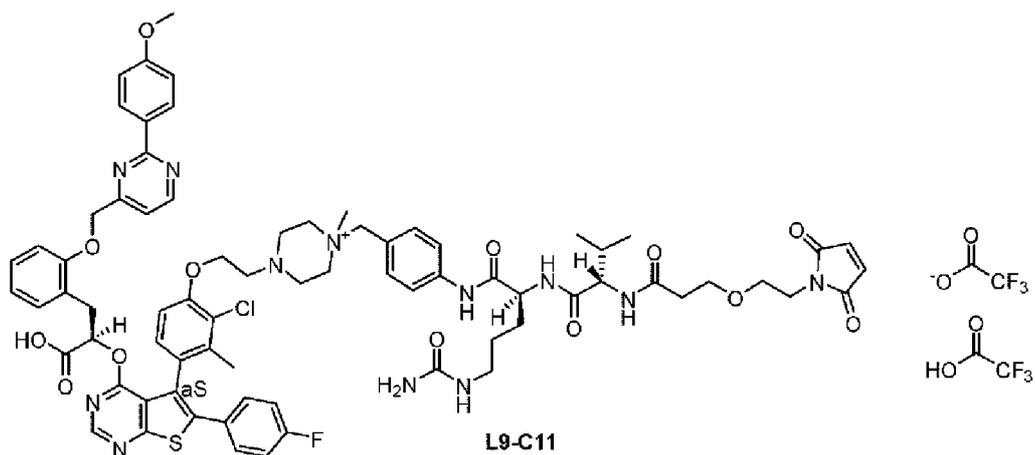
(2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-[4-фтор-3-(2,2,2-трифторэтокси)фенил]тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота



Методика такая же, как в способе синтеза **L9-C9**, заменяя **C9** использованный на стадии 3 на **(2R)-2-[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-[4-фтор-3-(2,2,2-трифторэтокси)фенил]тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту **C10** и с применением способа ТФК для очистки. HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+=1529,543/1529,5413$ (измеренное/теоретическое).**

Получение L9-C11:

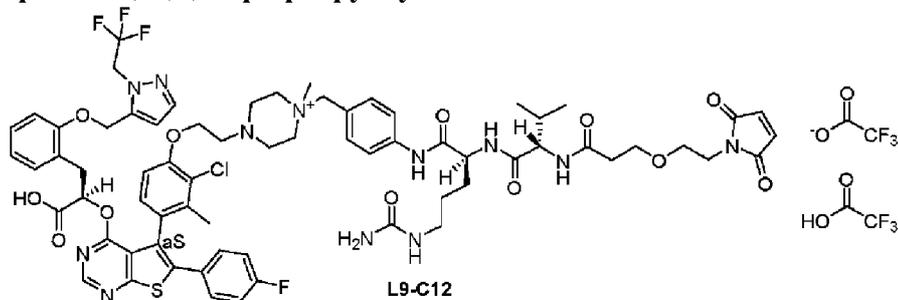
(2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(4-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота.



Методика такая же, как в способе синтеза **L9-C9**, заменяя **C9** использованный на стадии 3 на (2R)-2-[[[(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-(2-{[2-(4-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту **C11** и с применением способа ТФК для очистки. HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+=1431,5442/14,31,5433$ (измеренное/теоретическое).

Получение L9-C12:

(2R)-2-[[[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-[2-[[2-(2,2,2-трифторэтил)пиразол-3-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота

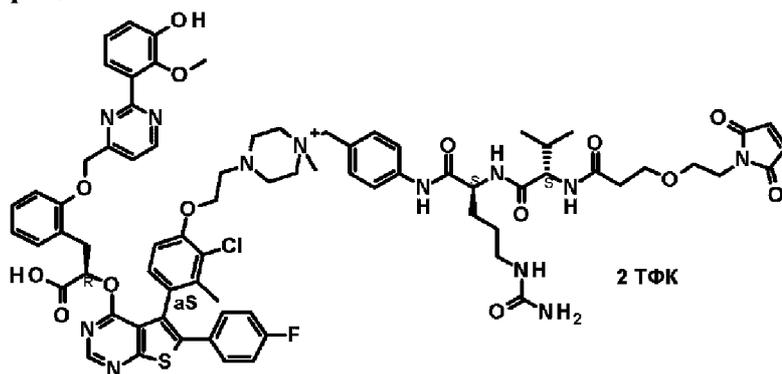


Методика такая же, как в способе синтеза **L9-C9**, заменяя **C9** использованный на стадии 3 на (2R)-2-[[[(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту **C12** с применением способа ТФК для очистки. HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+=1395,5048/1395,5045$ (измеренное/теоретическое).

Получение L9-C14:

(2R)-2-[[[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-[2-[[2-(3-гидрокси-2-метокси-фенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-

трифторацетат



Стадия 1: (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метокси-3-сульфоокси-фенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

500 мг этил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил]пропаноат (0,60 ммоль, **WO2016/207216 Получение 1**) и 202 мг (3-гидрокси-2-метокси-фенил)бороновую кислоту (1,20 ммоль) растворяют в 9 мл 1,4-диоксана, затем добавляют 42 мг Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,06 ммоль), 588 мг Cs₂CO₃ (1,80 ммоль) и 9 мл воды и смесь перемешивают в атмосфере N₂ при 70°C до полного превращения. Затем ее разбавляют водой, нейтрализуют 2 М водным раствором HCl и экстрагируют ДХМ. Объединенную органическую фазу сушат над Na₂SO₄, фильтруют, и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный сложный эфир очищают флэш-хроматографией с применением гептана, EtOAc и 0,7 М NH₃ раствор в MeOH в качестве элюентов с получением смеси диастереоизомеров. Затем ее растворяют в 23,6 мл пиридина, добавляют 0,97 мл SO₃×пиримидин (5,98 ммоль) и смесь перемешивают при 70°C до полного превращения. Затем ее концентрируют при пониженном давлении и растворяют в 2 мл диоксана, затем 200 мг KOH (3,57 ммоль) и добавляют 1 мл воды. Смесь перемешивают при кт до полного гидролиза. Затем ее нейтрализуют с 2 М водным раствором HCl и прямо впрыскивают на преп-ОФ-ВЭЖХ, с применением 25 мМ водного раствора NH₄HCO₃ и MeCN в качестве элюентов. Диастереоизомер, элюированный позднее, собирают в качестве указанного в заголовке продукта. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ: 8,92 (д, 1H), 8,63 (с, 1H), 7,68 (дд, 1H), 7,63 (д, 1H), 7,34 (д, 1H), 7,30 (дд, 2H), 7,29 (д, 1H), 7,20 (т, 2H), 7,16 (т, 1H), 7,15 (д, 1H), 7,10 (т, 1H), 7,02 (д, 1H), 6,73 (т, 1H), 6,38 (д, 1H), 5,50 (дд, 1H), 5,29/5,23 (д+д, 2H), 4,21/4,16 (м+м, 2H), 3,84 (с, 3H), 3,25/2,55 (дд+дд, 2H), 3,18-2,75 (м, 10H), 2,65 (шс, 3H), 1,82 (с, 3H). МСВР рассчитано для C₄₇H₄₄N₆O₁₀S₂ClF: 970,2233; найдено 971,2297 (M+H).

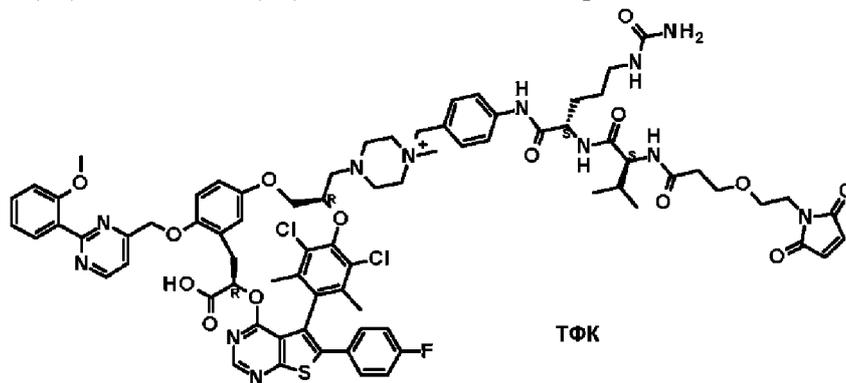
Стадия 2: (2R)-2-[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксотиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(3-гидрокси-2-метокси-фенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат L9-

С14

К раствору (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метокси-3-сульфоокси-фенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (20,0 мг; 0,0206 ммоль) в ДМФ (309 мкл) последовательно добавляют (2S)-N-[4-(хлорметил)фенил]-2-[[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентанамид (17,5 мг; 0,0206 ммоль), ДИПЭА (10,8 мкл; 0,0618 ммоль) и ТВАІ (1 мг; 0,0027 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 70°C в течение 18 часов. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge и с применением способа ТФК с получением **L9-C14** (10,5 мг; 0,00725 ммоль) в виде белого порошка. HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+=1448,5437/1448,5466$ [измеренное/теоретическое].

Получение L9-P15:

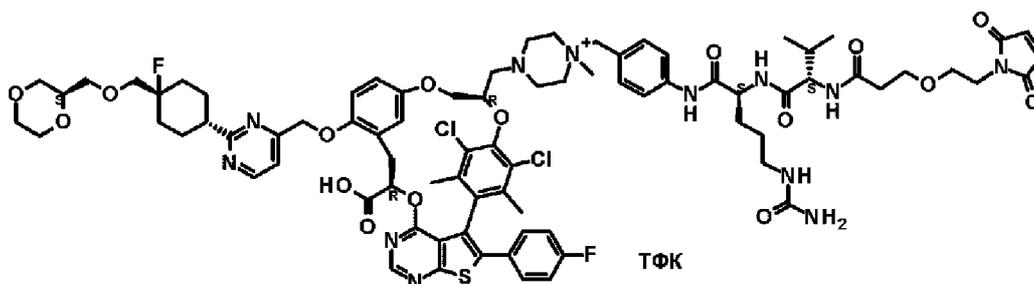
(11R,20R)-23,26-дихлор-20-[[4-[[4-[[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]метил]-3-(4-фторфенил)-14-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]-24,25-диметил-10,18,21-триокса-4-тиа-6,8-дизапентацикло[20,2,2,12,5,113,17,09,28]октакоза-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-декаен-11-карбоновая кислота; 2,2,2-трифторацетат



К раствору (11R,20R)-23,26-дихлор-3-(4-фторфенил)-14-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]-24,25-диметил-20-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-10,18,21-триокса-4-тиа-6,8-дизапентацикло[20,2,2,12,5,113,17,09,28]октакоза-1(25),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22(26),23-декаен-11-карбоновой кислоты **P15** (получена согласно WO 2019/035914; 10,0 мг; 0,0105 ммоль) в ДМФ (630 мкл), последовательно добавляют (2S)-N-[4-(бромметил)фенил]-2-[[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентанамид (10,0 мг; 0,0158 ммоль), ДИПЭА (5,5 мкл; 0,0315 ммоль) и ТВАІ (0,5 мг; 0,0010 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 0,5 часа. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge и с применением способа ТФК с получением **L9-P15** (11,9 мг; 0,00733 ммоль) в виде белого порошка. HR-ИЭР+: m/z $[M-CF_3CO_2]^+=1507,5183/1507,5155$

Получение L9-P16:

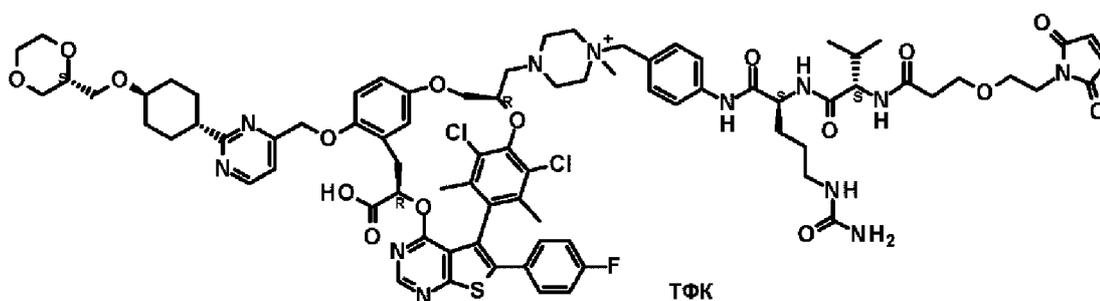
(11R,20R)-23,26-дихлор-14-[[2-[4-[[[(2S)-1,4-диоксан-2-ил]метоксиметил]-4-фтор-циклогексил]пиримидин-4-ил]метокси]-20-[[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]метил]-3-(4-фторфенил)-24,25-диметил-10,18,21-триокса-4-тиа-6,8-диазапентацикло[20,2,2,12,5,113,17,09,28]октакоза-1(25),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22(26),23-декаен-11-карбоновая кислота; 2,2,2-трифторацетат



К раствору (11R,20R)-23,26-дихлор-14-[[2-[4-[[[(2S)-1,4-диоксан-2-ил]метоксиметил]-4-фтор-циклогексил]пиримидин-4-ил]метокси]-3-(4-фторфенил)-24,25-диметил-20-[[4-метилпиперазин-1-ил]метил]-10,18,21-триокса-4-тиа-6,8-диазапентацикло[20,2,2,12,5,113,17,09,28]октакоза-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-декаен-11-карбоновой кислоты **P16** (получена согласно WO 2019/035911; 14,7 мг; 0,0137 ммоль) в ДМФ (1 мл) последовательно добавляют (2S)-N-[4-(бромметил)фенил]-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентанамид (13,1 мг; 0,0205 ммоль) и ДИПЭА (7,1 мкл; 0,0410 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов. Неочищенный продукт очищают прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Brige с применением способа ТФК с получением **L9-P16** (7,9 мг; 0,00420 ммоль) в виде белого порошка. ИК (см⁻¹): 3327, 1768/1706, 1666, 1199/1118, 831/798. HR-ИЭР+: m/z [M-CF₃CO₂]⁺=1631,6071/1631,6054 [измеренное/теоретическое]

Получение L9-P17:

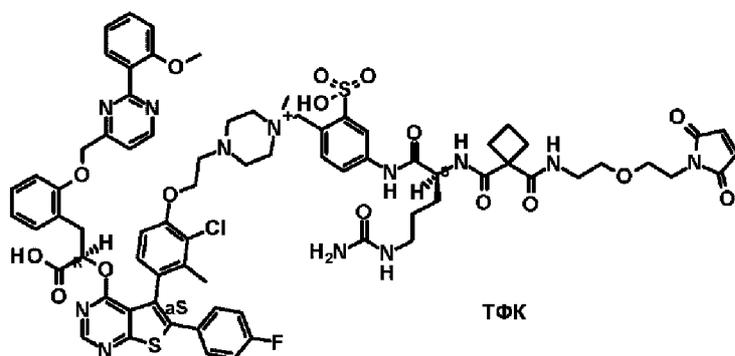
(11R,20R)-23,26-дихлор-14-[[2-[4-[[[(2S)-1,4-диоксан-2-ил]метокси]циклогексил]пиримидин-4-ил]метокси]-20-[[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]метил]-3-(4-фторфенил)-24,25-диметил-10,18,21-триокса-4-тиа-6,8-диазапентацикло[20,2,2,12,5,113,17,09,28]октакоза-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-декаен-11-карбоновая кислота; 2,2,2-трифторацетат



К раствору (11R,20R)-23,26-дихлор-14-[[2-[4-[[[(2S)-1,4-диоксан-2-ил]метокси]циклогексил]пиримидин-4-ил]метокси]-3-(4-фторфенил)-24,25-диметил-20-[[4-метилпиперазин-1-ил]метил]-10,18,21-триокса-4-тиа-6,8-диазапентацикло[20,2,2,12,5,113,17,09,28]октакоза-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-декаен-11-карбоновой кислоты **P17** (получена согласно WO 2019/035911; 14,5 мг; 0,0139 ммоль) в ДМФ (1 мл), последовательно добавляют (2S)-N-[4-(бромметил)фенил]-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентанамида (13,3 мг; 0,0208 ммоль) и ДИПЭА (7,3 мкл; 0,0417 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 8 часов. Неочищенный продукт очищают прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Brige и с применением способа ТФК с получением **L9-P17** (7,0 мг, 0,00437 ммоль) в виде белого порошка. ИК (см^{-1}): 3700-2400, 1771/1738/1705, 1665, 1194/1128. HR-ИЭР+: m/z $[\text{M}-\text{CF}_3\text{CO}_2]^+=1599,6013/1599,5992$. HR-ИЭР+: m/z $[\text{M}-\text{CF}_3\text{CO}_2+\text{H}]^{2+}=800,3049/800,3035$ [измеренное/теоретическое]

Получение L25-P1:

2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-фенокси]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]-5-[[[(2S)-2-[[1-[2-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]этилкарбамоил]циклобутанкарбонил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]бензолсульфонат; 2,2,2-трифторуксусная кислота



Стадия 1: трет-бутил 1-[2-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]этилкарбамоил]циклобутанкарбоксилат

К раствору 1-трет-бутоксикарбонилциклобутанкарбоновой кислоты (58,6 мг; 0,293 ммоль) в ДХМ (5,85 мл), последовательно добавляют 1-[2-(2-аминоэтокси)этил]пиррол-2,5-дион (53,9 мг; 0,293 ммоль), EDC (84,2 мг; 0,439 ммоль), НОВt (59,3 мг; 0,439 ммоль) и

ДИПЭА (204 мкл; 1,17 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 18 часов. Прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Реакционную смесь концентрируют досуха и солюбилизируют в ДМФ (1 мл) и раствор очищают на колонке X-Bridge C₁₈ прямым помещением реакционной смеси на колонку и с применением способа ТФК с получением указанного в заголовке соединения (57,3 мг; 0,156 ммоль). ИК (см⁻¹): 3390, 1697/1666. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 7,5 (т, 1H), 7,02 (с, 2H), 3,55/3,5 (2т, 4H), 3,38 (т, 2H), 3,17 (кв, 2H), 2,33 (м, 4H), 1,77 (м, 2H), 1,38 (с, 9H). УЭЖХ-МС: МС(ИЭР): m/z [M+Na]⁺=389,26 [M+H-tBu]⁺=311,22

Стадия 2: 1-[2-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]этилкарбамоил]циклобутанкарбоновая кислота

К раствору трет-бутил 1-[2-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]этилкарбамоил]циклобутанкарбоксилат (7 мг; 0,0191 ммоль) в ДХМ (0,175 мл), добавляют ТФК (51,2 мкл; 0,668 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3,5 часов, затем концентрируют досуха с получением указанного в заголовке соединения (5,8 мг; 0,0187 ммоль) в виде бесцветного масла. Неочищенный продукт применяют на следующей стадии. УЭЖХ-МС: МС(ИЭР): m/z [M+H]⁺=311,35, [M+Na]⁺=333,37

Стадия 3: (2,3,4,5,6-пентафторфенил) 1-[2-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]этилкарбамоил]циклобутанкарбоксилат

К раствору 1-[2-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]этилкарбамоил]циклобутанкарбоновой кислоты (18,2 мг; 0,0587 ммоль) в ТГФ (3 мл), последовательно добавляют 2,3,4,5,6-пентафторфенол (13,0 мг; 0,0704 ммоль) и ДЦК (14,5 мг; 0,0704 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 часов и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Реакционную смесь суспендируют, осадок отфильтровывают и промывают ТГФ (1 мл) с получением раствор (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 1-[2-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]этилкарбамоил]циклобутанкарбоксилата в ТГФ. Неочищенный раствор продукта используют на стадии 9. УЭЖХ-МС: МС(ИЭР): m/z [M+H]⁺=477,28, [M+Na]⁺=499,23

Стадия 4: метил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат

К раствору (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты **P1** (5,0 г; 5,712 ммоль) в ДХМ (25 мл) и метаноле (25 мл), добавляют по каплям раствор диазометил(триметил)силан (2 М в Et₂O) (5,712 мл; 11,42 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. После завершения реакционную смесь гасят медленным добавлением уксусной кислоты до превращения желтого цвета в красный и концентрируют досуха с получением неочищенной смеси.

Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в ДХМ) с получением указанного в заголовке соединения (4,52 г; 5,082 ммоль). УЭЖХ-МС: МС(ИЭР): m/z [M+H]⁺=889,27+891,6, [M+Na]⁺=911,31, [M+2H]²⁺= 445,59. ИК (см⁻¹): 1753, 1238/1053. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 8,6 (с, 1H), 8,45 (д, 1H), 7,6 (д, 1H), 7,52 (дд, 1H), 7,45 (тд, 1H), 7,3 (м, 3H), 7,25-7,1 (м, 5H), 7,02 (т+д, 2H), 6,78 (т, 1H), 6,31 (дд, 1H), 5,52 (дд, 1H), 5,25 (AB, 2H), 4,2 (м, 2H), 3,78/3,65 (2с, 6H), 3,2/2,58 (2дд, 2H), 2,71 (т, 2H), 2,5/2,3 (2м, 8H), 2,12 (с, 3H), 1,88 (с, 3H).

Стадия 5: 5-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-уреидопентаноил]амино]-2-(гидроксиметил)бензолсульфоновая кислота

К раствору Fmoc-Cit-OH (2,224 г; 5,596 ммоль) в ДХМ (22,2 мл) и метаноле (22,2 мл) последовательно добавляют натрий 5-амино-2-(гидроксиметил) бензолсульфонат (1,89 мг; 8,395 ммоль) и EEDQ (2,768 г; 11,19 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 25 часов, затем концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в ДХМ) с получением указанного в заголовке соединения (2,81 г; 4,823 ммоль) в виде белого порошка. МК (см⁻¹): 3700-3000, 1660 (большой), 1180. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 10,02 (с, 1H), 7,88 (м, 3H), 7,76 (2т, 2H), 7,7 (дд, 1H), 7,61 (д, 1H), 5,99 (т, 1H), 5,38 (м, 2H), 5,03 (т, 1H), 4,72 (д, 2H), 4,3-4,2 (м, 3H), 4,15 (м, 1H), 3,06-2,90 (м, 2H), 1,75-1,30 (м, 4H). УЭЖХ-МС: МС(ИЭР): m/z [M+H]⁺=583,42, [M+Na]⁺=565,31.

Стадия 6: 2-(хлорметил)-5-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-уреидопентаноил]амино]бензолсульфоновая кислота

К раствору 5-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-уреидопентаноил]амино]-2-(гидроксиметил)бензолсульфоновой кислоты (543,6 мг; 0,933 ммоль) в NMP (5 мл) добавляют при комнатной температуре раствор SOCl₂ (68,1 мкл; 0,933 ммоль) в NMP (200 мкл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 мин, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Для достижения полного превращения, SOCl₂ (68 мкл) добавляют еще 7 раз. Избыток SOCl₂ выпаривают под вакуумом, и остаток очищают прямым помещением реакционной смеси на колонку Oasis с применением способа ТФК с получением указанного в заголовке соединения (362 мг; 0,512 ммоль) в виде белого твердого вещества. УЭЖХ-МС: МС(ИЭР): m/z [M+H]⁺=601,19+603,23 [M+Na]⁺=622,93

Стадия 7: 2-[[[4-[2-[2-хлор-4-[6-(4-фторфенил)-4-[(1R)-2-метокси-1-[[2-[[2-(2-метоксифенил)тиримидин-4-ил]метокси]фенил]метил]-2-оксо-этокси]тиено[2,3-d]тиримидин-5-ил]-3-метил-фенокси]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]-5-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-уреидопентаноил]амино]бензолсульфонат

К раствору 2-(хлорметил)-5-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-уреидопентаноил]амино]бензолсульфоновой кислоты (195,6 мг; 0,277 ммоль) со стадии 6 в растворе NMP (10 мл) последовательно добавляют метил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-

ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат (123 мг; 0,138 ммоль) со стадии 4, ДИПЭА (385 мкл, 2,213 ммоль) и ТВАІ (10 мг, 0,027 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 70°C в течение 12 часов, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт в растворе в NMP используют сразу на следующей стадии. УЭЖХ-МС: МС(ИЭР): m/z [M+H]⁺=1231,12+1233,45, [M+2H]²⁺=616,34+617,37.

Стадия 8: 5-[[[(2S)-2-амино-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-фенокси]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]бензолсульфонат; 2,2,2-трифторуксусная кислота

К предыдущему раствору 2-[[4-[2-[2-хлор-4-[6-(4-фторфенил)-4-[(1R)-2-метокси-1-[[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]метил]-2-оксо-этокси]тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-3-метил-фенокси]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]-5-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-ил)метоксикарбониламино]-5-уреидо-пентаноил]амино]бензолсульфоната в NMP, добавляют раствор моногидрата гидроксида лития (82,2 мг; 1,106 ммоль) в воде (4 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5 часов, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт раствор очищают прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge с применением способа ТФК с получением указанного в заголовке соединения (45,6 мг; 0,0374 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: MS(ИЭР): m/z [M+H]⁺=1217,46, [M+Na]⁺=1241,16, [M+2H]²⁺=609,61.

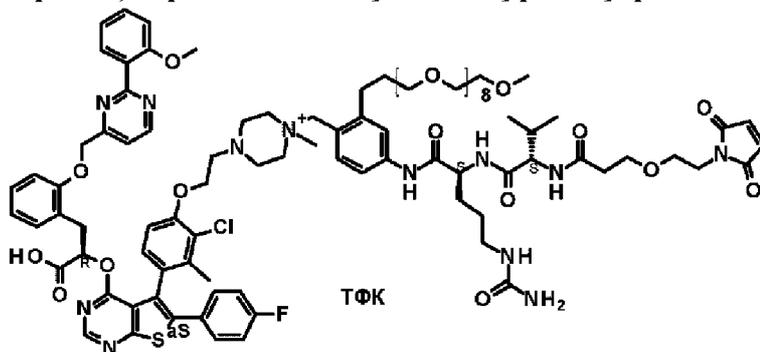
*Стадия 9: 2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-фенокси]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]-5-[[[(2S)-2-[[1-[2-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]этилкарбамоил]циклобутанкарбонил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]бензолсульфонат **L25-P1***

К раствору 5-[[[(2S)-2-амино-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[[4-[2-[4-[4-[(1R)-1-карбокси-2-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]этокси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-2-хлор-3-метил-фенокси]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]бензолсульфоната (22,6 мг; 0,0186 ммоль) в ДМФ (1,4 мл), последовательно добавляют ТГФ раствор (2,3,4,5,6-пентафторфенил) 1-[2-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]этилкарбамоил]циклобутанкарбоксилата (со стадии 3) (26,8 мг; 0,0562 ммоль) и ДИПЭА (12,9 мкл; 0,0742 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов. Неочищенный продукт раствор очищают прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge и с применением способа ТФК с получением **L25-P1** (7,5 мг; 0,0050 ммоль) в виде белого порошка. ИК (см⁻¹): 3321, 1705/1624, 1666, 1581, 1180/1124, 833/798/756/719/696. ¹H ЯМР (400/500 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 10,4 (с), 8,88 (д, 1H), 8,61 (с, 1H), 8,13 (дф, 1H), 7,92 (дд, 1H), 7,78 (д), 7,74 (т), 7,63 (д, 1H), 7,52 (дд, 1H), 7,47 (д, 1H), 7,46 (т, 1H), 7,38 (д, 1H), 7,3 (дд, 2H), 7,23 (д, 1H), 7,21 (т, 2H), 7,16 (т, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,03 (т, 1H), 7,01 (д, 1H), 7 (с, 2H), 6,73 (т, 1H), 6,22 (д, 1H),

5,99 (м), 5,55 (sl), 5,5 (дд, 1H), 5,25 (AB, 2H), 5,1 (сл, 2H), 4,37 (м, 1H), 4,33 (м, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,7 (м, 10H), 3,55 (м, 2H), 3,5 (м, 2H), 3,42 (м, 2H), 3,28/2,52 (2дд, 2H), 3,21 (м, 2H), 3,04 (сл, 3H), 2,97 (м, 2H), 2,4 (м, 4H), 1,85 (w, 3H), 1,74/1,62 (2м, 2H), 1,73 (м, 2H), 1,43/1,35 (2м, 2H). ¹³C ЯМР (400/500 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 157,5, 152,8, 135,4, 134,9, 131,5, 131,4, 131,4, 131,2, 131,1, 128,7, 121, 120,6, 119,2, 119,2, 116,3, 116, 112,8, 112,2, 111, 74, 69,5, 68,9, 67,4, 66,6, 56,2, 55,3/46,5, 54,1, 45,7, 39,4, 39,2, 37,2, 32,9, 29,7, 29,7, 27,3, 18, 16. ¹⁹F ЯМР (400/500 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. -74,6, -112,2. HR-ИЭР+: m/z [M+H]⁺=1509,4867/1509,4851 [измеренное/теоретическое]

Получение L26-P1:

(2R)-2-[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропил]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат; 2,2,2-трифторацетат



Стадия 1: 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]проп-1-ин

К раствору 2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этанола (1,95 г; 6,50 ммоль) в ТГФ (25,0 мл), добавляют при 0°C гидрид натрия (260,0 мг; 6,57 ммоль). Через 5 минут, добавляют раствор 3-бромпроп-1-ин в толуоле (1,42 мл; 13,14 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 1 часа и 2 дней при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Затем, реакционную смесь фильтруют, и фильтрат концентрируют досуха и очищают хроматографией на силикагеле (градиент ДХМ в метаноле) с получением указанного в заголовке соединения (1,74 г; 4,12 ммоль) в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (CDCl₃): 2,43 (т, 1H, J=2,4 Гц), 3,37 (с, 3H), 3,53-3,55 (м, 2H), 3,64-3,70 (м, 30H), 4,20 (д, 2H, J=2,4 Гц).

Стадия 2: 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамат

К раствору [[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-анилина (10,0 г; 27,52 ммоль) в метаноле (70 мл) и ДХМ (140 мл), последовательно добавляют Fmoc-Cit-OH (12,0 г; 30,28 ммоль) и EEDQ (8,17 г; 33,03 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 14 часов при комнатной температуре. После завершения реакции, полученный остаток

очищают колоночной хроматографией на силикагеле с применением ДХМ/метанола (100/0-88/12) в качестве элюента с получением указанного в заголовке соединения (17,09 г; 21,97 ммоль) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО): δ 0,09 (с, 6H), 0,91 (с, 9H), 1,38-1,48 (м, 2H), 1,59-1,68 (м, 2H), 2,93-3,05 (м, 2H), 4,06-4,15 (м, 2H), 4,20-4,29 (м, 3H), 4,56 (с, 2H), 5,41 (с, 2H), 5,98 (т, 1H, $J=5,5$ Гц), 7,30-7,43 (м, 5H), 7,55 (дд, 1H, $J=8,8, 2,1$ Гц), 7,69 (д, 1H, $J=7,8$ Гц), 7,74 (дд, 1H, $J=7,2, 3,4$ Гц), 7,89 (д, 1H, $J=7,5$ Гц), 8,25 (д, 1H, $J=1,5$ Гц), 10,12 (с, 1H).

Стадия 3: (2S)-2-амино-N-[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-фенил]-5-уреидо-пентанамид

К раствору 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамата (17,08 г; 23,00 ммоль) в ТГФ (120 мл), добавляют диметиламин 2М в ТГФ (44,5 мл; 89,00 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 15 часов при комнатной температуре. После концентрации досуха, полученный остаток очищают колоночной хроматографией на C_{18} с применением воды/ацетонитрила (98/02-0/100) в качестве элюента с получением указанного в заголовке соединения (5,47 г; 10,50 ммоль) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО): δ 0,0 (с, 6H), 0,81 (с, 9H), 1,27-1,38 (м, 3H), 1,47-1,53 (м, 1H), 2,83-2,89 (м, 2H), 3,16-3,19 (м, 1H), 4,46 (с, 2H), 5,26 (с, 2H), 5,82 (т, 1H, $J=5,6$ Гц), 7,24 (д, 1H, $J=8,5$ Гц), 7,50 (дд, 1H, $J=8,3, 2,0$ Гц), 8,17 (д, 1H, $J=2,0$ Гц).

Стадия 4: 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[1S)-1-[[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат

К раствору (2S)-2-амино-N-[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-фенил]-5-уреидо-пентанамида (3,00 г; 5,76 ммоль) в 2-метилтетрагидрофуране (240 мл), последовательно добавляют Fmoc-Val-Osu (8,65 г; 8,65 ммоль) и ДИПЭА (1,90 мл; 11,53 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 15 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь фильтруют через спеченную воронку и восстановленное твердое вещество промывают 2-метилтетрагидрофураном (2×250 мл), затем сушат в высоком вакууме с получением указанного в заголовке соединения (3,57 г; 4,24 ммоль) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО): δ 0,10 (с, 6H), 0,83-0,95 (м, 15H), 1,27-1,52 (м, 2H), 1,52-1,75 (м, 2H), 1,93-2,07 (м, 1H), 2,88-3,09 (м, 2H), 3,93 (т, 1H, $J=8,0$ Гц), 4,17-4,49 (м, 4H), 4,56 (с, 2H), 5,40 (с, 2H), 5,96 (т, 1H, $J=5,6$ Гц), 7,27-7,37 (м, 3H), 7,37-7,48 (м, 3H), 7,54 (д, 1H, $J=8,0$ Гц), 7,74 (т, 2H, $J=7,2$ Гц), 7,88 (д, 2H, $J=7,6$ Гц), 8,13 (д, 1H, $J=7,6$ Гц), 8,22 (с, 1H), 10,11 (с, 1H).

Стадия 5: 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[1S)-1-[[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]проп-1-инил]фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат

К раствору 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[1S)-1-[[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-йод-фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-

метил-пропил]карбамата (1,23 г; 1,46 ммоль) в диметилформамиде (15,40 мл), добавляют последовательно 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]проп-1-ин (930,0 мг; 2,20 ммоль) и ДИПЭА (2,47 мл; 14,92 ммоль). После 3 продуваний аргоном, добавляют Pd(PPh₃)₂Cl₂ (220 мг; 0,307 ммоль) и CuI (68,0 мг; 0,36 ммоль) и реакционную смесь продувают аргоном 3 раза. Реакционную смесь перемешивают в течение 3 часов при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Смесь разбавляют изопропилацетатом (200 мл) и промывают насыщенным раствором соли (3×150 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют досуха. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge с применением нейтрального способа с получением указанного в заголовке соединения (790,0 мг; 0,70 ммоль) в виде бледно-желтой камеди. ¹H ЯМР (ДМСО): δ 0,08 (с, 6H), 0,85-0,90 (м, 15H), 1,36-1,45 (м, 2H), 1,58-1,71 (м, 2H), 1,97-2,00 (м, 1H), 2,93-3,03 (м, 2H), 3,23 (с, 3H), 3,40-3,43 (м, 2H), 3,49-3,52 (м, 25H), 3,56-3,58 (м, 2H), 3,63-3,66 (м, 2H), 3,93 (дд, 1H, J=8,9, 6,9 Гц), 4,23-4,32 (м, 3H), 4,37-4,43 (м, 3H), 4,75 (с, 2H), 5,39 (с, 2H), 5,97 (т, 1H, J=6,1 Гц), 7,30-7,43 (м, 6H), 7,51-7,54 (м, 1H), 7,72-7,78 (м, 3H), 7,88 (д, 2H J=7,5 Гц), 8,12 (д, 2H, J=7,4 Гц), 10,10 (с, 1H).

Стадия 6: 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(гидроксиметил)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]проп-1-инил]фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат

К раствору 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]проп-1-инил]фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (452 мг; 0,40 ммоль) в тетрагидрофуране (0,60 мл) и воде (0,90 мл), добавляют уксусную кислоту (4,17 мл; 72,78 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 22 часов при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. После концентрации досуха, неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge с применением нейтрального способа с получением указанного в заголовке соединения (327 мг, 0,32 ммоль) в виде белой камеди. ¹H ЯМР (ДМСО): δ 0,87 (дд, 6H, J=11,7, 6,8 Гц), 1,36-1,45 (м, 2H), 1,58-1,71 (м, 2H), 1,97-2,00 (м, 1H), 2,93-3,02 (м, 2H), 3,23 (с, 3H), 3,31 (с, 5H), 3,40-3,43 (м, 2H), 3,48-3,53 (м, 21H), 3,54-3,64 (м, 6H), 3,91-3,95 (м, 1H), 4,23-4,42 (м, 4H), 4,56 (д, 2H, J=5,5 Гц), 5,19 (т, 1H, J=5,6 Гц), 5,39 (с, 2H), 5,96 (т, 1H, J=5,8 Гц), 7,30-7,34 (м, 2H), 7,39-7,43 (м, 4H), 7,50-7,52 (м, 1H), 7,72-7,76 (с, 3H), 7,88 (д, 1H J=7,5 Гц), 8,12 (д, 2H, J=7,4 Гц), 10,06 (с, 1H).

Стадия 7: 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(гидроксиметил)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]проп-1-инил]фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат

К раствору 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(гидроксиметил)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропил]фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (327,0 мг; 0,32 ммоль) в ТГФ (3,7 мл), добавляют уксусную кислоту (0,37 мл). После 3 продуваний аргоном, Pt/C 5% (195 мг) добавляют, и после еще 3 продуваний аргоном, реакционную смесь помещают в атмосферу водорода и перемешивают в течение 18 часов при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Смесь фильтруют через PTFE, и фильтрат концентрируют досуха, затем растирают в дихлорметане/пентане (1/4 смесь, 50 мл). Осадок выделяют фильтрацией с получением, после сушки, указанного в заголовке соединения (130 мг; 0,13 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО): δ 0,85-0,89 (м, 6H), 1,23-1,46 (м, 2H), 1,56-1,76 (м, 4H), 1,97-2,02 (м, 1H), 2,56-2,60 (м, 2H), 2,91-3,04 (м, 2H), 3,23 (с, 3H), 3,38-3,43 (м, 4H), 3,48-3,54 (м, 30H), 3,93 (дд, 1H, J=8,9, 6,9 Гц), 4,21-4,31 (м, 3H), 4,38-4,41 (м, 1H), 4,45 (д, 2H, J=5,3 Гц), 4,94 (т, 1H, J=5,3 Гц), 5,37 (с, 2H), 5,95 (т, 1H, J=5,8 Гц), 7,25 (д, 1H, J=8,3 Гц), 7,30-7,34 (м, 2H), 7,39-7,43 (с, 5H), 7,72-7,76 (м, 2H), 7,88 (д, 1H, J=7,5 Гц), 8,06 (д, 2H, J=7,6 Гц), 9,88 (с, 1H). УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+H]⁺=1026,52.

Стадия 8: 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(бромметил)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропил]фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат

К раствору 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(гидроксиметил)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропил]фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата (60 мг; 0,0584 ммоль) в ТГФ (6,6 мл), добавляют по каплям при 0°C PBr₃ (1M раствор в ТГФ) (0,0877 мл; 0,0877 ммоль). Раствор затем перемешивают 3 часов при комнатной температуре. Прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС после добавления в аликвоте морфолина для взаимодействия ожидаемого соединения брома. Реакционную смесь обрабатывают водным насыщенным раствором NH₄Cl (50 мкл). Через 5 минут смесь сушат над MgSO₄, фильтруют и промывают ТГФ (2 мл) с получением указанного в заголовке соединения брома в виде раствора ТГФ, который применяют неочищенным на следующей стадии. УЭЖХ-МС анализ проводят после добавления метанола и морфолина.

Стадия 9: (2R)-2-[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропил]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат

К ТГФ раствору 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[4-(бромметил)-3-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропил]фенил]карбамоил]-4-уреидо-бутил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамата с предыдущей стадии (0,0584 ммоль) последовательно добавляют ДМФ (1,5 мл), (2R)-2-[5-

[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановую кислоту **P1** (46,1 мг; 0,0527 ммоль) и ДИПЭА (0,173 мл; 0,995 ммоль). Реакционную смесь перемешивают 20 часов при комнатной температуре, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенную смесь, содержащую ожидаемое указанное в заголовке соединение и соединение со снятой защитой Fmoc (ожидаемое на стадии 10) применяют на следующей стадии снятия защиты. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M-Fmoc+H+H]⁺=1660,99

Стадия 10: (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропил]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат; 2,2,2-трифторуксусная кислота

К неочищенной смеси, полученной на предыдущей стадии, в ДМФ добавляют пиперидин (11,6 мкл; 0,117 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 часов, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. После завершения реакции, неочищенный продукт очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge с применением способа ГФК с получением указанного в заголовке соединения (29,2 мг; 0,0155 ммоль) в виде белого порошка. ИК: 3600-2300, 1672, 1602, 1541+1516. НР-ИЭР+: m/z [M-CF₃COO]⁺=1660,7574 (1660,7575 теоретическое)

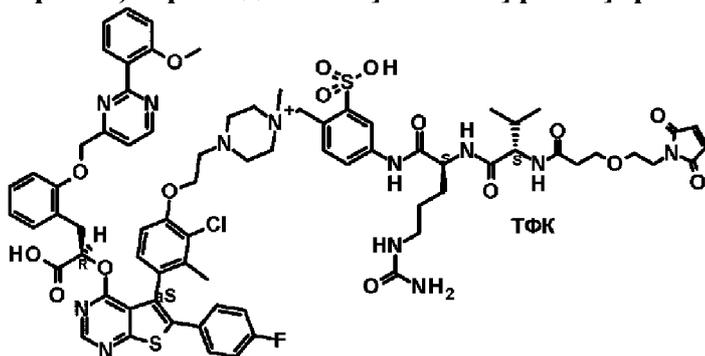
*Стадия 11: (2R)-2-[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропил]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат; 2,2,2-трифторацетат **L26-P1***

К раствору (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-метоксиэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропил]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты; 2,2,2-трифторацетата; 2,2,2-трифторуксусной кислоты (42,5 мг; 0,0225 ммоль) в ДМФ (1,28 мл), последовательно добавляют раствор (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноат (Brodpharm 21854) (7,71 мг; 0,0247 ммоль) и ДИПЭА (19,6 мкл; 0,112 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 часов, и прогресс реакционной смеси отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси

на колонку X-Bridge с применением способа ТФК с получением **L26-P1** (28 мг; 0,0151 ммоль) в виде белого порошка. HR-ИЭР+: m/z $[M-CF_3COO]^+=1855,8105$ (1855,8106 теоретическое)

Получение L27-P1:

(2R)-2-[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[2S)-2-[[2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-3-метил-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота



Стадия 1: 2-(хлорметил)-5-[[2S)-2-[[2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]бензолсульфонат

5-[[2S)-2-[[2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-(гидроксиметил)бензолсульфовую кислоту (300 мг; 0,4263 ммоль) растворяют в безводном NMP (6 мл) при комнатной температуре. Параллельно, получают раствор $SOCl_2$ (206 мкл) в NMP (6 мл). В реакционную смесь, добавляют 6 раз в течение 75 минут раствор 900 мкл $SOCl_2$. После последнего добавления, реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 минут. Неочищенный продукт очищают прямым помещением реакционной смеси на колонку Oasis с применением способа ТФК с получением указанного в заголовке соединения (138 мг; 0,1971 ммоль) в виде белого порошка. 1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 10,15+8,1+7,42+6,0 (с+2д+м, 4H), 7,9 (м, HH), 7,75 (м, 3H), 7,42+7,31 (2м, 5H), 5,23 (с, 2H), 4,4 (м, 1H), 4,3-4,2 (м, 3H), 3,95 (дд, 1H), 3,0 (м, 2H), 2,0 (м, 1H), 1,7+1,6 (2м, 2H), 1,48+1,37 (2м, 2H), 0,88 (2д, 6H). HR-ИЭР+: m/z $[M+H]^+=700,2199/700,2202$ [измеренное/теоретическое]

Стадия 2: 5-[[2S)-2-[[2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[[4-[2-[2-хлор-4-[6-(4-фторфенил)-4-[(1R)-2-метокси-1-[[2-[[2-(2-метоксифенил)тиридин-4-ил]метокси]фенил]метил]-2-оксо-этокси]тиено[2,3-d]тиридин-5-ил]-3-метил-фенокси]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]бензолсульфовая кислота

К раствору 2-(хлорметил)-5-[[2S)-2-[[2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-

пентаноил]амино]бензолсульфоната (82,4 мг; 0,1177 ммоль) в безводном NMP (2,5 мл), добавляют при комнатной температуре ДИЭА (94 мкл; 0,540 ммоль) затем метил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат (60 мг; 0,067 ммоль) и TBAI (12,4 мг; 0,034 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 80°C в течение 4 часов и в течение ночи при комнатной температуре. Затем, снова добавляют 2-(хлорметил)-5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]бензолсульфонат (14 мг; 0,017 ммоль), затем TBAI (17 мкл; 0,0337 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при 80°C в течение 4 часов и затем в течение ночи при комнатной температуре. Стадию снятия защиты Fmoc проводят добавлением DEA (53 мкл; 0,515 ммоль) в реакционную смесь и перемешиванием при комнатной температуре в течение ночи. Очистку проводят прямым впрыском смеси на колонку Oasis, элюированную градиентом раствора А: H₂O/CH₃CN/NH₄HCO₃ (1960 мл/40/3,16 г) до раствора В: CH₃CN/H₂O/NH₄HCO₃ (1600 мл/400 мл/3,16 г) с получением указанного в заголовке соединения (17 мг; 0,009 ммоль). УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M]⁺=1329

Стадия 3: (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К смеси 5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-[[4-[2-[2-хлор-4-[6-(4-фторфенил)-4-[(1R)-2-метокси-1-[[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]метил]-2-оксо-этокси]тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-3-метил-фенокси]этил]-1-метил-пиперазин-1-ий-1-ил]метил]бензолсульфоновой кислоты (18 мг; 0,014 ммоль) в диоксане/воде (1 мл/1 мл) добавляют LiOH·H₂O (2,3 мг; 0,054 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 4 часов. Раствор доводят до pH 6-7 добавлением HCl 1N, и диоксан выпаривают при пониженном давлении. Очистку проводят прямым впрыском смеси на колонку Oasis, элюированную градиентом раствора А: H₂O/CH₃CN/NH₄HCO₃ (1960 мл/40/3,16 г) до раствора В: CH₃CN/H₂O/NH₄HCO₃ (1600 мл/400 мл/3,16 г) с получением указанного в заголовке соединения (11 мг; 0,008 ммоль).

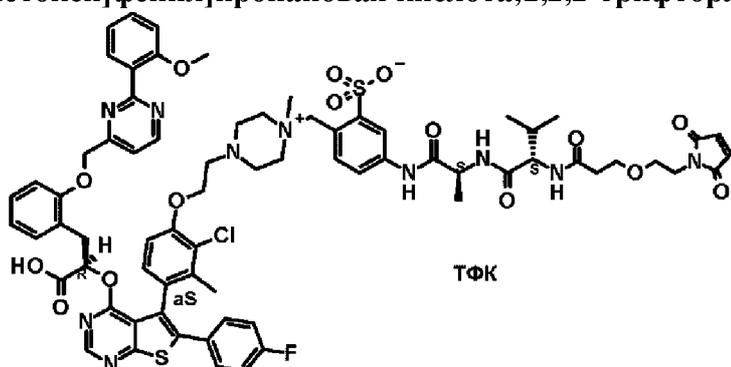
*Стадия 4: (2R)-2-[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксотиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-3-метил-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота **L27-P1***

К раствору (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидо-пентаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (10,5 мг;

0,007 ммоль) в ДМФ (0,4 мл), добавляют (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноат (5,7 мг; 0,018 ммоль), и раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 4 часов. Раствор очищают на колонке X-Bridge C₁₈ прямым помещением реакционной смеси на колонку и с применением способа ТФК с получением **L27-P1** (10 мг; 0,006 ммоль). HR-ИЭР+: [M+H]⁺ 1511,5018/1511,5002 [измеренное/теоретическое]

Получение **L28-P1**:

(2R)-2-[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат



Стадия 1: 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-(хлорметил)-3-метил-анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат

К раствору 5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-(гидроксиметил)бензолсульфоната (504,1 мг; 0,816 ммоль) в NMP (5 мл), добавляют 6 раз в течение 75 минут раствор SOCl₂ (60 мкл; 0,816 ммоль) в NMP (500мкл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 минут. Неочищенный продукт очищают прямым помещением реакционной смеси на колонку Oasis с применением способа ТФК с получением (337 мг) в виде смеси 70% указанного в заголовке соединения (384 ммоль) и 30% исходного материала (170 ммоль) в виде белого порошка. ИК (см⁻¹): 3600-2400, 1688+1648, 1599, 1518, 1022. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M+H]⁺=614,17+616,18 (Cl)

Стадия 2: (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-метил-фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат

К раствору метил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (152 мг; 0,171 ммоль) в NMP (4,5 мл), последовательно добавляют 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1S)-2-[4-

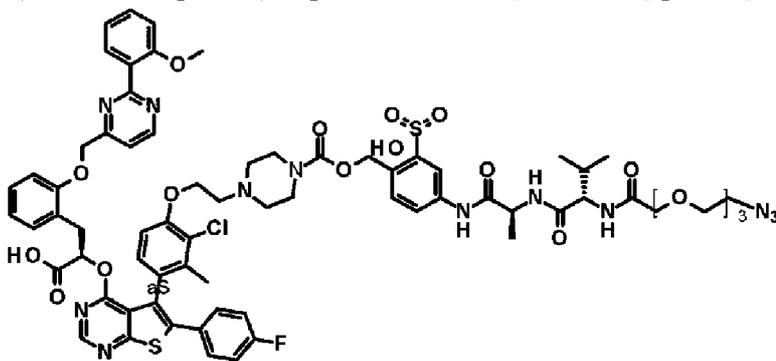
(хлорметил)-3-метил-анилино]-1-метил-2-оксо-этил]карбамоил]-2-метил-пропил]карбамат (150 мг; 0,171 ммоль), ДИПЭА (238 мкл; 1,37 ммоль) и ТВАИ (76 мг; 0,205 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при 80°C в течение 28 часов. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры. Затем добавляют раствор LiOH·H₂O (13,7 мг, 0,342 ммоль) в воде (500 мкл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 48 часов. Неочищенный продукт очищают С18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge и с применением способа ТФК с получением указанного в заголовке соединения (40 мг; 0,0325 ммоль) в виде белого порошка. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z [M]⁺=1230,61+1232,61 (Cl)

Стадия 3: (2R)-2-[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота; 2,2,2-трифторацетат L28-P1

К раствору (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-метил-фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты; 2,2,2-трифторацетата (6,0 мг; 0,0049 ммоль) в растворе ДМФ (180 мкл), последовательно добавляют (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 3-[2-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]этилкарбамоил]оксетан-3-карбоксилат (2,3 мг; 0,0073 ммоль) и ДИПЭА (3,0 мкл; 0,017 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5 часов и отслеживают УЭЖХ-МС. Неочищенный продукт очищают прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge с применением способа ТФК с получением **L28-P1** (2,9 мг; 0,0020 ммоль) в виде белого порошка. HR-ИЭР⁺: m/z [M+H]⁺=1425,4534/1425,4527 [измеренное/теоретическое]

Получение L29-C3:

(2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-(2-азидоэтокси)ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота



Стадия 1: натрий; 5-[[[(2S)-2-(трет-бутоксикарбониламино)пропаноил]амино]-2-

(гидроксиметил)бензолсульфонат

К раствору Вос-L-Ala-OH (588 мг; 3,11 ммоль) в ДМФ (38,6 мл), последовательно добавляют ГАТУ (1,77 г; 4,67 ммоль), натрий 5-амино-2-(гидроксиметил)бензолсульфонат (771 мг; 3,42 ммоль) и ДИПЭА (1,29 мл; 7,78 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 16 часов при комнатной температуре затем концентрируют досуха и совместно выпаривают с водой с получением неочищенной реакционной смеси. Полученный остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле с применением этилацетата/метанола 95:5-80:20 в качестве элюента с получением указанного в заголовке соединения (1,17 г; 2,95 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО): δ 1,24 (с, 9H), 1,38 (м, 3H), 4,05-1,44 (м, 1H), 4,73 (д, 2H, J=4,8 Гц), 5,04 (т, 1H, J=5,6 Гц); 6,97-7,02 (м, 1H), 7,33 (д, 1H, J=8 Гц), 7,65-7,70 (м, 1H), 7,83 (с, 1H), 9,91 (с, 1H).

Стадия 2: 5-[[[(2S)-2-аминопропаноил]амино]-2-(гидроксиметил)бензолсульфонат, гидрохлорид

Натрий 5-[[[(2S)-2-(трет-бутоксикарбониламино)пропаноил]амино]-2-(гидроксиметил)бензолсульфонат (1,17 г; 2,95 ммоль; 1 экв.) суспендируют в растворе HCl 4N в диоксане (10 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов затем концентрируют досуха с получением неочищенной смеси (982 мг; 2,95 ммоль) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО): δ 1,45 (д, 3H, J=5,6 Гц), 3,91-4,0 (м, 1H), 4,76 (с, 2H), 7,41 (д, 1H, J=7,6 Гц), 7,66 (д, 1H, J=7,6 Гц), 7,85 (с, 1H), 8,17 (с, 2H), 10,44 (с, 1H).

Стадия 3: 5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилбутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-(гидроксиметил)бензолсульфонат

К раствору 5-[[[(2S)-2-аминопропаноил]амино]-2-(гидроксиметил)бензолсульфоната, гидрохлорида (981 мг; 2,95 ммоль) в ДМФ (34,5 мл) добавляют Fmoc-L-Val-Osu (1,29 г; 2,95 ммоль; 1 экв.) и ДИПЭА (975 мкл; 5,9 ммоль). Смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре затем концентрируют досуха и совместно выпаривают с водой с получением неочищенной смеси. Полученный остаток очищают колоночной хроматографией на силикагеле с применением этилацетата/метанола 95:5-80:20 в качестве элюента с получением указанного в заголовке соединения (1,28 г; 2,072 ммоль) в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (ДМСО): δ 0,80-0,92 (м, 6H), 1,30 (д, 3H, J=6,4 Гц), 2,02-2,10 (м, 1H), 4,17-4,31 (м, 3H), 4,37-4,44 (м, 1H), 4,73 (д, 2H, J=5,6 Гц), 5,04 (т, 1H, J=6,4 Гц), 7,28-7,36 (м, 3H), 7,37-7,47 (м, 3H), 7,66 (д, 1H, J=8,4 Гц), 7,71-7,77 (м, 2H), 7,83-7,85 (м, 1H), 7,88 (д, 2H, J=7,6 Гц), 8,14 (д, 1H, J=6,4 Гц), 9,99 (с, 1H).

Стадия 4: 5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилбутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[(4-нитрофенокси)карбонилметил]бензолсульфоновая кислота

К суспензии 5-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилбутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-(гидроксиметил)бензолсульфоната (1,28 г; 2,07 ммоль) в ТГФ (65 мл), добавляют пиридин (875 мкл; 10,8 ммоль), затем 4-нитрофенил хлорформат (1,09 г; 5,41 ммоль). Смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. Затем добавляют дополнительный 4-нитрофенил хлорформат (1,09 г; 5,41

ммоль; 2,5 экв.). Через 5 часов перемешивания при комнатной температуре, смесь концентрируют досуха, затем очищают колоночной хроматографией на C_{18} с применением воды/ацетонитрила 90/10-0/100 в качестве элюента за 30 минут. Ацетонитрил из объединенных пробирок удаляют, и остаток лиофилизируют с получением указанного в заголовке соединения (650 мг; 0,83 ммоль) в виде белого твердого вещества. 1H ЯМР (ДМСО): δ 0,88 (м, 6H), 1,31 (д, 3H, $J=4,8$ Гц), 1,97-2,03 (м, 1H), 3,92 (т, 1H, $J=6,8$ Гц), 4,23 (с, 2H), 4,24-4,34 (м, 1H), 4,42 (т, 1H $J=5,6$ Гц), 5,69 (с, 2H), 7,30-7,48 (м, 6H), 7,62 (д, 2H, $J=8$ Гц), 7,72-7,76 (м, 3H), 7,89 (д, 2H, $J=6,4$ Гц), 7,94 (с, 1H), 8,18 (д, 1H, $J=5,6$ Гц), 8,33 (д, 2H, $J=7,6$ Гц), 10,11 (с, 1H). ^{13}C ЯМР (ДМСО): δ 18,01, 18,26, 19,21, 30,4, 46,66, 49,05, 59,91, 65,67, 67,82, 117,7, 119,1, 120,06, 122,66, 125,37, 126,33, 127,05, 127,62, 128,0, 138,06, 140,67, 143,77, 143,86, 145,1, 146,23, 151,96, 155,47, 156,12, 171,0, 171,15. ЖХМС (2-100 ACN/ H_2O +0,05% ТФК): 90,41% $T_r=12,7$ мин. Положительный режим 578,41 определено. Отрицательный режим 759,17 определено

Стадия 5: (2S)-2-[[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]метил]-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К суспензии (2S)-2-[[5-[3-хлор-2-метил-4-(2-пиперазин-1-илэтокси)фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]метил]-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты; 2,2,2-трифторуксусной кислоты (178,4 мг; 0,183 ммоль) в ДМФ (1,5 мл), последовательно добавляют 5-[[[(2S)-2-[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-[(4-нитрофенокси)карбонил]оксиметил]бензолсульфоновую кислоту (150 мг; 0,192 ммоль) и ДИПЭА (91 мкл; 0,549 ммоль), Смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре в течение 15 минут. Неочищенный продукт очищают прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge с применением способа NH_4HCO_3 с получением указанного в заголовке соединения (176 мг, 0,118 ммоль) в виде белого твердого вещества. УЭЖХ-МС: MS (ИЭР) m/z $[M+H]^+=1482,15+1484,56(CI)$

Стадия 6: (2S)-2-[[5-[4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]метил]-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору (2S)-2-[[5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]метил]-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (176 мг; 0,118 ммоль) в ДМФ (1,0 мл), добавляют пиперидин (24,17 мкл; 0,237 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 18 часов. Неочищенный продукт очищают прямым помещением

реакционной смеси на колонку X-Bridge с применением способа NH_4HCO_3 с получением указанного в заголовке соединения (102 мг; 0,0809 ммоль) в виде белого порошка. ИК (см^{-1}): 3620-2680, 1683, 1235. УЭЖХ-МС: МС (ИЭР) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+=1260,37+1262,37(\text{Cl})$. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ м.д. 10,20 (м, NH), 8,90 (м, 2H), 8,90 (м, 1H), 8,60 (м, NH), 8,60 (с, 1H), 7,90 (м, 1H), 7,78 (м, 1H), 7,70 (д, 1H), 7,55 (д, 1H), 7,48 (т, 1H), 7,45 (д, 1H), 7,3/7,2 (м, 4H), 7,20 (м, 1H), 7,20 (д, 1H), 7,15 (т, 1H), 7,15 (д, 1H), 7,05 (т, 1H), 7,00 (д, 1H), 6,7 (т, 1H), 6,2 (д, 1H), 5,48 (с, 2H), 5,50 (м, 1H), 5,23 (с, 2H), 4,50 (м, 1H), 4,25 (м, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,4 (м, 4H), 3,40 (м, 1H), 3,35 (м, 1H) 2,80 (м, 2H), 2,5 (м, 4H), 2,50 (м, 1H), 2,05 (м, 1H), 1,80 (с, 3H), 1,30 (д, 3H), 0,90 (дд, 6H).

Стадия 7: (2,3,4,5,6-пентафторфенил) 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетат

К раствору 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]уксусной кислоты (74 мг; 0,317 ммоль) в ТГФ (500 мкл) последовательно добавляют 2,3,4,5,6-пентафторфенол (70 мг; 0,380 ммоль) в растворе ТГФ (500 мкл) и ДЦК (78,5 мг; 0,380 ммоль) в растворе ТГФ (500 мкл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 18 часов. Неочищенную суспензию фильтруют через хлопковый слой в пипетке Пастера и раствор применяют без дальнейшей обработки на стадии 8.

Стадия 8: (2R)-2-[5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[2-(2-азидоэтокси)ацетил]амино]-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота **L29-C3**

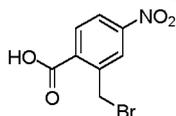
К раствору (2S)-2-[[5-[4-[2-[4-[[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метил-бутаноил]амино]пропаноил]амино]-2-сульфо-фенил]метоксикарбонил]пиперазин-1-ил]этокси]-3-хлор-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]метил]-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (100 мг; 0,0793 ммоль) в ДМФ (500 мкл) последовательно добавляют раствор (2,3,4,5,6-пентафторфенил) 2-[2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси]ацетата в ТГФ со стадии 7 (0,317 ммоль) и ДИПЭА (39,3 мкл; 0,238 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 15 минут. Неочищенный продукт очищают прямым помещением реакционной смеси на колонку X-Bridge с применением способа NH_4HCO_3 с получением **L29-C3** (43 мг, 0,0291 ммоль) в виде белого порошка. ИК (см^{-1}): 3257, 2102, 1663, 1236/1082, 834/756. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ м.д. 10,03 (с, NH), 8,87 (д, 1H), 8,59 (sNC, 1H), 8,35 (д, NH), 7,89 (дф, 1H), 7,69 (дд, 1H), 7,66 (м, 1H), 7,53 (д, 1H), 7,45 (т, 1H), 7,36 (д, 1H), 7,29 (дд, 2H), 7,21 (д, 1H), 7,20 (т, 2H), 7,19 (д, 1H), 7,14 (д, 1H), 7,13 (м, 1H), 7,09 (м, NH), 7,03 (т, 1H), 7,00 (д, 1H), 6,72 (т, 1H), 6,24 (д, 1H), 5,48 (dNC, 1H), 5,44 (с, 2H), 5,23 (AB, 2H), 4,40 (т, 1H), 4,30 (дд, 1H), 4,24 (м, 2H), 3,94 (с, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,58 (м, 10H), 3,38 (м, 4H), 3,36 (т, 2H), 3,30 (NC, 1H), 2,75 (т, 2H), 2,50 (м, 4H), 2,50 (м, 1H), 2,00 (м, 1H), 1,51 (с, 3H), 1,30 (д, 3H), 0,88/0,82 (2д, 6H). ^{13}C ЯМР (100/126 МГц, DMSO-d_6) δ м.д. 158,2, 131,6, 131,1, 130,9, 130,9, 130,9, 130,9, 128,3, 126,7, 120,7, 120,4, 119,3, 117,9, 116,2,

112,5, 112,1, 110,8, 70,2, 70,2; 69,6, 67,7, 64,0, 56,7, 56,5, 55,8, 53,2, 50,4, 49,2, 43,8, 31,7, 19,7, 18,7, 18,4, 17,8. ^{19}F ЯМР (376/470 МГц, ДМСО- d_6) δ м.д. -112,0. HR-ИЭР+: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+=1475,4643/1475,4638$; $[2\text{M}+\text{H}+\text{Ca}]^{3+}=996,6289/996,6273$; $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}=738,2378/738,2355$; $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}=749,2255/749,2265$.

Пример 2. Синтез и характеристика дополнительных линкеров, линкеро-полезных нагрузок и их предшественников.

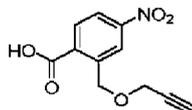
Типовые линкеры, линкеры-полезные нагрузки и их предшественники синтезируют с применением типовых способов, описанных в этом примере.

Синтез 2-(бромметил)-4-нитробензойной кислоты



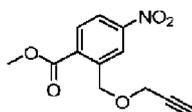
К перемешиваемому раствору 2-метил-4-нитробензойной кислоты (300 г, 1,5371 моль) в CCl_4 (3000 мл) добавляют NBS (300,93 г, 1,6908 моль) и AIBN (37,86 г, 0,2305 моль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают при 80°C в течение 16 ч. Реакционную смесь отслеживают анализом ТСХ. Реакционную смесь разбавляют насыщ. раствором NaHCO_3 (2 л) и экстрагируют этилацетатом (2×2 л). Объединенный органический слой сушат над безводным сульфатом натрия и концентрируют при пониженном давлении. Неочищенное соединение очищают колоночной хроматографией на силикагеле с применением 2-3% этилацетата в петролейном эфире в качестве элюента и получают 2-(бромметил)-4-нитробензойную кислоту. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,35 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 8,20 (кв, $J=8,8, 2,4$ Гц, 1H), 8,12 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 4,97 (с, 2H), 4,00 (с, 3H).

Синтез 4-нитро-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензойной кислоты



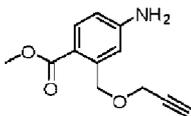
К смеси 2-(бромметил)-4-нитробензойной кислоты (250 г, 0,9122 моль) в ACN (5000 мл) добавляют проп-2-ин-1-ол (255,68 г, 265,50 мл, 4,5609 моль, $d=0,963$ г/мл) и Cs_2CO_3 (743,03 г, 2,2805 моль) при комнатной температуре. Полученную смесь нагревают до 80°C в течение 16 ч. Реакционную смесь фильтруют через слой целита, промывают этилацетатом (2 л). Фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Полученное неочищенное соединение добавляют в насыщ. раствор NaHCO_3 (1 л) и водный слой подкисляют до pH 2 с применением 2N HCl (2 л). После фильтрации вакуумной сушкой получают 4-нитро-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензойную кислоту. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО): δ 13,61 (шс, 1H), 8,37 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 8,23 (дд, $J=2,4, 8,4$ Гц, 1H), 8,10 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 4,95 (с, 2H), 4,37 (д, $J=2,4$ Гц, 2H), 3,52 (т, $J=2,4$ Гц, 1H).

Синтез метил 4-нитро-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензоат



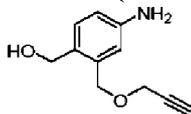
К перемешиваемому раствору 4-нитро-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензойной кислоты (130 г, 0,5527 моль) в MeOH (1300 мл) медленно добавляют SOCl_2 (526,08 г, 320,78 мл, 4,4219 моль, $d=1,64$ г/мл) при 0°C . Реакцию перемешивают при 70°C в течение 4 ч. Реакционный растворитель выпаривают при пониженном давлении. Полученный остаток растворяют в этилацетате (1000 мл) и промывают насыщ. NaHCO_3 (600 мл), вода (500 мл) и насыщенным раствором соли (500 мл). Отделенный органический слой сушат над сульфатом натрия, фильтруют и выпаривают при пониженном давлении с получением метил 4-нитро-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензоата. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,56 (т, $J=0,8$ Гц, 1H), 8,18-8,09 (м, 2H), 5,03 (с, 2H), 4,35 (д, $J=2,4$ Гц, 2H), 3,96 (с, 3H), 2,49 (т, $J=2,4$ Гц, 1H).

Синтез метил 4-амино-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензоата



К раствору метил 4-нитро-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензоата (110 г, 0,4414 моль) в смеси EtOH (1100 мл) и H_2O (550 мл) добавляют Fe порошок (197,21 г, 3,5310 моль) и NH_4Cl (188,88 г, 3,5310 моль) при комнатной температуре. Полученную смесь нагревают при 80°C в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через celite® и промывают этилацетатом (2 л). Фильтрат концентрируют при пониженном давлении до половины объема. К остатку добавляют этилацетат (1,5 л) и разделяют два слоя, и водный слой экстрагируют этилацетатом (2 л). Объединенный органический слой сушат над безводным сульфатом натрия и концентрируют при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Очистка SiO_2 колоночной хроматографией (15-20% этилацетат в петролейном эфире) дает метил 4-амино-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензоат. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,67 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 6,78 (т, $J=1,6$ Гц, 1H), 6,48 (кв, $J=8,4$, 2,4 Гц, 1H), 4,79 (с, 2H), 4,25 (д, $J=2,4$ Гц, 2H), 3,70 (д, $J=4,0$ Гц, 3H), 3,42 (т, $J=2,4$ Гц, 1H).

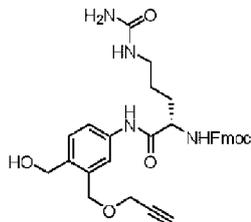
Синтез (4-амино-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)метанола



К перемешиваемому раствору ТГФ (1000 мл) добавляют LiAlH_4 (1 М в ТГФ) (21,23 г, 798,2 ммоль, 798,2 мл) медленно при 0°C . Раствор метил 4-амино-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензоата (70 г, 319,3 ммоль) в ТГФ (800 мл) добавляют медленно при 0°C . Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь охлаждают до 0°C , затем добавляют воду (22 мл) очень медленно и затем добавляют 20% NaOH (22 мл) и воду (66 мл). Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 30 мин. Безводный сульфат натрия добавляют для абсорбции избытка воды. Смесь фильтруют через celite®. Фильтровальную лепешку промывают этилацетатом (1000 мл) и 10% MeOH/ДХМ (500 мл). Фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Полученное

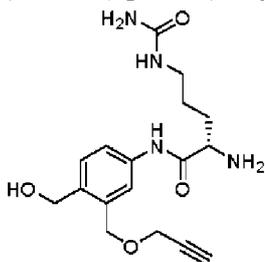
неочищенное соединение очищают SiO_2 колоночной хроматографией (35-40% этилацетат в петролейном эфире в качестве элюента) с получением (4-амино-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)метанола. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 6,98 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 6,56 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 6,43 (дд, $J=2,4, 8,0$ Гц, 1H), 4,98 (с, 2H), 4,64 (т, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,47 (с, 2H), 4,34 (д, $J=5,6$ Гц, 2H), 4,15 (д, $J=2,4$ Гц, 2H), 3,46 (т, $J=2,4$ Гц, 1H).

Синтез (9H-флуорен-9-ил)метил (S)-(1-((4-(гидроксиметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)карбамата



К раствору (4-амино-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)метанола (1,92 г, 10,04 ммоль, 1,0 экв.), (9H-флуорен-9-ил)метил (S)-(1-амино-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)карбамата (3,99 г, 10,04 ммоль, 1,0 экв.) и (1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния 3-оксида гексафторфосфата (4,20 г, 11,04 ммоль, 1,1 экв.) в ДМФ (10 мл) добавляют N,N-диизопропилэтиламин (2,62 мл, 15,06 ммоль, 1,5 экв.). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 1 с, смесь выливают в воду (200 мл). Полученные твердые вещества фильтруют, промывают водой и сушат под вакуумом и получают (9H-флуорен-9-ил)метил (S)-(1-((4-(гидроксиметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)карбамат. ЖХМС: Mn^+ =571,5; Rt =0,93 мин (2 мин кислый способ).

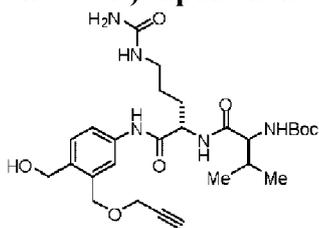
Синтез (S)-2-амино-N-(4-(гидроксиметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)-5-уреидопентанамида



К (9H-флуорен-9-ил)метил (S)-(1-((4-(гидроксиметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)карбамату (6,08 г, 10,65 ммоль, 1,0 экв.) добавляют диметиламин (2 М в ТГФ, 21,31 мл, 42,62 ммоль, 4 экв.). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 1,5 часов, раствор супернатанта декантируют из образовавшегося камедиподобного остатка. Остаток растирают с эфиром (3×50 мл), и полученные твердые вещества фильтруют, промывают эфиром и сушат под вакуумом. Получают (S)-2-амино-N-(4-(гидроксиметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)-5-уреидопентанамида. ЖХМС: Mn^+ 349,3; Rt =0,42 мин (2 мин кислый способ).

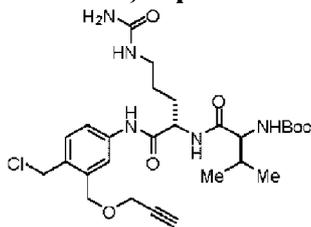
Синтез трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((4-(гидроксиметил)-3-((проп-2-ин-1-

илокси)метил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата



К раствору (S)-2-амино-N-(4-(гидроксиметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)-5-уреидопентанамида (3,50 г, 10,04 ммоль, 1,0 экв.), (трет-бутоксикарбонил)-L-валина (2,62 г, 12,05 ммоль, 1,2 экв.) и (1-[бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния 3-оксида гексафторфосфата (4,58 г, 12,05 ммоль, 1,2 экв.) в ДМФ (10 мл) добавляют N,N-диизопропилэтиламин (3,50 мл, 20,08 ммоль, 2,0 экв.). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 2 ч, смесь выливают в воду (200 мл) и полученную суспензию экстрагируют EtOAc (3×100 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия и концентрируют под вакуумом. После очистки ISCO SiO₂ хроматографией (0-20% метанол/дихлорметан), получают трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((4-(гидроксиметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 10,00 (с, 1H), 7,96 (д, J=7,7 Гц, 1H), 7,55 (дкв, J=4,9, 2,2 Гц, 2H, арил), 7,32 (д, J=8,9 Гц, 1H, арил), 6,76 (д, J=8,9 Гц, 1H), 5,95 (т, J=5,8 Гц, 1H), 5,38 (с, 2H), 5,01 (т, J=5,5 Гц, 1H), 4,54 (с, 2H), 4,45 (дд, J=25,2, 5,3 Гц, 3H), 4,20 (д, J=2,4 Гц, 2H), 3,83 (дд, J=8,9, 6,7 Гц, 1H), 3,49 (т, J=2,4 Гц, 1H), 2,97 (дг, J=26,0, 6,5 Гц, 2H), 1,96 (г, J=6,6 Гц, 1H), 1,74-1,50 (м, 2H), 1,39 (м, 11H), 0,84 (дд, J=16,2, 6,7 Гц, 6H). ЖХМС: M_n+ 570,5; R_t=0,79 мин (2 мин кислый способ).

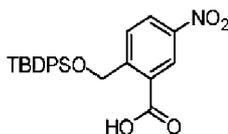
Синтез трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((4-(хлорметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат



К раствору трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((4-(гидроксиметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата (2,00 грамм, 3,65 ммоль, 1,0 экв.) в ацетонитриле (13,3 мл) при 0°C добавляют тионилхлорид (0,53 мл, 7,30 ммоль, 2,0 экв.). После перемешивания на ледяной бане в течение одного часа, раствор разбавляют водой (40 мл) и полученный белый осадок собирают фильтрацией, сушат на воздухе и сушат в высоком вакууме с получением трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((4-(хлорметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата. ЖХМС: M_n+ 588,5;

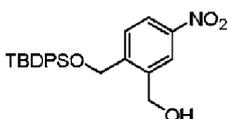
Rt=2,17 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензойной кислоты



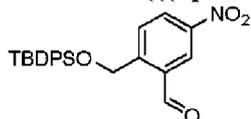
К раствору 6-нитроизобензофуран-1(3H)-она (90 г, 502,43 ммоль, 1,00 экв.) в MeOH (1000 мл) и KOH (28,19 г, 502,43 ммоль, 1,00 экв.) в H₂O (150 мл) добавляют. Коричневую смесь перемешивают при 25°C в течение 1,5 ч. Коричневую смесь концентрируют при пониженном давлении с получением остатка и растворяют в ДХМ (2000 мл). В смесь добавляют TBDPSCl (296,91 г, 1,08 моль, 277,49 мл, 2,15 экв.) и имидазол (171,03 г, 2,51 моль, 5,00 экв.), перемешивают при 25°C в течение 12 ч. Смесь концентрируют при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/этилацетат=1/0, 1/1), и 2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензойную кислоту получают в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ-d₄) δ м.д. 1,13 (с, 9 H) 5,26 (с, 2 H) 7,34-7,48 (м, 6 H) 7,68 (шд, J=8 Гц, 4 H) 8,24 (шд, J=8 Гц, 1 H) 8,46 (шд, J=8 Гц, 1 H) 8,74 (с, 1 H).

Синтез 2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитрофенил)метанола



К смеси 2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензойной кислоты (41 г, 94,14 ммоль, 1 экв.) в ТГФ (205 мл) добавляют NH₃. ТГФ (1 М, 470,68 мл, 5 экв.). Желтую смесь перемешивают при 60°C в течение 2 ч. В смесь добавляют MeOH (400 мл) и концентрируют при пониженном давлении с получением остатка. Затем добавляют H₂O (200 мл) и ДХМ (300 мл), экстрагируют ДХМ (3 × 200 мл), промывают насыщенным раствором соли (300 мл), сушат над безводным MgSO₄, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/этилацетат=1/0, 1/1). 2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитрофенил)метанол получают в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ-d₄) δ м.д. 1,10 (с, 9 H) 4,58 (с, 2 H) 4,89 (с, 2 H) 7,32-7,51 (м, 6 H) 7,68 (дд, J=8, 1,38 Гц, 4 H) 7,76 (д, J=8 Гц, 1 H) 8,15 (дд, J=8 2,26 Гц, 1 H) 8,30 (д, J=2 Гц, 1 H).

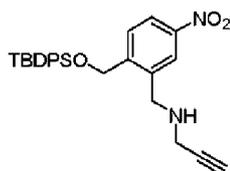
Синтез 2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензальдегида



К раствору 2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитрофенил)метанола (34 г, 80,65 ммоль, 1 экв.) в ДХМ (450 мл) добавляют MnO₂ (56,09 г, 645,22 ммоль, 8 экв.). Черную смесь перемешивают при 25°C в течение 36 ч. В смесь добавляют MeOH (400 мл) и концентрируют при пониженном давлении с получением остатка. Затем добавляют H₂O (200 мл) и ДХМ (300 мл), экстрагируют ДХМ (3 × 200 мл), промывают насыщенным

раствором соли (300 мл), сушат над безводным $MgSO_4$, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищают хроматографией на силикагеле ($CH_2Cl_2=100\%$). 2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензальдегид получают в виде белого твердого вещества. 1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ м.д. 1,14 (с, 9 H) 5,26 (с, 2 H) 7,34-7,53 (м, 6 H) 7,60-7,73 (м, 4 H) 8,13 (д, $J=8$ Гц, 1 H) 8,48 (дд, $J=8, 2,51$ Гц, 1 H) 8,67 (д, $J=2$ Гц, 1 H) 10,16 (с, 1 H).

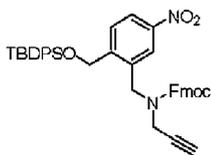
Синтез N-(2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензил)проп-2-ин-1-амин



К раствору 2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензальдегида (12,6 г, 30,03 ммоль, 1 экв.) в ДХМ (130 мл) добавляют проп-2-ин-1-амин (4,14 г, 75,08 ммоль, 4,81 мл, 2,5 экв.) и $MgSO_4$ (36,15 г, 300,33 ммоль, 10 экв.) затем суспензию перемешивают при 25°C в течение 24 ч. Берут немного реакционного раствора и обрабатывают $NaBH_4$, ТСХ показывает образование одной новой точки. Реакционную смесь фильтруют и концентрируют при пониженном давлении с получением остатка. (E)-N-[[2-[[трет-бутил(дифенил)силил]оксиметил]-5-нитро-фенил]метил]проп-2-ин-1-имин получают в виде желтого твердого вещества. 1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ м.д. 1,11 (с, 9 H) 2,48 (т, $J=2,38$ Гц, 1 H) 4,52 (т, $J=2,13$ Гц, 2 H) 5,09 (с, 2 H) 7,35-7,49 (м, 6 H) 7,63-7,72 (м, 4 H) 7,79 (д, $J=8,53$ Гц, 1 H) 8,25 (дд, $J=8,53, 2,51$ Гц, 1 H) 8,68 (д, $J=2,26$ Гц, 1 H) 8,84 (т, $J=1,88$ Гц, 1 H).

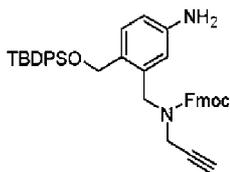
(E)-N-[[2-[[трет-бутил(дифенил)силил]оксиметил]-5-нитро-фенил]метил]проп-2-ин-1-имин (12 г, 26,28 ммоль, 1 экв.) растворяют в MeOH (100 мл) и ТГФ (50 мл), затем добавляют $NaBH_4$ (1,49 г, 39,42 ммоль, 1,5 экв.) и желтую смесь перемешивают при -20°C в течение 2 ч. ЖХМС показывает определение желаемого соединения. Реакционную смесь гасят добавлением MeOH (200 мл) при -20°C и затем концентрируют при пониженном давлении с получением остатка. Остаток растворяют с EtOAc (500 мл), промывают насыщенным раствором соли (150 мл), сушат над безводным Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищают флэш-хроматографией на силикагеле (элюент 0-10% этилацетат/петролейный эфир градиент). N-(2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензил)проп-2-ин-1-амин получают в виде бледно-желтого масла. 1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ м.д. 1,12 (с, 9 H) 2,13 (т, $J=2,38$ Гц, 1 H) 3,33 (д, $J=2,51$ Гц, 2 H) 3,80 (с, 2 H) 4,93 (с, 2 H) 7,36-7,49 (м, 6 H) 7,69 (дд, $J=7,91, 1,38$ Гц, 4 H) 7,77 (д, $J=8,53$ Гц, 1 H) 8,16 (дд, $J=8,41, 2,38$ Гц, 1 H) 8,24 (д, $J=2,26$ Гц, 1 H).

Синтез (9H-флуорен-9-ил)метил (2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамата



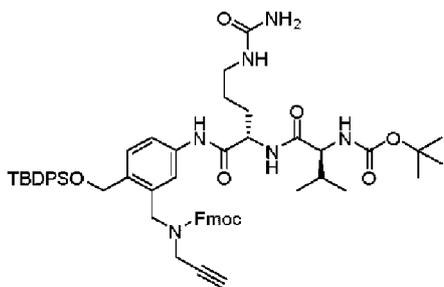
К раствору N-(2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензил)проп-2-ин-1-амина (9 г, 19,62 ммоль, 1 экв.) и FMOC-OSU (7,28 г, 21,59 ммоль, 1,1 экв.) в диоксане (90 мл) добавляют насыщ. NaHCO_3 (90 мл) и белую суспензию перемешивают при 20°C в течение 12 ч. Реакционную смесь разбавляют H_2O (150 мл) и экстрагируют EtOAc (150 мл x 2). Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли (200 мл), сушат над безводным Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищают флэш-хроматографией на силикагеле (элюент 0-30% этилацетат/петролейный эфир). (9H-флуорен-9-ил)метил (2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамат (7,7 г, 11,08 ммоль, 56,48% выход, 98% чистота) получают в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ м.д. 1,12 (с, 9 H) 2,17 (шд, $J=14,31$ Гц, 1 H) 3,87-4,97 (м, 9 H) 6,98-8,28 (м, 21 H).

Синтез (9H-флуорен-9-ил)метил (5-амино-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамата



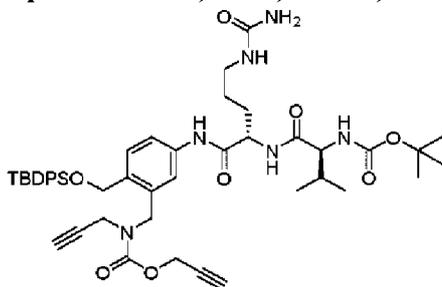
К охлажденному на ледяной бане раствору (9H-флуорен-9-ил)метил (2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамата (5,0 г, 7,34 ммоль, 1,0 экв.) в 10% $\text{AcOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (100 мл) добавляют Zn (7,20 г, 110 ммоль, 15 экв.). Ледяную баню удаляют, и полученную смесь перемешивают в течение 2 часов, в это время ее фильтруют через слой celite®. Летучие вещества удаляют в вакууме и остаток растворяют в EtOAc , промывают NaHCO_3 (насыщ.), NaCl (насыщ.), сушат над MgSO_4 , фильтруют, концентрируют и после ISCO SiO_2 хроматографии (0-75% $\text{EtOAc}/\text{Гептан}$) получают (9H-флуорен-9-ил)метил (5-амино-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамат. ЖХМС: $\text{Mn}^+=651,6$; $\text{Rt}=3,77$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез (9H-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамат



К (9H-флуорен-9-ил)метил (5-амино-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамату (2,99 г, 4,59 ммоль, 1,0 экв.) и (S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентановой кислоты (1,72 г, 4,59 ммоль, 1,0 экв.) в CH_2Cl_2 (40 мл) добавляют этил 2-этоксихинолин-1(2H)-карбоксилат (2,27 г, 9,18 ммоль, 2,0 экв.). После перемешивания в течение 10 мин, добавляют MeOH (1 мл) и раствор становится гомогенным. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч, летучие вещества удаляют в вакууме и после очистки ISCO SiO_2 хроматографией (0-15% MeOH/ CH_2Cl_2) получают (9H-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамат. ЖХМС: $\text{MH}^+=1008,8$; $\text{Rt}=3,77$ мин (5 мин кислый способ).

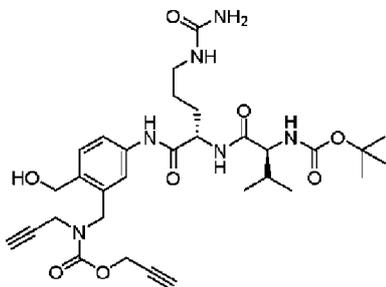
Синтез проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамата



К (9H-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамату (1,60 г, 1,588 ммоль, 1,0 экв.) добавляют 2М диметиламин в MeOH (30 мл, 60 ммоль, 37 экв.) и ТГФ (10 мл). После выстаивания в течение 3 ч, летучие вещества удаляют в вакууме и остаток растирают с Et_2O для удаления побочных продуктов снятия защиты FMOC. К полученному твердому веществу добавляют CH_2Cl_2 (16 мл) и пиридин (4 мл), и к гетерогенному раствору добавляют пропаргил хлорформиат (155 мкл, 1,588 ммоль, 1,0 экв.). После перемешивания в течение 30 минут, добавляют дополнительный пропаргил хлорформиат (155 мкл, 1,588 ммоль, 1,0 экв.). После перемешивания в течение еще 20 мин, MeOH (1 мл) добавляют для гашения оставшегося хлорформиата, и летучие вещества удаляют в вакууме. При очистке ISCO SiO_2 хроматографией (0-15% MeOH/ CH_2Cl_2) получают проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-

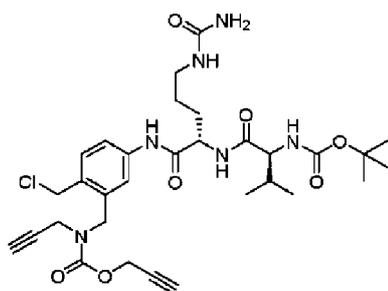
бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамат. ЖХМС: $MH^+=867,8$; $Rt=3,40$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(гидроксиметил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамата



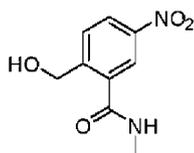
К раствору проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамата (984 мг, 1,135 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (7,5 мл) добавляют 1,0 М фторид тетрабутиламмония в ТГФ (2,27 мл, 2,27 ммоль, 2,0 экв.). После выстаивания в течение 6 ч, летучие вещества удаляют в вакууме, остаток очищают ИСКО SiO_2 хроматографией (0-40% $MeOH/CH_2Cl_2$) и получают проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(гидроксиметил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамат. ЖХМС: $MH^+=629,6$; $Rt=1,74$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(хлорметил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамата



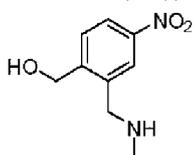
К проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(гидроксиметил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамату (205 мг, 0,326 ммоль, 1,0 экв.) в CH_2Cl_2 (10 мл) добавляют пиридин (158 мкл, 1,96 ммоль, 5 экв.). Гетерогенную смесь охлаждают на $0^\circ C$ ледяной бане и тионилхлорид (71 мкл, 0,98 ммоль, 3 экв.). После перемешивания на ледяной бане в течение 3 часов, реакционную смесь прямо очищают ИСКО SiO_2 хроматографией (0-30% $MeOH/CH_2Cl_2$) и получают проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(хлорметил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамат. ЖХМС: $MH^+=647,6$; $Rt=2,54$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 2-(гидроксиметил)-N-метил-5-нитробензамида



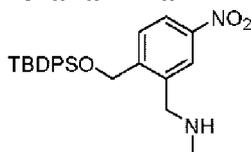
К перемешиваемой суспензии 6-нитроизобензофуран-1(3H)-она (500 г, 2,79 моль) в MeOH (1500 мл) добавляют MeNH₂ (3,00 кг, 29,94 моль, 600 мл, 31,0% чистота) при 25°C и перемешивают в течение 1 ч. Твердое вещество фильтруют и промывают водой дважды (600 мл) и сушат в высоком вакууме с получением остатка. Продукт 2-(гидроксиметил)-N-метил-5-нитробензамида получают в виде белого твердого вещества. ЖХМС: Rt=0,537 мин, MS m/z=193,2. ¹H ЯМР: 400 МГц ДМСО δ 8,57 (шд, J=4,4 Гц, 1H), 8,31 (дд, J=2,4, 8,6 Гц, 1H), 8,21 (д, J=2,4 Гц, 1H), 7,86 (д, J=8,8 Гц, 1H), 5,54 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,72 (д, J=5,5 Гц, 2H), 2,78 (д, J=4,4 Гц, 3H).

Синтез 2-((метиламино)метил)-4-нитрофенил)метанола



К раствору 2-(гидроксиметил)-N-метил-5-нитробензамида (560 г, 2,66 моль) в ТГФ (5000 мл) охлаждают до 0°C, затем добавляют ВН₃-Ме₂S (506 г, 6,66 моль) (2,0 М в ТГФ) по каплям в течение 60 мин и нагревают до 70°C в течение 5 ч. ЖХМС показала потребление исходного материала. После завершения, 4М НСl (1200 мл) в метаноле добавляют в реакционную смесь при 0°C и нагревают при 65°C в течение 8 ч. Реакционную смесь охлаждают до 0°C, твердое вещество фильтруют и концентрируют при пониженном давлении. Продукт 2-((метиламино)метил)-4-нитрофенил)метанол (520 г) получают в виде белого твердого вещества. ЖХМС: Rt=0,742 мин, MS m/z=197,1 [M+H]⁺. ¹H ЯМР: 400 МГц ДМСО δ 9,25 (шс, 2H), 8,37 (д, J=2,4 Гц, 1H), 8,14 (дд, J=2,4, 8,5 Гц, 1H), 7,63 (д, J=8,4 Гц, 1H), 5,72 (шс, 1H), 4,65 (с, 2H), 4,15 (шс, 2H), 2,55-2,45 (м, 3H).

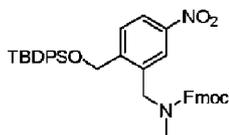
Синтез 1-(2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитрофенил)-N-метилметанамина



К раствору 2-((метиламино)метил)-4-нитрофенил)метанола (520 г, 2,65 моль) и имидазола (721 г, 10,6 моль) в ДХМ (2600 мл), охлажденному до 0°C добавляют TBDPS-Cl (1,09 кг, 3,98 моль, 1,02 л) по каплям и перемешивают в течение 2 ч. Смесь выливают в ледяную воду (1000 мл) и экстрагируют этилацетатом. Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли, сушат над Na₂SO₄, фильтруют и выпаривают под вакуумом с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле, элюируя этилацетатом:петролейный эфир (от 10/1 до 1) с получением остатка. Продукт 1-(2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-

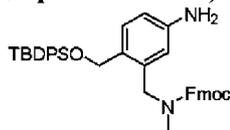
нитрофенил)-N-метилметанамином получают в виде желтой жидкости. ЖХМС: продукт: Rt=0,910 мин, МС m/z=435,2 [M+H]⁺. ¹H ЯМР: 400 МГц CDCl₃ δ 8,23 (д, J=2,4 Гц, 1H), 8,15 (дд, J=2,4, 8,4 Гц, 1H), 7,76 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,71-7,66 (м, 4H), 7,50-7,37 (м, 6H), 4,88 (с, 2H), 3,65 (с, 2H), 2,39 (с, 3H), 1,12 (с, 9H).

Синтез (9H-флуорен-9-ил)метил (2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензил)(метил)карбамат



К раствору 1-(2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитрофенил)-N-метилметанамина (400 г, 920,3 ммоль) в ТГФ (4000 мл) добавляют FMOC-OSU (341,5 г, 1,01 моль) и Et₃N (186,2 г, 1,84 моль, 256,2 мл). Смесь перемешивают при 25°C в течение 1 ч. Смесь выливают в воду (1600 мл) и экстрагируют этилацетатом (1000 мл x 2). Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли, сушат над Na₂SO₄, фильтруют и выпаривают под вакуумом с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищают хроматографией на силикагеле, элюируя петролейным эфиром:этилацетатом (от 1/0 до 1/1) с получением (9H-флуорен-9-ил)метил (2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензил)(метил)карбамата в виде белого твердого вещества. ЖХМС: Rt=0,931 мин, МС m/z=657,2 [M+H]⁺. ¹H ЯМР: EW16000-26-P1A, 400 МГц CDCl₃ δ 8,21-7,96 (м, 1H), 7,87-7,68 (м, 3H), 7,68-7,62 (м, 4H), 7,62-7,47 (м, 2H), 7,47-7,28 (м, 9H), 7,26-7,05 (м, 2H), 4,81 (шс, 1H), 4,62-4,37 (м, 4H), 4,31-4,19 (м, 1H), 4,08-3,95 (м, 1H), 2,87 (шд, J=5,2 Гц, 3H), 1,12 (с, 9H).

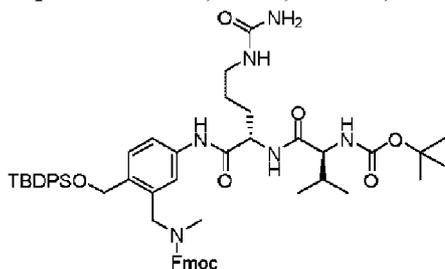
Синтез (9H-флуорен-9-ил)метил (5-амино-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(метил)карбамата



Раствор (9H-флуорен-9-ил)метил (2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)-5-нитробензил)(метил)карбамата (3,0 г, 4,57 ммоль, 1,0 экв.) в MeOH (90 мл) и EtOAc (30 мл) дегазируют и продувают баллоном N₂ через трехходовой запорный кран. После повторения дегазации/продувания N₂ 2х, добавляют 10% Pd/C тип deGussa (0,486 г, 0,457 ммоль, 0,1 экв.). Полученную смесь дегазируют и продувают баллоном 2 H₂ через трехходовой запорный кран. После повторения дегазации/продувания H₂ 2х, реакцию перемешивают под давлением баллона H₂ в течение 4 часов. Реакционную смесь дегазируют и продувают N₂, фильтруют через слой целита, дополнительно элюируя MeOH. После удаления летучих веществ в вакууме и прокачивания в высоком вакууме получают (9H-флуорен-9-ил)метил (5-амино-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(метил)карбамат. ЖХМС: MH⁺=627,7; Rt=1,59 мин (2 мин кислый способ).

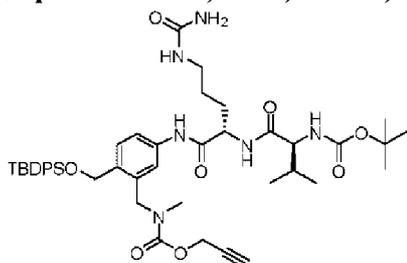
Синтез (9H-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-

бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(метил)карбамата



К (9H-флуорен-9-ил)метил (5-амино-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(метил)карбамату (2,86 г, 4,56 ммоль, 1,0 экв.) и (S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентановой кислоте (1,71 г, 4,56 ммоль, 1,0 экв.) в 2:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (60 мл) добавляют этил 2-этоксихинолин-1(2H)-карбоксилат (2,256 г, 9,12 ммоль, 2,0 экв.). Гомогенный раствор перемешивают в течение 16 часов, в это время добавляют дополнительную (S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентановую кислоту (0,340 г, 0,2 экв.) и этил 2-этоксихинолин-1(2H)-карбоксилат (0,452 г, 0,4 экв.) для завершения реакции. После перемешивания в течение дополнительных 5 часов летучие вещества удаляют в вакууме, и после очистка ISCO SiO_2 хроматографией (0-5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) получают (9H-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(метил)карбамат. ЖХМС: $\text{MH}^+ = 984,1$; $R_t = 1,54$ мин (2 мин кислый способ).

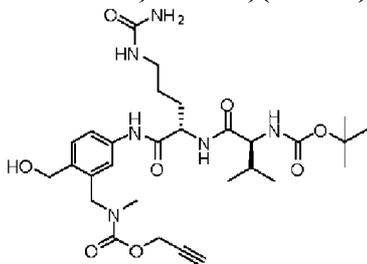
Синтез проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(метил)карбамата



К (9H-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(метил)карбамату (2,05 г, 2,085 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (10 мл) добавляют 2,0 М диметил амин в MeOH (10,42 мл, 20,85 ммоль, 10 экв.). После перемешивания в течение 16 часов летучие вещества удаляют в вакууме. Остаток растворяют в CH_2Cl_2 (20 мл) и ДИЭА (0,533 мл, 4,17 ммоль, 2 экв.) и добавляют пропаргил хлорформат (0,264 мл, 2,71 ммоль, 1,3 экв.). После перемешивания при кт в течение 16 часов реакционную смесь разбавляют CH_2Cl_2 (20 мл), промывают NaHCO_3 (насыщ.), NaCl (насыщ.), сушат над MgSO_4 , фильтруют, концентрируют и очищают ISCO SiO_2 хроматографией (0-15% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) с получением проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-

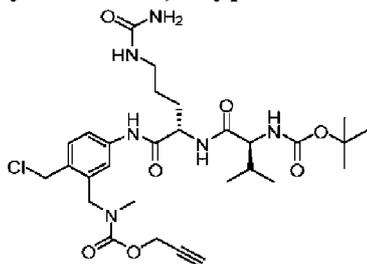
((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(метил)карбамата. ЖХМС: $MH^+=843,8$; $Rt=1,35$ мин (2 мин кислый способ).

Синтез проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(гидроксиметил)бензил)(метил)карбамата



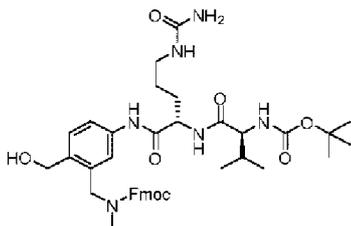
К 0°C раствору проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((трет-бутилдифенилсилил)окси)метил)бензил)(метил)карбамата (1,6 г, 1,90 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (10,0 мл) добавляют 1,0 М фторид тетрабутиламмония в ТГФ (3,80 мл, 3,80 ммоль, 2,0 экв.). После нагревания до комнатной температуры и перемешивания в течение 16 ч, летучие вещества удаляют в вакууме, остаток растворяют в EtOAc, промывают $NaHCO_3$ (насыщ.), $NaCl$ (насыщ.), сушат над $MgSO_4$, фильтруют, концентрируют и остаток очищают ISCO SiO_2 хроматографией (0-30% $MeOH/CH_2Cl_2$) с получением проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(гидроксиметил)бензил)(метил)карбамата. ЖХМС: $MH^+=605,7$; $Rt=0,81$ мин (2 мин кислый способ).

Синтез проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(хлорметил)бензил)(метил)карбамата



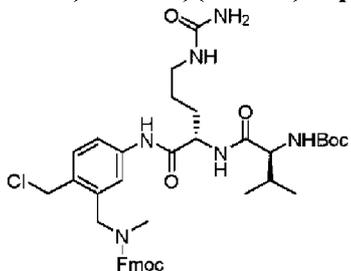
К проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(гидроксиметил)бензил)(метил)карбамату (350 мг, 0,579 ммоль, 1,0 экв.) в CH_2Cl_2 (10 мл) добавляют пиридин (0,278 мл, 3,47 ммоль, 6 экв.). Гетерогенную смесь охлаждают на 0°C ледяной бане и тионилхлориде (0,126 мл, 1,73 ммоль, 3 экв.). После перемешивания на ледяной бане в течение 3 ч, реакционную смесь очищают ISCO SiO_2 хроматографией (0-30% $MeOH/CH_2Cl_2$) и получают проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(хлорметил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамат. ЖХМС: $MH^+=623,7$; $Rt=2,19$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез (9Н-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(гидроксиметил)бензил)(метил)карбамата



К (9Н-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((трет-бутилдифенилсилил)окси)метилбензил)(метил)карбамату (2,6 г, 2,64 ммоль, 1,0 экв.), растворенному в ТГФ (20 мл), добавляют уксусную кислоту (0,757 мл, 13,22 ммоль, 5,0 экв.) и 1,0 М ТВАФ в ТГФ (2,91 мл, 2,91 ммоль, 1,1 экв.). Раствор перемешивают в течение 72 часов, в это время летучие вещества удаляют в вакууме. После очистки ISCO SiO₂ хроматографией (0-30% MeOH/CH₂Cl₂) получают (9Н-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(гидроксиметил)бензил)(метил)карбамат. ЖХМС: МН⁺=745,5; R_t=1,07 мин (2 мин кислый способ).

Синтез (9Н-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(хлорметил)бензил)(метил)карбамата

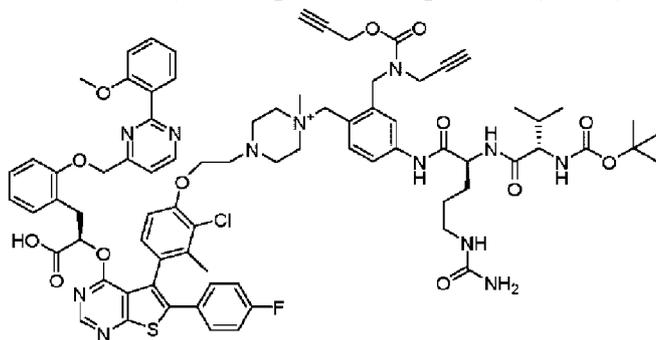


К (9Н-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(гидроксиметил)бензил)(метил)карбамату (200 мг, 0,269 ммоль, 1,0 экв.) в CH₂Cl₂ (10 мл) добавляют пиридин (0,130 мл, 1,61 ммоль, 6 экв.). Гетерогенную смесь охлаждают на 0°С ледяной бане и тионилхлориде (0,059 мл, 0,806 ммоль, 3 экв.). После быстрого перемешивания на ледяной бане, реакционную смесь перемешивают при нагревании до комнатной температуры в течение 2 часов. Реакционную смесь очищают ISCO SiO₂ хроматографией (0-30% MeOH/CH₂Cl₂) и получают (9Н-флуорен-9-ил)метил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(хлорметил)бензил)(метил)карбамат. ЖХМС: МН⁺=763,2; R_t=1,18 мин (2 мин кислый способ).

ОБЩАЯ МЕТОДИКА 1

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-ил((проп-2-ин-1-

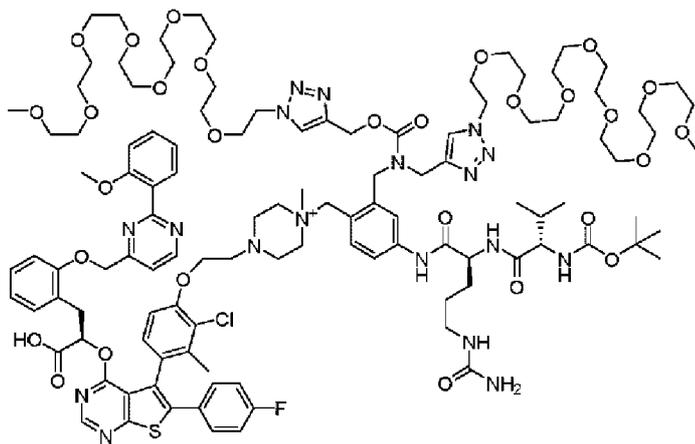
илокси)карбонил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



К (R)-2-((5-(3-хлор-2-метил-4-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси)фенил)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)пропановой кислоты гидрохлориду (73,8 мг, 0,81 ммоль, 1,0 экв.) и проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(хлорметил)бензил)(проп-2-ин-1-ил)карбамату (78 мг, 0,122 ммоль, 1,5 экв.) растворяют в ДМФ (0,5 мл) добавляют ДИЭА (70 мкл, 0,405 ммоль, 5,0 экв.), затем йодид тетрабутиламмония (25,4 мг, 0,069 ммоль, 0,85 экв.). После перемешивания в течение 5 ч, реакционную смесь разбавляют ДМСО (3 мл) и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% NH₄OH модификатор). После лиофилизации, получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-ил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. ЖХМС: M⁺=1486,3; Rt=2,70 мин (5 мин щелочной способ).

ОБЩАЯ МЕТОДИКА 2

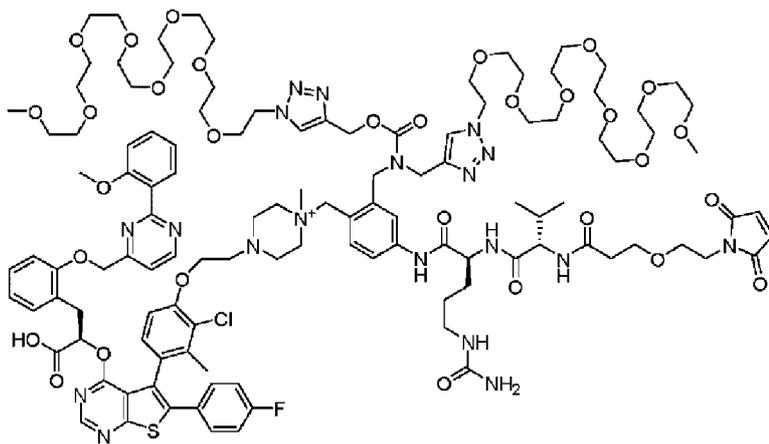
Синтез 1-(2-((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



К 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-ил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (24 мг, 0,016 ммоль, 1,0 экв.) и 25-азидо-2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозану (26,5 мг, 0,065 ммоль, 4 экв.) добавляют t-BuOH (1 мл). Смесь дегазируют в комнатном вакууме и продувают баллоном N₂ через 3-ходовой запорный кран. Дегазацию/продувание повторяют 3 раза. Добавляют 16 мг/мл водный раствор аскорбата натрия (297 мкл, 0,024 ммоль, 1,5 экв.) и раствор дегазируют и продувают N₂ три раза. Добавляют 4 мг/мл водный раствор сульфата меди (298 мкл, 0,0048 ммоль, 0,3 экв.) и раствор дегазируют и продувают N₂ три раза. После перемешивания под N₂ в течение 3 ч, реакционную смесь разбавляют ДМСО (3 мл) и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации получают 1-(2-((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР M⁺=2307,0730, Rt=2,69 мин (5 мин кислый способ).

ОБЩАЯ МЕТОДИКА 3

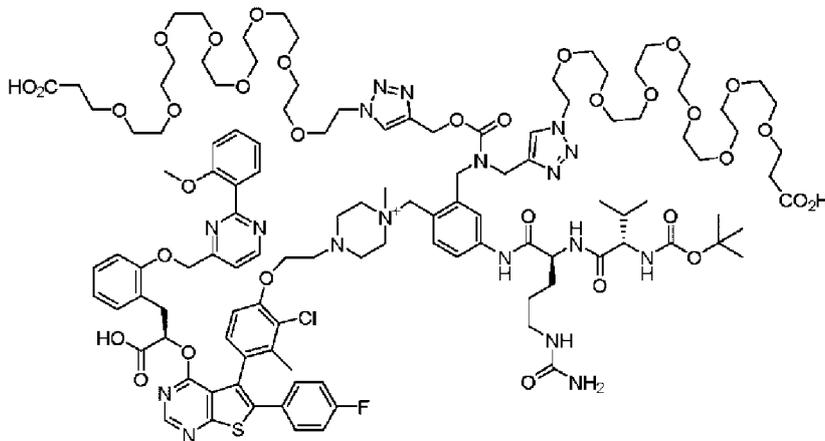
Синтез 1-(2-((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (L1-P1)



К 1-(2-((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (19 мг, 0,0082 ммоль, 1,0 экв.) добавляют 25% ТФК/CH₂Cl₂ (2 мл). После выстаивания в течение 45 мин, летучие вещества удаляют в вакууме, добавляют CH₂Cl₂ и летучие вещества удаляют в вакууме и откачивают. Остаток растворяют в ДМФ (1 мл) и добавляют ДИЭА (22 мкл, 0,124 ммоль, 15 экв.) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропаноат (5,1 мг, 0,016 ммоль, 2 экв.). После выстаивания в течение 18 ч, раствор разбавляют ДМСО (3 мл) и очищают RP-ISCO gold хроматографией. После лиофилизации, получают 1-(2-((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий (**L1-P1**). МСВР: M⁺=2399,0797, Rt=2,43 мин (5 мин кислотный прогон). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ м.д. 0,83 (дд, J=13,82, 6,72 Гц, 6 H) 1,30-1,52 (м, 2 H) 1,55-1,76 (м, 2 H) 1,83 (с, 3 H) 1,88-2,08 (м, 1 H) 2,28-2,46 (м, 7 H) 2,73-2,84 (м, 4 H) 2,84-3,08 (м, 8 H) 3,15-3,27 (м, 3 H) 3,43-3,66 (м, 68 H) 3,73-3,83 (м, 7 H) 4,16-4,30 (м, 3 H) 4,32-4,43 (м, 2 H) 4,47 (шс, 6 H) 4,60 (шс, 3 H) 5,16-5,30 (м, 3 H) 5,40 (шс, 2 H) 5,44-5,52 (м, 1 H) 5,99 (шт, J=5,07 Гц, 1 H) 6,21 (д, J=6,48 Гц, 1 H) 6,71 (т, J=7,40 Гц, 1 H) 6,97-7,04 (м, 2 H), 7,00 (с, 2H) 7,12-7,23 (м, 5 H) 7,27-7,54 (м, 8 H) 7,63 (д, J=5,14 Гц, 1 H) 7,78-7,94 (м, 3 H) 7,99 (шс, 1 H) 8,05-8,23 (м, 2 H) 8,60 (с, 1 H) 8,88 (д, J=5,13 Гц, 1 H) 10,24 (шс, 1 H).

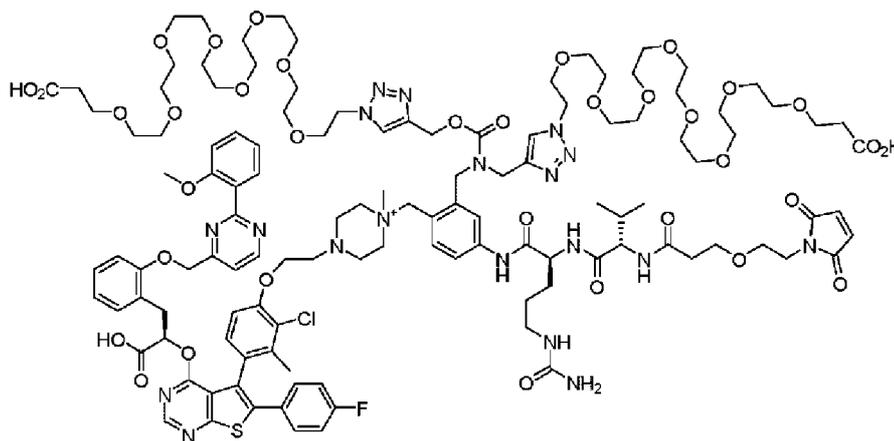
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-

октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



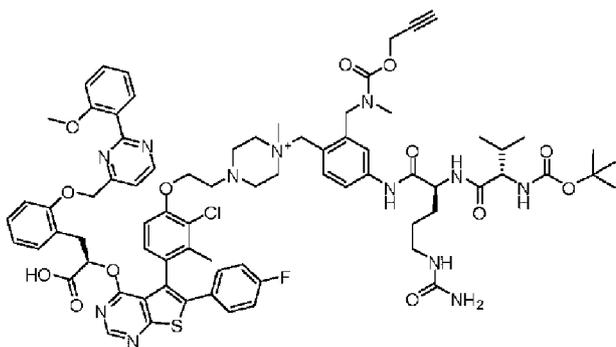
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-ил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (30 мг, 0,020 ммоль, 1,0 экв.) и 1-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозан-27-овой кислотой (28,3 мг, 0,061 ммоль, 3 экв.), получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: М+=2420,0867, Rt=2,57 мин (5 мин кислый способ).

ПРИМЕР 2: Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-((((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L10-P1)



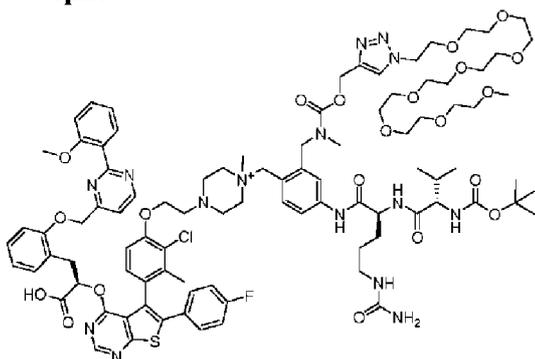
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((((1-(26-карбоксо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)((1-(26-карбоксо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (30 мг, 0,012 ммоль, 1,0 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-((((1-(26-карбоксо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)((1-(26-карбоксо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий (**L10-P1**). МСВР: $M^+ = 2515,0879$, $R_t = 2,43$ мин (5 мин кислый способ). ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO-}d_6$) δ м.д. 0,83 (дд, $J = 13,82, 6,72$ Гц, 6 H) 1,30-1,52 (м, 2 H) 1,55-1,76 (м, 2 H) 1,83 (с, 3 H) 1,88-2,08 (м, 1 H) 2,28-2,46 (м, 7 H) 2,73-2,84 (м, 4 H) 2,84-3,08 (м, 8 H) 3,15-3,27 (м, 3 H) 3,43-3,66 (м, 68 H) 3,73-3,83 (м, 7 H) 4,16-4,30 (м, 3 H) 4,32-4,43 (м, 2 H) 4,47 (шс, 6 H) 4,60 (шс, 3 H) 5,16-5,30 (м, 3 H) 5,40 (шс, 2 H) 5,44-5,52 (м, 1 H) 5,99 (шт, $J = 5,07$ Гц, 1 H) 6,21 (д, $J = 6,48$ Гц, 1 H) 6,71 (т, $J = 7,40$ Гц, 1 H) 6,97-7,04 (м, 2 H), 7,00 (с, 2H) 7,12-7,23 (м, 5 H) 7,27-7,54 (м, 8 H) 7,63 (д, $J = 5,14$ Гц, 1 H) 7,78-7,94 (м, 3 H) 7,99 (шс, 1 H) 8,05-8,23 (м, 2 H) 8,60 (с, 1 H) 8,88 (д, $J = 5,13$ Гц, 1 H) 10,24 (шс, 1 H).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 1 с (R)-2-((5-(3-хлор-2-метил-4-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси)фенил)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)пропановой кислоты гидрохлоридом (300 мг, 0,329 ммоль, 1,0 экв.) и проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(хлорметил)бензил)(метил)карбаматом (246 мг, 0,395 ммоль, 1,2 экв.), получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1461,5800$, $R_t = 2,53$ мин (5 мин кислый способ).

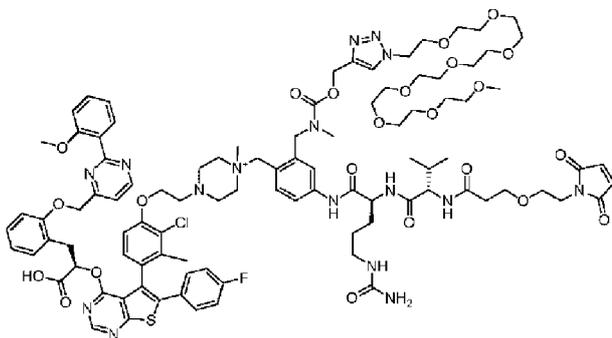
Синтез 1-(2-((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2 с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (20 мг, 0,14 ммоль, 1,0 экв.) и 25-азидо-2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозаном (16,8 мг, 0,041 ммоль, 3,0 экв.), получают 1-(2-((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-

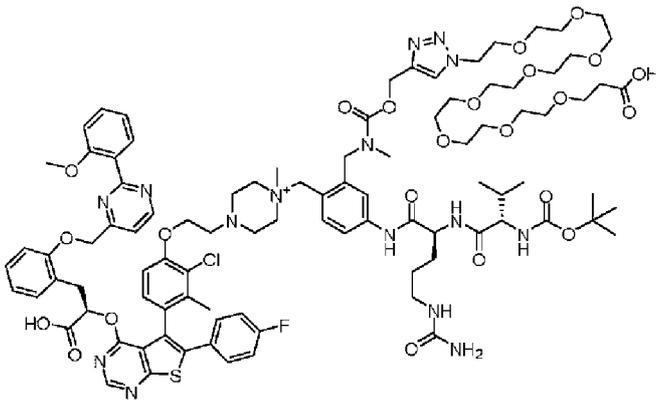
1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1872,8359$, $R_t = 2,56$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(2-((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (L4-P1)



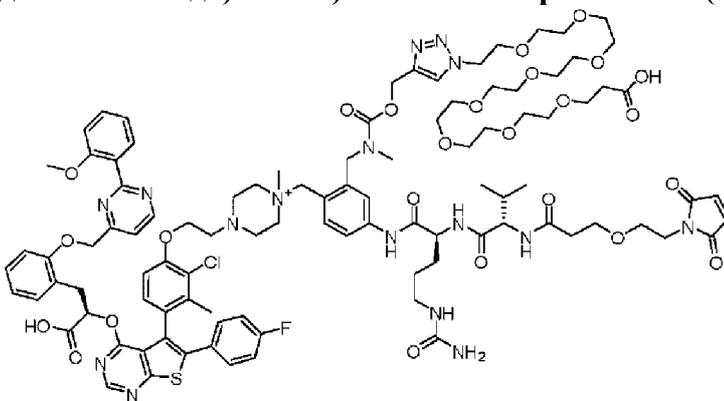
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ** 3 с 1-(2-((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (16,9 мг, 0,009 ммоль, 1,0 экв.), получают 1-(2-((((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий (L4-P1). МСВР: $M^+ = 1967,8375$, $R_t = 2,46$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокс)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (12 мг, 0,0082 ммоль, 1,0 экв.) и 1-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозан-27-овой кислотой (11,5 мг, 0,025 ммоль, 3,0 экв.), получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокс)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1928,8459$, $R_t = 2,52$ мин (5 мин кислый способ).

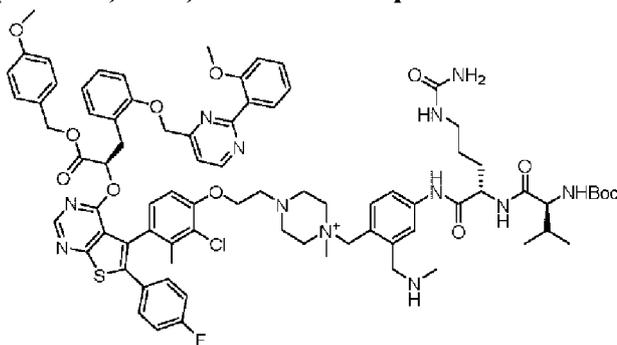
Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокс)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-((((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокс)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L3-P1)



Следуя **общей методике 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-

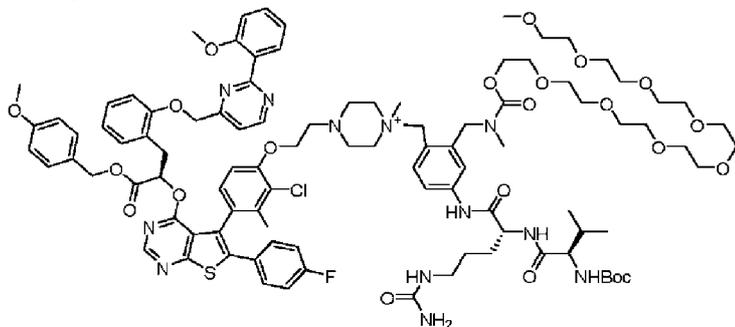
ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокситетрагидро-2H-пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокситиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий (12 мг, 0,006 ммоль, 1,00 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокситетрагидро-2H-пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокситиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((1-(26-карбокситетрагидро-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокситиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий (**L3-P1**). МСВР: $M^+=2024,8516$, $R_t=2,42$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий



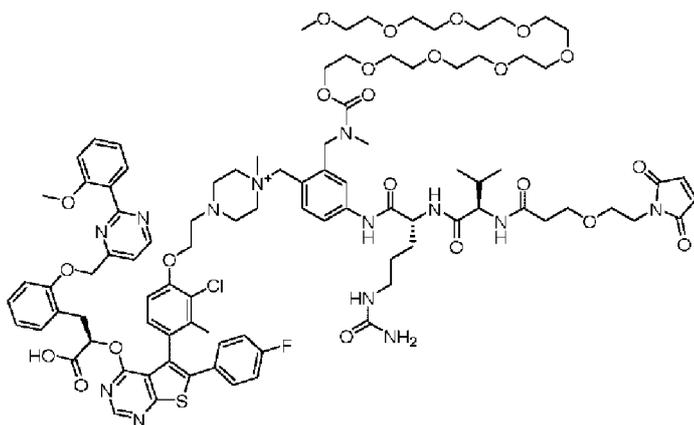
К 4-метоксибензил (R)-2-((5-(3-хлор-2-метил-4-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокситиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)пропаноату (160 мг, 0,161 ммоль, 1,0 экв.) и (9H-флуорен-9-ил)метил(5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(хлорметил)бензил)(метил)карбамату (153 мг, 0,201 ммоль, 1,25 экв.), растворенному в ДМФ (2 мл), добавляют ДИЭА (0,056 мл, 0,321 ммоль, 2,0 экв.) затем йодид тетрабутиламмония (65,3 мг, 0,177 ммоль, 1,1 экв.). После выстаивания в течение 16 ч, добавляют 2,0 диметиламин в ТГФ (0,804 мл, 1,67 ммоль, 10 экв.). После выстаивания в течение 2 ч, летучие вещества удаляют в вакууме, добавляют ДМСО (6 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+=1499,3700$; $R_t=2,59$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((R)-2-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2-метил-3-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28-нонаокса-2-азанокозил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



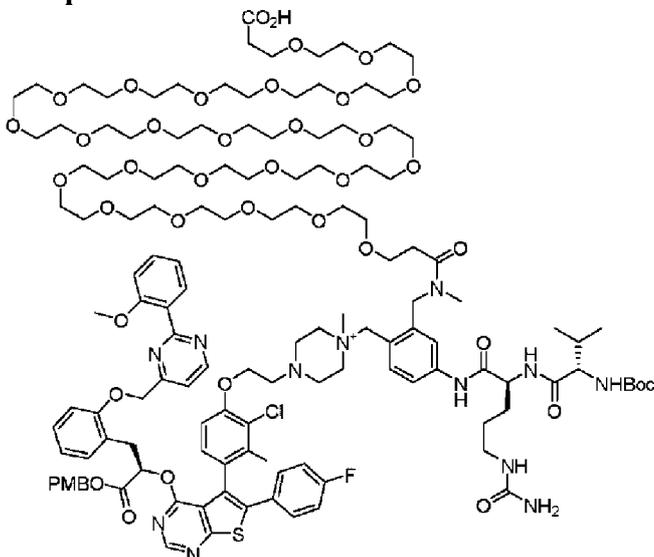
К 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (40 мг, 0,027 ммоль, 1,0 экв.) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил (2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил) карбонату (30,8 мг, 0,059 ммоль, 2,2 экв.), растворенным в ДМФ (1,5 мл), добавляют ДИЭА (0,009 мл, 0,053 ммоль, 2,0 экв.). После выстаивания в течение 1 часа, добавляют ДМСО (3 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации получают 1-(4-((R)-2-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2-метил-3-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28-нонаокса-2-азанокозил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: М⁺=1909,3800; R_t=2,92 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((R)-2-((R)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2-метил-3-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28-нонаокса-2-азанокозил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L2-P1)



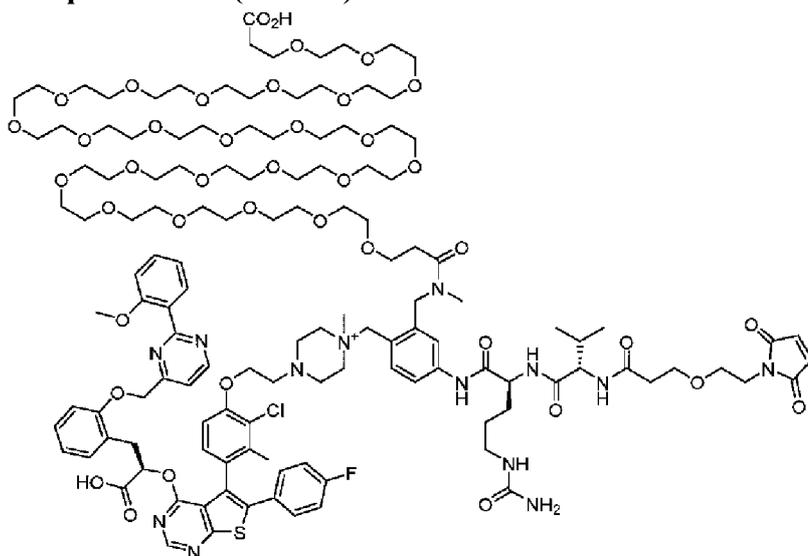
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((R)-2-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2-метил-3-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28-нонаокса-2-азанонакозил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (25,3 мг, 0,013 ммоль, 1,0 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((R)-2-((R)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2-метил-3-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28-нонаокса-2-азанонакозил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий (**L2-P1**). МСВР: $M^+ = 1884,7900$, $R_t = 2,50$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(80-карбоксо-2-метил-3-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-пентакозаокса-2-азаоктаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



К 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (150 мг, 0,093 ммоль, 1,0 экв.) и 79-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-79-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаоксанагептаконтановой кислоте (134 мг, 0,102 ммоль, 1,1 экв.) растворяют в ДМФ (2 мл) добавляют ДИЭА (0,081 мл, 0,464 ммоль, 5,0 экв.). После выстаивания в течение 18 ч, ДМСО (6 мл) добавляют и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(80-карбокси-2-метил-3-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-пентакозаокса-2-азаоктаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺=2700,8701; Rt=2,83 мин (5 мин кислый способ).

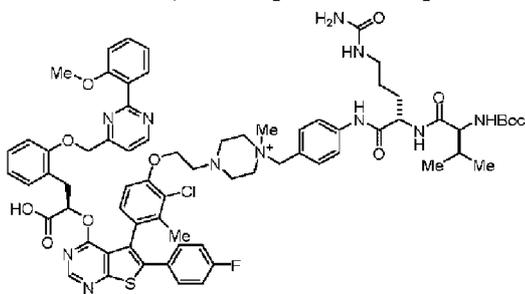
Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(80-карбокси-2-метил-3-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-пентакозаокса-2-азаоктаконтил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L11-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(80-карбокси-2-метил-3-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-

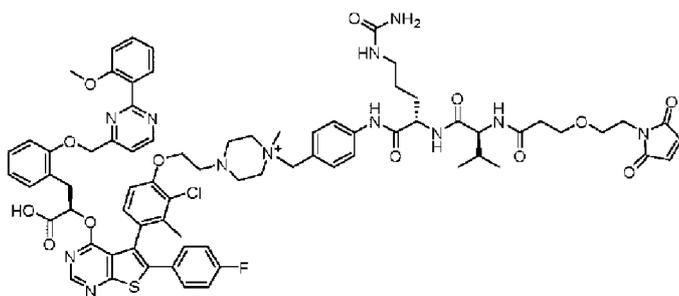
пентакозаокса-2-азаоктаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием, получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(80-карбоксо-2-метил-3-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-пентакозаокса-2-азаоктаконтил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий (L11-P1). МСВР: M⁺=2674,8201, Rt=2,44 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



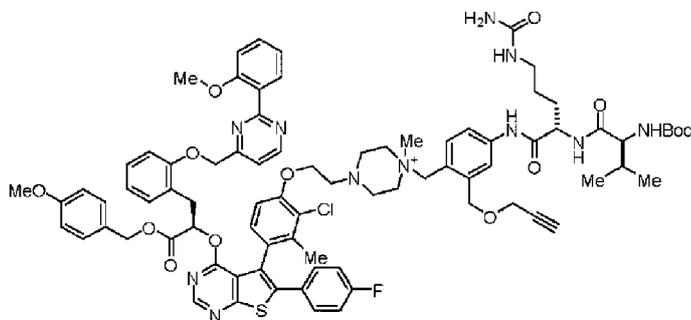
Следуя ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 1 с (R)-2-((5-(3-хлор-2-метил-4-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси)фенил)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)пропановой кислотой (50 мг, 0,057 ммоль, 1,0 экв.) и трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((4-(хлорметил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбаматом (34,1 мг, 0,069 ммоль, 1,2 экв.), получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. ЖХМС: M⁺=1337,2, Rt=1,11 мин (2 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия или (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-4-[2-[4-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[3-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этокси]пропаноиламино]-3-метил-бутаноил]амино]-5-уреидопентаноил]амино]фенил]метил]-4-метил-пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]-2-метил-фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (L9-P1)



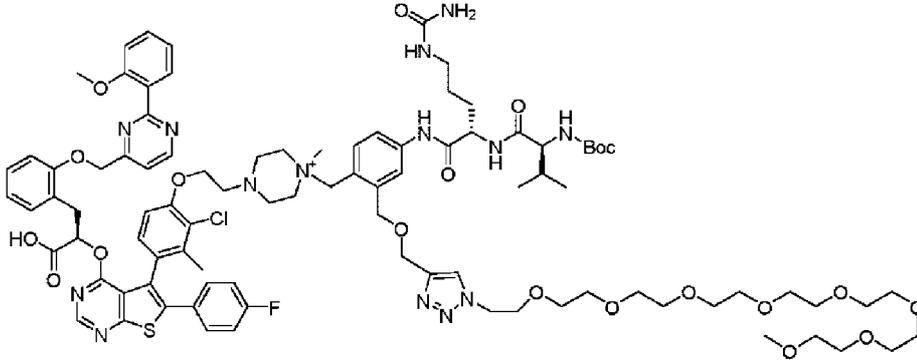
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (55 мг, 0,041 ммоль, 1,0 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий (**L9-P1**). МСВР: $M^+ = 1431,5400$, $R_t = 2,50$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



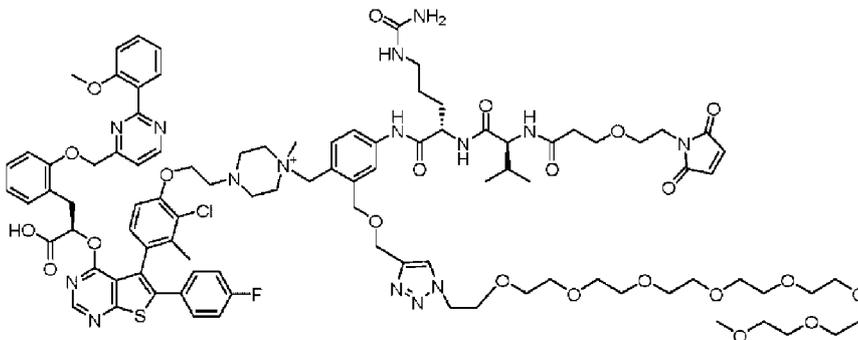
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 1** с 4-метоксибензил (R)-2-((5-(3-хлор-2-метил-4-(2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксид)фенил)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)пропаноатом (85 мг, 0,085 ммоль, 1,0 экв.) и трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((4-хлорметил)-3-((проп-2-ин-1-илокси)метил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбаматом (58 мг, 0,102 ммоль, 1,2 экв.), получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1524,6200$, $R_t = 2,95$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2 с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (20 мг, 0,014 ммоль, 1,0 экв.) и 25-азидо-2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозаном (5,8 мг, 0,014 ммоль, 1 экв.), получают 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. ЖХМС: [(M⁺)+H⁺]+2/2=908,5, Rt=1,15 мин (2 мин кислый способ).

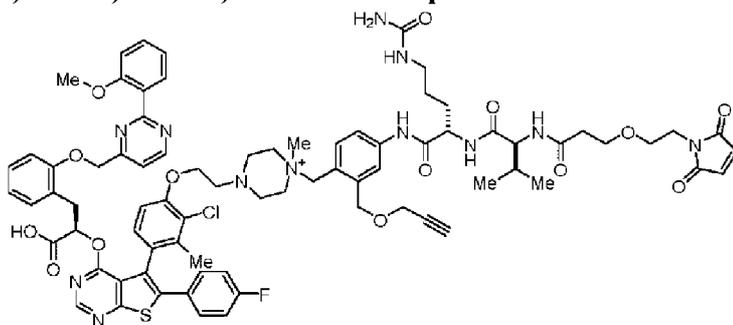
Синтез 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (L8-P1)



Следуя ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3 с 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-

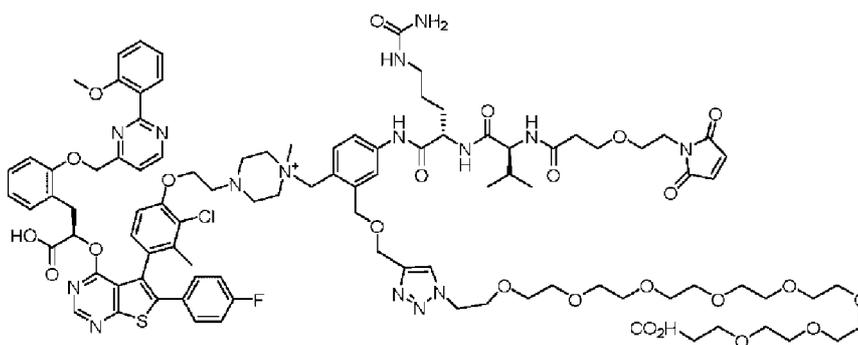
бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (20 мг, 0,010 ммоль, 1,0 экв.), получают 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий (**L8-P1**). МСВР: M^+ = 1908,8097, R_t = 2,37 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (123,1 мг, 0,075 ммоль, 1,0 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M^+ = 1499,5601, R_t = 2,50 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((1-(26-карбокси-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L7-P1**)**

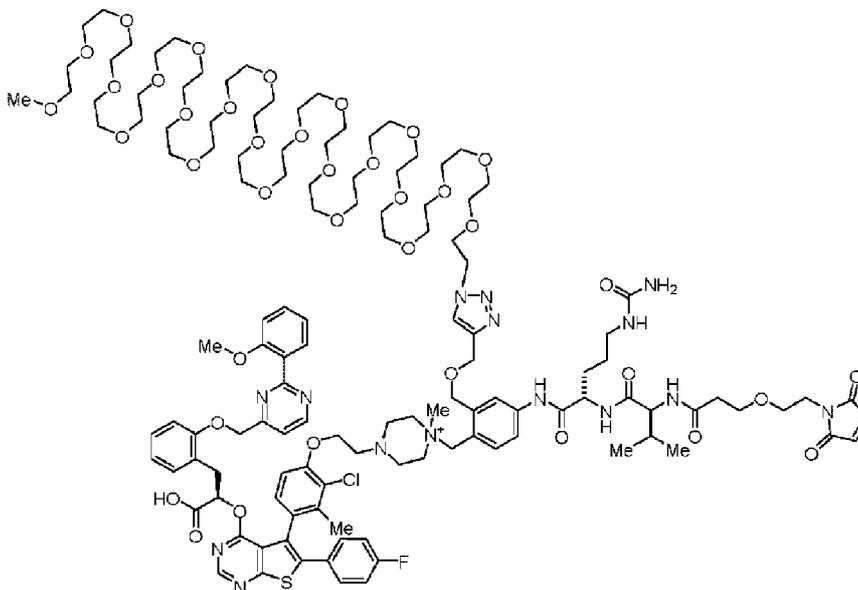


Следуя ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2 с 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксипропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ием (40 мг, 0,027 ммоль, 1,0 экв.) и 1-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозан-27-овой кислотой (37,4 мг, 0,080 ммоль, 3,0 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксипропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий (L7-P1). МСВР: $M^+ = 1965,5601$, $R_t = 2,35$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез

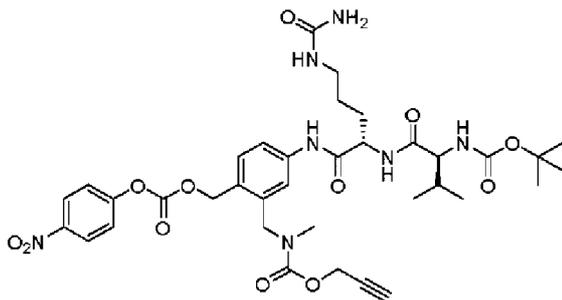
1-(2-(((1-

(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетраоксаоксатригептаконтан-73-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксипропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксипропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий (L5-P1)



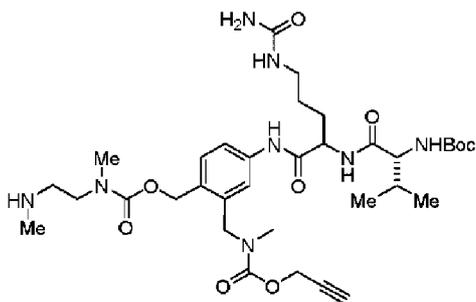
Следуя ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2 с 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ием (20,4 мг, 0,014 ммоль, 1,0 экв.) и 73-азидо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаоксатригептаконтаном (28,1 мг, 0,025 ммоль, 1,5 экв.), получают 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаоксатригептаконтан-73-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий (L5-P1). МСВР: $M^+ = 2613,2100$, $R_t = 2,44$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)метил)бензил(метил)карбамата



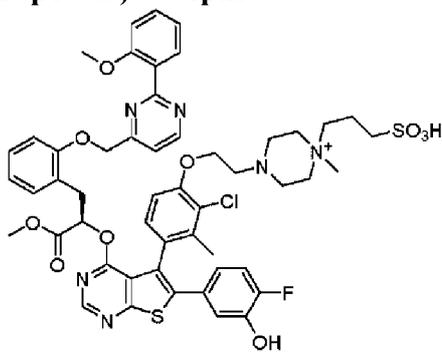
Раствор проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(гидроксиметил)бензил(метил)карбамата (249 мг, 0,412 ммоль) и 4-нитрофенил (4-нитрософенил) карбоната (356 мг, 1,24 ммоль, 3,0 экв.) в ДМФ (2 мл) перемешивают до гомогенности и выдерживают в течение 16 часов. Раствор разбавляют ДМСО (6 мл) и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, без модификатора). После лиофилизации, получают проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)метил)бензил(метил)карбамат. ЖХ/МС $M^+ = 770,7$, $R_t = 2,45$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез проп-2-ин-1-ил (5-((R)-2-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)бензил(метил)карбамата



К раствору проп-2-ин-1-ил (5-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)метил)бензил)(метил)карбамата (100 мг, 0,130 ммоль) в ДМФ (1 мл) добавляют N,N'-диметил-этилендиамин (22,90 мг, 0,260 ммоль), затем добавляют ДИПЭА (0,113 мл, 0,650 ммоль) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют ДМСО, очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% NH₄OH модификатор). После лиофилизации получают проп-2-ин-1-ил (5-((R)-2-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)бензил)(метил)карбамат. ЖХМС: МН⁺=719,9, R_t=0,73 мин (2 мин кислый способ).

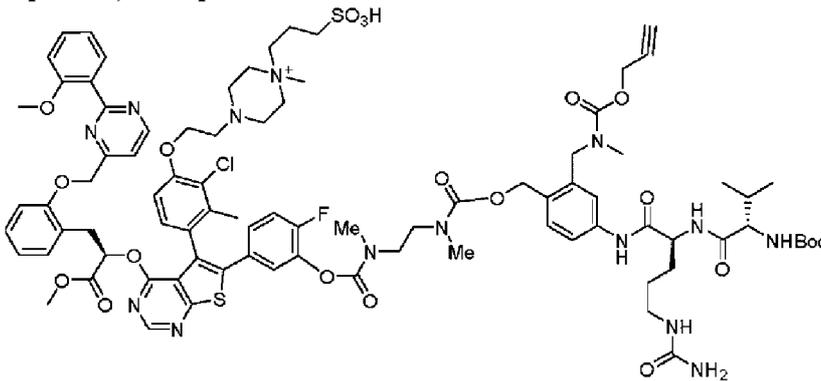
Синтез (R)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фтор-3-гидроксифенил)-4-((1-метокси-3-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия



К раствору (R)-4-(2-(4-(4-(1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фтор-3-гидроксифенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия или (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-[4-метил-4-(3-сульфопропил)пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-гидрокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (100 мг, 0,099 ммоль) в MeOH (1,5 мл) добавляют несколько капель H₂SO₄ (конц.). После перемешивания в течение ночи, MeOH удаляют в вакууме, Остаток растворяют в ДМСО, очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают (R)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фтор-3-гидроксифенил)-4-((1-метокси-3-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-

ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ий. МСВР M^+ =1027,2900, R_t =2,31 мин (5 мин кислый способ).

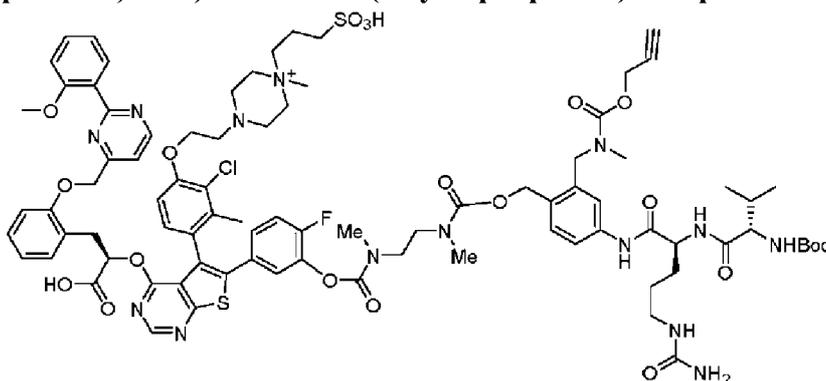
Синтез 4-(2-(4-(6-(3-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)-4-(((R)-1-метокси-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия



К раствору (R)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фтор-3-гидроксифенил)-4-((1-метокси-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия (50 мг, 0,049 ммоль, 1,0 экв.) в CH_2Cl_2 (1 мл) при 0°C добавляют ТЭА (34 мкл, 0,243 ммоль, 5,0 экв.) затем 4-нитрофенил хлорформат (10,8 мг, 0,054 ммоль, 1,1 экв.). После перемешивания в течение 15 мин, добавляют раствор проп-2-ин-1-ил (5-((R)-2-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((метил(2-(метиламино)этил)карбамоил)окси)метил)бензил)(метил)карбамата (66,3 мг, 0,092 ммоль, 2,0 экв.) в ДМФ (1 мл) затем ДИЭА (40 мкл, 0,231 ммоль, 5,0 экв.). После перемешивания в течение 2 ч, летучие вещества удаляют в вакууме, раствор разбавляют ДМСО (3 мл) и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/ H_2O , 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации получают 4-(2-(4-(6-(3-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)-4-(((R)-1-метокси-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ий. МСВР M^+ =1771,6700, R_t =2,57 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(6-(3-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)-4-(((R)-1-карбокسي-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-

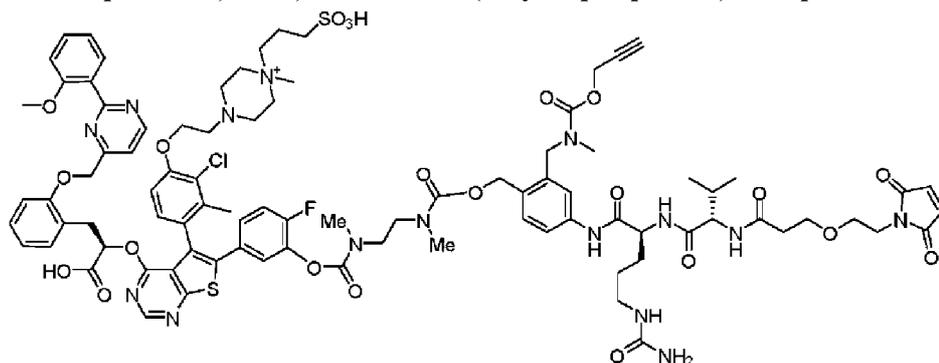
метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия



К раствору 4-(2-(4-(6-(3-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)-4-(((R)-1-метокси-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия (23 мг, 0,013 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (1 мл) добавляют 2N LiOH (0,032 мл, 0,065 ммоль, 5 экв.). После перемешивания в течение 2 ч, раствор нейтрализуют AcOH и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают

4-(2-(4-(6-(3-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)-4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия. МСВР M⁺=1757,6200, Rt=2,46 мин (5 мин кислый способ).

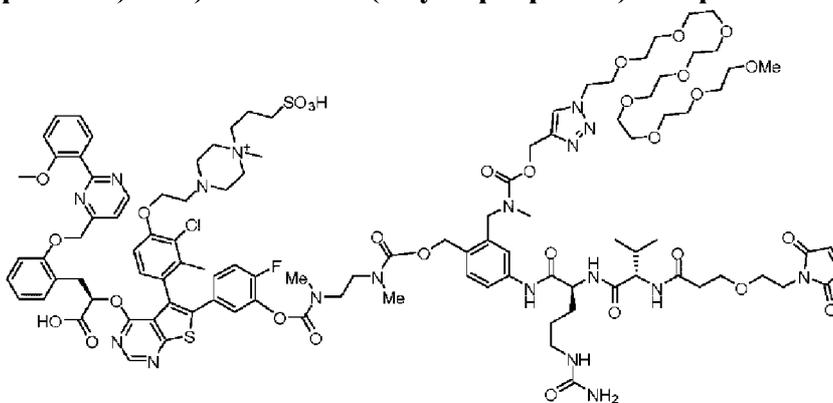
Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(3-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** м 4-(2-(4-(6-(3-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-((трет-

бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)-4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксигтиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ием (17 мг, 0,0097 ммоль, 1,0 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксиг)-6-(3-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксиг)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ий. МСВР: M⁺= 1852,5200, Rt=2,29 мин (5 мин кислый способ).

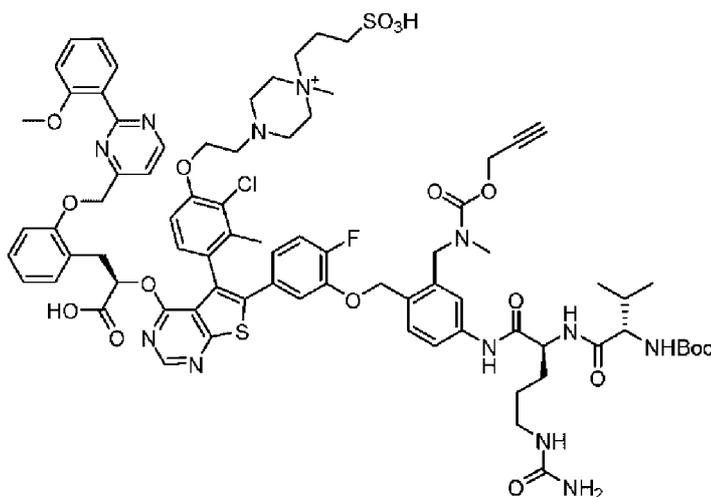
Синтез 4-(2-(4-(6-(3-(((2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксиг)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)-4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксигтиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия (L12-P2)



Следуя ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2 с 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксиг)-6-(3-(((2-(((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксиг)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ием (10 мг, 0,0054 ммоль, 1,0 экв.) и 25-азидо-2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозаном (4,4 мг, 0,011 ммоль, 2 экв.), получают 4-(2-(4-(6-(3-(((2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксиг)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-

уреидопентанамидо)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-4-фторфенил)-4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ий (**L12-P2**). МСВР: $M^+=2261,8601$, $R_t=2,24$ мин (5 мин кислый способ).

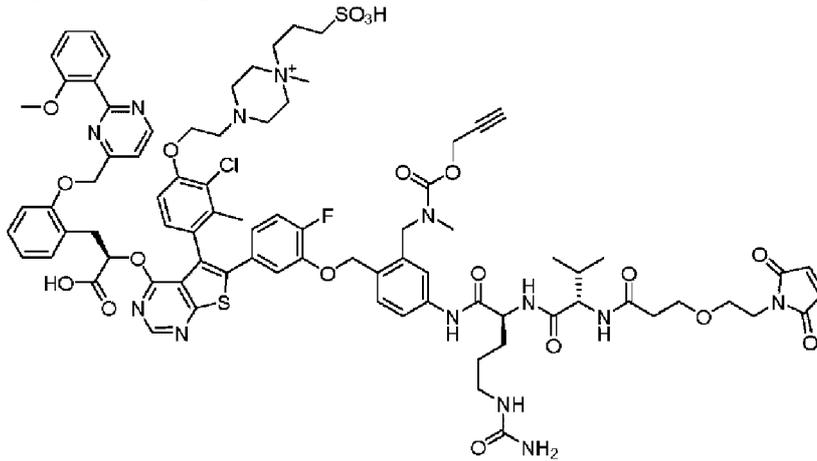
Синтез 4-(2-(4-(6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)-4-фторфенил)-4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия



Следуют ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 1 с применением (R)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фтор-3-гидроксифенил)-4-((1-метокси-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия (40 мг, 0,039 ммоль, 1,0 экв.) и проп-2-ин-1-ил (5-((R)-2-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(хлорметил)бензил)(метил)карбамата (36,4 мг, 0,058 ммоль, 1,5 экв.), с модификацией в том, что после алкилирования завершают добавление 2N LiOH (0,097 мл, 0,195 ммоль, 5,0 экв.) и перемешивают в течение 2 ч до нейтрализации и очистки ОФ-ВЭЖХ. После лиофилизации, получают 4-(2-(4-(6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)-4-фторфенил)-4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ий. МСВР: $M^+=1599,5856$, $R_t=1,34$ мин (2 мин кислый способ).

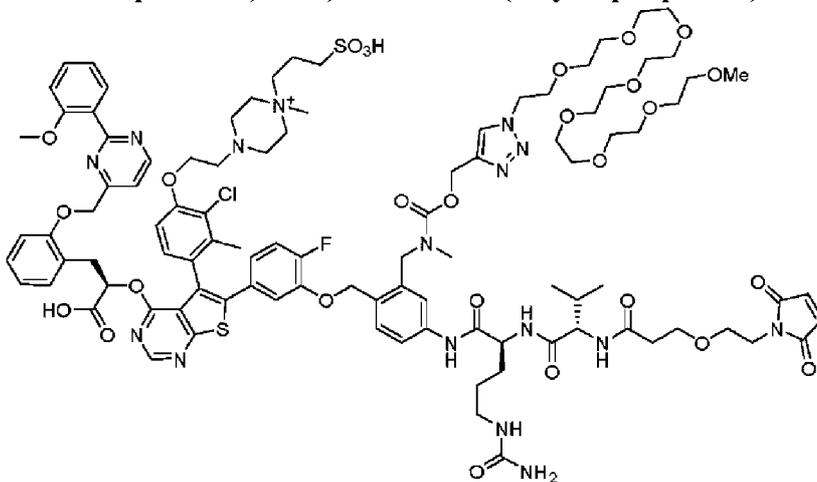
Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)-4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-

сульфопропил)пиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 4-(2-(4-(6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)-4-фторфенил)-4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксипропан-1-ил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ием (46 мг, 0,029 ммоль, 1,0 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)-4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксипропан-1-ил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ий. МСВР: M⁺ = 1694,5699, Rt=2,55 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(6-(3-((2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)окси)-4-фторфенил)-4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксипропан-1-ил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ия (L4-P2)

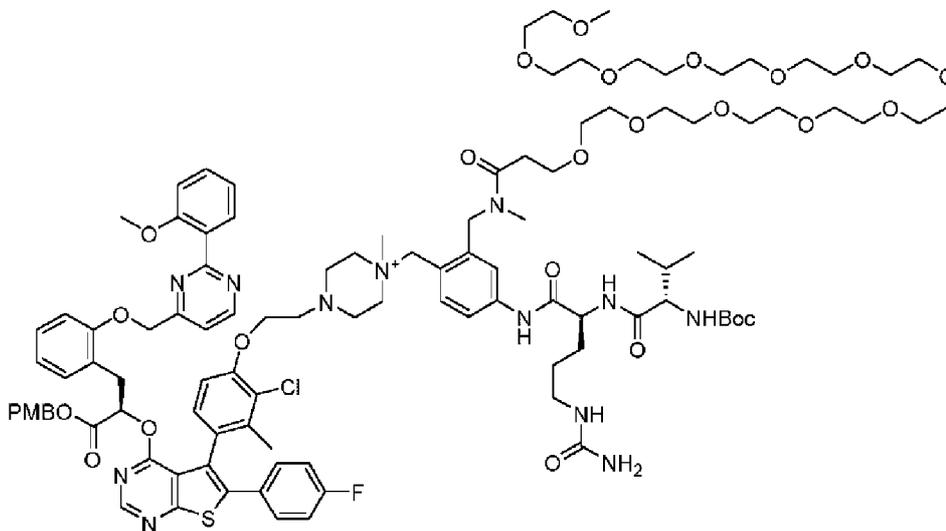


Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-

метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(3-((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метил((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)амино)метил)бензил)окси)-4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ием (44 мг, 0,026 ммоль, 1,0 экв.) и 25-азидо-2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозаном (21,2 мг, 0,052 ммоль, 2 экв.), получают 4-(2-(4-(6-(3-((2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксапентакозан-25-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)карбонил(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)окси)-4-фторфенил)-4-((R)-1-карбоксы-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метил-1-(3-сульфопропил)пиперазин-1-ий (**L4-P2**). МСВР: $M^+ = 2103,8000$, $R_t = 2,47$ мин (5 мин кислый способ).

ОБЩАЯ МЕТОДИКА 4:

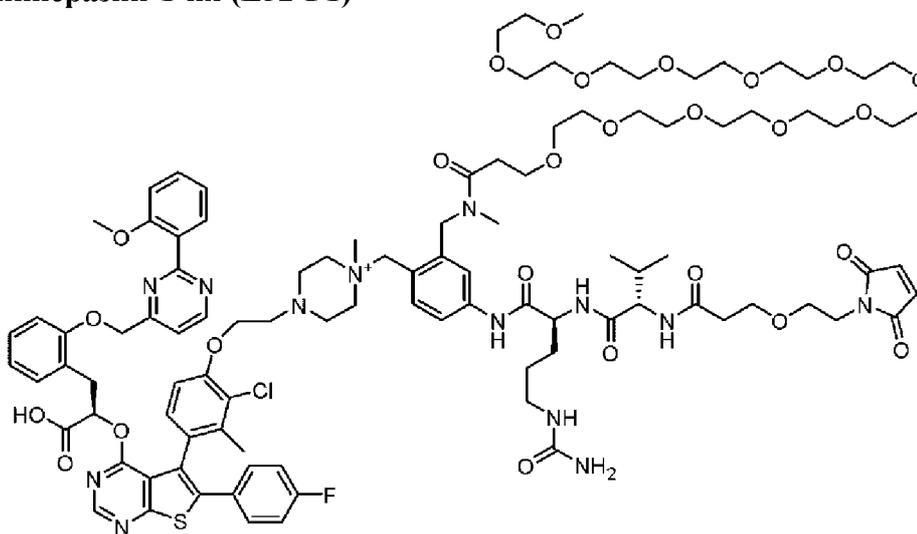
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(39-метил-38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азатетраконтан-40-ил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



К 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (60 мг, 0,040 ммоль, 1,0 экв.) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаоксаоктатриаконтан-38-оату (35,7 мг, 0,052 ммоль, 1,3 экв.), растворенным в ДМФ (1 мл), добавляют ДИПЭА (0,035 мл, 0,200 ммоль, 5,0 экв.). После выстаивания в течение 18 ч, добавляют ДМСО (2 мл) и

раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-70% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(39-метил-38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азатетраконтан-40-ил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: [M+Na]⁺=2092,9399; Rt=2,88 мин (5 мин кислый способ).

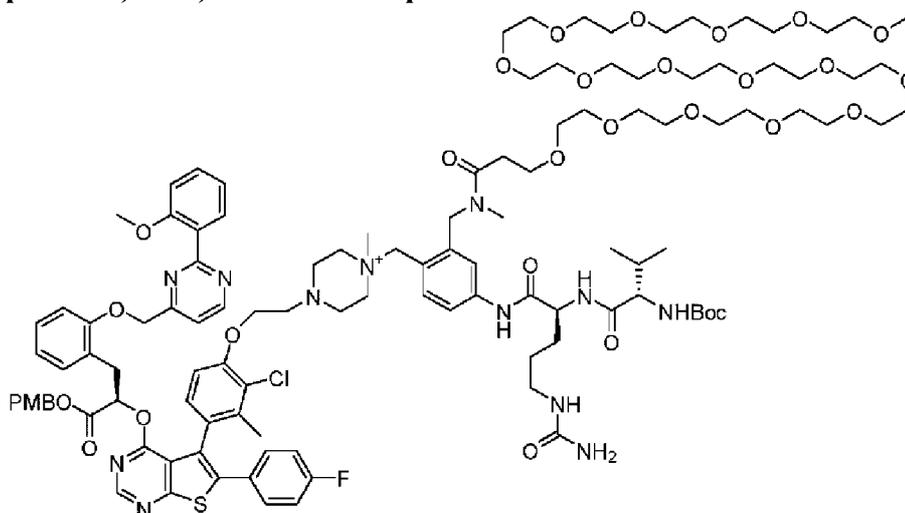
Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(39-метил-38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азатетраконтан-40-ил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L32-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(39-метил-38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азатетраконтан-40-ил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (43,4 мг, 0,021 ммоль, 1 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(39-метил-38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азатетраконтан-40-ил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: [M+Na]⁺= 2066,8799; Rt=2,44 мин (5 мин кислый способ).

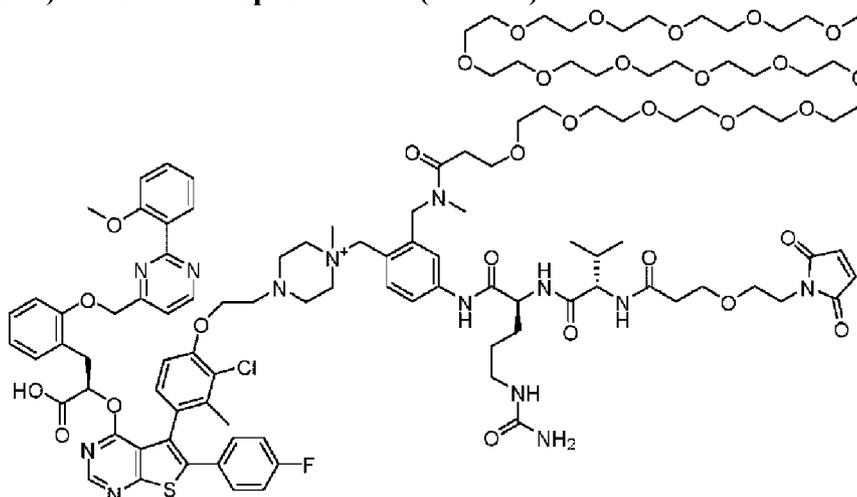
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(51-метил-50-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-гексадекаокса-51-азадопентаконтан-52-ил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-

((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



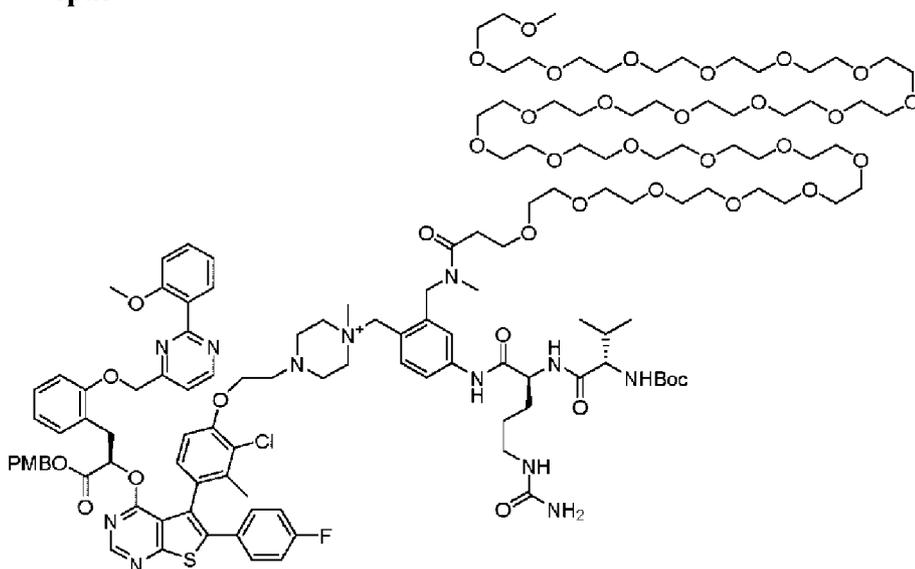
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 4** с 2,5-диоксопирролидин-1-ил 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-гексадекаоксапентаконтан-50-оатом (44,8 мг, 0,021 ммоль, 1 экв.), получают 1-(4-(((S)-2-(((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(51-метил-50-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-гексадекаокса-51-азадопентаконтан-52-ил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M+= 2246,0400; Rt=2,88 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-(((S)-2-(((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(51-метил-50-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-гексадекаокса-51-азадопентаконтан-52-ил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L31-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(51-метил-50-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-гексадекаокса-51-азадопентаконтан-52-ил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (47,5 мг, 0,021 ммоль, 1 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксии-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(51-метил-50-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-гексадекаокса-51-азадопентаконтан-52-ил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M^+ = 2221,0000; R_t = 2,45 мин (5 мин кислый способ).

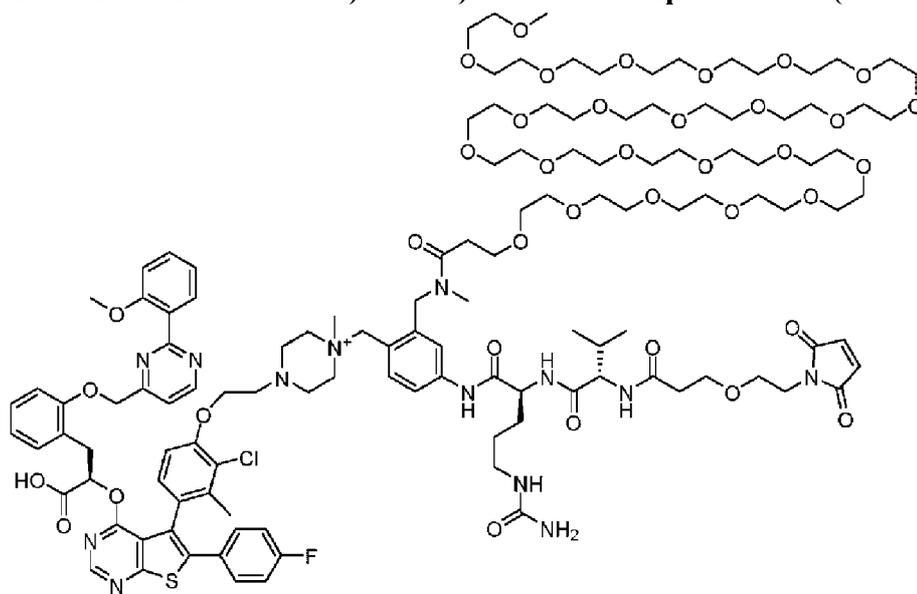
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(75-метил-74-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75-азагексагептаконтан-76-ил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 4** с 2,5-диоксопирролидин-1-ил 2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаоксатетрагептаконтан-74-оатом (52,6 мг, 0,043 ммоль, 1,3 экв.), получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(75-метил-74-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75-азагексагептаконтан-76-ил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-

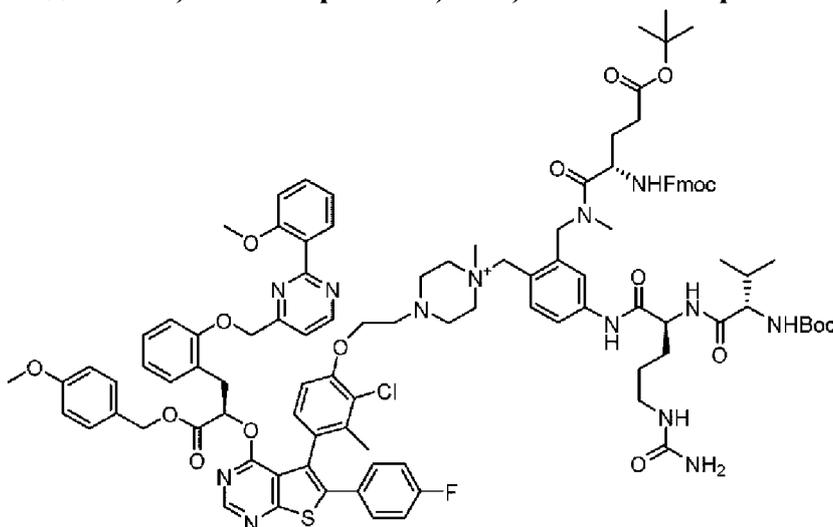
метилфенокс)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 2598,2500$; $R_t = 2,88$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокс)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокс)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокс)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(75-метил-74-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75-азагексагептаконтан-76-ил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий (L30-P1)



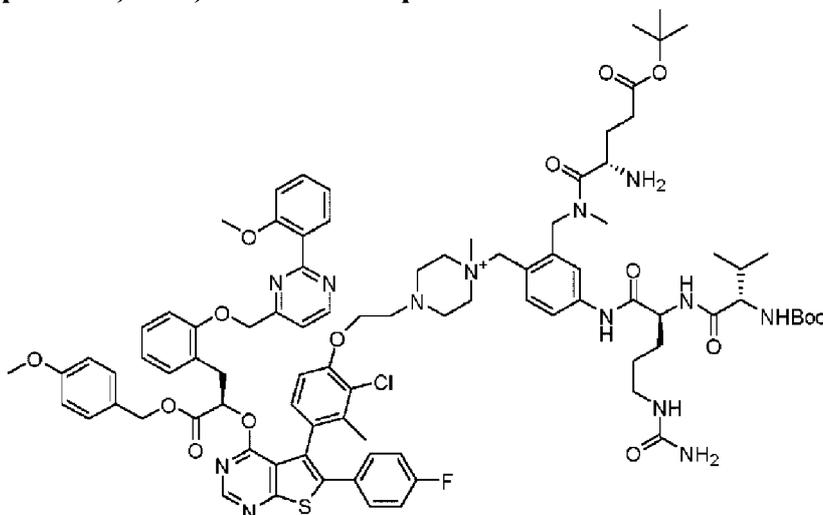
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ** 3 с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(75-метил-74-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75-азагексагептаконтан-76-ил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-(4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокс)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (38,8 мг, 0,014 ммоль, 1 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокс)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокс)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокс)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(75-метил-74-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-тетракозаокса-75-азагексагептаконтан-76-ил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 2573,2000$; $R_t = 2,47$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(2-(((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-5-(трет-бутокс)-N-метил-5-оксопентанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-(4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-

d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия

Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 4** с 5-(трет-бутил) 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил) (((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-L-глутаматом (39,0 мг, 0,075 ммоль, 1,1 экв.), получают 1-(2-(((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-5-(трет-бутоксид)-N-метил-5-оксопентанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M^+ = 1906,8101; R_t = 3,03 мин (5 мин кислый способ).

Синтез **1-(2-(((S)-2-амино-5-(трет-бутоксид)-N-метил-5-оксопентанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия**

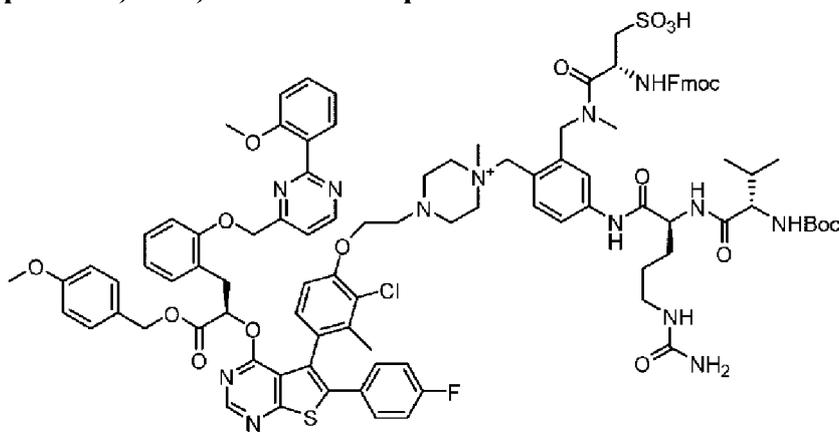


К 11-(2-(((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-5-(трет-бутоксид)-N-метил-5-оксопентанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-

метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (38,8 мг, 0,026 ммоль, 1,0 экв.), растворенному в ДМСО (2 мл), добавляют диметиламин (0,192 мл, 0,384 ммоль, 20 экв.). После выстаивания в течение 4 ч, ДМСО (2 мл) добавляют и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-70% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(2-(((S)-2-амино-5-(трет-бутокси)-N-метил-5-оксопентанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺=1684,4000; Rt=2,64 мин (5 мин кислый способ).

ОБЩАЯ МЕТОДИКА 5

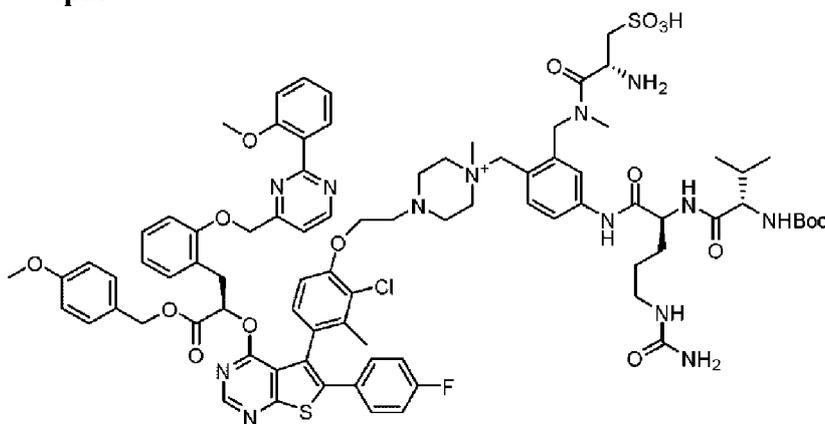
Синтез 1-(2-(((R)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-N-метил-3-сульфопропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



К (((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)(сульфо)-D-аланину (55,2 мг, 0,141 ммоль, 1,3 экв.) и 2-(3H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиримидин-3-ил)-1,1,3,3-тетраметилизоурония гексафторфосфату (V) (41,3 мг, 0,109 ммоль, 1,0 экв.), растворенным в ДМФ (2 мл), добавляют ДИПЭА (0,024 мл, 0,138 ммоль, 8,0 экв.). После выстаивания в течение 10 мин, добавляют 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий (200 мг, 0,109 ммоль, 1,0 экв.). После выстаивания в течение 2,5 ч, добавляют ДМСО (4 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-70% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации,

получают 1-(2-(((R)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-N-метил-3-сульфопропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+=1872,7000$; $R_t=3,09$ мин (5 мин кислый способ).

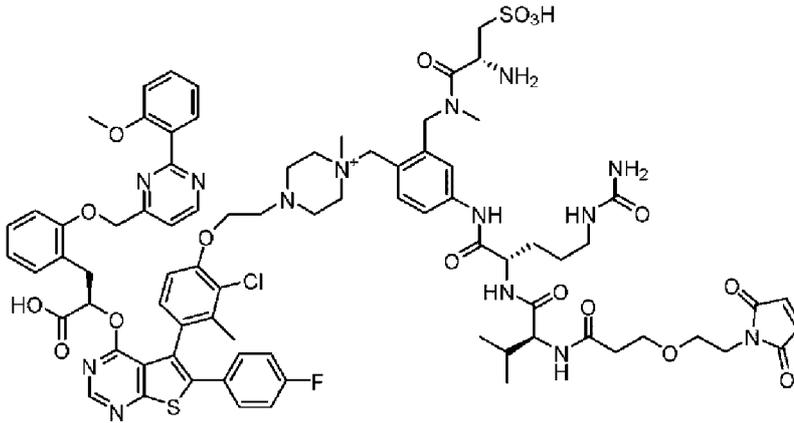
Синтез 1-(2-(((R)-2-амино-N-метил-3-сульфопропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



К 1-(2-(((R)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-N-метил-3-сульфопропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (173 мг, 0,087 ммоль, 1,0 экв.), растворенному в ТГФ (2 мл), добавляют диметиламин (0,870 мл, 1,740 ммоль, 20 экв.). После выстаивания в течение 5 ч, все летучие вещества удаляют *in vacuo*. Твердое вещество растирают с диэтиловым эфиром. ДМСО (2 мл) добавляют, и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(2-(((R)-2-амино-N-метил-3-сульфопропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+=1650,5800$; $R_t=2,71$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(2-(((R)-2-амино-N-метил-3-сульфопропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-

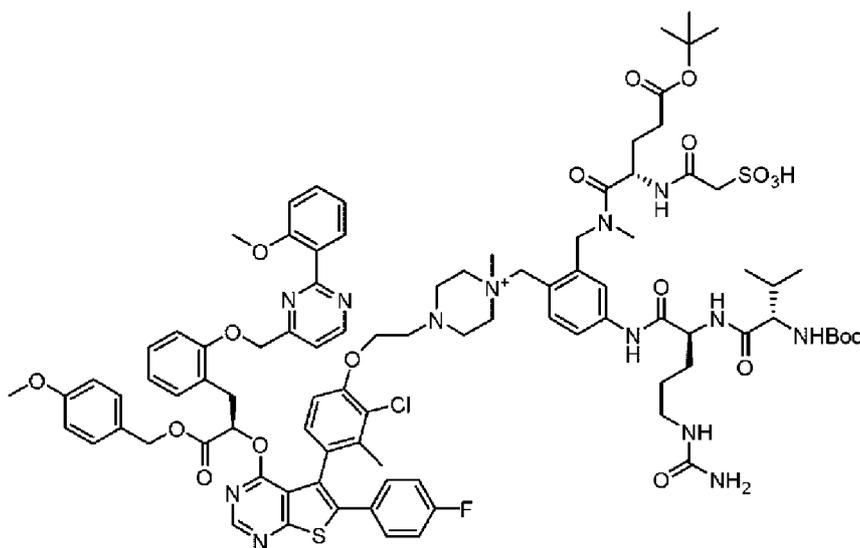
(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (L70-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(2-(((S)-2-амино-5-(трет-бутоксид-N-метил-5-оксопентанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (145 мг, 0,088 ммоль, 1 экв.), получают 1-(2-(((R)-2-амино-N-метил-3-сульфопропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-(((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M+= 1625,5601; Rt=2,32 мин (5 мин кислый способ).

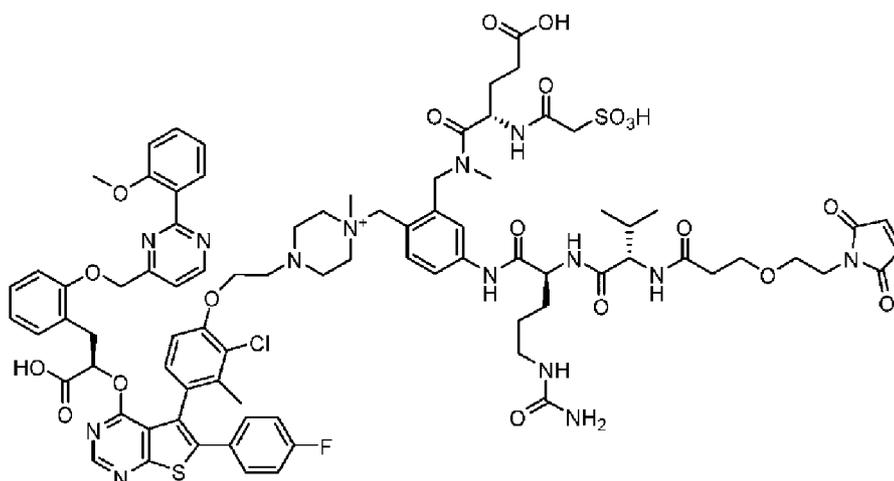
ОБЩАЯ МЕТОДИКА 6

Синтез **1-(2-(((S)-5-(трет-бутоксид-N-метил-5-оксо-2-(2-сульфоацетамидо)пентанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия**



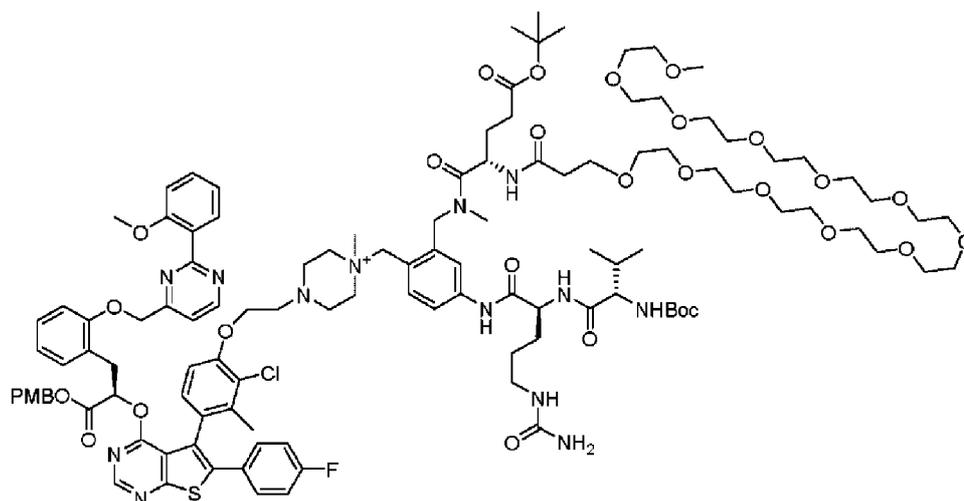
К 2-сульфоуксусной кислоте (4,83 мг, 0,035 ммоль, 2,0 экв.) и 2-(3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*b*]пиридин-3-ил)-1,1,3,3-тетраметилизоурония гексафторфосфату (V) (9,85 мг, 0,026 ммоль, 1,5 экв.), растворенному в ДМФ (1 мл), добавляют ДИПЭА (0,024 мл, 0,138 ммоль, 8,0 экв.). После выстаивания в течение 10 мин, добавляют 1-(2-(((S)-2-амино-5-(трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-((2-(2-метоксифенил)пиридин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-*d*]пиридин-5-ил)-3-метилфеноксипропан-1-ил)-1-метилпиперазин-1-ий (29,1 мг, 0,017 ммоль, 1,0). После выстаивания в течение 45 мин, добавляют ДМСО (2 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-70% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(2-(((S)-5-(трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)метил)-4-(((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-((2-(2-метоксифенил)пиридин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-*d*]пиридин-5-ил)-3-метилфеноксипропан-1-ил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺=1806,7000; Rt=3,10 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиридин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-*d*]пиридин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксипропан-1-ил)-2-(((S)-4-карбокси-N-метил-2-(2-сульфоацетиламино)бутанамидо)метил)-4-(((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L71-P1)



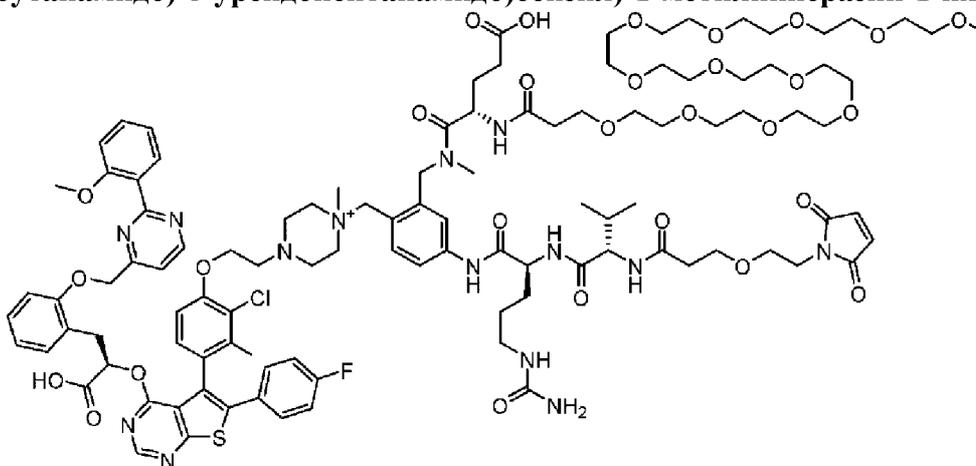
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(2-(((S)-5-(трет-бутокси)-N-метил-5-оксо-2-(2-сульфоацетидамидо)пентанамидо)метил)-4-(((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (23,7 мг, 0,011 ммоль, 1 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((S)-4-карбокси-N-метил-2-(2-сульфоацетидамидо)бутанамидо)метил)-4-(((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M+= 1725,5900; Rt=2,39 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(2-(((S)-40-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропил)-42-метил-38,41-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,42-дiazатритетраконтан-43-ил)-4-(((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 4** с 1-(2-(((S)-2-амино-5-(трет-бутокси)-N-метил-5-оксопентанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (30 мг, 0,018 ммоль, 1,0 экв.) и Mal-PEG12-NHS эфиром (18,31 мг, 0,027 ммоль, 1,5 экв.), получают 1-(2-(((S)-40-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропил)-42-метил-38,41-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,42-дiazатритетраконтан-43-ил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 2255,0400$; $R_t = 2,97$ мин (5 мин кислый способ).

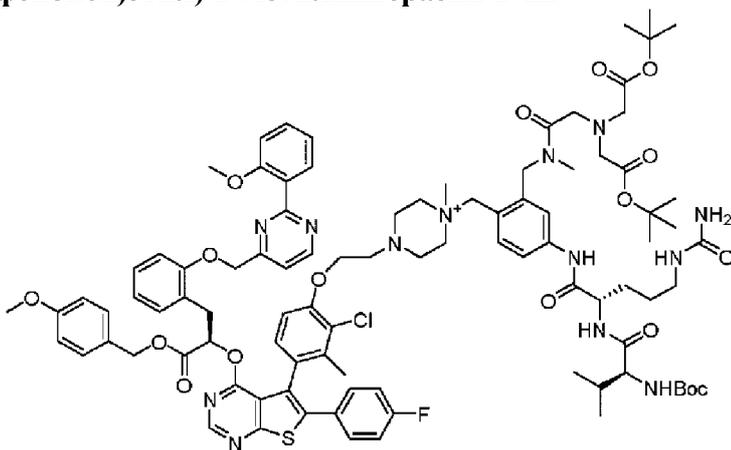
Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((S)-40-(2-карбоксиэтил)-42-метил-38,41-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,42-дiazатритетраконтан-43-ил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L72-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(2-(((S)-40-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропил)-42-метил-38,41-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,42-дiazатритетраконтан-43-ил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (20,1 мг, 8,91 мкмоль, 1 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((S)-40-(2-карбоксиэтил)-42-метил-38,41-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,42-дiazатритетраконтан-43-ил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-

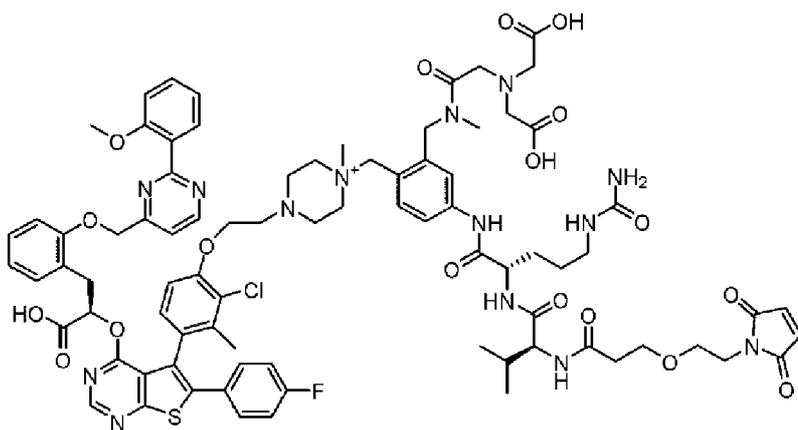
ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $[M]^+ = 2173,9199$; $R_t = 2,40$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(2-((2-(бис(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)амино)-N-метилацетамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 5** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (17,0 мг, 0,011 ммоль, 1,0 экв.) и бис(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)глицином (10,97 мг, 0,017 ммоль, 1,5 экв.), получают 1-(2-((2-(бис(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)амино)-N-метилацетамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1784,8000$; $R_t = 3,31$ мин (5 мин кислый способ).

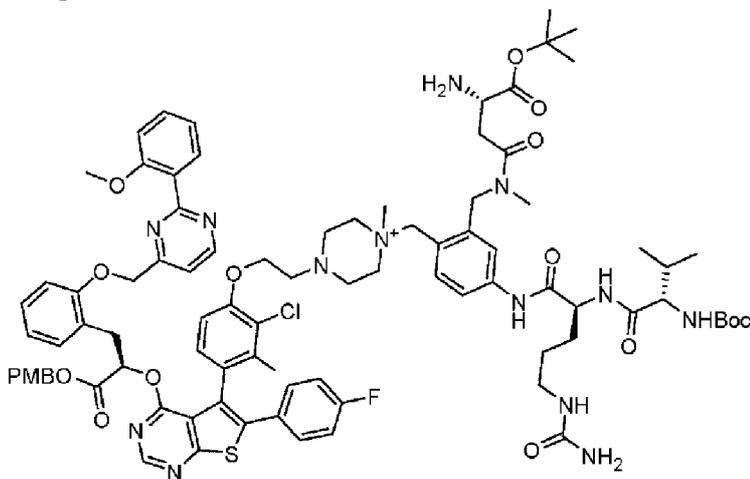
Синтез 1-(2-((2-(бис(карбоксиметил)амино)-N-метилацетамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (L67-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(2-((2-(бис(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)амино)-N-метилацетамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-(4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (9,2 мг, 5,12 мкмоль, 1 экв.), получают 1-(2-((2-(бис(карбоксиметил)амино)-N-метилацетамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M^+ = 1647,6100; R_t =2,28 мин (5 мин кислый способ).

Общая методика 7

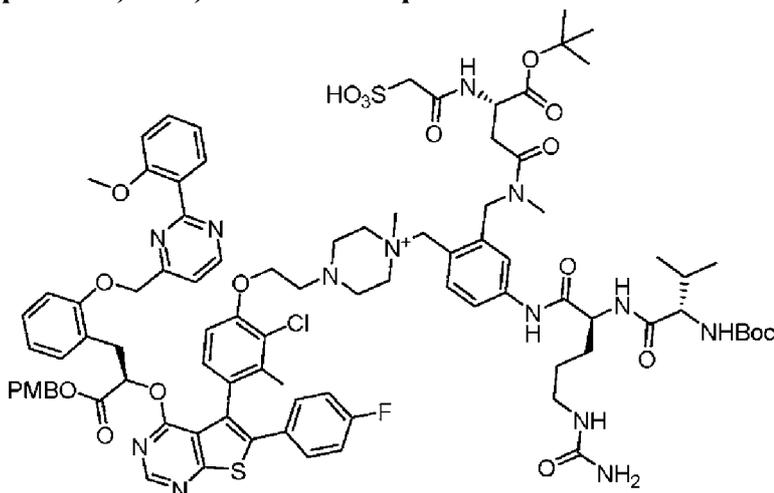
Синтез 1-(2-(((S)-3-амино-4-(трет-бутокси)-N-метил-4-оксобутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-(4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Реагенты применяют в виде исходного раствора в ДМФ. К (S)-3-(((9H-флуорен-9-

ил)метокси)карбонил)амино)-4-(трет-бутокси)-4-оксобутановой кислоте (8,04 мг, 161 мкл, 0,020 ммоль, 1,2 экв.) и 2-(3H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-3-ил)-1,1,3,3-тетраметилизуория гексафторфосфату (V) (6,81 мг, 681 мкл, 0,018 ммоль, 1,1 экв.) добавляют ДИПЭА (22,68 мкл, 0,130 ммоль, 8,0 экв.). После выстаивания в течение 10 мин, добавляют 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий (30 мг, 353 мкл, 0,016 ммоль, 1,0 экв.). После выстаивания в течение 45 мин, добавляют диметил амин (163 мкл, 0,326 ммоль). После выстаивания в течение 16 часов, добавляют ДМСО (2 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(2-(((S)-3-амино-4-(трет-бутокси)-N-метил-4-оксобутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺=1670,2300; Rt=2,69 мин (5 мин кислый способ).

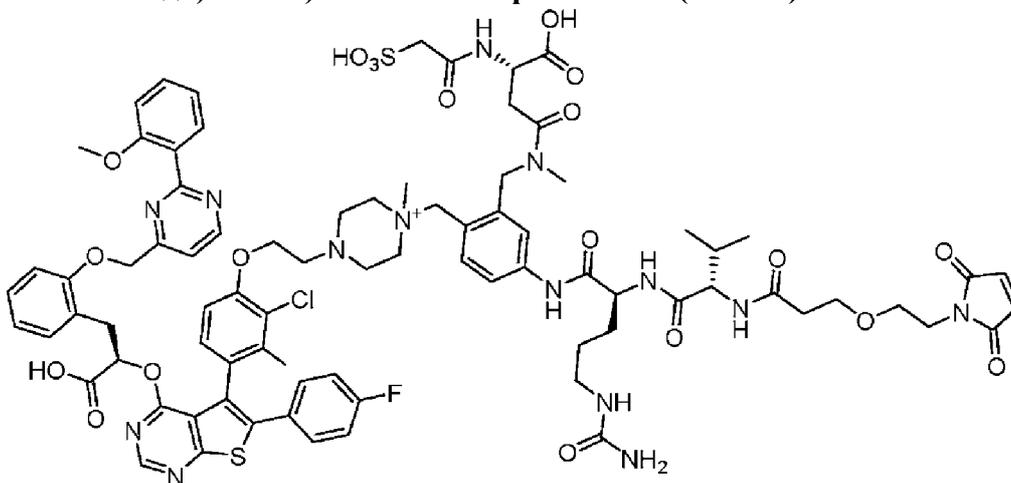
Синтез 1-(2-(((S)-4-(трет-бутокси)-N-метил-4-оксо-3-(2-сульфоацетамидо)бутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 6** с 1-(2-(((S)-3-амино-4-(трет-бутокси)-N-метил-4-оксобутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-

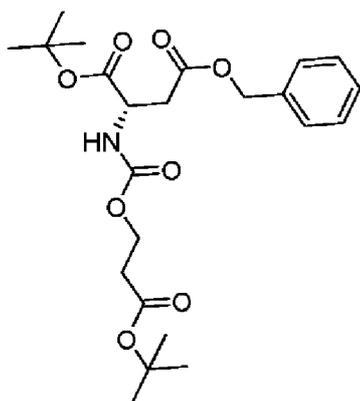
метилпиперазин-1-ием (20,6 мг, 10,23 мкмоль, 1 экв.), получают 1-(2-(((S)-4-(трет-бутокси)-N-метил-4-оксо-3-(2-сульфоацетиламино)бутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1792,6899$; $R_t = 3,17$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((S)-3-карбокси-N-метил-3-(2-сульфоацетиламино)пропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L79-P1)



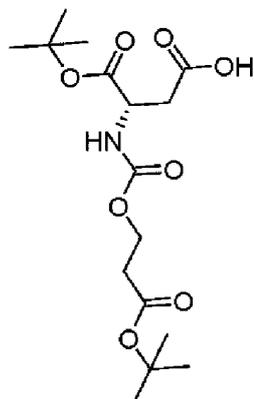
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(2-(((S)-4-(трет-бутокси)-N-метил-4-оксо-3-(2-сульфоацетиламино)бутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (25,3 мг, 0,012 ммоль, 1 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((S)-3-карбокси-N-метил-3-(2-сульфоацетиламино)пропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1711,5699$; $R_t = 2,48$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-бензил 1-(трет-бутил) ((3-(трет-бутокси)-3-оксопропокси)карбонил)-L-аспартата



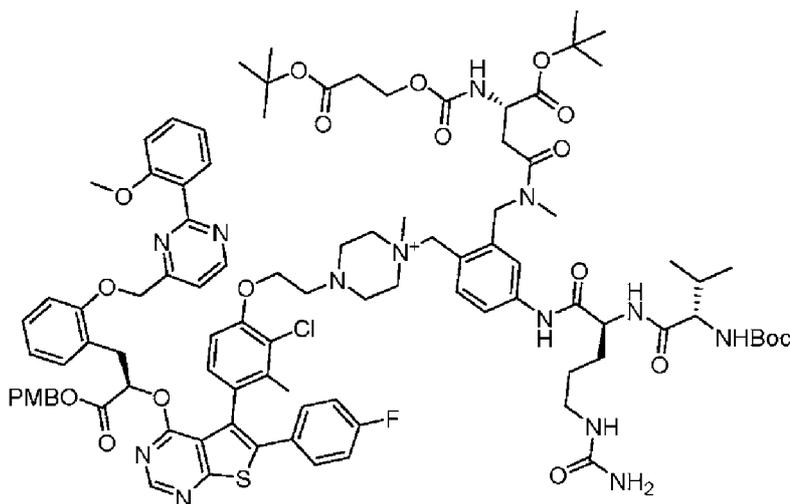
К трет-бутил 3-гидроксипропаноату (111 мг, 0,760 ммоль, 1 экв.) и бис(4-нитрофенил) карбонату (289 мг, 0,950 ммоль, 1,2 экв.), растворенным в ДМФ (2 мл), добавляют ДИПЭА (0,221 мл, 1,267 ммоль, 2,0 экв.). После выстаивания в течение 1 ч, добавляют 4-бензил 1-(трет-бутил) L-аспартат (200 мг, 0,633 ммоль). После выстаивания в течение 16 ч, добавляют ДМСО (4 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 4-бензил 1-(трет-бутил) ((3-(трет-бутоксид)-3-оксипропоксид)карбонил)-L-аспартат. МСВР: [M+H]⁺=452,4; Rt=2,68 мин (5 мин кислый способ).

Синтез ((S)-4-(трет-бутоксид)-3-(((3-(трет-бутоксид)-3-оксипропоксид)карбонил)амино)-4-оксобутановая кислота



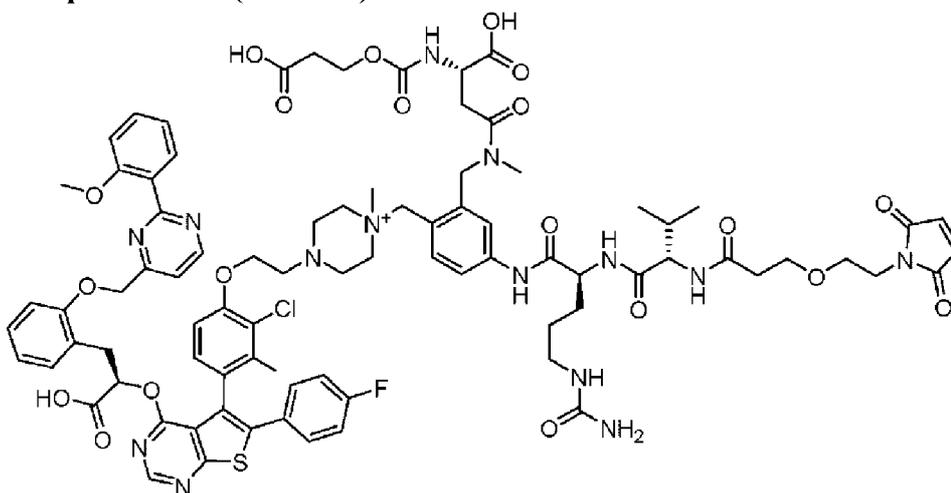
К 4-бензил 1-(трет-бутил) ((3-(трет-бутоксид)-3-оксипропоксид)карбонил)-L-аспартату (52,7 мг, 0,117 ммоль), растворенному в MeOH (2 мл) добавляют гидроксид палладия (8,20 мг, 0,012 ммоль, 0,1 экв.). Атмосферу реакции меняют на водород. После перемешивания в течение 16 ч, реакционную смесь фильтруют через слой целита. Фильтрат удаляют в вакууме с получением, 4-бензил 1-(трет-бутил) ((3-(трет-бутоксид)-3-оксипропоксид)карбонил)-L-аспартата.

Синтез 1-(2-((S)-5-(трет-бутоксикарбонил)-2,13,13-триметил-3,7,11-триоксо-8,12-диокса-2,6-дiazатетрадецил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксипропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



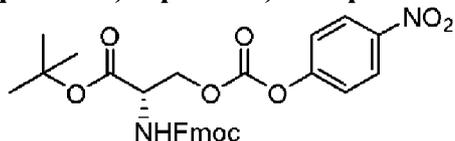
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ** 7 с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (20 мг, 235 мкл, 0,011 ммоль, 1 экв.) и 4-бензил 1-(трет-бутил) ((3-(трет-бутоксикарбонил)-3-оксопропокси)карбонил)-L-аспаратом (7,84 мг, 204 мкл, 0,022 ммоль, 2 экв.), получают 1-(2-((S)-5-(трет-бутоксикарбонил)-2,13,13-триметил-3,7,11-триоксо-8,12-диокса-2,6-дiazатетрадецил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1842,8000$; $R_t = 3,23$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((S)-3-карбокси-3-((2-карбоксиэтокси)карбонил)амино)-N-метилпропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L102-P1)



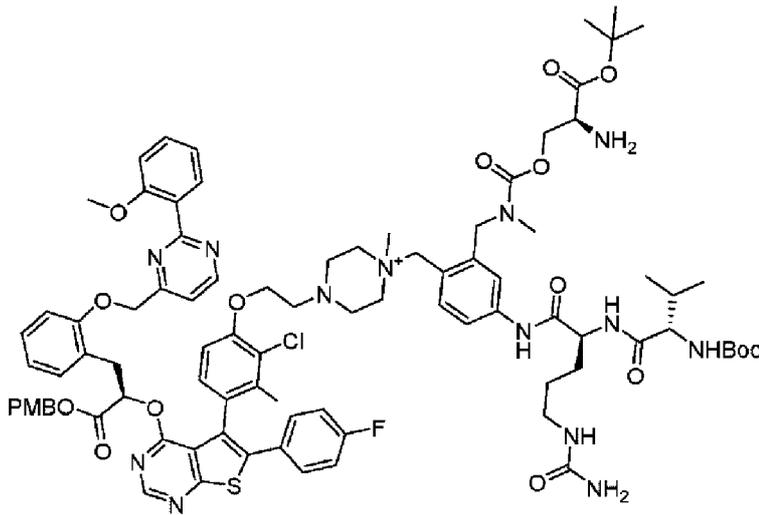
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(2-((S)-5-(трет-бутоксикарбонил)-2,13,13-триметил-3,7,11-триоксо-8,12-диокса-2,6-дiazатетрадецил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфеноксид)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (17,6 мг, 0,008 ммоль, 1 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокситетрагидро-2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксид)этил)-1-(2-(((S)-3-карбокситетрагидро-2-((2-карбокситетрагидро)карбонил)амино)-N-метилпропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺= 1705,6200; Rt=2,41 мин (5 мин кислый способ).

Синтез трет-бутил N-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-O-((4-нитрофеноксид)карбонил)-L-серината



К трет-бутил (((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-L-серинату (300 мг, 0,782 ммоль, 1 экв.) и бис(4-нитрофенил) карбонату (357 мг, 1,174 ммоль, 1,5 экв.), растворенным в ДМФ (2 мл), добавляют ДИПЭА (0,136 мл, 0,782 ммоль, 1,0 экв.). После выстаивания в течение 16 ч, добавляют ДМСО (4 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают трет-бутил N-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-O-((4-нитрофеноксид)карбонил)-L-серинат. МСВР: M⁺= 566,4; Rt=3,01 мин (5 мин кислый способ).

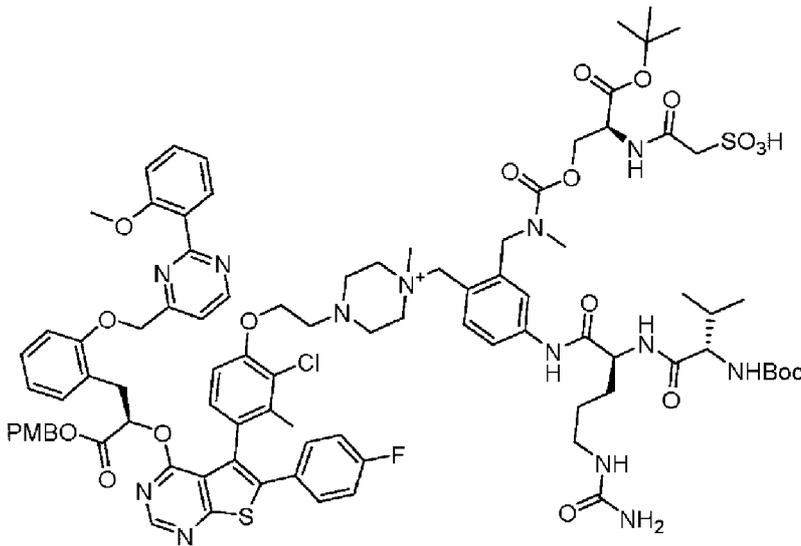
Синтез 1-(2-((((S)-2-амино-3-(трет-бутоксид)-3-оксопропид)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфеноксид)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



К трет-бутил N-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-O-((4-нитрофенокси)карбонил)-L-серинату (7,14 мг, 143 мкл, 0,013 ммоль, 1,2 экв.) и 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (20 мг, 235 мкл, 0,011 ммоль, 1,0 экв.) добавляют ДИПЭА (15,1 мкл, 0,087 ммоль, 8,0 экв.). После выстаивания в течение 16 ч, добавляют диметил амин (109 мкл, 0,217 ммоль, 20 экв.). Реакционную смесь перемешивают при КТ в течение 1 ч. ДМСО (4 мл) добавляют, и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(2-((((S)-2-амино-3-(трет-бутоксикарбонил)-3-оксопропокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺= 1686,7200; Rt=2,71 мин (5 мин кислый способ).

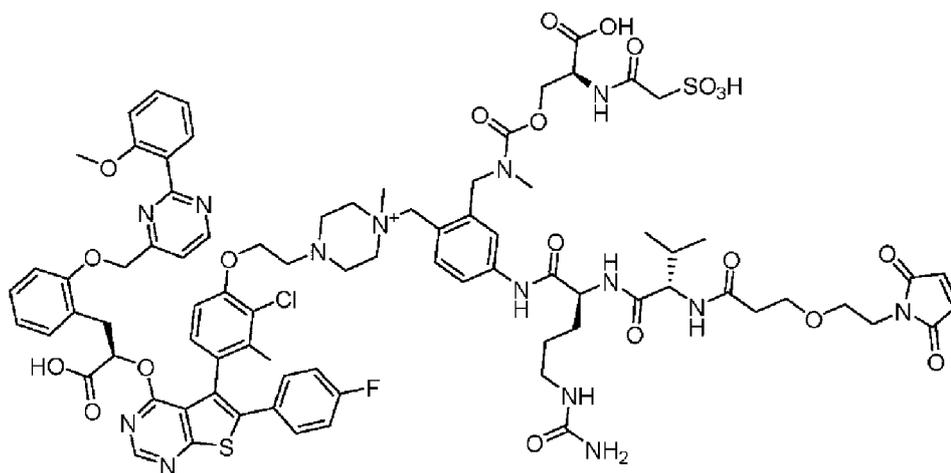
Синтез

1-(2-((((S)-3-(трет-бутоксикарбонил)-3-оксо-2-(2-сульфоацетида)пропокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



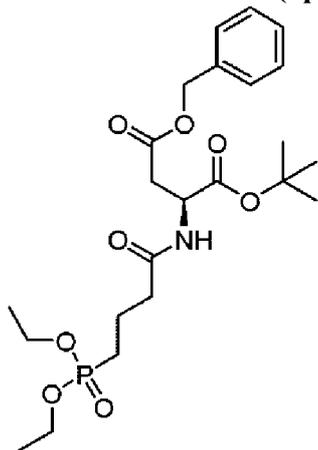
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 6** с 1-(2-((((S)-2-амино-3-(трет-бутоксипропокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-(((S)-2-(((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ийем (22,9 мг, 0,011 ммоль, 1 экв.), получают 1-(2-((((S)-3-(трет-бутоксипропокси)-3-оксо-2-(2-сульфоацетиламино)пропокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-(((S)-2-(((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M+= 1808,6899; Rt=3,18 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-((((S)-2-карбокси-2-(2-сульфоацетиламино)этокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-(((S)-2-(((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L77-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(2-((((S)-2-амино-3-(трет-бутокси)-3-оксопропокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (15,3 мг, 7,11 мкмоль, 1 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксии-2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-((((S)-2-карбоксии-2-(2-сульфоацетидами)этокси)карбонил)(метил)амино)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M+= 1727,5800; Rt=2,47 мин (5 мин кислый способ).

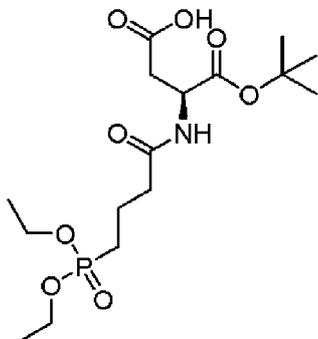
Синтез 4-бензил 1-(трет-бутил) (4-(диэтоксифосфорил)бутаноил)-L-аспартата



К 4-бензил 1-(трет-бутил) L-аспартату (200 мг, 0,633 ммоль, 1,0 экв.) и 4-(диэтоксифосфорил)бутановой кислоте (213 мг, 0,950 ммоль, 1,5 экв.), растворенным в ДМФ (2 мл), добавляют дициклогексилметандиимин (157 мг, 0,760 ммоль, 1,2 экв.), 1H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-1-ол гидрат (146 мг, 0,950 ммоль, 1,5 экв.) и ДИПЭА (0,110 мл, 0,633 ммоль, 1,0 экв.). После выстаивания в течение 16 ч, добавляют ДМСО (4 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК

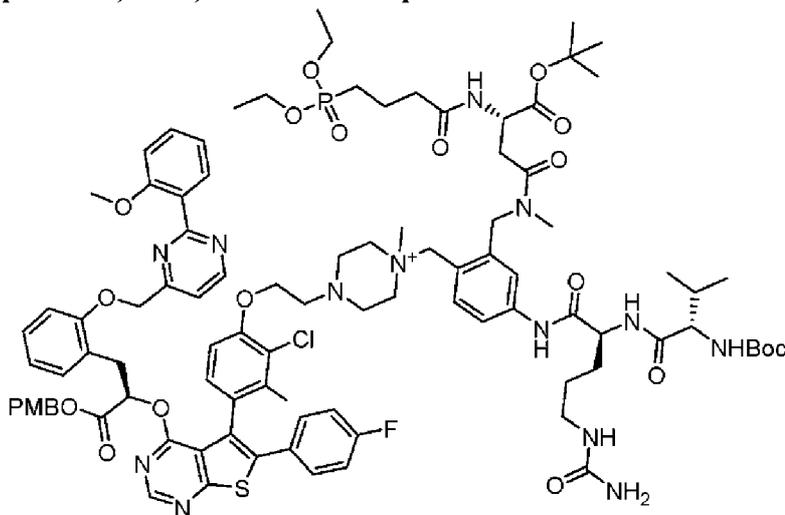
модификатор). После лиофилизации, получают 4-бензил 1-(трет-бутил) (4-(диэтоксифосфорил)бутаноил)-L-аспартат. МСВР: $[M+H]^+=486,4$; $R_t=2,15$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез (S)-4-(трет-бутокси)-3-(4-(диэтоксифосфорил)бутанамидо)-4-оксобутановой кислоты



К 4-бензил 1-(трет-бутил) (4-(диэтоксифосфорил)бутаноил)-L-аспартату (YUBI5-040-EXP082-001 (100 мг, 0,206 ммоль, 1,0 экв.), растворенному в MeOH (2 мл), добавляют гидроксид палладия (14,46 мг, 0,021 ммоль, 0,1 экв.). Атмосферу реакции меняют на водород. После перемешивания в течение 16 ч, реакционную смесь фильтруют через слой целита. Фильтрат удаляют *в вакууме* с получением (S)-4-(трет-бутокси)-3-(4-(диэтоксифосфорил)бутанамидо)-4-оксобутановой кислоты. МСВР: $[M+H]^+=396,3$; $R_t=1,35$ мин (5 мин кислый способ).

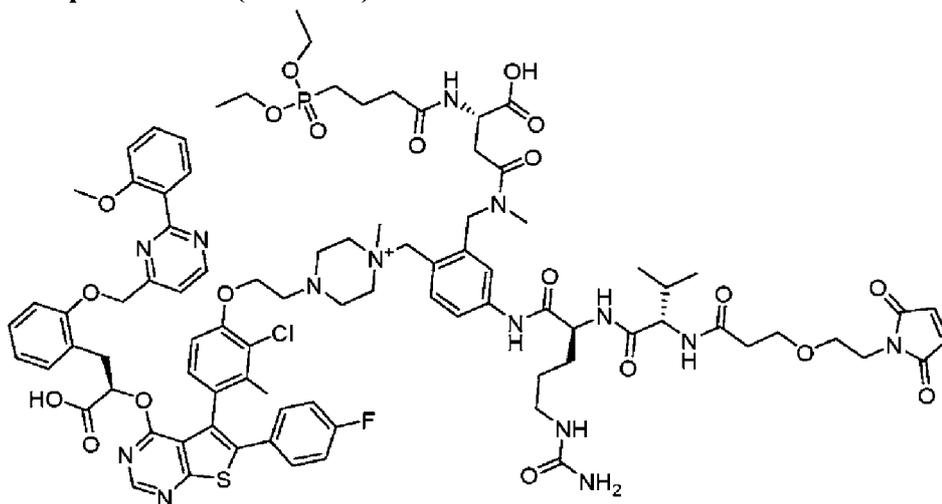
Синтез 1-(2-(((S)-4-(трет-бутокси)-3-(4-(диэтоксифосфорил)бутанамидо)-N-метил-4-оксобутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ** 7 с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-

метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (30 мг, 353 мкл, 0,016 ммоль, 1 экв.) и (S)-4-(трет-бутоксидиэтоксифосфорил)бутанамидо)-4-оксобутановой кислотой (12,87 мг, 161 мкл, 0,033 ммоль, 2 экв.), получают 1-(2-(((S)-4-(трет-бутоксидиэтоксифосфорил)бутанамидо)-N-метил-4-оксобутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МС: $M^{2+} = 940,3$; $R_t = 2,60$ мин (5 мин кислый способ).

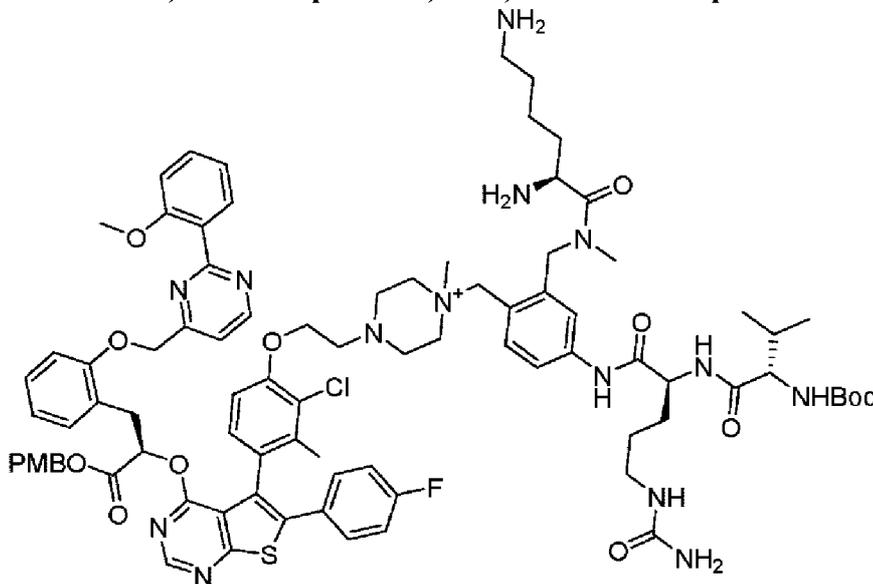
Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((S)-3-карбокси-3-(4-(диэтоксифосфорил)бутанамидо)-N-метилпропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L103-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(2-(((S)-4-(трет-бутоксидиэтоксифосфорил)бутанамидо)-N-метил-4-оксобутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (20 мг, 0,009 ммоль, 1 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((S)-3-карбокси-3-(4-(диэтоксифосфорил)бутанамидо)-N-метилпропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1795,6700$; $R_t = 2,44$ мин (5 мин кислый способ).

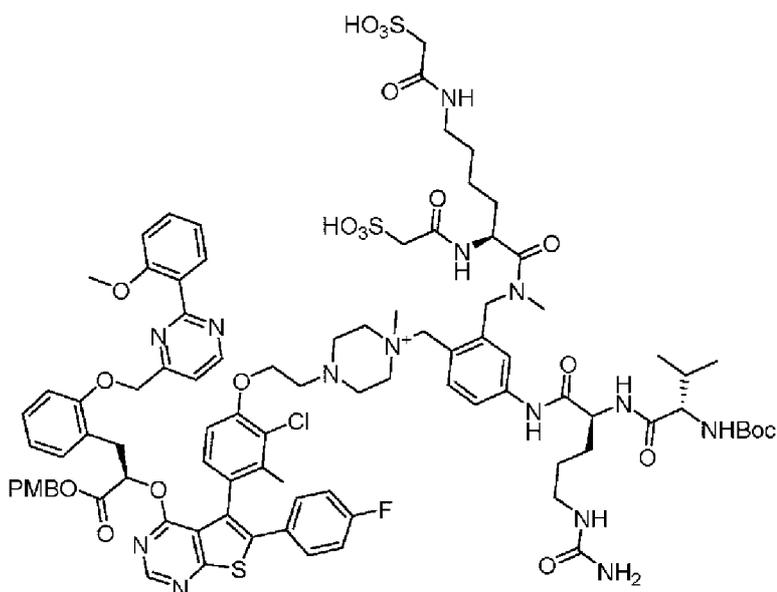
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-

5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-2,6-диамино-N-метилгексанамидо)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



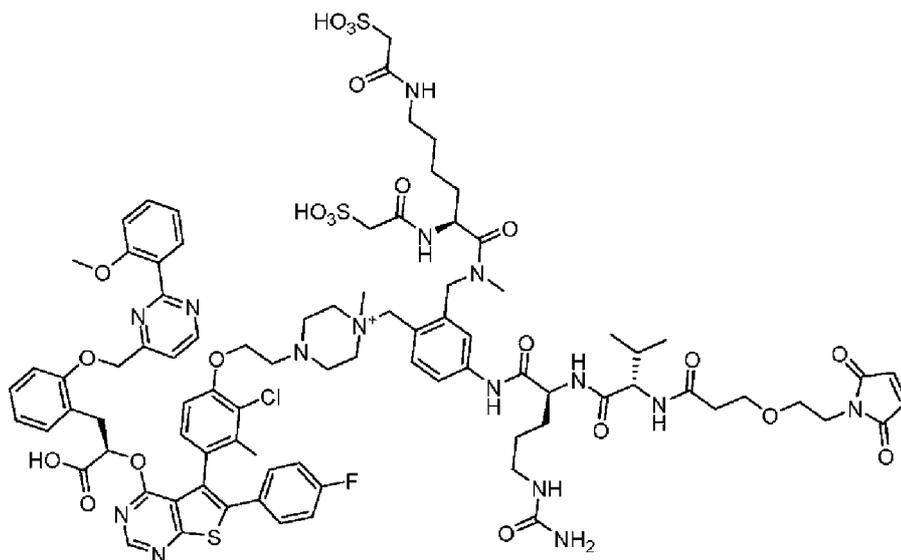
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ** 7 с 1-(4-(((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (20 мг, 0,011 ммоль, 1 экв.) и (S)-2,5-бис(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)пентановой кислотой (7,51 мг, 0,013 ммоль, 1,2 экв.), получают 1-(4-(((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-2,6-диамино-N-метилгексанамидо)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1627,4000$; $R_t = 2,48$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-(((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-N-метил-2,6-бис(2-сульфоацетамидо)гексанамидо)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



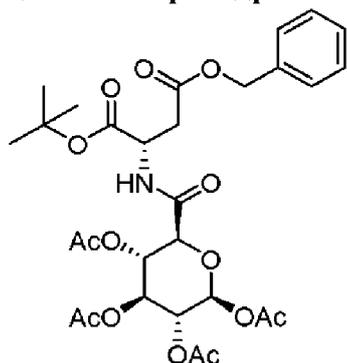
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 6** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-2,6-диамино-N-метилгексанамидо)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (9,7 мг, 0,0049 ммоль, 1 экв.), получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-N-метил-2,6-бис(2-сульфоацетамидо)гексанамидо)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия. МСВР: M^+ = 1871,6700; R_t =3,02 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-N-метил-2,6-бис(2-сульфоацетамидо)гексанамидо)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L78-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с **-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-N-метил-2,6-бис(2-сульфоацетиламино)гексанамидо)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ийем (15 мг, 7,55 мкмоль, 1 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-N-метил-2,6-бис(2-сульфоацетиламино)гексанамидо)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1846,6000$; $R_t = 2,49$ мин (5 мин кислый способ).**

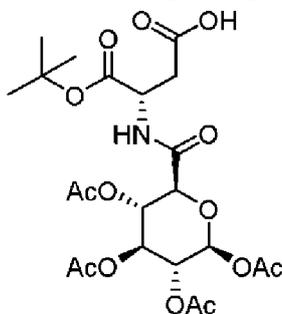
Синтез 4-бензил 1-(трет-бутил) ((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбонил)-L-аспартат



К **(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновой** кислоте (344 мг, 0,950 ммоль) и **4-бензил 1-(трет-бутил) L-аспартату** (300 мг, 0,950 ммоль), растворенным в ДМФ (3,2 мл), добавляют ДИПЭА (0,165 мл, 0,950 ммоль, 1,0 экв.), 1H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиримидин-1-ол гидрат (154 мг, 0,997 ммоль, 1,05 экв.) и 3-(((этилимино)метил)амино)-N,N-диметилпропан-1-амин гидрохлорид (191 мг, 0,997 ммоль, 1,05 экв.). После выстаивания в течение 16 ч, добавляют ДМСО (4 мл) и раствор

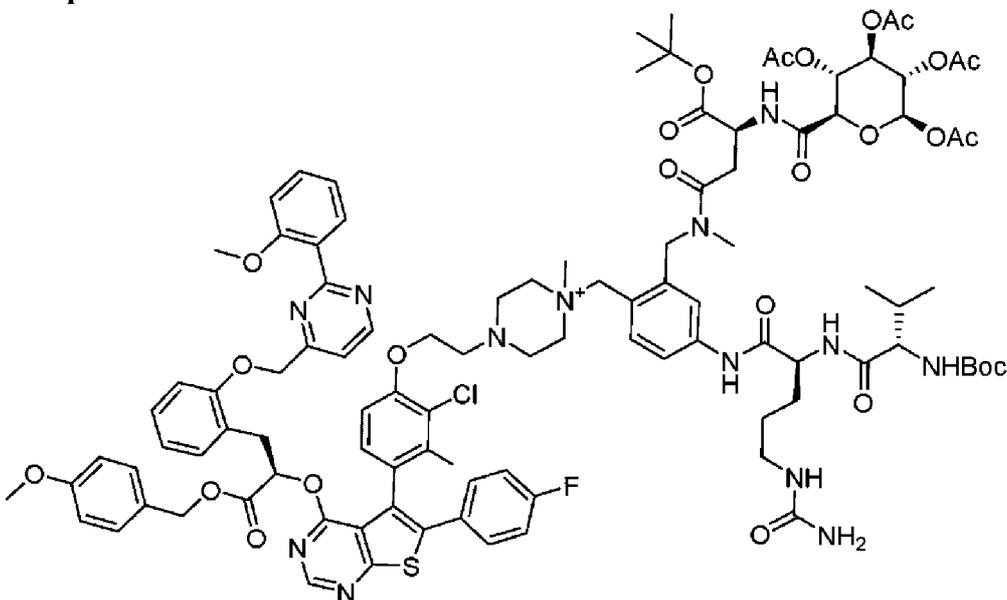
очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-70% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 4-бензил 1-(трет-бутил) ((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбонил)-L-аспартат. МСВР: M⁺=641,5; Rt=2,55 мин (5 мин кислый способ).

Синтез (S)-4-(трет-бутокси)-4-оксо-3-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)бутановой кислоты



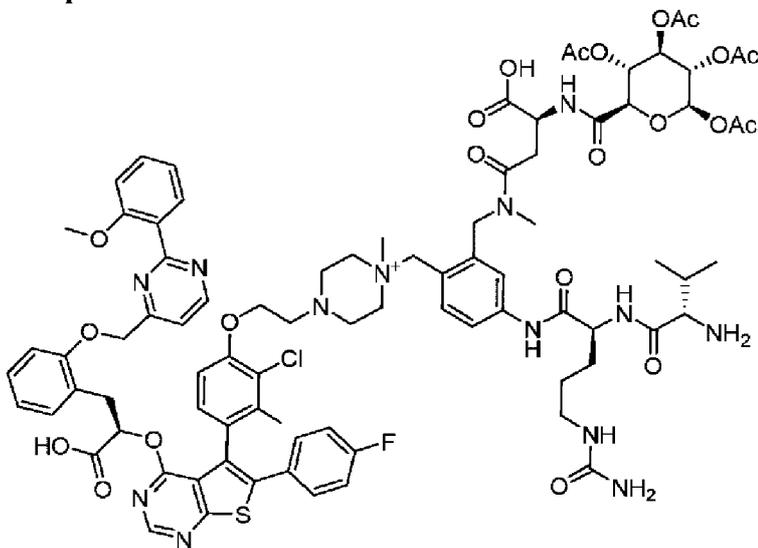
К 4-бензил 1-(трет-бутил) ((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбонил)-L-аспартату (100 мг, 0,160 ммоль, 1,0 экв.), растворенному в MeOH (2 мл) добавляют гидроксид палладия (11,26 мг, 0,016 ммоль, 0,1 экв.). Атмосферу реакции меняют на водород. После перемешивания в течение 16 ч, реакционную смесь фильтруют через слой целита. Фильтрат удаляют в вакууме с получением (S)-4-(трет-бутокси)-4-оксо-3-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)бутановой кислоты. МСВР: [M-H]⁻= 532,3, Rt=1,71 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(2-(((S)-4-(трет-бутокси)-N-метил-4-оксо-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)бутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ** 7 с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (30 мг, 0,016 ммоль, 1,0 экв.) и (S)-4-(трет-бутоксикарбонил)-4-оксо-3-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)бутановой кислотой (12,2 мг, 968 мкл, 0,023 ммоль, 1,4 экв.), получают 1-(2-(((S)-4-(трет-бутоксикарбонил)-N-метил-4-оксо-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)бутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 2014,7800$; $R_t = 3,21$ мин (5 мин кислый способ).

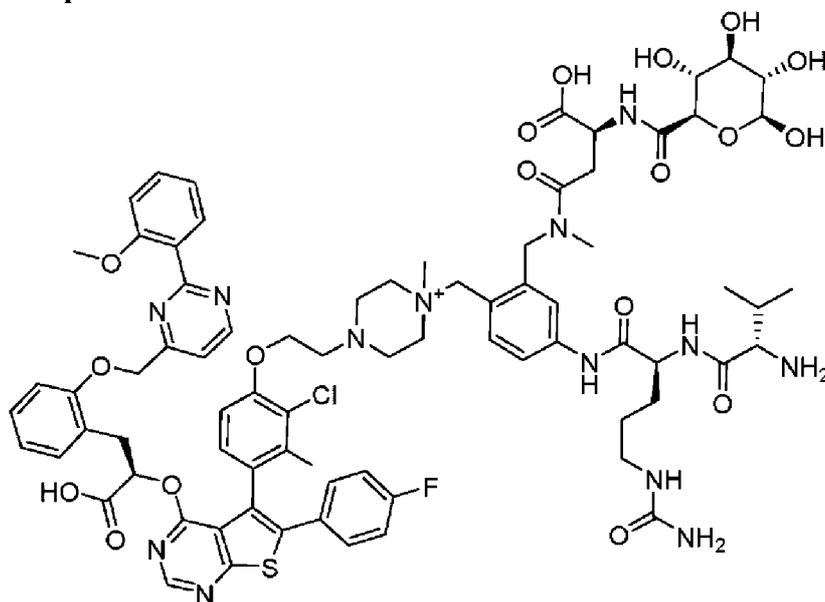
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-3-карбоксо-N-метил-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)пропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



К 1-(2-(((S)-4-(трет-бутоксикарбонил)-N-метил-4-оксо-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)бутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (22,7 мг, 0,009 ммоль, 1,0 экв.), растворенному в ДХМ (32 мл), добавляют ТФК (0,67 мл). После перемешивания в течение 45 мин, растворитель удаляют *in vacuo* с получением 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-

метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-3-карбокси-N-метил-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)пропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия. МСВР: $M^+=1738,6200$; $R_t=2,30$ мин (5 мин кислый способ).

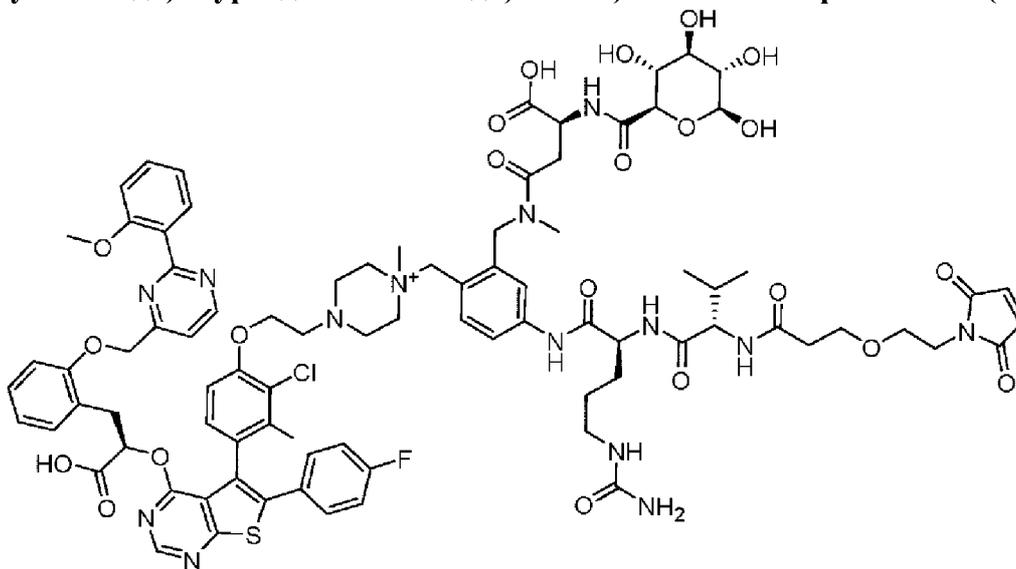
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-3-карбокси-N-метил-3-((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5,6-тетрагидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)пропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



К 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-3-карбокси-N-метил-3-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4,5,6-тетраацетокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)пропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (22,7 мг, 0,009 ммоль, 1,0 экв.), растворенному в ТГФ (1 мл) и МеОН (1 мл), добавляют гидроксид лития (5,04 мг, 0,120 ммоль, 10 экв.). После перемешивания в течение 2 часов, растворитель удаляют *in vacuo*. Добавляют воду (1 мл), ТФК (0,2 мл), МеСН (1 мл) и ДМСО (4 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-70% МеСН/Н₂О, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-3-карбокси-N-метил-3-((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5,6-тетрагидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)пропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР:

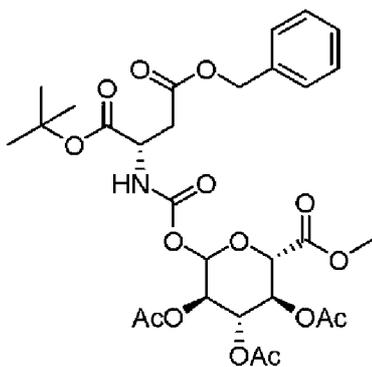
$M^+ = 1570,5900$; $R_t = 2,02$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((S)-3-карбокси-N-метил-3-((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5,6-тетрагидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)пропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L68-P1)



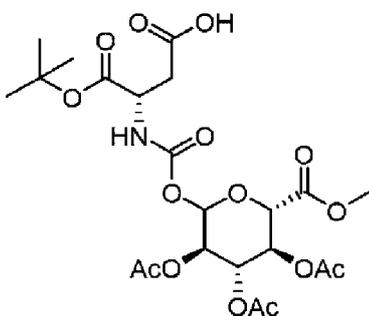
К 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((S)-3-карбокси-N-метил-3-((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5,6-тетрагидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)пропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (10,8 мг, 0,0056 ммоль, 1,0 экв.) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропаноату (5,25 мг, 0,017 ммоль, 3,5 экв.), растворенным в ДМФ (1 мл), добавляют ДИПЭА (7,86 мкл, 0,045 ммоль, 8 экв.). После выстаивания в течение 1,5 часов, ДМСО (2 мл) добавляют и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-70% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((S)-3-карбокси-N-метил-3-((2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5,6-тетрагидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамидо)пропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1765,6500$; $R_t = 2,31$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-бензил 1-(трет-бутил) (((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)-L-аспартата



К ((3R,4S,5S,6S)-2-гидрокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетату (254 мг, 0,760 ммоль, 1,2 экв.) и бис(4-нитрофенил) карбонату (289 мг, 0,950 ммоль, 1,5 экв.), растворенным в ДМФ (2 мл), добавляют ДИПЭА (0,221 мл, 1,267 ммоль, 2,0 экв.). После выстаивания в течение 1 ч, добавляют 4-бензил 1-(трет-бутил) L-аспартат (200 мг, 0,633 ммоль, 1,0 экв.). После выстаивания в течение 16 ч, добавляют ДМСО (6 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-70% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 4-бензил 1-(трет-бутил) (((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)-L-аспартат. МСВР: [M-H]⁻ = 638,4; Rt=2,61 мин (5 мин кислый способ).

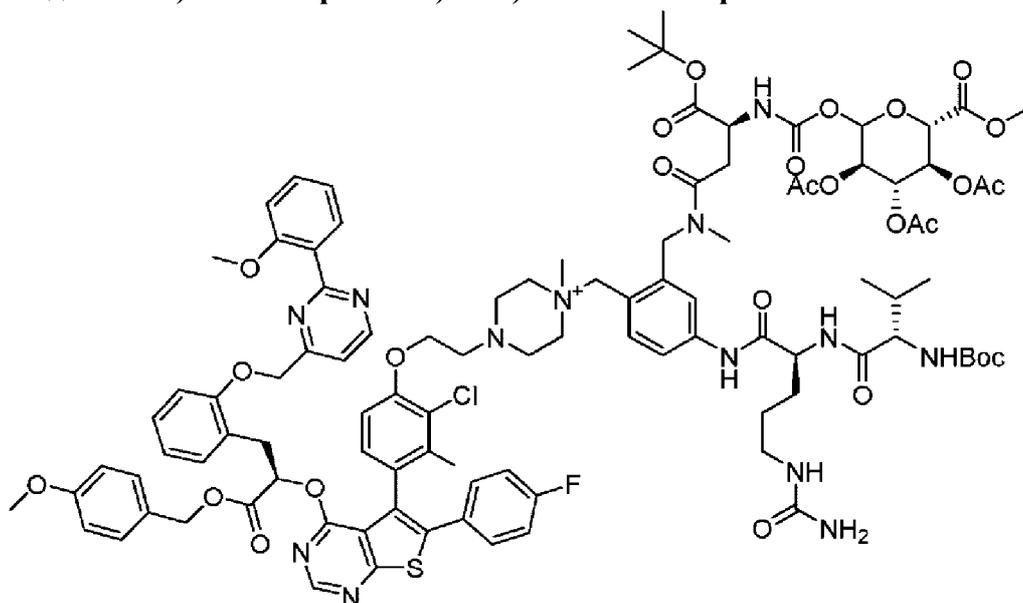
Синтез (3S)-4-(трет-бутокси)-4-оксо-3-((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)амино)бутановой кислоты



К 4-бензил 1-(трет-бутил) (((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)-L-аспартату (50 мг, 0,078 ммоль, 1,0 экв.), растворенному в MeOH (2 мл), добавляют гидроксид палладия (5,49 мг, 7,82 мкмоль, 0,1 экв.). Атмосферу реакции меняют на водород. После перемешивания в течение 16 ч, реакционную смесь фильтруют через слой целита. Фильтрат удаляют в вакууме с получением (3S)-4-(трет-бутокси)-4-оксо-3-((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)амино)бутановой кислоты. МСВР: [M-H]⁻: 548,4, Rt=1,79 мин (5 мин кислый способ).

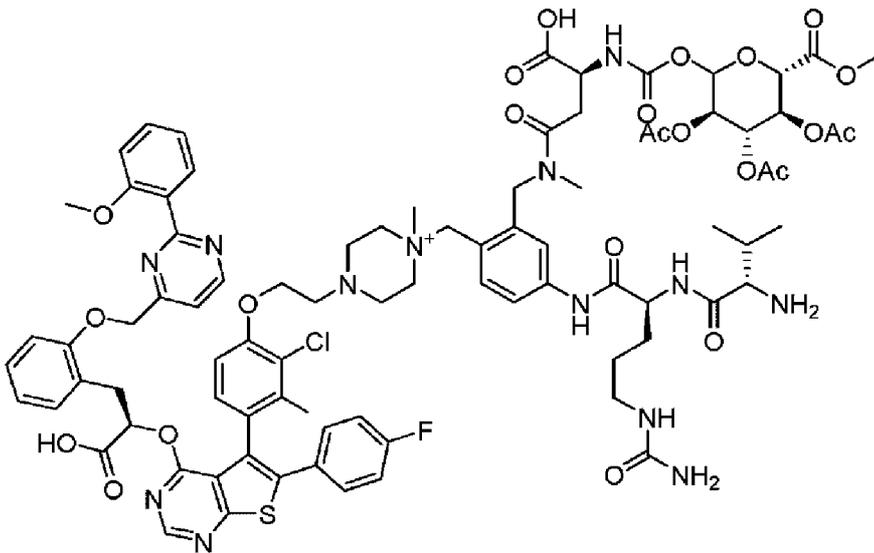
Синтез 1-(2-(((3S)-4-(трет-бутокси)-N-метил-4-оксо-3-((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)амино)бутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-2-

метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



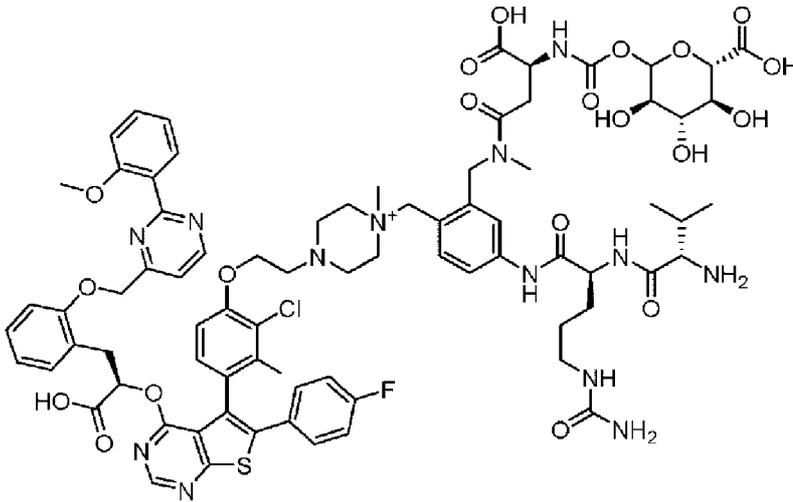
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ** 7 с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (30 мг, 0,016 ммоль, 1,0 экв.) и (3S)-4-(трет-бутоксикарбонил)амино)бутановой кислоты (12,5 мг, 0,250 ммоль, 1,4 экв.), получают 1-(2-(((3S)-4-(трет-бутоксикарбонил)амино)бутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M^+ =2030,7900; R_t =3,19 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((3S)-3-карбокси-N-метил-3-(((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)амино)пропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



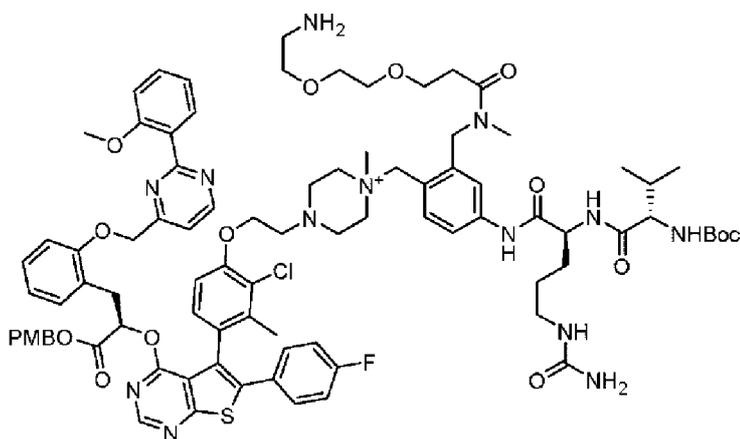
К 1-(2-(((3S)-4-(трет-бутоксид)-N-метил-4-оксо-3-((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)амино)бутанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-(4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (25,8 мг, 10,86 мкмоль, 1,0 экв.), растворенному в ДХМ (2 мл), добавляют ТФК (0,67 мл). После перемешивания в течение 2 ч, растворитель удаляют в вакууме с получением 1-(4-(((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((3S)-3-карбоксит-N-метил-3-((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)амино)пропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксит-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия. МСВР: $M^+ = 1754,6200$; $R_t = 2,31$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((3S)-3-карбоксит-3-((((3R,4S,5S,6S)-6-карбоксит-3,4,5-тригидрокси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)амино)-N-метилпропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксит-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



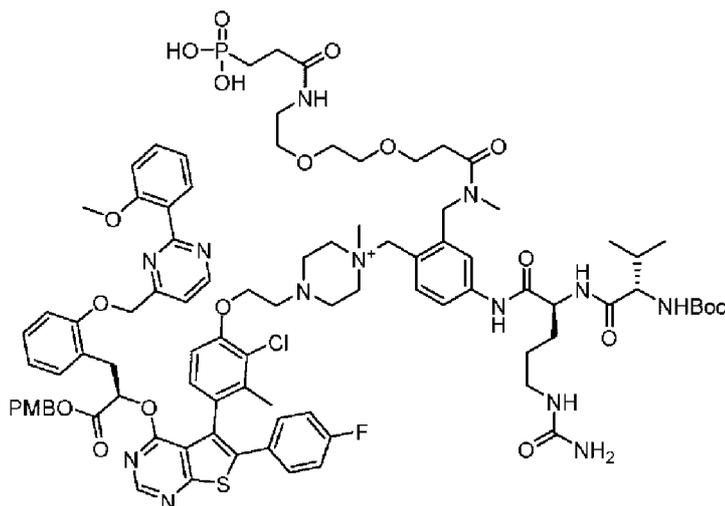
К 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((3S)-3-карбоксит-N-метил-3-((((3R,4S,5S,6S)-3,4,5-триацетокси-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)амино)пропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксит-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксит)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ию (26 мг, 0,012 ммоль, 1,0 экв.), растворенному в ТГФ (1 мл) и MeOH (1 мл), добавляют гидроксид лития (5,20 мг, 0,124 ммоль, 10 экв.). После перемешивания в течение 2 часов, растворитель удаляют в вакууме. Добавляют воду (1 мл), ТФК (0,2 мл), MeCN (1 мл) и ДМСО (4 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-70% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((3S)-3-карбоксит-3-((((3R,4S,5S,6S)-6-карбоксит-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)амино)-N-метилпропанамидо)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксит-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксит)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺=1614,5800; Rt=2,04 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксит-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксит)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((3S)-3-карбоксит-3-((((3R,4S,5S,6S)-6-карбоксит-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)карбонил)амино)-N-метилпропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксит)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L69-P1)



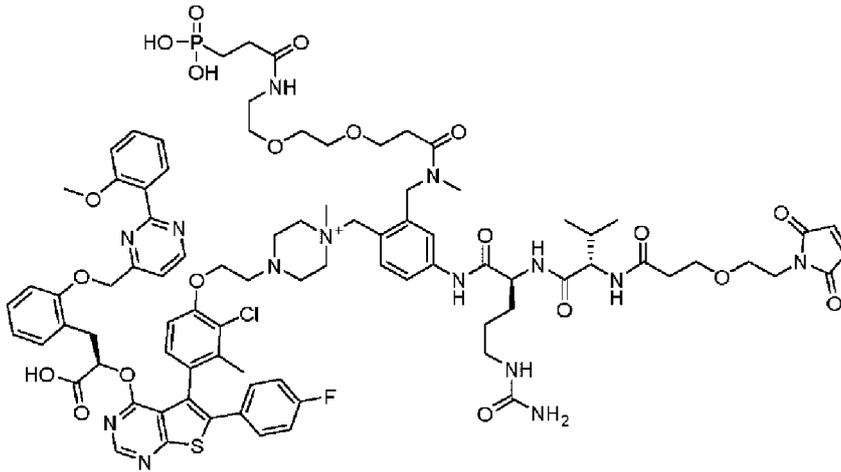
Смесь 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-(4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (45 мг, 0,026 ммоль), 1-(9H-флуорен-9-ил)-3-оксо-2,7,10-триокса-4-азатридекан-13-овой кислоты (12 мг, 0,030 ммоль), ГБТУ (12 мг, 0,032 ммоль) и ДИПЭА (0,023 мл, 0,13 ммоль) в ДМФ (1 мл) перемешивают при КТ в течение 30 мин. Me_2NH (2М в ТГФ, 0,065 мл, 0,13 ммоль) добавляют и смесь перемешивают при КТ в течение 1 ч. Дополнительное количество Me_2NH (2М в ТГФ, 0,1 мл, 0,2 ммоль) добавляют. Смесь продолжают перемешивать при КТ в течение 1 ч, разбавляют ДМСО (3 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией ($\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(2-((3-(2-(2-аминоэтокси)этокси)-N-метилпропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-(4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1658,7200$, $R_t = 2,57$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2-метил-3,13-диоксо-15-фосфоно-6,9-диокса-2,12-диазапентадецил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-(4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



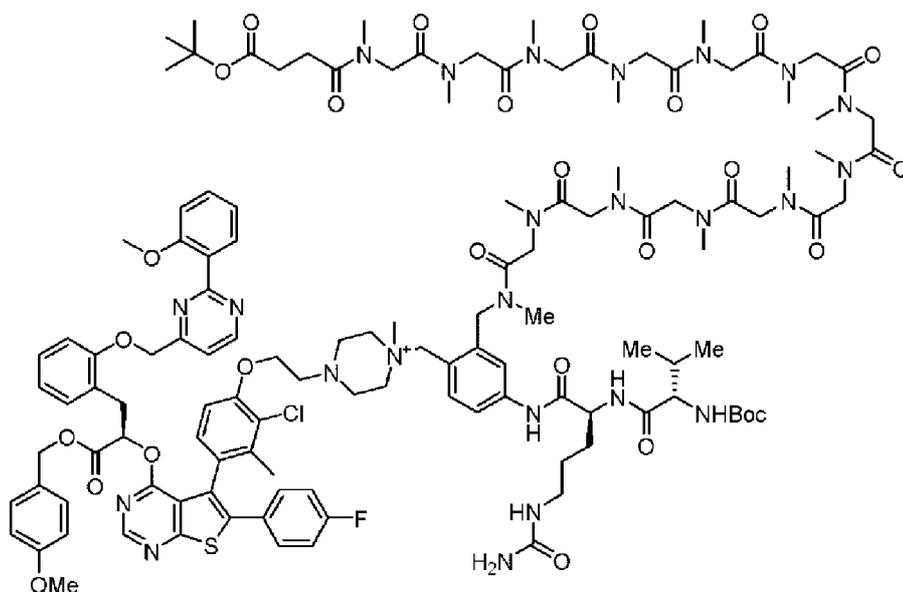
Смесь 3-фосфопропионовой кислоты (11 мг, 0,071 ммоль), ГБТУ (27 мг, 0,071 ммоль) и ДИПЭА (0,060 мл, 0,34 ммоль) в ДМФ (0,5 мл) перемешивают при КТ в течение 10 мин. Эту смесь добавляют к раствору 1-(2-((3-(2-(2-аминоэтокси)этокси)-N-метилпропанамидо)метил)-4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (40 мг, 0,021 ммоль) и ДИПЭА (0,010 мл, 0,057 ммоль) в ДМФ (0,5 мл). Смесь перемешивают при КТ в течение 2 дней. Смесь разбавляют ДМСО (3 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2-метил-3,13-диоксо-15-фосфоно-6,9-диокса-2,12-диазапентадецил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺= 1794,7100, Rt=2,78 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2-метил-3,13-диоксо-15-фосфоно-6,9-диокса-2,12-диазапентадецил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L41-P1)



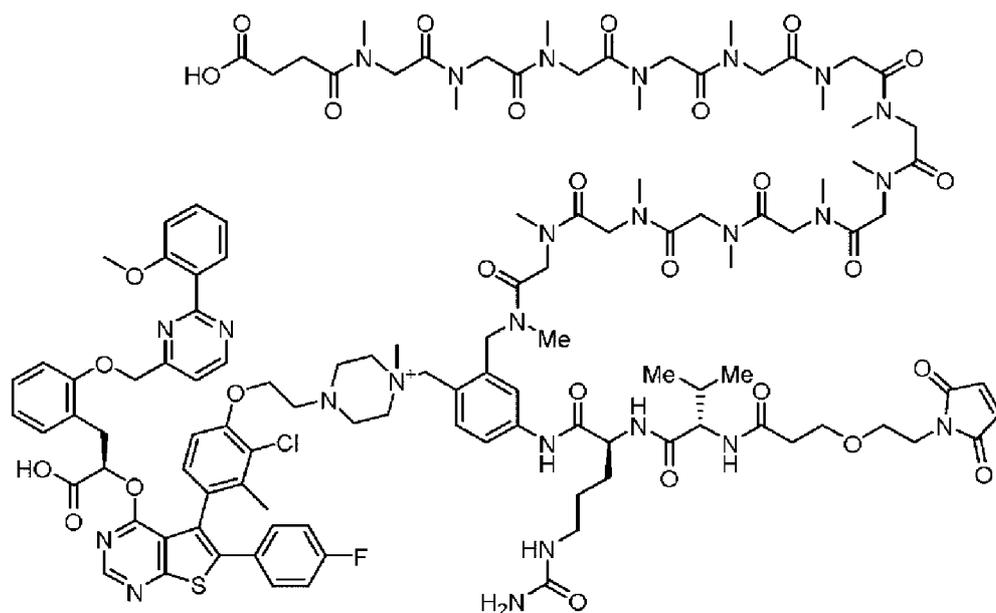
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** (за исключением того, что продукт после первой стадии с ТФК/CH₂Cl₂ очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией [MeCN/H₂O, 0,1% NH₄OH модификатор]) с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2-метил-3,13-диоксо-15-фосфоно-6,9-диокса-2,12-диазапентадецил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием, получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2-метил-3,13-диоксо-15-фосфоно-6,9-диокса-2,12-диазапентадецил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺= 1769,4500, Rt=2,33 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,44,44-пентадекаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42-тетрадекаоксо-43-окса-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-тридеказапентатетраконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



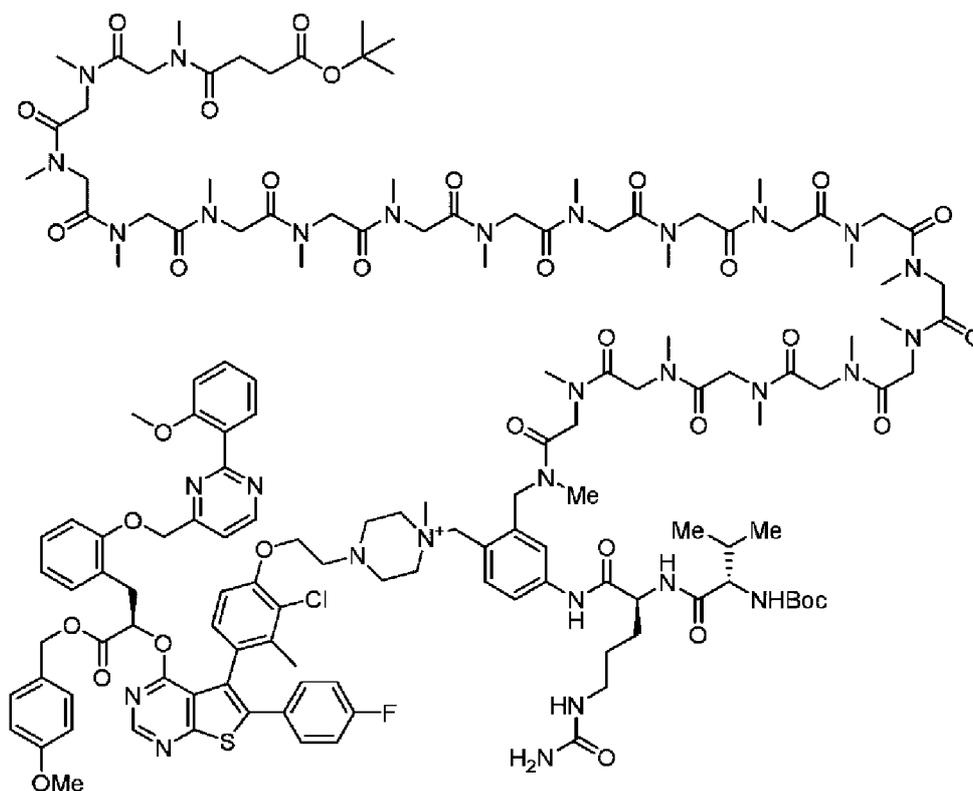
К перемешиваемому раствору 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (43,6 мг, 0,025 ммоль, 1,0 экв.), 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,42,42-тетрадекаметил-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-тридекаоксо-41-окса-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-додекаазатритетраконтановой кислоты (25,9 мг, 0,025 ммоль, 1,0 экв.) и ГАТУ (10,5 мг, 0,028 ммоль, 1,1 экв.) в ДМФ (0,25 мл) добавляют ДИПЭА (22 мкл, 0,126 ммоль, 5,0 экв.). Полученный раствор перемешивают при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Реакционную смесь разбавляют 1 мл ДМСО и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,44,44-пентадекаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42-тетрадекаоксо-43-окса-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-тридекаазапентатетраконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР М⁺ 2508,1499 Rt=2,78 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(2-(41-карбоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-тридекаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-тридекаоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-тридекаазагентетраконтил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (L35-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,44,44-пентадекаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42-тетрадекаоксо-43-окса-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-тридекаазептетраконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (50,4 мг, 0,019 ммоль, 1,0 экв.), получают 1-(2-(41-карбокси-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-тридекаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-тридекаоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-тридекаазептетраконтил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксипропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксипропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺ 2427,0400, rt=2,30 мин. (5 мин кислый способ).

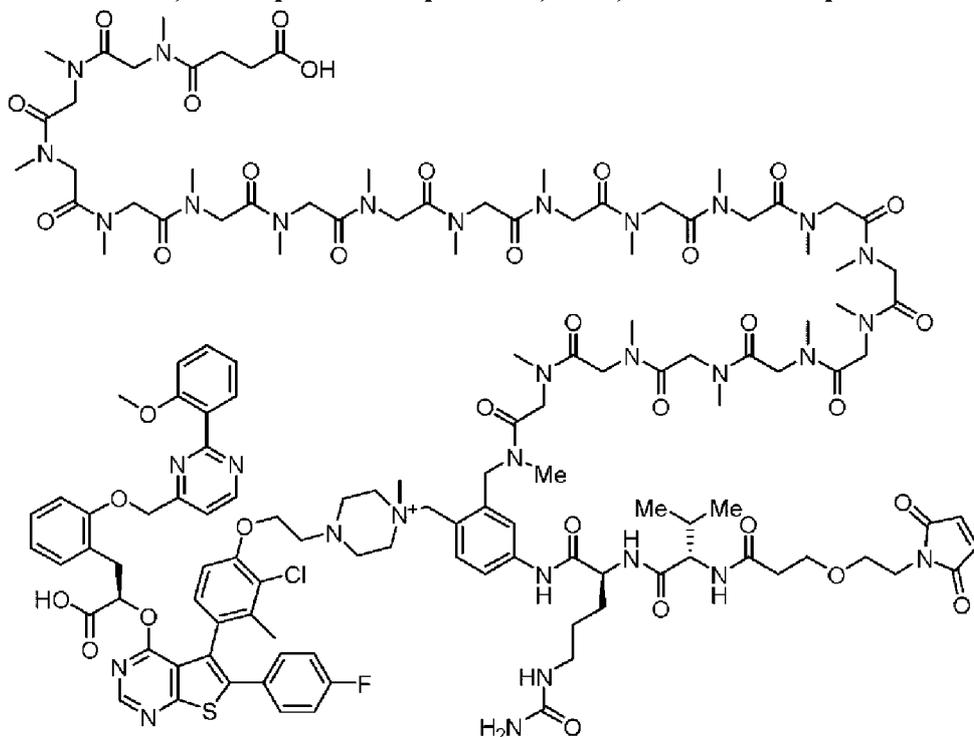
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,62,62-геникозаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-икозаоксо-61-окса-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-нонадекаазатригексаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



К перемешиваемому раствору 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (31,9 мг, 0,018 ммоль, 1,0 экв.), 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,60,60-икозаметил-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58-нонадекаоксо-59-окса-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54-октадекаазагенгексаконтановой кислоты (26,8 мг, 0,018 ммоль, 1,0 экв.) и ГАТУ (7,7 мг, 0,020 ммоль, 1,1 экв.) в ДМФ (0,25 мл) добавляют ДИПЭА (16 мкл, 0,092 ммоль, 5,0 экв.). Полученный раствор перемешивают при температуре окружающей среды в течение 1 часа. Реакционную смесь разбавляют 1 мл ДМСО и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,62,62-геникозаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-икозаоксо-61-окса-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-нонадекаазатригексаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР М⁺ 2934,3601 Rt=2,73 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(2-(59-карбоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-нонадекаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-нонадекаоксо-

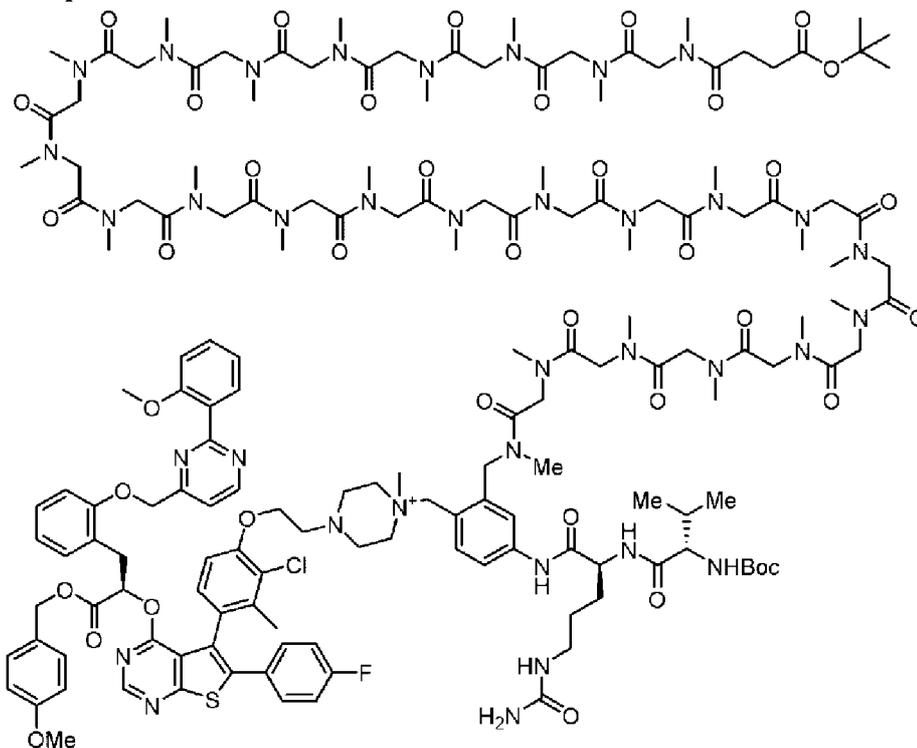
2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-нонадекаазанонапентаконтил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (L36-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ** 3 с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,62,62-геникозаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60-икозаоксо-61-окса-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-нонадекаазатригексаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (45,5 мг, 0,015 ммоль, 1,0 экв.), получают 1-(2-(59-карбокси-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-нонадекаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-нонадекаоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56-нонадекаазанонапентаконтил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺ 2853,2766, t_r=2,20 мин. (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,80,80-

гептакозаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-
гексакозаоксо-79-окса-
2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-
пентакозаазагеноктаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-
метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-
оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-
метилпиперазин-1-ия



К перемешиваемому раствору 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (27,8 мг, 0,016 ммоль, 1,0 экв.), 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,78,78-гексакозаметил-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаоксо-77-окса-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаазаногаптаконтановой кислоты (30,2 мг, 0,016 ммоль, 1,0 экв.) и ГАТУ (6,7 мг, 0,018 ммоль, 1,1 экв.) в ДМФ (0,25 мл) добавляют ДИПЭА (14 мкл, 0,080 ммоль, 5,0 экв.). Полученный раствор перемешивают при температуре окружающей среды в течение 1 часа. реакционную смесь разбавляют 1 мл ДМСО и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,80,80-гептакозаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-

гексакозаоксо-79-окса-

2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-

пентакозаазагеноктаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР М⁺ 3360,5798 Rt=2,68 мин (5 мин кислый способ).

Синтез

1-(2-(77-карбокси-

2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-пентакозаметил-

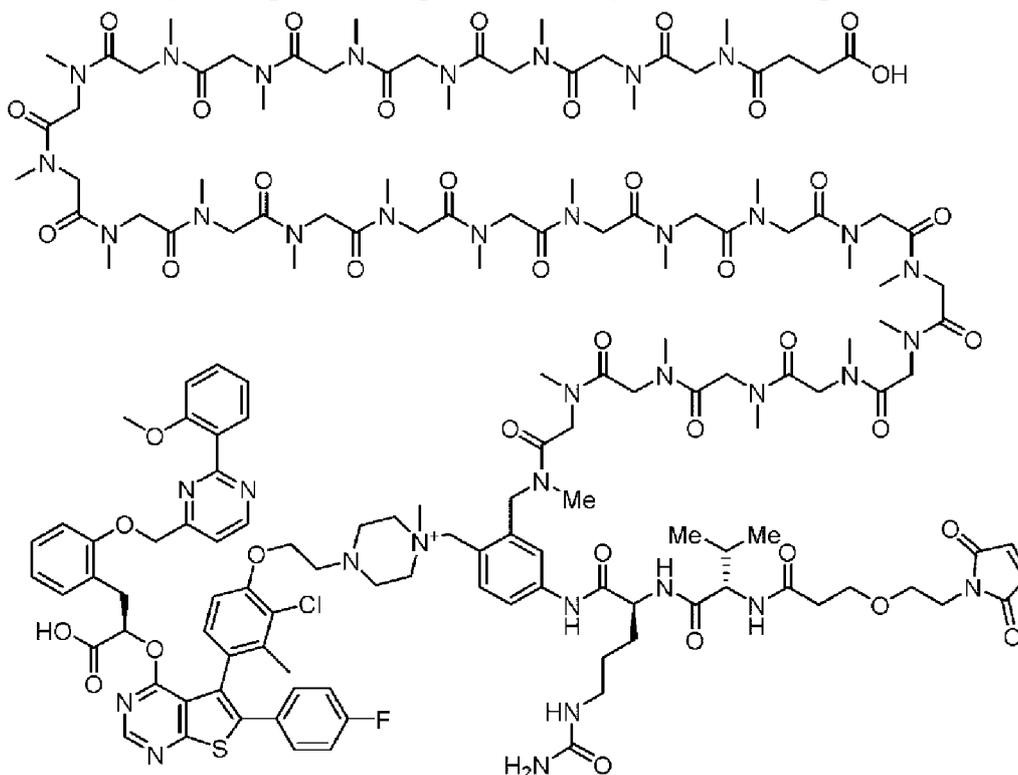
3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75-пентакозаоксо-

2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-

пентакозаазагептагептаконтил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-

уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-

метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (L37-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ** 3 с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-

бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-

(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,80,80-

гептакозаметил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-

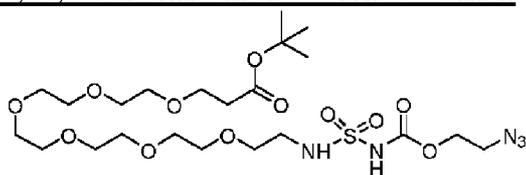
гексакозаоксо-79-окса-

2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-

пентакозаазагеноктаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-

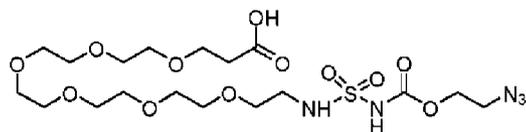
оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфеноксипропан-1-ил)-1-метилпиперазин-1-ий (41,3 мг, 0,012 ммоль, 1,0 экв.), получают 1-(2-(77-карбокситетрагидропиримидин-5-ил)-3-метилфеноксипропан-1-ил)-1-метилпиперазин-1-ий)-3,6,9,12,15,18-гексаоксагеникозан-21-оат. МСВР: M_+ 3279,4678, $t_r=2,21$ мин. (5 мин кислый способ).

Синтез Трет-бутил 1-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)-3,6,9,12,15,18-гексаоксагеникозан-21-оата



К 2-азидоэтан-1-олу (105 мг, 1,21 ммоль) в CH_2Cl_2 (15 мл) добавляют сероизоцианатидный хлорид (0,105 мл, 1,21 ммоль) при 0°C . Смесь перемешивают при 0°C в течение 30 мин. затем добавляют ТЭА (0,336 мл, 2,41 ммоль) и трет-бутил 1-амино-3,6,9,12,15,18-гексаоксагеникозан-21-оат (518 мг, 1,27 ммоль) в CH_2Cl_2 (1 мл). Смесь перемешивают при 0°C в течение 1ч и кт в течение 2 ч, затем гасят насыщ. NH_4Cl и 1 N HCl (2,4 мл). Водный слой экстрагируют CH_2Cl_2 (5X). Органические слои сушат над безв. Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют роторным испарением с получением прозрачного масла. очистка флэш-хроматографией (0-15% MeOH в CH_2Cl_2 , определение ELSD) дает трет-бутил 1-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)-3,6,9,12,15,18-гексаоксагеникозан-21-оат в виде прозрачного масла (474 мг, 0,788 ммоль): ЖХМС: $M^+\text{NH}_4^+=619,5$, $R_t=0,94$ мин (кислый, 2 мин). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 11,33 (с, 1H), 7,76 (с, 1H), 4,28-4,20 (м, 2H), 3,60 (тд, $J=5,6, 5,0, 2,9$ Гц, 4H), 3,55-3,45 (м, 22H), 3,16-3,04 (м, 2H), 2,46-2,38 (м, 2H), 1,41 (с, 9H).

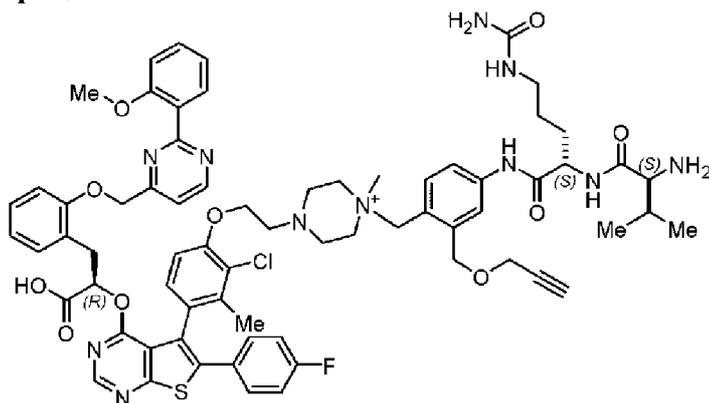
Синтез 1-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)-3,6,9,12,15,18-гексаоксагеникозан-21-овой кислоты



К трет-бутил 1-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)-3,6,9,12,15,18-гексаоксагеникозан-21-оату (145 мг, 0,241 ммоль) в CH_2Cl_2 (1 мл) при 0°C добавляют ТФК (1 мл, 12,98 ммоль). Смесь перемешивают при КТ в течение 1,45 ч, затем концентрируют роторным испарением при 25°C на водяной бане и сушат в высоком вакууме в течение 30 мин. Остаток азеотропно сушат с безв. толуолом (3 X 2 мл) и сушат в вакууме в течение ночи с получением 1-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)-3,6,9,12,15,18-

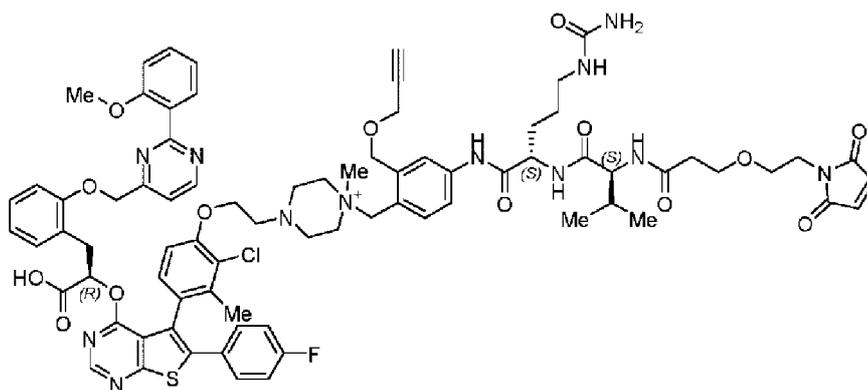
гексаоксагеникозан-21-овой кислоты в виде прозрачного масла (147 мг, 89% массовых к теоретическому выходу): ЖХМС: M^+ =546,3, 0,65 мин (кислый, 2 мин, ELSD); ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 11,30 (с, 1H), 7,77-7,71 (м, 1H), 4,25-4,19 (м, 2H), 3,63-3,55 (м, 4H), 3,54-3,45 (м, 22H), 3,07 (кв, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,47-2,40 (м, 2H).

Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетата



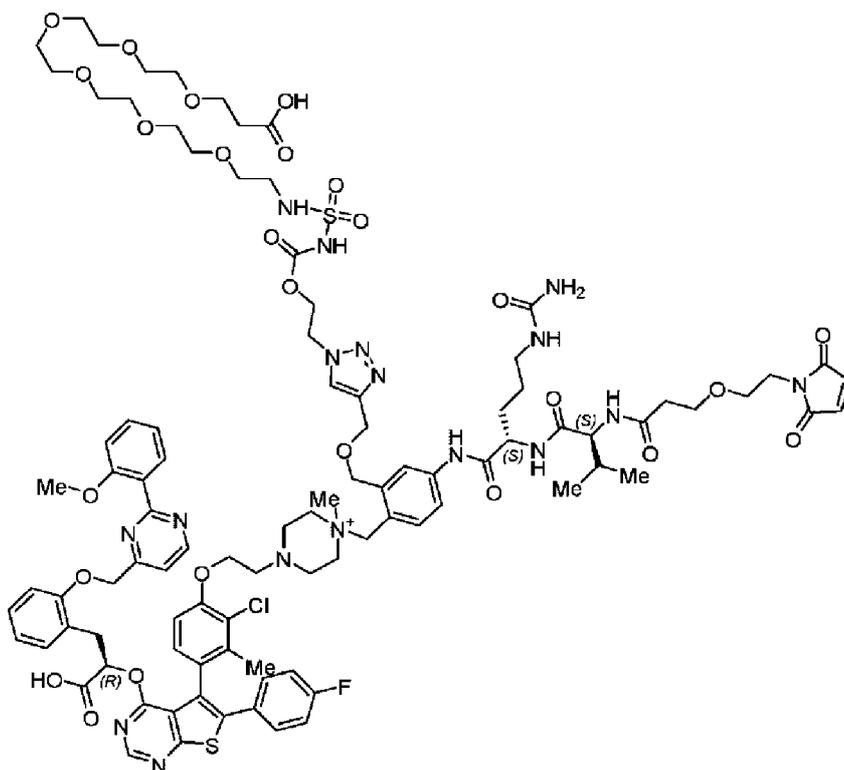
К 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетату (321 мг, 0,210 ммоль) при 0°C добавляют 25% ТФК в CH_2Cl_2 (12,3 мл, 40,0 ммоль). Реакционную смесь повышают до Кт, перемешивают в течение 1 ч, затем концентрируют в высоком вакууме при КТ на водяной бане. Неочищенный продукт разбавляют ДМСО (3 мл) и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (150 г, 10-80% $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий трифторацетат получают в виде белого порошка (224 мг, 0,158 ммоль): МСВР: M^+ =1304,5100, $R_t=2,15$ мин (5 мин кислый)

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетата



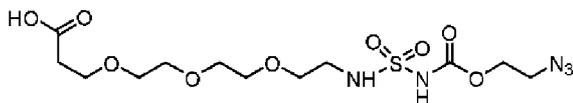
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетатом (164 мг, 0,115 ммоль) и Mal-Peg1-NHS эфиром (72 мг, 0,23 ммоль), 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетат получают в виде белого порошка (170 мг, 0,105 ммоль), МСВР: $M^+ = 1499,5699$, $R_t = 2,45$ мин (5 мин кислый); ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 10,16 (с, 1H), 8,81 (д, $J = 5,1$ Гц, 1H), 8,54 (с, 1H), 8,07 (д, $J = 7,2$ Гц, 1H), 7,75 (д, $J = 8,5$ Гц, 1H), 7,69 (д, $J = 6,9$ Гц, 2H), 7,56 (д, $J = 5,1$ Гц, 1H), 7,45 (дд, $J = 7,5, 1,8$ Гц, 1H), 7,42-7,29 (м, 3H), 7,24 (дд, $J = 8,9, 5,4$ Гц, 2H), 7,18-7,05 (м, 5H), 6,99-6,91 (м, 4H), 6,65 (т, $J = 7,4$ Гц, 1H), 6,15 (д, $J = 7,0$ Гц, 1H), 5,91 (с, 1H), 5,43 (дд, $J = 9,8, 3,5$ Гц, 1H), 5,23-5,12 (м, 2H), 4,54 (д, $J = 11,2$ Гц, 4H), 4,33-4,09 (м, 7H), 3,69 (с, 3H), 3,42-2,78 (м, 32H, наложение с ДМСО), 2,39-2,20 (м, 2H), 1,91-1,81 (м, 1H), 1,77 (с, 3H), 1,46 (дд, $J = 93,8, 31,3$ Гц, 3H), 0,76 (дд, $J = 13,8, 6,7$ Гц, 6H); ^{19}F ЯМР (376 МГц, ДМСО- d_6): -112,18 м.д.

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксо-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((1-(2-(((N-(20-карбоксо-3,6,9,12,15,18-гексаоксаикозил)сульфамойл)карбамоил)окси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетата (L59-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокситетрагидро-2H-пиррол-1-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-(((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий трифторацетатом (32 мг, 0,021 ммоль) и 1-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)-3,6,9,12,15,18-гексаоксагеникозан-21-овой кислотой (26,2 мг, 0,043 ммоль), 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокситетрагидро-2H-пиррол-1-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((1-(2-((N-(20-карбокситетрагидро-2H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий трифторацетат получают в виде белого порошка: МСВР: М⁺=2044,7700, R_t=2,36 мин (5 мин кислый).

Синтез **3-(2-(2-(2-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)этокси)этокси)этокси)пропановой кислоты**

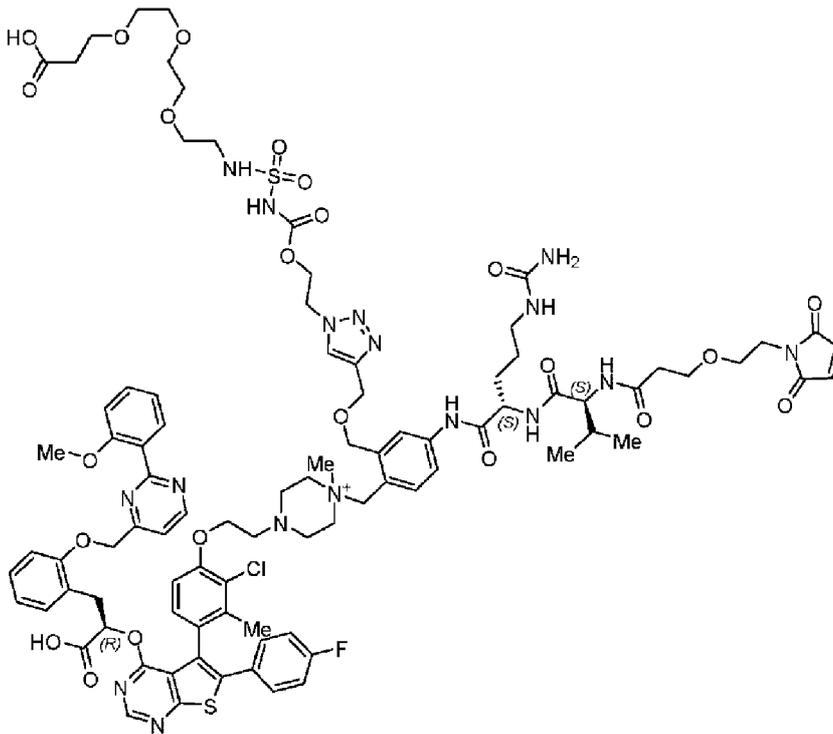


К 2-азидоэтан-1-олу (105 мг, 1,21 ммоль) в CH₂Cl₂ (15 мл) добавляют сероизоцианатидный хлорид (0,105 мл, 1,21 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивают при 0°C в течение 30 мин. При 0°C добавляют ТЭА (0,336 мл, 2,41 ммоль) и трет-бутил 3-(2-(2-(2-

аминоэтокси)этокси)этокси) пропаноат (401 мг, >80% техническая чистота, 1,447 ммоль) в CH_2Cl_2 (1 мл). После перемешивания при 0°C в течение 1 ч, затем при кт в течение 1 с, смесь гасят насыщ. NH_4Cl и 1 N HCl (2,4 мл). Водный слой экстрагируют CH_2Cl_2 (5X). Органические слои сушат над безв. Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют роторным испарением с получением прозрачного масла. После очистки флэш-хроматографией (0-15% MeOH в CH_2Cl_2 , ELSD определение) трет-бутил 3-(2-(2-(2-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)этокси)этокси)этокси)пропаноат получают в виде густого прозрачного масла (356 мг, 0,910 ммоль): ЖХМС: $\text{M}+\text{NH}_4^+=487,4$, $R_t=0,90$ мин (кислый, 2 мин, ELSD); ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 11,31 (с, 1H), 7,78-7,70 (м, 1H), 4,26-4,19 (м, 2H), 3,58 (тд, $J=5,6, 5,0, 3,7$ Гц, 4H), 3,53-3,39 (м, 10H), 3,10-3,03 (м, 2H), 2,44-2,39 (м, 2H), 1,40 (с, 9H).

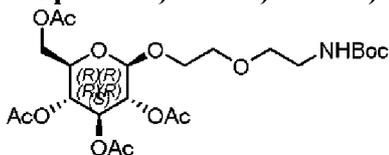
К трет-бутил 3-(2-(2-(2-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)этокси)этокси)этокси)пропаноату (162 мг, 0,345 ммоль) в CH_2Cl_2 (1 мл) при 0°C добавляют ТФК (1 мл, 13,0 ммоль). После перемешивания при КТ в течение 2 ч, смесь концентрируют роторным испарением на водяной бане при 25°C . Остаток сушат в высоком вакууме в течение 30 мин, азеотропной перегонкой с безв. толуолом (3X 2 мл) и в вакууме в течение ночи с получением 3-(2-(2-(2-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)этокси)этокси)этокси)пропановой кислоты в виде густого масла (139 мг, 0,335 ммоль): ЖХМС: $\text{M}+\text{NH}_4^+=431,4$, $R_t=0,62$ мин (кислый, 2 мин, ELSD); ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 11,32 (д, $J=15,4$ Гц, 1H), 7,78-7,69 (м, 1H), 4,27-4,15 (м, 2H), 3,67-3,54 (м, 8H), 3,49-3,42 (м, 4H), 3,07 (кв, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,47-2,39 (м, 4H).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокситетрагидро-2H-пиррол-2-ил)-2-метоксибензил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((1-(2-(((N-((2-(2-(2-(2-карбокситетрагидро-2H-пиррол-2-ил)-2-метоксибензил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)этокси)этил)сульфамоил)карбамоил)окси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетата (L60-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетатом (15 мг, 10 мкмоль) и 3-(2-(2-(2-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамойл)амино)этокси)этокси)этокси)пропановой кислотой (12 мг, 0,029 ммоль), 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((1-(2-(((N-2-(2-(2-(2-карбоксиэтокси)этокси)этокси)этил)сульфамойл)карбамоил)окси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетат получают в виде белого порошка: МСВР: MS+=1912,7000, Rt=2,38 мин (5 мин кислый).

Синтез **(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)этокси)этокси)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетата**



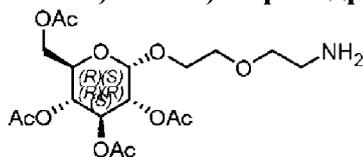
Смесь трет-бутил (2-(2-гидроксиэтокси)этил)карбамата (1535 мг, 7,48 ммоль), Ag₂CO₃ (8248 мг, 14,96 ммоль) и куска кристаллического йода в CH₂Cl₂ (6 мл) перемешивают с порошковыми 4А молекулярными ситами (1400 мг) в течение 15 мин. К смеси добавляют (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(ацетоксиметил)-6-бромтетрагидро-2H-пиран-3,4,5-

триил триацетат (2050 мг, 4,99 ммоль) в CH_2Cl_2 (6,00 мл), также перемешанный с порошковыми 4А молекулярными ситами (1400 мг) в течение 15 мин до добавления. Полученную смесь накрывают алюминиевой фольгой и перемешивают при КТ в течение 60 ч и затем фильтруют через целит с промыванием EtOAc . Фильтрат концентрируют с получением прозрачного масла, которое очищают флэш-хроматографией (0-10% MeOH в CH_2Cl_2 , ELSD определение) с получением, после концентрации соответствующих фракций, густого масла (640 мг) в виде 47/53% смеси желаемого (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)этокси)этокси)тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триил триацетата и (2*S*,3*aR*,5*R*,6*R*,7*S*,7*aR*)-5-(ацетоксиметил)-2-(2-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)этокси)этокси)-2-метилтетрагидро-5*H*-[1,3]диоксо[4,5-*b*]пиран-6,7-диил-диацетата: ЖХМС: $\text{MC}^+=536,4$, $\text{Rt}=0,96$ мин (2 мин, кислота, ELSD); ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 6,77 (с, 2*H*), 5,78 (с, 2*H*), 5,76 (с, 1*H*), 5,28 (т, $J=9,5$ Гц, 1*H*), 5,04 (т, $J=3,1$ Гц, 1*H*), 4,91 (т, $J=9,7$ Гц, 1*H*), 4,87-4,74 (м, 3*H*), 4,38 (ддд, $J=5,2, 3,1, 0,9$ Гц, 1*H*), 4,24-4,10 (м, 3*H*), 4,07-3,96 (м, 2*H*), 3,92 (дт, $J=8,8, 4,1$ Гц, 1*H*), 3,80 (дт, $J=11,2, 4,4$ Гц, 1*H*), 3,68-3,60 (м, 1*H*), 3,57-3,45 (м, 7*H*), 3,38 (тд, $J=6,2, 1,5$ Гц, 7*H*), 3,07 (дт, $J=6,1, 3,0$ Гц, 4*H*), 2,08 (с, 3*H*), 2,06 (с, 3*H*), 2,04 (с, 6*H*), 2,01 (с, 3*H*), 2,00 (с, 3*H*), 1,95 (с, 3*H*), 1,65 (с, 3*H*), 1,39 (с, 19*H*).

Синтез

(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-

аминоэтокси)этокси)тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триила триацетата



К 47/53% смеси (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-((трет-

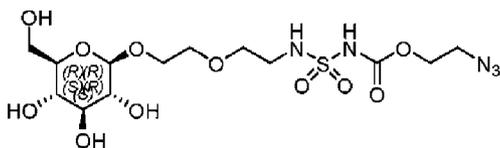
бутоксикарбонил)амино)этокси)этокси)тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триил триацетата и (2*S*,3*aR*,5*R*,6*R*,7*S*,7*aR*)-5-(ацетоксиметил)-2-(2-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)этокси)этокси)-2-метилтетрагидро-5*H*-[1,3]диоксо[4,5-*b*]пиран-6,7-диил диацетата (622 мг, 1,161 ммоль) в CH_2Cl_2 (16 мл) при 0°C добавляют ТФК (4,0 мл, 52 ммоль). Реакционную смесь повышают до Кт и перемешивают в течение 1 ч. Смесь концентрируют и остаток сушат в вакууме в течение 60 мин с получением светло-желтого масла. Неочищенный продукт разбавляют DMCO (4 мл) и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (5-60% $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$, 0,1% ТФК модификатор, ELSD определение). После лиофилизации подходящих фракций, (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-аминоэтокси)этокси)тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триил триацетат, в виде соли ТФК, получают в виде белого порошка (195 мг, 0,355 ммоль): ЖХМС: $\text{MC}^+=436,4$, $\text{Rt}=0,58$ мин (кислый, 2 мин); ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 7,72 (с, 3*H*), 5,27 (т, $J=9,4$ Гц, 1*H*), 4,92 (т, $J=9,6$ Гц, 1*H*), 4,86-4,75 (м, 2*H*), 4,22-4,15 (м, 1*H*), 4,07-3,94 (м, 3*H*), 3,89-3,53 (м, 14*H*, смешан с DMCO), 3,03-2,91 (м, 2*H*), 2,03 (с, 3*H*), 2,01 (с, 3*H*), 1,99 (с, 3*H*), 1,94 (с, 3*H*).

Синтез

2-азидоэтил

(N-(2-(2-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-тригидрокси-6-

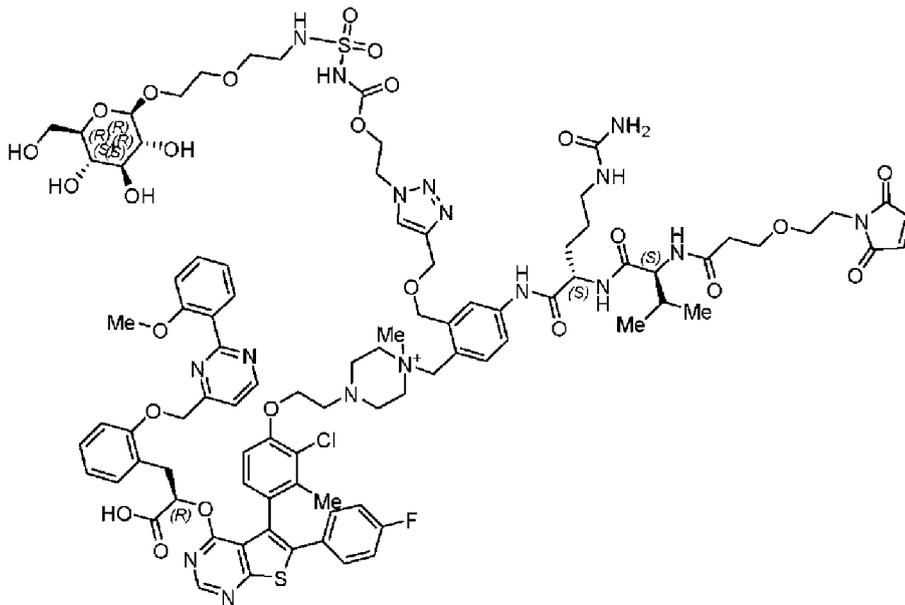
(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)окси)этокси)этил)сульфамоил)карбамат



К 2-азидоэтан-1-олу (16 мг, 0,18 ммоль) в CH_2Cl_2 (2,5 мл) добавляют сероизоцианатидный хлорид (0,016 мл, 0,184 ммоль) при 0°C . Смесь перемешивают при 0°C в течение 1 ч, затем добавляют ТЭА (0,128 мл, 0,919 ммоль) и (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-аминоэтокси)этокси)тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триил триацетат, в виде соли ТФК (116 мг, 0,211 ммоль) в CH_2Cl_2 (1,5 мл). После перемешивания при 0°C в течение 1 ч, затем при кт в течение 1 ч, смесь гасят насыщ. NH_4Cl и 1 N HCl (0,919 мл, 0,919 ммоль). Водный слой экстрагируют CH_2Cl_2 (5X). Органический слой над безв. Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют роторным испарением с получением (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-((*N*-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)этокси)этокси)тетрагидро-2*H*-пиран-3,4,5-триила триацетата в виде прозрачного масла (121 мг): ЖХМС: $\text{MC}+=628$, $\text{Rt}=0,85$ мин (кислый, 2 мин, ELSD); $^1\text{H ЯМР}$ (400 МГц, DMCO-d_6) δ 11,32 (с, 1*H*), 7,79-7,71 (м, 1*H*), 5,26 (т, $J=9,5$ Гц, 1*H*), 4,90 (т, $J=9,7$ Гц, 1*H*), 4,85-4,73 (м, 2*H*), 4,25-4,14 (м, 3*H*), 4,06-3,94 (м, 2*H*), 3,79 (ддд, $J=11,3, 5,3, 3,8$ Гц, 1*H*), 3,68-3,40 (м, 8*H*), 3,16-3,00 (м, 3*H*), 2,02 (с, 3*H*), 2,00 (с, 3*H*), 1,98 (с, 3*H*), 1,94 (с, 3*H*).

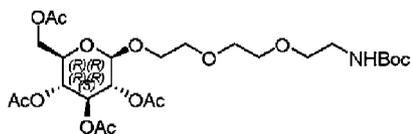
Полученный выше продукт растворяют в диоксане (3 мл) и охлаждают при 0°C . Добавляют $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0,5 М в воде, 2,94 мл, 1,47 ммоль). Полученный прозрачный раствор перемешивают при КТ в течение 1 ч и затем гасят при 0°C с HCl (5*N*, 0,147 мл, 0,735 ммоль). Смесь концентрируют роторным испарением при 20°C на водяной бане для удаления большей части диоксана. Остаточный раствор (около 3 мл) очищают преп-ВЭЖХ (Sunfire 5 мкм 30×50 мм колонка, 2-12% ацетонитрил с 0,1% FA в воде. Скорость потока: 75 мл/мин., MC 459,3, 476,3 определение) с получением, после удаления растворителя подходящих фракций лиофилизацией, 2-азидоэтил (*N*-(2-(2-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)окси)этокси)этил)сульфамоил)карбамата в виде полутвердого вещества (64 мг, 0,14 ммоль): ЖХМС: $\text{M}+\text{NH}_4^+=477,3$, $\text{MS}=-458$ (кислый, 2 мин, ELSD); $^1\text{H ЯМР}$ (400 МГц, DMCO-d_6) δ 11,32 (с, 1*H*), 7,71 (с, 1*H*), 4,96 (д, $J=4,9$ Гц, 1*H*), 4,89 (дд, $J=13,7, 4,8$ Гц, 2*H*), 4,47 (т, $J=5,9$ Гц, 1*H*), 4,22 (т, $J=5,0$ Гц, 2*H*), 4,15 (д, $J=7,8$ Гц, 1*H*), 3,90-3,81 (м, 1*H*), 3,67 (ддд, $J=12,0, 5,7, 2,0$ Гц, 1*H*), 3,62-3,39 (м, 8*H*), 3,19-2,90 (м, 6*H*).

Синтез 4-(2-(4-(4-((*R*)-1-карбокситетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)карбонил)амино)этокси)этил)сульфамоил)карбамоил)окси)этил)-1*H*-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетата (L63-P1)



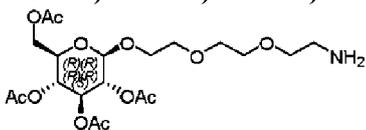
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетатом (36 мг, 0,022 ммоль) и 2-азидоэтил (N-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)этил)сульфамоил)карбамоил)окси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетат получают в виде белого порошка: МСВР: МС+=1958,6899, Rt=2,31 мин (5 мин кислый); ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 11,17 (с, 1H), 10,16 (с, 1H), 8,81 (д, J=5,2 Гц, 1H), 8,54 (с, 1H), 8,07 (д, J=13,5 Гц, 2H), 7,74 (д, J=8,6 Гц, 1H), 7,68 (кв, J=4,3, 2,7 Гц, 3H), 7,56 (д, J=5,1 Гц, 1H), 7,45 (дд, J=7,6, 1,8 Гц, 1H), 7,42-7,28 (м, 3H), 7,23 (ддд, J=8,5, 5,4, 2,6 Гц, 2H), 7,17-7,04 (м, 5H), 6,99-6,91 (м, 4H), 6,65 (т, J=7,4 Гц, 1H), 6,14 (дд, J=7,6, 1,8 Гц, 1H), 5,93 (с, 1H), 5,43 (дд, J=9,8, 3,6 Гц, 1H), 5,23-5,11 (м, 2H), 4,59 (дд, J=11,3, 7,4 Гц, 8H), 4,42-4,06 (м, 12H), 3,53-3,17 (м, 27H, наложение с ДМСО), 3,09-2,80 (м, 17H, наложение с ДМСО), 2,39-2,20 (м, 3H), 1,86 (h, J=6,9 Гц, 1H), 1,77 (с, 3H), 1,68-1,21 (м, 5H), 0,76 (дд, J=13,8, 6,8 Гц, 6H); ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆): -112,18 м.д.

Синтез (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(ацетоксиметил)-6-((2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триила триацетата



Смесь трет-бутил (2-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)этил)карбамата (1046 мг, 4,20 ммоль), Ag_2CO_3 (4627 мг, 8,39 ммоль) и куска кристаллического йода в CH_2Cl_2 (3 мл) перемешивают с порошковыми 4А молекулярными ситами (700 мг) в течение 15 мин. К смеси добавляют (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(ацетоксиметил)-6-бромтетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетат (1150 мг, 2,80 ммоль) в CH_2Cl_2 (3,00 мл) (также перемешанного с порошковыми 4А молекулярными ситами (700 мг) в течение 15 мин). Полученную смесь накрывают алюминиевой фольгой и перемешивают при КТ в течение 60 ч, затем фильтруют через целит с промыванием EtOAc . Фильтрат концентрируют с получением прозрачного масла. Очистка флэш-хроматографией (20-100% EtOAc в гептане, ELSD определение) дает 28/72% смесь (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(ацетоксиметил)-6-((2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триила триацетата и (2S,3aR,5R,6R,7S,7aR)-5-(ацетоксиметил)-2-((2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)окси)-2-метилтетрагидро-5H-[1,3]диоксо[4,5-b]пиран-6,7-диила диацетата в виде густого прозрачного масла (307 мг, 0,529 ммоль): ЖХМС: $\text{MC}^+=580,4$, $\text{Rt}=0,96$ мин (кислоты, 2 мин, ELSD только); ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 6,74 (с, 3H), 5,76 (с, 8H), 5,26 (т, $J=9,5$ Гц, 1H), 5,02 (т, $J=3,1$ Гц, 3H), 4,90 (т, $J=9,7$ Гц, 1H), 4,84-4,72 (м, 5H), 4,37 (ддд, $J=5,2, 3,1, 0,9$ Гц, 3H), 4,18 (дд, $J=12,2, 5,0$ Гц, 1H), 4,11 (д, $J=4,5$ Гц, 5H), 4,08-3,94 (м, 4H), 3,91 (дт, $J=8,6, 4,1$ Гц, 3H), 3,85-3,75 (м, 1H), 3,66-3,58 (м, 1H), 3,58-3,51 (м, 7H), 3,42-3,31 (м, 14H), 3,06 (кв, $J=5,9$ Гц, 8H), 2,07 (с, 7H), 2,05 (с, 7H), 2,02 (с, 10H), 1,99 (д, $J=1,0$ Гц, 6H), 1,99 (с, 3H), 1,94 (с, 3H), 1,63 (с, 7H), 1,38 (с, 36H), 1,18 (т, $J=7,1$ Гц, 4H).

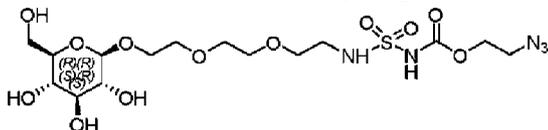
Синтез (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этокси)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триила триацетата



К смеси (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(ацетоксиметил)-6-((2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триила триацетата и (2S,3aR,5R,6R,7S,7aR)-5-(ацетоксиметил)-2-((2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатридекан-13-ил)окси)-2-метилтетрагидро-5H-[1,3]диоксо[4,5-b]пиран-6,7-диила диацетата (323 мг, 0,557 ммоль) в CH_2Cl_2 (8 мл) при 0°C добавляют ТФК (1,9 мл, 25 ммоль). После перемешивания при КТ в течение 45 мин, смесь концентрируют и остаток сушат под вакуумом в течение 60 мин с получением светло-желтого масла. Очистка флэш-хроматографией (0-20% MeOH в CH_2Cl_2 , с 0,2% NH_4OH модификатором в MeOH , ELSD определение) дает (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этокси)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетат в виде прозрачного масла (82 мг, 0,171 ммоль). ЖХМС: $\text{MC}^+=480,4$, $\text{Rt}=0,61$ мин (кислый, 2 мин,

ELSD); ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,76 (с, 2H), 5,28 (т, $J=9,4$ Гц, 1H), 4,93 (т, $J=9,7$ Гц, 1H), 4,86-4,75 (м, 2H), 4,20 (дд, $J=12,2, 5,0$ Гц, 1H), 4,08-3,95 (м, 2H), 3,88-3,79 (м, 1H), 3,67-3,53 (м, 1H, наложение с ДМСО), 3,00 (кв, $J=5,5$ Гц, 2H), 2,04 (с, 3H), 2,02 (с, 3H), 2,00 (с, 3H), 1,96 (с, 3H).

Синтез 2-азидоэтил (N-(2-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)этокси)этил)сульфамоил)карбамата

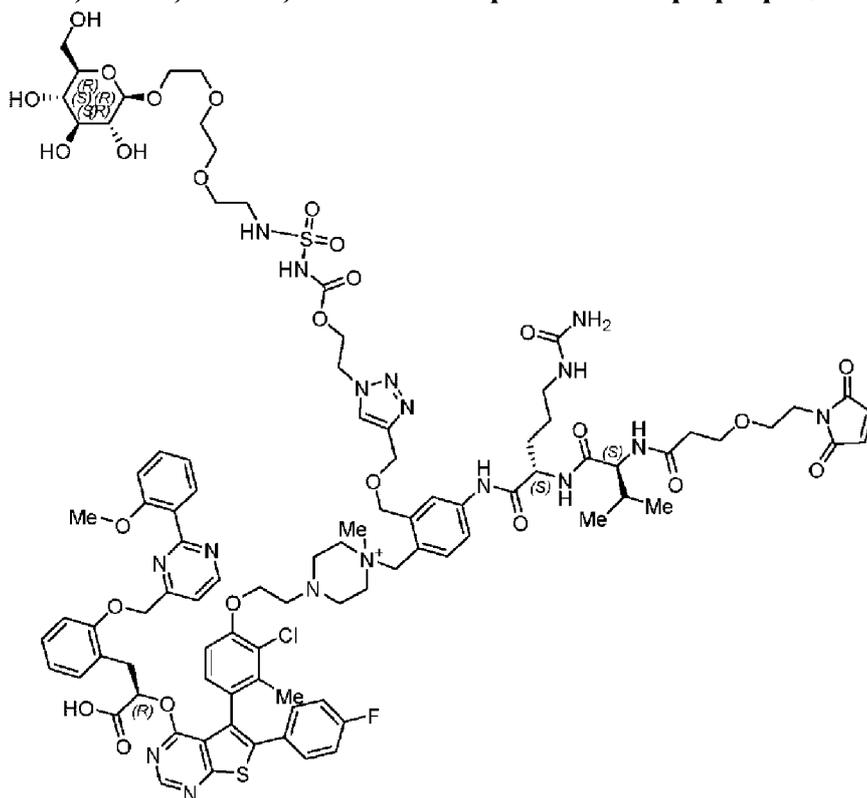


К 2-азидоэтан-1-олу (12,5 мг, 0,144 ммоль) в CH_2Cl_2 (2 мл) добавляют сероизоцианатидный хлорид (0,012 мл, 0,14 ммоль) при 0°C . Смесь перемешивают при 0°C в течение 45 мин, затем добавляют ТЭА (0,040 мл, 0,29 ммоль) и (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этокси)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетат (77 мг, 0,16 ммоль) в CH_2Cl_2 (1 мл). После перемешивания при 0°C в течение 1ч, затем при КТ в течение 1 ч, Смесь гасят насыщ. NH_4Cl и 1 N HCl (0,29 мл). Водный слой экстрагируют CH_2Cl_2 (5X). Органические слои сушат над безв. Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют роторным испарением с получением (2R,3R,4S,5R,6R)-2-(ацетоксиметил)-6-(2-(2-(2-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)этокси)этокси)этокси)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триила триацетата в виде прозрачного масла (75 мг): ЖХМС: 0,97 мин, $\text{MS}^+=672,4, 96$, $\text{Rt}=0,87$ мин (кислый, 2 мин, ELSD).

К полученному выше продукту в диоксане (4 мл) при 0°C добавляют $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0,5 М в воде, 3,45 мл, 1,72 ммоль). Полученный прозрачный раствор перемешивают при КТ в течение 1 ч и затем концентрируют роторным испарением с 20°C на водяной бане. Остаток очищают преп-ВЭЖХ (Sunfire 5 мкм 30×50 мм колонка, 2-12% ацетонитрил с 0,1% FA в воде. Скорость потока: 75 мл/мин, МС 503,5, 520,3 определение) с получением, после лиофилизации, 2-азидоэтил (N-(2-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)этокси)этил)сульфамоил)карбамата в виде прозрачной тонкой пленки (22 мг, 0,044 ммоль): ЖХМС: $\text{MS}^+=504,3$, $\text{Rt}=0,52$ мин (кислый, 2 мин, ELSD); ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 11,31 (с, 1H), 7,74 (с, 1H), 4,96 (д, $J=4,9$ Гц, 1H), 4,89 (дд, $J=12,5, 4,8$ Гц, 2H), 4,47 (т, $J=5,9$ Гц, 1H), 4,22 (т, $J=5,0$ Гц, 2H), 4,15 (д, $J=7,8$ Гц, 1H), 3,93-3,82 (м, 1H), 3,67 (дд, $J=11,2, 5,8$ Гц, 1H), 3,62-3,40 (м, 12H), 3,17-2,90 (м, 6H).

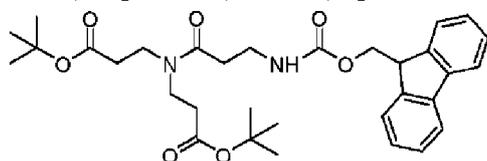
Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-(2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксид)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((1-(2-(((N-(2-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)этокси)этил)сульфамоил)карбамоил)окси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-

ил)метокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетата (L62-P1)



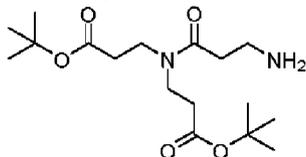
Следуя ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2 с 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ием трифторацетатом (32 мг, 0,020 ммоль) и 2-азидоэтил (N-(2-(2-(2-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)этокси)этил)сульфамоил)карбаматом (21 мг, 0,042 ммоль), 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((1-(2-(((N-(2-(2-(2-(((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)этокси)этил)сульфамоил)карбамоил)окси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий трифторацетат получают в виде белого порошка: МСВР: МС+=2002,7100, Rt=2,37 мин (5 мин кислый).

Синтез **Ди-трет-бутил** **3,3'-(((3-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)пропаноил)азандиил)дипропионата**



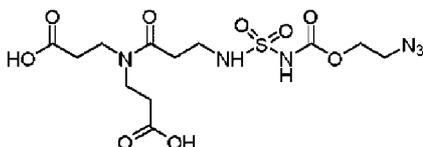
К смеси ди-трет-бутил 3,3'-азандиилдипропионата (403 мг, 1,47 ммоль), 3-((((9Н-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)пропановой кислоты (505 мг, 1,62 ммоль) и ДИПЭА (0,309 мл, 1,77 ммоль) в CH_2Cl_2 (3 мл) добавляют *N*-(диметиламинопропил)-*N'*-этил-карбодиимид гидрохлорид.НCl (367 мг, 1,92 ммоль). После перемешивания при КТ в течение 2 ч, смесь гасят насыщ. NH_4Cl и экстрагируют CH_2Cl_2 (3X). Объединенную органическую фазу промывают насыщенным раствором соли, сушат над безв. Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют. Полученный неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией (0-50% EtOAc в гептане) с получением ди-трет-бутил 3,3'-((3-((((9Н-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)пропаноил)азандиил)дипропионата в виде белой пены (290 мг, 0,511 ммоль): ЖХМС: МС+=567,5, Rt=1,32 мин (кислота, 2 мин); PMR: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,94-7,88 (м, 2H), 7,70 (д, J=7,5 Гц, 2H), 7,47-7,40 (м, 2H), 7,40-7,31 (м, 2H), 7,22 (т, J=5,7 Гц, 1H), 4,31 (д, J=6,8 Гц, 2H), 4,26-4,18 (м, 1H), 3,56-3,03 (м, 8H), 2,50-2,38 (м, 4H), 1,41 (с, 9H), 1,40 (с, 9H).

Синтез ди-трет-бутил 3,3'-((3-аминопропаноил)азандиил)дипропионат, 1-(9Н-флуорен-9-ил)-*N,N*-диметилметанамина



К ди-трет-бутил 3,3'-((3-((((9Н-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)пропаноил)азандиил)дипропионату (288 мг, 0,508 ммоль) в CH_2Cl_2 (3 мл) добавляют диметиламин (2 N в ТГФ, 1 мл, 2 ммоль). Смесь перемешивают при КТ в течение 1 ч. Добавляют еще диметиламин (2 N в ТГФ, 1 мл, 2 ммоль). После перемешивания в течение дополнительных 4 ч, смесь концентрируют и остаток очищают флэш-хроматографией (0-25% MeOH в CH_2Cl_2 , 37 мин, 0,2% NH_4OH модификатор в MeOH, ELSD определение) с получением ди-трет-бутил 3,3'-((3-аминопропаноил)азандиил)дипропионат, 1-(9Н-флуорен-9-ил)-*N,N*-диметилметанамина в виде светло-коричневого масла (62 мг, 0,472 ммоль): ЖХМС: МС+=345,4, Rt=0,76 мин (кислотас, 2 мин, ELSD); ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 4,05 (с, 2H), 3,51 (т, J=7,2 Гц, 2H), 3,43 (т, J=7,3 Гц, 2H), 3,31 (с, 2H), 2,79 (т, J=6,4 Гц, 2H), 2,55-2,45 (м, 17H, наложение с DMSO), 2,41 (т, J=7,3 Гц, 2H), 1,41 (с, 9H), 1,40 (с, 9H).

Синтез 3,3'-((3-((*N*-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамоил)амино)пропаноил)азандиил)дипропионовой кислоты

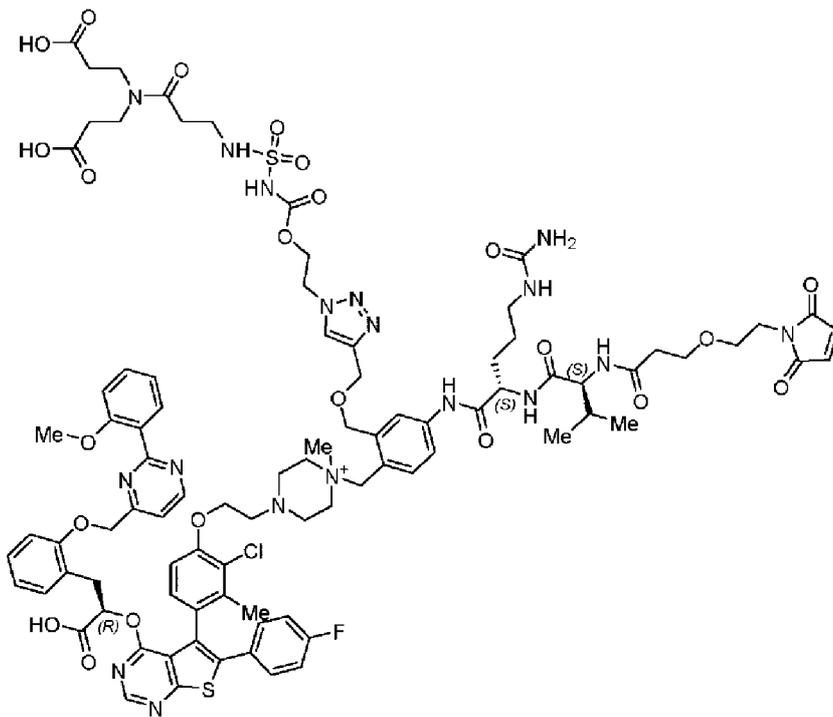


К 2-азидоэтан-1-олу (16 мг, 0,18 ммоль) в CH_2Cl_2 (2,5 мл) добавляют сероизоцианатидный хлорид (0,016 мл, 0,18 ммоль) при 0°C . Смесь перемешивают при 0°C в течение 30 мин, затем добавляют ТЭА (0,051 мл, 0,37 ммоль) и ди-трет-бутил 3,3'-((3-

аминопропаноил)азандиил)дипропионат (73 мг, 0,21 ммоль) в CH_2Cl_2 (1 мл). После перемешивания при 0°C в течение 1 ч и затем при кт в течение 1 ч, смесь гасят насыщ. NH_4Cl и 1 N HCl (0,37 мл). Водный слой экстрагируют CH_2Cl_2 (5X). Органические слои сушат над безв. Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют роторным испарением. Полученный остаток очищают флэш-хроматографией (0-10% MeOH в CH_2Cl_2 , ELSD и UV214 определение) с получением ди-трет-бутил 3,3'-((3-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамойл)амино)пропаноил)азандиил)дипропионата в виде густого прозрачного масла (70 мг, 0,13 ммоль): ЖХМС $\text{MC}+=537,4$, $\text{Rt}=1,08$ мин (кислый, 2 мин, ELSD); ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 11,39 (с, 1H), 7,65-7,59 (м, 1H), 4,28-4,23 (м, 2H), 3,63-3,59 (м, 2H), 3,54-3,47 (м, 2H), 3,47-3,38 (м, 2H), 3,18-3,09 (м, 2H), 2,61-2,54 (м, 4H), 2,43 (дд, $J=8,5, 6,0$ Гц, 2H), 1,43 (с, 9H), 1,42 (с, 9H).

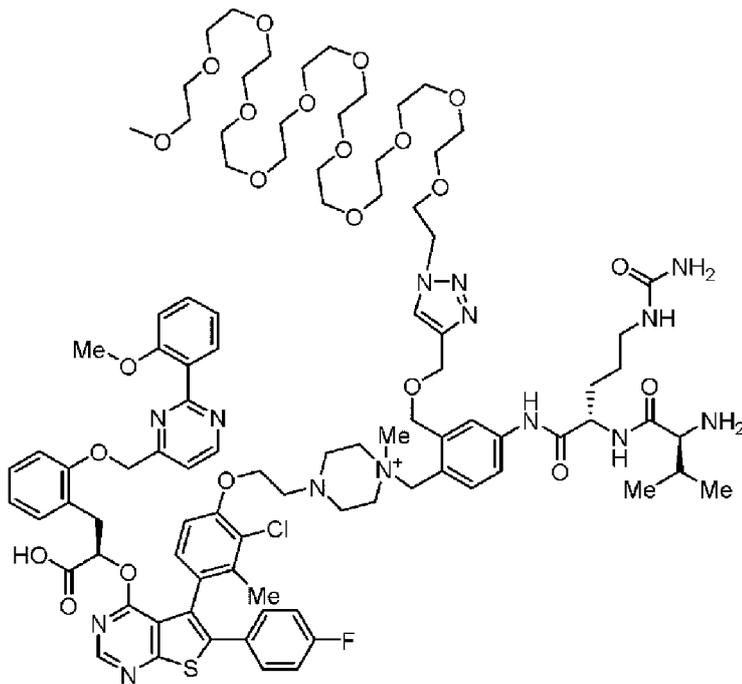
К полученному выше продукту в CH_2Cl_2 (2 мл) при 0°C добавляют ТФК (2 мл). После перемешивания при КТ в течение 1,5 ч, смесь концентрируют роторным испарением при 25°C на водяной бане. Остаток сушат в высоком вакууме в течение 30 мин, затем азеотропной перегонкой с безв. толуолом (3X 3 мл) и затем сушат в высоком вакууме в течение ночи с получением 3,3'-((3-((N-((2-азидоэтокси)карбонил)сульфамойл)амино)пропаноил)азандиил)дипропионовой кислоты в виде белого твердого вещества (72 мг, 77% массовых к теоретическому выходу. Его используют непосредственно на следующей стадии): ЖХМС $\text{MC}+=425,3$, $\text{Rt}=0,52$ мин (кислый, 2 мин, ELSD); ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 12,28 (с, 1H), 11,35 (с, 1H), 7,58 (т, $J=5,8$ Гц, 1H), 4,26-4,20 (м, 2H), 3,61-3,55 (м, 2H), 3,50 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 3,42 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 3,12 (кв, $J=6,8$ Гц, 2H), 2,56 (дд, $J=15,1, 7,4$ Гц, 4H), 2,43 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 2,08 (с, 1H).

Синтез **1-(2-(((1-(2-(((N-(3-(бис(2-карбоксиитил)амино)-3-оксопропил)сульфамойл)карбамоил)окси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбоксии-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксид)этил)-1-метилпиперазин-1-ия трифторацетата (L61-P1)**



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ийем трифторацетатом (20 мг, 0,012 ммоль) и 3,3'-((3-((N-((2-азидоэтоксид)карбонил)сульфамоил)амино)пропаноил)азандиил)дипропионовой кислотой (15 мг, 0,027 ммоль), 1-(2-(((1-(2-(((N-3-(бис(2-карбоксиэтил)амино)-3-оксопропил)сульфамоил)карбамоил)окси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий трифторацетат получают в виде белого порошка: МСВР: МС+=1923,6500 Rt=2,34 мин (5 мин кислый); ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 11,21 (с, 1H), 10,16 (с, 1H), 8,81 (д, J=5,1 Гц, 1H), 8,54 (с, 1H), 8,08 (д, J=13,7 Гц, 2H), 7,77-7,50 (м, 5H), 7,47-7,20 (м, 6H), 7,18-7,04 (м, 5H), 6,99-6,90 (м, 4H), 6,65 (т, J=7,4 Гц, 1H), 6,14 (дд, J=7,6, 1,7 Гц, 1H), 5,92 (с, 1H), 5,43 (дд, J=9,8, 3,5 Гц, 1H), 5,24-5,11 (м, 3H), 4,65-4,51 (м, 9H), 4,45-3,81 (м, 52H, наложение с ДМСО), 3,68 (с, 3H), 3,54-2,77 (м, 31H), 2,39-2,20 (м, 5H), 1,86 (кв, J=6,8 Гц, 1H), 1,77 (с, 3H), 1,69-1,00 (м, 6H), 0,76 (дд, J=13,9, 6,8 Гц, 6H); ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆): -112,16 м.д.

Синтез 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаоксагептатриаконтан-37-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия

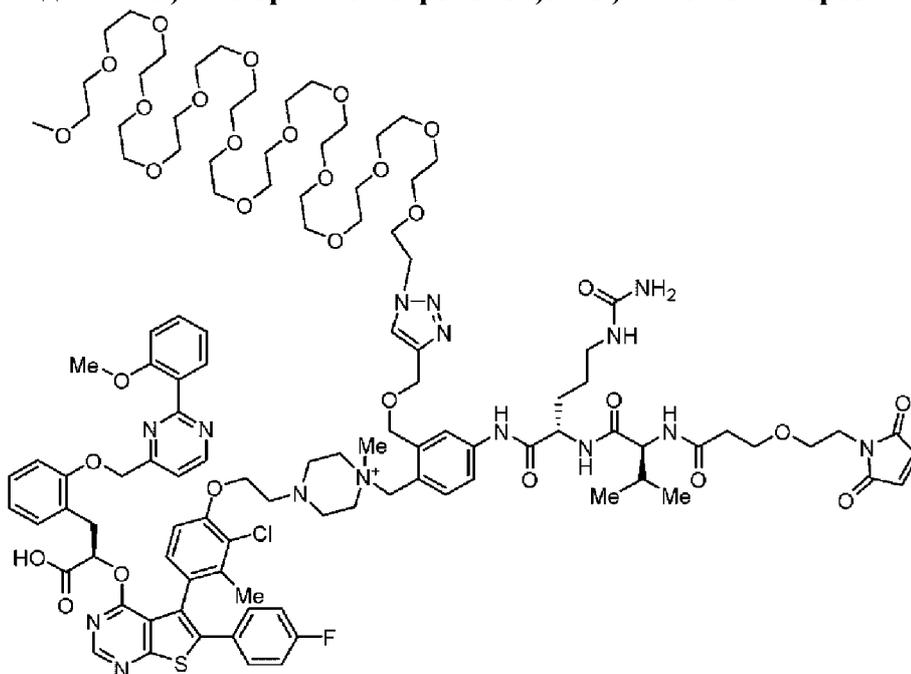


Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокситетрагидро-1H-пиррол-1-ил)этоксифенил)метокси)фенил)этоксифенил)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ийем (87,5 мг, 0,063 ммоль, 1,0 экв.) и mPEG12-Азидом (73,3 мг, 0,125 ммоль, 2 экв.), получают 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаоксагептатриаконтан-37-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокситетрагидро-1H-пиррол-1-ил)этоксифенил)метокси)фенил)этоксифенил)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+ = 1889,8544$, $R_t = 2,19$ мин (5 мин кислый способ).

Синтез 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаоксагептатриаконтан-37-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксипропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокситетрагидро-1H-пиррол-1-ил)этоксифенил)метокси)фенил)этоксифенил)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (L104-P1)

Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (155 мг, 0,119 ммоль, 1,0 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺= 1499,5699, Rt=2,39 мин (5 мин кислый способ).

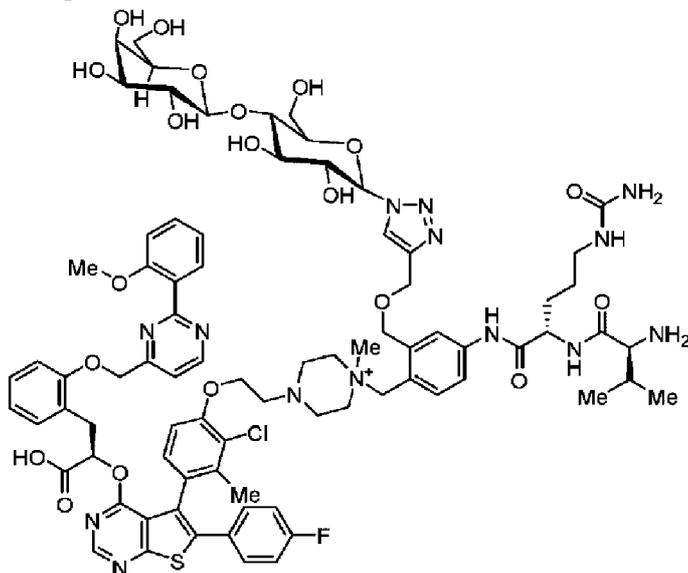
Синтез 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-гексадекаоксанонатетраконтан-49-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (L34-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ием (50 мг, 0,033 ммоль, 1,0 экв.) и m-PEG16-азидом (от Broadpharm BP-23558) (50,8 мг, 0,067 ммоль, 2 экв.), получают 1-(2-(((1-(2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47-гексадекаоксанонатетраконтан-49-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксид)пропанамидо)-3-

метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+=2261,0196$, $R_t=2,28$ мин (5 мин кислый способ).

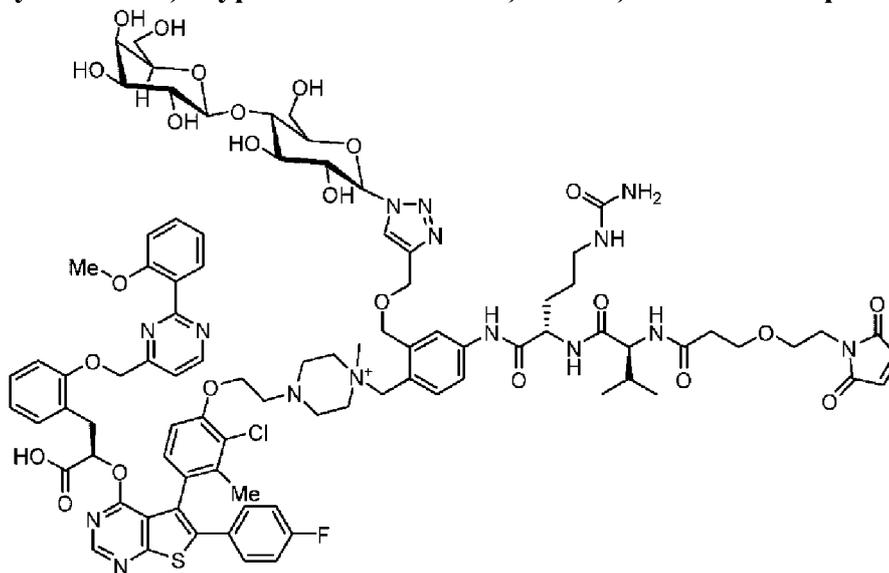
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (87,5 мг, 0,063 ммоль, 1,0 экв.) и 1-азидо-1-деокси-бета-D-лактопиранозидом (22,99 мг, 0,063 ммоль, 1 экв.), получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: $M^+=1671,6400$, $R_t=1,95$ мин (5 мин кислый способ).

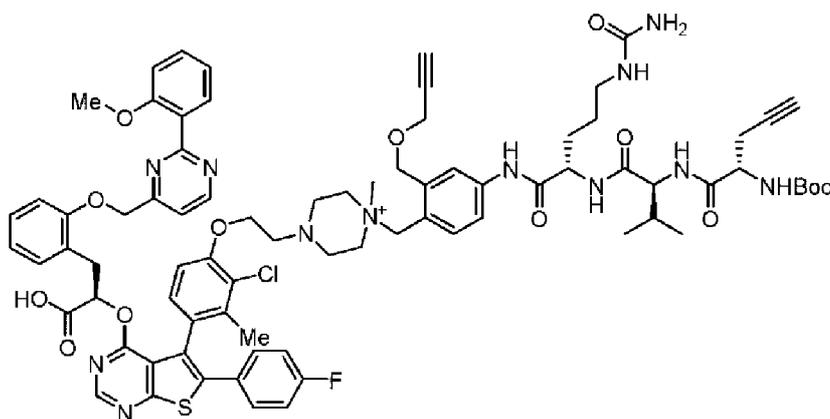
Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-

(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L46-P1)



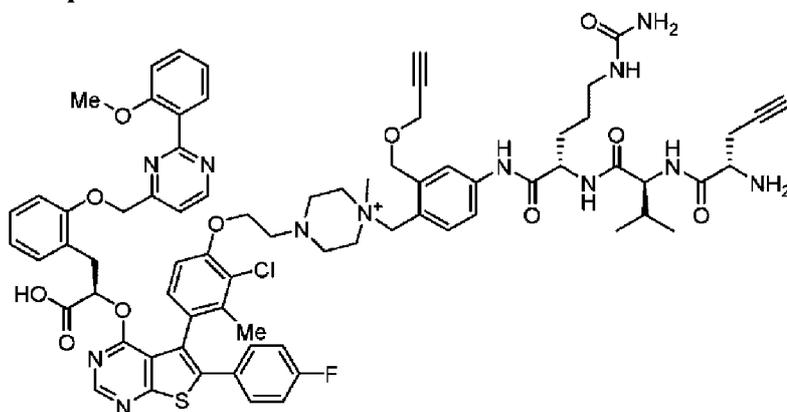
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокс)этил)-1-метилпиперазин-1-ием (35 мг, 0,020 ммоль, 1,0 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокс)этил)-1-(2-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M^+ = 1866,6899, R_t = 2,28 мин (5 мин кислый способ).

Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокс)этил)-1-(4-(((6S,9S,12S)-9-изопропил-2,2-диметил-4,7,10-триоксо-6-(проп-2-ин-1-ил)-12-(3-уреидопропил)-3-окса-5,8,11-триазатридекан-13-амидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия



К смеси Вос-пропаргил-Gly-ОН (40 мг, 0,188 ммоль, 1 экв.) и ГАТУ (71,3 мг, 0,188 ммоль, 1 экв.) в ДМФ (0,5 мл) добавляют ДИПЭА (65,5 мкл, 0,375 ммоль, 2 экв.). Смесь перемешивают при КТ в течение 30 мин. Затем раствор 1-(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия (245 мг, 0,188 ммоль, 1 экв.) в ДМФ (1 мл) добавляют в реакционную смесь. Реакционную смесь перемешивают при КТ в течение 30 мин. Неочищенную смесь разделяют на колонке С18 (100 картридж, MeCN/вода с 0,1% муравьиной кислотой, 0-100% за 15CV) с получением 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(4-((6S,9S,12S)-9-изопропил-2,2-диметил-4,7,10-триоксо-6-(проп-2-ин-1-ил)-12-(3-уреидопропил)-3-окса-5,8,11-триазатридекан-13-амидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия. МСВР: M^+ = 1499,6000, R_t = 2,91 мин (5 мин кислый способ).

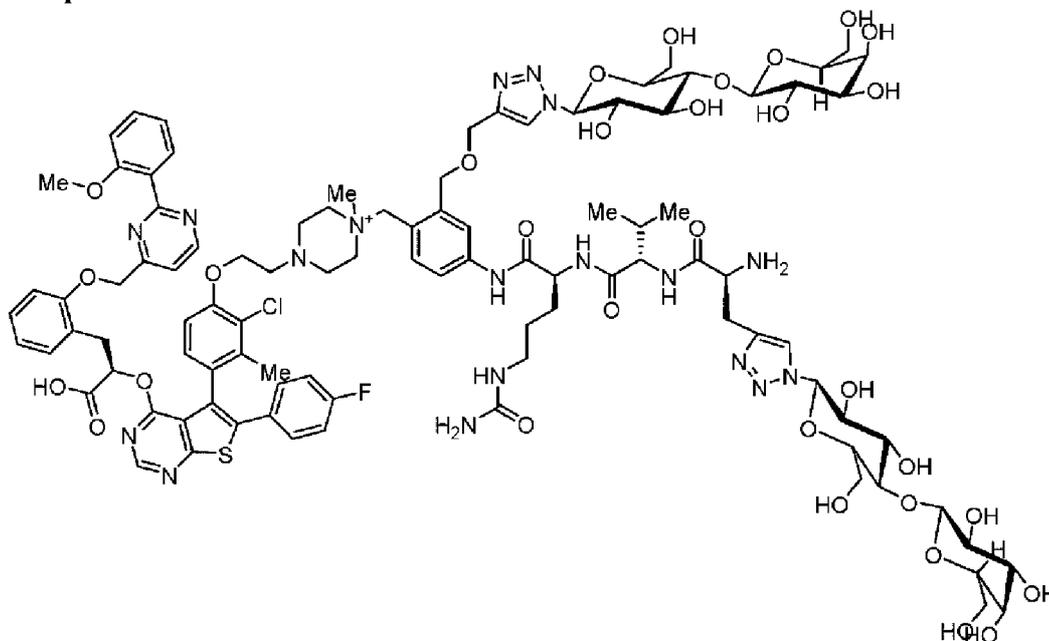
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-аминопент-4-инамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



При 0°C на бане с льдом и водой к 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-

d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксиэтил)-1-(4-((6S,9S,12S)-9-изопропил-2,2-диметил-4,7,10-триоксо-6-(проп-2-ин-1-ил)-12-(3-уреидопропил)-3-окса-5,8,11-триазатридекан-13-амидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-1-метилпиперазин-1-ию (56 мг, 0,037 ммоль) добавляют ТФК (25% в ДХМ) 2 мл, затем реакционную смесь повышают до КТ и перемешивают в течение 1ч. Неочищенную смесь концентрируют в высоком вакууме. Затем смесь растворяют в MeOH и очищают на C-18 колонке (50 г картридж, MeCN/вода с 0,1% муравьиной кислоты 0-100% за 16 CV) с получением 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-аминопент-4-инамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксиэтил)-1-метилпиперазин-1-ия. МСВР: M^+ = 1399,5400, R_t = 2,17 мин (5 мин кислый способ).

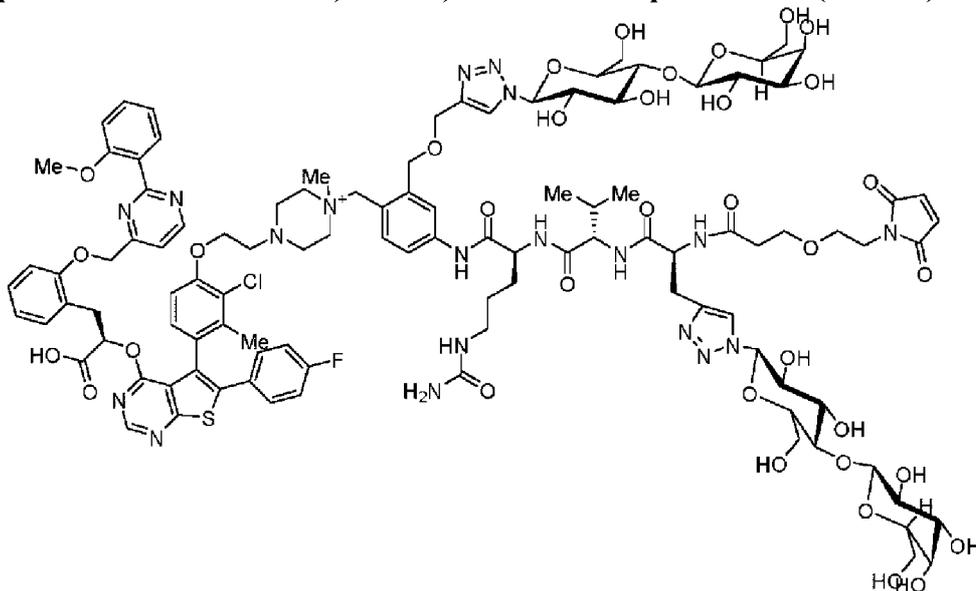
Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-амино-3-(1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((1-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксиэтил)-1-метилпиперазин-1-ия



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 2** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-аминопент-4-инамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((проп-2-ин-1-илокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфеноксиэтил)-1-

метилпиперазин-1-ием (44 мг, 0,031 ммоль, 1,0 экв.) и 1-азидо-1-деокси-бета-D-лактопиранозидом (69,2 мг, 0,188 ммоль, 6 экв.), получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-амино-3-(1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((1-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺= 2133,7800, Rt= 1,95 мин (5 мин кислый способ).

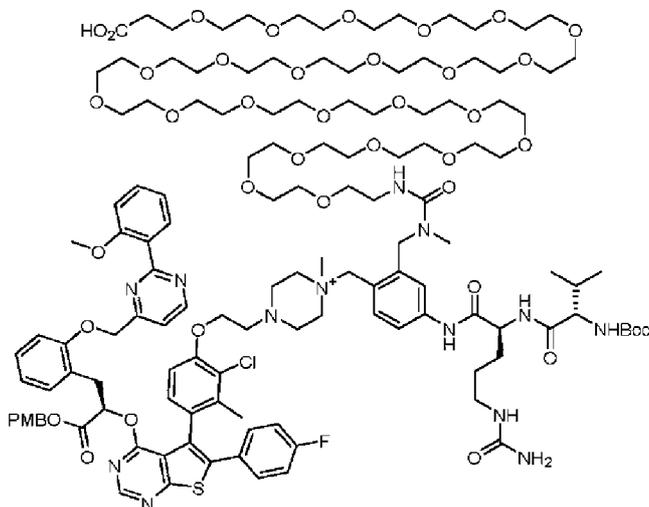
Синтез 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((1-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((2S,5S,8S)-8-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)-15-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-4,7,10-триоксо-2-(3-уреидопропил)-13-окса-3,6,9-триазапентадеканамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ия (L47-P1)



Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((S)-2-амино-3-(1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(((1-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-

ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)бензил)-4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ийем (19 мг, 0,009 ммоль, 1,0 экв.), получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этоксид)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(((1-((2S,3S,4S,5R,6S)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2R,3S,4R,5S,6S)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)метил)-4-((2S,5S,8S)-8-(((1-((2R,3R,4R,5S,6R)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил)-15-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-4,7,10-триоксо-2-(3-уреидопропил)-13-окса-3,6,9-триазапентадекапамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺= 2328,8301, Rt=2,15 мин (5 мин кислый способ).

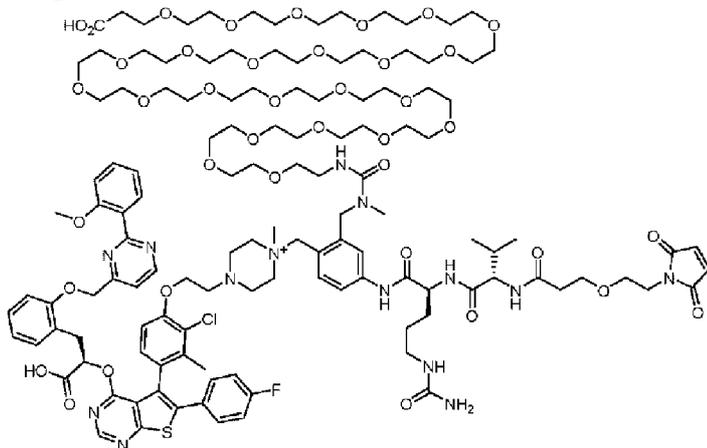
1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(78-карбокси-2-метил-3-оксо-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-тетракозаокса-2,4-диазаоктагептаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ия



Смесь 1-амино-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтан-75-овой кислоты (50 мг, 0,044 ммоль), бис(4-нитрофенил)карбоната (13 мг, 0,043 ммоль) и ДИПЭА (20 мкл, 0,12 ммоль) в ТГФ (2 мл) перемешивают при КТ в течение 2 ч. Смесь концентрируют продуванием газообразного азота через нее. Полученный твердый остаток берут в ДМФ (1 мл). Добавляют 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-((метиламино)метил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-((4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-

оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий (50 мг, 0,029 ммоль) и ДИПЭА (100 мкл, 0,573 ммоль). Смесь перемешивают при КТ в течение 5 мин. Смесь разбавляют ДМСО (2 мл) и раствор очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации, получают 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(78-карбокси-2-метил-3-оксо-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-тетракозаокса-2,4-диазаоктагептаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-(4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ий. МСВР: M⁺= 2671,2700, Rt=2,88 мин (5 мин кислый способ).

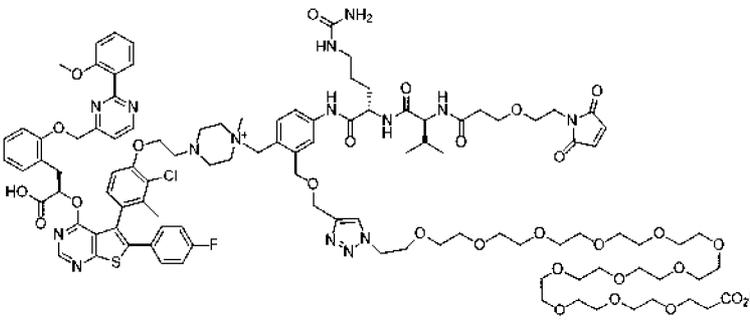
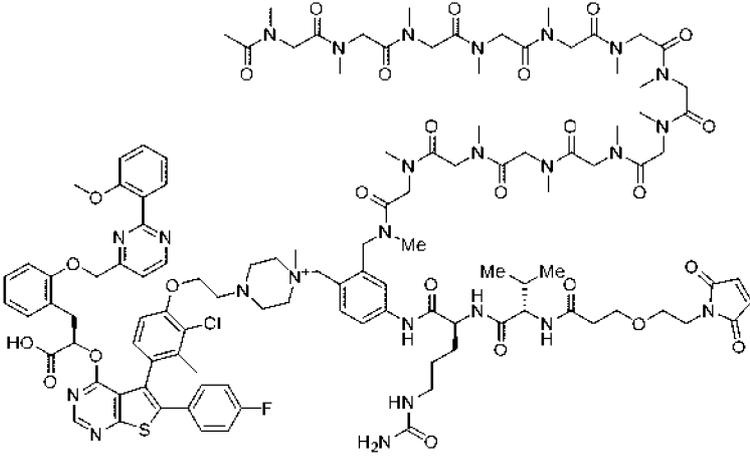
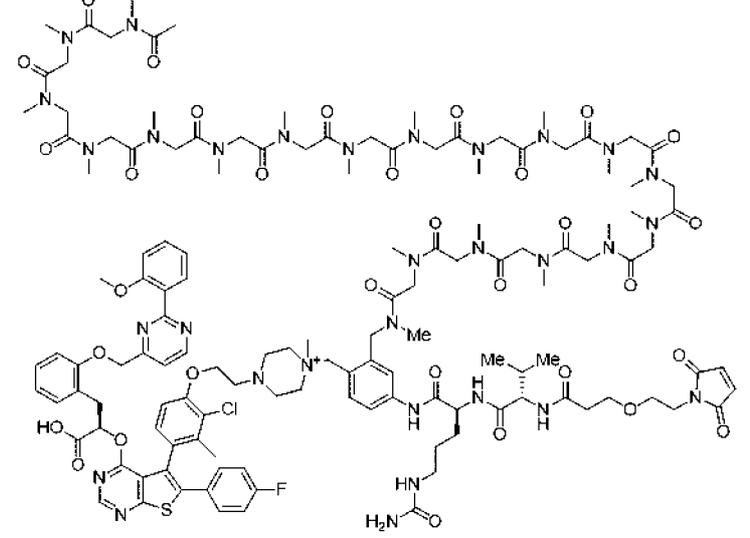
4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(78-карбокси-2-метил-3-оксо-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-тетракозаокса-2,4-диазаоктагептаконтил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-метилпиперазин-1-ий (L42-P1)

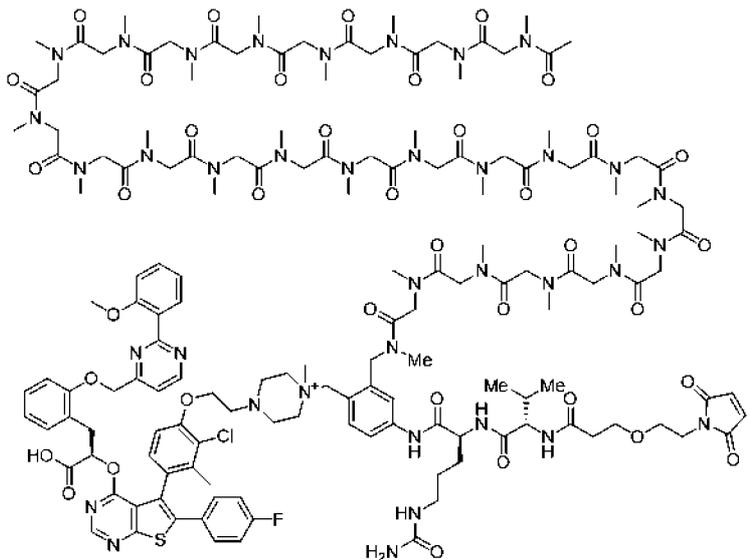
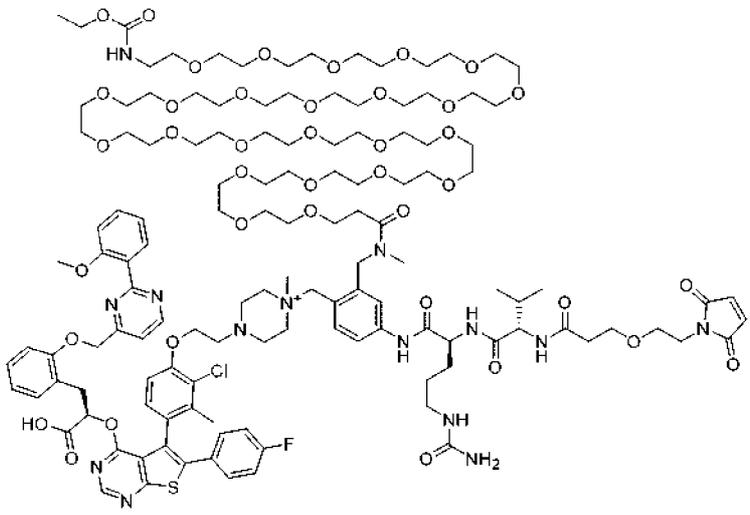
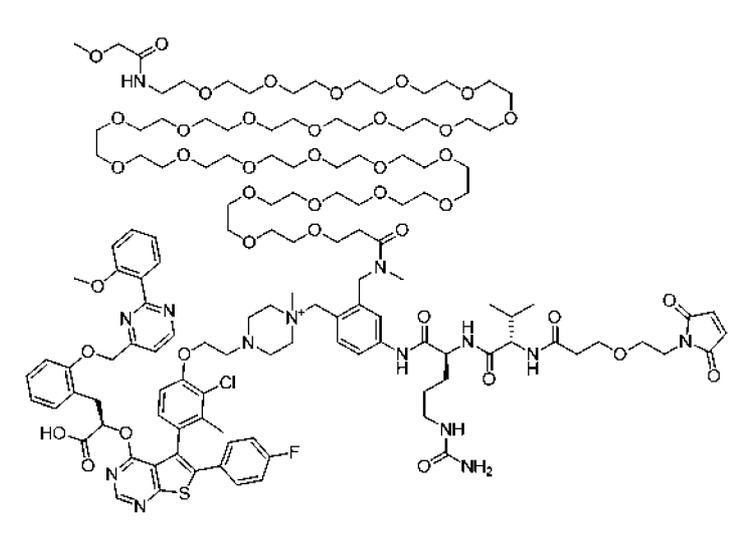


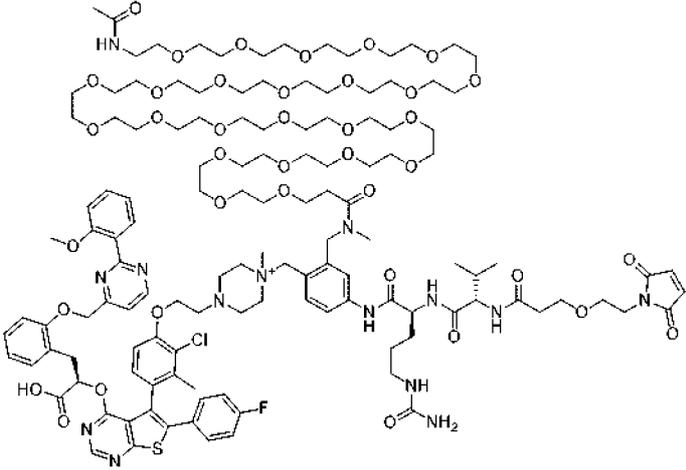
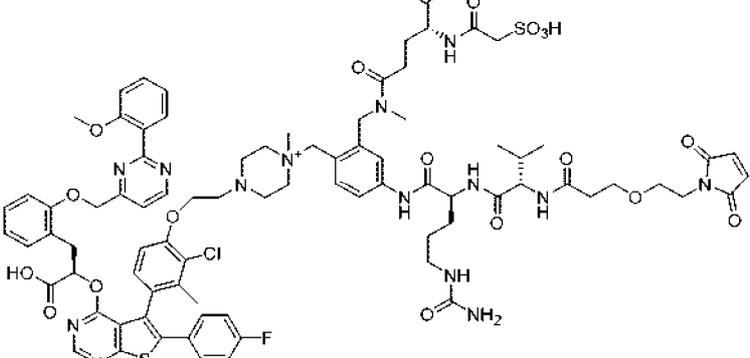
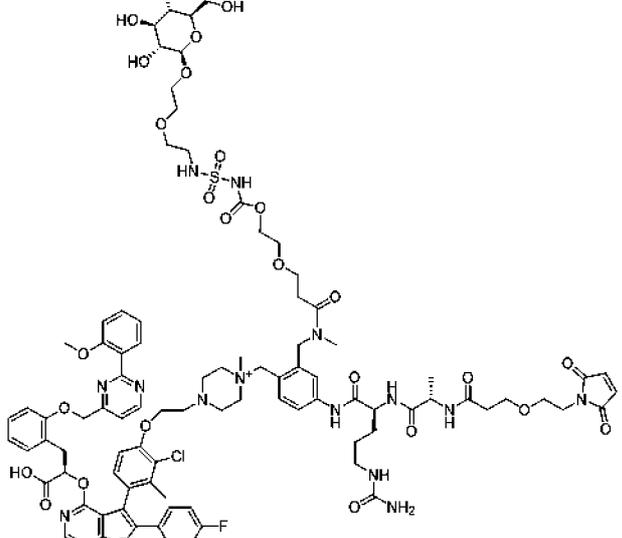
Следуя **ОБЩЕЙ МЕТОДИКЕ 3** с 1-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)-2-(78-карбокси-2-метил-3-оксо-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-тетракозаокса-2,4-диазаоктагептаконтил)бензил)-4-(2-(2-хлор-4-(6-(4-фторфенил)-4-(((R)-1-(4-метоксибензил)окси)-3-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)-1-оксопропан-2-ил)окси)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метилфенокси)этил)-1-метилпиперазин-1-ием, получают 4-(2-(4-(4-((R)-1-карбокси-2-(2-((2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил)метокси)фенил)этокси)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил)-2-хлор-3-метилфенокси)этил)-1-(2-(78-карбокси-2-метил-3-оксо-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-тетракозаокса-2,4-диазаоктагептаконтил)-4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил)-1-

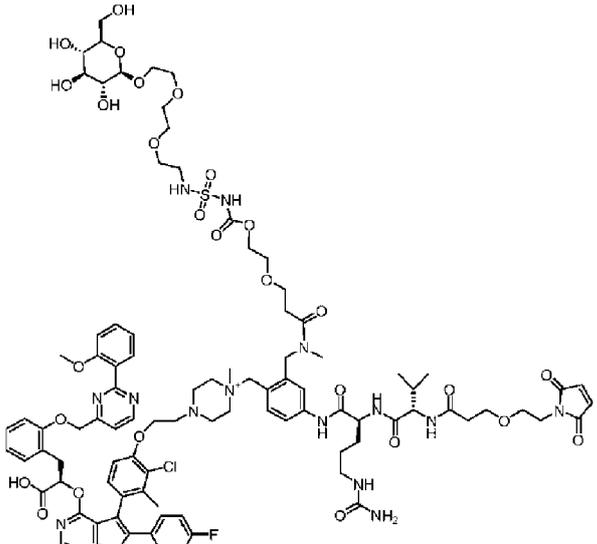
метилпиперазин-1-ий (L42-P1). МСВР: M^+ = 2646,7700, R_t = 2,38 мин (5 мин кислый способ).

Следующие соединения получают с применением методик, аналогичных описанным выше.

Код	Структура линкер-полезная нагрузка	Способы синтеза	Характеризация
L33-P1		Общая методика 2	МСВР: M^+ 2142,9099, r_t = 2,39 мин. (5 мин кислый способ).
L38-P1		Аналогично синтезу L35-P1 и с применением общей методики 3	МСВР: M^+ 2369,0400, r_t = 2,11 мин. (5 мин кислый способ).
L39-P1		Аналогично синтезу L35-P1 и с применением общей методики 3	МСВР: M^+ 2795,2537, r_t = 2,07 мин. (5 мин кислый способ).

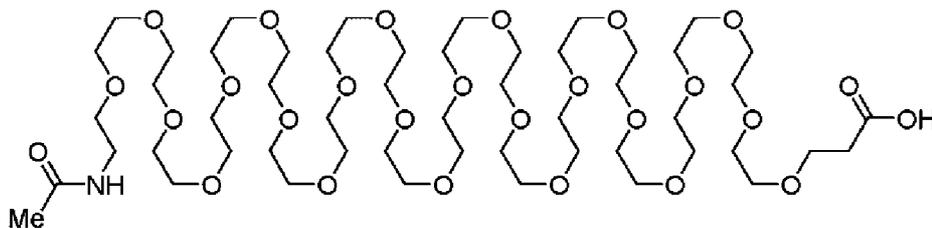
L40-P1		Аналогично синтезу L35-P1 и с применением общей методики 3	МСВР: М ⁺ 3221,4653, $t_r=2,05$ мин. (5 мин кислый способ).
L43-P1		Аналогично синтезу L35-P1 и с применением общей методики 3	МСВР: М ⁺ 2673,7827, $t_r=2,46$ мин. (5 мин кислый способ).
L44-P1		Аналогично синтезу L35-P1 и с применением общей методики 3	МСВР: М ⁺ 2673,7832, $t_r=2,39$ мин. (5 мин кислый способ).

L45-P1		Аналогично синтезу L35-P1 и с применением общей методики 3	МСВР: М ⁺ 2644,2253, $t_r=2,50$ мин. (5 мин кислый способ).
L95-P1		Аналогично синтезу L71-P1	МСВР: М ⁺ 1725,6000, $t_r=2,32$ мин. (5 мин кислый способ)
		Аналогично синтезу L62-P1	МСВР: М ⁺ 1962,7100, $t_r=2,50$ мин. (5 мин кислый способ).

L105-P1		Аналогично синтезу L62-P1	МСВР: М ⁺ 1962,7100, $t_r=2,50$ мин. (5 мин кислый способ).
---------	---	---------------------------	--

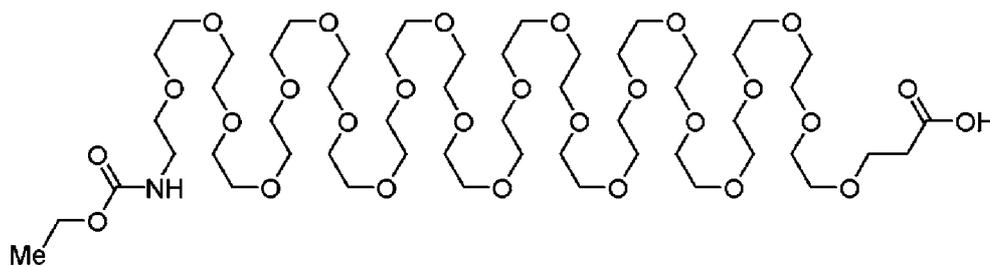
Способы синтеза для получения полиэтиленгликолей в L43-P1, L44-P1 и L45-P1 описаны ниже.

Синтез 2-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75-тетракозаокса-3-азаоктагептаконтан-78-овой кислоты



К перемешиваемому раствору 1-амино-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтан-75-овой кислоты (100 мг, 0,087 ммоль, 1,0 экв.) и ДИПЭА (24,8 мг, 34 мкл, 0,192 ммоль, 2,2 экв.) в дихлорметане (0,5 мл) добавляют уксусный ангидрид (8,9 мг, 8,25 мкл, 1,0 экв.). Полученную смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение 1,5 часов. Растворитель удаляют при пониженном давлении. Полученный остаток берут в ДМСО (1 мл) и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации получают 2-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75-тетракозаокса-3-азаоктагептаконтан-78-овую кислоту (62,3 мг, 0,052 ммоль, 60% выход). ЖХ/МС [М-Н]⁺ 1187,3 $t_r=0,75$ мин. (2 мин кислый способ). ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,86 (с, 1H), 3,60 (т, J=6,4 Гц, 3H), 3,50 (д, J=4,9 Гц, 9H), 3,40 (т, J=5,9 Гц, 2H), 3,18 (кв, J=5,8 Гц, 2H), 2,44 (т, J=6,4 Гц, 2H), 1,80 (с, 3H).

Синтез 4-оксо-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77-пентакозаокса-5-азаоктаконтан-80-овой кислоты



К перемешиваемому раствору 1-амино-

3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-

тетракозаоксапентагептаконтан-75-овой кислоты (100 мг, 0,087 ммоль, 1,0 экв.) и ДИПЭА

(24,8 мг, 34 мкл, 0,192 ммоль, 2,2 экв.) в дихлорметане (0,5 мл) добавляют этил

хлорформиат (9,5 мг, 8,34 мкл, 1,0 экв.). Полученную смесь перемешивают при температуре

окружающей среды в течение 1,5 часов. Растворитель удаляют при пониженном давлении.

Полученный остаток берут в ДМСО (1 мл) и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold

хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации

получают 4-оксо-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77-

пентакозаокса-5-азаоктаконтан-80-овую кислоту (75 мг, 0,062 ммоль, 71% выход). ЖХ/МС

[M-H]⁻ 1217,3 Rt=0,81 мин. (2 мин кислый способ). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,03 (с,

1H), 3,97 (кв, J=7,1 Гц, 2H), 3,60 (т, J=6,4 Гц, 2H), 3,50 (д, J=5,0 Гц, 92H), 3,40 (т, J=6,1 Гц,

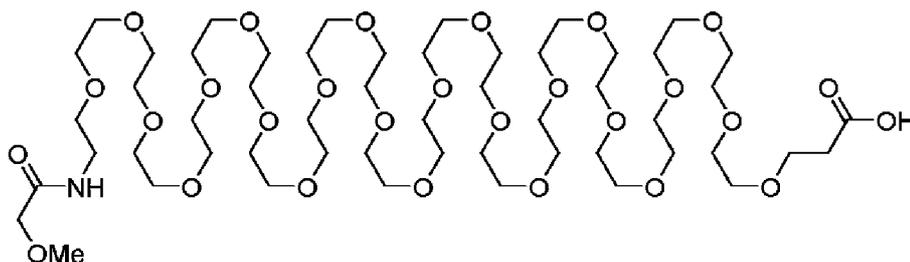
2H), 3,11 (кв, J=5,9 Гц, 2H), 2,45 (кв, J=6,5 Гц, 2H), 1,15 (т, J=7,1 Гц, 3H).

Синтез

4-оксо-

2,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77-пентакозаокса-5-

азаоктаконтан-80-овой кислоты



К перемешиваемому раствору 1-амино-

3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-

тетракозаоксапентагептаконтан-75-овой кислоты (100 мг, 0,087 ммоль, 1,0 экв.) и ДИПЭА

(24,8 мг, 34 мкл, 0,192 ммоль, 2,2 экв.) в дихлорметане (0,5 мл) добавляют метоксиацетил

хлорид (11,36 мг, 9,57 мкл, 1,2 экв.). Полученную смесь перемешивают при температуре

окружающей среды в течение 1,5 часов. Растворитель удаляют при пониженном давлении.

Полученный остаток берут в ДМСО (1 мл) и очищают ОФ-ВЭЖХ ISCO gold

хроматографией (10-100% MeCN/H₂O, 0,1% ТФК модификатор). После лиофилизации

получают 4-оксо-2,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77-

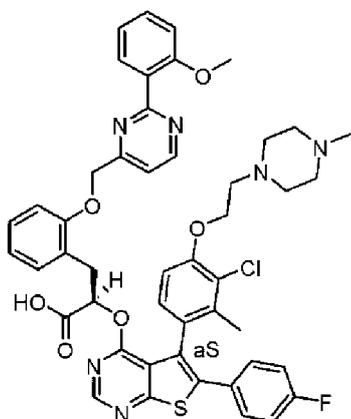
пентакозаокса-5-азаоктаконтан-80-овую кислоту (69 мг, 0,057 ммоль, 65% выход). ЖХ/МС [М-Н]- 1217,4 Rt=0,75 мин. (2 мин кислый способ). ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,68 (с, 1Н), 3,79 (с, 2Н), 3,60 (т, J=6,4 Гц, 2Н), 3,51 (с, 92Н), 3,43 (т, J=6,0 Гц, 2Н), 3,30 (с, 3Н), 3,26 (кв, J=6,0 Гц, 2Н), 2,44 (т, J=6,4 Гц, 2Н).

Пример 3. Синтез и характеристика Mcl-1 полезных нагрузок

Типовые полезные нагрузки синтезируют с применением типовых способов, описанных в этом примере.

Получение C1:

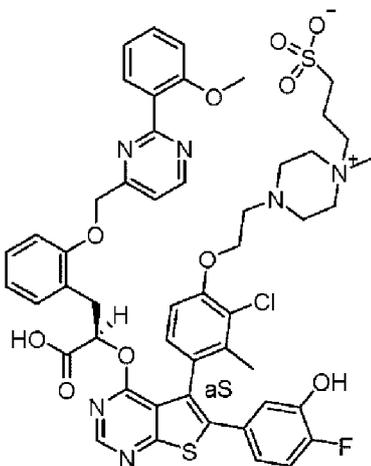
(2R)-2-{{(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановая кислота



C1 получали согласно Примеру 30 в WO 2015/097123.

Получение C2:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-[4-метил-4-(3-сульфопропил)пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-гидрокси-фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота



Стадия A: 5-бром-4-хлор-6-(4-фтор-3-тетрагидротриан-2-илокси-фенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин

4,49 г 5-бром-4-хлор-6-йод-тиено[2,3-d]пиримидина (11,96 ммоль; получен согласно WO 2015/097123, получение 1a) и 4,31 г (4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)бороновой кислоты (17,94 ммоль) растворяют в 60 мл ТГФ, затем добавляют 134 мг Pd(OAc)₂ (0,60 ммоль), 508 мг tBuXPhos (1,20 ммоль), 11,69 г Cs₂CO₃ (35,88 ммоль) и 60 мл воды и смесь перемешивают при 70°C под атмосферой N₂ до тех пор, пока не прекратится превращение. Затем разбавляют водой, нейтрализуют 2 М водным раствором HCl и экстрагируют ДХМ. Объединенный органический слой сушат над Na₂SO₄, фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией с применением гептана и EtOAc в качестве элюентов с получением 5-бром-4-хлор-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидина. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ: 9,02 (с, 1H), 7,64 (дд, J=7,9, 2,1 Гц, 1H), 7,47 (дд, J=11,0, 8,5 Гц, 1H), 7,36 (м, 1H), 5,63 (м, 1H), 3,81 (м, 1H), 3,61 (м, 1H), 1,94-1,78 (м, 3H), 1,69-1,50 (м, 3H). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d₆) δ: 166,6, 153,9, 153,1, 152,7, 144,3, 139,2, 127,7, 126,6, 124,2, 119,9, 117,1, 100,7, 97,2, 61,6, 29,5, 24,5, 18,2. МСВР рассчитано для C₁₇H₁₃N₂O₂SBrClF: 441,9554; найдено 442,9624 (M+H).

Стадия В: этил (2R)-2-[5-бром-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат

3,09 г 5-бром-4-хлор-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидина (6,97 ммоль), 3,28 г этил (2R)-2-гидрокси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (8,02 ммоль; получен согласно WO 2015/097123, получение 3bs) растворяют в 70 мл *трет*-бутанола, затем добавляют 6,82 г Cs₂CO₃ (20,9 ммоль) и смесь перемешивают при 70°C под атмосферой N₂ до тех пор, пока не прекратится превращение. Затем ее разбавляют водой, нейтрализуют 2 М водным раствором HCl и экстрагируют ДХМ. Объединенный органический слой сушат над Na₂SO₄, фильтруют, и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией с применением гептана и EtOAc в качестве элюентов с получением этил (2R)-2-[5-бром-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата в виде смеси диастереоизомеров. МСВР рассчитано для C₄₀H₃₆N₄O₇SBrF: 814,1472; найдено 815,1539 (M+H).

Стадия С: этил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилтиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат

3,65 г этил (2R)-2-[5-бром-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (4,47 ммоль) и 2,12 г 1-[2-[2-хлор-3-метил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)феноксид]этил]-4-метил-пиперазина (5,36 ммоль; получен согласно WO 2015/097123, получение 5b) растворяют в 22 мл диоксана, затем добавляют 315 мг PdCl₂×AtaPhos (0,45 ммоль), 4,37 г Cs₂CO₃ (13,41 ммоль) и 22 мл воды и смесь перемешивают при 70°C под атмосферой N₂ до полного превращения. Затем ее разбавляют водой, нейтрализуют 2 М водным раствором HCl и экстрагируют EtOAc. Объединенный органический слой сушат над Na₂SO₄, фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией с применением EtOAc и MeOH, затем ДХМ и MeOH в качестве элюентов с получением этил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата в виде смеси двух пар диастереоизомеров. МСВР рассчитано для C₅₄H₅₆N₆O₈SClF: 1002,3553; найдено 1003,3614 и 1003,3622 (M+H).

Стадия D: (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

3,47 г этил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (3,46 ммоль) растворяют в 35 мл диоксана, затем добавляют 1,45 г LiOH×H₂O (34,6 ммоль) и 35 мл воды. Смесь перемешивают при комнатной температуре до полного гидролиза. Затем ее разбавляют вода, подкисляют до pH 4 с 2 М водным раствором HCl и экстрагируют ДХМ. Объединенную органическую фазу сушат над Na₂SO₄, фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Атропоизомеры очищают и разделяют препаративной хроматографией с обращенной фазой с применением 25 мМ водного раствора NH₄HCO₃ и MeCN в качестве элюентов. Пару атропоизомеров, элюированную последней, выделяют как (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановую кислоту МСВР рассчитано для C₅₂H₅₂N₆O₈SClF: 974,3240; найдено 975,3303 (M+H).

Стадия E: (4-метоксифенил)метил (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-

метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат

2,39 г (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановой кислоты (2,45 ммоль), 1,13 г DTBAD (4,91 ммоль) и 1,29 г PPh₃ (4,91 ммоль) растворяют в 49 мл толуола, затем добавляют 0,61 мл РМВ-ОН (4,91 ммоль) и реакционную смесь перемешивают при 50°С до полного превращения. Затем Смесь разбавляют ДХМ и затем концентрируют при пониженном давлении и затем очищают флэш-хроматографией, с применением гептана и EtOAc в качестве элюентов с получением (4-метоксифенил)метил (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата в виде смеси диастереоизомеров. МСВР рассчитано для C₆₀H₆₀N₆O₉SClF: 1094,3815; найдено 1095,3880 (M+H).

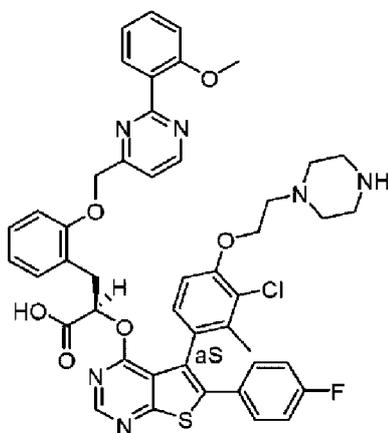
Стадия F: (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-[4-метил-4-(3-сульфопротил)пиперазин-4-ий-1-ил]этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-гидрокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота (C2)

600 мг (4-метоксифенил)метил (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фтор-3-тетрагидропиран-2-илокси-фенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (0,548 ммоль) растворяют в 11 мл MeCN, затем добавляют 0,48 мл оксатиолана 2,2-диоксида (5,48 ммоль) и смесь перемешивают под атмосферой N₂ при 60°С до полного превращения. Затем ее концентрируют при пониженном давлении, растворяют в 8 мл ДХМ, затем добавляют 2,2 мл ТФК и смесь перемешивают при комнатной температуре до полного расщепления ТНР и РМВ. Затем ее концентрируют (нагревающую баню удаляют). Ее растворяют в 10 мл ТГФ и снова концентрируют при пониженном давлении на бане 30°С. Неочищенный продукт очищают препаративной хроматографией с обращенной фазой с применением 5 мМ водного раствора NH₄HCO₃ и MeCN в качестве элюентов с получением **C2**. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ: 13,19 (шс, 1H), 10,16 (шс, 1H), 8,89 (д, J=5,2 Гц, 1H), 8,58 (с, 1H), 7,68 (шс, 1H), 7,52 (дд, J=7,5, 1,8 Гц, 1H), 7,46 (м, 1H), 7,33 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,22-7,09 (м, 4H), 7,06-7,00 (м, 2H), 6,86 (дд, J=8,3, 2,0 Гц, 1H), 6,74 (т, J=7,4 Гц, 1H), 6,66 (м, 1H), 6,23 (д, J=6,7 Гц, 1H), 5,46 (дд, J=9,8, 3,3 Гц, 1H), 5,27 (д, J=15,2 Гц, 1H), 5,22 (д, J=15,2 Гц, 1H), 4,23 (м, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,46 (м, 2H),

3,41-3,23 (м, 5H), 2,97 (с, 3H), 2,94-2,77 (м, 6H), 2,48 (м, 1H), 2,45 (т, $J=7,0$ Гц, 2H), 2,00-1,90 (м, 2H), 1,86 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО- d_6) δ : 170,8, 166,2, 165,9, 164,7, 157,7, 157,2, 155,4, 153,6, 152,7, 152,3, 149,9, 145,1, 137,0, 135,9, 131,0, 130,8, 130,3, 129,2, 128,34, 128,32, 128,2, 128,0, 122,0, 120,5, 120,1, 118,8, 118,2, 116,6, 115,6, 112,2, 111,9, 110,6, 73,3, 69,0, 67,3, 59,2, 59,1, 55,71, 55,68, 47,6, 46,1, 31,8, 18,1, 17,6. МСВР рассчитано для $\text{C}_{50}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{S}_2\text{ClF}$: 1012,2703; найдено 1013,2775 (M+H).

Получение С3:

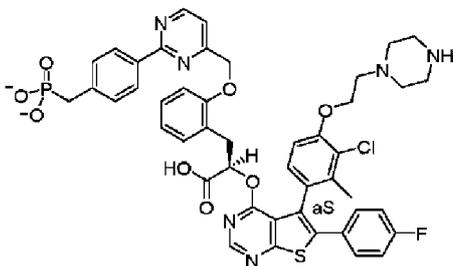
(2R)-2-[[[(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(пиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановая кислота



С3 получают согласно Примеру 744 в WO 2015/097123.

Получение С4:

(2R)-2-[[[(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(пиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановая кислота



Стадия 1: этил (2R)-2-[5-бром-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил]пропаноат

К раствору этил (2R)-3-[2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил]-2-гидроксипропаноата (25 г, 74,2 ммоль) в ТГФ (38 мл) последовательно добавляют 5-бром-6-(4-фторфенил)-4-йод-тиено[2,3-d]пиримидин (23 г, 67,5 ммоль) и карбонат цезия (67 г, 203 ммоль). Реакционную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение

ночи и летучие вещества выпаривают. Остаток разбавляют этилацетатом и водой (соответственно 500 и 400 мл) и раствор фильтруют. Органический слой отделяют, промывают насыщенным раствором соли, сушат над сульфатом магния и концентрируют под вакуумом. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (градиент этилацетатом в петролейном эфире с получением этил (2R)-2-[5-бром-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил]пропаноата в виде слегка оранжевого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 8,83 (д, 1H), 8,65 (с, 1H), 7,75 (м, 2H), 7,71 (д, 1H), 7,48 (д, 1H), 7,45 (м, 2H), 7,25 (т, 1H), 7,06 (д, 1H), 6,95 (т, 1H), 5,75 (дд, 1H), 5,28 (2*д, 2H), 4,18 (кв, 2H), 3,6/3,3 (2*дд, 2H), 1,12 (т, 3H). ИК длина волны (см^{-1}): 1749.

Стадия 2: (4-бром-2-хлор-3-метил-фенокси)-триизопропил-силан

К раствору 4-бром-2-хлор-3-метил-фенола (100 г, 482 ммоль) в дихлорметане (1,5 L) добавляют имидазол (82 г, 1,2 моль) и по каплям в течение 1 ч хлор(триизопропил)силан (102 мл, 482 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч и добавляют воду (500 мл). Органические слои промывают насыщенным раствором соли (200 мл), сушат над сульфатом магния и концентрируют. Остаток применяют без дальнейшей очистки. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,48 (с, 1H), 7,2 (дд, 1H), 6,7 (д, 1H), 1,3 (м, 3H), 1,1 (2с, 18H).

Стадия 3: трет-бутил-[2-хлор-3-метил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенокси]-диметил-силан

К раствору (4-бром-2-хлор-3-метил-фенокси)-триизопропил-силана (27,2 г, 71,9 ммоль) в ТГФ (350 мл) при -78°C под аргоном добавляют по каплям в течение 30 мин раствор н-бутил лития 1,6 М в ТГФ (49,5 мл, 79,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при -78°C в течение 2 ч и раствор 2-изопропоксид-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (16,1 г, 86,4 ммоль) в ТГФ (50 мл) добавляют по каплям в течение 30 мин. После 2 ч перемешивания при -78°C , реакционную смесь гасят медленным добавлением воды (20 мл) и нагревают до комнатной температуры, разбавляют водой (200 мл) и экстрагируют этилацетатом. Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли, сушат над сульфатом магния и концентрируют под вакуумом. Остаток применяют без дальнейшей очистки. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 7,5 (д, 1H), 6,82 (д, 1H), 2,52 (с, 3H), 1,32 (м, 3H), 1,3 (с, 12H), 1,08 (с, 18H).

Стадия 4: 2-хлор-3-метил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенол

К раствору трет-бутил-[2-хлор-3-метил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенокси]-диметил-силана (25,4 г, 59,8 ммоль) в ТГФ (750 мл) добавляют по каплям при комнатной температуре раствор тетрабутиламмония фторида 1 М в ТГФ (90 мл, 90

ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение 2 ч, концентрируют, разбавляют этилацетатом, разделяют с водой и экстрагируют этилацетатом. Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли, сушат над сульфатом магния и концентрируют под вакуумом. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (градиент этанол в дихлорметане) с получением 2-хлор-3-метил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенола. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 10,4 (м, 1H), 7,4 (д, 1H), 6,8 (д, 1H), 2,5 (с, 3H), 1,3 (с, 12H). ИК длина волны (см^{-1}): 3580-3185, 1591, 857, 827.

Стадия 5: этил (2R)-2-[[5(5S_a)-5-(3-хлор-4-гидрокси-2-метилфенил)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси]-3-[2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил]пропаноат

К раствору этил (2R)-2-[5-бром-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил]пропаноата (43,8 г, 61,2 ммоль) и 2-хлор-3-метил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенола (19,7 г, 73,5 ммоль) в смеси ТГФ/Н₂О 1/1 (800 мл) добавляют карбонат цезия (40 г, 122 ммоль). Реакционную смесь дегазируют барботированием аргона через раствор в течение 20 мин и добавляют бис(дипрет-бутил(4-диметиламинофенил)фосфин)дихлорпалладий(II) (4,35 г, 6,1 ммоль). Реакционную смесь нагревают при 80°C под аргоном в течение ночи. Реакционную смесь разбавляют водой, разделяют с этилацетатом и экстрагируют этилацетатом. Объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли, сушат над сульфатом магния и концентрируют под вакуумом. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в дихлорметане) с получением этил (2R)-2-[5-(3-хлор-4-гидрокси-2-метил-фенил)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил]пропаноата в виде смеси диастереоизомеров 85/15 (aS/aR или S_a/R_a). Оптически чистый aS (от S_a) получают очисткой препаративной СЖХ.

Стадия 6: трет-бутил 4-(2-{2-хлор-4-[4-[[2(2R)-3-[2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил]-1-этокси-1-оксопропан-2-ил]окси]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-3-метилфеноксид}этил)пиперазин-1-карбоксилат

К раствору трифенилфосфина (2,66 г, 10 ммоль) в ТГФ добавляют при комнатной температуре под аргоном диизопропил азодикарбоксилат (2,33 г, 10 ммоль). Через 15 мин перемешивания добавляют раствор трет-бутил 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-карбоксилата (2,33 г, 10 ммоль) в ТГФ (8 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, затем добавляют по каплям раствор и (2R)-2-[(5S_a)-5-(3-хлор-4-гидрокси-2-метил-фенил)-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил]пропановую кислоту (3,57 г, 5 ммоль) в ТГФ (8 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 96 ч и

концентрируют. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол (содержащий 7М аммиак) в дихлорметане) с получением трет-бутил 4-(2-{2-хлор-4-[4-{{(2R)-3-{2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил}-1-этокси-1-оксопропан-2-ил]окси}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-3-метилфенокси}этил)пиперазин-1-карбоксилата, ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 8,95 (д, 1H), 8,58 (с, 1H), 8,32 (д, 2H), 7,58 (д, 1H), 7,41 (дд, 2H), 7,32 (д, 1H), 7,29 (дд, 2H), 7,22 (т, 2H), 7,21 (д, 1H), 7,19 (т, 1H), 7,05 (д, 1H), 6,75 (т, 1H), 6,31 (дд, 1H), 5,53 (дд, 1H), 5,29 (дд, 2H), 4,2 (м, 2H), 4,05 (кв, 2H), 3,97 (м, 4H), 3,3 (м, 2H), 3,2 (т, 4H), 3,19/2,59 (м, 2H), 2,72 (т, 2H), 2,4 (т, 4H), 1,87 (с, 3H), 1,37 (с, 9H), 1,18 (т, 6H), 1,05 (т, 3H). ^{13}C ЯМР (125 МГц, CDCl_3): δ 158, 152, 131, 131, 130, 130, 128, 127, 120,5, 116, 116, 112, 110, 73, 68,5, 67, 62, 61, 56, 52, 43, 32, 32, 28, 17, 16, 14.

Стадия 7: трет-бутил 4-(2-{2-хлор-4-[4-{{(2R)-3-{2-[(2-4-[(диэтоксифосфорил)метил]фенил}пиримидин-4-ил)метокси]фенил}-1-этокси-1-оксопропан-2-ил]окси}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-3-метилфенокси}этил)пиперазин-1-карбоксилат

К раствору трет-бутил 4-(2-{2-хлор-4-[4-{{(2R)-3-{2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил}-1-этокси-1-оксопропан-2-ил]окси}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-3-метилфенокси}этил)пиперазин-1-карбоксилата (337 мг, 0,367 ммоль) и [4-(диэтоксифосфорилметил)фенил]бороновой кислоты (200 мг, 0,735 ммоль) в диоксане (2,5 мл), добавляют воду (2,5 мл) и карбонат цезия (241 мг, 0,735 ммоль). Реакционную смесь дегазируют барботированием аргона через раствор в течение 30 мин, Бис(трифенилфосфин)палладий(II) дихлорид (2,5 мг, 3,6 мкмоль) добавляют, и реакцию смесь нагревают микроволновым облучением в герметично закрытом сосуде при 90°C в течение 3 ч. Реакционную смесь разбавляют этилацетатом и водой. Водный слой экстрагируют этилацетатом и объединенные органические слои промывают насыщенным раствором соли, сушат над сульфатом магния и концентрируют под вакуумом. Остаток очищают хроматографией на силикагеле (градиент метанол в дихлорметане) с получением трет-бутил

4-(2-{2-хлор-4-[4-{{(2R)-3-{2-[(2-4-[(диэтоксифосфорил)метил]фенил}пиримидин-4-ил)метокси]фенил}-1-этокси-1-оксопропан-2-ил]окси}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-3-метилфенокси}этил)пиперазин-1-карбоксилата, ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6): δ 8,95 (д, 1H), 8,58 (с, 1H), 8,32 (д, 2H), 7,58 (д, 1H), 7,41 (дд, 2H), 7,32 (д, 1H), 7,29 (дд, 2H), 7,22 (т, 2H), 7,21 (д, 1H), 7,19 (т, 1H), 7,05 (д, 1H), 6,75 (т, 1H), 6,31 (дд, 1H), 5,53 (дд, 1H), 5,29 (2*d, 2H), 4,2 (м, 2H), 4,05 (кв, 2H), 3,97 (м, 4H), 3,3 (м, 2H), 3,2 (т, 4H), 3,19/2,59 (2*дд, 2H), 2,72 (т, 2H), 2,4 (т, 4H), 1,87 (с, 3H), 1,37 (с, 9H), 1,18 (т, 6H), 1,05 (т, 3H). ^{13}C ЯМР (125 МГц, DMSO-d_6) δ 158, 152, 131, 131, 130, 130, 128, 127, 120,5, 116, 116, 112, 110, 73, 68,5, 67, 62,

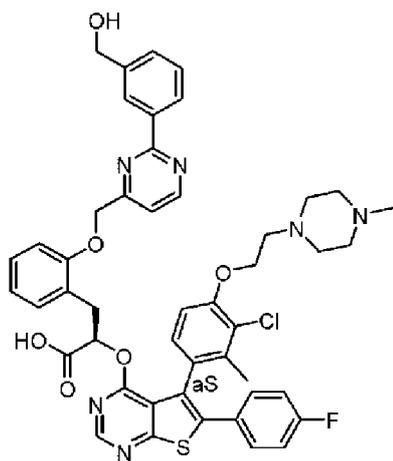
61, 56, 52, 43, 32, 32, 28, 17, 16, 14

Стадия 8: Синтез (2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-(2-пиперазин-1-илэтокси)фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-[4-(фосфонометил)фенил]пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

К раствору трет-бутил 4-(2-{2-хлор-4-[4-{{(2R)-3-{2-[(2-{4-[(диэтоксифосфорил)метил]фенил} пиримидин-4-ил)метокси]фенил}-1-этокси-1-оксопропан-2-ил]окси}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-5-ил]-3-метилфенокси}этил)пиперазин-1-карбоксилата (540 мг, 0,486 ммоль) в дихлорметане (5 мл) добавляют бромтриметилсилан (186 мкл, 1,46 ммоль). Реакционную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение ночи. Еще одну порцию бромтриметилсилан добавляют при комнатной температуре (186 мкл, 1,46 ммоль), и реакционную смесь нагревают при кипении с обратным холодильником в течение 20 ч и концентрируют досуха. Остаток берут в метаноле, перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч и концентрируют с получением коричневого вязкого масла, которое разбавляют диоксаном (4 мл) и водой (4 мл). Добавляют моногидрат гидроксида лития (100 мг, 24 ммоль) порциями, и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, нагревают при 45°C в течение 3 ч и концентрируют. Остаток разбавляют водой (5 мл), подкисляют до pH 2 добавлением по каплям водного раствора 2 M HCl. Осадок фильтруют, промывают ТГФ и очищают C18 преп-ВЭЖХ с обращенной фазой прямым помещением реакционной смеси на колонку Xbridge и с применением способа NH₄HCO₃ с получением **C4**. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,88 (шд, 1 H), 8,25 (д, 2 H), 7,75 (т, 1 H), 7,59 (с, 1 H), 7,52 (д, 1 H), 7,35 (д, 2 H), 7,23 (дд, 2 H), 7,18 (д, 1 H), 7,15 (т, 2 H), 7,11 (т, 1 H), 7,02 (д, 1 H), 6,82 (д, 1 H), 6,64 (м, 1 H), 5,51 (д, 1 H), 5,28/5,07 (м, 2 H), 3,82/3,55 (2м, 2 H), 3,35/2,55 (шс, 2 H), 2,81 (д, 2 H), 2,55 (м, 4 H), 2,4/2,27 (2м, 2 H), 2,21 (м, 4 H), 1,65 (шс, 3 H). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d₆): δ 131,5, 130,2, 129,7, 127,4, 127,2, 120,3, 115,9, 115,3, 111,9, 110,3, 75,1, 69,2, 67,3, 56,4, 49,9, 42,4, 40, 38,9, 18,1. ³¹P ЯМР (200 МГц, ДМСО-d₆): δ 15 HR-ИЭР+: m/z [M+H]⁺=925,2356/925,2346 (измеренное/теоретическое)

Получение C5:

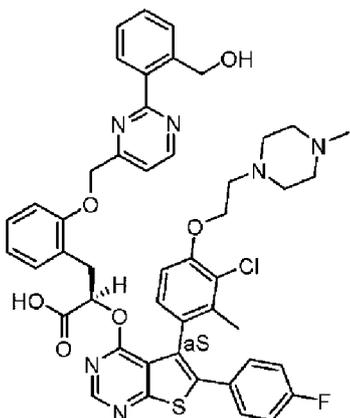
(2R)-2-{{(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{2-(4-гидроксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановая кислота



C5 получают согласно Примеру 3 в WO 2016/207216.

Получение C6:

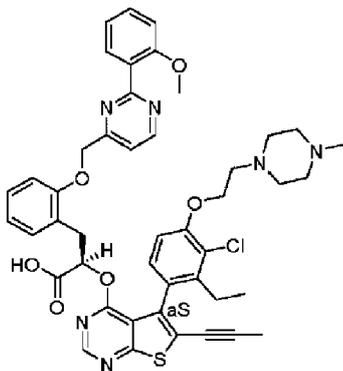
(2R)-2-[(5*S*_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-({2-[2-(гидроксиметил)фенил]пиримидин-4-ил}метокси)фенил]пропановая кислота



C6 получают согласно Примеру 728 в WO 2015/097123.

Получение C7:

(2R)-2-[(5*S*_a)-5-[3-хлор-2-этил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-проп-1-инил-тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота



Стадия А: этил (2R)-2-(5-йод-6-проп-1-инил-тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)окси-3-

[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат

5,0 г 4-хлор-5-йод-6-проп-1-инил-тиено[2,3-d]пиримидина (15,0 ммоль; получен согласно WO 2015/097123, получение 2f) и 6,10 г этил (2R)-2-гидрокси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (15,0 ммоль; получен согласно WO 2015/097123, получение 3bs) растворяют в 150 мл *трет*-бутанола, затем добавляют 14,7 г Cs₂CO₃ (45,0 ммоль) и смесь перемешивают под атмосферой N₂ при 50°C до тех пор, пока превращение не прекратится. Затем добавляют воду и насыщенный раствор соли и смесь экстрагируют EtOAc. Объединенный органический слой сушат над Na₂SO₄, фильтруют, и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией с применением гептана и EtOAc в качестве элюентов с получением этил (2R)-2-(5-йод-6-проп-1-инил-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ: 8,89 (д, J=5,1 Гц, 1H), 8,59 (с, 1H), 7,62 (д, J=5,2 Гц, 1H), 7,55 (дд, J=7,5, 1,6 Гц, 1H), 7,51 (дд, J=7,5, 1,6 Гц, 1H), 7,43 (м, 1H), 7,26 (м, 1H), 7,11 (м, 2H), 7,02 (тд, J=7,5, 0,9 Гц, 1H), 6,94 (тд, J=7,4, 0,8 Гц, 1H), 5,79 (дд, J=9,1, 4,6 Гц, 1H), 5,31 (д, J=14,9 Гц, 1H), 5,26 (д, J=14,9 Гц, 1H), 4,13 (м, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,60 (дд, J=13,8, 4,5 Гц, 1H), 3,33 (м, 1H), 2,21 (с, 3H), 1,10 (т, J=7,1 Гц, 3H). ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆) δ: 169,4, 166,5, 165,7, 164,8, 161,3, 157,7, 155,8, 153,6, 132,2, 131,0, 130,8, 128,3, 124,0, 120,9, 120,1, 115,5, 112,2, 112,0, 110,5, 98,9, 79,5, 74,4, 74,3, 69,1, 61,1, 55,7, 13,9, 4,6.

Стадия В: 2-хлор-3-этил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенол

33,7 г [2-хлор-3-этил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)феноксид]-триизопропил-силана (76,9 ммоль; получен согласно WO 2015/097123, получение 5e) растворяют в 600 мл ТГФ и охлаждают до 0°C, затем 92,3 мл ТВАФ (92,3 ммоль, 1M раствор в ТГФ) добавляют по каплям и смесь перемешивают до полного превращения. Затем ее разбавляют насыщенным раствором соли, подкисляют лимонной кислотой, затем экстрагируют ДХМ. Объединенный органический слой сушат над Na₂SO₄, фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией с применением гептана и EtOAc в качестве элюентов с получением 2-хлор-3-этил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенола. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 7,63 (д, J=8,2 Гц, 1H), 6,86 (д, J=8,2 Гц, 1H), 5,87 (с, 1H), 3,09 (кв, J=7,44 Гц, 2H), 1,33(с, 12H), 1,15 (т, J=7,44 Гц, 3H).

Стадия С: этил (2R)-2-[5-(3-хлор-2-этил-4-гидрокси-фенил)-6-проп-1-инил-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноат

353 мг этил (2R)-2-(5-йод-6-проп-1-инил-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил)окси-3-[2-[[2-

(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (0,50 ммоль) и 282 мг 2-хлор-3-этил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенола (0,55 ммоль) растворяют в 2 мл диоксане, затем добавляют 35 мг PdCl₂×AtaPhos (0,05 ммоль), 326 мг Cs₂CO₃ (1,00 ммоль) и 1 мл воды и смесь перемешивают в микроволновом реакторе при 100°C под атмосферой N₂ в течение 20 минут. Затем ее разбавляют насыщенным раствором соли, подкисляют до pH 5 с 1 М водным раствором HCl и экстрагируют ДХМ. Объединенный органический слой сушат над Na₂SO₄, фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией с применением гептана и EtOAc в качестве элюентов. Затем ее далее очищают препаративной хроматографией с обращенной фазой с применением 5 mM водного раствора NH₄HCO₃ и MeCN в качестве элюентов с получением этил (2R)-2-[5-(3-хлор-2-этил-4-гидрокси-фенил)-6-проп-1-инил-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата в виде 2:1 смеси атропоизомеров. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ: 10,35/10,29 (с, 1H), 8,93 (д, J=5,1 Гц, 1H), 8,59/8,57 (с, 1H), 7,63/7,60 (д, J=5,1 Гц, 1H), 7,54-6,93 (м, 8 H), 6,84/6,74 (т, J=7,5 Гц, 1H), 6,43/6,18 (дд, J=7,5, 1,4 Гц, 1H), 5,51/5,40 (м, 1H), 5,30-5,16 (м, 2H), 4,17-3,99 (м, 2H), 3,76/3,75 (с, 3H), 3,34-3,14 (м, 1H), 2,93-2,35 (м, 3H), 2,02/1,98 (с, 3H), 1,08/1,04 (т, J=7,0 Гц, 3H), 0,94/0,76 (т, J=7,5 Гц, 3H).

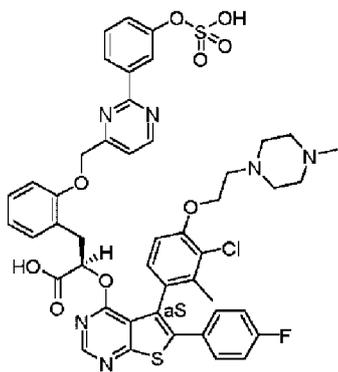
Стадия D: (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-этил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-проп-1-инил-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота, C7

322 мг этил (2R)-2-[5-(3-хлор-2-этил-4-гидрокси-фенил)-6-проп-1-инил-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (0,44 ммоль), 190 мг 2-(4-метилпиперазин-1-ил)этанола (1,32 ммоль) и 346 мг PPh₃ (1,32 ммоль) растворяют в 10 мл сухого толуола, затем добавляют 304 мг DTBAD (1,32 ммоль) и смесь перемешивают при 50°C под атмосферой N₂ до тех пор, пока не превратится превращение. Затем смесь концентрируют при пониженном давлении и остаток очищают флэш-хроматографией с применением гептана, EtOAc и MeOH в качестве элюентов, затем далее очищают препаративной хроматографией с обращенной фазой с применением 5 mM водного раствора NH₄HCO₃ и MeCN в качестве элюентов с получением промежуточного сложного эфира. Его растворяют в 2 мл диоксана, затем добавляют 84 мг LiOH×H₂O (2,00 ммоль) и 1 мл воды. Смесь перемешивают при 50°C до полного гидролиза. Затем ее разбавляют насыщенным раствором соли, нейтрализуют с 2 М водным раствором HCl и экстрагируют ДХМ. Объединенную органическую фазу сушат над Na₂SO₄, фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении.

Атропоизомеры очищают и разделяют препаративной хроматографией с обращенной фазой с применением 5 мМ водного раствора NH_4HCO_3 и MeCN в качестве элюентов. Атропоизомер, элюированный позже, выделяют как **C7**. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ : 8,88 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 8,60 (с, 1H), 7,76 (д, $J=5,0$ Гц, 1H), 7,54 (дд, $J=7,6, 1,8$ Гц, 1H), 7,46 (м, 1H), 7,26 (д, $J=8,5$ Гц, 1H), 7,20-7,13 (м, 3H), 7,04 (тд, $J=7,5, 0,9$ Гц, 1H), 7,00 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 6,78 (т, $J=7,5$ Гц, 1H), 6,32 (дд, $J=7,4, 1,5$ Гц, 1H), 5,48 (дд, $J=9,7, 2,9$ Гц, 1H), 5,27 (д, $J=15,0$ Гц, 1H), 5,19 (д, $J=15,0$ Гц, 1H), 4,23 (м, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,31 (м, 1H), 2,75 (м, 2H), 2,47 (м, 1H), 2,64-2,36 (м, 10H), 2,22 (с, 3H), 2,01 (с, 3H), 0,74 (т, $J=7,5$ Гц, 3H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, DMSO-d_6) δ : 165,95, 165,89, 164,7, 157,8, 157,2, 155,3, 154,0, 141,6, 135,6, 131,0, 130,8, 130,1, 128,4, 128,0, 127,2, 121,4, 120,1, 117,8, 112,2, 111,7, 97,2, 74,9, 68,9, 67,1, 56,1, 55,7, 54,0, 32,7, 24,4, 13,1, 4,4. МСВР рассчитано для $\text{C}_{45}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_6\text{SCl}$: 832,2810; найдено 833,2878 (M+H).

Получение **C8**:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(3-сульфооксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

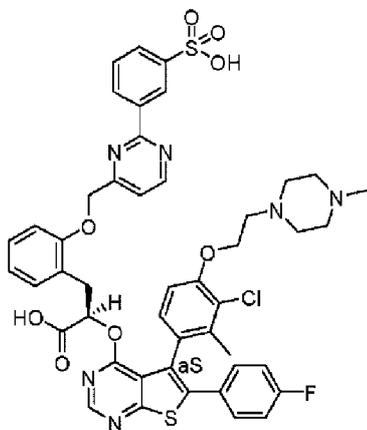


210 мг этил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(3-гидроксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (0,24 ммоль; получен согласно WO 2016/207216, получение 2) растворяют в 9,3 мл пиридина, затем добавляют 0,38 мл $\text{SO}_3 \times \text{пиридин}$ (2,36 ммоль) и смесь перемешивают при 70°C до полного превращения. Затем смесь концентрируют при пониженном давлении и остаток растворяют в 2 мл диоксан, затем добавляют 200 мг KOH (3,56 ммоль) и 1 мл воды. Смесь перемешивают при 70°C до полного гидролиза сложного эфира Et. Затем ее нейтрализуют 5 М водным раствором HCl и очищают препаративной хроматографией с обращенной фазой (прямой впрыск) с применением 25 мМ водного раствора NH_4HCO_3 и MeCN в качестве элюентов с получением **C8**. ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ : 8,93 (д, $J=5,1$ Гц, 1H), 8,63 (с, 1H), 8,27 (м, 1H), 8,13 (м, 1H), 7,61 (д, $J=5,1$ Гц, 1H), 7,43 (т, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,33 (д, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,32-7,27 (м, 3H),

7,23-7,13 (м, 4H), 7,05 (д, $J=7,8$ Гц, 1H), 6,73 (т, $J=7,5$ Гц, 1H), 6,31 (дд, $J=7,5, 1,3$ Гц, 1H), 5,51 (дд, $J=9,8, 3,5$ Гц, 1H), 5,34 (д, $J=15,2$ Гц, 1H), 5,27 (д, $J=15,2$ Гц, 1H), 4,24-4,08 (м, 2H), 3,26 (дд, $J=14,3, 3,4$ Гц, 1H), 3,10-2,52 (м, 14H), 1,82 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (125 МГц, ДМСО- d_6) δ : 170,8, 166,5, 166,4, 162,8, 162,7, 158,3, 155,3, 154,0, 153,6, 152,9, 137,8, 136,8, 135,9, 131,12, 131,05, 130,4, 130,3, 129,1, 128,5, 128,2, 127,8, 124,4, 123,5, 122,7, 121,9, 120,5, 120,2, 118,8, 116,0, 115,9, 112,0, 110,5, 73,5, 69,1, 67,2, 55,4, 43,1, 31,8, 17,5. МСВР рассчитано для $\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}_2\text{ClF}$: 940,2127; найдено 941,2191 (M+H).

Получение С9:

2R)-2-{{5-{{3-хлор-2-метил-4-[[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{{2-(3-сульфофенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановая кислота

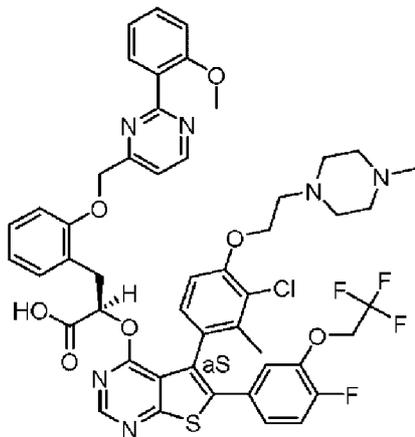


750 мг этил (2R)-2-[(5Sa)-5-[3-хлор-2-метил-4-[[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-метилсульфанилпиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (0,89 ммоль; получен согласно WO 2015/097123, получение 10a) растворяют в 9 мл ТГФ, затем добавляют 726 мг [3-(2,2-диметилпропоксисульфонил)фенил]бороновой кислоты (2,67 ммоль), 62 мг $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,05 ммоль) и 509 мг тиофен-2-карбонилксимеди (2,67 ммоль) и смесь перемешивают при 75°C до полного превращения. Затем ее концентрируют при пониженном давлении и очищают флэш-хроматографией с применением гептана, EtOAc и 0,7 М NH_3 раствора в MeOH в качестве элюентов. Затем ее растворяют в 20 мл 1,1,1,3,3,3-гексафторпропан-2-ола, добавляют 4,5 мл ТФК и смесь перемешивают при 80°C до полного гидролиза сульфонового эфира. Смесь концентрируют при пониженном давлении и затем растворяют в 5 мл диоксана, затем добавляют 210 мг $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5,00 ммоль) и 2 мл воды. Смесь перемешивают при комнатной температуре до полного гидролиза. Затем ее разбавляют насыщенным раствором соли, нейтрализуют 2 М водным раствором HCl и экстрагируют ДХМ. Объединенную органическую фазу сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Полученные атропоизомеры

очищают и разделяют препаративной хроматографией с обращенной фазой с применением 25 мМ водного раствора NH_4HCO_3 и MeCN в качестве элюентов, затем далее очищают с применением 0,1% водного раствора ТФК и MeCN в качестве элюентов с получением **C9**. ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ : 13,19 (шс, 1H), 9,48 (шс, 1H), 8,94 (д, $J=5,1$ Гц, 1H), 8,74 (т, $J=1,6$ Гц, 1H), 8,65 (с, 1H), 8,37 (дт, $J=7,8, 2,9$ Гц, 1H), 7,78 (дт, $J=7,6, 1,5$ Гц, 1H), 7,60 (д, $J=5,1$ Гц, 1H), 7,51 (т, $J=7,7$ Гц, 1H), 7,29 (м, 3H), 7,22-7,14 (м, 3H), 7,13-7,05 (м, 2H), 6,74 (т, $J=7,5$ Гц, 1H), 6,38 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 5,53 (дд, $J=9,6, 3,6$ Гц, 1H), 5,37 (д, $J=15,3$ Гц, 1H), 5,31 (д, $J=15,3$ Гц, 1H), 4,2 (м, 2H), 3,50-2,88 (м, 11H), 2,76 (с, 3H), 2,61 (дд, $J=14,2, 9,7$ Гц, 1H), 1,79 (с, 3H). ^{13}C ЯМР (125 МГц, DMSO-d_6) δ : 170,8, 166,5, 163,0, 162,7, 161,1, 158,4, 155,4, 153,3, 152,9, 148,6, 136,6, 136,0, 131,1, 130,1, 129,0, 128,5, 128,3, 128,1, 127,9, 125,3, 124,4, 121,9, 120,5, 118,8, 116,2, 116,0, 115,9, 112,1, 110,5, 73,2, 69,1, 66,5, 55,0, 51,7, 49,7, 42,1, 31,5, 17,5. МСВР рассчитано для $\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_2\text{ClF}$: 924,2178; найдено 925,2274 (M+H).

Получение C10:

(2R)-2-[(5S_a)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-[4-фтор-3-(2,2,2-трифторэтокси)фенил]тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

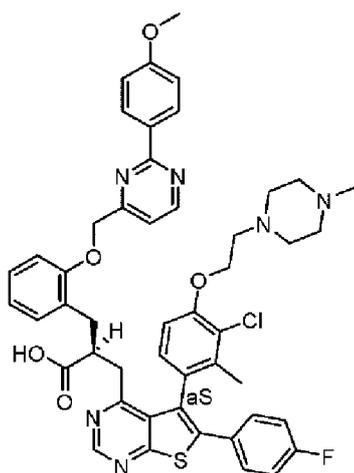


250 мг этил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-йод-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (0,27 ммоль; получен согласно WO 2015/097123, получение 30) и 79 мг [4-фтор-3-(2,2,2-трифторэтокси)фенил]бороновой кислоты (0,40 ммоль) растворяют в 1 мл ТГФ, затем добавляют 3,0 мг PdOAc_2 (0,013 ммоль), 5,7 мг tBuXPhos (0,013 ммоль), 174 мг Cs_2CO_3 (0,53 ммоль) и 0,27 мл воды и смесь перемешивают при 70°C под атмосферой N_2 в течение 2 часов. Затем ее разбавляют насыщенным раствором соли и экстрагируют 2-МеТГФ. объединенный органический слой сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный эфир очищают флэш-хроматографией с применением гептана, EtOAc и 0,7 М NH_3 раствора в MeOH в качестве элюентов. Затем ее растворяют в 5,3 мл диоксана, затем добавляют 64 мг

LiOH×H₂O (1,52 ммоль) и 1,3 мл воды. Смесь перемешивают при комнатной температуре до полного гидролиза. Затем ее разбавляют насыщенным раствором соли, нейтрализуют 2 М водным раствором HCl и экстрагируют ДХМ. Объединенную органическую фазу сушат над Na₂SO₄, фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Атропоизомеры очищают и разделяют препаративной хроматографией с обращенной фазой с применением 25 mM водного раствора NH₄HCO₃ и MeCN в качестве элюентов. Атропоизомер, элюированный позже, выделяют как **C10**. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ: 8,91 (д, J=5,2 Гц, 1H), 8,57 (с, 1H), 7,82 (д, J=5,1 Гц, 1H), 7,53 (дд, J=7,5, 1,7 Гц, 1H), 7,45 (м, 2H), 7,27 (дд, J=11,0, 8,6 Гц, 1H), 7,22 (д, J=8,6 Гц, 1H), 7,16-7,09 (м, 3H), 7,03 (т, J=7,5 Гц, 1H), 6,98 (д, J=8,3 Гц, 1H), 6,92 (м, 1H), 6,69 (т, J=7,4 Гц, 1H), 6,16 (д, J=7,2 Гц, 1H), 5,47 (дд, J=10,3, 2,6 Гц, 1H), 5,25 (д, J=15,1 Гц, 1H), 5,19 (д, J=15,1 Гц, 1H), 4,75-4,53 (м, 2H), 4,21 (т, J=5,5 Гц, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,41 (д, J=12,0 Гц, 1H), 2,77-2,30 (м, 12H), 2,24 (с, 3H), 1,81 (с, 3H). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d₆) δ: 171,3, 166,2, 166,0, 164,6, 163,5, 157,9, 157,2, 155,3, 153,7, 153,1, 152,1, 150,5, 144,6, 135,8, 131,0, 130,8, 130,7, 129,6, 129,1, 128,4, 128,1, 127,8, 125,4, 123,7, 122,0, 120,4, 120,1, 118,8, 117,0, 116,7, 115,6, 112,2, 111,7, 110,5, 74,8, 68,9, 67,2, 65,6, 56,0, 55,7, 53,8, 52,0, 44,6, 32,7, 17,5. МСВР рассчитано для C₄₉H₄₅N₆O₇SClF₄: 972,2695; найдено 973,2761 (M+H).

Получение C11:

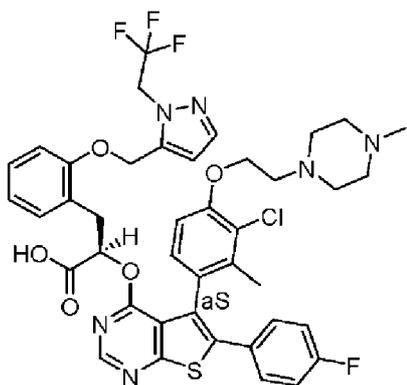
(2R)-2-{{(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил}окси}-3-(2-{[2-(4-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановая кислота



C11 получают согласно Примеру 107 в WO 2015/097123.

Получение C12

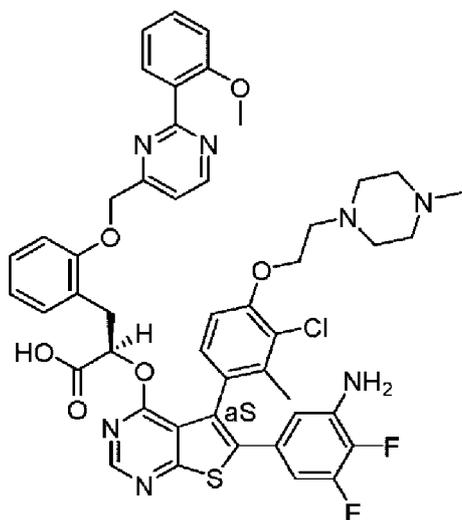
(2R)-2-{{(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил}окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пирозол-5-ил]метокси}фенил)пропановая кислота



C12 получают согласно Примеру 77 в WO 2015/097123.

Получение C13

(2R)-2-[(5S_a)-6-(3-амино-4,5-дифтор-фенил)-5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропановая кислота

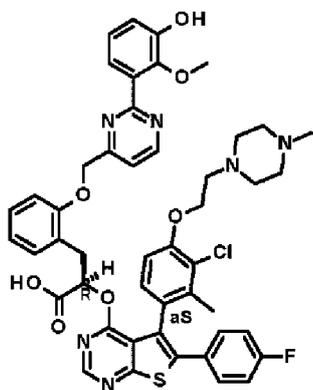


250 мг этил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-йод-тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]фенил]пропаноата (0,27 ммоль; получен согласно WO 2015/097123, получение 30) и 102 мг 2,3-дифтор-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)анилина (0,41 ммоль) растворяют в 1 мл ТГФ, затем добавляют 3,0 мг PdOAc₂ (0,013 ммоль), 5,7 мг tBuXPhos (0,013 ммоль), 174 мг Cs₂CO₃ (0,53 ммоль) и 0,27 мл воды и смесь перемешивают при 70°C под атмосферой N₂ в течение 2 часов. Затем ее разбавляют насыщенным раствором соли и экстрагируют 2-МеТГФ. Объединенный органический слой сушат над Na₂SO₄, фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный сложный эфир очищают флэш-хроматографией с применением гептана, EtOAc и 0,7 М NH₃ раствора в MeOH в качестве элюентов. Затем ее растворяют в 0,7 мл диоксана, затем добавляют 60 мг LiOH×H₂O (1,43 ммоль) и 0,18 мл воды. Смесь перемешивают при комнатной температуре до полного гидролиза. Затем ее разбавляют насыщенным раствором

соли, нейтрализуют 2 М водным раствором HCl и экстрагируют ДХМ. Объединенную органическую фазу сушат над Na₂SO₄, фильтруют и фильтрат концентрируют при пониженном давлении. Атропоизомеры очищают и разделяют препаративной хроматографией с обращенной фазой с применением 25 мМ водного раствора NH₄HCO₃ и MeCN в качестве элюентов. Атропоизомер, элюированный позже, выделяют как **C13**. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ: 8,89 (д, J=5,2 Гц, 1H), 8,56 (с, 1H), 7,76 (д, J=5,0 Гц, 1H), 7,53 (дд, J=7,6, 1,8 Гц, 1H), 7,45 (м, 1H), 7,36 (д, J=8,6 Гц, 1H), 7,20 (д, J=8,7 Гц, 1H), 7,13 (м, 2H), 7,03 (тд, J=7,5, 1,0 Гц, 1H), 6,99 (д, J=8,1 Гц, 1H), 6,71 (т, J=7,3 Гц, 1H), 6,62 (м, 1H), 6,21 (д, J=7,5, 1,3 Гц, 1H), 6,12 (м, 1H), 5,73 (с, 2H), 5,46 (дд, J=10,1, 3,1 Гц, 1H), 5,25 (д, J=15,1 Гц, 1H), 5,19 (д, J=15,2 Гц, 1H), 4,22 (м, 2H), 3,75 (с, 3H), 3,35 (м, 1H), 2,73 (м, 2H), 2,65-2,35 (м, 9H), 2,22 (с, 3H), 1,85 (с, 3H). ¹³C ЯМР (125 МГц, ДМСО-d₆) δ: 171,1, 166,0, 165,3, 163,3, 157,8, 157,2, 155,3, 153,7, 152,9, 149,0, 138,9, 137,1, 135,8, 131,0, 130,8, 130,4, 128,7, 128,4, 128,1, 127,8, 125,2, 122,0, 120,4, 120,1, 118,9, 115,6, 112,2, 111,9, 110,6, 103,2, 74,5, 68,9, 67,1, 56,0, 55,7, 53,9, 52,1, 44,7, 32,6, 17,6. МСВР рассчитано для C₄₇H₄₄N₇O₆SClF₂: 907,2730; найдено 908,2803 (M+H).

Получение C14

(2R)-2-{{(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил}окси}-3-(2-{[2-(3-гидрокси-2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановая кислота

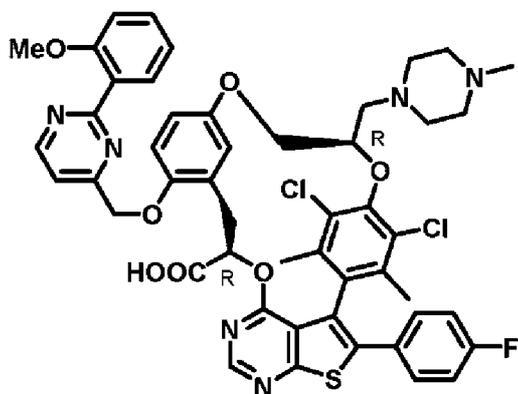


210 мг этил (2R)-2-[5-[3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси-3-[2-[(2-хлорпиримидин-4-ил)метокси]фенил]пропаноата (0,25 ммоль, **WO2016/207216 получение 1**) и 84 мг (3-гидрокси-2-метокси-фенил)бороновой кислоты (0,50 ммоль) растворяют в 3,8 мл 1,4-диоксана, затем добавляют 18 мг Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0,025 ммоль), 240 мг Cs₂CO₃ (0,75 ммоль) и 3,8 мл воды и смесь перемешивают под атмосферой N₂ при 70°C до полного превращения. Затем ее разбавляют водой, нейтрализуют 2 М водным раствором HCl и экстрагируют ДХМ. Объединенную органическую фазу сушат над Na₂SO₄, фильтруют и фильтрат

концентрируют при пониженном давлении. Неочищенный сложный эфир очищают флэш-хроматографией с применением гептана, EtOAc и 0,7 М NH₃ раствора в MeOH в качестве элюентов с получением смеси диастереоизомеров. Ее растворяют в 2 мл диоксана, затем добавляют 245 мг LiOH×H₂O (5,85 ммоль) и 1 мл воды. Смесь перемешивают при кт до полного гидролиза. Затем ее нейтрализуют 2 М водным раствором HCl и прямо впрыскивают на преп-ОФ-ВЭЖХ, с применением 0,1% водного раствора ТФК и MeCN в качестве элюентов. Диастереоизомер, элюированный позже, выделяют как **C14**. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ: 9,53 (шс, 1H), 8,91 (д, 1H), 8,56 (с, 1H), 7,79 (д, 1H), 7,42 (д, 1H), 7,26 (м, 2H), 7,19 (д, 1H), 7,18 (м, 2H), 7,12 (т, 1H), 7,06 (дд, 1H), 6,98 (м, 1H), 6,98 (м, 1H), 6,97 (д, 1H), 6,68 (т, 1H), 6,16 (д, 1H), 5,47 (м, 1H), 5,27/5,20 (д+д, 2H), 4,26/4,19 (м+м, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,38/2,42 (дд+дд, 2H), 2,74 (м, 2H), 2,55 (ш, 4H), 2,47 (ш, 4H), 2,25 (с, 3H), 1,80 (с, 3H). МСВР рассчитано для C₄₇H₄₄N₆O₇SClF: 890,2665; найдено 891,2721 (M+H).

Получение P15

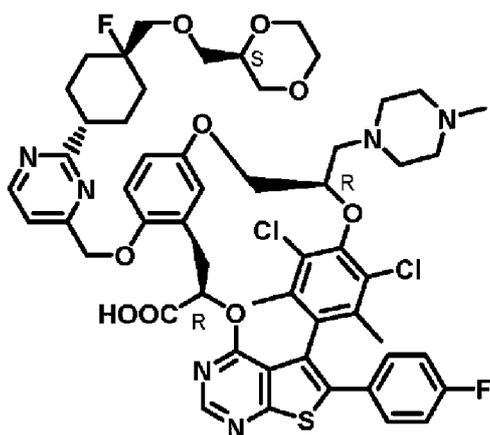
(11R,20R)-23,26-дихлор-3-(4-фторфенил)-14-[[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси]-24,25-диметил-20-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-10,18,21-триокса-4-тиа-6,8-диазапентацикло[20,2,2,12,5,113,17,09,28]октакоза-1(25),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22(26),23-декаен-11-карбоновая кислота



P15 получают согласно Примеру 116 в WO 2019/035914.

Получение P16

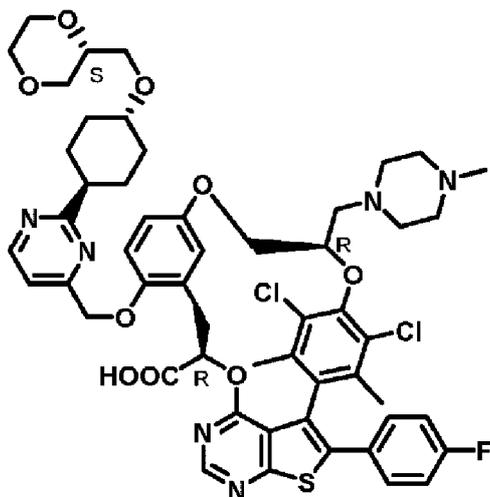
(11R,20R)-23,26-дихлор-14-[[2-[4-[(2S)-1,4-диоксан-2-ил]метоксиметил]-4-фторциклогексил]пиримидин-4-ил]метокси]-3-(4-фторфенил)-24,25-диметил-20-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-10,18,21-триокса-4-тиа-6,8-диазапентацикло[20,2,2,12,5,113,17,09,28]октакоза-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-декаен-11-карбоновая кислота



P16 получают согласно Примеру 28 в WO 2019/035911.

Получение P17

(11R,20R)-23,26-дихлор-14-[[2-[4-[[2-(2S)-1,4-диоксан-2-ил]метокси]циклогексил]пиримидин-4-ил]метокси]-3-(4-фторфенил)-24,25-диметил-20-[(4-метилпиперазин-1-ил)метил]-10,18,21-триокса-4-гиа-6,8-диазапентацикло[20,2,2,12,5,113,17,09,28]октакоза-1(24),2,5(28),6,8,13,15,17(27),22,25-декаен-11-карбоновая кислота



P17 получают согласно Примеру 44 в WO 2019/035911.

Пример 4: Конъюгация и аналитическая характеристика анти-CD74 ADC

Типовые конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) синтезируют с применением типовых способов, описанных ниже. Анти-CD74 антитела (Милатузумаб), используемые для приготовления типовых ADC, обозначаются аббревиатурой Ab M, CD74 или CD74_CysmAb (Таблица 6). Термин «CysmAb» относится к мутациям цистеина в тяжелой цепи антитела, которые используются для конъюгирования линкер-полезная нагрузка с антителом через малеимидные группы. Все полноразмерные конъюгированные антитела CD74, используемые здесь, содержат сконструированные мутации цистеина E152C и S375C (пронумерованные в соответствии с системой EU).

Таблица 6. Антитела, применяемые для синтеза типовых ADC

Обозначение антитела	Антитело	Мутация Fc	Последовательность (Тяжелая цепь/Легкая цепь)
Ab M или CD74	милатузумаб	Дикий тип-	SEQ ID Nos 12, 25
Анти-CD74CysmAb с молчащей Fc или CD74 с молчащей Fc	милатузумаб	DANAPA молчащая Fc	SEQ ID Nos 15, 25

Конъюгация

Способ С1: антитело связывали на смоле *mp* Protein A (GE Healthcare) в соотношении 10 мг Ab на 1 мл смолы в PBS в течение 30 минут путем перемешивания в одноразовой колонке размера Biorad. Чтобы деблокировать реакционноспособные цистеины, моногидрат гидрохлорида цистеина добавляют до конечной концентрации 20 мМ. Смесь перемешивают в течение 30 минут при комнатной температуре, промывая 5 раз смолу 50 колоночными объемами PBS на вакуумном коллекторе. Затем смолу ресуспендируют в равном объеме PBS, содержащем 250 нМ CuCl₂ и инкубируют в течение 1 часа и 30 мин. Повторно окисленное антитело промывают 5 раз 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе и ресуспендируют в равном объеме PBS. К смеси добавляют 10-кратный молярный избыток 20 мМ раствора линкер-полезная нагрузка и равный объем ДМСО. Смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 2 часов. Для контроля конъюгации берут 20 мкл суспензии смолы, центрифугируют, супернатант удаляют и затем элюируют 40 мкл буфером для элюирования антитела (Thermo Fisher Scientific). Супернатант анализируют хроматографией с обращенной фазой с применением колонки Agilent PLRP-S 4000A 5 мкм, 4,6×50 мм (буфер А является водой, 0,1% ТФК, буфер В Ацетонитрил, 0,1% ТФК, колонку выдерживают при 80°C, расход 1,5 мл/мин). После устранения избытка линкера-полезной нагрузки путем промывки смолы 5 раз 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе, ADC элюируют из белка А с помощью буфера для элюирования антитела и нейтрализуют 1/10 объема 1 М Tris pH 9,0. Все приведенные в качестве примера ADC подвергают замене буфера через диализ в PBS 1X pH 7,4 (Sigma Life Science, P3813, 10ПАК), концентрируют с применением Vivaspin 20, 50KD, PES (Sartorius Stedim, VS2031), стерильно фильтруют через 0,2 мкм стерильный фильтр PES, 25 мм (Whatmann, G896-2502) и хранят при 4°C. Конъюгацию проводят в диапазоне 5 мг антитела. Все приведенные в качестве примера ADC характеризуют аналитической эксклюзионной хроматографией Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare, 28990945) для определения доли мономера, и ЖХ-МС для определения DAR (Таблица 16).

Способ С2. Антитело инкубируют со смолой RMP Protein A (GE) в соотношении 10 мг Ab к 1 мл смолы в PBS в течение 15 минут при перемешивании в одноразовой колонке подходящего размера. Цистеин HCl добавляют до конечной концентрации 20 мМ и инкубируют при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре, чтобы позволить реакционноспособным цистеинам деблокироваться. Смолу быстро промывают

50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе. Затем смолу ресуспендируют в равном объеме PBS, содержащем 250 нМ CuCl_2 . Реформацию межцепочечных дисульфидов антитела отслеживают по временным точкам. В каждый момент времени берут 25 мкл суспензии смолы, добавляют 1 мкл 20 мМ MC-valcit-MMAE и пробирку постукивают несколько раз. Смолу центрифугируют, супернатант удаляют и затем элюируют 50 мкл буфером для элюирования антитела (Thermo). Смолу пеллетируют, и супернатант анализируют хроматографией с обращенной фазой с использованием колонки Agilent PLRP-S 4000A 5 мкм, 4,6×50 мм (буфер А вода, 0,1% ТФК, буфер В Ацетонитрил, 0,1% ТФК, колонку выдерживают при 80°C, скорость потока 1,5 мл/мин). После того, как было определено, что антитело реформировало свои межцепочечные дисульфидные связи, смолу промывают 10 объемами колонки PBS, и смолу ресуспендируют в равном объеме PBS и в реакцию добавляют 8-12 эквивалентов линкер-полезная нагрузка в ДМСО с конечной концентрацией 10% ДМСО, и затем инкубируют при комнатной температуре в течение 3 часов. Смолу затем промывают 50 объемами колонки PBS. ADC элюируют из смолы с белком А с помощью буфера для элюирования антитела. Затем буфер ADC заменяют на PBS или другой подходящий буфер и проводят препаративную эксклюзионную хроматографию для удаления агрегатов (S200 Increase; GE), если требуется удалить агрегаты. Проводят следующие анализы - аналитическая SEC для определения доли мономера, масс-спектропия для определения DAR, тест LAL для определения эндотоксиновой нагрузки и концентрацию белка определяют с помощью A280 с использованием коэффициента возбуждения и молекулярной массы антитела.

Способ С3 (получение промежуточного лекарственного вещества (DSi)). 200 мг антитела (1,36 мкм) при 10 мг/мл инкубируют с 20 мл осажденной смолы RMP Protein A (GE Lifesciences, 17513803) и перемешивают в течение 15 минут. Цистеин HCl моногидрат добавляют до конечной концентрации 20 мМ и инкубируют при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре, чтобы позволить реакционноспособным цистеинам деблокироваться. Смолу быстро промывают 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе. Затем смолу ресуспендируют в равном объеме PBS, содержащем 250 нМ CuCl_2 . Реформацию межцепочечных дисульфидов антитела отслеживают по временным точкам. В каждый момент времени берут 25 мкл суспензии смолы, добавляют 1 мкл 20 мМ MC-valcit-MMAE и пробирку постукивают несколько раз. Смолу центрифугируют, супернатант удаляют и затем элюируют 50 мкл буфером для элюирования антитела (Thermo). Смолу пеллетируют, и супернатант анализируют хроматографией с обращенной фазой с использованием колонки Agilent PLRP-S 4000A 5 мкм, 4,6×50 мм (буфер А вода, 0,1% ТФК, буфер В Ацетонитрил, 0,1% ТФК, колонку выдерживают при 80°C, скорость потока 1,5 мл/мин; Градиент 0 минут - 30% В, 5 минут - 45% В, 6,5 мин - 100% В, 8 минут - 100% В, 10 минут - 30%). Через 60 минут после добавления CuCl_2 , удаляют промывкой 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе и затем добавляют 20 мл PBS для ресуспендирования и осушают под действием силы тяжести. Антитело элюируют со 100 мл буфера для элюирования антитела (Thermo Scientific, 21004) и затем буфер заменяют на 1X

PBS pH 7,2. Продукт затем концентрируют с применением центрифужного концентратора с применением Amicon Ultra-15, 50KDa, регенерированной целлюлозы (Millipore, UFC0905024), до 6,6 мг/мл аликвотируют в 5 мг аликвоты и мгновенно замораживают в жидком азоте и хранят при -80°C до применения.

(CD74-L5-P1): 120 мг антитела (0,816 мкм, 1,0 экв.) инкубируют с 12 мл осажденной смолы RMP Protein A (GE Lifesciences, 17513803) и перемешивают в течение 15 минут. Цистеин HCl моногидрат добавляют до конечной концентрации 20 мМ и инкубируют при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре, чтобы позволить реакционноспособным цистеинам деблокироваться. Смолу быстро промывают 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе. Затем смолу ресуспендируют в равном объеме PBS, содержащем 250 нМ CuCl₂. Реформацию межцепочечных дисульфидов антитела отслеживают по временным точкам. В каждый момент времени берут 25 мкл суспензии смолы, добавляют 1 мкл 20 мМ MC-valcit-MMAE и пробирку постукивают несколько раз. Смолу центрифугируют, супернатант удаляют и затем элюируют 50 мкл буфером для элюирования антитела (Thermo, 24001). Смолу пеллетируют, и супернатант анализируют хроматографией с обращенной фазой с использованием колонки Agilent PLRP-S 4000A 5 мкм, 4,6×50 мм (буфер А вода, 0,1% ТФК, буфер В Ацетонитрил, 0,1% ТФК, колонку выдерживают при 80°C, скорость потока 1,5 мл/мин; Градиент 0 минут - 30% В, 5 минут - 45% В, 6,5 мин - 100% В, 8 минут - 100% В, 10 минут - 30%). Через 60 минут после добавления CuCl₂, удаляют промыванием 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе и затем добавляют 12 мл PBS для ресуспендирования. К этой суспензии смолы и антитела добавляют **L5-P1** (365 мкл 20 мМ раствор в ДМСО, 6,528 мкмоль, 8 экв.). Полученную смесь инкубируют при температуре окружающей среды в течение 3 часов. Смолу затем промывают 50 объемами колонки PBS. ADC элюируют из со смолы буфером для элюирования антитела (Thermo Scientific, 21004). Буфер ADC заменяли на 1X PBS (20X PBS, TeknovaP0191) через диализ и проводят препаративную эксклюзионную хроматографию, элюируя в PBS Дульбекко pH 7,2 (Hyclone SH30028,03) для удаления агрегатов с помощью HiLoad 26/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare, 28989336). Продукт затем концентрируют с применением центрифужного концентратора с применением Amicon Ultra-15, 50KDa, регенерированной целлюлозы (Millipore, UFC0905024), до 8 мг/мл и стерильно фильтруют через 0,22 мкм стерильный фильтр PVDFapore, 25 мм (Millipore, SLGV013SL) и хранят при 4°C. Конечный выход составляет 74,1 мг (0,504 мкмоль). Проводят следующие анализы: аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC) для определения доли мономера, масс-спектрокопия (МС) для определения DAR, тест LAL для определения эндотоксиновой нагрузки, и концентрацию белка определяют с помощью A280 с использованием коэффициента возбуждения и молекулярной массы антитела. Данные МСВР (белковый способ) показали, что преобладающая масса тяжелой цепи составляет 54294 да, что дает DAR 4,4, рассчитанный путем сравнения МС интенсивностей пиков для видов DAR1, DAR2 и DAR3. SEC показывает агрегацию $\leq 1\%$, по данным сравнения площади высокомолекулярного пикового поглощения при 210 и 280 нм с

площадью пикового поглощения для мономерного ADC.

(CD74-L7-P1): 120 мг антитела (0,136 мкмоль, 1,0 экв.) инкубируют с 2 мл осажденной смолы RMP Protein A (GE Lifesciences, 17513803) и перемешивают в течение 15 минут. Цистеин HCl моногидрат добавляют до конечной концентрации 20 mM и инкубируют при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре, чтобы позволить реакционноспособным цистеинам деблокироваться. Смолу быстро промывают 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе. Затем смолу ресуспендируют в равном объеме PBS, содержащем 250 нМ CuCl₂. Реформацию межцепочечных дисульфидов антитела отслеживают по временным точкам. В каждый момент времени берут 25 мкл суспензии смолы, добавляют 1 мкл 20 mM MC-valcit-MMAE и пробирку постукивают несколько раз. Смолу центрифугируют, супернатант удаляют и затем элюируют 50 мкл буфером для элюирования антитела (Thermo). Смолу пеллетируют, и супернатант анализируют хроматографией с обращенной фазой с использованием колонки Agilent PLRP-S 4000A 5 мкм, 4,6×50 мм (буфер А вода, 0,1% ТФК, буфер В Ацетонитрил, 0,1% ТФК, колонку выдерживают при 80°C, скорость потока 1,5 мл/мин; Градиент 0 минут - 30% В, 5 минут - 45% В, 6,5 мин - 100% В, 8 минут - 100% В, 10 минут - 30%). Через 60 минут после добавления CuCl₂, удаляют промыванием 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе и затем добавляют 2 мл PBS для ресуспендирования. К этой суспензии смолы и антитела добавляют **L7-P1** (55 мкл 20 mM раствор в ДМСО, 1,088 мкмоль, 8 экв.). Полученную смесь инкубируют при температуре окружающей среды в течение 3 часов. Смолу затем промывают 50 объемами колонки PBS. ADC элюируют из смолы буфером для элюирования антитела (Thermo Scientific, 21004). Буфер ADC заменяли на 1X PBS (20X PBS, TeknovaP0191) через диализ и проводят препаративную эксклюзионную хроматографию, элюируя в PBS Дульбекко pH 7,2 (Hyclone SH30028,03) для удаления агрегатов с помощью HiLoad 26/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare, 28989336). Продукт затем концентрируют с применением центрифужного концентратора с применением Amicon Ultra-15, 50KDa, регенерированной целлюлозы (Millipore, UFC0905024), до 4,5 мг/мл и стерильно фильтруют через 0,22 мкм стерильный фильтр PVDFapore, 25 мм (Millipore, SLGV013SL) и хранят при 4°C. Конечный выход составляет 1,6 мг (0,00681 мкмоль). Проводят следующие анализы: аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC) для определения доли мономера, масс-спектрометрия (МС) для определения DAR, тест LAL для определения эндотоксиновой нагрузки, и концентрацию белка определяют с помощью A280 с использованием коэффициента возбуждения и молекулярной массы антитела. Данные МСВР (белковый способ) показали, что преобладающая масса тяжелой цепи составляет 54294 да, что дает DAR 3,8, рассчитанный путем сравнения МС интенсивностей пиков для видов DAR1, DAR2 и DAR3. SEC показывает агрегацию 1,8%, по данным сравнения площади высокомолекулярного пикового поглощения при 210 и 280 нм с площадью пикового поглощения для мономерного ADC.

Аналитические способы

Жидкостная хроматография-Масс-спектрометрия (ЖХ/МС) I

Общая методика. Соотношение между лекарственным средством и антителами (DAR) типовых ADC определяют с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ/МС) в соответствии с одним из следующих способов (например, ЖХ-I, LCII и ЖХ-III). Для всех способов ЖХ, подвижной фазой А является очищенная вода степени MS (Biosolve, Dieuze, France, 00232141B1BS), подвижной фазой В является ацетонитрил степени MS (Biosolve, Dieuze, France, 0001204101BS), и подвижной фазой D является очищенная вода степени MS с добавлением 1% муравьиной кислоты (FA) (Honeywell/Fluka, Bucharest, Romania, 56302). Подвижную фазу D фиксируют на уровне 10% для поддержания состава подвижной фазы 0,1% FA, и температура колонки устанавливают на уровне 80°C. Общий способ MS оптимизирован для всех синтезированных ADC, за исключением одного ADC, где собственный MS используют для определения среднего DAR (см. MS-I и Таблицу 16 ниже).

Общая методика (1): Соотношение между лекарственным средством и антителами (DAR) типовых ADC определяют способом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ/МС) согласно следующему способу. Для всех способов ЖХ подвижной фазой А является очищенная вода степени MS (Honeywell, LC015-1), подвижной фазой В является 80% изопропанол степени MS (Honeywell LC323-1); 20% ацетонитрил (Honeywell, LC015-1), LC323-1) с добавлением 1% муравьиной кислоты (FA) (Thermo Scientific, 85178). Температуру колонки устанавливают на уровне 80°C. Общий способ МС оптимизируют для всех синтезированных ADC. Колонкой, использованной для анализа, является Agilent PLRP-S 4000 А; 2,1×150 мм, 8 мкм (Agilent, PL1912-3803). Используемая скорость потока 0,3 мл/мин. Градиент 0-0,75 минут 95% А, 0,76-1,9 минут 75% А, 1,91-11,0 минут 50% А, 11,01-11,50 10% А, 11, 51-13,50 минут 95% А, 13,51-18 минут 95% А на Acquity Bio H-Class Quarternary UPLC (Waters). Системой МС является масс-спектрометр Xevo G2-XS QToF ESI (Waters), и данные, полученные за 1,5-11 минут, и массы анализируют между 15000-80000 дальтон. DAR определяют из деконволюционных спектров или УФ хроматограммы путем суммирования интегрированных площадей пиков МС (общий ионный ток) или УФ (280 нм) неконъюгированных и конъюгированных данных видов (mAb или ассоциированный фрагмент), взвешенных путем умножения каждой площади на количество прикрепленного лекарственного средства. В сумме, взвешенные площади делят на сумму общей площади, и результаты дают окончательное среднее значение DAR для полноразмерного ADC.

ЖХ-I: ADC загружают в колонку для обессоливания MassPREP Micro (2,1×5,0 мм, Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France, 186004032). Для анализа массы исходного вещества проводят стадию обессоливания в течение 0,5 мин при 5% подвижной фазе В со скоростью потока 0,5 мл/мин. Стадию элюирования выполняют с градиентом от 0,51 мин при 5% В до 2,0 мин при 90% В со скоростью потока 0,2 мл/мин. Две стадии промывки устанавливают от 2,1 мин до 2,7 мин и от 2,8 мин до 3,4 мин при 5% В до 90% В со скоростью потока 0,5 мл/мин. Наконец, стадия кондиционирования используют при 3,5 мин в течение 0,5 мин при 5% В (0,5 мл/мин).

Для анализа ADC в восстановленных условиях проводят стадию обессоливания в течение 0,5 мин при 5% В со скоростью потока 0,2 мл/мин. Затем начинают стадию элюирования с градиентом от 0,51 мин при 10% В до 7,61 мин при 80% В со скоростью потока 0,2 мл/мин. Устанавливают две стадии промывки от 8,1 мин до 8,6 мин и от 8,7 мин до 9,2 мин от 5% В до 90% В (0,5 мл/мин). Наконец, стадию кондиционирования проводят при 9,3 мин в течение 0,5 мин при 5% В со скоростью потока 0,5 мл/мин.

ЖХ-II: ADC загружают в колонку MabPac RP (2,1×100 мм, 4 мкм, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, 088647). Для анализа как в исходных, так и в восстанавливающих условиях, проводят стадию обессоливания в течение 1,4 мин при 20% В со скоростью потока 0,4 мл/мин. Затем стадию элюирования проводят с градиентом от 1,5 мин при 20% В до 11,5 мин при 70% В со скоростью потока 0,3 мл/мин. Стадия промывки устанавливают от 11,75 мин до 13,75 мин при 90% В со скоростью потока 0,5 мл/мин. Наконец, стадию кондиционирования используют при 14,0 мин в течение 1,0 мин при 20% В со скоростью потока 0,4 мл/мин.

ЖХ-III: ADC загружают на Bioresolve RP mAb Polyphenyl, 450A, 2,7 мкм, 2,1×150 мм (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France, 186008946). Для анализа как в исходных, так и в восстанавливающих условиях проводят стадию обессоливания в течение 1,4 мин при 20% В со скоростью потока 0,4 мл/мин. Стадию элюирования проводят с градиентом от 1,5 мин при 20% В до 11,5 мин при 70% В со скоростью потока 0,3 мл/мин. Стадию промывки устанавливают от 11,75 мин до 13,75 мин при 90% В со скоростью потока 0,5 мл/мин. Наконец, стадию кондиционирования используют при 14,0 мин в течение 1,0 мин при 20% В со скоростью потока 0,4 мл/мин.

ЖХ-IV: ADC загружают на Bioresolve RP mAb Polyphenyl, 450A, 2,7 мкм, 2,1×150 мм (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France, 186008946). Для анализа как в исходных, так и в восстанавливающих условиях проводят стадию обессоливания в течение 1,5 мин при 20% В со скоростью потока 0,6 мл/мин. Стадию элюирования проводят с градиентом от 1,5 мин при 20% В до 16,5 мин при 50% В со скоростью потока 0,6 мл/мин. Стадию промывки устанавливают от 16,8 мин до 18,8 мин при 90% В со скоростью потока 0,6 мл/мин. Наконец, стадию кондиционирования используют при 19,1 мин в течение 1,9 мин при 20% В со скоростью потока 0,6 мл/мин (общее время прогона=21 минута).

МС-I: Буфер ADC меняют на МС совместимый буфер и вводят непосредственно в гибридный прибор Q-TOF MS (Synapt G2-S HDMS, Waters, Manchester, UK), оборудованный автоматизированным источником наноИЭР на основе чипа (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY, USA), работающий в режиме положительной ионизации. Параметры инструментальной МС настраивают для сохранения нативной 3D структуры в газовой фазе и обеспечения эффективной десольватации и передачи ионов.

Анализ ЖХ-МС проводят с применением хроматографической системы Waters UPLC H-Class Bio, комбинированной с масс-спектрометром ESI Xevo G2 XS Q-TOF (Waters, Manchester, UK). ADC анализируют либо в интактном состоянии (без предварительной обработки), либо после восстановления с 5 мМ (конечная концентрация)

DTT (Thermo Scientific, Rockford, IL, 20291). Затем обработанный ADC анализируют с применением вышеупомянутого ЖХ-IV (Таблица 16). Времяпролетные масс-спектры с ионизацией электрораспылением анализируемых веществ получают с использованием программного обеспечения для сбора данных MassLynx™ (Waters, Manchester, UK). Затем полученную интенсивность в зависимости от m/z спектра деконволютируют с применением способа максимальной энтропии (MaxEnt) программного обеспечения MassLynx™ для определения массы каждого интактного вида антитела или каждого восстановленного фрагмента антитела в зависимости от применяемой обработки. Наконец, DAR определяют из деконволютированных спектров или УФ хроматограммы путем суммирования интегрированных площадей пиков МС (общий ионный ток) или УФ (280 нм) не конъюгированных и конъюгированных данных видов (mAb или ассоциированного фрагмента). Для определения DAR с помощью УФ хроматограммы относительную долю площади каждого вида умножают на количество прикрепленного лекарственного средства. Суммированные, взвешенные площади каждого вида делят на сумму общей относительной площади в процентах, и результаты дают оценку окончательного среднего значения DAR для полноразмерного ADC. Для определения DAR деконволюцией спектров, долю каждого идентифицированного вида рассчитывают по значению пика интенсивности из деконволютированных спектров. Полученную долю умножают на количество прикрепленного лекарственного средства. Суммированные результаты дают оценку окончательного среднего значения DAR для полного ADC.

Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ЖХ/МС) II

Данные ЖХ/МС получают с применением прибора со следующими параметрами (таблица 7):

Таблица 7. Параметры

Насос	Waters AcQuity UPLC Binary Solvent Manager
Управление образцом	Waters AcQuity UPLC Sample Manager
Компартмент колонки	Waters AcQuity UPLC Column Manager
Датчик	Waters AcQuity UPLC PDA
ELSD	Shimadzu ELSD-LTII
Масс спектр	Waters SQD
Колонки	AcQuity UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм
Элюент А1	0,1% муравьиная кислота в воде
Элюент В1	0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле
Элюент А2	5 мМ гидроксид аммония в воде
Элюент В2	5 мМ гидроксид аммония в ацетонитриле

Способы, используемые для получения данных ЖХ/МС, следующие (таблицы 8-10):

Таблица 8. 2 минутный кислый способ

<u>2 мин кислый способ</u>	
Элюент А1	0,1% муравьиная кислота в воде
Элюент В1	0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле
Поток	1,0 мл/мин
Время остановки	3,00 мин

рН		2,6	
Градиент	Время	%А (Элюент А1)	%В (Элюент В1)
	0,00	95	5
	0,20	95	5
	2,00	5	95
	2,50	5	95
	2,60	95	5
	3,00	95	5
Колонка	AcQuity UPLC ВЕН С18 1,7 мкм 2,1×50 мм		
Температура колонки	50°С		
ТАС	210-400 нм		
Интервал массы	120-1500 Да		
Время сканирования	0,3 сек		

Таблица 9. 2 минутный щелочной способ

<u>2 мин щелочной способ</u>			
Элюент А2	5 мМ Гидроксид аммония в воде		
Элюент В2	5 мМ Гидроксид аммония в ацетонитриле		
Поток	1,0 мл/мин		
Время остановки	3,00 мин		
рН	10,2		
Градиент	Время	%А (Элюент А2)	%В (Элюент В2)
	0,00	95	5
	0,20	95	5
	2,00	5	95
	2,50	5	95
	2,60	95	5
	3,00	95	5
	Колонка	AcQuity UPLC ВЕН С18 1,7 мкм 2,1×50 мм	
Температура колонки	50°С		
ТАС	210-400 нм		
Интервал массы	120-1500 Да		
Время сканирования	0,3 сек		

Таблица 10. 5 минутный кислый способ

<u>5 мин кислый способ</u>			
Поток	1,0 мл/мин		
Время остановки	5,20 мин		
рН	2,6		
Градиент	Время	%А (Элюент А1)	%В (Элюент В1)
	0,00	98	2
	4,40	2	98
	5,15	2	98
	5,19	98	2

Колонка	AcQuity UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм
Температура колонки	50°C
ТАС	210-400 нм
Интервал массы	120-1500 Да
Время сканирования	0,3 сек

Масс спектрометрия высокого разрешения

МСВР данные собирают применением инструмента со следующими параметрами (таблица 11):

Таблица 11. Параметры

Насос	Waters AcQuity UPLC Binary Solvent Manager
Управление образцом	Waters AcQuity UPLC Sample Manager
Компартмент колонки	Waters AcQuity UPLC Column Manager
Датчик	Waters AcQuity UPLC PDA
ELSD	н/д
Масс спектр	Waters Xevo G2 Qtof
Колонки	AcQuity UPLC PrST C4 300Å 1,7 мкм 2,1×100 мм AcQuity UPLC CSH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм ProSwift RP-3U 4,6×50 мм SS
Элюент А1	0,1% муравьиная кислота в воде
Элюент В1	0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле
Элюент А2	0,05% трифторуксусная кислота в воде
Элюент В2	0,05% трифторуксусная кислота в ацетонитриле

Способы, используемые для получения данных МСВР для линкеров/полезных нагрузок и синтетических промежуточных соединений, следующие (таблицы 7 и 8):

Таблица 12. 5 минутный кислый способ

<u>5 мин кислый способ</u>			
Поток	1,0 мл/мин		
Время остановки	5,2 мин		
рН	2,6		
Градиент	Время	%А (Элюент А2)	%В (Элюент В2)
	0,00	98	2
	4,40	2	98
	5,15	2	98
	5,19	98	2
Колонка	AcQuity UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм		
Температура колонки	50°C		
ТАС	210-400 нм		
Интервал массы	300-4000 Да		

Обработка	н/д
Время сканирования	0,3 сек

Таблица 13. 2 минутный кислый способ

<u>2 мин кислый способ</u>			
Поток	1,0 мл/мин		
Время остановки	2,20 мин		
pH	2,6		
Градиент	Время	%A (Элюент A2)	%B (Элюент B2)
	0,00	98	2
	0,06	98	2
	1,76	2	98
	2,00	2	98
	2,16	98	2
Колонка	AcQuity UPLC CSH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм		
Температура колонки	50°C		
ТАС	210-400 нм		
Интервал массы	100-2050 Да		
Время сканирования	0,2 сек		

Способ, используемый для создания данных МСВР для ADCs следующий (таблица 14):

Таблица 14. Белковый способ

Белковый способ:			
Поток	1,0 мл/мин		
Время остановки	3,30 мин		
pH	2,6		
Градиент	Время	%A (Элюент) A1)	%B (Элюент) B1)
	0,00	98	2
	0,70	98	2
	2,00	2	98
	2,10	2	98
	2,30	98	2
	3,30	98	2
Колонка	ProSwift RP-3U 4,6×50mm SS		
Температура колонки	50°C		
ТАС	210-400 нм		
Интервал массы	600-3900 Да		
Обработка	14000-170000 Да		
Время сканирования	1,5 сек		

Эксклюзионная хроматография (SEC) I

Эксклюзионную хроматографию (SEC) проводят для определения качества ADC и доли агрегации (%) после очистки. Анализ проводят на аналитической колонке Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare, 28990945) в изократических условиях 100% PBS pH 7,4 (Sigma, P3813, 10ПАК), поток 0,45 мл/мин в течение 12 минут. % агрегированной фракции образца ADC определяют количественно на основании площади пика поглощения при 280 нм. Расчет основан на отношении отношения высокомолекулярного элюента при 280 нм к сумме площади пика поглощения при той же длине волны высокомолекулярного и мономерного элюентов, умноженной на 100%.

Эксклюзионную хроматографию (SEC) (I) проводят для определения качества ADC и доли агрегации (%) после очистки. Анализ проводят на аналитической колонке Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare, 28990945) в изократических условиях PBS pH 7,2 (Hyclone SH30028.03) с добавлением 150 mM NaCl и 1 mM EDTA, поток 0,45 мл/мин за 8 минут. % агрегированной фракции образца ADC определяют количественно на основании площади пика поглощения при 280 нм. Расчет основан на отношении отношения высокомолекулярного элюента при 280 нм к сумме площади пика поглощения при той же длине волны высокомолекулярного и мономерного элюентов, умноженной на 100%. Данные получают с помощью ВЭЖХ Agilent Bio-Inert 1260, оснащенной датчиками светорассеяния Wyatt miniDAWN и Treos (Wyatt Technologies, Santa Barbara, CA).

Эксклюзионная хроматография (SEC) II

Данные SEC получают с использованием прибора со следующими параметрами (таблица 15) и продолжительностью прогона 12 минут:

Таблица 15. Параметры

Насос	Waters bioAcQuity UPLC Quaternary Solvent Manager
Управление образцом	Waters bioAcQuity UPLC Sample Manager FTN
Компартмент колонки	Waters AcQuity UPLC 30cm Column Heater
Датчик	Waters AcQuity UPLC PDA
ELSD	н/д
Масс спектр	н/д
Колонки	Superdex 200 Increase 5/150 GL
Элюент A1	1X PBS (забуференный фосфатом солевой раствор) + 0,1M NaCl+5% изопропанол
Элюент B1	н/д

Результаты

Характеристики типовых ADC приведены в таблицах 16, 16a и 16b (способ сочетания и ЖХ/МС, состояние агрегирования и DAR). Средние значения DAR определяют с применением вышеуказанных способов ЖХ/МС (ЖХ/МС I), и долю агрегации определяют с применением вышеуказанных способов SEC (SEC I).

Таблица 16. Аналитическая характеристика ADC и методика конъюгирования

ADS	Способ	Способ	DAR	% аггр. (по
-----	--------	--------	-----	-------------

	конъюгирования	ЖХ-МС		SEC I)
Ab M - L9-P16	C1	ЖХ-IV	2,8	0,2
Ab M - L9-P17	C1	ЖХ-IV	3,2	0,2
Ab M - L9-P15	C1	ЖХ-IV	2,7	0,2
Ab M - L9-C1	C1	ЖХ-IV	2,7	3,8

Таблица 16а. Аналитическая характеристика ADC и методика конъюгирования

ADC	Способ конъюгирования	Способ I ЖХ-МС	DAR (по ЖХ-МС I)	% аггр. (по SEC I)
CD74_Молчащая Fc-L5-P1	C2	1	4,4	0,9
CD74_Молчащая Fc-L7-P1	C2	1	3,8	1,8

Таблица 16б. Аналитическая характеристика ADC и методика конъюгирования

ADC	Способ конъюгирования	Способ МСВР	DAR (по МСВР)	% аггр. (по SEC II)
CD74-L5-P1	C3	Белок	3,9	6,0
CD74-L30-P1	C3	Белок	3,8	5,7
CD74-L31-P1	C3	Белок	3,7	5,3
CD74-L32-P1	C3	Белок	3,6	10,3
CD74-L33-P1	C3	Белок	3,5	10,7
CD74-L34-P1	C3	Белок	3,9	10,1
CD74-L35-P1	C3	Белок	3,8	10,0
CD74-L36-P1	C3	Белок	3,8	8,0
CD74-L37-P1	C3	Белок	3,8	11,0
CD74-L60-P1	C3	Белок	3,7	8,0
CD74-L61-P1	C3	Белок	3,8	3,4
CD74-L62-P1	C3	Белок	3,8	5,5
CD74-L63-P1	C3	Белок	3,7	12,0
CD74-L67-P1	C3	Белок	3,7	9,1
CD74-L68-P1	C3	Белок	3,8	17
CD74-L69-P1	C3	Белок	3,8	5,7
CD74-L71-P1	C3	Белок	3,8	12,3
CD74-L72-P1	C3	Белок	3,5	6,0
CD74-L77-P1	C3	Белок	3,5	11,0
CD74-L78-P1	C3	Белок	3,6	18,0
CD74-L79-P1	C3	Белок	3,7	21,0
CD74-L86-P1	C3	Белок	3,7	9,0

Пример 5: In Vitro оценка I

Ингибирование Mcl-1 за счет поляризации флуоресценции (FP)

Относительную связывающую способность каждого соединения определяют с помощью поляризации флуоресценции (FP). В способе используют меченый флуоресцеином лиганд (Флуоресцеин-βAla-Ahx-A-REIGAQLRRMADDLNAQY-OH; MW

2765), который связывается с белком Mcl-1 (эталонная последовательность UniProt: Q07820; SEQ ID NO: 48), что приводит к увеличению измеренной анизотропии. в единицах милли-поляризации (мП) с применением ридера. Добавление соединения, которое конкурентно связывается с тем же сайтом, что и лиганд, приводит к увеличению доли несвязанного лиганда в системе, на что указывает уменьшение количества мП единиц.

Готовят 11-точечное серийное разведение каждого соединения в ДМСО и 2 мкл переносят в 384-луночный планшет с плоским дном и низким уровнем связывания (конечная концентрация ДМСО 5%). Затем добавляют 38 мкл буфера (10 mM 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтанесульфоновая кислота [HEPES], 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,4), содержащего меченный флуоресцеином лиганд (конечная концентрация 1 нМ) и белок Mcl-1 (конечная концентрация 5 нМ).

Планшеты для анализа инкубируют ~2 часа при комнатной температуре перед измерением FP на ридере Biomek Synergy2 (Возб. 528 нм, Исп. 640 нм, Порог 510 нм) и рассчитывают единицы мП. Связывание возрастающих доз тестируемого соединения выражают как долю снижения мП по сравнению с окном, установленным между контролями «только 5% ДМСО» и «100% ингибирование». Кривые доза-ответ с 11 точками строят с помощью программного обеспечения XL-Fit с использованием 4-параметрической логистической модели (сигмоидальная модель доза-ответ) и определяют ингибирующие концентрации, которые дают 50% снижение мП (IC_{50}). Результаты представлены в таблице 17 ниже. Результаты показывают, что тестируемые соединения ингибируют взаимодействие между белком Mcl-1 и пептидом, меченным флуоресцеином.

Цитотоксичность in vitro

Исследования цитотоксичности проводят на клеточной линии множественной миеломы NCI-H929. Клетки распределяют по микропланшетам и подвергают воздействию тестируемых соединений в течение 48 часов. Затем жизнеспособность клеток определяют колориметрическим анализом Microculture Tetrazolium Assay (Carmichael et al. (1987) Cancer Res. 47:936-42).

Результаты выражают в IC_{50} (концентрация соединения, которая ингибирует жизнеспособность клеток на 50%) и они представлены в таблице 17 ниже. Результаты показывают, что тестируемые соединения цитотоксичны для клеток NCI-H929.

Таблица 17. IC_{50} ингибирования Mcl-1 и цитотоксичности в клетках NCI-H929

Полезная нагрузка	IC_{50} (M) Mcl-1 FP	IC_{50} (M) МТТ Н929	Полезная нагрузка	IC_{50} (M) Mcl-1 FP	IC_{50} (M) МТТ Н929
C1	2,8E-09	3,0E-09	C8	3,0E-09	5,74E-07
C2	2,6E-09	8,51E-06	C9	2,5E-09	2,27E-06

Полезная нагрузка	IC ₅₀ (M) Mcl-1 FP	IC ₅₀ (M) MTT H929	Полезная нагрузка	IC ₅₀ (M) Mcl-1 FP	IC ₅₀ (M) MTT H929
C3	9,48E-10	4,2E-08	C10	3,4E-09	1,35E-08
C4	2,6E-09	3,21E-06	C11	5,3E-09	7,0E-09
C5	4,05E-09	4,08E-09	C12	5,9E-09	4,2E-08
C6	1,18E-09	3,0E-09	C13	2,2E-09	3,76E-09
C7	2,6E-09	1,88E-09	C14	8,4E-10	2,61E-09

Пример 6: In Vitro оценка II - In vitro активность CD74-L7-P1 и P1 полезной нагрузки в клеточных линиях DLBCL (CTG 72ч)

Клеточные линии DLBCL (Karpas422, SUDHL4, NUDHL1, SUDHL6, SUDHL10, DOHHL2 и SUDHL5) культивируют в RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки, пенициллина (100 ME/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и L-глутамина (2 mM). Клетки культивируют при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки высевают в 96-луночные планшеты и подвергают воздействию ADC или соответствующей полезной нагрузки в течение 72 часов (серийное разведение; по 9 концентраций каждого, трижды). Влияние ADC или полезной нагрузки на жизнеспособность клеток оценивают через 3 дня инкубации при 37°C/5% CO₂ путем количественного определения клеточных уровней АТФ с использованием CellTiterGlo в количестве 75 мкл реагента на лунку. Все условия тестируют в трех повторах. Люминесценцию количественно определяют на многофункциональном планшетном ридере. IC₅₀ рассчитывают с использованием аппроксимации стандартной четырехпараметрической кривой. IC₅₀ определяют как концентрацию соединения, при которой сигнал CTG снижается до 50% от измеренного для контроля. Каждый эксперимент проводят не менее двух раз с воспроизводимостью результатов. Как показано в таблице 18 и на **фиг. 1А** и **1В**, полезная нагрузка P1 и ADC CD74-L7-P1 вызывают дозозависимое снижение жизнеспособности клеток DLBCL в анализе CTG.

Таблица 18: IC₅₀ цитотоксичности ADC и полезной нагрузки в различных клеточных линиях

IC ₅₀ M (CTG 72h)	Karpas422	SUDHL4	NUDHL 1	SUDHL6	SUDHL1 0	DOHHL 2	SUDHL5
IgG-L7-P1	He тестировано	He тестировано	He тестировано	He тестировано	>3,0e-007	>3,0e-007	>3,0e-007
CD74-L7-P1	1,054e-009	4,793e-010	1,033e-008	1,453e-009	9,417e-011	1,195e-009	3,139e-011
P1	1,921e-009	9,373e-010	1,849e-008	3,087e-009	2,164e-010	1,824e-009	2,164e-010

Пример 7: In Vitro оценка III - In vitro активность CD74-Mcl-1 ADC и полезных

нагрузок в клеточной линии Monomac1 AML (CTG 72ч)

Клетки Monomac1 культивируют в RPMI с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки, пенициллина (100 МЕ/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и L-глутамин (2 мМ). Клеточные линии культивируют при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки высевают в 96-луночные планшеты и подвергают воздействию полезных нагрузок или ADC в течение 72 часов (серийное разведение; 9 концентраций каждого, трижды). Влияние полезных нагрузок или ADC на жизнеспособность клеток оценивают через 3 дня инкубации при 37°C/5% CO₂ путем количественного определения клеточных уровней АТФ с использованием CellTiterGlo при 75 мкл реагента на лунку. Все условия тестируют в трех повторах. Люминесценцию количественно определяют на многофункциональном планшетном ридере. IC₅₀ рассчитывают с использованием аппроксимации стандартной четырехпараметрической кривой. IC₅₀ определяют как концентрацию соединения, при которой сигнал CTG снижается до 50% от измеренного для контроля. Каждый эксперимент проводят не менее двух раз с воспроизводимостью результатов. Как показано в таблице 19 и на **фиг. 2**, полезные нагрузки и анти-CD74-Mcl-1 ADC вызывали дозозависимое снижение жизнеспособности клеток Monomac1 в анализе CTG.

Таблица 19. IC₅₀ цитотоксичности ADC и полезной нагрузки в клетке Monomac-

1

ADC или полезные нагрузки	IC50 M (CTG 72ч) Monomac1
CD74-L7-P1	9,217e-011
P1	1,294e-009
CD74-L9-P1	4,815e-010
P1	1,322e-009
CD74-L9-P17	2,367e-011
P17	6,201e-010
CD74-L9-P16	2,064e-011
P16	2,812e-010
CD74-L9-P15	3,996e-011
P15	3,86e-010

Пример 8: In Vitro оценка IV - In vitro активность CD74 ADC в разных линиях раковых клеток

Клеточные линии

Конъюгат CD74 MCL-1 антитело-лекарственное средство CD74-L7-P1, изотип IgG-L7-P1 ADC и полезную нагрузку P1, не содержащую MCL-1, тестируют на шести линиях

эндогенных раковых клеток. KMS-21BM (JCRB № JCRB1185, культивированные в RPMI-1640+10% FBS), KMS-20 (JCRB № JCRB1196, культивированные в RPMI-1640+10% FBS), MONO-MAC-1 (DSMZ № ACC-252 культивированные в RPMI-1640+10% FBS+1x заменимые аминокислоты+1 мМ пируват натрия), NOMO-1 (DSMZ № ACC-542, культивированные в RPMI-1640+10% FBS), Kasumi-6 (ATCC № CRL-2775, культивированные в RPMI-1640+20% FBS+1,5 г/л бикарбоната натрия+4,5 г/л глюкозы+10 мМ HEPES, + 1 мМ пирувата натрия с добавлением 2 нг/мл рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (GM-CSF) и EOL-1 (DSMZ №. ACC-386, культивированные в RPMI-1640+10% FBS)

Ингибирование пролиферации и выживания клеток

Способность конъюгата антитело-лекарственное средство CD74 MCL-1 (CD74-L7-P1), изотипа IgG-L7-P1 ADC и полезной нагрузки P1, не содержащей MCL-1, ингибировать пролиферацию и выживаемость клеток оценивают с помощью анализа пролиферации Promega CellTiter-Glo®. Клеточные линии культивируют в среде, оптимальной для их роста, при 5% CO₂, 37°C в инкубаторе для тканевых культур. Перед посевом для анализа пролиферации клетки разделяют, по меньшей мере, за 2 дня до анализа для обеспечения оптимальной плотности роста. В день посева собирают суспензионные клетки. Жизнеспособность клеток и плотность клеток определяют с использованием счетчика клеток (Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter). Клетки с жизнеспособностью выше 85% высевают в 384-луночные планшеты с белым прозрачным дном, обработанные TC (Corning кат. № 3765). Клетки высевают с плотностью 1000 клеток на лунку в 45 мкл стандартной питательной среды. Планшеты инкубируют при 5% CO₂, 37°C в течение ночи в инкубаторе для тканевых культур. На следующий день, полезную нагрузку, не содержащую MCL-1 (P1), таргетный MCL-1 ADC и не таргетный изотип ADC готовят при 10X в стандартной питательной среде. Затем к клеткам добавляют приготовленные лекарственные препараты, что дает конечные концентрации 0,0005-500 нМ и конечный объем 50 мкл на лунку. Каждую концентрацию препарата тестируют в учетверенных количествах. Планшеты инкубируют при 5% CO₂, 37°C в течение 5 дней в инкубаторе для культур тканей, после чего жизнеспособность клеток оценивают путем добавления 25 мкл CellTiter Glo® (Promega, кат. № G7573), реагента, который лизирует клетки и измеряет общее содержание аденозинтрифосфата (АТФ). Планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентных сигналов перед считыванием с использованием ридера для люминесценции (EnVision Multilabel Plate Reader, PerkinElmer). Для оценки эффекта лечения лекарственными средствами, для нормализации обработанных образцов используют подсчеты люминесценции из лунок, содержащих необработанные клетки (100% жизнеспособность). Модель переменного углового коэффициента применяют для подгонки кривой нелинейной регрессии к данным в программе GraphPad PRISM версии 7.02. Значения IC₅₀ и A_{max} экстраполируют из полученных кривых.

Результат

Дозозависимые кривые для типовых линий раковых клеток, экспрессирующих представляющую интерес мишень CD74, показаны на **фиг. 3** (квадрат=CD74-L7-P1, круг IgG-L7-P1, треугольник=свободная полезная нагрузка MCL1 P1). Концентрации обработки, необходимые для ингибирования 50% роста или выживаемости клеток (IC₅₀), рассчитывают с типовыми значениями IC₅₀ для тестируемых клеточных линий, суммированных в Таблице 20.

Таблица 20: CD74 MCL1 ADC

	CD74-L7-P1		IgG-L7-P1		P1	
	IC ₅₀ (нМ)	A _{max}	IC ₅₀ (нМ)	A _{max}	IC ₅₀ (нМ)	A _{max}
KMS-21BM	0,948	98,75	>200	--	0,941	85,27
KMS-20	0,814	101,3	>200	--	4,946	94,34
MONO-MAC-1	**	**	>200	--	1,151	82,41
Kasumi-6	2,947	127,8	>200	--	9,266	88,12
NOMO-1	1,433	95,88	>200	--	5,015	110,9
EOL-1	0,118	124,0	>200	--	1,095	67,97

** протестировано, но кривая не сошлась

Пример 9: In Vitro оценка V - In vitro активность CD74 ADC в качестве единственного агента и в комбинации с ингибиторами Bcl-2

Клеточные линии

Конъюгат CD74 MCL-1 антитело-лекарственное средство тестируют на трех линиях эндогенных раковых клеток. MONO-MAC-1 (DSMZ № ACC-252 культивированные в RPMI-1640+10% FBS+1x заменимые аминокислоты+1 мМ пируват натрия), NOMO-1 (DSMZ № ACC-542, культивированные в RPMI-1640+10% FBS) и EOL-1 (DSMZ No. ACC-386, культивированные в RPMI-1640+10% FBS)

Ингибирование клеточной пролиферации и выживаемости

Способность CD74 MCL-1 конъюгата антитело-лекарственное средство ингибировать пролиферацию клеток в комбинации с ингибитором BCL-2, и выживаемость оценивают с применением анализа пролиферации Promega CellTiter-Glo®. Клеточные линии культивируют в среде, оптимальной для их роста, при 5% CO₂, 37°C в инкубаторе для тканевых культур. Перед посевом для анализа пролиферации, клетки разделяют, по меньшей мере, за 2 дня до анализа для обеспечения оптимальной плотности роста. В день посева собирают суспензионные клетки. Жизнеспособность клеток и плотность клеток определяют с помощью счетчика клеток (Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter). Клетки с жизнеспособностью выше 85% высевают в 384-луночные планшеты с белым прозрачным дном, обработанные TC (Corning кат. № 3765). Клетки высевают с плотностью 1000 клеток на лунку в 45 мкл стандартной питательной среды. Планшеты инкубируют при 5% CO₂, 37°C в течение ночи в инкубаторе для тканевых культур. На следующий день, полезную нагрузку (P1), не содержащую MCL-1, таргетирующие MCL-1 ADC и не таргетный изотип ADC готовят при 10X стандартной питательной среде. Полученное лекарственное средство затем добавляют к клеткам с получением конечной концентрации 0,0005-300 нМ и конечного объема 50 мкл на лунку. Концентрацию каждого

лекарственного средства тестируют четыре раза. Для каждого соединения оценивают три варианта условий. Соединения оценивают как отдельные агенты и в комбинации с Венетоклаксом и в комбинации с Соединением А1. Венетоклакс и Соединение А1 вводят в конечной концентрации 5 нМ или 50 нМ. Планшеты инкубируют при 5% CO₂, 37°C в течение 5 дней в инкубаторе для культур тканей, после чего жизнеспособность клеток оценивают путем добавления 25 мкл реагента CellTiter Glo® (Promega, кат. № G7573), который лизирует клетки и измеряет общее содержание аденозинтрифосфата (АТФ). Планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентных сигналов перед считыванием с применением устройства для считывания люминесценции (EnVision Multilabel Plate Reader, PerkinElmer). Чтобы оценить эффект лечения лекарственным средством, подсчет люминесценции из лунок, содержащих необработанные клетки (100% жизнеспособность), используют для нормализации обработанных образцов. Для подгонки кривой нелинейной регрессии к данным в программе GraphPad PRISM версии 7,02 применяют модель переменного углового коэффициента. Значения IC₅₀ и A_{max} экстраполируют из полученных кривых.

Результат

Дозозависимые кривые для типовых линий раковых клеток, экспрессирующих представляющие интерес мишени CD74, показаны на **ФИГ. 4** и **ФИГ. 5**. Концентрации обработки, необходимые для ингибирования 50% роста или выживаемости клеток (IC₅₀), рассчитывают с типовыми значениями IC₅₀ для тестируемых клеточных линий, приведенных в таблице 21.

Таблица 21: CD74-MCL-1 ADC в комбинации с Венетоклаксом и соединением А1

	NOMO-1		MONO-MAC-1		EOL-1	
	IC ₅₀ (нМ)	A _{max} (Span)	IC ₅₀ (нМ)	A _{max} (Span)	IC ₅₀ (нМ)	A _{max} (Span)
CD74-L5-P1	3,70	74,45	7,95	84,9	1,419	91,25
CD74-L5-P1+5 нМ Венетоклакс	1,03	89,68	1,31	115,5	0,164	113,4
CD74-L5-P1+50 нМ Венетоклакс	0,278	92,24	0,409	88,73	н/д	н/д
CD74-L5-P1+5 нМ Соединение А1	0,457	91,5	0,636	113,5	0,1364	99,58
CD74-L5-P1+50 нМ Соединение А1	0,138	100,6	0,156	115,4	н/д	н/д
P1	1,45	94,01	0,800	94,52	1,069	94,92
P1+5 нМ Венетоклакс	1,59	70,4	0,183	110,2	0,365	87,42
P1+50 нМ Венетоклакс	0,567	69,95	0,122	84,64	н/д	н/д
P1+5 нМ Соединение А1	0,640	60,65	0,100	121,5	0,2294	89,37
P1+50 нМ Соединение А1	0,222	97,61	0,052	102,9	н/д	н/д
IgG1-L5-P1	>50	--	107,9	73,83	>50	--

IgG1-L5-P1+5 нМ Венетоклак	>50	--	>50	107,1	>50	--
IgG1-L5-P1+50 нМ Венетоклак	>50	--	47,57	108,7	н/д	н/д
IgG1-L5-P1+5 нМ Соединение А1	137,6	123,2	57,93	122,4	92,33	122,1
IgG1-L5-P1+50 нМ Соединение А1	>50	--	30,8	114,8	н/д	н/д

Пример 10: In Vitro оценка VI - In vitro активность CD74 MCL-1 ADC

Клеточные линии

Конъюгат CD74 MCL-1 антитело-лекарственное средство тестируют на трех линиях эндогенных раковых клеток. MONO-MAC-1 (DSMZ № ACC-252 культивированные в RPMI-1640+10% FBS+1x заменимые аминокислоты+1 мМ пируват натрия), NOMO-1 (DSMZ № ACC-542, культивированные в RPMI-1640+10% FBS) и EOL-1 (DSMZ No. ACC-386, культивированные в RPMI-1640+10% FBS)

Ингибирование пролиферации клеток и выживаемости

Способность CD74 MCL-1 конъюгата антитело-лекарственное средство ингибировать пролиферацию клеток и выживаемость оценивают с помощью анализа пролиферации Promega CellTiter-Glo®. Клеточные линии культивируют в среде, оптимальной для их роста, при 5% CO₂, 37°C в инкубаторе для культур тканей. Перед посевом для анализа пролиферации, клетки разделяют, по меньшей мере, за 2 дня до анализа для обеспечения оптимальной плотности роста. В день посева собирают суспензионные клетки. Жизнеспособность клеток и плотность клеток определяют с помощью счетчика клеток (Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter). Клетки с жизнеспособностью выше 85% высевают в 384-луночные планшеты с белым прозрачным дном, обработанные TC (Corning кат. № 3765). Клетки высевают с плотностью 1000 клеток на лунку в 45 мкл стандартной питательной среды. Планшеты инкубируют при 5% CO₂, 37°C в течение ночи в инкубаторе для культур тканей. На следующий день таргетирующие MCL-1 ADC готовят при 10X в стандартной питательной среде. Подготовленные обработки лекарственным средством затем добавляют к клеткам, с получением конечных концентраций 0,01-200 нМ и конечного объема 50 мкл на лунку. Концентрацию каждого лекарственного средства тестируют с четырьмя повторами. Планшеты инкубируют при 5% CO₂, 37°C в течение 5 дней в инкубаторе для культур тканей, после чего жизнеспособность клеток оценивают путем добавления 25 мкл реагента CellTiter Glo® (Promega, кат. № G7573), который лизирует клетки и измеряет общее содержание аденозинтрифосфата (АТФ). Планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентных сигналов перед считыванием с применением ридера люминесценции (EnVision Multilabel Plate Reader, PerkinElmer). Чтобы оценить эффект лечения лекарственным средством, подсчет люминесценции из лунок, содержащих необработанные клетки (100% жизнеспособность), используют для нормализации обработанных образцов. Для подгонки кривой нелинейной регрессии к данным в программе GraphPad PRISM версии 7,02 применяют модель переменного углового коэффициента. Значения IC₅₀ и A_{max} экстраполируют из полученных кривых, и они показаны в таблице 22.

Таблица 22: значения IC₅₀

Линкер- полезная нагрузка в ADC	Высвобо- жденная полезная нагрузка	MONO- MAC-1 IC ₅₀ (нМ)	MONO- MAC-1 A _{max}	NOMO-1 IC ₅₀ (нМ)	NOMO -1 A _{max}	EOL-1 IC ₅₀ (нМ)	EOL-1 A _{max}
L5-P1	P1	7,95	84,9	2,221	55,58	1,018	75,06
L30-P1	P1	5,451	86,78	1,617	78,95	0,2508	197,6
L31-P1	P1	3,959	110,3	1,195	73,4	0,466	83,98
L32-P1	P1	6,721	97,57	1,504	62,58	0,1604	125
L33-P1	P1	6,716	89,18	2,584	58,95	0,6202	66,96
L34-P1	P1	6,275	104,4	2,961	66,95	0,736	70,92
L35-P1	P1	**	**	6,904	62,73	0,8938	75,56
L36-P1	P1	0,519	66,3	4,578	63,34	0,6856	100,8
L37-P1	P1	**	**	5,141	83,05	0,0425	243
L60-P1	P1	**	**	2,625	76,94	0,5348	79,04
L61-P1	P1	**	**	0,5457	45,63	0,03283	63,76
L62-P1	P1	**	**	3,411	65,18	0,7708	83,03
L63-P1	P1	**	**	0,7138	61,25	**	**
L67-P1	P1	**	**	2,493	79,39	0,2614	119,3
L68-P1	P1	**	**	6,912	91,25	0,788	127,3
L69-P1	P1	**	**	14,75	95,03	0,7043	159,6
L71-P1	P1	**	**	9,825	53,62	0,3409	93,09
L72-P1	P1	**	**	**	57,68	0,3857	109,8
L77-P1	P1	0,9865	108,2	3,185	48,53	0,3832	102,6
L78-P1	P1	**	**	3,735	53,4	0,4304	87,22
L79-P1	P1	**	**	3,136	56,07	0,4916	91,3
L86-P1	P1	**	**	7,475	74,52	0,7212	105,5

** протестировано, но кривая не сошлась

Пример 11. In Vivo оценка I - In vivo активность CD74 ADC в Nomo1 модели острого миелоидного лейкоза после внутривенного (ВВ) введения

Терапевтический эффект *in vivo* таргетирующего CD74 ADC, составленного в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS), определяют на модели острого миелоидного лейкоза Nomo1 после внутривенного (ВВ) введения. Тестируют следующие соединения: анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1, анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc и IgG1-линкер-полезная нагрузка с молчащей Fc.

Материалы и методы.

Клетки Nomo1, полученные из DSMZ, культивируют в RPMI с добавлением 10% FBS. 0,1 мл, содержащий 5×10^6 клеток, подкожно инокулируют в правый бок самок мышей SCID, предоставленных Charles River. Когда опухоли достигают соответствующего объема, мышей произвольно распределяют по 6 животных на группу, с применением программного обеспечения Easy stat. IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc, анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молей Fc_L5-P1 (30 мг/кг) вводят однократно

внутривенно в PBS. Венетоклакс (синтезированный в Servier Research Institute - IdRS) составляют в виде PEG/EtOH/Phosal (полиэтиленгликоль/этанол/фосфал, 30/10/60) и вводят перорально (ПО) ежедневно в течение недели (50мг/кг, 4ON/3OFF/4ON). Измеряют массу тела мышей три раза в неделю и измеряют размер опухоли с помощью электронных штангенциркулей. Объем опухоли оценивают путем измерения минимального и максимального диаметров опухоли по формуле: (минимальный диаметр)²(максимальный диаметр)/2. В последний день, по меньшей мере, у половины животных из всех групп, все еще присутствующих в исследовании (d9), ингибирование роста опухоли вычисляют с применением формулы:

$$\left(1 - \frac{\text{Среднее (DTV при Dх в леченной группе)}}{\text{Среднее (DTV при Dх в контрольной группе)}}\right) \times 100$$

где DTV (дельта объема опухоли) при Dх, рассчитанный как TV при Dх - TV в случайном порядке.

Мышей умерщвляют при первом измерении, при котором объем опухоли превышает 2000 мм³, или при первых признаках ухудшения здоровья животных. Все эксперименты проводят в соответствии с французскими правилами, действующими в 2018 году после одобрения IdRS Ethical Committee. Мышей SCID содержат в соответствии с установленными правилами.

Результаты

Эффективность анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 на ксенотрансплантатах Nomo1 проиллюстрирована на **ФИГ. 3**. Лечение начинают через 10 дней после инокуляции опухолевых клеток (средний размер 191,6 мм³). IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc (не таргетное ADC FS), анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc (голое антитело FS) и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 (CD74-таргетное ADC FS) вводят ВВ в дозе 30 мг/кг. Не таргетные ADC FS и CD74-таргетные ADC FS также объединяют с венетоклаксом, который дозируют ПО 4ON/3OFF/4ON в дозе 50 мг/кг. На 9 день отсутствие или очень незначительное ингибирование роста опухоли (% TGI) было индуцировано голым антителом FS, CD74-таргетное ADC FS или соответствующее не таргетное ADC FS в дозе 30 мкг/кг (TGI=32,7%, -5,6% и -12,2%, соответственно), как изображено на **ФИГ. 6** и Таблице **23**. Однако в комбинации с венетоклаксом, противоопухолевая активность, индуцированная CD74-таргетным ADC FS, была намного выше, чем соответствующего не таргетного ADC FS (TGI=98,6% против 5,5%, соответственно, p <0,001). Следует отметить, что только венетоклакс практически не влиял на рост опухоли (TGI=26,2%). Клинически значимой потери массы тела или других клинических признаков в результате лечения не наблюдают (**ФИГ. 7**).

Таблица 23: Ингибирование роста опухоли Nomo1

Лечение	Доза/схема	%TGI (d9)
IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc	30МК QD, ВВ	-12,2
анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc	30МК QD, ВВ	32,7

анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1	30МК QD, BB	-5,6
Венетоклак	50МК 4ON/3OFF/4ON, ПО	26,2
IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc+ венетоклак	30МК QD, BB+ 50МК 4ON/3OFF/4ON, ПО	5,5
анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1+ венетоклак	30МК QD, BB+ 50МК 4ON/3OFF/4ON, ПО	98,6***

*** $p \leq 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Пример 12. In Vivo оценка II - In vivo активность CD74 ADC в Karpas422 модели диффузной В-крупноклеточной лимфомы после внутривенного (BB) введения

Терапевтический эффект *in vivo* таргетирующего CD74 ADC, составленного в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS), определяют на модели диффузной В-крупноклеточной лимфомы Karpas422 после внутривенного (BB) введения. Тестируют следующие соединения: CD74-таргетным ADC является анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1, IgG1-линкер-полезная нагрузка с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc.

Материалы и методы.

Клетки Karpas422, полученные из ATCC, культивируют в RPMI с добавлением 20% FBS. Клетки ресуспендируют в 100% Matrigel (BD Biosciences), и 0,1 мл содержащий 11×10^6 клеток, подкожно инокулируют в правый бок самок мышей NSG, предоставленных Charles River. Когда опухоли достигают соответствующего объема, мышей произвольно распределяют по 6 животных на группу, с применением программного обеспечения Easy stat. IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc, анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молей Fc_L5-P1 (30 мг/кг) вводят однократно BB в PBS. Венетоклак (синтезированный в Servier Research Institute - IdRS) составляют в виде PEG/EtOH/Phosal (полиэтиленгликоль/этанол/фосфал, 30/10/60) и вводят перорально (ПО) ежедневно в течение недели (50 мг/кг, 4ON/3OFF/4ON). Измеряют массу тела мышей три раза в неделю и измеряют размер опухоли с помощью электронных штангенциркулей. Объем опухоли оценивают путем измерения минимального и максимального диаметров опухоли по формуле: $(\text{минимальный диаметр})^2(\text{максимальный диаметр})/2$. В последний день, по меньшей мере, у половины животных из всех групп, все еще присутствующих в исследовании (d23), ингибирование роста опухоли вычисляют с применением формулы:

$$\left(1 - \frac{\text{Среднее (DTV при Dx в леченной группе)}}{\text{Среднее (DTV при Dx в контрольной группе)}}\right) \times 100$$

где DTV (дельта объема опухоли) при Dx, рассчитанный как TV при Dx - TV в случайном порядке. Ответ оценивают следующим образом: CR (полный ответ), если размер опухоли $\leq 25 \text{ мм}^3$, по меньшей мере, для трех измерений, PR (частичный ответ), если размер опухоли от 25 мм^3 до $168,3 \text{ мм}^3$ (половина начального размера), по меньшей мере, для трех измерений. Мышей умерщвляют при первом измерении, при котором объем опухоли превышает 2000 мм^3 , или при первых признаках ухудшения здоровья животных. Все эксперименты проводят в соответствии с французскими правилами, действующими в 2018

году после одобрения IdRS Ethical Committee. Мышей SCID содержат в соответствии с установленными правилами.

Результаты

Эффективность анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 на ксенотрансплантатах Каграс422 проиллюстрирована на **ФИГ. 8**. Лечение начинают через 17 дней после инокуляции опухолевых клеток (средний размер 336,6 мм³). IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc (не таргетное ADC FS), анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc (голое антитело FS) и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 (CD74-таргетное ADC FS) вводят один раз ВВ в дозе 30 мг/кг. Не таргетные ADC FS и CD74-таргетные ADC FS также объединяют с венетоклаксом, который дозируют ПО 4ON/3OFF/4ON в дозе 50 мг/кг.

На 23 день отсутствие ингибирования роста опухоли (% TGI) было индуцировано голым антителом FS, CD74-таргетное ADC FS или соответствующее не таргетное ADC FS в дозе 30 мкг/кг (TGI=-1%, -61,8% и -76,2%, соответственно), как изображено на **ФИГ. 8** и Таблице 24. Однако в комбинации с венетоклаксом, противоопухолевая активность, индуцированная CD74-таргетным ADC FS, была намного выше, чем соответствующего не таргетного ADC FS (TGI=154,9% против -9%, соответственно, $p < 0,001$). Следует отметить, что только венетоклакс практически не влиял на рост опухоли (TGI=31,1%). Никаких клинических признаков в результате лечения не наблюдают, кроме умеренной потери массы тела (все еще не клинически значимой) в группах, дозированных венетоклаксом (**ФИГ. 9**).

Таблица 24: Ингибирование роста опухоли Каграс422

Лечение	Доза/схема	%TGI (d23)	%CR	%PR
IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc	30МК QD, ВВ	-76,2	0	0
анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc	30МК QD, ВВ	-1	0	0
анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1	30МК QD, ВВ	-61,8	0	0
Венетоклакс	50МК 4ON/3OFF/4ON, ПО	31,1	0	0
IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc+ венетоклакс	30МК QD, ВВ+ 50МК 4ON/3OFF/4ON, ПО	-9	0	0
анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1+ венетоклакс	30МК QD, ВВ+ 50МК 4ON/3OFF/4ON, ПО	154,9***	33	67

*** $p \leq 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Пример 13. In Vivo Оценка III - In vivo активность CD74 ADC в Мономаc1 модели острого миелоидного лейкоза после внутривенного (ВВ) введения

Терапевтический эффект *in vivo* таргетирующего CD74 ADC, составленного в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS), определяют на модели острого

миелоидного лейкоза Monomas1 после внутривенного (ВВ) введения. Тестируют следующие соединения: CD74-таргетным ADC является анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1, IgG1-линкер-полезная нагрузка с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc.

Материалы и методы.

Клетки Monomas1, полученные из DSMZ, культивируют в RPMI с добавлением 10% FBS. 0,1 мл содержащий 5×10^6 клеток, подкожно инокулируют в правый бок самок мышей SCID, предоставленных Charles River. Когда опухоли достигают соответствующего объема, мышей произвольно распределяют по 6 животных на группу, с применением программного обеспечения Easy stat. IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc, анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc и анти-CD74_CysmAb с молей Fc_L5-P1 (30 мг/кг) вводят однократно ВВ в PBS. Венетоклакс (синтезированный в Servier Research Institute - IdRS) составляют в виде PEG/EtOH/Phosal (полиэтиленгликоль/этанол/фосфал, 30/10/60) и вводят перорально (ПО) ежедневно в течение недели (50 мг/кг, 2ON/2OFF/5ON/2OFF/4ON). Измеряют массу тела мышей три раза в неделю и измеряют размер опухоли с помощью электронных штангенциркулей. Объем опухоли оценивают путем измерения минимального и максимального диаметров опухоли по формуле: (минимальный диаметр)²(максимальный диаметр)/2. В последний день, по меньшей мере, у половины животных из всех групп, все еще присутствующих в исследовании (d16), ингибирование роста опухоли вычисляют с применением формулы:

$$\left(1 - \frac{\text{Среднее (DTV при } D_x \text{ в леченной группе)}}{\text{Среднее (DTV при } D_x \text{ в контрольной группе)}}\right) \times 100$$

где DTV (дельта объема опухоли) при D_x , рассчитанный как TV при D_x - TV в случайном порядке.

Ответ оценивают следующим образом: CR (полный ответ), если размер опухоли ≤ 25 мм³, по меньшей мере, для трех измерений, PR (частичный ответ), если размер опухоли от 25 мм³ до 60,1 мм³ (половина начального размера), по меньшей мере, для трех измерений. Мышей умерщвляют при первом измерении, при котором объем опухоли превышает 2000 мм³, или при первых признаках ухудшения здоровья животных. Все эксперименты проводят в соответствии с французскими правилами, действующими в 2018 году после одобрения IdRS Ethical Committee. Мышей SCID содержат в соответствии с установленными правилами.

Результаты

Эффективность анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 на ксенотрансплантатах Каграс422 проиллюстрирована на **ФИГ. 10**. Лечение начинают через 7 дней после инокуляции опухолевых клеток (средний размер 120,2 мм³). IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc (не таргетное ADC FS), анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc (голое антитело FS) и анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1 (CD74-таргетное ADC FS) вводят один раз ВВ в дозе 30 мг/кг. Не таргетные ADC FS и CD74-таргетные ADC FS также объединяют с венетоклаксом, который дозируют ПО 2ON/2OFF/5ON/2OFF/4ON в дозе 50

мг/кг. На 16 день отсутствие ингибирования роста опухоли (% TGI), индуцированное CD74-таргетным ADC FS в дозе 30 мкг/кг было больше, чем для голого антитела FS (TGI=33,8% к -23%, соответственно, $p < 0,05$) и соответствующего не таргетного ADC FS (TGI=-14,6%), как изображено на **ФИГ. 10** и Таблице **25**. В сочетании с венетоклаксом не таргетное ADC FS проявляет некоторую противоопухолевую активность (TGI=34,4%, $p < 0,05$), но полная и продолжительная регрессия опухоли наблюдается только в сочетании с CD74-таргетным ADC FS (TGI=108,5%, $p < 0,001$). Клинически значимой потери веса тела или других клинических признаков в результате лечения не наблюдают (**ФИГ. 11**).

Таблица 25: Ингибирование роста опухоли Monomac1

Лечение	Доза/схема	%TGI (d16)	%CR	%PR
IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc	30МК QD, BB	-14,6	0	0
анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc	30МК QD, BB	-23	0	0
анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1	30МК QD, BB	33,8*	0	0
Венетоклакс	50МК 2ON/2OFF/5ON/2OFF/4ON, ПО	4,5	0	0
IgG1-Линкер-Полезная нагрузка с молчащей Fc+ венетоклакс	30МК QD, BB+50МК 2ON/2OFF/5ON/2OFF/4ON, ПО	34,4*	0	0
анти-CD74_CysmAb с молчащей Fc_L5-P1+ венетоклакс	30МК QD, BB+50МК 2ON/2OFF/5ON/2OFF/4ON, ПО	108,5***	100	0

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ по сравнению в контрольной группой

Пример 14: In vivo эффективность CD74-L5-P1 с молчащей Fc против EOL1 модели ксенотрансплантата острого миелоидного (эозинофильного) лейкоза у мышей

Поскольку исследования *in vitro* продемонстрировали мишень-зависимое и эффективное ингибирование роста клеток в клеточной линии EOL1 для комбинации CD74-L5-P1 с молчащей Fc с венетоклаксом, противоопухолевую активность этого комбинированного лечения оценивают *in vivo* на этой модели AML.

Способы

Клетки, трансфицированные люциферазой EOL1, культивируют при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе в среде RPMI1640 (BioConcept Ltd. Amimed) с добавлением 10% FCS (BioConcept Ltd. Amimed, # 2-01F30-I), 2 мМ L-глутамин (BioConcept Ltd. Amimed, # 5-10K00-H) и 1 мМ пирувата натрия (BioConcept Ltd. Amimed, # 5-60F00-H), 10 мМ HEPES (Gibco # 11560496). Для установки ксенотрансплантатов EOL1, клетки собирают и ресуспендируют в HBSS (Gibco, # 14175) перед тем, как вводить подкожно 100 мкл, содержащих 5×10⁶ клеток, в бок самок бежевых мышей SCID (Charles River, Germany).

Рост опухоли контролируют регулярно после инокуляции клеток, и животных произвольно распределяют в группы лечения (n=6) со средним объемом опухоли около 130 мм³. Контрольную и различные лечебные группы дозируют, как указано на **ФИГ. 12**. CD74-L5-P1 с молчащей Fc, изотип IgG1. ADC с молчащей Fc и CD74 с молчащей Fc антитело вводят внутривенно (вв) однократно в начале лечения в дозах, указанных на **ФИГ. 12**, либо отдельно, либо в комбинации с венетоклаксом, который вводят перорально (по) ежедневно (qd) в дозе 50 мг/кг. Дозы корректируют в соответствии с массой тела каждой мыши. Объем внутривенной дозы составляет 10 мл/кг, и каждый ADC растворяют в 0,9% (масс./об.) NaCl в воде. Данные об объеме опухоли на 10 день после лечения анализируют статистически с использованием рангового критерия Краскела-Уоллиса (Indigo Software). Если применимо, результаты представлены как среднее ± СОС. В качестве меры эффективности, значение % Т/С рассчитывают на 10 день по:

$$(\Delta \text{ объем опухоли}_{\text{леченной}} / \Delta \text{ объем опухоли}_{\text{контрольной}}) * 100$$

Регресс опухоли рассчитывали по:

$$- (\Delta \text{ объем опухоли}_{\text{леченной}} / \Delta \text{ объем опухоли}_{\text{леченной в начале}}) * 100$$

Где Δ объема опухоли является средний объем опухоли в день оценки минус средний объем опухоли в начале эксперимента.

Результаты: эффективность и переносимость.

Противоопухолевые эффекты CD74-L5-P1 с молчащей Fc в комбинации с венетоклаксом вместе с различными контрольными группами суммированы на **ФИГ. 12** и в Таблице 26. Ограниченная эффективность наблюдается только при использовании венетоклакса (50 мг/кг перорально 1 раз в день) и комбинации CD74 с молчащей Fc антитело плюс венетоклаксом. Небольшую задержку роста опухоли (TGD) наблюдают при комбинации изотипа IgG1 ADC (30 мг/кг) плюс венетоклаксом (50 мг/кг) и также с CD74-L5-P1 с молчащей Fc (30 мг/кг), но никакие них статистически не отличаются от контрольной группы носителя. Напротив, полную регрессию (CR) наблюдают для CD74-L5-P1 с молчащей Fc в дозе 10 или 30 мг/кг ВВ однократно в комбинации с венетоклаксом 50 мг/кг перорально qdx21 (p <0,05 для группы носителя и группы изотипа IgG1 ADC плюс венетоклаксом). Все процедуры хорошо переносятся на основе изменения массы тела (**ФИГ. 13**).

Таблица 26: Противоопухолевые эффекты CD74-L5-P1 с молчащей Fc в комбинации с венетоклаксом

Тестируемый агент, схема и путь дозирования	День	Δ объема опухоли (мм ³)	Т/С (%)	Регрессия (%)
носитель по+носитель вв	10	1082	100	
носитель по+CD74-L5-P1 с молчащей Fc 30	10	817	76	

мг/кг вв				
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+носитель для ADC	10	977	90	
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+CD74-L5-P1 с молчащей Fc 30 мг/кг вв	10	-128		-100* [§]
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+CD74-L5-P1 с молчащей Fc 10 мг/кг вв	10	-127		-100* [§]
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+изотип-IgG1 ADC с молчащей Fc 30 мг/кг вв	10	963	88,99	
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+CD74 с молчащей Fc 30 мг/кг вв	10	1028	95,03	

Дельты объемов опухолей и T/C% рассчитаны на 10 день и представлены как средние. * означает статистическую разницу ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным носителем и [§] означает статистическую разницу ($< 0,05$) по сравнению с изотипом IgG1 ADC+венетоклакс на 10 день (ранговый критерий Краскела-Уоллиса; Indigo Software).

Пример 15: *In vivo* эффективность CD74-ADCs с молчащей Fc с разными линкерами-полезными нагрузками против EOL1 модели ксенотрансплантата острого миелоидного (эозинофильного) лейкоза у мышей

Для оптимизации линкера-полезной нагрузки, эффективность 6 CD74-ADC с разными линкерами-полезными нагрузками (L5-P1, L30-P1, L31-P1, L32-P1, L33-P1 и L34-P1) оценивают в модели EOL1 *in vivo*.

Способы

Клетки, трансфицированные люциферазой EOL1, культивируют при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе в среде RPMI1640 (BioConcept Ltd. Amimed) с добавлением 10% FCS (BioConcept Ltd. Amimed, # 2-01F30-I), 2 mM L-глутамин (BioConcept Ltd. Amimed, # 5-10K00-H) и 1 mM пирувата натрия (BioConcept Ltd. Amimed, # 5-60F00-H), 10 mM HEPES (Gibco # 11560496). Для установки ксенотрансплантатов EOL1, клетки собирают и ресуспендируют в HBSS (Gibco, # 14175) перед тем, как вводить подкожно 100 мкл, содержащих 5×10⁶ клеток, в бок самок бежевых мышей SCID (Charles River, Germany). Рост опухоли контролируют регулярно после инокуляции клеток, и животных произвольно распределяют в группы лечения (n=6) со средним объемом опухоли около 130 мм³. Контроль и разные CD74-ADC с молчащей fc (L5-P1, L30-P1, L31-P1, L32-P1, L33-P1 и L34-P1) дозируют, как показано на **ФИГ. 14**. ADC вводят внутривенно (вв) один раз в начале лечения в дозе 2,5 мг/кг или 3,3 мг/кг в комбинации с венетоклаксом, который вводят перорально (по) ежедневно (qd) в дозе 50 мг/кг. Дозы корректируют в соответствии с массой тела каждой мыши. Объем вв дозы составляет 10 мл/кг, и каждый ADC растворяют в 0,9% (масс./об.) NaCl в воде. Данные об объеме опухоли на 10 день после лечения анализируют статистически с использованием однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием множественного сравнения Тьюки (Indigo Software). Результаты представлены как среднее ± СОС. В качестве меры эффективности, значение % T/C рассчитывают на 10 день по:

$(\Delta \text{ объем опухоли}_{\text{леченной}} / \Delta \text{ объем опухоли}_{\text{контрольной}}) * 100$

Регресс опухоли рассчитывают по:

$-(\Delta \text{ объем опухоли}_{\text{леченной}} / \Delta \text{ объем опухоли}_{\text{леченной в начале}}) * 100$

Где Δ объема опухоли является средний объем опухоли в день оценки минус средний объем опухоли в начале эксперимента.

Результаты: эффективность и переносимость.

Все ADC, за исключением CD74-L5-P1 с молчащей Fc, значительно ($p < 0,05$) снижают рост опухолей EOL1 после введения низкой дозы 2,5 мг/кг в комбинации с венетоклаксом по сравнению с контрольной группой носителя на 10 день (ФИГ. 14 и таблица 27). CD74-L34-P1 с молчащей Fc демонстрирует дозозависимый ответ между 2,5 и 3,3 мг/кг. Все схемы лечения хорошо переносятся на основе изменений массы тела (ФИГ. 15).

Таблица 27: Противоопухолевые эффекты CD74-ADC в комбинации с венетоклаксом

Тестируемый агент, схема и путь дозирования	День	Δ объема опухоли (мм ³)	T/C (%)
носитель по+носитель вв	10	1082	100
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+CD74-L5-P1 2,5 мг/кг вв	10	702	70
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+CD74-L30-P1 2,5 мг/кг вв	10	47	5*\$
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+CD74-L31-P1 2,5 мг/кг вв	10	144	14*\$
Венетоклакс 50 мг/кг по qd CD74-L32-P1 2,5 мг/кг вв	10	38	4*\$
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+CD74-L33-P1 2,5 мг/кг вв	10	228	23*\$
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+CD74-L34-P1 2,5 мг/кг вв	10	401	40*
Венетоклакс 50 мг/кг по qd+CD74-L34-P1 3,3 мг/кг вв	10	170	17*\$

Дельты объемов опухолей и T/C% рассчитаны на 10 день и представлены как средние. * означает статистическую разницу ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным носителем и \$ означает статистическую разницу ($< 0,05$) по сравнению с CD74-L5-P1+венетоклаксом на 10 день (однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием множественного сравнения Тьюки; Indigo Software).

Пример 16 - экспрессия гуманизованных вариантов LL1

Векторы экспрессии, содержащие различные гуманизованные тяжелые цепи LL1 и гуманизованные легкие цепи LL1, котрансфицируют в клетки Expi293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) с применением экспифектамина и культивируют в течение 7 дней. Супернатанты культур собирают центрифугированием, фильтруют и очищают антитела с помощью Белок А аффинной хроматографией. Чистоту антитела после аффинной хроматографии проверяют аналитической эксклюзионной хроматографией.

Первый раунд трансфекций (таблица 28) сфокусирован на оценке различных гуманизованных тяжелых и легких цепей, а также мутаций удаления РТМ (см. Пример 17).

Таблица 28: Экспрессия гуманизованных вариантов LL1, первый раунд

Тяжелая цепь	Легкая цепь	Конечный выход (мг)	Чистота (% мономера)
--------------	-------------	---------------------	----------------------

hLL1	hLL1	2,58	99,73
hLL1	hzLL1-Vk1b	2,57	99,75
hLL1	hzLL1-Vk1a	2,28	99,79
hLL1	hLL1 (NQ)	1,34	99,78
hLL1	hLL1 (QG)	1,05	99,78
hLL1	hLL1 (TG)	1,89	99,7
hLL1	hLL1 (SG)	2,06	99,67
hLL1	hLL1 (NV)	0,53	99,53
hzLL1-VH2	hzLL1-Vk1b	2,98	99,74
hzLL1-VH1b	hzLL1-Vk1b	2,60	99,5
hzLL1-VH1a	hzLL1-Vk1b	2,60	99,62
hzLL1-VH3	hLL1	3,49	99,69
hzLL1-VH2	hLL1	2,10	99,81
hzLL1-VH3	hzLL1-Vk1a	2,71	99,66
hzLL1-VH1b	hLL1	2,96	99,62
hzLL1-VH2	hzLL1-Vk1a	2,77	99,77
hzLL1-VH1a	hLL1	2,80	99,67
hzLL1-VH1b	hzLL1-Vk1a	3,00	99,55
hzLL1-VH3	hzLL1-Vk1b	3,07	99,62
hzLL1-VH1a	hzLL1-Vk1a	2,64	99,61

Общая экспрессия и чистота сопоставимы между большинством гуманизированных вариантов и исходной гуманизированной версией (hLL1). Уменьшение общего выхода наблюдается для большинства вариантов удаления PTM по сравнению с другими гуманизированными вариантами.

Набор мутаций NQ был включен в легкие цепи hzLL1-Vk1b и hzLL1-Vk1a, и второй раунд вариантов экспрессируют с применением временной трансфекции в клетки Expi293 (Таблица 29):

Таблица 29: Экспрессия гуманизированных вариантов LL1, второй раунд

Тяжелая цепь	Легкая цепь	Конечный выход (мг)	Чистота (% мономера)
hLL1	hzLL1-Vk1a (NQ)	2,8	96,0
hLL1	hzLL1-Vk1b (NQ)	0,5	98,0
hzLL1-VH1a Y95F	hzLL1-Vk1a (NQ)	2,75	98,0
hzLL1-VH1a Y95F	hzLL1-Vk1b (NQ)	0,8	99,0
hzLL1-VH1a V5Q Y95F	hzLL1-Vk1a (NQ)	1,8	98,0
hzLL1-VH1a V5Q Y95F	hzLL1-Vk1b (NQ)	0,8	99,0

Общая экспрессия этих вариантов, по-видимому, коррелирует с выбором легкой цепи - вариантов с легкой цепью hzLL1-Vk1a (NQ), экспрессируемых на более высоком уровне, чем варианты с легкой цепью hzLL1-Vk1b (NQ).

Варианты гуманизированных антител тестируют с использованием FACS и SPR на связывание с белком CD74 человека. Отбирают варианты антител с характеристиками связывания, аналогичными милатузумабу.

Пример 17: гуманизация и удаление РТМ из VH и VL последовательностей LL1

Вариабельные домены для анти-CD74 антитела мыши LL1 описаны в US7931903 в контексте последовательностей химерного антитела (cLL1):

LL1 VH

QVQLQQSGPELKKPGETVKVTCKTSGYTFTNYGVNWIQTPGEGGLQWMGWINP
NTGEPTFDDDFKGRFAFSLESSASTAFLQISNLKNEDMGTYFCSRSRGKNEAWFDYWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO:49)

LL1 VL

DIQLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYTV
SNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSSHVPPTFGAGTKLEIK (SEQ
ID NO:50)

Они описаны одновременно как последовательности для гуманизованных VH и VL доменов, hLL1 VH и hLL1 VL, соответственно:

hLL1 VH

QVQLQQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGVNWIQAPGQGLQWMGWIN
PNTGEPTFDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEAWFAYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:10)

hLL1 VL

DIQLTQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWFQQRPGQSPRLIYTV
SNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ
ID NO:23)

Гуманизация этих последовательностей описана в примере 5 из US7931903. Этот процесс гуманизации описывает гуманизацию обоих вариабельных доменов с использованием последовательностей гуманизованных антител, не относящихся к зародышевой линии (RT-TS3, HF-21/28), в качестве матрицы, которая вводит ряд остатков каркаса мыши в конечные последовательности антитела. Кроме того, проблемный сайт (Asn-Gly или NG) для посттрансляционной модификации общего белка (деамидирования) остается нетронутым в области L1 CDR гуманизованной легкой цепи. Эти свойства нежелательны для терапевтических антител, поскольку они могут повышать иммуногенность или снижать аффинность связывания антитела при хранении.

Две отдельные попытки были предприняты, чтобы разрешить эти осложнения. Во-первых, как тяжелая, так и легкая цепи LL1 были повторно гуманизованы с использованием каркасов зародышевой линии человека в качестве матрицы. Во-вторых, несколько мутаций были намеренно введены в последовательность Asn-Gly в CDR L1 области легкой цепи LL1 для нарушения сайта посттрансляционной модификации. Гуманизованные конструкции с разумной экспрессией и связыванием с CD74 были объединены с мутациями удаления РТМ для получения окончательных ведущих кандидатов.

Гуманизация LL1

Первоначально последовательности VH и VL LL1 мыши сравнивают с каркасами

зародышевой линии мыши. Для VH, наиболее близким совпадением V-гена (79/98 остатков) является IGHV9-1*02 мыши (номенклатура IMGT) с мутациями зародышевой линии, разбросанными между CDR и каркасными областями. Для VL наиболее близким совпадением V-гена (93/100 остатков) является IGKV1-100*01 мыши с мутациями, разделенными между областями CDR и N-концом.

Выравнивание VH области LL1 мыши с зародышевыми линиями человека выявило разумное совпадение с тремя зародышевыми линиями человека: IGHV7-4-1*02 (наиболее близкое совпадение), IGHV1-3*02 и IGHV5-51*02. Некоторые остатки мыши в каркасных областях, сохраненные в ходе предшествующей гуманизации тяжелой цепи (hLL1 VH), также отмечены как потенциально важные для связывания. Эти три зародышевые линии человека и остатки мыши используют для получения 6 вариантов тяжелых цепей:

1. Гуманизация к IGHV7-4-1*02 (hzLL1-VH1a)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGVNWVRQAPGQGLEWMGWIN
PNTGEPTFDDDFKGRFVFSLDSSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCSRSRGKNEAWFDYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:51)

2. Гуманизация к IGHV7-4-1*02 с удержанием мутации V37I (hzLL1-VH1b)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGVNWIRQAPGQGLEWMGWINP
NTGEPTFDDDFKGRFVFSLDSSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCSRSRGKNEAWFDYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:52)

3. Гуманизация к IGHV7-4-1*02 с удержанием мутации Y95F (hzLL1-VH1a Y95F)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGVNWVRQAPGQGLEWMGWIN
PNTGEPTFDDDFKGRFVFSLDSSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCRSRSGKNEAWFDYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:53)

4. Гуманизация к IGHV7-4-1*02 с удержанием мутаций V5Q Y95F (hzLL1-VH1a V5Q Y95F)

QVQLQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYGVNWVRQAPGQGLEWMGWIN
PNTGEPTFDDDFKGRFVFSLDSSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCRSRSGKNEAWFDYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:54)

5. Гуманизация к IGHV1-3*02 (hzLL1-VH2)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGVNWVRQAPGQRLEWMGWI
NPNTGEPTFDDDFKGRVTITLDSSASTAYMELSSLRSEDMAVYYCSRSGKNEAWFDY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:55)

6. Гуманизация к IGHV5-51*01 (hzLL1-VH3)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTNYGVNWVRQMPGKGLEWMGWIN
PNTGEPTFDDDFKQVTISLDSSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCSRSGKNEAWFDY
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:56)

Для легкой цепи, выравнивание легкой цепи LL1 мыши с зародышевыми линиями человека выявило разумные совпадения с двумя зародышевыми линиями человека - IGKV2-40*01 и IGKV2-30*02. Эти последовательности были использованы для получения двух вариантов гуманизированных легких цепей:

1. Гуманизация к IGKV2-40*01 (hzLL1-Vk1a)

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLOKPGQSPQLLIYTV
 SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYFCSQSSHVPPTFGQGKLEIK (SEQ
 ID NO:27)

2. Гуманизация к IGKV2-30*02 (hzLL1-Vk1b)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYT
 VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYFCSQSSHVPPTFGQGKLEIK (SEQ
 ID NO:31)

Гуманизированные тяжелые цепи и легкие цепи синтезируют и применяют для экспрессии рекомбинантного белка (см. **Пример 16**).

Удаление PTM из легкой цепи LL1

Для удаления сайта деамидирования (Asn-Gly, NG) из CDR L1 области легкой цепи, последовательности, содержащие следующие 5 перемежающихся остатков (QG, SG, TG, NQ, NV) конструируют в последовательности hLL1 VL. Их используют для получения следующих 5 вариантных легких цепей:

hLL1 VL (QG)

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRQGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTV
 SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ
 ID NO:57)

hLL1 VL (SG)

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRSGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTVS
 NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ ID
 NO:58)

hLL1 VL (TG)

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRTGNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTV
 SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ
 ID NO:59)

hLL1 VL (NQ)

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNQNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTV
 SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ
 ID NO:36)

hLL1 VL (NV)

DIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNVNTYLHWFQQRPGQSPRLLIYTV
 SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEIK (SEQ
 ID NO:60)

Мутантные гуманизированные легкие цепи синтезируют и применяют для экспрессии рекомбинантного белка.

Пример 18 Определение K_D Biacore

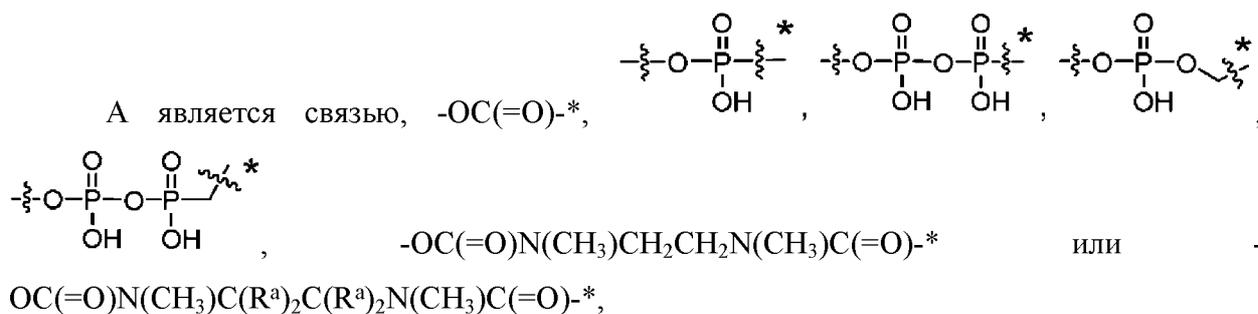
Связывание с CD74 человека и яванского макака для WT IgG и гуманизированных вариантов антител оценивают для определения аффинности с использованием Biacore.

Константы кинетической скорости получают с помощью SPR с использованием прибора Biacore 8K (Cytiva, ранее GE Healthcare Lifesciences), как описано ниже. Метод захвата анти-IgG Fc используют для определения кинетики антител. Используют коммерчески доступный набор для захвата анти-IgG Fc (Cytiva, ранее GE Healthcare Lifesciences). Предоставленный IgG иммобилизован на поверхности чипа с использованием предоставленного протокола связывания амина от GE. Это иммобилизованное антитело захватывает WT и гуманизированные варианты, и растворимый CD74 человека и яванского макака вытекает в качестве анализируемых веществ. Концентрация CD74 начинается с 100 нМ и серийно разведена от одной части на одну часть рабочего буфера для семи концентраций. Регенерацию проводят в конце каждой концентрации с использованием определенных условий в наборе.

Для получения окончательных данных выполняют вычитание двух опорных сигналов. Необработанные данные подгоняют к 1:1 модели связывания с параметром(ами) показателя преломления, установленным локально. Из-за природы антигена в следующей таблице перечислены очевидные кинетические результаты для WT и гуманизированных вариантов IgG.

Таблица 30 Кинетические результаты

Образец	Антиген	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)	Антиген	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
милатузумаб	CD74 человека	1,0E+05	5,1E-04	4,9E-09	CD74 яванского макака	5,6E+04	8,8E-04	1,6E-08
Hcmil x LCmil_NQ		9,6E+04	3,3E-04	3,4E-09		3,0E+04	7,7E-04	2,6E-08
Mil_HC x hzVklb		2,3E+05	1,7E-04	7,2E-10		1,1E+05	5,8E-04	5,1E-09
Mil_HC x hzVkl1a		2,1E+05	1,8E-04	8,5E-10		1,0E+05	5,8E-04	5,7E-09
VHmil x VK1aNQ		2,0E+05	1,8E-04	9,1E-10		1,0E+05	6,2E-04	5,9E-09
VHmil x VK1bNQ		2,2E+05	1,6E-04	7,6E-10		1,1E+05	5,8E-04	5,3E-09

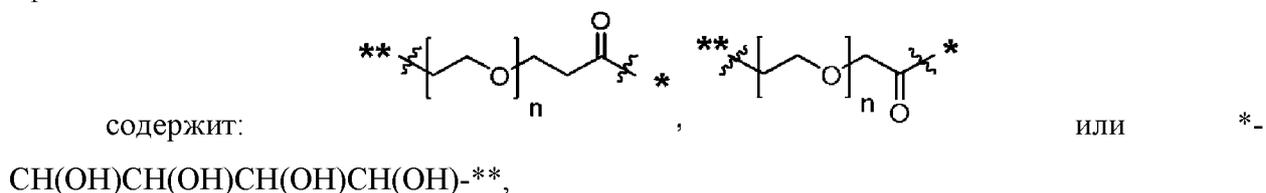


где каждый R^a независимо выбран из H , C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила, и * из А означает точку присоединения к D;

L_3 является спейсерной группой; и

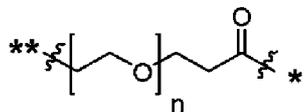
R^2 является гидрофильной группой.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1 или 2, отличающийся тем, что L_1



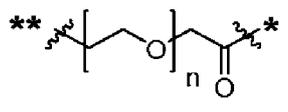
где каждый n является целым числом от 1 до 12, где * из L_1 означает точку прямого присоединения к L_p и ** из L_1 означает точку прямого или косвенного присоединения к R^1 .

4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что L_1 является



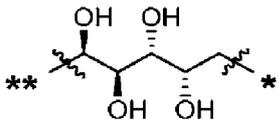
и n является целым числом от 1 до 12 или n равен 1 или n равен 12, где * из L_1 означает точку прямого или косвенного присоединения к L_p и ** из L_1 означает точку прямого присоединения к R^1 .

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что L^1 является



и n является целым числом от 1 до 12, где * из L_1 означает точку прямого или косвенного присоединения к L_p и ** из L_1 означает точку прямого или косвенного присоединения к R^1 .

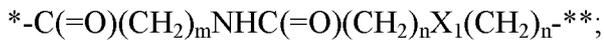
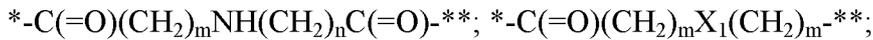
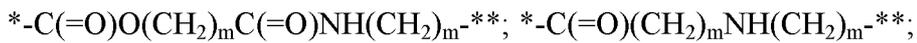
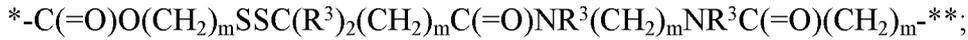
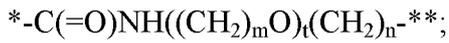
6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-3, где L_1 содержит



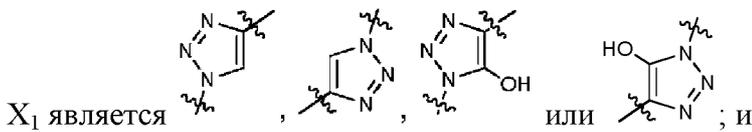
, где * из L_1 означает точку прямого или косвенного присоединения к L_p и ** из L_1 означает точку прямого или косвенного присоединения к R^1 .

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1 или 2, отличающийся тем, что L_1 является мостиковым спейсером, содержащим:





косвенного присоединения к L_p и $**$ из L_1 означает точку прямого или косвенного присоединения к R^1 ;



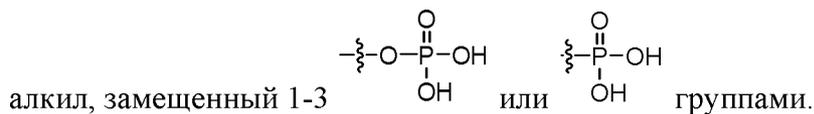
каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

каждый n независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; и

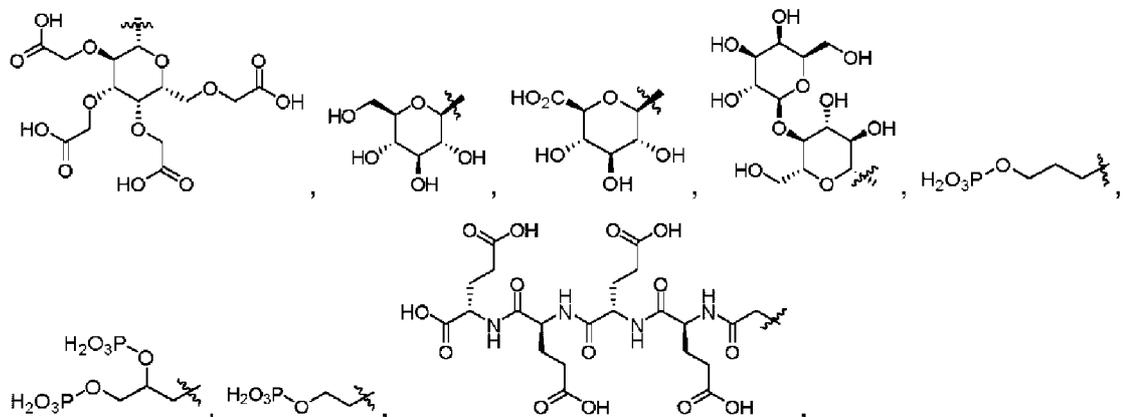
каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30;

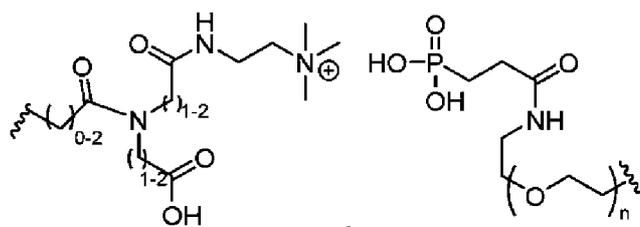
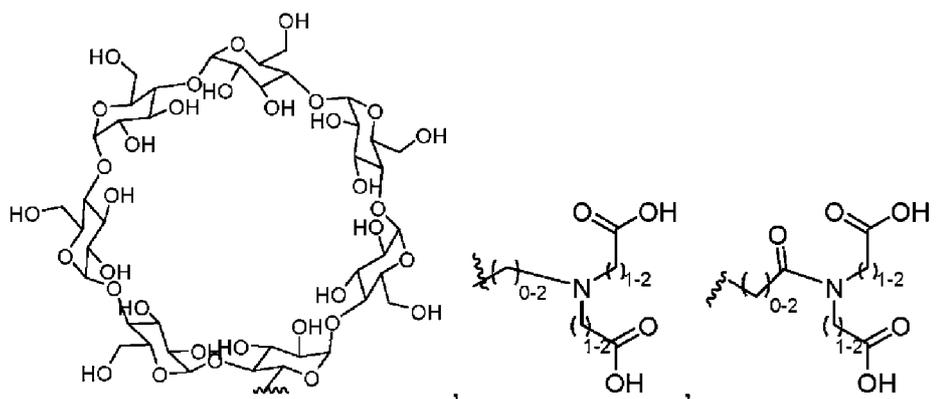
и каждый R^3 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что R^2 является гидрофильной группой, содержащей полиэтиленгликоль, полиалкиленгликоль, полиол, полисаркозин, сахар, олигосахарид, полипептид или C_2 - C_6

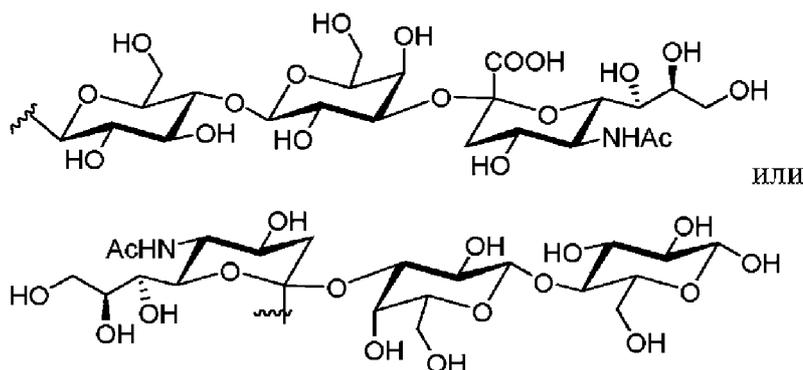
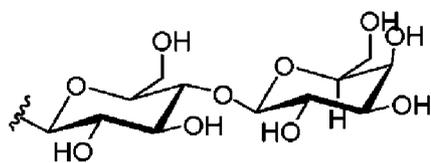


9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что R^2 является



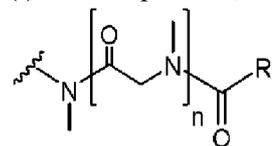


где n равно целому числу от 1 до 6,



10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1 или 8, отличающийся тем, что гидрофильная группа содержит:

(i) полисаркозин, например, со следующей группой:



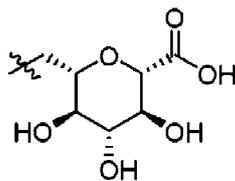
, где n равно целому числу от 3 и 25; и R является H , $-CH_3$ или $-CH_2CH_2C(=O)OH$; или



(ii) полиэтиленгликоль формулы: где R является H , $-CH_3$, $CH_2CH_2NHC(=O)OR_a$, $-CH_2CH_2NHC(=O)R_a$ или $-CH_2CH_2C(=O)OR_a$, R' является OH , $-OCH_3$, $-CH_2CH_2NHC(=O)OR_a$, $-CH_2CH_2NHC(=O)R_a$ или $-OCH_2CH_2C(=O)OR_a$, где R_a является H или C_{1-4} алкилом, необязательно замещенным либо OH или C_{1-4}

алкоксилем, и каждый из m и n независимо является целым числом между 2 и 25.

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-9, отличающийся



тем, что гидрофильная группа содержит

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что:

(i) L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $\text{---}\xi\text{---}W\text{---}X\text{---}\xi\text{---}$,

где:

W является $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NH}-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{N R}^b \text{C}(=\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{N R}^b \text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$, $-\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-$, $-\text{NHS}(\text{O})_2-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H , C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила; и

X является связью, триазилилом или $-\text{CH}_2$ -триазилилом; или

(ii) L_3 является спейсерной группой, имеющей структуру $\text{---}\xi\text{---}W\text{---}X\text{---}\xi\text{---}$,

где:

W является $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^b)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NH}-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{C}(\text{R}^b)_2\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)-$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{X}-\text{R}^2)\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{NR}^b\text{C}(=\text{O})\text{NR}^b-$, $-\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}-$, $-\text{NHS}(\text{O})_2-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ или $-\text{NH}-$, где каждый R^b независимо выбран из H , C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила; и

X является $-\text{CH}_2$ -триазилил- C_{1-4} алкилен- $\text{OC}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2\text{NH}-$, $-\text{C}_{4-6}$ циклоалкилен- $\text{OC}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2\text{NH}-$, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-}$ или $-\text{CH}_2$ -триазилил- C_{1-4} алкилен- $\text{OC}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2\text{NH}-$, где каждый n независимо равен 1, 2 или 3.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что группу присоединения образуют реакцией, содержащей, по меньшей мере, одну реакционноспособную группу.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что группу присоединения образуют взаимодействием:

первой реакционноспособной группы, которая присоединена к линкеру, и

второй реакционноспособной группы, которая присоединена к антителу или является аминокислотным остатком антитела.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 13 или 14, отличающийся тем,

что, по меньшей мере, одна из реакционноспособных групп содержит:

тиол,

малеимид,

галоацетамид,

азид,

алкин,

циклооктен,

триарилфосфин,

оксаноборнадиен,

циклооктин,

диарилтетразин,

моноарилтетразин,

норборнен,

альдегид,

гидроксиламин,

гидразин,

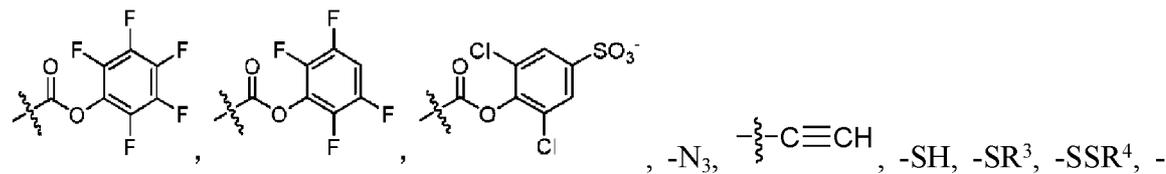
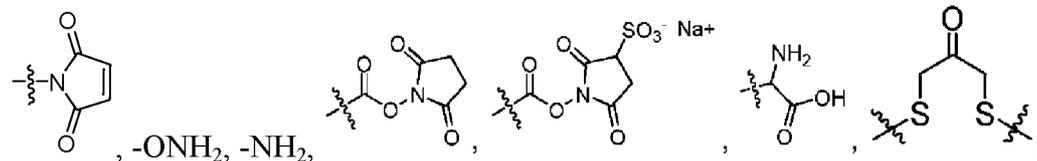
$\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-}$,

кетон,

винилсульфон,

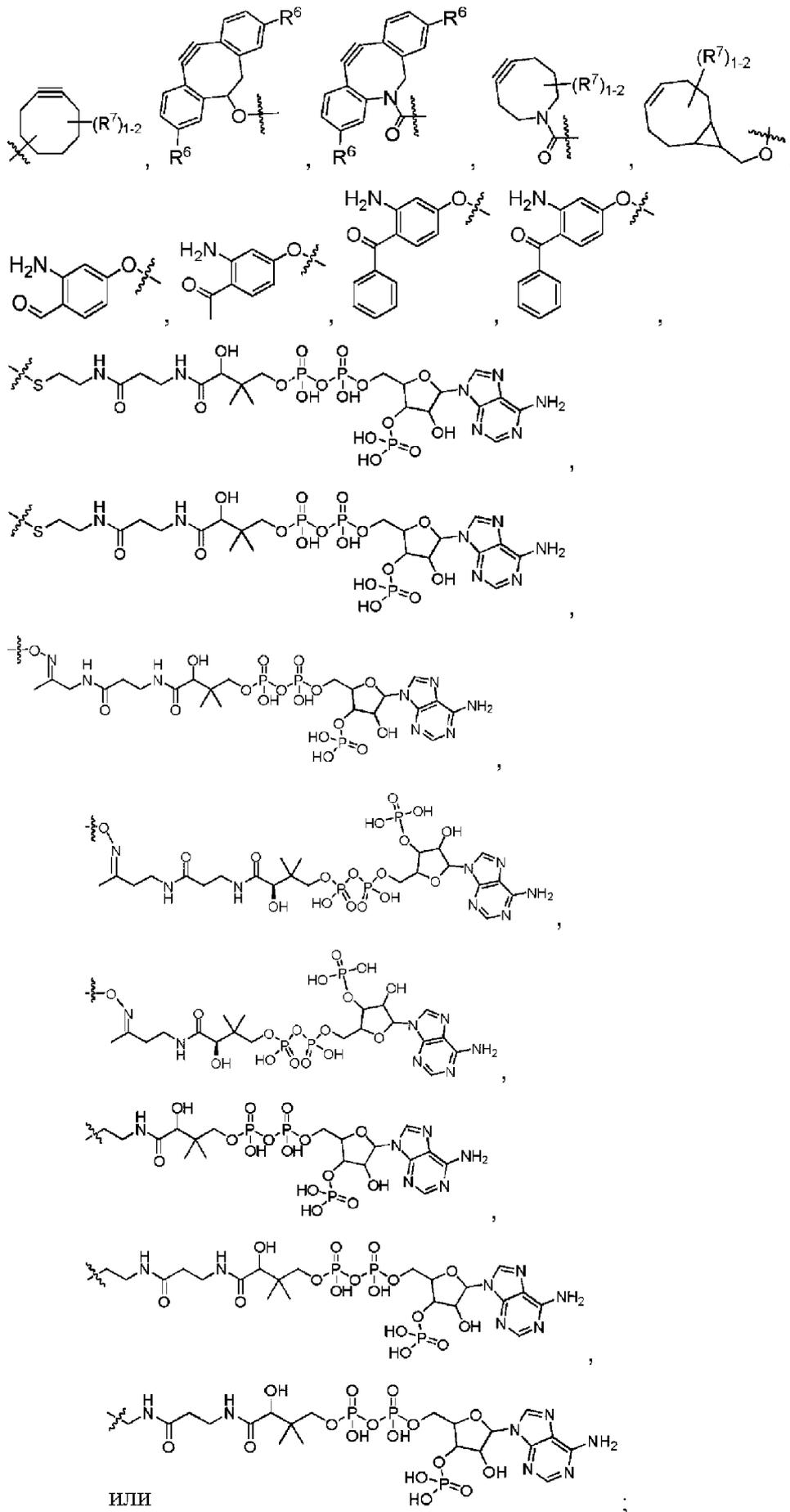
азиридин,

аминокислотный остаток,



$\text{S(=O)}_2(\text{CH}=\text{CH}_2)$, $-(\text{CH}_2)_2\text{S(=O)}_2(\text{CH}=\text{CH}_2)$, $-\text{NHS(=O)}_2(\text{CH}=\text{CH}_2)$, $-\text{NHC(=O)CH}_2\text{Br}$, -





где:

каждый R^3 независимо выбран из H и C_1-C_6 алкила;

каждый R^4 является 2-пиридилом или 4-пиридилом;

каждый R^5 независимо выбран из H, C_1-C_6 алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^6 независимо выбран из H, C_1-C_6 алкила, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ и -OH;

каждый R^7 независимо выбран из H, C_1-C_6 алкила, фтора, бензилокси, замещенного $-C(=O)OH$, бензила, замещенного $-C(=O)OH$, C_{1-4} алкокси, замещенного $-C(=O)OH$ и C_{1-4} алкила, замещенного $-C(=O)OH$.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 14 или 15, отличающийся тем, что первая реакционноспособная группа и вторая реакционноспособная группа содержит:

тиол и малеимид,

тиол и галоацетамид,

тиол и винилсульфон,

тиол и азиридин,

азид и алкин,

азид и циклооктин,

азид и циклооктен,

азид и триарилфосфин,

азид и оксаноборнадиен,

диарилтетразин и циклооктен,

моноарилтетразин и норборнен,

альдегид и гидроксилламин,

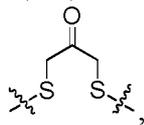
альдегид и гидразин,

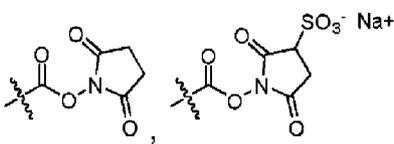
альдегид и $NH_2-NH-C(=O)-$,

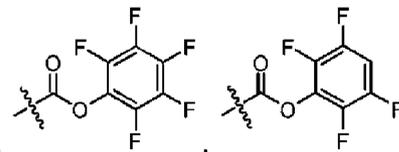
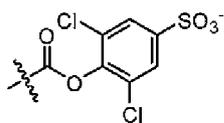
кетон и а гидроксилламин,

кетон и гидразин,

кетон и $NH_2-NH-C(=O)-$,

гидроксилламин и 

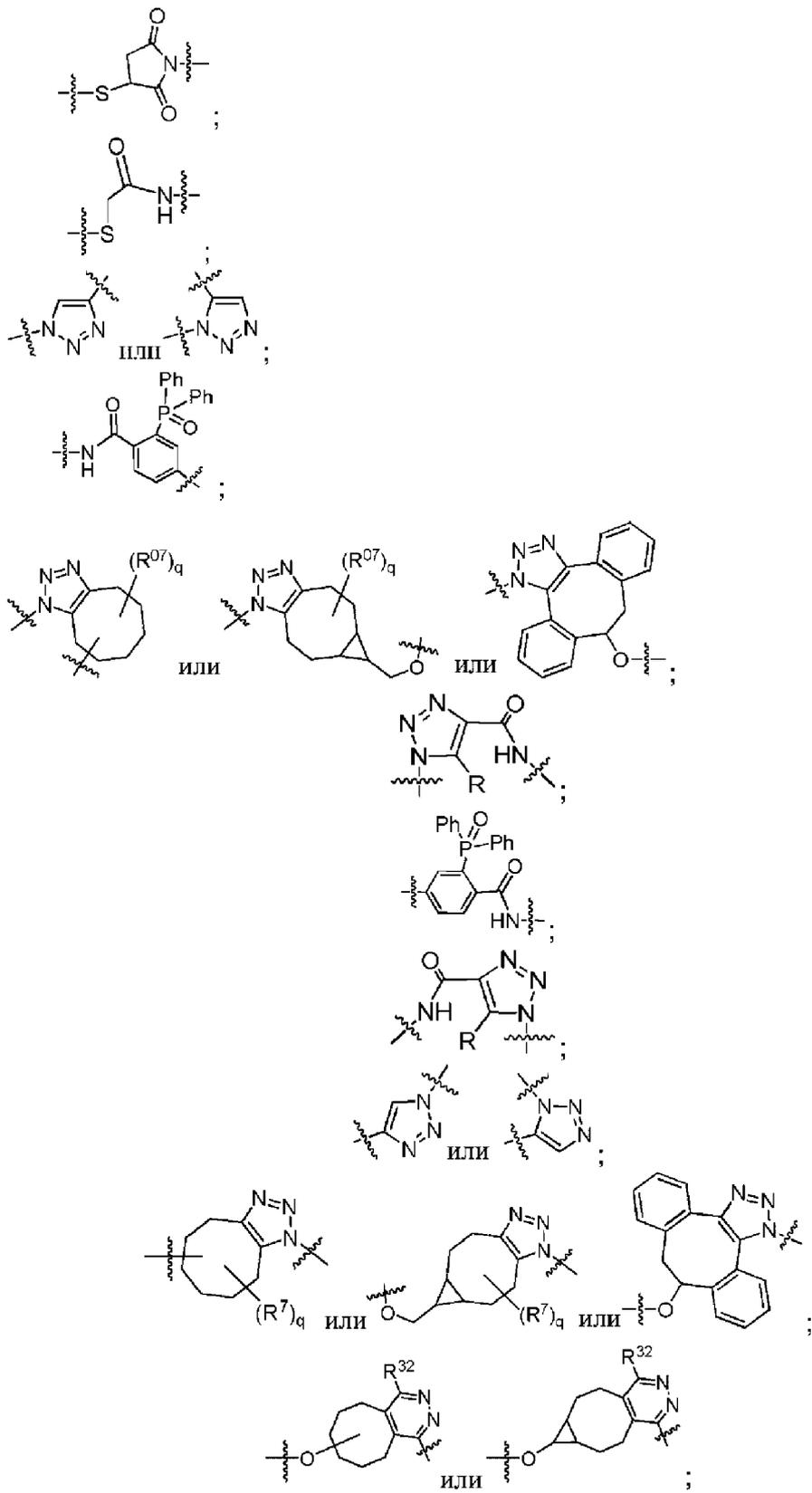
амин и 

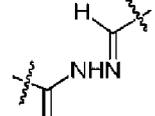
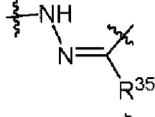
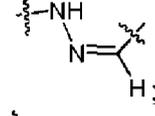
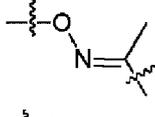
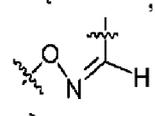
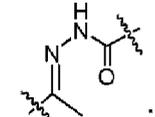
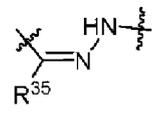
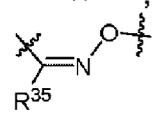
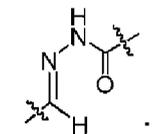
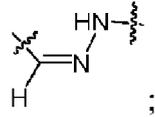
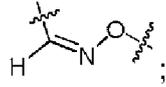
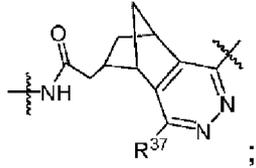
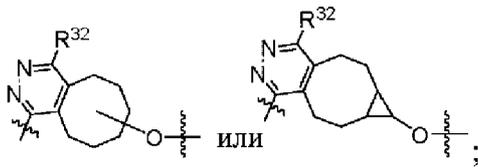


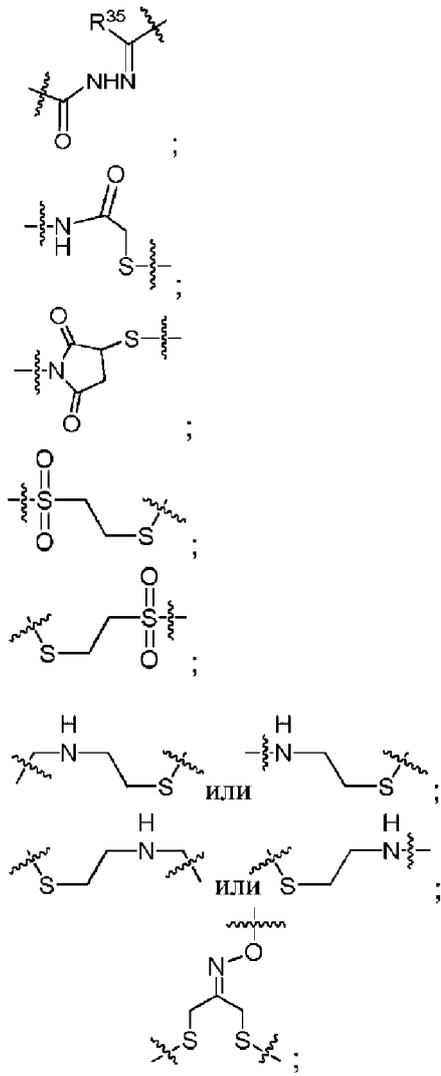
или

CoA или аналог CoA и сериновый остаток.

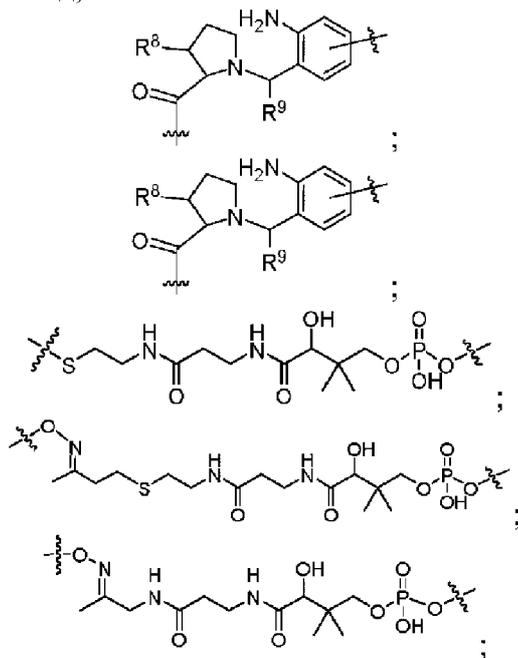
17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что группа присоединения содержит группу, выбранную из:

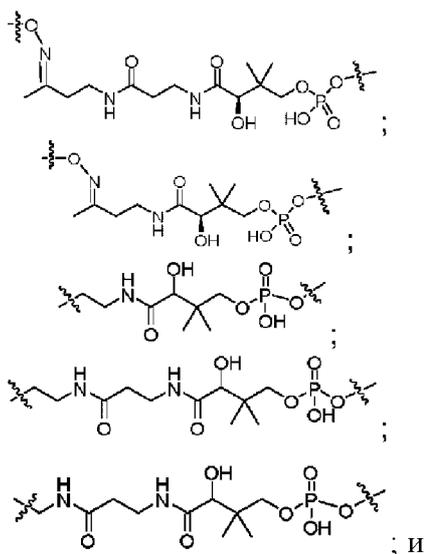






амид;





дисульфид,

где:

R^{32} является H, C_{1-4} алкилом, фенилом, пиримидином или пиридином;

R^{35} является H, C_{1-6} алкилом, фенилом или C_{1-4} алкилом, замещенным 1-3 -ОН группами;

каждый R^7 независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)OH, бензила, замещенного -C(=O)OH, C_{1-4} алкокси, замещенного -C(=O)OH и C_{1-4} алкила, замещенного -C(=O)OH;

R^{37} независимо выбран из H, фенила и пиридина;

q равен 0, 1, 2 или 3;

R^8 является H или метилом; и

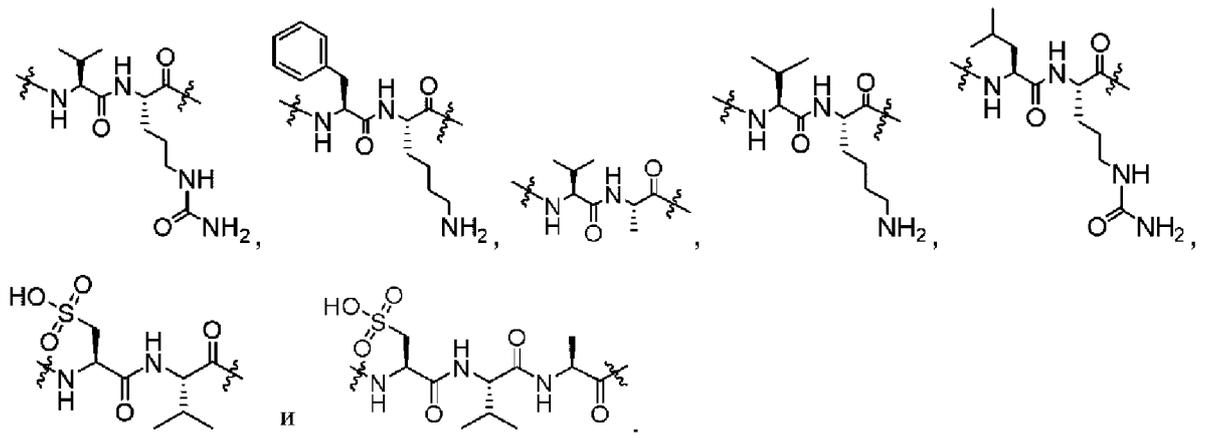
R^9 является H, -CH₃ или фенилом.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что пептидная группа содержит 1-4 аминокислотных остатка, 1-3 аминокислотных остатка или 1-2 аминокислотных остатка.

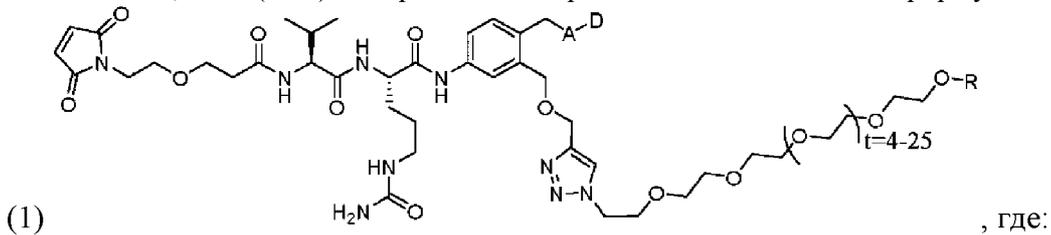
19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что аминокислотные остатки выбраны из L-глицина (Gly), L-валина (Val), L-цитруллина (Cit), L-цистеиновой кислоты (сульфо-Ala), L-лизина (Lys), L-изолейцина (Ile), L-фенилаланина (Phe), L-метионина (Met), L-аспарагина (Asn), L-пролина (Pro), L-аланина (Ala), L-лейцина (Leu), L-триптофана (Trp) и L-тирозина (Tyr).

20. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что пептидная группа содержит Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala, Val-Lys, Leu-Cit, сульфо-Ala-Val, и/или сульфо-Ala-Val-Ala

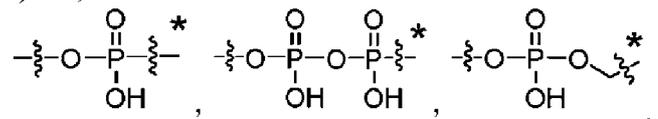
21. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что Lp выбран из:



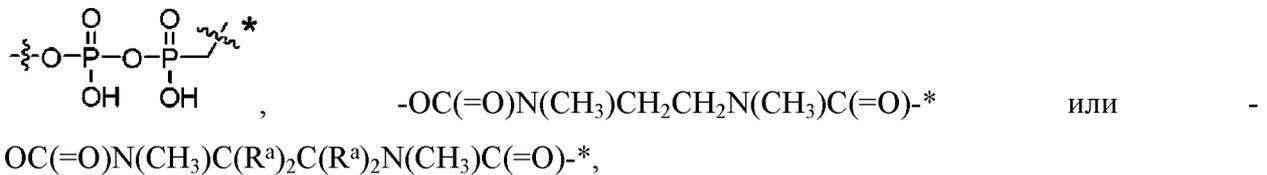
22. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что -(L-D) содержит или образована из соединения формулы:



R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;

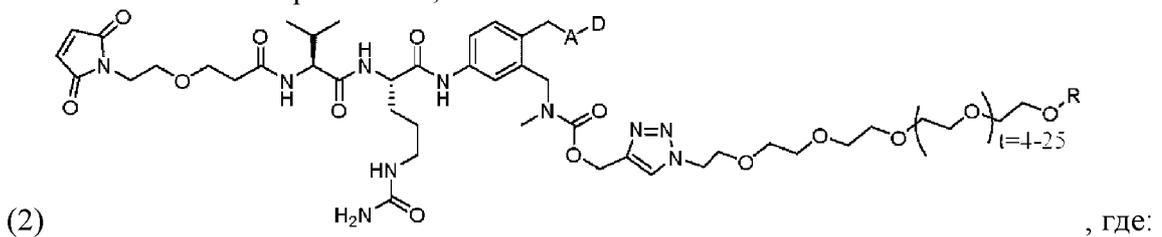


A является связью, -OC(=O)-*,

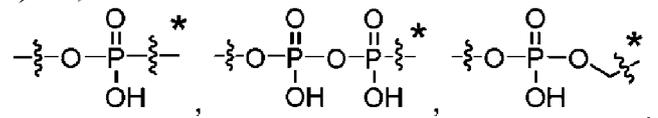


где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D; и

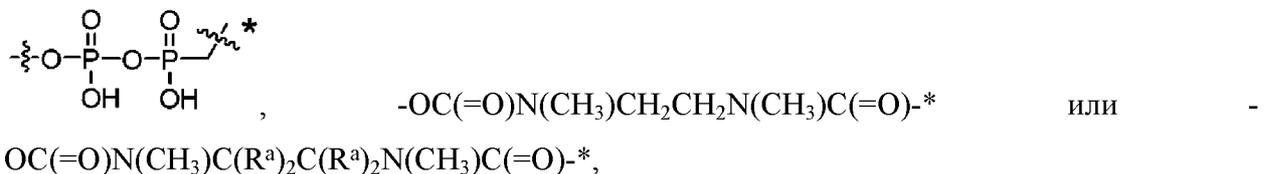
D является ингибитором Mcl-1;



R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;

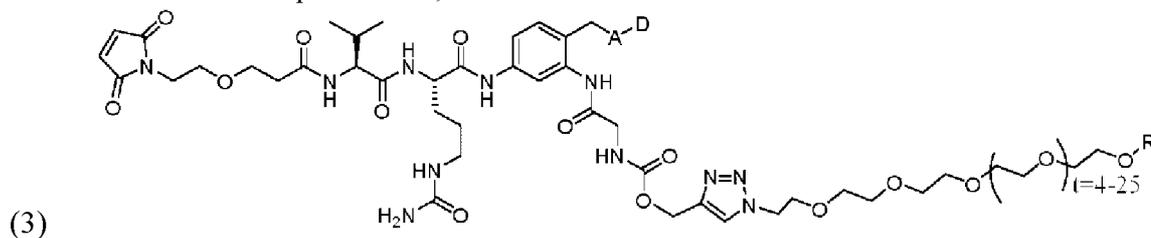


A является связью, -OC(=O)-*,



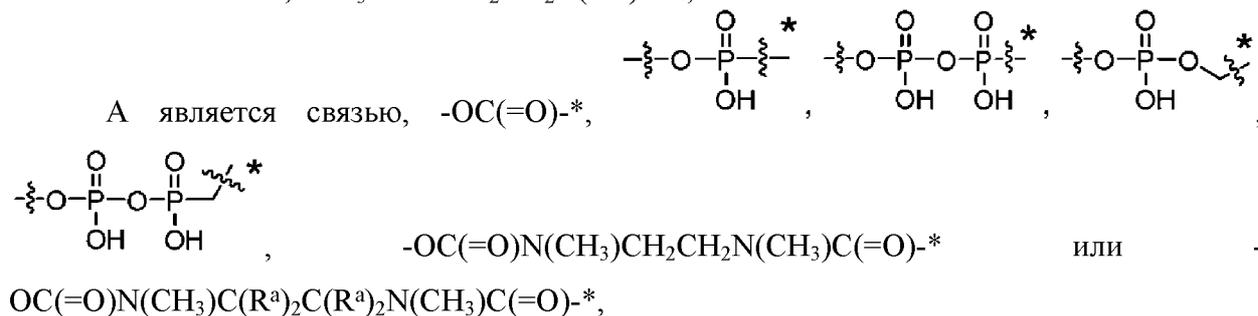
где каждый R^a независимо выбран из H , C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D ; и

D является ингибитором Mcl-1;



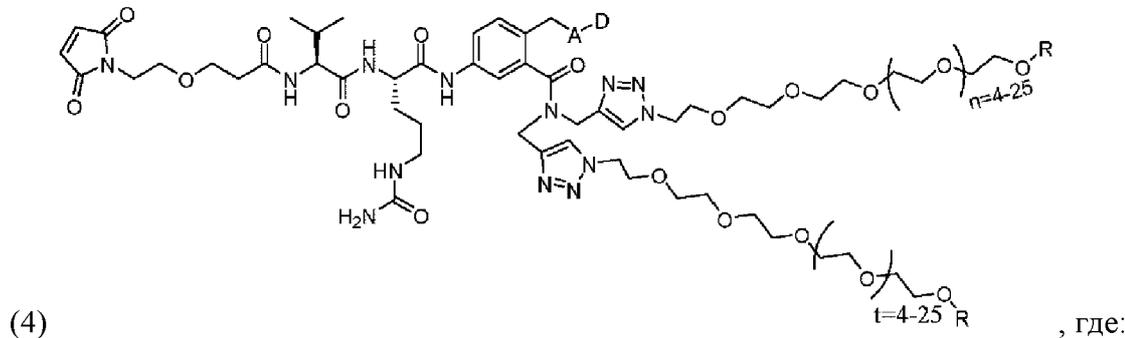
где:

R является H , $-CH_3$ или $-CH_2CH_2C(=O)OH$;

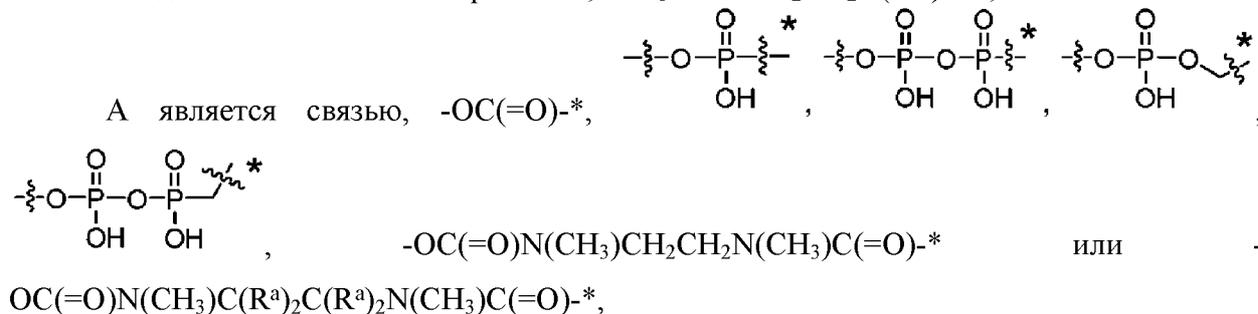


где каждый R^a независимо выбран из H , C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D ; и

D является ингибитором Mcl-1;

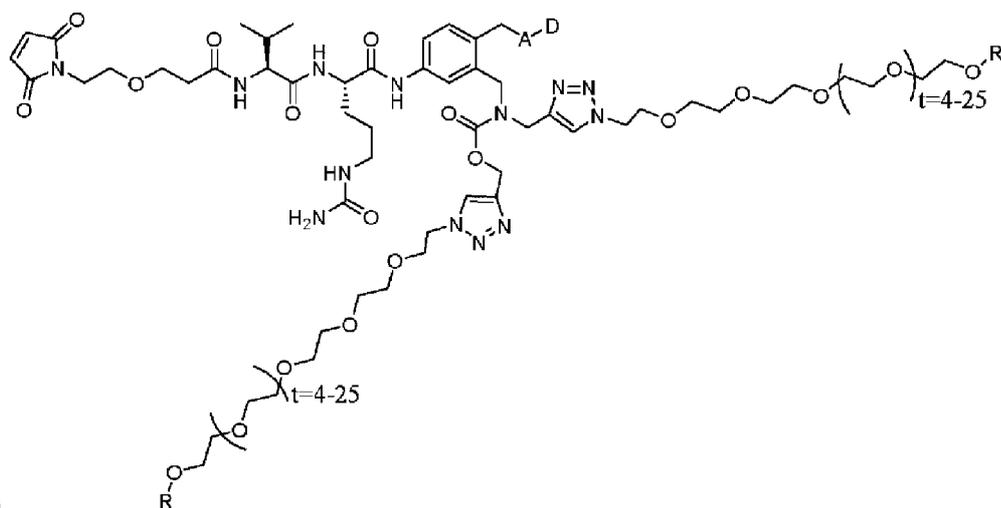


каждый R независимо выбран из H , $-CH_3$ или $-CH_2CH_2C(=O)OH$;



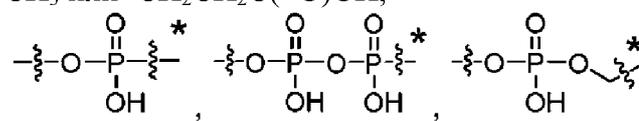
где каждый R^a независимо выбран из H , C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D ; и

D является ингибитором Mcl-1;

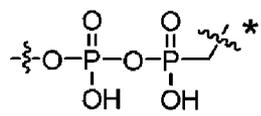


, где:

каждый R независимо выбран из H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;



A является связью, -OC(=O)-*,



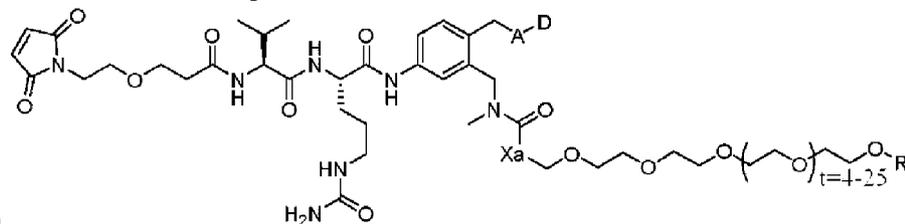
-OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-*

или

OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*,

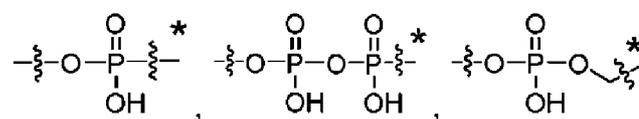
где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1;

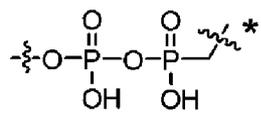


, где:

Ха является -CH₂-, -OCH₂-, -NHCH₂- или -NRCH₂- и каждый R независимо равен H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;



A является связью, -OC(=O)-*,



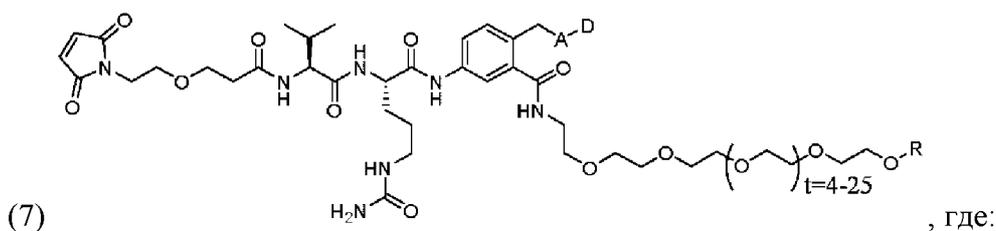
-OC(=O)N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)C(=O)-*

или

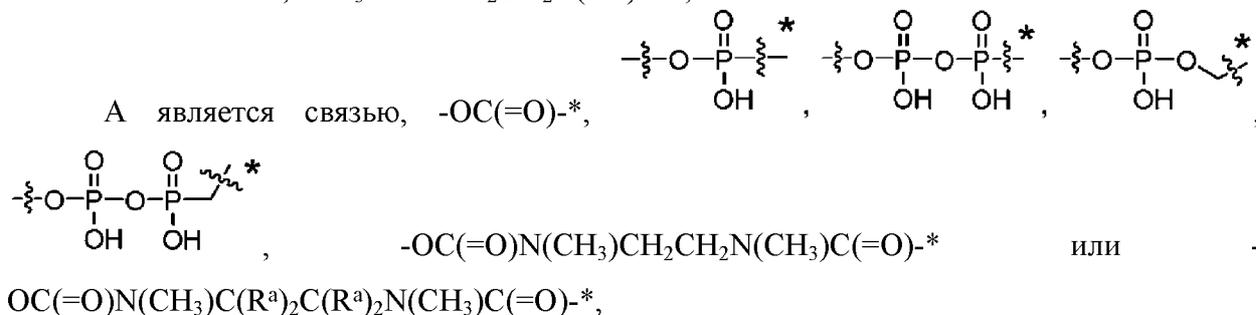
OC(=O)N(CH₃)C(R^a)₂C(R^a)₂N(CH₃)C(=O)-*,

где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1;

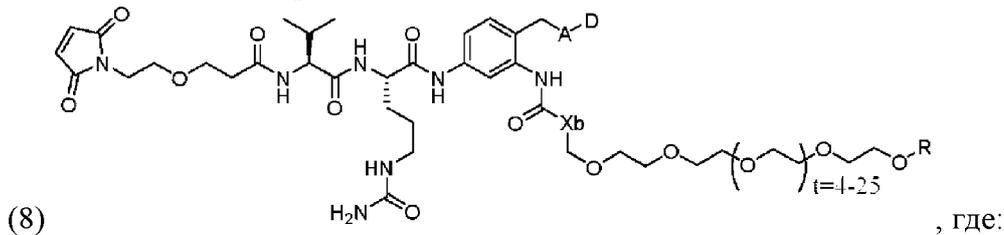


R является H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;

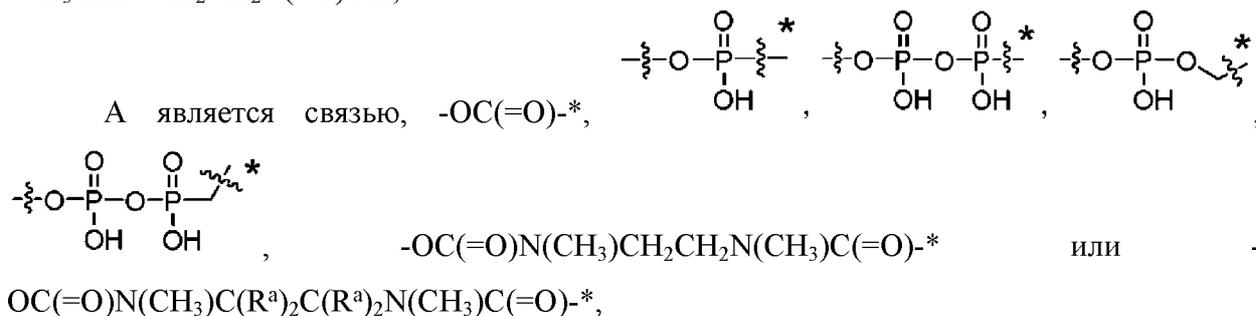


где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1;

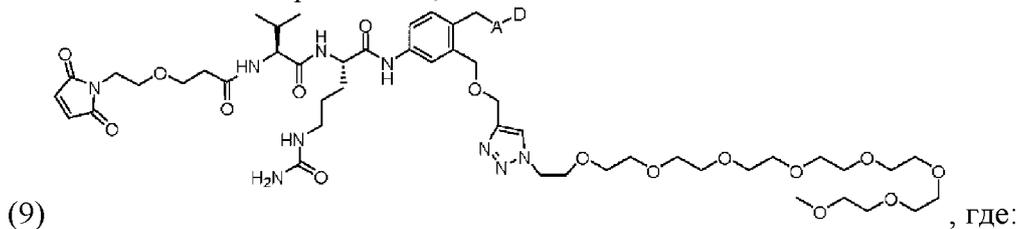


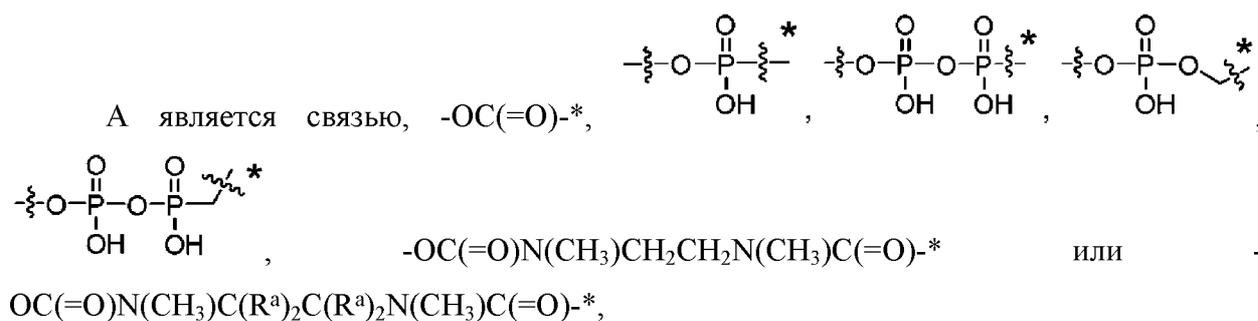
Xb является -CH₂-, -OCH₂-, -NHCH₂- или -NRCH₂- и каждый R независимо равен H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;



где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D; и

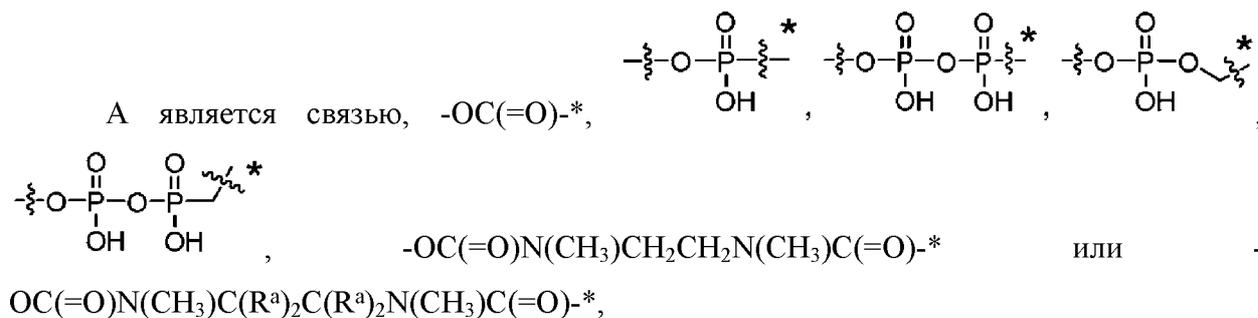
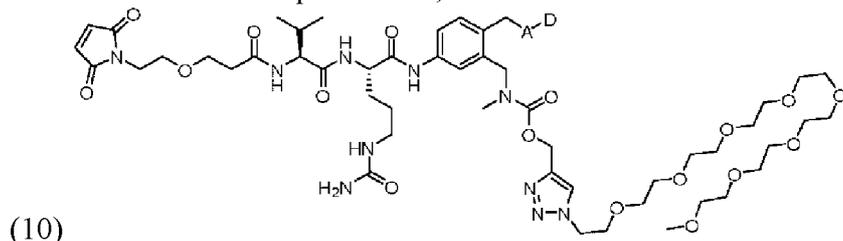
D является ингибитором Mcl-1;





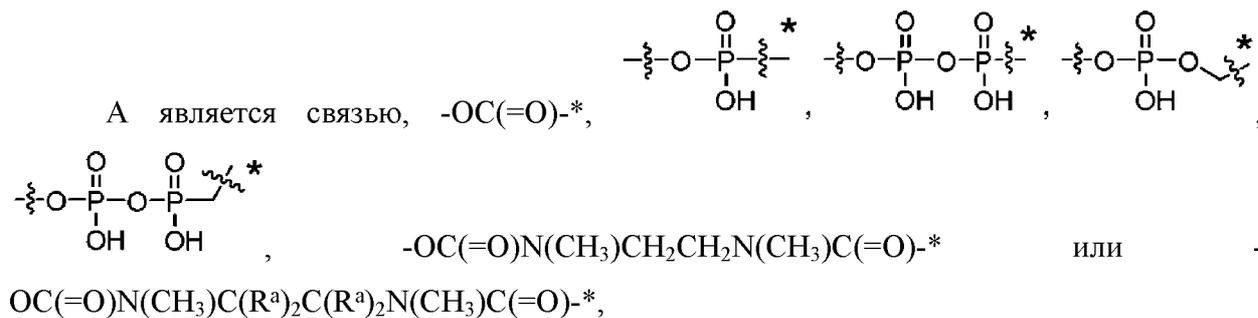
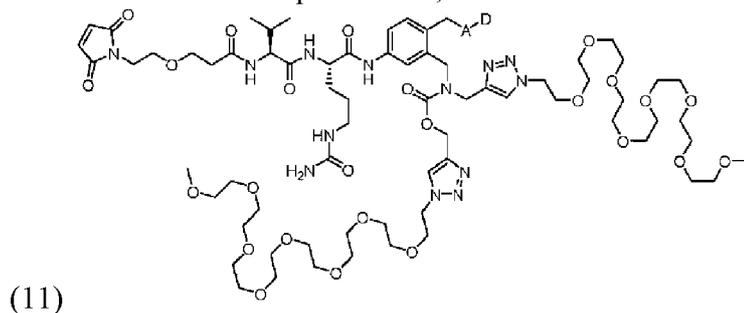
где каждый R^a независимо выбран из H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила и $\text{C}_3\text{-C}_8$ циклоалкила и \ast из А означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1;



где каждый R^a независимо выбран из H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила и $\text{C}_3\text{-C}_8$ циклоалкила и \ast из А означает точку присоединения к D; и

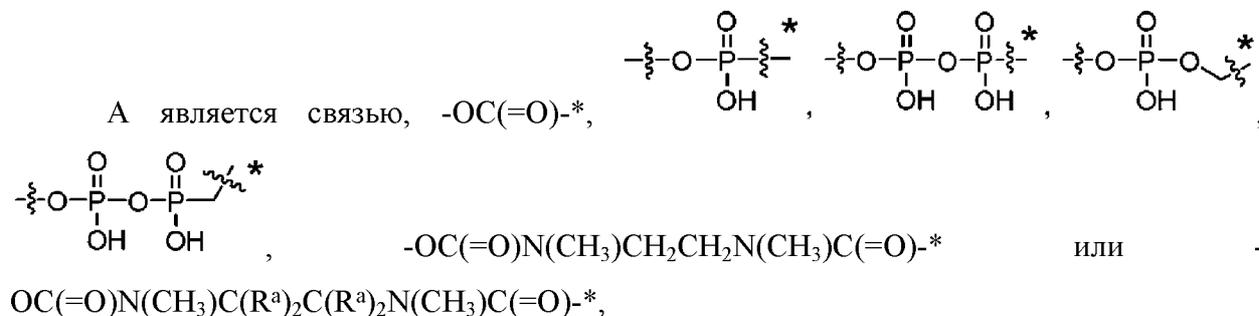
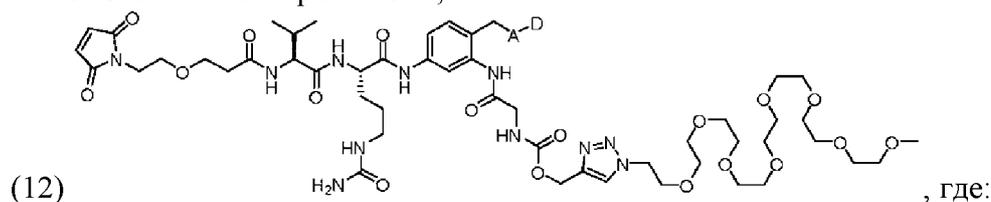
D является ингибитором Mcl-1;



где каждый R^a независимо выбран из H , $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила и $\text{C}_3\text{-C}_8$ циклоалкила и \ast из А

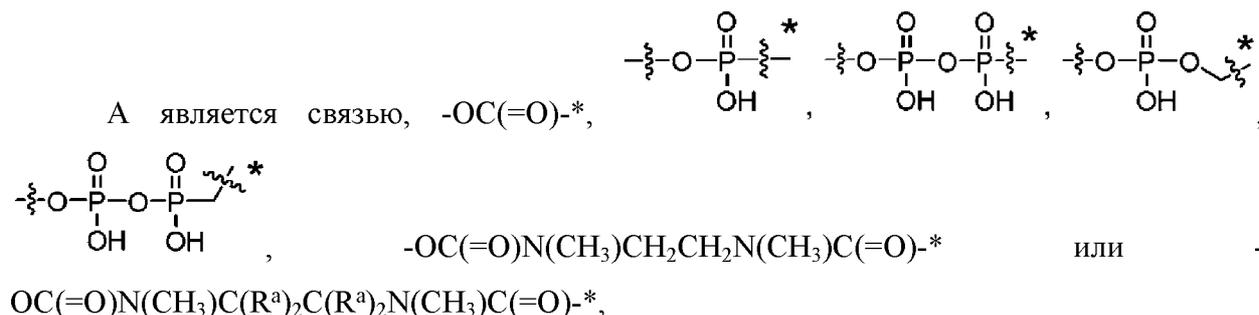
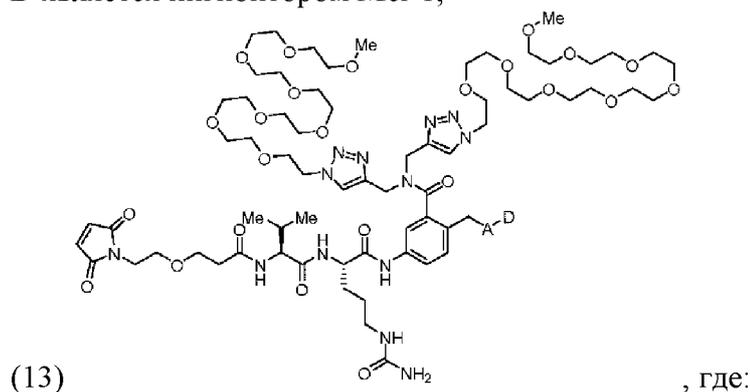
означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1;



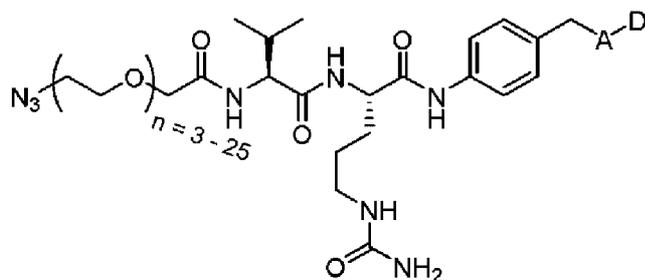
где каждый R^a независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1;



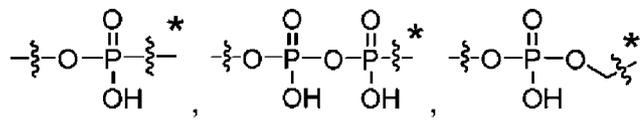
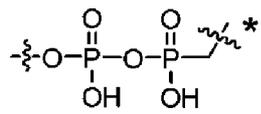
где каждый R^a независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1;



(14)

, где:

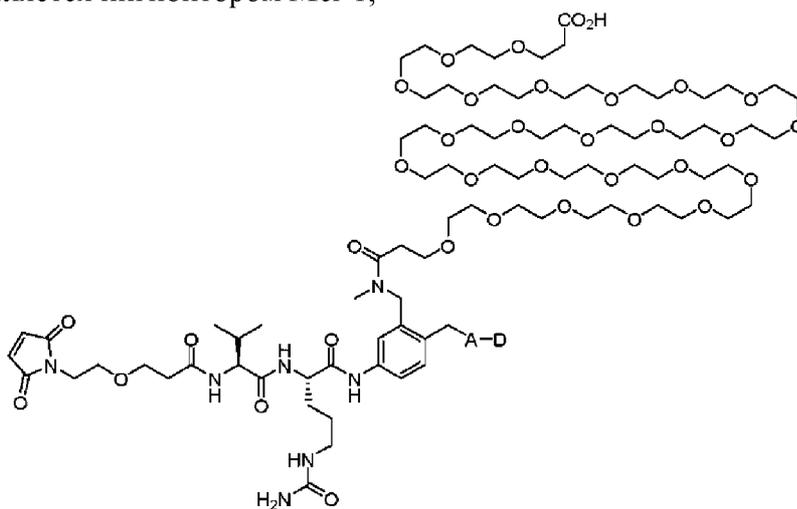
A является связью, $-\text{OC}(=\text{O})-$ *- $\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ *

или

 $\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ *

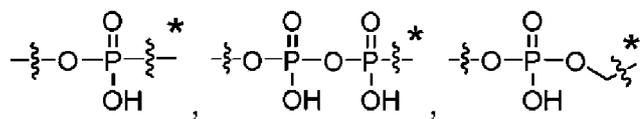
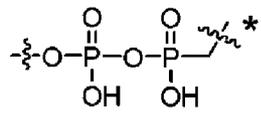
где каждый R^a независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1;



(15)

, где:

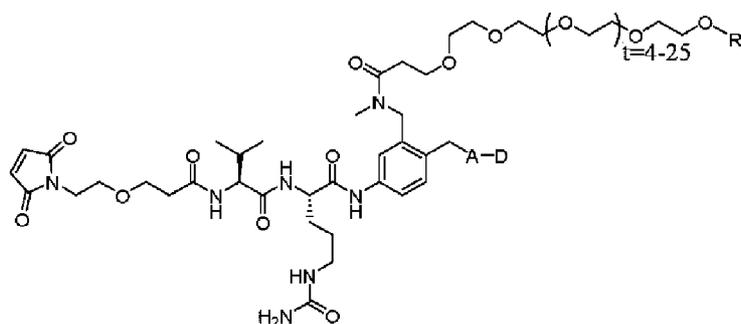
A является связью, $-\text{OC}(=\text{O})-$ *- $\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ *

или

 $\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{R}^a)_2\text{C}(\text{R}^a)_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(=\text{O})-$ *

где каждый R^a независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила и C_3 - C_8 циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D; и

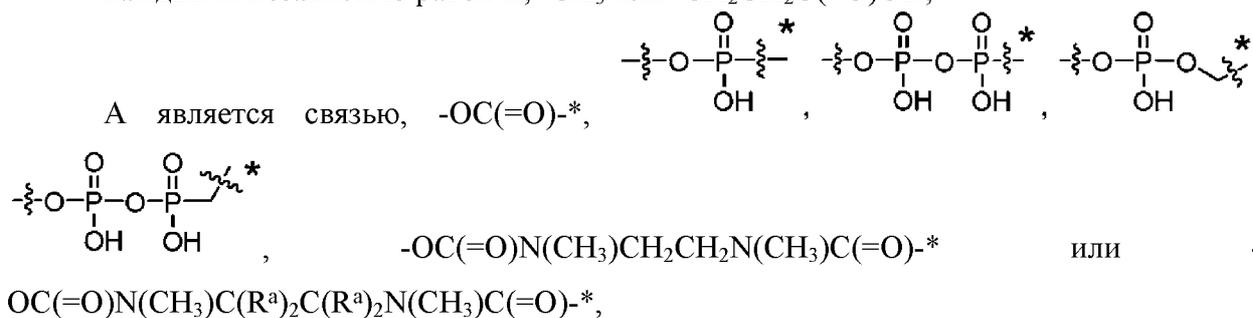
D является ингибитором Mcl-1; или



(16)

, где:

каждый R независимо равен H, -CH₃ или -CH₂CH₂C(=O)OH;



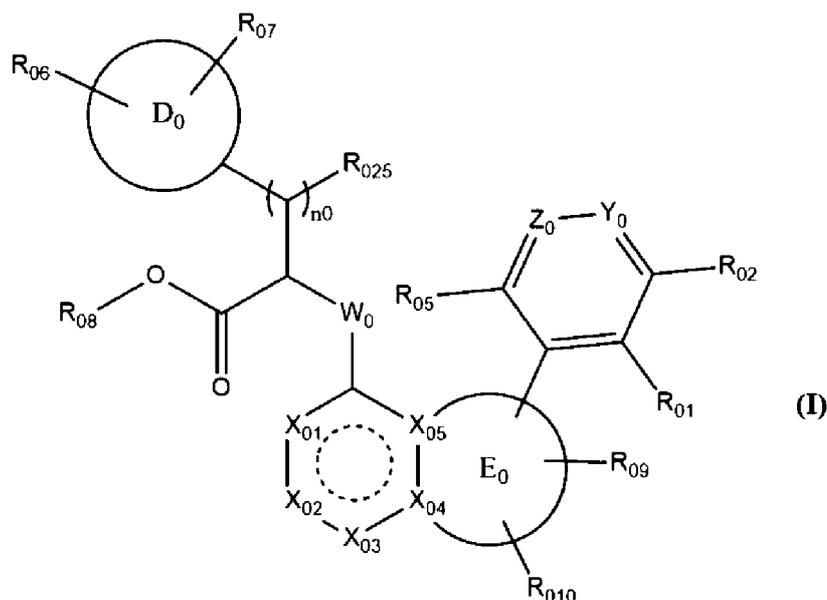
где каждый R^a независимо выбран из H, C₁-C₆ алкила и C₃-C₈ циклоалкила и * из A означает точку присоединения к D; и

D является ингибитором Mcl-1.

23. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-22, отличающийся тем, что A является связью.

24. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что R является -CH₃.

25. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что D содержит соединение формулы (I):



(I)

где:

кольцо D₀ является циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой,

арильной группой или гетероарильной группой,

кольцо E_0 является фурильным, тиенильным или пирролильным кольцом,

X_{01} , X_{03} , X_{04} и X_{05} независимо друг от друга являются атомом углерода или атомом азота,

X_{02} является C- R_{026} группой или атомом азота,



означает, что кольцо является ароматическим,

Y_0 является атомом азота или C- R_{03} группой,

Z_0 является атомом азота или C- R_{04} группой,

R_{01} является атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2 - C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2 - C_6)алкинильной группой, линейной или разветвленной (C_1 - C_6)галоалкильной группой, гидроксильной группой, гидрокси(C_1 - C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкоксигруппой, -S-(C_1 - C_6)алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, - Cy_{08} , -(C_0 - C_6)алкил-N $R_{011}R_{011}'$, -O-(C_1 - C_6)алкил-N $R_{011}R_{011}'$, -O-(C_1 - C_6)алкил- R_{012} , -C(O)-OR $_{011}$, -O-C(O)- R_{011} , -C(O)-N $R_{011}R_{011}'$, -N R_{011} -C(O)- R_{011}' , -N R_{011} -C(O)-OR $_{011}'$, -(C_1 - C_6)алкил-N R_{011} -C(O)- R_{011}' , -SO $_2$ -N $R_{011}R_{011}'$ или -SO $_2$ -(C_1 - C_6)алкилом,

R_{02} , R_{03} , R_{04} и R_{05} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2 - C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2 - C_6)алкинильной группой, линейным или разветвленным (C_1 - C_6)галоалкилом, гидроксигруппой, гидрокси(C_1 - C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкоксигруппой, -S-(C_1 - C_6)алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, -(C_0 - C_6)алкил-N $R_{011}R_{011}'$, -O- Cy_{01} , -(C_0 - C_6)алкил- Cy_{01} , -(C_2 - C_6)алкенил- Cy_{01} , -(C_2 - C_6)алкинил- Cy_{01} , -O-(C_1 - C_6)алкил-N $R_{011}R_{011}'$, -O-(C_1 - C_6)алкил- R_{031} , -O-(C_1 - C_6)алкил- R_{012} , -C(O)-OR $_{011}$, -O-C(O)- R_{011} , -C(O)-N $R_{011}R_{011}'$, -N R_{011} -C(O)- R_{011}' , -N R_{011} -C(O)-OR $_{011}'$, -(C_1 - C_6)алкил-N R_{011} -C(O)- R_{011}' , -SO $_2$ -N $R_{011}R_{011}'$ или -SO $_2$ -(C_1 - C_6)алкил,

или пара (R_{01} , R_{02}), (R_{02} , R_{03}), (R_{03} , R_{04}) или (R_{04} , R_{05}) вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещен 1 или 2 группами, выбранными из галогена, линейного или разветвленного (C_1 - C_6)алкила, (C_0 - C_6)алкил-N $R_{011}R_{011}'$, -N $R_{013}R_{013}'$, -(C_0 - C_6)алкил- Cy_{01} или оксо,

R_{06} и R_{07} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2 - C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2 - C_6)алкинильной группой, линейным или разветвленным (C_1 - C_6)галоалкилом, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкоксигруппой, -S-(C_1 - C_6)алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, -(C_0 - C_6)алкил-N $R_{011}R_{011}'$, -O-(C_1 - C_6)алкил-N $R_{011}R_{011}'$, -O- Cy_{01} , -(C_0 - C_6)алкил- Cy_{01} , -(C_2 - C_6)алкенил- Cy_{01} , -(C_2 - C_6)алкинил- Cy_{01} , -O-(C_1 - C_6)алкил- R_{012} , -C(O)-

OR_{011} , $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

или пара (R_{06} , R_{07}), сконденсированная с двумя соседними атомами углерода, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой, $-NR_{013}R_{013}'$, $-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{01} или оксо,

W_0 является $-CH_2-$ группой, $-NH-$ группой или атомом кислорода,

R_{08} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_8) алкильной группой, $-CHR_{0a}R_{0b}$ группой, арильной группой, гетероарильной группой, арил (C_1-C_6) алкильной группой или гетероарил (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{09} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6) алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6) алкинильной группой, $-Cy_{02}$, $-(C_1-C_6)$ алкил- Cy_{02} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- Cy_{02} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- Cy_{02} , $-Cy_{02}-Cy_{03}$, $-(C_2-C_6)$ алкинил- $O-Cy_{02}$, $-Cy_{02}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{03} , атомом галогена, цианогруппой, $-C(O)-R_{014}$ или $-C(O)-NR_{014}R_{014}'$,

R_{010} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6) алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6) алкинильной группой, арил (C_1-C_6) алкильной группой, (C_1-C_6) циклоалкилалкильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6) галоалкилом или $-(C_1-C_6)$ алкил- $O-Cy_{04}$,

или пара (R_{09} , R_{010}), сконденсированная с двумя соседними атомами углерода, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N,

R_{011} и R_{011}' независимо друг от друга являются атомом водорода, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой или $-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{01} ,

или пара (R_{011} , R_{011}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где N атом может быть замещен 1 или 2 группами, выбранными из линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой и где один или несколько атомов углерода линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой необязательно дейтерированы,

R_{012} является $-Cy_{05}$, $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-Cy_{06}-O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{07} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} , $-NH-C(O)-NH-R_{011}$, $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} , $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}R_{011}'$, $-OR_{011}$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- OR_{011} , $-SO_2-R_{011}$, $-C(O)-OR_{011}$,

R_{013} , R_{013}' , R_{014} и R_{014}' независимо друг от друга являются атомом водорода или необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой,

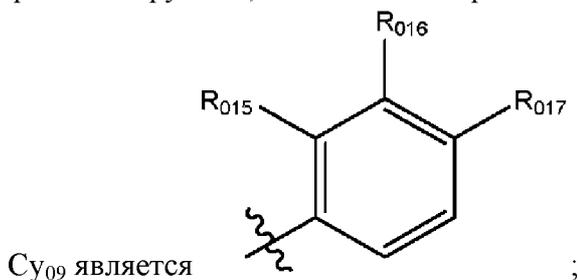
R_{0a} является атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой,

R_{0b} является $-O-C(O)-O-R_{0c}$ группой, $-O-C(O)-NR_{0c}R_{0c}'$ группой или $-O-P(O)(OR_{0c})_2$ группой,

R_{0c} и R_{0c}' независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1 - C_8)алкильной группой, циклоалкильной группой, (C_1 - C_6)алкокси(C_1 - C_6)алкильной группой или (C_1 - C_6)алкоксикарбонил(C_1 - C_6)алкильной группой,

или пара (R_{0c} , R_{0c}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют не ароматическое кольцо, состоящее из 5-7 членов кольца, которое может содержать, в дополнение в атому азота, от 1 до 3 гетероатома, выбранных из кислорода и азота, где азот необязательно замещен линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой,

S_{y01} , S_{y02} , S_{y03} , S_{y04} , S_{y05} , S_{y06} , S_{y07} , S_{y08} и S_{y010} независимо друг от друга, являются циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой, каждая из которых необязательно замещена,



или S_{y09} является гетероарильной группой, которая замещена группой, выбранной из $-O-P(O)(OR_{020})_2$; $-O-P(O)(O^+M^+)_2$; $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$; гидрокси; гидрокси(C_1 - C_6)алкила; $-(CH_2)_{t0}-U_0-(CH_2)_{s0}$ -гетероциклоалкила; и $-U_0-(CH_2)_{q0}-NR_{021}R_{021}'$,

R_{015} является атомом водорода; $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$ группой; линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкокси(C_1 - C_6)алкильной группой; $-U_0-(CH_2)_{q0}-NR_{021}R_{021}'$ группой; или $-(CH_2)_{t0}-U_0-(CH_2)_{s0}$ -гетероциклоалкильной группой,

R_{016} является атомом водорода; гидроксигруппой; гидрокси(C_1 - C_6)алкильной группой; $-(CH_2)_{t0}-U_0-(CH_2)_{s0}$ -гетероциклоалкильной группой; $(CH_2)_{t0}-U_0-V_0-O-P(O)(OR_{020})_2$ группой; $-O-P(O)(O^+M^+)_2$ группой; $-O-S(O)_2OR_{020}$ группой; $-S(O)_2OR_{020}$ группой; $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$ группой; $-(CH_2)_{p0}-O-C(O)-NR_{022}R_{023}$ группой; или $-U_0-(CH_2)_{q0}-NR_{021}R_{021}'$ группой,

R_{017} является атомом водорода; $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{020}$ группой; $-CH_2-P(O)(OR_{020})_2$ группой; $-O-P(O)(OR_{020})_2$ группой; $-O-P(O)(O^+M^+)_2$ группой; гидроксигруппой; гидрокси(C_1 - C_6)алкильной группой; $-(CH_2)_{t0}-U_0-(CH_2)_{s0}$ -гетероциклоалкильной группой; $-U_0-(CH_2)_{q0}-NR_{021}R_{021}'$ группой; или альдоновой кислоты,

M^+ является фармацевтически приемлемым одновалентным катионом,

U_0 является связью или атомом кислорода,

V_0 является $-(CH_2)_{s0}$ - группой или $-C(O)-$ группой,

R_{018} является атомом водорода или (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{019} является атомом водорода или гидрокси (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{020} является атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{021} и R_{021}' независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой или гидрокси (C_1-C_6) алкильной группой,

или пара (R_{021}, R_{021}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{022} является (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкильной группой, $-(CH_2)_{p0}-NR_{024}R_{024}'$ группой или $-(CH_2)_{p0}-O-(CHR_{018}-CHR_{019}-O)_{q0}-R_{20}$ группой,

R_{023} является атомом водорода или (C_1-C_6) алкокси (C_1-C_6) алкильной группой,

или пара (R_{022}, R_{023}) вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-18 членов кольца, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-5 гетероатома, выбранных из O, S и N, где полученное кольцо необязательно замещено атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой или гетероциклоалкильной группой,

R_{024} и R_{024}' независимо друг от друга являются атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой,

или пара (R_{024}, R_{024}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, состоящее из 5-7 членов кольца, которое может содержать, в дополнение в атому азота, от 1 до 3 гетероатома, выбранных из O, S и N и где полученное кольцо необязательно замещено атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{025} является атомом водорода, гидроксигруппой или гидрокси (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{026} является атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой или цианогруппой,

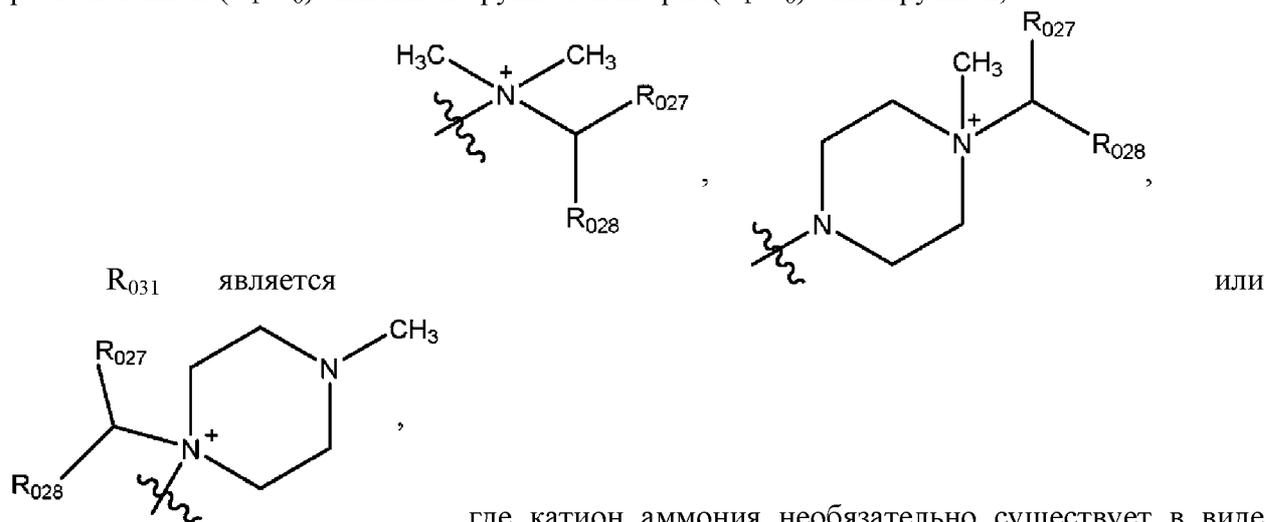
R_{027} является атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{028} является $-O-P(O)(O^-)(O^-)$ группой, $-O-P(O)(O^-)(OR_{030})$ группой, $-O-P(O)(OR_{030})(OR_{030}')$ группой, $-(CH_2)_{p0}-O-SO_2-O^-$ группой, $-(CH_2)_{p0}-SO_2-O^-$ группой, $-(CH_2)_{p0}-O-SO_2-OR_{030}$ группой, $-Cu_{010}$, $-(CH_2)_{p0}-SO_2-OR_{030}$ группой, $-O-C(O)-R_{029}$ группой, $-O-C(O)-OR_{029}$ группой или $-O-C(O)-NR_{029}R_{029}'$ группой;

R_{029} и R_{029}' независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_6) алкильной группой или линейной или разветвленной амино (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{030} и R_{030}' независимо друг от друга являются атомом водорода, линейной или

разветвленной (C₁-C₆)алкильной группой или арил(C₁-C₆)алкилгруппой,



, где катион аммония необязательно существует в виде цвиттерионной формы или имеет одновалентный анионный противоион,

p_0 является целым числом, равным 0 или 1,

r_0 является целым числом, равным 0, 1, 2 или 3,

q_0 является целым числом, равным 1, 2, 3 или 4,

g_0 и s_0 независимо являются целым числом, равным 0 или 1;

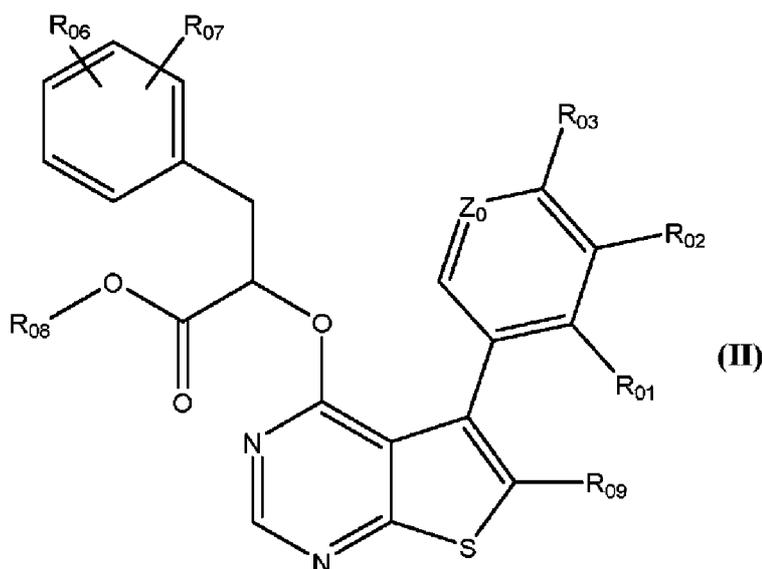
где, как максимум, один из R₀₃, R₀₉ или R₀₁₂ группами, если присутствуют, ковалентно присоединены к линкеру, и

где валентность атома не превышена посредством одного или нескольких атомов, связанных с ним,

или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

26. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 25, отличающийся тем, что C_{у01}, C_{у02}, C_{у03}, C_{у04}, C_{у05}, C_{у06}, C_{у07}, C_{у08} и C_{у010}, независимо друг от друга, является циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой, каждая из которых необязательно замещена одной или несколькими группами, выбранными из галогена; -(C₁-C₆)алкокси; -(C₁-C₆)галоалкил; -(C₁-C₆)галоалкокси; -(CH₂)_{p0}-O-SO₂-OR₀₃₀; -(CH₂)_{p0}-SO₂-OR₀₃₀; -O-P(O)(OR₀₂₀)₂; -O-P(O)(O⁻M⁺)₂; -CH₂-P(O)(OR₀₂₀)₂; -(CH₂)_{p0}-O-(CHR₀₁₈-CHR₀₁₉-O)_{q0}-R₀₂₀; гидроксид; гидроксид(C₁-C₆)алкила; -(CH₂)_{i0}-U₀-(CH₂)_{s0}-гетероциклоалкила; или -U₀-(CH₂)_{q0}-NR₀₂₁R₀₂₁'.

27. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-26, отличающийся тем, что D содержит соединение формулы (II):



где:

Z_0 является атомом азота или $C-R_{04}$ группой,

R_{01} является атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)галоалкильной группой, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, $-C_{y_{08}}$, $-NR_{011}R_{011}'$,

R_{02} , R_{03} и R_{04} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)галоалкил, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-C_{y_{01}}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- $C_{y_{01}}$, $-(C_2-C_6)$ алкенил- $C_{y_{01}}$, $-(C_2-C_6)$ алкинил- $C_{y_{01}}$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{031} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

или пара (R_{02} , R_{03}) или (R_{03} , R_{04}) вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где кольцо необязательно замещено группой, выбранной из линейного или разветвленного (C_1-C_6)алкила, $-NR_{013}R_{013}'$, $-(C_0-C_6)$ алкил- $C_{y_{01}}$ и оксо,

R_{06} и R_{07} независимо друг от друга являются атомом водорода, атомом галогена, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, линейным или разветвленным (C_1-C_6)галоалкилом, гидроксигруппой, линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкоксигруппой, $-S-(C_1-C_6)$ алкильной группой, цианогруппой, нитрогруппой, $-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-C_{y_{01}}$, $-(C_0-C_6)$ алкил- $C_{y_{01}}$, $-(C_2-C_6)$ алкенил- $C_{y_{01}}$, $-(C_2-C_6)$ алкинил- $C_{y_{01}}$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- R_{031} , $-C(O)-OR_{011}$, $-O-$

$C(O)-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-NR_{011}-C(O)-OR_{011}'$, $-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-SO_2-NR_{011}R_{011}'$ или $-SO_2-(C_1-C_6)$ алкилом,

или пара (R_{06} , R_{07}), конденсированная с двумя соседними атомами углерода, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N и где полученное кольцо необязательно замещено группой, выбранной из линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группы, $-NR_{013}R_{013}'$, $-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{01} и оксо,

R_{08} является атомом водорода, линейной или разветвленной (C_1-C_8)алкильной группой, арильной группой, гетероарильной группой, арил- (C_1-C_6) алкилгруппой или гетероарил- (C_1-C_6) алкильной группой,

R_{09} является линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группой, линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группой, $-Cy_{02}$, $-(C_1-C_6)$ алкил- Cy_{02} , $-(C_2-C_6)$ алкенил- Cy_{02} , $-(C_2-C_6)$ алкинил- Cy_{02} , $-Cy_{02}-Cy_{03}$, $-(C_2-C_6)$ алкинил- $O-Cy_{02}$, $-Cy_{02}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{03} , атомом галогена, цианогруппой, $-C(O)-R_{014}$, $-C(O)-NR_{014}R_{014}'$,

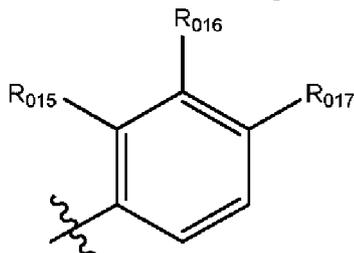
R_{011} и R_{011}' независимо друг от друга являются атомом водорода, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или $-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{01} ,

или пара (R_{011} , R_{011}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где атом N необязательно замещен линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой и где один или несколько атомов углерода линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группы необязательно дейтерированы,

R_{012} является $-Cy_{05}$, $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- $NR_{011}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{06} , $-Cy_{05}-Cy_{06}-O-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{07} , $-Cy_{05}-(C_0-C_6)$ алкил- Cy_{09} , $-NH-C(O)-NH-R_{011}$, $-C(O)-NR_{011}R_{011}'$, $-NR_{011}R_{011}'$, $-OR_{011}$, $-NR_{011}-C(O)-R_{011}'$, $-O-(C_1-C_6)$ алкил- OR_{011} , $-SO_2-R_{011}$ или $-C(O)-OR_{011}$,

R_{013} , R_{013}' , R_{014} и R_{014}' независимо друг от друга являются атомом водорода или необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

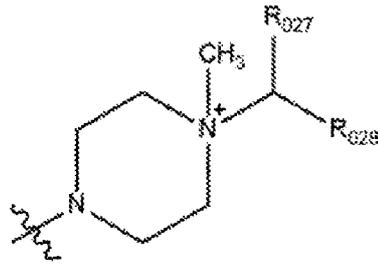
Cy_{01} , Cy_{02} , Cy_{03} , Cy_{05} , Cy_{06} , Cy_{07} и Cy_{08} независимо друг от друга, являются циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой, каждая из которых необязательно замещена,



Cy_{09} является

, где R_{015} , R_{016} и R_{017} такие, как определены

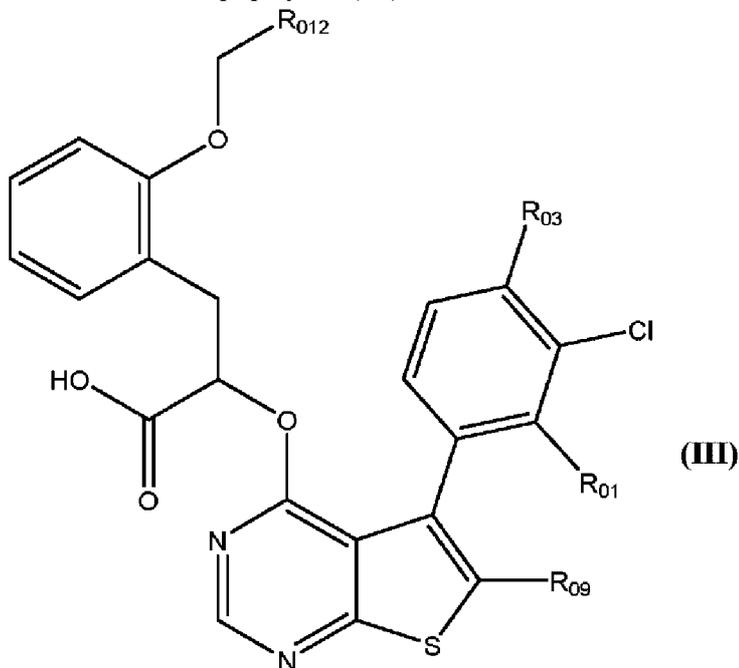
для формулы (I),



R_{031} является , где R_{027} и R_{028} такие, как определены для формулы (I), где, как максимум, одна из R_{03}, R_{09} или R_{012} групп, если присутствует, ковалентно присоединена к линкеру,

или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

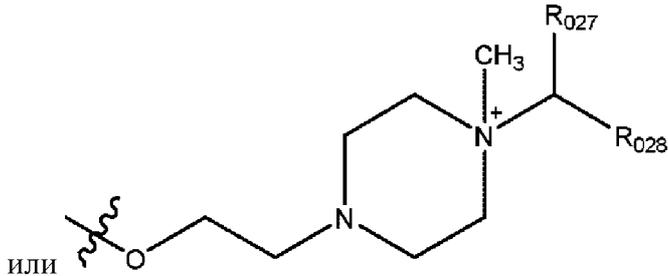
28. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-27, где D содержит соединение формулы (III):



где:

R_{01} является линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой,

R_{03} является $-O-(C_1-C_6)$ алкил- $NR_{011}R_{011}'$,



где R_{011} и R_{011}' независимо друг от друга являются атомом водорода, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группой или $-(C_0-C_6)$ алкил- Su_{01} ;

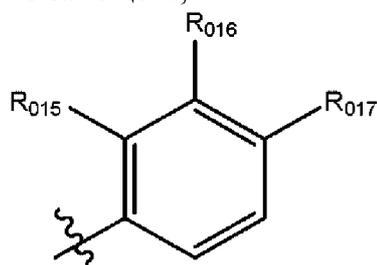
или пара (R_{011} , R_{011}') вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют ароматическое или не ароматическое кольцо, содержащее 5-7 членов в кольце, которое необязательно содержит, в дополнение к атому азота, 1-3 гетероатома, выбранных из O, S и N, где атом N может быть замещен 1 или 2 группами, выбранными из атома водорода или линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группы,

и где R_{027} является атомом водорода и R_{028} является $-(CH_2)_{p0}-O-SO_2-O-$ группой или $-(CH_2)_{p0}-SO_2-OR_{030}$ группой;

R_{09} является линейной или разветвленной (C_2 - C_6)алкильной группой или $-C_{y02}$,

R_{012} является $-C_{y05}$, $-C_{y05}-(C_0-C_6)$ алкил- C_{y06} или $-C_{y05}-(C_0-C_6)$ алкил- C_{y09} ,

C_{y01} , C_{y02} , C_{y05} и C_{y06} независимо друг от друга, являются циклоалкильной группой, гетероциклоалкильной группой, арильной группой или гетероарильной группой, каждая из которых необязательно замещена,



C_{y09} является

R_{015} , R_{016} и R_{017} такие, как определены для формулы (I),

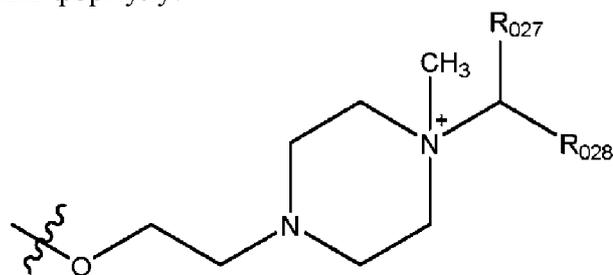
где, как максимум, один из R_{03} , R_{09} или R_{012} группы, если присутствуют, ковалентно присоединены к линкеру,

или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

29. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 28, отличающийся тем, что R_{01} является метилом или этилом.

30. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 28, отличающийся тем, что R_{03} является $-O-CH_2-CH_2-NR_{011}R_{011}'$, где R_{011} и R_{011}' образуют, вместе с атомом азота, несущем их, пиперазинильную группу, которая может быть замещена группой, являющейся атомом водорода или линейной или разветвленной (C_1 - C_6)алкильной группой).

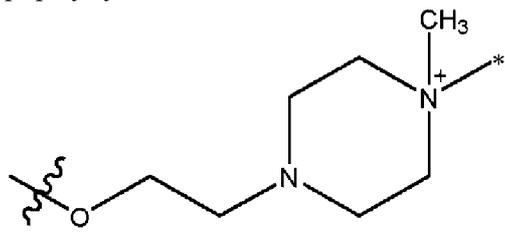
31. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 28, отличающийся тем, что R_{03} содержит формулу:



, где R_{027} является атомом водорода и R_{028} является $-(CH_2)_{p0}-SO_2-OR_{030}$ группой.

32. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 28, отличающийся тем, что R_{03}

имеет формулу:



где —* является связью с линкером.

33. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 28, отличающийся тем, что R_{09} является Su_{02} .

34. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 33, отличающийся тем, что Su_{02} является необязательно замещенной арильной группой.

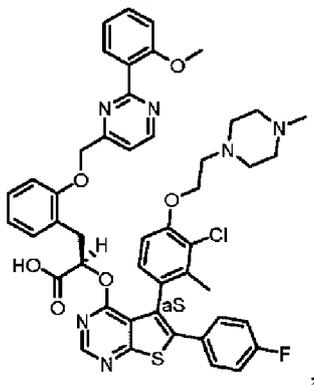
35. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 28, отличающийся тем, что Su_{05} содержит гетероарильную группу, выбранную из пирозолильной группы и пиримидинильной группы.

36. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 28, отличающийся тем, что Su_{05} является пиримидинильной группой.

37. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-36, отличающийся тем, что L присоединен к D ковалентной связью от L к R_{03} формулы (I), (II) или (III); или L присоединен к D ковалентной связью от L к R_{09} формулы (I), (II) или (III).

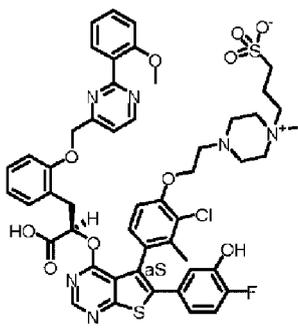
38. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-37, отличающийся тем, что:

(1) D содержит:



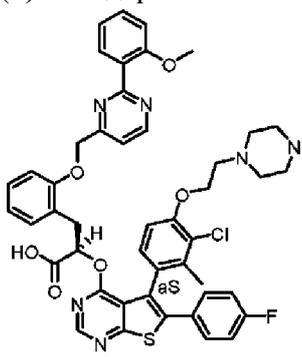
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(2) D содержит:



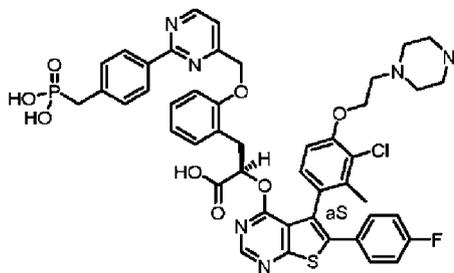
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(3) D содержит:



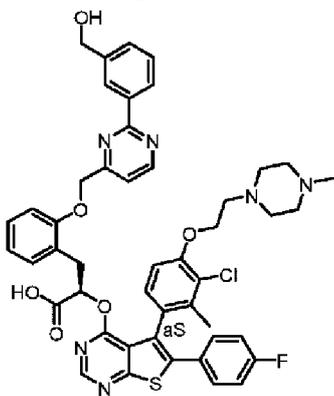
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(4) D содержит:



или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

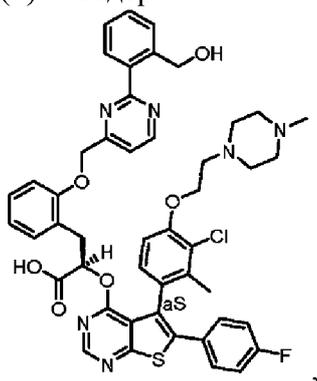
(5) D содержит:



или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное

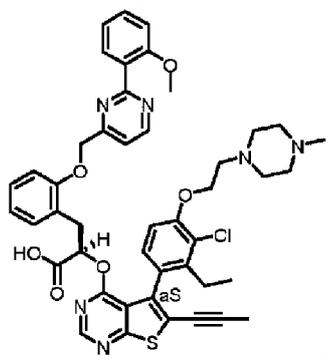
и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(6) D содержит:



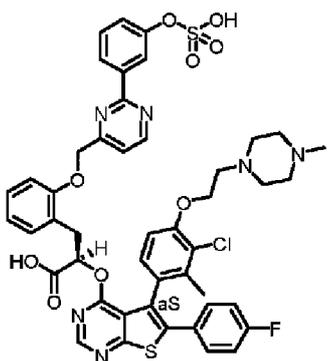
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(7) D содержит:



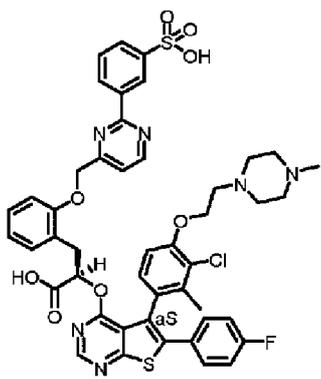
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(8) D содержит:



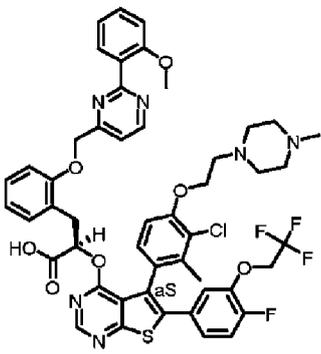
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(9) D содержит:



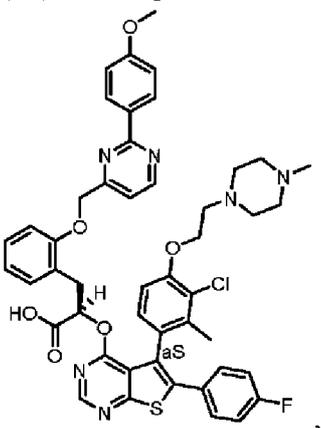
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(10) D содержит:



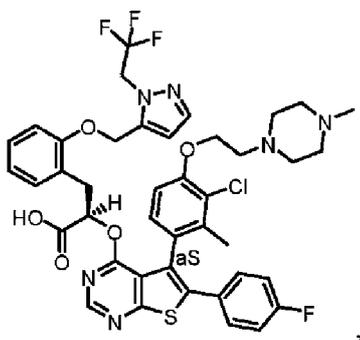
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(11) D содержит:



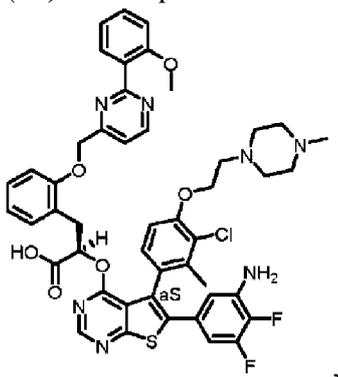
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(12) D содержит:



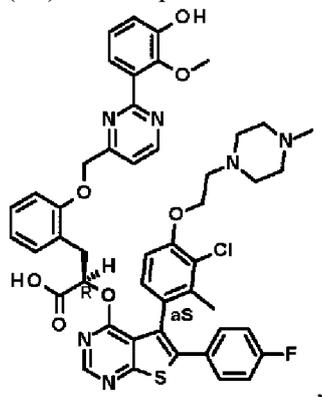
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных; или

(13) D содержит:



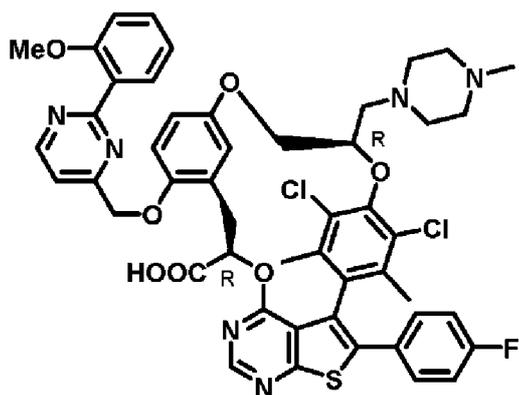
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(14) D содержит:



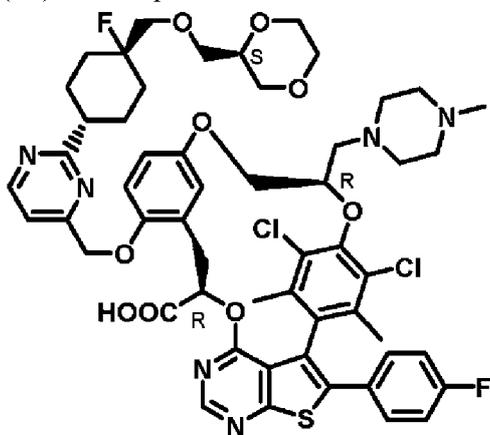
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(15) D содержит:



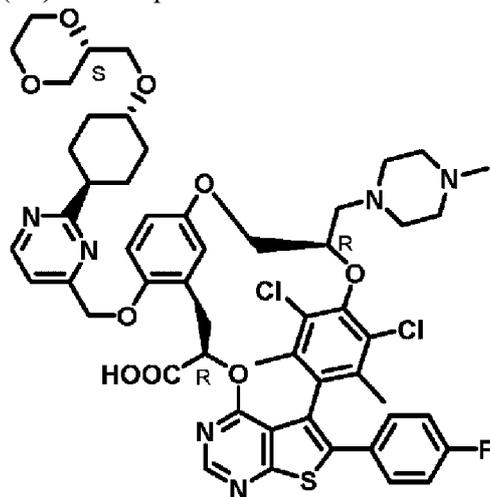
или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных;

(16) D содержит:



или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных; или

(17) D содержит:



или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

39. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-38, отличающийся тем, что -(L-D) образуется из соединения, выбранного из таблицы А или энантиомер, диастереоизомер, атропоизомер, дейтерированное производное и/или

фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных.

40. Анти-CD74 антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи следующим образом:

(i) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:1, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:2, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:3; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:16, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:17 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:18;

(ii) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:4, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:2, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:3; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:16, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:17 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:18;

(iii) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:5, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:6, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:3; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:19, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:20 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:21;

(iv) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:7, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:8, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:9; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:22, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:20 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:18;

(v) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:1, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:2, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:3; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:35, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:17 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:18;

(vi) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:4, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:2, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:3; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:35, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:17 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:18;

(vi) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:4, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:2, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:3; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:35, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:17 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:18.

(vii) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:5, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:6, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:3; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:22, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:20 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:21, или

(viii) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) состоящая из SEQ ID NO:7, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) состоящая из SEQ ID NO:8, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) состоящая из SEQ ID NO:9; CDR1 легкой цепи (LCDR1) состоящая из SEQ ID NO:17, CDR2 легкой цепи (LCDR2) состоящая из SEQ ID NO:20 и CDR3 легкой цепи (LCDR3) состоящая из SEQ ID NO:18.

41. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 40, отличающееся тем,

аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:38;

(k) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:14 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:38;

(l) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:15 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:38;

(m) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:12 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:42;

(n) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:14 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:42;

(o) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:15 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:42;

(p) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:12 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:46;

(q) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:14 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:46; или

(r) аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO:15 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO:46.

43. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп. 40-42.

44. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 43.

45. Клеточная линия, содержащая вектор по п. 44 или нуклеиновую кислоту по п. 43.

46. Способ получения антитела по любому из пп. 40-42, включающий выращивание клеточной линии по п. 45 в условиях, подходящих для экспрессирования антитела, с последующей очисткой антитела.

47. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-39, отличающийся тем, что анти-CD74 антитело содержит антитело по любому из пп. 40-42.

48. Композиция, содержащая несколько копий конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-39 и 47, где среднее p конъюгата антитело-лекарственное средство в композиции составляет от примерно 2 до примерно 16, например, от примерно 2 до примерно 8, например, от примерно 2 до примерно 4.

49. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-39 и 47 или композиция по п. 48 и фармацевтически приемлемый носитель.

50. Способ лечения субъекта, имеющего рак или подозревающегося в его наличии, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-39 и 47, композиции по п. 48 или фармацевтической композиции по п. 49.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что рак экспрессирует CD74.

52. Способ по п. 50 или 51, отличающийся тем, что раком является опухоль или гематологический рак, предпочтительно, раком является рак груди, множественная миелома, плазмноклеточная миелома, лейкоз, лимфома, рак желудка, острый миелоидный

лейкоз, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфолейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярная лимфома, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланома, миелогенный лейкоз, миелома, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого, хронический лимфолейкоз, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки.

53. Способ уменьшения или ингибирования роста опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-39 и 47, композиции по п. 48 или фармацевтической композиции по п. 49.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что опухоль экспрессирует CD74.

55. Способ по п. 53 или 54, отличающийся тем, что опухолью является рак груди, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, меланома, рак полости рта, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак простаты, мелкоклеточный рак легких или рак селезенки.

56. Способ по любому из пп. 53-55, отличающийся тем, что введение конъюгата антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции снижает или ингибирует рост опухоли, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95% или по меньшей мере, примерно на 99%.

57. Способ уменьшения или замедления роста популяции раковых клеток у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственного средства по любому из пп. 1-39 и 47, композиции по п. 48 или фармацевтической композиции по п. 49.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что популяция раковых клеток экспрессирует CD74.

59. Способ по п. 57 или 58, отличающийся тем, что популяция раковых клеток происходит из опухоли или гематологического рака, предпочтительно, популяция раковых клеток происходит из рака груди, множественной миеломы, плазмноклеточной миеломы, лейкоза, лимфомы, рака желудка, острого миелоидного лейкоза, рака мочевого пузыря, рака головного мозга, рака костного мозга, рака шейки матки, хронического лимфолейкоза, колоректального рака, рака пищевода, гепатоцеллюлярного рака, лимфобластного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфоидных злокачественных новообразований Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланомы, миелогенного лейкоза, миеломы, рака яичников, немелкоклеточного рака легкого, хронического лимфолейкоза, рака простаты, мелкоклеточного рака легкого или рака селезенки.

60. Способ по любому из пп. 57-59, отличающийся тем, что введение конъюгата

антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции снижает популяцию раковых клеток или замедляет рост популяции раковых клеток, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95% или по меньшей мере, примерно на 99%.

61. Способ определения того, будет ли субъект, имеющий рак или подозревающийся в его наличии, реагировать на лечение конъюгатом антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-39 и 47, композицией по п. 48 или фармацевтической композицией по п. 49, включающий предоставление биологического образца от субъекта; контакт образца с конъюгатом антитело-лекарственное средство; и обнаружение связывания конъюгата антитело-лекарственное средство с раковыми клетками в образце.

62. Способ по п. 61, отличающийся тем, что раковые клетки в образце экспрессируют CD74.

63. Способ по п. 61 или п.62, отличающийся тем, что рак экспрессирует CD74.

64. Способ по любому из пп. 61-63, отличающийся тем, что раком является опухоль или гематологический рак, предпочтительно, раком является рак груди, множественную миелому, плазмноклеточная миелома, лейкоз, лимфома, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфолейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярная лимфома, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланомы, миелогенный лейкоз, миелома, рак полости рта, рак яичников, не мелкоклеточный рак легкого, хронический лимфолейкоз, рак простаты, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки.

65. Способ по любому из пп. 61-64, отличающийся тем, что образцом является образец биопсии ткани, образец крови или образец костного мозга.

66. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-39 и 47, включающий реакцию антитела или антигенсвязывающего фрагмента с расщепляемым линкером, присоединенным к ингибитору MCL1, в условиях, допускающих конъюгацию.

67. Способ по любому из пп. 50-60, дополнительно включающий введение субъекту, который в этом нуждается, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента, предпочтительно, отличающийся тем, что одним дополнительным терапевтическим агентом является ингибитор Vcl-2, более предпочтительно, одним дополнительным терапевтическим агентом является венетоклакс, соединение A1 или соединение A2.

68. Конъюгат антитело-лекарственное средство формулы (1):



где:

Ab является анти-CD74-антителом или его антигенсвязывающим фрагментом,

необязательно, где Ab является антителом с молчащей Fc ;

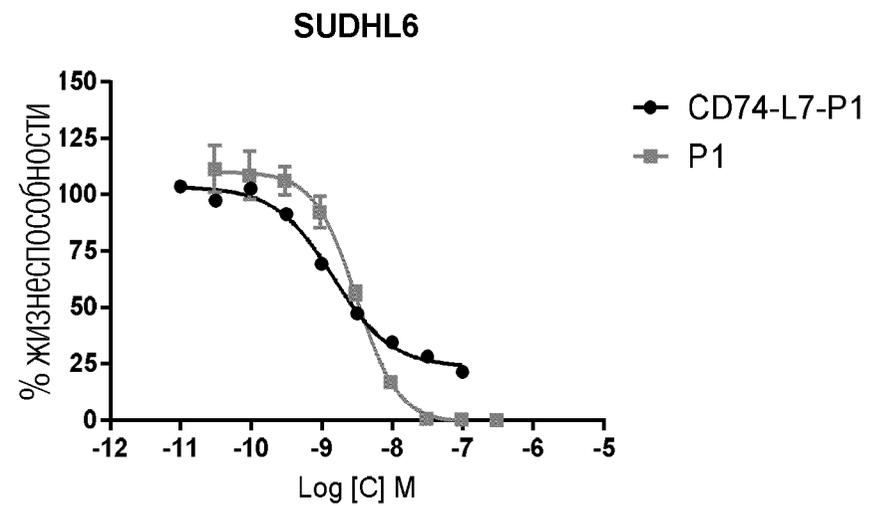
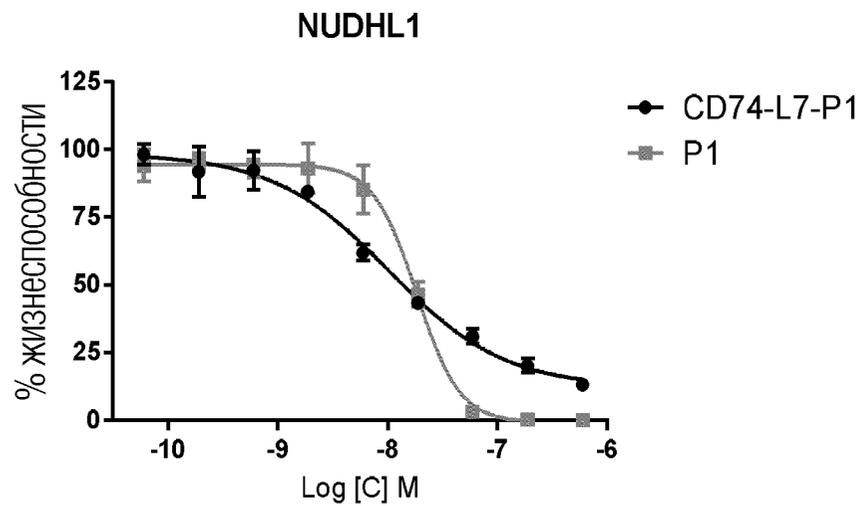
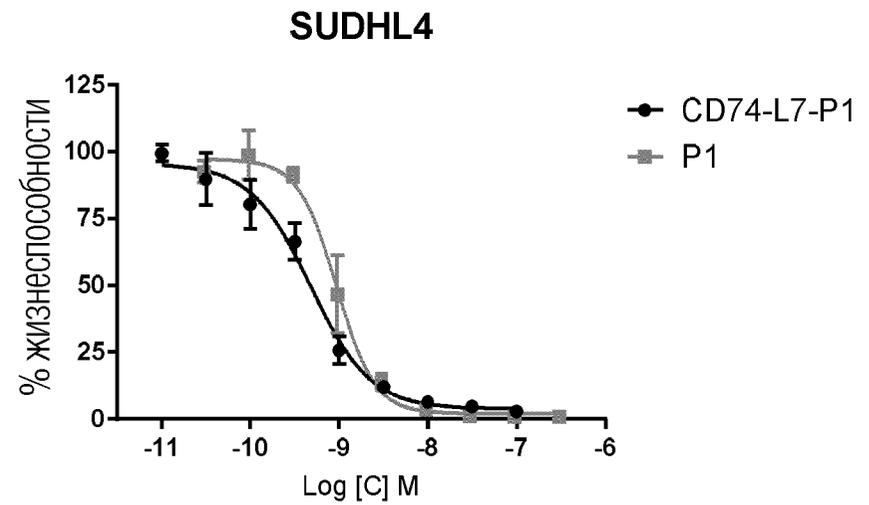
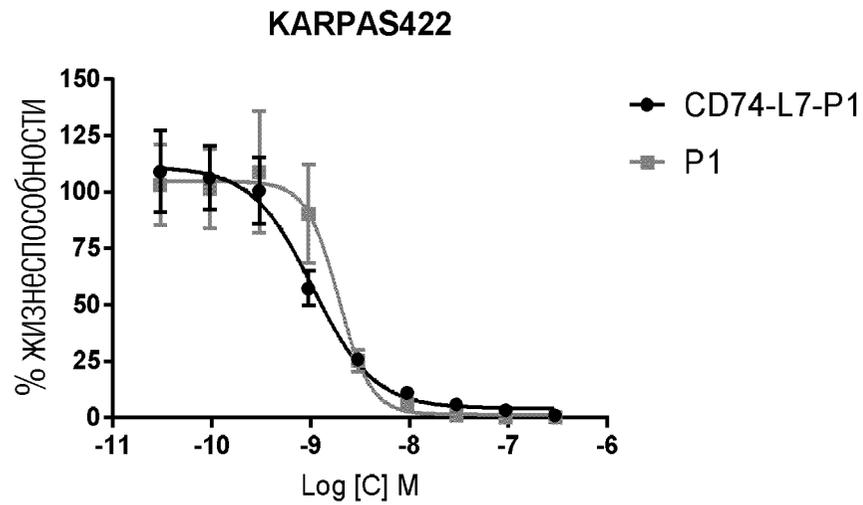
p является целым числом от 1 до 16;

L является линкером; и

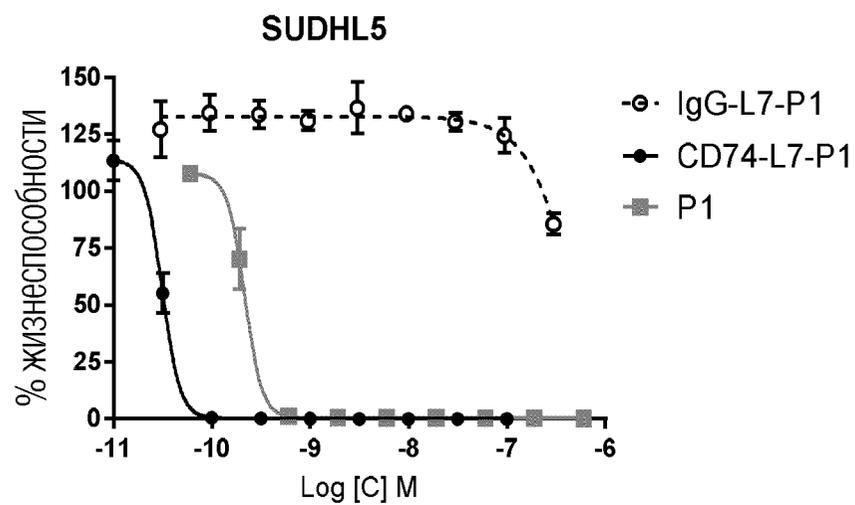
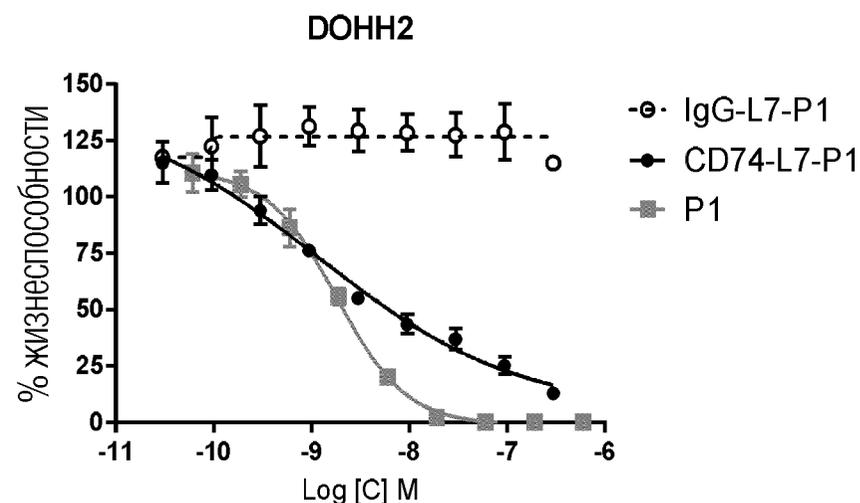
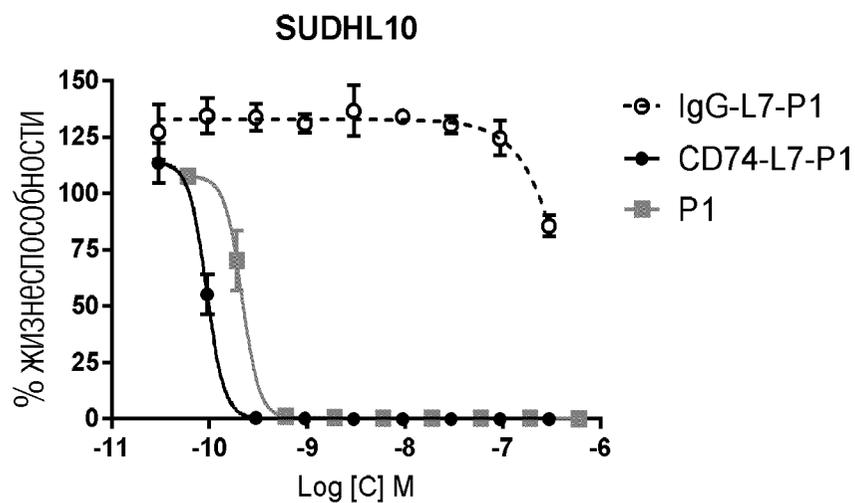
D является соединением ингибитором MCL1.

69. Способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 68 в комбинации с ингибитором Bcl-2, субъекту, нуждающемуся в этом, где заболевание или нарушение опосредовано CD74.

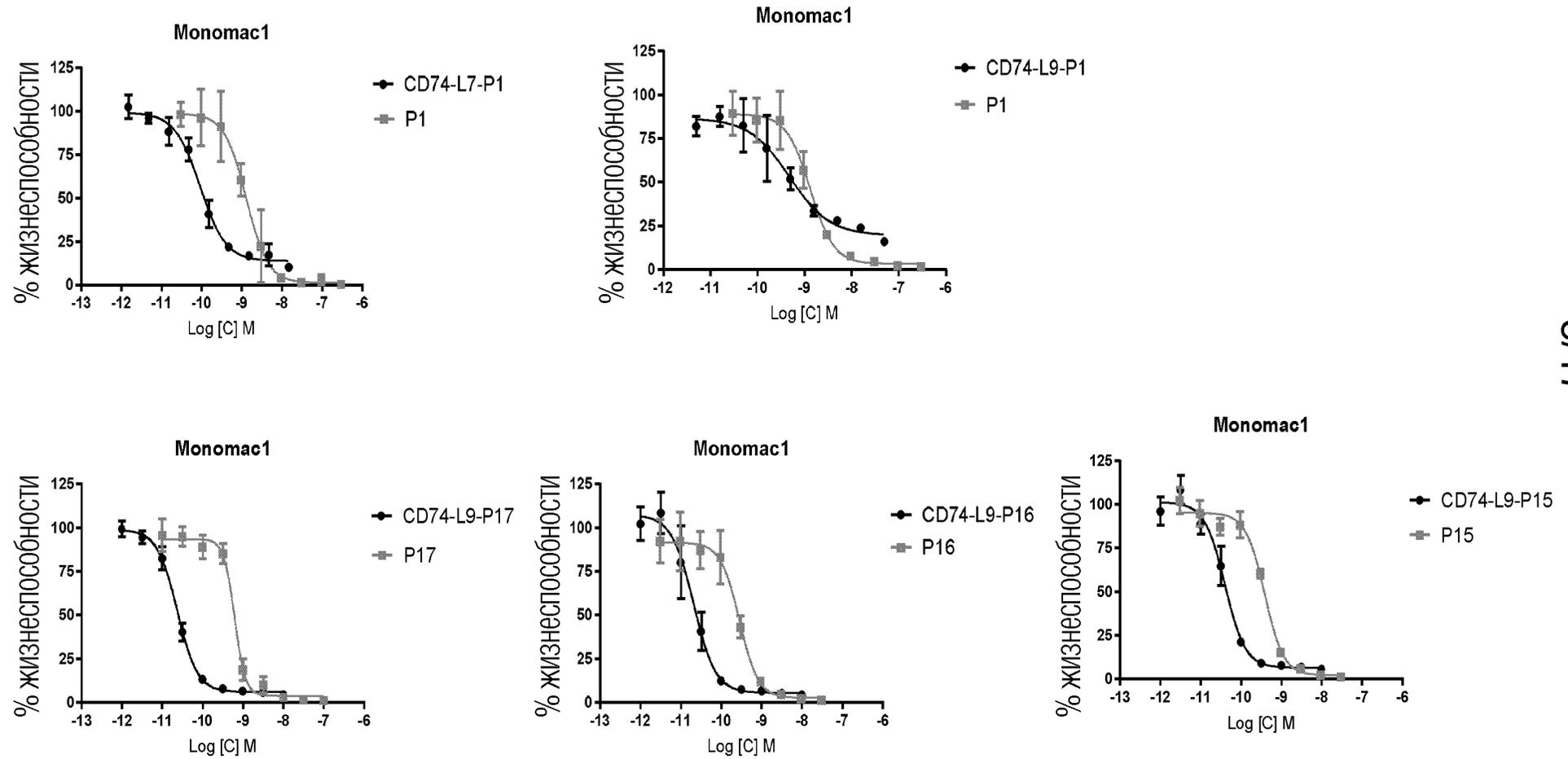
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

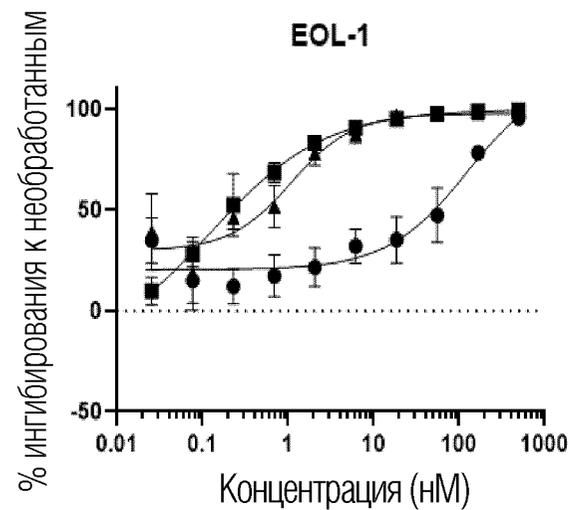
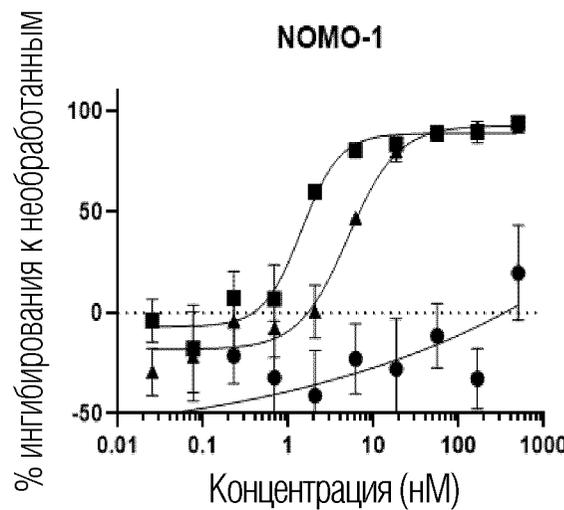
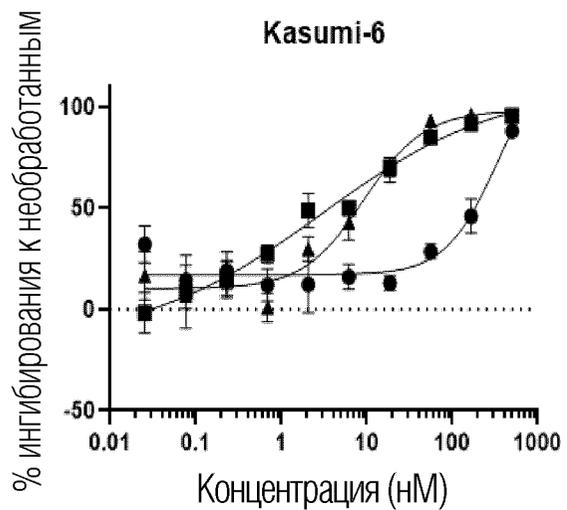
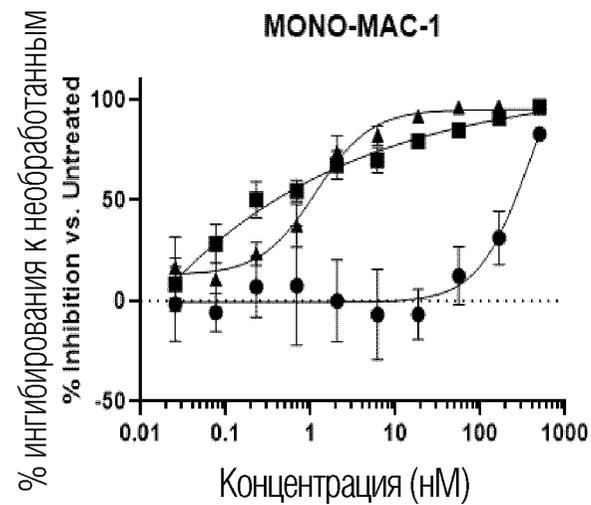
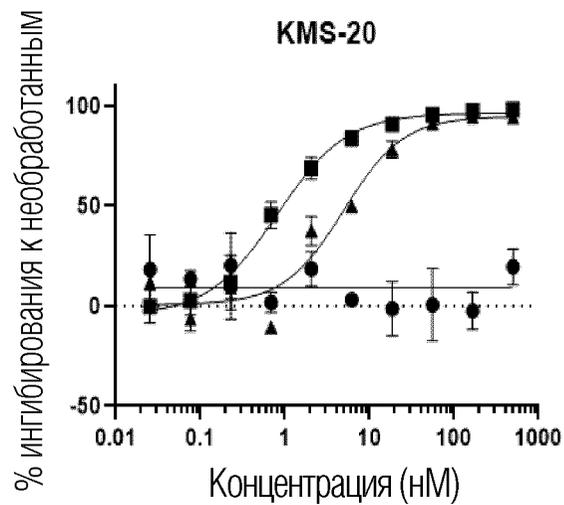
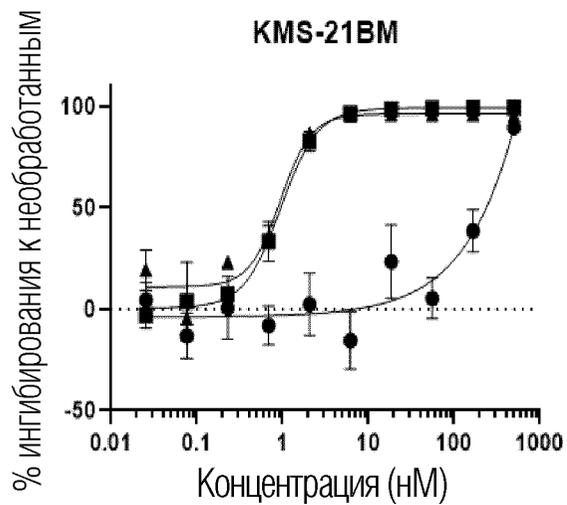


ФИГ. 2 In vitro активность CD74 ADC и полезных нагрузок в клеточной линии Monomac1 (CTG 72ч)

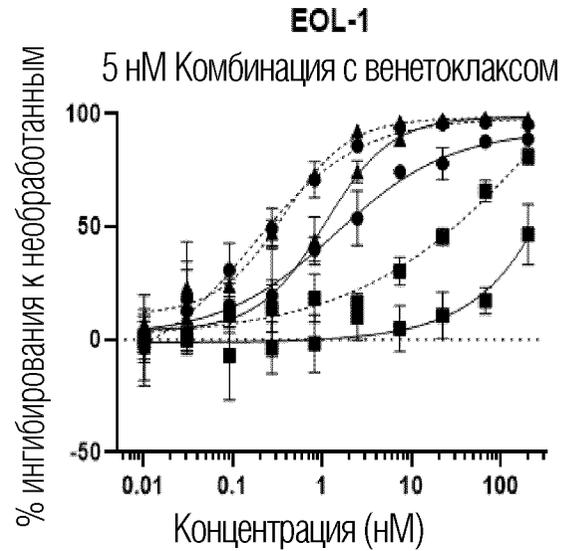
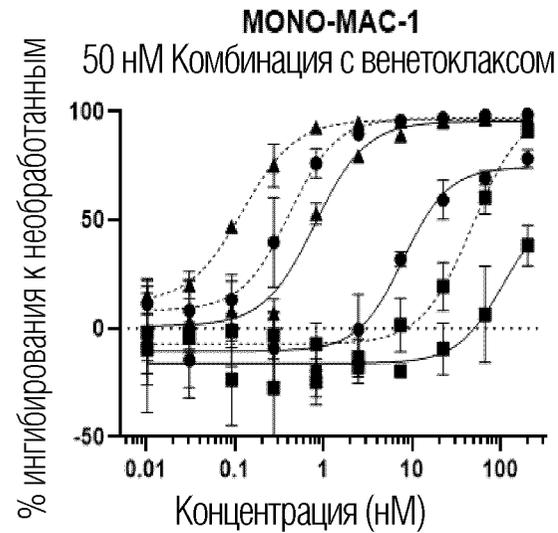
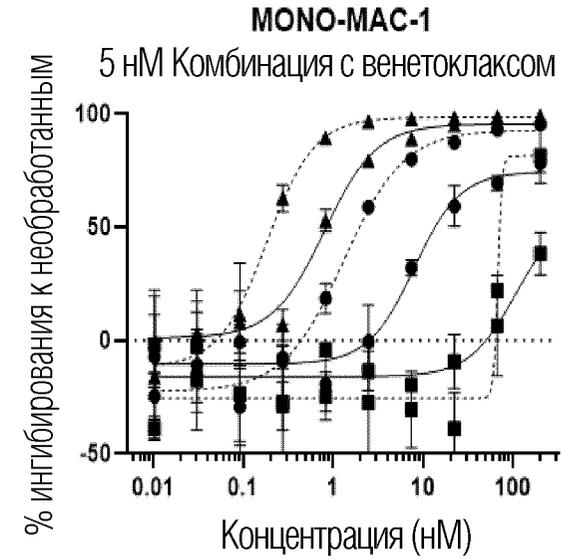
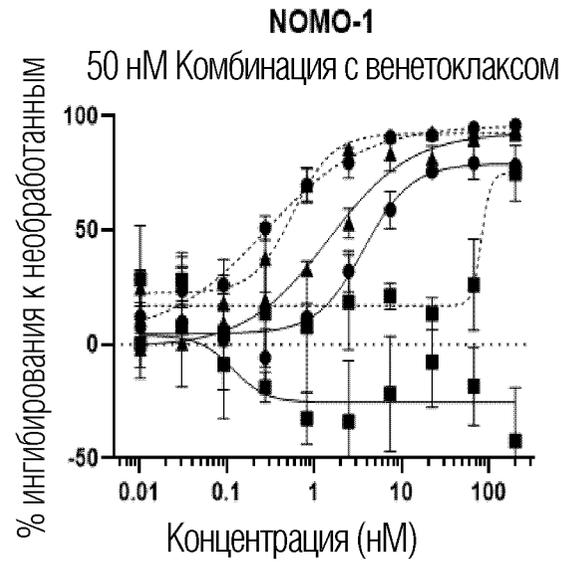
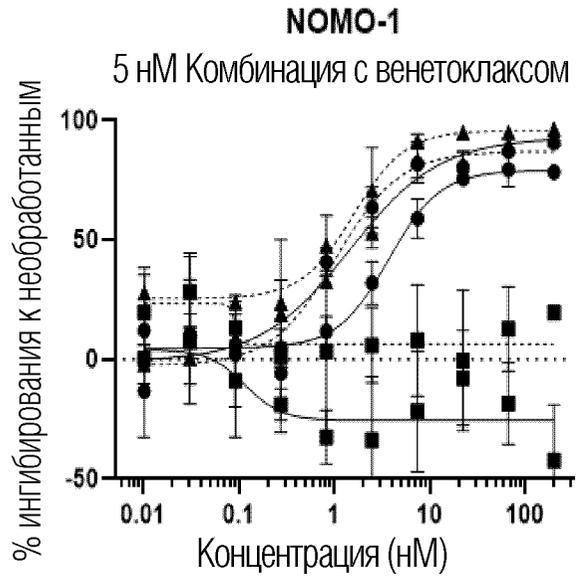


ФИГ. 3

- CD74-L7-P1
- IgG-L7-P1
- ▲ P1

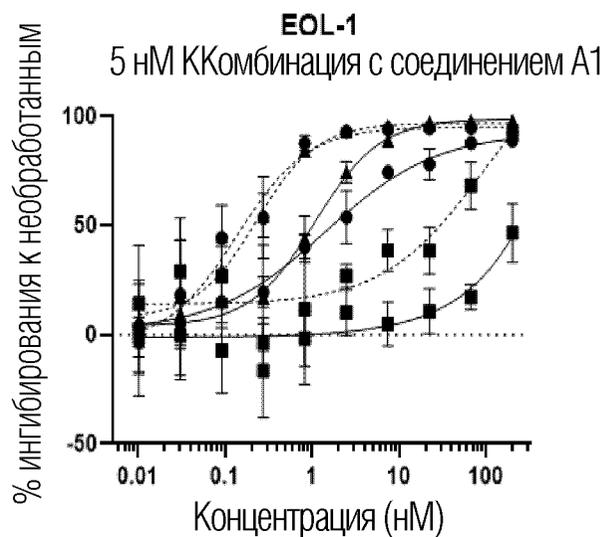
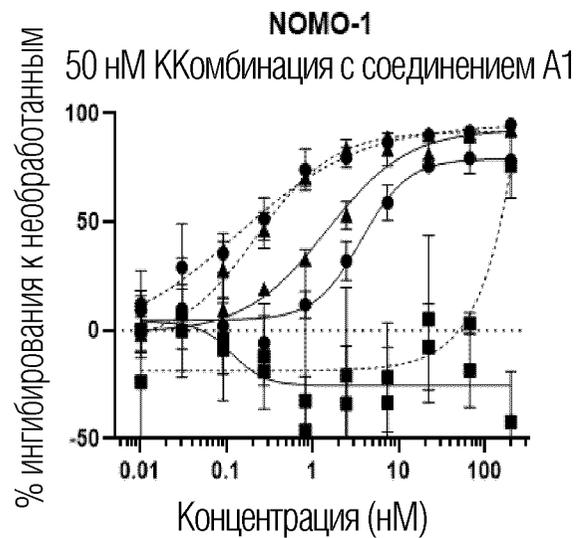
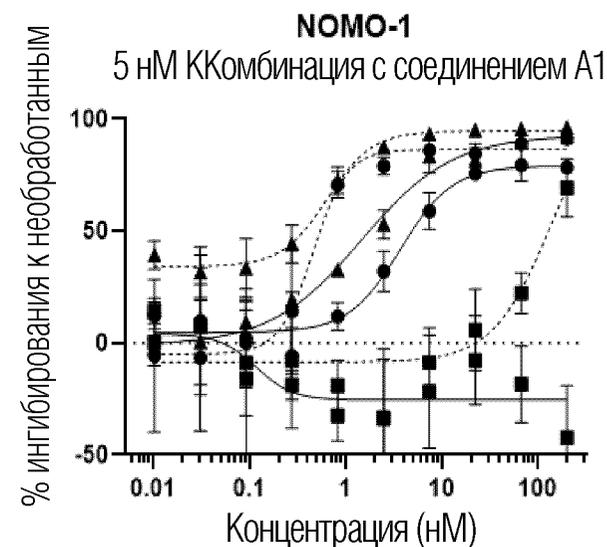
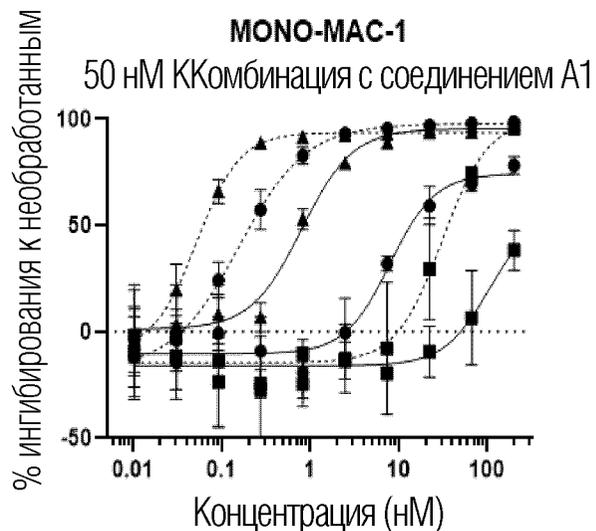
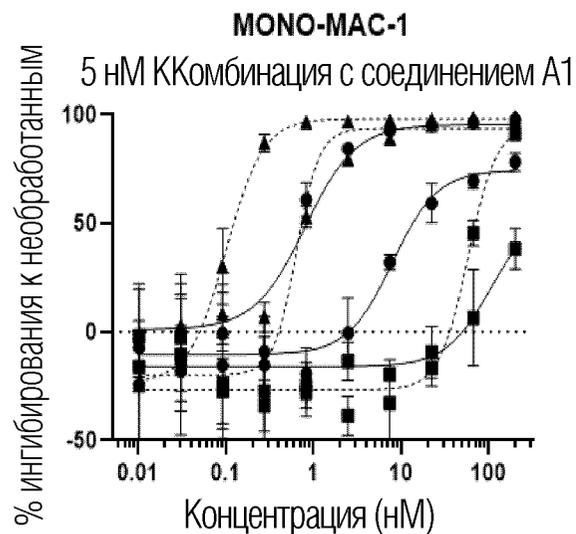


ФИГ. 4



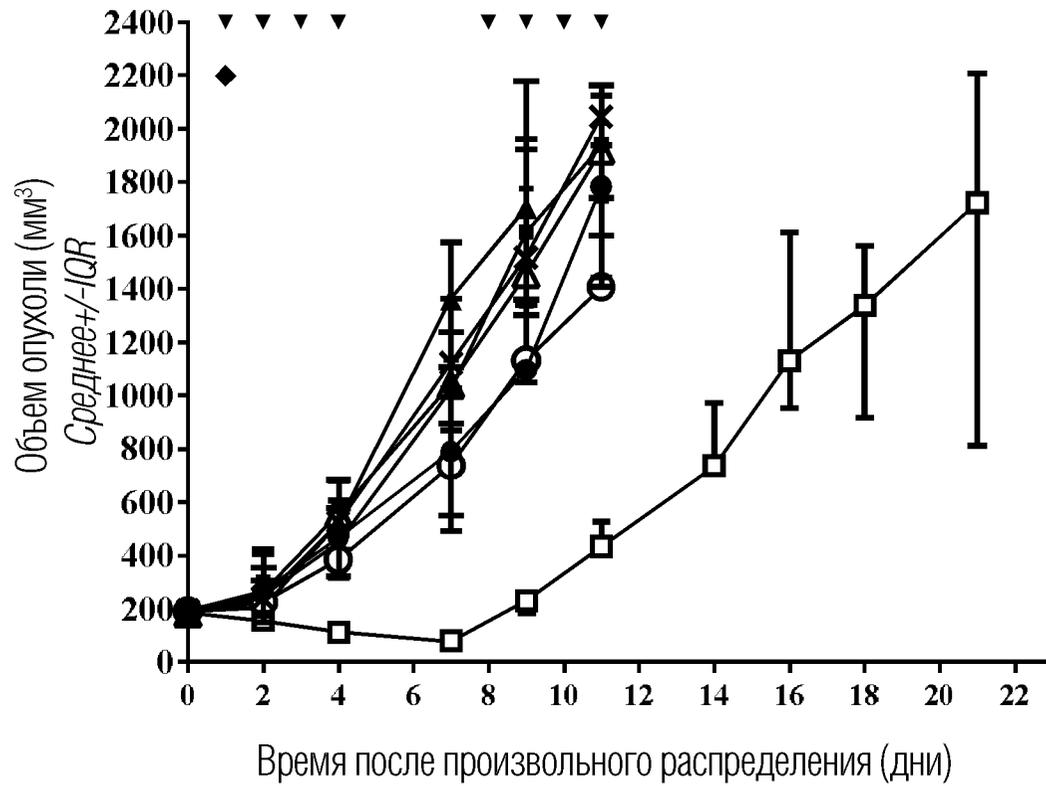
- CD74-L5-P1
- IgG1-L5-P1
- ▲ P1
- CD74-L5-P1 + Комбинация
- IgG1-L5-P1 + Комбинация
- ▲ P1 + Комбинация

ФИГ. 5



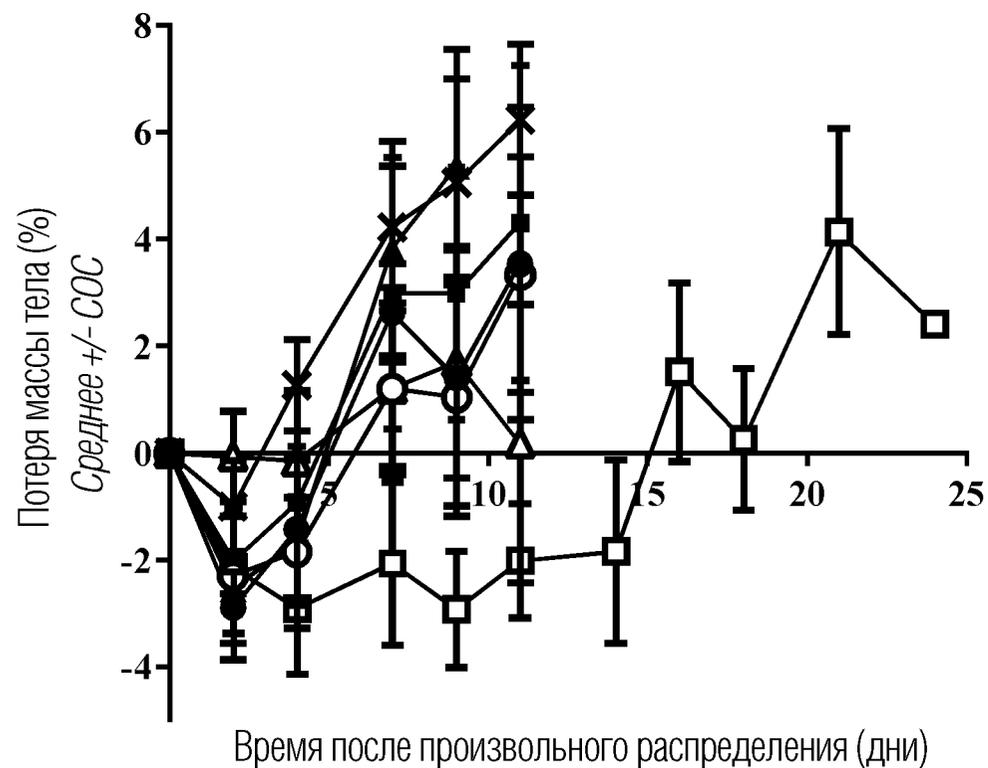
- CD74-L5-P1
- IgG1-L5-P1
- ▲ P1
- CD74-L5-P1 + Комбинация
- IgG1-L5-P1 + Комбинация
- ▲ P1 + Комбинация

ФИГ. 6



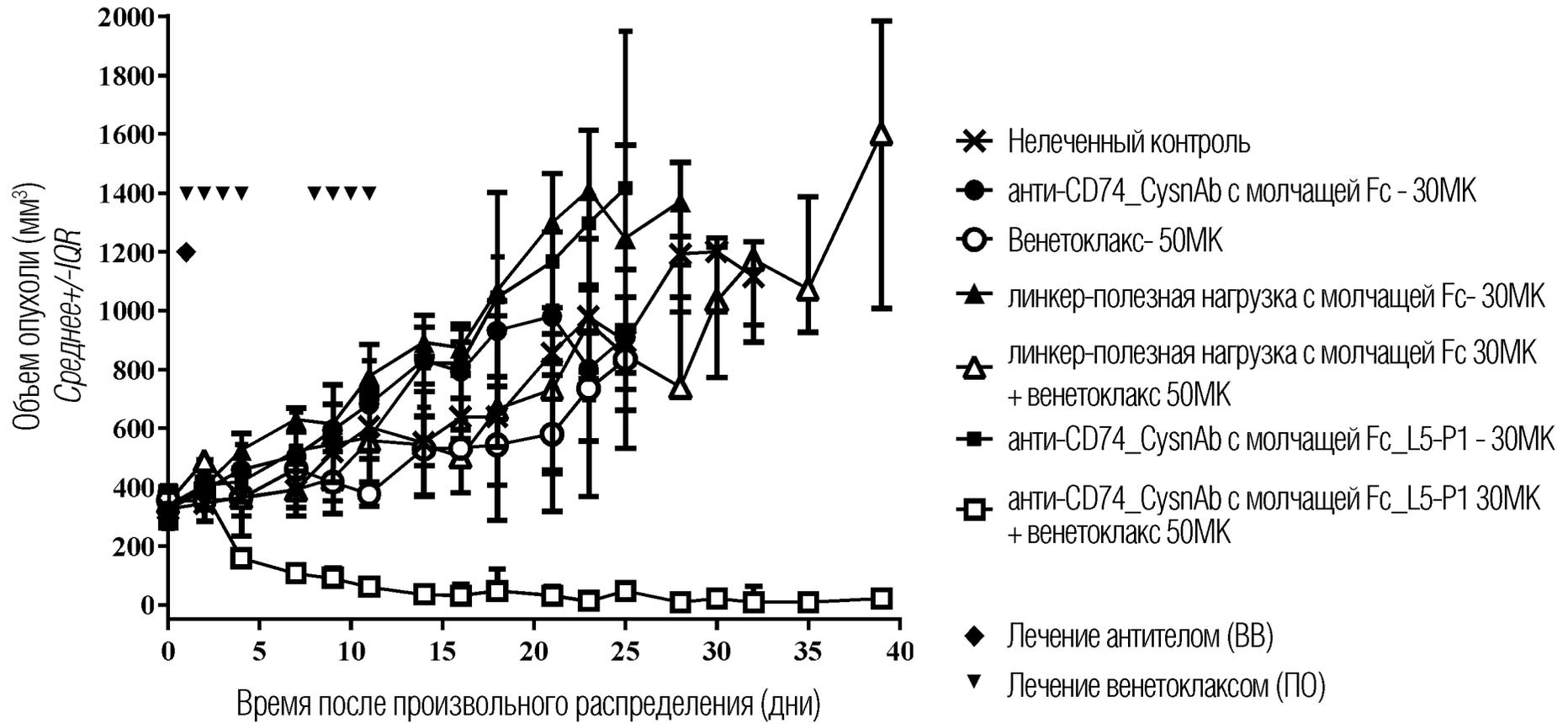
- * Нелеченный контроль
- анти-CD74_CysnAb с молчащей Fc - 30МК
- Венетоклакс- 50МК
- ▲ линкер-полезная нагрузка с молчащей Fc- 30МК
- △ линкер-полезная нагрузка с молчащей Fc 30МК + венетоклакс 50МК
- анти-CD74_CysnAb с молчащей Fc_L5-P1 - 30МК
- анти-CD74_CysnAb с молчащей Fc_L5-P1 30МК + венетоклакс 50МК
- ◆ Лечение антителом (BB)
- ▼ Лечение венетоклаксом (ПО)

ФИГ. 7

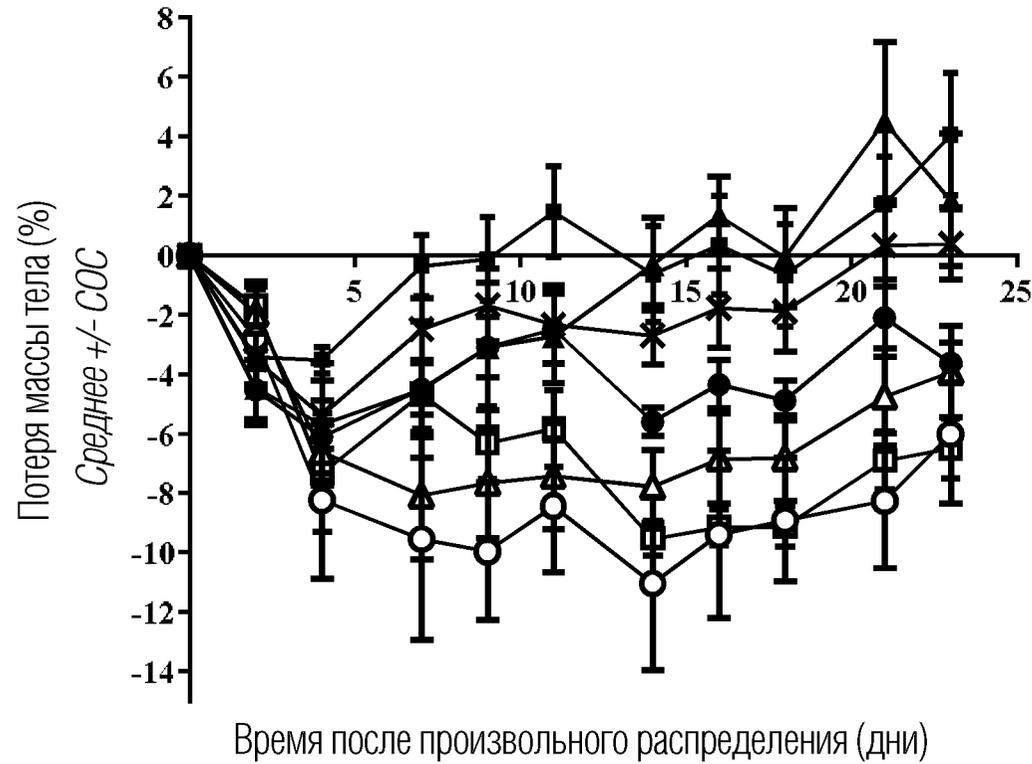


- ✕ Нелеченный контроль
- анти-CD74_CysnAb с молчащей Fc - 30МК
- ▲ линкер-полезная нагрузка с молчащей Fc- 30МК
- △ линкер-полезная нагрузка с молчащей Fc 30МК + венетоклакс 50МК
- Венетоклакс 50МК
- анти-CD74_CysnAb с молчащей Fc_L5-P1 - 30МК
- анти-CD74_CysnAb с молчащей Fc_L5-P1 30МК + венетоклакс 50МК

ФИГ. 8

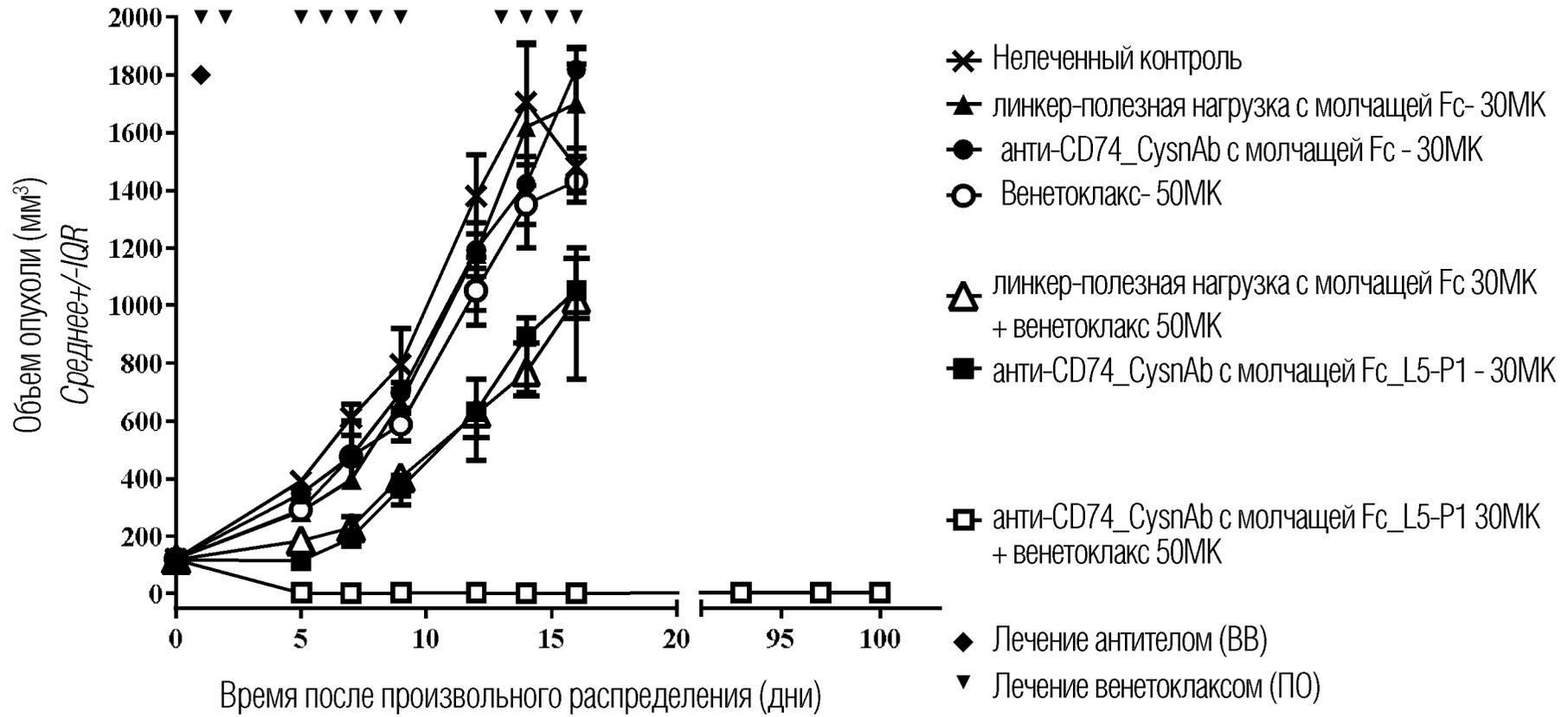


ФИГ. 9



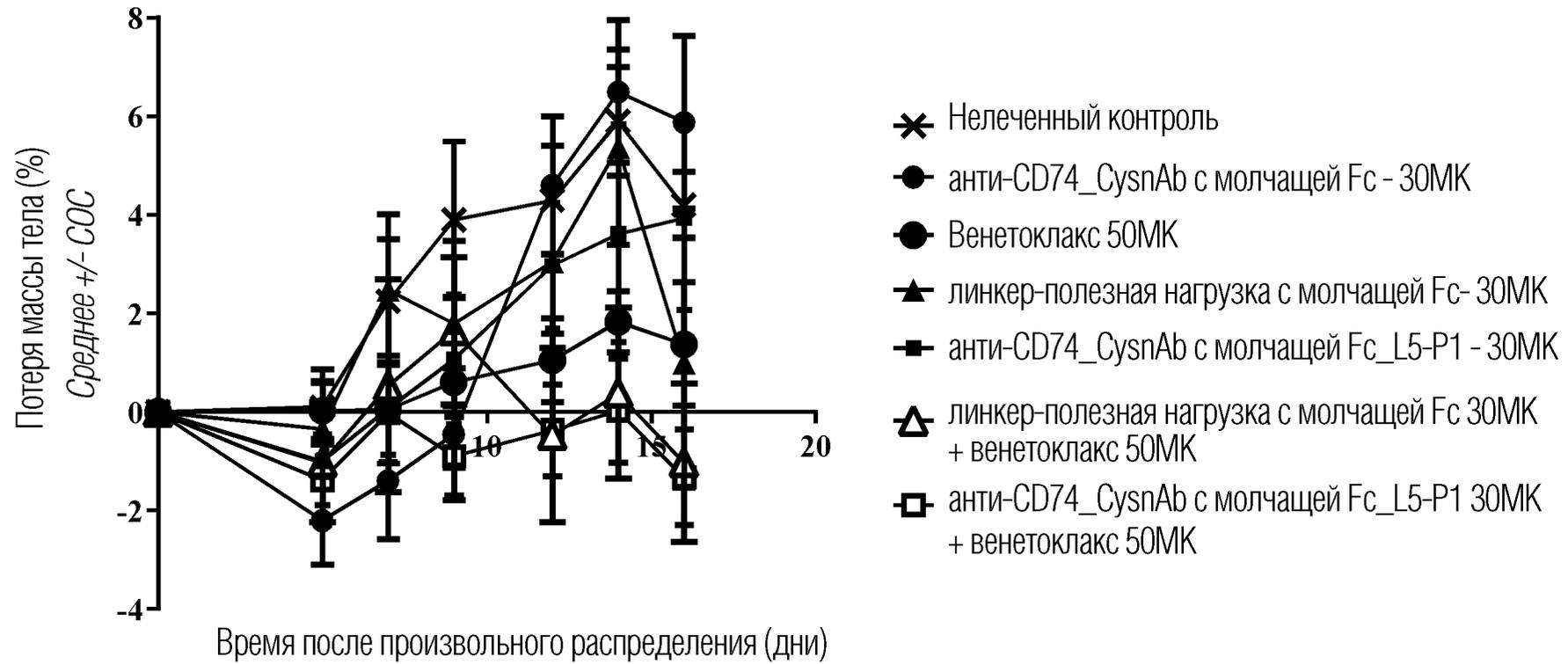
- * Нелеченный контроль
- анти-CD74_CysnAb с молчащей Fc - 30МК
- Венетоклакс 50МК
- ▲ линкер-полезная нагрузка с молчащей Fc- 30МК
- △ линкер-полезная нагрузка с молчащей Fc 30МК + венетоклакс 50МК
- анти-CD74_CysnAb с молчащей Fc_L5-P1 - 30МК
- анти-CD74_CysnAb с молчащей Fc_L5-P1 30МК + венетоклакс 50МК

ФИГ. 10

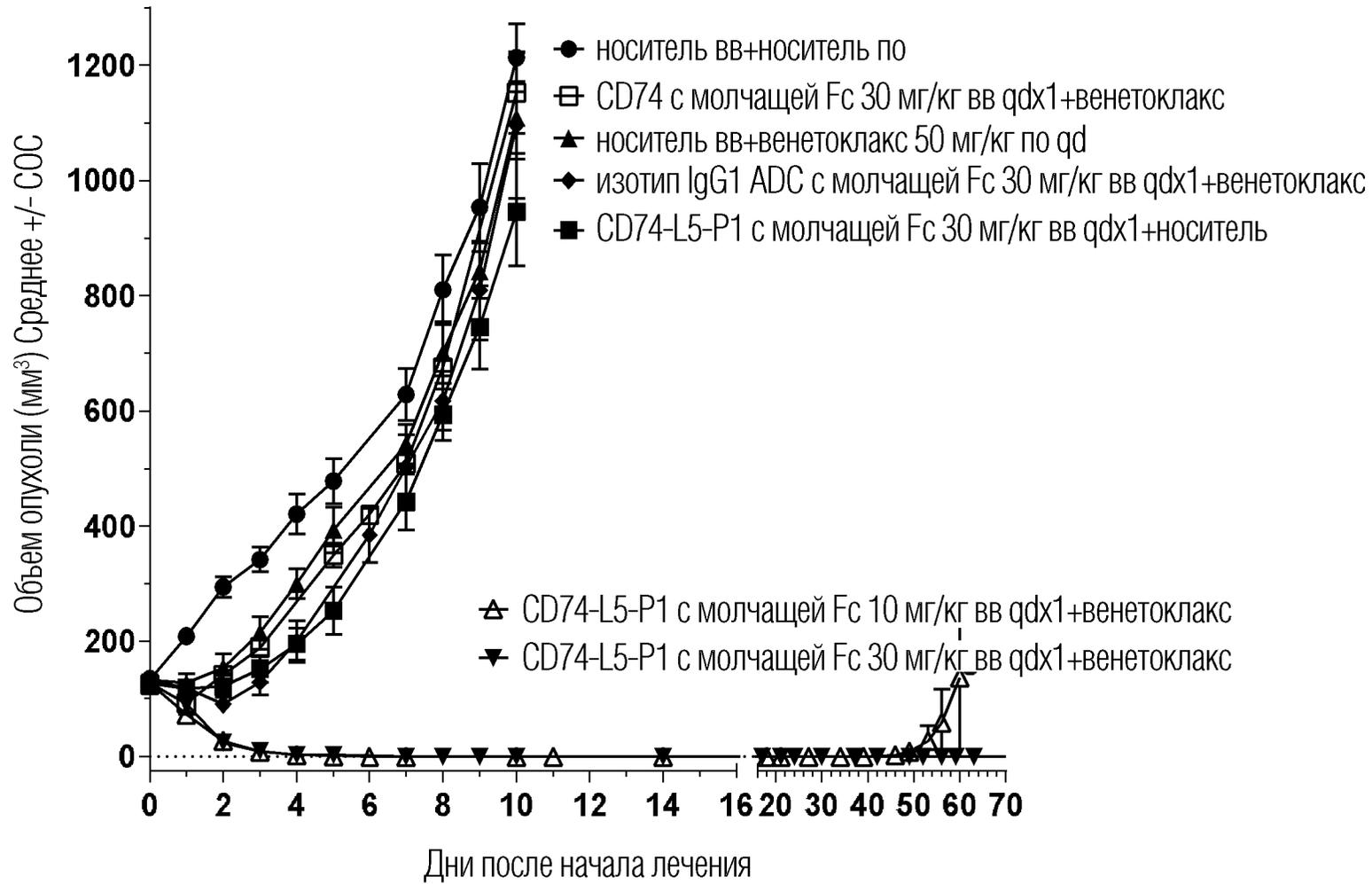


11/17

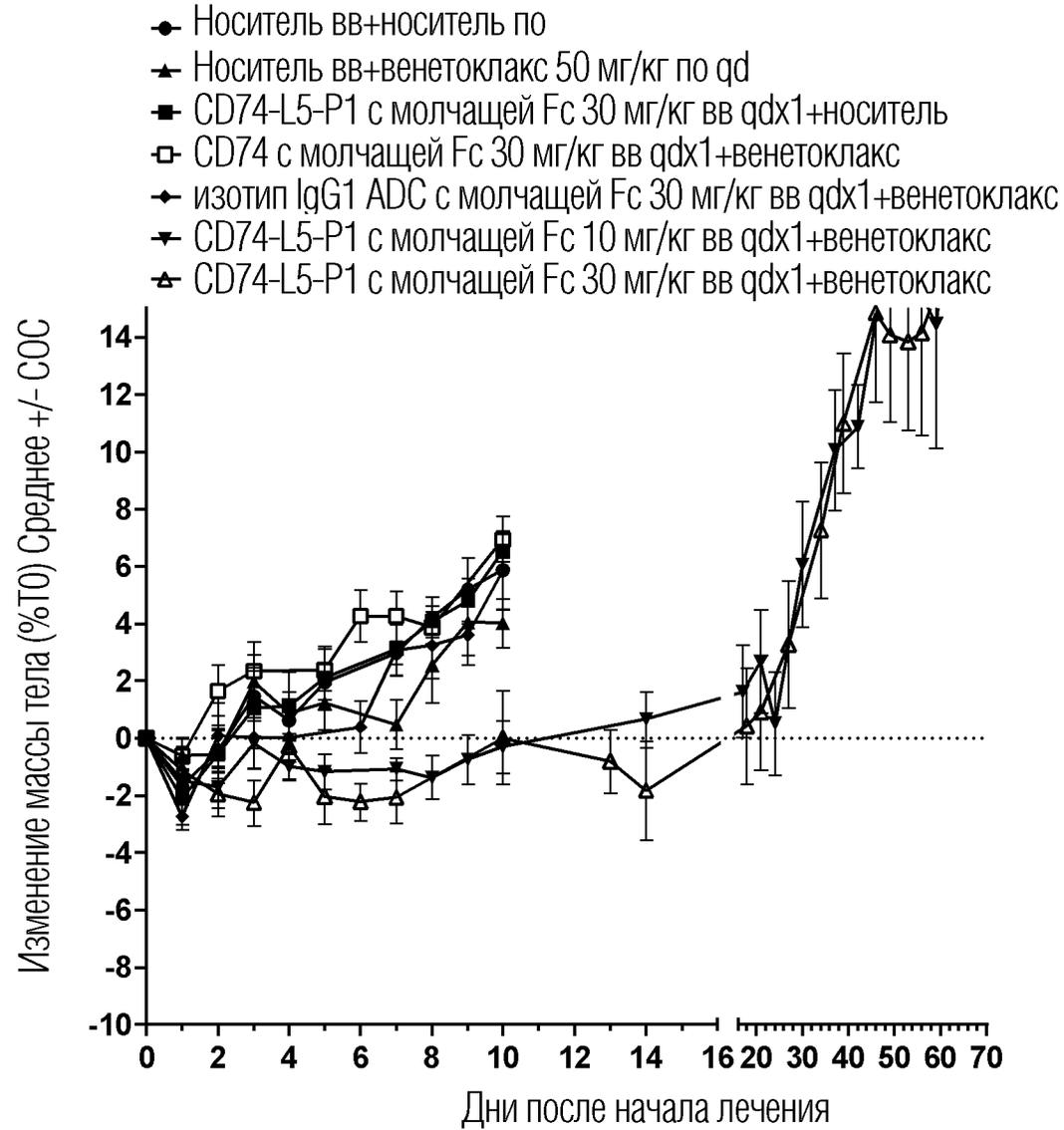
ФИГ. 11



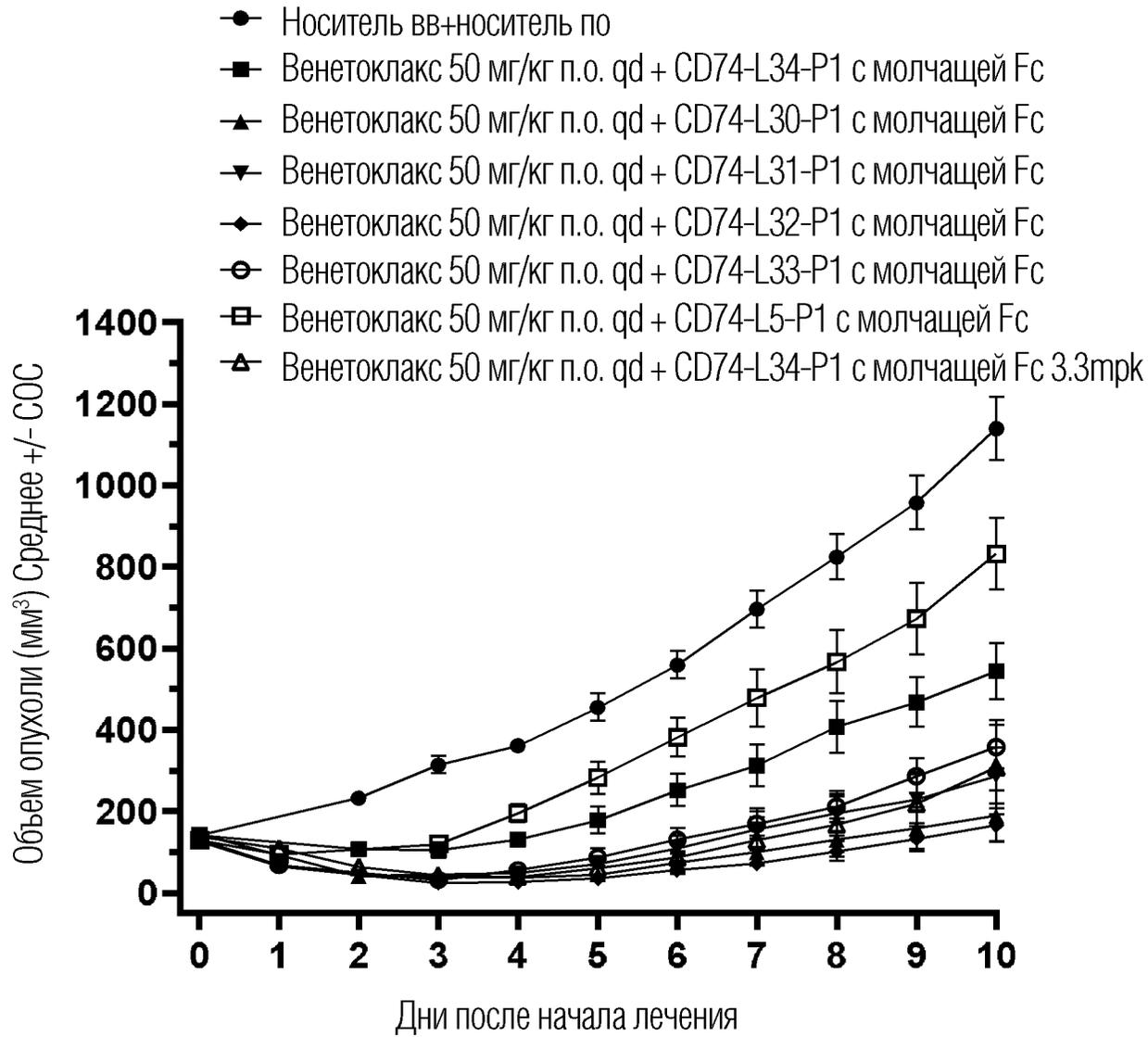
ФИГ. 12



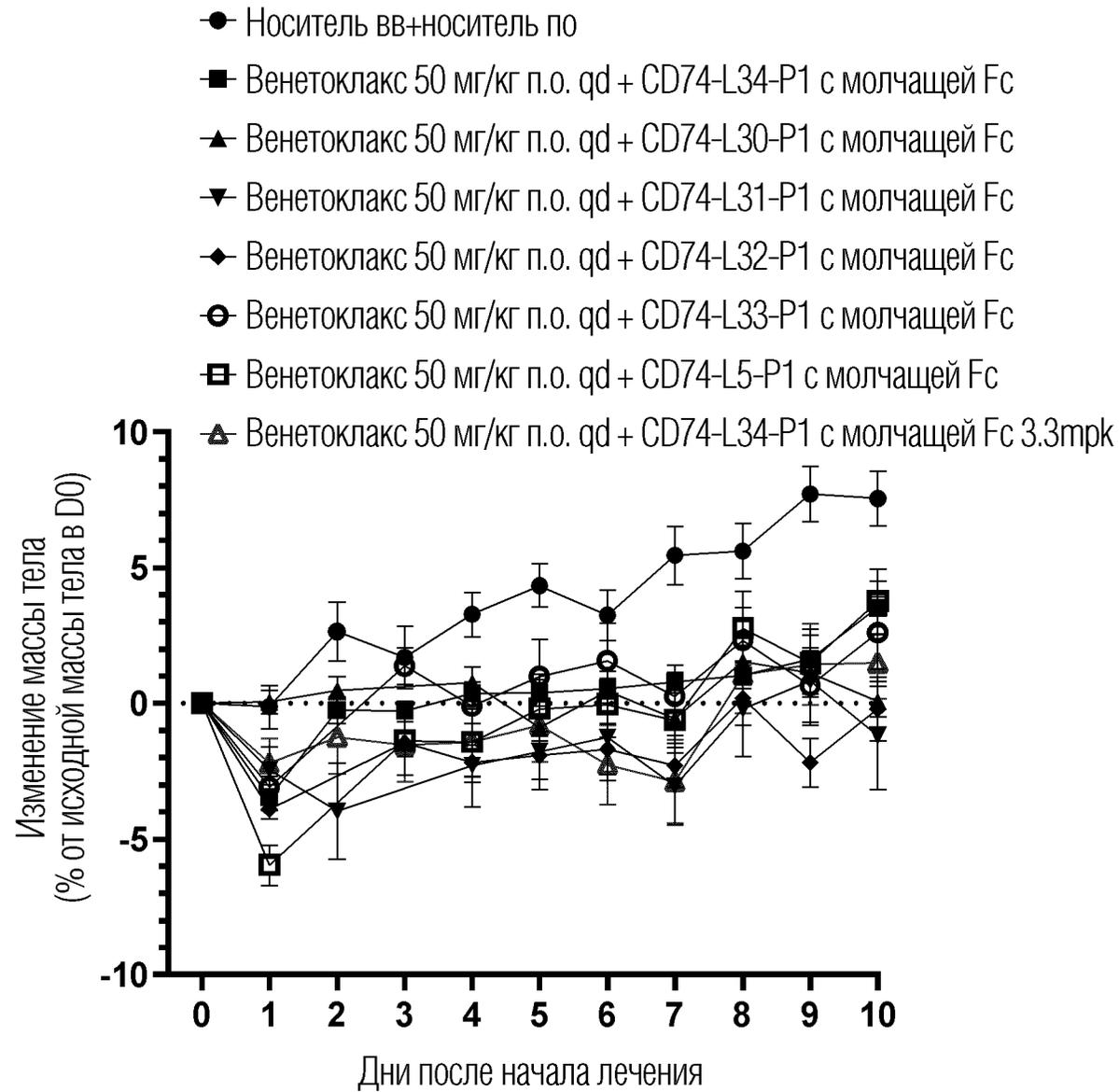
ФИГ. 13



ФИГ. 14



ФИГ. 15



ФИГ. 16

