(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293554 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.10

(22) Дата подачи заявки
2017.04.06

(51) Int. Cl. ***C07D 417/14*** (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(54) КОНЪЮГИРОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПОСРЕДСТВОМ БИС-СВЯЗЫВАНИЯ

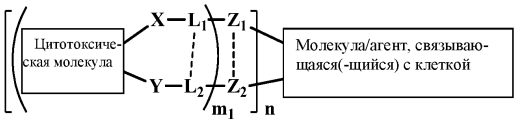
(62) **201992081; 2017.04.06**

(71) Заявитель:
ХАНЧЖОУ ДЭК БИОТЕК КО., ЛТД (CN)

(72) Изобретатель:
Чжао Роберт Юнсинь (US), Хуан Юаньюань, Ян Цинлян, Гай Шунь, Е Ханбо, Чжао Линьяо, Ян Ченюй, Сюй Ифан, Го Хуэйхуэй, Чао Минцзюнь, Тун Цяньцянь, Ли Вэньцзюнь, Цай Сян, Чжоу Сяомай, Се Хуншэн, Цзя Цзюньсян, Чжу Хайфэн, Го Чжисян, Гао Шуйхун, Ван Чуньянь, Линь Чэнь, Ян Яньлэй, Е Чжиуан, Пэн Цзе, Сюй Цзюнь, Цзо Сяотао, Су Цинюй (CN)

(74) Представитель:
Ловцов С.В., Вилесов А.С., Гавриков К.В., Коптева Т.В., Левчук Д.В., Стукалова В.В. (RU)

(57) Предлагается способ конъюгирования цитотоксических соединений с молекулами, связывающимися с клеткой, посредством бис-линкера (двойного линкера), как показано в формуле (I). Представлены способы бис-связывания при изготовлении конъюгата молекулы цитотоксического препарата и связывающегося с клеткой агента специфическим образом. Это также относится к применению конъюгатов для лечения онкологических заболеваний, или аутоиммунных заболеваний, или инфекционных заболеваний.



202293554 A1

202293554 A1

КОНЪЮГИРОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПОСРЕДСТВОМ БИС-СВЯЗЫВАНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к конъюгированию цитотоксических соединений с молекулами, связывающимися с клеткой, посредством бис-линкера (двойного линкера). Оно относится к способу конъюгирования посредством бис-связывания цитотоксических лекарственных средств/молекул, в частности, когда лекарственное средство содержит двойные амино, гидроксил, диамино, аминогидроксил, дигидроксил, карбоксил, гидразин, альдегид и тиол функциональные группы. Настоящее изобретение также относится к способам получения конъюгатов “агент, связывающийся с клеткой-лекарственное средство (цитотоксический агент)” с помощью бис-линкера особым образом.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) стали одной из многообещающих целевых терапий для рака, что подтверждается клиническим успехом брентуксимаба ведотина (Adcetris) для рецидивирующей/рефрактерной лимфомы Ходжкина (Okeley, N., et al, Hematol Oncol. Clin. North. Am, 2014, 28, 13-25; Gopal, A., et al, Blood 2015, 125, 1236-43) и адотрастузумаба эмтанзина для рецидивирующего HER2+ рака молочной железы (Peddi, P. and Hurvitz, S., Ther. Adv. Med. Oncol. 2014, 6(5), 202–9; Lambert, J. and Chari, R., J. Med. Chem. 2014, 57, 6949-64). Три важных компонента, моноклональное антитело, цитотоксическая полезная нагрузка и условный линкер ADC, а также места присоединения компонентов линкер-полезная нагрузка все они являются важными факторами для успеха ADC. Прошло три десятилетия с момента начала изучения каждого фактора компонентов ADC. Однако линкерные технологии остаются ограниченными по объему, поскольку конъюгированные лекарственные средства должны содержать определенные реакционноспособные функциональные группы, ликеры должны обеспечивать стабильность при циркулировании и облегчать высвобождение лекарственного средства при связывании антигена и внутриклеточном захвате и, что важно, не наносить вреда нормальным тканям после того, как компоненты линкер-полезная нагрузка связываются с нецелевыми мишенями во время циркуляции (Ponte, J. et al., Bioconj. Chem., 2016, 27(7), 1588-98; Dovgan, I., et al. Sci. Rep. 2016, 6, 30835; Ross, P. L. and Wolfe, J. L. J. Pharm. Sci. 105(2), 391-7; Chen, T. et al. J. Pharm. Biomed. Anal., 2016, 117, 304-10).

В ранних ADC линкеры, которые в частности использовались для ADC, нацеленных на жидкую опухоль, были слишком лабильными и приводили к высвобождению свободного лекарственного средства в кровоток и, как следствие, к нецелевой токсичности (Bander, N.H. et al., Clin. Adv. Hematol. Oncol., 2012, 10, 1-16). В настоящем поколении ADC линкеры более стабильны и цитотоксические агенты являются значительно более эффективными (Behrens, C. R. and Liu, B., mAbs, 2014. 6, 46-53). Тем не менее, до сих пор нецелевая токсичность по-прежнему является основной проблемой при разработке ADC лекарственных средств (Roberts, S.A. et al., Regul. Toxicol. Pharmacol. 2013, 67, 382-91). Например, в клинической практике адотрастузумаб эмтанзин (T-DM1, Kadcyla®), в котором используется стабильный (нерасщепляемый) линкер MCC, показал большую пользу у пациентов с HER2-положительным метастатическим раком молочной железы (mBC - метастатический рак молочной железы) или у пациентов, которые уже лечились от mBC или у которых развился рецидив опухоли HER2 в течение шести месяцев после адъювантной терапии (Peddi, P. and Hurvitz, S., Ther. Adv. Med. Oncol. 2014, 6(5), 202 –209; Piwko C, et al, Clin Drug Investig. 2015, 35(8), 487-93; Lambert, J. and Chari, R., J. Med. Chem. 2014, 57, 6949−64). Но T-DM1 потерпел неудачу в клинических испытаниях в качестве лечения первой линии для пациентов с HER2-положительным неоперабельным местно-распространенным или метастатическим раком молочной железы и как лечение второй линии HER2-положительного распространенного рака желудка из-за небольшой пользы для пациентов при сравнении побочная токсичность-эффективность (Ellis, PA, et al., J. Clin. Oncol. 2015, 33, (suppl; abstr 507 of 2015 ASCO Annual Meeting); Shen, K. et al, Sci Rep. 2016; 6: 23262; de Goeij, B. E. and Lambert, J. M. Curr Opin Immunol 2016, 40, 14-23; Barrios, C. H. et al, J Clin Oncol 2016, 34, (suppl; abstr 593 of 2016 ASCO Annual Meeting).

Для решения проблем нецелевой токсичности исследования и разработки в области химии и дизайна ADC в настоящее время расширяют области компоновки линкер-полезная нагрузка и химии конъюгирования за пределы только высокоактивных полезных нагрузок, и особенно для решения проблемы активности линкер-полезная нагрузка ADC относительно мишеней/целевых заболеваний (Lambert, JM Ther Deliv 2016, 7, 279-82; Zhao, RY et al, 2011, J. Med. Chem. 54, 3606-23). В настоящее время многие разработчики лекарств и академические институты уделяют большое внимание созданию новых надежных специфических линкеров конъюгирования и сайтспецифических методов конъюгирования ADC, которые, по-видимому, имеют более длительный период полужизни в кровотоке, более высокую эффективность, потенциально сниженную

нецелевую токсичность и узкий диапазон *in vivo* фармакокинетических (PK) свойств ADC, а также лучшую однородность характеристик от серии к серии при производстве ADC (Hamblett, KJ et al., Clin. Cancer Res. 2004, 10, 7063−70; Adem, Y. T. et al, Bioconjugate Chem. 2014, 25, 656−664; Boylan, N. J. *Bioconjugate Chem.* 2013, *24*, 1008–1016; Strop, P., et al 2013 Chem. Biol. 20, 161−67; Wakankar, A. mAbs, 2011, 3, 161–172). Данные специфические способы конъюгирования, о которых сообщалось до сих пор, включают введение рекомбинантных цистеинов (Junutula, J.R. et al. Nat. Biotechnol. 2008, 26, 925–32; Junutula, J. R., et al 2010 Clin. Cancer Res. 16, 4769; US Patents 8,309,300; 7,855,275; 7,521,541; 7,723,485, WO2008/141044), селеноцистеинов (Hofer, T., et al. Biochemistry 2009, 48, 12047–57; Li, X., et al. Methods 2014, 65, 133–8; патент США 8916159 Национального института рака США), цистеинов содержащих тэг с перфторароматическими реагентами (Zhang, C. et al. Nat. Chem. 2015, 8, 1–9), тиолфукозы (Okeley, N.M., et al., 2013, Bioconjugate Chem. 24, 1650), неприродных аминокислот (Axup, J. Y., et al, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2012, 109, 16101-6; Zimmerman, E.S., et al., 2014, Bioconjug. Chem. 25, 351–361; Wu, P. и др., 2009 Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 3000-5; Rabuka, D., et al, Nat. Protoc. 2012, 7, 1052−67; патент США 8778631 и патентные заявки 20100184135, WO2010/081110 Sutro Biopharma; WO 2006/069246, 2007/059312, патенты США 7,332,571, 7,696,312 и 7,638,299 для Ambrx; WO 2007/130453, патенты США 7632492 и 7829659 Allozyne), конъюгирование с восстановленными межмолекулярными дисульфидами путем повторного мостикового соединения дибромалемидов (Jones, M. W. et al. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 1847–52) бисульфоновые реагенты (Badescu, G. et al. Bioconjug. Chem. 2014, 25, 1124–36; WO2013/190272, WO2014/064424 PolyTherics Ltd), дибромпиридазиндионы (Maruani, A. et al. Nat. Commun. 2015, 6, 6645), галактозил- и сиалилтрансферазы (Zhou, Q. et al. Bioconjug. Chem. 2014, 25, 510–520; патентная заявка США 20140294867 Sanofi-Genzyme), генерирующий формилглицин фермент (FGE) (Drake, P. M. et al. Bioconj. Chem. 2014, 25, 1331–41; Carrico, I. S. et al патенты США 7985783; 8097701; 8349910 и патентные заявки США 20140141025, 20100210543 Redwood Bioscience), фосфопантетинилтрансферазы (PPTases) (Grünewald, J. et al. Bioconjug. Chem. 2015, 26, 2554–62), сортаза A (Beerli, R. R., et al. PLoS One 2015, 10, e0131177), генетически введенный глютаминовый тэг с Streptoverticillium mobaraense трансглутаминазой (mTG) (Strop, P., Bioconj. Chem., 2014, 25, 855–62; Strop, P., et al., Chem. Biol. 2013, 20, 161–7; патент США 8871908 Rinat-Pfizer) или с микробной трансглутаминазой (MTGase) (Dennler, P., et al, 2014, Bioconjug. Chem. 25, 569–78; Siegmund, V. et al. Angew. Chemie - Int. Ed. 2015, 54, 13420–4; патентная заявка США

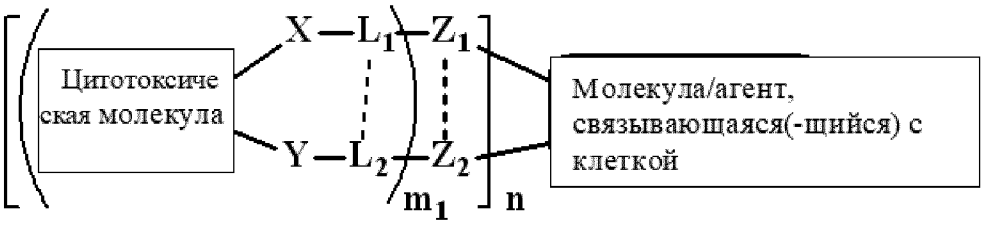
20130189287 Innate Pharma; патент США 7893019 Bio-Ker S.r.l. (IT)), образуемые ферментом/бактерией изопептидные-пептидные связи, которые образуются вне главной цепи белка (Kang, H. J., et al. Science 2007, 318, 1625–8; Zakeri, B. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109, E690–7; Zakeri, B. & Howarth, M. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 4526–7).

Мы раскрыли несколько способов конъюгирования повторно соединяемых пар тиолов восстановленных межцепочечных дисульфидных связей нативного антитела, такие как использование броммалеимидных и дибромалеимидных линкеров (WO2014/009774), 2,3-дизамещенных янтарных/2-монозамещенных/2,3-дизамещенных фумаровых или малеиновых линкеров (WO2015/155753, WO20160596228), ацетилендикарбоновых линкеров (WO2015/151080, WO20160596228) или гидразиновых линкеров (WO2015/151081). ADC, полученные с использованием данных линкеров и способов, продемонстрировали лучшие окна терапевтического индекса, чем традиционно неселективное конъюгирование через остатки цистеина или лизина на антителе. В данном документе мы раскрываем изобретение бис-линкеров и способов конъюгирования цитотоксической молекулы, в частности, когда цитотоксический агент содержит двойные группы: диамино, аминогидроксил, дигидроксил, карбоксил, альдегид и тиолы. Иммуноконъюгаты, полученные с помощью бис-связывания, имеют более длительный период полувыведения во время целевой доставки и сводят к минимуму воздействие на нецелевые клетки, ткани или органы во время кровообращения, что приводит к снижению нецелевой токсичности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предлагает бис-связывание антитела с цитотоксическим агентом, в частности, когда цитотоксический агент содержит две функциональные группы из амино, гидроксил, диамино, аминогидроксил, дигидроксил, карбоксил, гидразин или тиол. Оно также предлагает бис-линкер для конъюгирования молекулы, связывающейся с клеткой, с цитотоксической молекулой определенным образом.

В одном аспекте настоящего изобретения, бис-связь представлена Формулой (I):



(I)

где

«——» представляет собой одинарную связь;

«-----» представляет собой необязательно либо одинарную связь, либо двойную связь или может необязательно отсутствовать;

n и m_1 независимо равны от 1 до 20;

Агент/молекула, связывающийся с клеткой, в каркасе, который связывается с Z_1 и Z_2, может быть любого вида, известного в настоящее время или который станет известным, молекулы, которая связывается, образует комплексы или контактирует с некоторой частью клеточной популяции, которую требуется терапевтически или иным образом биологически модифицировать. Предпочтительно агент/молекула, связывающийся с клеткой, представляет собой иммунотерапевтический белок, антитело, фрагмент антитела или пептиды, содержащие более четырех аминокислот;

цитотоксическая молекула/агент в каркасе представляет собой терапевтическое лекарственное средство, или иммунотерапевтический белок/молекулу, или функциональную молекулу для усиления связывания или стабилизации агента, связывающегося с клеткой, или связывающегося с поверхностным рецептором клетки лиганда, или для ингибирования пролиферация клеток;

X и Y представляют собой одинаковую или различную, и независимо функциональную группу, которая связывает цитотоксическое лекарственное средство через дисульфид, простой тиоэфир, сложный тиоэфир, пептид, гидразон, простой эфир, сложный эфир, карбамат, карбонат, амин (вторичный, третичный или четвертичный), имин, циклогетероалкиан, гетероароматическую, алкоксимовую или амидную связь; предпочтительно X и Y независимо выбраны из NH; NHNH; $N(R_1)$; $N(R_1)N(R_2)$; O; S; S-S, O-NH. O-$N(R_1)$, CH_2-NH. CH_2-$N(R_1)$, CH=NH. CH=$N(R_1)$, S(O), $S(O_2)$, P(O)(OH), S(O)NH, $S(O_2)$NH, P(O)(OH)NH, NHS(O)NH, $NHS(O_2)NH$, NHP(O)(OH)NH, $N(R_1)S(O)N(R_2)$, $N(R_1)S(O_2)N(R_2)$, $N(R_1)P(O)(OH)N(R_2)$, OS(O)NH, $OS(O_2)NH$, OP(O)(OH)NH, C(O), C(NH), $C(NR_1)$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, OC(O)NH, OC(NH)NH; $OC(NR_1)NH$, NHC(O)NH; NHC(NH)NH; $NHC(NR_1)NH$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, $OC(O)N(R_1)$, $OC(NH)N(R_1)$, $OC(NR_1)N(R_1)$, $NHC(O)N(R_1)$, $NHC(NH)N(R_1)$, $NHC(NR_1)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(NH)N(R_1)$, $N(R_1)C(NR_1)N(R_1)$; или C_1-C_6 алкила; C_2-C_8 алкенила, гетероалкила, алкилциклоалкила или гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила или гетероарила;

Z_1 и Z_2 являются одинаковыми или разными, и независимо представляют собой функциональную группу, которая связывается с молекулой, связывающейся с клеткой, с образованием дисульфида, простого эфира, сложного эфира, простого тиоэфира, сложного

тиоэфира, пептида, гидразона, карбамата, карбоната, амина (вторичного, третичного или четвертичного), имина, циклогетероалкиана, гетероароматической, алкилоксимовой или амидной связи; предпочтительно Z_1 и Z_2 независимо имеют следующие структуры: C(O)CH, C(O)C, $C(O)CH_2$, $ArCH_2$, C(O), NH; NHNH; $N(R_1)$; $N(R_1)N(R_2)$; O; S; S-S, O-NH. O-$N(R_1)$, CH_2-NH. CH_2-$N(R_1)$, CH=NH. CH=$N(R_1)$, S(O), $S(O_2)$, P(O)(OH), S(O)NH, $S(O_2)$NH, P(O)(OH)NH, NHS(O)NH, $NHS(O_2)NH$, NHP(O)(OH)NH, $N(R_1)S(O)N(R_2)$, $N(R_1)S(O_2)N(R_2)$, $N(R_1)P(O)(OH)N(R_2)$, OS(O)NH, $OS(O_2)NH$, OP(O)(OH)NH, C(O), C(NH), $C(NR_1)$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, OC(O)NH, OC(NH)NH; $OC(NR_1)NH$, NHC(O)NH; NHC(NH)NH; $NHC(NR_1)NH$, C(O)NH, $C(NR_1)NH$, $OC(O)N(R_1)$, $OC(NH)N(R_1)$, $OC(NR_1)N(R_1)$, $NHC(O)N(R_1)$, $NHC(NH)N(R_1)$, $NHC(NR_1)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(NH)N(R_1)$, $N(R_1)C(NR_1)N(R_1)$; или C_1-C_8 алкила; C_2-C_8 гетероалкила, алкилциклоалкила, гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила, гетероарила;

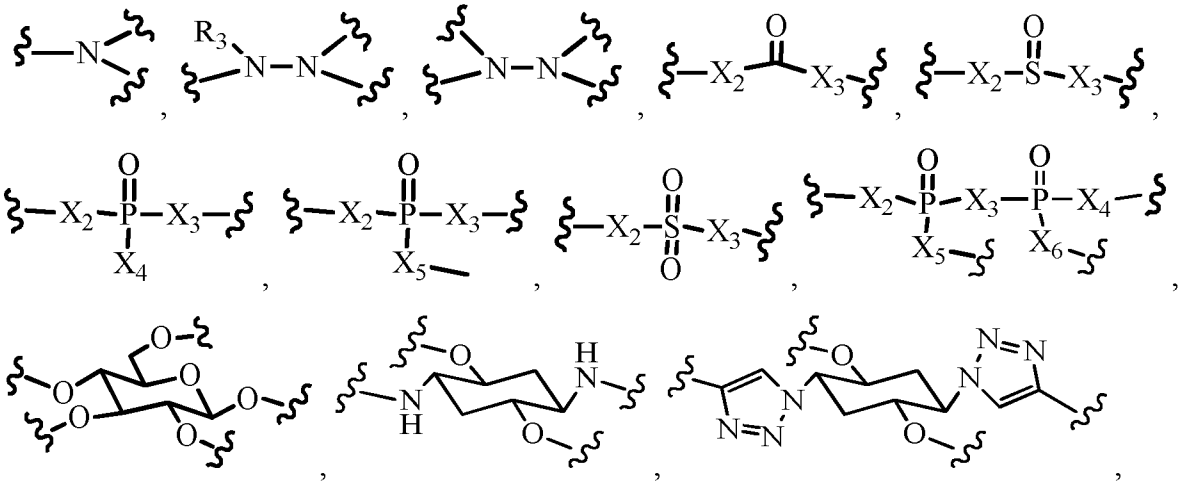
Предпочтительно Z_1 и Z_2 связаны с парами тиолов агента/молекулы, связывающегося с клеткой. Тиолы являются предпочтительными парами атомов серы восстановленных из дисульфидных связей внутренней цепи агента, связывающегося с клеткой посредством восстанавливающего агента выбранного из дитиотреитола (DTT), дитиоэритритола (DTE), L-глютатиона (GSH), трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP), 2-меркаптоэтиламина (β-MEA) или/и бета меркаптоэтанола (β-ME, 2-ME).

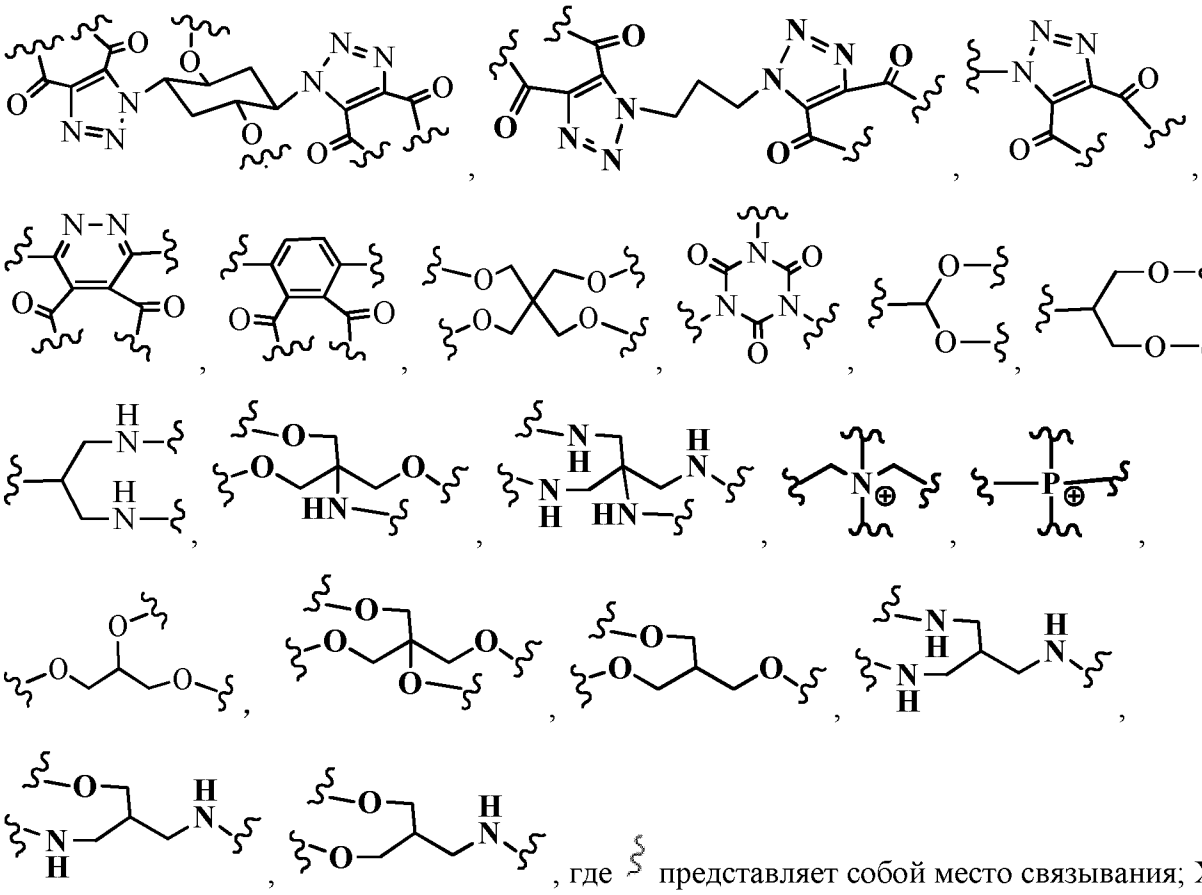
L_1 и L_2 представляют собой цепочку атомов, выбранных из C, N, O, S, Si и P, предпочтительно содержащую 0~500 атомов, которая ковалентно соединяется с X и Z_1, и с Y и Z_2. Атомы, используемые при образовании L_1 и L_2, могут быть объединены всеми химически важными способами, такими как образование алкилена, алкенилена и алкинилена, простых эфиров, полиоксиалкиленов, сложных эфиров, аминов, иминов, полиаминов, гидразинов, гидразонов, амидов, мочевин, семикарбазидов, карбазидов, алкоксиаминов, алкоксиламинов, уретанов, аминокислотот, пептидов, ацилоксиламинов, гидроксамовых кислот или их комбинацией. Предпочтительно L_1 и L_2, одинаковые или разные, независимо выбраны из O, NH, S, NHNH, $N(R_3)$, $N(R_3)N(R_{3'})$, полиэтиленокси-единицы формулы $(OCH_2CH_2)_pOR_3$, или $(OCH_2CH\text{-}(CH_3))_pOR_3$, или $NH(CH_2CH_2O)_pR_3$, или $NH(CH_2CH(CH_3)O)_pR_3$, или $N[(CH_2CH_2O)_pR_3]\text{-}[(CH_2CH_2O)_{p'}R_{3'}]$, или $(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$, или $CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$, где p и p‘ независимо представляют собой целое число, выбранное от 0 до около 1000, или их комбинацию; C_1-C_8 алкила; C_2-C_8 гетероалкила или алкилциклоалкила, гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила или гетероарила;

где R_1, R_2, R_3, R_4, и $R_{3'}$ независимо представляют собой H; C_1-C_8 алкил; C_2-C_8 гетероалкил, алкилциклоалкил или гетероциклоалкил; C_3-C_8 арил, Ar-алкил, гетероциклил, карбоциклил, гетероалкилциклоалкил, алкилкарбонил или гетероарил; или сложных эфиров, простых эфиров или амидов, включающих C_1-C_8 атомов углерода; или 1~8 аминокислот; или полиэтиленокси, имеющих формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 0 до около 5000, или их комбинации;

L_1 или L_2 могут необязательно состоять из одного или более линкерных компонентов 6-малеимидокапроила («MC»), малеимидопропаноила («MP»), валина-цитруллина («val-cit» или «vc»), аланина-фенилаланина («ala-phe» или «af»), п-аминобензилоксикарбонила («PAB»), 4-тиопентаноата («SPP»), 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата («MCC»), (4-ацетил)аминобензоата («SIAB»), 4-тиобутирата (SPDB), 4-тио-2-гидроксисульфонил-бутирата (2-сульфо-SPDB) или природных или неприродных пептидов, содержащих 1~8 природных или неприродных аминокислот. Природная аминокислота предпочтительно выбрана из аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аргинина, гистидина, лизина, серина, треонина, аспарагина, глютамина, цистеина, селеноцистеина, тирозина, фенилаланина, глицина, пролина, триптофана и аланина;

Кроме того, L_1 и L_2 могут независимо содержать одну из следующих гидрофильных структур:



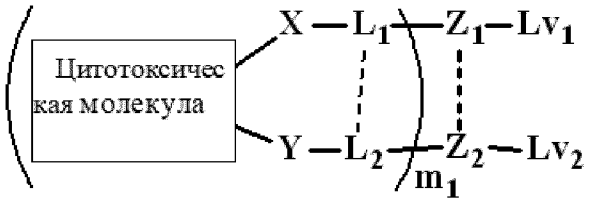


, где ~ представляет собой место связывания; X_2, X_3, X_4, X_5, и X_6 независимо выбраны из NH; NHNH; $N(R_3)$; $N(R_3)N(R_{3'})$; O; S; C_1-C_6 алкила; C_2-C_6 гетероалкила, алкилциклоалкила или гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила, гетероарила; или 1~8 аминокислот; где R_3 и $R_{3'}$ независимо представляют собой H; C_1-C_8 алкил; C_2-C_8 гетероалкил, алкилциклоалкил или гетероциклоалкил; C_3-C_8 арил, Ar-алкил, гетероциклил, карбоциклил, гетероалкилциклоалкил, алкилкарбонил или гетероарил; или сложных эфиров, простых эфиров или амидов, включающих C_1-C_8 атомов углерода; или полиэтиленокси, имеющих формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 0 до около 5000, или их комбинации;

X_1 и Y_1, независимо представляют собой O, NH, CH_2, $N(CH_3)$, NHNH, S, C(O)O, C(O)NH; m_1=1-20;

Кроме того, L_1, L_2, X, Y, Z_1, и Z_2 могут независимо отсутствовать, но L_1 и Z_1, или L_2 и Z_2 не могут отсутствовать одновременно.

В другом аспекте данное изобретение предлагает легкореакционноспособный бис-линкер Формулы (II), приведенной ниже, в котором два или более остатка молекулы, связывающейся с клеткой, могут одновременно или последовательно приводится в контакт с ним с образованием Формулы (I).



(II)

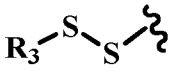
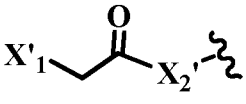
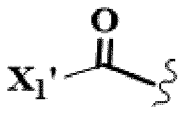
где:

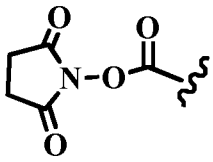
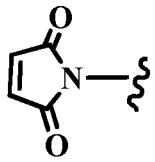
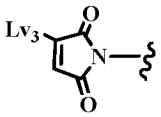
«——» представляет собой одинарную связь;«-----» представляет собой необязательно либо одинарную связь, либо двойную связь, либо тройную связь или может необязательно отсутствовать;

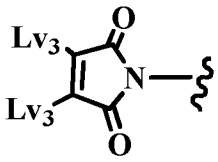
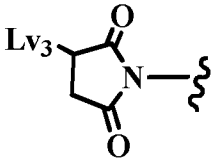
При условии, что когда ----- представляет собой тройную связь, оба Lv_1 и Lv_2 отсутствуют;

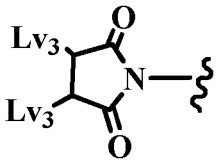
Цитотоксическая молекула в каркасе, m_1, X, Y, L_1, L_2, Z_1, и Z_2 определены так же, как в Формуле (I);

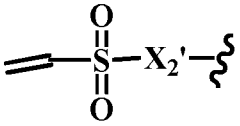
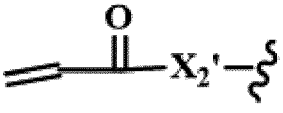
Lv_1 и Lv_2 представляют собой одинаковую или различную уходящую группу, которую могут приводить в контакт с тиольной, амино, карбоксильной, селенольной, фенольной или гидроксильной группой в молекуле, связывающейся с клеткой. Такие уходящие группы представляют собой, но не ограничиваются ими, галогенид (например, фторид, хлорид, бромид и йодид), метансульфонил (мезил), толуолсульфонил (тозил), трифторметилсульфонил (трифлат), трифторметилсульфонат, нитрофеноксил, N-сукцинимидилгидроксил (NHS) феноксил; динитрофеноксил; пентафторфеноксил, тетрафторфеноксил, трифторфеноксил, дифторфеноксил, монофторфеноксил, пентахлорфеноксил, 1H-имидазол-1-ил, хлорфеноксил, дихлорфеноксил, трихлорфеноксил, тетрахлорфеноксил, N-(бензотриазол-ил)оксил, 2-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфонил, фенилоксадиазолсульфонил (-сульфон-ODA), 2-этил-5-фенилизоксазолий-ил, фенилоксадиазолил (ODA), оксадиазолил, ненасыщенный атом углерода (двойная или тройная связь между атомами углерод-углерод, углерод-азот, углерод-сера, углерод-фосфор, сера-азот, фосфор-азот, кислород-азот или углерод-кислород) или интермедиат, полученный с помощью реагента конденсации реакций Мицунобу, или одна из следующих структур:

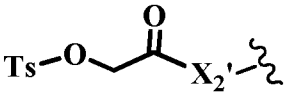
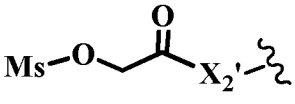
 дисульфид;  галогенацетил;  ацилгалогенид (галогенангидрид);

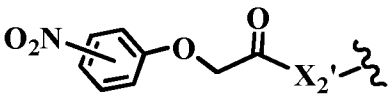
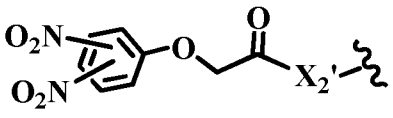
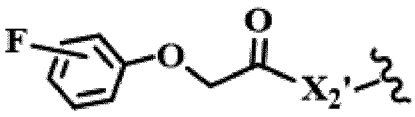
 сложный эфир *N*-гидроксисукцинимида;  малеимид; 

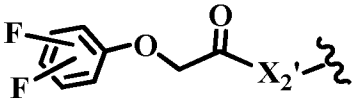
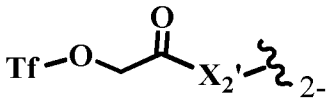
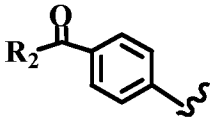
монозамещенный малеимид;  дизамещенный малеимид; 

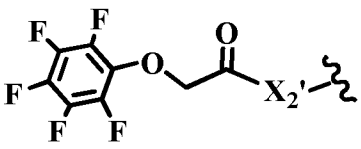
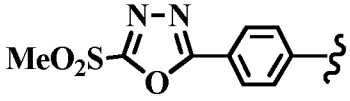
монозамещенный сукцинимид;  дизамещенный сукцинимид; -CHO альдегид;

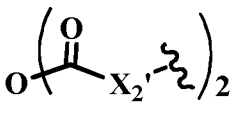
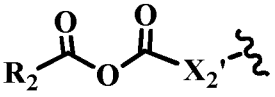
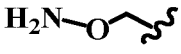
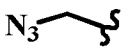
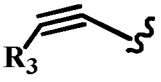
 этенсульфонил;  акрил (акрилоил);

 2-(тозилокси)ацетил;  2-(мезилокси)ацетил;

 2-(нитрофенокси)ацетил;  2-(динитрофенокси)ацетил;  2-(фторфенокси)ацетил;

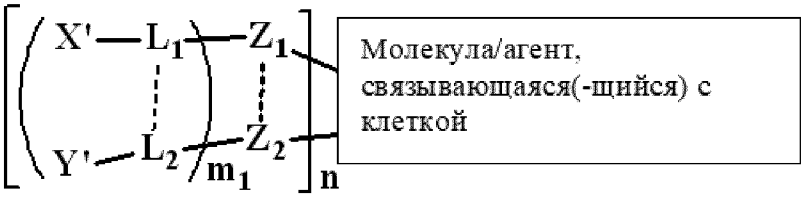
 2-(дифторфенокси)ацетил;  2-(((трифторметил)сульфонил)окси)ацетил;  кетон или альдегид,

 2-(пентафторфенокси)ацетил;  ,

метилсульфонфенилоксадиазол (ODA);  ,  ангидрид кислоты,  алкилоксиамино;  азидо,  алкинил или  гидразид. Где X_1' представляет собой F, Cl, Br, I или Lv_3; X_2' представляет собой O, NH, N(R_1), или CH_2; R_3 независимо представляет собой H, ароматическую, гетероароматическую или ароматическую группу, где один или более атомов H независимо заменены на -R_1, -галоген, -OR_1, -SR_1, -NR_1R_2, - NO_2, -S(O)R_1,-$S(O)_2R_1$, или -$COOR_1$; Lv_3 представляет собой уходящую группу, выбранную из F, Cl, Br, I, нитрофенола; N-гидроксисукцинимида (NHS); фенола; динитрофенола; пентафторфенола; тетрафторфенола; дифторфенола; монофторфенола; пентахлорфенола; трифлата; имидазола; дихлорфенола; тетрахлорфенола; 1-гидроксибензотриазола; тозилата; мезилата; 2-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфоната, простых и смешанных ангидридов, например, уксусного ангидрида, формил ангидрида; или интермедиата, полученного с помощью реагента конденсации для реакций пептидного сочетания или для реакций Мицунобу;

R_1 и R_2 независимо выбраны из H, C_1-C_8 алкила, C_2-C_8 алкенила, гетероалкила, алкилциклоалкила или гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила или гетероарила или C_2-C_8 сложных эфиров, простого эфира или амида; или пептидов, содержащих 1-8 аминокислот; или полиэтиленоксигруппы, имеющей формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 0 до около 1000, или комбинации из вышеуказанных групп.

В другом аспекте данное изобретение относится к реакционноспособному бис-линкеру следующей Формулы (III), в котором две или более функциональных групп цитотоксической молекулы могут приводиться в контакт с ним одновременно или последовательно с образованием Формулы (I).



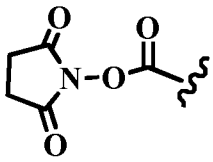
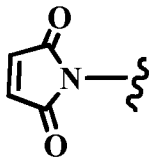
(III)

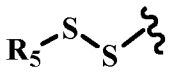
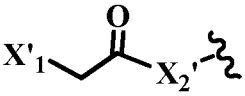
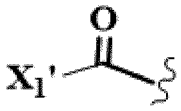
где:

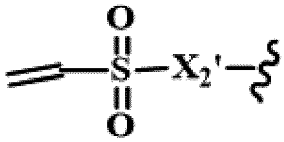
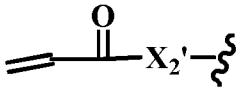
m_1, n, агент/молекула, связывающийся с клеткой, L_1, L_2, Z_1, и Z_2 являются такими, как определено в Формуле (I);

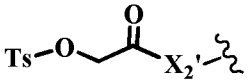
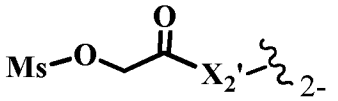
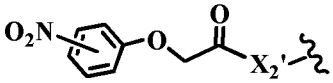
X' и Y' представляют собой функциональную группу, которая может независимо или последовательно приводится в контакт с группами остатков цитотоксического лекарственного средства с образованием X и Y соответственно, причем X и Y являются такими, как определено в Формуле (I);

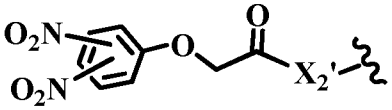
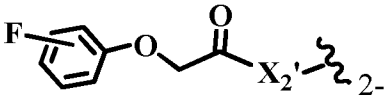
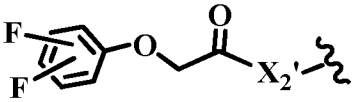
X' и Y' предпочтительно представляют собой *N*-гидроксисукцинимидные эфиры, п-нитрофенильные эфиры, динитрофенильные эфиры, пентафторфенильные эфиры, пиридилдисульфиды, нитропиридилдисульфиды, малеимиды, гидразин, галогенацетаты, ацетилендикарбоновые кислоты, хлориды карбоновых кислот. Предпочтительно X и Y имеют одну из следующих структур:

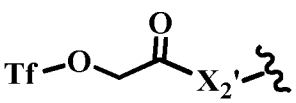
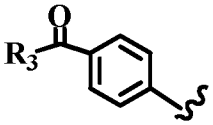
 сложный эфир N-гидроксисукцинимида;  малеимид;

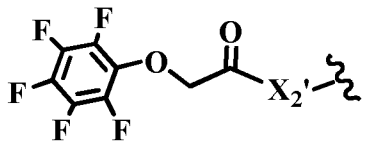
 дисульфид;  галогенацетил; 

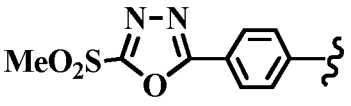
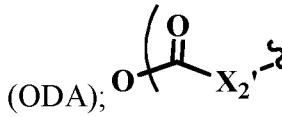
 ацилгалогенид (галогенангидрид); этенсульфонил; 

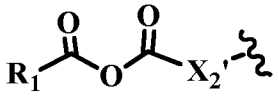
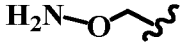
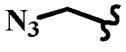
акрил (акрилоил);  2-(тозилокси)ацетил;  2-(мезилокси)ацетил;  2-(нитрофенокси)ацетил;

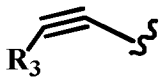
 2-(динитрофенокси)ацетил;  2-(фторфенокси)ацетил;  2-(дифторфенокси)ацетил;

 2-(((трифторметил)сульфонил)окси)ацетил;  кетон

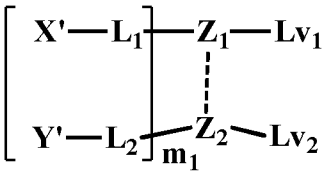
или альдегид,  2-(пентафторфенокси)ацетил;

 , метилсульфонфенилоксадиазол (ODA);  ,

 , ангидрид кислоты,  алкилоксиамино;  азидо,

 алкинил или г  гидразид, где X_1' представляет собой F, Cl, Br, I или Lv_3; X_2' представляет собой O, NH, N(R_1), или CH_2; R_3 и R_5 представляют собой H, R_1 ароматическую, гетероароматическую или ароматическую группу, где один или более атомов H независимо заменены на -R_1, -галоген, -OR_1, -SR_1, -NR_1R_2, - NO_2, -S(O)R_1, -$S(O)_2R_1$, или -$COOR_1$; Lv_3 представляет собой уходящую группу, выбранную из метансульфонила (мезила), толуолсульфонила (тозила), трифторметилсульфонила (трифлата), трифторметилсульфоната, нитрофеноксила; N-гидроксисукцинимидила (NHS); феноксила; динитрофеноксила; пентафторфеноксила, тетрафторфеноксила, трифторфеноксила, дифторфеноксила, монофторфеноксила, пентахлорфеноксила, 1H-имидазол-1-ила; хлорфеноксила, дихлорфеноксила, тетрахлорфеноксила, N-(бензотриазолил)оксила, 2-этил-5-фенилизоксазолий-ила, фенилоксадиазолила (ODA), оксадиазолила или интермедиата, полученного с помощью реагента конденсации для реакций Мицунобу, где R_1 и R_2 являются такими, как определено выше.

В другом аспекте данное изобретение предлагает реакционноспособный бис-линкер Формулы (IV), приведенной ниже, в которой цитотоксическая молекула и молекула, связывающаяся с клеткой, могут независимо, одновременно или последовательно контактировать с ним с образованием Формулы (I).

 (IV).

где m_1, L_1, L_2, Z_1 и Z_2 являются такими, как определено в Формуле (I); Lv_1 и Lv_2 являются такими, как определено в Формуле (II), и X ', и Y' являются такими, как определено в Формуле (III);

n представляет собой 1 ~ 20; и T являются таким, как описано ранее в Формуле (I).

Настоящее изобретение также относится к способу получения конъюгата молекула, связывающаяся с клеткой-лекарственное средство, Формулы (I).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлен общий синтез бис-связанных конъюгатов согласно данной патентной заявки посредством двойного связывания фенилдиаминовой, фенилдиольной или аминофенольной группы лекарственного средства на одном конце и пары тиолов молекулы, связывающейся с клеткой на другом конце, причем волнистая линия представляет собой остальную часть лекарственного средства или связанный компонент лекарственного средства, который отсутствует (не показано).

На Фиг. 2 представлен синтез аналогов тирозина (Tyr) и тубутирозина (Tut), которые содержат амино или нитрогруппу в бензольном кольце для двойного связывания с молекулой, связывающейся с клеткой.

На Фиг. 3 представлен синтез компонентов аналогов тубулизина.

На Фиг. 4 представлен синтез компонентов аналогов тубулизина.

На Фиг. 5 представлен синтез аналога тубулизина, содержащего бис-линкер, и его конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 6 представлен синтез аналогов тубулизина, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 7 представлен синтез аналогов тубулизина, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 8 представлен синтез аналогов тубулизина, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 9 представлен синтез аналогов тубулизина, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 10 представлен синтез аналогов тубулизина, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 11 представлен синтез аналогов тубулизина, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 12 представлен синтез компонентов бис-линкеров и бис-связывание с аналогом тубутирозина (Tup), компонента тубулизина.

На Фиг. 13 представлен синтез аналогов тубулизина, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов в антителе.

На Фиг. 14 представлен синтез аналога тубулизина, содержащего бис-линкер, и его конъюгирование с антителом посредством пары тиолов в антителе.

На Фиг. 15 представлен синтез аналога тубулизина, содержащего бис-линкер, и его конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 16 представлен синтез аналога тубулизина, содержащего бис-линкер, и его конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 17 представлено конъюгирование аналога тубулизина, содержащего бис-линкер, с антителом посредством пары тиолов антитела, и синтез аналога тубупенилалина (Tup), содержащего бис-линкер с двойным амидным связыванием.

На Фиг. 18 представлен синтез аналога тубулизина, содержащего бис-линкер, и его конъюгирование с антителом посредством пары тиолов в антителе.

На Фиг. 19 представлено конъюгирование аналога тубулизина, содержащего бис-линкер, с антителом посредством пары тиолов антитела, и синтез аналога тубупенилалина (Tup), содержащего бис-линкер с двойным амидным связыванием.

На Фиг. 20 представлен синтез аналога тубулизина, содержащего бис-линкер, и его конъюгирование с антителом посредством пары тиолов в антителе.

На Фиг. 21 представлен синтез аналога тубулизина, содержащего бис-линкер, и его конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 22 представлен синтез компонентов аналога диметилауристатина.

На Фиг. 23 представлен синтез аналогов диметилауристатина F, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 24 представлен синтез аналогов диметилауристатина F, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 25 представлен синтез аналогов диметилауристатина F, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 26 представлен синтез аналогов диметилауристатина F, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 27 представлен синтез аналогов диметилауристатина F, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 28 представлен синтез аналогов диметилауристатина F, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 29 представлен синтез аналога аматоксина, содержащего диаминогруппу в его ароматическом кольце.

На Фиг. 30 представлен синтез аналога аматоксина, содержащего бис-линкер, и его конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 31 представлен синтез бис-линкера и его связывание с аналогом аматоксина.

На Фиг. 32 представлен синтез аналогов аматоксина, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 33 представлен синтез аналогов аматоксина, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 34 представлен синтез аналогов аматоксина, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 35 представлен синтез аналогов аматоксина и аналогов диметилауристатина F, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 36 представлен синтез аналогов тубулизина и аналогов димера CBI, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 37 представлен синтез аналогов димера CBI, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 38 представлен синтез аналогов димера CBI, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 39 представлен синтез аналогов димера CBI, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 40 представлен синтез аналогов димера CBI, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 41 представлен синтез аналогов димера PBD, содержащих бис-линкер.

На Фиг. 42 представлен синтез аналогов димера PBD, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 43 представлен синтез аналогов димера PBD, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 44 представлен синтез аналогов димера PBD, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 45 представлен синтез аналогов димера PBD, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 46 представлен синтез аналогов димера PBD, содержащих бис-линкер, и их конъюгирование с антителом посредством пары тиолов антитела.

На Фиг. 47 представлено сравнение противоопухолевого эффекта конъюгатов **A-3a, B-6a, B-12a, B-15a, B-18a, B-20a, B-21a, B-24a, B-28a, C-3a, D-2a** вместе с T-DM1 и PBS (контроль) с использованием клеточной модели рака желудка N87, в.в., одна инъекция,

доза 3 мг/кг для конъюгатов **A-3a, B-6a, B-12a, B-15a, B-18a, B-20a, B-21a, B-24a, B-28a,** T-DM1 и доза 1 мг/кг для конъюгатов **C-3a** и **D-1a**. Все 12 конъюгатов, протестированных в данном документе, продемонстрировали противоопухолевую активность. Животные в группах конъюгатов **B-24a, C-3a, B-20a, B-21a** и **D-20a** продемонстрировали лучшую противоопухолевую активность, чем T-DM1. Однако животные в группах конъюгатов **B-18a, B-15a, A-3a, B-6a, B-28a** и **B-12a** продемонстрировали худшую противоопухолевую активность, чем T-DM1. T-DM1 в дозе 3 мг/кг ингибировал рост опухоли в течение 28 дней, но не мог устранить опухоли в любое время во время испытания. Напротив, конъюгаты **B-20a, B-21a** и **D-20a** полностью уничтожали опухоли некоторых животных с 15 дня до 43 дня.

На Фиг. 48 представлены фотографии животных, подвергнутых испытанию in vivo, с их очищенными опухолями из групп PBS, конъюгатов A-3a, B-15a, B-21a и T-DM1 после умерщвления животных. У пяти из восьми животных из группы конъюгатов B-21a не было обнаружено опухоли (обозначено как 无). Пять из восьми животных из группы конъюгата B-15a погибли (обозначены как 死亡) на 43 день из-за слишком большой опухоли.

На Фиг. 49 представлено исследование стабильности конъюгата B-21a в сыворотке мыши по сравнению с обычным, моносвязанным конъюгатом T-1a и T-DM1. Это указывает на то, что конъюгат, содержащий бис-связь, является более стабильным, чем регулярные конъюгаты, содержащие моносвязь в сыворотке мыши.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термин «алкил» относится к алифатической углеводородной группе или одновалентным группам, полученным из алкана путем удаления одного или двух атомов водорода от атомов углерода. Он может быть прямым или разветвленным, имеющим C_1-C_8 (от 1 до 8 атомов углерода) в цепи. Термин «разветвленный» означает, что одна или более низших алкильных групп, таких как метил, этил или пропил, присоединены к линейной алкильной цепи. Типичные алкильные группы включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, н-пентил, 3-пентил, октил, нонил, децил, циклопентил, циклогексил, 2,2-диметилбутил, 2,3-диметилбутил, 2,2-диметилпентил, 2,3-диметилпентил, 3,3-диметилпентил, 2,3,4-триметилпентил, 3-метилгексил, 2,2-диметилгексил, 2,4-диметилгексил, 2,5-диметилгексил, 3,5-диметилгексил, 2,4-диметилпентил, 2-метилгептил, 3-метилгептил, н-гептил, изогептил, н-октил и изооктил.

C_1-C_8 алкильная группа может быть незамещенной или замещенной одной или более группами, включая, но не ограничиваясь ими, -C_1-C_8 алкил,-O-(C_1-C_8 алкил), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -галоген, -N_3, -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ и -CN ; причем каждый R' независимо выбран из -C_1-C_8 алкила и арила.

Термин «галоген» относится к атому фтора, хлора, брома или йода; предпочтительно атому фтора и хлора.

Термин «гетероалкил» относится к C_2-C_8 алкилу, в котором от одного до четырех атомов углерода независимо замещены гетероатомом из группы, состоящей из O, S и N.

Термин «карбоцикл» относится к насыщенному или ненасыщенному кольцу, содержащему от 3 до 8 атомов углерода в качестве моноцикла или от 7 до 13 атомов углерода в качестве бицикла. Моноциклические карбоциклы содержат от 3 до 6 кольцевых атомов, более типично 5 или 6 кольцевых атомов. Бициклические карбоциклы содержат от 7 до 12 кольцевых атомов, расположенных в виде бициклической [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] системы, или 9 или 10 кольцевых атомов, расположенных в виде бициклической [5,6] или [6,6] системы. Типичные C_3-C_8 карбоциклы включают, но не ограничиваются ими, -циклопропил, -циклобутил, -циклопентил, -циклопентадиенил, -циклогексил, -циклогексенил, -1,3-циклогексадиенил, -1,4-циклогексадиенил, -циклогептил, -1,3-циклогептадиенил, -1,3,5-циклогептатриенил, -циклооктил и -циклооктадиенил.

Термин «C_3-C_8 карбоцикл» относится к 3-, 4-, 5-, 6-, 7- или 8-членному насыщенному или ненасыщенному неароматическому карбоциклическому кольцу. C_3-C_8 -карбоциклическая группа может быть незамещенной или замещенной одной или более группами, включая, но не ограничиваясь ими, -C_1-C_8 алкил,-O-(C_1-C_8 алкил), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -S(O)R',-S(O)$_2$R', -OH, -галоген, -N_3, -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ и -CN ; где каждый R' независимо выбран из -C_1-C_8 алкила и арила.

Термин «алкенил» относится к алифатической углеводородной группе, содержащей двойную углерод-углеродную связь, которая может быть прямой или разветвленной, содержащей от 2 до 8 атомов углерода в цепи. Типичные алкенильные группы включают этенил, пропенил, *н*-бутенил, изобутенил, 3-метилбут-2-енил, *н*-пентенил, гексенил, гептенил, октенил.

Термин «алкинил» относится к алифатической углеводородной группе, содержащей тройную углерод-углеродную связь, которая может быть прямой или разветвленной,

содержащей от 2 до 8 атомов углерода в цепи. Типичные алкинильные группы включают этинил, пропинил, *н*-бутинил, 2-бутинил, 3-метилбутинил, 5-пентинил, *н*-пентинил, гексилинил, гептинил и октинил.

Термин «алкилен» относится к насыщенному, разветвленному или линейному или циклическому углеводородному радикалу с 1-18 атомами углерода и содержит два одновалентных радикальных центра, полученных путем удаления двух атомов водорода от одного и того же или двух разных атомов углерода исходного алкана. Типичные алкиленовые радикалы включают, но не ограничиваются ими: метилен (-CH_2-), 1,2-этил (-CH_2CH_2-), 1,3-пропил (-$CH_2CH_2CH_2$-), 1,4-бутил (-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-), и тому подобное.

Термин «алкенилен» относится к ненасыщенному, разветвленному или линейному или циклическому углеводородному радикалу с 2-18 атомами углерода и содержит два одновалентных радикальных центра, полученных путем удаления двух атомов водорода от одного и того же или двух разных атомов углерода исходного алкена. Типичные алкениленовые радикалы включают, но не ограничиваются ими: 1,2-этилен (-CH=CH-).

Термин «алкинилен» относится к ненасыщенному, разветвленному или линейному или циклическому углеводородному радикалу с 2-18 атомами углерода и содержит два одновалентных радикальных центра, полученных путем удаления двух атомов водорода от одного и того же или двух разных атомов углерода исходного алкина. Типичные алкиниленовые радикалы включают, но не ограничиваются ими: ацетилен, пропаргил и 4-пентинил.

Термин «арил» или «Ar» относится к ароматической или гетероароматической группе, состоящей из одного или более колец, включающих от трех до четырнадцати атомов углерода, предпочтительно от шести до десяти атомов углерода. Термин «гетероароматическая группа» относится к одному или более атомам углерода в ароматической группе, предпочтительно один, два, три или четыре атома углерода заменены на O, N, Si, Se, P или S, предпочтительно на O, S и N. Термин арил или Ar также относится к ароматической группе, в которой один или более атомов H независимо замещены на -R', -галоген, -OR', или -SR', -NR'R'', -N=NR', -N=R', -NR'R'',-NO_2, -S(O)R', -$S(O)_2$R', -$S(O)_2$OR', -$OS(O)_2$OR', -PR'R'', -P(O)R'R'', -P(OR')(OR''), -P(O)(OR')(OR'') или -OP(O)(OR')(OR''), причем R', R'' независимо представляют собой H, алкил, алкенил, алкинил, гетероалкил, арил, арилалкил, карбонил или фармацевтические соли.

Термин «гетероцикл» относится к кольцевой системе, в которой от одного до четырех атомов углерода в кольце независимо заменены гетероатомом из группы O, N, S, Se, B, Si и P. Предпочтительными гетероатомами являются O, N и S. Гетероциклы также описаны в

The Handbook of Chemistry and Physics, 78th Edition, CRC Press, Inc., 1997-1998, p. 225-226, описание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Предпочтительный неароматический гетероциклил включает эпоксид, азиридинил, тиираниl, пирролидинил, пиразолидинил, имидазолидинил, оксиранил, тетрагидрофуранил, диоксоланил, тетрагидропиранил, диоксанил, диоксаланил, пиперидил, пиперазинил, морфолинил, пиранил, имидазолинил, пирролинил, пиразолинил, тиазолидинил, тетрагидротиопиранил, дитианил, тиоморфолинил, дигидропиранил, тетрагидропиранил, дигидропиранил, тетрагидропиридил, дигидропиридил, тетрагидропиримидинил, дигидротиопиранил, азепанил, а также конденсированные системы, образующиеся в результате конденсации с фенильной группой.

Термин «гетероарил» или ароматические гетероциклы относится к 3-14, предпочтительно 5-10-членным ароматическим гетеро, моно-, би- или мультициклическим кольцам. Примеры включают пирролил, пиридил, пиразолил, тиенил, пиримидинил, пиразинил, тетразолил, индолил, хинолинил, пуринил, имидазолил, тиенил, тиазолил, бензотиазолил, фуранил, бензофуранил, 1,2,4-тиадиазолил, изотиазолил, триазолил, тетразолил, изохинолил, бензотиенил, изобензофурил, пиразолил, карбазолил, бензимидазолил, изоксазолил, пиридил-*N*-оксид, а также конденсированные системы, образующиеся в результате конденсации с фенильной группой.

«Алкил», «циклоалкил», «алкенил», «алкинил», «арил», «гетероарил», «гетероциклил» и тому подобное относятся также к соответствующим «алкилену», «циклоалкилену», «алкенилену», «алкинилену», «арилену», «гетероарилену», «гетероциклену» и тому подобное, которые образуются при удалении двух атомов водорода.

Термин «арилалкил» относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, связанных с атомом углерода, обычно концевым или sp^3-атомом углерода, заменен арильным радикалом. Типичные арилалкильные группы включают бензил, 2-фенилэтан-1-ил, 2-фенилэтан-1-ил, нафтилметил, 2-нафтилэтан-1-ил, 2-нафтилэтан-1-ил, нафтобензил, 2-нафтофенилэтан-1-ил и тому подобное.

Термин «гетероарилалкил» относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, связанных с атомом углерода, обычно концевым или sp^3-атомом углерода, заменен гетероарильным радикалом. Примерами гетероарилалкильных групп являются 2-бензимидазолилметил, 2-фурилэтил.

Примеры «гидроксилзащитной группы» включают метоксиметиловый эфир, 2-

метоксиэтоксиметиловый эфир, тетрагидропираниловый эфир, бензиловый эфир, п-метоксибензиловый эфир, триметилсилиловый эфир, триэтилсилиловый эфир, триизопропилсилиловый эфир, *трет*-бутилдиметилсилиловый эфир, трифенилметилсилиловый эфир, ацетатные эфиры, пивалоат, бензоат, метансульфонат и *п*-толуолсульфонат.

Термин «уходящая группа» относится к функциональной группе, которая может быть замещена другой функциональной группой. Такие уходящие группы хорошо известны в данной области техники, и примеры включают галогенид (например, хлорид, бромид и йодид), метансульфонил (мезил), *п*-толуолсульфонил (тозил), трифторметилсульфонил (трифлат) и трифторметилсульфонат. Предпочтительная уходящая группа выбрана из нитрофенола; N-гидроксисукцинимида (NHS); фенола; динитрофенола; пентафторфенола; тетрафторфенола; дифторфенола; монофторфенола; пентахлорфенола; трифлата; имидазола; дихлорфенола; тетрахлорфенола; 1-гидроксибензотриазола; тозилата; мезилата; 2-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфоната, простых и смешанных ангидридов, например, ацетилангидрида, формил ангидрида; или интермедиата, полученного с помощью конденсационного реагента для реакций пептидного сочетания или для реакций Мицунобу.

В данном документе могут быть использованы следующие аббревиатуры,имеющие указанные определения: Boc, трет-бутоксикарбонил; BroP, бромтриспирролидинофосфонийгексафторфосфат; CDI, 1,1'-карбонилдиимидазол; DCC, дициклогексилкарбодиимид; DCE, дихлорэтан; ДХМ, дихлорметан; DIAD, диизопропилазодикарбоксилат; DIBAL-H, диизобутилалюминийгидрид; DIPEA, диизопропилэтиламин; DEPC, диэтилфосфороцианидат; DMA, N, N-диметилацетамид; DMAP, 4-(N,N-диметиламино)пиридин; ДМФА, N,N-диметилформамид; ДМСО, диметилсульфоксид; DTT, дитиотреитол; EDC, 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид гидрохлорид; МС-ЭИ, электроспрэй масс-спектрометрия; HATU, гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония; HOBt, 1-гидроксибензотриазол; ВЭЖХ, высокоэффективная жидкостная хроматография; NHS, N-гидроксисукцинимид; ММР, 4-метилморфолин; PAB, п-аминобензил; PBS, физиологический раствор с фосфатным буфером (pH 7,0~7,5); ПЭГ, полиэтиленгликоль; SEC, эксклюзионная хроматография; TCEP, трис(2-карбоксиэтил)фосфин; ТФК, трифторуксусная кислота; ТГФ, тетрагидрофуран; Val, валин.

Термин «аминокислота (ы)» может относиться к природным и/или неприродным аминокислотам, предпочтительно альфа-аминокислотам. Природные аминокислоты

являются кислотами, которые кодируются генетическим кодом: аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глютамин, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, тирозин, триптофан и валин. Неприродные аминокислоты являются производными форм протеогенных аминокислот. Примеры включают гидроксипролин, лантионин, 2-аминоизомасляную кислоту, дегидроаланин, гамма-аминомасляную кислоту (нейротрансмиттер), орнитин, цитруллин, бета-аланин (3-аминопропановую кислоту), гамма-карбоксиглутамат, селеноцистеин (присутствует также во многих неэукариотах, а также во многих эукариотах, но не кодируется непосредственно ДНК), пирролизин (обнаружен только у некоторых архей и одной бактерии), N-формилметионин (который часто является начальной аминокислотой белков в бактериях, митохондриях и хлоропластах), 5-гидрокситриптофан, L-дигидроксифенилаланин, трийодтиронин, L-3,4-дигидроксифенилаланин (DOPA) и O-фосфосерин. Термин аминокислота также включает аналоги аминокислот и миметики. Аналоги представляют собой соединения, имеющие такую же общую структуру $H_2N(R)CHCO_2H$ природной аминокислоты, за исключением того, что группа R не обнаружена среди природных аминокислот. Примеры аналогов включают гомосерин, норлейцин, метионин-сульфоксид и метионинметилсульфоний. Предпочтительно, миметик аминокислоты представляет собой соединение, которое имеет структуру, отличную от общей химической структуры альфа-аминокислоты, но функционирует аналогично таковой. Термин «неприродная аминокислота» предназначен для обозначения стереохимической формы «D», причем природные аминокислоты имеют форму «L». В случае, если в настоящей патентной заявке используется 1~8 аминокислот, аминокислотная последовательность предпочтительно представляет собой последовательность распознавания для расщепления протеазой. Многие последовательности распознавания для расщепления протеазой известны в данной области техники. См., например, Matayoshi et al. Science 247: 954 (1990); Dunn et al. Meth. Enzymol. 241: 254 (1994); Seidah et al. Meth. Enzymol. 244: 175 (1994); Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 615 (1994); Weber et al. Meth. Enzymol. 244: 595 (1994); Smith et al. Meth. Enzymol. 244: 412 (1994); и Bouvier et al. Meth. Enzymol. 248: 614 (1995); раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В частности, последовательность выбрана из группы, состоящей из Val-Cit, Ala-Val, Ala-Ala, Val-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser и Glu.

Термин «гликозид» описывает молекулу, в которой сахарная группа через свой

аномерный углерод связана с другой группой через гликозидную связь. Гликозиды могут быть связаны через O-(*O*-гликозид), N-(гликозиламин), S-(тиогликозид) или C-(*C*-гликозид) гликозидную связь. Они имеют структурную эмпирическую формулу $C_m(H_2O)_n$ (где m может отличаться от n, а m и n <36), гликозид в данном контексте включает глюкозу (декстрозу), фруктозу (левулозу), аллозу, альтрозу, маннозу, гулозу, йодозу, галактозу, талозу, галактозамин, глюкозамин, сиаловую кислоту, N-ацетилглюкозамин, сульфохиновозу (6-дезокси-6-сульфо-D-глюкопиранозу), рибозу, арабинозу, ксилозу, ликсозу, сорбит, маннит, мальтозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, мальтодекстрины, рафинозу, глюкуроновую кислоту (глюкуронид) и стахиозу. Он может быть в форме D или форме L, 5 атомной циклической форме фуранозы, 6 атомной циклических форме пиранозы или ациклической форме, α-изомера (-OH аномерный атом углерода находится ниже плоскости атомов углерода проекции Хауорта) или β-изомера (-OH аномерный атом углерода находится над плоскостью атомов углерода проекции Хауорта). Углевод, как используется в данном документе, может быть как моносахаридом, дисахаридом, полиолом или олигосахаридом, содержащим 3-6 единиц сахара.

Термин «фармацевтически» или «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают побочную, аллергическую или другую неблагоприятную реакцию при введении животному или человеку, в зависимости от ситуации.

Термины «фармацевтически приемлемый сольват» или «сольват» относятся к ассоциации одной или более молекул растворителя и раскрытого соединения. Примеры растворителей, которые образуют фармацевтически приемлемые сольваты, включают, но не ограничиваются ими, воду, изопропанол, этанол, метанол, ДМСО, этилацетат, уксусную кислоту и этаноламин.

Термин «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» включает любые носители, разбавители, адъюванты или носители, такие как консерванты или антиоксиданты, наполнители, дезинтегрирующие агенты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты, суспендирующие агенты, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и тому подобное. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какой-либо обычный носитель или агент несовместим с активным ингредиентом, предполагается его использование в терапевтических

композициях. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции в виде подходящих терапевтических комбинаций.

Как используется в данном документе, термин «фармацевтические соли» относится к производным раскрытых соединений, в которых исходное соединение модифицируется путем получения его кислотных или основных солей. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя обычные нетоксичные соли или четвертичные аммониевые соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Например, такие обычные нетоксичные соли включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная кислота и тому подобное; и соли, полученные из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, винная, лимонная, метансульфоновая, бензолсульфоновая, глюкуроновая, глутаминовая, бензойная, салициловая, толуолсульфоновая, щавелевая, фумаровая, малеиновая, молочная кислота и тому подобное. Дополнительные соли присоединения включают соли аммония, такие как трометамин, меглюмин, эполамин и т.д., соли металлов, таких как натрий, калий, кальций, цинк или магний.

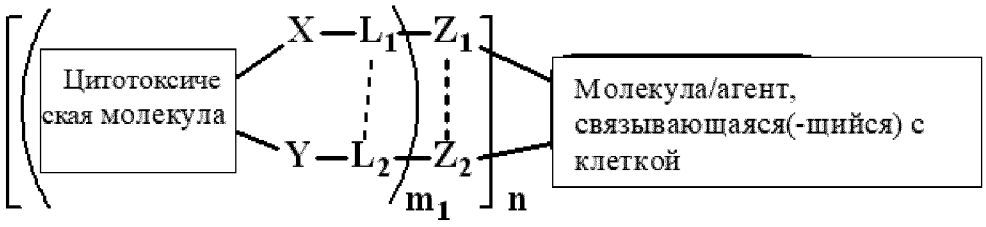
Фармацевтические соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, обычными химическими способами. Как правило, такие соли могут быть получены реакцией свободных кислотных или основных форм данных соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси. Как правило, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, являются предпочтительными. Списки подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, раскрытие которой настоящим включено в качестве ссылки.

Термин «введение» относится к любому способу переноса, доставки, введения или транспортировки фармацевтического лекарственного средства или другого агента субъекту. Такие способы включают пероральное введение, местный контакт, внутривенное, внутрибрюшинное, внутримышечное, интралезиальное, интраназальное, подкожное или интратекальное введение. Настоящее изобретение также предусматривает использование устройства или инструмента для введения агента. Такое устройство может использовать активную или пассивную транспортировку и может быть устройством доставки с медленным или быстрым высвобождением.

Новые конъюгаты, описанные в данном документе, используют мостиковые линкеры. Примеры некоторых подходящих линкеров и их синтез представлены на Фиг. 1-34.

КОНЪЮГАТ “АГЕНТ, СВЯЗЫВАЮЩИЙСЯ С КЛЕТКОЙ — ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ МОЛЕКУЛА”, СВЯЗАННЫЙ ПОСРЕДСТВОМ БИС-СВЯЗЫВАНИЯ

Бис-связывание конъюгата представлено Формулой (I):



(I)

где

«——» представляет собой одинарную связь;

«-----» представляет собой необязательно либо одинарную связь, либо двойную связь или может необязательно отсутствовать;

n и m_1 независимо равны от 1 до 20;

Агент/молекула, связывающийся с клеткой, в каркасе, который связывается с Z_1 и Z_2, может быть любого вида, известного в настоящее время, или который станет известным, молекулы, которая связывается, образует комплексы или реагирует с некоторой частью клеточной популяции, которую требуется терапевтически или иным образом биологически модифицировать. Предпочтительно агент/молекула, связывающийся с клеткой, представляет собой иммунотерапевтический белок, антитело, одноцепочечное антитело; фрагмент антитела, который связывается с клеткой-мишенью; моноклональное антитело; одноцепочечное моноклональное антитело; или фрагмент моноклонального антитела, который связывается с клеткой-мишенью; химерное антитело; фрагмент химерного антитела, который связывается с клеткой-мишенью; домен антитела; фрагмент домена антитела, который связывается с клеткой-мишенью; аднектины, которые имитируют антитела; DARPins (дарпины); лимфокин; гормон; витамин; фактор роста; колониестимулирующий фактор; или молекулу, переносящую питательные вещества в клетку (трансферрин); связывающие пептиды, содержащие более четырех аминокислот, или белок, или антитело, или малую молекулу, связывающуюся с клеткой или лиганд,

присоединенный к альбумину, полимерам, дендримерам, липосомам, наночастицам, везикулам или (вирусным) капсидам;

Цитотоксическая молекула/агент в каркасе представляет собой терапевтическое лекарственное средство/молекулу/агент или иммунотерапевтический белок/молекулу, или функциональную молекулу для усиления связывания или стабилизации агента, связывающегося с клеткой, или лиганда, связывающегося с поверхностным клеточным рецептором, или для ингибирования пролиферации клеток, или для наблюдения, обнаружения или исследования действия молекулы, связывающейся с клеткой. Также это может быть аналог, или пролекарство, или фармацевтически приемлемая соль, гидрат или гидратированная соль, или кристаллическая структура, или оптический изомер, рацемат, диастереомер или энантиомер, иммунотерапевтического соединения, химиотерапевтическое соединение, антитело (проантитело) или фрагмент антитела (проантитела), или миРНК, или молекула ДНК, или лиганд, связывающийся с клеточной поверхностью;

Предпочтительно цитотоксическая молекула представляет собой любое из множества низкомолекулярных лекарственных средств, включая, но не ограничиваясь ими, тубулизины, калихеамицины, ауристатины, майтанзиноиды, аналоги CC-1065, морфолино доксорубицины, таксаны, криптофицины, аматоксины (например, аманитины), эпотилоны, еribулины, гелданамицины, дуокармицины, дауномицины, метотрексаты, виндезины, винкристины и бензодиазепиновые димеры (например, димеры пирролобензодиазепина (PBD), томаймицин, индолинобензодиазепины, имидазобензотиадиазепины или оксазолидинобензодиазепины);

X и Y представляют собой одинаковую или различную, и независимо функциональную группу, которая связывает цитотоксическое лекарственное средство через дисульфид, простой тиоэфир, сложный тиоэфир, пептид, гидразон, простой эфир, сложный эфир, карбамат, карбонат, амин (вторичный, третичный или четвертичный), имин, циклогетероалкиан, гетероароматическую, алкоксимовую или амидную связь; предпочтительно X и Y независимо выбраны из NH; NHNH; $N(R_1)$; $N(R_1)N(R_2)$; O; S; S-S, O-NH. $O-N(R_1)$, CH_2-NH. $CH_2-N(R_1)$, CH=NH. $CH=N(R_1)$, S(O), $S(O_2)$, P(O)(OH), S(O)NH, $S(O_2)NH$, P(O)(OH)NH, NHS(O)NH, $NHS(O_2)NH$, NHP(O)(OH)NH, $N(R_1)S(O)N(R_2)$, $N(R_1)S(O_2)N(R_2)$, $N(R_1)P(O)(OH)N(R_2)$, $OS(O)NH$, $OS(O_2)NH$, OP(O)(OH)NH, C(O), C(NH), $C(NR_1)$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, OC(O)NH, OC(NH)NH; $OC(NR_1)NH$, NHC(O)NH; NHC(NH)NH; $NHC(NR_1)NH$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, $OC(O)N(R_1)$, $OC(NH)N(R_1)$, $OC(NR_1)N(R_1)$, $NHC(O)N(R_1)$, $NHC(NH)N(R_1)$, $NHC(NR_1)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$,

$N(R_1)C(NH)N(R_1)$, $N(R_1)C(NR_1)N(R_1)$; или C_1-C_6 алкила; C_2-C_8 алкенила, гетероалкила, алкилциклоалкила или гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила или гетероарила;

Z_1 и Z_2 являются одинаковыми или разными и независимо представляют собой функциональную группу, которая связана с молекулой, связывающейся с клеткой, с образованием дисульфидной, простоэфирной, сложноэфирной, простой тиоэфирной, сложной тиоэфирной, пептидной, гидразонной, карбаматной, карбонатной, аминной (вторичной, третичной или четвертичной), иминной, циклогетероалкиановой, гетероароматической, алкилоксимовой или амидной связи; предпочтительно Z_1 и Z_2 независимо имеют следующие структуры: C(O)CH, C(O)C, $C(O)CH_2$, $ArCH_2$, C(O), NH; NHNH; $N(R_1)$; $N(R_1)N(R_2)$; O; S; S-S, O-NH. $O\text{-}N(R_1)$, CH_2-NH. $CH_2\text{-}N(R_1)$, CH=NH. $CH=N(R_1)$, S(O), $S(O_2)$, P(O)(OH), S(O)NH, $S(O_2)NH$, P(O)(OH)NH, NHS(O)NH, $NHS(O_2)NH$, NHP(O)(OH)NH, $N(R_1)S(O)N(R_2)$, $N(R_1)S(O_2)N(R_2)$, $N(R_1)P(O)(OH)N(R_2)$, $OS(O)NH$, $OS(O_2)NH$, OP(O)(OH)NH, C(O), C(NH), $C(NR_1)$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, OC(O)NH, OC(NH)NH; $OC(NR_1)NH$, NHC(O)NH; NHC(NH)NH; $NHC(NR_1)NH$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, $OC(O)N(R_1)$, $OC(NH)N(R_1)$, $OC(NR_1)N(R_1)$, $NHC(O)N(R_1)$, $NHC(NH)N(R_1)$, $NHC(NR_1)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(NH)N(R_1)$, $N(R_1)C(NR_1)N(R_1)$; или C_1-C_8 алкил; C_2-C_8 гетероалкил, алкилциклоалкил или гетероциклоалкил; C_3-C_8 арил, Ar-алкил, гетероциклил, карбоциклил, циклоалкила, гетероалкилциклоалкил, алкилкарбонил или гетероарил;

Предпочтительно Z_1 и Z_2 связаны с парами тиолов агента/молекулы, связывающегося с клеткой. Тиолы предпочтительно представляют собой пары атомов серы восстановленных из дисульфидных связей внутренней цепи агента, связывающегося с клеткой посредством восстанавливающего агента, выбранного из дитиотреитола (DTT), дитиоэритритола (DTE), L-глютатиона (GSH), трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP), 2-меркаптоэтиламина (β-MEA), или/и бета меркаптоэтанола (β-ME, 2-ME).

L_1 и L_2 представляют собой цепь атомов, выбранных из C, N, O, S, Si и P, содержащую 0~500 атомов, которая ковалентно соединяется с X и Z_1, и с Y и Z_2. Атомы, используемые при образовании L_1 и L_2, могут быть объединены всеми химически значимыми способами, предпочтительно они представляю собой C_1 –C_{20} алкилен, алкенилен и алкинилен, простые эфиры, полиоксиалкилены, сложные эфиры, амины, имины, полиамины, гидразины, гидразоны, амиды, мочевины, семикарбазиды, карбазиды, алкоксиамины, алкоксиламины, уретаны, аминокислоты, пептиды, ацилоксиламины, гидроксамовые кислоты или их вышеуказанную комбинацию. Более предпочтительно, L_1 и L_2, являются

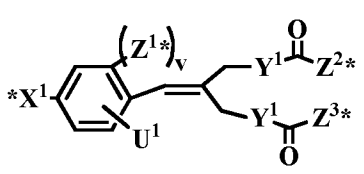
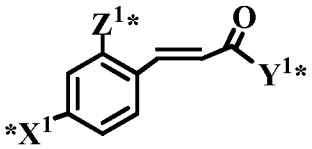
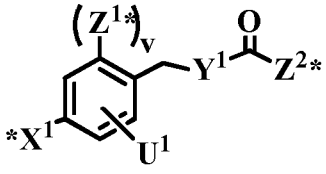
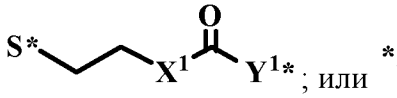
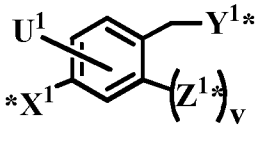
одинаковыми или различными, независимо выбраны из O, NH, S, NHNH, $N(R_3)$, $N(R_3)N(R_{3'})$, C_1-C_8 алкила, амида, аминов, иминов, гидразинов, гидразонов; C_2-C_8 гетероалкила, алкилциклоалкила, простых эфиров, сложных эфиров, гидразонов, мочевин, семикарбазидов, карбазидов, алкоксиаминов, алкоксиламинов, уретанов, аминокислот, пептидов, ацилоксиламинов, гидроксамовых кислот или гетероциклоалкилов; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила или гетероарила; полиэтиленоксигруппы формулы $(OCH_2CH_2)_pOR_3$, или $(OCH_2\text{-}CH(CH_3))_pOR_3$, или $NH(CH_2CH_2O)_pR_3$, или $NH(CH_2CH(CH_3)O)_pR_3$, или $N[(CH_2CH_2O)_pR_3]\text{-}[(CH_2CH_2O)_{p'}R_{3'}]$, или $(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$, или $CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$, где p и p' независимо представляют собой целое число, выбранное от 0 до около 5000, или их комбинацию; где R_3 и $R_{3'}$ независимо представляют собой H; C_1-C_8 алкил; C_2-C_8 гетероалкил, алкилциклоалкил или гетероциклоалкил; C_3-C_8 арил, Ar-алкил, гетероциклил, карбоциклил, циклоалкил, гетероалкилциклоалкил, алкилкарбонил или гетероарил; или C_2-C_8 сложных эфиров, простого эфира или амида; или 1~8 аминокислот; или полиэтиленоксигруппы формулы $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 0 до около 5000 или их вышеуказанную комбинацию;

Необязательно, L_1 и L_2 могут независимо состоять из одного или более линкерных компонентов 6-малеимидокапроила («MC»), малеимидопропаноила («MP»), валин-цитруллина («val-cit» или «vc»), аланин-фенилаланина («ala-phe» или «af») , п-аминобензилоксикарбонила («PAB»), 4-тиопентаноата («SPP»), 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата («MCC»), (4-ацетил)аминобензоата («SIAB»), 4 -тиобутирата (SPDB), 4-тио-2-гидроксисульфонилбутирата (2-сульфо-SPDB) или природных или неприродных пептидов, содержащих 1~8 природных или неприродных аминокислот. Природная аминокислота предпочтительно выбрана из аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аргинина, гистидина, лизина, серина, треонина, аспарагина, глютамина, цистеина, селеноцистеина, тирозина, фенилаланина, глицина, пролина, триптофана, аланина;

L_1 и L_2 могут также независимо содержать саморасщепляющийся или несаморасщепляющийся компонент, пептидные звенья, гидразоновую связь, дисульфидную, сложноэфирную, оксимную, амидную или простотиоэфирную связь. Саморасщепляющийся фрагмент включает, но не ограничивается ими, ароматические соединения, которые в электронном виде сходны с пара-аминобензилкарбамоильными

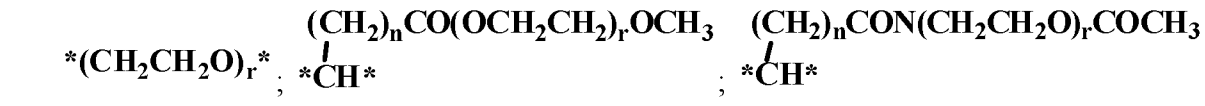
(PAB) группами, такими как производные 2-аминоимидазол-5-метанола, гетероциклические аналоги PAB, бета-глюкуронид и орто- или пара-аминобензилацетали;

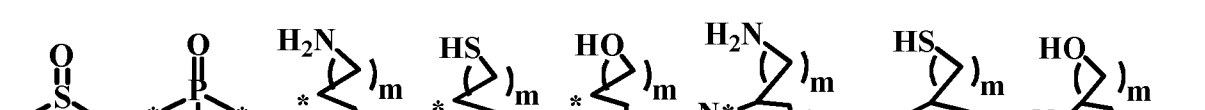
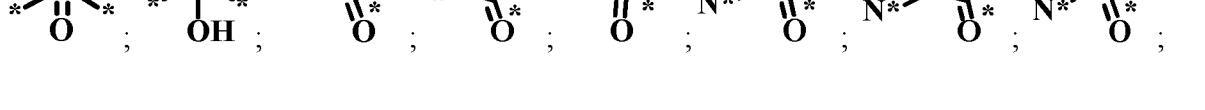
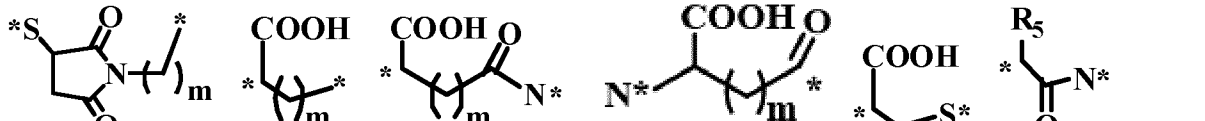
Предпочтительно, саморасщепляющийся линкерный компонент имеет одну из следующих структур:

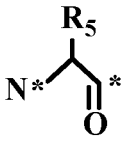
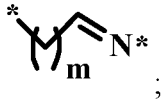
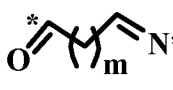
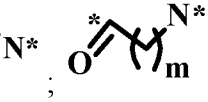






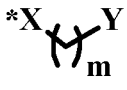
где (*) атом представляет собой точку присоединения дополнительных спейсерных или высвобождаемых линкерных фрагментов или цитотоксического агента и/или связывающейся молекулы (CBA); X^1, Y^1, Z^2 и Z^3 независимо представляют собой NH, O или S; Z^1 независимо представляет собой H, NHR_1, OR_1, SR_1, COX_1R_1 где X_1 и R_1 являются такими, как определено выше; v равно 0 или 1; U^1 независимо представляет собой H, OH, C_1~C_6 алкил, $(OCH_2CH_2)_n$, F, Cl, Br, I, OR_5, SR_5, NR_5R_5', $N{=}NR_5$, $N{=}R_5$, NR_5R_5', NO_2, SOR_5R_5', SO_2R_5, SO_3R_5, OSO_3R_5, PR_5R_5', POR_5R_5', $PO_2R_5R_5'$, $OPO(OR_5)(OR_5')$ или $OCH_2PO(OR_5(OR_5')$, где R_5 и R_5' независимо выбраны из H, C_1~C_8 алкила; C_2~C_8 алкенила, алкинила, гетероалкила, или аминокислоты; C_3~C_8 арила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероциклоалкила, гетероаралкила, алкилкарбонила или гликозида; или фармацевтических катионных солей;

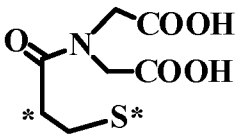
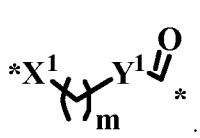
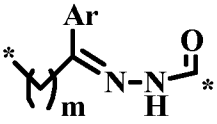
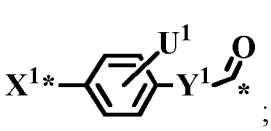
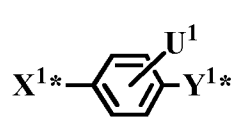
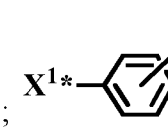
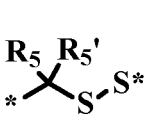
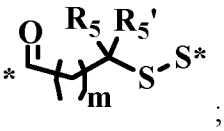
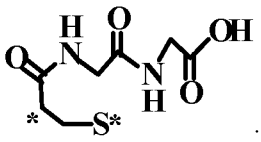
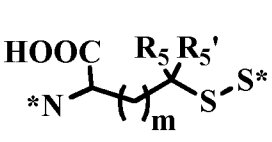
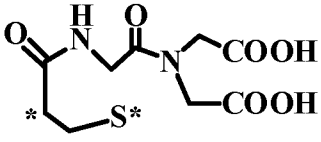
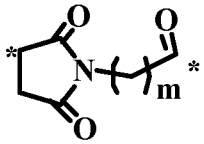
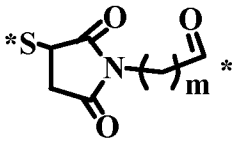
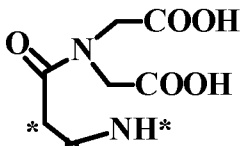
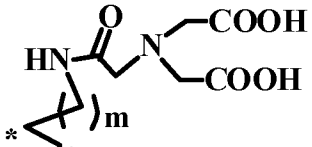
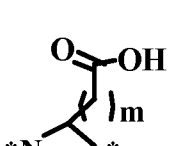
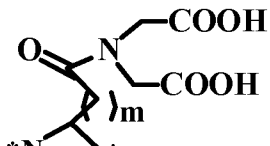
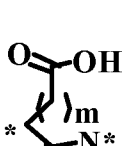
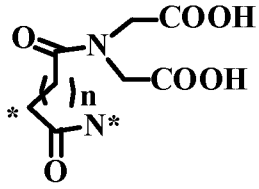
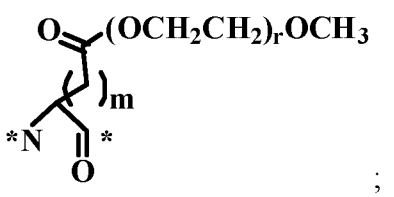
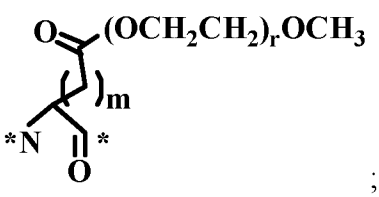
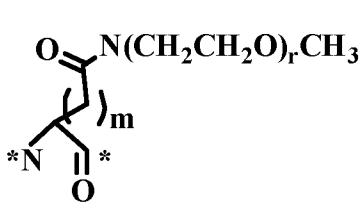
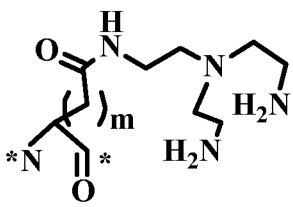
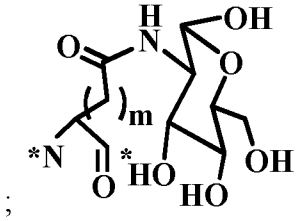
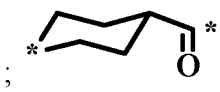
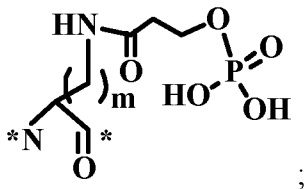
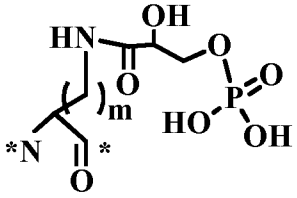
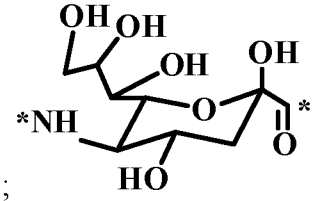
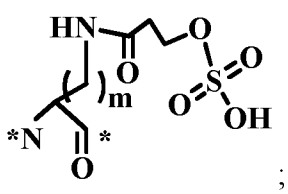
Несаморасщепляющийся линкерный компонент имеет одну из следующих структур:

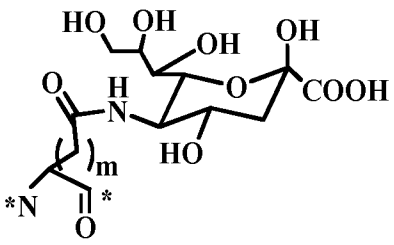
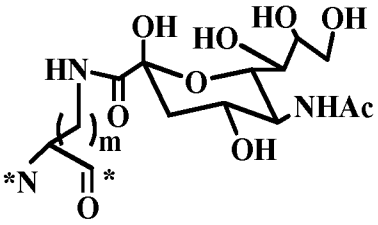
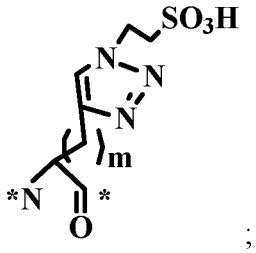
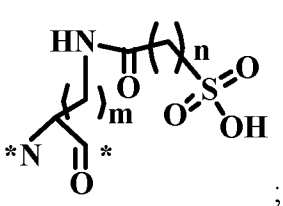
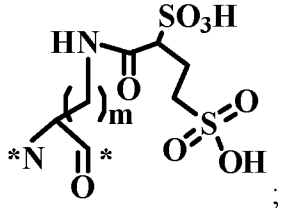
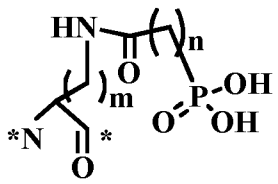




;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

где (*) атом представляет собой точку присоединения дополнительных спейсерных или высвобождаемых линкеров, цитотоксических агентов и/или связывающихся молекул ; X^1, Y^1, U^1, R_5, R_5' являются такими, как определено выше; r равно 0~100; m и n независимо равны 0-6;

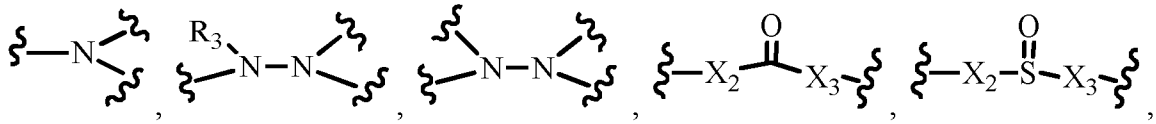
Кроме того, предпочтительно, L_1 и L_2 могут независимо представлять собой высвобождаемый линкер. Термин «высвобождаемый линкер» относится к линкеру, который включает по меньшей мере одну связь, которая может быть разорвана в физиологических условиях, таких как pH-лабильная, кислотно-лабильная, щелочно-лабильная, окислительно-лабильная, метаболически лабильная, биохимически лабильная или фермент-лабильная связь. Понятно, что такие физиологические условия, приводящие к разрыву связи, необязательно включают биологический или метаболический процесс и вместо этого могут включать стандартную химическую реакцию, такую как реакция гидролиза или замещения, например, эндосома, имеющая более низкий pH, чем цитозольный pH и/или реакцию обмена дисульфидной связи с внутриклеточным тиолом, таким как миллимолярный диапазон избытка глутатиона внутри злокачественных клеток;

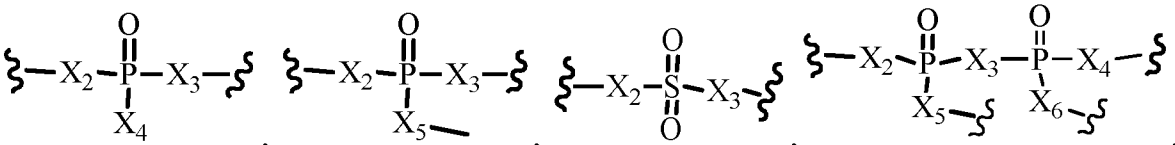
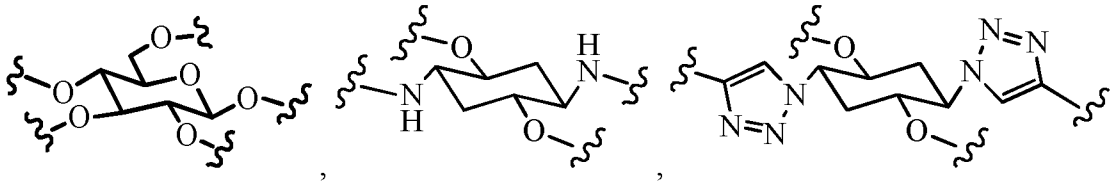
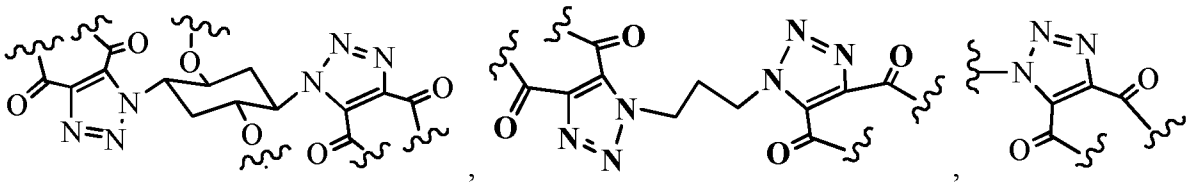
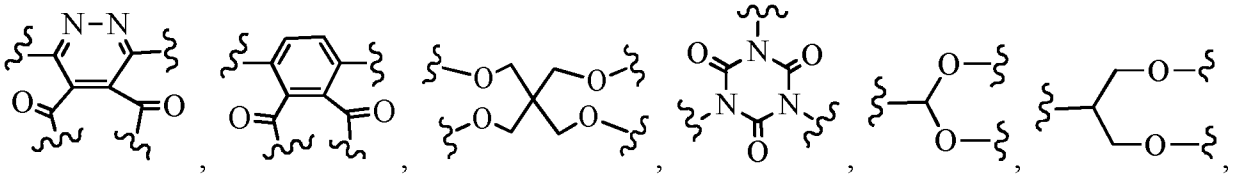
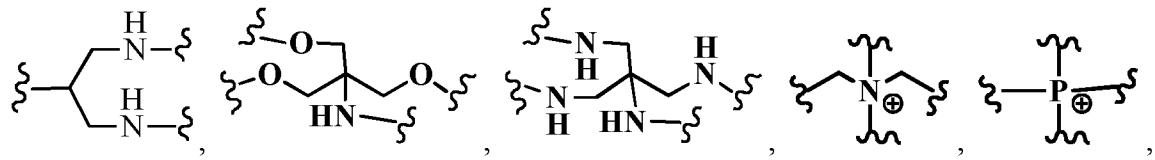
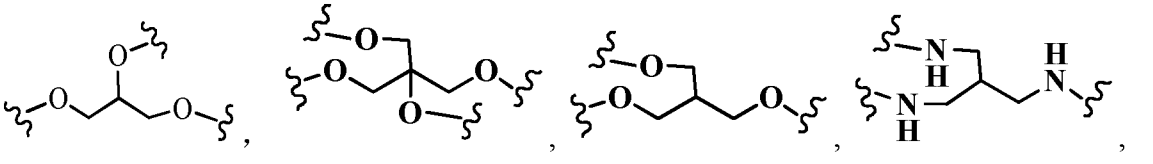
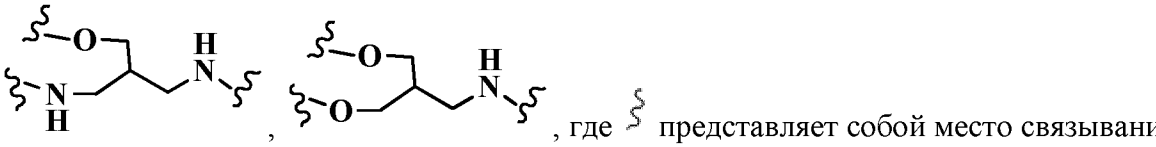
Примеры высвобождаемых линкеров L_1 или L_2 включают в себя, но не ограничиваются ими:

$-(CR_5R_6)_m(Aa)r(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$, $-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(Aa)_r(OCH_2CH_2)_t-$, $-(Aa)_r-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$, $-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_r(Aa)_t-$, $-(CR_5R_6)_m-(CR_7{=}CR_8)(CR_9R_{10})_n(Aa)_t(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(Aa)_t(NR_{11}CO)(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$,$-(CR_5R_6)_m(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t-(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m-(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m$-фенил-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R_6)_m$-фурил-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R_6)_m-$

оксазолил-CO(Aa)$_t$(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -(CR$_5$R$_6$)$_m$-тиазолил-CO(Aa)$_t$(CCR$_7$R$_8$)$_n$-, -(CR$_5$R$_6$)$_t$-тиенил-CO(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -(CR$_5$R$_6$)$_t$-имидазолил-CO-(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -(CR$_5$R$_6$)$_t$-морфолино-CO(Aa)$_t$-(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -(CR$_5$R$_6$)$_t$пиперазино-CO(Aa)$_t$-(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -(CR$_5$R$_6$)$_t$-N-метилпиперазин-CO(Aa)$_t$-(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -(CR$_5$R)$_m$-(Aa)$_t$фенил-, -(CR$_5$R$_6$)$_m$-(Aa)$_t$фурил-, -(CR$_5$R$_6$)$_m$-оксазолил(Aa)$_t$-, -(CR$_5$R$_6$)$_m$-тиазолил(Aa)$_t$-, -(CR$_5$R$_6$)$_m$-тиенил-(Aa)$_t$-, -(CR$_5$R$_6$)$_m$-имидазолил(Aa)$_t$-, -(C R$_5$R$_6$)$_m$-морфолино-(Aa)$_t$-, -(CR$_5$R$_6$)$_m$-пиперазино-(Aa)$_t$-, -(CR$_5$R$_6$)$_m$-N-метилпиперазин-(Aa)$_t$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$(Aa)r(CR$_7$R$_8$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_t$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$(CR$_7$R$_8$)$_n$(Aa)$_r$(OCH$_2$CH$_2$)$_t$-, -K(Aa)$_r$-(CR$_5$R$_6$)$_m$(CR$_7$R$_8$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_t$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$(CR$_7$R$_8$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_r$(Aa)$_t$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-(CR$_7$=CR$_8$)(CR$_9$R$_{10}$)$_n$(Aa)$_t$(OCH$_2$CH$_2$)$_r$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$(NR$_{11}$CO)(Aa)$_t$(CR$_9$R$_{10}$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_r$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$(Aa)$_t$(NR$_{11}$CO)(CR$_9$R$_{10}$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_r$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$(OCO)(Aa)$_t$(CR$_9$R$_{10}$)$_n$-(OCH$_2$CH$_2$)$_r$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$(OCNR$_7$)(Aa)$_t$(CR$_9$R$_{10}$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_r$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$(CO)(Aa)$_t$-(CR$_9$R$_{10}$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_r$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$(NR$_{11}$CO)(Aa)$_t$(CR$_9$R$_{10}$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_r$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-(OCO)(Aa)$_t$(CR$_9$R$_{10}$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_r$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$(OCNR$_7$)(Aa)$_t$(CR$_9$R$_{10}$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_r$-, -K-(CR$_5$R$_6$)$_m$(CO)(Aa)$_t$(CR$_9$R$_{10}$)$_n$(OCH$_2$CH$_2$)$_r$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-фенил-CO(Aa)$_t$(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -K-(CR$_5$R$_6$)$_m$-фурил-CO(Aa)$_t$-(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-оксазолил-CO(Aa)$_t$(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-тиазолил-CO(Aa)$_t$-(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_t$-тиенил-CO(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_t$имидазолил-CO-(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_t$морфолино-CO(Aa)$_t$(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_t$пиперазино-CO(Aa)$_t$-(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_t$-N-метилпиперазин CO(Aa)$_t$(CR$_7$R$_8$)$_n$-, -K(CR$_5$R)$_m$(Aa)$_t$фенил, -K-(CR$_5$R$_6$)$_m$-(Aa)$_t$фурил-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-оксазолил(Aa)$_t$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-тиазолил(Aa)$_t$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-тиенил-(Aa)$_t$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-имидазолил(Aa)$_t$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-морфолино(Aa)$_t$-, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$-пиперазино-(Aa)$_t$G, -K(CR$_5$R$_6$)$_m$N-метилпиперазин(Aa)$_t$-; где m, Aa, m и n являются как описано выше; t и r независимо равны 0 – 100; R$_3$, R$_4$, R$_5$, R$_6$, R$_7$, и R$_8$ независимо выбраны из H; галогенида; C$_1$~C$_8$ алкила; C$_2$~C$_8$ арила, алкенила, алкинила, простого эфира, сложного эфира, амина или амида, которые необязательно замещены одним или более галогенидом, CN, NR$_1$R$_2$, CF$_3$, OR$_1$, арилом, гетероциклом, S(O)R$_1$, SO$_2$R$_1$, -CO$_2$H, -SO$_3$H, -OR$_1$, -CO$_2$R$_1$, -CONR$_1$, -PO$_2$R$_1$R$_2$, -PO$_3$H или P(O)R$_1$R$_2$R$_3$; K представляет собой NR$_1$, -SS-, -C(=O)-, -C(=O)NH-, -C(=O)O-, -C=NH-O-, -C=N-NH-, -C(=O)NH-NH-, O, S, Se, B, Het (гетероциклическое или гетероароматическое кольцо имеющее C$_3$-C$_8$), или пептидов содержащих 1- 20 аминокислот;

Кроме того, L$_1$ и L$_2$ могут независимо содержать одну из следующих гидрофильных структур:



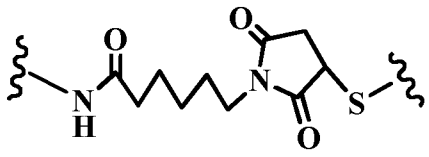








, где $\sim$ представляет собой место связывания; X_2, X_3, X_4, X_5, или X_6 независимо выбраны из NH; NHNH; $N(R_3)$; $N(R_3)N(R_{3'})$; O; S; C_1-C_6 алкила; C_2-C_6 гетероалкила, алкилциклоалкила или гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила, гетероарила; или 1~ 8 аминокислот; где R_3 и $R_{3'}$ независимо представляют собой H; C_1-C_8 алкил; C_2-C_8 гетероалкил, алкилциклоалкил или гетероциклоалкил; C_3-C_8 арил, Ar-алкил, гетероциклил, карбоциклил, циклоалкил, гетероалкилциклоалкил, алкилкарбонил или гетероарил; или C_2-C_8 сложных эфиров, простых эфиров или амидов; или полиэтиленоксигрупп, имеющих формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 0 до около 5000, или их комбинации;

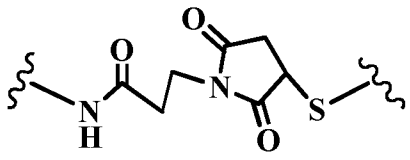
Более предпочтительно R_1, L_1 или L_2, независимо представляют собой линейный алкил, содержащий от 1 до 6 атомов углерода, или полиэтиленоксигруппу, имеющую

формулу $(OCH_2CH_2)_p$, p = 1~5000, или пептид, содержащий 1~4 единиц аминокислот (L или D форма) или вышеуказанную комбинацию.

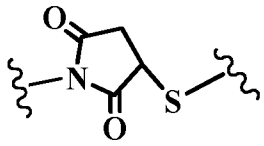
Кроме того, X, Y, L_1, L_2, Z_1 или Z_2 могут независимо состоять из одного или более следующих компонентов, как показано ниже:



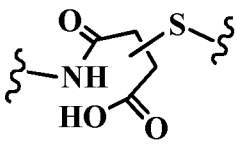
6-малеимидокапроила (MC),



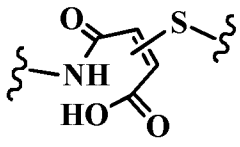
малеимидопропаноила (MP),



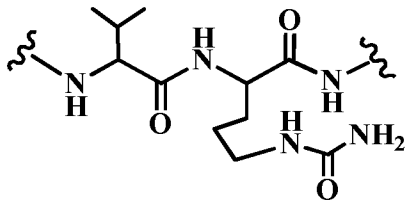
тиомалеидо,



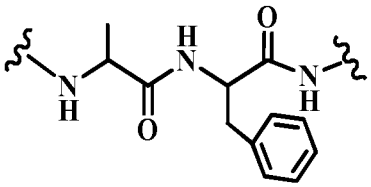
тиоаминооксобутановой кислоты,



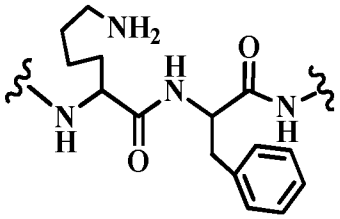
тиоаминооксобутеновой кислоты,



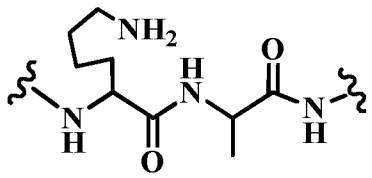
валин-цитруллина (val-cit),



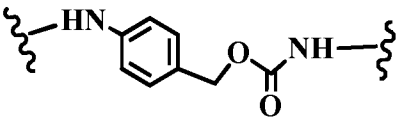
аланин-фенилаланина (ala-phe),



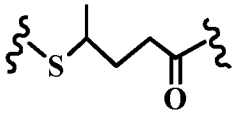
лизин-фенилаланина (lys-phe) ,



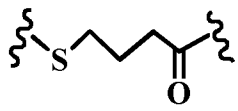
лизин-аланина (lys-ala),



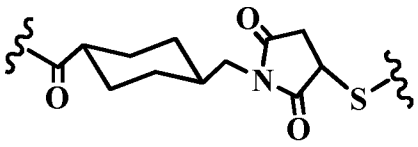
пара-аминобензилоксикарбонила (PAB),



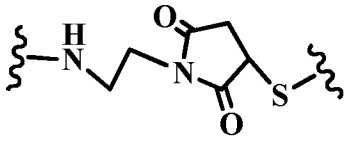
4-тиопентаноата (SPP),

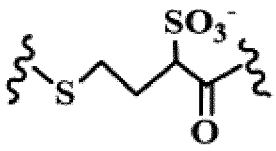


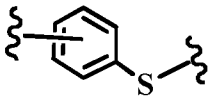
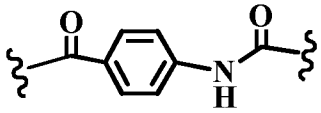
4-тиобутирата (SPDB),

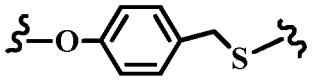


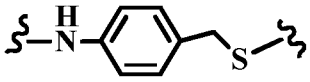
4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (MCC),

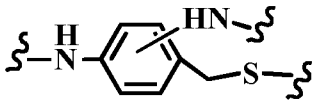
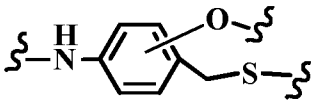


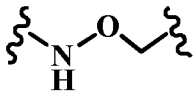
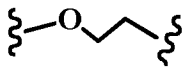
малеимидоэтила (ME),  4-тио-2-гидроксисульфонилбутирата (2-

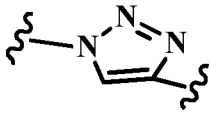
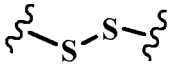
сульфо-SPDB),  арилтиола (PySS),  (4-

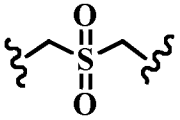
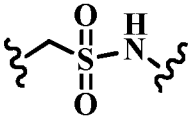
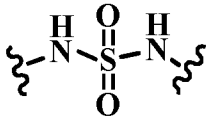
ацетил)аминобензоата (SIAB),  оксилбензилтио,

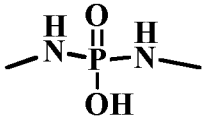
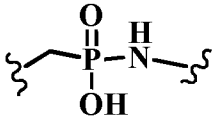
 аминобензилтио,  диоксилбензилтио,

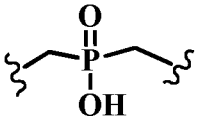
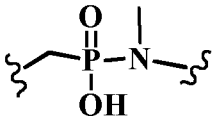
 диаминобензилтио,  аминооксилбензилтио,

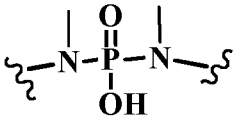
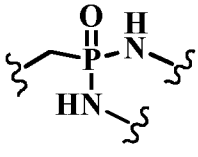
 алкоксиамино (AOA),  этиленокси (EO), 

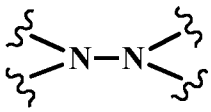
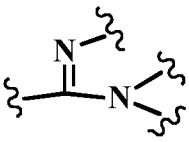
4-метил-4-дитиопентаноила (MPDP),  триазола,  дитио,

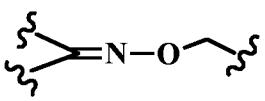
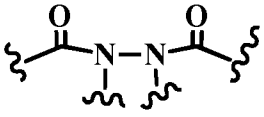
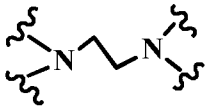
 алкилсульфонила,  алкилсульфонамида, 

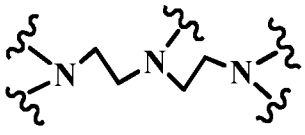
сульфон-бисамида,  фосфондиамида,  алкилфосфонамида,

 фосфиновой кислоты,  N-метилфосфонамидной кислоты,

 N,N'-диметилфосфонамидной кислоты,  N,N'-

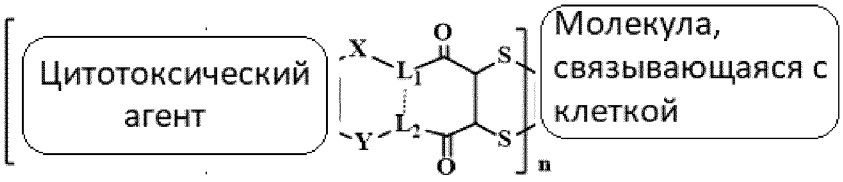
диметилфосфондиамида,  гидразина,  ацетимидамида;

 оксима,  ацетилацетогидразида, 

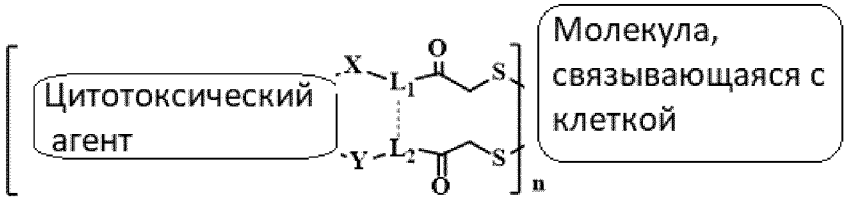
аминоэтиламина,  аминоэтиламиноэтиламина и L- или D-, природных или неприродных пептидов, содержащих 1-20 аминокислот; где связующая связь между атомами означает, что она может соединять любые соседние углеродные связи; волнистая линия - место, с которым может быть связана другая связь;

Альтернативно, X, Y, L_1, L_2, Z_1, или Z_2 могут независимо отсутствовать, но L_1 и Z_1, или L_2 и Z_2 не могут отсутствовать одновременно.

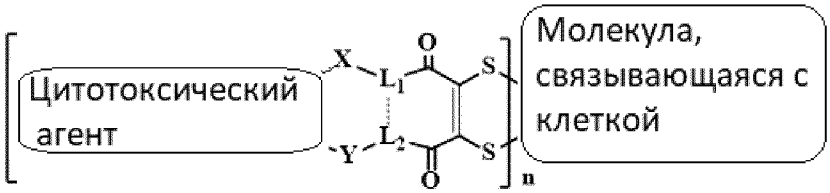
Предпочтительно, бис-связывание конъюгата дополнительно представлено Формулами (I-a), (I-b), (I-c), (I-d), (I-e), (I-f), (I-g), (I-h), (I-i), (I-j), (I-k), (I-m), (I-n), (I-o), (I-p), (I-q), (I-r), (I-s), (I-t), (I-u), (I-v) и (I-w) ниже:



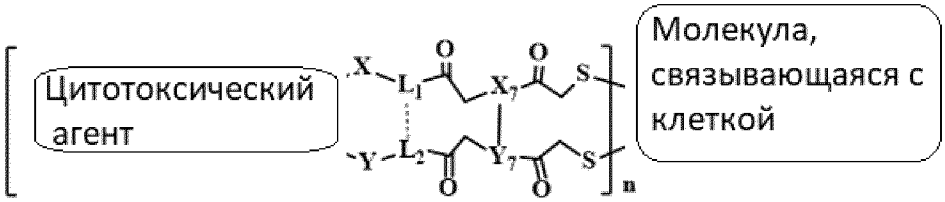
(I-a),



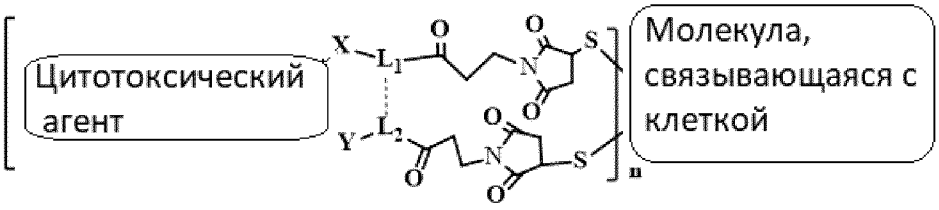
(I-b),



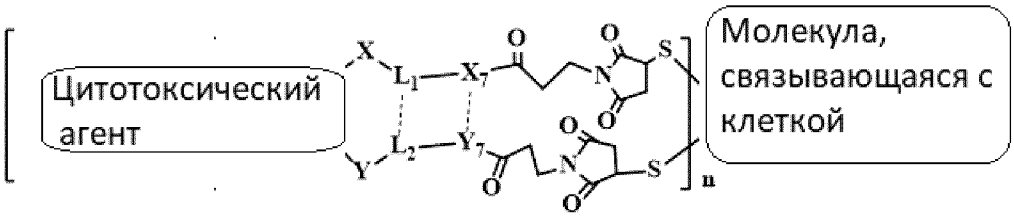
(I-c)



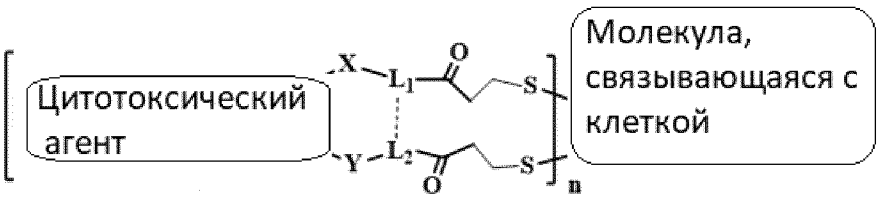
(I-d)



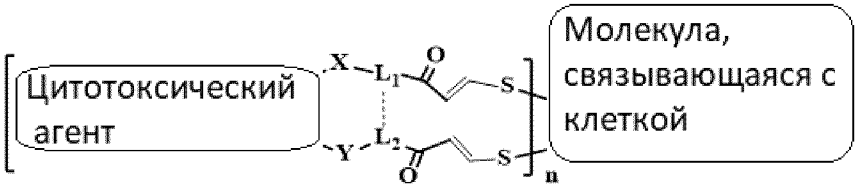
(I-e)



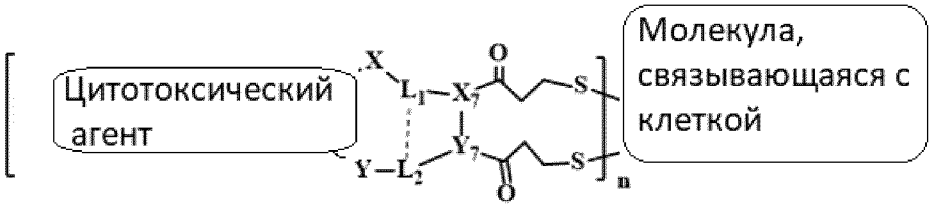
(I-f)



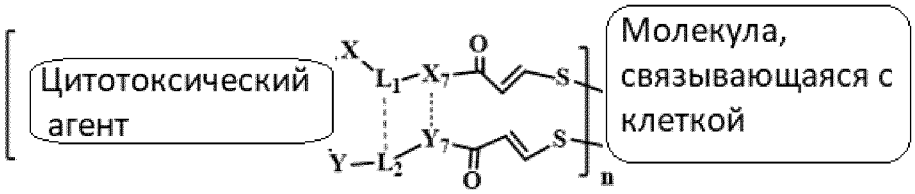
(I-g)



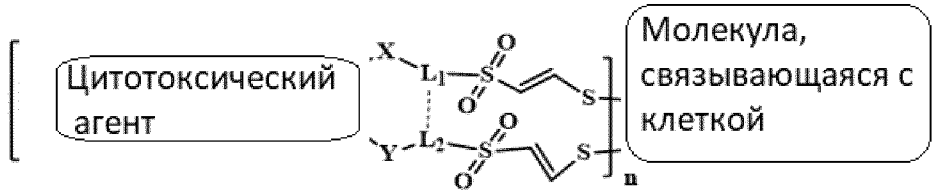
(I-h)



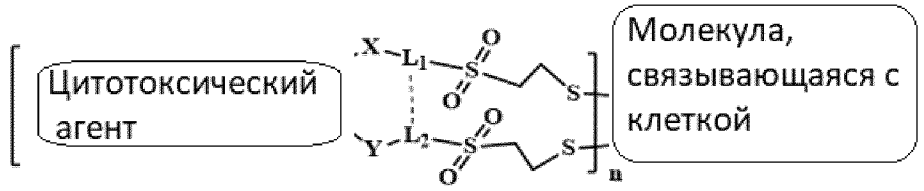
(I-i)



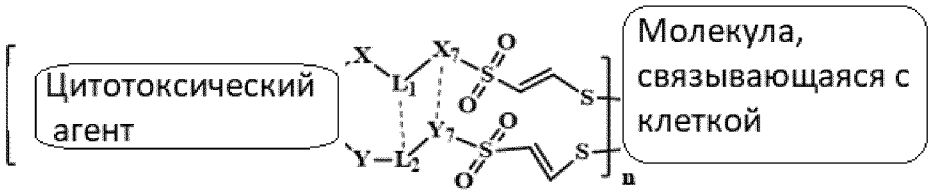
(I-j)



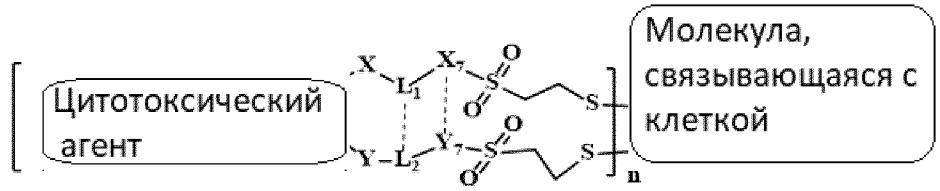
(I-k)



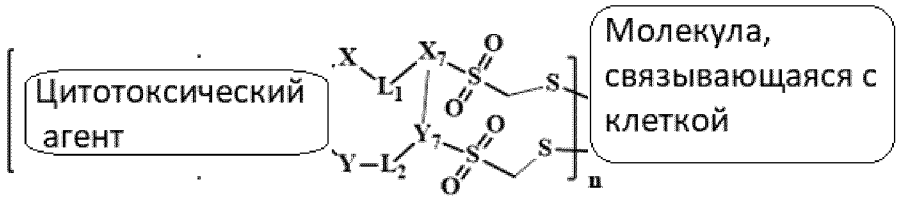
(I-l)



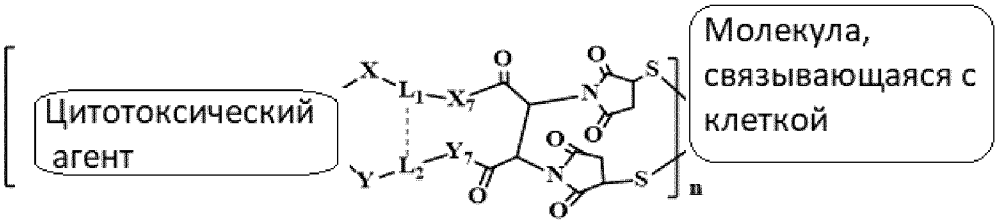
(I-m)



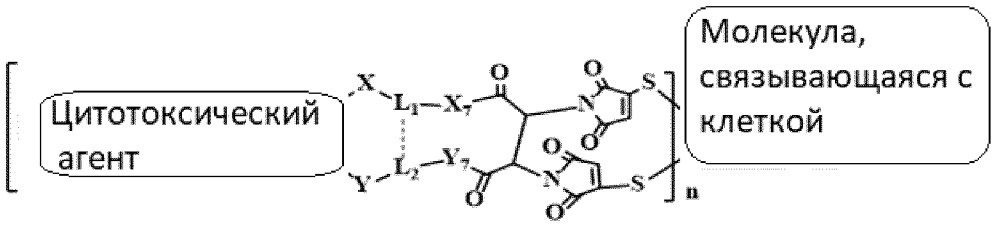
(I-n)



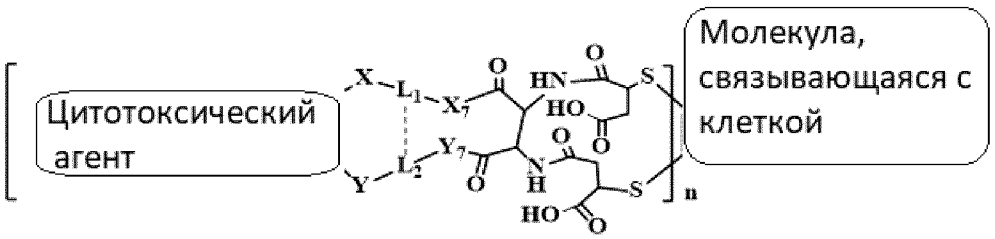
(I-o)



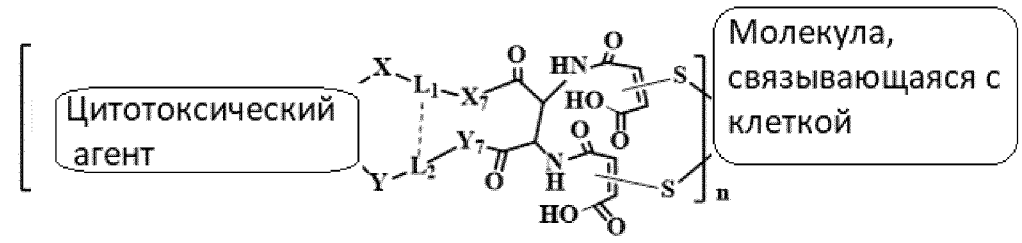
(I-p)



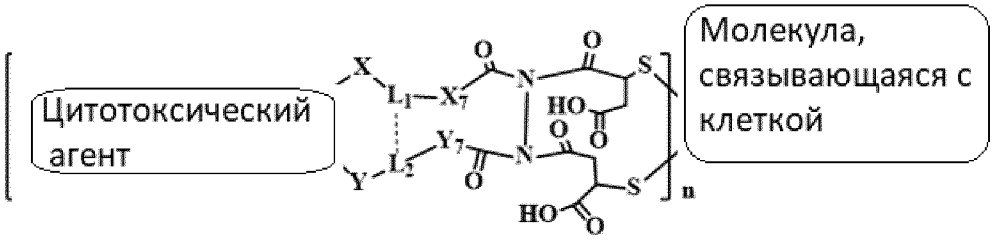
(I-q)



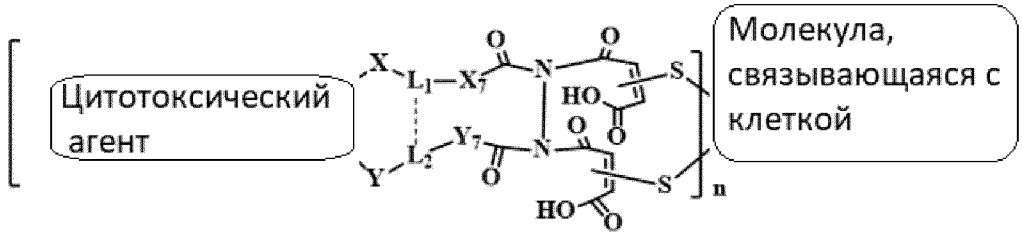
(I-r)



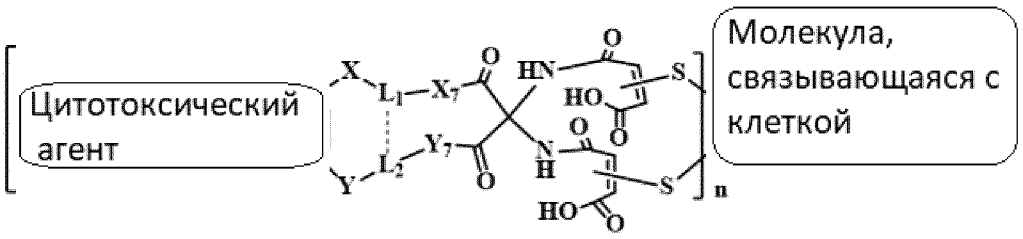
(I-s)



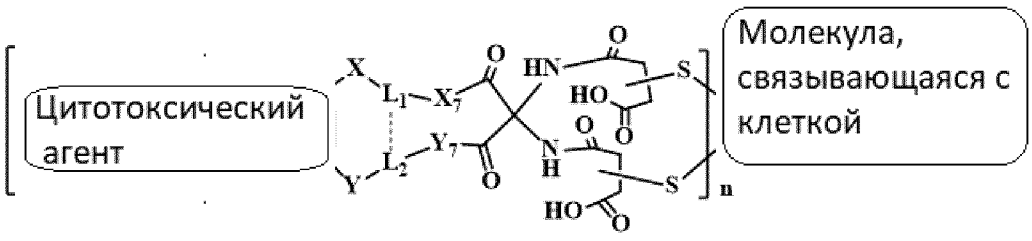
(I-t)



(I-u)



(I-v)



(I-w)

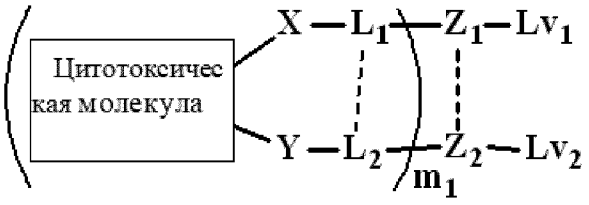
где X_7 и Y_7 независимо представляют собой CH, CH_2, NH, O, S, NHNH, $N(R_1)$ и N; химическая связь между двумя атомов означает, что она может соединять любые смежные атомы; «-----», X, Y, R_1, n, L_1 и L_2 являются такими, как описано выше; цитотоксический агент представляет собой ту же самую цитотоксическую молекулу, описанную выше.

В более предпочтительном аспекте X и Y независимо представляют собой амино, гидрокси, диамино, аминогидрокси, дигидрокси, карбокси, альдегидо, гидразино, тиольную, фосфатную или сульфонильную группу в ароматическом кольце.

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С МОЛЕКУЛАМИ, СВЯЗЫВАЮЩИМИСЯ С КЛЕТКОЙ, С ПОМОЩЬЮ БИС-СВЯЗЫВАНИЯ

Получение конъюгатов лекарственных средств с молекулами, связывающимися с клетками, согласно настоящему изобретению, и пути синтеза для получения конъюгатов с помощью бис-связывания, представлены на Фиг. 1-46.

В одном аспекте данное изобретение относится к реакционноспособному бис-линкеру, содержащему цитотоксическую молекулу Формулы (II) ниже, в котором два или более остатка молекулы, связывающейся с клеткой, могут одновременно или последовательно приводится в контакт с ним с образованием Формулы (I).



(II)

где:

«——» представляет собой одинарную связь;

«------» представляет собой необязательно либо одинарную связь, либо двойную связь, либо тройную связь или может необязательно отсутствовать;

При условии, что когда ----- представляет собой тройную связь, как Lv_1, так и Lv_2 отсутствуют;

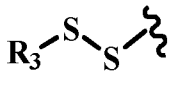
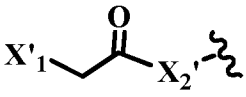
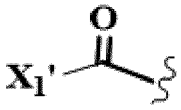
Цитотоксическая молекула в каркасе, m_1, X, Y, L_1, L_2, Z_1, и Z_2 являются такими же, как определено в Формуле (I);

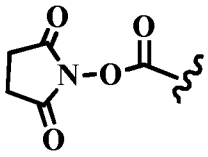
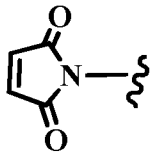
Lv_1 и Lv_2 представляют собой одинаковую или различную уходящую группу, которая может реагировать с тиольной, амино, карбоксильной, селенольной, фенольной или гидроксильной группой в молекуле, связывающейся с клеткой. Lv_1 и Lv_2 независимо выбраны из OH; F; Cl; Br; I; нитрофенола; N-гидроксисукцинимида (NHS); фенола; динитрофенола; пентафторфенола; тетрафторфенола; дифторфенола; монофторфенола; пентахлорфенола; трифлата; имидазола; дихлорфенола; тетрахлорфенола; 1-гидроксибензотриазола; тозилата; мезилата; 2-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфоната, простых и смешанных ангидридов, например, уксусного ангидрида, формил ангидрида; или интермедиата, полученного с помощью реагента конденсации для реакций пептидного сочетания или для реакций Мицунобу. Примерами реагентов конденсации являются: EDC (N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид), DCC (дициклогексилкарбодиимид), N, N'-диизопропилкарбодиимид (DIC), N-циклогексил-N'-

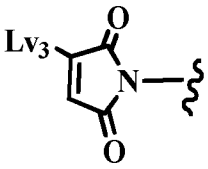
(2-морфолино-этил)карбодиимид мезо п-толуолсульфонат (CMC или CME-CDI), 1,1'-карбонилдиимидазол (CDI), TBTU (O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония тетрафторборат), N,N,N',N'-тетраметил-O-(1H-бензотриазол-1-ил)урония гексафторфосфат (HBTU), (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфонийгексафторфосфат(BOP), (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфонийгексафторфосфат (PyBOP), диэтилцианофосфонат (DEPC), хлор-N,N,N',N'-тетраметилформамидинийгексафторфосфат, 1-[бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния-3-оксид гексафторфосфат (HATU), 1-[(диметиламино)(морфолино)метилен]-1H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-1-ий 3-оксид гексафторфосфат (HDMA), 2-хлор-1,3-диметилимидазолидиния гексафторфосфат (CIP), хлортрипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyCloP), фтор-N,N,N',N'-бис(тетраметилен)формамидиния гексафторфосфат (BTFFH), N,N,N',N'-тетраметил-S-(1-оксидо-2-пиридил)тиурония гексафторфосфат, O-(2-оксо-1(2H)пиридил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний тетрафторборат (TPTU), S-(1-оксидо-2-пиридил)-N,N,N',N'-тетраметилтиуроний тетрафторборат, O-[(этоксикарбонил)-цианометиленамино]-N,N,N',N'-тетраметилуронийгексафторфосфат (HOTU), (1-циано-2-этокси-2-оксоэтилиденаминокси)диметиламиноморфолинокарбений гексафторфосфат (COMU), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-бис(тетраметилен)уроний гексафторфосфат (HBPyU), N-бензил-N'-циклогексилкарбодиимид (связанный или нет с полимером), дипирролидино (N-сукцинимидилокси)карбений гексафторфосфат (HSPyU), хлордипирролидинокарбения гексафторфосфат (PyClU), 2-хлор-1,3-диметилимидазолидин тетрафторбират (CIB), (бензотриазол-1-илокси)дипиперидинокарбений гексафторфосфат (HBPipU), O-(6-хлорбензотриазол-1-ил)-N,N,N′,N′-тетраметилуроний тетрафторборат (TCTU), бромтрис(диметиламино)фосфоний гексафторфосфат (BroP) пропилфосфоновый ангидрид PPACA, T3P®) , 2-морфолиноэтилизоцианид (MEI), N,N,N′,N′-тетраметил-O-(N-сукцинимидил)уроний гексафторфосфат (HSTU), 2-бром-1-этилпиридиний тетрафторборат (BEP) , O-[(этоксикарбонил)цианометиленамино]-N,N,N′,N′-тетраметилуроний тетрафторборат (TOTU), 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолинийхлорид (MMTM, DMTMM), N,N,N′,N′-тетраметил-O-(N-сукцинимидил)уроний тетрафторборат (TSTU), O-(3,4-дигидро-4-оксо-1,2,3-бензотриазин-3-ил)-N,N,N′,N′-тетраметилуроний тетрафторборат (TDBTU), 1,1'-(азодикарбонил)дипиперидин (ADD), ди-(4-хлорбензил)азодикарбоксилат (DCAD), ди-трет-бутилазодикарбоксилат (DBAD), диизопропилазодикарбоксилат (DIAD),

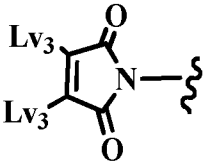
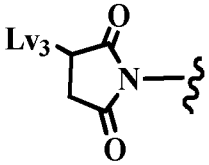
диэтилазодикарбоксилат (DEAD). Кроме того, Lv_1 и Lv_2 могут быть простым или смешанным ангидридом, кислот C_1~C_8;

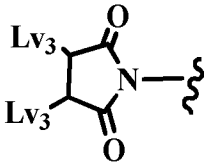
Предпочтительно, Lv_1 и Lv_2 независимо выбраны из галогенида (например, фторида, хлорида, бромида и йодида), метансульфонила (мезила), толуолсульфонила (тозила), трифторметилсульфонила (трифлата), трифторметилсульфоната, нитрофеноксила, N-сукцинимидилгидроксила (NHS) феноксила; динитрофеноксила; пентафторфеноксила, тетрафторфеноксила, трифторфеноксила, дифторфеноксила, монофторфеноксила, пентахлорфеноксила, 1H-имидазол-1-ила, хлорфеноксила, дихлорфеноксила, трихлорфеноксила, тетрахлорфеноксила, N-(бензотриазол-ил)оксила, 2-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфонила, фенилоксадиазолсульфонила (-сульфон-ODA), 2-этил-5-фенилизоксазолий-ила, фенилоксадиазолила (ODA), оксадиазолила, ненасыщенного атома углерода (двойная или тройная связь между атомами углерод-углерод, углерод-азот, углерод-сера, углерод-фосфор, сера-азот, фосфор-азот, кислород-азот или углерод-кислород) или одной из следующих структур:

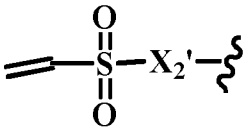
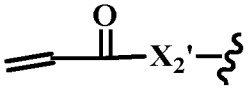
 дисульфид;  галогенацетил;  ацилгалогенид (галогенангидрид);

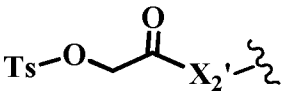
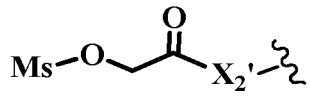
 сложный эфир *N*-гидроксисукцинимида;  малеимид;

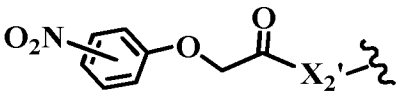
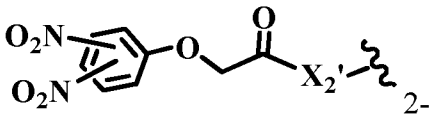
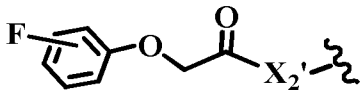


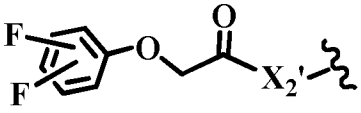
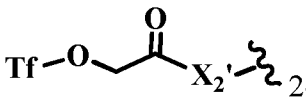
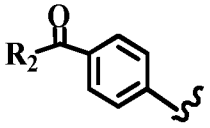
 монозамещенный малеимид; дизамещенный малеимид; 

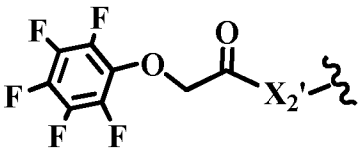
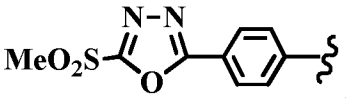
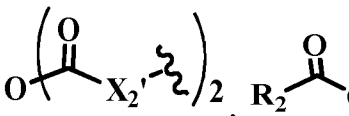
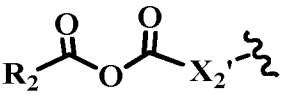
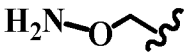
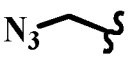
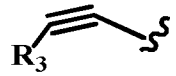
 монозамещенный сукцинимид; дизамещенный сукцинимид; -CHO альдегид;

 этенсульфонил;  акрил (акрилоил);

 2-(тозилокси)ацетил;  2-(мезилокси)ацетил;

 2-(нитрофенокси)ацетил;  2-(динитрофенокси)ацетил;  2-(фторфенокси)ацетил;

 2-(дифторфенокси)ацетил;  2-(((трифторметил)сульфонил)окси)ацетил;  кетон или альдегид,

 2-(пентафторфенокси)ацетил;  , метилсульфонфенилоксадиазол (ODA);  ,  ангидрид кислоты,  алкилоксиамино;  азидо,  алкинил или  гидразид, где X_1' представляет собой F, Cl, Br, I или Lv_3; X_2' представляет собой O, NH, N(R_1), или CH_2; R_3 независимо представляет собой H, ароматическую, гетероароматическую или ароматическую группу, где один или более атомов H независимо заменены на -R_1, -галоген, -OR_1, -SR_1, -NR_1R_2, - NO_2, -S(O)R_1,-$S(O)_2R_1$, или -$COOR_1$; Lv_3 представляет собой уходящую группу, выбранную из F, Cl, Br, I, нитрофенола; N-гидроксисукцинимида (NHS); фенола; динитрофенола; пентафторфенола, тетрафторфенола, дифторфенола, монофторфенола, пентахлорфенола, трифлата; имидазола; дихлорфенола, тетрахлорфенола, 1-гидроксибензотриазола; тозилата; мезилата; 2-этил-5-фенилизоксазолий-3′-сульфоната, простых и смешанных ангидридов, например, уксусного ангидрида, формил ангидрида; или интермедиата, полученного с

помощью реагента конденсации для реакций пептидного сочетания или для реакций Мицунобу;

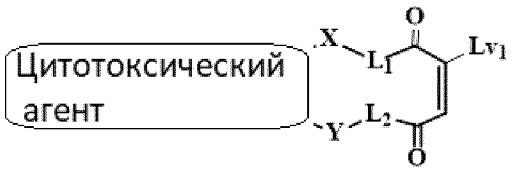
R_1 и R_2 независимо выбраны из H, C_1-C_8 алкила, C_2-C_8 алкенила, гетероалкила, алкилциклоалкила или гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила или гетероарила или C_2-C_8 сложных эфиров, простого эфира или амида; или пептидов, содержащих 1-8 аминокислот; или полиэтиленоксигруппы, имеющей формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 0 до около 5000, или комбинации из вышеуказанных групп.

Кроме того, функциональные группы X или Y, которые обеспечивают связывание лекарственного средства или цитотоксического агента, предпочтительно включают группы, которые обеспечивают связывание через дисульфидную, простотиоэфирную, сложнотиоэфирную, пептидную, гидразонную, сложноэфирную, карбаматную, карбонатную, алкоксимную или амидную связь. Такие функциональные группы включают, но не ограничиваются ими, тиол, дисульфид, амино, карбоксил, альдегиды, кетон, малеимидо, галогенацетил, гидразины, алкоксиамино и/или гидрокси;

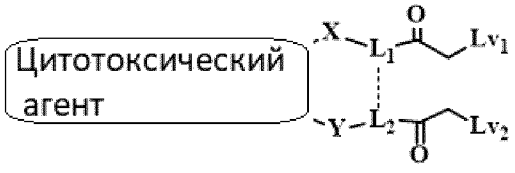
Предпочтительно бис-связывание конъюгата дополнительно представлено Формулами (II-a), (II-b), (II-c), (II-d), (II-e), (II-f), (II-g), (II-h), (II-i), (II-j), (II-k), (II-m), (II-n), (II-o), (II-q), (II-r), (II-s), (II-t), (II-u), (II-v), (II-w), (II-x), (II-y), (II-z), (II-a1), (II-a2), (II-a3) и (II-a4):



(II-a),



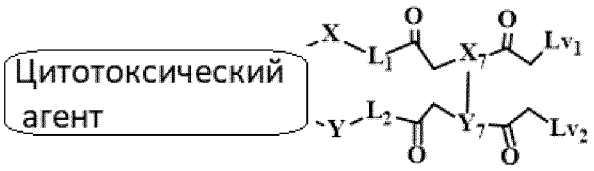
(II-b),



(II-c),



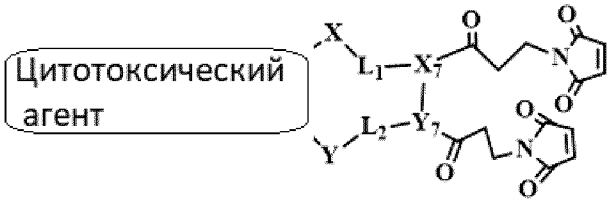
(II-d),



(II-e),



(II-f),



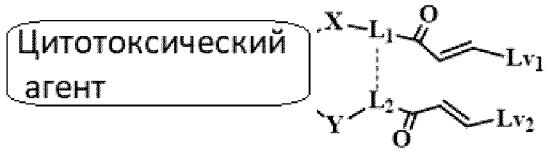


(II-g),

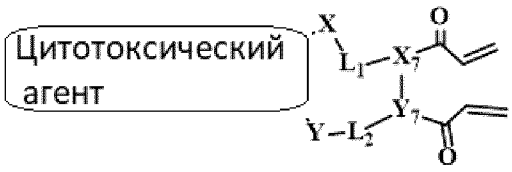
(II-h),

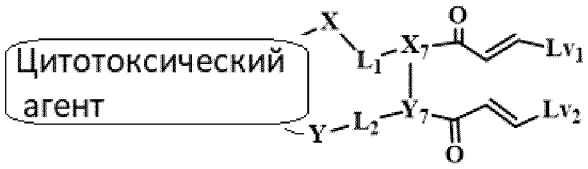


(II-i),



(II-j),





(II-k);

(II-l);



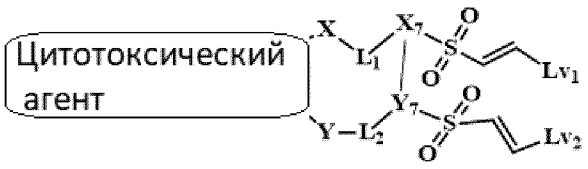


(II-m),

(II-o),



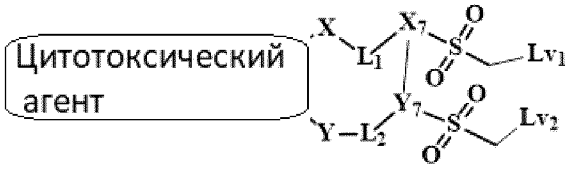
(II-p),



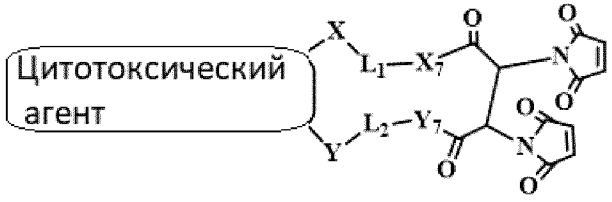
(II-q),



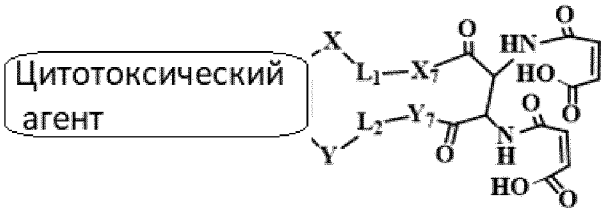
(II-r),



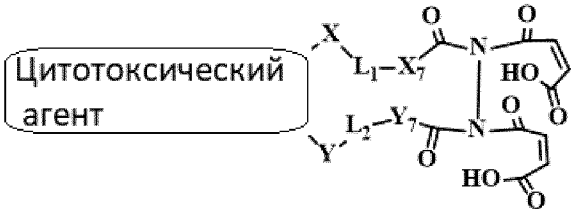
(II-s)



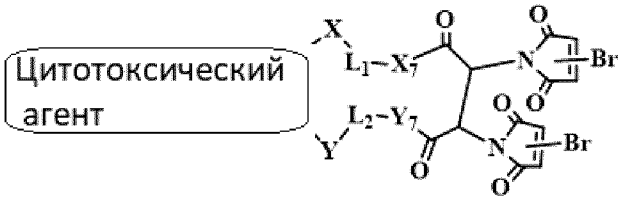
(II-t),



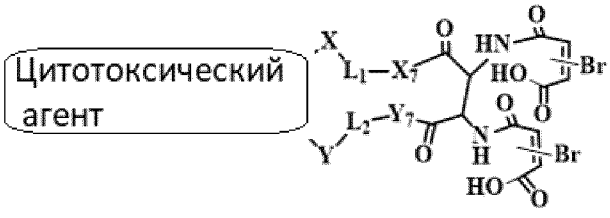
(II-u),



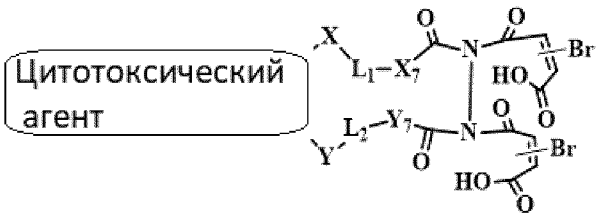
(II-v),



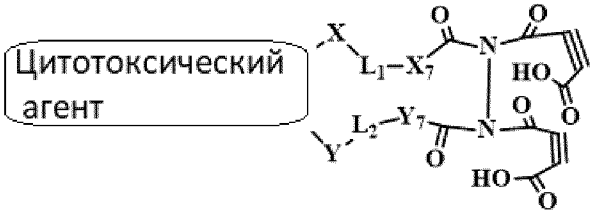
(II-w),



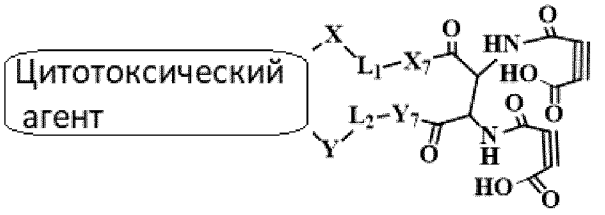
(II-x),



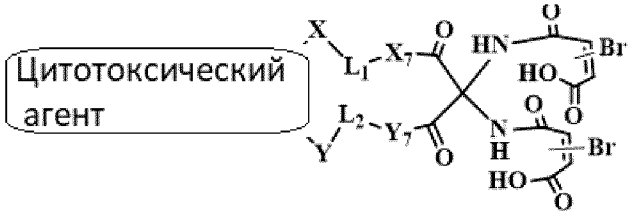
(II-y),



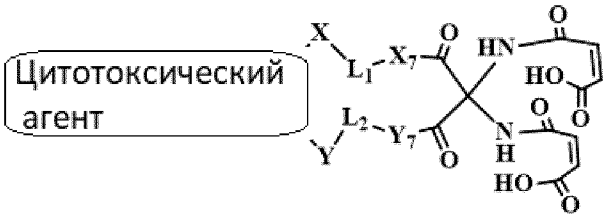
(II-z),



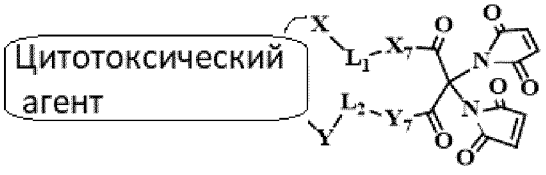
(II-a1),



(II-a2)



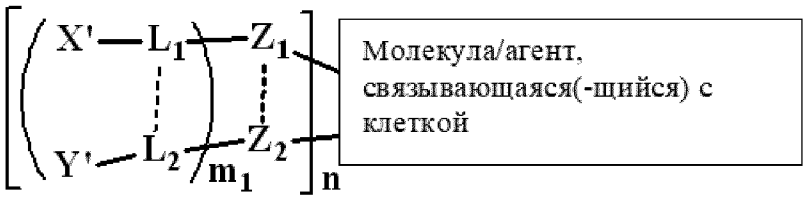
(II-a3),



(II-a4),

где X_7 и Y_7 независимо представляют собой CH, CH_2, NH, O, S, NHNH, $N(R_1)$ и N; X, Y, R_1, n, «-----», L_1 и L_2 являются такими, как описано выше; химическая связь между двумя атомами означает, что она может связывать любой из смежных двух атомов; R_1, X, Y, n, L_1, L_2, Lv_1 и Lv_2 являются такими как описано выше. Предпочтительно Lv1 и Lv2 независимо выбраны из Cl, Br, I, метансульфонила (мезила), толуолсульфонила (тозила), трифторметилсульфонила (трифлата), трифторметилсульфоната и нитрофеноксила.

В другом аспекте данное изобретение относится к реакционноспособному бис-линкеру, конъюгированному с агентом/молекулой, связывающимся с клеткой Формулы (III) ниже, в котором две или более функциональных группы цитотоксической молекулы могут контактировать с ним одновременно или последовательно с образованием Формулы (I):



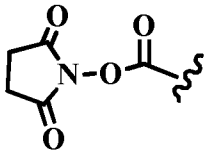
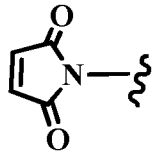
(III)

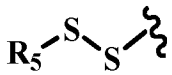
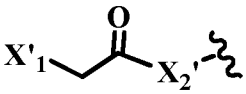
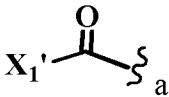
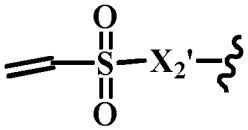
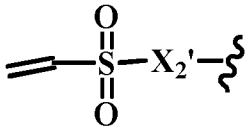
где:

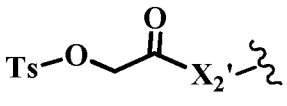
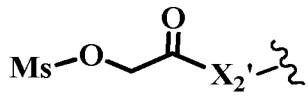
m_1, n, «------», агент/молекула, связывающийся с клеткой, L_1, L_2, Z_1, и Z_2 являются такими, как определено в Формуле (I);

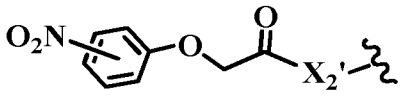
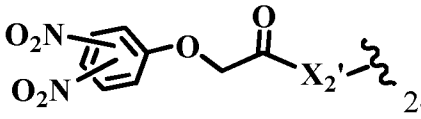
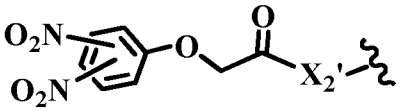
X 'и Y' представляют собой функциональную группу, которая может независимо или последовательно контактировать с группами остатков цитотоксического лекарственного средства с образованием X и Y соответственно, причем X и Y являются такими, как определено в Формуле (I);

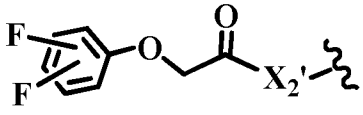
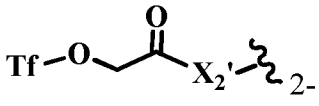
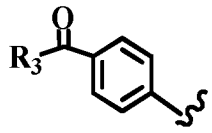
X' и Y' предпочтительно представляют собой независимо дисульфидный заместитель, малеимидо, галогенацетил, алкоксиамин, азидо, кетон, альдегид, гидразин, амино, гидроксил, карбоксилат, имидазол, тиол или алкин; или сложный эфир N-гидроксисукцинимида, пара-нитрофениловый сложный эфир, динитрофениловый сложный эфир, пентафторфениловый сложный эфир, пентахлорфениловый сложный эфир; тетрафторфениловый сложный эфир; дифторфениловый сложный эфир; монофторфениловый сложный эфир; или пентахлорфениловый сложный эфир, дихлорфениловый сложный эфир, тетрахлорфениловый сложный эфир или 1-гидроксибензотриазольный сложный эфир; трифлат, мезилат или тозилат; 2-этил-5-фенилизоксазолиум-3'-сульфонат; пиридилдисульфид или нитропиридилдисульфид; малеимид, галогенацетат, ацетилендикарбоксильную группу или галогенат карбоновой кислоты (фторид, хлорид, бромид или йодид). Предпочтительно X и Y имеют одну из следующих структур:

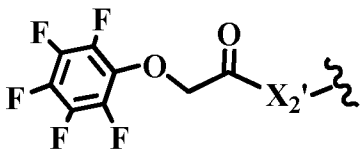
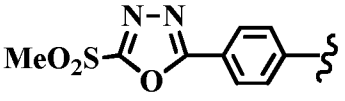

сложный эфир N-гидроксисукцинимида;

малеимид;

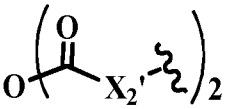
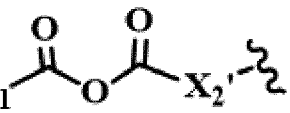
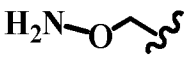
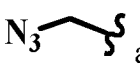
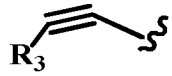

Дисульфид;

галогенацетил;

ацилгалогенид (галогенангидрид);

этенсульфонил;

акрил (акрилоил);


2-(тозилокси)ацетил; 
2-(мезилокси)ацетил;


2-(нитрофенокси)ацетил; 
2-(динитрофенокси)ацетил; 
2-(фторфенокси)ацетил;

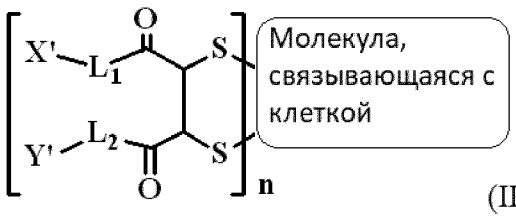

2-(дифторфенокси)ацетил; 
(((трифторметил)сульфонил)окси)ацетил; 
кетон или альдегид,


2-(пентафторфенокси)ацетил; 
,

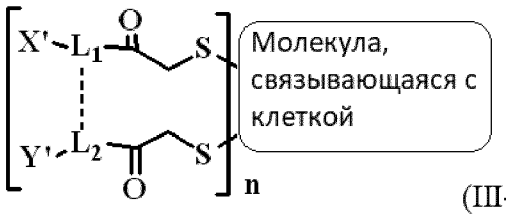
метилсульфонфенилоксадиазол (ODA); 
, 
ангидрид кислоты, 
алкилоксиамино; 
азидо, 
алкинил или 
гидразид, где X_1' представляет собой F, Cl, Br, I или Lv_3; X_2' представляет собой O, NH, N(R_1), или CH_2; R_3 и R_5 представляют собой H, R_1, ароматическую, гетероароматическую или ароматическую группу, где один или более атомов H независимо заменены на -R_1, -галоген, -OR_1, -SR_1, -NR_1R_2, - NO_2, -$S(O)R_1$, -$S(O)_2R_1$, или -$COOR_1$; Lv_3 представляет собой уходящую группу, выбранную из метансульфонила (мезила), толуолсульфонила (тозила), трифторметилсульфонила (трифлата), трифторметансульфоната, нитрофеноксила; N-гидроксисукцинимидила (NHS); феноксила; динитрофеноксила; пентафторфеноксила, тетрафторфеноксила, трифторфеноксила, дифторфеноксила, монофторфеноксила, пентахлорфеноксила, 1H-имидазол-1-ила; хлорфеноксила, дихлорфеноксила, трихлорфеноксила, тетрахлорфеноксила, N-(бензотриазолил)оксила, 2-этил-5-фенилизоксазолий-ила, фенилоксадиазолила (ODA), оксадиазолила или интермедиата, полученного с помощью

реагента конденсации для реакций Мицунобу, где R_1 и R_2 являются такими, как определено выше;

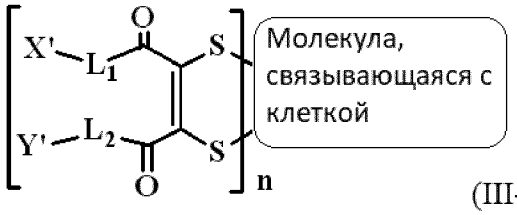
Предпочтительно бис-линкер для получения конъюгата дополнительно представлен Формулами (III-a), (III-b), (III-c), (III-d), (III-e), (III-f), (III-g), (III-h), (III-i), (III-j), (III-k), (III-l), (III-m), (III-n), (III-o), (III-p), (III-r), (III-s), (III-t), (III-u), (III-v) и (III-w) ниже:



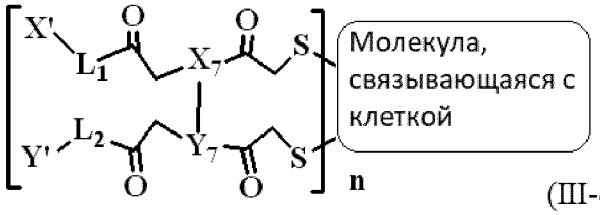
(III-a),



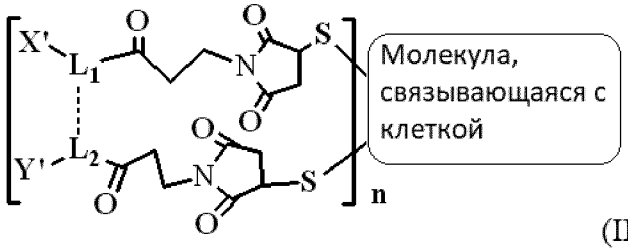
(III-b),



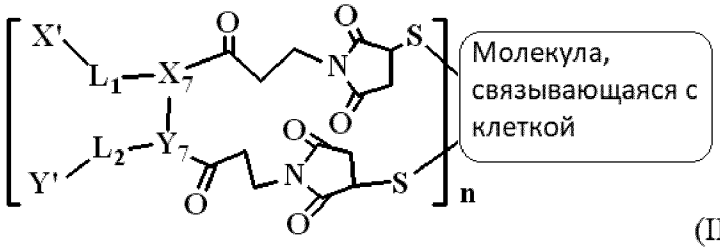
(III-c),



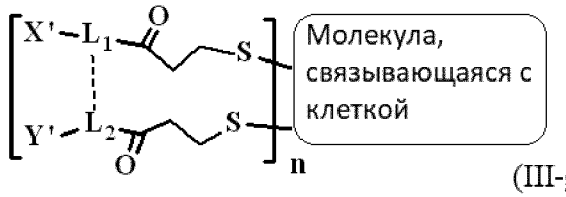
(III-d),



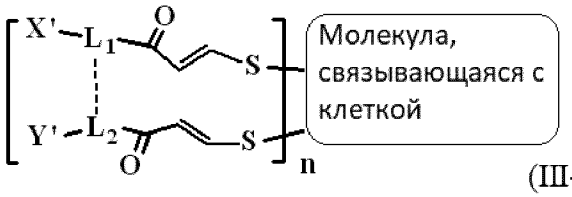
(III-e),



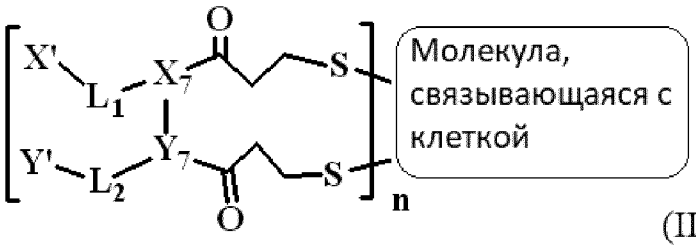
(III-f),



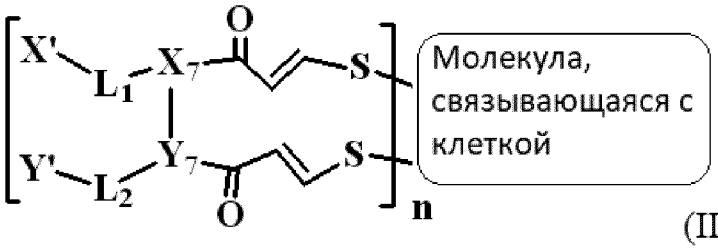
(III-g),



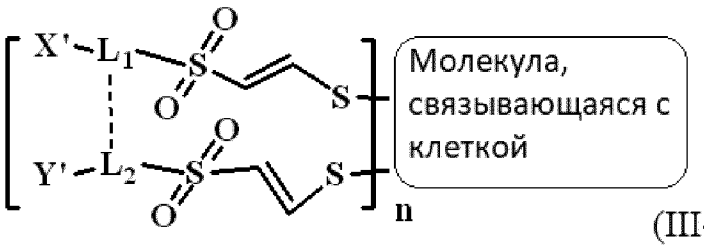
(III-h)



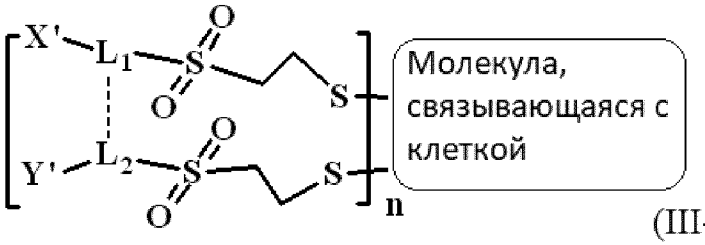
(III-i),



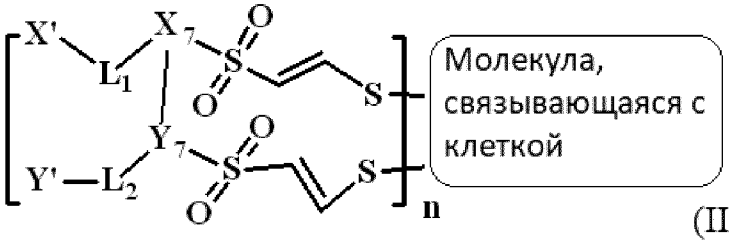
(III-j)



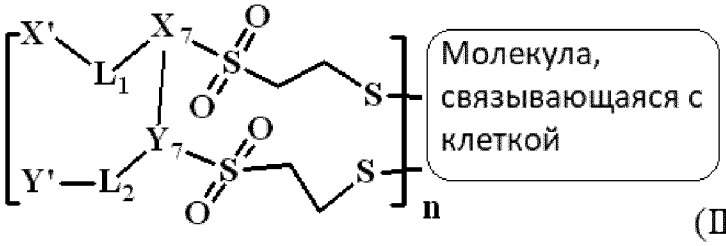
(III-k),



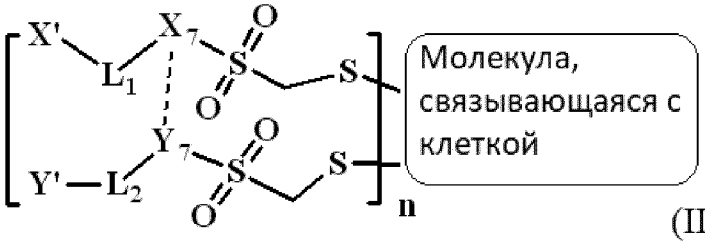
(III-l)



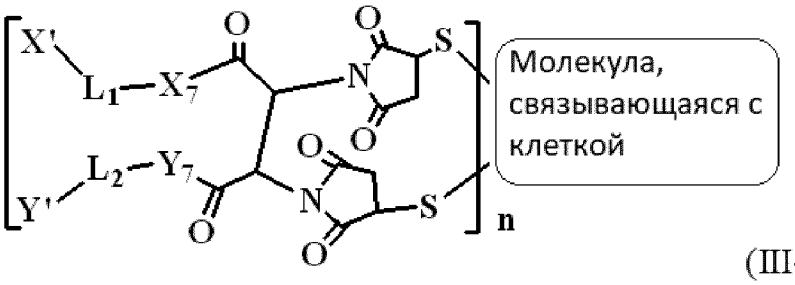
(III-m)



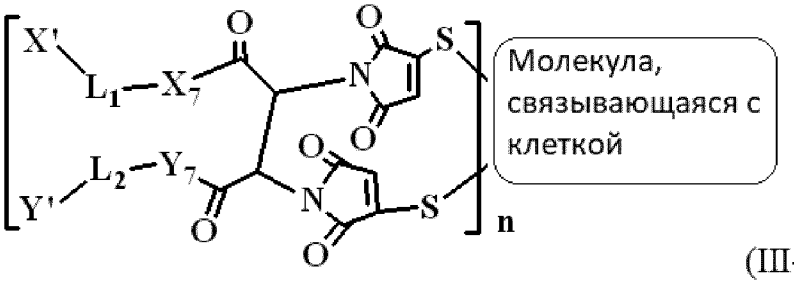
(III-n)



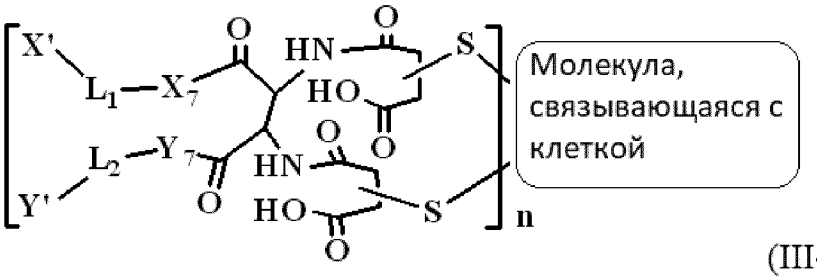
(III-o)



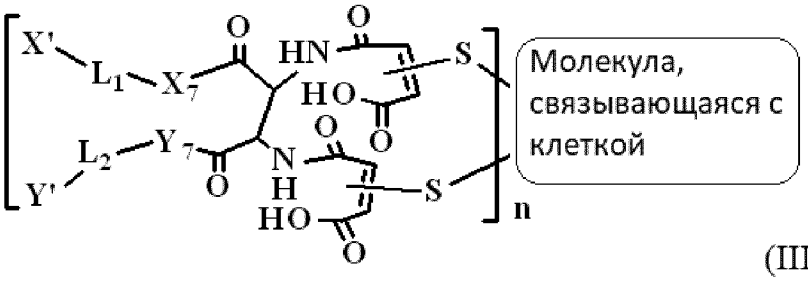
(III-p),



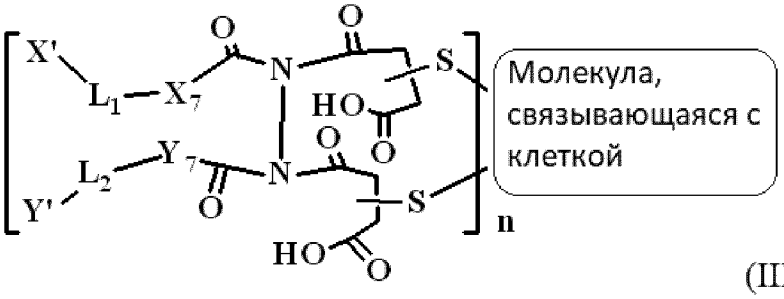
(III-q),



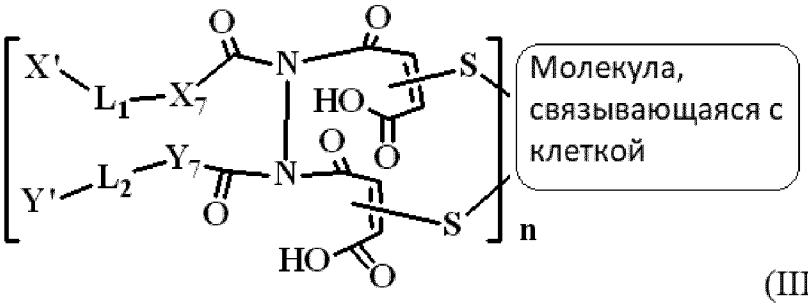
(III-r),



(III-s),



(III-t),

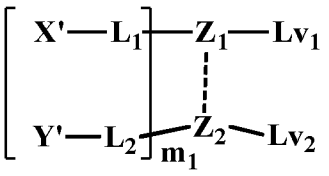


(III-u),

где X_7 и Y_7

независимо представляют собой CH, CH_2, NH, O, S, NHNH, $N(R_1)$, и N; химическая связь между двумя атомами означает, что она может связывать любой из смежных двух атомов; R_1, X', Y', n, L_1 и L_2 являются такими, как описано выше.

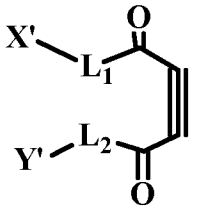
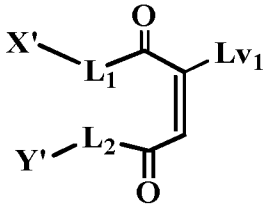
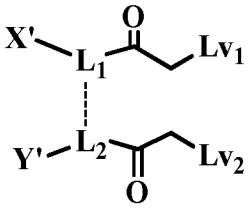
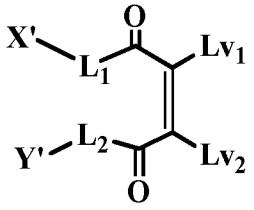
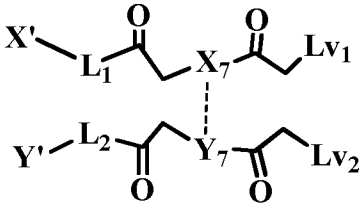
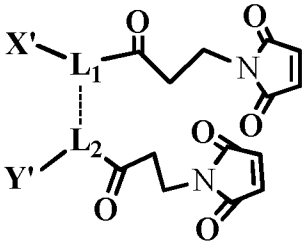
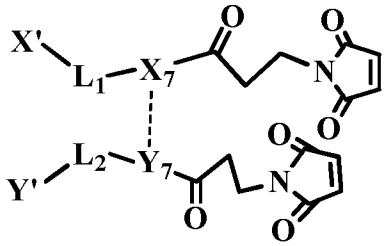
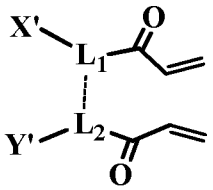
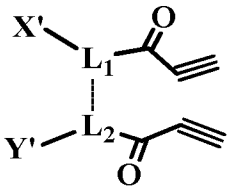
В другом аспекте данное изобретение предлагает реакционноспособный бис-линкер Формулы (IV), приведенной ниже, в которой цитотоксическая молекула и молекула, связывающаяся с клеткой, могут независимо, одновременно или последовательно контактировать с ним с образованием Формулы (I):

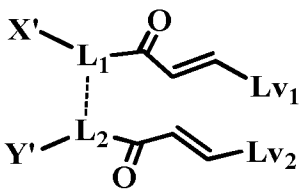


(IV).

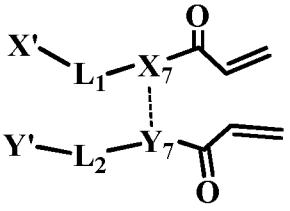
где «-----», m_1, L_1, L_2, Z_1 и Z_2 являются такими, как определено в Формуле (I); Lv_1 и Lv_2 являются такими, как определено в Формуле (II), и X', и Y' являются такими, как определено в Формуле (III);

Предпочтительно бис-линкер для получения конъюгата дополнительно представлен Формулами (IV-a), (IV-b), (IV-c), (IV-d), (IV-e), (IV-f), (IV-g), (IV-h), (IV-i), (IV-j), (IV-k), (IV-m), (IV-n), (IV-o), (IV-p), (IV-q), (IV-r) и (IV-s):

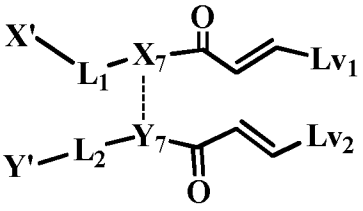

(IV-a),

(IV-b),

(IV-c),

(IV-d),

(IV-e),

(IV-f),

(IV-g),

(IV-h),

(IV-i),



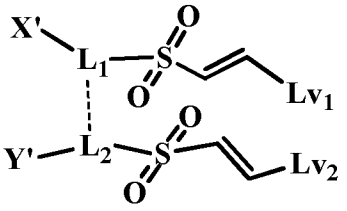
(IV-j),



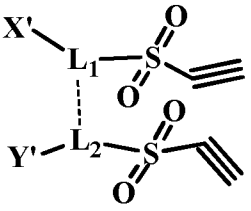
(IV-k);



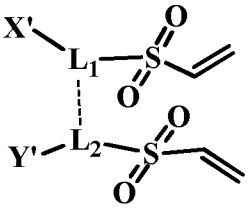
(IV-l);



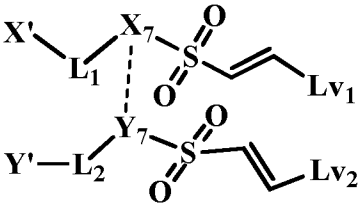
(IV-m),



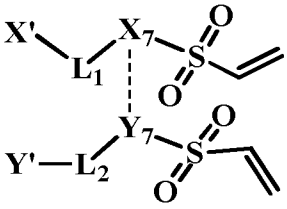
(IV-o),



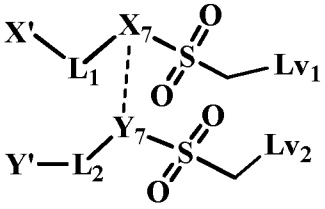
(IV-p),



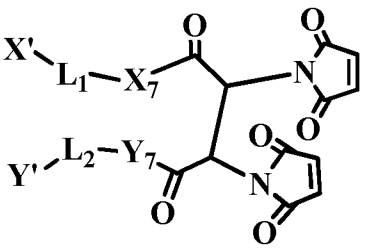
(IV-q),



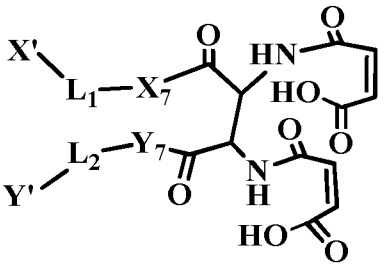
(IV-r),



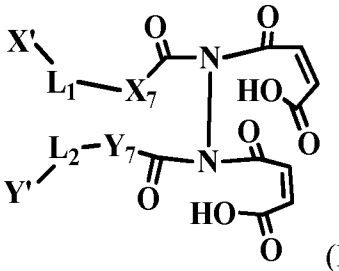
(IV-s),



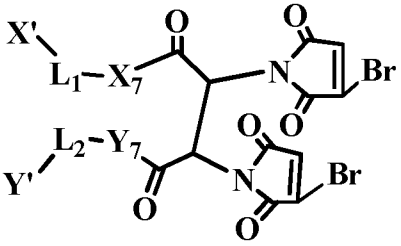
(IV-t),



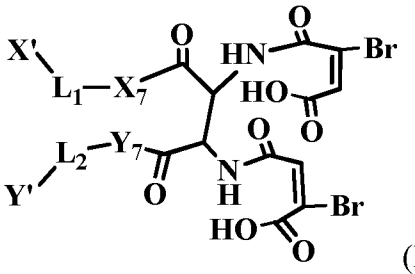
(IV-u),



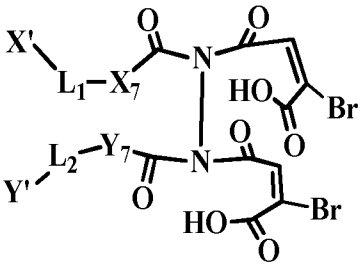
(IV-v),



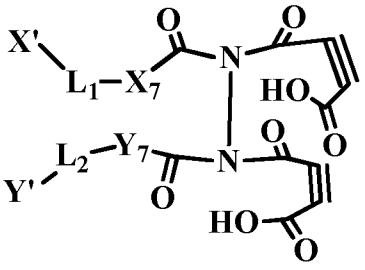
(IV-w),



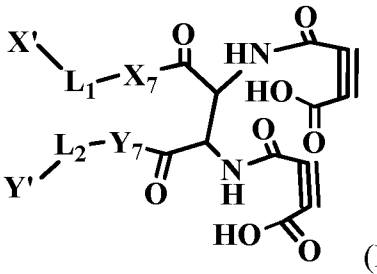
(IV-x),



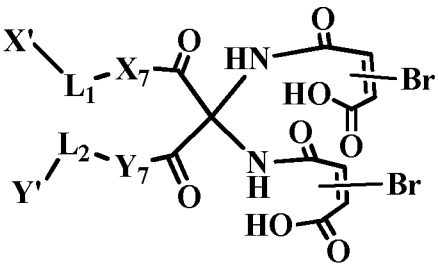
(IV-y),



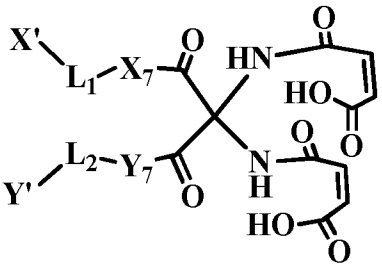
(IV-z),



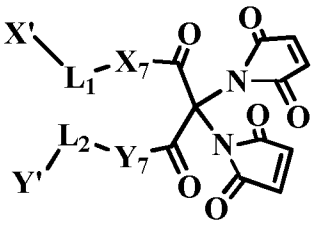
(IV-a1),



(IV-a2),



(IV-a3),



(IV-a4),

где X_7 и Y_7 независимо представляют собой CH, CH_2, NH, O, S, NHNH, $N(R_1)$ и N; химическая связь между двумя атомами означает, что она может связывать любой из смежные двух атомов; «-----», R_1, X', Y', n, L_1 и L_2являются таким, как описано выше.

Примерами функциональных групп X' или Y', которые обеспечивают взаимодействие с концевой амино или гидроксильной группой лекарственного средства/цитотоксического агента, могут быть, но не ограничиваются ими, сложные эфиры N-гидроксисукцинимида, пара-нитрофениловые сложные эфиры, динитрофениловые сложные эфиры, пентафторфениловые сложные эфиры, хлориды карбоновых кислот или ангидриды карбоновых кислот; с концевым тиолом цитотоксического агента могут быть, но не ограничиваясь ими, пиридилдисульфиды, нитропиридилдисульфиды, малеимиды, галогенацетаты, метилсульфонфенилоксадиазол (ODA), хлориды карбоновых кислот и ангидрид карбоновой кислоты; с концевым кетоном или альдегидом могут быть, но не ограничиваясь ими, амины, алкоксиамины, гидразины, ациloксиламины или гидразид; с концевым азидом может быть, но не ограничиваясь этим, алкин.

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ

Конъюгаты Формулы (I) могут быть получены через промежуточные соединения Формул (II), (III) или (IV) соответственно. Некоторые примеры Формулы (II) структурно представлены на Фиг. 1-40. Для синтеза конъюгата Формулы (I), как правило, две

функциональные группы в лекарственном средстве или цитотоксичной молекуле сначала приводят в контакт последовательно или одновременно с X' группой и Y' группой линкера Формулы (IV) в химическом растворителе или в водной среде, содержащей 0,1-99,5% органических растворителей, или в 100% водной среде с образованием соединения Формулы (II). Затем соединение Формулы (II) может быть необязательно сначала изолировано или может немедленно или одновременно, или последовательно приведено в контакт с двумя или более остатками молекулы, связывающейся с клеткой, предпочтительно с парой свободных тиолов, образующихся в результате восстановления дисульфидных связей молекулы, связывающейся с клеткой, при 0-60°C, pH 5~9, в водной среде с добавлением или без добавления 0~30% смешиваемых с водой (смешивающихся) органических растворителей, таких как DMA, ДМФА, этанол, метанол, ацетон, ацетонитрил, ТГФ, изопропанол, диоксан, пропиленгликоль или этилендиол с образованием конъюгата Формулы (I).

Альтернативно, конъюгаты Формулы (I) также могут быть получены посредством первой реакции линкеров Формулы (IV) с двумя или более остатками молекулы, связывающейся с клеткой, предпочтительно с парой свободных тиолов, образующихся в результате восстановления дисульфидных связей молекулы, связывающейся с клеткой, при 0-60 °C, pH 5-9, в водной среде с добавлением или без добавления 0~30% смешиваемых с водой (смешивающихся) органических растворителей с образованием модифицированной молекулы, связывающейся с клеткой, Формулы (III). Пары тиолов являются предпочтительными парами дисульфидных связей, восстановленных из дисульфидных связей внутренней цепи молекулы, связывающейся с клеткой, посредством восстанавливающего агента, который может быть выбран из дитиотреитола (DTT), дитиоэритритола (DTE), L-глютатиона (GSH), трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP), 2-меркаптоэтиламина (β-MEA), или/и бета меркаптоэтанола (β-ME, 2-ME) при pH 4~9 в водной среде с добавлением или без добавления 0~30% смешиваемых с водой (смешивающихся) органических растворителей. Реакционноспособные группы X' и Y' Формулы (III), которые могут быть независимо дисульфидом, тиолом, сложным тиоэфиром, малеимидо, галогенацетилом, азидом, 1-ином, кетоном, альдегидом, алкоксиамино, трифлатом, карбонилимидазолом, тозилатом, мезилатом, 2-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфонатом или сложными эфирами карбоновых кислот и нитрофенолом, N-гидроксисукцинимидом (NHS), фенолом; динитрофенолом, пентафторфенолом, тетрафторфенолом, дифторфенолом, монофторфенолом, пентахлорфенолом, дихлорфенолом, тетрахлорфенолом, 1-гидроксибензотриазолом,

ангидридами или гидразидами, или другими производными сложных эфиров кислоты, которые могут затем приводить в контакт с двумя группами лекарственного средства/цитотоксического агента, одновременно или последовательно при 0-60°C, pH 4~9,5 в водной среде с добавлением или без добавления 0~30% смешиваемых с водой (смешивающихся) органических растворителей с получением конъюгата Формулы (I) после очистки на колонке или диализа. Реактивные группы лекарственного средства/цитотоксического агента приводят в контакт с модифицированной молекулой, связывающейся с клеткой, Формулы (III) соответственно различными способами. Например, связь, содержащая дисульфидные связи в конъюгатах "агент, связывающийся с клеткой-лекарственное средство" Формулы (I), достигается дисульфидным обменом между дисульфидной связью в модифицированном агенте, связывающимся с клеткой, Формулы (III) и лекарственным средством, содержащим свободную тиольную группу; связь, содержащая простотиоэфирные связи в конъюгатах "агент, связывающийся с клеткой-лекарственное средство" Формулы (I), получается взаимодействием модифицированного малеимидо или галогенацетил, или этилсульфонил агента, связывающегося с клеткой, Формулы (III) и лекарственного средства, содержащего свободную тиоловую группу; связь, содержащая кислотно лабильную гидразоновую связь в конъюгатах, может быть получена взаимодействием карбонильной группы лекарственного средства или соединения Формулы (III) с гидразидным фрагментом соединения Формулы (III) или лекарственного средства, соответственно, способами известными в данной области техники (см., например, P. Hamann et al., Cancer Res. 53, 3336-34, 1993; B. Laguzza et al., J. Med. Chem., 32; 548-55, 1959; P. Trail et al., Cancer Res., 57; 100-5, 1997); связь, содержащая связь триазола в конъюгатах, может быть получена взаимодействием 1-иновой группы лекарственного средства или соединения Формулы (III) с азидным фрагментом другого аналога, соответственно, посредством клик химии (циклоприсоединение по Хьюсгену) (Lutz, J-F. et al, 2008, Adv. Drug Del. Rev.60, 958–70; Sletten, E. M. et al 2011, AccChem. Research 44, 666–76). Связь, содержащая связь оксима в конъюгатах "агент, связывающийся с клеткой-лекарственное средство", связанных через оксим, получается взаимодействием кето- или альдегидогруппы в модифицированном агенте, связывающимся с клеткой Формулы (III) или лекарственном средстве с оксиамин группой в лекарственном средстве или модифицированном агенте, связывающимся с клеткой, Формулы (III) соответственно. Тиолсодержащее лекарственное средство может взаимодействовать с модифицированным линкером молекулы, связывающейся с клеткой, Формулы (III), содержащим малеимидо, или галогенацетил, или этилсульфонильный

заместитель при pH 5,5-9,0 в водном буфере, с образованием простотиоэфирной связи в конъюгате “агент, связывающийся с клеткой-лекарственное средство” Формулы (I). Тиолсодержащее лекарственное средство может подвергаться дисульфидному обмену с модифицированным линкером Формулы (III), содержащим пиридилдитио-фрагмент, с образованием конъюгата, содержащим дисульфидную связь. Лекарственное средство, содержащее гидроксильную группу или тиоловую группу, может взаимодействовать с модифицированным мостиковым линкером Формулы (III), содержащим галоген, в частности альфа-галогенкарбоксилатом, в присутствии мягкого основания, например, pH 8,0-9,5, с получением модифицированного лекарственного средства, содержащего простоэфирную или простую тиоэфирную связь. Гидроксильную группу в лекарственном средстве можно конденсировать со сшивающим линкером Формулы (IV), несущим карбоксильную группу, в присутствии дегидратирующего агента, такого как EDC или DCC, для получения сложноэфирной связи, и затем целевой модифицированный лекарственным средством мостиковый линкер Формулы (III) подвергается конъюгированию с молекулой, связывающейся с клеткой. Лекарственное средство, содержащее аминогруппу, может конденсироваться с группой карбоксилового сложного эфира NHS, имидазола, нитрофенола; N-гидроксисукцинимида (NHS); фенола; динитрофенола; пентафторфенола; тетрафторфенола; дифторфенола; монофторфенола; пентахлорфенола; трифлата; имидазола; дихлорфенола; тетрахлорфенола; 1-гидроксибензотриазола; тозилата; мезилата; 2-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфоната молекулы, связывающейся с клеткой-линкера Формулы (III) с образованием конъюгата через амидную связь.

Синтетический конъюгат может быть очищен стандартными биохимическими способами, такими как гель-фильтрация на колонке с сефадексом G25 или сефакрилом S300, адсорбционная хроматография и ионный обмен или диализ. В некоторых случаях малая молекула в качестве агента, связывающегося с клеткой (например, фолиевая кислота, меланоцитостимулирующий гормон, EGF и т. д.), конъюгированная с низкомолекулярными лекарственными средствами, может быть очищена с помощью хроматографии, такой как ВЭЖХ, колоночная хроматография среднего давления или ионообменная хроматография.

Для достижения более высокого выхода реакции конъюгирования комплекса цитотоксическая молекула-бис-линкер Формулы (II) с парой свободных тиолов молекулы, связывающейся с клеткой, предпочтительно антитела, может потребоваться добавление к реакционной смеси небольшого процента смешивающихся с водой органических

растворителей или агентов межфазного переноса. Сшивающий реагент (линкер) Формулы (II) может быть сначала растворен в полярном органическом растворителе, который смешивается с водой, например, в различных спиртах, таких как метанол, этанол и пропанол, ацетон, ацетонитрил, тетрагидрофуран (ТГФ), 1,4-диоксан, диметилформамид (ДМФА), диметилацетамид (DMA) или диметилсульфоксид (ДМСО) в высокой концентрации, например, 1-500 мМ. В то же время, молекулу, связывающуюся с клеткой, такую как антитело, растворенную в водном буфере с pH 4-9,5, предпочтительно pH 6-8,5, при концентрации 1-50 мг/мл обрабатывают 0,5-20 эквивалентами TCEP или DTT в течение 20 минут до 48 часов. После восстановления DTT можно удалить хроматографической очисткой SEC. TCEP может быть также необязательно удален с помощью хроматографии SEC или может оставаться в реакционной смеси до следующей стадии реакции без дополнительной очистки. Кроме того, восстановление антител или других агентов, связывающихся с клеткой с помощью TCEP может быть выполнено вместе с существующей молекулой “лекарственное средство-линкер” Формулы (II), для которой перекрестное конъюгирование молекул, связывающихся с клеткой может быть достигнуто одновременно с восстановлением TCEP.

Водные растворы для модификации молекулы, связывающихся с клеткой забуферены между pH 4 и 9, предпочтительно между 6,0 и 7,5, и могут содержать любые ненуклеофильные буферные соли, пригодные для этих диапазонов pH. Типичные буферы включают фосфатный, ацетатный, триэтаноламин HCl, HEPES и MOPS буферы, которые могут содержать дополнительные компоненты, такие как циклодекстрины, гидроксипропил-β-циклодекстрин, полиэтиленгликоли, сахарозу и соли, например, NaCl и KCl. После добавления “лекарственное средство-линкера” Формулы (II) в раствор, содержащий восстановленные молекулы, связывающиеся с клеткой, реакционную смесь инкубируют при температуре от 4 до 45 °C, предпочтительно при 15 °C - температуре окружающей среды. За ходом реакции можно следить, измеряя уменьшение поглощения на определенной длине волны УФ-излучения, например, при 254 нм, или увеличение поглощения на определенной длине волны УФ-излучения, например, 280 нм, или другой подходящей длине волны. После завершения реакции выделение модифицированного агента, связывающегося с клеткой можно проводить обычным способом, используя, например, гель-фильтрационную хроматографию, ионообменную хроматографию, адсорбционную хроматографию или колоночную хроматографию на силикагеле или алюминий оксиде, кристаллизацию, препаративную тонкослойную хроматографию, ионообменную хроматографию или ВЭЖХ.

Степень модификации может быть оценена путем измерения поглощения высвобождаемых нитропиридинтионовой, динитропиридиндитионовой, пиридинтионовой, карбоксиламидопиридиндитионовой и дикарбоксиламидопиридиндитионовой групп с помощью УФ-спектров. Для конъюгирования без хромофорной группы реакцию модификации или конъюгирования можно отслеживать с помощью ЖХМС, предпочтительно с помощью масс-спектрометрии СВЭЖХ-QTOF (QTOF - времяпролётный квадрупольный микромасс-спектрометр) или капиллярного электрофореза - масс-спектрометрии (КЭ-МС). Мостиковые перекрестные линкеры, описанные в данном документе, имеют разнообразные функциональные группы, которые могут реагировать с любыми лекарственными средствами, предпочтительно цитотоксическими агентами, которые обладают подходящим заместителем. Например, модифицированные молекулы, связывающиеся с клеткой, несущие амино- или гидроксильный заместитель, могут приводится в контакт с лекарственными средствами, содержащими сложный эфир N-гидроксисукцинимида (NHS), модифицированные молекулы, связывающиеся с клеткой, несущие тиольный заместитель, могут приводится в контакт с лекарственными средствами, содержащими малеимидную или галогенацетильную группу. Кроме того, модифицированные молекулы, связывающиеся с клеткой, содержащие карбонильный (кетоновый или альдегидный) заместитель, могут реагировать с лекарственными средствами, содержащими гидразид или алкоксиамин. Специалист в данной области техники может легко определить, какой линкер использовать, основываясь на известной реакционной способности доступной функциональной группы линкера.

АГЕНТЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С КЛЕТКОЙ

Молекула, связывающаяся с клеткой, Cb, которая содержит конъюгаты и модифицированные агенты, связывающиеся с клеткой, по настоящему изобретению, может быть любого типа, известного в настоящее время, или который станет известным, молекула, которая связывается, образует комплексы или реагирует с некоторой частью популяция клеток, которую требуется терапевтически или иным образом биологически модифицировать.

Агенты, связывающиеся с клеткой, включают в себя, но не ограничиваются ими, белки с большой молекулярной массой, такие как, например, антитело, антитело-подобный белок, полноразмерные антитела (поликлональные антитела, моноклональные антитела, димеры, мультимеры, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела, триспецифичные антитела или тетраспецифичные антитела); одноцепочечные

антитела; фрагменты антител, такие как Fab, Fab', $F(ab')_2$, F_v, [Parham, J. Immunol. 131, 2895-902 (1983)], фрагменты, полученные из библиотеки экспрессии Fab, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR, диатело, триатело, тетратело, миниантитело, проантитело, фрагмент проантитела, малые иммунные белки (SIP) и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленного, которые иммуноспецифически связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами, микробными антигенами или белком, генерируемым иммунной системой, который способен распознавать, связываться с конкретным антигеном или проявлять желаемую биологическую активность (Miller et al (2003) J. of Immunology 170: 4854-61); интерфероны (такие как тип I, II, III); пептиды; лимфокины, такие как IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF, интерферон-гамма (IFN-γ); гормоны, такие как инсулин, TRH (тиреотропин-рилизинг-гормоны), MSH (меланоцит-стимулирующий гормон), стероидные гормоны, такие как андрогены и эстрогены, меланоцит-стимулирующий гормон (MSH); факторы роста и колониестимулирующие факторы, такие как эпидермальные факторы роста (EGF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGFα, TGFβ, инсулин и инсулиноподобные факторы роста (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF и GM-CSF [Burgess, Immunology Today, 5, 155-8 (1984)]; факторы роста коровьей оспы (VGF); факторы роста фибробластов (FGF); белки с меньшей молекулярной массой, полипептиды, пептиды и пептидные гормоны, такие как бомбезин, гастрин, гастрин-рилизинг пептид; полученные из тромбоцитов факторы роста; интерлейкин и цитокины, такие как интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), факторы, ингибирующие лейкемию, колониестимулирующий фактор гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF); витамины, такие как фолат; апопротеины и гликопротеины, такие как трансферрин [O'Keefe et al., 260 J. Biol. Chem. 932-7 (1985)]; связывающие сахар белки или липопротеины, такие как лектины; молекулы переносящие питательные вещества в клетку; и низкомолекулярные ингибиторы, такие как ингибиторы простат-специфического мембранного антигена (PSMA) и низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназы (TKI), непептиды или любые другие молекулы, связывающиеся с клеткой, или вещества, такие как биоактивные полимеры (Dhar, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 2008, 105, 17356-61); биоактивные дендримеры (Lee, et al., Nat. Biotechnol. 2005, 23, 1517-26; Almutairi, et al; Proc. Natl. Acad. Sci. 2009, 106, 685-90); наночастицы (Liong, et al, ACS Nano, 2008, 2, 1309-12; Medarova, et al, Nat. Med. 2007, 13, 372-7; Javier, et al, Bioconjugate Chem. 2008, 19, 1309-12); липосомы (Medinai, et al., Curr.

Phar. Des. 2004, 10, 2981-9); вирусные капсиды (Flenniken, et al., Viruses Nanotechnol. 2009, 327, 71-93).

Обычно, моноклональное антитело является предпочтительным в качестве агента связывающегося с поверхностным клеточным рецептором, если подходящее моноклональное антитело доступно. И антитело может быть мышиным, человеческим, гуманизированным, химерным или полученным из других видов.

Производство антител, используемых в настоящем изобретении, включает процедуры in vivo или in vitro, или их комбинации. Способы получения поликлональных антирецепторных пептидных антител хорошо известны в данной области техники, например, в патенте США № 4493795 (Nestor et al.). Моноклональное антитело обычно получают путем слияния клеток миеломы с клетками селезенки мыши, которая была иммунизирована желаемым антигеном (Köhler, G.; Milstein, C. (1975). Nature 256: 495-7). Подробные процедуры описаны в «Antibodies--A Laboratory Manual», Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1988), которая включена в настоящий документ посредством ссылки. В частности, моноклональные антитела получают иммунизацией мышей, крыс, хомяков или любого другого млекопитающего антигеном, представляющим интерес, таким как интактная клетка-мишень, антигены, выделенные из клетки-мишени, цельный вирус, аттенуированный цельный вирус и вирусные белки. Спленоциты обычно сливают с клетками миеломы с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000. Слитые гибриды отбираются по их чувствительности к НАТ (гипоксантин-аминоптерин-тимин). Гибридомы, продуцирующие моноклональное антитело, пригодное для применения в практике данного изобретения, идентифицируются по их способности иммунореактивно реагировать с указанными рецепторами или ингибировать активность рецептора на клетках-мишенях.

Моноклональное антитело, используемое в настоящем изобретении, может быть получено путем инициирования культуры моноклональной гибридомы, содержащей питательную среду, содержащую гибридому, которая секретирует молекулы антител соответствующей антигенной специфичности. Культуру поддерживают в условиях и в течение периода времени, достаточного, чтобы гибридома секретировала молекулы антитела в среду. Среду, содержащую антитело, затем собирают. Молекулы антител могут быть затем выделены хорошо известными методами, такими как аффинная хроматография с белком-А; анионная, катионная, гидрофобная или эксклюзионная хроматография (в частности, по сродству к специфическому антигену после белка А и хроматографии на

колонке, разделяющей молекулы по размеру); центрифугирование, дифференциальная растворимость или любая другая стандартная методика очистки белков.

Среды, пригодные для приготовления данных композиций, хорошо известны в данной области техники и коммерчески доступны, и включают синтетические питательные среды. Типичной синтетической средой является минимальная необходимая среда Дульбекко (DMEM; Dulbecco et al., Virol. 8, 396 (1959)) с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 0-20 мМ глютамина, 0-20% фетальной сыворотки теленка, нескольких м.ч. тяжелых металлов, таких как Cu, Mn, Fe или Zn, и т. д., или/и других тяжелых металлов, добавленных в форме их солей и с антипенообразователем, таким как блок-сополимер полиоксиэтилена-полиоксипропилена.

Кроме того, продуцирующие антитела клеточные линии также могут быть созданы с помощью методов, отличных от слияния, таких как прямая трансформация В-лимфоцитов онкогенной ДНК или трансфекция онковирусом, таким как вирус Эпштейна-Барра (EBV, также называемый герпесвирусом человека 4 (HHV-4)) или герпесвирус, связанный с саркомой Капоши (KSHV). См., патенты США № 4341761; 4399121; 4427783; 4444887; 4451570; 4466917; 4472500; 4491632; 4493890. Моноклональное антитело также может быть получено через антирецепторный пептид или пептиды, содержащие карбоксильный конец, что хорошо известно в данной области техники. См., Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4949-53 (1983); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 178-82 (1985); Lei et al. Biochemistry 34(20): 6675-88, (1995). Как правило, антирецепторный пептид или пептидный аналог используют либо отдельно, либо в виде конъюгата с иммуногенным носителем, в качестве иммуногена для получения антирецепторных пептидных моноклональных антител.

Существует также ряд других хорошо известных способов получения моноклональных антител в качестве связывающих молекул в данном изобретении. Особенно полезными являются методы получения полностью человеческих антител. Одним из методов является технология фагового дисплея, которая может быть использована для выбора ряда антител человека, специфически связывающихся с антигеном, с использованием методов аффинного обогащения. Фаговый дисплей был подробно описан в литературе, и создание и скрининг библиотек фагового дисплея хорошо известны в данной области техники, см., например, Dente et al, Gene. 148(1):7-13 (1994); Little et al, Biotechnol Adv. 12(3): 539-55 (1994); Clackson et al., Nature 352: 264-8 (1991); Huse et al., Science 246: 1275-81 (1989).

Моноклональные антитела, полученные методом гибридомы от другого вида, кроме человека, такого как мышь, могут быть гуманизированы, чтобы избежать выработки анти-мышиных человеческих антител при введении в организм человека. Среди наиболее распространенных методов гуманизации антител - трансплантация областей, определяющих комплементарность и повторная перекладка. Данные способы были подробно описаны, см., например, патент США № 5859205 и 6797492; Liu et al., Immunol Rev. 222: 9-27 (2008); Almagro et al, Front Biosci. 13: 1619-33 (2008); Lazar et al, Mol Immunol. 44(8): 1986-98 (2007); Li et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103(10): 3557-62 (2006), каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. Полностью человеческие антитела также могут быть получены путем иммунизации иммуногена трансгенных мышей, кроликов, обезьян или других млекопитающих, несущих большие части тяжелых и легких цепей человеческого иммуноглобулина. Примерами таких мышей являются: Xenomouse. (Abgenix/Amgen), HuMAb-Mouse (Medarex/BMS), VelociMouse (Regeneron), см. также патенты США № 6596541, 6207418, 6150584, 6111166, 6075181, 5922545, 5661016, 5545806, 5436149 и 5569825. В терапии человека вариабельные области мыши и константные области человека также можно объединить для создания так называемых «химерных антител», которые являются значительно менее иммуногенными для человека, чем мышиные mAb (Kipriyanov et al, Mol Biotechnol. 26: 39-60 (2004); Houdebine, Curr Opin Biotechnol. 13: 625-9 (2002), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки). Кроме того, сайт-направленный мутагенез в вариабельной области антитела может приводить к антителу с более высокой аффинностью и специфичностью к его антигену (Brannigan et al, Nat Rev Mol Cell Biol. 3: 964-70, (2002)); Adams et al, J Immunol Methods. 231: 249-60 (1999)) и обмен константными областями mAb может улучшить его способность опосредовать эффекторные функции связывания и цитотоксичность.

Антитела, иммуноспецифичные относительно антигена злокачественной клетки, также могут быть получены коммерческим путем или получены любым способом, известным специалисту в данной области техники, таким как, например, методы химического синтеза или рекомбинантной экспрессии. Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитела, иммуноспецифичные к антигену злокачественных клеток, может быть получена коммерчески, например, из базы данных GenBank или подобной базы данных, литературных публикаций или путем обычного клонирования и секвенирования.

Помимо антитела, пептид или белок, которые связывают/блокируют/нацелены или каким-либо другим образом взаимодействуют с эпитопами или соответствующими

рецепторами на клетке-мишени, могут быть использованы в качестве связывающейся молекулы. Данные пептиды или белки могут представлять собой любой случайный пептид или белки, которые имеют сродство к эпитопам или соответствующим рецепторам, и они не обязательно должны принадлежать к семейству иммуноглобулинов. Данные пептиды могут быть выделены с помощью той же методики, что используются для антител в фаговогом дисплее (Szardenings, J Recept Signal Transduct Res. 2003, 23(4): 307-49). Использование пептидов из таких случайных пептидных библиотек может быть аналогичным антителам и фрагментам антител. Связывающие молекулы пептидов или белков могут быть конъюгированы или связаны с большими молекулами или материалами, такими как, но не ограничиваясь ими, альбумин, полимер, липосома, наночастица, дендример, при условии, что такое присоединение позволяет пептиду или белку сохранить его антигенсвязывающую специфичность.

Примеры антител, используемых для конъюгирования лекарственных средств через линкеры данного изобретения для лечения рака, аутоиммунного заболевания и/или инфекционного заболевания, включают, но не ограничиваются ими, 3F8 (анти-GD2), абаговомаб (анти-CA-125), абциксимаб (анти-CD41 (интегрин альфа-IIb), адалимумаб (анти-TNF-α), адекатумумаб (анти-EpCAM, CD326), афелимомаб (анти-TNF-α); афутузумаб (анти-CD20), алазизумаб пегол (анти-VEGFR2), ALD518 (анти-IL-6), алемтузумаб (капмас, мабкампас, анти-CD52), алтумомаб (анти-CEA), анатумомаб (анти-TAG-72), анрукинзумаб (IMA-638, анти-IL-13), аполизумаб (анти-HLA-DR), арцитумомаб (анти-CEA), аселизумаб (анти-L-селектин (CD62L), атлизумаб (тоцилизумаб, актемра, роактемра, анти-IL-6 рецептор), аторолимумаб (анти резус-фактор), бапинеузумаб (анти-бета-амилоид), базиликсимаб (симулект, анти-CD25 (α-цепь рецептора IL-2)), бавитуксимаб (анти-фосфатидилсерин), бектумомаб (лимфоскан, анти-CD22), белимумаб (бенлиста, лимфостат-B, анти-BAFF), бенрализумаб (анти-CD125), бертилимумаб (анти-CCL11 (эотаксин-1)), бесилесомаб (сцинтимун, анти-CEA-связанный антиген), бевацизумаб (авастин, анти-VEGF-A), бициромаб (фибрисинт, анти-фибрин II бета-цепь), биватузумаб (анти-CD44 v6), блинатумомаб (BiTe анти-CD19), брентуксимаб (cAC10, анти-CD30 TNFRSF8), брякинумаб (анти-IL-12, IL-23) канакинумаб (иларис, анти-IL-1), кантузумаб (C242 , анти-CanAg), капромаб, катумаксомаб (ремоваб, анти-EpCAM, анти-CD3), CC49 (анти-TAG-72), целизумаб (анти-CD4), цертолизумаб пегол (цимзиа анти-TNF-α), цетуксимаб (эрбитукс, IMC-C225, анти-EGFR), цитатузумаб богатокс (анти-EpCAM), циксутузумаб (анти-IGF-1), кленоликсимаб (анти-CD4), кливатузумаб (анти-MUC1), конатумумаб (анти-TRAIL-R2), CR6261 (анти-грипп A гемагглютинин),

дацетузумаб (анти-CD40), даклизумаб (зенапакс, анти-CD25 (α-цепь рецептора IL-2)), даратумумаб (анти-CD38 (циклическая АДФ-рибоза гидролаза), денозумаб (пролиа , анти-RANKL), детумомаб (анти-B-лимфома клетки), дорлимомаб, дорликсизумаб, экромексимаб (анти-GD3 ганглиозид), экулизумаб (солирис, анти-C5), эдобакомаб (анти-эндотоксин), эдреколомаб (ранорекс, MAb17-1A, анти-EpCAM), эфализумаб (раптива, анти-LFA-1 (CD11a)), эфунгумаб (микограб, анти-Hsp90), элотузумаб (анти-SLAMF7), элсилимомаб (анти-IL-6), энлимомаб пегол (анти-ICAM-1 (CD54)), эпитумомаб (анти-эписиалин), эпратузумаб (анти-CD22), эрлизумаб (анти-ITGB2 (CD18)), эртумаксомаб (рексомун, анти-HER2/neu, CD3), этарацизумаб (абегрин, антиинтегрин $\alpha_v\beta_3$), эксбивирумаб (поверхностный антиген гепатита B), фанолесомаб (нейтроспек, анти-CD15), фаралимомаб (антиинтерфероновый рецептор), фарлетузумаб (антифолатный рецептор 1), фелвизумаб (анти-респираторный синцитиальный вирус), фезакинумаб (анти-IL-22), фигитумумаб (анти-IGF-1 рецептор), фонолизумаб (анти-IFN-γ), форавирумаб (гликопротеин против вируса бешенства), фрезолимумаб (анти-TGF-β), галиксимаб (анти-CD80), гантенумаб (анти-бета-амилоид), гавилимомаб (анти-CD147 (базигин)), гемтузумаб (анти-CD33), гирентуксимаб (антикарбоновая ангидраза 9), глембатумумаб (CR 011, анти-GPNMB), голимумаб (симпони, анти-TNF-α), гомиликсимаб (анти-CD23 (IgE-рецептор)), ибализумаб (анти-CD4), ибритумомаб (анти-CD20), иговомаб (индимацис-125, анти -CA-125), имциромаб (майосуцинт, антикардиальный миозин), инфликсимаб (ремикад, анти-TNF-α), интетумумаб (анти-CD51), инолимомаб (анти-CD25 (α-цепь рецептора IL-2)), инотузумаб (анти-CD22), ипилимумаб (анти-CD152), иратумумаб (анти-CD30 (TNFRSF8)), келиксимаб (анти-CD4), лабетузумаб (CEA-сид, анти-CEA), лебрикизумаб (анти-IL-13) , лемалесомаб (анти-NCA-90 (гранулоцитарный антиген)), лерделимумаб (анти-TGF бета 2), лексатумумаб (анти-TRAIL-R2), либивирумаб (поверхностный антиген гепатита B), линтузумаб (анти-CD33), лукатумумаб (анти-CD40), люмиксимаб (анти-CD23 (IgE-рецептор), мапатумумаб (анти-TRAIL-R1), маслимомаб (анти-T-клеточный рецептор), матузумаб (анти-EGFR), меполизумаб (босатрия, анти-IL-5), метелимумаб (анти-TGF бета 1), милатузумаб (анти-CD74), минретумомаб (анти-TAG-72), митумомаб (BEC-2, анти-GD3 ганглиозид), моролимумаб (анти-резус-фактор), мотавизумаб (нумакс, анти-респираторный синцитиальный вирус), муромонаб-CD3 (ортоклон OKT3, анти-CD3), наколомаб (анти-C242), наптумомаб (анти-5T4), натализумаб (тисабри, анти-интегрин α_4), небакумаб (антиэндотоксин), нецитумумаб (анти-EGFR), нерелимомаб (анти-TNF-α), нимотузумаб (терацим, тералок, анти-EGFR), нофетумомаб, окрелизумаб (анти-CD20), одулимомаб (афолимомаб, анти-LFA-1 (CD11a)), офатумумаб

(арзера, анти-CD20), оларатумаб (анти-PDGF-Rα), омализумаб (ксолаир, анти-IgE Fc область), опортузумаб (анти-EpCAM), ореговомаб (оварекс, анти-CA-125), отеликсизумаб (анти-CD3), пагибаксимаб (антилипотейхоевая кислота), паливизумаб (синаджис, аббосинаджис, анти-респираторный синцитиальный вирус), панитумумаб (вектибикс, ABX-EGF, анти-EGFR) , панобакумаб (анти-Pseudomonas aeruginosa), пасколизумаб (анти-IL-4), пемтумомаб (терагин, анти-MUC1), пертузумаб (омнитарг, 2C4, анти-HER2 / neu), пекселизумаб (анти-C5), пинтумомаб (анти-аденокарциномы антиген), приликсимаб (анти-CD4), притумумаб (анти-виментина), PRO 140 (анти- CCR5), ракотумомаб (1E10, анти-(N-гликолилнейраминовая кислота (NeuGc, NGNA)-ганглиозиды GM3)), рафивирумаб (гликопротеин против бешенства), рамукирумаб (анти-VEGFR2), ранибизумаб (люцентис, анти-VEGF-A), раксибакумаб (анти-сибирская язва токсин, защитный антиген), регавирумаб (анти-цитомегаловирусный гликопротеин B), реслизумаб (анти-IL-5), рилотумумаб (анти-HGF), ритуксимаб (мабтера, ритуксанмаб, анти-CD20), робатумумаб (анти-IGF-1 рецептор), ронтализумаб (анти-IFN-α), ровелизумаб (леукарест, анти-CD11, CD18), руплизумаб (антова, анти-CD154 (CD40L)), сатумомаб (анти-TAG-72), севирумаб (анти-цитомегаловирус), сибротузумаб (анти-FAP), сифалимумаб (анти-IFN-α), силтуксимаб (анти-IL-6), сиплизумаб (анти-CD2)), (смарт) MI95 (анти-CD33), соланезумаб (анти-бета-амилоид), сонепцизумаб (анти-сфингозин-1-фосфат), сонтузумаб (анти-эпизиалин), стамулумаб (анти-миостатин), сулесомаб (лейкоскан, (анти-NCA-90 (гранулоцитарный антиген), такатузумаб (анти-альфа-фетопротеин), тадоцизумаб (анти-интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$), тализумаб (анти-IgE), танезумаб (анти-NGF), таплитумомаб (анти-CD19), тефибазумаб (аурексис, (анти-агглютинирующий фактор A), телимомаб, тенатумомаб (анти-тенасцин C), тенеликсимаб (анти-CD40), теплизумаб (анти-CD3), TGN1412 (анти-CD28), тицилимумаб (тремелимумаб, (анти-CTLA-4)), тигатузумаб (анти-TRAIL-R2), TNX-650 (анти-IL-13), тоцилизумаб (атлизумаб, актемра, роактемра, (анти-IL-6 рецептор)), торализумаб (анти-CD154 (CD40L)), тозитумомаб (анти-CD20), трастузумаб (герцептин, (анти-HER2/neu), тремелимумаб (анти-CTLA-4), тукотузумаб целмолейкин (анти-EpCAM), тувирумаб (вирус антигепатита B), уртоксазумаб (анти-Escherichia coli), устекинумаб (стелара, анти-IL-12, IL-23), вапаликсимаб (анти-AOC3 (VAP-1)), ведолизумаб ((антиинтегрин $\alpha_4\beta_7$), велтузумаб (анти-CD20), вепалимомаб (анти-AOC3 (VAP-1)), визилизумаб (нувион, анти-CD3), витаксин (антисосудистый интегрин avb3), волоциксимаб (антиинтегрин $\alpha_5\beta_1$), вотумумаб (хюмаспект, противоопухолевый антиген CTAA16.88), залутумумаб (хюмакс-EGFr, (анти-EGFR), занолимумаб (хюмакс-CD4, анти-CD4), зирамумаб (анти-CD147 (базигин)), золимомаб (анти-CD5), этанерсепт (энбрел®),

алефасепт (амевив®), абатасепт (оренсиа®), рилонасепт (аркалист), 14F7 [анти-IRP-2 (железо-регулирующий белок 2)], 14G2a (анти-GD2 ганглиозид , от Нац. Рак Инст. для меланомы и солидных опухолей), J591 (анти-PSMA, Вейл Корнеллская медицинская школа для рака простаты), 225.28S [анти-HMW-MAA (высокомолекулярный меланома ассоциированный антиген), Sorin Radiofarmaci S.R.L. (Милан, Италия) для меланомы], COL-1 (анти-CEACAM3, CGM1, от Нац. Рак Инст. США для колоректального и желудочного рака), CYT-356 (Онколтад®, для рака простаты), HNK20 (Ора Вакс Инк. для респираторно-синцитиального вируса), иммураит (от Иммуномедикс для НХЛ), Lym-1 (анти-HLA-DR10, Перегрин Фарм. для онкологических заболеваний), MAK-195F [анти-TNF (фактор некроза опухоли; TNFA, TNF-альфа; TNFSF2), от Аббот/Кнолл для сепстического токсического шока], MEDI-500 [T10B9, анти-CD3, TRαβ (T клеточный рецептор альфа/бета), комплексный, от МедИммьюн Инк. для реакции «трансплантат против хозяина», RING SCAN [анти-TAG 72 (связанный с опухолью гликопротеин 72), от Неопроб Корп. для рака молочной железы, толстой кишки и прямой кишки], авицидин (анти-EPCAM (молекула адгезии эпителиальных клеток), анти-TACSTD1 (кальциевый сигнальный преобразователь 1, связанный с опухолью), анти-GA733-2 (белок, ассоциированный с опухолью желудочно-кишечного тракта 2), анти-EGP-2 (эпителиальный гликопротеин 2); KSA; KS1/4-антиген; M4S; опухолевый антиген 17-1A; CD326 от НеоРикс Корп. для рака толстой кишки, яичников, предстательной железы и НХЛ]; лимфоцид (Иммуномедикс, Нью Джерси), смарт ID10 (Протеин Дизайн Лэбс), онколим (Текниклон Инк., Калифорния), алломюн (БиоТрансплант, Калифорния), анти-VEGF (Генентек, Калифорния); CEAcide (Иммуномедикс, Нью Джерси), IMC-1C11 (ИмКлон, Нью Джерси) и цетуксимаб (ИмКлон, Нью Джерси).

Другие антитела в качестве молекул/лигандов, связывающихся с клеткой включают, но не ограничиваются ими, антитела к следующим антигенам: аминопептидаза N (CD13), аннексин A1, B7-H3 (CD276, различные виды рака), CA125 (яичники), CA15-3 (карциномы), CA19-9 (карциномы), L6 (карциномы), Lewis Y (карциномы), Lewis X (карциномы), альфа-фетопротеин (карциномы), CA242 (колоректальный), плацентарная щелочная фосфатаза (карциномы), простат-специфический антиген (рак простаты), простатическая кислотная фосфатаза (рак простаты), эпидермальный фактор роста (карциномы), CD2 (болезнь Ходжкина, НХЛ лимфома, множественная миелома), CD3-эпсилон (T-клеточная лимфома, рак легких, рак молочной железы, рак яичников, аутоиммунные заболевания, злокачественный асцит), CD19 (злокачественные опухоли B-клеток), CD20 (неходжкинская лимфома), CD22 (лейкоз, лимфома, множественная

миелома, CKB), CD30 (лимфома Ходжкина), CD33 (лейкоз, аутоиммунные заболевания), CD38 (множественная миелома), CD40 (лимфома, множественная миелома, лейкоз (CLL)), CD51 (метастатическая меланома, саркома), CD52 (лейкоз), CD56 (мелкоклеточный рак легких, рак яичников, клеточная карцинома Меркеля и жидкая опухоль, множественная миелома), CD66e (рак), CD70 (метастатический почечно-клеточный рак и неходжкинская лимфома), CD74 (множественная миелома), CD80 (лимфома), CD98 (рак), муцин (карцинома), CD221 (солидные опухоли), CD227 (рак молочной железы, рак яичников), CD262 (НМРЛ и другие виды рака), CD309 (рак яичников), CD326 (солидные опухоли), CEACAM3 (колоректальный рак, рак желудка), CEACAM5 (карциноэмбриональный антиген; CEA, CD66e) (рак молочной железы, колоректальный рак и рак легких), DLL3 (delta-подобный-3), DLL4 (delta-подобный-4), EGFR (рецептор эпидермального фактора роста, различные виды рака), CTLA4 (меланома), CXCR4 (CD184 , гемоонкология, солидные опухоли), эндоглин (CD105, солидные опухоли), EPCAM (молекула адгезии эпителиальных клеток, рак мочевого пузыря, головы, шеи, толстой кишки, предстательной железы, НХЛ и яичников), ERBB2 (рецептор эпидермального фактора роста 2; рак легких, молочной железы, простаты), FCGR1 (аутоиммунные заболевания), FOLR (рецептор фолата, рак яичников), ганглиозид GD2 (рак), G-28 (антиген гликолипида клеточной поверхности, меланома), идиотип GD3 (рак), белки теплового шока (рак), HER1 (рак легких, рак желудка), HER2 (рак молочной железы, легких и яичников), HLA-DR10 (НХЛ), HLA-DRB (НХЛ, В-клеточный лейкоз), хорионический гонадотропин человека (карцинома), IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1, солидные опухоли, рак крови), рецептор IL-2 (рецептор интерлейкина 2, Т-клеточный лейкоз и лимфомы), IL-6R (рецептор интерлейкина 6, множественная миелома, RA, болезнь Кастелмана, IL6-зависимые опухоли), интегрины (αvβ3, α5β1, α6β4, αIIβ3, α5β5, αvβ5, для различных видов рака), MAGE-1 (карциномы), MAGE-2 (карциномы), MAGE-3 (карциномы), MAGE 4 (карциномы), рецептор анти-трансферрина (карциномы), p97 (меланома), MS4A1 (мембранного охвата 4-х доменный член 1 подсемейства А, мелкоклеточный рак легких, НХЛ), нуклеолин, онкогенный продукт Neu (карциномы), Р21 (карциномы), паратоп анти-(N-гликолилнейраминовой кислоты, рак молочной железы, меланома), PLAP-подобная щелочная фосфатаза яичка (рак яичников, рак яичка), PSMA (опухоли простаты), PSA (рак простаты), ROBO4, TAG 72 (ассоциированный с опухолью гликопротеин 72, AML, рак желудка, колоректальный рак, рак яичников), Т-клеточный трансмембранный белок (рак), Tie (CD202b), TNFRSF10B (член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 10B, рак), TNFRSF13B (член

суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 13B, множественная миелома, НХЛ, другие виды рака, RA и SLE), TPBG (гликопротеин трофобласта, почечно-клеточная карцинома), TRAIL-R1 (рецептор 1 лиганда индуцирующего некроз апоптоз опухоли, лимфома, НХЛ, колоректальный рак, рак легких), VCAM-1 (CD106, меланома), VEGF, VEGF-A, VEGF-2 (CD309) (различные виды рака). Были рассмотрены некоторые другие опухоль ассоциированные антигены, распознаваемые антителами (Gerber, et al, mAbs 1:3, 247-53 (2009); Novellino et al, Cancer Immunol Immunother. 54(3), 187-207 (2005). Franke, et al, Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15, 459-76).

Агенты, связывающиеся с клеткой, более предпочтительные антитела, могут представлять собой любые агенты, которые способны связываться с опухолевыми клетками, инфицированными вирусом клетками, инфицированные микроорганизмами клетками, инфицированные паразитом клетками, аутоиммунными клетками, активированными клетками, миелоидными клетками, активированными Т-клетками, В-клетками или меланоцитами. Более конкретно, агенты, связывающиеся с клеткой могут быть любыми агентами/молекулами, способными связываться с любым из следующих антигенов или рецепторов: CD2, CD2R, CD3, CD3gd, CD3e, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD12, CD12w, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD15u, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RO, CD46, CD47, CD47R, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55,CD56, CD57, CD58, CD59, CD60, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD74, CD75, CD75s, CD76, CD77, CD78, CD79, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CDw84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD99R, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CDw113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CDw119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CDw121b, CD122, CD123, CDw123, CD124, CD125, CDw125, CD126, CD127, CD128, CDw128, CD129, CD130, CD131, CDw131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CDw136, CD137, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CDw156c, CD157,

CD158a, CD158b, CD159a, CD159b, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD162R, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CDw186, CD187, CD188, CD189, CD190, Cd191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CD198, CDw198, CD199, CDw199, CD200, CD200a, CD200b, CD201, CD202, CD202b, CD203, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210, CD212, CD213a1, CD213a2, CDw217, CDw218a, CDw218b, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235ab, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD252, CD253, CD254, CD256, CD257, CD258, CD261, CD262, CD263, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD271, CD273, CD274, CD275, CD276 (B7-H3), CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD289, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300a, CD300c, CD300e, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD324, CDw325, CD326, CDw327, CDw328, CDw329, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CDw338, CD339, 4-1BB, 5AC, 5T4 (гликопротеин трофобласта, TPBG, 5T4, Wnt-активируемый ингибиторный фактор 1 или WAIF1), аденокарциноманантиген, AGS-5, AGS-22M6, Активин-рецептор-подобная киназа 1, AFP, AKAP-4, ALK, альфа-интергрин, альфа- v бета6, амино-пептидаза N, амилоид бета, рецептор андрогена, ангиопоэтин 2, ангиопоэтин 3, аннексин A1, токсин-защитный антиген сибирской язвы, рецептор анти-трансферрина, AOC3 (VAP-1), B7-H3, Bacillus anthracisanthrax, BAFF (фактор активации B-клеток)), клетка B-лимфомы, bcr-abl, бомбезин, BORIS, C5, антиген C242, CA125 (углеводный антиген 125, MUC16), CA-IX (или CAIX, карбоангидраза 9), CALLA, CanAg, Canis lupus familiaris IL31, карбоангидраза IX, сердечный миозин, CCL11 (CC-мотив, хемокина 11), CCR4 (рецептор C-C хемокина типа 4, CD194), CCR5, CD3E (эпсилон), CEA (карциноэмбриональный антиген), CEACAM3, CEACAM5 (карциноэмбриональный антиген), CFD (фактор D), Ch4D5, холецистокинин 2 (CCK2R), CLDN18 (клаудин-18), агглютинирующий фактор A, CRIPTO, FCSF1R (рецептор колониестимулирующего фактора 1, CD115), CSF2 (колониестимулирующий фактор 2, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF)), CTLA4 (цитотоксический белок 4, ассоциированный с T-лимфоцитами), опухолевый антиген CTAA16.88, CXCR4 (CD184), C-X-C хемокиновый рецептор типа 4, циклическая АДФ-рибоза гидролаза,

циклин B1, CYP1B1, цитомегаловирус, цитомегаловирусный гликопротеин B, дабигатран, DLL3 (дельта-подобный лиганд 3), DLL4 (дельта-подобный лиганд 4), DPP4 (дипептидил-пептидаза 4) DR5 (рецептор смерти 5), токсин типа 1 кишечной палочки E.coli, токсин типа 2 кишечной палочки E.coli, ED-B, EGFL7 (EGF-подобный белок, содержащий домен 7), EGFR, EGFRII, EGFRvIII, эндоглин (CD105), рецептор эндотелина B, эндотоксин, EpCAM (молекула адгезии эпителиальных клеток), EphA2, эпизиалин, ERBB2 (рецептор эпидермального фактора роста 2), ERBB3, ERG (ген слияния TMPRSS2 ETS), Escherichia coli, ETV6-AML, FAP (белок альфа активации фибробластов), FCGR1, альфа-фетопротеин, фибрин II, бета-цепь, дополнительный домен фибронектина-B, FOLR (фолатный рецептор), альфа-рецептор фолата, фолатгидролаза, Fos-ассоциированный антиген 1, белок F респираторно-синцитиального вируса, связанный с ожогом рецептор, фукозил GM1, GD2 ганглиозид, G-28 (антиген гликолипида клеточной поверхности), GD3 идиотип, GloboH, глипикан 3, N-гликолилнейраминовая кислота, GM3, α-цепь рецептора GMCSF, фактор дифференцировки роста 8, GP100, GPNMB (трансмембранный гликопротеин NMB), GUCY2C (гуанилатциклаза 2C, гуанилилциклаза C (GC-C), кишечная гуанилатциклаза, рецептор гуанилатциклаза C, рецептор термостабильного энтеротоксина (hSTAR), белки теплового шока, гемагглютинин, поверхностный антиген гепатита B, вирус гепатита B, HER1 (рецептор 1 эпидермального фактора роста человека), HER2, HER2/neu, HER3 (ERBB-3), IgG4, HGF/SF (фактор роста гепатоцитов/фактор рассеяния), HHGFR, ВИЧ-1, комплекс гистонов, HLA-DR (антиген лейкоцитов человека), HLA-DR10, HLA-DRB, HMWMAA, хорионический гонадотропин человека, HNGF, разброс киназа рецептора рассеяния, HPV E6/E7, Hsp90, hTERT, ICAM-1 (молекула межклеточной адгезии 1), идиотип, IGF1R (IGF-1, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1), IGHE, IFN- γ , гемаглютинин вируса гриппа, IgE, IgE область Fc, IGHE, интерлейкины (например, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-17A, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 или IL-28), IL31RA, ILGF2 (инсулиноподобный фактор роста 2), интегрины (α4, $\alpha_{IIb}\beta_3$, αvβ3, $\alpha_4\beta_7$, α5β1, α6β4, α7β7,αIIβ3, α5β5, αvβ5), интерферон гамма-индуцированный белок, ITGA2, ITGB2, KIR2D , LCK,Le, Legumain, антиген Lewis-Y, LFA-1 (антиген 1, ассоциированный с функцией лимфоцитов, CD11a), LHRH, LINGO-1, липотейхоевая кислота, LIV1A, LMP2, LTA, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE A1, MAGE A3, MAGE 4, MART1, MCP-1, MIF (фактор, ингибирующий миграцию макрофагов, или фактор, ингибирующий гликозилирование) (GIF)), MS4A1 (мембранного охвата 4-х доменный член 1 подсемейства A), MSLN (мезотелин), MUC1 (Mucin 1, ассоциированный с

клеточной поверхностью (MUC1) или полиморфный эпителиальный муцин (PEM)), MUC1-KLH, MUC16 (CA125), MCP1 (хемотаксический белок 1 моноцитов), Melan-A/MART1, ML-IAP, MPG, MS4A1 (белок мембранного охвата 4-х доменный подсемейства A), MYCN, миелин-ассоциированный гликопротеин, миостатин, NA17, NARP-1, NCA-90 (гранулоцитарный антиген), нектин-4 (ASG-22ME), NGF, нейрональная апоптоз-регулируемая протеиназа 1, NOGO-A, Notch-рецептор, нуклеолин, онкогенный продукт Neu, NY-BR-1, NY-ESO-1, OX- 40, OxLDL (окисленный липопротеин низкой плотности), OY-TES1, P21, не мутантный p53, P97, Page4, PAP, паратоп анти-(N-гликолилнейраминовой кислоты), PAX3, PAX5, PCSK9, PDCD1 (PD-1, белок запрограммированной клетки 1, CD279), PDGF-Rα (рецептор фактора роста тромбоцитов альфа-типа), PDGFR-β, PDL-1, PLAC1, PLAP-подобная щелочная фосфатаза яичка, тромбоцитарный рецептор фактора роста бета, фосфат-натриевый котранспортер, PMEL 17, полисиаловая кислота d, протеиназа 3 (PR1), рак предстательной железы, PS (фосфатидилсерин), клетки карциномы предстательной железы, Pseudomonas aeruginosa, PSMA, PSA, PSCA, гликопротеин вируса бешенства, RHD (Rh полипептид 1 (RhPI), CD240), резус-фактор, RANKL, рецепторы RANTES (CCR1, CCR3, CCR5), RhoC, мутант Ras, RGS5, ROBO4, респираторно-синцитиальный вирус, RON, точки инициации транслокации саркомы, SART3, склеростин, SLAMF7 (член семейства SLAM 7), селектин P, SDC1 (синдекан 1), sLe(a), соматомедин C, SIP (сфингозин-1-фосфат), соматостатин, белок 17 сперматозоидов, SSX2, STЭAP1 (шести трансмембранный эпителиальный антиген продстательной железы 1), STЭAP2, STn, TAG-72 (ассоциированный с опухолью гликопротеин 72) , сурвивин, Т-клеточный рецептор, Т-клеточный трансмембранный белок, TEM1 (опухолевый эндотелиальный маркер 1), TENB2, тенасцин C (TN-C), TGF-α, TGF-β (трансформирующий фактор роста бета), TGF-β1, TGF -β2 (трансформирующий фактор роста-бета 2), Tie (CD202b), Tie2, TIM-1 (CDX-014), Tn, TNF, TNF-α, TNFRSF8, TNFRSF10B (член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 10B), TNFRSF13B (член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 13B), TPBG (гликопротеин трофобласта), TRAIL-R1 (рецептор 1 лиганда индуцирующего некроз апоптоз опухоли), TRAILR2 (рецептор смерти 5 (DR5)), ассоциированный с опухолью кальциевый сигнальный преобразователь 2, специфичное для опухоли гликозилирование MUC1, рецептор TWEAK, TYRP1 (гликопротеин 75), TROP-2, TRP-2, тирозиназа, VCAM-1 (CD106), VEGF, VEGF-A, VEGF-2 (CD309), VEGFR- 1, VEGFR2 или виментин, WT1, XAGE 1 или клетки, экспрессирующие любые рецепторы инсулинового фактора роста или любые рецепторы эпидермального фактора роста.

В другом конкретном варианте осуществления конъюгаты “лиганд, связывающийся с клеткой-лекарственное средство” связанные через мостиковые линкеры по настоящему изобретению используются для нацеленного лечения рака. Целевые раковые заболевания включают, но не ограничиваются ими, адренокортикальную карциному, рак анального канала, рак мочевого пузыря, опухоль головного мозга (у взрослых, глиому ствола головного мозга, у детей, мозжечковую астроцитому, церебральную астроцитому, эпендимому, медуллобластому, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную и шишковидную опухоли, зрительную и гипоталамную глиому), рак молочной железы, карциноидную опухоль, рак желудочно-кишечного тракта, карциному неизвестного происхождения, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак внепеченочных желчных протоков, опухоли семейства Юинга (PNET), экстра-черепную эмбрионально-клеточную опухоль, рак глаз, внутриглазную меланому, рак желчного пузыря, рак желудка, эмбрионально-клеточную опухоль, экстрагонадальную, гестационную трофобластическую опухоль, рак головы и шеи, карциному гипофарингеальной области, карциному островковых клеток, рак почек (рак почечных клеток), рак гортани, лейкоз (острый лимфобластный, острый миелоидный, хронический лимфоцитарный, хронический миелогенный, волосатоклеточный), рак губ и полости рта, рак печени, рак легких (немелкоклеточный, мелкоклеточный), лимфому (СПИД ассоциированная, центральной нервной система, Т-клеточная лифома кожи, болезнь Ходжкина, неходжкинская болезнь), злокачественную мезотелиому, меланому, карциному клеток Меркеля, метастатический плоскоклеточный рак шеи с оккультной первичной, множественной миеломой и другими плазматическими новообразованиями, грибовидный микоз, миелодиспластический синдром, миелопролиферативные нарушения, рак носоглотки, нейробластома, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркома, рак яичника (эпителиальный, эмбрионально-клеточная опухоль,
пограничная опухоль яичника), рак поджелудочной железы (экзокринный, карцинома островковых клеток), рак околоносовых пазух и полости носа, рак паращитовидной железы, рак полового члена, феохромоцитомный рак, рак гипофиза, новообразование клеток плазмы, рак предстательной железы, рабдомиосаркома, рак прямой кишки, рак почечных клеток (рак почек), рак почечной лоханки и мочеточника (переходноклеточный), рак слюнных желез, синдром Сезары, рак кожи, рак кожи (кожная Т-клеточная лимфома, саркома Капоши, меланома), рак тонкой кишки,
саркому мягких тканей, рак желудка, рак яичка, тимому (злокачественную), рак

щитовидной железы, рак уретры, рак матки (саркома), необычный детский рак, рак влагалища, рак вульвы, опухоль Вильмса.

В другом конкретном варианте осуществления конъюгаты “агент, связывающийся с клеткой-лекарственное средство” по данному изобретению используются в согласии с композициями и способами для лечения или профилактики аутоиммунного заболевания. Аутоиммунные заболевания включают в себя, но не ограничиваются ими, ахлоргидрию при аутоиммунном активном хроническом гепатите, острый рассеянный энцефаломиелит, острый геморрагический лейкоэнцефалит, болезнь Аддисона, агаммаглобулинемию, гнездную алопецию, боковой амиотрофический склероз, анкилозирующий спондилит, анти-GBM/TBM нефрит, антифосфолипидный синдром, антисинтетазный синдром, артрит, атопическую аллергию, атопический дерматит, аутоиммунную апластическую анемию, аутоиммунную кардиомиопатию, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунную периферическую невропатию, аутоиммунные панкреатиты, аутоиммунные полиэндокринные синтдомы типов I, II и III, аутоиммунный прогестероновый дерматит, аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру, аутоиммунный увеит, болезнь Бало/концентрический склероз Бало, синдром Бечетса, болезнь Бержера, энцефалит Бикерстаффа, синдром Блау, буллезный пемфигоид, болезнь Каслмана, болезнь Чага, синдром хронической усталости и иммунной дисфункции, хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию, хронический рецидивирующий мультифокальный остомиелит, хроническую болезнь Лайма, хроническую обструктивную болезнь легких, синдром Шурга-Штрауса, рубцовую пемфигоидную болезнь, глютеновую болезнь, синдром Когана, холодную агглютининовую болезнь, дефицит компонента комплемента 2, височный артериит, CREST-синдром, болезнь Крона (тип идиопатических воспалительных заболеваний кишечника), синдром Кушинга, кожный лейкоцитокластический ангиит, болезнь Дего, болезнь Деркума, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, сахарный диабет 1-го типа, диффузный кожный системный склероз, синдром Дрессера,
дискоидную красную волчанку, экзему, эндометриоз, артрит, связанный с энтезитом, эозинофильный фасциит,
приобретённый буллезный эпидермолиз , узловатую эритему, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, синдром Эвана, прогрессирующую оссифицирующую фибродисплазию, фибромиалгию, фибромиозит, фиброзирующий альвеолит, гастрит, гастроинтестинальный пемфигоид, гигантоклеточный артериит, гломерулонефрит,

синдром Гудпастюра, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемолитическую анемию, пурпурк Генош-Шонлейна, гестационный герпес, гнойный гидраденит, синдром Хьюза (см. антифосфолипидный синдром), гипогаммаглобулинемию, идиопатические воспалительные демиелинизирующие болезни, идиопатический легочный фиброз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (см. аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура), IgA нефропатию (также болезнь Бергера), миозит включающего тела, воспалительную демиелинизирующую полинеопатию, интерстициальный цистит, синдром раздраженного кишечника, ювенильный идиопатический артрит, ювенильный ревматоидный артрит, болезнь Кавасаки, миастенический синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склеротический лишай, болезнь линейного IgA (LAD), болезнь Лу Герига (также боковой амиотрофический склероз), люпоидный гепатит, красную волчанку, синдром Мажида, болезнь Меньэ, микроскопический полиангиит, синдром Миллера-Фишера, смешанную болезнь соединительной ткани, морфею, болезнь Муха-Хабермана, синдром Макла-Уэллса, множественную миелому, рассеянный склероз, миастения гравис, миозит, нарколепсию, невромиелит зрительный (болезнь Девика), нейромиотонию, глазной рубцующийся пемфигоид, опсо-миоклональный синдром, атрофическую форму аутоиммунного тиреоидита, палиндромный ревматизм, PANDAS (педиатрические аутоиммунные психоневрологические расстройства, связанные со стрептококком), паранеопластическую мозжечковую дегенерацию, пароксизмальную ночную гемоглобинурию, синдром Парри Ромберга, синдром Парсоннажа-Тернера, парспланит, пемфигус, обычный пемфигус, злокачественную анемию, околовенозный энцефаломиелит, синдром POEMS, узелковый полиартериит, ревматическая полимиалгия, полимиозит, первичный билиарный цирроз печени, первичный склерозирующий холангит, прогрессирующую воспалительную невропатию, псориаз, псориатический артрит, гангренозную пиодермию, истинную эритроцитарную аплазию, энцефалит Расмунсена, феномен Рэйнада, рецидивирующий полихондрит, синдром Рейтера, синдром беспокойных ног, фиброзный периуретерит, ревматоидный артрит, ревматоидную лихорадка, саркоидоз, шизофрению, синдром Шмидта, синдром Шницлера, склерит, склеродермию, синдром Шегрена, спондилоартропатию, синдром липкой крови, синдром Стилла, синдром скованного человека, подострый бактериальный инфекционный эндокардит, синдром Сусака, синдром Свита, болезнь Сиденгама, симпатическую офтальмию, артериит Такаясу, височный артериит (гигантоклеточный артериит), синдром Толоза-Хант, поперечный миелит, язвенный колит (тип идиопатических воспалительных

заболеваний кишечника), недифференцированную болезнь соединительной ткани, недифференцированную спондилоартропатию, васкулит, витилиго, гранулематоз Вегенера, синдром Вильсона, синдром Вискотта-Олдрича.

В другом конкретном варианте осуществления связывающая молекула, используемая для конъюгата связанного через бис-линкеры по настоящему изобретению для лечения или профилактики аутоиммунного заболевания, может быть, но не ограничиваясь этим, антиэластиновым антителом; антителом Abys против эпителиальных клеток; антителом против белка базального мембранного коллагена типа IV ; антиядерным антителом; антителом к двуспиральной нативной ДНК; антителом к односпиральной нативной ДНК, анти-кардиолипиновым антителом IgM, IgG; анти-целиакновым антителом; анти-фосфолипидным антителом IgK, IgG; анти-SM антителом; анти-митохондриальным антителом; анти-тироидным антителом; микросомальным антителом, антителом Т-клеток; анти-тиреоглобулин антителом; анти-SCL-70; анти-Jo; анти-U.sub.1RNP; анти-La/SSB; анти-SSA; анти-SSB; антителом к перитальным клеткам; анти-гистоновым антителом; анти-RNP; C-ANCA; P-ANCA; анти-центромерным антителом; анти-фибрилларин и анти-GBM антителом, анти-ганглиозидным антителом; анти-десмогеин 3 антителом; анти-p62 антителом; анти-sp100 антителом; анти-митохондриальным (M2) антителом; анти-ревматоидный фактор антителом; анти-MCV антителом; антителом против топоизомеразы; анти-нейтрофил цитоплазматическим (cANCA) антителом.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления связывающая молекула для конъюгата в настоящем изобретении может связываться как с рецептором, так и с рецепторным комплексом, экспрессируемым на поверхности активированного лимфоцита, который ассоциируется с аутоиммунным заболеванием. Рецептор или рецепторный комплекс может содержать член суперсемейства генов иммуноглобулинов (например, CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD28, CD30, CD33, CD37, CD38, CD56, CD70, CD79, CD79b, CD90, CD125, CD137, CD138, CD147, CD152/CTLA-4, PD-1 или ICOS), член суперсемейства рецепторов TNF (ФНО) (например, CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, INF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, остеопротегерин, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 и APO-3), интегрин, рецептор цитокинов, рецептор хемокинов, главный белок гистосовместимости, лектин (C-тип, S-тип или I-тип) или контрольный белок комплемента.

В другом конкретном варианте осуществления полезные лиганды, связывающиеся с клеткой, которые являются иммуноспецифичными для вирусного или микробного антигена, представляют собой гуманизированные или человеческие моноклональные

антитела. Используемый в данном документе термин «вирусный антиген» включает в себя, но не ограничивается ими, любой вирусный пептид, полипептидный белок (например, ВИЧ gp120, ВИЧ-nef, гликопротеин RSV F, нейрамимидаза вируса гриппа, гемаглютинин вируса гриппа, HTLV tax, гликопротеин вируса простого герпеса (например, gB, gC, gD и gE) и поверхностный антиген гепатита B)), способный вызывать иммунный ответ. Используемый в данном документе термин «микробный антиген» включает в себя, но не ограничивается ими, любой микробный пептид, полипептид, белок, сахарид, полисахарид или молекулу липида (например, полипептиды бактерий, грибов, патогенных простейших или дрожжей, включая, например, LPS и капсульный полисахарид 5/8), который способен вызывать иммунный ответ. Примеры антител, доступных для вирусной или микробной инфекции, включают в себя, но не ограничиваются ими, паливизумаб, который представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против респираторного синцитиального вируса для лечения инфекции RSV; PRO542, который представляет собой слитое антитело CD4 для лечения ВИЧ-инфекции; Оставир, который представляет собой антитело человека для лечения вируса гепатита B; ПРОТВИР, который представляет собой гуманизированное антитело IgG 1 для лечения цитомегаловируса; и анти-LPS антитела.

Конъюгаты “молекула, связывающаяся с клеткой-лекарственное средство” связанные через бис-линкеры по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения инфекционных заболеваний. Данные инфекционные заболевания включают, но не ограничиваются ими, инфекции Acinetobacter, актиномикоз, африканскую сонную болезнь (африканский трипаносомоз), СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита), амебиаз, анаплазмоз, сибирскую язву, инфекцию Arcano-bacterium haemolyticum, аргентинскую геморрагическую лихорадку, Ascariasis, аспергиллез, астровирусная инфекция, бабезиоз, инфекцию Bacillus cereus, бактериальную пневмонию, бактериальный вагиноз, бактероидную инфекцию, балантидиаз, инфекцию байлисаскарис, БК-вирусную инфекцию, черную пиедра, бластоцистную гуманистическую инфекцию, бластомикоз, боливианскую геморагическую лихорадку, инфекцию боррелией, ботулизм (и детский ботулизм), бразильскую геморагическую лихорадку, бруцилез, инфекцию Burkholderia, язву Бурули, калицивирусную инфекцию (норовирус и саповирус), кампилобактериоз, кандидоз (монилиаз; молочница), болезнь кошачьих царапин, целлюлит, болезнь Шагаса (американский трипаносомоз), шанкроид, ветряную оспу, хламидию, инфекцию Chlamydophila pneumoniae, холеру, хромобластомикоз, клонорхоз, инфекцию Clostridium difficile, коксидиодомикоз, американскую горную клещевую лихорадку простуду (острый

вирусный ринофарингит; острый насморк), болезнь Крейцфельдта-Якоба, конго-крымскую геморрагическую лихорадку, криптококкоз, криптоспоридиоз, кожные мигрирующие личинки, циклоспориаз, цистикеркоз, цитомегаловирусную инфекцию, лихорадку Денге, диентамебиаз, дифтерию, дифилобосриаз, дракункулиаз, геморагическую лихорадку Эбола, экинококсоз, эрлихиоз, энтеробиоз (остричная инфекция), энтерококковую инфекцию, энтеровирусную инфекцию, эпидемический тиф, эритремную инфекцию (Пятая болезнь), внезапную экзантему, фасциолопсиаз, фасциолоз, фатальную семейную бессонницу, филариаз, пищевое отравление Clostridium perfringens, свободно живущую амебную инфекцию, инфекцию Fusobacterium, газовую гангрену (Clostridial myonecrosis), геотрихоз, синдром Герстманна-Штрюсслера-Шейнкера, гиардиаз, сап, гнатостомиаз, гонорею, паховую гранулему (Donovanosis), стрептококковую инфекцию группы A, стрептококковую инфекцию группы B, гемофилическую инфекцию, энтеровирусный везикулярный стоматит (HFMD), хантавирусный легочный синдром, инфекция Helicobacter pylori, гемолитико-уремический синдром, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, гепатит A, гепатит B, гепатит C, гепатит D, гепатит E, простой герпес, гистоплазмоз, анкилостомную инфекцию, бокавирусную инфекцию человека, эрлихиоз человека, гранулоцитный анаплазмос человека, метапневмовирусную инфекцию, моноцитарный эрлихиоз человека, папилломавирусную инфекцию человека, вирусную парагриппозную инфекцию человека, гименолепаз, инфекционный мононуклеоз (моно) вируса Эпштейна-Барр, грипп, изоспориаз, болезнь Кавасаки, кератит, инфекцию Kingella kingae, куру, лихорадку Ласса, легионеллез (болезнь Легионеров), легионеллез (лихорадка Понтиак), лейшманиоз, проказу, лептоспироз, листериоз, болезнь Лайма (боррелиоз Лайма), лимфатический филяриоз (слоновая болезнь), лимфоцитарный хориоменингит, малярию, марбургскую геморрагическую лихорадку, корь, мелиодоз (болезнь Уитмора), менингит, менингококковую болезнь, метагонимоз, микроспоридиоз, контагиозный моллюск, паротит, мышиный тиф (эндемический тиф), микоплазменную пневмонию, мицетому, миаз, неонатальный конъюнктивит (офтальмия новорожденного), (новый) вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD, nvCJD), нокардиоз, онхоцеркоз (речная слепота), паракокцидиоидоз (южноамериканский бластомикоз), парагонимоз, пастереллез, Pediculosis capitis (головные вши), Pediculosis corporis (вши тела), Pediculosis pubis (лобковые вши, крабовые вши), воспаление тазовых органов, пертусит (коклюш), чуму, пневмоококковую инфекцию, пневмоцистную пневмонию, пневмонию, полиомиелит, инфекцию Prevotella, первичный амебный менингоэнцефалит, прогрессирующую

многоочаговую лейкоэнцефалопатию, пситтакоз, лихорадку Q, бешенство, лихорадку от крысиного укуса, респираторно-синцитиальную вирусную инфекцию, риноспоридиоз, риновирусную инфекцию, риккетсиозную инфекциб, рикцитозную осру, лихорадку долины Рифт, пятнистую лихорадку Скалистых гор, ротавирусную инфекцию, краснуху, сальмонеллез, ОРВИ (острый респираторный синдром), чесотку, шистосомоз, сепсис, шигеллез (бациллярная дизентерия), опоясывающий лишай (Herpes zoster), натуральную оспу(Variola), споротрихоз, стафилококковое пищевое отравление, стафилококковую инфекцию, стронгилоидоз, сифилис, тениаз, столбняк, дерматомикоз бороды и усов (псевдофолликулит волос бороды), грибковое поражение волосистой части (дерматомикоз волосистой части головы), дерматомикоз гладкой кожи (стригущий лишай тела), паховый дерматомикоз (паховый зуд), опоясывающий лишай (стригущий лишай рук), чёрный лишай, грибковое заболевание ног (стопа спортсмена), дерматофитный онихомикоз (онихомикоз), отрубевидный лишай (Pityriasor versicolor) , токсокароз (глазные мигрирующие личинки), токсокароз (висцеральные мигрирующие личинки), токсоплазмоз, трихинеллез, трихомониаз, трихуроз (власоглав), туберкулез, туляремия, инфекцию Ureaplasma urealyticum, венесуэльский лошадиный энцефалит, венесуэльскую геморрагическую лихорадку, вирусную пневмонию, лихорадку Западного Нила, белую пьедра (Tinea blanca), псевдотуберкулезную инфекцию Yersinia, иерсиниоз, желтую лихорадка, зигомикоз.

Молекулы, связывающиеся с клетками, которые, как более предпочтительно, являются антителами, описанными в данном патенте, против патогенных штаммов которые включают в себя, но не ограничиваются ими, антитела против патогенов Acinetobacter baumannii, Actinomyces israelii, Actinomyces gerencseriae и Propionibacterium propionicus, Trypanosoma brucei, ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), Entamoeba histolytica, род Anaplasma, Bacillus anthracis, Arcanobacterium haemolyticum, вирус Junin, Ascaris lumbricoides, род Aspergillus, семья Astroviridae, род Babesia, Bacillus cereus, разнообразные бактерии, род Bacteroides, Balantidium coli, род Baylisascaris, BK вирус, Piedraia hortae, Blastocystis hominis, Blastomyces dermatitides, Machupo вирус, род Borrelia, Clostridium botulinum, Sabia, род Brucella, обычно Burkholderia cepacia и другие виды Burkholderia, Mycobacterium ulcerans, семейство Caliciviridae, род Campylobacter, обычно Candida albicans и другие виды Candida, Bartonella henselae, группа A Streptococcus и Staphylococcus, Trypanosoma cruzi, Haemophilus ducreyi, Varicella zoster вирус (VZV), Chlamydia trachomatis, Chlamydophila pneumoniae, Vibrio cholerae, Fonsecaea pedrosoi, Clonorchis sinensis, Clostridium difficile, Coccidioides immitis и Coccidioides posadasii, вирус

колорадской клещевой лихорадки, риновирусы, короновирусы, CJD прион, вирус конго-крымской геморрагической лихорадки, Cryptococcus neoformans, род Cryptosporidium, Ancylostoma braziliense; разнообразные паразиты, Cyclospora cayetanensis, Taenia solium, Cytomegalovirus, Dengue viruses (DEN-1, DEN-2, DEN-3 и DEN-4) – флавивирусы, Dientamoeba fragilis, Corynebacterium diphtheriae, Diphyllobothrium, Dracunculus medinensis, эболавирус, род Echinococcus, Ehrlichia genus, Enterobius vermicularis, род Enterococcus, род Enterovirus, Rickettsia prowazekii, парвовирус B19, герпевирус человека 6 и герпевирус человека 7, Fasciolopsis buski, Fasciola hepatica и Fasciola gigantica, FFI прион, Filarioidea суперсемейство, Clostridium perfringens, род Fusobacterium, Clostridium perfringens; другие виды Clostridium, Geotrichum candidum, GSS прион, Giardia intestinalis, Burkholderia mallei, Gnathostoma spinigerum и Gnathostoma hispidum, Neisseria gonorrhoeae, Klebsiella granulomatis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Haemophilus influenzae, энтеровирусы, в основном вирус коксаки A и энтеровирус 71, вирус Sin Nombre, Helicobacter pylori, Escherichia coli O157:H7, семейство Bunyaviridae, вирус гепатита A, вирус гепатита B, вирус гепатита C, вирус гепатита D, вирус гепатита E, вирус простого герпеса 1, вирус простого герпеса 2, Histoplasma capsulatum, Ancylostoma duodenale и Necator americanus, Hemophilus influenzae, бокавирус человека, Ehrlichia ewingii, Anaplasma phagocytophilum, метапневмовирус человека, Ehrlichia chaffeensis, вирус папиломы человека, вирус параинфлюенцы человека, Hymenolepis nana и Hymenolepis diminuta, вирус Эпштейна-Барр, семейство Orthomy-xoviridae, Isospora belli, Kingella kingae, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella ozaenas, Klebsiella rhinoscleromotis, прион Kuru, вирус Lassa, Legionella pneumophila, Legionella pneumophila, род Leishmania, Mycobacterium leprae и Mycobacterium lepromatosis, род Leptospira, Listeria monocytogenes, Borrelia burgdorferi и другие виды Borrelia, Wuchereria bancrofti и Brugia malayi, вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), род Plasmodium, марбургский вирус, вирус кори, Burkholderia pseudomallei, Neisseria meningitides, Metagonimus yokagawai, Microsporidia phylum, вирус контагиозного молюска (MCV), вирус паротита, Rickettsia typhi, Mycoplasma pneumoniae, разнообразные представители бактерий (Actinomycetoma) и грибков (Eumycetoma), паразитарные личинки двухкрылых насекомых, Chlamydia trachomatis и Neisseria gonorrhoeae, прион vCJD, Nocardia asteroides и другие виды Nocardia, Onchocerca volvulus, Paracoccidioides brasiliensis, Paragonimus westermani и другие виды Paragonimus, род Pasteurella, Pediculus humanus capitis, Pediculus humanus corporis, Phthirus pubis, Bordetella pertussis, Yersinia pestis, Streptococcus pneumoniae, Pneumocystis jirovecii, полиовирус, род

Prevotella, Naegleria fowleri, вирус JC, Chlamydophila psittaci, Coxiella burnetii, вирус бешенства, Streptobacillus moniliformis и Spirillum minus, респираторно-синцитиальный вирус, Rhinosporidium seeberi, риновирус, род Rickettsia, Rickettsia akari, вирус лихорадки долины Рифт, Rickettsia rickettsii, ротавирус, вирус коревой краснухи, Salmonella genus, коронавирус SARS, Sarcoptes scabiei, род Schistosoma, род Shigella, вирус ветряной оспы, Variola major или Variola minor, Sporothrix schenckii, Staphylococcus genus, род Staphylococcus, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Strongyloides stercoralis, Treponema pallidum, род Taenia, Clostridium tetani, род Trichophyton, Trichophyton tonsurans, род Trichophyton, Epidermophyton floccosum, Trichophyton rubrum, и Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Hortaea werneckii, род Trichophyton, род Malassezia, Toxocara canis или Toxocara cati, Toxoplasma gondii, Trichinella spiralis, Trichomonas vaginalis, Trichuris trichiura, Mycobacterium tuberculosis, Francisella tularensis, Ureaplasma urealyticum, вирус венесуэльского энцефалита лошадей, Vibrio colerae, вирус Guanarito, вирус западного Нила, Trichosporon beigelii, Yersinia pseudotuberculosis, Yersinia enterocolitica, вирус желтой лихорадки, Mucorales order (Mucormycosis) и Entomophthorales order (Entomophthora-mycosis), Pseudomonas aeruginosa, Campylobacter (Vibrio) fetus, Aeromonas hydrophila, Edwardsiella tarda, Yersinia pestis, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Salmonella typhimurium, Treponema pertenue, Treponema carateneum, Borrelia vincentii, Borrelia burgdorferi, Leptospira icterohemorrhagiae, Pneumocystis carinii, Brucella abortus, Brucella suis, Brucella melitensis, Mycoplasma spp., Rickettsia prowazeki, Rickettsia tsutsugumushi, Clamydia spp.; патогенные грибки (Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Histoplasma capsulatum); простейшие (Entomoeba histolytica, Trichomonas tenas, Trichomonas hominis, Tryoanosoma gambiense, Trypanosoma rhodesiense, Leishmania donovani, Leishmania tropica, Leishmania braziliensis, Pneumocystis pneumonia, Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malaria); или гельминты (Schistosoma japonicum, Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium, и анкилостомы).

Другие антитела в качестве лигандов, связывающихся с клетками, используемые в данном изобретении для лечения вирусных заболеваний, включают, но не ограничиваются ими, антитела против антигенов патогенных вирусов, в том числе в качестве неограничивающих примеров: Poxyiridae, Herpesviridae, Adenoviridae, Papovaviridae, Enteroviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Retroviridae, вирусы гриппа, вирусы парагриппа, паротит, корь, респираторно-синцитиальный вирус, корьевая краснуха, Arboviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, не-A/не-B вирус гепатита, Rhinoviridae, Coronaviridae, Rotoviridae, онковирус [такой как, HBV (гепатоцеллюлярная карцинома),

HPV (рак шейки матки, рак анального канала), ассоциированный с саркомой Капоши герпевирус (саркома Капоши), вирус Эпштейна-Барр (назофарингеальная карцинома, лимфома Беркитта, первичная лимфома центральной нервной системы), MCPyV (рак клеток Меркель), SV40 (вирус обезьян 40), HCV (гепатоцеллюлярная карцинома), HTLV-I (Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых)], иммунные расстройства вызванные вирусом: [таким как вирус иммунодефицита человека (СПИД)]; вирус центральной нервной системы: [такой как, JCV (прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия), MeV (подострый склерозирующий лейкоэнцефалит), LCV (лимфоцитарный хориоменингит), Arbovirus encephalitis, Orthomyxoviridae (возможно) (Encephalitis lethargica), RV (бешенство), вирус Chandipura, герпевирусный менингит, синдром Рамсея-Ханта тип II; поливирус (полиомиелит, пост-полио синдром), HTLV-I (тропический спастический парапарез)]; цитомегаловирус (Cytomegalovirus retinitis, HSV (герпетический кератит)); кардиоваскулярный вирус [такой как CBV (перикардит, миокардит)]; респираторная системная/острая вирусная назофарингальная/вирусная пневмония: [вирус Эпштейна-Барр (инфекция EBV/инфекционный мононуклеоз), цитомегаловирус; SARS коронавирус (тяжелый острый респираторный синдром) Orthomyxoviridae: вирус гриппа A/B/C (грипп/птичий грипп), парамиксовирус: вирусы парагриппа человека (парагрипп), RSV (респираторный синцитиальный вирус человека), hMPV]; вирус пищеварительной системы [MuV (паротит), цитомегаловирус (цитомегаловирусный эзофагит); аденовирус (аденовирусная инфекция); ротавирус, норовирус, астровирус, коронавирус; HBV (вирус гепатита B), CBV, HAV (вирус гепатита A), HCV (вирус гепатита C), HDV (вирус гепатита D), HEV (вирус гепатита E), HGV (вирус гепатита G)]; урогенитальный вирус [например, вирус BK, MuV (паротит)].

В соответствии с еще одной целью настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим конъюгат по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом для лечения раковых заболеваний, инфекций или аутоиммунных расстройств. Способ лечения раковых заболеваний, инфекций и аутоиммунных расстройств может применяться на практике in vitro, in vivo или ex vivo. Примеры применения in vitro включают обработку клеточных культур для уничтожения всех клеток, за исключением желаемых вариантов, которые не экспрессируют целевой антиген; или уничтожения вариантов, которые экспрессируют нежелательный антиген. Примеры использования ex vivo включают обработку гемопоэтических стволовых клеток (HSC) перед выполнением трансплантации (HSCT) одному и тому же пациенту для уничтожения больных или

злокачественных клеток. Например, клиническое лечение ex vivo для удаления опухолевых клеток или лимфоидных клеток из костного мозга перед аутологичной трансплантацией при лечении рака или при лечении аутоиммунного заболевания, или для удаления Т-клеток и других лимфоидных клеток из аллогенного костного мозга или ткани до трансплантации для того, чтобы предотвратить заболевание трансплантат против хозяина, можно осуществлять следующим образом. У пациента или другого человека отбирают костный мозг, а затем инкубируют в среде, содержащей сыворотку, к которой добавляют конъюгат по изобретению, в диапазоне концентраций от около 1 пМ до 0,1 мМ, в течение от около 30 минут до около 48 часов при температуре около 37 °С. Точные условия концентрации и время инкубации (= доза) легко определяются квалифицированными врачами. После инкубации клетки костного мозга промывают средой, содержащей сыворотку, и возвращают пациенту внутривенной инфузией согласно известным методикам. В тех случаях, когда пациент получает другое лечение, такое как курс аблятивной химиотерапии или облучение всего тела между временем сбора костного мозга и реинфузией обработанных клеток, обработанные клетки костного мозга хранят замороженными в жидком азоте с использованием стандартного медицинского оборудования.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА/ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ ДЛЯ КОНЪЮГИРОВАНИЯ

Лекарственные средства, которые могут быть конъюгированы с молекулой, связывающейся с клеткой, настоящего изобретения, представляют собой низкомолекулярные лекарственные средства, включающие в себя цитотоксические агенты, которые могут быть связаны с или после их модификации для связывания с агентом, связывающимся с клеткой. Термин «низкомолекулярное лекарственное средство» широко используется в настоящем документе для обозначения органического, неорганического или металлоорганического соединения, которое может иметь молекулярную массу, например, от 100 до 2500, более подходящую от 200 до 2000. Низкомолекулярные лекарственные средства хорошо охарактеризованы в данной области техники, например, в WO05058367A2 и в патенте США № 4956303, среди прочего, и включены во всей своей полноте посредством ссылки. Лекарственные средства включают в себя известные лекарственные средства и те, которые могут стать известными лекарственными средствами.

Лекарственные средства, которые известны, включают в себя, но не ограничиваются ими,

1). Химиотерапевтические агенты: a). алкилирующие агенты: такие, как азотистые иприты: хлорамбуцил, хлорнафазин, циклофосфамид, дакарбазин, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлорэтамин оксид гидрохлорид, манномустин, митобронитол, мельфалан, митолактол, пипоброман, новембихин, фенестерин, преднимустин, тиотепа, трофосфамид, урацильный иприт; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); дуокармицин (включая синтетические аналоги, димеры KW-2189, CBI-TMI и CBI); димеры бензодиазепина (например, димеры пирролобензодиазепина (PBD) или томаймицина, индолинобензодиазепинов, имидазобензотиадиазепинов или оксазолидинобензодиазепинов); нитрозомочевины: (кармустин, ломустин, хлорозотоцин, фотемустин, нимустин, ранимустин); алкилсульфонаты: (бусульфан, треосульфан, импросульфан и пипосульфан); триазены: (дакарбазин); платиносодержащие соединения: (карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин); азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилоломеламин]; б) растительные алкалоиды: такие как алкалоиды барвинка: (винкристин, винбластин, виндезин, винорелбин, навелбин); таксоиды: (паклитаксел, доцетаксол) и их аналоги, майтанзиноиды (DM1, DM2, DM3, DM4, майтанзин и ансамитоцины) и их аналоги, криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); эпотилоны, элеутеробин, дискодермолид, бриостатины, долостатины, ауристатины, тубулизины, цефалостатины; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; c). ингибиторы ДНК-топоизомеразы: такие как [эпиподофиллины: (9-аминокамптотецин, камптотецин, криснатол, дауномицин, этопозид, этопозид фосфат, иринотекан, митоксантрон, новантрон, ретиноевые кислоты (ретинолы), тенипозид, топотекан, 9-нитрокамптотецин (RFS 2000)); митомицины: (Митомицин C) и его аналоги]; d). анти-метаболиты: такие как {[анти-фолаты: ингибиторы DHFR: (метотрексат, триметрексат, деноптерин, птероптерин, аминоптерин (4-аминоптероевая кислота) или другие аналоги фолиевой кислоты); ингибиторы IMP-дегидрогеназы: (микофеноловая кислота, тиазофурин, рибавирин, EICAR); ингибиторы рибонуклеотидредуктазы: (гидроксимочевина, дефероксамин)]; [аналоги пиримидина: аналоги урацила: (анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, капецитабин (кселода), кармофур, цитарабин, дидезоксуридин, доксифлуридин, эноцитабин, 5-фторурацил, флоксуридин, ратитрексед (томудекс)); аналоги цитозина: (цитарабин, цитозинарабинозид, флударабин); аналоги пурина: (азатиоприн, флударабин, меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин)]; пополнитель запаса фолиевой кислоты, такой

как фролиновая кислота}; e). гормональные терапии: такие как {антагонисты рецепторов: [антиэстрогены: (мегестрол, ралоксифен, тамоксифен); агонисты LHRH: (госкрклин, лейпролид ацетат); антиандрогены: (бикалутамид, флутамид, калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, гозерелин, лейпролид, мепитиостан, нилутамид, тестолактон, трилостан и другие ингибиторы андрогенов)]; ретиноиды/дельтоиды: [аналоги витамина D3: (CB 1093, EB 1089 KH 1060, холекальциферол, эргокальциферол); фотодинамическая терапия: (вертепорфин, фталоцианин, фотосенсибилизатор Pc4, деметоксигипокреллин A); цитокины: (интерферон-альфа, интерферон-гамма, фактор некроза опухолей (TNF), белки человека, содержащие домен TNF)]}; f). ингибиторы киназы, такие как BIBW 2992 (анти-EGFR/Erb2), иматиниб, гефитиниб, пегаптаниб, сорафениб, дазатиниб, сунитиниб, эрлотиниб, нилотиниб, лапатиниб, акситиниб, пазопаниб. вандетаниб, E7080 (анти-VEGFR2), мумбритиниб, понатиниб (AP24534), бафетиниб (INNO-406), бозутиниб (SKI-606), кабозантиниб, висмодегиб, инипариб, руксолитиниб, CYT387, акситиниб, тивозаниб, сорафениб, бевацизумаб, цетуксимаб, трастузумаб, ранибизумаб, панитумумаб, испинесиб; g). ингибиторы поли(АДФ-рибозо)полимеразы (ПАРП), такие как олапариб, нирапариб, инипариб, талазопариб, велипариб, велипариб, CEP 9722 (цефалон), E7016 (Эизаи), BGB-290 (БеиГен), 3-аминобензамид;

h) антибиотики, такие как энедииновые антибиотики (например, калихеамицины, особенно калихеамицин γ1, δ1, α1 и β1, см., например, J. Med. Chem., 39 (11), 2103–2117 (1996), Angew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); динемицин, включая динемицин A и дезоксидинемицин; эсперамицин, кедарцидин, C-1027, мадуропептин, а также неокарзиностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые хромофоры энедииновых антиобиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин; хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, нитомицины, микофенолокислота , ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; i) другие: такие как поликетиды (ацетогенины), особенно булатацин и булатацинон; гемцитабин, эпоксомицины (например, карфилзомиб), бортезомиб, талидомид, леналидомид, помалидомид, тозедостат, зибрестат, PLX4032, STA-9090, стимувакс, алловектин-7, ксегева, провенж, йервой, ингибиторы изопренилирования (такие как ловастатин), допаминергичные

нейротоксины (такие как 1-метил-4-фенилпиридиниевый ион), ингибиторы клеточного цикла (такие как стауроспорин), актиномицины (такие как актиномицин D, дактиномицин), блеомицины (такие как блеомицин A2, блеомицин B2, пепломицин), антрациклины (такие как даунорубицин, доксорубицин (адриамицин), идарубицин, эпирубицин, эрибулин, пирарубицин, зорубицин, метоксантрон, ингибиторы MDR (такие как верапамил), ингибиторы Ca^{2+}-АТФазы (такие как тапсигаргин), ингибиторы гистондеацетилазы (вориностат, ромидепсин, панобиностат, вальпруевая кислота, моцетиностат (MGCD0103), белиностат, PCI-24781, энтиностат, SB939, ресминостат, гивиностат, AR-42, CUDC-101, сульфорафан, трихостатин A); тапсигаргин, целекоксиб, глитазоны, эпигаллокатехин галлат, дисульфирам, салиноспорамид A .; антиадреналовые средства, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминолевулиновая кислота; амсакрин; арабинозид, бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эфлорнитин (DFMO), эльфомитин; эллиптиния ацетат, этоглюцид; нитрат галлия; гацитозин, гидроксимочевина; ибандронат, лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин T-2, веррукарин A, роридин A и ангуидин); уретан, миРНК, антисмысловые лекарственные средства и нуклеолитический фермент.

2). Агент против аутоиммуных заболеваний включает в себя, но не ограничивается ими, циклоспорин, циклоспорин A, аминокапроновую кислоту, азатиоприн, бромокриптин, хлорамбуцил, хлорохин, циклофосфамид, кортикостероиды (например, амцинониды, бетаметазон, будезониды, гидрокортизон, флунизолид, флутиказон пропионат, флуокортолон даназол, дексаметазон, триамцинолона ацетонид, беклометазона дипропионат), DHEA (ДГЭА), энанерцепт, гидроксихлорохин, инфликсимаб, мелоксикам, метотрексат, мофетил, микофенилат, преднизон, сиролимус, такролимус.

3). Агент против инфекционного заболевания включает в себя, но не ограничивается ими, a). аминогликозиды: амикацин, астромицин, гентамицин (нетилмицин, сизомицин, изепамицин), гигромицин B, канамицин (амикацин, арбекацин, беканамицин, дибекацин, тобрамицин), неомицин (фрамицетин, паромомицин, рибостамицин), нетилмицин, спектиномицин, стрептомицин, тобрамицин, вердамицин; b). амфениколы: азидамфеникол, хлорамфеникол, флорфеникол, тиамфеникол; c). ансамицины:

гелданамицин, гербимицин; d). карбапенемы: биапенем, дорипенем, эртапенем, имипенем/циластатин, меропенем, панипенем; e). цефемы: карбацефем (лоракарбеф), цефацетрил, цефаклор, цефрадин, цефадроксил, цефалониум, цефалоридин, цефалотин или цефалосин, цефалексин, цефалоглицин, цефамандол, цефапирин, цефатризин, цефазафлур, цефаседон, цефазолин, цефбуперазон, цефкапен, цефальдоксим, цефепим, цефминокс, цефокситин, цефпрозил, цефроксадин, цефтезол, цефуроксим, цефиксим, цефдинир, цефдиторен, цефепим, цефетамет, цефменоксим, цефодизим, цефоницид, цефоперазон, цефоранид, цефотаксим, цефотиам, цефозопран, цефалексин, цефпимизол, цефпирамид, цефпиром, цефподоксим, цефпрозил, цефхином, цефсулодин, цефтазидим, цефтерам, цефтибутен, цефтиолен, цефтизоксим, цефтобипрол, цефтриаксон, цефуроксим, цефузонам, цефамицин (цефокситин, цефотетан, цефметазол), оксацефем (фломоксиф, латамоксиф); f). гликопептиды: блеомицин, ванкомицин (оритаванцин, телаванцин), тейкопланин (далбаванцин), рамопланин; g). глицилциклины: например, тигециклин; g). ингибиторы β-лактамазы: пенам (сульбактам, тазобактам), клавам (клавулановая кислота); i). линкозамиды: клиндамицин, линкомицин; j). липопептиды: даптомицин, A54145, кальций-зависимые антибиотики (CDA); k). макролиды: азитромицин, цетромицин, кларитромицин, диритромицин, эритромицин, флуритромицин, джозамицин, кетолид (телитромицин, цетромицин), мидекамицин, миокамицин, олеандомицин, рифамицин (рифампицин рифампин, рифабутин, рифапентин), рокитамицин, рокситромицин, спектиномицин, спирамицин, такролимус (FK506), тролеандомицин, телитромицин; l). монобактамы: азтреонам, тигемонам; m). оксазолидиноны: линезолид; n). пенициллины: амоксициллин, ампициллин (пивампицилин, гетациклин, бакампициллин, метампициллин, талампициллин), азидоциллин, азлоциллин, бензилпенициллин, бензатин бензилпенициллин, бензатин феноксиметил-пенициллин, клометоциллин, прокаин бензилпенициллин, карбенициллин (кариндациллин), клоксациллин, диклоксациллин, эпициллин, флуклоксациллин, мециллинам (пивмециллинам), мезлоциллин, метициллин, нафциллин, оксациллин, пенамециллин, пенициллин, фенетилциллин, феноксиметилпенициллин, пиперациллин, пропициллин, сульбенициллин, темоциллин, тикарциллин; o). полипептиды: бацитрацин, колистин, полимиксин B; p). хинолоны: алатрофлоксацин, балофлоксацин, ципрофлоксацин, клинафлоксацин, данофлоксацин, дифлоксацин, эноксацин, энрофлоксацин, флоксин, гареноксацин, гатифлоксацин, гемифлоксацин, грепафлоксацин, кано тровафлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, марбофлоксацин, моксифлоксацин, надифлоксацин, норфлоксацин, орбифлоксацин, офлоксацин, пефлоксацин, тровафлоксацин грепафлоксацин, ситафлоксацин,

спарфлоксацин, темафлоксацин, тосуфлоксацин, тровафлоксацин; q). стрептограмины: пристинамицин, хинупристин/дальфопристин); r). сульфонамиды: мафенид, пронтозил, сульфацетамид, сульфаметизол, сульфанилимид, сульфасалазин, сульфизоксазол, триметоприм, триметоприм-сульфаметоксазол (котримоксазол); s). стероидные антибактериальные средства: например, фузидиевая кислота; t). тетрациклины: доксициклин, хлортетрациклин, кломоциклин, демеклоциклин, лимециклин, меклоциклин, метациклин, миноциклин, окситетрациклин, пенимециклин, ролитетрациклин, тетрациклин, глицилциклины (например, тигециклин); u). другие типы антибиотиков: аннонацин, арсфенамин, ингибиторы бактопренола (бацитрацин), ингибиторы DADAL/AR (циклосерин), диктиостатин, дискодермолид, элейтеробин, эпотилон, этамбутол, этопозид, фаропенем, фузидиевая кислота, фуразолидон, изониазид, лаулималид, метронидазол, мупироцин, миколактон, ингибиторы синтеза NAM (например, фосфомицин), нитрофурантоин, паклитаксел, платенсимицин, пиразинамид, квинупристин/дальфопристин, рифампицин (рифампин), тазобактам тинидазол, уварицин;

4). Антивирусные лекарственные средства: a). ингибиторы входа/слияния: аплавирок, маравирок, викривирок, gp41 (энфувиртид), PRO 140, CD4 (ибализумаб); b). ингибиторы интегразы: ралтегравир, элвитегравир, глобоиднан A; c). ингибиторы созревания: бевиримат, вивекон; d). ингибиторы нейраминидазы **:** осельтамивир, занамивир, перамивир; e). Нуклеозиды и нуклеотиды: абакавир, ацикловир, адефовир, амдоксовир, априцитабин, бривудин, цидофовир, клевудин, дексельвуцитабин, диданозин (ddI), элвуцитабин, эмтрицитабин (FTC), энтекавир, фамцикловир, фторурацил (5-FU), 3'-фтор-замещенные 2',3'-дидезоксинуклеозидные аналоги (например, 3'-фтор-2',3'-дидезокситимидин (FLT) и 3'-фтор-2',3'-дидезоксигуанозин (FLG), фомивирсен, ганцикловир, идоксуридин, ламивудин (3TC), l-нуклеозиды (например, β-l-тимидин и β-l-2'-дезоксицитидин), пенцикловир, рацивир, рибавирин, стампидин, ставудин (d4T), тарибавирин (вирамидин), телбивудин, тенофовир, трифлуридин валацикловир, валганцикловир, зальцитабин (ddC), зидовудин (AZT); f). Не-нуклеозиды: амантадин, атевиридин, каправирин, диарилпиримидины (этравирин, рилпивирин), делавирдин, докозанол, эмивирин, эфавиренц, фоскарнет (фосфономуравьина кислота), имиквимод, интерферон-альфа, ловирид, лоденозин, метизазон, невирапин, NOV-205, пэгинтерферон альфа подофиллотоксин, рифампицин, римантадин, ресиквимод (R-848), тромантадин; g) ингибиторы протеазы: ампренавир, атазанавир, боцепревир, дарунавир, фосампренавир, индинавир, лопинавир, нелфинавир, плеконарил, ритонавир, саквинавир, телапревир (VX-950), типранавир; h). Другие типы антивирусных лекарственных средств: абзим, арбидол,

каланолид А, церагенин, циановирин-н, диарилпиримидины, эпигаллокатехин галлат (EGCG), фоскарнет, гриффитсин, тарибавирин (вирамидин), гидроксимочевина, KP-1461, милтефозин, плеконарил, комбинированные гибридные ингибиторы рибавирин, селицилиб.

5). Лекарственные средства, используемые для конъюгатов, соединенных через бис-линкер, по настоящему изобретению, также включают радиоизотопы. Примерами радиоизотопов (радионуклидов) являются ^{3}H, ^{11}C, ^{14}C, ^{18}F, ^{32}P, ^{35}S, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{133}Xe, ^{177}Lu, ^{211}At или ^{213}Bi. Радиоизотопно-меченные антитела полезны в экспериментах по нацеленной визуализации рецепторов, или могут быть использованы для нацеленного лечения, такого как конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению (Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9): 1137-46). Молекулы, связывающиеся с клеткой, например, антителом, могут быть меченными реагентами лигандами через мостиковые линкеры по настоящему патенту, которые связывают, хелатируют или иным образом образуют комплекс с радиоактивным изотопом металла, используя методики, описанные в Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, Pubs. (1991). Хелатирующие лиганды, которые могут образовывать комплекс с ионом металла, включают в себя DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA и TETA (Macrocyclics, Даллас, Техас, США).

6). Фармацевтически приемлемые соли, кислоты, производные, гидратная или гидратированная соль; или кристаллическая структура; или оптический изомер, рацемат, диастереомер или энантиомер любого из вышеуказанных лекарственных средств.

В другом варианте осуществления молекула лекарственного средства/цитотоксическая молекула в Формуле (I) и/или (II) может представлять собой молекулу хромофора, таким образом конъюгат можно использовать для обнаружения, мониторинга или изучения взаимодействия молекулы, связывающейся с клеткой, с клеткой-мишенью. Молекулы хромофора представляют собой соединение, которое обладает способностью поглощать такие виды света, как УФ- свет, флуоресцентный свет, ИК- свет, ближний ИК-свет, видимый свет; молекула хроматофора включает в себя класс или подкласс ксантофоров, эритрофоров, иридофоров, лейкофоров, меланофоров и цианофоров; класс или подкласс молекул флуорофоров, которые представляют собой флуоресцентные химические соединения, переизлучающие свет после облучения; класс или подкласс молекул видимой фототрансдукции; класс или подкласс фотофорных молекул; класс или подкласс люминесцентных молекул; и класс или подкласс соединений люциферина.

Молекула хромофора может быть выбрана из, но не ограничиваясь ими, небелковых органических флуорофоров, такими как: производные ксантена (флуоресцеин, родамин, орегоновый зеленый, эозин и техаский красный); производных цианина: (цианин, индокарбоцианин, оксакарбоцианин, тиакарбоцианин и мероцианин); производных скварина и замещенных в кольце сквараинов, включая красители Seta, SeTau и Square; производных нафталина (производные дансила и продана); производных кумарина; производных оксадиазола (пиридилоксазол, нитробензоксадиазол и бензоксадиазол); производных антрацена (антрахиноны, включая DRAQ5, DRAQ7 и CyTRAK Orange); производных пирена (каскадный синий и др.); производных оксазина (нильский красный, нильский синий, крезиловый фиолетовый, оксазин 170 и т. д.), производных акридина (профлавин, акридиновый оранжевый, акридиновый желтый и др.), производных арилметина (аурамин, кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый), производных тетрапиррола (порфин, фталоцианин, билирубин).

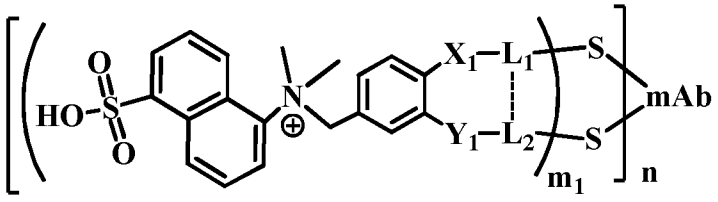
Или молекула хромофора может быть выбрана из любых аналогов и производных следующих флуорофорных соединений: CF краситель (Biotium), зонды DRAQ и CyTRAK (BioStatus), BODIPY (Invitrogen), Alexa Fluor (Invitrogen), DyLight Fluor (Thermo Scientific, Pierce), Atto и Tracy (Sigma Aldrich), FluoProbes (Interchim), красители Abberior (Abberior), красители DY и MegaStokes (Dyomics), красители Sulfo Cy (Cyandye), HiLyte Fluor (AnaSpec), красители Seta, SeTau и Square (SETA BioMedicals), красители Quasar и Cal Fluor (Biosearch Technologies), красители SureLight (APC, RPEPerCP, Phycobilisomes) (Columbia Biosciences), APC, APCXL, RPE, BPE (Phyco-Biotech).

Примеры широко используемых флуорофорных соединений, которые являются реакционноспособными или конъюгируемыми с линкерами по изобретению, представляют собой: аллофикоцианин (APC), аминокумарин, конъюгаты APC-Cy7, BODIPY-FL, Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy3B, Cy5, Cy5.5, Cy7, флуоресцеин, FluorX, гидроксикумарин, IR-783, лисамин родамин B, люциферинoвый желтый, метоксикумарин, NBD, Pacific Blue, Pacific Orange, конъюгаты PE-Cy5, конъюгаты PE-Cy7, PerCP, R-фикоэритрин (PE), красный 613, Seta-555-азид, Seta-555-DBCO, Seta-555-NHS, Seta-580-NHS, Seta-680-NHS, Seta-780-NHS, Seta-APC-780, Seta-PerCP-680, Seta-R-PE-670, SeTau-380-NHS, SeTau-405-малеимид, SeTau-405-NHS, SeTau-425-NHS, SeTau-647-NHS, техаский красный, TRITC, TruRed, X-родамин.

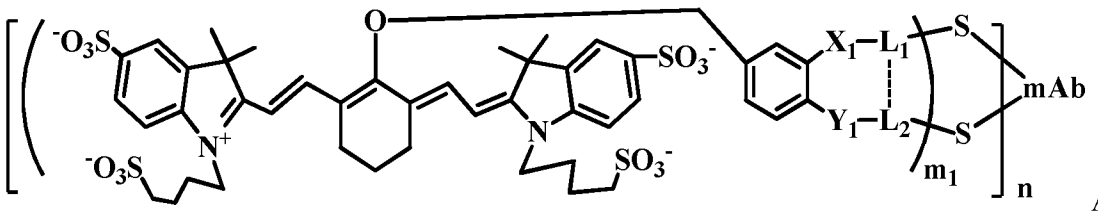
Флуорофорные соединения, которые могут быть связаны с линкерами по изобретению для исследования нуклеиновых кислот или белков, выбраны из следующих соединений или их производных: 7-AAD (7-аминоактиномицин D, CG-селективный),

акридиновый оранжевый, хромомицин A3, CyTRAK оранжевый (Biostatus, красный свет возбуждения темный), DAPI, DRAQ5, DRAQ7, бромид этидия, Hoechst33258, Hoechst33342, LDS 751, митрамицин, пропидиум йодид (PI), SYTOX Blue, SYTOX Green, SYTOX Orange, тиазольный оранжевый, TO-PRO: цианиновый мономер, TOTO-1, TO-PRO-1, TOTO-3, TO-PRO-3, YOSeta-1, YOYO-1. Флуорофорные соединения, которые могут быть связаны с линкерами по изобретению для исследования клеток, выбраны из следующих соединений или их производных: DCFH (2'7'-дихородигидрофлуоресцеин, окисленная форма), DHR (дигидродамин 123, окисленная форма, свет катализирует окисление), Fluo-3 (AM сложный эфир: pH > 6), Fluo-4 (AM сложный эфир pH 7.2), Indo-1 (AM сложный эфир, низкий/высокий уровень кальция (Ca2+)) и SNARF (pH 6/9). Предпочтительные флуорофорные соединения, которые могут быть связаны с линкерами по изобретению для исследования белков/антител, выбраны из следующих соединений или их производных: аллофикоцианин (APC), AmCyan1 (тетрамер, Clontech), AsRed2 (тетрамер, Clontech), Azami Green (мономер, MBL), азурит, B-фикоэритрин (BPE), Cerulean, CyPet, мономер DsRed (Clontech), DsRed2 («RFP», Clontech), EBFP, EBFP2, ECFP, EGFP (слабый димер, Clontech), Emerald (слабый димер, Invitrogen), EYFP (слабый димер, Clontech), GFP (мутация S65A), GFP (мутация S65C), GFP (S65L мутация), GFP (мутация S65T), GFP (мутация Y66F), GFP (мутация Y66H), GFP (мутация Y66W), GFPuv, HcRed1, J-Red, Katusha, Kusabira Orange (мономер, MBL), mCFP, mCherry, mCitrine , Midoriishi Cyan (димер, MBL), mKate (TagFP635, мономер, Evrogen), mKeima-Red (мономер, MBL), mKO, mOrange, mPlum, mRaspberry, mRFP1 (мономер, Tsien lab), mStrawberry, mTFP1, mTurquoise2, P3 (комплекс фикобилизомы), Peridinin Chlorophyll (PerCP), R-фикоэритрин (RPE), T-Sapphire, TagCFP (димер, Evrogen), TagGFP (димер, Evrogen), TagRFP (димер, Evrogen), TagYFP (димер, Evrogen), tdTomato (тандемный димер), Topaz, TurboFP602 (димер, Evrogen), TurboFP635 (димер, Evrogen), TurboGFP (димер, Evrogen), TurboRFP (димер, Evrogen), TurboYFP (димер, Evrogen), Venus, GFP дикого типа, YPet, ZsGreen1 (тетрамер, Clontech), ZsYellow1 (тетрамер, Clontech).

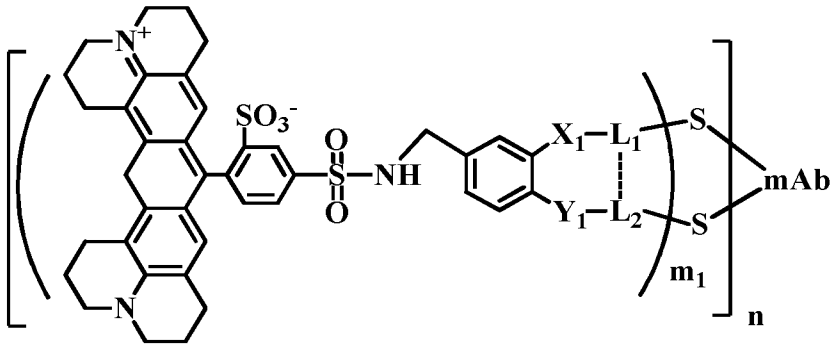
Примерами структуры конъюгатов антитело-молекула хромофора, связанных через мостиковый линкер являются следующие: Ac01, Ac02, Ac03, Ac04, Ac05, Ac06 и Ac07:



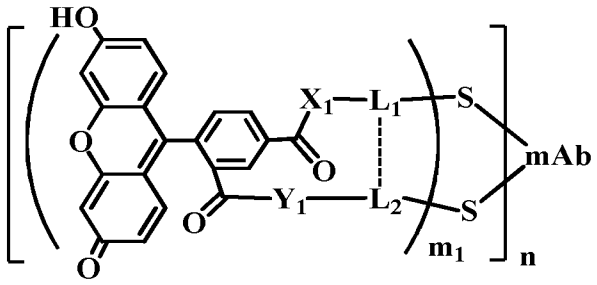
Ac01



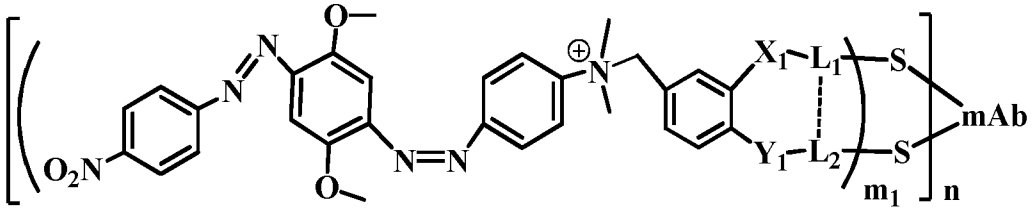
Ac02



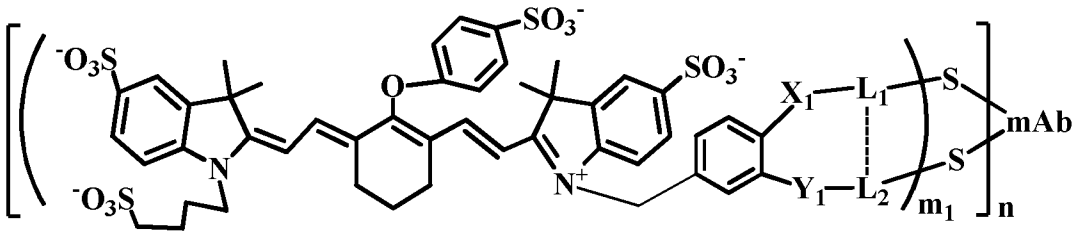
Ac03



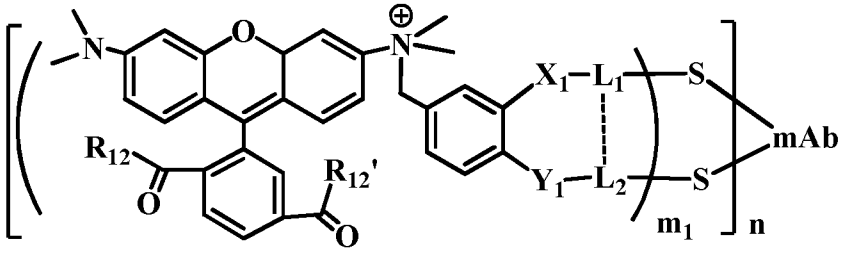
Ac04



Ac05



Ac06 (конъюгат IR800CW)



Ac07

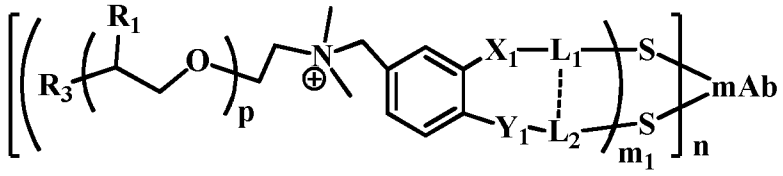
где «-----» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S,

$OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, $CH_2C(O)NHNHC(O)$ и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; R_{12} и R_{12}' независимо представляют собой OH, NH_2, NHR_1, $NHNH_2$, NHNHCOOH, O-R_1-COOH, NH-R_1-COOH, NH-$(Aa)_n$COOH, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, R_1-$NHSO_3H$, NH-R_1-$NHSO_3H$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, R_1-$NHPO_3H_2$, R_1-OPO_3H_2, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, OR_1-$NHPO_3H_2$, NH-R_1-$NHPO_3H_2$, NH-Ar-COOH, NH-Ar-NH_2, где p = 0-5000, Aa представляет собой аминокислоту; R_1, m_1, n, L_1, и L_2 являются такими, как определено в Формуле (I).

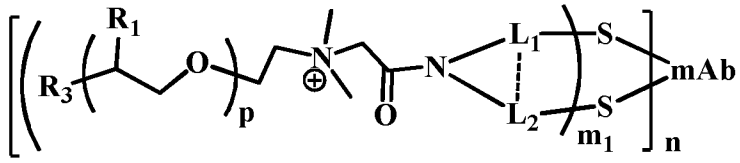
В другом варианте осуществления лекарственное средство в Формулах (I) и (II) может представлять собой полиалкиленгликоли, которые используются для увеличения периода полувыведения молекулы, связывающейся с клеткой, при введении млекопитающему. Полиалкиленгликоли включают в себя, но не ограничиваются ими, поли(этиленгликоли) (ПЭГ), поли(пропиленгликоль) и сополимеры этиленоксида и пропиленоксида; особенно предпочтительными являются ПЭГ, и более особенно предпочтительными являются монофункционально активированные гидроксиПЭГ (например, гидроксильные ПЭГ, активированные на одном конце, включая реакционноспособные сложные эфиры гидроксиПЭГ-монокарбоновых кислот, гидроксиПЭГ-моноальдегиды, гидроксиПЭГ-моноамины, гидроксиПЭГ-моногидразиды, , гидроксиПЭГ-монокарбазаты, гидроксиПЭГ-моноиодоацетамиды, гидроксиПЭГ-мономалеимиды, гидроксиПЭГ-моноортопиридилдисульфиды, гидроксиПЭГ-монооксимы, гидроксиПЭГ-монофенилкарбонаты, гидроксиПЭГ-монофенилглиоксали, гидроксиПЭГ-монотиазолидин-2-оны, гидроксиПЭГ-монотиосложные эфиры, гидроксиПЭГ-монотиолы, гидроксиПЭГ-монотриазины и гидроксиПЭГ-моновинилсульфоны).

В некоторых таких вариантах осуществления полиалкиленгликоль имеет молекулярную массу от около 10 Да до около 200 кДа, предпочтительно от около 88 Да до около 40 кДа; две ветви, каждая с молекулярной массой от около 88 Да до около 40 кДа; и более предпочтительно две ветви, каждая от около 88 Да до около 20 кДа. В одном конкретном варианте осуществления полиалкиленгликоль представляет собой поли(этилен)гликоль и имеет молекулярную массу около 10 кДа; около 20 кДа или около 40 кДа. В конкретных вариантах осуществления ПЭГ представляет собой ПЭГ 10 кДа (линейный или разветвленный), ПЭГ 20 кДа (линейный или разветвленный) или ПЭГ 40

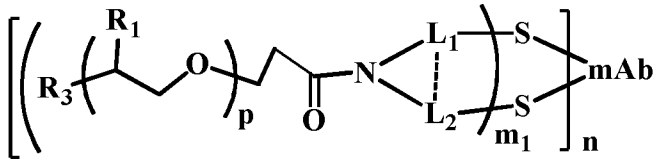
кДа (линейный или разветвленный). В ряде патентов США раскрыто получение линейных или разветвленных «неантигенных» ПЭГ полимеров и их производных или конъюгатов, например, в патентах США № 5428128; 5621039; 5622986; 5643575; 5728560; 5730990; 5738846; 5811076; 5824701; 5840900; 5880131; 5900402; 5902588; 5919455; 5951974; 5965119; 5965566; 5969040; 5981709; 6011042; 6042822; 6113906; 6127355; 6132713; 6177087 и 6180095. Структура конъюгатов антитело-полиалкиленгликоль связанных через мостиковый линкер является следующей: Pg01, Pg02 и Pg03.



Pg01



Pg02



Pg03

где «-----» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; p равно 1-5000, R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в Формуле (I). Предпочтительно R_1 и R_3 независимо представляют собой H, OH, OCH_3, CH_3 или OC_2H_5.

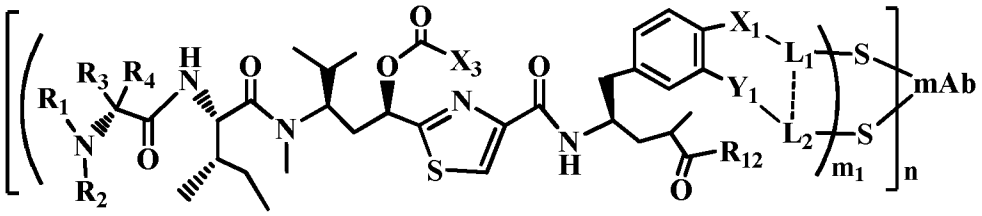
В еще одном варианте осуществления предпочтительными цитотоксическими агентами, которые конъюгированы с молекулой, связывающейся с клеткой через мостиковый линкер настоящего патента, являются тубулизины, майтансиноиды, таксаноиды (таксаны), аналоги CC-1065, даунорубицины и доксорубицины, аматоксины (включая аманитины), индолкарбоксамид, димеры бензодиазепинов (например, димеры пиролобензодиазепина (PBD), томаямицин, антрамицин, индолинобензодиазепины, имидазолобензотиазепины или оксазолидинобензодиазепины), калихеамицины и энедииновые антибиотики, актиномицин, азасерины, блеомицины, эпирубицин, эрибулин, тамоксифен, идарубицин, доластатины, ауристатины (например, монометилауристатин E, MMAE, MMAF, ауристатин PYE, ауристатин TP, ауристатины 2-AQ, 6-AQ, EB (AEB) и

EFP (AEFP) и их аналоги), дуокармицины, гелданамицины или другие ингибиторы HSP90, сентанамицин, метотрексаты, тиотепа, виндезины, винкристины, гемиастерлины, назумамиды, микрогинины, радиозумины, стрептонигтин, SN38 или другие аналоги или метаболиты камптотецина, альтеробактинов, микросклеродерминов, теонелламидов, эсперамицинов, PNU-159682; и их аналоги или производные, фармацевтически приемлемые соли, кислоты, производные, гидрат или гидратированная соль; или кристаллическая структура; или оптический изомер, рацемат, диастереомер или энантиомер любого из указанных выше лекарственных средств.

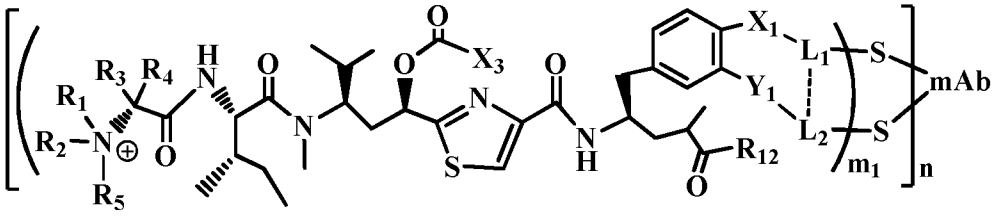
Тубулизины, которые являются предпочтительными для конъюгирования в настоящем изобретении, хорошо известны в данной области техники и могут быть выделены из природных источников в соответствии с известными способами или получены синтетически в соответствии с известными способами (например, Balasubramanian R., et al. J. Med. Chem., 2009, 52, 238–40; Wipf, P., et al. Org. Lett., 2004, 6, 4057–60; Pando, O., et al. J. Am. Chem. Soc., 2011, 133, 7692–5; Reddy, J. A., et al. Mol. Pharmaceutics, 2009, 6, 1518–25; Raghavan, B., et al. J. Med. Chem., 2008, 51, 1530–33; Patterson, A. W., et al. J. Org. Chem., 2008, 73, 4362–9; Pando, O., et al. Org. Lett., 2009, 11 (24), 5567–9; Wipf, P., et al. Org. Lett., 2007, 9 (8), 1605–7; Friestad, G. K., Org. Lett.,2004, 6, 3249–52; Peltier, H. M., et al. J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 16018–9; Chandrasekhar, S., et al J. Org. Chem., 2009, 74, 9531–4; Liu, Y., et al. Mol. Pharmaceutics, 2012, 9, 168–75; Friestad, G. K., et al. Org. Lett., 2009, 11, 1095–8; Kubicek, K., et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2010.49: 4809-12; Chai, Y., et al., Chem Biol, 2010, 17: 296-309; Ullrich, A., et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2009, 48, 4422-5; Sani, M., et al. Angew Chem Int Ed Engl, 2007, 46, 3526-9; Domling, A., et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2006, 45, 7235-9; Patent applications: Zanda, M., et al, Can. США Appl. CA 2710693 (2011); Chai, Y., et al. Eur. США Appl. 2174947 (2010), WO 2010034724; Leamon, C. et al, WO2010033733, WO 2009002993; Ellman, J., et al, PCT WO2009134279; WO 2009012958, US appl. 20110263650, 20110021568; Matschiner, G., et al, WO2009095447; Vlahov, I., et al, WO2009055562, WO 2008112873; Low, P., et al, WO2009026177; Richter, W., WO2008138561; Kjems, J., et al, WO 2008125116; Davis, M.; et al, WO2008076333; Diener, J.; et al, U.S. Pat.Appl. 20070041901, WO2006096754; Matschiner, G., et al, WO2006056464; Vaghefi, F., et al, WO2006033913; Doemling, A., Ger. Offen. DE102004030227, WO2004005327, WO2004005326, WO2004005269; Stanton, M., et al, U.S. Pat. Appl. Publ. 20040249130; Hoefle, G., et al, Ger. Offen. DE10254439, DE10241152, DE10008089; Leung, D., et al, WO2002077036; Reichenbach, H., et al, Ger. Offen. DE19638870; Wolfgang, R., US20120129779; Chen, H., патентная заявка США

20110027274. Предпочтительные структуры тубулизинов для конъюгирования молекул, связывающихся с клеткой, описаны в патентной заявке PCT/IB2012/053554.

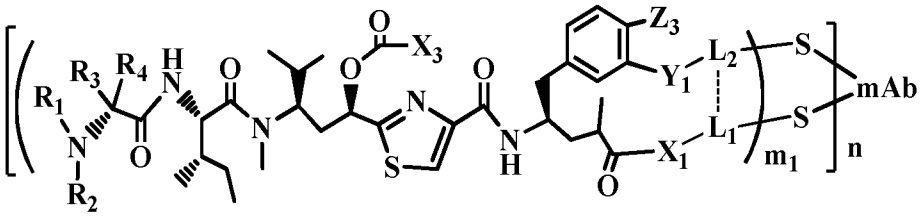
Примерами структур конъюгатов антитело-тубулизиновый аналог связанных через бис-линкер являются T01, T02, T03, T04, T05, T06 T07, T08, T09, T10 и T11:



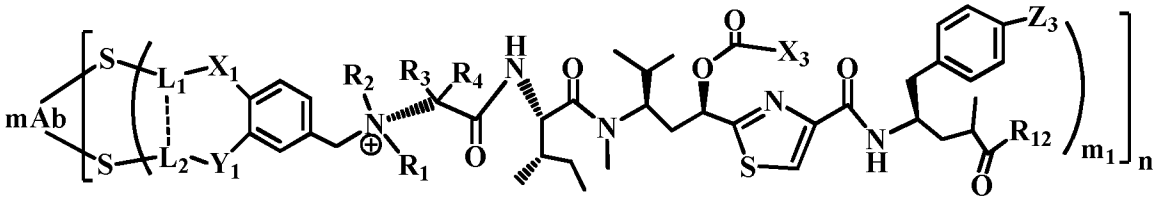
T01



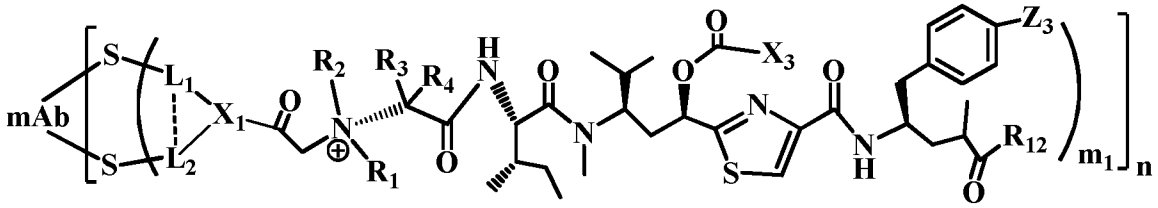
T02



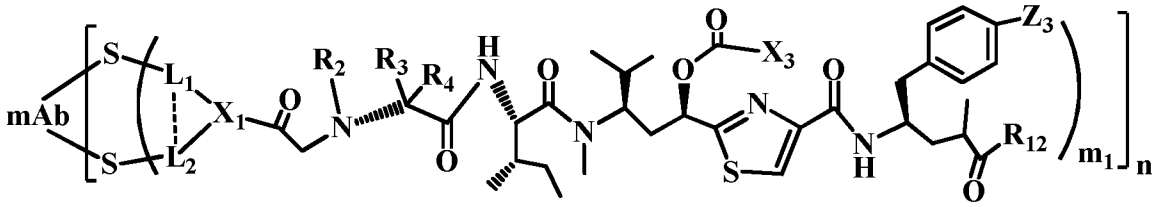
T03



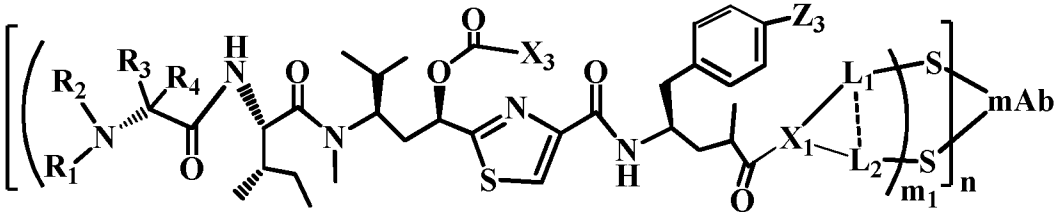
T04



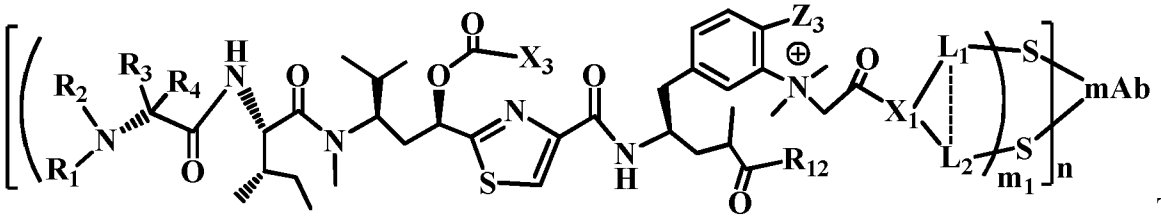
T05



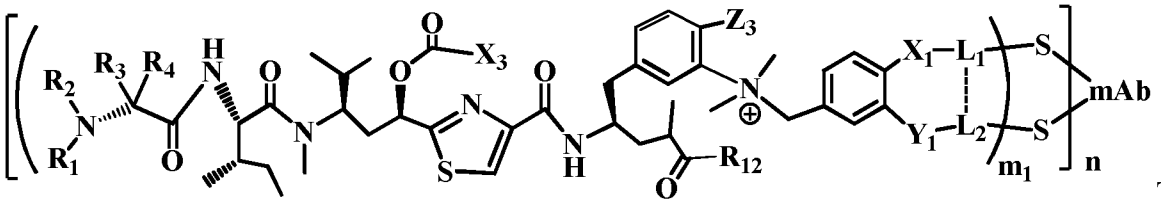
T06



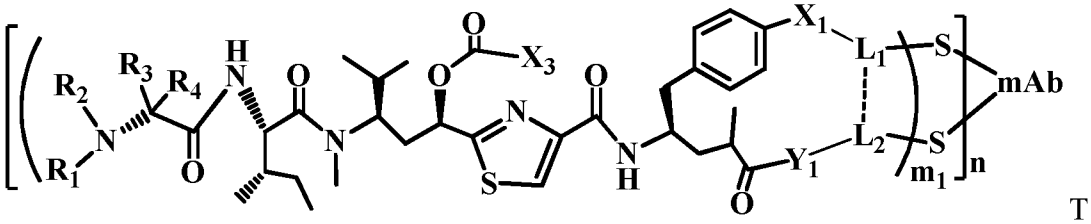
T07



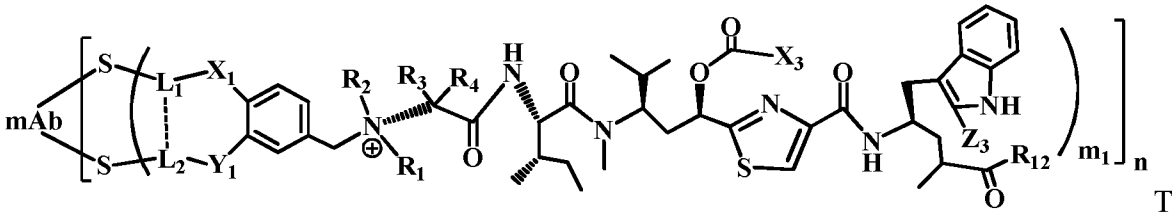
T08



T09



T10

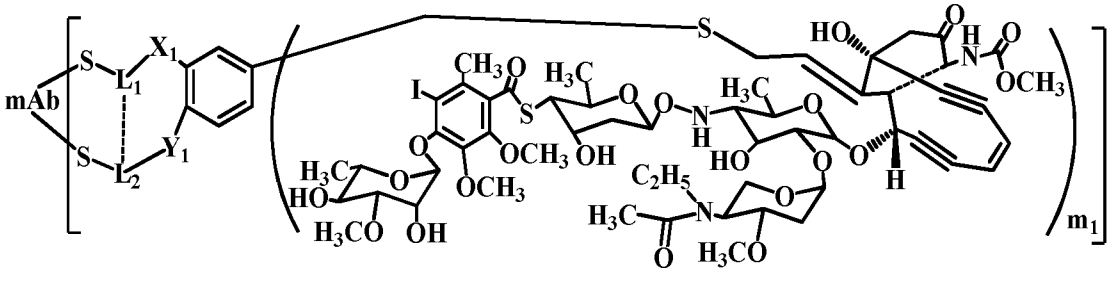


T11

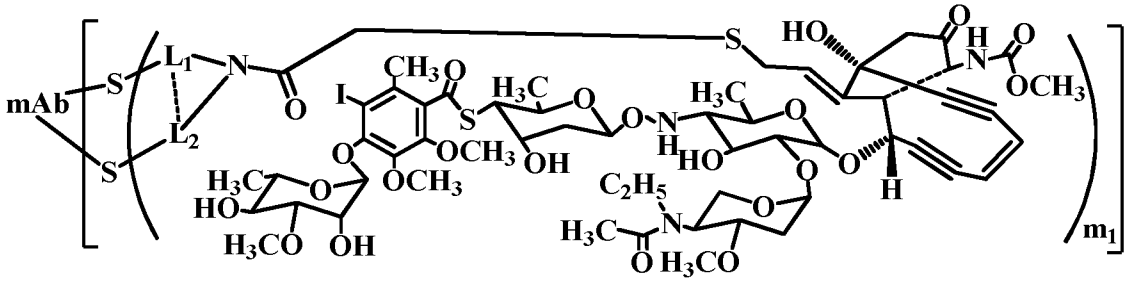
где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; R_{12} представляет собой OH, NH_2, NHR_1, $NHNH_2$, NHNHCOOH, O-R_1-COOH, NH-R_1-COOH, NH-$(Aa)_n$COOH, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, NR_1R_1', NHOH, $NHOR_1$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, NH-Ar-COOH, NH-Ar-$NH_2$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, R_1-$NHSO_3H$, NH-R_1-$NHSO_3H$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, OR_1, R_1-$NHPO_3H_2$, R_1-OPO_3H_2, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OPO_3H_2$, OR_1-$NHPO_3H_2$, NH-R_1-$NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2OH$, $NH(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2OH$, NH-$R_1$-$NH_2$, или $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$ где Aa представляет собой 1-8 аминокислот; n и m_1 независимо представляют собой 1-20; p равно 1-5000; предпочтительно R_1, R_1', R_2, R_3, и R_4 независимо представляют собой H, C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, амид или амины; C_2-C_8 арил, алкенил, алкинил,

гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил, сложный эфир, простой эфир, гетероциклоалкил или ацилоксиламины; или пептиды содержащие 1-8 аминокислот, или полиэтиленоксигруппу имеющую формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 1 до около 5000; два Rs: R_1R_2, R_2R_3, R_1R_3 или R_3R_4 могут образовывать 3-8 членное циклическое кольцо из алкильной, арильной, гетероарильной, гетероалкильной или алкилциклоалкильной группы; X_3 представляет собой H, CH_3, CH_2CH_3, C_3H_7, или $X_1'R_1'$, где X_1' представляет собой NH, $N(CH_3)$, NHNH, O или S; R_1' представляет собой H или C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, арил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил или ацилоксиламины; R_3' представляет собой H или C_1-C_6 линейный или разветвленный алкил; Z_3 представляет собой H, $COOR_1$, NH_2, NHR_1, OR_1, $CONHR_1$,$NHCOR_1$, $OCOR_1$, $OP(O)(OM_1)(OM_2)$, $OCH_2OP(O)(OM_1)(OM_2)$, OSO_3M_1, R_1, O-гликозид (глюкозид, галактозид, маннозид, глюкуронозид/глюкуронид, аллозид, фруктозид и т. д.), NH-гликозид, S-гликозид или CH_2-гликозид; M_1 и M_2 независимо представляют собой H, Na, K, Ca, Mg, NH_4, $NR_1R_2R_3$; L_1, и L_2 являются такими, как определено в Формуле (I).

Калихеамицины и родственные им энедииновые антибиотики, которые являются предпочтительными для конъюгатов “молекула, связывающаяся с клеткой-лекарственное средство” по настоящему патенту, описаны в: Nicolaou, K. C. et al, Science 1992, 256, 1172-1178; Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1993, 90, 5881-8), патенты США № 4970198; 5053394; 5108912; 5264586; 5384412; 5606040; 5712374; 5714586; 5739116; 5770701; 5770710; 5773001; 5877296; 6015562; 6124310; 8153768. Примерами структур конъюгатов антитело-калихеамициновый аналог, связанных через бис-линкер, являются C01 и C02:



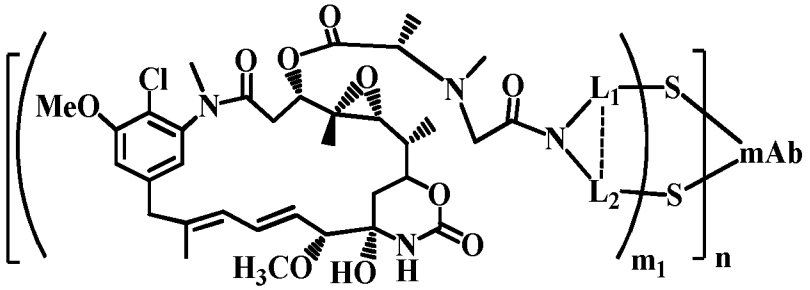
C01.



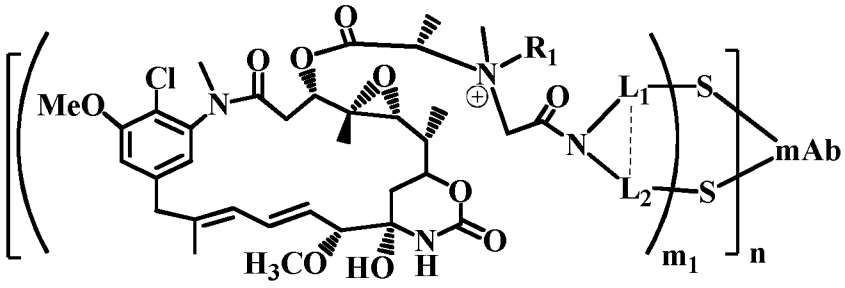
C02

где «-----» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; p равно 1-5000, R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в Формуле (I).

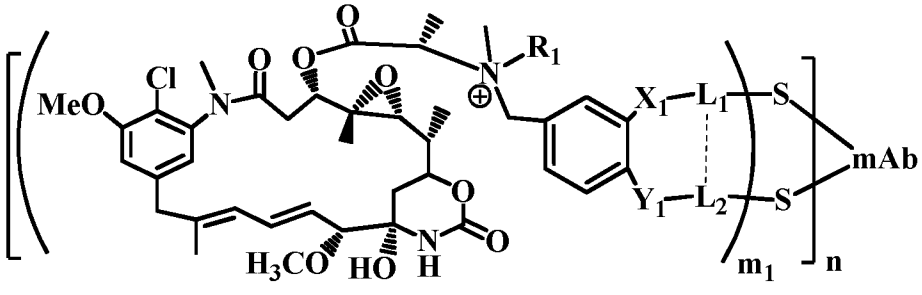
Майтанзиноиды, которые являются предпочтительными для использования в настоящем изобретении, включают в себя майтанзинол и его аналоги, и описаны в патентах США №4256746, 4361650, 4307016, 4294757, 4294757, 4371533, 4424219, 4331598, 4450254, 4364866, 4313946, 4315929, 4362663, 4322348, 4371533, 4424219, 5208020, 5416064, 5208020; 5416064; 6333410; 6441163; 6716821, 7276497, 7301019, 7303749, 7368565, 7411063, 7851432 и 8163888. Примером структуры конъюгата антитело-майтанзиноиды связанные через бис-линкер является My01, My02, My03, My04, My05 и My06:



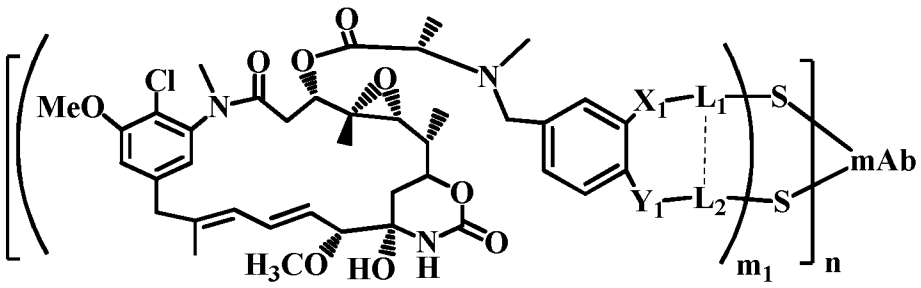
My01,



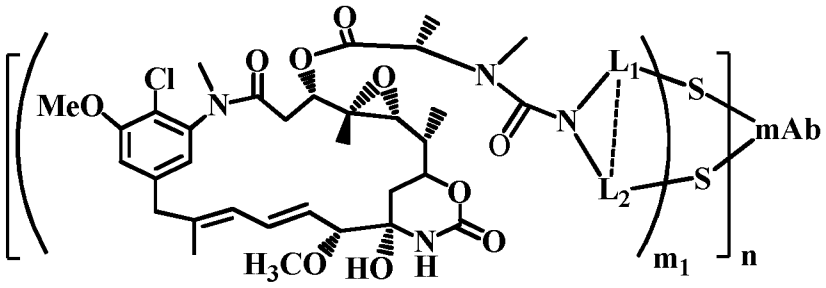
My02



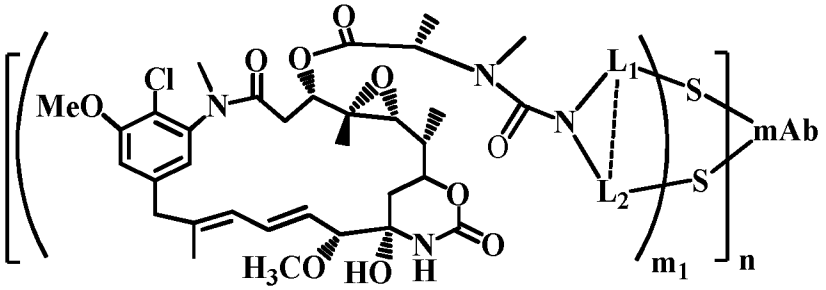
My03



My04



My05

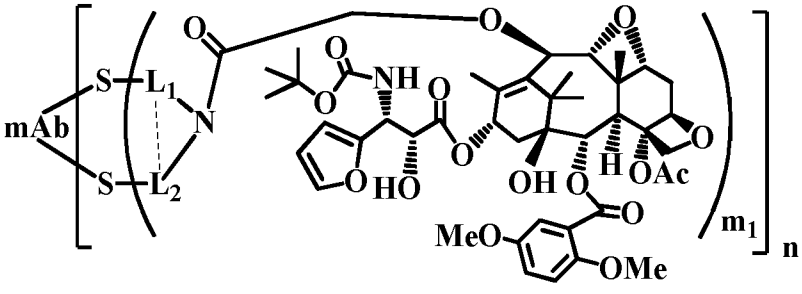


M06

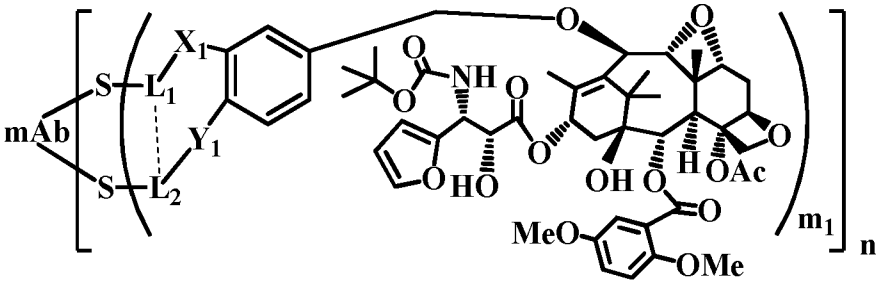
где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; p равно 1-5000, R_1, L_1 и L_2 являются таким, как определено в Формуле (I).

Таксаны, которые включают в себя паклитаксел (таксол), цитотоксический природный продукт и доцетаксел (таксотер), полусинтетическое производное и их аналоги, которые являются предпочтительными для конъюгирования, приводятся в следующих примерах: K C. Nicolaou et al., J. Am. Chem. Soc. 117, 2409-20, (1995); Ojima et al, J. Med. Chem. 39: 3889-3896 (1996); 40: 267-78 (1997); 45, 5620-3 (2002); Ojima et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 96:4256-61 (1999); Kim et al., Bull. Korean Chem. Soc., 20, 1389-90 (1999); Miller, et al. J. Med. Chem., 47, 4802-5(2004); патенты США № 5475011 5728849, 5811452; 6340701; 6372738; 6391913, 6436931; 6589979; 6596757; 6706708; 7008942; 7186851; 7217819; 7276499; 7598290; и 7667054.

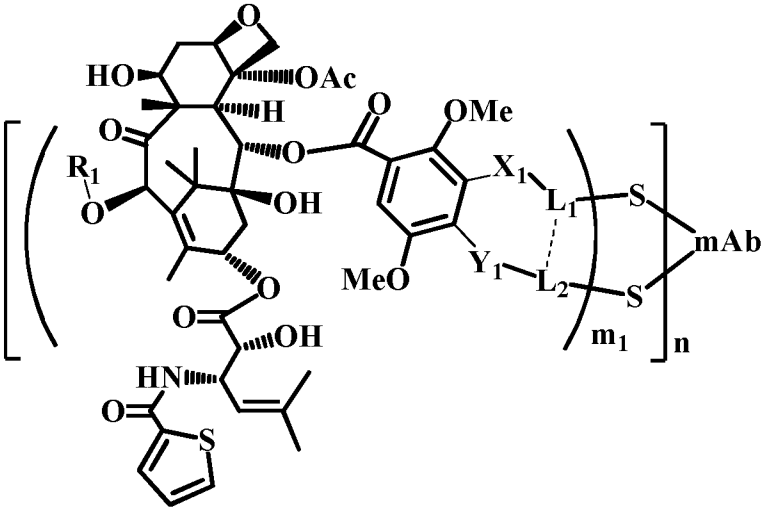
Примерами структур конъюгата “антитело-таксаны”, связанных через линкер согласно настоящему патенту являются Tx01, Tx02 и Tx03.



Tx01



Tx02

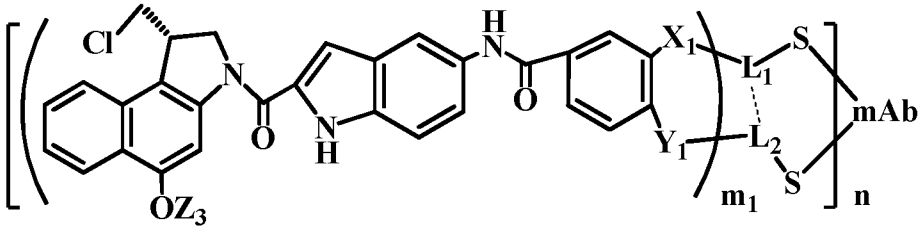


Tx03

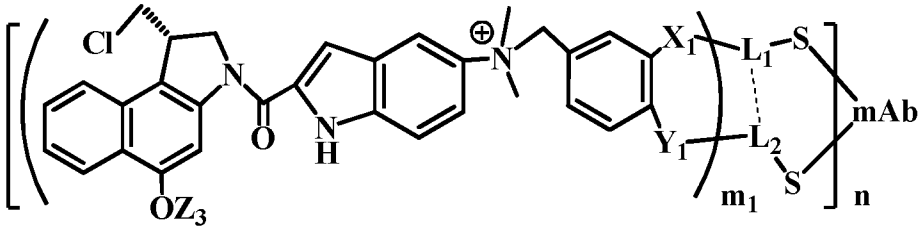
где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, OC(O)N(R_1), N(R_1)C(O)N(R_1), CH, C(O)NHNHC(O) и C(O)NR_1; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в Формуле (I).

Аналоги CC-1065 и аналоги докармицина также являются предпочтительными для использования в конъюгате, содержащем бис-мостиковый линкер по настоящему патенту. Примеры аналогов CC-1065 и аналогов доукармицина, а также их синтез описаны, например, в: Warpehoski, et al, J. Med. Chem. 31:590-603 (1988); D. Boger et al., J. Org. Chem; 66; 6654-61, 2001; патенты США №: 4169888, 4391904, 4671958, 4816567, 4912227, 4923990, 4952394, 4975278, 4978757, 4994578, 5037993, 5070092, 5084468, 5101038, 5117006, 5137877, 5138059, 5147786, 5187186, 5223409, 5225539, 5288514, 5324483,

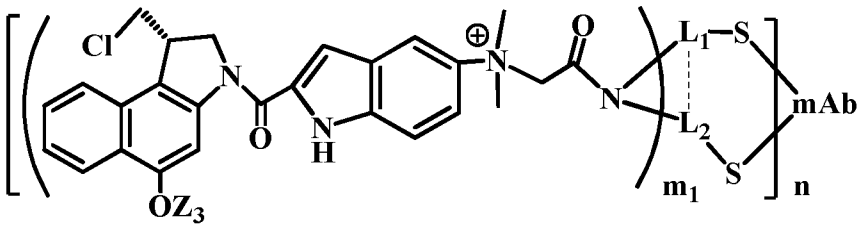
5332740, 5332837, 5334528, 5403484, 5427908, 5475092, 5495009, 5530101, 5545806, 5547667, 5569825, 5571698, 5573922, 5580717, 5585089, 5585499, 5587161, 5595499, 5606017, 5622929, 5625126, 5629430, 5633425, 5641780, 5660829, 5661016, 5686237, 5693762, 5703080, 5712374, 5714586, 5739116, 5739350, 5770429, 5773001, 5773435, 5786377 5786486, 5789650, 5814318, 5846545, 5874299, 5877296, 5877397, 5885793, 5939598, 5962216, 5969108, 5985908, 6060608, 6066742, 6075181, 6103236, 6114598, 6130237, 6132722, 6143901, 6150584, 6162963, 6172197, 6180370, 6194612, 6214345, 6262271, 6281354, 6310209, 6329497, 6342480, 6486326, 6512101, 6521404, 6534660, 6544731, 6548530, 6555313, 6555693, 6566336, 6586618, 6593081, 6630579, 6756397, 6759509, 6762179, 6884869, 6897034, 6946455, 7049316, 7087600, 7091186, 7115573, 7129261, 7214663, 7223837, 7304032, 7329507, 7329760, 7388026, 7655660, 7655661, 7906545 и 8012978. Примерами структур конъюгата “антитело-CC-1065 аналоги” связанных через линкер согласно настоящему патенту являются CC01, CC02, CC03 и CC04.



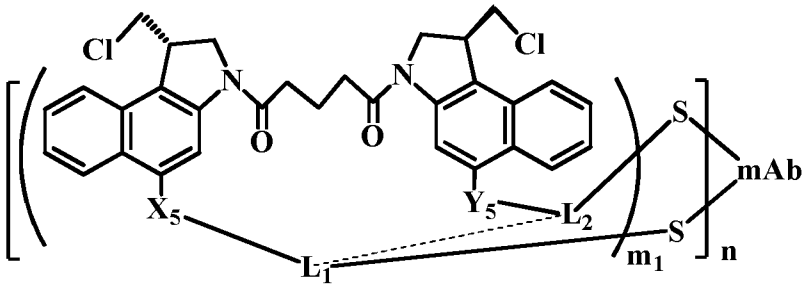
CC01



CC02



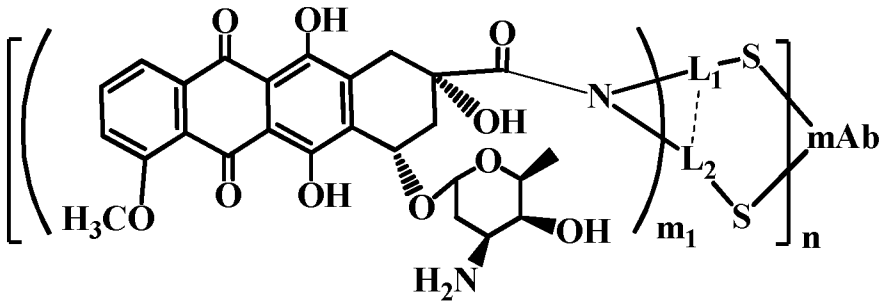
CC03



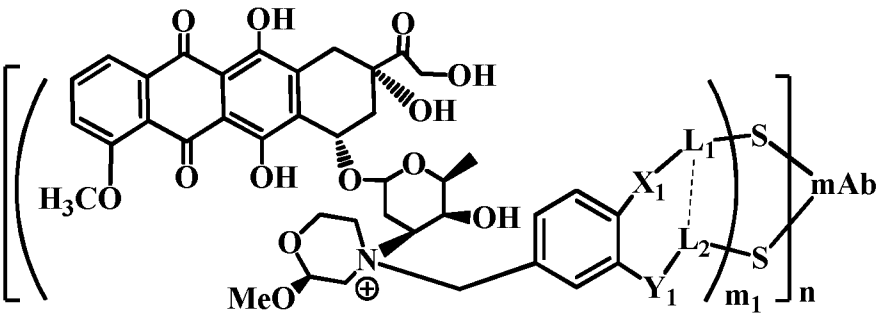
CC04

где mAb представляет собой антитело; Z_3 представляет собой H, $PO(OM_1)(OM_2)$, SO_3M_1, $CH_2PO(OM_1)(OM_2)$, $CH_3N(CH_2CH_2)_2NC(O)$-, $O(CH_2CH_2)_2NC(O)$-, R_1 или гликозид; «-----» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1,X_5, Y_1 и Y_5 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в Формуле (I).

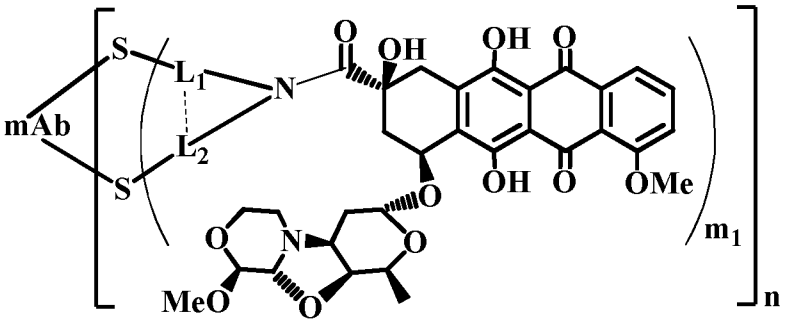
Аналоги даунорубицина/доксорубицина также предпочтительны для конъюгирования, через бис-линкер согласно настоящему патенту. Предпочтительные структуры, а также их синтез приведены в следующих примерах: Hurwitz, E., et al., Cancer Res. 35, 1175-81 (1975). Yang, H. M., and Reisfeld, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 1189-93 (1988); Pietersz, C. A., E., et al., E., et al.," Cancer Res. 48, 926-311 (1988); Trouet, et al., 79, 626-29 (1982); Z. Brich et al., J. Controlled Release, 19, 245-58 (1992); Chen et al., Syn. Comm., 33, 2377-90, 2003; King et al., Bioconj. Chem., 10, 279-88, 1999; King et al., J. Med. Chem., 45, 4336-43, 2002; Kratz et al., J Med Chem. 45, 5523-33, 2002; Kratz et al., Biol Pharm Bull. Jan. 21, 56-61, 1998; Lau et al., Bioorg. Med. Chem. 3, 1305-12, 1995; Scott et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 6, 1491-6, 1996; Watanabe et al., Tokai J. Experimental Clin. Med. 15, 327-34, 1990; Zhou et al., J. Am. Chem. Soc. 126, 15656-7, 2004; WO 01/38318; патенты США № 5106951; 5122368; 5146064; 5177016; 5208323; 5824805; 6146658; 6214345; 7569358; 7803903; 8084586; 8053205. Примерами структур конъюгата “антитело-CC-1065 аналоги” связанных через линкер согласно настоящему патенту являются Da01, Da02, Da03, Da04, Da05, Da06, Da07 и Da08.



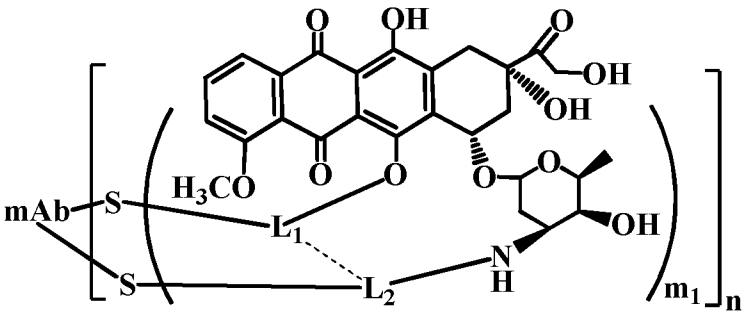
Da01



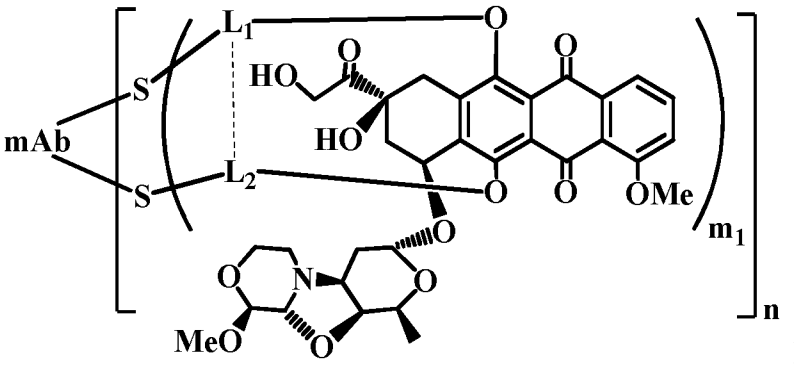
Da02



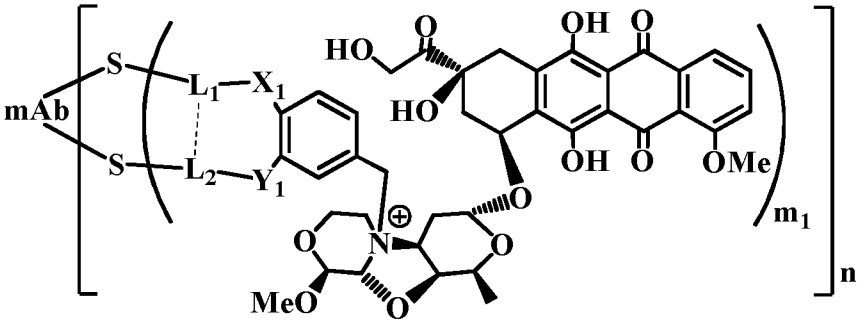
Da03



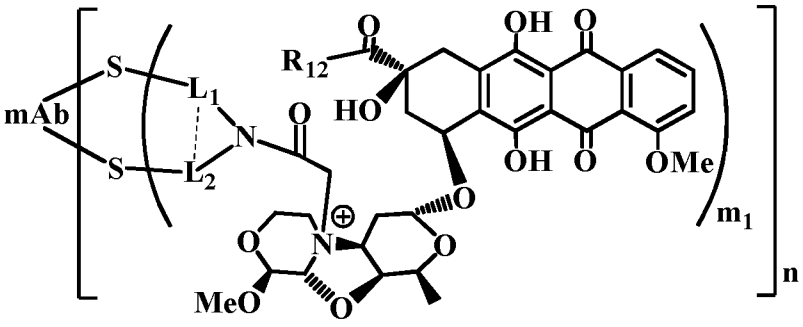
Da04



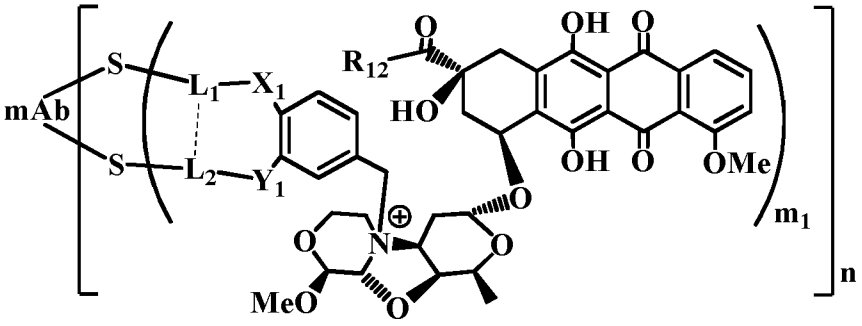
Da05



Da06



Da07

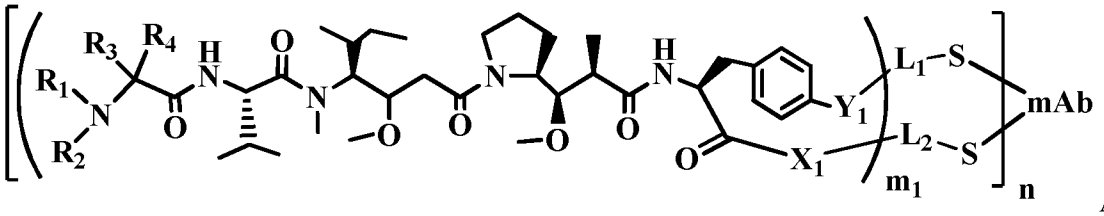


Da08

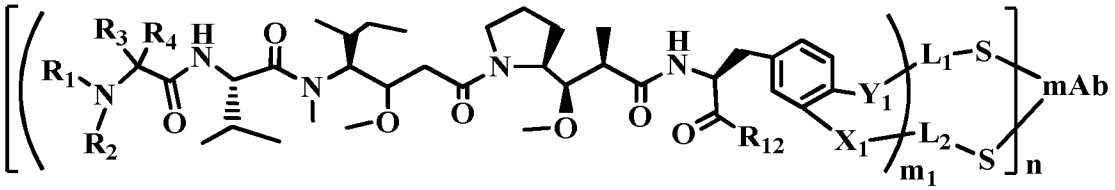
где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; R_{12} представляет собой OH, NH_2, NHR_1, $NHNH_2$, NHNHCOOH, O-R_1-COOH, NH-R_1-COOH, $NH(Aa)_nCOOH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, NR_1R_1', NHOH, $NHOR_1$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, NH-Ar-COOH, NH-Ar-$NH_2$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH\text{-}SO_3H$, R_1-$NHSO_3H$, NH-R_1-$NHSO_3H$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2$-$CH_2NHPO_3H_2$, OR_1, R_1-$NHPO_3H_2$, R_1-OPO_3H_2, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OPO_3H_2$, OR_1-$NHPO_3H_2$, NH-R_1-$NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2OH$, $NH(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2OH$, NH-$R_1$-$NH_2$, или $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, где Aa представляет собой 1-8 аминокислот; p равно 1-5000; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в Формуле (I).

Ауристатины и доластатины являются предпочтительными при конъюгировании включающем бис-линкеры согласно настоящему патенту. Ауристатины (например, ауристатин E (AE), ауристатин EB (AEB), ауристатин EFP (AEFP), монометилауристатин E (MMAE), монометилауристатин (MMAF), ауристатин F фенилендиамин (AFP)) и синтетический фенилаланильный вариант MMAE), которые представляют собой синтетические варианты аналогов доластатинов, описаны в Int. J. Oncol. 15: 367-72 (1999); Molecular Cancer Therapeutics, vol. 3, No. 8, pp. 921-32 (2004); патентах заявках США №.

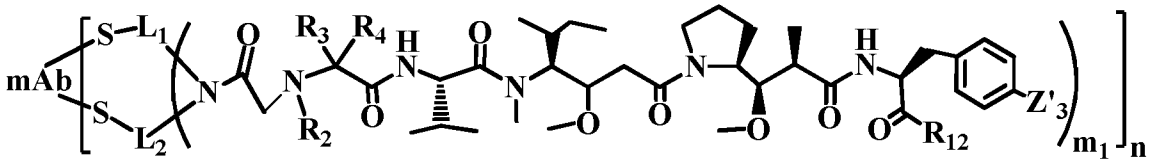
11134826, 20060074008, 2006022925. патентах США № 4414205, 4753894, 4764368, 4816444, 4879278, 4943628, 4978744, 5122368, 5165923, 5169774, 5286637, 5410024, 5521284, 5530097, 5554725, 5585089, 5599902, 5629197, 5635483, 5654399, 5663149, 5665860, 5708146, 5714586, 5741892, 5767236, 5767237, 5780588, 5821337, 5840699, 5965537, 6004934, 6033876, 6034065, 6048720, 6054297, 6054561, 6124431, 6143721, 6162930, 6214345, 6239104, 6323315, 6342219, 6342221, 6407213, 6569834, 6620911, 6639055, 6884869, 6913748, 7090843, 7091186, 7097840, 7098305, 7098308, 7498298, 7375078, 7462352, 7553816, 7659241, 7662387, 7745394, 7754681, 7829531, 7837980, 7837995, 7902338, 7964566, 7964567, 7851437, 7994135. Примерами структур конъюгата "антитело-ауристатины" связанных через линкер настоящего патента являются Au01, Au02, Au03, Au04, Au05, Au06, Au07, Au08, Au09, Au10, Au11, Au12 и Au13



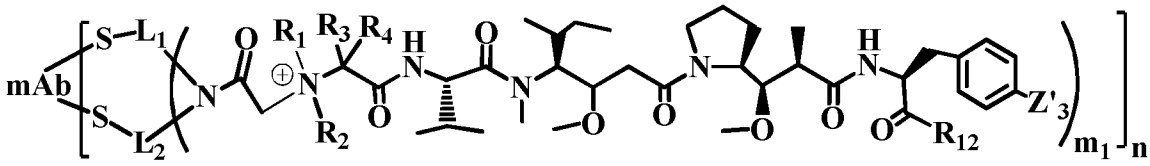
Au01



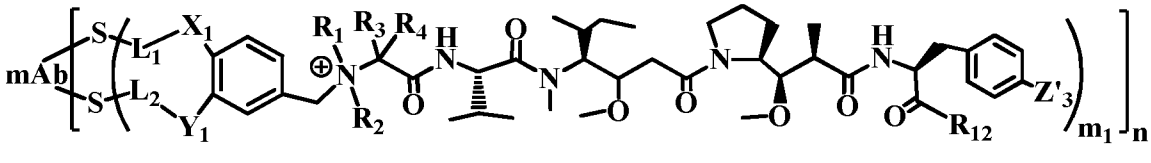
Au02



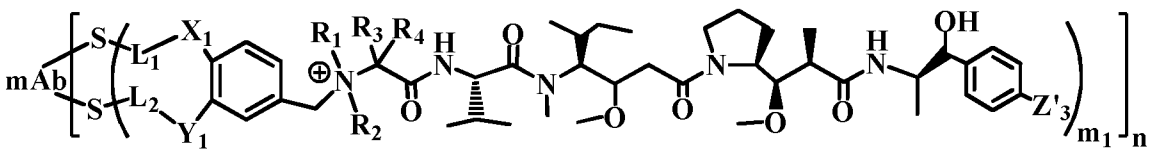
Au03



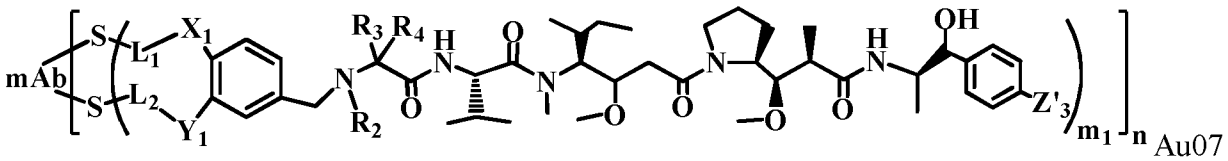
Au04

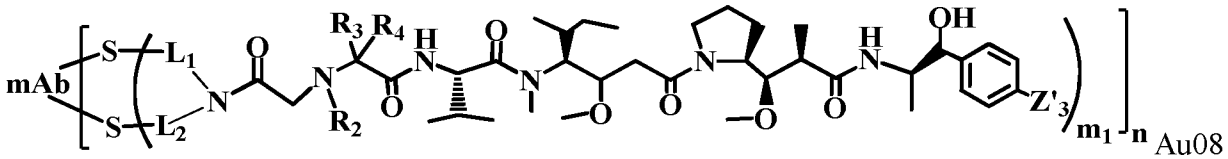


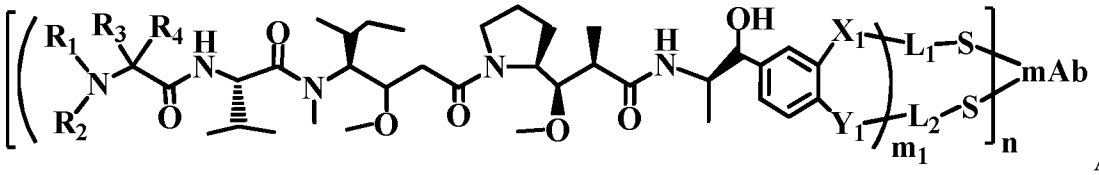
Au05

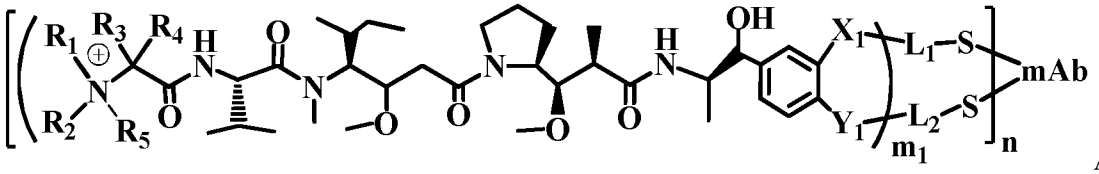


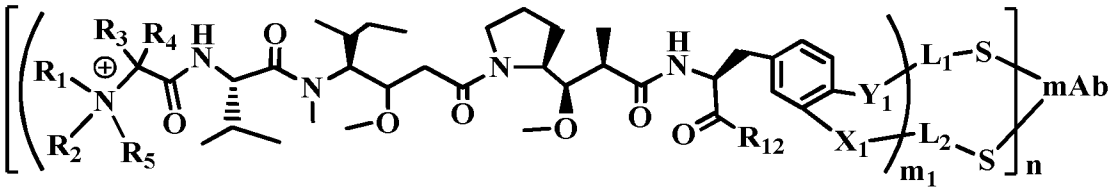
Au06

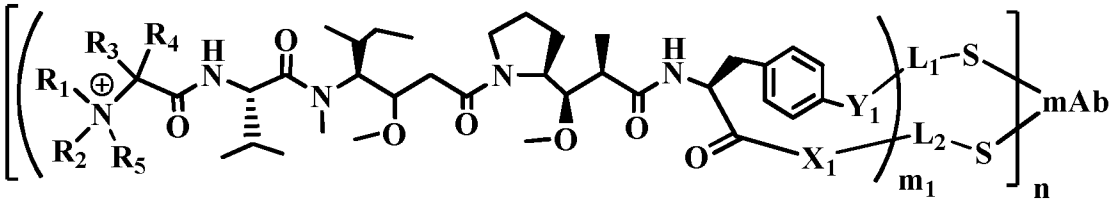

Au07

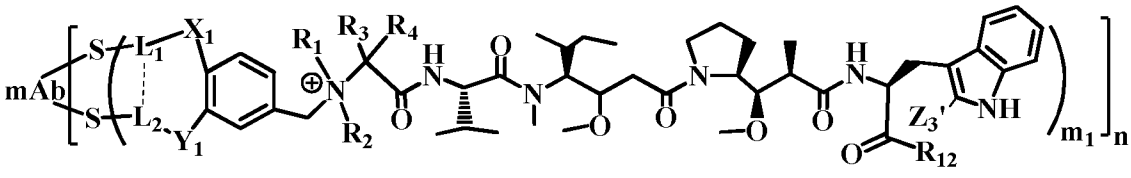

Au08


Au09


Au10


Au11


Au12

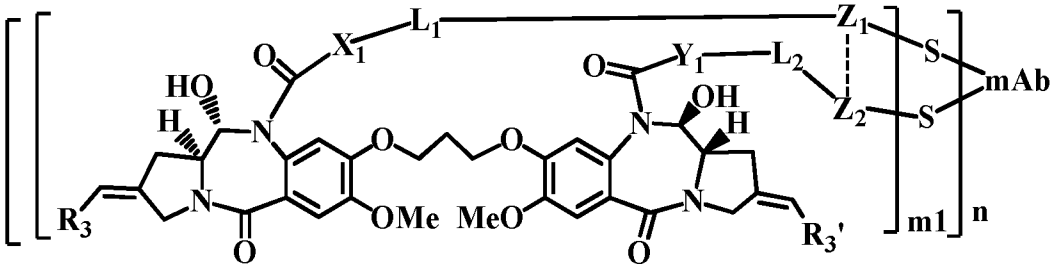

Au13

где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; R_{12} представляет собой OH, NH_2, NHR_1, $NHNH_2$, NHNHCOOH, O-R_1-COOH, NH-R_1-COOH, NH-$(Aa)_n$COOH, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, NR_1R_1', NHOH, $NHOR_1$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, NH-Ar-COOH, NH-Ar-$NH_2$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, R_1-$NHSO_3H$, NH-R_1-$NHSO_3H$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$,

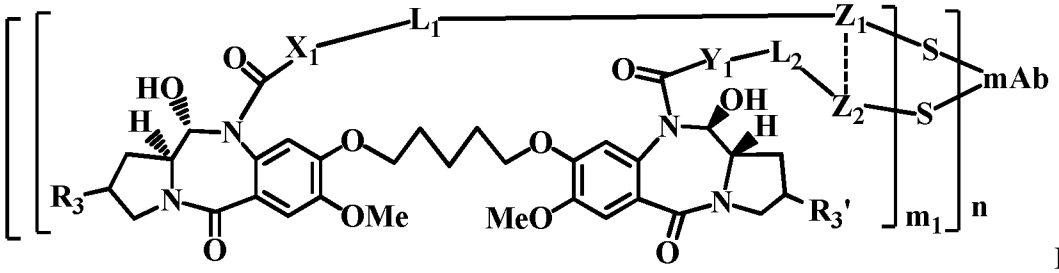
$NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, OR_1, R_1-$NHPO_3H_2$, R_1-OPO_3H_2, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OPO_3H_2$, OR_1-$NHPO_3H_2$, NH-R_1-$NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2OH$, $NH(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2OH$, NH-$R_1$-$NH_2$ или $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, где Aa представляет собой 1-8 аминокислот; p равно 1-5000; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; p равно 1-5000; предпочтительно R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляют собой H, C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, арил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил, сложный эфир, простой эфир, амид, амины, гетероциклоалкил или ацилоксиламины; или пептиды, содержащие 1-8 аминокислот, или полиэтиленоксигруппу, имеющую формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 1 до около 5000; Два Rs: R_1R_2, R_2R_3, R_1R_3 или R_3R_4 могут образовывать 3-8 членное циклическое кольцо из алкильной, арильной, гетероарильной, гетероалкильной или алкилциклоалкильной группы; X_3 представляет собой H, CH_3 или $X_1'R_1'$, где X_1' представляет собой NH, $N(CH_3)$, NHNH, O или S; R_1' представляет собой H или C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, арил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил или ацилоксиламины; R_3' представляет собой H или C_1-C_6 линейный или разветвленный алкил; Z_3 'представляет собой H, $COOR_1$, NH_2, NHR_1, OR_1, $CONHR_1$,$NHCOR_1$, $OCOR_1$, $OP(O)(OM_1)(OM_2)$, $OCH_2OP(O)(OM_1)(OM_2)$, OSO_3M_1, R_1, O-гликозид (глюкозид, галактозид, маннозид, глюкуронозид/глюкуронид, аллозид, фруктозид и т. д.), NH-гликозид, S-гликозид или CH_2-гликозид; M_1 и M_2 независимо представляют собой H, Na, K, Ca, Mg, NH_4, $NR_1R_2R_3$; Z_1, Z_2, L_1 и L_2 являются такими, как определено в Формуле (I).

Димеры бензодиазепина (например, диммеры пирролобензодиазепина (PBD) или (томаймицина), индолинобензодиазепинов, имидазобензотиадиазепинов или оксазолидинобензодиазепинов), которые являются предпочтительными цитотоксическими агентами, согласно настоящему изобретению, описаны в литературе: патенты США № 8163736; 8153627; 8034808; 7834005; 7741319; 7704924; 7691848; 7678787; 7612062; 7608615; 7557099; 7528128; 7528126; 7511032; 7429658; 7407951; 7326700; 7312210; 7265105; 7202239; 7189710; 7173026; 7109193; 7067511; 7064120; 7056913; 7049311; 7022699; 7015215; 6979684; 6951853; 6884799; 6800622; 6747144; 6660856; 6608192; 6562806; 6977254; 6951853; 6909006; 6344,451; 5880122; 4935362; 4764616; 4761412; 4723007; 4723003; 4683230; 4663453; 4508647; 4464467; 4427587; 4000304; патентные заявки США 20100203007, 20100316656, 20030195196. Примерами структур конъюгата "антитело-димеры бензодиазепина" связанных через линкер являются PB01, PB02, PB03,

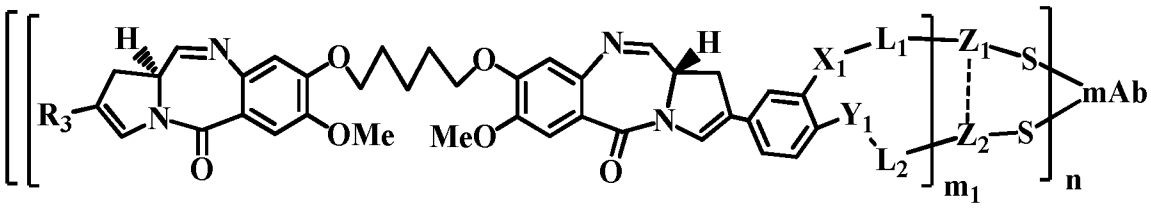
PB04, PB05, PB06, PB07, PB08, PB09, PB10, PB11, PB12, PB13, PB14, PB15, PB16, PB17, PB18, PB19, PB20, PB21 и PB22.



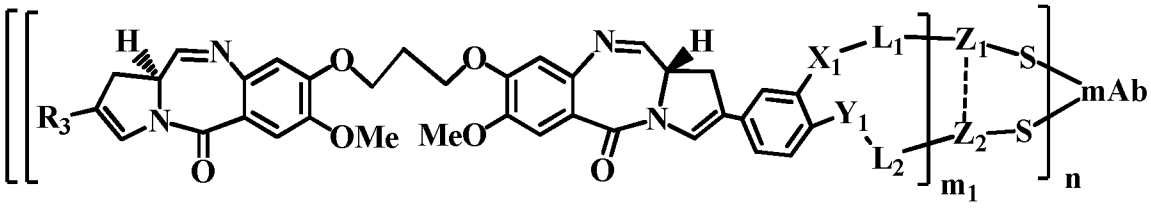
PB01



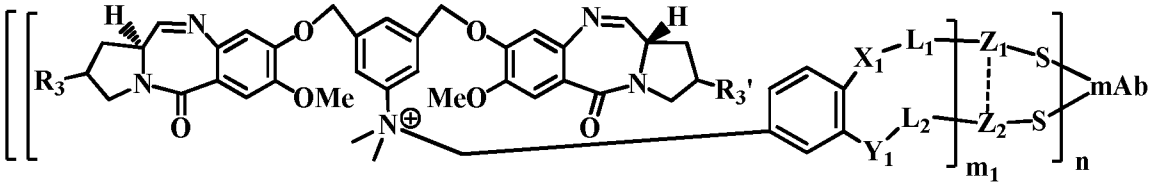
PB02



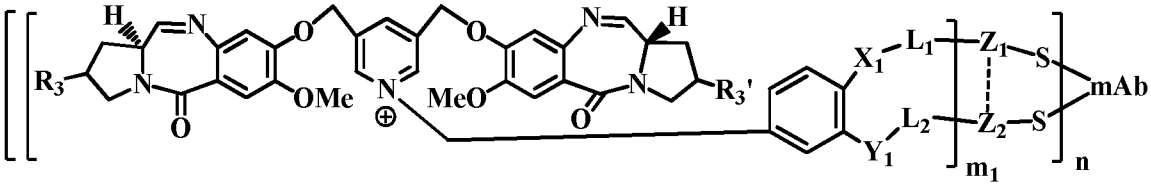
PB03



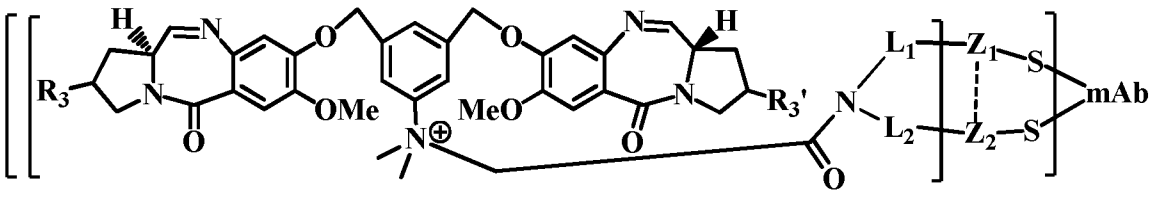
PB04



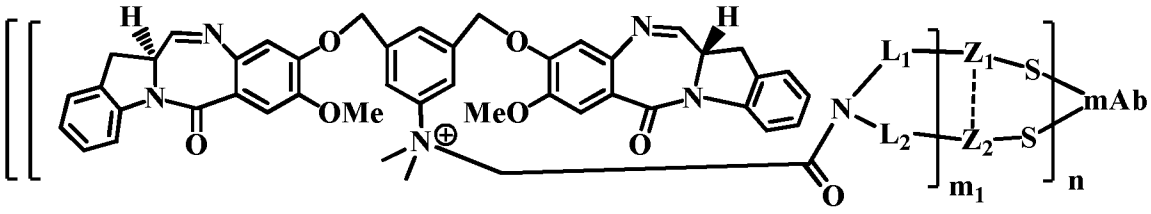
PB05



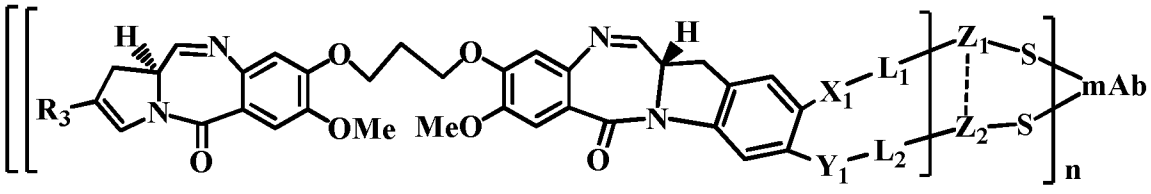
PB06



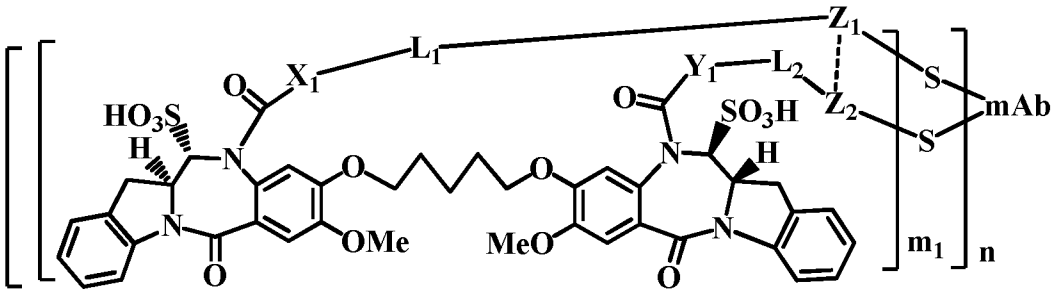
PB07



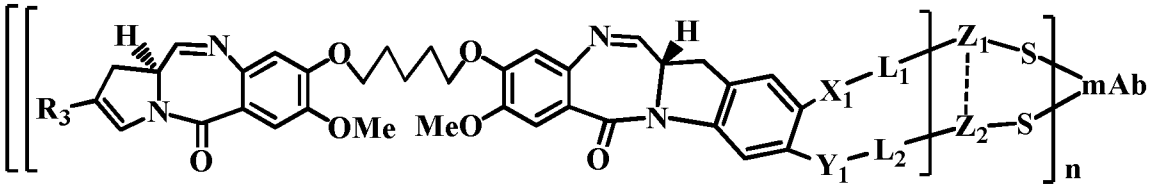
PB08



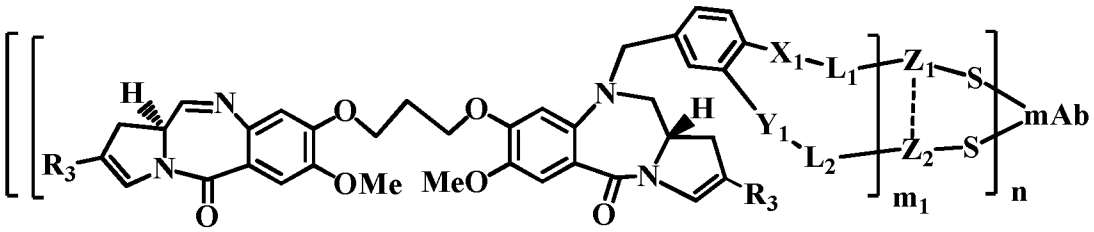
PB09



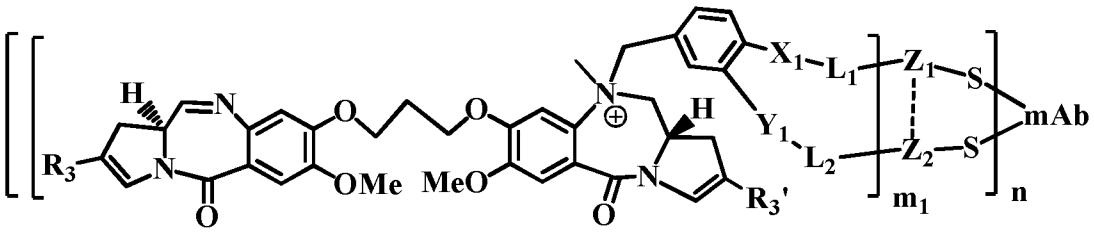
PB10



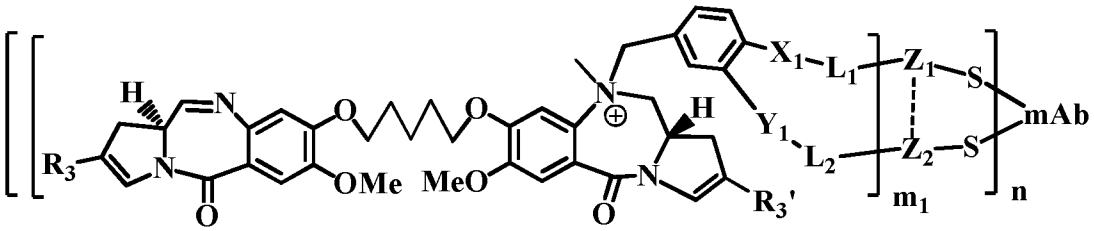
PB11



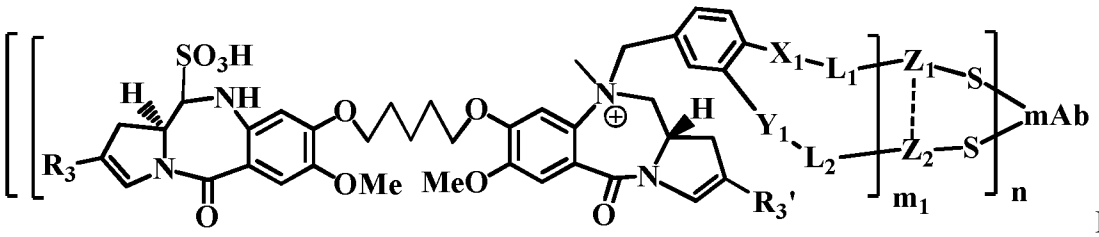
PB12



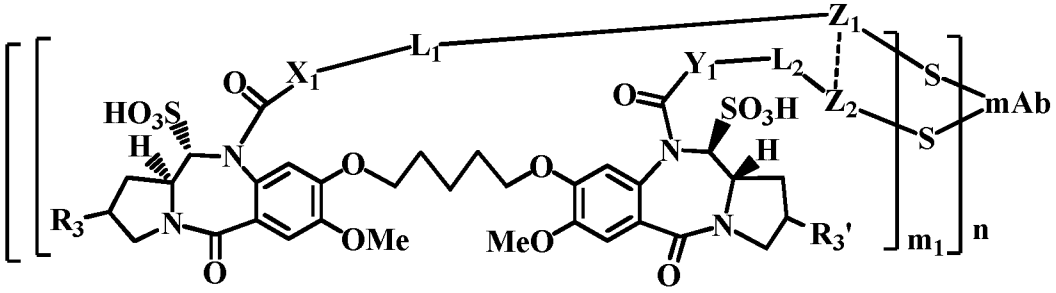
PB13



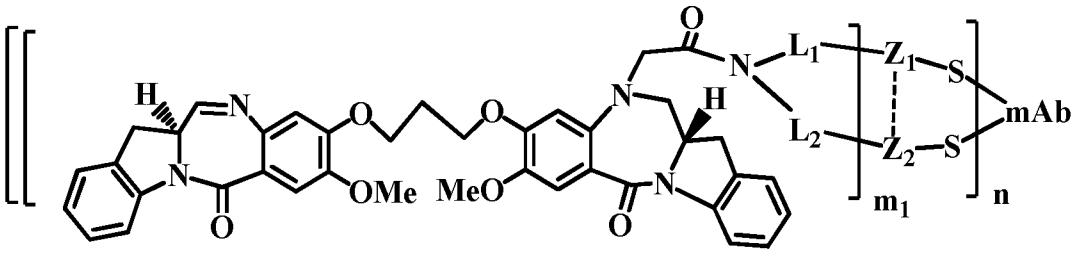
PB14



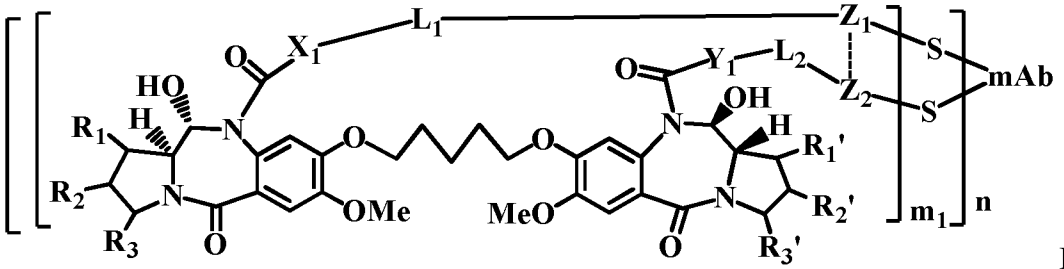
PB15



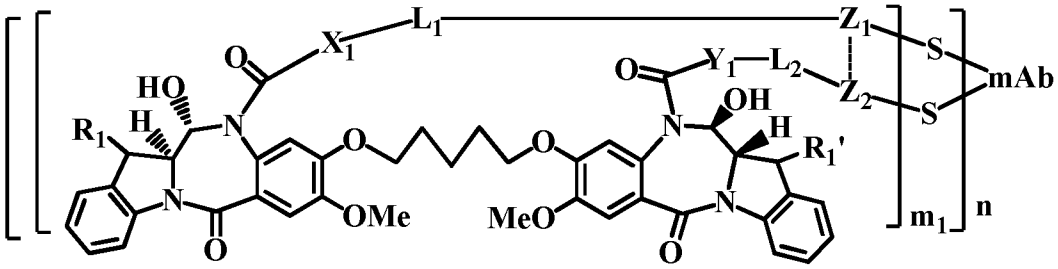
PB16



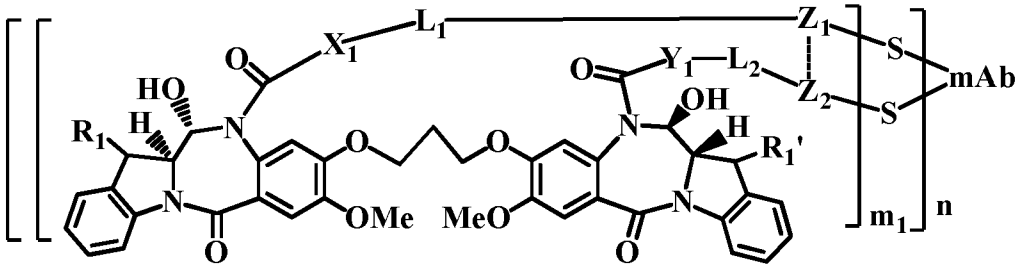
PB17



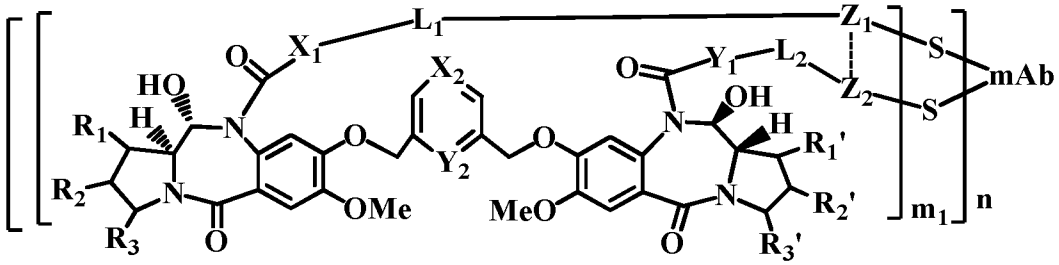
PB18



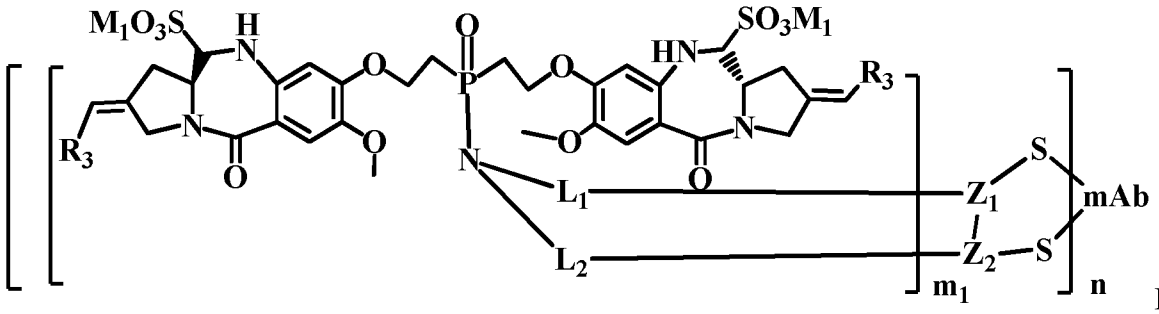
PB19



PB20



PB21

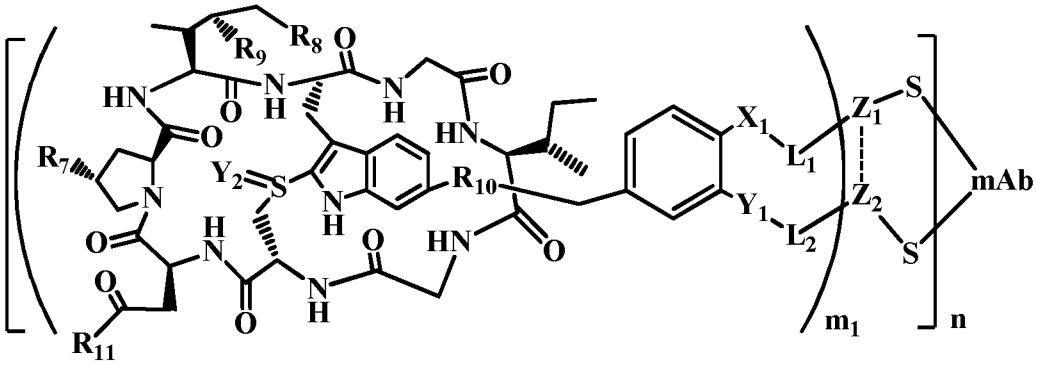


PB22

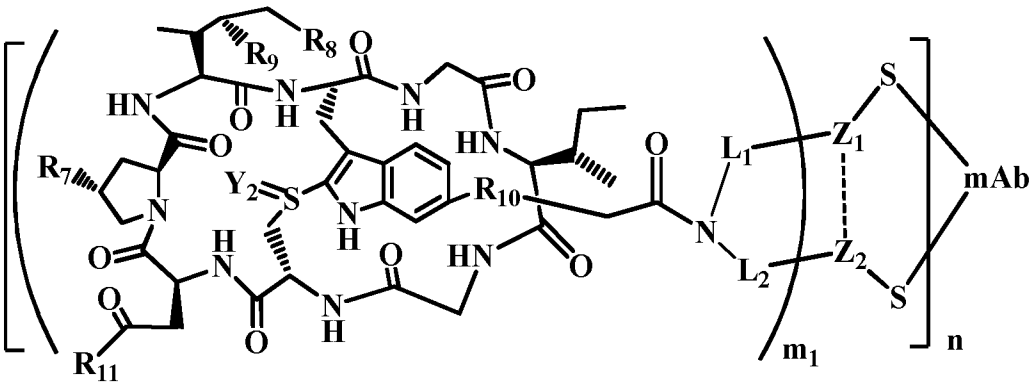
где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1, и Y_1независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; L_1, L_2, Z_1 и Z_2 являются таким, как определено в Формуле (I). R_1, R_2, R_3, R_1', R_2' и R_3' независимо представляют собой H; F; Cl; =O; =S; OH; SH; C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, арил, алкенил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил, сложный эфир ($COOR_5$ или $–OC(O)R_5$), простой эфир (OR_5), амид ($CONR_5$), карбамат ($OCONR_5$), амины (NHR_5, NR_5R_5'), гетероциклоалкил или ацилоксиламины (-C(O)NHOH, -$ONHC(O)R_5$); или пептиды, содержащие 1-8 природных или неприродных аминокислот, или полиэтиленоксигруппу имеющую формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 1 до около 5000. Два Rs: R_1R_2, R_2R_3, R_1R_3, R_1'R_2', R_2'R_3' или R_1'R_3' могут образовывать 3-8 членное циклическое кольцо из алкильной, арильной, гетероарильной, гетероалкильной или алкилциклоалкильной группы; X_2 и Y_2 независимо представляют собой N, CH_2 или CR_5, где R_5 представляет собой H, OH, NH_2, $NH(CH_3)$, $NHNH_2$, COOH, SH, OZ_3, SZ_3 или C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, арил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил или ацилоксиламины; Z_3 представляет собой H, $OP(O)(OM_1)(OM_2)$, $OCH_2OP(O)(OM_1)(OM_2)$, OSO_3M_1 или O-гликозид (глюкозид, галактозид, маннозид, глюкуронозид/глюкуронид, аллозид, фруктозид и т. д.), NH-гликозид, S-гликозид или CH_2-гликозид; M_1 и M_2 независимо представляют собой H, Na, K, Ca, Mg, NH_4, $NR_1R_2R_3$.

Аматоксины, которые представляют собой подгруппу по меньшей мере из десяти токсических соединений, первоначально найденных в нескольких родах ядовитых грибов, в частности Amanita phalloides и некоторых других видов грибов, также являются предпочтительными для конъюгирования согласно настоящему патенту. Указанные десять аматоксинов, называемых α-аманитином, β-аманитином, γ-аманитином, ε-аманитином, аманулином, аманулиновой кислотой, аманинамидом, аманином, проаманулином, представляют собой жесткие бициклические пептиды, которые синтезируются в виде пропротеинов из 35 аминокислот, из которых последние восемь аминокислот расщепляются пролилолигопептидазой (Litten, W. 1975 Scientific American232 (3): 90–101;H. E. Hallen, et al 2007 Proc. Nat. Aca. Sci. USA 104, 19097–101; K. Baumann, et al, 1993 Biochemistry 32 (15): 4043–50; Karlson-Stiber C, Persson H. 2003, Toxicon 42 (4): 339–49; Horgen, P. A. et al. 1978 Arch. Microbio. 118 (3): 317-9). Аматоксины убивают клетки, ингибируя РНК-полимеразу II (Pol II), останавливая транскрипцию генов и биосинтез белка (Brodner, O. G. and Wieland, T. 1976 Biochemistry,15(16): 3480–4; Fiume, L., Curr Probl Clin Biochem, 1977, 7: 23-8; Karlson-Stiber C, Persson H. 2003, Toxicon 42(4): 339–49; Chafin, D. R. , Guo, H. & Price, D. H. 1995 J. Biol. Chem. 270 (32): 19114–19; Wieland (1983) Int. J. Pept. Protein Res. 22(3): 257-76.). Аматоксины могут быть получены из собранных грибов Amanita phalloides (Yocum, R. R. 1978 Biochemistry 17(18): 3786-9; Zhang, P. et al, 2005, FEMS Microbiol. Lett.252(2), 223-8), или путем ферментации с использованием базидиомицета (Muraoka, S. and Shinozawa T., 2000 J. Biosci. Bioeng. 89(1): 73-6) или путем ферментации с использованием A. fissa (Guo, X. W., et al, 2006 Wei Sheng Wu Xue Bao 46(3): 373-8), или путем культивирования Galerina fasciculata или Galerina helvoliceps, штамма принадлежащего роду (WO/1990/009799, JP11137291). Однако выходы из выделения и ферментации были довольно низкими (менее 5 мг/л культуры). За последние три десятилетия сообщалось о нескольких способах получения аматоксинов и их аналогов (W. E. Savige, A. Fontana, Chem. Commun. 1976, 600–1; Zanotti, G., et al, Int J Pept Protein Res, 1981. 18(2): 162-8; Wieland, T., et al, Eur. J. Biochem. 1981, 117, 161–4; P. A. Bartlett, et al, Tetrahedron Lett. 1982, 23, 619–22; Zanotti, G., et al., Biochim Biophys Acta, 1986. 870(3): 454-62; Zanotti, G., et al., Int. J. Peptide Protein Res. 1987, 30, 323–9; Zanotti, G., et al., Int. J. Peptide Protein Res. 1987, 30, 450–9; Zanotti, G., et al., Int J Pept Protein Res, 1988. 32(1): 9-20; G. Zanotti, T. et al, Int. J. Peptide Protein Res. 1989, 34, 222–8; Zanotti, G., et al., Int J Pept Protein Res, 1990. 35(3): 263-70; Mullersman, J. E. and J. F. Preston, 3rd, Int J Pept Protein Res, 1991. 37(6): 544-51; Mullersman, J.E., et al, Int J Pept Protein Res, 1991. 38(5): 409-16; Zanotti, G., et al, Int J

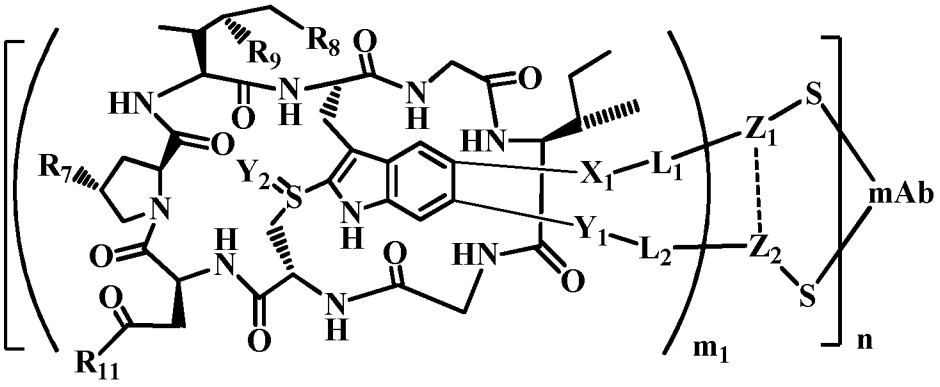
Pept Protein Res, 1992. 40(6): 551-8; Schmitt, W. et al, J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 4380–7; Anderson, M.O., et al, J. Org. Chem., 2005, 70(12): 4578-84; J. P. May, et al, J. Org. Chem. 2005, 70, 8424–30; F. Brueckner, P. Cramer, Nat. Struct. Mol. Biol. 2008, 15, 811–8; J. P. May, D. M. Perrin, Chem. Eur. J. 2008, 14, 3404–9; J. P. May, et al, Chem. Eur. J. 2008, 14, 3410–17; Q. Wang, et al, Eur. J. Org. Chem. 2002, 834–9; May, J. P. and D. M. Perrin, Biopolymers, 2007. 88(5): 714-24; May, J. P., et al., Chemistry, 2008. 14(11): 3410-7; S. De Lamo Marin, et al, Eur. J. Org. Chem. 2010, 3985–9; Pousse, G., et al., Org Lett, 2010. 12(16): 3582-5; Luo, H., et al., Chem Biol, 2014. 21(12): 1610-7; Zhao, L., et al., Chembiochem, 2015. 16(10): 1420-5) и большая часть этих способов являлась частичным синтезом. Из-за их чрезвычайно сильной активности и уникального механизма цитотоксичности, аматоксины использовались в качестве полезных нагрузок для конъюгирования (Fiume, L., Lancet, 1969. 2 (7625): 853-4; Barbanti-Brodano, G. and L. Fiume, Nat New Biol, 1973. 243(130): 281-3; Bonetti, E., M. et al, Arch Toxicol, 1976. 35(1): p. 69-73; Davis, M. T., Preston, J. F. Science 1981, 213, 1385–1388; Preston, J.F., et al, Arch Biochem Biophys, 1981. 209(1): 63-71; H. Faulstich, et al, Biochemistry 1981, 20, 6498–504; Barak, L.S., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(5): 3034-8; Faulstich, H. and L. Fiume, Methods Enzymol, 1985. 112: 225-37; Zhelev, Z., A. et al, Toxicon, 1987. 25(9): 981-7; Khalacheva, K., et al, Eksp Med Morfol, 1990. 29(3): 26-30; U. Bermbach, H. Faulstich, Biochemistry 1990, 29, 6839–45; Mullersman, J. E. and J. F. Preston, Int. J. Peptide Protein Res. 1991, 37, 544–51; Mullersman, J.E. and J.F. Preston, Biochem Cell Biol, 1991. 69(7): 418-27; J. Anderl, H. Echner, H. Faulstich, Beilstein J. Org. Chem. 2012, 8, 2072–84; Moldenhauer, G., et al, J. Natl. Cancer Inst. 2012, 104, 622–34; A. Moshnikova, et al; Biochemistry 2013, 52, 1171–8; Zhao, L., et al., Chembiochem, 2015. 16(10): 1420-5; Zhou, B., et al., Biosens Bioelectron, 2015. 68: 189-96; WO2014/043403, патент США20150218220, патент Европы 1661584). Мы работали над конъюгированием аматоксинов в течение некоторого времени. Примерами структур конъюгата “антитело-аматоксины”, связанных через линкер, являются предпочтительными в качестве следующих структур Am01, Am02, Am03 и Am04.



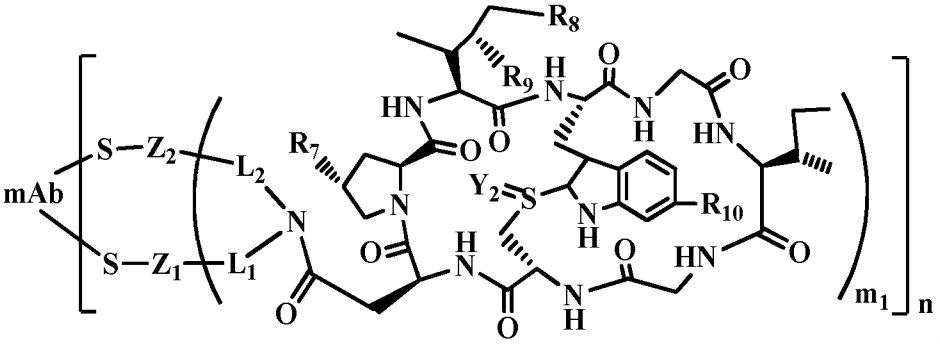
Am01



Am02



Am03



Am04

где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; R_7, R_8 и R_9 независимо представляют собой H, OH, OR_1, NH_2, NHR_1, C_1-C_6 алкил или отсутствуют; Y_2 представляет собой O, O_2, NR_1, NH или отсутствует; R_{10} представляет собой CH_2, O, NH, NR_1, NHC(O), NHC(O)NH, NHC(O)O, OC(O)O, C(O), OC(O), $OC(O)(NR_1)$, $(NR_1)C(O)(NR_1)$, $C(O)R_1$ или отсутствует; R_{11} представляет собой OH, NH_2, NHR_1, $NHNH_2$, NHNHCOOH, O-R_1-COOH, NH-R_1-COOH, NH-$(Aa)_n$COOH, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, NR_1R_1', $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, NH-Ar-COOH, NH-Ar-$NH_2$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, R_1-$NHSO_3H$, NH-R_1-

$NHSO_3H$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, OR_1, R_1-$NHPO_3H_2$, R_1-OPO_3H_2, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OPO_3H_2$, OR_1-$NHPO_3H_2$, NH-R_1-$NHPO_3H_2$ или $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, где Aa представляет собой 1-8 аминокислот; n и m_1 независимо равны 1-20; p равен 1 -5000; R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в Формуле (I). L_1, L_2, R_1, Z_1 и Z_2 являются такими, как определено в Формуле (I).

В еще одном варианте осуществления иммунотоксин может быть конъюгирован с молекулой, связывающейся с клеткой, через бис-линкер согласно настоящему патенту. Иммунотоксин в данном описании представляет собой макромолекулярное лекарственное средство, которое обычно представляет собой цитотоксический белок, полученный из бактериального или растительного белка, такого как дифтерийный токсин (DT), холерный токсин (CT), трихосантин (TCS), диантин, экзотоксин Pseudomonas A (ETA'), эритрогенные токсины, дифтерийный токсин, токсины AB, экзотоксины типа III и др. Также это может быть высокотоксичный бактериальный порообразующий протоксин, который требует протеолитической обработки для активации. Примером такого протоксина является проаэролизин и его генетически модифицированная форма, топсализин. Топсализин представляет собой модифицированный рекомбинантный белок, который был разработан для селективной активации ферментом в предстательной железе, что приводит к локализованной гибели клеток и разрушению тканей без повреждения соседних тканей и нервов.

В еще одном варианте осуществления лиганды, связывающиеся с клеткой или агонисты клеточных рецепторов могут быть конъюгированы с молекулой, связывающейся с клеткой через бис-линкер согласно настоящему патенту. Такие конъюгированные лиганды, связывающиеся с клеткой, или агонисты клеточных рецепторов, в частности, конъюгаты “антитело-рецептор”, могут не только работать в качестве нацеливающего проводника/ориентанта для доставки конъюгата в злокачественные клетки, но также использоваться для модуляции или костимуляции желаемого иммунного ответа или изменения сигнальных путей.

В иммунотерапии лиганды, связывающиеся с клеткой, или агонисты клеточных рецепторов, предпочтительны для конъюгирования с антителом TCR (Т-клеточных рецепторов) Т-клеток или CAR (химерных антигенных рецепторов) Т-клеток или В-клеточных рецепторов (BCR), естественных клеток-киллеров (NK) или цитотоксических клеток. Такое антитело предпочтительно является анти-CD3, CD4, CD8, CD16 (FcγRIII), CD27, CD40, CD40L, CD45RA, CD45RO, CD56, CD57, $CD57^{bright}$, TNFβ, Fas-лигандом, молекулами MHC класса I (HLA-A, B, C) или NKR-P1. Лиганды, связывающиеся с

клеткой или агонисты рецепторов выбраны из, но не ограничены этим: производных фолата (связываются с фолатным рецептором, белком, сверхэкспрессируемым при раке яичников и других злокачественных новообразованиях) (Low, P. S. et al 2008, Acc. Chem. Res. 41, 120-9); производных мочевино глутаминовой кислоты (связываются с специфичным мембранным антигеном предстательной железы, поверхностным маркером клеток рака предстательной железы) (Hillier, S.Metal, 2009, Cancer Res. 69, 6932-40); соматостатина (также известного как гормон, ингибирующий гормон роста (GHIH) или фактор, ингибирующий высвобождение соматотропина (SRIF)), или гормон, ингибирующий высвобождение соматотропина) и его аналога, такого как октреотид (сандостатин) и ланреотид (соматулин) (особенно для нейроэндокринных опухолей, GH-продуцирующей аденома гипофиза, параганглиомы, нефункциональной аденомы гипофиза, феохромоцитомы) (Ginj, M., et al, 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 16436-41). В целом, соматостатин и подтипы его рецепторов (sst1, sst2, sst3, sst4 и sst5) были обнаружены во многих типах опухолей, таких как нейроэндокринные опухоли, в частности в GH-секретирующие гипофизеаденомы (Reubi J. C., Landolt, A. M. 1984 J. Clin. Endocrinol Metab 59: 1148–51; Reubi J. C., Landolt A. M. 1987 J Clin Endocrinol Metab 65: 65–73; Moyse E, et al, J Clin Endocrinol Metab 61: 98–103) и гастроэнтеропанкреатические опухоли (Reubi J. C., et al, 1987 J Clin Endocrinol Metab 65: 1127–34; Reubi, J. C, et al, 1990 Cancer Res 50: 5969–77), феохромоцитомы (Epel-baum J, et al 1995 J Clin Endocrinol Metab 80:1837–44; Reubi J. C., et al, 1992 J Clin Endocrinol Metab 74: 1082–9), нейробластомы (Prevost G, 1996 Neuroendocrinology 63:188–197; Moertel, C. L, et al 1994 Am J Clin Path 102:752–756), медуллярный рак щитовидной железы (Reubi, J. C, et al 1991 Lab Invest 64:567–573), мелкоклеточный рак легких (Sagman U, et al, 1990 Cancer 66:2129–2133), не-нейроэндокринные опухоли, включая опухоли головного мозга, такие как менингиомы, медуллобластомы или глиомы (Reubi J. C., et al 1986 J Clin Endocrinol Metab 63: 433–8; Reubi J. C., et al 1987 Cancer Res 47: 5758–64; Fruhwald, M. C, et al 1999 Pediatr Res 45: 697–708), карциномы молочной железы (Reubi J. C., et al 1990 Int J Cancer 46: 416–20; Srkalovic G, et al 1990 J Clin Endocrinol Metab 70: 661–669), лимфомы (Reubi J. C., et al 1992, Int J Cancer50: 895–900), почечно-клеточный рак (Reubi J. C., et al 1992, Cancer Res 52: 6074–6078), мезенхимальные опухоли (Reubi J. C., et al 1996 Cancer Res 56: 1922–31), опухоли предстательной железы (Reubi J. C., et al 1995, J. Clin. Endocrinol Metab 80: 2806–14; et al 1989, Prostate 14:191–208; Halmos G, et al J. Clin. Endo-crinol Metab 85: 2564–71), яичников (Halmos, G, et al, 2000 J Clin Endocrinol Metab 85: 3509–12; Reubi J. C., et al 1991 Am J Pathol 138:1267–72), желудка (Reubi J. C., et al 1999, Int J Cancer 81: 376–86; Miller, G. V,

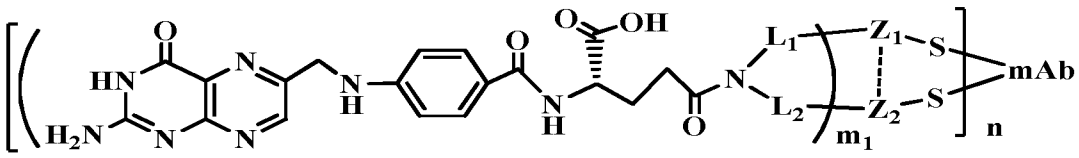
1992 Br J Cancer 66: 391–95), гепатоцеллюлярный рак (Kouroumalis E, et al., 1998, Gut 42: 442–7; Reubi J. C., et al 1999 Gut 45: 66–774) и назофарингеальные карциномы (Loh K. S, et al, 2002 Virchows Arch 441: 444-8); некоторые ароматические сульфонамиды, специфичные для карбоангидразы IX (маркер гипоксии и почечно-клеточного рака) (Neri, D., et al, Nat. Rev. Drug Discov. 2011, 10, 767-7); пептиды, активирующие аденилатциклазу гипофиза (PACAP) (PAC1) для феохромоцитом и параганглиом; вазоактивные кишечные пептиды (VIP) и подтипы их рецепторов (VPAC1, VPAC2) для рака легких, желудка, толстой кишки, прямой кишки, молочной железы, предстательной железы, протоков поджелудочной железы, печени, мочевого пузыря и эпителиальных опухолей; рецепторы α-меланоцит-стимулирующего гормона (α-MSH) для различных опухолей; холецистокининовые (CCK)/гастриновые рецепторы и их рецепторные подтипы (CCK1 (ранее CCK-A) и CCK2 для мелкоклеточного рака легких, медуллярных карцином щитовидной железы, астроцитом, инсулином и рака яичников; бомбезин (Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2)/гастрин-высвобождающий пептид (GRP) и подтипы его рецепторов (BB1, подтип рецепторов GRP (BB2), BB3 и BB4) для почечных клеток, карциномы молочной железы, легких, желудка и предстательной железы и нейробластомы (и нейробластома (Ohlsson, B., et al, 1999, Scand. J. Gastroenterology 34 (12): 1224–9; Weber, H. C., 2009, Cur. Opin. Endocri. Diab. Obesity 16(1): 66–71, Gonzalez N, et al, 2008, Cur. Opin. Endocri. Diab. Obesity 15(1), 58-64); рецепторы нейротензина и подтипы его рецепторов (NTR1, NTR2, NTR3) для мелкоклеточного рака легких, нейробластомы, рака поджелудочной железы, толстой кишки и саркомы Юинга; рецепторы вещества P и подтипы его рецепторов (такие как рецептор NK1 для глиальных опухолей, Hennig I. M., et al 1995 Int. J. Cancer 61, 786–792); рецепторы нейропептида Y (NPY) и подтипы его рецепторов (Y1 – Y6) для карцином молочной железы; хоминг пептиды включают RGD (Arg-Gly-Asp), NGR (Asn-Gly-Arg), димерные и мультимерные циклические пептиды RGD (например, cRGDfV), которые распознают рецепторы (интегрины) на поверхности опухоли (Laakkonen P, Vuorinen K. 2010, Integr Biol (Camb). 2(7–8): 326–337; Chen K, Chen X. 2011, Theranostics. 1:189–200; Garanger E, et al, Anti-Cancer Agents Med Chem. 7 (5): 552–558; Kerr, J. S. et al, Anticancer Research, 19(2A), 959-968; Thumshirn, G, et al, 2003 Chem. Eur. J. 9, 2717- 2725), и TAASGVRSMH или LTLRWVGLMS (рецептор хондроитинсульфата протеогликана NG2) и пептиды F3 (пептид из 31 аминокислоты, который связывается с рецептором нуклеолина, экспрессируемым на клеточной поверхности) (Zitzmann, S., 2002 Cancer Res., 62, 18, pp. 5139–5143, Temminga, K., 2005, Drug Resistance Updates, 8, 381–402; P. Laakkonen and K.

Vuorinen, 2010 Integrative Biol, 2(7-8), 326–337; M. A. Burg, 1999 Cancer Res., 59(12), 2869–2874; K. Porkka, et al 2002, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99(11), 7444-9); пептиды, проникающие в клетки (CPP) (Nakase I, et al, 2012, J. Control Release. 159(2),181–188); пептидные гормоны, такие как агонисты и антагонисты рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LHRH) и агонист гонадотропин-рилизинг-гормона (GnRH), воздействуют на выработку фолликулостимулирующего гормона (FSH) и выработку лютеинизирующего гормона (LH), а также тестостерона, например, бусерелин (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(OtBu)-Leu-Arg-Pro-NHEt), гонадорелин (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2), гозерелин (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(OtBu)-Leu-Arg-Pro-AzGly-NH_2), гистрелин (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-His(N-бензил)-Leu-Arg-Pro-NHEt), лейпролид (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt), нафарелин (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-2Nal-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2), трипторелин (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2), нафарелин, деслорелин, абареликс (Ac-D-2Nal-D-4-хлорPhe-D-3-(3-пиридил)Ala-Ser-(N-Me)Tyr-D-Asn-Leu-изопропилLys-Pro-DAla-NH_2), цетрореликс (Ac-D-2Nal-D-4-хлор-Phe-D-3-(3-пиридил)Ala-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH_2), дегареликс (Ac-D-2Nal-D-4-хлорPhe-D-3-(3-пиридил)Ala-Ser-4-аминоPhe(L-гидрооротил)-D-4-аминоPhe(карбамоил)-Leu-изопропилLys-Pro-D-Ala-NH_2) и ганиреликс (Ac-D-2Nal-D-4-хлорPhe-D-3-(3-пиридил)Ala-Ser-Tyr-D-(N9, N10-диэтил)-гомоArg-Leu-(N9, N10-диэтил)-гомоArg-Pro-D-Ala-NH_2) (Thundimadathil, J., J. Amino Acids, 2012, 967347, doi:10.1155/2012/967347; Boccon-Gibod, L.; et al, 2011, Therapeutic Advances in Urology 3(3): 127–140; Debruyne, F., 2006, Future Oncology, 2(6), 677–696; Schally A. V; Nagy, A. 1999 Eur J Endocrinol 141:1–14; Koppan M, et al 1999 Prostate 38:151–158); и рецепторы распознавания патернов (PRR), такие как Toll-подобные рецепторы (TLR), лектины C-типа и Nodlike-рецепторы (NLRs) (Fukata, M., et al, 2009, Semin. Immunol. 21, 242–253; Maisonneuve, C., et al, 2014, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 1–6; Botos, I., et al, 2011, Structure 19, 447–459; Means, T. K., et al, 2000, Life Sci. 68, 241–258), которые варьируются по размеру от малых молекул (имиквимод, гуанизин и аналоги аденозина) до больших и сложных биомакромолекул, таких как липополисахарид (LPS), нуклеиновые кислоты (CpG DNA, polyI: C) и липопептиды (Pam3CSK4) (Kasturi, S. P., et al, 2011, Nature 470, 543–547; Lane, T., 2001, J. R. Soc. Med. 94, 316; Hotz, C., and Bourquin, C., 2012, Oncoimmunology 1, 227−228; Dudek, A. Z., et al, 2007, Clin. Cancer Res. 13, 7119–25); рецепторы кальцитонина, которые представляют собой нейропептид из 32 аминокислот, участвующий в регуляции уровней кальция, в основном благодаря его воздействию на остеокласты и почки (Zaidi M, et al, 1990 Crit Rev Clin Lab Sci 28, 109–174; Gorn, A. H., et al 1995 J Clin Invest 95:2680–91); и рецепторы интегрина и подтипы его

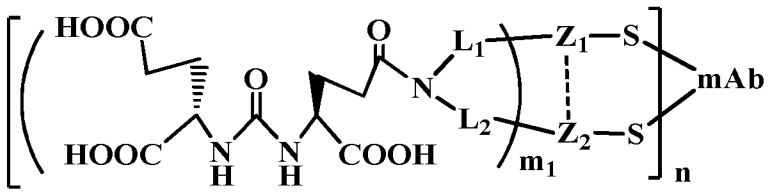
рецепторов (такие как $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ и т. д.), которые обычно играют важную роль в ангиогенезе, экспрессируются на поверхностях различных клеток, в частности, остеокластов, эндотелиальных клеток и опухолевых клеток (Ruoslahti, E. et al, 1994 Cell 77, 477-8; Albelda, S. M. et al, 1990 Cancer Res., 50, 6757-64). Короткие пептиды, GRGDSPK и циклические пентапептиды RGD, такие как цикло(RGDfV) (L1) и его производные [цикло(-N(Me)R-GDfV), цикло(R-Sar-DfV), цикло-(RG-N(Me)D-fV), цикло(RGD-N(Me)f-V), цикло(RGDf-N(Me)V-)(силенгитид)] продемонстрировали высокую аффинность связывания рецепторов интергрина (Dechantsreiter, M. A. et al, 1999 J. Med. Chem. 42, 3033-40, Goodman, S. L., et al, 2002 J. Med. Chem. 45, 1045-51).

Лиганды, связывающиеся с клеткой или агонисты клеточных рецепторов могут представлять собой белковые каркасные молекулы на основе Ig и не на основе Ig. Каркасы на основе Ig могут быть выбраны, но не ограничены, из нанотела (производного VHH (Ig верблюдовых)) (Muyldermans S., 2013 Annu Rev Biochem. 82, 775–97); доменных антител (dAb, производное домена VH или VL) (Holt, L. J, et al, 2003, Trends Biotechnol. 21, 484–90); биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE, биспецифическое диателo) (Baeuerle, P. A, et al, 2009, Curr. Opin. Mol. Ther. 11, 22–30); переориентирующееся антитело с двойной аффинностью (DART, биспецифическое диателo) (Moore P. A. P, et al. 2011, Blood 117(17), 4542–51); четырехвалентные тандемные антитела (TandAb, димеризованное биспецифичное диателo) (Cochlovius, B, et al. 2000, Cancer Res. 60(16):4336-4341). Каркасы не на основе Ig могут быть выбраны, но не ограничены, из антикалина (производного липокалинов) (Skerra A. 2008, FEBS J., 275 (11): 2677–83; Beste G, et al, 1999 Proc. Nat. Acad. USA. 96(5):1898–903; Skerra, A. 2000 Biochim Biophys Acta, 1482(1-2): 337–50; Skerra, A. 2007, Curr Opin Biotechnol. 18(4): 295–304; Skerra, A. 2008, FEBS J. 275(11):2677–83); аднектинов (10й FN3 (фибронектин)) (Koide, A, et al, 1998 J. Mol. Biol., 284(4):1141–51; Batori V, 2002, Protein Eng. 15(12): 1015–20; Tolcher, A. W, 2011, Clin. Cancer Res. 17(2): 363–71; Hackel, B. J, 2010, Protein Eng. Des. Sel. 23(4): 211–19); разработанных белков с анкириновым повтором (DARPin) (производные белков с анкириновым повтором (AR)) (Boersma, Y.L, et al, 2011 Curr Opin Biotechnol. 22(6): 849–57), например, DARPin C9, DARPin Ec4 и DARPin E69_LZ3_E01 (Winkler J, et al, 2009 Mol Cancer Ther. 8(9), 2674–83; Patricia M-K. M., et al, Clin Cancer Res. 2011; 17(1):100–10; Boersma Y. L, et al, 2011 J. Biol. Chem. 286 (48), 41273–85); авимеров (домен A/рецептор липопротеинов низкой плотности (LDL)) (Boersma Y. L, 2011 J. Biol. Chem. 286(48): 41273–41285; Silverman J, et al, 2005 Nat. Biotechnol., 23(12):1556–61).

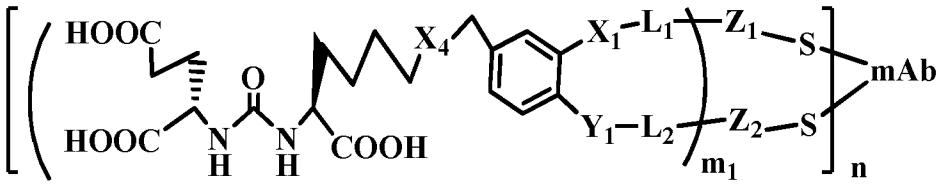
Примеры структур конъюгата “антитело-лиганд, связывающийся с клеткой” или агонистов клеточных рецепторов, или лекарственных средств, связанных через бис-линкер согласно патентной заявки, перечислены ниже: LB01 (конъюгат с фолатом), LB02 (конъюгат с лигандом PMSA), LB03 (конъюгат с лигандом PMSA), LB04 (конъюгат с лигандом PMSA), LB05 (конъюгат с соматостатином), LB06 (конъюгат с соматостатином), LB07 (октреотид, конъюгата аналога соматостатина), LB08 (ланреотид, конъюгата аналога соматостатина), LB09 (вапреотид(санвар), конъюгат аналога соматостатина), LB10 (конъюгат с лигандом CAIX), LB11 (конъюгат с лигандом CAIX), LB12 (рецептор высвобождающего гастрин пептида (GRPr), конъюгат MBA) LB13 (конъюгат лиганд рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LH-RH) и GnRH), LB14 (конъюгат лиганд рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LH-RH) и GnRH-лиганда), LB15 (антагонист GnRH, абареликс конъюгат), LB16 (кобаламин, конъюгат аналога витамина B12), LB17 (кобаламин, конъюгат аналога витамина B12), LB18 (пентапептидный циклический RGD конъюгат для рецептора интегрина $\alpha_v\beta_3$), LB19 (конъюгат гетеро-двухвалентного пептидного лиганда рецептора VEGF), LB20 (конъюгат нейромедина B), LB21 (конъюгат бомбезина для рецептора, сопряженного с G-белком), LB22 (конъюгат TLR_2 для Toll-подобного рецептора), LB23 (для рецептора андрогена), LB24 (циленгитид/цикло(-RGDfV-) конъюгат для рецептора интергрина α_v), LB23 (конъюгат с флудрокортизоном), LB25 (конъюгат с аналогом рифабутина), LB26 (конъюгат с аналогом рифабутина), LB27 (конъюгат с аналогом рифабутина), LB28 (конъюгат с флудрокортизоном), LB29 (конъюгат с дексаметазоном), LB30 (конъюгат с флутиказоном пропионатом), LB31 (конъюгат с беклометазоном дипропионатом), LB32 (конъюгат с триамцинолоном ацетонидом), LB33 (конъюгат с преднизоном), LB34 (конъюгат с преднизолоном), LB35 (конъюгат с метилпреднизолоном), LB36 (конъюгат с бетаметазоном), LB37 (конъюгат с аналогом иринотекана), LB38 (конъюгат с аналогом кризотиниба), LB39 (конъюгат с аналогом бортезомиба), LB40 (конъюгат с аналогом карфилзомиба), LB41 (конъюгат с аналогом карфилзомиба), LB42 (конъюгат с аналогом лейпролида), LB43 (конъюгат с аналогом трипторелина), LB44 (конъюгат с клиндамицина), LB45 (конъюгат с аналогом лираглутида), LB46 (конъюгат с аналогом семаглутида), LB47 (конъюгат с аналогом ретапамулина), LB48 (конъюгат с аналогом инбулина), LB49 (конъюгат с аналогом винбластина), LB50 (конъюгат с аналогом ликсисенатида), LB51 (конъюгат с аналогом осимертиниба), LB52 (конъюгат с аналогом неуклеозида), LB53 (конъюгат с аналогом эрлотиниба) и LB54 (конъюгат с аналогом лапатиниба), которые представлены следующими структурами:



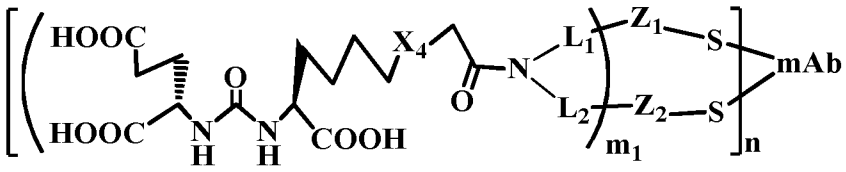
LB01 (конъюгат с фолатом),



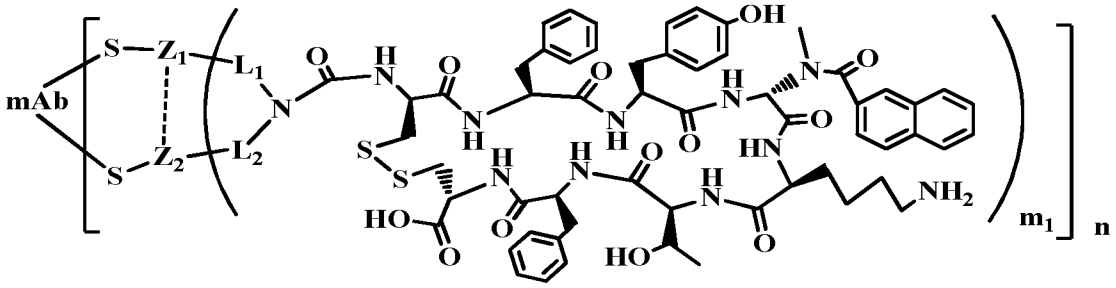
LB02 (конъюгат с лигандом PMSA),



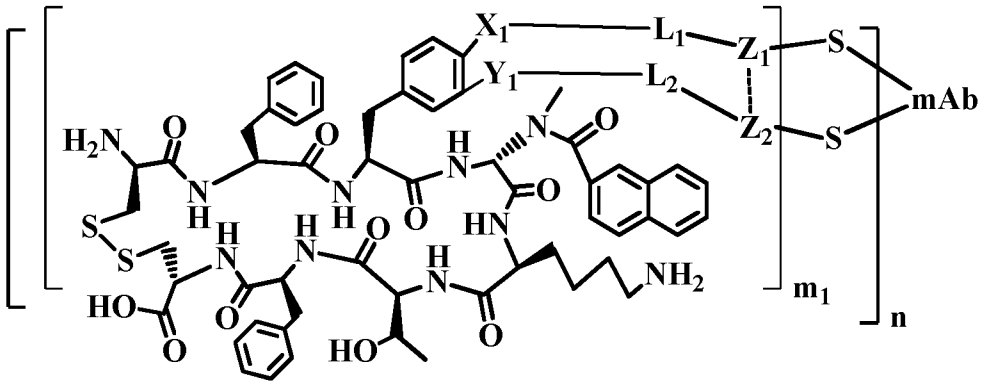
LB03 (конъюгат с лигандом PMSA),



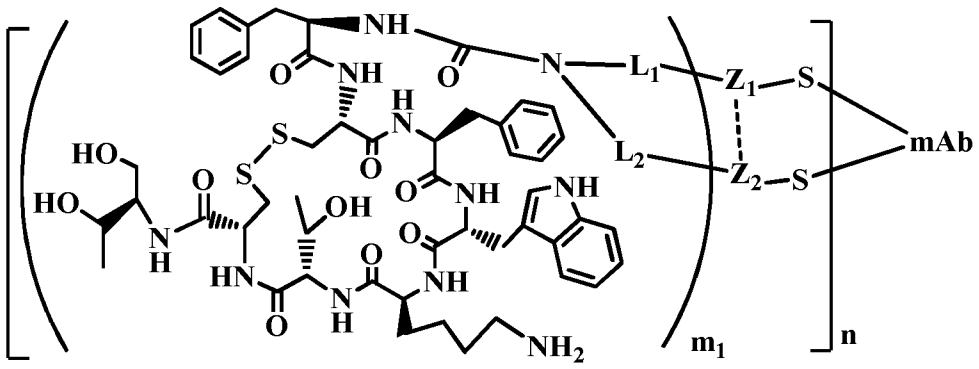
LB04 (конъюгат с лигандом PMSA),



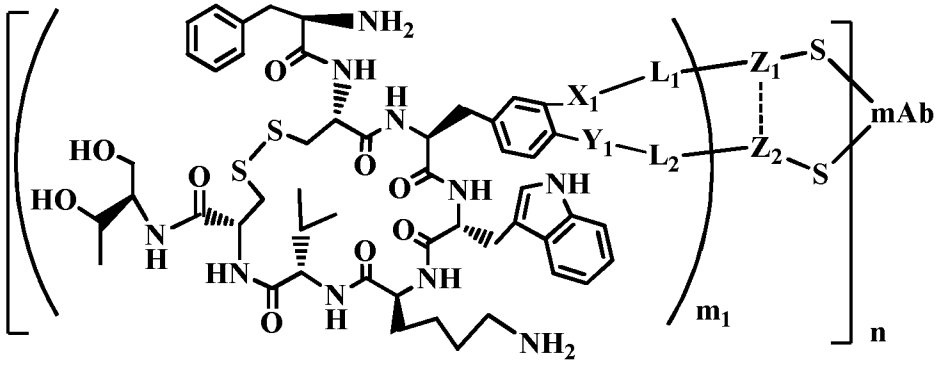
LB05 (конъюгат с соматостатином),



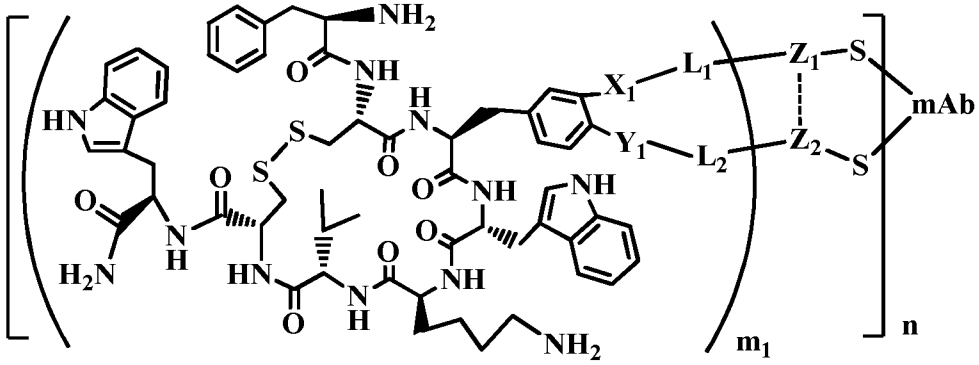
LB06 (конъюгат с соматостатином),



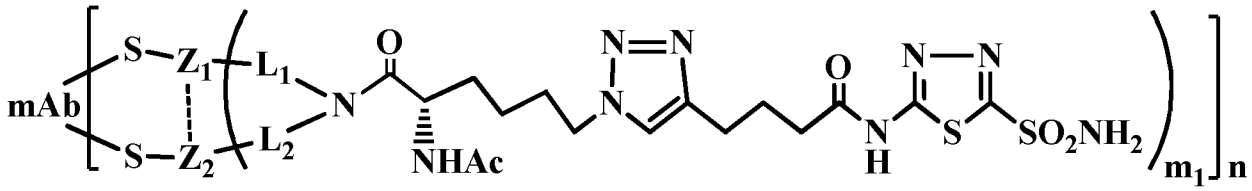
LB07 (октреотид, конъюгата аналога соматостатина),



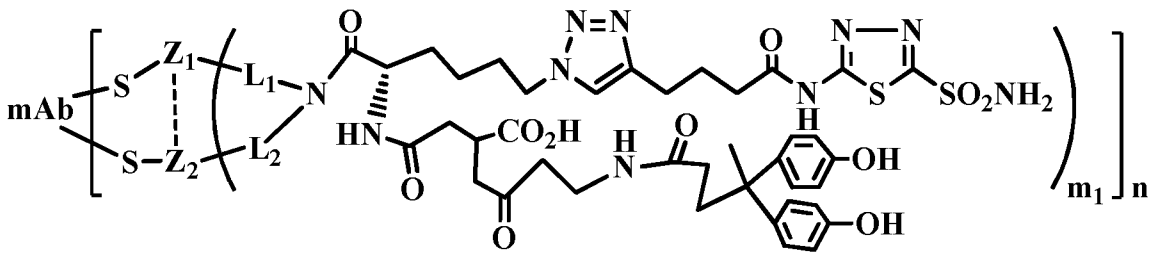
LB08 (ланреотид, конъюгата аналога соматостатина),



LB09 (вапреотид(санвар), конъюгат аналога соматостатина),

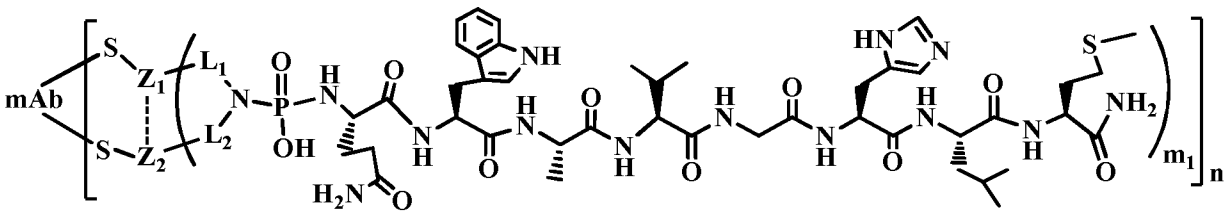


LB10 (конъюгат с лигандом CAIX),

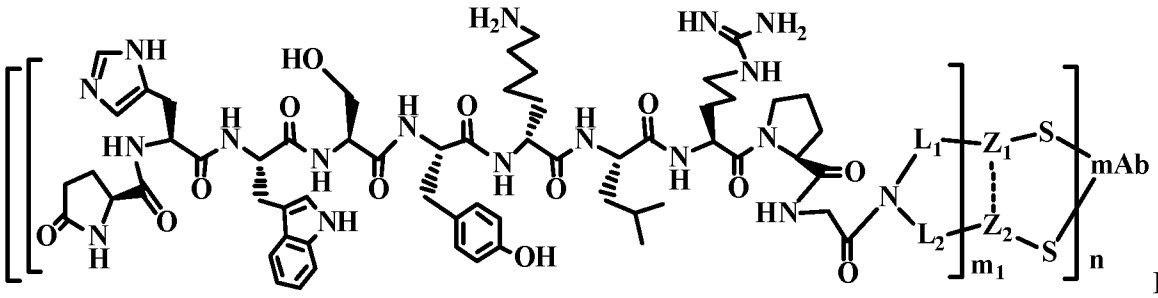


LB11

(конъюгат с лигандом CAIX),

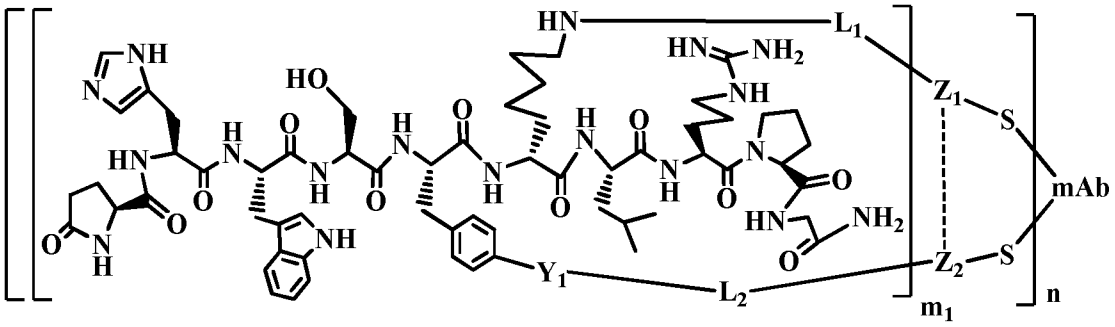


LB12 (рецептор высвобождающего гастрин пептида (GRPr), конъюгат MBA),

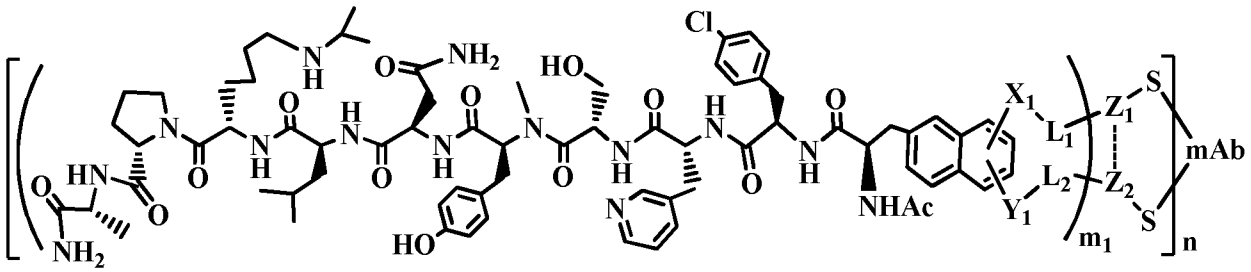


LB13

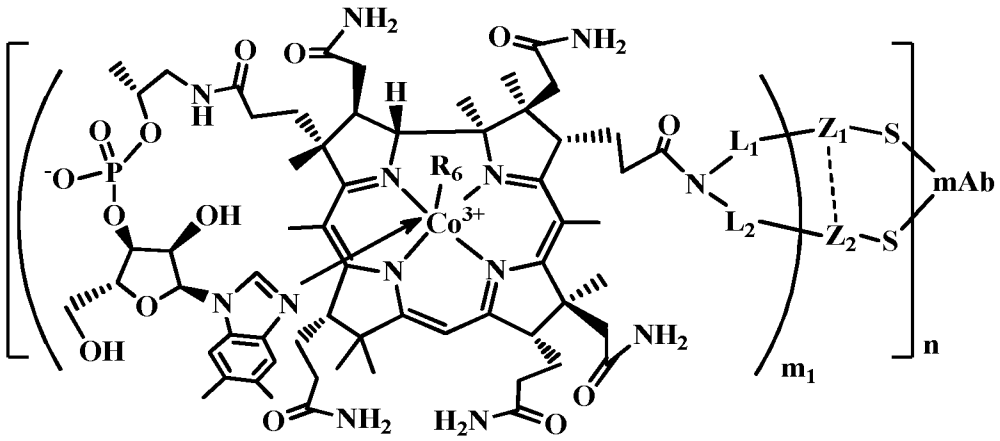
(конъюгат лиганд рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LH-RH) и GnRH),



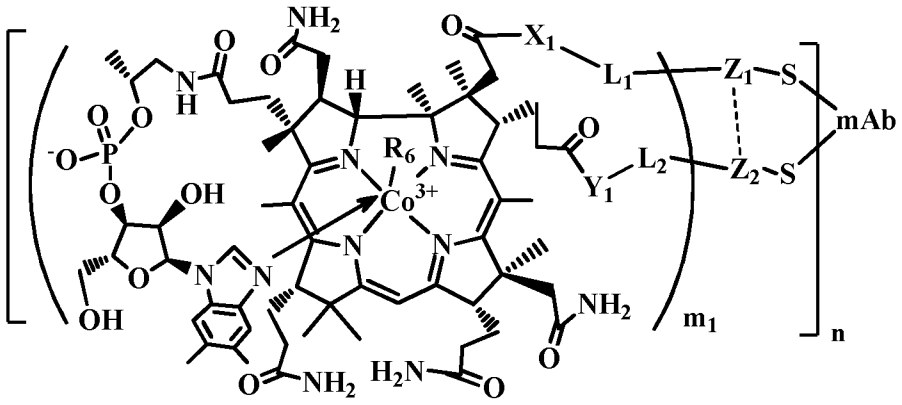
LB14 (конъюгат лиганд рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LH-RH) и GnRH-лиганда),



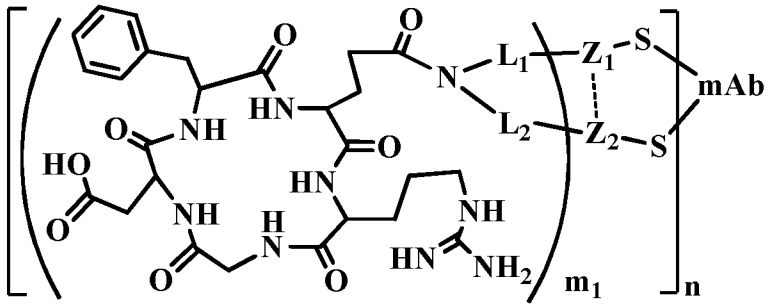
LB15 (антагонист GnRH, абареликс конъюгат),



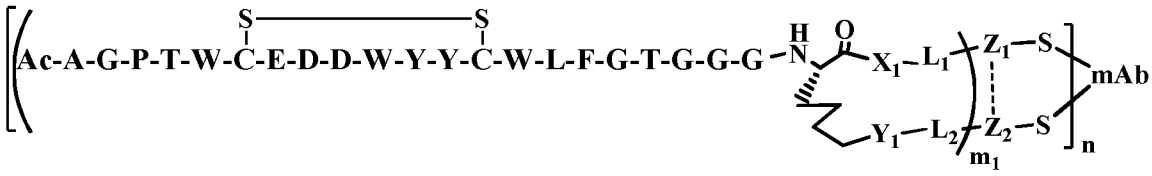
LB16 (кобаламин, конъюгат аналога витамина B12),



LB17 (кобаламин, конъюгат аналога витамина B12),

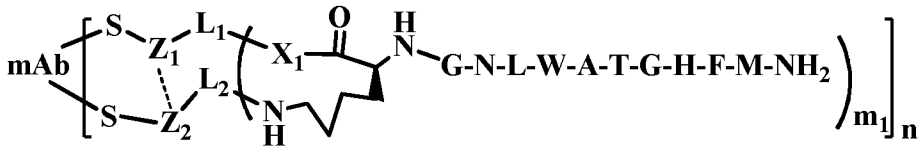


LB18 (пентапептидный циклический RGD конъюгат для рецептора интегрина $\alpha_v\beta_3$),



LB19

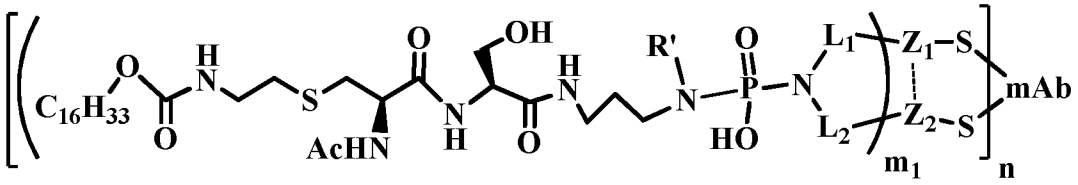
(конъюгат гетеро-двухвалентного пептидного лиганда рецептора VEGF),



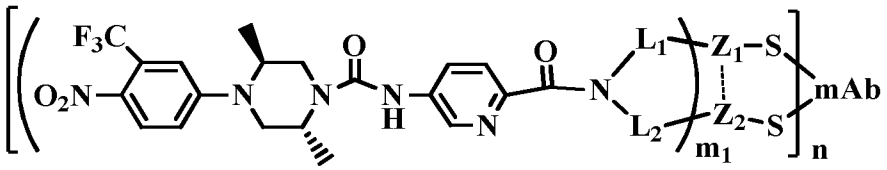
LB20 (конъюгат нейромедина B),



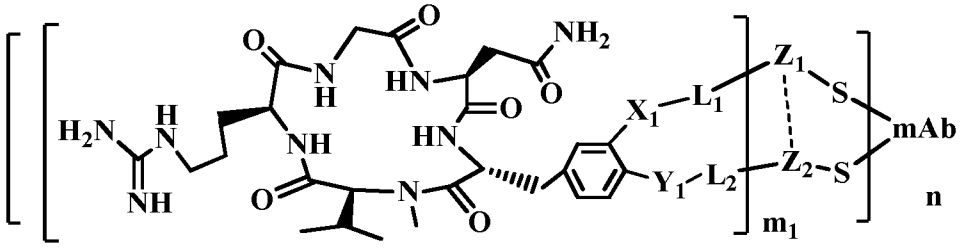
LB21 (конъюгат бомбезина для рецептора, сопряженного с G-белком),



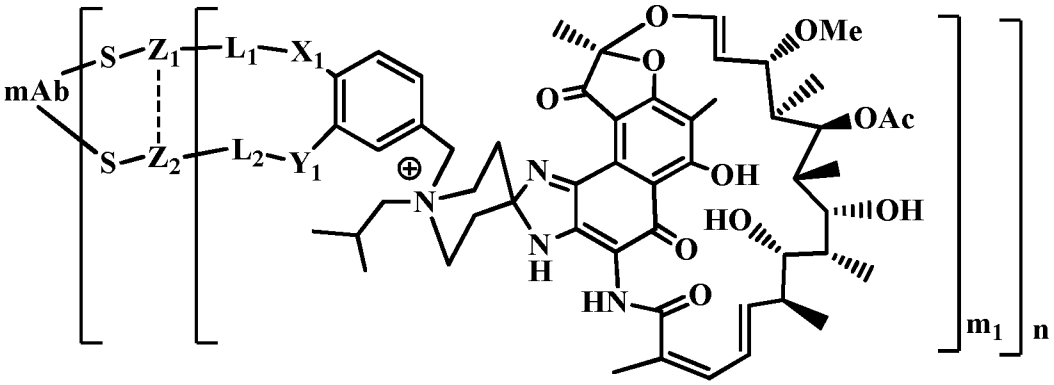
LB22 (конъюгат TLR_2 для Toll-подобного рецептора),



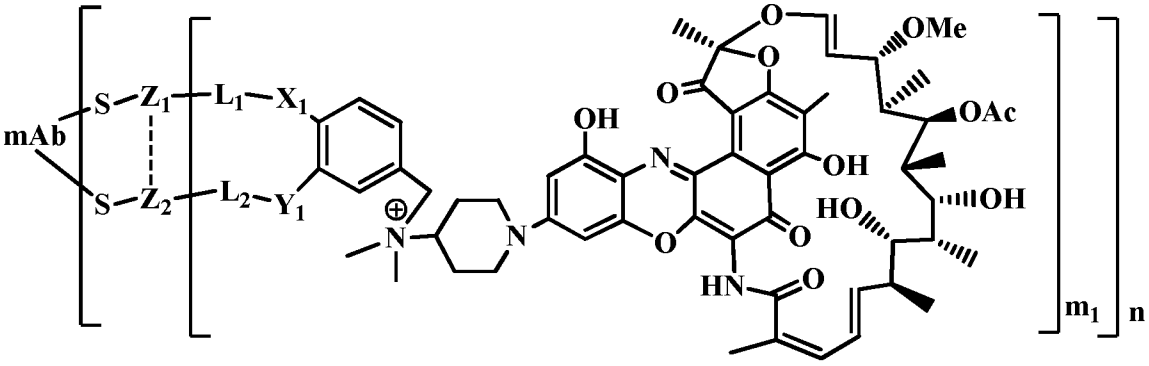
LB23 (для рецептора андрогена),



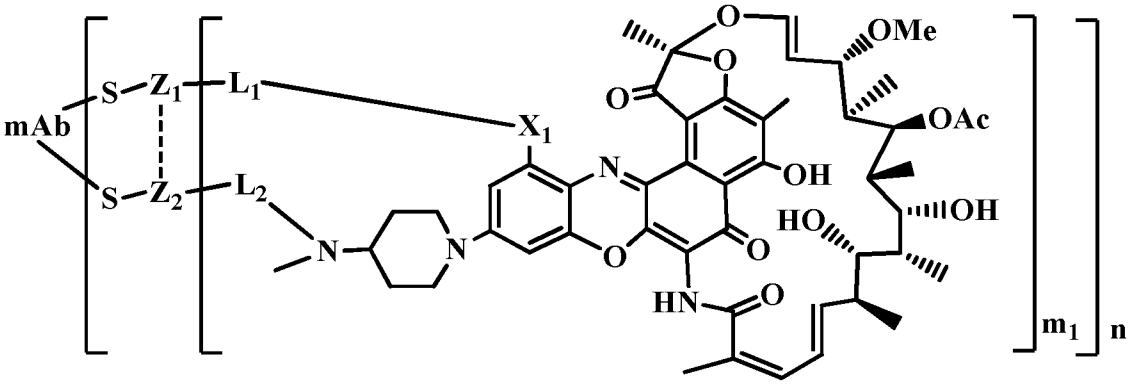
LB24 (циленгитид/цикло(-RGDfV-) конъюгат для рецептора интергрина α_v)



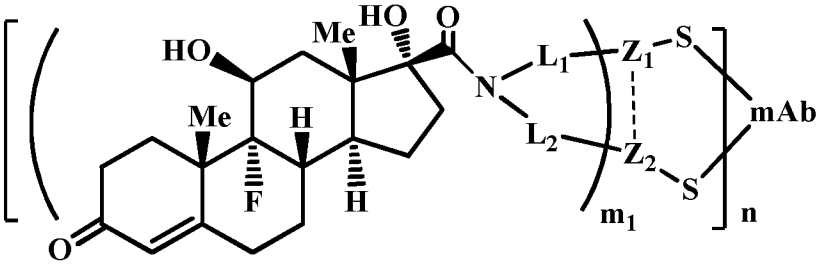
LB25 (конъюгат с аналогом рифабутина),



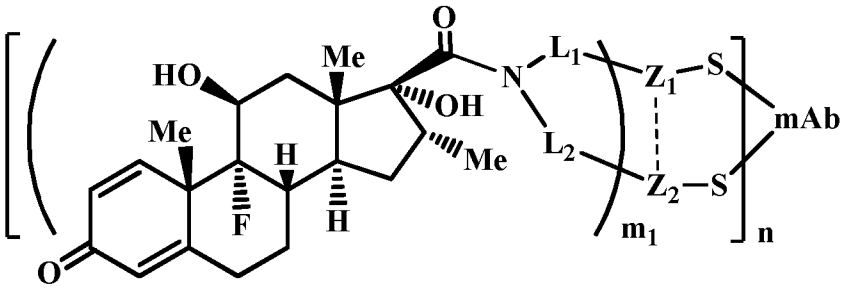
LB26 (конъюгат с аналогом рифабутина),



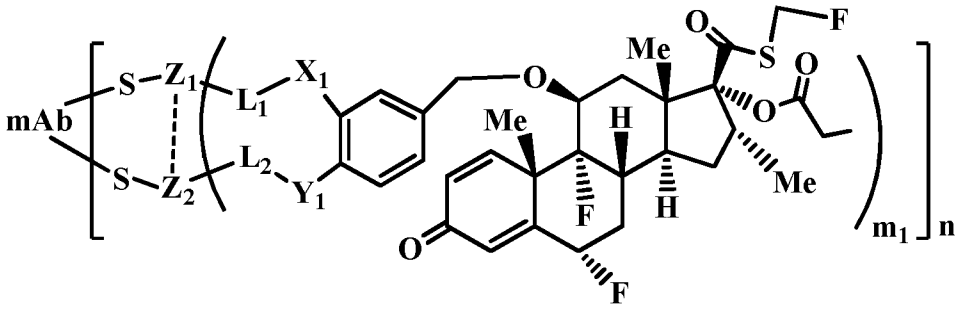
LB27 (конъюгат с аналогом рифабутина),



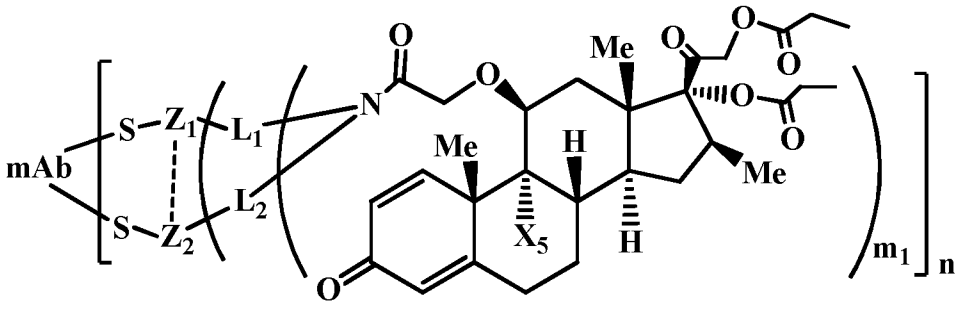
LB28 (конъюгат с флудрокортизоном),



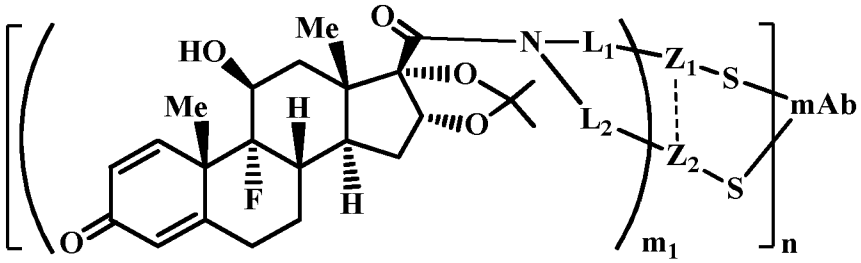
LB29 (конъюгат с дексаметазоном),



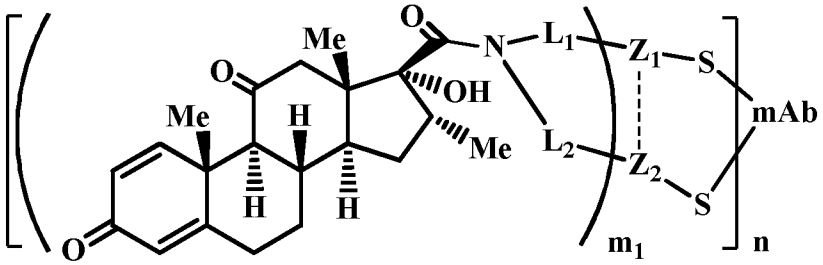
LB30 (конъюгат с флутиказоном пропионатом),



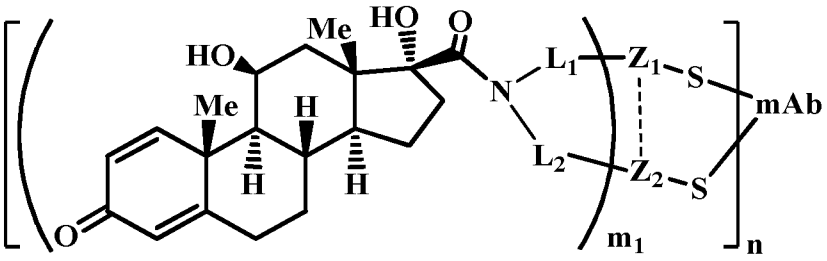
LB31 (конъюгат с беклометазоном дипропионатом),



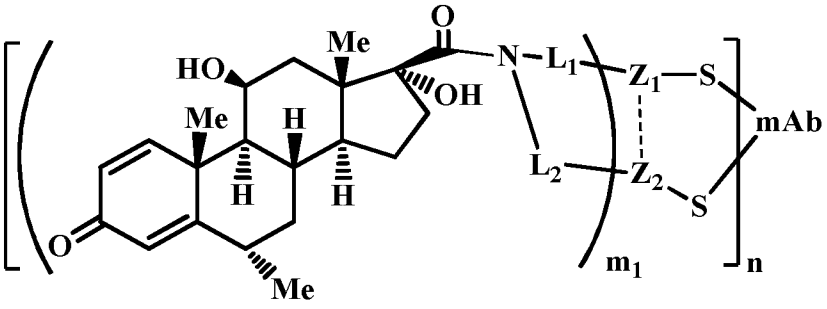
LB32 (конъюгат с триамцинолоном ацетонидом),



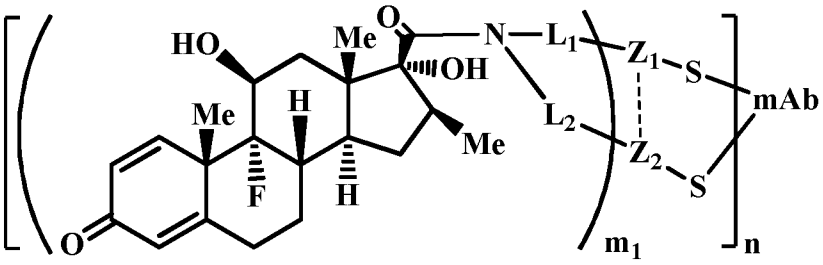
LB33 (конъюгат с преднизоном),



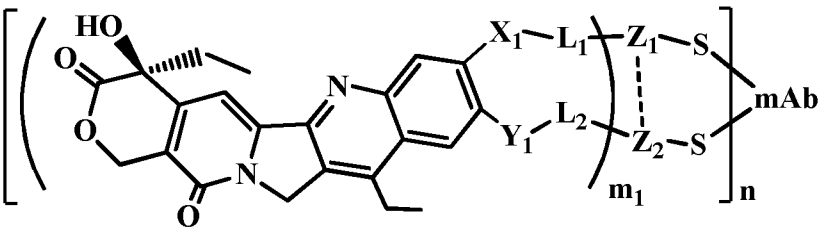
LB34 (конъюгат с преднизолоном),



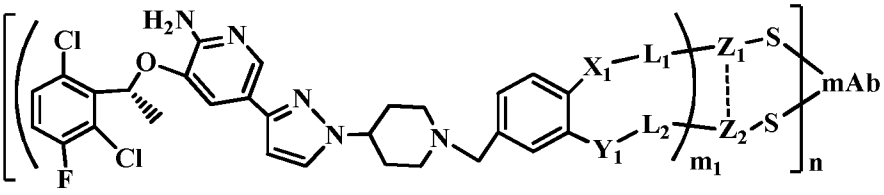
LB35 (конъюгат с метилпреднизолоном),



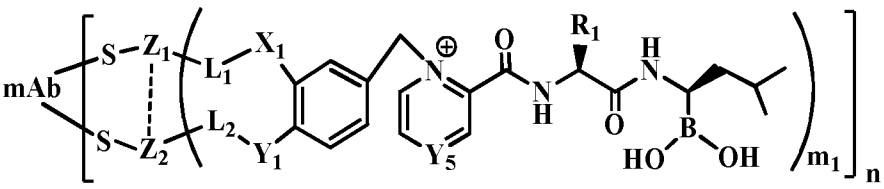
LB36 (конъюгат с бетаметазоном),



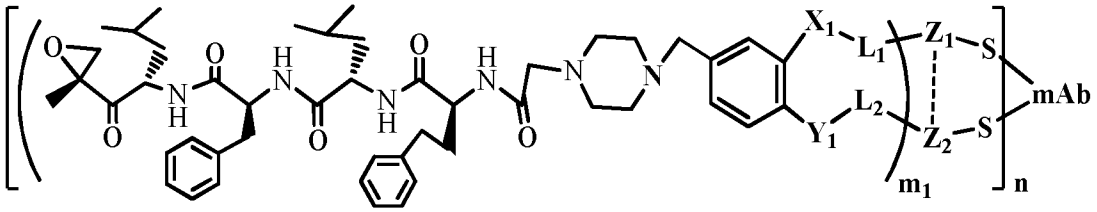
LB37 (конъюгат с аналогом иринотекана),



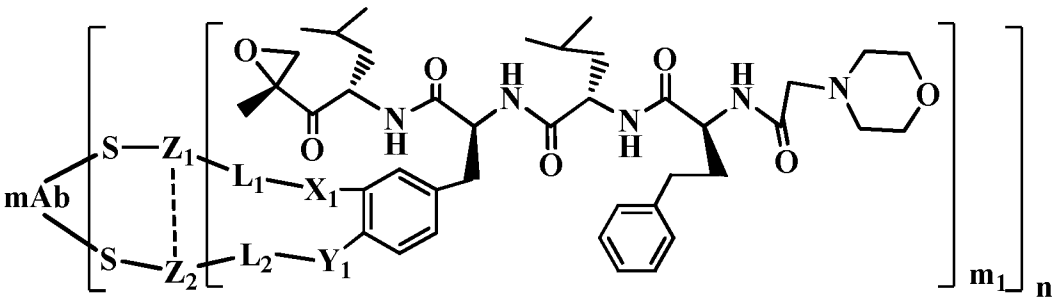
LB38 (конъюгат с аналогом кризотиниба),



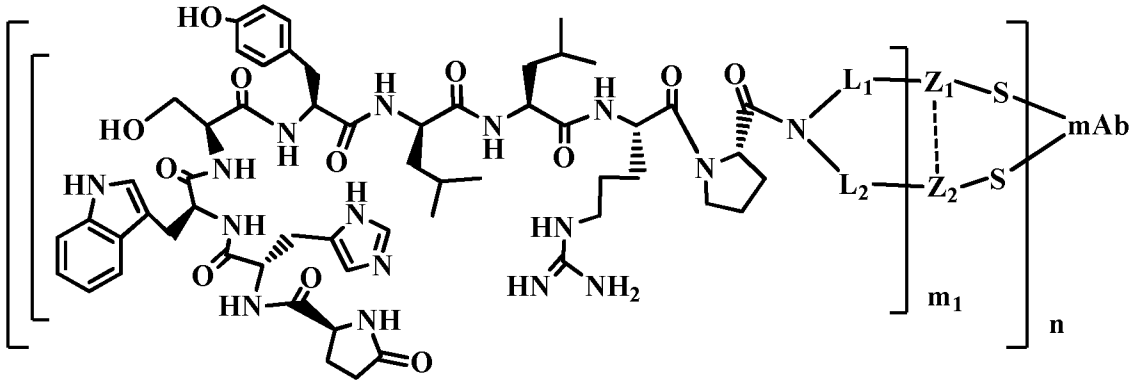
LB39 (конъюгат с аналогом бортезомиба), где Y_5 представляет собой N, CH, C(Cl), $C(CH_3)$ или $C(COOR_1)$; R_1 представляет собой H, C_1-C_6 алкил, C_3-C_8 Ar;



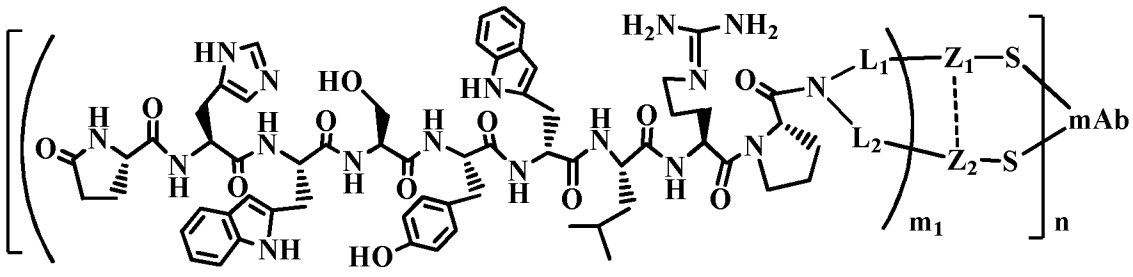
LB40 (конъюгат с аналогом карфилзомиба),



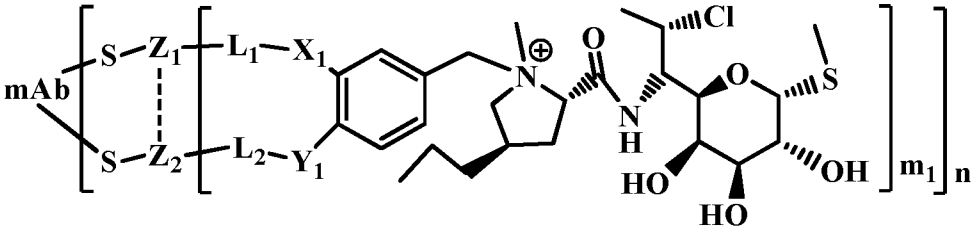
LB41 (конъюгат с аналогом карфилзомиба),



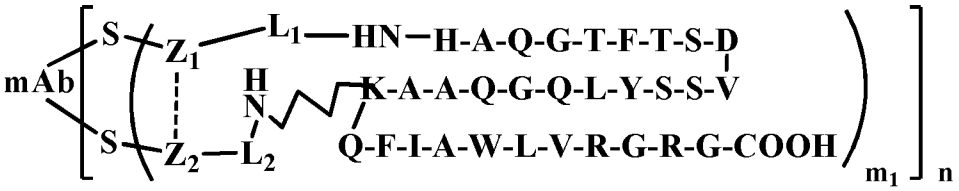
LB42 (конъюгат с аналогом лейпролида),



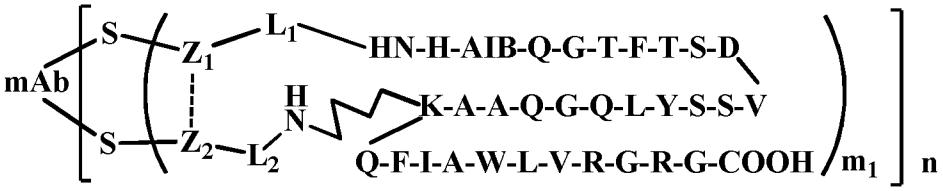
LB43 (конъюгат с аналогом трипторелина),



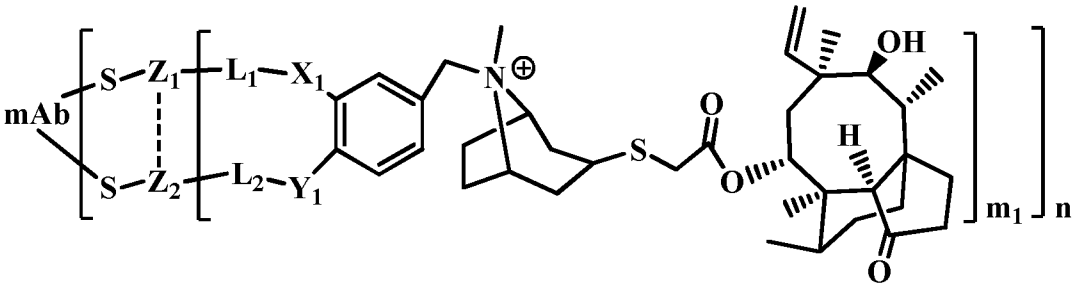
LB44 (конъюгат с клиндамицина),



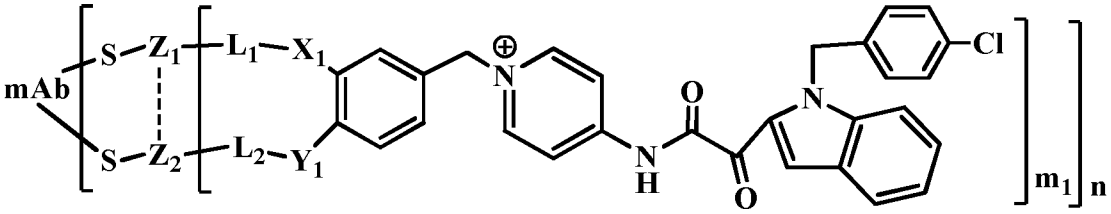
LB45 (конъюгат с аналогом лираглутида),



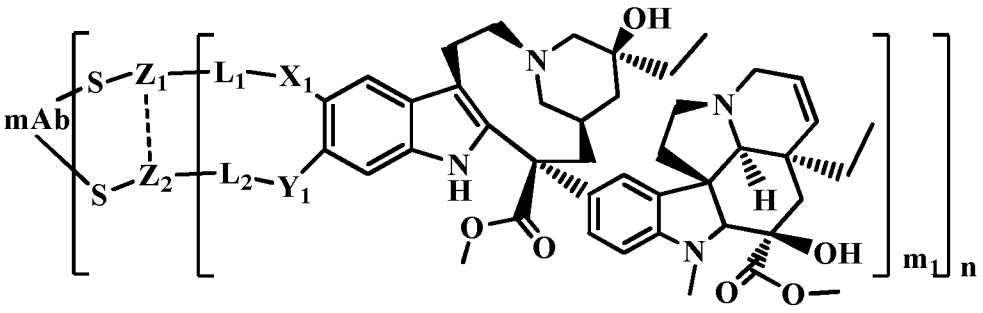
LB46 (конъюгат с аналогом семаглутида),



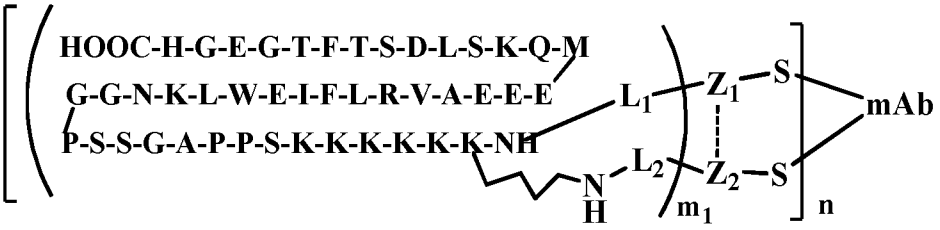
LB47 (конъюгат с аналогом ретапамулина),



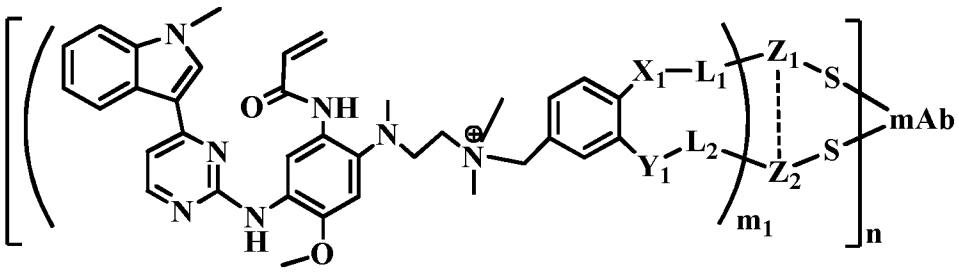
LB48 (конъюгат с аналогом инбулина),



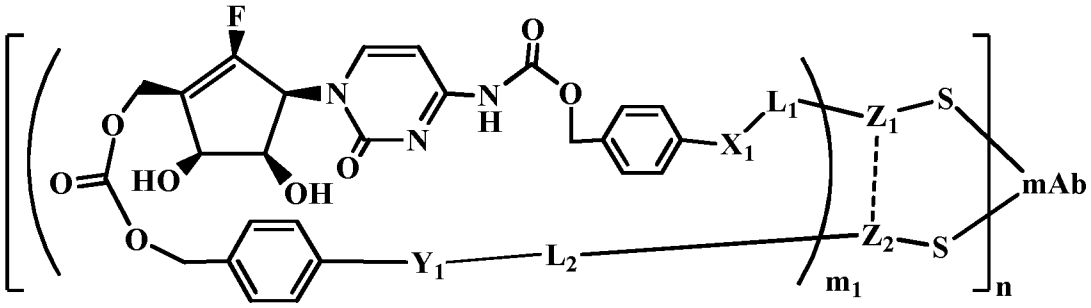
LB49 (конъюгат с аналогом винбластина),



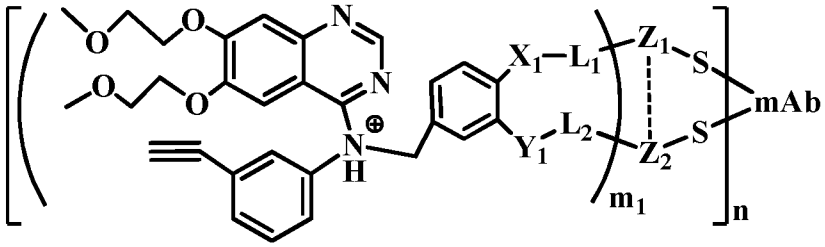
LB50 (конъюгат с аналогом ликсисенатида),



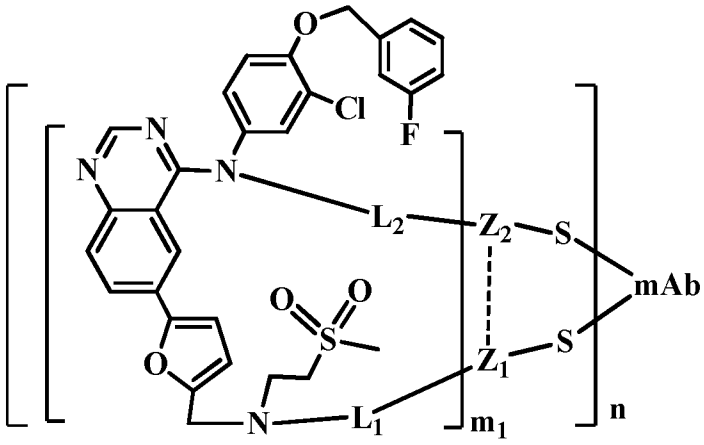
LB51 (конъюгат с аналогом осимертиниба),



LB52 (конъюгат с аналогом неуклеозида),



LB53 (конъюгат с аналогом эрлотиниба),

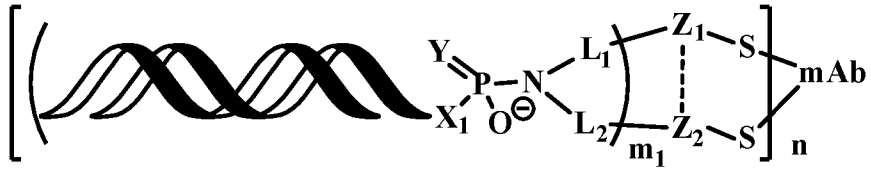


LB54 (конъюгат с аналогом лапатиниба),

где «▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, $CH_2C(O)NHNHC(O)$ и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; L_1, L_2, R_1, R_1', R_2, Z_1 и Z_2 являются таким, как определено в Формуле (I). X_3 представляет

собой CH_2, O, NH, NHC(O), NHC(O)NH, C(O), OC(O), OC(O)(NR_3), R_1, NHR_1, NR_1, C(O)R_1 или отсутствует ; X_4 представляет собой H, CH_2, OH, O, C(O), C(O)NH, C(O)N(R_1), R_1, NHR_1, NR_1, C(O)R_1 или C(O)O; X_5 представляет собой H, CH_3, F или Cl; M_1 и M_2 независимо представляют собой H, Na, K, Ca, Mg, NH_4, $NR_1R_2R_3$; R_6 представляет собой 5'-дезоксиаденозил, Me, OH или CN;

В еще одном варианте осуществления одна, две или более ДНК, РНК, мРНК, малые интерферирующие РНК (миРНК), микроРНК (микроРНК) и PIWI взаимодействующие РНК (пиРНК), предпочтительны для конъюгирования с молекулой, связывающейся с клеткой, через бис-линкер согласно настоящму патенту. Известно, что малые РНК (миРНК, микроРНК, пиРНК) и длинные некодирующие антисмысловые РНК ответственны за эпигенетические изменения в клетках (Goodchild, J (2011), Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 764: 1–15). ДНК, РНК, мРНК, миРНК, микроРНК или пиРНК в данном документе могут быть одно- или двуцепочечными с нуклеотидными единицами от 3 до 1 миллиона, и некоторые из этих нуклеотидов могут быть неприродными (синтетическими), например, как в олигонуклеотиде с фосфоротиоатной связью, например, в фомивирсене, или нуклеотиды могут быть связанными фосфоротиоатными связями, вместо фосфодиэфирных связей в природных РНК и ДНК, и фрагменты сахара представляют собой дезоксирибозу в средней части молекулы и 2'-О-метоксиэтилмодифицированную рибозу на двух концах, как, например, в мипомерсене, или олигонуклеотид, полученный из пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), морфолино, фосфоротиоата, тиофосфорамидата или с 2'-О-метоксиэтил (MOE), 2'-О-метил, 2'-фтор, блокированной нуклеиновой кислоты (LNA), или бициклическая нуклеиновая кислота (BNA) рибозного сахара, или нуклеиновые кислоты модифицированы для удаления 2'-3' углеродной связи в сахарном кольце (Whitehead, K. A.; et al (2011), *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2: 77–96; Bennett, C.F.; Swayze, E.E. (2010), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50: 259-29). Предпочтительно диапазон длины олигонуклеотидов составляет от около 8 до более 100 нуклеотидов. Пример структуры конъюгатов представлен ниже:

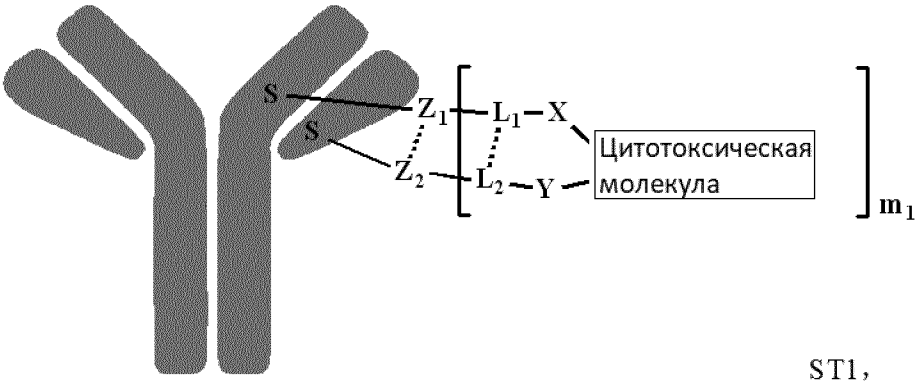


, SI-1

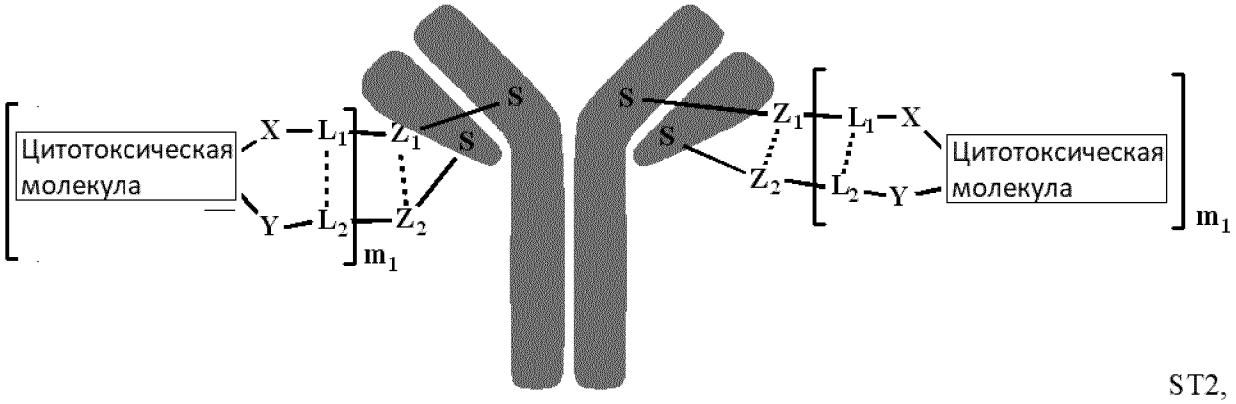
где mAb,m_1, n, X_1, L_1, L_2, Z_1, Z_2, «-----» являются такими, как определено в Формуле (I) или выше;  представляет собой одинарные или двойные цепи ДНК,

РНК, мРНК, миРНК, микроРНК или пиРНК; Y предпочтительно представляет собой O, S, NH или CH_2.

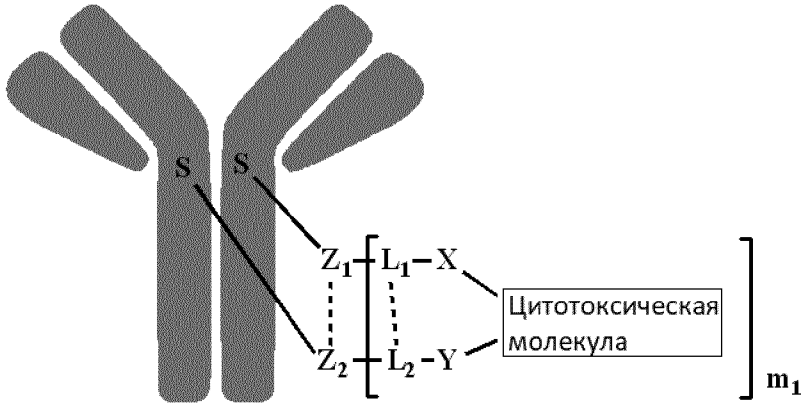
В еще одном варианте осуществления конъюгаты IgG-антитела, конъюгированные с одной, двумя или более различными по функциональности молекулами или лекарственными средствами, предпочтительно, специфически конъюгированы с парой тиолов (посредством восстановления дисульфидных связей) между легкой цепью и тяжелой цепью, верхней дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями и нижней дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями, как представлено в следующей структуре, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 или ST6:



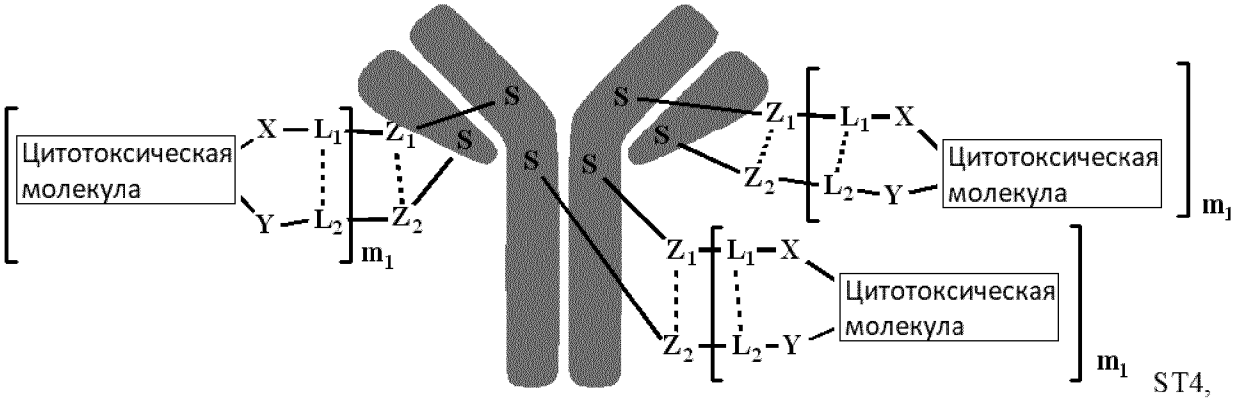
ST1,



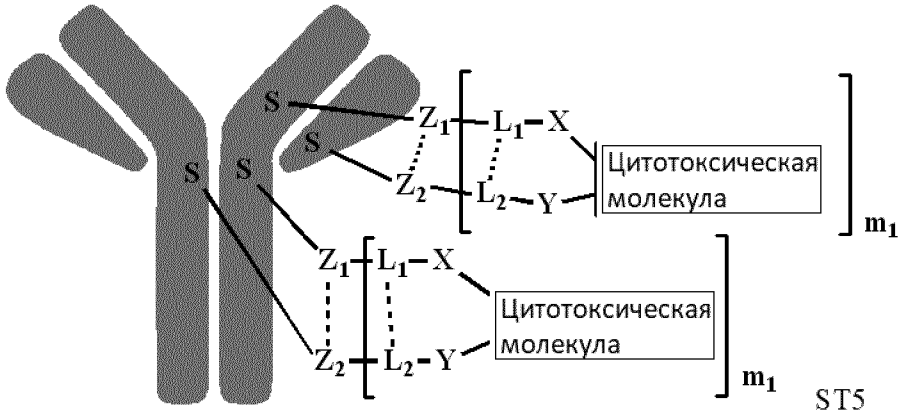
ST2,



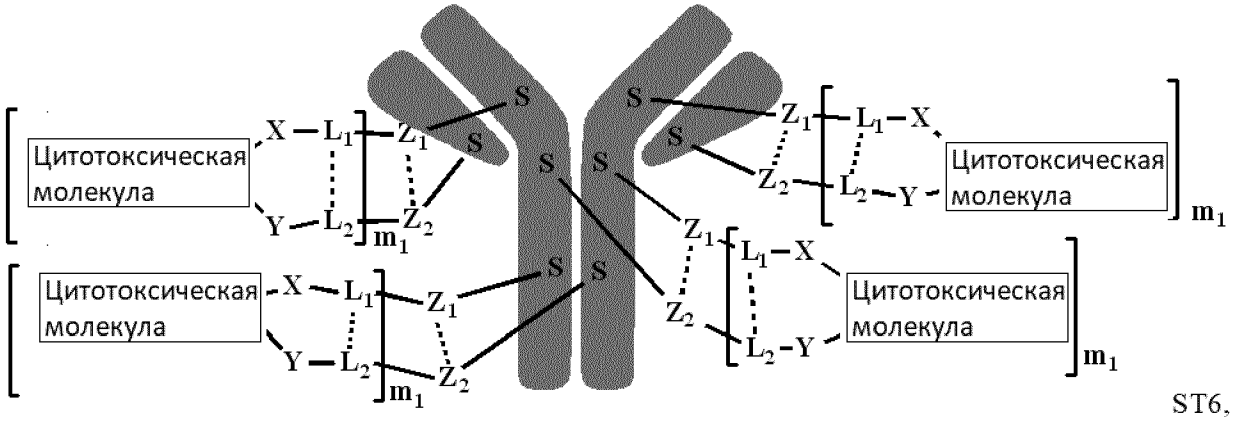
ST3,



ST4,



ST5



ST6,

где Z_1, Z_2, X, Y, L_1, L_2, «▬▬», m_1 и цитотоксическая молекула определяются так же, как X_1 в формуле (I) выше;

Кроме того, цитотоксические молекулы и m_1 в разных сайтах конъюгации молекулы, связывающейся с клеткой, могут отличаться, когда цитотоксические молекулы, содержащие одинаковые или разные бис-линкеры, последовательно конъюгируют с молекулой, связывающейся с клеткой, или когда разные цитотоксические молекулы, содержащие одни и те же или разные бис-линкеры добавляют поэтапно в реакционную смесь для конъюгации, содержащую связывающую клетки молекулу.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ И ПРИМЕНЕНИЕ

Конъюгаты заявки на патент составляются в жидком виде или пригодны для лиофилизации, и впоследствии восстанавливаются до жидкого состава. Жидкая композиция, содержащая 0,1 г/л ~ 300 г/л концентрации активного ингредиента конъюгата для доставки пациенту без высоких уровней агрегации антител, может включать один или более полиолов (например, сахаров), буферный агент с pH от 4,5 до 7,5 поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20 или 80), антиоксидант (например, аскорбиновая кислота и/или метионин), агент, регулирующий тоничность (например, маннит, сорбит или NaCl), хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры; консервант (например, бензиловый спирт) и/или свободную аминокислоту.

Подходящие буферные агенты для использования в составах включают, но не ограничиваются ими, соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; Трис, трометамин (трис(гидроксиметил)-аминометан) гидрохлорид или фосфатный буфер. Кроме того, аминокислотные компоненты также могут быть использованы в качестве буферного агента. Такой аминокислотный компонент включает без ограничения аргинин, глицин, глицилглицин и гистидин. Аргининовые буферы представляют собой буферы включающие ацетат аргинина, хлорид аргинина, фосфат аргинина, сульфат аргинина, сукцинат аргинина и т.д. В некоторых вариантах осуществления аргининовый буфер включает ацетат аргинина. Примеры гистидиновых буферов включают гистидин хлорид-аргинин хлорид, гистидин ацетат-аргинин ацетат, гистидин фосфат-аргинин фосфат, гистидин сульфат-аргинин сульфат, гистидин сукцинат-аргинин сукцинат и т.д. Составы буферов имеют pH от 4,5 до 7,5, предпочтительно от около 4,5 до около 6,5, более предпочтительно от около 5,0 до около 6,2. В некоторых вариантах осуществления концентрация солей органических кислот в буфере составляет от около 10 мМ до около 500 мМ.

«Полиол», который необязательно может быть включен в состав, представляет собой вещество с несколькими гидроксильными группами. Полиолы могут быть использованы в качестве стабилизирующих наполнителей и/или агентов изотоничности как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Полиолы могут защищать биофармацевтические препараты как от физического, так и от химического разложения. Преимущественно исключенные сорастворители увеличивают эффективное поверхностное натяжение растворителя на границе раздела белков, благодаря чему наиболее энергетически выгодные структурные конформации представляют собой структуры с наименьшей площадью поверхности. Полиолы включают сахара (восстанавливающие и невосстанавливающие сахара), сахарные спирты и сахарные кислоты. «Восстанавливающий сахар» представляет собой такой спирт, который содержит гемиацетальную группу, которая может восстанавливать ионы металлов или ковалентно реагировать с лизином и другими аминогруппами в белках, а «невосстанавливающий сахар» представляет собой такой, который не обладает этими свойствами восстанавливающего сахара. Примерами восстанавливающих сахаров являются фруктоза, манноза, мальтоза, лактоза, арабиноза, ксилоза, рибоза, рамноза, галактоза и глюкоза. Невосстанавливающие сахара включают сахарозу, трегалозу, сорбозу, мелезитозу и рафинозу. Сахарные спирты выбраны из маннита, ксилита, эритрита, мальтита, лактита, эритрита, треитола, сорбита и глицерина. Сахарные кислоты включают L-глюконат и его соли металлов. Предпочтительно невосстанавливающий сахар: сахароза или трегалоза в концентрации около от 0,01% до 15% выбирается в составе, где трегалоза предпочтительнее сахарозы из-за стабильности раствора трегалозы.

Поверхностно-активное вещество, необязательно в составах, выбирают из полисорбата (полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81, полисорбат 85 и тому подобное); полоксамер (например, полоксамер 188, поли(этиленоксид)-поли(пропиленоксид), полоксамер 407 или полиэтилен-полипропиленгликоль и тому подобное); Triton; додецилсульфат натрия (SDS); лаурисульфат натрия; октилгликозид натрия; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсульфобетаин; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарил-саркозин; линолеил-, миристил- или цетил-бетаин; лауроамидопропил-, кокамидопропил-, линолеамидопропил-, миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилбетаин (например, лауроамидопропил); миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилдиметиламин; метилкокоил- или динатрийметилолеилтаурат натрия; додецилбетаин, додецилдиметиламиноксид, кокамидопропилбетаин и кокоамфо глицинат;

и серии MONAQUAT ™ (например, изостеарилэтилимидония этосульфат); полиэтилгликоль, полипропилгликоль и сополимеры этилена и пропиленгликоля (например, Pluronics, PF68 и т. д.); и т.п. Предпочтительными поверхностно-активными веществами являются сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот, например полисорбат 20, 40, 60 или 80 (Твин 20, 40, 60 или 80). Концентрация поверхностно-активного вещества находится в диапазоне от 0,0001% до около 1,0%. В определенных вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества составляет от около 0,01% до около 0,1%. В одном варианте концентрация поверхностно-активного вещества составляет около 0,02%.

«Консервант», необязательно в составах, представляет собой соединение, которое существенно снижает бактериальное действие в нем. Примеры потенциальных консервантов включают в себя хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония (смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, в которой алкильные группы представляют собой длинноцепные соединения) и хлорид бензетония. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, такие как фенол, бутил и бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол. Консервант в состав включен в количестве менее чем 5%. Предпочтительно от 0,01 до 1%. В одном варианте осуществления консервант в данном документе представляет собой бензиловый спирт.

Подходящими свободными аминокислотами для необязательного использования в составе, но не ограничиваясь ими, являются аргинин, лизин, гистидин, орнитин, изолейцин, лейцин, аланин, глицин, глутаминовая кислота или аспарагиновая кислота. Включение основной аминокислоты является предпочтительным, то есть аргинина, лизина и/или гистидина. Если композиция включает гистидин, то он может действовать как в качестве буферного агента, так и в качестве свободной аминокислоты, но когда используется буфер гистидина, он обычно включает в себя свободную негистидиновую аминокислоту, например, гистидиновый буфер и лизин. Аминокислота может присутствовать в ее D- и/или L-форме, но L-форма является типичной. Аминокислота может присутствовать в виде любой подходящей соли, например, гидрохлоридной соли, такой как аргинин-HCl. Концентрация аминокислоты находится в диапазоне от 0,0001% до 15,0%. Предпочтительно от 0,01 до 5%.

Композиции могут необязательно содержать метионин или аскорбиновую кислоту в качестве антиоксиданта в концентрации от около 0,01 до 5 мг/мл; Композиции могут

необязательно содержать хелатообразующий агент, например, ЭДТА, ЭГТА и т. д., в концентрации около от 0,01 до 2 мМ.

Конечный состав можно довести до предпочтительного значения pH с помощью корректирующего агента (например, кислоты, такой как HCl, H_2SO_4, уксусной кислоты, H_3PO_4, лимонной кислоты и т. д., или основания, такого как NaOH, KOH, NH_3OH, этаноламина, диэтаноламина или триэтаноламина, фосфата натрия, фосфата калия, тринатрийцитрата, трометамина и т. д.), и состав следует поддерживать «изотоническим», что означает, что представляющий интерес состав по существу имеет такое же осмотическое давление как человеческая кровь. Изотонические составы будут в общем иметь осмотическое давление от около 250 до 350 мОсм. Изотоничность может быть измерена с использование осмометра давления паров или замерзания, например.

Другие вспомогательные вещества, которые могут быть использованы в жидком или лиофилизированном составе согласно заявке на патент, включают, например, фукозу, целлобиозу, мальтотриозу, мелибиозу, октулозу, рибозу, ксилит, аргинин, гистидин, глицин, аланин, метионин, глутаминовую кислоту, лизин, имидазол, глицилглицин, маннозилглицерат, тритон X-100, Pluoronic F-127, целлюлозу, циклодекстрин, декстран (10, 40 и/или 70 кДа), полидекстрозу, мальтодекстрин, фиколл, желатин, гидроксипропилметил, фосфат натрия, фосфат калия, $ZnCl_2$, цинк, оксид цинка, цитрат натрия, тринатрийцитрат, трометамин, медь, фибронектин, гепарин, человеческий сывороточный альбумин, протамин, глицерин, глицерин, ЭДТА, метакрезол, бензиловый спирт, фенол, многоатомные спирты или многоатомные спирты, гидрированные формы углеводов с карбонильной группой, восстановленной до первичной или вторичной гидроксильной группы.

Другие предполагаемые вспомогательные вещества, которые могут быть использованы в водных фармацевтических композициях, согласно заявке на патент, включают, например, ароматизаторы, антимикробные агенты, подсластители, антиоксиданты, антистатики, липиды, такие как фосфолипиды или жирные кислоты, стероиды, такие как холестерин, белковые вспомогательные вещества, такие как сывороточный альбумин (человеческий сывороточный альбумин), рекомбинантный человеческий альбумин, желатин, казеин, солеобразующие противоионы, такие как натрий и тому подобное. Эти и дополнительные известные фармацевтические вспомогательные вещества и/или добавки, подходящие для использования в составах согласно настоящему изобретению, известны в данной области техники, например, как указано в «The Handbook of Pharmaceutical Excipients», 4-^{e} издание, Rowe et al., Eds.,

American Pharmaceuticals Association (2003) и Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 21- e издание, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу приготовления состава, включающему стадии: (a) лиофилизации состава, содержащего конъюгаты, вспомогательные вещества и буферную систему, в порошок; и (b) восстановление лиофилизированной смеси со стадии (a) в среде для восстановления, так что восстановленный состав является стабильным. Состав на стадии (a) может дополнительно содержать стабилизатор и один или более вспомогательных веществ, выбранных из группы, включающей наполнитель, соль, поверхностно-активное вещество и консервант, как описано выше. В качестве восстанавливающих сред может быть использовано несколько разбавленных органических кислот или вода, т.е. стерильная вода, бактериостатическая вода для инъекций (BWFI). Среда для восстановления может быть выбрана из воды, то есть стерильной воды, бактериостатической воды для инъекций (BWFI) или группы, состоящей из уксусной кислоты, пропионовой кислоты, янтарной кислоты, хлорида натрия, хлорида магния, кислого раствора хлорида натрия, кислого раствора хлорида магния -и кислого раствора аргинина, в количестве от около 10 до около 250 мМ.

Жидкий фармацевтический состав конъюгатов согласно настоящей заявке на патент должен демонстрировать множество заранее определенных характеристик. Одной из основных проблем в жидких лекарственных препаратах является стабильность, поскольку белки/антитела имеют тенденцию образовывать растворимые и нерастворимые агрегаты в процессе производства и хранения. Кроме того, в растворе могут происходить различные химические реакции (дезамидирование, окисление, ограничение, изомеризация и т. д.), приводящие к повышению уровня продуктов разложения и/или потере биологической активности. Предпочтительно, конъюгат в жидкой форме или в форме лиофилизата должен иметь срок годности более 18 месяцев при 25 °C. Более предпочтительный конъюгат в жидкой форме или в форме лиофилизата должен иметь срок годности более 24 месяцев при 25 °C. Наиболее предпочтительный жидкий состав должен демонстрировать срок годности около 24–36 месяцев при 2–8 °C, а состав лиофилизата должен демонстрировать срок годности примерно предпочтительно до 60 месяцев при 2–8 °C. Как жидкие, так и лиофилизированные составы должны демонстрировать срок годности при хранении не менее двух лет при -20 °C или -70 °C.

В некоторых вариантах осуществления состав является стабильным после замораживания (например, -20 °C или -70 °C) и оттаивания состава, например, после 1, 2

или 3 циклов замораживания и оттаивания. Стабильность может быть оценена качественно и/или количественно различными способами, включая оценку соотношения лекарственное средство/антитело (белок) и образование агрегатов (например, с использованием УФ, эксклюзионной хроматографии, путем измерения мутности и/или визуальным контролем) ; путем оценки неоднородности заряда с помощью катионообменной хроматографии, изоэлектрического капиллярного фокусирования изображения (icIEF) или капиллярного зонного электрофореза; анализ аминоконцевой или карбоксиконцевой последовательности; масс-спектрометрический анализ или матричная лазерная десорбционная ионизация/времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI/TOF MS) или HPLC-MS/MS; SDS-PAGE анализ для сравнения восстановленного и интактного антитела; анализ пептидной карты (например, триптический или LYS-C); оценка биологической активности или антигенсвязывающей функции антитела; и т.п.
Нестабильность может включать в себя одно или несколько из: агрегации, дезамидирования (например, Asn дезамидирование), окисление (например, окисление Met), изомеризации (например, изомеризаци Asp), отсечение / гидролиз / фрагментация (например, фрагментация шарнирной области), образование сукцинимида, неспаренный цистеин (ы), удлинение N-конца, обработка С-конца, различия гликозилирования, и т.п.
Стабильный конъюгат также должен «сохранять свою биологическую активность» в фармацевтической композиции, если биологическая активность конъюгата в данный момент времени, например, в течение 12 месяцев, в пределах около 20%, предпочтительно около 10% (в пределах ошибок анализа) биологической активности, проявляемой в то время, когда фармацевтическую композицию готовили, определяли, например, в анализе связывания антигена и/или в анализе цитотоксичности in vitro.

Фармацевтический контейнер или сосуд используют для хранения фармацевтического состава любого из конъюгатов согласно заявке на патент. Емкость представляет собой флакон, бутылку, предварительно заполненный шприц или предварительно заполненный шприц с автоинжектором.

Для клинического применения in vivo конъюгат через бис-связь по изобретению будет поставляться в виде растворов или в виде лиофилизированного твердого вещества, которое может быть повторно растворено в стерильной воде для инъекций. Примеры подходящих протоколов введения конъюгата следующие. Конъюгаты вводят ежедневно, еженедельно, раз в две недели, три раза в неделю, один раз каждые четыре недели или ежемесячно в течение 8 ~ 54 недель в виде внутривенного болюса. Болюсные дозы

вводятся в количестве от 50 до 1000 мл физиологического раствора, к которому необязательно может быть добавлен человеческий сывороточный альбумин (например, от 0,5 до 1 мл концентрированного раствора человеческого сывороточного альбумина, 100 мг/мл). Дозы будут составлять около от 50 мкг до 20 мг/кг от массы тела в неделю, в/в. (в диапазоне от 10 мкг до 200 мг/кг на инъекцию) Через 4 ~ 54 недели после лечения пациент может пройти второй курс лечения. Клиницисты могут определить конкретные клинические протоколы в отношении пути введения, вспомогательных веществ, разбавителей, дозировок, времени и т. д.

Примеры медицинских состояний, которые можно лечить в соответствии со способами уничтожения выбранных клеточных популяций in vivo или ex vivo, включают злокачественные новообразования любых типов рака, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата и инфекции (вирусные, бактериальные или паразитические).

Количество конъюгата, которое требуется для достижения желаемого биологического эффекта, будет варьироваться в зависимости от ряда факторов, включая химические характеристики, активность и биодоступность конъюгатов, тип заболевания, вид, к которому относится пациент, состояние болезни пациента, путь введения, все факторы, которые диктуют необходимые количества дозы, доставку и режим для введения.

В общих чертах, конъюгаты через бис-линкеры по настоящему изобретению могут быть предоставлены в водном физиологическом буферном растворе, содержащем 0,1-10% масс./об. конъюгатов для парентерального введения. Типичные диапазоны доз составляют от 1 мкг/кг до 0,1 г/кг массы тела в день; еженедельно, раз в две недели, раз в три недели или в месяц, предпочтительный диапазон доз составляет от 0,01 мг/кг до 20 мг/кг массы тела, еженедельно, раз в две недели или раз в месяц, эквивалентная доза для человека. Предпочтительная дозировка лекарственного средства, которая должна вводиться, вероятно, зависит от таких переменных, как тип и степень прогрессирования заболевания или расстройства, общее состояние здоровья конкретного пациента, относительная биологическая эффективность выбранного соединения, состав соединения, путь введения (внутривенно, внутримышечно или др.), фармакокинетические свойства конъюгатов по выбранному пути доставки, а также скорость (болюс или непрерывная инфузия) и график введения (количество повторений за определенный период времени).

Конъюгаты через линкеры по настоящему изобретению также можно вводить в единичных дозированных формах, где термин «единичная доза» означает однократную дозу, которую можно вводить пациенту и которую можно легко обрабатывать и упаковывать, оставаясь в виде физически и химически стабильной стандартной дозы,

содержащей либо сам активный конъюгат, либо в виде фармацевтически приемлемой композиции, как описано ниже. Таким образом, типичные суммарные суточные/еженедельные/раз в две недели/месячные дозы составляют от 0,01 до 100 мг/кг массы тела. В качестве общего руководства, стандартные дозы для людей варьируются от 1 мг до 3000 мг в день или в неделю, в течение двух недель (раз в две недели), три недели или в месяц. Предпочтительно диапазон стандартных доз составляет от 1 до 500 мг, вводимых от одного до четырех раз в месяц, и еще более предпочтительно от 1 до 100 мг, один раз в неделю или один раз в две недели или один раз в три недели. Конъюгаты, представленные в настоящем документе, могут быть составлены в фармацевтические композиции путем смешивания с одним или более фармацевтически приемлемыми наполнителями. Такие композиции с единичной дозой могут быть приготовлены для применения пероральным введением, особенно в форме таблеток, простых капсул или мягких гелевых капсул; или интраназально, особенно в форме порошков, капель для носа или аэрозолей; или кожно, например, местно в виде мазей, кремов, лосьонов, гелей или спреев или через трансдермальные пластыри.

В еще одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество конъюгата Формулы (II) и любых конъюгатов, описанных в настоящей патентной заявке, может быть введена одновременно с другими терапевтическими агентами, такими как химиотерапевтический агент, лучевая терапия, иммунотерапевтические агенты, агенты аутоиммунного расстройства, антиинфекционные агенты или другие конъюгаты для синергетически эффективного лечения или профилактики рака, или аутоиммунного заболевания, или инфекционного заболевания. Синергетические агенты предпочтительно выбраны из одного или более следующих лекарственных средств: абатацепт (Оренсия), абиратерона ацетат (Zytiga®), абраксан, ацетаминофен / гидрокодон, адалимумаб, афатиниб дималеат (Gilotrif®), алектиниб (Alecensa), алемтузумаб (Campath®), алитретиноин (Panretin®), адо-трастузумаб эмтанзин (Kadcyla™), смешанные соли амфетамина (амфетамин/ декстроамфетамин или адерал XR), анастрозол (Arimidex®), арипипразол, атазанавир, атезолизумаб (Tecentriq, MPDL3280A), аторвастатин, акситиниб (Inlyta®), AZD9291, белиностат (Beleodaq™), бевацизумаб (Avastin®), бортезомиб (PS-341; Velcade, Neomib, Bortecad), кабазитаксель (evtana®), кабозантиниб (Cometriq™), бексаротен (Targretin®), блинатумомаб (Blincyto™), бортезомиб (Velcade®), бозутиниб (Bosulif®), брентуксимаб ведотин (Adcetris®), будезонид, будезонид/формотерол, бупренорфин, капецитабин, карфилзомиб (Kyprolis®), целекоксиб, церитиниб (LDK378/Zykadia), цетуксимаб (Erbitux®), циклоспорин,

цинакальцет, кризотиниб (Xalkori®), кобиметиниб (Cotellic), дабигатран, дабрафениб (Tafinlar®), даратумумаб (Darzalex), дарбэпоэтин альфа, дарунавир, иматиниба мезилат (Gleevec®), дазатиниб (Sprycel®), денилейкин-дифтитокс (Ontak®), деносумаб (Xgeva®), депакот, дексаметазон, декслансопразол, дексметилфенидат, динутуксимаб (Unituxin™), доксициклин, дулоксетин, дурвалумаб (MEDI4736), элотузумаб (Empliciti), эмтрицитабин / рилпивирин / тенофовира дизопроксилфумарат, эмтрицитабин / тенофовир / эфавиренз, эноксапарин, энзалутамид (Xtandi®), эпоэтин альфа, эрлотиниб (Tarceva®), эзомепразол, эсзопиклон, этанерцепт, эверолимус (Afinitor®), эксеместан (Aromasin®), эверолимус (Afinitor®), эзетимиб, эзетимиб / симвастатин, фенофибрат, филграстим, финголимод, флутиказона пропионат, флутиказон / сальметерол, фулвестрант (Faslodex®), гефинитиб (Iressa®), глатирамер, гозерелин ацетат (Zoladex), икотиниб, иматиниб (Gleevec), ибритутомаб тиуксетан (Zevalin®), ибрутиниб (Imbruvica™), иделалисиб (Zydelig®), инфликсимаб, инипариб, инсулин аспарт, инсулин детемир, инсулин гларгин, инсулин лизпро, интерферон бета−1a, интерферон бета-1b, лапатиниб (Tykerb®), ипилимумаб (Yervoy®), ипратропия бромид / сальбутамол, иксазомиб (Ninlaro®), ланреотид ацеатат (Somatuline® Depot), леналиомид (Revlimid®), ленватиниб (Lenvima™) летрозол (Femara®), левотироксин, левотироксин, лидокаин, линезолид, лираглутид, лиздексамфетамин, MEDI4736 (AstraZeneca, Celgene), мемантин, метилфенидат, метопролол, модафинил, мометазон, нецитумумаб (Portrazza), нилотиниб (Tasigna®), нирапариб, ниволумаб (Opdivo®), офатумумаб (Arzerra®), обинутузумаб (Gazyva™), олапариб (Lynparza™), олмесартан, олмесартан / гидрохлоротиазид, омализумаб, этиловые эфиры омега-3 жирных кислот, осельтамивир, озимертиниб (или мерелетиниб, Tagrisso), оксикодон, палбоциклиб (Ibrance®), паливизумаб, панитумумаб (Vectibix®), панобиностат (Farydak®), пазопаниб (Votrient®), пембролизумаб (Keytruda®), пеметрексед (Alimta), пертузумаб (Perjeta™), конъюгированная пневмококковая вакцина, помалидомид (Pomalyst®), прегабалин, пропранолол, кветиапин, рабепразол, хлорид радия 223 (Xofigo®), ралоксифен, ралтегравир, рамуцирумаб (Cyramza®), ранибизумаб, регорафениб (Stivarga®), ритуксимаб (Rituxan®), ривароксабан, ромидепсин (Istodax®), розувастатин, руксолитиниб фосфат (Jakafi™), сальбутамол, севеламер, силденафил, силтуксимаб (Sylvant™), ситаглиптин, ситаглиптин/метформин, солифенацин, сонидегиб (LDE225, Odomzo), сорафениб (Nexavar®), сунитиниб (Sutent®), тадалафил, тамоксифен, телапревир, талазопариб, темсиролимус (Torisel®), тенофовир/эмтрицитабин, тестостерон гель, талидомид (Immunoprin, Talidex), тиотропия бромид, торемифен (Fareston®), траметиниб (Mekinist®), трастузумаб, трабектидин (эктеинасцидин 743, Yondelis),

трифлуридин/типирацил (Lonsurf, TAS-102), третиноин (Vesanoid®), устекинумаб, валсартан, велипариб, вандетаниб (Caprelsa®), вемурафениб (Zelboraf®), венетоклакс (Venclexta), вориностат (Zolinza®), зив-афлиберцепт (Zaltrap®), зоставакс, и их аналоги, производные, фармацевтически приемлемые соли, носители, разбавители или их вспомогательные вещества, или комбинация вышеуказанного.

Лекарственные средства/цитотоксические агенты, используемые для конъюгирования через мостиковый линкер согласно настоящему патенту, могут представлять собой любые аналоги и/или производные лекарственных средств/молекул, описанных в настоящем патенте. Специалист в области лекарственных средств/цитотоксических агентов легко поймет, что каждое из лекарственных средств/цитотоксических агентов, описанных в настоящем документе, может быть модифицировано таким образом, что получающееся в результате соединение все еще сохраняет специфичность и/или активность исходного соединения. Специалист в данной области техники также поймет, что многие из этих соединений могут быть использованы вместо лекарственных средств/цитотоксических агентов, описанных в данном документе. Таким образом, лекарственные средства/цитотоксические агенты согласно настоящему изобретению включают аналоги и производные соединений, описанных в данном документе.

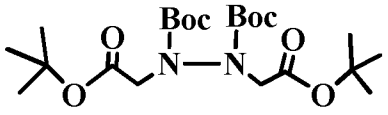
Все ссылки, цитируемые в данном документе и в следующих примерах, непосредственно включены в качестве ссылки во всей их полноте.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение далее описано в следующих примерах, которые не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Клеточные линии, описанные в следующих примерах, поддерживали в культуре в соответствии с условиями, определенными Американской коллекцией типовых культур (ATCC) или Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Брауншвейг, Германия (DMSZ), или Шанхайским институтом клеточной культуры Китайской академии науки, если не указано иное. Реагенты для клеточных культур были получены от Invitrogen Corp., если не указано иное. Все безводные растворители были получены коммерчески и хранились в герметичных склянках под азотом. Все остальные реагенты и растворители были приобретены наивысшего качества и использованы без дальнейшей очистки. Разделение препаративной ВЭЖХ проводили с помощью Varain PreStar HPLC. Спектры ЯМР регистрировали на приборе Varian Mercury 400 МГц. Химические сдвиги (.дельта.) представлены в частях на миллион (ч/млн) по отношению к тетраметилсилану при 0,00, а константы взаимодействия (J) указаны в Гц. Данные масс-спектров были получены на

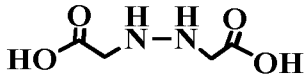
масс-спектрометре Waters Xevo QTOF, оборудованном модулем разделения Waters Acquity UPLC и детектором Acquity TUV.

Пример 1. Синтез ди-трет-бутил 1,2-бис(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)гидразин-1,2-дикарбоксилата.



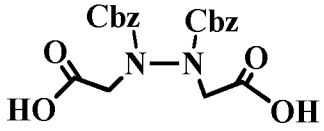
К ди-трет-бутил гидразин-1,2-дикарбоксилату (8,01 г, 34,4 ммоль) в ДМФА (150 мл) добавляли NaH (60% в масле, 2,76 г, 68,8 ммоль). После перемешивания при к.т. в течение 30 минут, добавляли трет-бутил 2-бромацетат (14,01 г, 72,1 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, добавляли дополнительное количество метанола (3 мл), упаривали, разбавляли EtOAc (100 мл) и водой (100 мл), разделяли, и водный слой экстрагировали EtOAc (2 x 50 мл). Органические слои объединяли, сушили над $MgSO_4$, фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (EtOAc/Гексан от 1:5 до 1:3) с получением указанного в заголовке соединения (12,98 г 82% выход) в виде бесцветного масла. ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{22}H_{41}N_2O_8$ $[M+H]^+$ 461,28, найдено 461,40.

Пример 2. Синтез 2,2'-(гидразин-1,2-диил)диуксусной кислоты.



К ди-трет-бутил 1,2-бис(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)гидразин-1,2-дикарбоксилату (6,51 г, 14,14 ммоль) в 1,4-диоксане (40 мл) добавляли HCl (12 M, 10 мл). Смесь перемешивали в течение 30 минут, разбавляли диоксаном (20 мл) и толуолом (40 мл), упаривали и совместно упаривали с диоксаном (20 мл) и толуолом (40 мл) досуха с получением неочищенного указанного в заголовке продукта для следующей стадии без дальнейшей очистки (2,15 г, 103% выход, ~93% чистота). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_4H_9N_2O_4$ $[M+H]^+$ 149,05, найдено 149,40.

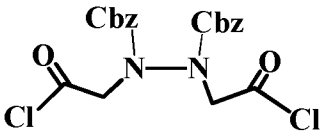
Пример 3. Синтез 2,2'-(1,2-бис((бензилокси)карбонил)гидразин-1,2-диил)диуксусной кислоты.



К раствору 2,2'-(гидразин-1,2-диил)диуксусной кислоты (1,10 г, 7,43 ммоль) в смеси ТГФ (200 мл) и NaH_2PO_4 (0,1 M, 250 мл, pH 8,0) 4 порциями добавляли бензилкарбонохлоридат (5,01 г, 29,47 ммоль) в течение 2 часов. Смесь перемешивали в

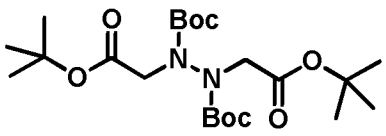
течение еще 6 часов, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя смесью H_2O/CH_3CN (1:9), содержащей 1% муравьиную кислоту, с получением указанного в заголовке соединения (2,26 г, 73% выход, ~95% чистота). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{20}H_{21}N_2O_8$ $[M+H]^+$ 417,12, найдено 417,40.

Пример 4. Синтез дибензил 1,2-бис(2-хлор-2-оксоэтил)гидразин-1,2-дикарбоксилата.



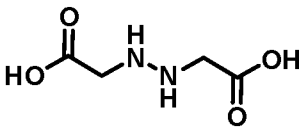
К 2,2'-(1,2-бис((бензилокси)карбонил)гидразин-1,2-диил)диуксусной кислоте (350 мг, 0,841 ммоль) в дихлорэтане (30 мл) добавляли $(COCl)_2$ (905 мг, 7,13 ммоль), затем добавляли 0,030 мл ДМФ. После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 часов, смесь разбавляли толуолом, упаривали и совместно упаривали с дихлорэтаном (2 x 20 мл) и толуолом (2 x 15 мл) досуха с получением указанного в заголовке неочищенного продукта (который является нестабильным) для следующей стадии без дальнейшей очистки (365 мг, 96% выход). ЭСИ МС m/z вычислено для $C_{20}H_{19}Cl_2N_2O_6$ $[M+H]^+$ 453,05, найдено 453,50.

Пример 5. Синтез ди-трет-бутил 1,2-бис(2-(*трет*-бутокси)-2-оксоэтил)гидразин-1,2-дикарбоксилата.



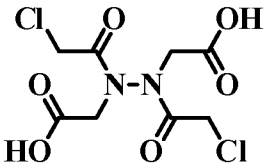
К суспензии NaH (0,259 г, 6,48 ммоль 3.0 экв.) в безводном ДМФА (2 мл) при комнатной температуре добавляли ди-трет-бутилгидразин-1,2-дикарбоксилат (0,50 г, 2,16 ммоль 1,0 экв.) в безводном ДМФА (8 мл) в течение 10 минут в атмосфере азота. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут, а затем охлаждали до 0 °C. К смеси по каплям добавляли трет-бутил 2-бромацетат (1,4 мл, 8,61 ммоль, 4,0 экв.). Полученную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Добавляли насыщенный раствор хлорида аммония (100 мл). Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали EtOAc (3 × 50 мл). Объединенный органический раствор промывали водой и насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (10:1 смесь изомеров гексана/ EtOAc) с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (0,94 г, 99.6% выход). ЭСИ МС m/z $[M+Na]^+$ 483,4.

Пример 6. Синтез 2,2'-(гидразин-1,2-диил)диуксусной кислоты.



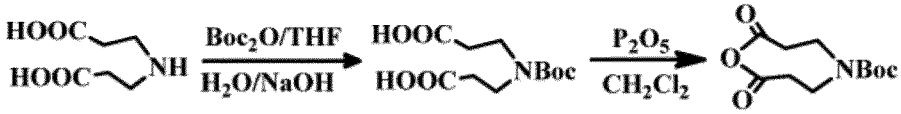
К раствору ди-трет-бутил 1,2-бис(2-(*трет*-бутокси)-2-оксоэтил)гидразин-1,2-дикарбоксилата (0,94 г, 2,04 ммоль) в ДХМ (4 мл) при 0 °C добавляли ТФК (4 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут, а затем нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи . Смесь упаривали, разбавляли ДХМ и упаривали. Данную операцию повторяли три раза с получением белого твердого вещества. Растирали с ДХМ и белое твердое вещество отфильтровывали (0,232 г, 76,8% выход). ЭСИ МС m/z $[M+H]^+$ 149,2.

Пример 7. Синтез 2,2'-(1,2-бис(2-хлорацетил)гидразин -1,2-диил)диуксусной кислоты.



К раствору 2,2'-(гидразин-1,2-диил)диуксусной кислоты (0,232 г, 1,57 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ТГФ (10 мл) при 0 °C добавляли 2-хлорацетилхлорид (0.38 мл, 4,70 ммоль 3,0 экв.) в течение 10 минут. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи, и упаривали. Остаток трижды совместно упаривали с ТГФ с получением белого твердого вещества (0,472 г, теоретический выход). ЭСИ МС m/z $[M+H]^+$ 301,1.

Пример 8. Синтез трет-бутил 2,8-диоксо-1,5-оксазокан-5-карбоксилата.

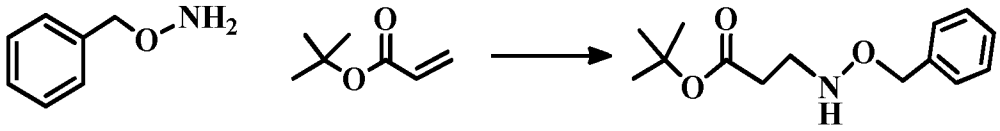


К раствору 3,3'-азандиилдипропановой кислоты (10,00 г, 62,08 ммоль) в 1,0 М NaOH (300 мл) при 4 °C добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (22,10 г, 101,3 ммоль) в 200 мл ТГФ в течение 1 часа. После добавления, смесь перемешивали в течение 2 часов при 4 °C. Смесь осторожно подкисляли до pH ~4 с помощью 0,2 М H_3PO_4, упаривали при пониженном давлении, экстрагировали CH2Cl2, сушили над Na2SO4, упаривали и очищали с помощью флэш-хроматографии на SiO2, элюируя AcOH/MeOH/CH_2Cl_2 (0,01:1:5) с получением 3,3'-((трет-бутоксикарбонил)азандиил)дипропановой кислоты (13,62 г, 84% выход). ЭСИ МС m/z $C_{11}H_{19}NO_6$ $[M+H]^+$, рассчит. 262,27, найдено 262,40.

К раствору 3,3'-((трет-бутоксикарбонил)азандиил)дипропановой кислоты (8,0 г, 30,6 ммоль) в CH_2Cl_2 (500 мл) при 0 °C добавляли оксид фосфора (8,70 г, 61,30 ммоль). Смесь

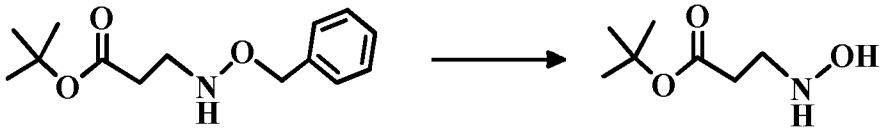
перемешивали при 0 °C в течение 2 часов, а затем при к.т. в течение 1 часа, фильтровали через небольшую колонку с SiO_2 и колонку промывали EtOAc/CH_2Cl_2 (1:6). Фильтрат упаривали и растирали с EtOAc/гексан с получением указанного в заголовке соединения (5,64 г, 74% выход). ЭСИ МС m/z $C_{11}H_{17}NO_5$ $[M+H]^+$, рассчит. 244,11, найдено 244,30.

Пример 9. Синтез трет-бутил 3-((бензилокси)амино)пропаноата.



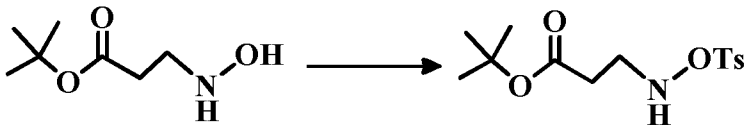
К O-бензилгидроксиламин гидрохлориду (10,0 г, 62,7 ммоль) в ТГФ (100 мл) добавляли Et_3N (15 мл) и трет-бутилакрилат (12,1 г, 94,5 ммоль). Смесь нагревали до кипения с обратным холодильником в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя смесью EtOAc/гексан (1:4) с получением указанного в заголовке соединения 3 (13,08 г, 83% выход). 1H ЯМР ($CDCl_3$) 7,49~7,25 (м, 5H), 4,75 (с, 2H), 3,20 (т, J=6,4Гц, 2H), 2,54 (т, J=6,4Гц, 2H), 1,49 (с, 9H); МС ЭСИ m/z+ $C_{14}H_{21}NNaO_3$ (M+Na), рассч. 274,15, найдено 274,20.

Пример 10. Синтез трет-бутил 3-(гидроксиамино)пропаноата.



К трет-бутил 3-((бензилокси)амино)пропаноату (13,0 г, 51,76 ммоль) в метаноле (100 мл) добавляли Pd/C (0,85 г, 10%Pd, 50% влажности) в сосуде для гидрирования. После того как систему эвакуировали в вакууме и подсоединяли к газообразному водороду под 2 атм, реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Неочищенную реакционную смесь пропускали через слой целита, промывая этанолом, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя смесью MeOH/ДХМ (1:10~1:5) с получением указанного в заголовке соединения (7,25 г, 87% выход). 1H ЯМР ($CDCl_3$) 3,22 (т, J=6,4 Гц, 2H), 2,55 (т, J=6,4Гц, 2H), 1,49 (с, 9H); МС ЭСИ m/z+ $C_7H_{15}NNaO_3$ (M+Na), рассч. 184,10, найдено 184,30.

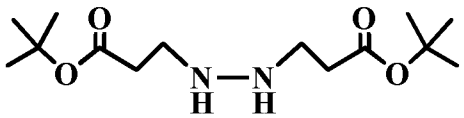
Пример 11. Синтез трет-бутил 3-((тозилокси)амино)пропаноата.



К трет-бутил 3-(гидроксиамин)пропионата (5.10 г, 31.65 ммоль) в смеси ДХМ (50 мл) и пиридина (20 мл) добавляли хлорид тозилата (12,05 г, 63,42) при 4 °C. После добавления, смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали и

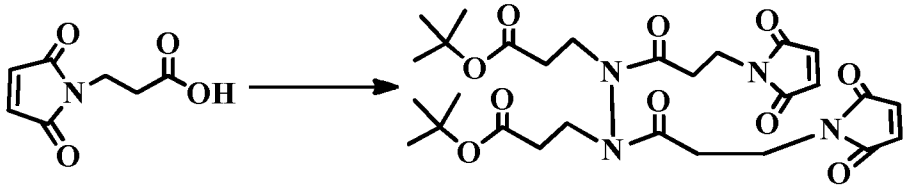
очищали на колонке с SiO_2, элюируя EtOAc/ДХМ (1:10~1:6) с получением указанного в заголовке соединения (8,58 г, 86% выход). 1H ЯМР ($CDCl_3$) 7,81 (с, 2H), 7,46 (с, 2H), 3,22 (т, J=6,4Гц, 2H), 2.55 (т, J=6,4Гц, 2H), 2,41 (с, 3H), 1,49 (с, 9H); МС ЭСИ m/z+ $C_{14}H_{21}NNaO_5S$ (M+Na), рассчит. 338,11, найдено 338,30.

Пример 12. Синтез трет-бутил 3,3'-(гидразин-1,2-диил)дипропаноата.



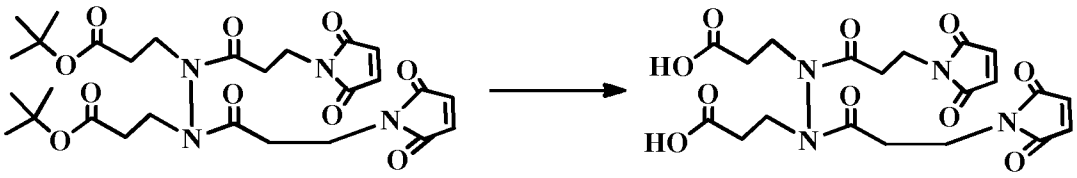
Трет-бутил 3-аминопропаноата (3,05 г, 21.01 ммоль) в ТГФ (80 мл) добавляли трет-бутил 3-((тозилокси)амино)пропаноат (5,10 г, 16,18 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, а затем при 45 °C в течение 6 часов. Смесь упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя CH_3OH/ДХМ/Et_3N (1:12:0,01~1:8:0,01) с получением указанного в заголовке соединения (2,89 г, 62% выход). МС ЭСИ m/z+ $C_{14}H_{28}N_2NaO_4$ (M+Na), рассчит. 311,20, найдено 311,40.

Пример 13. Синтез ди-трет-бутил 3,3'-(1,2-бис(3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропаноил)гидразин-1,2-диил)дипропаноата.



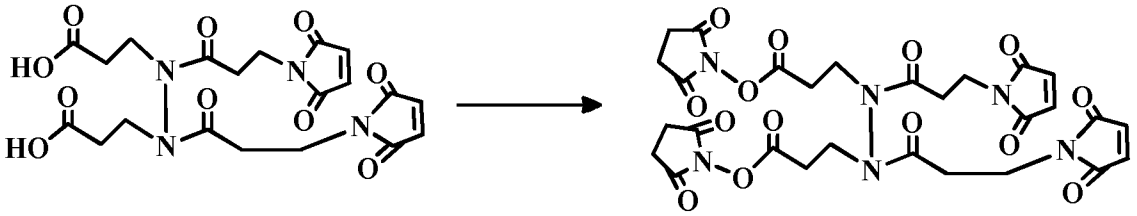
К 3-малеидопропановой кислоте (1.00 г, 5,91 ммоль) в ДХМ (50 мл) добавляли оксалилхлорид (2,70 г, 21.25 ммоль) и ДМФ (50 мкл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, упаривали и совместно упаривали со смесью ДХМ/толуол с получением неочищенного хлорида 3-малеидопропановой кислоты. К соединению ди-трет-бутил 3,3'-(гидразин-1,2-диил)дипропаноата (0,51 г, 1,76 ммоль) в смеси ДХМ (35 мл) добавляли неочищенный хлорид 3-малеидопропановой кислоты. Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали, концентрировали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя EtOAc/ДХМ (1:15~1:8) с получением указанного в заголовке соединения (738 мг, 71% выход). МС ЭСИ m/z+ $C_{28}H_{38}N_4NaO_{10}$ (M+Na), рассчит. 613,26, найдено 613,40.

Пример 14. Синтез 3,3'-(1,2-бис(3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропаноил)гидразин-1,2-диил)дипропановой кислоты.



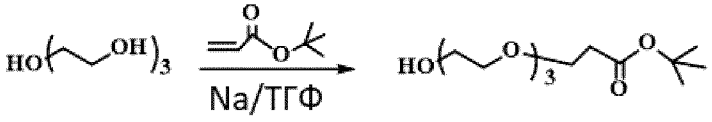
К соединению 14 (700 мг, 1.18 ммоль) в диоксане (4 мл) добавляли HCl (конц. 1 мл). Смесь перемешивали в течение 30 минут, разбавляли EtOH (10 мл) и тоуолом (10 мл), упаривали и совместно упаривали с EtOH (10 мл) и толуолом (10 мл) с получением неочищенного указанного в заголовке продукта (560 мг) для следующей стадии без дополнительной очистки. МС ЭСИ m/z- $C_{20}H_{21}N_4O_{10}$ (M-H), рассч. 477,13, найдено 477,20.

Пример 15. Синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-3,3'-(1,2-бис(3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропаноил)гидразин-1,2-диил)дипропаноата.



К неочищенному соединению 3,3'-(1,2-бис(3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропаноил)-гидразин-1,2-диил)дипропановой кислоты (~560 мг, ~1.17 ммоль) в DMA (8 мл) добавляли NHS (400 мг, 3,47 ммоль) и EDC (1,01 г, 5,26 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя EtOAc/ДХМ (1:12~1:7) с получением указанного в заголовке соединения (520 мг, 65% выход за две стадии). МС ЭСИ m/z+ $C_{28}H_{28}N_6NaO_{14}$ (M+Na), рассчит. 695,17, найдено 695,40.

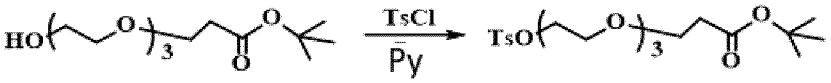
Пример 16. Синтез трет-бутил 3-(2-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)этокси)пропаноата.



К 350 мл безводного ТГФ при перемешивании добавляли 80 мг (0.0025 моль) металлического натрия и триэтиленгликоля 150,1 г, 1,00 моль). После полного растворения натрия добавляли трет-бутилакрилат (24 мл, 0,33 моль). Раствор перемешивали в течение 20 часов при комнатной температуре и нейтрализовали 8 мл 1,0 М HCl. Растворитель удаляли в вакууме, а остаток суспендировали в насыщенном водном растворе хлорида натрия (250 мл) и экстрагировали этилацетатом (3 × 125 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл), затем водой (100 мл), сушили над сульфатом натрия и удаляли

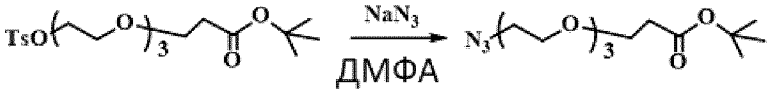
растворитель. Полученное бесцветное масло сушили в вакууме, получая 69,78 г (выход 76%) указанного в заголовке продукта. ^{1}H ЯМР: 1,41 (с, 9H), 2,49 (т, 2H, J = 6,4 Гц), 3,59-3,72 (м, 14H). МС ЭСИ m/z- $C_{13}H_{25}O_6$ (M-H), рассч. 277,17, найдено 277,20.

Пример 17. Синтез трет-бутил-3-(2-(2-(2-(тозилокси)этокси)этокси)этокси) пропаноата.



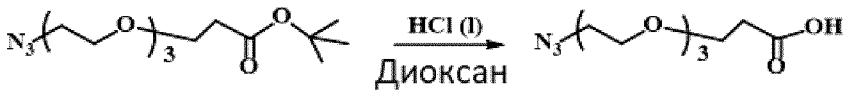
Раствор трет-бутил-3-(2-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)этокси)пропаноата (10,0 г, 35,95 ммоль) в ацетонитриле (50,0 мл) обрабатывали пиридином (20,0 мл). Через капельную воронку по каплям добавляли раствор тозилхлорида (7,12 г, 37,3 ммоль) в 50 мл ацетонитрила в течение 30 минут. Через 5 часов анализ ТСХ показал завершение реакции. Образовавшийся гидрохлорид пиридина отфильтровывали и растворитель удаляли. Остаток очищали на силикагеле, элюируя смесью от 20% этилацетата в гексане до чистого этилацетата, с получением 11,2 г (выход 76%) указанного в заголовке соединения. ^{1}H ЯМР: 1.40 (с, 9H), 2.40 (с, 3H), 2.45 (т, 2H, J=6,4 Гц), 3,52-3,68 (м, 14H), 4,11 (т, 2H, J=4,8 Гц), 7,30 (д, 2H, J=8,0 Гц), 7,75 (д, 2H, J=8,0 Гц); МС ЭСИ m/z+ $C_{20}H_{33}O_8S$ (M+H), рассч. 433,18, найдено 433,30.

Пример 18. Синтез трет-бутил-3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)пропаноата.



К 50 мл ДМФА при перемешивании добавляли трет-бутил 3-(2-(2-(2-(тозилокси)этокси)этокси)этокси)пропаноат (4,0 г, 9,25 ммоль) и азид натрия (0,737 г, 11,3 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 80 °C. Через 4 часов анализ ТСХ показал завершение реакции. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли воду (25 мл). Водный слой отделяли и экстрагировали этилацетатом (3 × 35 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и удаляли растворитель в вакууме. Неочищенный азид (2,24 г, выход 98%, чистота около 93% по данным ВЭЖХ) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$): 1,40 (с, 9H), 2,45 (т, 2H, J = 6,4 Гц), 3,33 (т, 2H, J = 5,2 Гц), 3,53-3,66 (м, 12H). МС ЭСИ m/z+ $C_{13}H_{26}N_3O_8$ (M+H), рассч. 304,18, найдено 304,20.

Пример 19. Синтез 3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)пропановой кислоты.



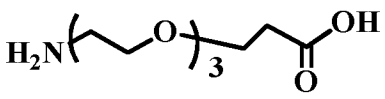
К трет-бутил 3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)пропаноата (2,20 г, 7,25 ммоль) в 1,4-диоксане (40 мл) добавляли HCl (12 М, 10 мл). Смесь перемешивали в течение 40 минут, разбавляли диоксаном (20 мл) и толуолом (40 мл), упаривали и упаривали совместно с диоксаном (20 мл) и толуолом (40 мл) досуха с получением неочищенного указанного в заголовке продукта для следующей стадии без дальнейшей очистки (1,88 г, выход 105%, чистота ~ 92% по данным ВЭЖХ). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_9H_{18}N_3O_5$ $[M+H]^+$ 248,12, найдено 248,40.

Пример 20. Синтез трет-бутилового эфира 13-амино-4,7,10-триоксадодекановой кислоты и трет-бутилового эфира 13-амино-бис (4,7,10-триоксадодекановой кислоты).



Неочищенный азид 3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)пропановой кислоты (5,0 г, ~ 14,84 ммоль) растворяли в этаноле (80 мл) и добавляли 300 мг 10% Pd/C. Систему вакуумировали и помещали под 2 атм газообразного водорода через реактор гидрирования при интенсивном перемешивании. Затем реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, ТСХ показал полное израсходование исходных веществ. Неочищенную реакционную смесь пропускали через тонкий слой целита, промывая этанолом. Растворитель удаляли и амин очищали на силикагеле, используя смесь метанола (от 5% до 15%) и 1% триэтиламина в метиленхлориде в качестве элюента с получением трет-бутилового эфира 13-амино-4,7,10-триоксадодекановой кислоты (1,83 г, выход 44%, МС ЭСИ m/z+ $C_{13}H_{27}NO_5$ (M+H), рассч. 278,19, найдено 278,30) и трет-бутилового эфира 13-амино-бис (4,7,10-триоксадодекановой кислоты (2,58 г, 32% выход, МС ЭСИ m/z+ $C_{26}H_{52}NO_{10}$ (M+H), рассч. 538,35, найдено 538,40).

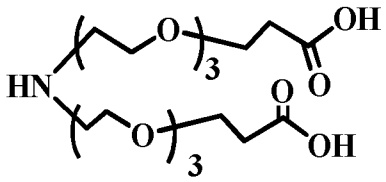
Пример 21. Синтез HCl соли 3-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этокси)пропановой кислоты.



К трет-бутиловому эфиру 13-амино-4,7,10-триоксадодекановой кислоты (0,80 г, 2,89 ммоль) в 30 мл диоксана при перемешивании добавляли 10 мл HCl (36%). Через 0,5 ч анализ ТСХ показал завершение реакции, реакционную смесь упаривали и упаривали

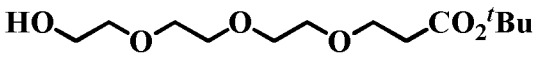
совместно с EtOH и EtOH/толуолом с образованием указанного в заголовке продукта в виде соли HCl (> 90% чистота, 0,640 г, выход 86%) без дальнейшей очистки. МС ЭСИ m/z+ $C_9H_{20}NO_5$ (M+H), рассч. 222,12, найдено 222,20.

Пример 22. 13-Амино-бис(4,7,10-триоксадодекановая кислота, HCl соль.



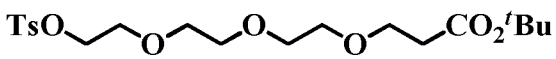
К 13-амино-бис(трет-бутиловому эфиру 4,7,10-триоксадодекановой кислоты) (1,00 г, 1,85 ммоль) в 30 мл диоксана добавляли 10 мл HCl (36%) при перемешивании. Через 0,5 ч анализ ТСХ показала, что реакция завершилась, реакционную смесь выпаривали и выпаривали совместно с EtOH и EtOH/толуолом с образованием указанного в заголовке продукта в виде соли HCl (> 90% чистота, 0,71 г, выход 91%) без дальнейшей очистки. МС ЭСИ m/z+ $C_{18}H_{36}NO_{10}$ (M+H), рассч. 426,22, найдено 426,20.

Пример 23. Синтез *трет*-бутил 3-(2-(2-(2-гидроэтокси)этокси)этокси)пропаноата.



К раствору 2,2'-(этан-1,2-диилбис(окси))диэтанола (55,0 мл, 410,75 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ТГФ (200 мл) добавляли натрий (0,1 г). Смесь перемешивали до полного израсходования Na, а затем по каплям добавляли *трет*-бутилакрилат (20,0 мл, 137,79 ммоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали в течение ночи, а затем гасили раствором HCl (20,0 мл, 1 н.) при 0 °C. ТГФ удаляли на роторном испарителе, добавляли насыщенный водный раствор хлорида натрия (300 мл) и полученную смесь экстрагировали EtOAc (3 × 100 мл). Органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (3 × 300 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали и упаривали, получая бесцветное масло (30,20 г, выход 79,0%), которое использовали без дополнительной очистки. МС ЭСИ m/z рассч. для $C_{13}H_{27}O_6$ $[M + H]^+$ 278,1729, найдено 278,1730.

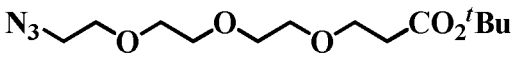
Пример 24. Синтез *трет*-бутил 3-(2-(2-(2-(тозилокси)этокси)этокси)этокси)пропаноата.



К раствору трет-бутил 3-(2-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)этокси)пропаноата (30,20 г, 108,5 ммоль, 1,0 экв.) и TsCl (41,37 г, 217,0 ммоль, 2,0 экв.) в безводном ДХМ (220 мл) при 0 °C добавляли ТЭА (30,0 мл, 217,0 ммоль, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, а затем промывали водой (3 × 300 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали,

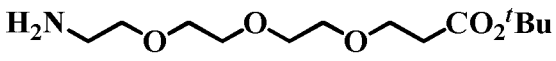
упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (смесь изомеров гексана 3:1/EtOAc) с получением бесцветного масла (39,4 г, выход 84,0%). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{20}H_{33}O_8S$ $[M + H]^+$ 433,1818, найдено 433,2838.

Пример 25. Синтез *трет*-бутил 3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)пропаноата.



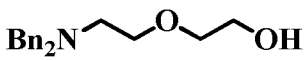
К раствору трет-бутил 3-(2-(2-(2-(тозилокси)этокси)этокси)этокси)пропаноата (39,4 г, 91,1 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДМФА (100 мл) добавляли NaN_3(20,67 г, 316,6 ммоль, 3,5 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли воду (500 мл) и экстрагировали EtOAc (3 × 300 мл). Объединенные органические слои промывали водой (3 × 900 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (900 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали колоночной хроматографией на SiO_2 (5: 1 смесь изомеров гексана/EtOAc), получая светло-желтое масло (23,8 г, 85,53% выход). МС ЭСИ m/z рассч. для $C_{13}H_{25}O_3N_5Na$ $[M + Na]^+$ 326,2, найдено 326,2.

Пример 26. Синтез *трет*-бутил 3-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этокси)пропаноата.



Ni Ренея (7,5 г, суспендированный в воде) промывали водой (три раза) и изопропиловым спиртом (три раза) и смешивали с *трет*-бутил 3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)пропаноатом (5,0 г, 16,5 ммоль) в изопропиловом спирте. Смесь перемешивали в атмосфере H_2 при комнатной температуре в течение 16 часов, а затем фильтровали через слой целита, промывая изопропиловым спиртом. Фильтрат упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии (5-25% MeOH/ДХМ), получая светло-желтое масло (2,60 г, выход 57%). МС ЭСИ m/z рассч. для $C_{13}H_{28}NO_5$ $[M+H]^+$ 279,19; найдено 279,19.

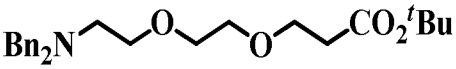
Пример 27. Синтез 2-(2-(дибензиламино)этокси)этанола



В 2-(2-Аминоэтокси)этанол (21,00 г, 200 ммоль, 1,0 экв.) и K_2CO_3 (83,00 г, 600 ммоль, 3,0 экв.) в ацетонитриле (350 мл) добавляли BnBr (57,0 мл, 480 ммоль, 2,4 экв.). Смесь нагревали до кипения с обратным холодильником в течение ночи. Добавляли воду (1 л) и экстрагировали EtOAc (3 × 300 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (1000 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на

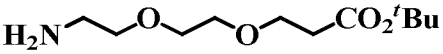
SiO_2 (4:1 смесь изомеров гексана/EtOAc), получая бесцветное масло (50,97 г, 89,2% выход). МС ЭСИ m/z вычислено для $C_{18}H_{23}NO_2Na$ $[M + Na]^+$ 309,1729, найдено 309,1967.

Пример 28. Синтез трет-бутил 3-(2-(2-(дибензиламино)этокси)этокси)пропаноата.



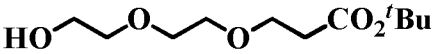
К смеси 2-(2-(дибензиламино)этокси)этанола (47,17 г, 165,3 ммоль, 1,0 экв.) , трет-бутилакрилата (72,0 мл, 495,9 ммоль, 3,0 экв.) и н-Bu_4NI (6,10 г, 16,53 ммоль, 0,1 экв.) в ДХМ (560 мл) добавляли раствор гидроксида натрия (300 мл, 50%). Смесь перемешивали в течение ночи. Органический слой отделяли, а водный слой экстрагировали EtOAc (3 × 100 мл). Органические слои промывали водой (3 × 300 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (7:1 смесь изомеров гексана/EtOAc), получая бесцветное масло (61,08 г, выход 89,4%). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{25}H_{36}NO_4$ $[M + H]^+$ 414,2566, найдено 414,2384.

Пример 29. Синтез *трет-бутил* 3-(2-(2-аминоэтокси)этокси)пропаноата.



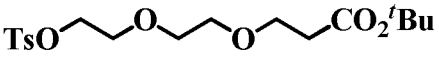
К раствору трет-бутил 3-(2-(2-(дибензиламино)этокси)этокси) пропаноата (20,00 г, 48,36 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (30 мл) и MeOH (60 мл) добавляли Pd/C (2,00 г, 10% масс., 50% влажный) в склянке для гидрирования. Смесь встряхивали при давлении 1 атм. H_2 в течение ночи, фильтровали через целит (вспомогательное средство для фильтрования) и фильтрат упаривали с получением бесцветного масла (10,58 г, выход 93,8%). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{11}H_{24}NO_4$ $[M + H]^+$ 234,1627, найдено 234,1810.

Пример 30. Синтез *трет-бутил* 3-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)пропаноата.



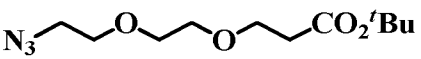
К раствору 2,2'-оксидиэтанола (19,7 мл, 206,7 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ТГФ (100 мл) добавляли натрий (0,1 г). Смесь перемешивали до израсходования Na, а затем по каплям добавляли *трет*-бутилакрилат (10,0 мл, 68,9 ммоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали в течение ночи, добавляли насыщенный раствор хлорида натрия (200 мл) и экстрагировали EtOAc (3 × 100 мл). Органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (3 × 300 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (1:1 смесь изомеров гексана/EtOAc) с получением бесцветного масла (8,10 г, выход 49,4%). МС ЭСИ m/z рассч. для $C_{11}H_{23}O_5$ $[M +H]^+$ 235,1467, найдено 235,1667.

Пример 31. Синтез *трет-бутил* 3-(2-(2-(тозилокси)этокси)этокси)пропаноата.



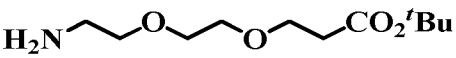
К раствору *трет*-бутил 3-(2-(2-гидроксиэтокси)этокси)пропаноата (6,24 г, 26,63 ммоль, 1,0 экв.) и TsCl (10,15 г, 53,27 ммоль, 2,0 экв.) в безводном ДХМ (50 мл) при 0 °C добавляли пиридин (4,3 мл, 53,27 ммоль, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, а затем промывали водой (100 мл) и водный слой экстрагировали ДХМ (3 × 50 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (5:1 смесь изомеров гексана/EtOAc), получая бесцветное масло (6,33 г, 61,3% выход). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{18}H_{27}O_7S$ $[M + H]^+$ 389,1556, найдено 389,2809.

Пример 32. Синтез *трет-бутил* 3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропаноата.



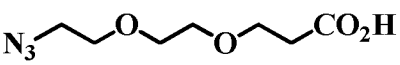
К раствору *трет*-бутил 3-(2-(2-(тозилокси)этокси)этокси)пропаноата (5,80 г, 14,93 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДМФА (20 мл) добавляли NaN_3 (5,02 г, 77,22 ммоль, 5,0 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли воду (120 мл) и экстрагировали EtOAc (3 × 50 мл). Объединенные органические слои промывали водой (3 × 150 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (150 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (5:1 смесь изомеров гексана/EtOAc), получая бесцветное масло (3,73 г, выход 69,6%). МС ЭСИ m/z рассч. для $C_{11}H_{22}O_3N_4Na[M + H]^+$ 260,1532, найдено 260,2259.

Пример 33. Синтез *трет-бутил* 3-(2-(2-аминоэтокси)этокси)пропаноата.



трет-бутил-3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропаноат (0,18 г, 0,69 ммоль) растворяли в MeOH (3,0 мл, 60 мкл концентрированной HCl) и гидрировали Pd/C (10% масс., 20 мг) в атмосфере H_2 в течение 30 минут. Катализатор отфильтровывали через слой целита, промывая MeOH. Фильтрат упаривали, получая бесцветное масло (0,15 г, выход 93%). МС ЭСИ m/z рассч. для $C_{11}H_{24}NO_4$ $[M+H]^+$ 234,16; найдено 234,14.

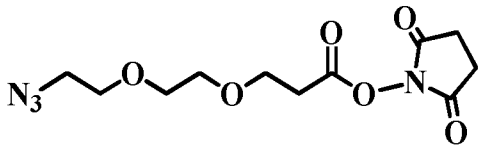
Пример 34. Синтез 3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропановой кислоты.



трет-бутил-3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропаноата (2,51 г, 9,68 ммоль), растворенного в 1,4-диоксане (30 мл), обрабатывали 10 мл HCl (конц.) при комнатной

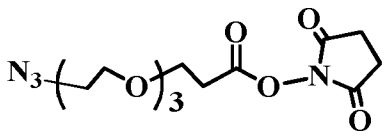
температуре. Смесь перемешивали в течение 35 минут, разбавляли EtOH (30 мл) и толуолом (30 мл), и упаривали в вакууме. Неочищенную смесь очищали на силикагеле, используя смесь метанола (от 5 до 10%) и 1% муравьиной кислоты в метиленхлориде в качестве элюента, с получением указанного в заголовке соединения (1,63 г, выход 83%), МС ЭСИ m/z. $C_7H_{12}N_3O_4$ $[M-H]^-$, рассч. 202,06, найдено 202,30.

Пример 35. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2-азидоэтокси) этокси)пропаноата.



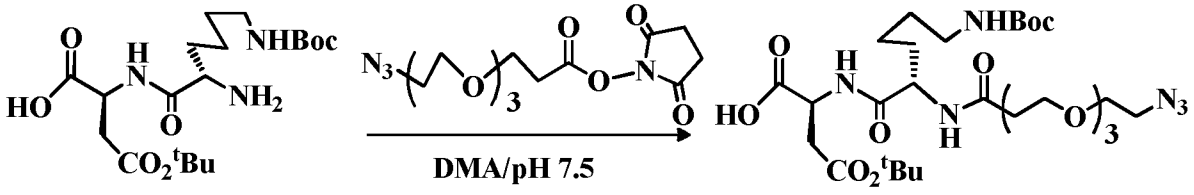
К 3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропановой кислоте (1,60 г, 7,87 ммоль) в 30 мл дихлорметана добавляли NHS (1,08 г, 9,39 ммоль) и EDC (3,60 г, 18,75 ммоль) при перемешивании. Через 8 часов анализ ТСХ показал завершение реакции, реакционную смесь упаривали и очищали на силикагеле, используя в качестве элюента смесь этилацетата (от 5% до 10%) в метиленхлориде, с получением указанного в заголовке соединения (1,93 г, выход 82%). МС ЭСИ m/z $C_{11}H_{17}N_4O_6$ $[M+H]^+$, рассч. 301,11, найдено 301,20.

Пример 36. Синтез 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)пропаноата.



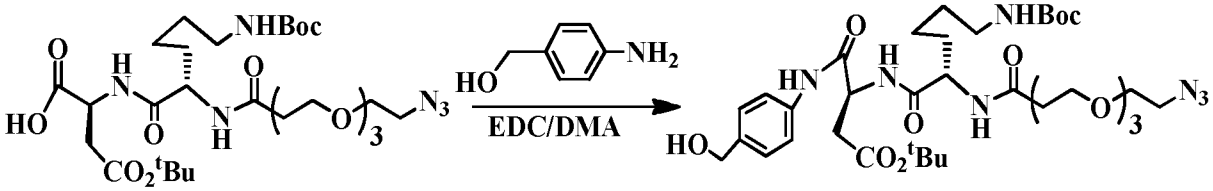
К 3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)пропановой кислоте (4,50 г, 18,21 ммоль) в 80 мл дихлорметана при перемешивании добавляли NHS (3,0 г, 26,08 ммоль) и EDC (7,60 г, 39,58 ммоль). Через 8 часов анализ ТСХ показал завершение реакции, реакционную смесь упаривали и очищали на силикагеле, используя в качестве элюента смесь этилацетата (от 5% до 10%) в метиленхлориде, с получением указанного в заголовке соединения (5,38 г, 86% выход). МС ЭСИ m/z $C_{13}H_{20}N_4O_7$ $[M+H]^+$, рассч. 345,13, найдено 345,30.

Пример 37. Синтез (14S, 17S)-1-азидо-17-(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)-14-(4 -((трет-бутоксикарбонил)амино)бутил)-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оевой кислоты



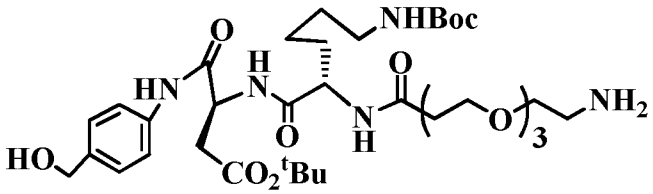
К раствору (S)-2-((S)-2-амино-6-((трет-бутоксикарбонил)амино)гексанамидо)-4-(трет-бутокси)-4-оксобутановой кислоты (2,81 г, 6,73 ммоль) в смеси DMA (70 мл) и 0,1 М NaH_2PO_4 (50 мл, pH 7,5) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)пропаноат (3,50 г, 10,17). Смесь перемешивали в течение 4 часов, упаривали в вакууме, очищали на силикагеле, используя смесь метанола (от 5% до 15%) в метиленхлориде, содержащую 0,5% уксусную кислоту в качестве элюента с получением указанного в заголовке соединения (3,35 г, 77% выход). МС ЭСИ m/z $C_{28}H_{51}N_6O_{11}$ $[M+H]^+$, рассч. 647,35, найдено 647,80.

Пример 38. Синтез (14S,17S)-трет-бутил-1-азидо-14-(4-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутил)-17-((4-(гидроксиметил)фенил)карбамоил)-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазанонадекан-19-оата



(14S,17S)-1-азидо-17-(2-(трет-бутокси)-2-оксоэтил)-14-(4-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутил)-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оновой кислоты (3,30 г, 5,10 ммоль) и (4-аминофенил)метанола (0,75 г, 6,09) в DMA (25 мл) добавляли EDC (2,30 г, 11,97 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали в вакууме, очищали на силикагеле, используя в качестве элюента смесь метанола (от 5% до 8%) в метиленхлориде с получением указанного в заголовке соединения (3,18 г, выход 83%). МС ЭСИ m/z $C_{35}H_{58}N_7O_{11}$ $[M+H]^+$, рассч. 752,41, найдено 752,85.

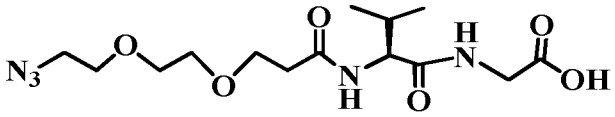
Пример 39. Синтез (14S,17S)-трет-бутил 1-амино-14-(4-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутил)-17-((4-(гидроксиметил)фенил)карбамоил)-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазанонадекан-19-оата



К раствору (14S,17S)-трет-бутил 1-азидо-14-(4-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутил)-17-((4-(гидроксиметил)фенил)карбамоил)-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазанонадекан-19-оата (1,50 г, 1,99 ммоль) в ТГФ (35 мл) добавляли Pd/C (200 мг, 10% Pd, 50% влажности) в сосуде для гидрирования. Смесь встряхивали при давлении 1 атм. H_2 в течение ночи, фильтровали через целит (вспомогательное средство для фильтрации) и фильтрат упаривали, получая указанное в заголовке соединение (1,43 г, выход 99%),

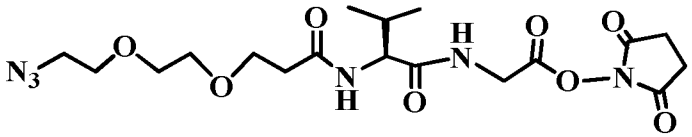
которое сразу использовали для следующей стадии без дополнительной очистки. МС ЭСИ m/z $C_{35}H_{60}N_5O_{11}$ $[M+H]^+$, рассч.726,42, найдено 726,70.

Пример 40. Синтез (S)-15-азидо-5-изопропил-4,7-диоксо-10,13-диокса-3,6-диазапентадекан-1-оевой кислоты



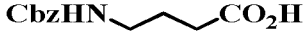
К раствору (S)-2-(2-амино-3-метилбутанамидо)уксусной кислоты (Val-Gly) (1,01 г, 5,80 ммоль) в смеси DMA (50 мл) и 0,1 М NaH_2PO_4 (50 мл, pH 7,5) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропаноат (1,90 г, 6,33). Смесь перемешивали в течение 4 часов, упаривали в вакууме, очищали на силикагеле, используя в качестве элюента смесь метанола (от 5% до 15%) в метиленхлориде, содержащую 0,5% уксусную кислоту, с получением указанного в заголовке соединения (1,52 г, выход 73%). МС ЭСИ m/z $C_{14}H_{26}N_5O_6$ $[M+H]^+$, рассч. 360,18, найдено 360,40.

Пример 41. Синтез (S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 15-азидо-5-изопропил-4,7-диоксо-10,13-диокса-3,6-диазапентадекан-1-оата



К раствору (S)-15-азидо-5-изопропил-4,7-диоксо-10,13-диокса-3,6-диазапентадекан-1-оевой кислоты (1,50 г, 4,17 ммоль) в 40 мл дихлорметана при перемешивании добавляли NHS (0,88 г, 7,65 ммоль) и EDC (2,60 г, 13,54 ммоль). После 8 часов, ТХМ анализ показал завершение реакции, реакционную смесь упаривали и очищали на силикагеле с использованием смеси этилацетата (от 5% до 20%) в метиленхлориде в качестве элюента с получением указанного в заголовке соединения (1,48 г, 78% выход). ЭСИ МС m/z $C_{18}H_{29}N_6O_8$ $[M+H]^+$, рассчитано для 457,20, найдено 457,50.

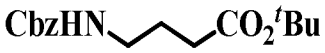
Пример 42. Синтез 4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутановой кислоты.



Раствор 4-аминомасляной кислоты (7,5 г, 75 ммоль) и NaOH (6 г, 150 ммоль) в H_2O (40 мл) охлаждали до 0 °С и по каплям добавляли раствор CbzCl (16,1 г, 95 ммоль) в ТГФ (32 мл). После 1 часа, реакционную смеси оставляли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 часов. ТГФ удаляют в вакууме, pH водного раствора доводили до 1,5 добавлением 6 н HCl. Экстрагировали этилацетатом и органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили и упаривали,

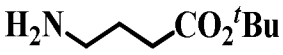
получая указанное в заголовке соединение (16,4 г, выход 92%). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{12}H_{16}NO_5$ $[M+H]^+$238,10, найдено 238,08.

Пример 43. Синтез *трет-бутил* 4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутаноата.



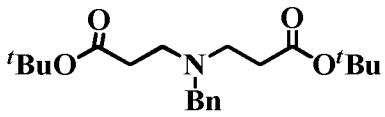
DMAP (0,8 г, 6,56 ммоль) и DCC (17,1 г, 83 ммоль) добавляли к раствору 4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутановой кислоты (16,4 г, 69,2 ммоль) и трет-BuOH (15,4 г, 208 ммоль) в ДХМ (100 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи, реакционную смесь фильтровали и фильтрат упаривали. Остаток растворяли в этилацетате промывали 1 н HCl, насыщенным водным раствором хлорида натрия и сушили над Na_2SO_4. Упаривание и очистка с помощью колоночной хроматографии (10-50% EtOAc/смесь изомеров гексана) давало указанное в заголовке соединение (7,5 г, 37% выход). МС ЭСИ m/z рассч. для $C_{16}H_{23}NO_4Na$ $[M+Na]^+$ 316,16, найдено 316,13.

Пример 44. Синтез *трет-* бутил 4-аминобутаноата.



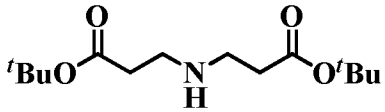
трет-Бутил 4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутаноата (560 мг, 1,91 ммоль) растворяли в MeOH (50 мл), и добавляли катализатор Pd/C (10% масс., 100 мг), затем гидрировали (1 атм) при комнатной температуре в течение 3 часов. Катализатор отфильтровывали и все летучие вещества удаляли в вакууме, получая указанное в заголовке соединение (272 мг, 90% выход). МС ЭСИ m/z рассч. для $C_8H_{18}NO_2$ $[M+H]^+$ 160,13, найдено 160,13.

Пример 45. Синтез ди-*трет*-бутил 3,3'-(бензилазандиил)дипропаноата.



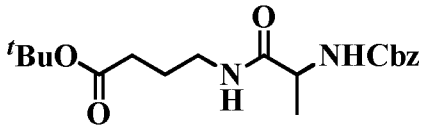
Смесь фенилметанамина (2,0 мл, 18,29 ммоль, 1,0 экв.) и *трет-* бутилакрилата (13,3 мл, 91,46 ммоль, 5,0 экв.) нагревали с обратным холодильником при 80 °C в течение ночи, а затем упаривали. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (20:1 смесь изомеров гексана/EtOAc), получая указанное в заголовке соединение в виде бесцветного масла (5,10 г, 77% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{21}H_{34}NO_4$ $[M+H]^+$ 364,2, найдено 364,2. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,38 – 7,21 (м, 5H), 3,58 (с, 2H), 2,76 (т, J = 7,0 Гц, 4H), 2,38 (т, J = 7,0 Гц, 4H), 1,43 (с, 17H).

Пример 46. Синтез ди-*трет*-бутил 3,3'-азандиилдипропаноата.



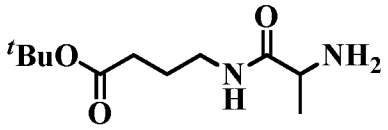
К раствору ди-*трет*-бутил 3,3'-(бензилазандиил)дипропаноата (1,37 г, 3,77 ммоль, 1,0 экв.) в MeOH (10 мл) добавляли Pd/C (0,20 г, 10% Pd/C, влажность 50%) в сосуде для гидрирования. Смесь встряхивали в течение ночи в атмосфере H_2, а затем фильтровали через слой целита. Фильтрат упаривали, получая указанное в заголовке соединение в виде бесцветного масла (1,22 г, выход 89%). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{14}H_{28}NO_4$ $[M+H]^+$ 274,19, найдено 274,20.

Пример 47. Синтез *трет-* бутил 4-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)пропанамидо)-бутаноата.



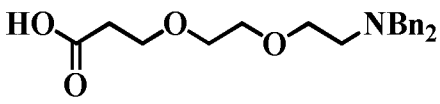
К раствору *трет*-бутил 4-аминобутаноата (1,00 г, 6,28 ммоль, 1,0 экв.) и Z-L-алаина (2,10 г, 9,42 ммоль, 1,5 экв.) в безводном ДХМ (50 мл) при 0 °C добавляли HATU (3,10 г, 8,164 ммоль, 1,3 экв.) и ТЭА (2,6 мл, 18,8 ммоль, 3,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 10 минут, затем нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Смесь разбавляли ДХМ и промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (10:3 петролейный эфир/этилацетат) с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (1,39 г, 61% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{19}H_{29}N_2O_5Na$ $[M+H]^+$ 387,2, найдено 387,2.

Пример 48. Синтез трет-бутил 4-(2-аминопропанамидо)бутаноата.



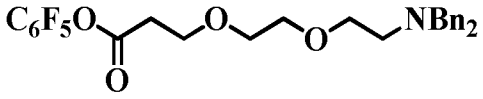
К раствору *трет*-бутил 4-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)пропанамидо) бутаноата (1,39 г, 3,808 ммоль, 1,0 экв.) в MeOH (12 мл) добавляли Pd/C (0,20 г, 10% масс., 10% влажности) в склянке для гидрирования. Смесь встряхивали в течение 2 часов, а затем фильтровали через целит (вспомогательное средство для фильтрации), упаривали, получая указанное в заголовке соединение в виде светло-желтого масла (0,838 г, выход 95%). МС ЭСИ m/z: рассч. для $C_{11}H_{23}N_2O_3$ $[M+H]^+$ 231,16, найдено 231,15.

Пример 49. Синтез 3-(2-(2-(дибензиламино)этокси)этокси)пропановой кислоты.



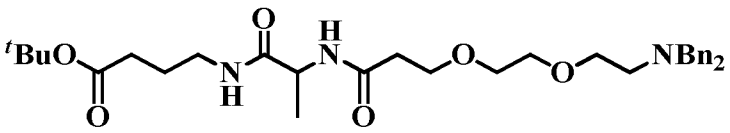
К раствору *трет*-бутил 3-(2-(2-(дибензиламино)этокси)этокси)пропаноата (2,3 г, 5,59 ммоль, 1,0 экв.) в ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли ТФК (5 мл). После перемешивания в течение 90 минут, реакционную смесь разбавляли безводным толуолом и упаривали, эту операцию повторяли три раза, получая указанное в заголовке соединение в виде светло-желтого масла (2,0 г, теоретический выход), который непосредственно использовали на следующей стадии. МС ЭСИ m/z рассч. для $C_{21}H_{28}NO_4$ $[M+H]^+$ 358,19, найдено 358,19.

Пример 50. Синтез перфторфенил 3-(2-(2-(дибензиламино)этокси)этокси)пропаноата.



К раствору 3-(2-(2-(дибензиламино)этокси)этокси)пропановой кислоты (2,00 г, 5,59 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДХМ (30 мл) при 0 °С добавляли DIPEA до нейтрального pH, а затем добавляли PFP (1,54 г, 8,38 ммоль, 1,5 экв.) и DIC (1,04 мл, 6,70 ммоль, 1,2 экв.). После 10 минут, реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Смесь фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (15:1 петролейный эфир/этилацетат) с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (2,10 г, выход 72%). МС ЭСИ m/z: calcd. for $C_{27}H_{27}F_5NO_4$ $[M+H]^+$ 524,2, найдено 524,2.

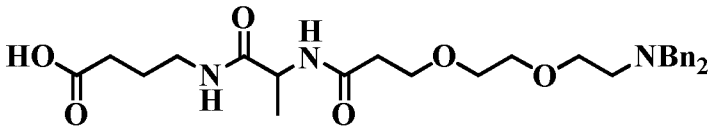
Пример 51. Синтез *трет*- бутил 2-бензил-13-метил-11,14-диоксо-1-фенил-5,8-диокса-2,12,15-триазанонадекан-19-оата.



К раствору трет-бутил 4-(2-аминопропанамидо)бутаноата (0,736 г, 3,2 ммоль, 1,0 экв.) и перфторфенил 3-(2-(2-(дибензиламино)этокси)этокси)пропаноата (2,01 г, 3,84 ммоль, 1,2 экв.) в безводном DMA (20 мл) при 0 °С добавляли DIPEA (1,7 мл, 9,6 ммоль, 3,0 экв.). После перемешивания при 0 °С в течение 10 минут реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Добавляли воду (100 мл) и смесь экстрагировали EtOAc (3 × 100 мл). Объединенные органические слои промывали водой (3 × 200 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (200 мл), сушили над Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (25:2 ДХМ/MeOH), получая указанное в заголовке соединение в виде бесцветного

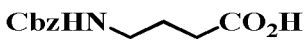
масла (1,46 г, выход 80%). МС ЭСИ m/z: calcd. for $C_{32}H_{48}N_3O_6$ $[M+H]^+$ 570,34, найдено570,33.

Пример 52. Синтез 2-бензил-13-метил-11,14-диоксо-1-фенил-5,8-диокса -2,12,15-триазанонадекан-19-оевой кислоты.



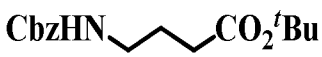
К раствору *трет*- бутил 2-бензил-13-метил-11,14-диоксо-1-фенил-5,8-диокса-2,12,15-триазанонадекан-19-оата (0,057 г, 0,101 ммоль, 1,0 экв) в ДХМ (3 мл) при комнатной температуре добавляли ТФК (1 мл) и перемешивали в течение 40 минут. Реакционную смесь разбавляли безводным толуолом, а затем упаривали. Данную операцию повторяли три раза с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (0,052 г, теоретический выход), которое использовали непосредственно на следующей стадии. МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{28}H_{40}N_3O_6$ $[M+H]^+$ 514,28, найдено 514,28.

Пример 53. Синтез 4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутановой кислоты



Раствор 4-аминомасляной кислоты (7,5 г, 75 ммоль) и NaOH (6 г, 150 ммоль) в H2O (40 мл) охлаждали до 0 °C, а затем по каплям добавляли раствор CbzCl (16,1 г, 95 ммоль) в ТГФ (32 мл). После 1 часа, реакционную смеси оставляли нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 часов. ТГФ удаляют в вакууме, pH водного раствора доводили до 1,5 добавлением 6 н HCl. Экстрагировали этилацетатом и органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили и упаривали, получая указанное в заголовке соединение (16,4 г, выход 92%). ЭСИ МС m/z рассчитано для C12H16NO5 [M+H]+238,10, найдено 238,08.

Пример 54. Синтез трет-бутил 4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутаноата.



DMAP (0,8 г, 6,56 ммоль) и DCC (17,1 г, 83 ммоль) добавляли к раствору 4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутановой кислоты (16,4 г, 69,2 ммоль) и трет-BuOH (15,4 г, 208 ммоль) в ДХМ (100 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи, реакционную смесь фильтровали и фильтрат упаривали. Остаток растворяли в этилацетате промывали 1 н HCl, насыщенным водным раствором хлорида натрия и сушили над Na_2SO_4. Упаривание и очистка с помощью колоночной хроматографии (10-50% EtOAc/смесь изомеров гексана) давало указанное в заголовке

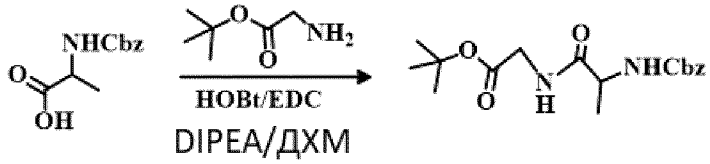
соединение (7,5 г, 37% выход). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{16}H_{23}NO_4Na$ $[M+Na]^+$316,16, найдено 316,13.

Пример 55. Синтез трет-бутил 4-аминобутаноата.



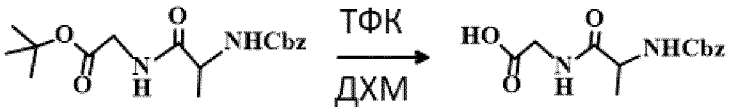
трет-Бутил 4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутаноата (560 мг, 1,91 ммоль) растворяли в MeOH (50 мл), и добавляли катализатор Pd/C (10% масс., 100 мг), затем гидрировали (1 атм) при комнатной температуре в течение 3 часов. Катализатор отфильтровывали и все летучие вещества удаляли в вакууме, получая указанное в заголовке соединение (272 мг, 90% выход). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_8H_{18}NO_2$ $[M+H]^+$160,13, найдено 160,13.

Пример 56. Синтез трет-бутил 2-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)пропанамидо)ацетата.



2-(((Бензилокси)карбонил)амино)пропановую кислоту (0,84 г, 5 ммоль), трет-бутил 2-аминоацетат (0,66 г, 5 ммоль), HOBt (0,68 г, 5 ммоль), EDC (1,44 г, 7,5 ммоль) растворяли в ДХМ (20 мл) с последующим добавлением DIPEA (1,7 мл, 10 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, промывали H_2O (100 мл) и водный слой экстрагировали EtOAc. Органические слои объединяли, сушили над $MgSO_4$, фильтровали, упаривали при пониженном давлении и остаток очищали на колонке с SiO_2 с получением указанного в заголовке продукта **1** (0,87 г, 52%). ЭСИ: m/z: рассч. для $C_{17}H_{25}N_2O_5$ $[M+H]^+$: 337,17, найдено 337,17.

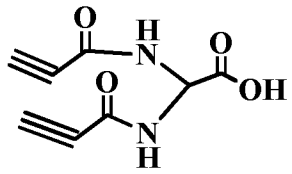
Пример 57. Синтез 2-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)пропанамидо)уксусной кислоты.



Трет-бутил 2-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)пропанамидо)ацетат (0,25 г, 0,74 ммоль) растворяли в ДХМ (30 мл) с последующим добавлением ТФК (10 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали, получая указанное

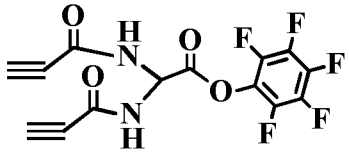
в заголовке соединение, используемое для следующей стадии без дополнительной очистки. ЭСИ: m/z: рассч. для $C_{13}H_{17}N_2O_5$ $[M+H]^+$: 281,11, найдено 281,60.

Пример 58. Синтез 2,2-дипропиоламидоуксусной кислоты.



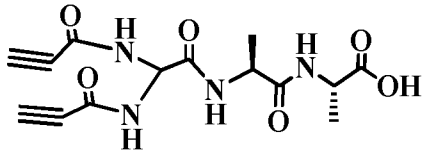
2,2-диаминоуксусной кислоты (2,0 г, 22,2 ммоль) в смеси EtOH (15 мл) и 50 мМ NaH_2PO_4 pH 7,5 буфер (25 мл) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-илпропиолат (9,0 г, 53,8 ммоль). Смесь перемешивали в течение 8 часов, упаривали, pH доводили до 3,0 0,1 М HCl, экстрагировали EtOAc (3 x 30 мл). Органические слои объединяли, сушили над Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя смесью MeOH/CH_2Cl_2 (от 1:10 до 1:6), с получением указанного в заголовке соединения (3,27 г, 76% выход). 1H ЯМР ($CDCl_3$) 11,8 (уш., 1H), 8,12 (д, 2H), 6,66 (м, 1H), 2,66 (с, 2H). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_8H_6N_2O_4$ $[M+H]^+$ 195,03, найдено 195,20.

Пример 59. Синтез перфторфенил-2,2-дипропиоламидоацетата.



2,2-дипропиоламидоуксусную кислоту (2,01 г, 10,31 ммоль), пентафторфенол (2,08 г, 11,30 ммоль), DIPEA (1,00 мл, 5,73 ммоль) и EDC (4,01 г, 20,88 ммоль) в CH_2Cl_2 (100 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя EtOAc/CH_2Cl_2 (от 1:15 до 1:8), с получением указанного в заголовке соединения (3,08 г, выход 83%). 1H ЯМР ($CDCl_3$) 8,10 (д, 2H), 6,61 (м, 1H), 2,67 (с, 2H). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{14}H_6F_5N_2O_4$ $[M+H]^+$ 361,02, найдено 361,20.

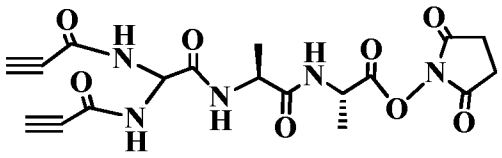
Пример 60. Синтез (S)-2-((S)-2-(2,2-дипропиоламидоацетамидо) пропанамидо)пропановой кислоты.



(S)-2-((S)-2-аминопропанамидо)пропановую кислоту (422) (1,10 г, 6,87 ммоль) в смеси DMA (18 мл) и 50 мМ NaH_2PO_4, pH 7,5, буфер (30 мл) добавляли перфторфенил 2,2-дипропиоламидоацетат (3,00 г, 8,33 ммоль). Смесь перемешивали в течение 14 часов, упаривали, pH доводили до 3,0 0,1 М HCl, экстрагировали EtOAc (3 x 40 мл). Органические слои объединяли, сушили над Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали

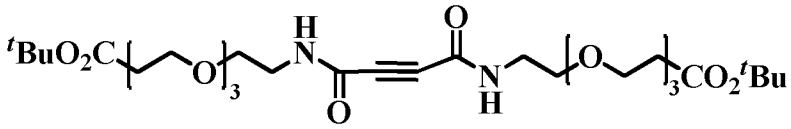
на колонке с SiO_2, элюируя смесью $MeOH/CH_2Cl_2$ (от 1:10 до 1:5), с получением указанного в заголовке соединения (1,80 г, 78% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{14}H_{17}N_4O_6$ $[M+H]^+$ 337,11, найдено 337,30.

Пример 61. Синтез (S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 2-((S)-2-(2,2-дипропиоламидоацетамидо)пропанамидо)пропаноата.



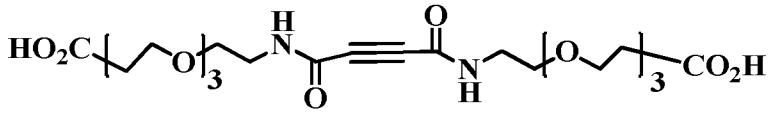
(S)-2-((S)-2-(2,2-дипропиоламидоацетамидо)пропанамидо) пропановую кислоту (1,01 г, 3,00 ммоль), NHS (0,41 г, 3,56 ммоль), DIPEA (0,40 мл, 2,29 ммоль) и EDC (1,51 г, 7,86 ммоль) в CH_2Cl_2 (50 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя $EtOAc/CH_2Cl_2$ (от 1:15 до 1:7), с получением указанного в заголовке соединения (1,05 г, выход 81%). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{18}H_{20}N_5O_8$ $[M+H]^+$ 434,12, найдено 434,40.

Пример 62. Синтез ди-*трет*- бутил 14,17-диоксо-4,7,10,21,24,27-гексаокса-13,18-диазатриаконт-15-ин-1,30-диоата.



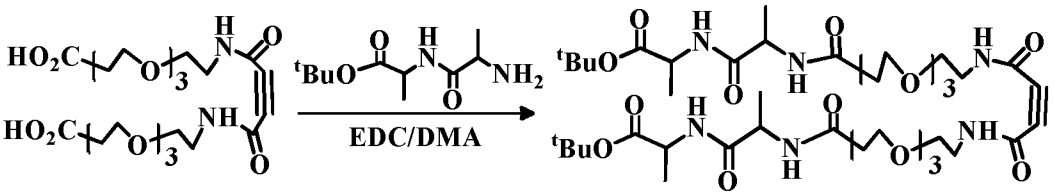
Ацетилендикарбоновую кислоту (0,35 г, 3,09 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в NMP (10 мл) и охлаждали до 0 °C, к смеси добавляли соединение трет-бутил 3-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси))-этокси)пропаноат (2,06 г, 7,43 ммоль, 2,4 экв.), а затем порциями DMTMM (2,39 г, 8,65 ммоль, 2,8 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 6 часов, а затем разбавляли этилацетатом и промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический раствор упаривали и растирали со смесью растворителей этилацетат и петролейный эфир. Твердое вещество отфильтровывали и фильтрат упаривали, и очищали с помощью колоночной хроматографии (80-90% ЭА/ПЭ), получая светло-желтое масло (2,26 г,> 100% выход), которое использовали без дополнительной очистки. МС ЭСИ m/z $[M+H]^+$ 633,30.

Пример 63. Синтез 14,17-диоксо-4,7,10,21,24,27-гексаокса-13,18-диаза триаконт-15-ин-1,30-диоевой кислоты.



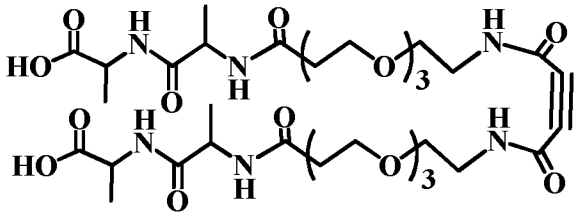
Соединение ди-*трет*-бутил 14,17-диоксо-4,7,10,21,24,27-гексаокса-13,18-диазатриаконт-15-ин-1,30-диоата (2,26 г) растворяли в дихлорметане (15 мл) и охлаждали до 0 °C, затем обрабатывали ТФК (15 мл). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 45 минут, а затем растворитель и остаточную ТФК удаляли на роторном испарителе. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (0-15% MeOH/ДХМ), получая светло-желтое масло (1,39 г, выход 86% для двух стадий). МС ЭСИ m/z $[M+H]^+$ 521,24.

Пример 64. Синтез ди-трет-бутил 2,5,38,41-тетраметил-4,7,20,23,36,39-гексаоксо-10,13,16,27,30,33-гексаокса-3,6,19,24,37,40-гексаазадотетраконт-21-ин-1,42-диоата



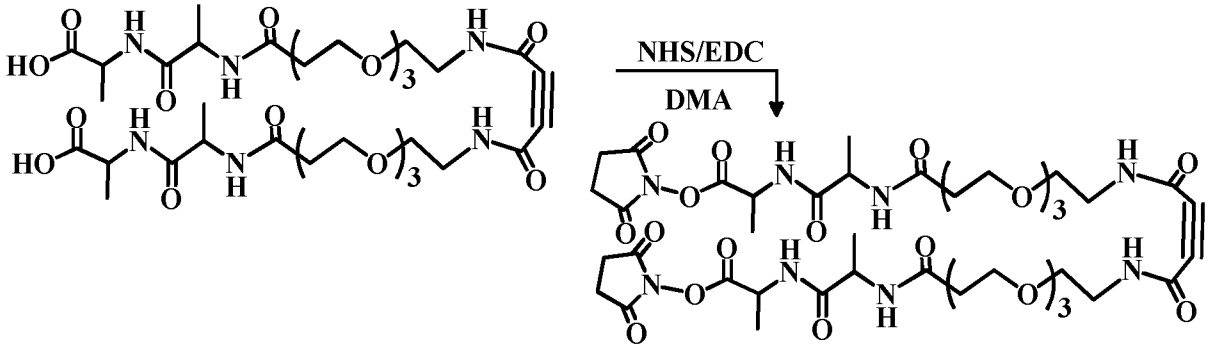
К раствору 14,17-диоксо-4,7,10,21,24,27-гексаокса-13,18-диаза триаконт-15-ин-1,30-диовой кислоты (1,38 г, 2,65 ммоль), трет -бутил 2-(2-аминопропанамидо)пропаноата (0,75 г, 3,47 ммоль) в смеси DMA (40 мл) добавляли EDC (2,05 г, 10,67 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя EtOAc/CH_2Cl_2 (от 1:5 до 1:1), с получением указанного в заголовке соединения (2,01 г, выход 82%, чистота ~ 95% по данным ВЭЖХ). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{42}H_{73}N_6O_{16}$ $[M+H]^+$ 917,50, найдено 917,90.

Пример 65. Синтез 2,5,38,41-тетраметил-4,7,20,23,36,39-гексаоксо-10,13,16,27,30,33-гексаокса-3,6,19,24,37,40-гексаазадотетраконт-21-ин-1,42-диовой кислоты.



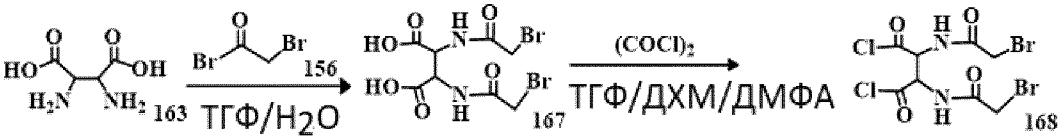
Ди-ди-трет-бутил 2,5,38,41-тетраметил-4,7,20,23,36,39-гексаоксо-10,13,16,27,30,33-гексаокса-3,6,19 24,37,40-гексаазадотетраконт-21-ин-1,42-диоат (1,50 г, 1,63 ммоль) растворяли в смеси CH_2Cl_2 (10 мл) и ТФК (10 мл). Смесь перемешивали в течение ночи, разбавляли толуолом (20 мл), упаривали с получением указанного в заголовке соединения (1,33 г, выход 101%, чистота ~ 92% по данным ВЭЖХ), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС ЭСИ m/z рассч. $C_{34}H_{56}N_6O_{16}$ $[M+H]^+$ 805,37, найдено 805,85.

Пример 66. Синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2,5,38,41-тетраметил-4,7,20,23,36,39-гексаоксо-10,13,16,27,30,33- гексаокса-3,6,19,24,37,40-гексаазадотетраконт-21-ин-1,42-диоата



К раствору 2,5,38,41-тетраметил-4,7,20,23,36,39-гексаоксо-10,13,16,27,30,33-гексаокса-3,6,19,24,37,40-гексаазадотетраконт-21-ин-1,42-диовой кислоты (1,30 г, 1,61 ммоль) в смеси DMA (10 мл) добавляли NHS (0,60 г, 5,21 ммоль) и EDC (1,95 г, 10,15 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя EtOAc/CH_2Cl_2 (от 1:4 до 2:1), с получением указанного в заголовке соединения (1,33 г, выход 83%, чистота ~ 95% по данным ВЭЖХ). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{42}H_{63}N_8O_{20}$ $[M+H]^+$ 999,40, найдено 999,95.

Пример 67. Синтез 2,3-бис(2-бромацетамидо)сукцинилдихлорида.

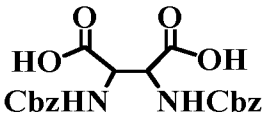


К 2,3-диаминоянтарной кислоте (5,00 г, 33,77 ммоль) в смеси ТГФ/H_2O/DIPEA (125 мл/125 мл/8 мл) добавляли 2-бромацетилбромид (25,0 г, 125,09 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, выпаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (H_2O/CH_3CN 5:95) с получением 2,3-бис(2-бромацетамидо)янтарной кислоты (9,95 г, выход 76%) в виде светло-желтое масло. ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_8H_{11}Br_2N_2O_6$ $[M+H]^+$ 388,89, найдено 388,68.

2,3-бис(2-бромацетамидо)янтарную кислоту (3,50 г, 9,02 ммоль) в дихлорметане (80 мл) добавляли оксалилдихлорид (5,80 г, 46,05 ммоль) и ДМФА (0,01 мл). Смесь перемешивали в течение 2,5 часов, разбавляли толуолом, упаривали и совместно упаривали с дихлорэтаном (2 х 20 мл) и толуолом (2 х 15 мл) досуха с получением 2,3-бис (2-бромацетамидо)сукцинилдихлорида в виде неочищенного продукта (который является нестабильным), который использовали для следующей стадии без дополнительной

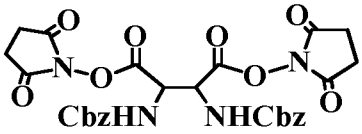
очистки (3,90 г, выход 102%). МС ЭСИ m/z рассч. для $C_8H_9Br_2Cl_2N_2O_4$ $[M+H]^+$ 424,82, найдено 424,90.

Пример 68. Синтез 2,3-бис(((бензилокси)карбонил)амино)янтарной кислоты.



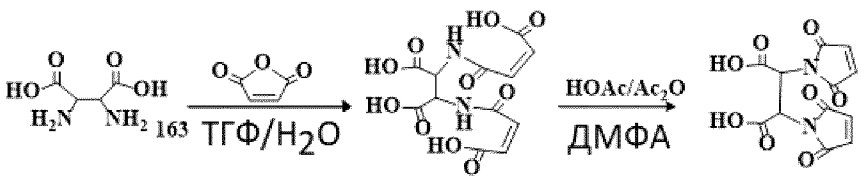
К раствору 2,3-диаминоянтарной кислоты (4,05 г, 27,35 ммоль) в смеси ТГФ (250 мл) и NaH_2PO_4 (0,1 М, 250 мл, pH 8,0) 4 порциями добавляли бензилкарбонохлоридат (15,0 г, 88,23 ммоль) в течение 2 часов. Смесь перемешивали в течение дополнительных 6 часов, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя смесью H_2O/CH_3CN (1:9), содержащей 1% муравьиную кислоту, с получением указанного в заголовке соединения (8,65 г, 76% выход, ~95% чистота). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{20}H_{21}N_2O_8$ $[M+H]^+$ 417,12, найдено 417,60.

Пример 69. Синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2,3-бис (((бензилокси)карбонил)амино)сукцината



К раствору 2,3-бис(((бензилокси)карбонил)амино)янтарной кислоты (4,25 г, 10,21 ммоль) в смеси DMA (70 мл) добавляли NHS (3,60 г, 31,30 ммоль) и EDC (7,05 г, 36,72 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя смесью $EtOAc/CH_2Cl_2$ (1: 6) с получением указанного в заголовке соединения (5,42 г, выход 87%, чистота ~ 95%). МС ЭСИ m/z рассч. Для $C_{28}H_{27}N_4O_{12}$ $[M+H]^+$ 611,15, найдено 611,60

Пример 70. Синтез 2,3-бис(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)янтарной кислоты.

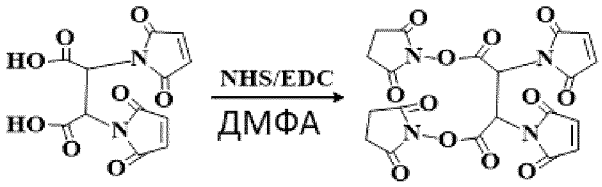


2,3-Диаминоянтарную кислоту (5,00 г, 33,77 ммоль) в смеси ТГФ/H_2O/DIPEA (125 мл/125 мл/2 мл) добавляли малеиновый ангидрид (6,68 г, 68,21 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали с получением 2,3-бис((Z)-3-

карбоксиакриламидо)янтарной кислоты (11,05 г, выход 99%) в виде белого твердого вещества. ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{12}H_{13}N_2O_{10}$ $[M+H]^+$ 345,05, найдено 345,35.

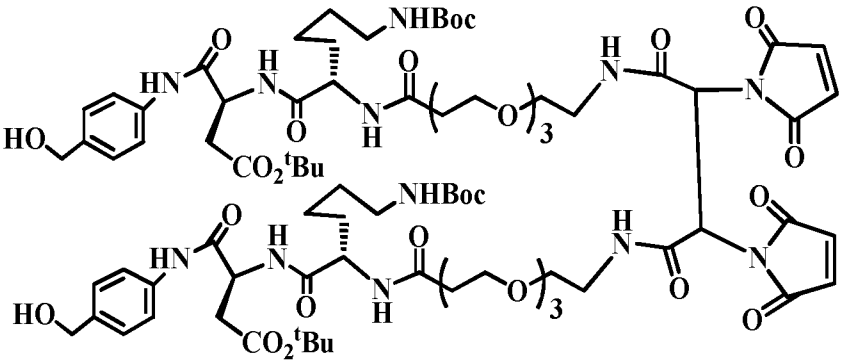
К 2,3-бис((Z)-3-карбоксиакриламидо)янтарной кислоте (11,05 г, 33,43 ммоль) в смеси раствора HOAc (70 мл), ДМФА (10 мл) и толуола (50 мл) добавляли уксусный ангидрид (30 мл). Смесь перемешивали в течение 2 часов, нагревали до кипения с насадкой Дина-Старка при 100 °C в течение 6 часов, упаривали, совместно упаривали с EtOH (2 x 40 мл) и толуолом (2 x 40 мл), и очищали на колонке с SiO_2, элюируя H_2O/CH_3CN (1:10) с получением указанного в заголовке соединения (7,90 г, 76% выход, ~95% чистота). МС ЭСИ m/z рассч. для $C_{12}H_9N_2O_8$ $[M+H]^+$ 309,03, найдено 309,30.

Пример 71. Синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2,3-бис(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)сукцината



К раствору 2,3-бис(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)янтарной кислоты (4,00 г, 12,98 ммоль) в смеси ДМФА (70 мл) добавляли NHS (3,60 г, 31,30 ммоль) и EDC (7,05 г, 36,72 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя $EtOAc/CH_2Cl_2$ (1: 6), с получением указанного в заголовке соединения (5,73 г, выход 88%, чистота ~ 96% по данным ВЭЖХ). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{20}H_{15}N_4O_{12}$ $[M+H]^+$ 503,06, найдено 503,45.

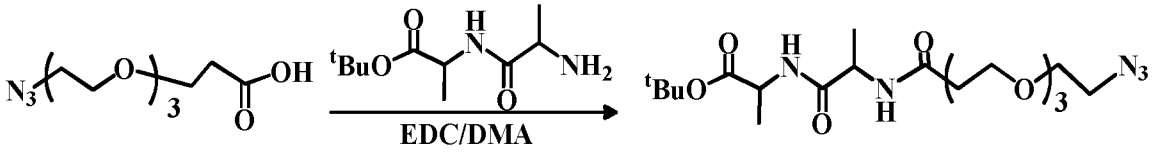
Пример 72. Синтез (3S,6S,39S,42S)-ди-трет-бутил 6,39-бис (4-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутил)-22,23-бис(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,42-бис((4-(гидроксиметил)фенил)карбамоил)-5,8,21,24,37,40-гексаоксо-11,14,17,28,31,34-гексаоксо-4,7,20,25,38,41-гексаазатетратетраконтан-1,44-диоата



К (14S,17S)-трет-бутил 1-амино-14-(4-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутил)-17-((4-(гидроксиметил)фенил)карбамоил)-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазанонадекан-19-оату

(1,43 г, 1,97 ммоль) и 2,3-бис(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)янтарной кислоте (0,30 г, 0,97 ммоль) в DMA (25 мл) добавляли EDC (1,30 г, 6,77 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали в вакууме, очищали на силикагеле, используя в качестве элюента смесь метанола (от 5% до 8%) в метиленхлориде с получением указанного в заголовке соединения (1,33 г, выход 80%). МС ЭСИ m/z $C_{82}H_{123}N_{12}O_{28}$ $[M+H]^+$, рассч. 1722,85, найдено 1722,98.

Пример 73. Синтез трет-бутил-1-азидо-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оата



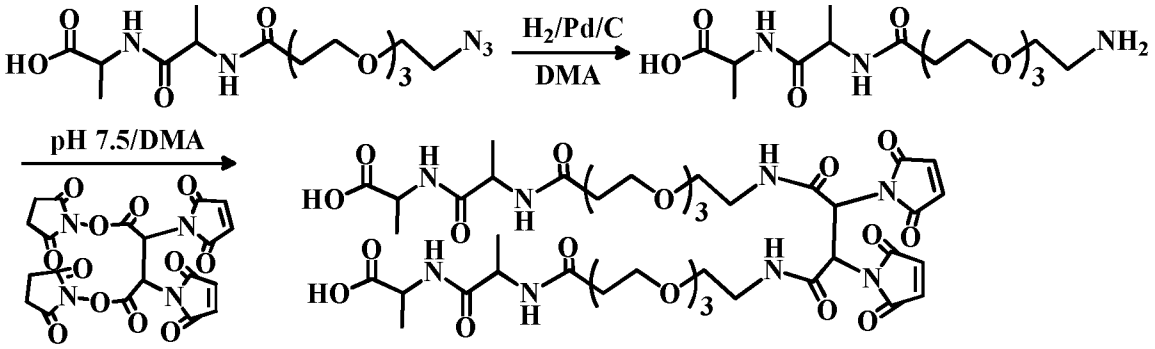
К раствору 3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)пропановой кислоты (1,55 г, 6,27 ммоль), трет-бутил 2-(2-аминопропанамидо)пропаноата (1,35 г, 6,27 ммоль) в смеси DMA (60 мл) добавляли EDC (3,05 г, 15,88 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя $EtOAc/CH_2Cl_2$ (1: 3), с получением указанного в заголовке соединения (2,42 г, выход 86%, чистота ~ 95% по данным ВЭЖХ). МС ЭСИ m/z рассч. Для $C_{19}H_{36}N_5O_7$ $[M+H]^+$ 446,25, найдено 446,60

Пример 74. Синтез 1-азидо-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оевой кислоты



К трет-бутил-1-азидо-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оату (2,20 г, 4,94 ммоль) в 1,4-диоксане (40 мл) добавляли HCl (12 М, 10 мл). Смесь перемешивали в течение 40 минут, разбавляли диоксаном (20 мл) и толуолом (40 мл), упаривали и выпаривали совместно с диоксаном (20 мл) и толуолом (40 мл) досуха с получением неочищенного указанного в заголовке продукта, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки (1,92 г, выход 100%, чистота ~ 94% по данным ВЭЖХ). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{15}H_{28}N_5O_7$ $[M+H]^+$ 390,19, найдено 390,45.

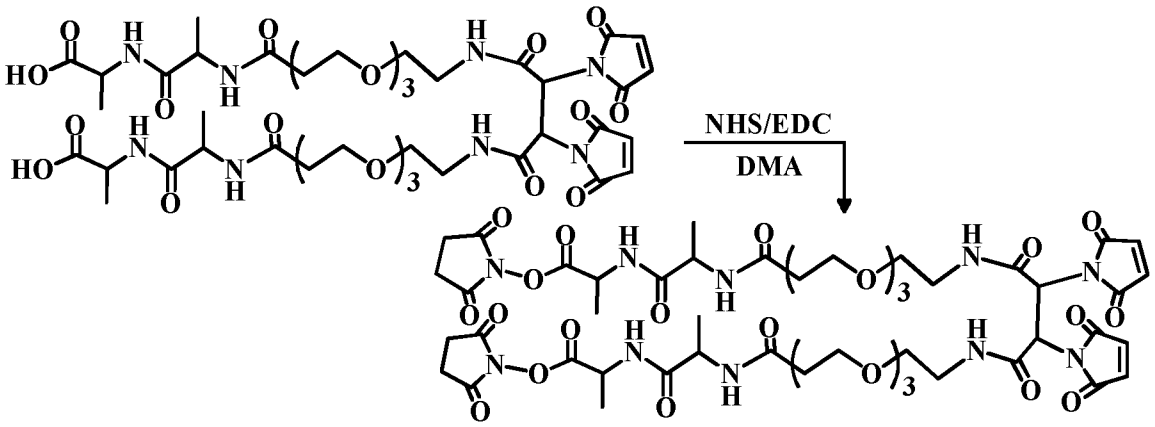
Пример 75. Синтез 21,22-бис(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-2,5,38,41-тетраметил-4,7,20,23,36,39 -гексаоксо-10,13,16,27,30,33-гексаокса-3,6,19,24,37,40-гексаазадотетраконтан-1,42-диовой кислоты.



1- К азидо-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оевой кислоте (1,90 г, 4,88 ммоль) в DMA (40 мл) добавляли Pd/C (0,20 г, 50% влажности). Систему вакуумировали и помещали под 2 атм газообразного водорода через реактор гидрирования при интенсивном перемешивании. Затем реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов при комнатной температуре и ТСХ показала израсходование исходных веществ. Неочищенную реакционную смесь пропускали через тонкий слой целита, промывая этанолом. Растворитель упаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, 1-амино-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оевой кислоты в DMA, который непосредственно использовали на следующей стадии. МС ЭСИ m/z+ $C_{15}H_{30}N_3O_7$ (M+H), рассч. 364,20, найдено 364,30.

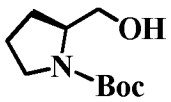
К амину в DMA (~ 30 мл) добавляли 0,1 М NaH2PO4, pH 7,5 (20 мл) с последующим добавлением бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2,3-бис(2,5- диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)сукцината (1,30 г, 2,59 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя смесью 8% воды с CH_3CN, с получением указанного в заголовке соединения (1,97 г, выход 81%). МС ЭСИ m/z+ $C_{42}H_{63}N_8O_{20}$ (M+H), рассч. 999,41, найдено 999,95.

Пример 76. Синтез бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 21,22-бис(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-2,5,38,41-тетраметил -4,7,20,23,36,39-гексаоксо-10,13,16,27,30,33-гексаокса-3,6,19,24,37,40-гексаазадотетраконтан-1,42-диоата



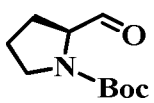
К раствору 21,22-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-2,5,38,41-тетраметил-4,7,20,23,36,39-гексаоксо-10,13,16,27,30,33-гексаокса-3,6,19,24,37,40-гексаазадотетраконтан-1,42-диовой кислоты (1,50 г, 1,50 ммоль) в смеси DMA (10 мл) добавляли NHS (0,60 г, 5,21 ммоль) и EDC (1,95 г, 10,15 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя $EtOAc/CH_2Cl_2$ (от 1:4 до 2:1), с получением указанного в заголовке соединения (1,50 г, выход 83%, чистота ~ 95% по данным ВЭЖХ).). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{50}H_{69}N_{10}O_{24}$ $[M+H]^+$ 1193,44, найдено 1193,95.

Пример 77. Синтез (S)-*трет*-бутил 2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбоксилата.



Boc-L-пролин (10,0 г, 46,4 ммоль), растворенный в 50 мл ТГФ, охлаждали до 0 °C, к которому осторожно добавляли BH_3 в ТГФ (1,0 М, 46,4 мл). Смесь перемешивали при 0 °C в течение 1,5 ч, затем выливали в ледяную воду и экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали при пониженном давлении, получая указанное в заголовке соединение (8,50 г, выход 91%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 3,94 (дд, J = 4,9, 2,7 Гц, 2H), 3,60 (ддд, J = 18,7, 11,9, 9,3 Гц, 2H), 3,49–3,37 (м, 1H), 3,34–3,23 (м, 1H), 2,06–1,91 (м, 1H), 1,89–1,69 (м, 2H), 1,65–1,51 (м, 1H), 1,49–0,40 (м, 9H).

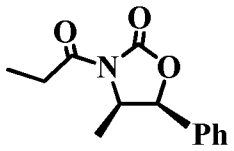
Пример 78. Синтез (S)-*трет*-бутил 2-формилпирролидин-1-карбоксилата.



К раствору (S)-*трет*-бутил 2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбоксилата (13,0 г, 64,6 ммоль) в диметилсульфоксиде (90 мл) добавляли триэтиламин (40 мл) и перемешивание продолжали в течение 15 минут. Смесь охлаждали на ледяной бане и

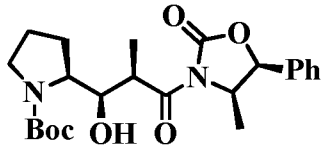
порциями в течение 40 минут добавляли комплекс триоксид серы с пиридином (35,98 г, 226 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2,5 ч. После добавления льда (250 г), смесь экстрагировали дихлорметаном (150 мл × 3). Органическую фазу промывали 50%-ным раствором лимонной кислоты (150 мл), водой (150 мл), насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (150 мл) и насыщенным раствором хлорида натрия (150 мл), сушили над безводным Na_2SO_4. Удаление растворителя в вакууме давало указанный в заголовке альдегид (10,4 г, 81% выход) в виде густого масла, которое использовали без дальнейшей очистки. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 9,45 (с, 1H), 4,04 (с, 1H), 3,53 (дд, J = 14,4, 8,0 Гц, 2H), 2,00-1,82 (м, 4H), 1,44 (д, J = 22,6 Гц, 9H).

Пример 79. Синтез (4R,5S)-4-метил-5-фенил-3-пропионилоксазолидин-2-она.



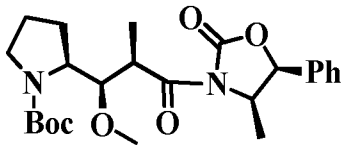
н- Бутиллитий в гексане (21,6 мл, 2,2 М, 47,43 ммоль) добавляли по каплям при -78 °C к перемешиваемому раствору 4-метил-5-фенилоксазолидин-2-она (8,0 г, 45,17 ммоль) в ТГФ (100 мл) под N_2. Раствор выдерживали при -78 °C в течение 1 часа, затем медленно добавляли пропионилхлорид (4,4 мл, 50,59 ммоль). Реакционную смесь нагревают до -50 °C, перемешивали в течение 2 часов, затем добавляли насыщенный раствор хлорида аммония (100 мл). Органический растворитель удаляли в вакууме и полученный раствор экстрагировали этилацетатом (3 × 100 мл). Органический слой промывали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (100 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл), сушили над Na_2SO_4, фильтровали и упаривали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией (20% этилацетат/смесь изомеров гексана) с получением указанного в заголовке соединения в виде густого масла (10,5 г, выход 98%). 1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,45-7,34 (м, 3H), 7,30 (д, J = 7,0 Гц, 2H), 5,67 (д, J = 7,3 Гц, 1H), 4,82-4,70 (м, 1H), 2,97 (дд, J = 19,0, 7,4 Гц, 2H), 1,19 (т, J = 7,4 Гц, 3H), 0,90 (д, J = 6,6 Гц, 3H).

Пример 80. Синтез (S)-*трет*-бутил 2-((1R, 2R)-1-гидрокси-2-метил-3-((4R, 5S)-4-метил-2-оксо-5-фенилоксазолидин-3-ил)-3-оксопропил) пирролидин-1-карбоксилата.



К раствору (4R, 5S)-4-метил-5-фенил-3-пропионилоксазолидин-2-она (9,40 г, 40,4 ммоль) в дихлорметане (60 мл) добавляли Et_3N (6,45 мл, 46,64 ммоль) при 0 °C с последующим добавлением 1M трифлата дибутилборона в дихлорметане (42 мл, 42 ммоль). Смесь перемешивали при 0 °C в течение 45 минут, охлаждали до -70 °C, затем медленно добавляли (S)-*трет*-бутил 2-формилпирролидин-1-карбоксилат (4,58 г, 22,97 ммоль) в дихлорметане (40 мл) в течение 30 минут. Реакционную смесь перемешивали при -70 °C в течение 2 часов, при 0 °C в течение 1 часа и при комнатной температуре 15 мин, а затем добавляли фосфатный буферный раствор (pH 7,38 мл). После добавления MeOH-30% H_2O_2 (2:1, 100 мл) при температуре ниже 10 °C и перемешивали в течение 20 минут, добавляли воду (100 мл) и смесь упаривали в вакууме. К остатку добавляли дополнительное количество воды (200 мл) и смесь экстрагировали этилацетатом (3 × 100 мл). Органический слой промывали 1 н $KHSO_4$ (100 мл), раствором гидракарбоната натрия (100 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (10-50% этилацетат/смесь изомеров гексана) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (7,10 г, выход 71%). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,39 (дт, J = 23,4, 7,1 Гц, 3H), 7,30 (д, J = 7,5 Гц, 2H), 5,67 (д, J = 7,1 Гц, 1H), 4,84-4,67 (м, 1H), 4,08-3,93 (м, 3H), 3,92-3,84 (м, 1H), 3,50 (д, J = 9,0 Гц, 1H), 3,24 (д, J = 6,7 Гц, 1H), 2,15 (с, 1H), 1,89 (дд, J = 22,4, 14,8 Гц, 3H), 1,48 (д, J = 21,5 Гц, 9H), 1,33 (д, J = 6,9 Гц, 3H), 0,88 (д, J = 6,4 Гц, 3H).

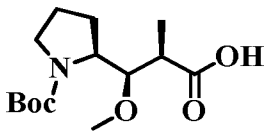
Пример 81. Синтез (S)-*трет*-бутил 2-((1R, 2R)-1-метокси-2-метил-3-((4R, 5S)-4-метил-2-оксо-5-фенилоксазолидин-3-ил)-3-оксопропил) пирролидин-1-карбоксилата.



К смеси (S)-*трет*-бутил 2-((1R, 2R)-1-гидрокси-2-метил-3-((4R, 5S)-4-метил-2-оксо-5-фенилоксазолидин-3-ил)-3-оксопропил) пирролидин-1-карбоксилата (5,1 г, 11,9 ммоль) и молекулярные сита (4 Å, 5 г) добавляли безводный дихлорэтан (30 мл) в атмосфере N_2. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут и охлаждали до 0 °C. Добавляли протонную губку (6,62 г, 30,9 ммоль), а затем тетрафторборат триметилоксония (4,40 г, 29,7 ммоль). Перемешивание продолжали в течение 2 часов при 0 °C и 48 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат упаривали, и очищали с помощью колоночной хроматографии (20-70% этилацетат/смесь изомеров гексана) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого

твердого вещества (1,80 г, 35% выход). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,46-7,27 (м, 5H), 5,65 (с, 1H), 4,69 (с, 1H), 3,92 (с, 1H), 3,83 (с, 1H), 3,48 (s, 3H), 3,17 (с, 2H), 2,02-1,68 (м, 5H), 1,48 (д, J = 22,3 Гц, 9H), 1,32 (т, J = 6,0 Гц, 3H), 0,91 - 0,84 (м. 3H).

Пример 82. Синтез (2R,3R)-3-((S)-1-(*трет*-бутоксикарбонил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропановой кислоты.



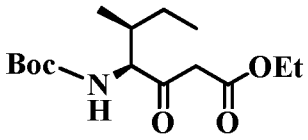
К раствору (S)-*трет*-бутил 2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-((4R,5S)-4-метил-2-оксо-5-фенилоксазолидин-3-ил)-3-оксопропил)пирролидин-1-карбоксилата (1,80 г, 4,03 ммоль) в ТГФ (30 мл) и H_2O (7,5 мл) добавляли 30% H_2O_2 (1,44 мл, 14,4 ммоль) в течение 5 минут при 0 °C, затем добавляли раствор LiOH (0,27 г, 6,45 ммоль) в воде (5 мл). После перемешивания при 0 °C в течение 3 часов добавляли 1 н сульфит натрия (15,7 мл) и смеси оставляли нагреться до комнатной температуры, и перемешивали в течение ночи. ТГФ удаляли в вакууме и водную фазу промывали дихлорметаном (3 × 50 мл) для удаления дополнительного оксазолидинона. Водную фазу подкисляли до pH 3 с помощью 1 н HCl и экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл). Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над Na2SO4, фильтровали и упаривали в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде бесцветного масла (1,15 г, выход 98%). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 3,99 – 3,74 (м, 2H), 3,44 (д, J = 2,6 Гц, 3H), 3,23 (с, 1H), 2,60 – 2,45 (м, 1H), 1,92 (тт, J = 56,0, 31,5 Гц, 3H), 1,79 – 1,69 (м, 1H), 1,58 – 1,39 (м, 9H), 1,30 – 1,24 (м, 3H).

Пример 83. Синтез (2R, 3R)-метил 3-метокси-2-метил-3-((S)-пирролидин-2-ил)пропаноата



К раствору (2R, 3R)-3-((S)-1-(*трет*-бутоксикарбонил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропановой кислоты (0,86 г, 2,99 ммоль) в MeOH (10 мл) медленно добавляли тионилхлорид (1,08 мл, 14,95 ммоль) при 0□. Затем реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Смесь упаривали в вакууме и выпаривали совместно с толуолом, получая указанное в заголовке соединение (0,71 г, выход 100%) в виде белого твердого вещества, которое немедленно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МСВР (масс-спектрометрия высокого разрешения) (ЭСИ) m/z рассч. для $C_{10}H_{20}NO_3$ [M+H]+: 202,14, найдено: 202,14.

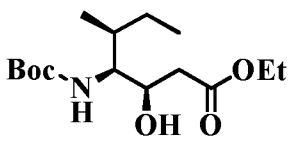
Пример 84. Синтез (4S,5S)-этил 4-((*трет*-бутоксикарбониламино)-5-метил-3-оксогептаноата.



К охлажденному льдом раствору N-Boc-L-изолейцина (4,55 г, 19,67 ммоль) в ТГФ (20 мл) добавляли 1,1'-карбонилдиимидазол (3,51 г, 21,63 ммоль). После прекращения выделения газа полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3,5 часов.

Раствор свежеприготовленного изопропилмагний бромида в ТГФ (123 ммоль, 30 мл) по каплям добавляли к предварительно охлажденному (0 °C) раствору этил гидроген малонат (6,50 г, 49,2 ммоль) с такой скоростью, чтобы поддерживать внутреннюю температуру ниже 5 °C. Смесь перемешивали при к. т. в течение 1,5 ч. Данный раствор енолята магния затем охлаждали на ледяной бане, с последующим постепенным добавлением раствора имидазолида в течение 1 часа через двустороннюю иглу-переходник при 0 °C. Полученную смесь перемешивали при 0 °C в течение 30 минут, затем при к.т. в течение 64 часов. В реакционную смесь добавляли 10% водный раствор лимонной кислоты (5 мл) и подкисляли до pH 3 с помощью дополнительного количества 10% водного раствора лимонной кислоты (110 мл). Смесь экстрагировали этилацетатом (3 × 150 мл). Органические экстракты промывали водой (50 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (50 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, используя смесь этилацетат/гексан (1: 4) в качестве элюента, с получением указанного в заголовке соединения (5,50 г, выход 93%). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 5,04 (д, *J* = 7,8 Гц, 1H), 4,20 (п, *J* = 7,0 Гц, 3H), 3,52 (т, *J* = 10,7 Гц, 2H), 1,96 (д, *J* = 3,7 Гц, 1H), 1,69 (с, 2H), 1,44 (с, 9H), 1,28 (дд, *J* = 7,1, 2,9 Гц, 3H), 0,98 (т, *J* = 6,9 Гц, 3H), 0,92 – 0,86 (м, 3H).

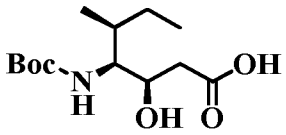
Пример 85. Синтез (3R,4S,5S)-этил 4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-3- гидрокси-5-метилгептаноата.



К раствору (4S,5S)-этил 4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-5-метил-3-оксогептаноата (5,90 г, 19,83 ммоль) в этаноле (6 мл) при -60 °C добавляли одной порцией боргидрид натрия (3,77 г, 99,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 5,5 часов при

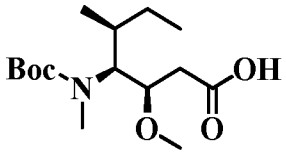
температуре ниже -55 °C, затем добавляли 10% водный раствор лимонной кислоты (100 мл). Полученный раствор подкисляли до pH 2 с помощью дополнительного количества 10% водной лимонной кислоты с последующей экстракцией этилацетатом (3 × 100 мл). Органические экстракты промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (10-50% этилацетат/гексан), получая чистое указанное в заголовке соединение в виде диастереомера (2,20 г, 37% выход) и смесь двух диастереомеров (2,0 г, 34% выход, соотношение около 9:1). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 4,41 (д, J = 9,3 Гц, 1H), 4,17 (тт, J = 7,1, 3,6 Гц, 2H), 4,00 (т, J = 6,9 Гц, 1H), 3,55 (дд, J = 11,7, 9,3 Гц, 1H), 2,56 – 2,51 (м, 2H), 2,44 (дд, J = 16,4, 9,0 Гц, 1H), 1,79 (д, J = 3,8 Гц, 1H), 1,60 – 1,53 (м, 1H), 1,43 (с, 9H), 1,27 (дд, J = 9,3, 5,0 Гц, 3H), 1,03 – 0,91 (м, 7H).

Пример 86. Синтез (3R,4S,5S)-4-((*трет*-бутоксикарбониламино)-3-гидрокси -5-метилгептановой кислоты.



К раствору (3R,4S,5S)-этил-4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-3-гидрокси-5-метилгептаноата (2,20 г, 7,20 ммоль) в этаноле (22 мл) добавляли 1 н водный раствор гидроксид натрия (7,57 мл, 7,57 ммоль). Смесь перемешивали при 0 °C в течение 30 минут, затем при к.т. в течение 2 ч. Полученный раствор подкисляли до pH 4 добавлением 1 н водным раствором соляной кислоты, который затем экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл). Органические экстракты промывали 1 н. водным раствором гидросульфата калия (50 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме, получая соединение (1,90 г, выход 95%). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 4,50 (д, J = 8,7 Гц, 1H), 4,07 (д, J = 5,5 Гц, 1H), 3,59 (д, J = 8,3 Гц, 1H), 2,56 – 2,45 (м, 2H), 1,76 – 1,65 (м, 1H), 1,56 (д, J = 7,1 Гц, 1H), 1,45 (с, 9H), 1,26 (т, J = 7,1 Гц, 3H), 0,93 (дд, J = 14,4, 7,1 Гц, 6H).

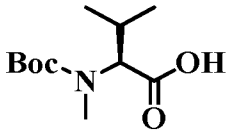
Пример 87. Синтез (3R,4S,5S)-4-((*трет*-бутоксикарбонил)(метил)амино)- 3-метокси-5-метилгептановой кислоты.



К раствору (3R,4S,5S)-4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-3-гидрокси-5-метилгептановой кислоты (1,90 г, 6,9 ммоль) в ТГФ (40 мл) добавляли гидрид натрия (60%

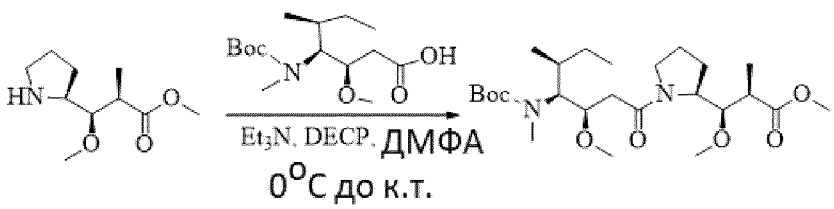
масляная суспензия, 1,93 г, 48,3 ммоль) при 0 °С. После перемешивания в течение 1 часа, добавляли метилйодид (6,6 мл, 103,5 ммоль). Перемешивание продолжали при 0 °С в течение 40 часов до добавления насыщенного водного раствора гидрокарбоната натрия (50 мл), затем добавляли воду (100 мл). Смесь промывали диэтиловым эфиром (2 × 50 мл) и водный слой подкисляли до pH 3 с помощью 1 н водным раствором гидросульфата калия, затем экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл). Объединенные органические экстракты промывали 5% водным тиосульфатом натрия (50 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (1,00 г, 48% выход). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 3,95 (д, J = 75,4 Гц, 2H), 3,42 (д, J = 4,4 Гц, 3H), 2,71 (с, 3H), 2,62 (с, 1H), 2,56 – 2,47 (м, 2H), 1,79 (с, 1H), 1,47 (с, 1H), 1,45 (д, J = 3,3 Гц, 9H), 1,13 – 1,05 (м, 1H), 0,96 (д, J = 6,7 Гц, 3H), 0,89 (тд, J = 7,2, 2,5 Гц, 3H).

Пример 88. Синтез Boc-N-Me-L-Val-OH.



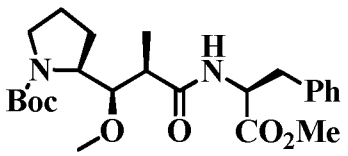
К раствору Boc-L-Val-OH (2,00 г, 9,2 ммоль) и метилйодида (5,74 мл, 92 ммоль) в безводном ТГФ (40 мл) добавляли гидрид натрия (3,68 г, 92 ммоль) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 1,5 ч, затем нагревали до к.т. и перемешивали в течение 24 ч. В реакционную смесь добавляли ледяную воду (50 мл). После добавления воды (100 мл) реакционную смесь промывали этилацетатом (3 × 50 мл) и водный раствор подкисляли до pH 3, затем экстрагировали этилацетатом (3 × 50 мл). Объединенную органическую фазу сушили над Na_2SO_4 и упаривали, получая Boc-N-Me-Val-OH (2,00 г, выход 94%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 4,10 (д, J = 10,0 Гц, 1H), 2,87 (с, 3H), 2,37 – 2,13 (м, 1H), 1,44 (д, J = 26,7 Гц, 9H), 1,02 (д, J = 6,5 Гц, 3H), 0,90 (т, J = 8,6 Гц, 3H).

Пример 89. Синтез (2R, 3R)-метил 3-((S)-1-((3R, 4S, 5S)-4-((трет-бутоксикарбонил)-(метил) амино)-3-метокси-5-метилгептаноил) пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропаноата.



К раствору (2R, 3R)-метил-3-метокси-2-метил-3-((S)-пирролидин-2-ил)пропаноата (0,71 г, 2,99 ммоль) и (3R, 4S, 5S)-4-((трет-бутоксикарбонил)(метил)амино)-3-метокси-5-метилгептановой кислоты (1 г, 3,29 ммоль) в ДМФА (10 мл) при 0 °С добавляли диэтилцианофосфонат (545 мкл, 3,59 ммоль), затем добавляли Et_3N (1,25 мл, 8,99 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 2 часов, затем нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (50 мл), промывали 1 н водным раствором гидросульфата калия (20 мл), водой (20 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (20 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (20 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя смесью этилацетат/гексан (от 1: 5 до 2: 1), с получением указанного в заголовке белого твердого вещества (0,9 г, выход 62%). МСВР (ЭСИ) m/z рассчит. для $C_{25}H_{46}N_2O_7$ [M+H]+: 487,33, найдено: 487,32.

Пример 90. Синтез (S)-*трет*-бутил 2-((1R,2R)-1-метокси-3-(((S)-1- метокси-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-карбоксилата.

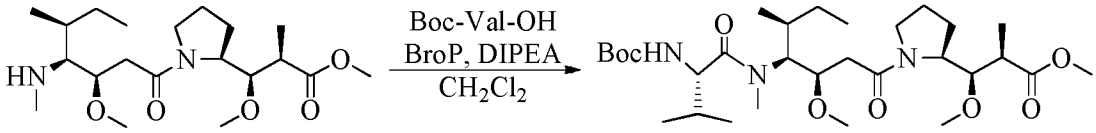


К раствору (2R,3R)-3-((S)-1-(*трет*-бутоксикарбонил)пирролидин-2-ил)-3-метокси -2-метилпропановой кислоты (100 мг, 0,347 ммоль) и гидрохлорид L-фенилаланинметилового эфира (107,8 мг, 0,500 ммоль) в ДМФА (5 мл) при 0 °С добавляли диэтилцианофосфонат (75,6 мкл, 0,451 ммоль), затем Et_3N (131 мкл, 0,94 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 2 часов, затем нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Затем реакционную смесь разбавляли этилацетатом (80 мл), промывали 1 н водным раствором гидросульфата калия (40 мл), водой (40 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (40 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (40 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали in vacuo. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (15-75% этилацетат/смесь изомеров гексана) с получением указанного в заголовке соединения (130 мг, 83% выход) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,28 (дд, *J* = 7,9, 6,5 Гц, 2H), 7,23 (т, *J* = 7,3 Гц, 1H), 7,16 (с, 2H), 4,81 (с, 1H), 3,98 – 3,56 (м, 5H), 3,50 (с, 1H), 3,37 (д, *J* = 2,9 Гц, 3H), 3,17 (дд, *J* = 13,9, 5,4 Гц, 2H), 3,04 (дд, *J* = 14,0, 7,7 Гц, 1H), 2,34 (с, 1H), 1,81 – 1,69 (м, 2H), 1,65 (с, 3H), 1,51 – 1,40 (м, 9H), 1,16 (д, *J* = 7,0 Гц, 3H).

Пример 91. Общая процедура удаления функциональных групп Boc с помощью трифторуксусной кислоты.

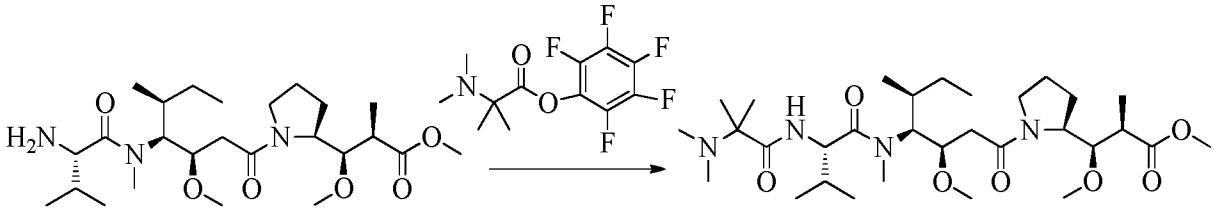
К раствору *N*-Boc аминокислоты (1,0 ммоль) в метиленхлориде (2,5 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (1,0 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 1-3 часов, реакционную смесь упаривали in vacuo. Совместное упаривание с толуолом давало незащищенный продукт, который использовали без какой-либо дополнительной очистки.

Пример 92. Синтез (2R, 3R)-метил 3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-N,3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропаноата



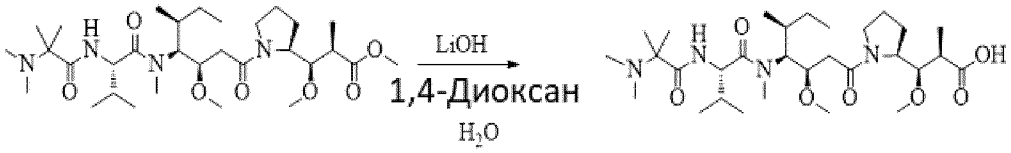
К раствору продукта (2R,3R)-метил 3-метокси-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-3-метокси-5-метил-4-(метиламино)гептаноил)пирролидин-2-ил)-2-метилпропаноата (715 мг, 1,85 ммоль) без защитных групп и Boc-Val-OH (1,2 г, 5,56 ммоль) в ДХМ (20 мл) при 0 □ добавляли BroP (1,08 г, 2,78 ммоль), затем добавляли диизопропилэтиламин (1,13 мл, 6,48 ммоль). Смесь закрывали от света и перемешивали при 0 °C в течение 30 минут, затем при комнатной температуре в течение 48 часов. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (50 мл), промывали 1 н водным раствором гидросульфата калия (20 мл), водой (20 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (20 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (20 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя смесью этилацетат/гексан (от 1:5 до 4:1) с получением указанного в заголовке соединения (0,92 г, 85% выход) в виде белого твердого вещества. МСВР (ЭСИ) m /z рассчит. для $C_{30}H_{55}N_3O_8$ [M+H]+: 586,40, найдено: 586,37.

Пример 93. Синтез (2R,3R)-метил 3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N, 3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил) пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропаноата



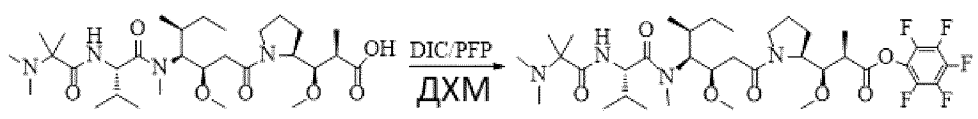
К раствору незащищенного продукта (2R, 3R)-метил 3-((S)-1-((3R, 4S, 5S)-4-((S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-N, 3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропаноата (50 мг, 0,085 ммоль) и перфторфенил 2-(диметиламино)-2-метилпропаноата (74,5 мг, 0,25 ммоль) в ДМФА (2 мл) при 0□ добавляли DIPEA (44 мкл, 0,255 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (30 мл), промывали водой (10 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (10 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью этилацетат/гексан (от 1:5 до 5:1), с получением указанного в заголовке соединения (50 мг, выход 100%). МСВР (ЭСИ) m/z рассчит. для $C_{31}H_{58}N_4O_7$ [M+H]+: 599, найдено: 599.

Пример 94. Синтез (2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N, 3 -диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропановой кислоты



К раствору (2R,3R)-метил 3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N,3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропаноата (50 мг, 0,0836 ммоль) в 1,4-диоксане (3 мл) при 0-4 °C по каплям в течение 5 минут добавляли раствор гидроксида лития (14 мг, 0,334 ммоль) в воде (3 мл). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 часов. Смесь подкисляли до pH 7 с помощью 1 н HCl и упаривали в вакууме, а затем использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МСВР (ЭСИ) m /z рассчит. для $C_{30}H_{57}N_4O_7$ [M+H]+: 585,41, найдено: 585,80.

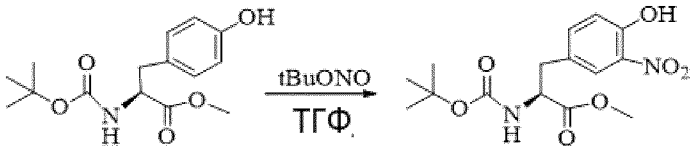
Пример 95. Синтез (2R, 3R)-перфторфенил 3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N,3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил) пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропаноата



К раствору (2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N,3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-

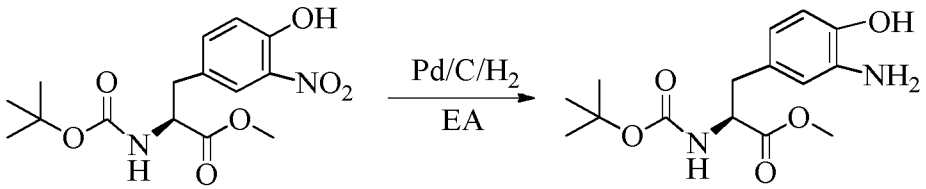
2-ил)-3-метокси-2-метилпропановой кислоты (0,0836 ммоль) и PFP (18,5 мг, 0,1 ммоль) в ДХМ (2 мл) добавляли DIC (12,7 мг, 0,1 ммоль) при 0 °C. Смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь упаривали в вакууме и использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки. МСВР (ЭСИ) m/z рассчит. для $C_{36}H_{56}F_5N_4O_7$ [M+H]+: 751,40, найдено: 751,70.

Пример 96. Синтез (S)-метил 2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(4-гидрокси-3-нитрофенил)пропаноата



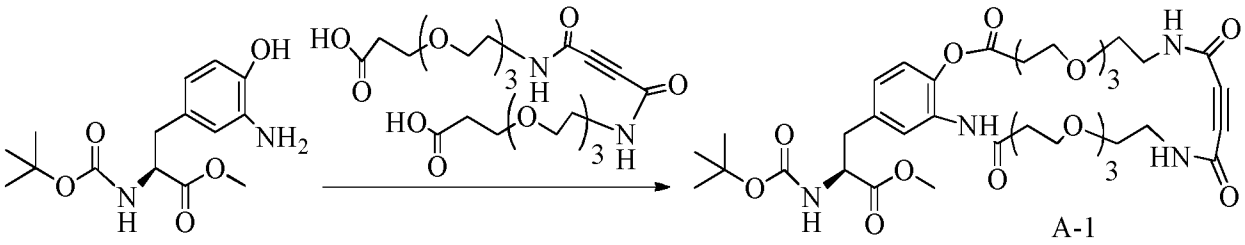
К раствору метилового эфира Boc-L-тирозина (5 г, 16,9 ммоль) в ТГФ (50 мл) добавляли трет-бутилнитрит (10 мл, 84,6 ммоль), затем реакционную смесь перемешивали в течение 5 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, используя этилацетат/гексан (от 1:10 до 1:5), с получением соединения (4,5 г, выход 78%) в виде желтого твердого вещества. МСВР (ЭСИ) m /z рассчит. для $C_{15}H_{21}N_2O_7$ [M+H]+: 341,13, найдено: 341,30.

Пример 97. Синтез (S)-метил 3-(3-амино-4-гидроксифенил)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропаноата



К раствору (S)-метил 3-(3-амино-4-гидроксифенил)-2-(трет-бутоксикарбониламино)пропаноата (2 г, 6,44 ммоль) в этилацетате (20 мл) добавляли Pd/C (0,2 г) и перемешивали в течение 2 ч в атмосфере водорода. Смесь фильтровали и фильтрат упаривали в вакууме, получая указанное в заголовке соединение (1,7 г, выход 95%) в виде белого твердого вещества. МСВР (ЭСИ) m/z рассчит. для $C_{15}H_{23}N_2O_5$ [M+H]+: 311,15, найдено: 311,30.

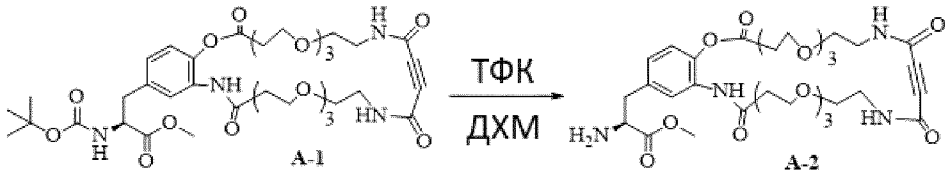
Пример 98. Синтез Соединения A-1



A-1

К раствору 14,17-диоксо-4,7,10,21,24,27-гексаокса-13,18-диазатриаконт-15-ин-1,30-диовой кислоты (95 мг, 0,182 ммоль) и (S)-метил 3-(3-амино-4-гидроксифенил)-2-(трет-бутоксикарбониламино) пропаноата (56,6 мг, 0,182 ммоль) в ДМФА (5 мл) при 0 °C и добавляли EDC (128,5 мг, 0,338 ммоль), с последующим добавлением DIPEA (64 мкл, 0,365 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Смесь разбавляли этилацетатом (30 мл), промывали водой (10 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (10 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя смесью ДХМ/MeOH (от 20:1 до 10:1), с получением соединения A-1 (68 мг, выход 47%). МСВР (ЭСИ) m /z рассчит. для $C_{37}H_{55}N_4O_{15}$ [M+H]+: 795,36, найдено: 795,30.

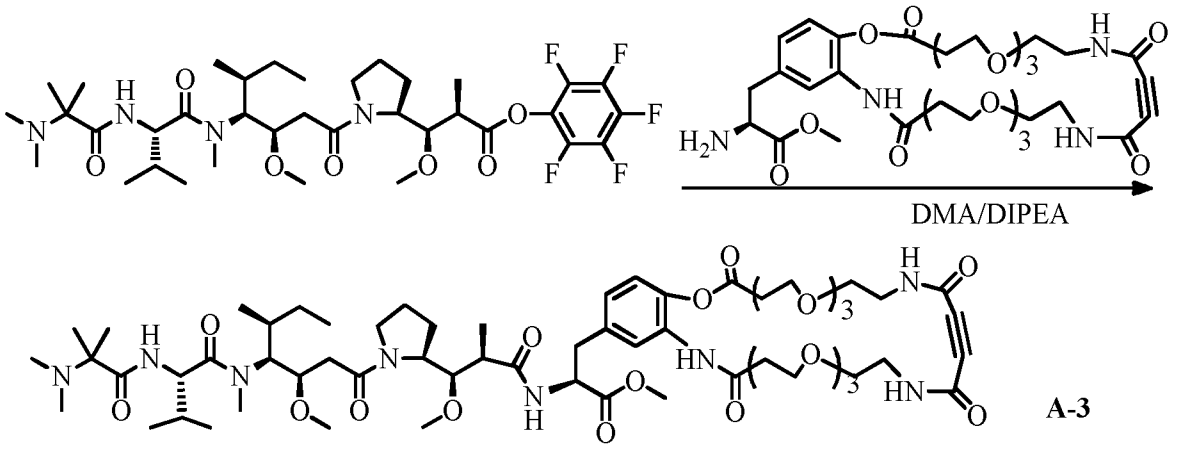
Пример 99. Синтез Соединения A-2



A-1 A-2

К раствору соединения **A-1** (32 мг, 0,04 ммоль) в ДХМ (3 мл) добавляли ТФК (1 мл) при 0 °C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 30 минут, разбавляли толуолом, концентрировали, выпаривали совместно с толуолом, а затем использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МСВР (ЭСИ) m/z рассчит. для $C_{33}H_{47}N_4O_{15}$ [M+H]+: 795,36, найдено: 795,30.

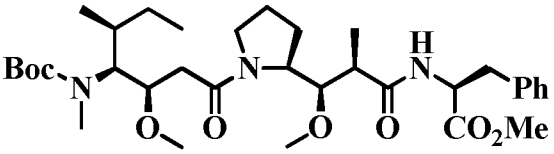
Пример 100. Синтез Соединения A-3



A-3

К раствору (2R, 3R)-перфторфенил 3-((S)-1-((3R, 4S, 5S)-4-((S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N,3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил) пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропаноата (20 мг, 0,027 ммоль) и соединения **A-2** (31,7 мг, 0,04 ммоль) в DMA (2 мл) добавляли DIPEA (9 мкл, 0,053 ммоль) при 0 °C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 30 минут. Смесь упаривали в вакууме и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (C-18, 250 мм × 10 мм, элюировали H_2O/CH_3CN (9 мл/мин, от 90% воды до 40% воды за 40 минут) с получением соединения **A-3** (14 мг, 42% выход). МСВР (ЭСИ) m /z рассчит. для $C_{62}H_{101}N_8O_{19}$ [M+H]+: 1261,71 найдено: 1261,30.

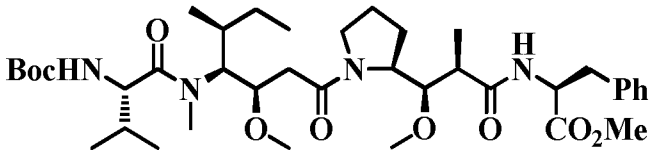
Пример 101. Синтез (S)-метил 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((*трет*-бутоксикарбонил)(метил)амино)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата.



К раствору Boc-незащищенного продукта (S)-*трет*-бутил 2-((1R,2R)-1-метокси-3-(((S)-1- метокси-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-карбоксилата (0,29 ммоль) и (3R,4S,5S)-4-((*трет*-бутоксикарбонил)(метил)амино)- 3-метокси-5-метилгептановой кислоты (96,6 мг, 0,318 ммоль) в ДМФА (5 мл) при 0 °C добавляли диэтилцианофосфонат (58 мкл, 0,347 ммоль), затем добавляли Et_3N (109 мкл, 0,78 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 2 часов, затем нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (80 мл), промывали 1 н водным раствором гидросульфата калия (40 мл), водой (40 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (40 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (40 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (15-75%

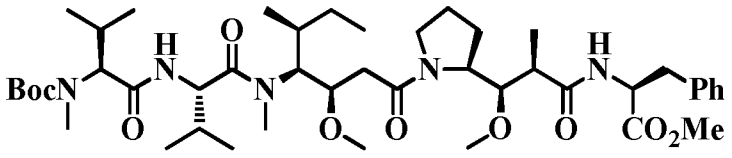
этилацетат/смесь изомеров гексана) с получением указанного в заголовке соединения (150 мг, выход 81%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС (ЭСИ) m/z рассч. для $C_{34}H_{55}N_3O_8$ $[M+H]^+$: 634,40, найдено: 634,40.

Пример 102. Синтез (S)-метил 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-*N*,3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата.



К раствору Boc-незащищенного продукта (S)-метил 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((*трет*-бутоксикарбонил)(метил)амино)-3-метокси-5-метилгептаноил)-пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата (0,118 ммоль) и Boc-Val-OH (51,8 мг, 0,236 ммоль) в ДХМ (5 мл) при 0 °C добавляли BroP (70,1 мг, 0,184 ммоль), затем добавляли диизопропилэтиламин (70 мкл, 0,425 ммоль). Смесь защищали от света и перемешивали при 0 °C в течение 30 минут, затем при комнатной температуре в течение 2 дней. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (80 мл), промывали 1 н водным раствором гидросульфата калия (40 мл), водой (40 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (40 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (40 мл), сушили над Na_2SO_4 и упаривали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (20-100% этилацетат/смесь изомеров гексана) с получением указанного в заголовке соединения (67 мг, 77% выход) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС (ЭСИ) m/z рассч. для $C_{39}H_{64}N_4O_9$ $[M+H]^+$: 733,47, найдено: 733,46.

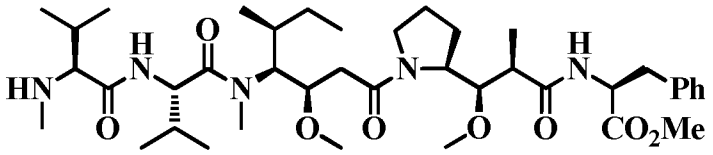
Пример 103. Синтез (S)-метил 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((6S,9S,12S, 13R)-12-((S)-втор-бутил)-6, 9-диизопропил-13-метокси-2,2,5,11-тетраметил-4,7,10-триоксо-3-окса-5,8,11-триазапентадекан-15-оил) пирролидин-2-ил)-3 метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата.



К раствору Boc-незащищенного продукта (S)-метил 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-*N*,3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата (0,091 ммоль) и Boc-N-Me-Val-OH (127 мг, 0,548 ммоль) в ДМФА (5 мл) при 0 °C добавляли диэтилцианофосфонат (18,2 мкл, 0,114 ммоль), затем добавляли *N*-

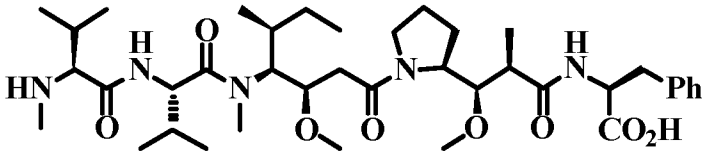
метилморфолин (59 мкл, 0,548 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 2 часов, затем нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (80 мл), промывали 1 н водным раствором гидросульфата калия (40 мл), водой (40 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (40 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (40 мл), сушили над сульфатом натрия и упаривали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (20-100% этилацетат/смесь изомеров гексана) с получением указанного в заголовке соединения (30 мг, выход 39%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС (ЭСИ) m/z рассч. для $C_{45}H_{75}N_5O_{10}$ $[M+H]^+$: 846,55, найдено: 846,56.

Пример 104. Синтез (S)-метил 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метиламино)бутанамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метил-гептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата.



К раствору (S) -метил 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((6S,9S,12S,13R)-12-((S) -втор-бутил)-6,9-диизопропил-13-метокси-2,2,5,11-тетраметил-4,7,10-триоксо-3-окса-5,8,11-триазапентадекан-15-оил) пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата (75,0 мг, 0,0886 ммоль) в метиленхлориде (5 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (2 мл) при комнатной температуре. После перемешивания при комнатной температуре в течение 1 часа реакционную смесь упаривали в вакууме. Совместное выпаривание с толуолом давало указанный в заголовке незащищенный продукт, который использовали без дальнейшей очистки.

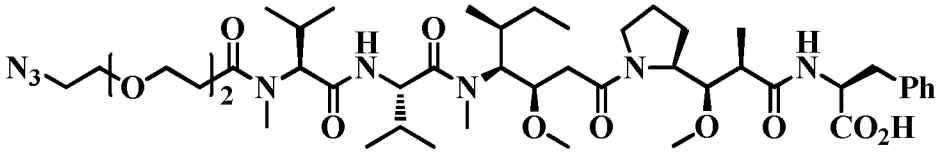
Пример 105. Синтез (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N, 3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метиламино)бутанамидо) бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил) пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановой кислоты.



(S)-метил 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метиламино)бутанамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метил-гептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноат (25 мг, 0,030 ммоль) в смеси конц. HCl (0,3 мл) и 1,4-диоксана (0,9 мл) перемешивали при к.т. в течение 35 минут. Смесь разбавляли EtOH (1,0 мл) и толуолом (1,0 мл), упаривали и совместно упаривали с

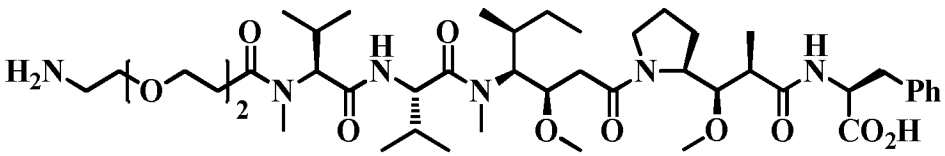
EtOH/толуолом (2:1) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (22 мг, ~100% выход), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС (ЭСИ) m/z рассч. для $C_{39}H_{66}N_5O_8$ $[M+H]^+$: 732,48, найдено: 732,60.

Пример 106. Синтез (2S)-2-((2R,3R)-3-((2S)-1-((11S,14S,17S)-1-азидо-17-((R)-втор-бутил)-11,14-диизопропил-18-метокси-10,16-диметил-9,12,15-триоксо-3,6-диокса-10,13,16-триазакосан-20-оил) пирролидин-2-ил)- 3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановой кислоты.



К неочищенной (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метиламино)бутанамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)-пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановой кислоты (22 мг, 0,030 ммоль) в смеси DMA (0,8 мл) и буферного раствора NaH_2PO_4 (pH 7,5, 1,0 M, 0,7 мл) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропаноат (18,0 мг, 0,060 ммоль) четырьмя порциями за 2 часа. Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (CH_3OH/CH_2Cl_2/HOAc 1:8:0,01) с получением указанного в заголовке соединения (22,5 мг, 82% выход). ЖХ-МС (ЭСИ) m/z рассч. для $C_{46}H_{77}N_8O_{11}$ $[M+H]^+$: 917,56, найдено: 917,60.

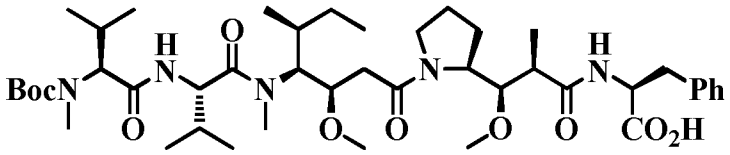
Пример 107. Синтез (2S)-2-((2R, 3R)-3-((2S)-1-((11S, 14S, 17S)-1-амино-17-((R)-втор-бутил)-11,14-диизопропил-18-метокси-10,16-диметил-9,12,15-триоксо-3,6-диокса-10,13,16-триазакосан-20-оил) пирролидин-2-ил)-3- метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановой кислоты.



К (2S)-2-((2R,3R)-3-((2S)-1-((11S,14S,17S)-1-азидо-17-((R)-втор-бутил)-11, 14-диизопропил-18-метокси-10,16-диметил-9,12,15-триоксо-3,6-диокса-10,13,16-триазакосан-20-оил)пирролидин-2-ил)-3 -метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановой кислоте (22,0 мг, 0,024 ммоль) в метаноле (5 мл) в сосуде для гидрирования добавляли Pd/C (5 мг, 10% Pd, 50% влажности). После вакуумирования воздуха и пропускания H_2 при 172 КПа (25 фунт/кв.дюйм) смесь встряхивали в течение 4 ч, фильтровали через целит. Фильтрат упаривали с получением неочищенного указанного в заголовке продукта (~ 20 мг, выход

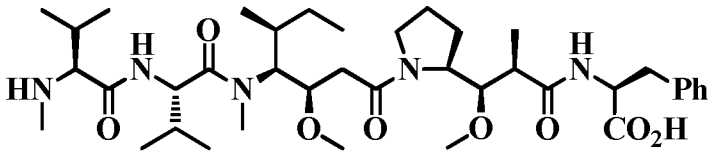
92%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС ЭСИ m/z+ $C_{46}H_{79}N_6O_{11}$ (M+H), рассчт. 891,57, найдено 891,60.

Пример 108. Синтез (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((6S,9S,12S,13R)-12-((S)-втор- бутил)-6,9-диизопропил-13-метокси-2,2,5,11-тетраметил-4,7,10-триоксо-3-окса-5,8,11-триазапентадекан-15-оил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановой кислоты.



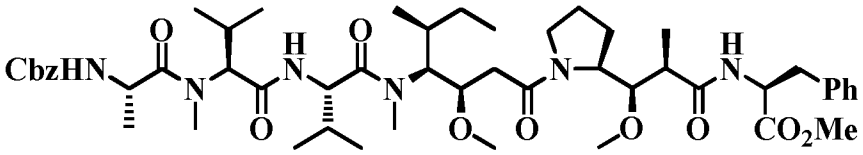
К раствору (S)-метил 2-((2R,3R)-3-((S)-1-((6S,9S,12S,13R)-12-((S)-втор-бутил)-6,9-диизопропил-13-метокси-2,2,5,11-тетраметил-4,7,10-триоксо-3-окса-5,8,11-триазапентадекан-15-оил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата (30 мг, 0,035 ммоль) в ТГФ (1,0 мл) добавляли LiOH в воде (1,0М, 0,8 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 35 минут, нейтрализовали с помощью 0,5 MH_3PO_4 до pH 6, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (CH_3OH/CH_2Cl_2/HOAc 1:10:0,01) с получением указанного в заголовке соединения (25,0 мг, 85% выход). ЖХ-МС (ЭСИ) m/z рассч.для $C_{44}H_{74}N_5O_{10}$ $[M+H]^+$: 832,54, найдено: 832,60.

Пример 109. Синтез (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N, 3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метиламино)бутанамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил) пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановой кислоты.



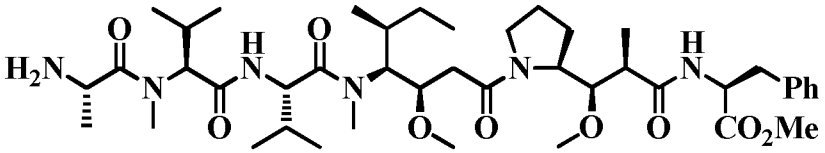
К раствору (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((6S,9S,12S,13R)-12-((S)-втор-бутил)-6,9-диизопропил-13-метокси-2,2,5,11-тетраметил-4,7,10-триоксо-3-окса-5,8,11-триазапентадекан-15-оил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановой кислоты (25 мг, 0,030 ммоль) в диоксане (2,0 мл) добавляли HCl (12,0 М, 0,6 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут, разбавляли диоксаном (4 мл) и толуолом (4 мл), упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на С-18 колонке ВЭЖХ, элюируя MeOH и водой (L200 мм x Ф20 мм, v = 9). мл/мин, от 5% метанола до 40% метанола за 40 мин) с получением указанного в заголовке соединения (20,0 мг, выход 90%). ЖХ-МС (ЭСИ) m/z рассч. для $C_{39}H_{66}N_5O_8$ $[M+H]^+$: 732,48, найдено: 732,90.

Пример 110. Синтез (*S*)-метил 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,14*S*,15*R*)-14-((*S*)- *втор*-бутил)-8,11-диизопропил-15-метокси-5,7,13-триметил-3,6,9,12-тетраоксо-1-фенил-2-окса-4,7,10,13-тетраазагептадекан-17-оил) пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата.



К раствору MMAF-OMe (0,132 г, 0,178 ммоль, 1,0 экв.) и ZL-аланина (0,119 г, 0,533 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) при 0 °С последовательно добавляли HATU (0,135 г. 0,356 ммоль, 2,0 экв.) и NMM (0,12 мл, 1,07 ммоль, 6,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 10 минут, затем нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Смесь разбавляли ДХМ и промывали водой, и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (20:1 ДХМ/MeOH) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого пенистого твердого вещества (0,148 г, выход 88%). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{51}H_{79}N_6O_{11}$ $[M+H]^+$ 951,6, найдено 951,6.

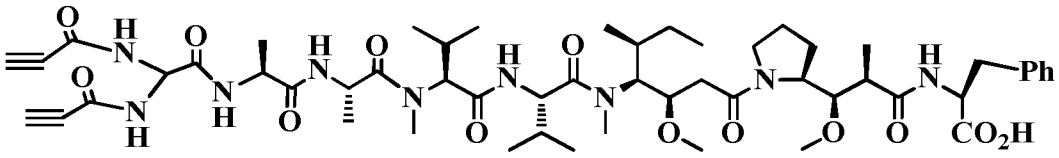
Пример 111. Синтез (*S*)-метил 2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-амино-N-метилпропанамидо)-3-метилбутанамидо)-N, 3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси- 2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата.



К раствору (*S*)-метил 2-((2*R*,3*R*)-3-((*S*)-1-((5*S*,8*S*,11*S*,14*S*,15*R*)-14-((*S*)-*втор*-бутил)-8,11-диизопропил-15-метокси-5,7,13-триметил-3,6,9,12-тетраоксо-1-фенил-2-окса-4,7,10,13-тетраазагептадекан-17-оил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноата (0,148 г, 0,156 ммоль, 1,0 эквив.) в MeOH (5 мл) добавляли Pd/C (0,100 г, 10% Pd/C, 50% влажности) в сосуде для гидрирования. Смесь встряхивали в течение 5 часов, затем фильтровали через слой целита. Фильтрат упаривали, получая указанное в заголовке соединение в виде белого пенистого твердого вещества (0,122 г, выход 96%). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{43}H_{73}N_6O_9$ $[M+H]^+$ 817,5, найдено 817,5.

Пример 112. Синтез (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((8S,11S,14S,17S,20S,21R)-20-((S)-втор-бутил)-14,17-диизопропил-21-метокси-8,11,13,19-тетраметил-3,6,9,12,15,18-гексаоксо-5-

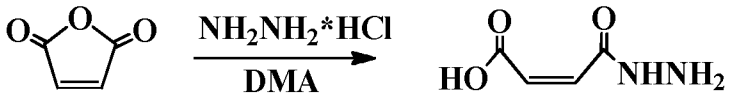
пропиоламидо-4,7,10,13,16,19-гексаазатрикос-1-ин-23-оил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановой кислоты (A-4).



A-4.

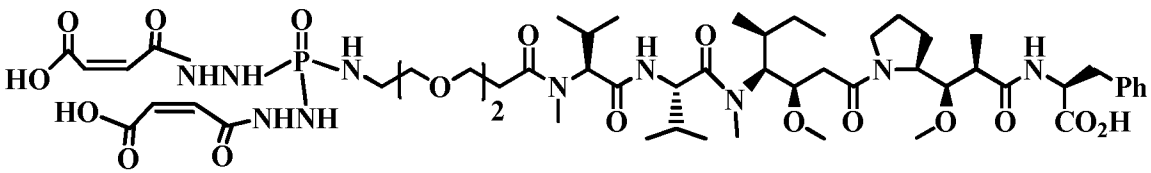
К соединению *(S)*-метил 2-((2*R*,3*R*)-3-((S)-1-((3*R*,4*S*,5*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-((*S*)-2-амино-N-метилпропанамидо)-3-метилбутанамидо)-N,3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропаноат (20 мг, 0,027 ммоль) в смеси DMA (2 мл) и 0,1 М Na_2HPO_4, pH 8,0 (1 мл), добавляли (S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 2-((S)-2-(2,2-дипропиоламидоацетамидо)пропанамидо)пропаноат (20,1 мг, 0,046 ммоль) тремя порциями в течение 3 часов, а затем смесь перемешивали в течение дополнительных 12 часов. Смесь упаривали, и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (200 (L) мм x 10(d) мм, колонка C_{18}, 10-100% ацетонитрил/вода за 40 минут, v =8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (22,1 мг, 78% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{53}H_{80}N_9O_{13}$ $[M+H]^+$ 1050,58, найдено 1050,96.

Пример 113. Синтез (Z)-4-гидразинил-4-оксобут-2-еноевой кислоты, гидрохлоридной соли.



К гидразингидрохлориду (7,00 г, 102,1 ммоль) в DMA (100 мл) добавляли малеиновый ангидрид (10,01 г). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и перекристаллизовывали в EtOH с образованием указанного в заголовке соединения (12,22 г, выход 92%). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_4H_7N_2O_3$ $[M+H]^+$ 131,04, найдено 131,20.

Пример 114. Синтез (2S)-2-((2R,3R)-3-((2S)-1-((11S,14S,17S,18R)-17-((S)-втор-бутил)-11,14 диизопропил-18-метокси-10,16-диметил-9,12,15-триоксо-1-((бис (2-(Z)-3-карбоксиакрилгидразинил)фосфорил) амино)-3,6-диокса-10, 13,16-триазаикозан-20-оил) пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановой кислоты (A-5).

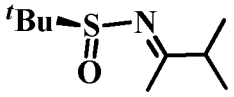


A-5

К соединению (Z)-4-гидразинил-4-оксобут-2-еноевой кислоты HCl соль (22,0 мг, 0,132 ммоль) в смеси ТГФ (5 мл) и DIPEA (10 мкл, 0,057 ммоль) при 0 °C добавляли $POCl_3$

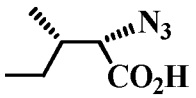
(10,1 мг, 0,0665 ммоль). После перемешивания при 0ºС в течение 20 мин смесь нагревали до комнатной температуры и продолжали перемешивать в течение дополнительных 4 ч. Затем к смеси добавляли (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((11S,14S,17S,18R)-1-амино-17-((S)- втор-бутил)-11,14-диизопропил-18-метокси-10,16-диметил-9,12,15-триоксо-3,6-диокса-10,13,16-триазаикосан-20-оил) пирролидин-2 ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-фенилпропановую кислоту (60 мг, 0,067 ммоль) и DIPEA (20 мкл, 0,114 ммоль). Смесь перемешивали при 50 °С в течение ночи, упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (200 (L) мм x 10(d) мм, колонка C_{18}, 10-100% ацетонитрил/вода в течение 40 минут, v =8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (25,6 мг, 31% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{54}H_{84}N_{88}O_{18}P$ $[M+H]^+$ 1195,59, найдено 1196,10.

Пример 115. Синтез (S, E)-2-метил-N-(3-метилбутан-2-илиден) пропан-2-сульфонамида.



К раствору (S)-2-метилпропан-2-сульфинамида (100 г, 0,825 моль, 1,0 экв.) в 1 л ТГФ добавляли $Ti(OEt)_4$ (345 мл, 1,82 моль, 2,2 экв.) и 3-метил-2-бутанон (81 мл, 0,825 моль 1,0 экв.) в атмосфере N_2 при к.т. Реакционную смесь нагревали до кипения с обратным холодильником в течение 16 часов, затем охлаждали до комнатной температуры и выливали на ледяную воду. Смесь фильтровали и слой на фильтре промывали EtOAc. Органический слой отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали с получением остатка, который очищали вакуумной перегонкой (15-20 мм. рт.ст., 95 °С) с получением указанного в заголовке продукта (141 г, 90% выход) в виде желтого масла. 1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 2,54 – 2,44 (м, 1H), 2,25 (с, 3H), 1,17 (с, 9H), 1,06 (дд, J = 6,9, 5,1 Гц, 6H). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_9H_{19}NaNOS$ $[M+Na]^+$ 212,12; найдено 212,11.

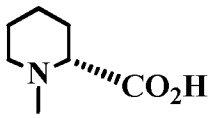
Пример 116. Синтез (2S,3S)-2-азидо-3-метилпентановой кислоты.



К раствору NaN_3 (20,0 г, 308 ммоль) в смеси воды (50 мл) и дихлорметана (80 мл), охлажденного до 0 °С, медленно добавляли Tf_2O (10 мл, 59,2 ммоль, 2,0 экв.). После добавления, реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 2 часов, затем органическую фазу отделяли и водную фазу экстрагировали дихлорметаном (2 × 40 мл). Объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором $NaHCO_3$ и использовали как есть. Дихлорметановый раствор трифторазида добавляли к смеси (L)-

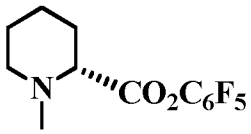
изолейцина (4,04 г, 30,8 ммоль, 1,0 экв.), K_2CO_3 (6,39 г, 46,2 ммоль, 1,5 экв.), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (77,4 мг, 0,31 ммоль, 0,01 экв.) в воде (100 мл) и метаноле (200 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 16 часов. Органические растворители удаляли при пониженном давлении, а водную фазу разбавляли водой (250 мл) и подкисляли до pH 6 концентрированной HCl, и разбавляли фосфатным буфером (0,25 М, pH 6,2, 250 мл). Водный слой промывали EtOAc (5 × 100 мл) для удаления побочного продукта сульфонамид, а затем подкисляли до pH 2 концентрированной HCl, экстрагировали EtOAc (3×150 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали и упаривали, получая указанный в заголовке продукт (4,90 г, выход 99%) в виде бесцветного масла. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 12,01 (с, 1H), 3,82 (д, J = 5,9 Гц, 1H), 2,00 (ддд, J = 10,6, 8,6, 5,5 Гц, 1H), 1,54 (д.кв.д., J = 14,8, 7,5, 4,4 Гц, 1H), 1,36 – 1,24 (м, 1H), 1,08 – 0,99 (м, 3H), 0,97 – 0,87 (м, 3H).

Пример 117. Синтез D-*N*-метилпипеколиновой кислоты.



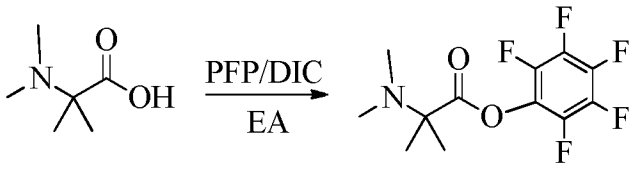
К раствору D-пипеколиновой кислоты (10,0 г, 77,4 ммоль, 1,0 экв.) в метаноле (100 мл) добавляли формальдегид (37% водный раствор, 30,8 мл, 154,8 ммоль, 2,0 экв.), затем Pd/C (10% масс., 1,0 г). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере H_2 (1 атм) в течение ночи, а затем фильтровали через целит, промывая слой на фильтре метанолом. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая указанное в заголовке соединение (10,0 г, выход 90%) в виде белого твердого вещества.

Пример 118. Синтез (R)-перфторфенил 1-метилпиперидин-2-карбоксилата.



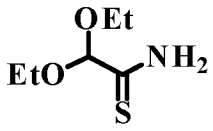
К раствору D- *N*- метилпипеколиновой кислоты (2,65 г, 18,5 ммоль) в EtOAc (50 мл) добавляли пентафторфенол (3,75 г, 20,4 ммоль) и DCC (4,21 г, 20,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов, а затем фильтровали через целит. Слой на фильтре промывали 10 мл EtOAc. Фильтрат использовали для следующей стадии без дальнейшей очистки или упаривания. МС ЭСИ m/z вычислено для $C_{13}H_{13}F_5NO_2$ $[M+H]^+$ 309,08; найдено 309.60.

Пример 119. Синтез перфторфенил 2-(диметиламино)-2-метилпропаноата



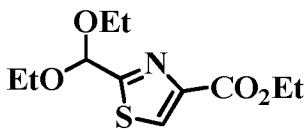
К раствору 2-(диметиламино)-2-метилпропановой кислоты (5,00 г, 38,10 ммоль) в этилацетате (200 мл) при 0 °C добавляли 2,3,4,5,6-пентафторфенол (10,4 г, 57,0 ммоль) с последующим добавлением DIC (8,8 мл, 57,0 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры, перемешивали в течение ночи и фильтровали. Фильтрат упаривали, получая указанное в заголовке соединение (12,0 г,> 100% выход), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС ЭСИ m/z вычислено для $C_{12}H_{13}F_5NO_2$ $[M+H]^+$ 298,08; найдено 298,60.

Пример 120. Синтез 2,2-диэтоксиэтантиоамида.



2,2-диэтоксиацетонитрил (100 г, 0,774 моль, 1,0 экв.) смешивали с водным раствором $(NH_4)_2S$ (48%, 143 мл, 1,05 моль, 1,36 экв.) в метаноле (1,5 л) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 16 часов, реакционную смесь упаривали и остаток растворяли в дихлорметане, промывали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали. Остаток растирали со смесью растворителей петролейный эфир и дихлорметан. После фильтрования получали желаемый указанный в заголовке продукт в виде белого твердого вещества (100 г, выход 79%). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,81 (д, J = 71,1 Гц, 2H), 5,03 (с, 1H), 3,73 (д.кв., J = 9,4, 7,1 Гц, 2H), 3,64 (д.кв. J = 9,4, 7,0 Гц, 2H), 1,25 (т, J = 7,1 Гц, 6H).

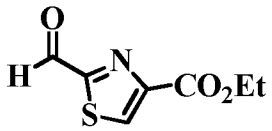
Пример 121. Синтез этил 2-(диэтоксиметил)тиазол-4-карбоксилата.



90 г молекулярных сит (3Å) добавляли к смеси 2,2-диэтоксиэтантиоамида (100 г, 0,61 моль, 1,0 экв.) и этилбромпирувата (142 мл, 1,1 моль, 1,8 экв.) в 1 л EtOH. Смесь нагревали до кипения с обратным холодильником (внутренняя температура около 60 °C) в течение 1 часа, затем удаляли этанол на роторном испарителе и остаток растворяли в дихлорметане. Твердое вещество отфильтровывали и фильтрат упаривали, и очищали с

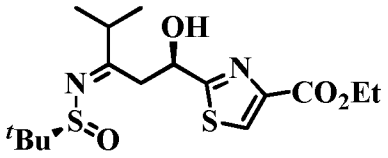
помощью колоночной хроматографии (ПЭ/EtOAc 5:1-3:1), получая указанное в заголовке (тиазолкарбоксилат) соединение (130 г, выход 82%) в виде желтого масла.

Пример 122. Синтез этил 2-формилтиазол-4-карбоксилата.



К раствору 2-(диэтоксиметил)тиазол-4-карбоксилата (130 г, 0,50 моль в ацетоне (1,3 L) добавляли 2 н HCl (85 мл, 0,165 моль 0,33 экв.). Реакционную смесь нагревали до кипения с обратным холодильником (внутренняя температура около 60 °C), контролировали с помощью анализа ТСХ до полного расходования исходного вещества (около 1-2 ч). Ацетон удаляли при пониженном давлении и остаток растворяли в дихлорметане (1,3 L), промывали насыщенным раствором $NaHCO_3$, водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, а затем сушили над безводным Na_2SO_4. Раствор фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью перекристаллизации из петролейного эфира и диэтилового эфира, получая указанное в заголовке соединение в виде белого твердого вещества (40 г, 43% выход). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 10,08 – 10,06 (м, 1H), 8,53 – 8,50 (м, 1H), 4,49 (кв, J = 7,1 Гц, 2H), 1,44 (т, J = 7,1 Гц, 3H). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_7H_8NO_3S$ $[M+H]^+$ 186,01; найдено 186,01.

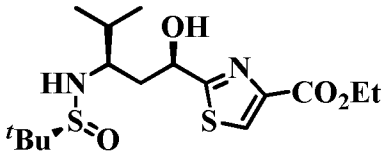
Пример 123. Синтез этил 2-((R,E)-3-(((S)-трет-бутилсульфинил) имино)-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксилата.



К раствору диизопропиламина (121 мл, 0,86 моль 4,0 экв.) в сухом ТГФ (300 мл) добавляли *н*-бутиллитий (2,5 М, 302 мл, 0,76 моль, 3,5 экв.) при -78 °C в атмосфере N_2. Реакционную смесь нагревали до 0 °C в течение 30 минут, а затем снова охлаждали до -78 °C. Добавляли (S, E)-2-метил-N-(3-метилбутан-2-илиден)пропан-2-сульфонамид (57 г, 0,3 моль, 1,4 экв.) в ТГФ (200 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа перед добавлением по каплям $ClTi(O^{изо}Pr)_3$ (168,5 г, 0,645 моль, 3,0 экв.) в ТГФ (350 мл). После перемешивания в течение 1 часа, по каплям добавляли этил 2-формилтиазол-4-карбоксилат (40 г, 0,215 моль, 1,0 экв.), растворенный в ТГФ (175 мл) и полученную реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов. Завершение реакции показал анализ ТСХ. В реакционную смесь добавляли смесь уксусной кислоты и ТГФ (об/об 1:4, 200 мл),

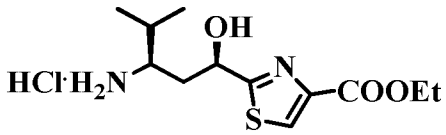
затем выливали в ледяную воду, экстрагировали EtOAc (4 × 500 мл). Органическую фазу промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали и упаривали. Остаток очищали колоночной хроматографией (ДХМ/EtOAc/ПЭ 2: 1:2), получая указанное в заголовке соединение (60 г, выход 74%) в виде бесцветного масла. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8,13 (с, 1H), 6,63 (д, J = 8,2 Гц, 1H), 5,20 – 5,11 (м, 1H), 4,43 (кв, J = 7,0 Гц, 2H), 3,42 – 3,28 (м, 2H), 2,89 (д.т., J = 13,1, 6,5 Гц, 1H), 1,42 (т, J = 7,1 Гц, 3H), 1,33 (с, 9H), 1,25 – 1,22 (м, 6H). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{16}H_{26}NaN_2O_4S_2$ $[M+Na]^+$ 397,13, найдено 397,11.

Пример 124. Синтез этил 2-((1R, 3R)-3-((S)-1,1-диметилэтилсульфинамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил) тиазол-4-карбоксилата.



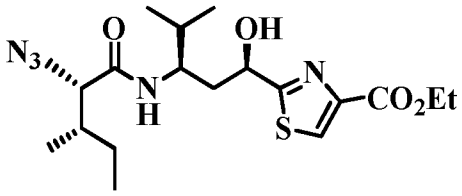
Раствор этил 2-((R,E)-3-(((S)-трет-бутилсульфинил)имино)-1-гидрокси-4-метилпентил) тиазол-4-карбоксилата (23,5 г, 62,7 ммоль), растворенного в ТГФ (200 мл), охлаждали до -45 °C. Медленно добавляли $Ti(OEt)_4$ (42,9 мл, 188 ммоль, 3,0 экв.). После завершения добавления смесь перемешивали в течение 1 часа до добавления порциями $NaBH_4$ (4,75 г, 126 ммоль, 2,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при -45 °C в течение 3 часов. Анализ ТСХ показал не полное расходование некоторых исходных веществ. В реакционную смесь вливали HOAc/ТГФ (об/об 1:4, 25 мл), затем EtOH (25 мл). Реакционную смесь выливали на лед (100 г) и нагревали до комнатной температуры. После фильтровании через целит органическую фазу отделяли и промывали водой, и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали и упаривали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc/PE 1:1) с получением указанного в заголовке продукта (16,7 г, 71% выход) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8,10 (с, 1H), 5,51 (д, J = 5,8 Гц, 1H), 5,23 – 5,15 (м, 1H), 4,41 (кв, J = 7,0 Гц, 2H), 3,48 – 3,40 (м, 1H), 3,37 (д, J = 8,3 Гц, 1H), 2,29 (т, J = 13,0 Гц, 1H), 1,95 – 1,87 (м, 1H), 1,73 – 1,67 (м, 1H), 1,40 (т, J = 7,1 Гц, 3H), 1,29 (с, 9H), 0,93 (д, J = 7,3 Гц, 3H), 0,90 (д, J = 7,2 Гц, 3H). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{16}H_{28}NaN_2O_4S_2$ $[M+Na]^+$ 399,15, найдено 399,14.

Пример 125. Синтез гидрохлорида этил 2-((1R, 3R)-3-амино-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксилата.



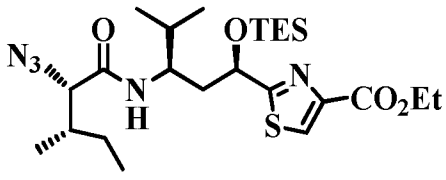
К раствору этил 2-((1R, 3R)-3-((S)-1,1-диметилэтилсульфинамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил) тиазол-4-карбоксилата (6,00 г, 16,0 ммоль, 1,0 экв.) в этаноле (40 мл) медленно добавляли 4 н. HCl в диоксане (40 мл) при 0 °C. Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 2,5 часов, затем упаривали и растирали с петролейным эфиром. Белое твердое указанное в заголовке вещество (4,54 г, 92% выход) собирали и использовали на следующей стадии.

Пример 126. Синтез этил 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-азидо-3-метилпентанамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксилата.



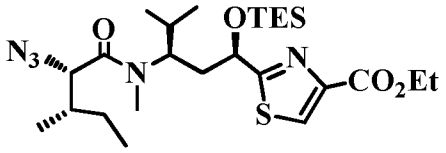
(2S,3S)-2-азидо-3-метилпентановую кислоту (5,03g, 28,8 ммоль, 2,0 экв.) растворяли в ТГФ (120 мл) и охлаждали до 0 °C, к которому последовательно добавляли NMM (6,2 мл, 56,0 ммоль, 4,0 экв.) и изобутилхлорформиат (3,7 мл, 28,8 ммоль, 2,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 30 минут и при к.т. 1,0 ч., а затем снова охлаждали до 0 °C. Порциями добавляли гидрохлорид этил 2-((1R,3R)-3-амино-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол -4-карбоксилат (4,54 г, 14,7 ммоль, 1,0 экв.). После перемешивания при 0 °C в течение 30 минут, реакционную смесь нагревали до к.т. и перемешивали в течение 2 часов. В реакционную смесь добавляли воду при 0 °C и реакционную смесь экстрагировали этилацетатом три раза. Объединенные органические слои промывали 1 н HCl, насыщенным раствором $NaHCO_3$ и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали и упаривали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (0-30% EtOAc/PE) с получением белого твердого вещества указанного в заголовке соединения (4,55 г, 74% выход).

Пример 127. Синтез этил 2-((1R, 3R)-3-((2S, 3S)-2-азидо-3-метилпентанамидо)-4-метил-1-((триэтилсилил) окси)пентил)тиазол-4-карбоксилата.



К раствору этил 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-азидо-3-метилпентанамидо)-1- гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксилата (5,30 г, 12,8 ммоль, 1,0 экв.) в CH_2Cl_2 (50 мл) добавляли имидазол (1,75 г, 25,6 ммоль, 2,0 экв.), затем хлортриэтилсилан (4,3 мл, 25,6 ммоль, 2,0 экв.) при 0 °C. Реакционную смесь оставляли нагреваться до к.т. в течение 1 часа и перемешивали еще в течение одного дополнительного часа. К реакционной смеси добавляли насыщенный раствор хлорида натрия, органический слой отделяли, а водный слой экстрагировали EtOAc. Объединенные органические фазы сушили, фильтровали, упаривали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной хроматографии с градиентом 15-35% EtOAc в петролейном эфире с получением указанного в заголовке продукта (6,70 г, выход 99%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8,12 (с, 1H), 6,75 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 5,20 – 5,12 (м, 1H), 4,44 (кв, J = 7,0 Гц, 2H), 4,06 – 3,97 (м, 1H), 3,87 (д, J = 3,8 Гц, 1H), 2,14 (д, J = 3,8 Гц, 1H), 2,01 – 1,91 (м, 3H), 1,42 (т, J = 7,1 Гц, 3H), 1,34 – 1,25 (м, 2H), 1,06 (д, J = 6,8 Гц, 3H), 1,00 – 0,93 (м, 18H), 0,88 (дд, J = 19,1, 6,8 Гц, 6H). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{24}H_{44}N_5O_4SSi$ $[M+H]^+$ 526,28, найдено 526,28.

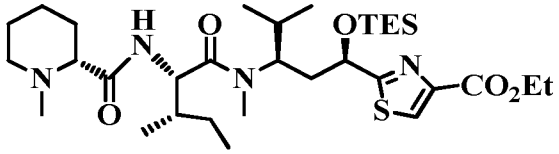
Пример 128. Синтез этил 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-азидо-N, 3-диметилпентанамидо)-4-метил-1-((триэтилсилил)окси)пентил) тиазол-4 карбоксилата.



Раствор этил 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-азидо-3-метилпентанамидо)-4- метил-1-((триэтилсилил)окси)пентил)тиазол-4-карбоксилата (5,20 г, 9,9 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (50 мл) охлаждали до -45 °C и добавляли KHMDS (1M в толуоле, 23,8 мл, 23,8 ммоль, 2,4 экв.). Полученную смесь перемешивали при -45 °C в течение 20 минут с последующим добавлением йодистого метила (1,85 мл, 29,7 ммоль, 3,0 экв.). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры в течение 4,5 часов, затем в реакцию добавляли EtOH (10 мл). Неочищенный продукт разбавляли EtOAc (250 мл) и промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл). Водный слой экстрагировали EtOAc (3 × 50 мл). Органические слои сушили, фильтровали, упаривали и очищали на колоночной хроматографии с градиентом 15-35% EtOAc в петролейном эфире с получением указанного в заголовке продукта (3,33 г, выход 63%) в виде светло-желтого масла. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 8,09 (с, 1H), 4,95 (д, J = 6,6 Гц, 1H),4,41 (кв, J = 7,1 Гц, 2H), 3,56 (д, J = 9,5 Гц, 1H), 2,98 (с, 3H), 2,27 – 2,06 (м, 4H), 1,83 – 1,70 (м, 2H), 1,41 (т, J = 7,2 Гц, 3H), 1,29 (ддд, J = 8,9, 6,8, 1,6 Гц, 3H), 1,01 (д, J = 6,6 Гц, 3H), 0,96 (дт, J = 8,0, 2,9

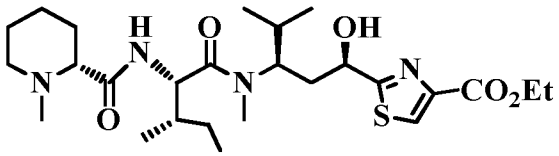
Гц, 15H), 0,92 (д, J = 6,6 Гц, 3H), 0,90 (д, J = 6,7 Гц,3H). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{25}H_{46}N_5O_4SSi$ $[M+H]^+$ 540,30, найдено 540,30.

Пример 129. Синтез этил 2-((3S,6R,8R)-3-((S)-втор-бутил)-10,10-диэтил-6- изопропил-5-метил-1-((R)-1-метилпиперидин2-ил)-1,4-диоксо-9-окса-2,5-диаза-10-силадодекан-8-ил)тиазол-4-карбоксилата.



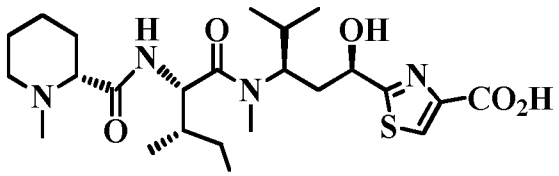
Сухой Pd/C (10% масс., 300 мг) и этил 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-азидо-N,3-диметилпентанамидо)-4-метил-1-((триэтилсилил)окси)пентил)тиазол-4-карбоксилат (3,33 г, 6,61 ммоль) добавляли к (R)-перфторфенил 1-метилпиперидин-2-карбоксилат в EtOAc. Реакционную смесь перемешивали при атмосфере водорода в течение 27 часов, а затем фильтровали через слой целита, промывая осадок на фильтре EtOAc. Объединенные органические порции упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии с градиентом 0-5% метанола в EtOAc с получением указанного в заголовке продукта (3,90 г, 86% выход). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{32}H_{59}N_4O_5SSi$ $[M+H]^+$ 639,39, найдено 639,39.

Пример 130. Синтез этил 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-N,3-диметил-2-((R)-1-метил пиперидин-2-карбоксамидо)пентанамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксилата.



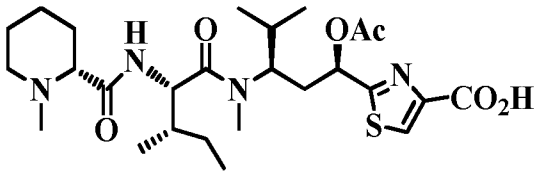
Этил 2-((3S,6R,8R)-3-((S)-втор-бутил)-10,10-диэтил-6- изопропил-5-метил-1-((R)-1-метилпиперидин-2-ил)-1,4-диоксо-9-окса-2,5-диаза-10-сидадодекан-8-ил)тиазол-4-карбоксилат (3,90 г, 6,1 ммоль) растворяли в обескислороженной смеси AcOH/вода/ТГФ (об/об/об 3:1:1, 100 мл), и перемешивали при к.т. в течение 48 часов. Затем реакционную смесь упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии (2:98 до 15:85 MeOH/EtOAc) с получением указанного в заголовке соединения (2,50 г, 72% выход через 2 стадии). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{26}H_{45}N_4O_5S$ $[M+H]^+$ 525,30, найдено 525,33.

Пример 131. Синтез 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-N,3-диметил-2-((R)-1-метилпиперидин-2-карбоксамидо)пентанамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоновой кислоты.



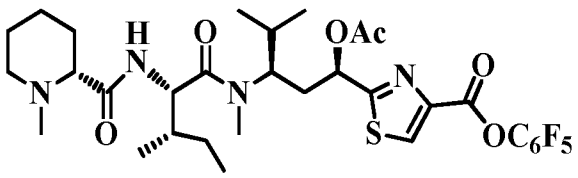
Водный раствор LiOH (0,4 N, 47,7 мл, 19,1 ммоль, 4,0 экв.) добавляли к раствору этил 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-N,3-диметил-2-((R)-1-метил пиперидин-2-карбоксамидо)-пентанамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксилата (2,50 г, 4,76 ммоль, 1,0 экв.) в диоксане (47,7 мл) при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при к.т. в течение 2 часов, а затем упаривали. Хроматографическая очистка на колонке с SiO_2 (100% CH_2Cl_2, затем CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH 80:20:1) давала указанное в заголовке соединение (2,36 г, выход 99%) в виде аморфного твердого вещества. ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{24}H_{41}N_4O_5S$ $[M+H]^+$ 497,27, найдено 497,28.

Пример 132. Синтез 2-((1R,3R)-1-ацетокси-3-((2S,3S)-N,3-диметил-2-((R)-1-метилпиперидин-2-карбоксамидо)пентанамидо)-4-метилпентил)тиазол-4-карбоновой кислоты.



К раствору 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-N,3-диметил-2-((R)-1-метилпиперидин-2-карбоксамидо)пентанамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоновой кислоты (2,36 г, 4,75 ммоль) в пиридине (50 мл) при 0 °C, медленно добавляли уксусный ангидрид (2,25 мл, 24 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры в течение 2 часов и перемешивали при к.т. в течение 24 часов. Реакционную смесь упаривали и остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка C_{18}, 50 мм (д) x 250 (мм), 50 мл/мин, 10-90% ацетонитрил/вода в течение 45 мин) с получением указанного в заголовке соединения (2,25 г, выход 88%) в виде аморфного белого твердого вещества. ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{26}H_{43}N_4O_6S$ $[M+H]^+$ 539,28, найдено 539,28.

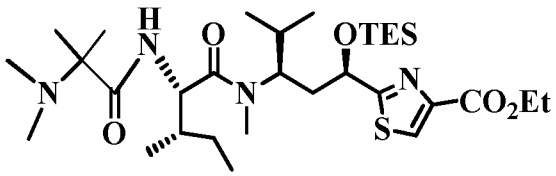
Пример 133. Синтез (1R,3R)-3-((2S,3S)-N, 3-диметил-2-((R)-1-метилпиперидин-2-карбоксамидо) пентанамидо)-4-метил-1-(4-(перфторбензоил)тиазол-2-ил)пентилацетата.



К раствору 2-((1R,3R)-1-ацетокси-3-((2S,3S)-N, 3-диметил-2-((R)-1-метилпиперидин-2-карбоксамидо)пентанамидо)-4-метилпентил)тиазол-4-карбоновой кислоты (860 мг, 1,60

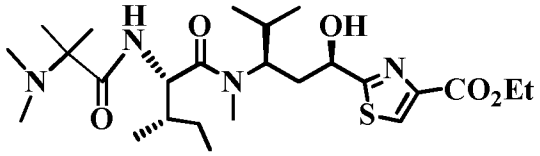
ммоль, 1,0 экв.) в дихлорметане (20 мл) добавляли пентафторфенол (440 мг, 2,40 ммоль, 1,5 экв.) и *N,N'*-диизопропилкарбодиимид (220 мг, 1,75 ммоль, 1,1 экв.) при 0 ° С. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. После удаления растворителя при пониженном давлении реакционную смесь разбавляли EtOAc (20 мл), затем фильтровали через целит. Фильтрат упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (от 1:10 до 1:3 EtOAc/ДХМ), получая указанное в заголовке соединение (935,30 мг, выход 82%), которое непосредственно использовали для следующей стадии. МС ЭСИ m/z вычислено для $C_{32}H_{42}F_5N_4O_6S$ $[M+H]^+$ 704,28, найдено 704,60.

Пример 134. Синтез этила 2-((6S, 9R, 11R)-6-((S)-втор-бутил)-13,13-диэтил-9-изопропил-2,3,3,8-тетраметил-4,7- диоксо-12-окса-2,5,8-триаза-13-силапентадекан-11-ил) тиазол-4-карбоксилата.



Сухой Pd/C (10 мас.%, 300 мг) и этил 2-((1R, 3R)-3-((2S, 3S)-2-азидо-N, 3-диметилпентанамидо)-4-метил-1-((триэтилсилил)окси)пентил)тиазол-4-карбоксилат (3,33 г, 6,16 ммоль) добавляли к перфторфенил 2-(диметиламино)-2-метилпропаноату (~ 2,75 г, 1,5 экв. неочищенного) в EtOAc. Реакционную смесь перемешивали при атмосфере водорода в течение 27 часов, а затем фильтровали через слой целита, промывая осадок на фильтре EtOAc. Объединенные органические порции упаривали и очищали колоночной хроматографией с градиентом 0-5% метанола в EtOAc с получением указанного в заголовке продукта (3,24 г, выход 84%). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{31}H_{59}N_4O_5SSi$ $[M+H]^+$ 626,39, найдено 626,95.

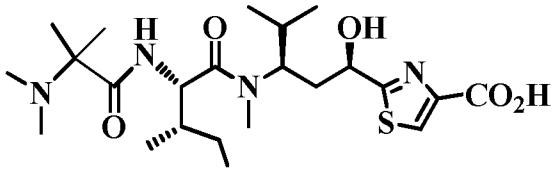
Пример 135. Синтез этила 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N, 3-диметилпентанамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксилата.



Этил 2-((6S, 9R, 11R)-6-((S)-втор-бутил)-13,13-диэтил-9-изопропил-2,3,3,8-тетраметил-4,7-диоксо- 12-окса-2,5,8-триаза-13-силапентадекан-11-ил) тиазол-4-карбоксилат (3,20 г, 5,11 ммоль) растворяли в дезоксигенированной смеси АсОН/вода/ТГФ (об./об./об. 3:1:1, 100 мл) и перемешивали при комнатной температуре в

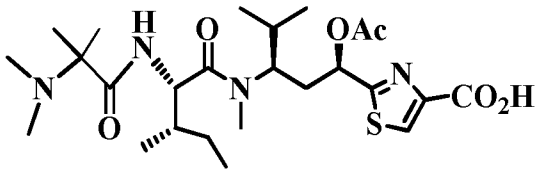
течение 48 часов. Реакционную смесь затем упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (2:98-15:85 MeOH/EtOAc) с получением указанного в заголовке соединения (2,33 г, выход 89%). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{25}H_{45}N_4O_5S$ $[M+H]^+$ 512,30, найдено 512,45.

Пример 136. Синтез 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N, 3-диметилпентанамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоновой кислоты.



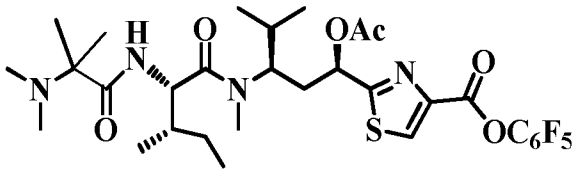
Водный раствор LiOH (0,4 н., 47,7 мл, 19,1 ммоль, 4,0 экв.) добавляли к раствору этил 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N, 3-диметилпентанамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксилата (2,30 г, 4,50 ммоль, 1,0 экв.) в диоксане (50 мл) при 0 ° С. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем упаривали. Хроматографическая очистка на колонке с SiO_2 (100% CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH 80:20:1) давала указанное в заголовке соединение (2,13 г, выход 98%) в виде аморфного твердого вещества. ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{23}H_{41}N_4O_5S$ $[M+H]^+$ 485,27, найдено 485,55.

Пример 137. Синтез 2-((6S,9R,11R)-6-((S)-втор-бутил)-9-изопропил-2,3,3,8-тетраметил-4,7,13-триоксо-12-окса -2,5,8-триазатетрадекан-11-ил) тиазол-4-карбоновой кислоты.



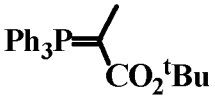
К раствору 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N, 3-диметилпентанамидо)-1-гидрокси-4-метилпентил)триазол-4-карбоновой кислоты (2,10 г, 4,33 ммоль) в пиридине (50 мл) при 0 °С медленно добавляли уксусный ангидрид (2,25 мл, 24 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры в течение 2 часов и перемешивали при к.т. в течение 24 часов. Реакционную смесь упаривали и остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка C_{18}, 50 мм (д) x 250 (мм), 50 мл/мин, 10-90% ацетонитрил/вода в течение 45 мин) с получением указанного в заголовке соединения (1,95 г, выход 86%) в виде аморфного белого твердого вещества. ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{25}H_{43}N_4O_6S$ $[M+H]^+$ 526,28, найдено 526,80.

Пример 138. Синтез перфторфенил 2-((6S,9R,11R)-6-((S)-втор-бутил)-9-изопропил-2,3,3,8-тетраметил-4,7,13-триоксо-12- окса-2,5,8-триазатетрадекан-11-ил)тиазол-4-карбоксилата.



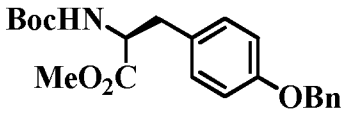
К раствору 2-((6S,9R,11R)-6-((S)-втор-бутил)-9-изопропил-2,3,3,8-тетраметил-4,7,13-триоксо-12 -окса-2,5,8-триазатетрадекан-11-ил)тиазол-4-карбоновой кислоты (1,90 г, 3,61 ммоль, 1,0 экв.) в дихлорметане (70 мл) добавляли пентафторфенол (1,00 г, 5,43 ммоль, 1,5 экв.) и *N,N'* -диизопропилкарбодиимид (512 мг, 3,96 ммоль, 1,1 экв.) при 0 ° С. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. После удаления растворителя при пониженном давлении реакционную смесь разбавляли EtOAc (80 мл), затем фильтровали через целит. Фильтрат упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (от 1:10 до 1:3 EtOAc/ДХМ), получая указанное в заголовке соединение (2,09 г, выход 84%), которое непосредственно использовали для следующей стадии. МС ЭСИ m/z вычислено для $C_{31}H_{42}F_5N_4O_6S$ $[M+H]^+$ 693,27, найдено 693,60.

Пример 139. Синтез *трет*-бутил-2-(трифенилфосфоранилиден)пропаноата.



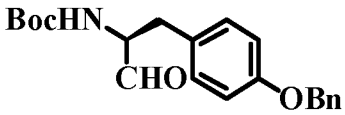
Смесь *трет*-бутил-2-бромпропаноата (15,5 г, 74,1 ммоль, 1,0 экв.) и трифенилфосфина (19,4 г, 74,1 ммоль, 1,0 экв.) в сухом ацетонитриле (45 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Ацетонитрил удаляли при пониженном давлении и добавляли толуол для растворения белого осадка. Толуол затем декантировали и белое твердое вещество растворяли в дихлорметане (100 мл), и переносили в делительную воронку. В воронку добавляли 10% NaOH (100 мл) и после встряхивания органический слой сразу же желтел. Органический слой отделяли и водный слой один раз экстрагировали дихлорметаном (30 мл). Дихлорметановые слои объединяли и один раз промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), затем сушили над Na_2SO_4, фильтровали и упаривали, получая илид в виде желтого твердого вещества (16,8 г, 58%).

Пример 140. Синтез (S)-метил 3-(4-(бензилокси)фенил)-2-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)пропаноата.



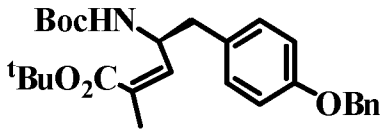
К смеси Boc-L-Tyr-OMe (20,0 г, 67,7 ммоль, 1,0 экв.), K_2CO_3 (14,0 г, 101,6 ммоль, 1,5 экв.) и KI (1,12 г, 6,77 ммоль, 0,1 экв.) в ацетоне (100 мл) медленно добавляли BnBr (10,5 мл, 81,3 ммоль, 1,2 экв.). Смесь затем нагревали до кипения с обратным холодильником в течение ночи. Добавляли воду (250 мл) и реакционную смесь экстрагировали EtOAc (3×100 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (4:1 смесь изомеров гексана/EtOAc) с получением белого твердого указанного в заголовке соединения (26,12 г, 99% выход). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7,44-7,41 (м, 2H), 7,41-7,36 (м, 2H), 7,35-7,30 (м, 1H), 7,04 (д, J = 8,5 Гц, 2H), 6,93 - 6,89 (м, 2H), 5,04 (с, 2H), 4,97 (д, J = 7,7 Гц, 1H), 4,55 (д, J = 6,9 Гц, 1H), 3,71 (с, 3H), 3,03 (дд , J = 14,4, 5,7 Гц, 2H), 1,44 (д, J = 18,6 Гц, 10H). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{22}H_{27}NO_5Na$ $[M+Na]^+$ 408,18, найдено 408,11.

Пример 141. Синтез (S)-трет-бутил(1-(4-(бензилокси)фенил)-3-оксопропан-2-ил)карбамата.



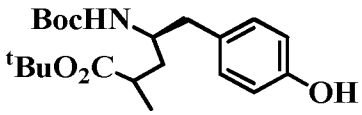
К раствору (S)-метил 3-(4-(бензилокси)фенил)-2-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)пропаноата (26,1 г, 67,8 ммоль, 1,0 экв.) в безводном дихлорметане (450 мл) при -78 °C добавляли DIBAL (1,0 M в смеси изомеров гексана, 163 мл, 2,2 экв.) в течение 1 часа. Смесь перемешивали при -78 °C в течение 3 часов, а затем добавляли 50 мл этанола. По каплям добавляли 1 н. HCl до достижения pH 4. Полученную смесь нагревали до 0 °C. Слои разделяли и водный слой дополнительно экстрагировали EtOAc (3 × 100 мл). Объединенные органические растворы промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4 и упаривали. Растирание с ПЭ/EtOAc и фильтрование давали белое твердое указанное в заголовке соединение (18,3 г, выход 76%). МС ESI m/z вычислено для $C_{22}H_{27}NO_5Na$ $[M+Na]^+$ 378,11, найдено 378,11.

Пример 142. Синтез (S,Z)-*трет*-бутил 5-(4-(бензилокси)фенил)-4-((*трет*-оксикарбонил)амино)-2-метилпент-2-еноата.



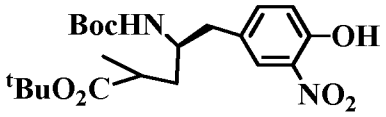
(S)-трет-Бутил (1-(4-(бензилокси)фенил)-3-оксопропан-2-ил)карбамат (0,84 г, 2 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в сухом дихлорметане (50 мл), добавляли *трет*- бутил 2-(трифенилфосфоранилиден)пропаноат (1,6 г, 4 ммоль, 2,0 экв.) и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч, завершение реакции определяли с помощью ТСХ. Очистка колоночной хроматографией (10-50% EtOAc/смесь изомеров гексана) давала указанное в заголовке соединение (1,16 г, выход 98%).

Пример 143. Синтез (4R)-трет-бутил 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(4-гидроксифенил)-2-метилпентаноата.



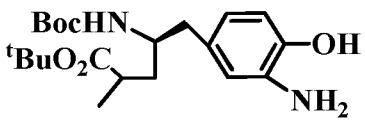
(S,Z)-*трет*-бутил 5-(4-(бензилокси)фенил)-4-((*трет*-оксикарбонил)амино)-2-метилпент-2-еноат (467 мг × 1 ммоль) растворяли в метаноле (30 мл) и гидрировали (1 атм) с катализатором Pd/C (10% масс., 250 мг) при комнатной температуре в течение ночи. Катализатор отфильтровывали и фильтрат упаривали при пониженном давлении, получая указанное в заголовке соединение (выход 379 мг , 99%).

Пример 144. Синтез (4R)-трет-бутил 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(4-гидрокси-3-нитрофенил)-2-метилпентаноат.



(4R)-трет-бутил 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(4-гидроксифенил)-2-метилпентаноат (379 мг , 1 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в ТГФ (20 мл), добавляли раствор *трет*-бутилнитрита (315 мг , 3 ммоль, 3,0 экв.) в ТГФ (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, а затем выливали в воду, экстрагировали EtOAc (2 × 50 мл) и объединенные органические фазы промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали и упаривали. Очистка колоночной хроматографией (10-50% EtOAc/смесь изомеров гексана) давала указанное в заголовке соединение (300 мг, выход 71%).

Пример 145. Синтез (*4R*)-*трет*-бутил 5-(3-амино-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата.

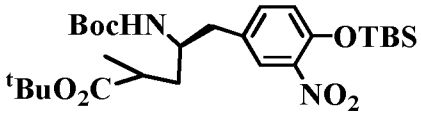


(4R)-трет-бутил 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(4-гидрокси-3-нитрофенил)-2-метилпентаноат (200 мг, 0,47 ммоль) растворяли в EtOAc (30 мл) и смешивали с

палладиевым катализатором (10 % на углероде, 100 мг), затем гидрировали (1 атм) при к.т. в течение 2 часов. Катализатор отфильтровывали и все летучие вещества удаляли в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (185 мг, 99%).

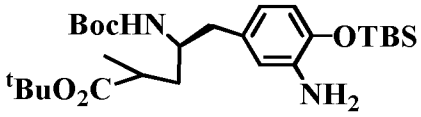
Альтернативно, (4R)-трет-бутил 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(4-гидрокси-3-нитрофенил)-2-метилпентаноат (56 мг × 0,132 ммоль) растворяли в EtOAc (20 мл) и смешивают с катализатором Pd/C (10% масс., 50 мг) и гидрировали (1 атм) при комнатной температуре в течение 3 часов. Катализатор отфильтровывали и все летучие вещества удаляли в вакууме, получая указанное в заголовке соединение (52 мг, выход 99%). МС ЭСИ m/z вычислено для $C_{21}H_{35}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 395,25, найдено 395,26.

Пример 146. Синтез (4R)-*трет*-бутил 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(4-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-3-нитрофенил)-2-метилпентаноата.



К раствору (4R)-трет-бутил 4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(4-гидрокси-3-нитрофенил)-2-метилпентаноата (424 мг, 1 ммоль) в ДХМ (20 мл) добавляли имидазол (408 мг, 6 ммоль) и *трет*- бутилхлордиметилсилан (602 мг, 4 ммоль). Полученный раствор перемешивали при к.т. в течение 3 часов. Затем реакционную смесь промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над безводным Na_2SO_4, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии (от 10% до 30% EtOAc/смесью изомеров гексана), получая указанное в заголовке соединение (344 мг, выход 64%).

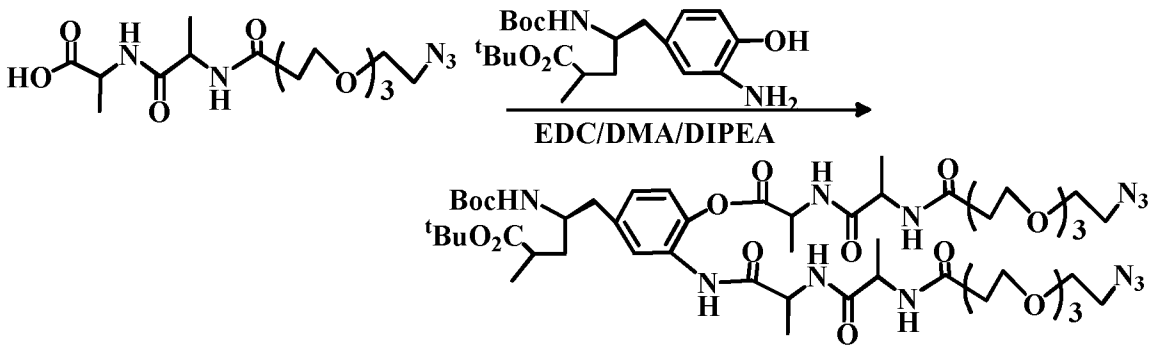
Пример 147. Синтез (4R)-трет-бутил 5-(3-амино-4-((трет-бутилдиметилсилил)окси)фенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноатена.



(4R)-*трет*-Бутил 4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-5-(4-((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)-3-нитрофенил)-2-метилпентаноат (200 мг, 0,37 ммоль) растворяли в EtOAc (30 мл), смешивали с палладиевым катализатором (10% масс. на углероде, 100 мг) гидрировали (1 атм.) при к.т. в течение 2 часов. Катализатор отфильтровывали и все летучие вещества удаляли в вакууме, получая указанное в заголовке соединение (187 мг, 99% выход).

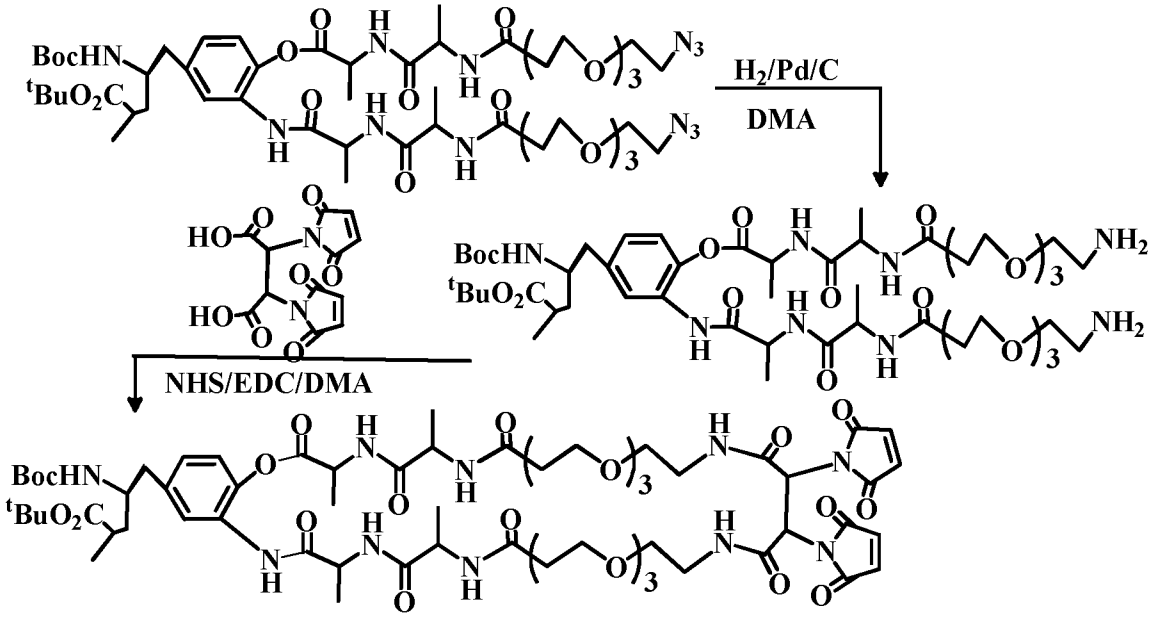
Пример 148. Синтез 2-(1-азидо-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадеканамидо)-4-((2R)-5-(трет-бутокси)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-4-

метил-5-оксопентил)фенил 1-азидо-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оата



К раствору 1-азидо-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оевой кислоты (1,50 г, 3,85 ммоль) и (4R)-трет-бутил 5-(3-амино-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата (0,75 г, 1,90 ммоль) в DMA (40 мл) добавляли EDC (2,05 г, 10,67 ммоль) и DIPEA (0,70 мл, 4,0 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя $EtOAc/CH_2Cl_2$ (от 1:5 до 1:1), с получением указанного в заголовке соединения (2,01 г, выход 82%, чистота ~ 95% по данным ВЭЖХ). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{51}H_{85}N_{12}O_{17}$ $[M+H]^+$ 1137,61, найдено 1137,90.

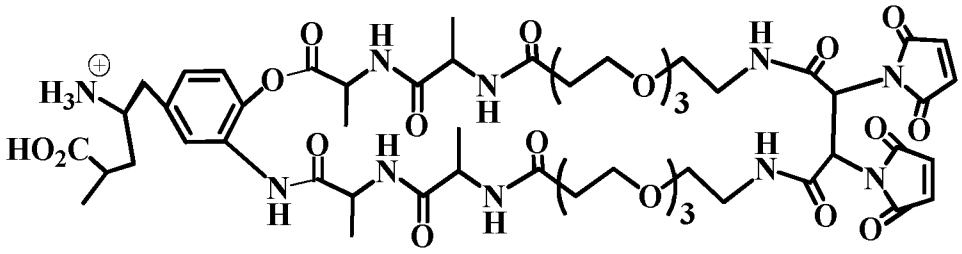
Пример 149. Синтез (4R)-трет-бутил 5-(22,23-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пирролл-1-ил)-3,6,39,42-тетраметил-2 5,8,21,24,37,40,43-октаоксо-3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,15,16,18,19, 20,21,22,23, 24,25,26,27,29,30,32,33,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44-гексатриаконтагидро-2H-бензо[b][1, 14,17,20,31,34,37,4,7,10,23,28,41,44] гептаокса-гептазазациклогексатетраконтин-46-ил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата



2-(1-Азидо-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадеканамидо)-4-((2R)-5-(трет-бутокси)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-4-метил-5-оксопентил)фенил 1-азидо-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оат (900 мг, 0,79 ммоль) растворяли в EtOAc (30 мл), перемешивали с палладиевым катализатором (10% масс. на углероде, 100 мг) и гидрировали (1 атм) при к.т. в течение 4 часов. Катализатор отфильтровывали и все летучие вещества удаляли в вакууме с получением 2-(1-амино-14,17-диметил-12,15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадеканамидо)-4-((2R)-5-(трет-бутокси)-2-((трет-бутоксикарбонил) амино)-4-метил-5-оксопентил)фенил 1-амино-14,17-диметил-12, 15-диоксо-3,6,9-триокса-13,16-диазаоктадекан-18-оата (815 мг, 96% выход), который использовали сразу же без дальнейшей очистки. ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{51}H_{88}N_8O_{17}$ $[M+H]^+$ 1085,62, найдено 1085,95.

К диамин (810 мг, 0,75 ммоль) и 2,3-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)янтарной кислоте (231 мг, 0,75 ммоль) в DMA (10 мл), добавляли EDC (1,25 г, 6,51 ммоль) и DIPEA (0,35 мл, 2,0 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали на колонке SiO_2, элюируя EtOAc/CH_2Cl_2 (от 1: 5 до 1: 1), с получением указанного в заголовке соединения (844 мг, выход 83%, чистота ~ 95% по данным ВЭЖХ).). МС ЭСИ m/z вычислено для $C_{63}H_{92}N_{10}O_{23}$ $[M+H]^+$ 1357,63, найдено 1357,95.

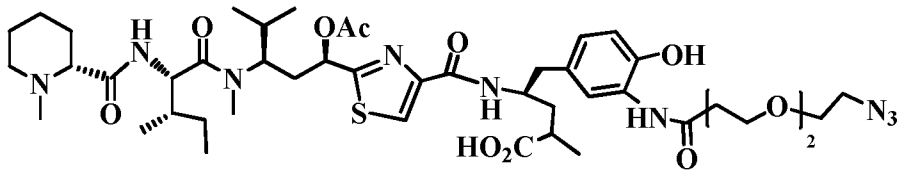
Пример 150. Синтез (2R)-1-(22,23-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,6,39,42-тетраметил-2,5, 8,21,24,37,40,43-октаоксо-3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,15,16,18,19,20, 21,22,23, 24,25,26,27,29, 30,32,33,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44-гексатриаконтагидро-2H-бензо [b] [1,14,17,20,31,34,37, 4,7,10,23,28,41,44] гептаоксагептаазациклогексатетраконтин-46-ил)-4-карбоксипентан-2-аминия



(4R)-Трет-бутил 5-(22,23-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,6,39,42-тетраметил-2,5, 8,21,24,37,40,43-октаоксо-3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,15,16,18,19,20,21,22,23 24,25,26,27, 29,30,32,33,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44-гексатриаконтагидро-2H-бензо[b][1,14,17,20,31,34, 37,4,7,10,23,28,41,44] гептаоксагептаазациклогексатетраконтин-46-ил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (840 мг, 0,62 ммоль) растворяли в смеси CH_2Cl_2 (6 мл) и ТФК (4 мл). Смесь перемешивали в течение ночи, разбавляли толуолом (10 мл), упаривали с получением указанного в заголовке соединения

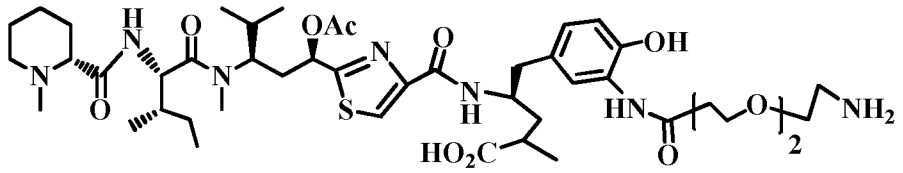
(7,43 г, выход 100%, чистота ~ 91% по данным ВЭЖХ), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС ЭСИ m/z рассч. $C_{54}H_{76}N_{10}O_{21}$ $[M+H]^+$ 1200,51, найдено 1200,95.

Пример 151. Синтез (4R)-4-(2-((1R,3R)-1-ацетокси-3-((2S,3S)-N, 3-диметил-2-((R)-1-метилпиперидин-2- карбоксамидо) пентанамидо)-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксамидо)-5-(3-(3-(2-(2-азидоэтокси)этокси) пропанамидо)-4-гидроксифенил)-2-метилпентановой кислоты.



К раствору (4R)-4-(2-((1R,3R)-1-ацетокси-3-((2S,3S)-N,3-диметил-2-((R)-1-метилпиперидин-2-карбоксамидо)пентанамидо)-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксамидо)-5-(3-амино-4-гидроксифенил)-2-метилпентановой кислоты (Huang Y. et al, Med Chem. #44, 249th ACS National Meeting, Denver, CO, Mar. 22~26, 2015; WO2014009774) (100 мг, 0,131 ммоль) в смеси DMA (10 мл) и буферного раствора NaH_2PO_4 (pH 7,5, 1,0 M, 0,7 мл) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропаноат (80,0 мг, 0,266 ммоль) четырьмя порциями в течение 2 часов. Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью препаративной C_{18} ВЭЖХ (3,0 × 25 см, 25 мл/мин), элюируя от 80% вода/метанол до 10% вода/метанол в течение 45 минут с получением указанного в заголовке соединения (101,5 мг, 82% выход). ЖХ-МС (ЭСИ) m/z рассч. для $C_{45}H_{70}N_9O_{11}S$ $[M+H]^+$: 944,48, найдено: 944,70.

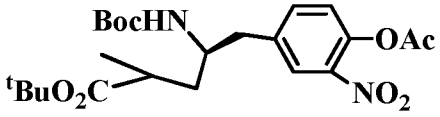
Пример 152. Синтез (4R)-4-(2-((1R, 3R)-1-ацетокси-3-((2S,3S)-N,3-диметил-2-((R)-1-метилпиперидин- 2-карбоксамидо) пентанамидо)-4-метилпентил) тиазол-4-карбоксамидо)-5-(3-(3-(2-(2-(2-аминоэтокси))этокси) пропанамидо)-4-гидроксифенил)-2-метилпентановой кислоты.



К раствору (4R)-4-(2-((1R,3R)-1-ацетокси-3-((2S,3S)-N,3- диметил-2-((R)-1-метилпиперидин-2-карбоксамидо)пентанамидо)-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксамидо)-5-(3-(3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропанамидо)-4-гидроксифенил)-2-метилпентановой кислоты (100,0 мг, 0,106 ммоль) в метаноле(25 мл), содержащем 0,1% HCl в сосуде для гидрирования добавляли Pd/C (25 мг, 10% Pd, 50% влажности). После вакуумирования

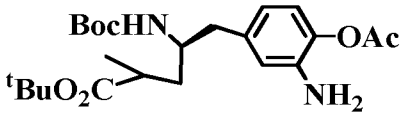
воздуха в сосуде и пропускания H_2 при 35 фунт/кв.дюйм смесь встряхивали в течение 4 ч, фильтровали через целит. Фильтрат упаривали и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ C_{18} (3,0 × 25 см, 25 мл/мин), элюируя от 85% вода/метанол до 15% вода/метанол в течение 45 минут, с получением указанного в заголовке соединения (77,5 мг, 79 % выход). ЖХ-МС (ЭСИ) m/z рассч. для $C_{45}H_{72}N_7O_{11}S$ $[M+H]^+$: 918,49, найдено: 918,60.

Пример 153. Синтез (4R)-*трет*-бутил 5-(4-ацетокси-3-нитрофенил)-4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата.



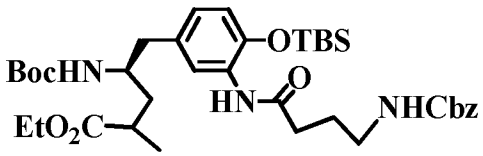
К раствору соединения **190** (107,1 мг, 0,252 ммоль) в дихлорметане (4,0 мл) при 0 °C последовательно добавляли уксусный ангидрид (0,11 мл, 1,17 ммоль) и триэтиламин (0,16 мл). Затем реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 часа, разбавляли дихлорметаном и промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали и упаривали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (0-15% ЭА/ПЭ), получая бесцветное масло (120,3 мг, теоретический выход). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{23}H_{35}N_2O_8$ $[M+H]^+$ 467,23, найдено 467,23.

Пример 154. Синтез (4R)-*трет*-бутил 5-(4-ацетокси-3-аминофенил)-4-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата.



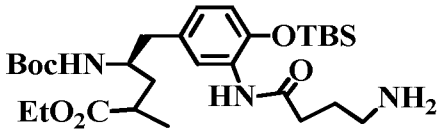
(4R)-Трет-бутил 5-(4-ацетокси-3-нитрофенил)-4-((трет- бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (120,3 мг, 0,258 ммоль) растворяли в этилацетате (5 мл) и уксусной кислоте (0,5 мл). К смеси добавляли Pd/C (10% масс., 10 мг) и смесь перемешивали в атмосфере H_2 при комнатной температуре в течение 30 минут, а затем фильтровали через слой целита, промывая этилацетатом. Фильтрат упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии (0-25% ЭА/ПЭ) с получением желтого масла (120,9 мг, теоретический выход). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{23}H_{37}N_2O_6$ $[M+H]^+$ 437,26, найдено 437,28.

Пример 155. Синтез (4R)-этил 5-(3-(4-(((бензилокси)карбонил)амино) бутанамидо)-4-((трет-бутилдиметилсилил)окси)фенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата.



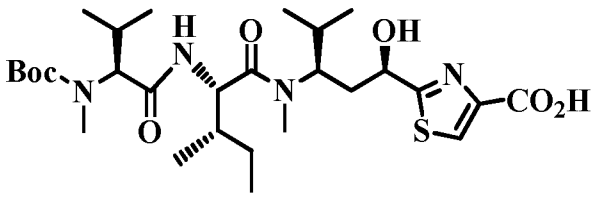
2,5-диоксопирролидин-1-ил 4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутаноата (0,396 г, 1,2 ммоль) и (4R)-этил 5-(3-амино-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил) амино)-2-метилпентаноата (0,44 г, 1,2 ммоль) растворяли в EtOH (10 мл) добавляли фосфатный буферный раствор (pH=7,5, 0,1M, 2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, а затем растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 с получением указанного в заголовке продукта (0,485 г, 70%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{31}H_{44}N_3O_8$ $[M+H]^+$: 586,31, найдено 586,31.

Пример 156. Синтез (4R)-этил 5-(3-(4-аминобутанамидо)-4-((трет-бутилдиметилсилил)окси)фенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата.



(4R)-этил 5-(3-(4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутанамидо)-4-((трет-бутилдиметилсилил)окси)фенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (0,35 г, 0,5 ммоль) растворяли в MeOH (5 мл), а затем добавляли Pd/C (10% масс., 35 мг). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере H_2 в течение ночи, затем фильтровали через целит и фильтрат упаривали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке продукта (0,22 г, выход 79%). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{29}H_{52}N_3O_6Si$ $[M+H]^+$: 566,35, найдено 566,35.

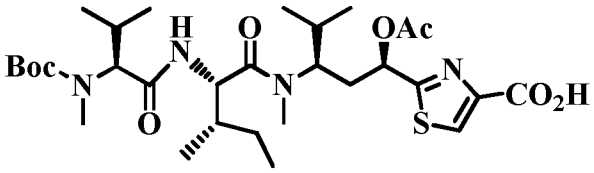
Пример 157. Синтез 2-((6S,9S,12R,14R)-9-((S)-втор-бутил)-14-гидрокси-6,12-диизопропил-2,2,5,11-тетраметил-4,7 10-триоксо-3-окса-5,8,11-триазатетрадекан-14-ил) тиазол-4-карбоновой кислоты.



К раствору Boc-N-Me-L-Val-OH (33 мг, 0,14 ммоль) в EtOAc добавляли пентафторфенол (39 мг, 0,21 ммоль) и DCC (32 мг, 0,154 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов, а затем фильтровали через слой целита, промывая EtOAc. Фильтрат упаривали и повторно растворяли в DMA (2 мл), а затем добавляли 2-((1R,3R)-3-((2S,3S)-2-амино-N,3-диметилпентанамидо)-1-гидрокси-4-

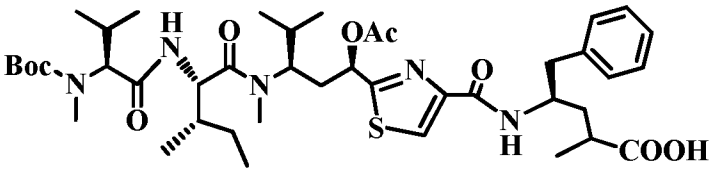
метилпентил)тиазол-4-карбоновую кислоту (52 мг, 0,14 ммоль) и DIPEA (48,5 мкл, 0,28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов, затем упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка C_{18}, 10-100% ацетонитрил/вода) с получением указанного в заголовке соединения (40,2 мг, 49% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{28}H_{49}N_4O_7S$ $[M+H]^+$: 585,32, найдено 585,32.

Пример 158. Синтез 2-((6S,9S,12R,14R)-9-((S)-втор-бутил)-6,12-ди- изопропил-2,2,5,11-тетраметил-4,7,10,16-тетраоксо-3,15-диокса-5,8,11-триазагептадекан-14-ил)тиазол-4-карбоновой кислоты.



2-((6S,9S,12R,14R)-9-((S)-втор-бутил)-14-гидрокси-6,12-диизопропил-2,2,5,11-тетраметил-4,7,10-триоксо-3-окса-5,8,11-триазатетрадекан-14-ил)тиазол-4-карбоновую кислоту (40 мг, 0,069 ммоль) растворяли в пиридине (8 мл), добавляли уксусный ангидрид (20,4 мг, 0,2) ммоль) при 0 °C и реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры, и перемешивали в течение ночи. Смесь упаривали и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 с градиентом ДХМ/MeOH с получением указанного в заголовке продукта (48,1 мг, выход ~ 100%). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{30}H_{51}N_4O_8S$ $[M+H]^+$ 627,33, найдено 627,33.

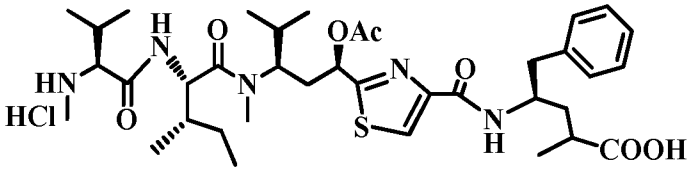
Пример 159. Синтез (4R)-4-(2-((6S,9S,12R,14R)-9-((S)-втор-бутил)-6,12-диизопропил-2,2,5,11-тетраметил-4,7,10,16-тетраоксо-3,15-диокса-5,8,11-триазагептадекан-14-ил)тиазол-4-карбоксамидо)-2-метил-5-фенилпентановой кислоты.



К раствору 2-((6S,9S,12R,14R)-9-((S)-втор-бутил)-6,12-диизопропил-2,2,5,11-тетраметил-4,7,10,16-тетраоксо-3,15-диокса-5,8,11-триазагептадекан-14-ил)тиазол-4-карбоновой кислоты (48,1 мг, 0,077 ммоль) в EtOAc добавляли пентафторфенол (21,2 мг, 0,115 ммоль) и DCC (17,4 мг, 0,085 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов, а затем фильтровали через слой целита, промывая EtOAc. Фильтрат упаривали и повторно растворяли в DMA (4 мл), а затем добавляли (4R)-4-амино-2-метил-5-фенилпентановую кислоту (20,7 мг, 0,1 ммоль) и DIPEA (26,8 мкл, 0,154 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной

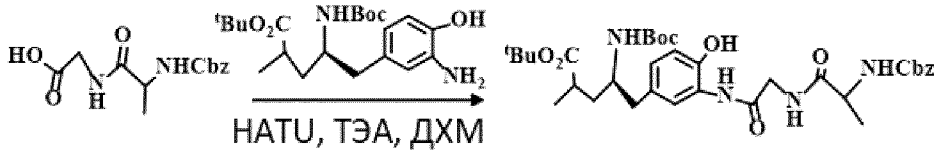
температуре в течение 24 часов, затем упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка C_{18}, 10-100% ацетонитрил/вода) с получением указанного в заголовке соединения (63 мг, ~100% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{42}H_{66}N_5O_9S$ $[M+H]^+$ 816,45, найдено 816,45.

Пример 160. Синтез гидрохлорида (4R)-4-(2-((3S, 6S, 9R, 11R)-6-((S)-втор-бутил)-3,9-диизопропил-8-метил-4,7,13- триоксо-12-окса-2,5,8-триазатетрадекан-11-ил)тиазол-4-карбоксамидо)-2-метил-5-фенилпентановой кислоты.



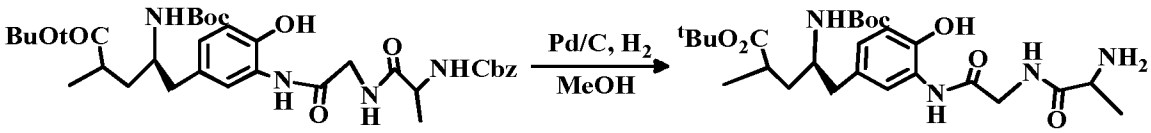
(4R)-4-(2-((6S,9S,12R,14R)-9-((S)-втор-бутил)-6,12-диизопропил-2,2,5,11-тетраметил-4, 7,10,16-тетраоксо-3,15-диокса-5,8,11-триазагептадекан-14-ил)тиазол-4-карбоксамидо)-2-метил-5-фенилпентановая кислота (60 мг, 0,073 ммоль) в этилацетате (3 мл) и соляная кислота (0,8 мл, 12 М). Смесь перемешивали в течение 30 минут и разбавляли толуолом (5 мл) и диоксаном (5 мл). Смесь упаривали и совместно упаривали досуха с диоксаном (5 мл) и толуолом (5 мл). Полученный неочищенный указанный в заголовке продукт (57,1 мг, выход 103%) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{37}H_{58}N_5O_7S$ $[M+H]^+$ 716,40, найдено 716,60.

Пример 161. Синтез (4R)-третбутил-5-(3-(2-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)пропанамидо)ацетамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата



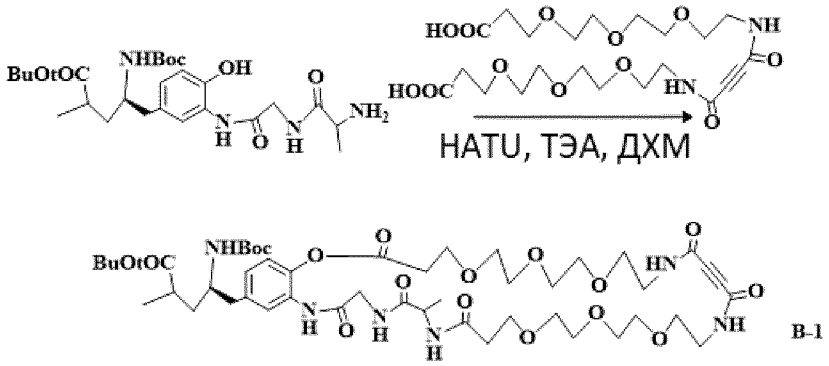
2-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)пропанамидо)уксусную кислоту (0,2 г, 0,7 ммоль), (4R)-трет-бутил-5-(3-амино-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил) амино)-2-метилпентаноат (0,19 г, 0,48 ммоль) и HATU (0,18 г, 0,48 ммоль) растворяли в ДХМ (20 мл) с последующим добавлением ТЭА((134 мкл, 0,96 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и остаток очищали на колонке с SiO_2 с получением указанного в заголовке продукта (0,3 г, 95%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{34}H_{49}N_4O_9$ $[M+H]^+$:657,34, найдено 657,34.

Пример 162. Синтез (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(2-аминопропанамидо) ацетамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил) амино)-2-метилпентаноата



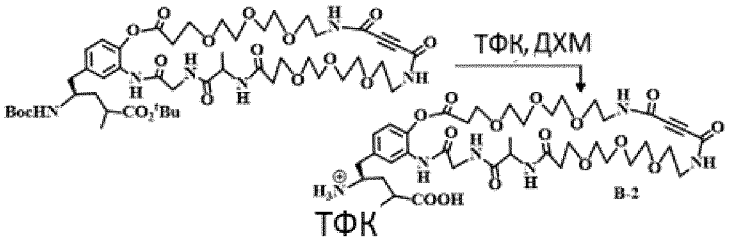
В сосуд для гидрирования, Pd/C (0,1 г, 33% масс., 50% влажности) добавляли к раствору (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(2-(((бензилокси))карбонил)амино)пропанамидо)ацетамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата (0,3 г, 0,46 ммоль) в MeOH (10 мл). Смесь встряхивали в течение ночи при 1 атм H_2, затем фильтровали через целит (вспомогательное средство для фильтрации) и фильтрат упаривали, получая указанное в заголовке соединение (0,21 г, 87%), используемое для следующей стадии без дополнительной очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{26}H_{43}N_4O_7$ $[M+H]^+$:523,31, найдено 523,31.

Пример 163. Синтез B-1 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



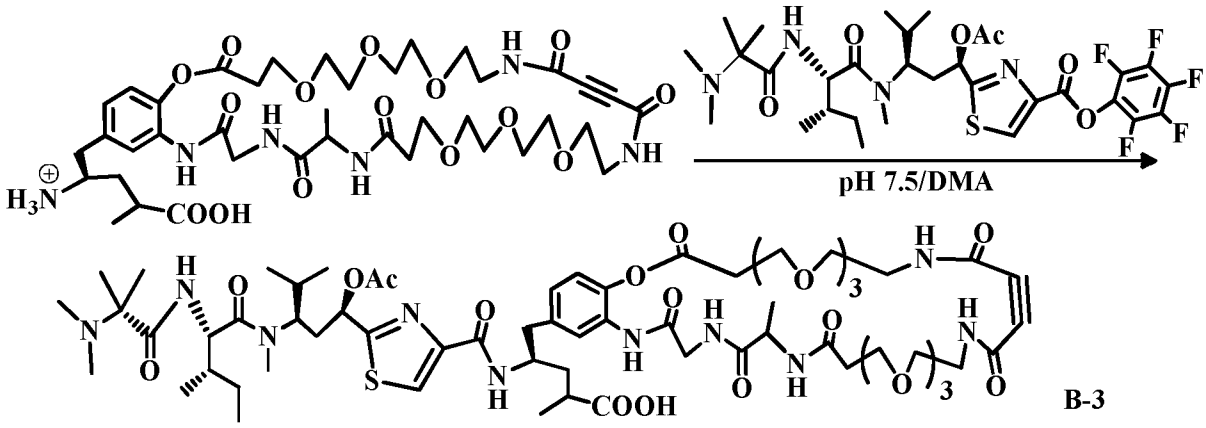
5-(3-(2-(2-аминопропанамидо)ацетамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (0,11 г, 0,2 ммоль), 4,17-диоксо-4 7,10,21,24,27-гексаокса-13,18-диазатриаконт-15-ин-1,30-диовую кислоту (0,104 г, 0,2 ммоль), HATU (0,07 г, 0,2 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл) с последующим добавлением ТЭА (55 мкл, 0,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2, получая продукт **B-1** (0,046 г, 23%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{48}H_{75}N_6O_{17}$ $[M+H]^+$: 1007,51, найдено 1007,52.

Пример 164. Синтез B-2 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



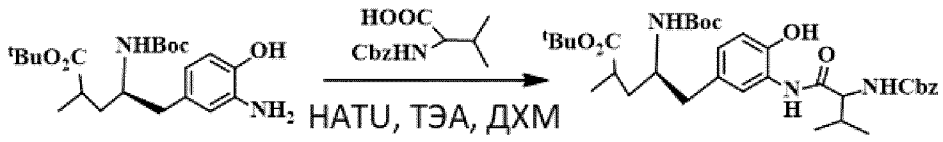
Соединение **B-1** (0,046 г, 0,045 ммоль), растворенное в ДХМ (1 мл), добавляли ТФК (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, упаривали и совместно упаривали с ДХМ/толуолом с получением неочищенного соединения **B -2** (38,6 мг, выход 100%), используемое на следующей стадии без дополнительной очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{39}H_{59}N_6O_{15}$ $[M+H]^+$: 851,40, найдено 851,95.

Пример 165. Синтез B-3 (аналог тубулизина, имеющий бис-линкер).



К раствору соединения **B-2** (38,6 мг, 0,045 ммоль) в DMA (4 мл) добавляли перфторфенил 2-((6S,9R,11R)-6-((S)-втор-бутил)-9-изопропил- 2,3,3,8-тетраметил-4,7,13-триоксо-12-окса-2,5,8-триазатетрадекан-11-ил)тиазол-4-карбоксилат (31,14 мг, 0,045 ммоль), затем добавляли DIPEA (28 мкл, 0,159 ммоль), реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Затем раствор упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с градиентом $MeCN/H_2O$ (от 10% MeCN до 70% MeCN через 45 мин, колонка C-18, 10 мм (д) x 250 мм (л), 9 мл/мин) с получением указанного в заголовке продукта (7,9 мг, 13%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{64}H_{99}N_{10}O_{20}S$ $[M+H]^+$: 1359,67, найдено 1359,62.

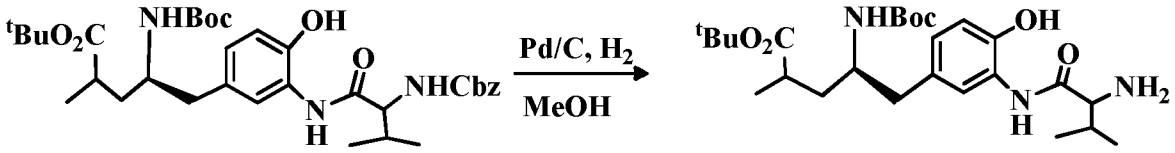
Пример 166. Синтез (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-



метилпентаноата.

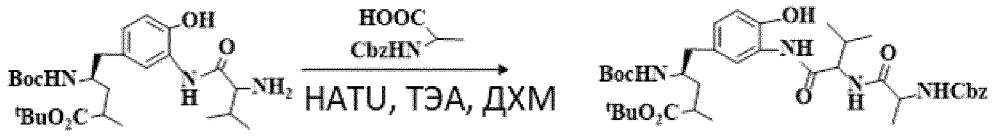
(4R)-трет-бутил-5-(3-амино-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (0,2 г, 0,51 ммоль), 2-(((бензилокси)карбонил)амино)-3-метилбутановую кислоту (0,13 г, 0,51 ммоль), HATU (0,2 г, 0,51 ммоль) растворяли в ДХМ (20 мл) с последующим добавлением ТЭАТЕА (110 мкл, 0,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем растворитель удаляли при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2 с получением указанного в заголовке продукта **12** (0,29 г, 90%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{34}H_{50}N_3O_8$ $[M+H]^+$: 628,35, найдено 628,35.

Пример 167. Синтез (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-амино-3-метилбутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата.



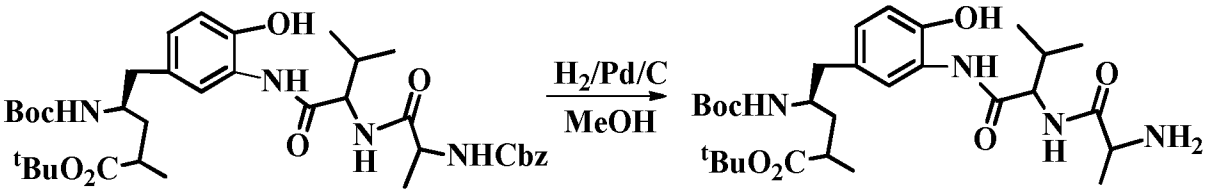
В сосуде для гидрирования, добавляли Pd/C (0,1 г, 33% масс., 50% влажность) к раствору (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(((бензилокси) карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата (0,29 г, 0,46 ммоль) в MeOH (10 мл). Смесь встряхивали в течение ночи при 1 атм H_2, затем фильтровали через целит (вспомогательный фильтр). Фильтрат упаривали с получением указанного в заголовке соединения (0,23 г, 100%) и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{26}H_{44}N_3O_6$ $[M+H]^+$:494,64, найдено 494,64.

Пример 168. Синтез (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(2-(((бензилокси) карбонил) амино)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата.



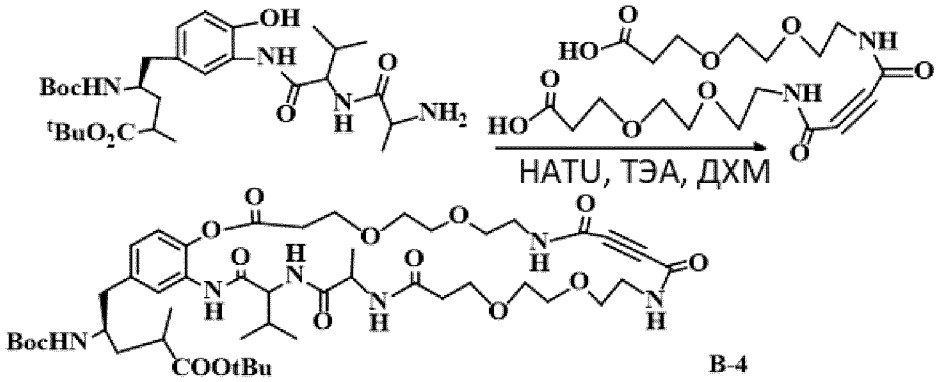
(4R)-трет-бутил-5-(3-(2-амино-3-метилбутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (0,23 г, 0,46 ммоль), 2-(((бензилокси)карбонил)аминопропановую кислоту (0,10 г, 0,46 ммоль) и HATU (0,18 г, 0,46 ммоль) растворяли в ДХМ (20 мл) с последующим добавлением ТЭАТЕА (110 мкл, 0,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2 с получением указанного в заголовке продукта (0,3 г, 95%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{37}H_{55}N_4O_9$ $[M+H]^+$: 699,39, найдено 699,35.

Пример 169. Синтез (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(2-аминопропанамидо)-3-метилбутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата



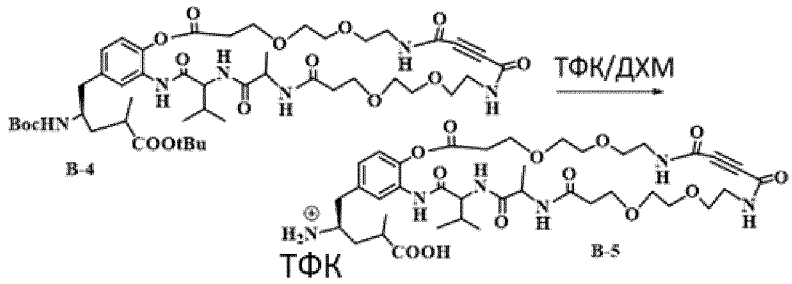
В сосуде для гидрирования Pd/C (0,1 г, 33% масс., 50% влажность) добавляли к раствору (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(2-(((бензилокси)) карбонил)амино) пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата (0,3 г, 0,43 ммоль) в MeOH (10 мл). Смесь встряхивали в течение ночи при 1 атм H_2, затем фильтровали через целит (вспомогательное средство для фильтрации), фильтрат упаривали, получая указанное в заголовке соединение (0,22 г, 93%), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{29}H_{49}N_4O_7$ $[M+H]^+$: 565,35, найдено 565,31.

Пример 170. Синтез B-4 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



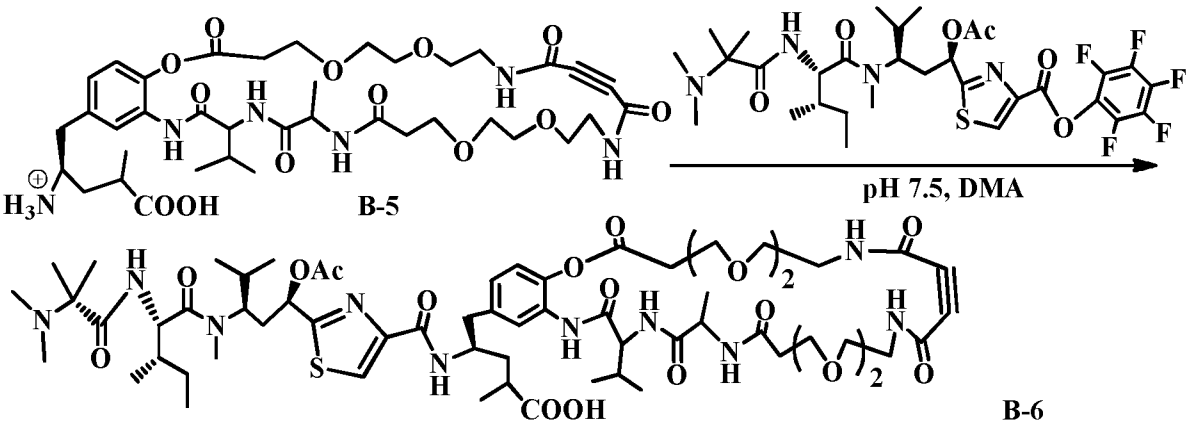
(4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(2-аминопропанамидо)-3-метилбутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (0,05 г, 0,09 ммоль), 11,14-диоксо-4,7,18,21-тетраокса-10,15-диазатетракос-12-ин-1,24-диовую кислоту (0,038 г, 0,09 ммоль), HATU (0,067 г, 0,18 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл) с последующим добавлением ТЭА (55 мкл, 0,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2, получая продукт B-4 (0,01 г, 12%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{47}H_{73}N_6O_{15}$ $[M+H]^+$: 961,51, найдено 961,52.

Пример 171. Синтез B-5 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



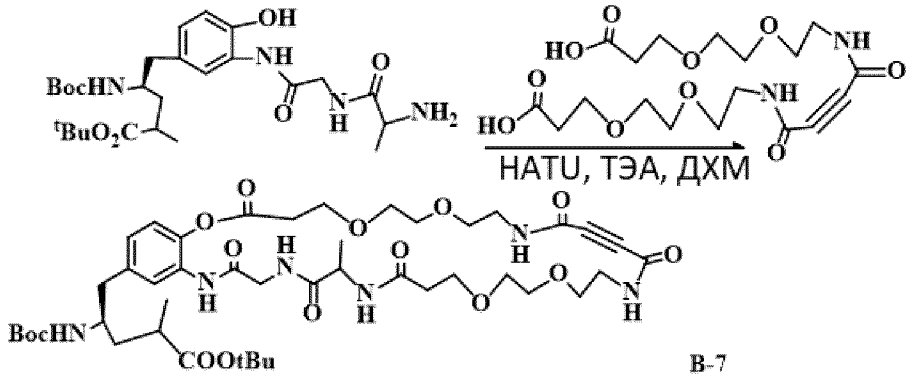
Соединение **B-4** (0,01 г, 0,01 ммоль) растворяли в ДХМ (1 мл) с последующим добавлением ТФК (0,8 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, упаривали, получая соединение **B-5 (** 10 мг **)** для следующей стадии без дополнительной очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{38}H_{56}N_6O_{13}$ $[M+H]^+$: 804,39, найдено 804,65.

Пример 172. Синтез B-6 (аналог тубулизина, имеющий бис-линкер).



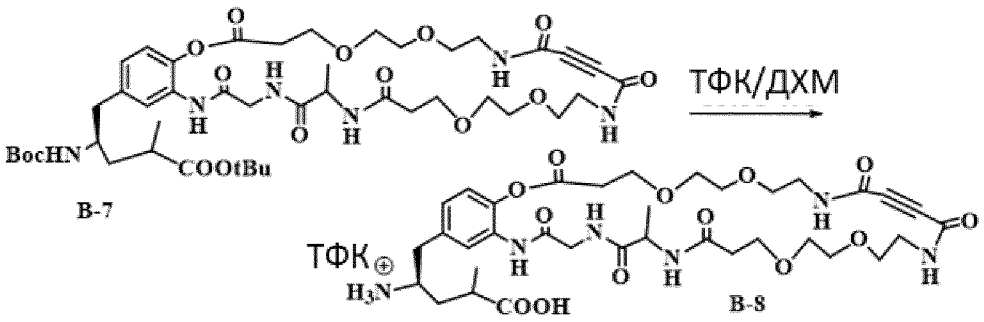
К раствору соединения **B-5** (~ 10 мг) в DMA (4 мл) добавляли соединение пентафторидной кислоты (6,92 мг, 0,01 ммоль) и DIPEA (3,4 мкл, 0,02 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с градиентом MeCN/H_2O (от 10% MeCN до 70% MeCN через 45 мин, колонка C-18, 10 мм (д) x 250 мм (л), 9 мл/мин) с получением продукта **B-6** (8,1 мг, 62%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{63}H_{97}N_{10}O_{18}S$ $[M+H]^+$: 1313,66, найдено 1313,66.

Пример 173. Синтез B-7 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



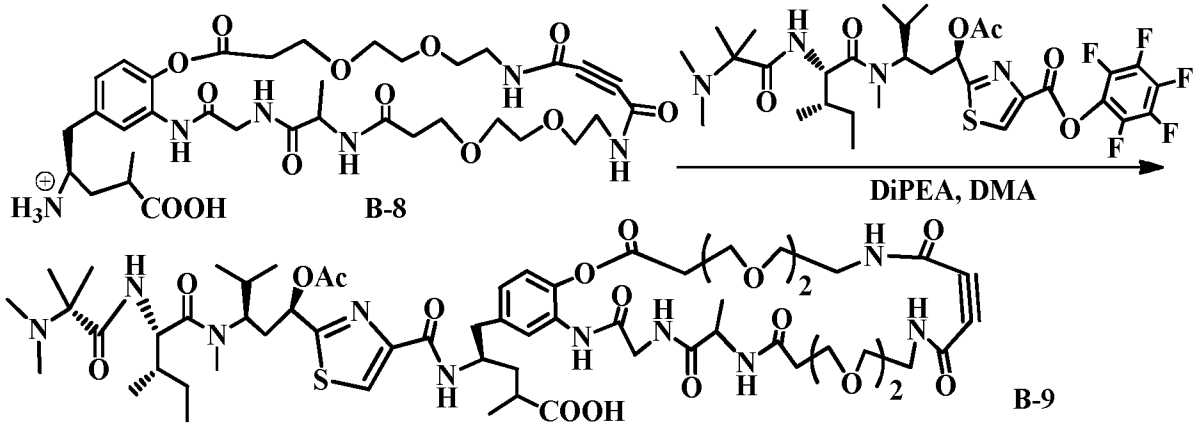
(4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(2-аминопропанамидо) ацетамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил) амино)-2-метилпентаноат (0,21 г, 0,4 ммоль) 11,14-диоксо-4,7,18,21-тетраокса-10,15-диазатетракос-12-ин-1,24-диовую кислоту (0,17 г, 0,4 ммоль), HATU (0,15 г, 0,4 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл) с последующим добавлением ТЭА (110 мкл, 0,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2, получая продукт **B-7** (0,126 г, 34 %). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{44}H_{67}N_6O_{15}$ $[M+H]^+$: 919,46, найдено 919,46.

Пример 174. Синтез B-8 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



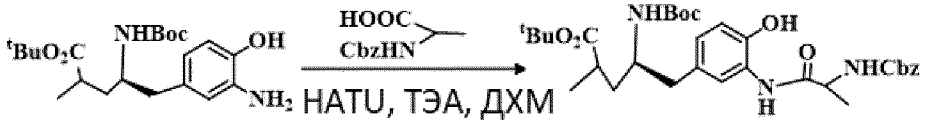
Соединение **B-7** (0,041 г, 0,045 ммоль) растворяли в ДХМ (1 мл) с последующим добавлением ТФК (1 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов, упаривали, получая соединение **B-8,** которое использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{35}H_{51}N_6O_{13}$ $[M+H]^+$: 763,35, найдено 763,80.

Пример 175. Синтез B-9 (аналог тубулизина, имеющий бис-линкер).



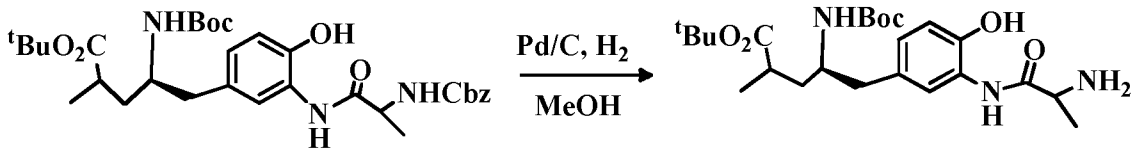
К раствору соединения **B-8** (9,1 мг, 0,012 ммоль) в DMA (1 мл) добавляли соединение пентафторидной кислоты (8,3 мг, 0,012 ммоль) и DIPEA (1,4 мкл, 0,008 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с градиентом MeCN/H_2O (от 10% MeCN до 70% MeCN через 45 мин, колонка C-18, 10 мм (д) x 250 мм (л), 9 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения **B-9** (4,7 мг, 31%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{60}H_{91}N_{10}O_{18}S$ $[M+H]^+$: 1271,62, найдено 1271,62.

Пример 176. Синтез (4R)-третбутил-5-(3-(2-(((бензилокси) карбонил)амино) пропанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил) амино)-2-метилпентаноата



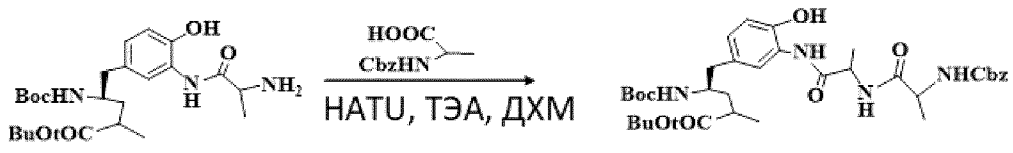
(4R)-трет-бутил-5-(3-амино-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (0,3 г, 0,76 ммоль), 2-(((бензилокси)карбонил)аминопропановую кислоту (0,17 г, 0,76 ммоль), HATU (0,29 г, 0,76 ммоль) растворяли в ДХМ (20 мл) с последующим добавлением ТЭА (110 мкл, 0,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2 с получением указанного в заголовке продукта (0,43 г, 95%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{32}H_{46}N_3O_8$ $[M+H]^+$: 600,32, найдено 600,32.

Пример 177. Синтез (4R)-третбутил-5-(3-(2-аминопропанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата.



В сосуд для гидрирования, добавляли Pd/C (0,1 г, 33% масс., 50% влажность) к раствору (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(((бензилокси) карбонил)амино)пропанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата (0,3 г, 0,5 ммоль) в MeOH (10 мл). Смесь встряхивали в течение ночи при 1 атм H_2, а затем фильтровали через целит (вспомогательное средство для фильтрации). Фильтрат упаривали, получая указанное в заголовке соединение (0,24 г, 100%), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{24}H_{40}N_3O_6$ $[M+H]^+$: 466,28, найдено 466,28.

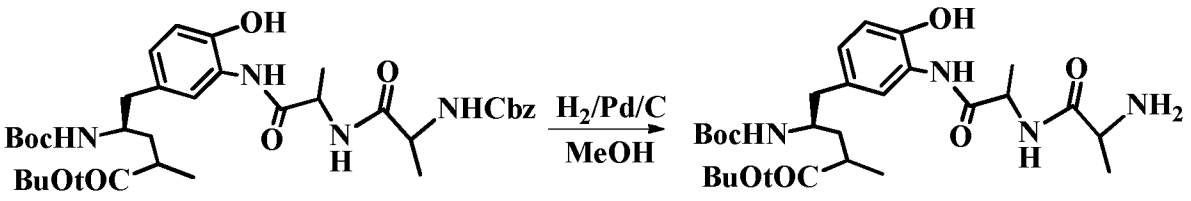
Пример 178. Синтез (4R)-третбутил-5-(3-(2-(2-(((бензилокси)карбонил)амино) пропанамидо)пропанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата



(4R)-Трет-бутил-5-(3-(2-аминопропанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (0,24 г, 0,5 ммоль), 2-(((бензилокси)карбонил)амино)пропановую кислоту (0,11 г, 0,5 ммоль) и HATU (0,2 г, 0,5 ммоль) растворяли в ДХМ (20 мл) с последующим добавлением ТЭА (110 мкл, 0,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2 с получением

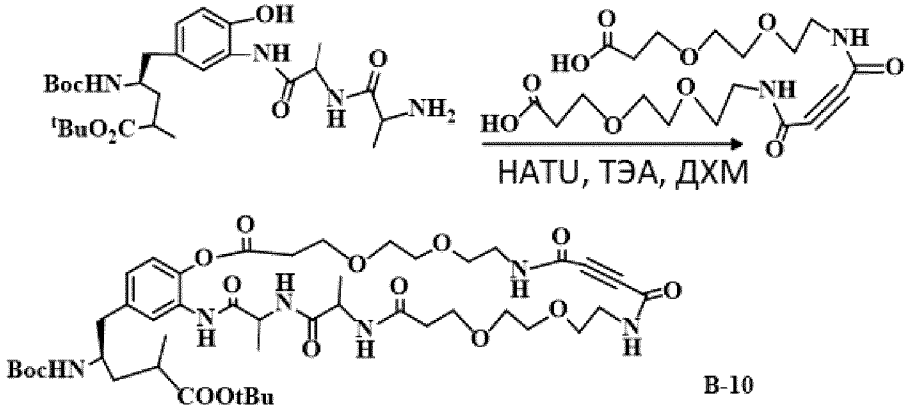
указанного в заголовке продукта (0,28 г, 85%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{35}H_{51}N_4O_9$ $[M+H]^+$: 671,36, найдено 671,35.

Пример 179. Синтез (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(2-аминопропанамидо) пропанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил) амино)-2-метилпентаноата.



В колбу для гидрирования, добавляли Pd/C (0,028 г, 10% масс., 50% влажность) к раствору (4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(2-(((бензилокси))карбонил)амино)пропанамидо)пропанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата (0,28 г, 0,42 ммоль) в MeOH (10 мл). Смесь встряхивали в течение ночи при 1 атм H_2, а затем фильтровали через целит (вспомогательное средство для фильтрации). Фильтрат упаривали, получая указанное в заголовке соединение (0,18 г, 100%), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{27}H_{45}N_4O_7$ $[M+H]^+$: 437,32, найдено 437,31.

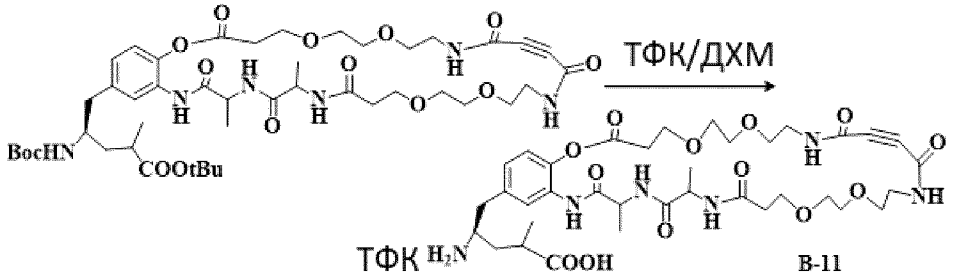
Пример 180. Синтез B-10 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



(4R)-трет-бутил-5-(3-(2-(2-аминопропанамидо) пропанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил) амино)-2-метилпентаноат (0,064 г, 0,12 ммоль) 11,14-диоксо-4,7,18,21-тетраокса-10,15-диазатетракос-12-ин-1,24-диовую кислоту (0,042 г, 0,097 ммоль) и HATU (0,073 г, 0,194 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл) с последующим добавлением ТЭА (27,5 мкл, 0,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2 с

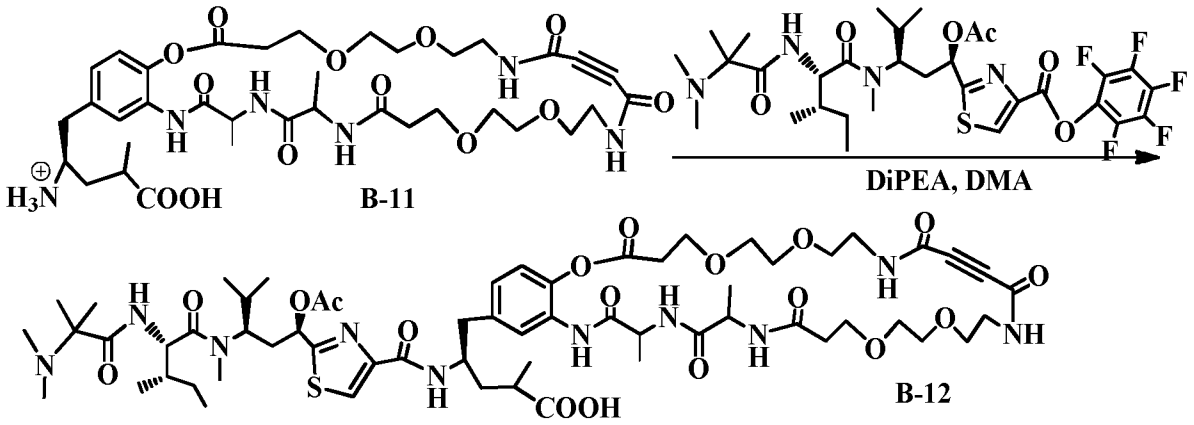
получением указанного в заголовке продукта **B-10** (0,074 г, 82%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{45}H_{69}N_6O_{15}$ $[M+H]^+$: 933,47, найдено 933,46.

Пример 181. Синтез B-11 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



Соединение **B-10** (0,074 г, 0,08 ммоль) растворяли в ДХМ (1 мл) с последующим добавлением ТФК (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, упаривали с получением соединения **B-11,** которое использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки.

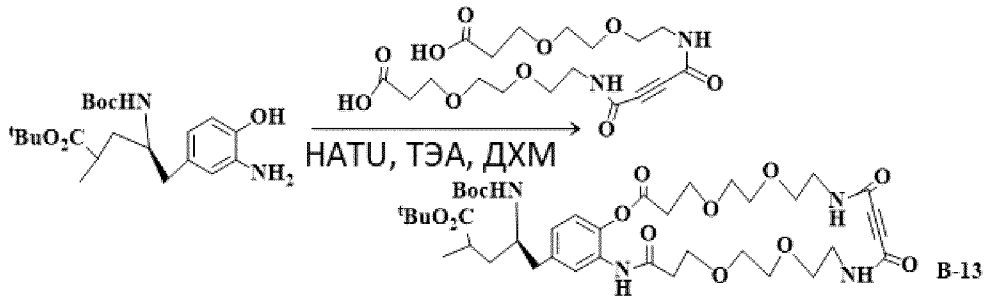
Пример 182. Синтез B-12 (аналог тубулизина, имеющий бис-линкер).



К раствору соединения **B-11** (62,08 мг, 0,08 ммоль) в DMA (1 мл) добавляли соединение пентафторидной кислоты (55,36 мг, 0,08 ммоль), затем добавляли DIPEA (27 мкл, 0,16 ммоль), реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Затем раствор упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с градиентом MeCN/H_2O (от 10% MeCN до 70% MeCN через 45 мин, колонка C-18, 10 мм (д) x 250 мм (л), 9 мл/мин) с получением указанного в заголовке продукта **B-12** (20 мг, 20%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{60}H_{91}N_{10}O_{18}S$ $[M+H]^+$: 1285,63, найдено 1285,63.

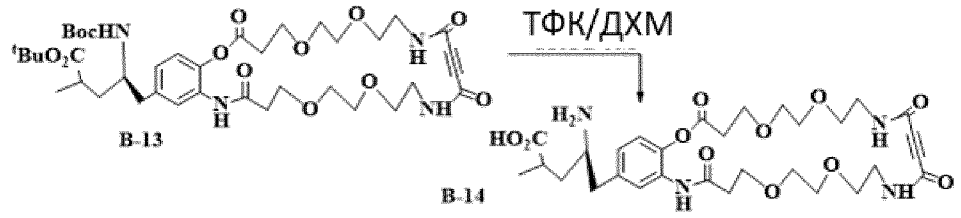
Пример 183. Синтез B-13 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер). (4R)-трет-бутил-5-(3-амино-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (0,19 г, 0,48 ммоль), 11,14-диоксо-4, 7,18,21-тетраокса-10,15-диазатетракос-12-ин-1,24-диовую кислоту (0,173 г, 0,4 ммоль) и HATU (0,3 г, 0,8 ммоль)

растворяли в ДХМ (50 мл), затем добавляли ТЭА (110 мкл, 0,8 ммоль).



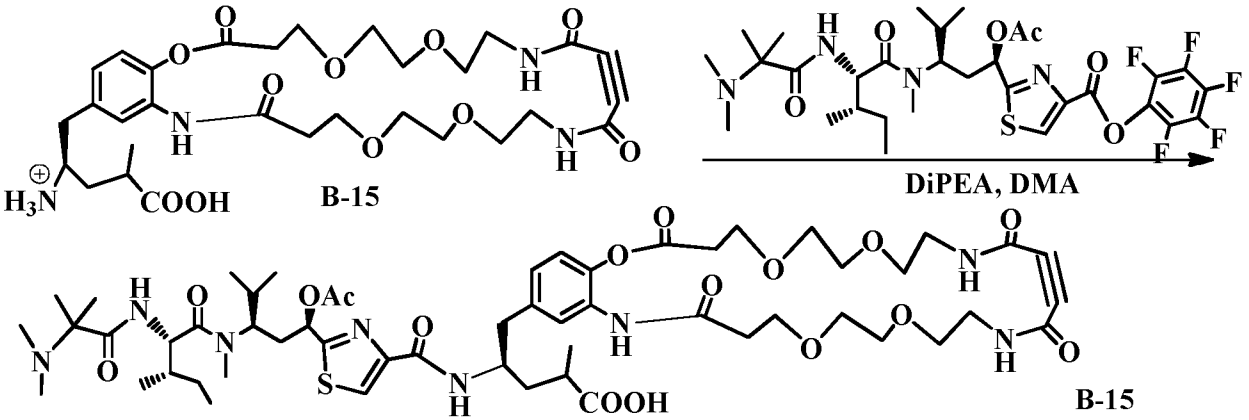
Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2 с получением указанного в заголовке продукта **B-13** (0,25 г, 80%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{39}H_{59}N_4O_{13}$ $[M+H]^+$: 791,40, найдено 791,40.

Пример 184. Синтез B-14 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



Соединение **B-13** (0,1 г, 0,14 ммоль) растворяли в ДХМ (1 мл) а затем добавляли ТФК (0,8 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем упаривали, получая соединение **B-14,** которое использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки.

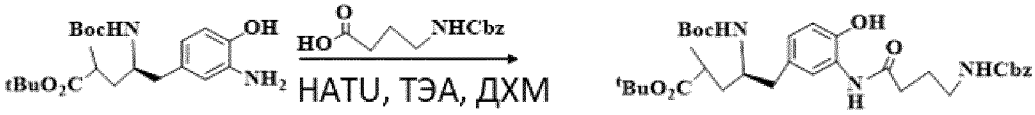
Пример 185. Синтез B-15 (аналог тубулизина, имеющий бис-линкер).



К раствору соединения **B-14** (88,76 мг, 0,14 ммоль) в DMA (1 мл) добавляли соединение пентафторидной кислоты (96,88 мг, 0,14 ммоль), затем добавляли DIPEA (47,5

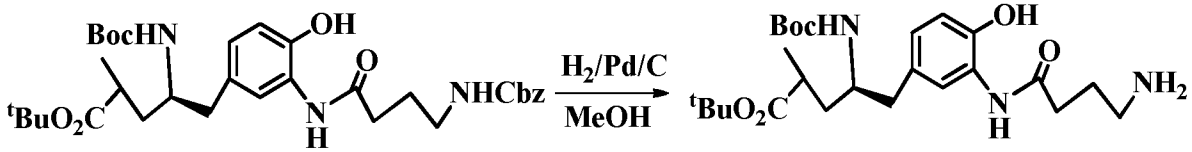
мкл, 0,28 ммоль), реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Затем раствор упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с градиентом MeCN/H_2O (от 10% MeCN до 70% MeCN через 45 мин, колонка C-18, 10 мм (д) x 250 мм (л), 9 мл/мин) для получения указанного в заголовке продукта **B-15** (40 мг, 25%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{55}H_{83}N_8O_{16}S$ $[M+H]^+$: 1143,56, найдено 1143,56.

Пример 186. Синтез (4R)-трет-бутил-5-(3-(4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата



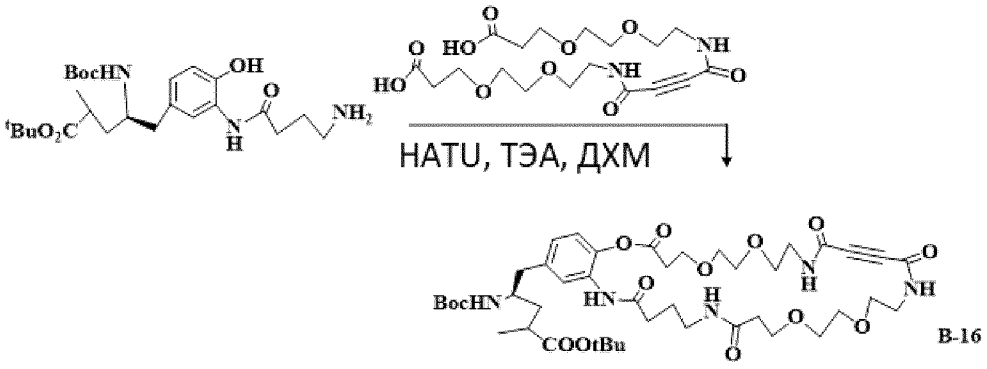
(4R)-трет-бутил-5-(3-амино-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (0,2 г, 0,5 ммоль), 4-(((бензилокси)карбонил)амино)бутановую кислоту (0,12 г, 0,5 ммоль) и HATU (0,2 г, 0,5 ммоль) растворяли в ДХМ (50 мл), а затем добавляли ТЭА (110 мкл, 0,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2 с получением указанного в заголовке продукта (0,26 г, 85%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{33}H_{48}N_3O_8$ $[M+H]^+$: 614,34, найдено 614,34.

Пример 187. Синтез (4R)-трет-бутил-5-(3-(4-аминобутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата.



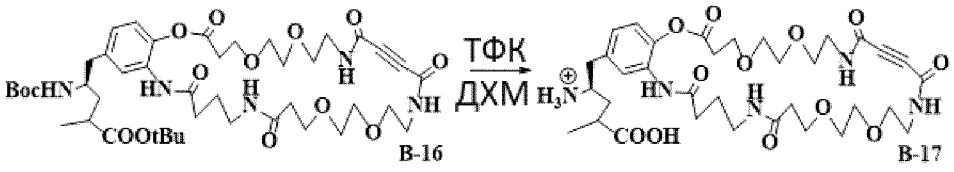
В колбу для гидрирования, добавляли Pd/C (0,028 г, 10% масс., 50% влажность) к раствору (4R)-трет-бутил-5-(3-(4-(((бензилокси) карбонил)амино)бутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноата (0,09 г, 0,15 ммоль) в MeOH (10 мл). Смесь встряхивали в течение ночи при 1 атм H_2, а затем фильтровали через целит (вспомогательное средство для фильтрации). Фильтрат упаривали, получая указанное в заголовке соединение (0,07 г, 100%), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{25}H_{42}N_3O_6[M+H]^+$: 480,30, найдено 480,31.

Пример 188. Синтез B-16 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



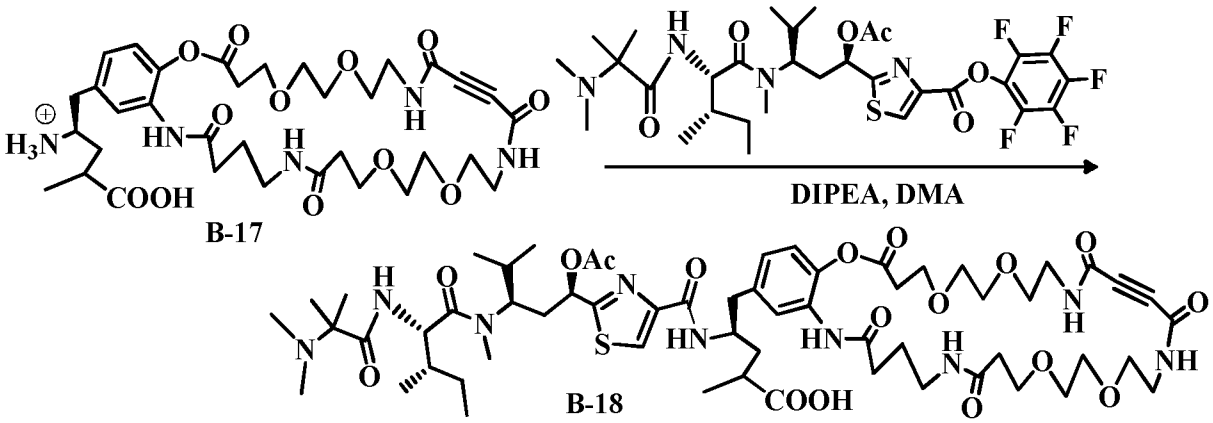
(4R)-трет-бутил-5-(3-(4-аминобутанамидо)-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (39 мг, 0,08 ммоль), 11,14-диоксо-4,7,18,21-тетраокса-10,15-диазатетракос-12-ин-1,24-диовую кислоту (43 мг, 0,1 ммоль) и HATU (30,4 мг, 0,08 ммоль) растворяли в ДХМ (20 мл) с последующим добавлением ТЭА (22 мкл, 0,16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2 с получением указанного в заголовке продукта **B-16** (42 мг, 60%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{43}H_{66}N_5O_{14}$ $[M+H]^+$: 876,45, найдено 876,40.

Пример 189. Синтез B-17 (фрагмент тубулизина, имеющий бис-линкер).



Соединение **B-16** (17 мг, 0,019 ммоль) растворяли в ДХМ (0,8 мл) с последующим добавлением ТЭА (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем упаривали, получая соединение **B-17 (** 17 мг,> 100%), которое использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{34}H_{50}N_5O_{12}$ $[M+H]^+$: 720,34, найдено 720,70.

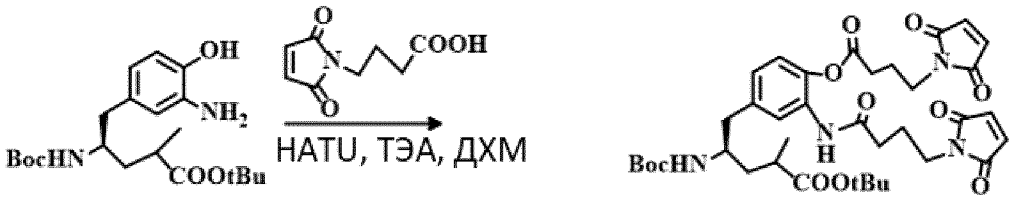
Пример 190. Синтез B-18 (аналог тубулизина, имеющий бис-линкер).



B-17 B-18

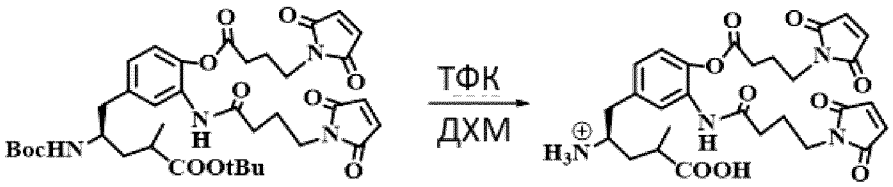
К раствору соединения **B-17** (13,6 мг, 0,019 ммоль) в DMA (1 мл) добавляли соединение пентафторид-активной кислоты (13 мг, 0,019 ммоль) и DIPEA (6,4 мкл, 0,038 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с градиентом MeCN/H_2O (от 10% MeCN до 70% MeCN через 45 мин, колонка С-18, 10 мм (д) х 250 мм (л), 9 мл/мин) с получением указанного в заголовке продукта **B-18** (9,9 мг, 42%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{59}H_{90}N_9O_{17}S$ $[M+H]^+$: 1228,61, найдено 1228. 60.

Пример 191. Синтез (4R)-трет-бутил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(3-(4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)бутанамидо)-4-((4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил) бутаноил)окси)фенил)-2-метилпентаноата.



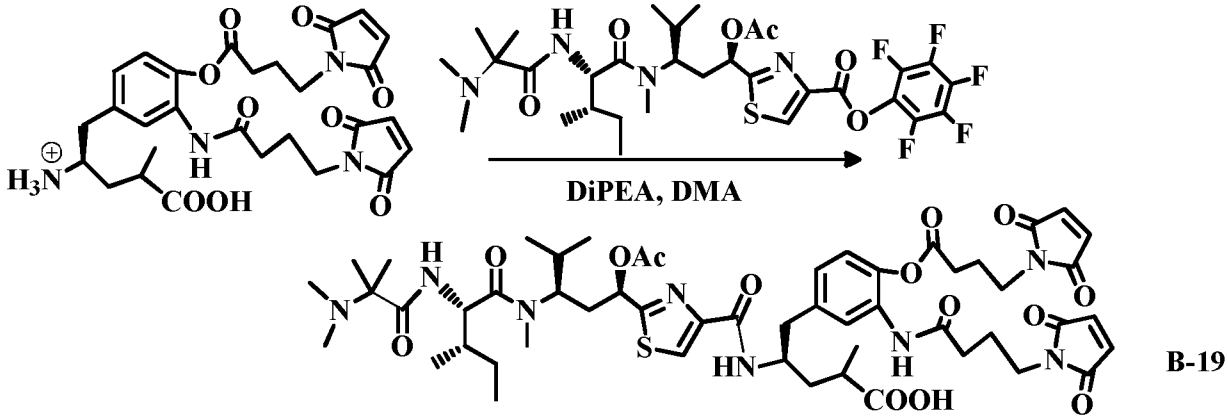
(4R)-трет-бутил-5-(3-амино-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (68 мг, 0,17 ммоль), 4-(2,5-диоксо- 2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)бутановую кислоту (94,5 мг, 0,52 ммоль) и HATU (161,5 мг, 0,425 ммоль) растворяли в ДХМ (50 мл) с последующим добавлением ТЭА(73 мкл, 0,52 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке с SiO_2, элюируя смесью EtOAc/ДХМ (1:10), с получением указанного в заголовке продукта (98 мг, 80%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{37}H_{49}N_4O_{11}$ $[M+H]^+$: 725,33, найдено 725,34.

Пример 192. Синтез (2R)-4-карбокси-1-(3-(4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)бутанамидо)-4-((4-(2, 5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)бутаноил)окси)фенил) пентан-2-амина, соли ТФК.



(4R)-трет-бутил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(3-(4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)бутанамидо)-4-((4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил) бутаноил)окси)фенил)-2-метилпентаноат (98 мг, 0,135 ммоль) растворяли в ДХМ (5 мл) с последующим добавлением ТФК (3 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем упаривали, получая указанное в заголовке соединение (95 мг,> 100% выход), которое использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{28}H_{33}N_4O_9$ $[M+H]^+$: 569,22, найдено 569,60.

Пример 193. Синтез (4R)-4-(2-((6S,9R,11R)-6-((S)-втор-бутил)-9-изопропил-2,3,3,8-тетраметил-4,7, 13-триоксо-12-окса-2,5,8-триазатетрадекан-11-ил) тиазол-4-карбоксамидо)-5-(3-(4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н- пиррол-1-ил)бутанамидо)-4-((4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)бутаноил)окси)фенил)-2-метилпентановой кислоты (В- 19).

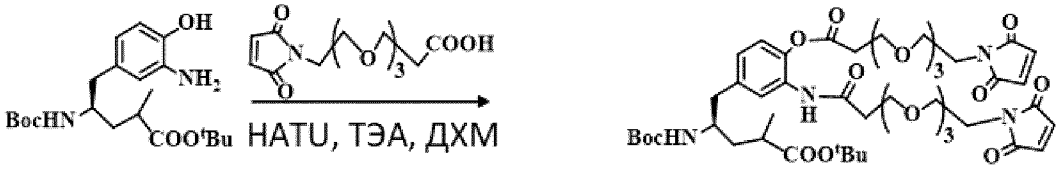


В-19

К раствору (2R)-4-карбокси-1-(3-(4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)бутанамидо)-4-((4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)бутаноил)окси)фенил)пентан-2-амина, соль ТФК (76,9 мг, 0,135 ммоль) в DMA (1 мл) добавляли соединение пентафторидной кислоты (44 мг, 0,06 ммоль) и DIPEA (45,8 мкл, 0,27 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с градиентом MeCN/H_2O (от 10% MeCN до 70% MeCN через 45 мин, колонка С-18, 10 мм (д) х 250 мм (л), 9 мл/мин) с

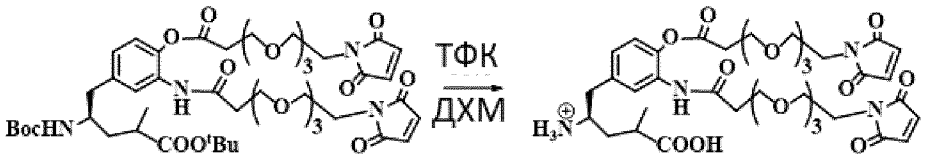
получением указанного в заголовке продукта **B-19** (37 мг, 55%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{53}H_{73}N_8O_{14}S$ $[M+H]^+$: 1077,49, найдено 1077. 50.

Пример 194. Синтез (4R)-трет-бутил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(3-(3-(2-(2-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)этокси)этокси)этокси)пропанамидо)-4-((3-(2-(2-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1 ил)этокси)этокси)этокси)пропаноил)окси)фенил)-2-метилпентаноата.



(4R)-трет-бутил-5-(3-амино-4-гидроксифенил)-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпентаноат (100 мг, 0,25 ммоль), 3-(2-(2-) (2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)этокси)этокси)этокси)пропановую кислоту (75 мг, 0,25 ммоль) и HATU (190 мг, 0,5 ммоль) растворяли в ДХМ (50 мл) с последующим добавлением ТЭА (73 мкл, 0,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали при пониженном давлении и очищали на колонке SiO_2, элюируя смесью EtOAc/ДХМ (1: 3), с получением указанного в заголовке продукта (180,05 мг, 75%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{47}H_{69}N_4O_{17}$ $[M+H]^+$: 961,45, найдено 961,81.

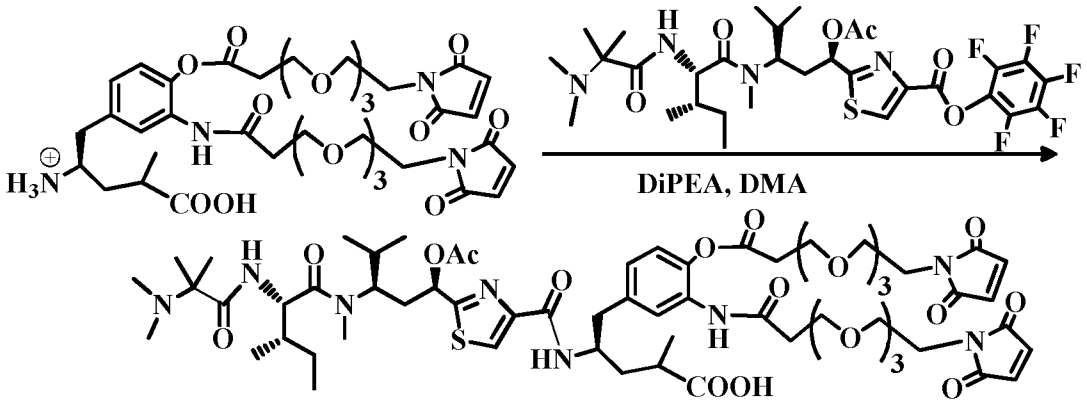
Пример 195. Синтез (2R)-4-карбокси-1-(3-(3-(2-(2-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)этокси))этокси)этокси)пропанамидо)-4-((3-(2-(2-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)этокси)этокси)этокси)пропаноил)окси)фенил)пентан-2-амина, соль ТФК.



(4R)-Трет-бутил-4-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-(3-(3-(2-(2-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н))пиррол-1-ил)этокси)этокси)этокси) пропанамидо)-4-((3-(2-(2-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)этокси)этокси)этокси)пропаноил)окси)фенил)-2-метилпентаноат (180,0 мг, 0,187 ммоль) растворяли в ДХМ (12 мл) с последующим добавлением ТФК (6 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем концентрировали и упаривали досуха совместно с ДХМ/толуолом с получением указанного в заголовке соединения (155 мг,> 100% выход), которое

использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки. ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{38}H_{54}N_4O_{15}$ $[M+H]^+$: 805,35, найдено 805,60.

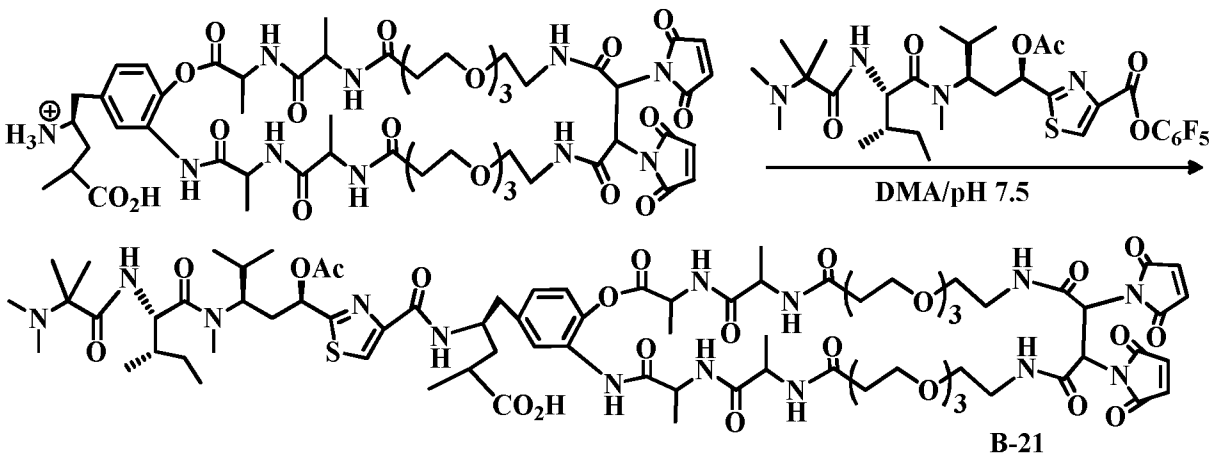
Пример 196. Синтез (4R)-4-(2-((6S,9R,11R)-6-((S)-втор-бутил)-9-изопропил-2,3,3,8-тетраметил-4,7, 13-триоксо-12-окса-2,5,8-триазатетрадекан-11-ил) тиазол-4-карбоксамидо)-5-(3-(3-(2-(2-(2-(2,5-диоксо -2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)этокси)этокси)этокси)пропанамидо)-4-((3-(2-(2-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)этокси) этокси)этокси)этокси)пропаноил)окси)фенил)-2-метилпентановой кислоты (**B-20**).



B-20

К раствору (2R)-4-карбокси-1-(3-(3-(2-(2-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил))этокси)этокси)этокси)пропанамидо)-4-((3-(2-(2-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)этокси)этокси)этокси)пропаноил)окси)фенил)пентан-2-амина, соль ТФК (43 мг, 0,06 ммоль) в DMA (1 мл), добавляли соединение пентафторид-активной кислоты (48,5 мг, 0,06 ммоль) и DIPEA (34 мкл, 0,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с градиентом MeCN/H_2O (от 10% MeCN до 70% MeCN через 45 мин, колонка С-18, 10 мм (д) х 250 мм (л), 9 мл/мин) с получением указанного в заголовке продукта **B-20** (35 мг, 45%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{59}H_{85}N_8O_{18}S$ $[M+H]^+$: 1313,61, найдено 1313. 85.

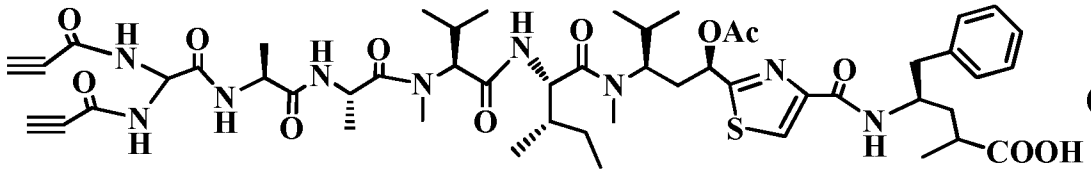
Пример 197. Синтез (4R)-5-(22,23-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-3,6,39,42-тетраметил-2,5, 8,21,24,37,40,43-октаоксо-3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,15,16,18,19,20,21,22,23, 24,25,26,27, 29,30,32,33,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44-гексатриаконтагидро-2Н-бензо[b][1,14,17,20,31,34,37,4,7,10,23,28,41,44] гептаоксагептаазациклогексатетраконтин-46-ил)-4-(2-((6S, 9R, 11R)-6-((S)-втор-бутил)-9-изопропил-2,3,3,8-тетраметил-4,7,13-триоксо-12-окса-2,5,8-триазатетрадекан-11-ил)тиазол-4-карбоксамидо)-2-метилпентановой кислоты (**B-21**).



B-21

К раствору (2R)-1-(22,23-бис(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,6,39,42-тетраметил-2, 5,8,21,24,37,40,43-октаоксо-3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,15,16,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,29,30,32,33,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44-гексатриаконтагидро-2H-бензо[b][1,14,17,20,31,34,37, 4,7,10,23,28,41,44] гептаоксагептаазациклогексатетраконтин-46-ил)-4-карбоксипентан-2-амина ТФК соль (60 мг, 0,050 ммоль) в DMA (1,5 мл) добавляли соединение пентафторид-активной кислоты (44 мг, 0,06 ммоль) и 0,1 M NaH_2PO_4, pH 7,5, 0,8 мл. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с градиентом $MeCN/H_2O$ (от 10% MeCN до 70% MeCN через 45 мин, колонка C-18, 10 мм (д) x 250 мм (л), 8 мл/мин) с получением указанного в заголовке продукта **B-21** (44 мг, выход 52%). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{79}H_{117}N_{14}O_{26}S$ $[M+H]^+$: 1709,79, найдено 1709,55.

Пример 198. Синтез (4R)-4-(2-((4R, 6R, 9S, 12S, 15S, 18S)-9-((S)-втор-бутил)-6,12-диизопропил-7,13,15, 18-тетраметил-2,8,11,14,17,20,23-гептаоксо-21-пропиоламидо-3-окса-7,10,13,16,19,22-гексаазапентакос-24-ин-4-ил)тиазол-4-карбоксамидо)-2-метил-5-фенилпентановой кислоты (B-22).



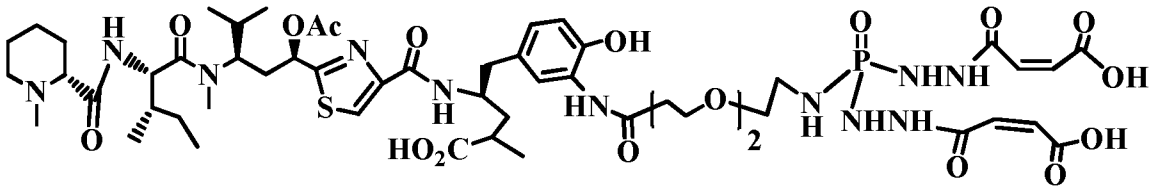
(B-22)

К гидрохлорид (4R)-4-(2-((3S,6S,9R,11R)-6-((S)-втор-бутил)-3,9-диизопропил-8-метил-4,7,13-триоксо-12-окса-2,5,8-триазатетрадекан-11-ил) тиазол-4-карбоксамидо)-2-метил-5-фенилпентановой кислоты (25 мг, 0,034 ммоль) в смеси DMA (2 мл) и 0,1 M Na_2HPO_4, pH 8,0 (1 мл), добавляли (S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 2-((S)-2-(2,2-дипропиоламидоацетамидо)пропанамидо)пропаноат (23,1 мг, 0,053 ммоль) тремя порциями в течение 3 часов, а затем смесь перемешивали в течение еще 12 часов. Смесь

упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (200 (L) мм x 10(d) мм, колонка C_{18}, 10-100% ацетонитрил/вода за 40 минут, v =8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (30,0 мг, 85% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{51}H_{71}N_9O_{12}S$ $[M+H]^+$ 1034,49, найдено 1034,90.

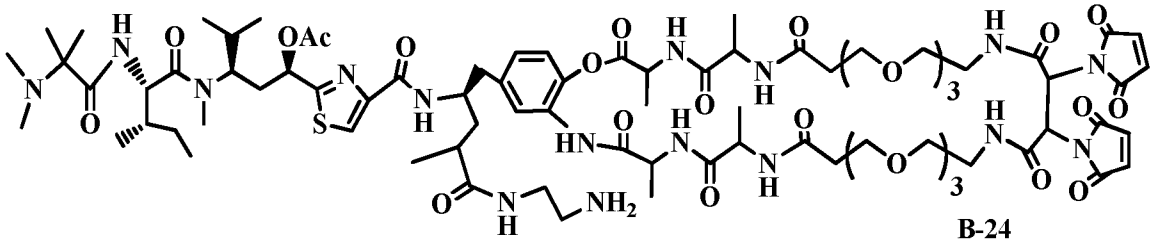
Пример 199. Синтез (4R)-4-(2-((1R, 3R)-1-ацетокси-3-((2S, 3S)-N, 3-диметил-2-((R)-1-метилпиперидин-2- карбоксамидо) пентанамидо)-4-метил-пентил)тиазол-4-карбоксамидо)-5-(4-гидрокси-3-(3-(2-(2-((бис((Z)-3-карбоксиакрилгидразинил)фосфорил)амино)этокси)этокси)пропанамидо)фенил)-2-метилпентановой кислоты (B-23).

(**Б-23**)



К соединению (Z)-3-карбоксиакрилгидразид соли HCl (22,0 мг, 0,132 ммоль) в смеси ТГФ (5 мл) и DIPEA (10 мкл, 0,057 ммоль) при 0 °C добавляли $POCl_3$ (10,1 мг, 0,0665 ммоль). После перемешивания при 0°C в течение 20 минут смесь нагревали до комнатной температуры и продолжали перемешивать в течение дополнительных 4 часов. Затем к смеси добавляли соединение (4R)-4-(2-((1R, 3R)-1-ацетокси-3-((2S, 3S)-N,3-диметил-2-((R)-1 метилпиперидин-2-карбоксамидо)пентанамидо)-4-метилпентил)тиазол-4-карбоксамидо)-5-(3-(3-(2-(2-аминоэтокси)этокси)пропанамидо)-4-гидроксифенил)-2-метилпентановую кислоту (60 мг, 0,065 ммоль) и DIPEA (20 мкл, 0,114 ммоль). Смесь перемешивали при 50 °C в течение ночи, упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (250 (L) мм x 10(d) мм, колонка C_{18}, 10-100% ацетонитрил/вода в течение 40 минут, v =8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (23,1 мг, 32% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{53}H_{81}N_{11}O_{18}PS$ $[M+H]^+$ 1222,51, найдено 1222,80.

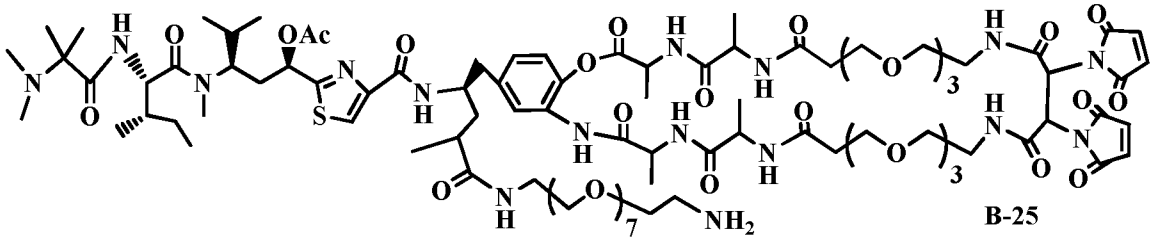
Пример 200. Синтез (1R,3R)-1-(4-(((2R)-5-((2-аминоэтил)амино)-1-(22,23-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро)-1H-пиррол-1-ил)-3,6,39,42-тетраметил-2,5,8,21,24,37,40,43-октаоксо-3,4,5,6,7,8, 9,10,12,13,15,16,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,29,30,32,33,35,36,37,38,39, 40,41,42,43,44-гексатриаконтагидро-2H-бензо[b] [1,14,17,20,31,34,37,4,7,10,23,28,41,44]гептаоксагептааза-циклогексатетраконтин -46-ил)-4-метил-5-оксопентан-2-ил)карбамоил)тиазол-2-ил)-3-((2S,3S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)- N,3-диметилпентанамидо)-4-метилпентилацетата (**B-24**).



B-24

Соединение B-21 (22,0 мг, 0,0129 ммоль) в DMA (1 мл) добавляли EDC (15,0 мг, 0,078 ммоль), гидрохлоридную соль этан-1,2-диамина (8,0 мг, 0,060 ммоль) и DIPEA (0,010 мл, 0,060 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (250 (л) мм x 10(d) мм, C_{18} колонка, 10-100% ацетонитрил/вода в течение 40 минут, v =8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (14,0 мг, 62% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{81}H_{123}N_{16}O_{25}S$ $[M+H]^+$ 1751,85, найдено 1751,20.

Пример 201. Синтез (1R,3R)-1-(4-(((28R)-1-амино-29-(22,23-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-) ил)-3,6,39,42-тетраметил-2,5,8,21,24,37,40,43-октаоксо-3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,
15,16,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,29,30,32,33,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44-гексатриаконтагидро-2H-бензо[b][1,14,17,20,31,34,37,4,7,10,23,28,41,44] гептаоксагептааза-циклогексатетраконтин-46-ил)-26 метил-25-оксо-3,6,9,12,15,18,21-гептаокса-24-азанонакосан-28-ил карбамоил)тиазол-2-ил)-3-((2S, 3S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N,3-диметилпентанамидо)-4-метилпентилацетата (**B-25**)

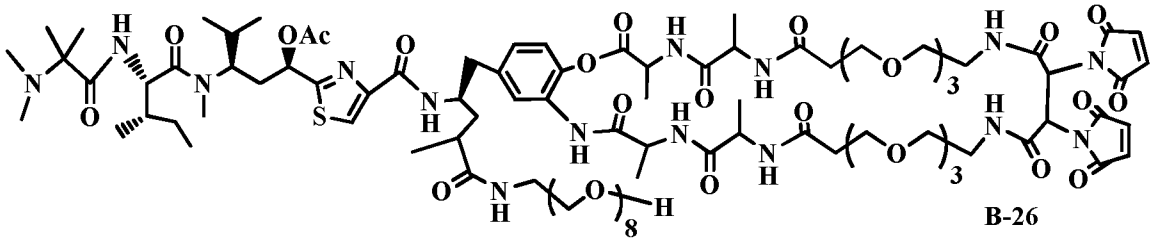


B-25

Соединение B-21 (22,0 мг, 0,0129 ммоль) в DMA (1 мл) добавляли EDC (15,0 мг, 0,078 ммоль), гидрохлорид 3,6,9,12,15,18,21-гептаоксатрикозан-1,23-диамина (26,0 мг, 0,059 ммоль) и DIPEA (0,010 мл, 0,060 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (250 (л) мм x 10(d) мм, C_{18} колонка, 10-100% ацетонитрил/вода в течение 40 минут, v =8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (14,5 мг, 55% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{95}H_{151}N_{16}O_{32}S$ $[M+H]^+$ 2060,03, найдено 2060,80.

Пример 202. Синтез (1R, 3R)-1-(4-(((28R)-29-(22,23-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,6,39,42-тетраметил-2,5,8,21,24,37,40,43-октаоксо-

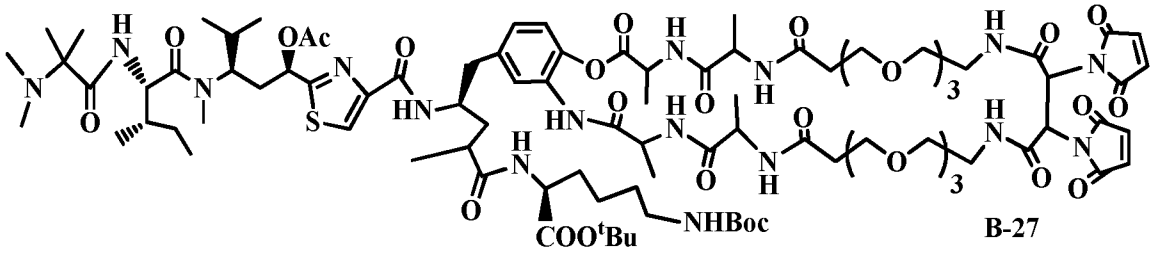
3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,15,16,
18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,29,30,32,33,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44-гексатриаконтагидро -2H-бензо[b][1,14,17,20,31,34,37,4,7,10,23,28,41,44] гептаоксагептааза-циклогексатетраконтин-46-ил)-1-гидрокси-26 метил-25-оксо-3,6,9,12,15,18,21-гептаокса-24-азанонакосан-28-ил)карбамоил)тиазол-2-ил)-3-((2S, 3S)-2-(2-(диметиламино)-2-метилпропанамидо)-N, 3-диметилпентанамидо)-4-метилпентилацетата (**B-26**)



B-26

Соединение B-21 (22,0 мг, 0,0129 ммоль) в DMA (1 мл) добавляли EDC (15,0 мг, 0,078 ммоль) и 23-амино-3,6,9,12,15,18,21-гептаоксатрикозан-1-ол (22,0 мг, 0,059 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (250 (л) мм x 10(d) мм, C_{18} колонка, 10-100% ацетонитрил/вода в течение 40 минут, v =8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (14,1 мг, 53% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{95}H_{150}N_{15}O_{33}S$ $[M+H]^+$ 2061,02, найдено 2061,74.

Пример 203. Синтез (2S)-трет-бутил 2-((4R)-5-(22,23-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,6, 39,42-тетраметил-2,5,8,21,24,37,40,43-октаоксо-3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,15,16,18,
19,20,21,22,23,24,25,26,27,29,30,32,33,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44-гексатриконтгидро-2H-бензо[b] [1,14,17,20,31,34,37,4,7,10,23,28,41,44] гептаоксагепта-азациклогексатетраконтин-46-ил)-4-(2-((6S , 9R, 11R)-6-((S)-втор-бутил)-9-изопропил-2,3,3,8-тетраметил-4,7,13-триоксо-12-окса-2,5,8- триазатетрадекан-11-ил)тиазол-4-карбоксамидо)-2-метилпентанамидо)-6-((трет-бутоксикарбонил)амино)гексаноата (**B-27**).

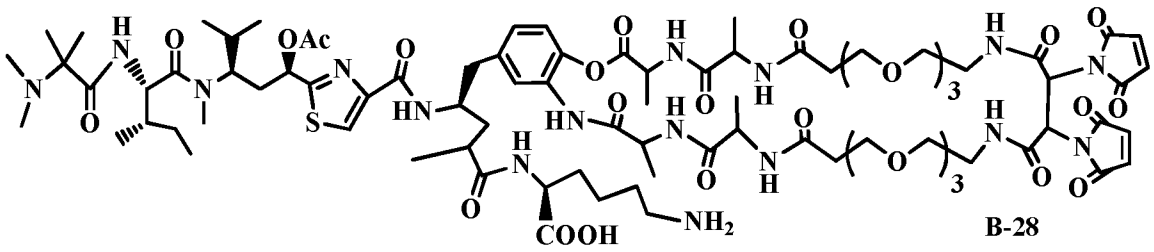


B-27

Соединение B-21 (25,0 мг, 0,0146 ммоль) в DMA (1 мл) добавляли EDC (15,0 мг, 0,078 ммоль) и (S)-трет-бутил 2-амино-6-((трет-бутоксикарбонил)амино)гексаноат (9,0 мг, 0,030 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (250 (л) мм x 10(d) мм, C_{18} колонка, 10-100%

ацетонитрил/вода в течение 40 минут, v =8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (20,5 мг, 71% выход). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{94}H_{144}N_{16}O_{29}S$ $[M+H]^+$ 1994,00, найдено 1994,85.

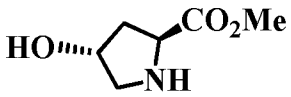
Пример 204. Синтез (2S)-6-амино-2-((4R)-5-(22,23-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,6 , 39,42-тетраметил-2,5,8,21,24,37,40,43-октаоксо-3,4,5,6,7,8,9,10,12,13, 15,16,18 , 19,20,21,22,23,24,25,26,27,29,30,32,33,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44гексатриаконтгидро-2H бензо[b][1,14,17,20,31,34,37,4,7,10,23,28,41,44]гептаоксагептааза-циклогексатетраконтин-46-ил)-4-(2-((6S,9R,11R)-6-((S)-втор-бутил)-9-изопропил-2,3,3,8-тетраметил-4,7,13-триоксо-12-окса-2,5,8 -триазатетрадекан-11-ил)тиазол-4-карбоксамидо)-2-метилпентанамидо)гексановой кислоты (**B-28**).



B-28

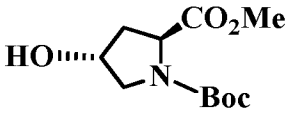
Соединение B-27 (20,0 мг, 0,010 ммоль) растворяли в ДХМ (1 мл) с последующим добавлением ТФК (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем упаривали и очищали ВЭЖХ с обращенной фазой (250 (л) мм × 10 (d) мм, колонка C_{18}, 10-100% ацетонитрил/вода в течение 40 минут, v = 8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (13,5 мг, 73% выход). ЭСИ: m/z: рассчитано для $C_{85}H_{129}N_{16}O_{27}S$ $[M+H]^+$: 1837,89, найдено 1838,20.

Пример 205. Синтез гидрохлорида (2S,4R)-метил 4-гидроксипирролидин-2-карбоксилата.



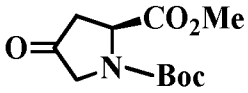
К раствору транс-4-гидрокси-L-пролина (15,0 г, 114,3 ммоль) в сухом метаноле (250 мл) по каплям добавляли тионилхлорид (17 мл, 231 ммоль) при 0-4 °C. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали, кристаллизовали из смеси EtOH/гексан с получением указанного в заголовке соединения (18,0 г, выход 87%). МС ЭСИ m/z 168,2 ($[M+Na]^+$).

Пример 206. Синтез (2S,4R)-1-*трет*-бутил 2-метил 4-гидроксипирролидин-1,2-дикарбоксилата.



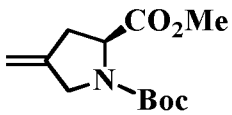
К раствору метилового эфира транс-4-гидрокси-L-пролина (18,0 г, 107,0 ммоль) в смеси MeOH (150 мл) и раствора гидрокарбоната натрия (2,0 М, 350 мл) добавляли Boc_2O (30,0 г, (137,6 ммоль) тремя порциями за 4 часа. После перемешивания в течение дополнительных 4 часов, реакционную смесь упаривали до ~350 мл и экстрагировали EtOAc (4 × 80 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (1:1 смесь изомеров гексана/EtOAc), получая указанное в заголовке соединение (22,54 г, выход 86%). МС ЭСИ m/z 268,2 ($[M+Na]^+$).

Пример 207. Синтез (S)-1-*трет*-бутил 2-метил 4-оксопирролидин-1,2-дикарбоксилата.



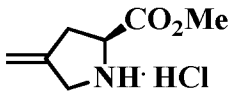
Указанное в заголовке соединение, полученное путем окисления по Дессу-Мартину, описано в: Franco Manfre et al. J. Org. Chem. 1992, 57, 2060-2065). Альтернативно процедура окисления по Сверну заключается в следующем: к раствору $(COCl)_2$ (13,0 мл, 74,38 ммоль) в CH_2Cl_2 (350 мл), охлажденном до -78 °C добавляли сухой ДМСО (26,0 мл). Раствор перемешивали при -78 °C в течение 15 минут, а затем добавляли (2S,4R)-1-*трет*-бутил 2-метил 4-гидроксипирролидин-1,2-дикарбоксилат (8,0 г, 32,63 ммоль) в CH_2Cl_2 (100 мл). После перемешивания при -78 °C в течение 2 часов по каплям добавляли триэтиламин (50 мл, 180,3 ммоль) и реакционный раствор нагревали до комнатной температуры. Смесь разбавляли водным раствором NaH_2PO_4 (1,0 М, 400 мл) и фазы разделяли. Водный слой экстрагировали CH_2Cl_2 (2 × 60 мл). Органические слои объединяли, сушили над $MgSO_4$, фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (7:3 смесь изомеров гексана/EtOAc) с получением указанного в заголовке соединения (6,73 г, 85% выход). МС ЭСИ m/z 266,2($[M+Na]^+$).

Пример 208. Синтез (S)-1-*трет*-бутил 2-метил 4-метиленпирролидин-1,2-дикарбоксилата.



К суспензии метилтрифенилфосфонийбромида (19,62 г, 55,11 ммоль) в ТГФ (150 мл) при 0 °С добавляли трет-бутоксид калия (6,20 г, 55,30 ммоль) в безводном ТГФ (80 мл). После перемешивания при 0 °С в течение 2 часов полученный желтый илид добавляли к раствору (S)-1-*трет*-бутил 2-метил 4-оксопирролидин-1,2-дикарбоксилата (6,70 г, 27,55 ммоль) в ТГФ (40 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 1 часа реакционную смесь упаривали, разбавляли EtOAc (200 мл), промывали H_2O (150 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (150 мл), сушили над $MgSO_4$, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии с SiO_2 (9:1 смесь изомеров гексана/EtOAc) с получением указанного в заголовке соединения (5,77 г, выход 87%). МС ЭИ m/z 264 ($[M+Na]^+$).

Пример 209. Синтез гидрохлорид (S) -метил 4-метиленпирролидин-2-карбоксилата.



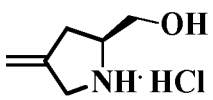
К раствору (S)-1-*трет*-бутил 2-метил 4-метиленпирролидин-1,2-дикарбоксилата (5,70 г, 23,63 ммоль) в EtOAc (40 мл) при 4 °С добавляли HCl (12 М, 10 мл). Смесь перемешивали в течение 1 часа, разбавляли толуолом (50 мл), упаривали и кристаллизовали из смеси EtOH/смесь изомеров гексана с получением указанного в заголовке соединения в виде соли HCl (3,85 г, выход 92%). МС ЭИ m/z 142,2 ($[M+H]^+$).

Пример 210. Синтез (S)-трет-бутил-2-(гидроксиметил)-4-метиленпирролидин-1-карбоксилата.



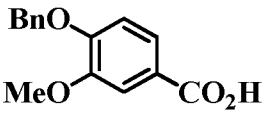
К раствору (S)-1-*трет*- бутил-2-метил-4-метиленпирролидин-1,2-дикарбоксилата (5,20 г, 21,56 ммоль) в безводном ТГФ (100 мл) при 0 °С добавляли $LiAlH_4$ (15 мл, 2М в ТГФ). После перемешивания при 0 °С в течение 4 часов, к реакционной смеси добавляли метанол (5 мл) и воду (20 мл). Реакционную смесь нейтрализовали 1 М HCl до pH 7, разбавляли EtOAc (80 мл), фильтровали через целит, разделяли и водный слой экстрагировали EtOAc. Органические слои объединяли, сушили над Na_2SO_4, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (EtOAc/ДХМ 1:5) с получением указанного в заголовке соединения (3,77 г, выход 82%). МС ЭИ m/z 236,40 ($[M+Na]^+$).

Пример 211. Синтез (S)-(4-метиленпирролидин-2-ил)метанола, гидрохлоридной соли.



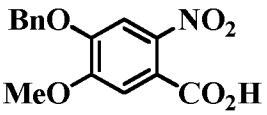
К раствору (S)-трет-бутил-2-(гидроксиметил)-4-метиленпирролидин-1-карбоксилата (3,70 г, 17,36 ммоль) в EtOAc (30 мл) при 4 °C добавляли HCl (12 M, 10 мл). Смесь перемешивали в течение 1 часа, разбавляли толуолом (50 мл), упаривали и кристаллизовали из смеси EtOH/гексан с получением указанного в заголовке соединения в виде соли HCl (2,43 г, выход 94%). МС ЭИ m/z 115,1 ($[M+H]^+$).

Пример 212. Синтез 4-(бензилокси)-3-метоксибензойной кислоты.



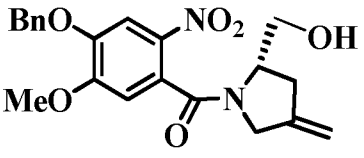
К смеси 4-гидрокси-3-метоксибензойной кислоты (50,0 г, 297,5 ммоль) в этаноле (350 мл) и водн. растворе NaOH (2,0 M, 350 мл) добавляли BnBr (140,0 г, 823,5 ммоль). Смесь перемешивали при 65 °C в течение 8 часов, концентрировали, упаривали совместно с водой (2 × 400 мл) и упаривали до ~ 400 мл, подкисляли до pH 3,0 с помощью 6 н. HCl. Твердое вещество отфильтровывали, кристаллизовали с помощью EtOH, сушили при 45 °C в вакууме, получая указанное в заголовке соединение (63,6 г, выход 83%). МС ЭСИ m/z 281,2 ($[M+Na]^+$).

Пример 213. Синтез 4-(бензилокси)-5-метокси-2-нитробензойной кислоты.



К раствору 4-(бензилокси)-3-метоксибензойной кислоты (63,5 г, 246,0 ммоль) в CH_2Cl_2 (400 мл) и HOAc (100 мл) добавляли HNO_3 (дымящая, 25,0 мл, 528,5 ммоль). Смесь перемешивали в течение 6 часов, упаривали, кристаллизовали в EtOH, сушили при 40 °C в вакууме, получая указанное в заголовке соединение (63,3 г, 85% выход). МС ЭСИ m/z 326,1 ($[M+Na]^+$).

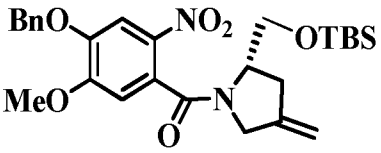
Пример 214. Синтез (S)-(4-(бензилокси)-5-метокси-2-нитрофенил)(2-(гидроксиметил)-4-метиленпирролидин-1-ил)метанона.



Каталитическое количество ДМФА (30 мкл) добавляли к раствору 4-(бензилокси)-5-метокси-2-нитробензойной кислоты (2,70 г, 8,91 ммоль) и оксалилхлорида (2,0 мл, 22,50 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (70 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Избыток CH_2Cl_2 и оксалилхлорида удаляли на роторе. Ацетилхлорид повторно суспендировали в свежем CH_2Cl_2 (70 мл) и медленно добавляли к

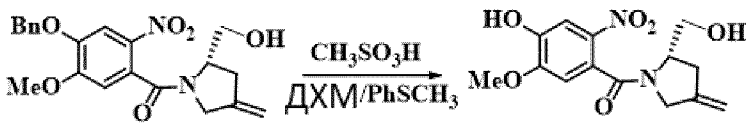
предварительно смешанному раствору (S)-(4-метиленпирролидин-2-ил)метанола, гидрохлоридной соли (1,32 г, 8,91 ммоль) и Et_3N (6 мл) в CH_2Cl_2 при 0 °C в атмосфере N_2. Реакционную смесь оставляли нагреваться до к.т. и продолжали перемешивать в течение 8 часов. После удаления CH_2Cl_2 и Et_3N, остаток разделяли между H_2O и EtOAc (70/70 мл). Водный слой дополнительно экстрагировали EtOAc (2 × 60 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (40 мл), сушили ($MgSO_4$) и упаривали. Очистка остатка с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 2: 8 смесь изомеров гексана/EtOAc) давала указанное в заголовке соединение (2,80 г, выход 79%). МС ЭИ m/z 421,2 ($[M+Na]^+$).

Пример 215. Синтез (S)-(4-(бензилокси)-5-метокси-2-нитрофенил)(2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленпирролидин-1-ил)метанона.



К S)-(4-(Бензилокси)-5-метокси-2-нитрофенил)(2-(гидроксиметил)-4-метиленпирролидин-1-ил)метанону (2,78 г, 8,52 ммоль) в смеси ДХМ (10 мл) и пиридину (10 мл) добавляли трет-бутилхлордиметилсилан (2,50 г, 16,66 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя $EtOAc/CH_2Cl_2$ (1:6), с получением указанного в заголовке соединения (3,62 г, выход 83%, чистота ~ 95%). МС ЭСИ m/z вычислено для $C_{27}H_{37}N_2O_6Si$ $[M+H]^+$ 513,23, найдено 513,65.

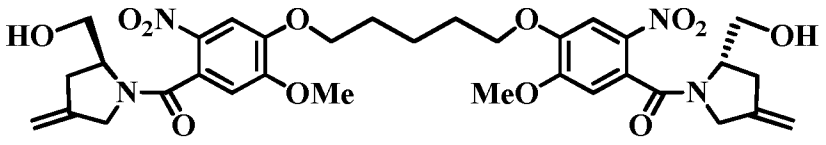
Пример 216. Синтез (S)-(4-гидрокси-5-метокси-2-нитрофенил)(2-(гидроксиметил)-4-метиленпирролидин-1-ил)метанона.



К (S)-(4-(бензилокси)-5-метокси-2-нитрофенил)(2-(гидроксиметил)-4-метиленпирролидин-1-ил)метанона (2,80 г, 7,03 ммоль) в смеси ДХМ (30 мл)) и CH_3SO_3H (8 мл) добавляли $PhSCH_3$ (2,00 г, 14,06 ммоль). Смесь перемешивали в течение 0,5 ч, разбавляли ДХМ (40 мл), нейтрализовали, осторожно добавляя 0,1 М раствор Na_2CO_3. Смесь разделяли и водный раствор экстрагировали ДХМ (2 × 10 мл). Органические слои объединяли, сушили над Na_2SO_4, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя смесью $MeOH/CH_2Cl_2$ (от 1:15 до 1:6), с получением указанного в заголовке соединения (1,84 г,

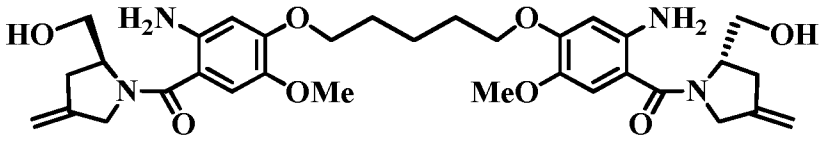
выход 85%, ~ 95% чистота). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{14}H_{17}N_2O_6$ $[M+H]^+$ 309,10, найдено 309,30.

Пример 217. Синтез (S)-((пентан-1,5-диилбис(окси))бис (5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))бис(((S)-2-(гидроксиметил)-4 -метиленпирролидин-1-ил)метанона)



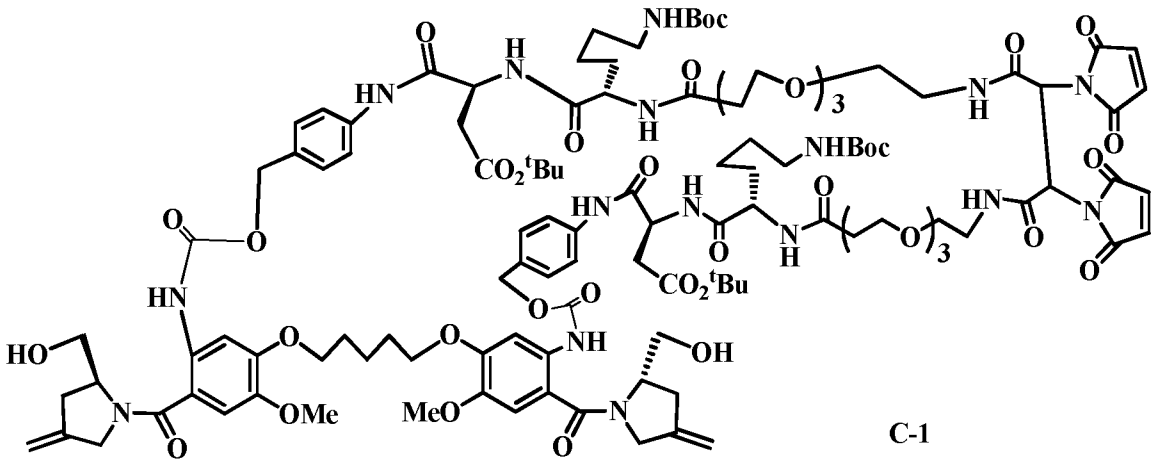
К (S)-(4-гидрокси-5-метокси-2-нитрофенил) (2-(гидроксиметил)-4-метиленпирролидин-1-ил)метаноне (0,801 г, 2,60 ммоль) в бутаноне (10 мл) добавляли Cs_2CO_3 (2,50 г, 7,67 ммоль) с последующим добавлением 1,5-дийодопентана (415 ммоль, 1,28 ммоль). Смесь перемешивали в течение 26 часов, упаривали и очищали на колонке с SiO_2, элюируя смесью $MeOH/CH_2Cl_2$ (от 1:15 до 1:5), с получением указанного в заголовке соединения (0,675 г, выход 77%, чистота ~ 95%). ЭСИ МС m/z рассчитано для $C_{33}H_{41}N_4O_{12}$ $[M+H]^+$ 685,26, найдено 685,60.

Пример 218. Синтез (S)-((пентан-1,5-диилбис(окси))бис (2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))бис(((S)-2-(гидроксиметил)-4 -метиленпирролидин-1-ил)метанона)



К (S)-((пентан-1,5-диилбис(окси))бис (5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))бис(((S)-2-(гидроксиметил)-4-метиленпирролидин-1-ил)метанону) (0,670 г, 0,98 ммоль) в CH_3OH (10 мл) добавляли $Na_2S_2O_4$ (1,01 г, 5,80 ммоль) в H_2O (8 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 часов. Реакционную смесь концентрировали и совместно выпаривали с DMA (2 × 10 мл) и EtOH (2 × 10 мл) в высоком вакууме до сухого состояния с получением указанного в заголовке соединения (общая масса 1,63 г), содержащего неорганические соли, которое использовали непосредственно на следующей стадии реакции (без дальнейшего разделения). ЭСМС m/z 647,32 ($[M+Na]^+$).

Пример 219. Синтез С-1 (аналог димера PBD, имеющий бис-линкер).

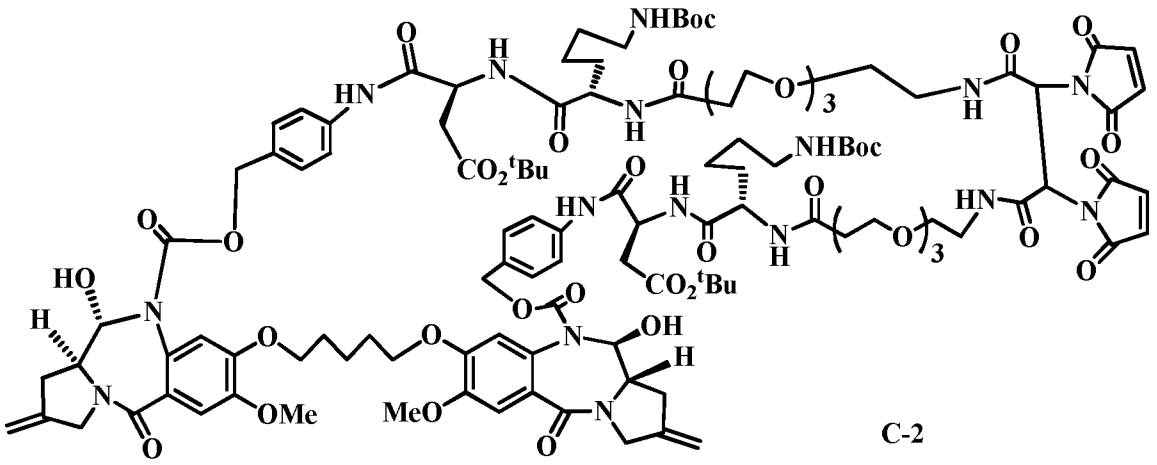


C-1

(3S,6S,39S,42S)-ди-трет-бутил 6,39-бис(4-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутил)-22,23-бис(2,5-диоксо-2,5- дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,42-бис((4-(гидроксиметил)фенил) карбамоил)-5,8,21,24,37,40-гексаоксо-11,14,17,28, 31,34-гексаокси-4,7,20,25,38,41-гексаазатетратетраконтан-1,44-диоат (0,840 г, 0,488 ммоль) в ТГФ (8 мл), содержащий пиридин (0,100 мл, 1,24 ммоль) при 0 °C добавляли по каплям раствор трифосгена (0,290 мг, 0,977 ммоль) в ТГФ (3,0 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 15 мин, затем использовали непосредственно на следующей стадии.

(S)-((пентан-1,5-диилбис(окси))бис (2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))бис(((S)-2-(гидроксиметил)-4-метиленпирролидин -1-ил)метанон), содержащий неорганические соли (0,842 мг, ~ 0,49 ммоль), суспендировали в EtOH (10 мл) при 0 °C и добавляли трихлорид в ТГФ, приготовленный выше. Смесь перемешивали при 0 °C в течение 4 часов, затем нагревали до комнатной температуры в течение 1 часа, упаривали и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (250 (л) мм x 10(d) мм, C_{18} колонка, 10-80% ацетонитрил/вода в течение 40 минут, v =8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (561,1 мг, 48% выход за три стадии). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{117}H_{163}N_{16}O_{38}$ $[M+H]^+$ 2400,12, найдено 2400,90.

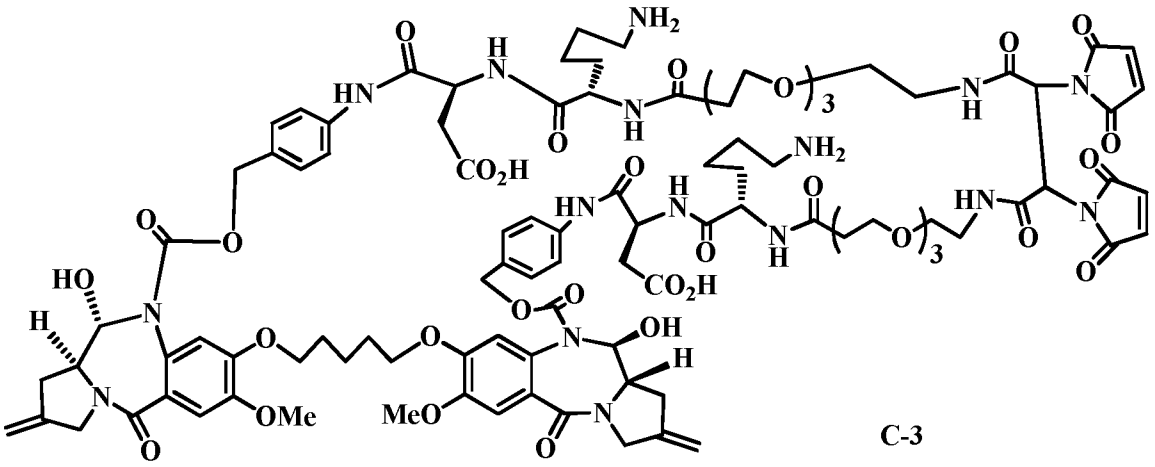
Пример 220. Синтез C-2 (аналог димера PBD, имеющий бис-линкер).



C-2

Перйодинан Десса-Мартина (138,0 мг, 0,329 ммоль) добавляли к раствору соединения **C-1** (132,0 мг, 0,055 ммоль) в ДХМ (5,0 мл) при 0 °C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 часов. Затем добавляли насыщенный раствор $NaHCO_3/Na_2SO_3$ (5,0 мл/5,0 мл) и смесь экстрагировали ДХМ (3 × 25 мл). Объединенные органические слои промывали $NaHCO_3/Na_2SO_3$ (5,0 мл/5,0 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (10 мл), сушили над Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (250 (л) мм x 10(d) мм, C_{18} колонка, 10-80% ацетонитрил/вода в течение 40 минут, v =8 мл/мин) с получением указанного в заголовке соединения (103,1 мг, 78% выход) в виде пены. МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{117}H_{158}N_{16}O_{38}$ $[M+H]^+$ 2396,09, найдено 2396,65.

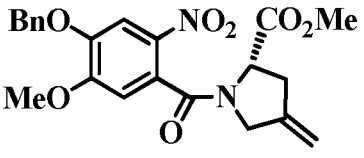
Пример 221. Синтез C-3 (аналог димера PBD, имеющий бис-линкер).



C-3

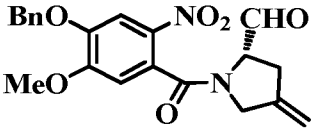
Соединение C-2 (55,0 мг, 0,023 ммоль) растворяли в ДХМ (3 мл) с последующим добавлением ТФК (3 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем упаривали и выпаривали совместно с ДХМ/толуолом до сухого состояния, получая неочищенный продукт C-3 (48,0 мг, выход 100%, чистота 92% по данным ВЭЖХ), который далее очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (250 (L) мм × 10 (d) мм, колонка C_{18}, 5-60% ацетонитрил/вода в течение 40 минут, v = 8 мл/мин), получая очищенный продукт **C-3** (42,1 мг, выход 88%, чистота 96%) в виде пены. МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{99}H_{126}N_{16}O_{34}$ $[M+H]^+$ 2083,86, найдено 2084,35.

Пример 222. Синтез (S)-метил 1-(4-(бензилокси)-5-метокси-2-нитробензоил)-4-метиленпирролидин-2-карбоксилата.



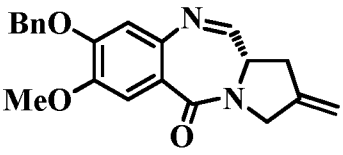
Каталитическое количество ДМФА (30 мкл) добавляли к раствору 4-(бензилокси)-5-метокси-2-нитробензойной кислоты (2,70 г, 8,91 ммоль) и оксалилхлорида (2,0 мл, 22,50 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (70 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Избыток CH_2Cl_2 и оксалилхлорида удаляли на роторе. Ацетилхлорид повторно суспендировали в свежем CH_2Cl_2 (70 мл) и медленно добавляли к предварительно смешанному раствору гидрохлорида (S)-метил 4-метиленпирролидин-2-карбоксилата (1,58 г, 8,91 ммоль) и Et_3N (6 мл) в CH_2Cl_2 при 0 °C в атмосфере N_2. Реакционную смесь нагревали до к.т. и продолжали перемешивание в течение 8 часов. После удаления CH_2Cl_2 и Et_3N, остаток разделяли между H_2O и EtOAc (70/70 мл). Водный слой дополнительно экстрагировали EtOAc (2 × 60 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (40 мл), сушили ($MgSO_4$) и упаривали. Очистка остатка с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 2:8 смесь изомеров гексана/EtOAc) давала указанное в заголовке соединение (2,88 г, выход 76%). МС ЭИ m/z 449,1 ($[M+Na]^+$).

Пример 223. Синтез (S)-1-(4-(бензилокси)-5-метокси-2-нитробензоил)-4-метиленпирролидин-2-карбальдегида.



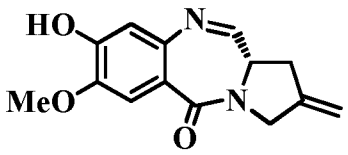
К энергично перемешиваемому раствору (S)-метил 1-(4-(бензилокси)-5-метокси-2-нитро бензоил)-4-метиленпирролидин-2-карбоксилата (2,80 г, 6,57 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (60 мл) по каплям добавляли DIBAL-H (1н в CH_2Cl_2, 10 мл) при -78 °C в атмосфере N_2. После перемешивания смеси в течение дополнительных 90 минут избыток реагента разлагали добавлением 2 мл метанола, а затем 5% HCl (10 мл). Полученную смесь оставляли нагреться до 0 °C. Слои разделяли и водный слой дополнительно экстрагировали CH_2Cl_2 (3 × 50 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили ($MgSO_4$) и упаривали. Очистка остатка с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 95: 5 $CHCl_3$/MeOH) давала указанное в заголовке соединение (2,19 г, выход 84%). МСЭИ m/z 419,1 ($[M+Na]^+$).

Пример 224. Синтез (S)-8-(бензилокси)-7-метокси-2-метилен-2,3-дигидро-1H-бензо[e]-пирроло[1,2-a]азепин-5(11aH)-она.



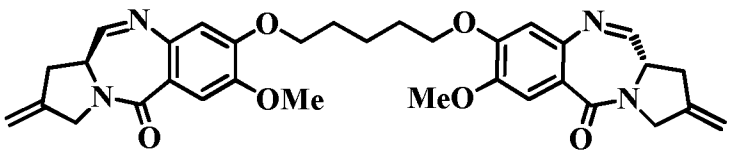
Смесь (S)-1-(4-(бензилокси)-5-метокси-2-нитробензоил)-4- метиленпирролидин-2-карбальдегида (2,18 г, 5,50 ммоль) и $Na_2S_2O_4$ (8,0 г, 45,97 ммоль) в ТГФ (60 мл) и H_2O (40 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов. Растворители удаляли в высоком вакууме. Остаток повторно суспендировали в MeOH (60 мл) и по каплям добавляли HCl (6M) до достижения pH ~ 2. Полученную смесь перемешивали при к.т. в течение 1 часа. Из реакционной смеси удаляли большую часть MeOH, затем разбавляли EtOAc (100 мл). EtOAc раствор промывали насыщенным раствором $NaHCO_3$, насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили ($MgSO_4$) и упаривали. Очистка остатка с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 97:3 $CHCl_3$/MeOH) давала указанное в заголовке соединение (1,52 г, 80%). ЭИМС m/z 372,1 ($[M+Na]^+$).

Пример 225. Синтез (S)-8-гидрокси-7-метокси-2-метилен-2,3 -дигидро-1H-бензо[e]-пирроло[1,2-a]азепин-5(11aH)-она.



К раствору (S)-8-(бензилокси)-7-метокси-2-метилен-2,3 -дигидро-1H-бензо[e]-пирроло[1,2-a]азепин-5(11aH)-она (1,50 г, 4,32 ммоль) в 70 мл CH_2Cl_2 добавляли 25 мл CH_3SO_3H при 0 °C. Смесь перемешивали при 0 °C в течение 10 минут, затем при комнатной температуре в течение 2 часов, разбавляли CH_2Cl_2, pH доводили холодным 1,0 н раствором $NaHCO_3$ до 4 и фильтровали. Водный слой экстрагировали CH_2Cl_2 (3 × 60 мл). Органические слои объединяли, сушили над Na_2SO_4, фильтровали, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии на SiO_2 (CH_3OH/CH_2Cl_2 1:15) с получением 811 мг (73% выход) указанного в заголовке соединения. ЭСМС m/z 281,1 ($[M+Na]^+$).

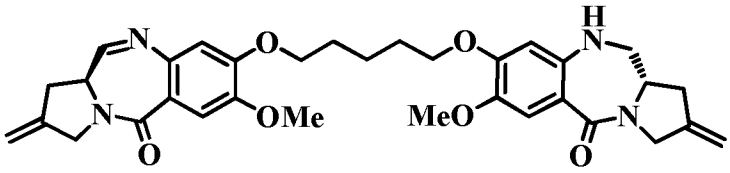
Пример 226. Синтез (11aS,11a'S)-8,8'- (пентан-1,5-диилбис(окси))бис(7-метокси-2-метилен-2,3-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a] 1,4]диазепин-5(11aH)-она).



К перемешанному суспендированному раствору Cs_2CO_3 (0,761 г, 2,33 ммоль) в бутаноне (8 мл) добавляли (S)-8-гидрокси-7-метокси-2-метилен-2,3-дигидро-1H-бензо[e]-пирроло[1,2-a]азепин-5(11aH)-он (401 мг, 1,55 ммоль) и 1,5-дийодопентан (240 мг, 0,740 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали и

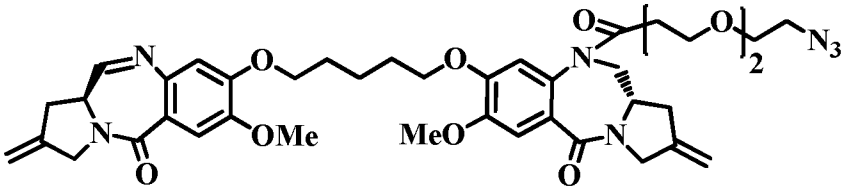
очищали с помощью хроматографии на SiO_2 (EtOAc/CH_2Cl_2 1:10) с получением 337 мг (выход 78%) указанного в заголовке продукта. ЭСМС m/z 607,2 ($[M+Na]^+$).

Пример 227. Синтез (S)-7-метокси-8-((5-(((S)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-) бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-2-метилен-2,3-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-5(11aH)-она.



К раствору (11aS,11a'S)-8,8'-(пентан-1,5-диилбис(окси))бис (7-метокси-2-метилен-2,3-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a] [1,4]диазепин-5(11aH)-она) (150 мг, 0,256 ммоль) в безводном дихлорметане (1 мл) и абсолютном этаноле (1,5 мл) добавляли боргидрид натрия в метоксиэтиловом эфире (85 мкл, 0,5 М, 0,042 ммоль) при 0 °C. Через 5 минут убирали ледяную баню и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, затем охлаждали до 0 °C, добавляли насыщенный хлорид аммония, разбавляли дихлорметаном и фазы разделяли. Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4, фильтровали через целит и упаривали. Остаток очищали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой (колонка C_{18}, ацетонитрил/вода). Соответствующие фракции экстрагировали дихлорметаном и упаривали, получая указанное в заголовке соединение (64,7 мг, 43%), МС m/z 609,2 ($[M+Na]^+$), 625,3 ($[M+K]^+$) и 627,2 ($[M+Na+H_2O]^+$); было получено полностью восстановленное соединение (16,5 мг, 11%), МС m/z 611,2 ($[M+Na]^+$), 627,2 ($[M+K]^+$), 629,2 ($[M+Na+H_2O]^+$); и непрореагировавший исходный материал также удаляли (10,2 мг, 7%), МС m/z 607,2 ($[M+Na]^+$), 625,2 ($[M+Na+H_2O]^+$).

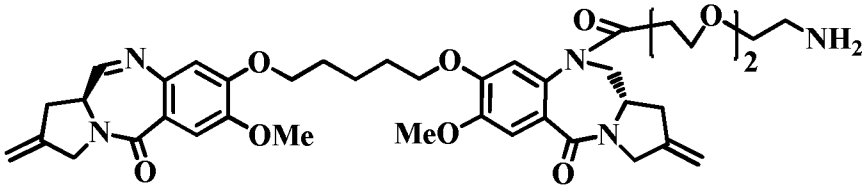
Пример 228. Синтез (S)-8-((5-(((S)-10-(3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропаноил)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2, 3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-7-метокси-2- метилен-2,3-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-5 (11aH)-она.



К смеси (S)-7-метокси-8-((5-(((S) -7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-) 1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-8-ил)окси)пентил)окси) -2-метилен-

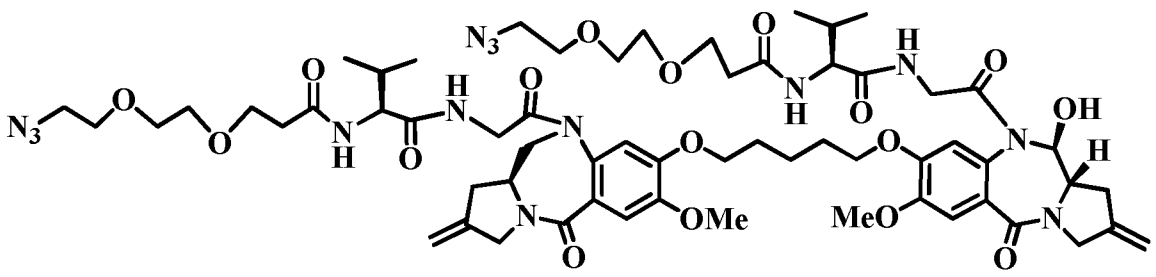
2,3-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-5(11aH)-она (60,0 мг, 0,102 ммоль) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропаноата (40,5 мг, 0,134 ммоль) в дихлорметане (5 мл) добавляли EDC (100,5 мг, 0,520 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии с SiO_2 ($EtOAc/CH_2Cl_2$, 1:6) с получением 63,1 мг (выход 81%) указанного в заголовке продукта. МС ЭСИ m/z $C_{40}H_{50}N_7O_9$ $[M+H]^+$, рассч. 772,36, найдено 772,30.

Пример 229. Синтез (S)-8-((5-(((S)-10-(3-(2-(2-аминоэтокси)этокси)пропаноил)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-7-метокси-2- метилен-2,3-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-5 (11aH)-она.



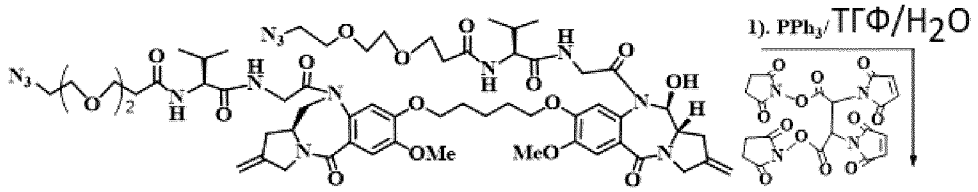
К раствору (S)-8-((5-(((S)-10-(3-(2-(2-азидоэтокси)этокси)пропаноил)-7-метокси-2-метилен-5-оксо- 2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-7-метокси- 2-метилен-2,3-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-5 (11aH)-она (60 мг, 0,078 ммоль) в смеси ТГФ (5 мл) и NaH_2PO_4 буферного раствора (pH 7,5, 1,0 M, 0,7 мл) добавляли PPh_3 (70 мг, 0,267 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали и очищали на C_{18} препаративной ВЭЖХ, элюировали водой/CH_3CN (от 90% воды до 35% воды в течение 35 минут), получая 45,1 мг (выход 79%) указанного в заголовке продукта после высушивания в высоком вакууме. МС ЭСИ m/z $C_{40}H_{52}N_5O_9$ $[M+H]^+$, рассч. 746,37, найдено 746,50.

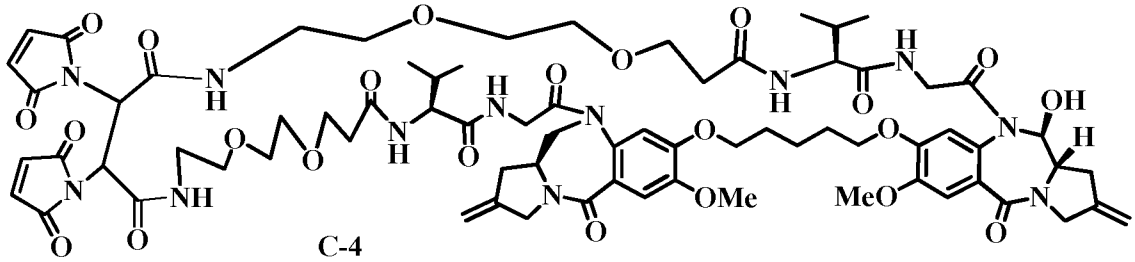
Пример 230. Синтез (S)-N-(2-((S)-8-((5-(((11S, 11aS)-10-((S)-15-азидо-5-изопропил-4,7-диоксо)-10,13-диокса-3,6-диазапентадекан-1-оил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H- бензо[e]пирроло [1,2-a][1,4]диазепин-8-ил) окси) пентил)-окси)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11a тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-10 (5H)-ил)-2-оксоэтил)-2-(3-(2-(2-азидоэтокси)этокси) пропанамидо)-3-метилбутанамида.



К смеси (S)-7-метокси-8-((5-(((S)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-) 1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-2-метилен-2,3-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-5(11aH)-она (60,0 мг, 0,102 ммоль) и (S)-15-азидо-5-изопропил-4,7-диоксо-10,13-диокса-3,6-диазапентадекан-1-оновой кислоты (90,2 мг, 0,25 ммоль) в DMA (8 мл) добавляли BrOP (240,2 мг, 0,618 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали и очищали с помощью колоночной хроматографии с SiO_2 (CH_3OH/CH_2Cl_2, от 1:10 до 1: 5), получая 97,1 мг (выход 74%) указанного в заголовке продукта. МС ЭСИ m/z $C_{61}H_{87}N_{14}O_{17}$ $[M+H]^+$, рассч. 1287,63, найдено 1287,95.

Пример 231. Синтез (S)-N-(2-((S)-8-((5-(((11S, 11aS)-10-((S)-15-амино-5-изопропил-4,7-диоксо)-10,13-диокса-3,6-диазапентадекан-1-оил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4] диазепин-8-ил)окси)пентил) окси)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11a- тетрагидро-1H-бензо[e]пиррол[1,2-a][1,4]диазепин-10 (5H)-ил)-2-оксоэтил)-2-(3-(2-(2-аминоэтокси)этокси) пропанамидо)-3-метилбутанамида (C-4).



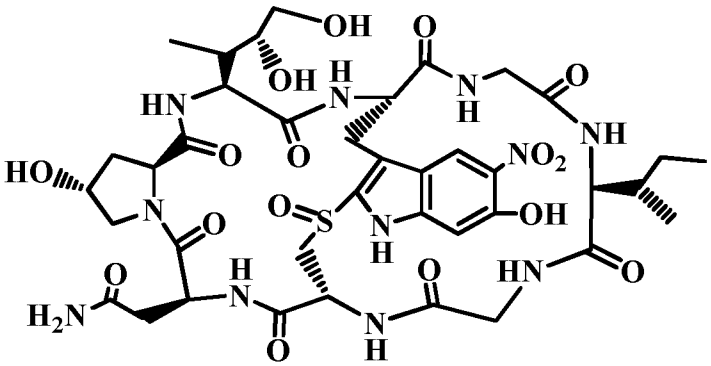


C-4

К раствору (S)-N-(2-((S)-8-((5-(((11S, 11aS))-10-((S)-15-азидо-5-изопропил-4,7 диоксо-10,13-диокса-3,6-диазапентадекан-1-оил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-8-ил)окси)пентил)-окси)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-10 (5H)-ил)-2-оксоэтил)-2-(3-(2-(2- азидоэтокси) этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамида (85 мг, 0,066 ммоль) в смеси ТГФ (5 мл) и NaH_2PO_4 буферном растворе (pH 7,5, 1,0 M, 0,7 мл) добавляли PPh_3 (100 мг, 0,381 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После подтверждения ЖХ-МС образование (S)-N-

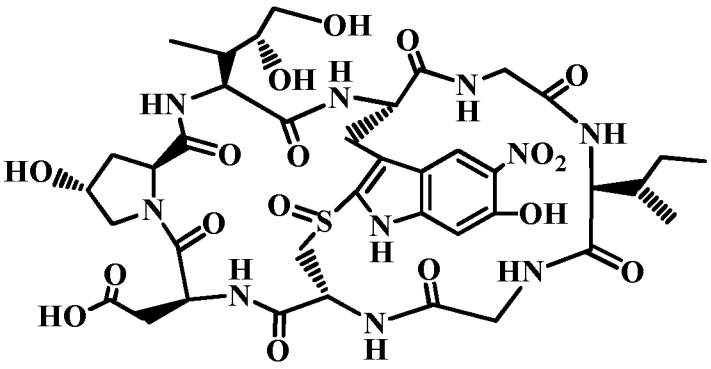
(2-((S)-8-((5-(((11S,11aS)-10-((S)-15-амино-5-изопропил)-4,7-диоксо-10,13-диокса-3,6-диазапентадекан-1-оил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11, 11a-гексагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-10(5H)-ил)-2-оксоэтил)-2-(3-(2-(2-аминоэтокси) этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамида (МС ЭСИ m/z $C_{61}H_{90}N_{10}O_{17}$ $[M+Na]^+$, рассч. 1257,66, найдено 1257,90), добавляли бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 2,3-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)сукцинат (33 мг, 0,066 ммоль). Смесь продолжали перемешивать в течение 4 ч, упаривали и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с C_{18}, элюировали водой/CH_3CN (от 90% воды до 30% воды за 35 мин), получая 40,1 мг (выход 40%) указанного в заголовке продукта С-4 после высушивания в высоком вакууме. МС ЭСИ m/z $C_{73}H_{95}N_{12}O_{23}$ $[M+H]^+$, рассч. 1507,66, найдено 1507,90.

Пример 232. Синтез нитро-α-аманитина.



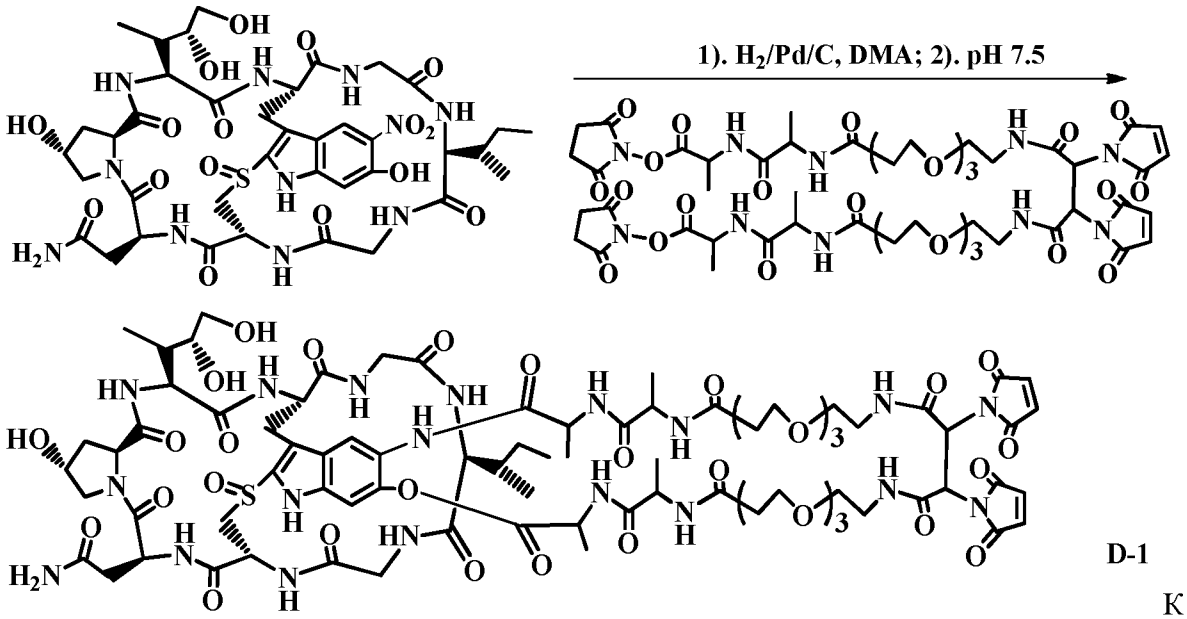
К раствору α-аманитина (15,0 мг, 0,0163 ммоль) в уксусной кислоте (0,5 мл) и CH_2Cl_2 (1 мл) добавляли 70% HNO_3 (0,3 мл) при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 1 часа, затем при комнатной температуре 2 часа. Затем добавляли воду (5 мл) и DMA (4 мл), реакционную смесь упаривали и очищали препаративной ВЭЖХ (H_2O/MeCN) с получением светло-желтого твердого вещества (9,8 мг, выход 62%). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{39}H_{54}N_{11}O_{16}S$ $[M+H]^+$ 963,34, найдено 964,95.

Пример 233. Синтез нитро-β-аманитина



К раствору β--аманитина (15,0 мг, 0,0163 ммоль) в уксусной кислоте (0,5 мл) и CH_2Cl_2 (1 мл) добавляли 70% HNO_3 (0,3 мл) при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение 1 часа, затем при комнатной температуре 2 часа. Затем добавляли воду (5 мл) и DMA (4 мл), реакционную смесь упаривали и очищали препаративной ВЭЖХ (H_2O/MeCN) с получением светло-желтого твердого вещества (9,8 мг, выход 62%). МС ЭСИ m/z: рассчитано для $C_{39}H_{53}N_{10}O_{17}S$ $[M+H]^+$ 965,32, найдено 965,86.

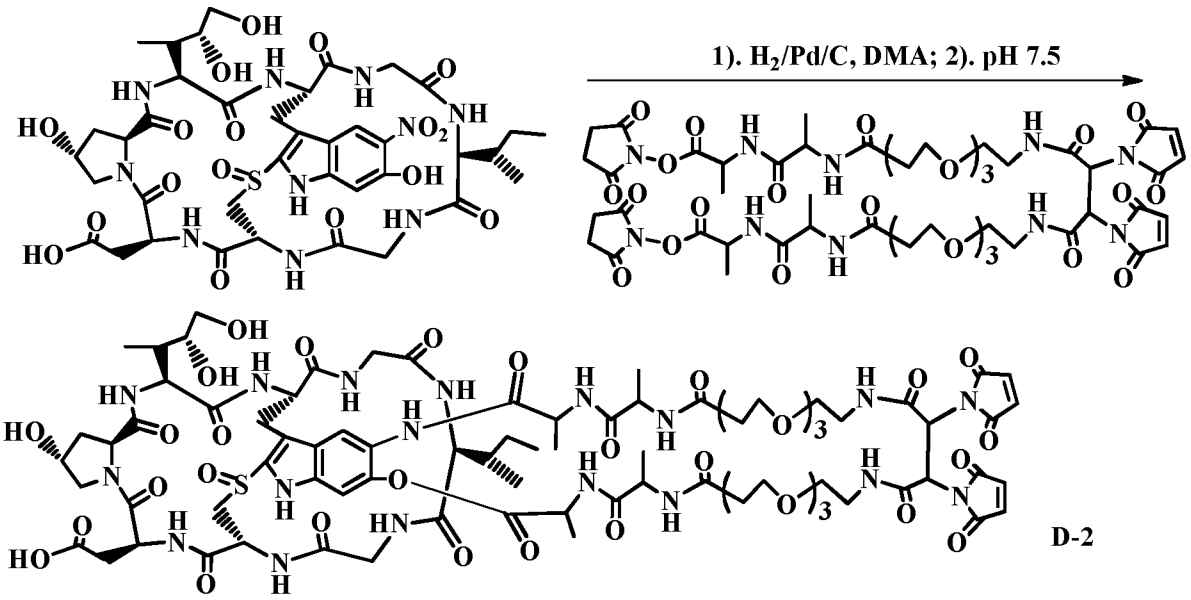
Пример 234. Синтез конъюгируемого аналога -аманитина (D-1), имеющего бис-линкер.



D-1

К раствору нитро-α-аманитина (9,0 мг, 0,0093 ммоль) в DMA (1 мл)) добавляли Pd/C (3 мг, 50% влажности), затем гидрировали (1 атм) при комнатной температуре в течение 6 часов. Катализатор отфильтровывали с последующим добавлением 0,5 мл, 0,1 М NaH2PO4, pH 7,5 и бис (2,5-диоксопирролидин-1-ил) 21,22-бис (2,5-диоксо-2,5-дигидро- 1H-пиррол-1-ил)-2,5,38,41-тетраметил-4,7,20,23,36,39-гексаоксо-10,13,16,27,30,33-гексаокса-3,6 19,24,37,40-гексаазадотетраконтан-1,42-диоата (11,0 мг, 0,0092 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали и очищали на препаративной ВЭЖХ с C_{18}, элюировали водой/CH_3CN (от 90% воды до 30% воды в течение 35 минут), получая 6,1 мг (выход 35%) указанного в заголовке продукта Д-1 после высушивания в высоком вакууме. МС ЭСИ m/z $C_{81}H_{116}N_{19}O_{31}S$ $[M+H]^+$, рассч. 1882,77, найдено 1882,20.

Пример 235. Синтез конъюгируемого аналога -аманитина (D-1), имеющего бис-линкер.



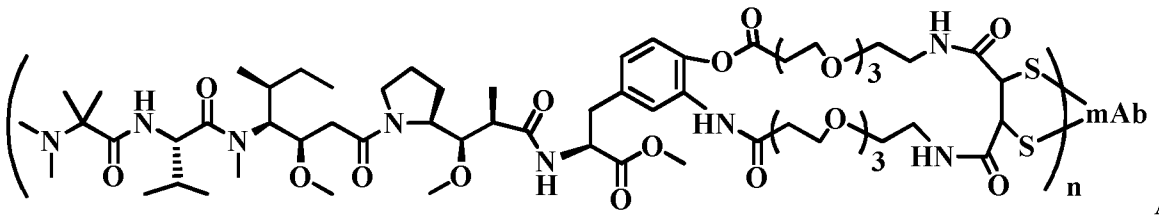
D-2

К раствору нитро-β-аманитина (9,0 мг, 0,0093 ммоль) в DMA (1 мл) добавляли Pd/C (3 мг, 50% влажности), затем гидрировали (1 атм) при комнатной температуре в течение 6 часов. Катализатор отфильтровывали с последующим добавлением 0,5 мл, 0,1 М NaH2PO4, pH 7,5 и бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 21,22-бис(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-2,5,38,41-тетраметил-4,7,20,23,36,39-гексаоксо-10,13,16,27,30,33-гексаокса-3,6 19,24,37,40-гексаазадотетраконтан-1,42-диоата (11,0 мг, 0,0092 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ C_{18}, элюировали смесью вода/CH_3CN (от 90% воды до 30% воды в течение 35 минут) с получением (7,0 мг, 40% выход) указанного в заголовке продукта D-2 после высушивания в высоком вакууме. МС ЭСИ m/z $C_{81}H_{115}N_{18}O_{32}S$ $[M+H]^+$, рассч. 1883,76, найдено 1884,10.

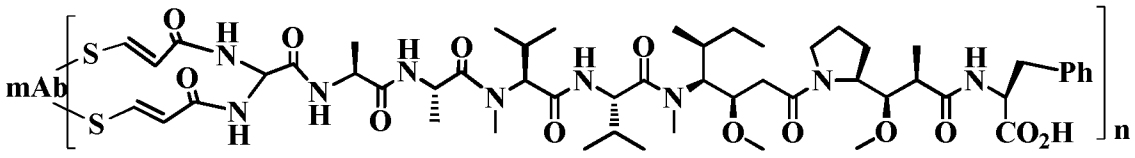
Пример 236. Общий способ приготовления конъюгата.

К смеси 2,0 мл 10 мг/мл антитела her2 при pH 6,0 ~ 8,0 независимо добавляли 0,70 ~ 2,0 мл PBS буфера из 100 мМ NaH_2PO_4, pH 6,5 ~ 8,5 буферов, TCEP (16-20 мкл, 20 мМ в воде) и соединение **A-3, A-4, A-5, B-3, B-6, B-9, B-12, B-15, B-18, B-19, B-20, B-21, B-22, B-23, B-24, B-25, B-26, B-28, C-3, C-4, D-1** или **D-2** (28-32 мкл, 20 мМ в DMA). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 4~18 часов, затем добавляли DHAA (135 мкл, 50 мМ). После непрерывной инкубации при комнатной температуре в течение ночи смесь очищали на колонке G-25, элюированной 100 мМ NaH_2PO_4, 50 мМ NaCl, pH 6,0-7,5, с получением 12,8-18,1 мг соединения конъюгата **A-3a, A-4a, A-5a, B-3a, B-6a, B-9a, B-12a, B-15a, B-18a, B-19a, B-20a, B-21a, B-22a, B-23a, B-24a, B-25a, B-26a, B-28a, C-3a, C-4a, D-1a** или **D-2a** (выход 75%-90%) соответственно в 14,4 ~ 15,5 мл буфера. Соотношение лекарственное средство/антитело (DAR) для конъюгата составляло 3,1~4,2,

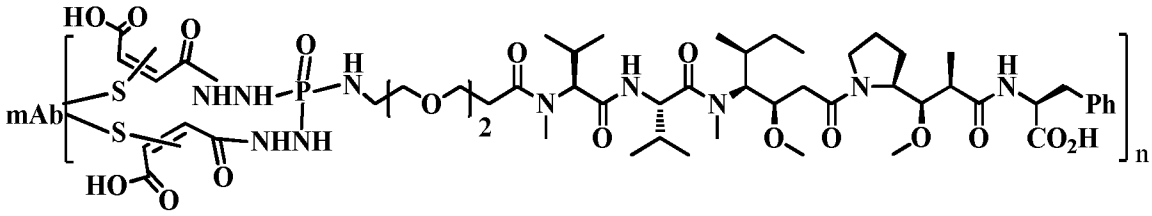
что определяли с помощью масс-спектра СВЭЖХ-QTOF. Он представляет собой 94 ~ 99% мономер, исходя из анализа с помощью эксклюзионной ВЭЖХ (Tosoh Bioscience, Tskgel G3000SW, 7,8 мм ID × 30 см, 0,5 мл/мин, 100 мин), и одной полосы в ДСН-ПААГ-электрофорезе. Структуры конъюгатов представлены ниже:



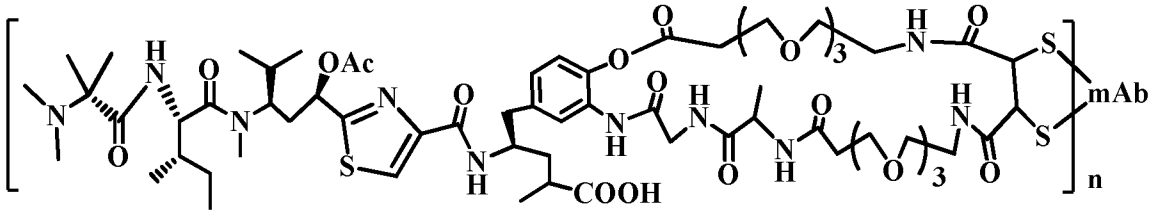
A-3a,



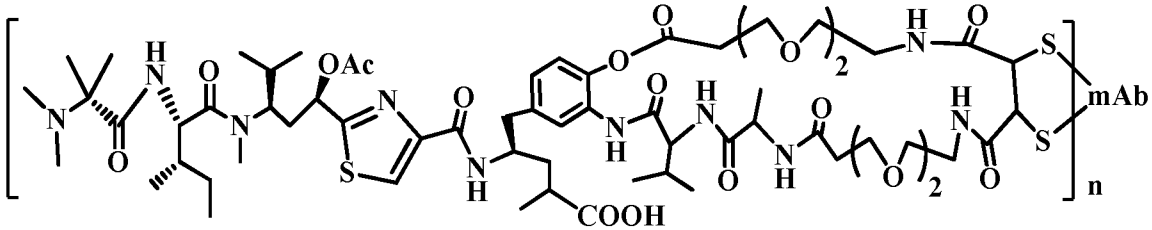
A-4a,,



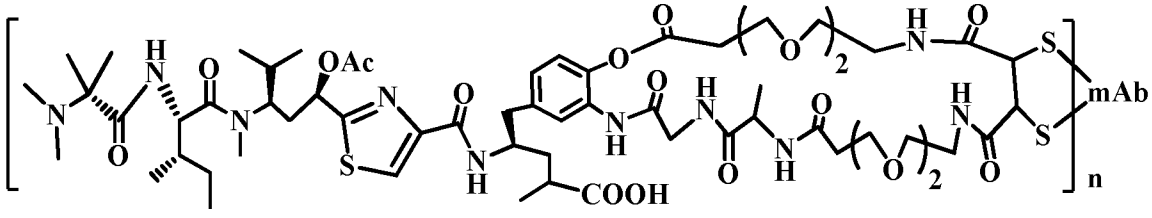
A-5a,



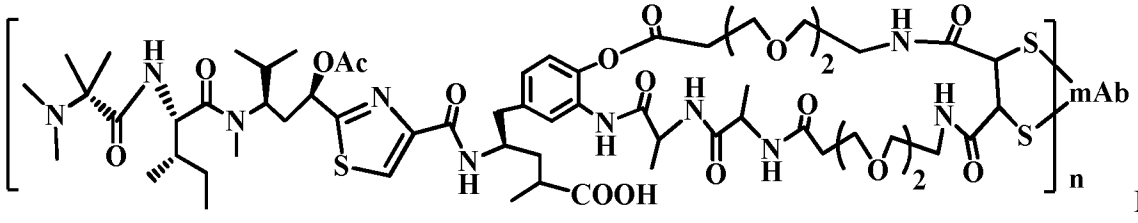
B-3a,



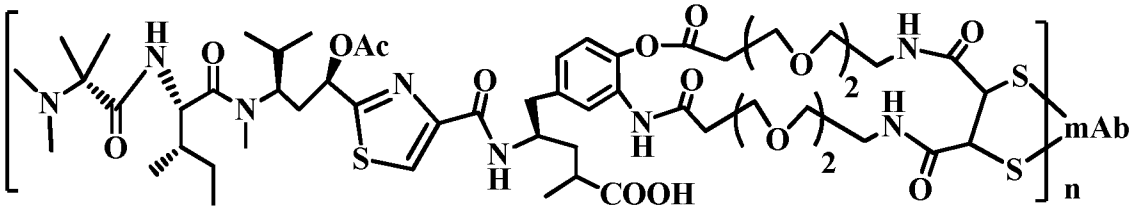
B-6a,



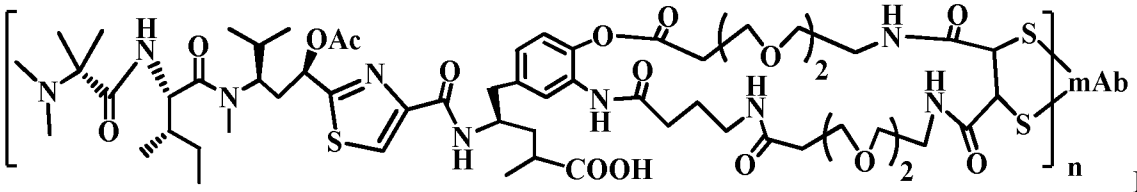
B-9a,



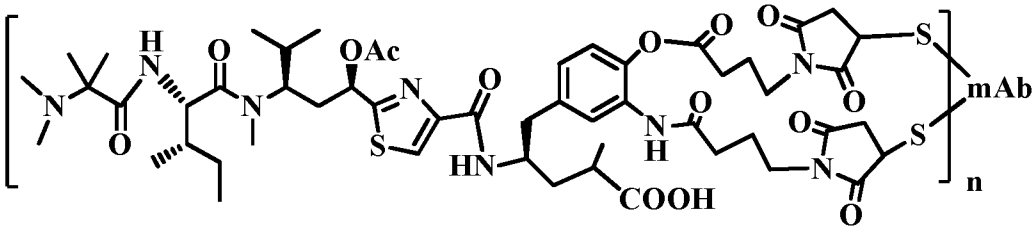
B-12a,



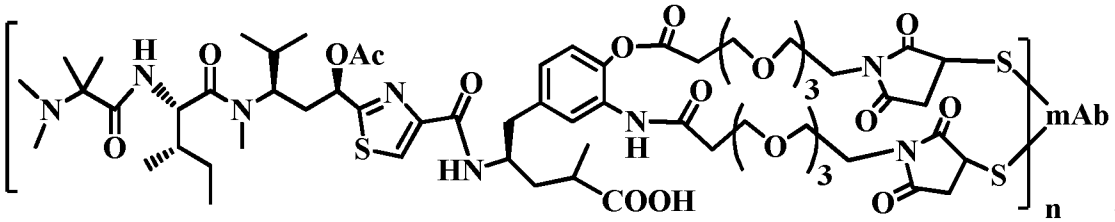
B-15a,



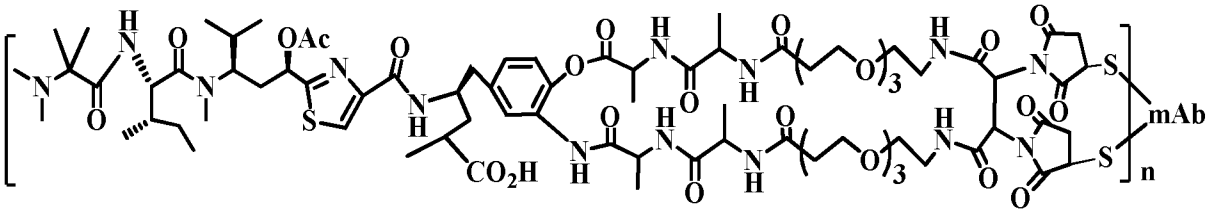
B-18a,



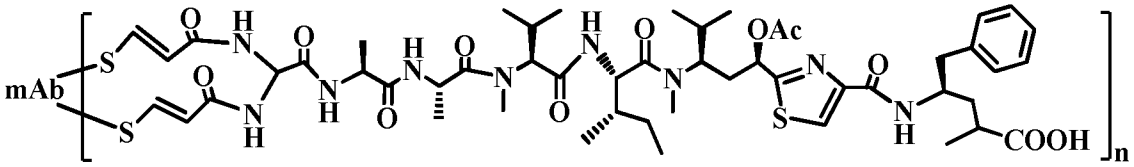
B-19a,



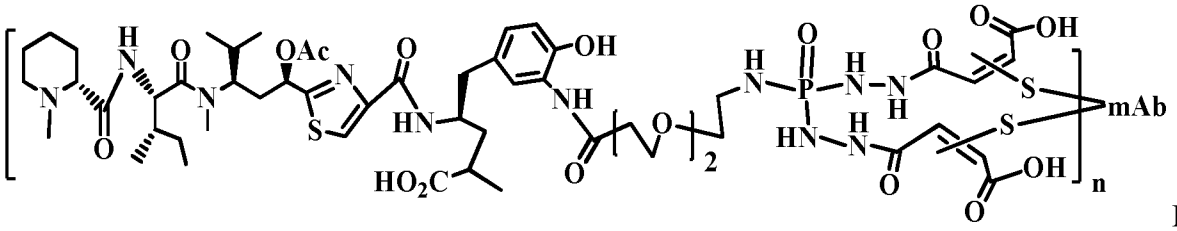
B-20a,



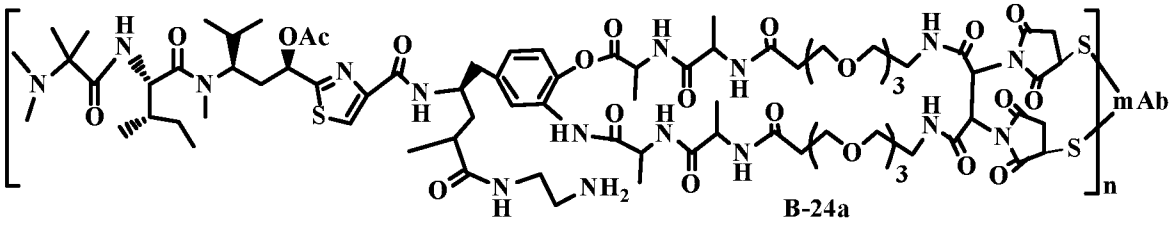
B-21a,



B-22a,

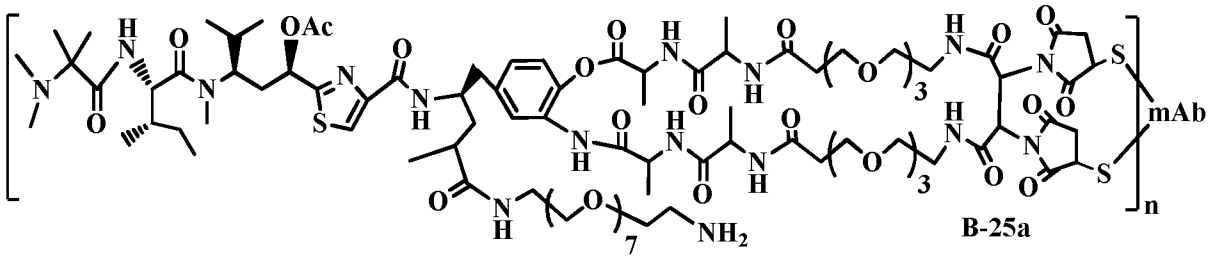


B-23a,



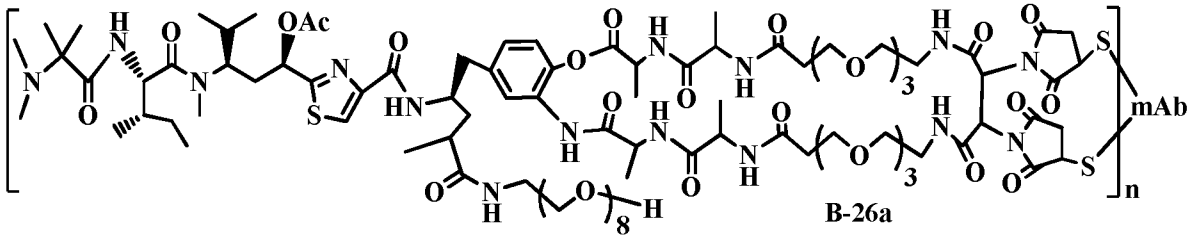
B-24a

B-24a,



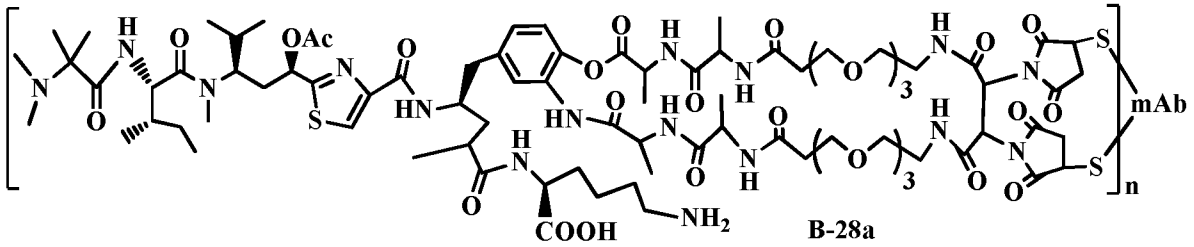
B-25a

B-25a,



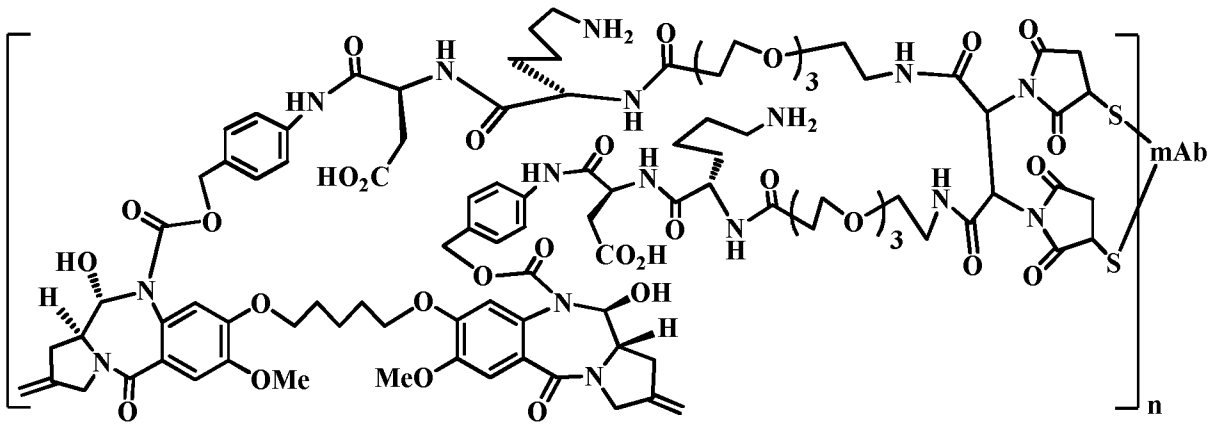
B-26a

B-26a,

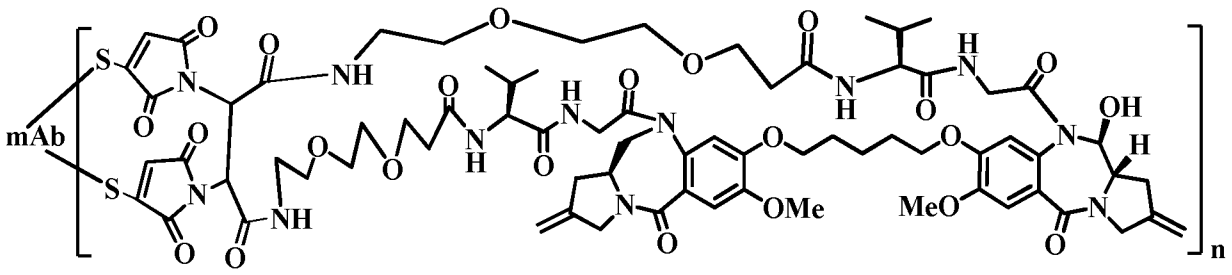


B-28a

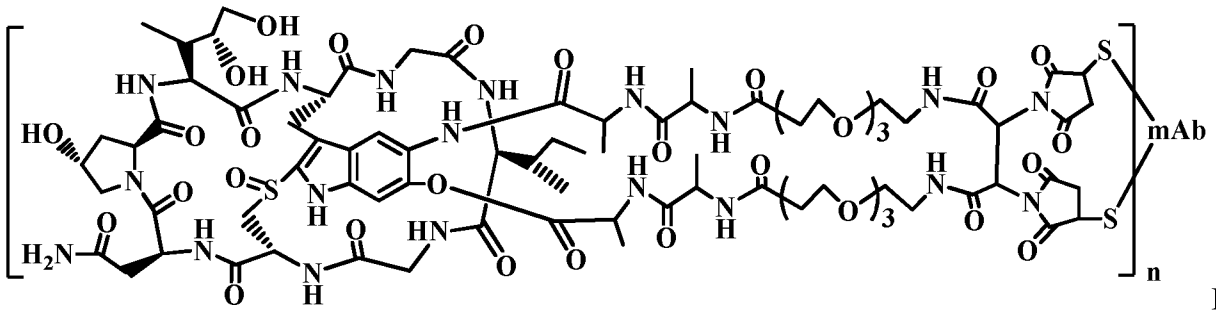
B-28a



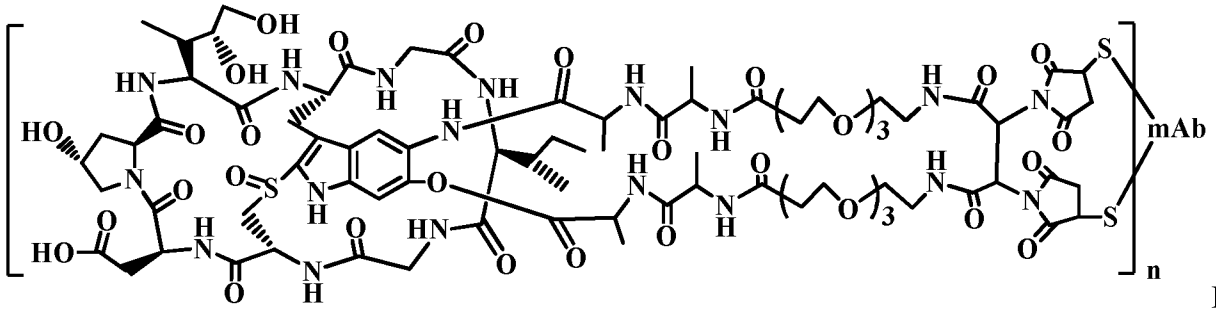
C-3a,



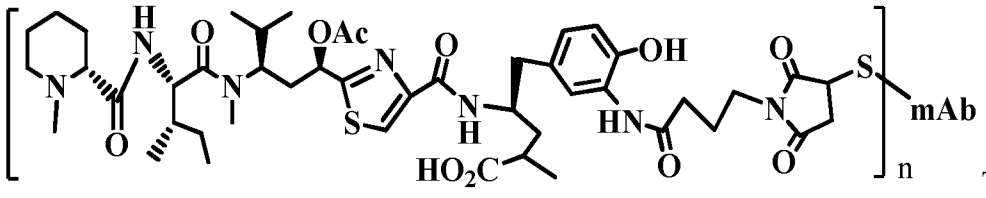
C-4a,



D-1a



D-2a



T-1a

где n = 2,0 ~ 4,5

Пример 237. in vitro оценка цитотоксичности конъюгата **A-3a, A-4a, A-5a, B-3a, B-6a, B-9a, B-12a, B-15a, B-18a, B-19a, B-20a, B-21a, B-22a, B-23a, B-24, B-25, B-26, B-28, C-3a, C-4a, D-1a** или **D-2a** по сравнению с T-DM1:

Клеточной линией, использованной в анализах цитотоксичности, была NCI-N87, клеточная линия карциномы желудка человека; клетки выращивали в RPMI-1640 с 10% FBS. Для проведения анализа клетки (180 мкл, 6000 клеток) добавляли в каждую лунку в 96-луночном планшете и инкубировали в течение 24 часов при 37 °C с 5% CO_2. Затем клетки обрабатывали тестируемыми соединениями (20 мкл) в различных концентрациях в подходящей среде для культивирования клеток (общий объем, 0,2 мл). Контрольные

лунки содержали клетки и среду, но не содержали испытуемых соединений. Планшеты инкубировали в течение 120 часов при 37 °C с 5% CO_2. Затем в лунки добавляли MTT (5 мг/мл) (20 мкл) и планшеты инкубировали в течение 1,5 часов при 37 °C. Среду осторожно удаляли, а затем добавляли ДМСО (180 мкл). После встряхивания в течение 15 минут измеряли оптическую плотность при 490 нм и 570 нм с эталонным фильтром 620 нм. % ингибирования рассчитывали по следующему уравнению: % ингибирования = [1-(проба для анализа)/(проба для контроля)] × 100.

Результаты цитотоксичности IC_{50}:

	DAR (соотношение лекарственных средств)	Клетки N87 (Ag+) IC_{50} (нМ)	Клетки N87 (Ag+) IC_{90} (нМ)
Конъюгат **A-3a**	3,5	0,32 нМ	0,91 нМ
Конъюгат **A-4a**	3,8	0,17 нМ	0,87 нМ
Конъюгат **A-5a**	4,1	0,094 нМ	0,31 нМ
Конъюгат **B-3a**	3,8	0,14 нМ	0,28
Конъюгат **B-6a**	3,8	0,21 нМ	0,62
Конъюгат **B-9a**	3,6	0,17 нМ	0,67
Конъюгат **B-12a**	3,8	0,13 нМ	0,06
Конъюгат **B-15a**	3,6	0,29 нМ	0,92
Конъюгат **B-18a**	3,6	0,46 нМ	1,20
Конъюгат **B-19a**	3,5	0,12 нМ	0,63
Конъюгат **B-20a**	3,8	0,33 нМ	0,96
Конъюгат **B-21a**	3,8	0,42 нМ	1,10
Конъюгат **B-22a**	3,6	0,13 нМ	0,33

Конъюгат **B-23a**	3,6	0,18 нМ	0,38
Конъюгат **B-24a**	3,8	0,83 нМ	1,46
Конъюгат **B-25a**	3,8	0,72 нМ	1,82
Конъюгат **B-26a**	3,7	0,93 нМ	1,93
Конъюгат **B-28a**	3,6	0,45 нМ	0,78
Конъюгат **C-3a**	3,6	0,09 нМ	0,17
Конъюгат **C-4a**	3,7	0,26 нМ	0,48
Конъюгат **D -1a**	3,8	0,041 нМ	0,087
Конъюгат **D -2a**	3,9	0,033 нМ	0,072
Конъюгат **T-1a**	3,8	0,25 нМ	0,51
T-DM1	3,5	0,12 нМ	0,26

Пример 238. Противоопухолевая активность in vivo (мыши линии BALB/c Nude, имеющих ксенотрансплантатную опухоль NCI-N87).

in vivo эффективность конъюгатов **A-3a, B-6a, B-12a, B-15a, B-18a, B-20a, B-21a, B-24a, B-28a, C-3a** и **D-2a** наряду с T-DM1 оценивали на моделях ксенотрансплантатной опухоли линии клеток N-87 карциномы желудка человека. Пятинедельным самкам мышей линии BALB/c Nude (104 животных) подкожно инокулировали в область под правым плечом клетки карциномы N-87 (5×10^6 клеток/мышь) в 0,1 мл бессывороточной среды. Опухоли давали вырасти в течение 8 дней до среднего размера 110 $мм^3$. Затем животные были случайным образом разделены на 13 групп (по 8 животных в группе). Первая группа мышей служила в качестве контрольной группы и получала носитель с фосфатно-солевым буфером (PBS). 10 групп обрабатывали конъюгатами **A-3a, B-6a, B-12a, B-15a, B-18a, B-20a, B-21a, B-24a, B-28a** и T-DM1 соответственно в дозе 3 мг/кг, вводимой внутривенно. Оставшиеся 2 группы обрабатывали конъюгатом **C-3a** и **D-1a** соответственно в дозе 1 мг/кг, вводимой внутривенно. Три измерения опухоли проводили каждые 4 дня, и объемы опухоли рассчитывали по формуле объем опухоли = 1/2 (длина × ширина × высота). В то же время измеряли массу животных . Мышей умерщвляли по достижению одного из

следующих критериев: (1) потеря в весе тела составляла более чем 20% от веса тела до введения соединения, (2) объем опухоли более чем 2000 мм^3, (3) слишком больны, чтобы самостоятельно достигнуть источника еды и воды, или (4) некроз кожи. Мышь считалась не имеющей опухоли, при отсутствии опухоли при пальпации.

Результаты представлены на Фиг.47. Все 13 конъюгатов не вызывали потери в весе тела животных. И животных в контрольной группе умерщвляли на день 50 из-за объема опухоли более чем 1800 мм^3 и животные были очень больны. Здесь все 12 протестированных конъюгатов продемонстрировали противоопухолевую активность. У животных в группах конъюгатов **B-24a, C-3a, B-20a, B-21a** и **D-20a** демонстрировалась лучшая противоопухолевая активность конъюгатов, по сравнению с T-DM1. Но у животных в группах конъюгатов **B-18a, B-15a, A-3a, B-6a, B-28a** и **B-12a** демонстрировалась худшая противоопухолевая активность конъюгатов, по сравнению с T-DM1. T-DM1 в дозе 3 мг/кг ингибировал рост опухоли в течение 28 дней, но он не смог устранить опухоли во время теста. Напротив, конъюгаты **B-20a, B-21a** и **D-20a** полностью уничтожали опухоли некоторых животных с 15 дня до 43 дня. Ингибирование роста опухоли в этих дозах перечислены ниже:

Конъюгат	Отсрочка в росте опухоли
T-DM1	28 дней
B-18a	3 дня
B-15a	5 дней
A-3a	7 дней
B-6a	8 дней
B-28a	10 дней
B-12a	19 дней
B-24a	33 дня
C-3a	39 дней

B-20a	> 45 дней
B-21a	> 45 дней
D-2a	> 45 дней

В конце эксперимента (день 50) животных группы PBS, A-3a, B-21a, T-DM1 и B-15a умерщвляли, и опухоли удаляли, что представлено на Фиг. 48.

Пример 239. Исследование стабильности конъюгата, имеющего бис-связь, по сравнению с обычными конъюгатами, имеющими моно-связь в мышиной сыворотке.

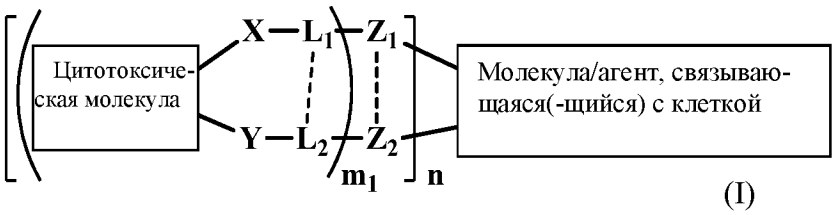
Сорок пять самок мышей ICR в возрасте 6-7 недель были разделены на 3 группы. Каждая группа включала 15 мышей для исследования PK одного из трех ADC. Эти 15 мышей были дополнительно случайным образом разделены на три группы (n = 5). Каждой мыши вводили конъюгаты T-DM_1, B-21a и T-1a (Huang Y. et al, Med Chem. #44, 249th ACS National Meeting, Denver, CO, Mar. 22~26, 2015; WO2014009774) соответственно в дозе 10 мг/кг/на мышь, в/в, болюсно. Отбор крови выполнялся в соответствии с Руководством NCI по отбору крови грызунов. В основном, мышей в каждой группе брали по очереди для отбора крови, чтобы избежать более чем двукратного отбора крови в течение 24 часов. Кровь брали из ретроорбитального кровяного синуса с помощью капилляра 70 мкл в моменты времени 0 (до введения дозы), 0,083, 0,25, 0,5, 1, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 312 и 504 часа после введения дозы. Образцы плазмы анализировали на суммарные антитела и антитела, конъюгированные с лекарственным средством, с помощью специальных методов ИФА. Вкратце, концентрацию конъюгированного антитела или общую концентрацию антитела в мышиной сыворотке измеряли следующим образом: 96-луночные планшеты для ИФА соответственно покрывали в течение ночи при 4 °C антителом к DM1, антителом к тубулизину или Fab-антителом к Her-2 (1 мкг/мл в 10 мМ PBS, pH 7,2). Затем планшеты трижды промывали промывочным буфером PBS-T (PBS/0,02% Tween20) и затем блокировали буфером для разведения 1% (вес/объем) BSA/PBS-T в течение 1 часа при 37 °C. После того, как блокирующий буфер был удален, стандарты или образцы мышиной сыворотки, каждый с тройными повторностями, разбавляли в 1% буфере BSA/PBS-T, инкубировали при 37 °C в течение 1 часа, затем добавляли AP-конъюгированное ослиное античеловеческое антитело в течение 30 минут при 37 °C после того, как пластины промывали. Планшеты снова промывали с последующим добавлением субстрата pNPP для проявления цвета и затем считывали на

считывающем устройстве для микропланшетов при длине волны 405 нм, как только реакцию образования цвета гасили гидроксидом натрия 1 моль/л. Концентрацию конъюгированного антитела или общую концентрацию антитела получали из подгонки четырехпараметрической кривой к стандартной кривой.

В результате, как показано на Фиг. 49, поведение PK общих антител и антител, конъюгированных с лекарственными средствами, после введения трех ADC представлено в виде типичных двухфазных кривых клиренса. Эквивалентность между плазмой и периферическими тканями была достигнута через 8 часов после введения дозы. Фаза элиминации наступала через 24 часа после введения и продолжалась до последней точки отбора. Таким образом, значения воздействия конъюгата (Auc_{last}) для этих трех ADC составляют 14981, 14713 и 16981 ч/мкг/кг для T-DM1, T-1a и B-21a соответственно. Объемы распределения для всех этих трех конъюгатов вдвое превышают общие объемы крови. Клиренсы (CL) конъюгатов составляют 0,59, 0,57 и 0,47 мл/час/кг, что почти вдвое меньше, чем для общих антител. Клиренс B-21a, как конъюгата, так и суммарных антител, меньше, чем у двух других ADC, что указывает на то, что конъюгат, имеющий бис-связь, является более стабильным, чем обычные моносвязанные конъюгаты в сыворотке мыши.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, связанный посредством бис-связывания Формулы (I):



(I)

в котором

«——» представляет собой одинарную связь; «-----» представляет собой, необязательно, или одинарную связь, или двойную связь, или может необязательно отсутствовать; n и m_1 независимо равны 1–20;

Молекула, связывающаяся с клеткой, в каркасе, который связывается с Z_1 и Z_2, является молекулой/агентом, которая связывается, образует комплексы или реагирует с некоторой частью клеточной популяции, которую требуется терапевтически или иным образом биологически модифицировать. Агент/молекула, связывающийся с клеткой, представляет собой иммунотерапевтический белок, антитело, одноцепочечное антитело; фрагмент антитела, который связывается с клеткой-мишенью; моноклональное антитело; одноцепочечное моноклональное антитело; или фрагмент моноклонального антитела, который связывается с клеткой-мишенью; химерное антитело; фрагмент химерного антитела, который связывается с клеткой-мишенью; доменное антитело; фрагмент доменного антитела, который связывается с клеткой-мишенью; аднектины, которые имитируют антитела; белки DARP; лимфокин; гормон; витамин; фактор роста; колониестимулирующий фактор; или переносящую питательные вещества молекулу; трансферрин; связывающие пептиды, содержащие более четырех аминокислот, или антитело, или протеин, или малую молекулу, связывающуюся с клеткой, или связывающийся лиганд, присоединенные к альбумину, полимерам, дендримерам, липосомам, наночастицам, везикулам или (вирусным) капсидам;

Цитотоксическая молекула в каркасе представляет собой терапевтическое лекарственное средство/молекулу/агент, или иммунотерапевтический белок/молекулу, или функциональную молекулу для усиления связывания или стабилизации агента, связывающегося с клеткой, или связывающегося с поверхностным рецептором лиганда клетки, или для ингибирования пролиферация клеток, или для наблюдения, обнаружения или исследования действия молекулы, связывающейся с клеткой, или аналог, или пролекарство, иммунотерапевтическое соединение, химиотерапевтическое соединение, антитело (проантитело) или фрагмент антитела (проантитело), или миРНК, или молекулу ДНК, или лиганд, связывающийся с клеточной поверхностью; или аналог или пролекарство терапевтического лекарственного средства, содержащего тубулизины, калихеамицины, ауристатины,

майтанзиноиды, аналоги CC-1065, морфолино доксорубицины, таксаны, криптофицины, аматоксины, эпотилоны, еribулины, гелданамицины, дуокармицины, дауномицины, метотрексаты, виндезины, винкристины и бензодиазепиновые димеры (например, димеры пирролобензодиазепина (PBD), томаймицин, индолинобензодиазепины, имидазобензотиадиазепины или оксазолидинобензодиазепины);

X и Y представляют собой одинаковую или различную и, независимо, функциональную группу, которая связывает цитотоксическое лекарственное средство через дисульфид, простой тиоэфир, сложный тиоэфир, пептид, гидразон, простой эфир, сложный эфир, карбамат, карбонат, амин (вторичный, третичный или четвертичный), имин, циклогетероалкиан, гетероароматическую, алкоксимовую или амидную связь; X и Y независимо выбраны из NH; NHNH; $N(R_1)$; $N(R_1)N(R_2)$; O; S; S-S, O-NH. $O-N(R_1)$, CH_2-NH. $CH_2-N(R_1)$, CH=NH. $CH=N(R_1)$, S(O), $S(O_2)$, P(O)(OH), S(O)NH, $S(O_2)NH$, P(O)(OH)NH, NHS(O)NH, $NHS(O_2)NH$, NHP(O)(OH)NH, $N(R_1)S(O)N(R_2)$, $N(R_1)S(O_2)N(R_2)$, $N(R_1)P(O)(OH)N(R_2)$, OS(O)NH, $OS(O_2)NH$, OP(O)(OH)NH, C(O), C(NH), $C(NR_1)$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, OC(O)NH, OC(NH)NH; $OC(NR_1)NH$, NHC(O)NH; NHC(NH)NH; $NHC(NR_1)NH$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, $OC(O)N(R_1)$, $OC(NH)N(R_1)$, $OC(NR_1)N(R_1)$, $NHC(O)N(R_1)$, $NHC(NH)N(R_1)$, $NHC(NR_1)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(NH)N(R_1)$, $N(R_1)C(NR_1)N(R_1)$; или C_1-C_6 алкила; C_2-C_8 алкенила, гетероалкила, алкилциклоалкила или гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила или гетероарила;

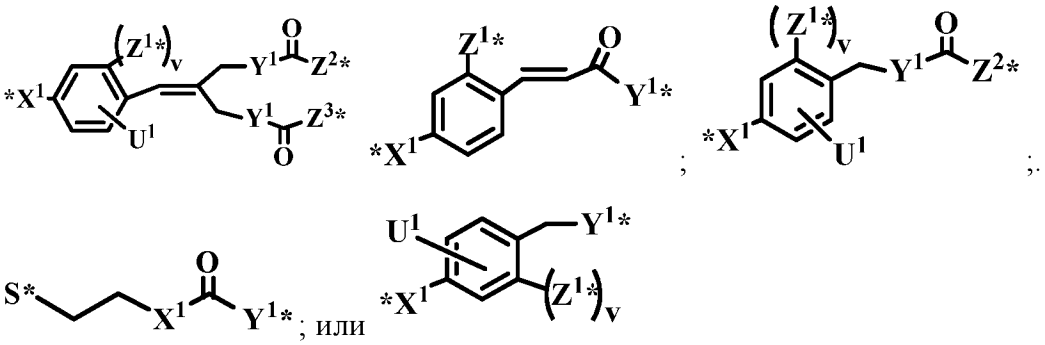
Z_1 и Z_2 являются одинаковыми или разными и независимо представляют собой функциональную группу, которая связана с молекулой, связывающейся с клеткой, с образованием дисульфидной, простоэфирной, сложноэфирной, простой тиоэфирной, сложнотиоэфирной, пептидной, гидразонной, карбаматной, карбонатной, аминной (вторичной, третичной или четвертичной), иминной, циклогетероалкиановой, гетероароматической, алкилоксимовой или амидной связи; Z_1 и Z_2 независимо имеют следующие структуры: C(O)CH, C(O)C, $C(O)CH_2$, $ArCH_2$, C(O), NH; NHNH; $N(R_1)$; $N(R_1)N(R_2)$; O; S; S-S, O-NH. $O-N(R_1)$, CH_2-NH. $CH_2-N(R_1)$, CH=NH. $CH=N(R_1)$, S(O), $S(O_2)$, P(O)(OH), S(O)NH, $S(O_2)NH$, P(O)(OH)NH, NHS(O)NH, $NHS(O_2)NH$, NHP(O)(OH)NH, $N(R_1)S(O)N(R_2)$, $N(R_1)S(O_2)N(R_2)$, $N(R_1)P(O)(OH)N(R_2)$, OS(O)NH, $OS(O_2)NH$, OP(O)(OH)NH, C(O), C(NH), $C(NR_1)$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, OC(O)NH, OC(NH)NH; $OC(NR_1)NH$, NHC(O)NH; NHC(NH)NH; $NHC(NR_1)NH$, C(O)NH, C(NH)NH, $C(NR_1)NH$, $OC(O)N(R_1)$, $OC(NH)N(R_1)$, $OC(NR_1)N(R_1)$, $NHC(O)N(R_1)$, $NHC(NH)N(R_1)$, $NHC(NR_1)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$,

$N(R_1)C(NH)N(R_1)$, $N(R_1)C(NR_1)N(R_1)$; или C_1-C_8 алкил, C_2-C_8 гетероалкил, алкилциклоалкил или гетероциклоалкил; C_3-C_8 арил, Ar-алкил, гетероциклический, карбоциклический, циклоалкил, гетероалкилциклоалкил, алкилкарбонил или гетероарил;

L_1 и L_2, являются одинаковыми или различными, независимо выбраны из O; NH; S; NHNH; $N(R_3)$; $N(R_3)N(R_{3'})$; C_1-C_8 алкила, амида, аминов, иминов, гидразинов или гидразонов; C_2-C_8 гетероалкила, алкилциклоалкила, простых эфиров, сложных эфиров, гидразонов, мочевин, семикарбазидов, карбазидов, алкоксиаминов, алкоксиламинов, уретанов, аминокислот, пептидов, ацилоксиламинов, гидроксамовых кислот или гетероциклоалкилов; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила или гетероарила; 1~8 аминокислот; полиэтиленоксигруппы формулы $(OCH_2CH_2)_pOR_3$, или $(OCH_2\text{-}CH(CH_3))_pOR_3$, или $NH(CH_2CH_2O)_pR_3$, или $NH(CH_2CH(CH_3)O)_pR_3$, или $N[(CH_2CH_2O)_pR_3]\text{-}[(CH_2CH_2O)_{p'}R_{3'}]$, или $(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$, или $CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_pCOOR_3$, где p и p' независимо представляют собой целое число, выбранное от 0 до около 5000, или их комбинацию; R_3 и $R_{3'}$ независимо представляют собой H; C_1-C_8 алкил; C_2-C_8 гетероалкил, алкилциклоалкил или гетероциклоалкил; C_3-C_8 арил, Ar-алкил, гетероциклил, карбоциклил, циклоалкил, гетероалкилциклоалкил, алкилкарбонил или гетероарил; или C_2-C_8 сложных эфиров, простого эфира или амида; или 1 ~ 8 аминокислот; или полиэтиленоксигруппы формулы $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 0 до около 5000, или их вышеуказанную комбинацию;

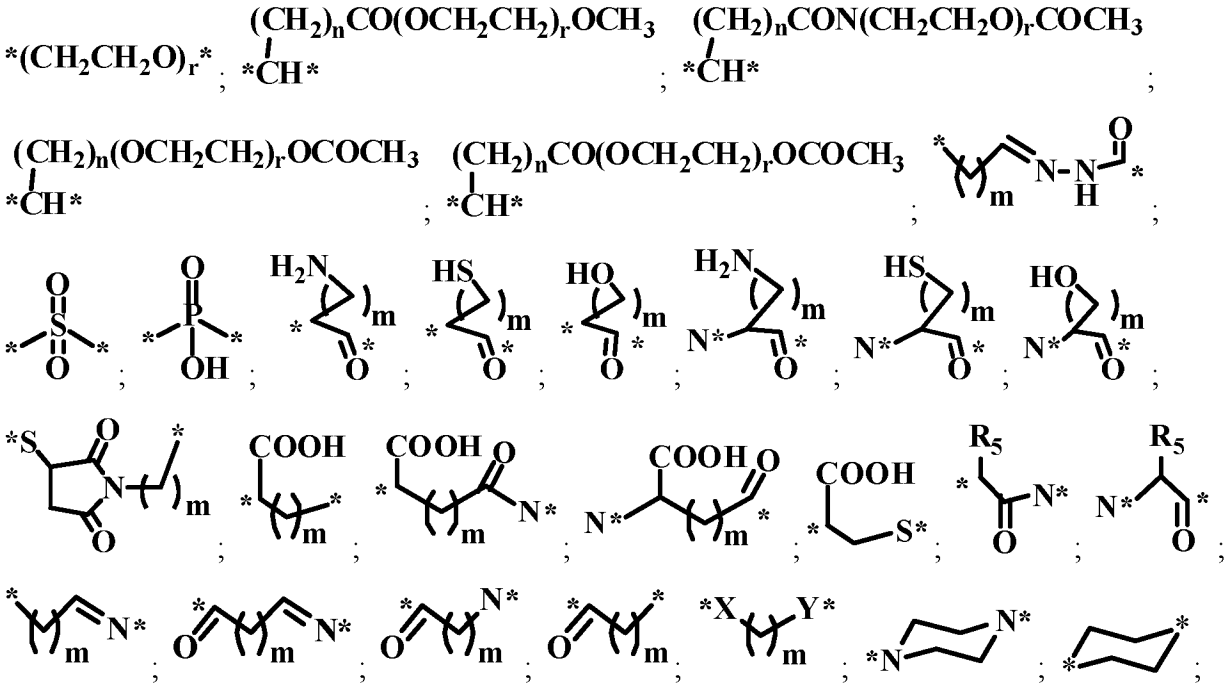
или L_1 и L_2 независимо содержат один или более линкерных компонентов 6-малеимидокапроила («MC»), малеимидопропаноила («MP»), валин-цитруллина («val-cit» или «vc»), аланин-фенилаланина («ala-phe» или «af»), п-аминобензилоксикарбонила («PAB»), 4-тиопентаноата («SPP»), 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата («MCC»), (4-ацетил)аминобензоата («SIAB»), 4 -тиобутирата (SPDB), 4-тио-2-гидроксисульфонилбутирата (2-сульфо-SPDB) или природных или неприродных пептидов содержащих 1 ~ 8 природных или неприродных аминокислот;

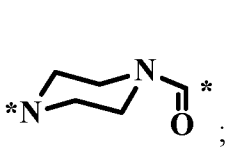
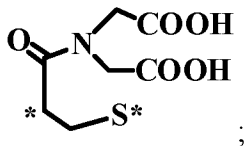
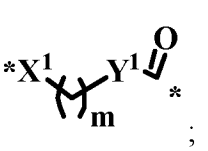
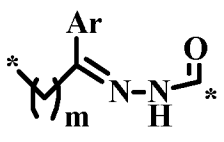
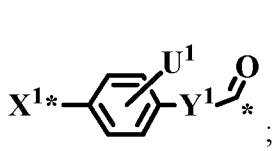
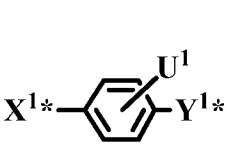
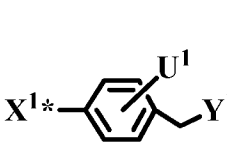
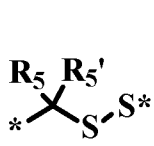
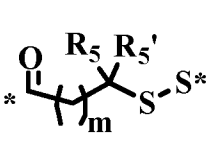
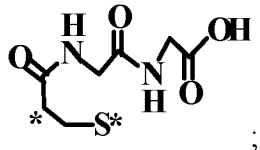
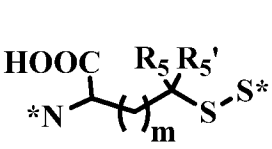
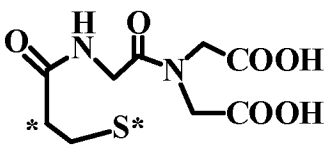
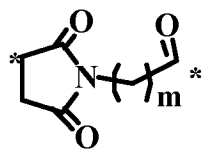
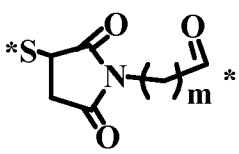
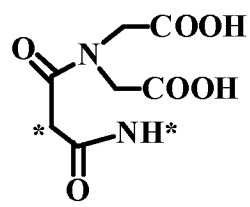
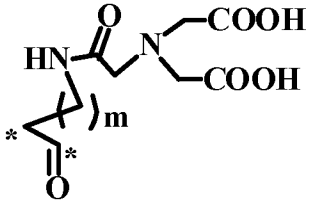
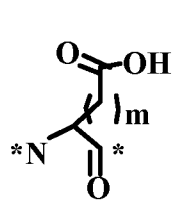
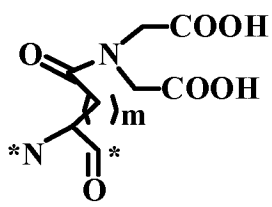
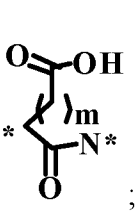
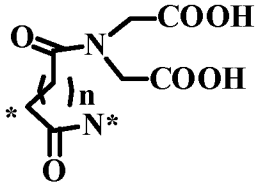
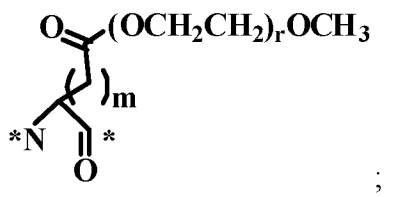
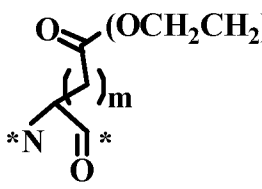
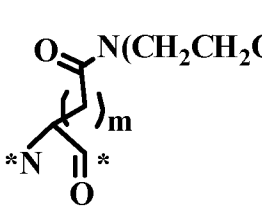
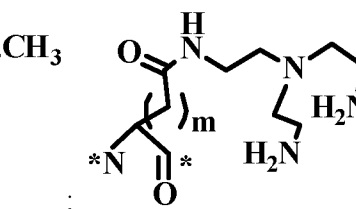
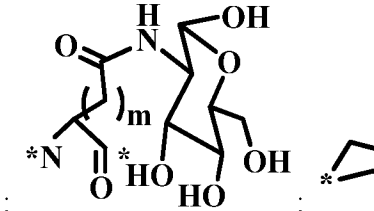
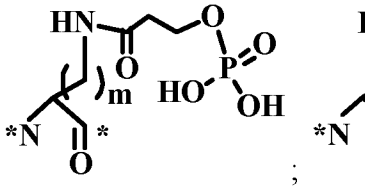
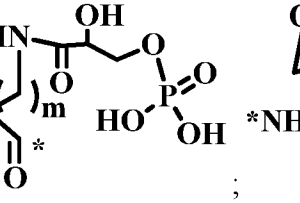
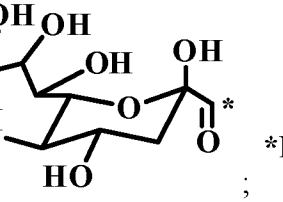
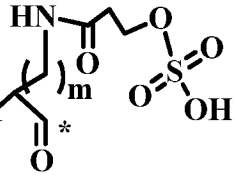
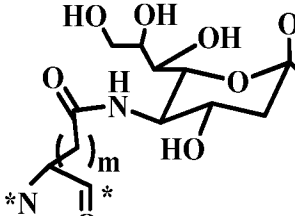
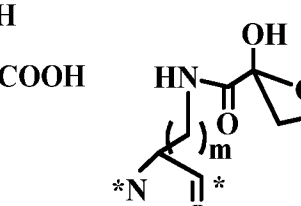
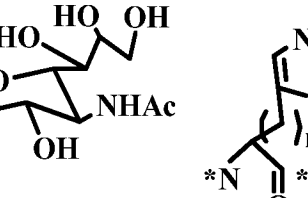
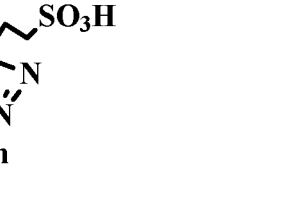
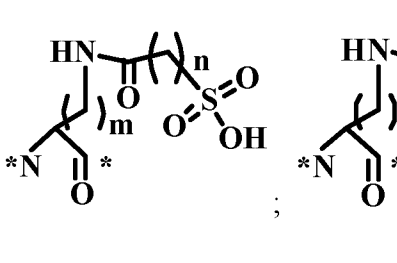
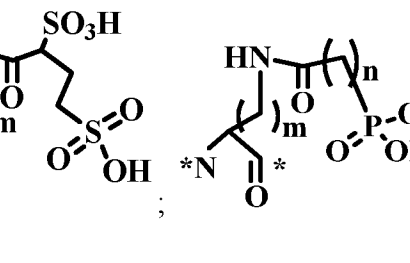
L_1 и L_2 независимо содержат саморазрущающийся компонент, пептидные звенья, гидразоновую связь, дисульфидную, сложноэфирную, оксимную, амидную или простотиоэфирную связь. Саморазрущающийся фрагмент включает в себя ароматические соединения, которые в электронном виде сходны с пара-аминобензилкарбамоильными (PAB) группами, производными 2-аминоимидазол-5-метанола, гетероциклическими аналогами PAB, бета-глюкуронидом и орто- или пара-аминобензилацеталями;



где (*) атом представляет собой точку присоединения дополнительных спейсерных или высвобождаемых линкерных фрагментов или цитотоксического агента и/или связывающейся молекулы (CBA); X^1, Y^1, Z^2 и Z^3 независимо представляют собой NH, O или S; Z^1 независимо представляет собой H, NHR_1, OR_1, SR_1, COX_1R_1 где X_1 и R_1 представляют собой как определено выше; v равно 0 или 1; U^1 независимо представляет собой H, OH, C_1~C_6 алкил, $(OCH_2CH_2)_n$, F, Cl, Br, I, OR_5, SR_5, NR_5R_5', $N{=}NR_5$, $N{=}R_5$, NR_5R_5', NO_2, SOR_5R_5', SO_2R_5, SO_3R_5, OSO_3R_5, PR_5R_5', POR_5R_5', $PO_2R_5R_5'$, $OPO(OR_5)(OR_5')$ или $OCH_2PO(OR_5(OR_5')$, где R_5 и $R_{5'}$ независимо выбраны из H, C_1~C_8 алкила; C_2~C_8 алкенила, алкинила, гетероалкила, или аминокислоты; C_3~C_8 арила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероциклоалкила, гетероаралкила, алкилкарбонила или гликозида; или фармацевтических катионных солей;

или L_1 и L_2 независимо содержат несаморазрущающийся линкерный компонент, содержащий одну из следующих структур:




;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

где (*) атом представляет собой точку присоединения дополнительных спейсерных или высвобождаемых линкеров, цитотоксических агентов и/или молекул связывания; X^1, Y^1, U^1, R_5, R_5' являются такими, как определено выше; r составляет 0 ~ 100; m и n независимо равны 0-6;

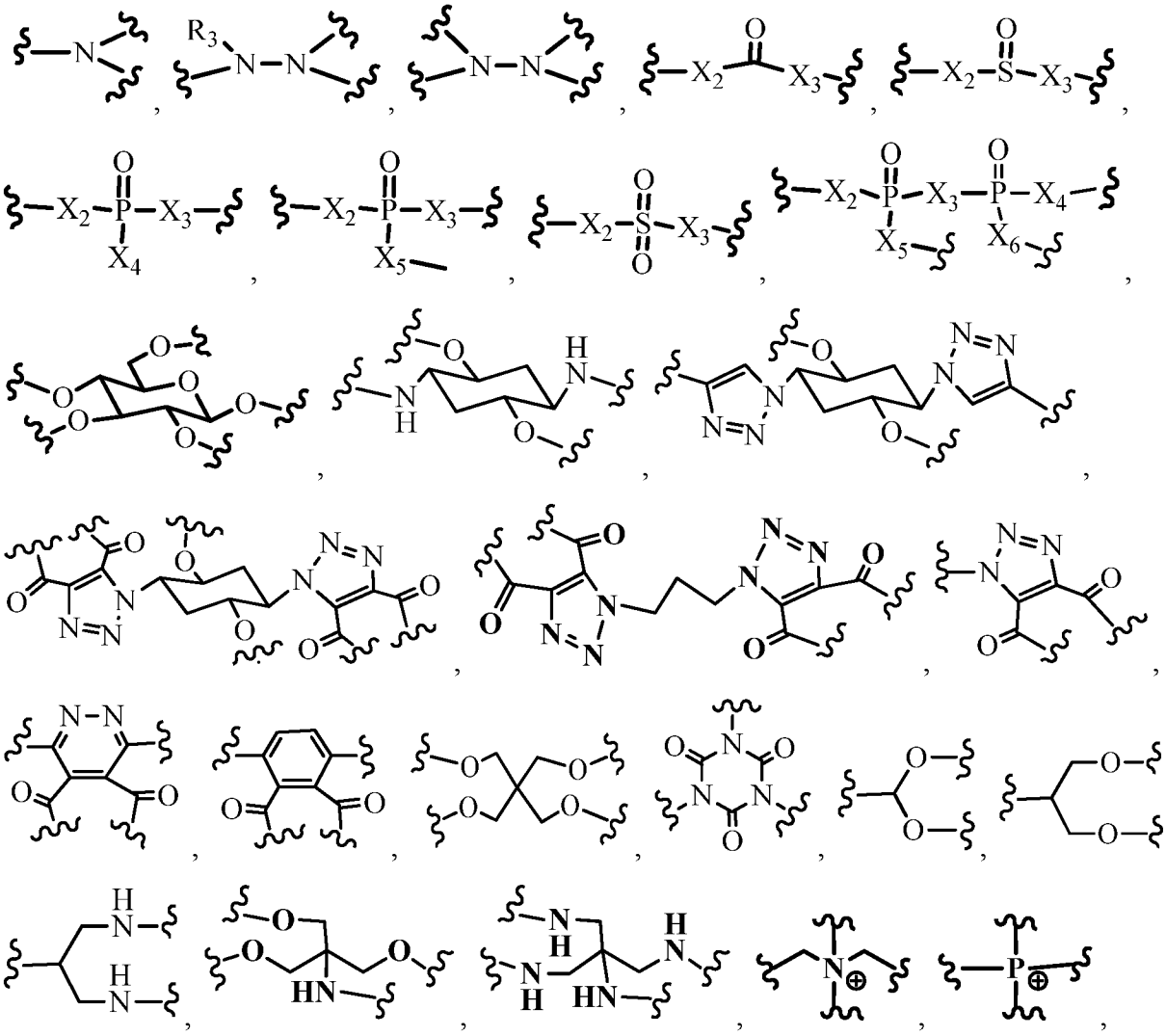
или L_1 и L_2 независимо представляют собой высвобождаемый линкер, который включает по меньшей мере одну связь, которая может быть разорвана в физиологических условиях, такая как pH-лабильная, кислотно-лабильная, щелочно-лабильная, окислительно-лабильная, метаболически лабильная, биохимически лабильная или фермент-лабильная связь, который имеет одну из следующих структур:

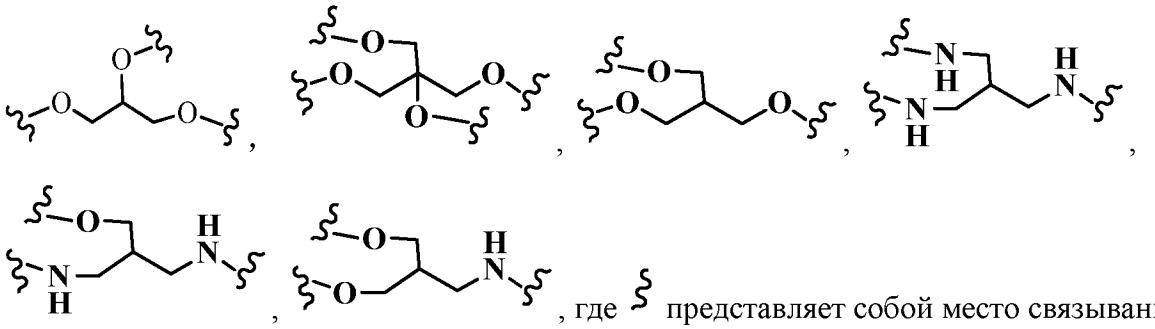
$-(CR_5R_6)_m(Aa)r(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$, $-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(Aa)_r(OCH_2CH_2)_t-$, $-(Aa)_r-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$, $-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_r(Aa)_t-$, $-(CR_5R_6)_m-(CR_7{=}CR_8)(CR_9R_{10})_n(Aa)_t(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(Aa)_t(NR_{11}CO)(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$,$-(CR_5R_6)_m(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t-(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m-(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$, $-(CR_5R_6)_m$-фенил-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R_6)_m$-фурил-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R_6)_m$-оксазолил-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R_6)_m$-тиазолил-$CO(Aa)_t(CCR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R_6)_t$-тиенил-$CO(CR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R_6)_t$-имидазолил-CO-$(CR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R_6)_t$-морфолино-$CO(Aa)_t$-$(CR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R_6)_t$пиперазино-$CO(Aa)_t$-$(CR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R_6)_t$-N-метилпиперазин-$CO(Aa)_t$-$(CR_7R_8)_n-$, $-(CR_5R)_m$-$(Aa)_t$фенил-, $-(CR_5R_6)_m$-$(Aa)_t$фурил-, $-(CR_5R_6)_m$-оксазолил$(Aa)_t-$, $-(CR_5R_6)_m$-тиазолил$(Aa)_t-$, $-(CR_5R_6)_m$-тиенил-$(Aa)_t-$, $-(CR_5R_6)_m$-имидазолил$(Aa)_t-$, $-(C\ R_5R_6)_m$-морфолино-$(Aa)_t-$, $-(CR_5R_6)_m$-пиперазино-$(Aa)_t-$, $-(CR_5R_6)_m$-N-метилпиперазино-$(Aa)_t-$,

$-K(CR_5R_6)_m(Aa)r(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$, $-K(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(Aa)_r(OCH_2CH_2)_t-$, $-K(Aa)_r-(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_t-$, $-K(CR_5R_6)_m(CR_7R_8)_n(OCH_2CH_2)_r(Aa)_t-$, $-K(CR_5R_6)_m-(CR_7{=}CR_8)(CR_9R_{10})_n(Aa)_t(OCH_2CH_2)_r-$, $-K(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-K(CR_5R_6)_m(Aa)_t(NR_{11}CO)(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-K(CR_5R_6)_m(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n-(OCH_2CH_2)_r-$, $-K(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-K(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t-(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-K(CR_5R_6)_m(NR_{11}CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-K(CR_5R_6)_m-(OCO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-K(CR_5R_6)_m(OCNR_7)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-K-(CR_5R_6)_m(CO)(Aa)_t(CR_9R_{10})_n(OCH_2CH_2)_r-$, $-K(CR_5R_6)_m$-фенил-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$, $-K-(CR_5R_6)_m$-furyl-$CO(Aa)_t$-$(CR_7R_8)_n-$, $-K(CR_5R_6)_m$-оксазолил-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$, $-K(CR_5R_6)_m$-тиазолил-$CO(Aa)_t$-$(CR_7R_8)_n-$, $-K(CR_5R_6)_t$-тиенил-$CO(CR_7R_8)_n-$, $-K(CR_5R_6)_t$имидазол-CO-$(CR_7R_8)_n-$, $-K(CR_5R_6)_t$морфолино-$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n-$, $-K(CR_5R_6)_t$пиперазино-$CO(Aa)_t$-

$(CR_7R_8)_n$-, -$K(CR_5R_6)_t$-N-метилпиперазин$CO(Aa)_t(CR_7R_8)_n$-, -$K(CR_5R)_m(Aa)_t$фенил, -K-$(CR_5R_6)_m$-$(Aa)_t$фурил-, -$K(CR_5R_6)_m$-оксазолил$(Aa)_t$-, -$K(CR_5R_6)_m$-тиазолил$(Aa)_t$-, -$K(CR_5R_6)_m$-тиенил-$(Aa)_t$-, -$K(CR_5R_6)_m$-имидазолил$(Aa)_t$-, -$K(CR_5R_6)_m$-морфолино$(Aa)_t$-, -$K(CR_5R_6)_m$-пиперазино-$(Aa)_t$G, -$K(CR_5R_6)_m$N-метилпиперазино$(Aa)_t$-; где m, Aa, m и n описаны выше; t и r независимо равны 0 – 100; R_3, R_4, R_5, R_6, R_7 и R_8 независимо выбраны из H; галогенида; C_1~C_8 алкила; C_2~C_8 арила, алкенила, алкинила, эфира, сложного эфира, амина или амида, который необязательно замещен одним или более галогенидом, CN, NR_1R_2, CF_3, OR_1, арилом, гетероциклом, $S(O)R_1$, SO_2R_1, $-CO_2H$, $-SO_3H$, $-OR_1$, $-CO_2R_1$, $-CONR_1$, $-PO_2R_1R_2$, $-PO_3H$ или $P(O)R_1R_2R_3$; K представляет собой NR_1, -SS-, -C(=O)-, -C(=O)NH-, -C(=O)O-, -C=NH-O-, -C=N-NH-, -C(=O)NH-NH-, O, S, Se, B, Het (гетероциклическое или гетероароматическое кольцо, содержащее C_3-C_8), или пептиды, содержащие 1-20 аминокислот;

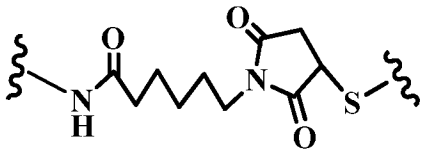
L_1 и L_2 независимо содержат одну из следующих гидрофильных структур:



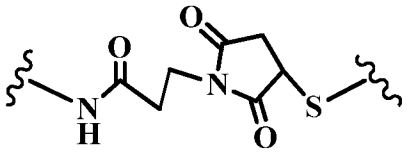


, где ~ представляет собой место связывания; X_2, X_3, X_4, X_5, и X_6 независимо выбраны из NH; NHNH; $N(R_3)$; $N(R_3)N(R_{3'})$; O; S; C_1-C_6 алкила; C_2-C_6 гетероалкила, алкилциклоалкила или гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила, гетероарила; или 1 ~ 8 аминокислот; где R_3 и $R_{3'}$ независимо представляют собой H; C_1-C_8 алкил; C_2-C_8 гетероалкил, алкилциклоалкил или гетероциклоалкил; C_3-C_8 арил, Ar-алкил, гетероциклил, карбоциклил, циклоалкил, гетероалкилциклоалкил, алкилкарбонил или гетероарил; или C_2-C_8 сложных эфиров, простых эфиров или амидов; или полиэтиленоксигрупп, имеющих формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому число от 0 до около 5000, или их комбинации;

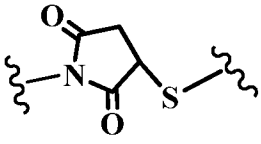
Кроме того, где X, Y, L_1, L_2, Z_1 или Z_2 могут независимо состоять из одного или более следующих компонентов, как показано ниже:



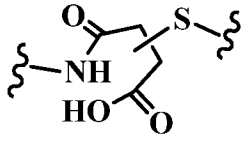
6-малеидокапроил (MC),



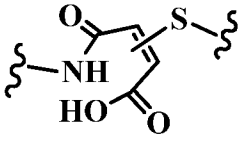
малеимидопропаноил (MP),



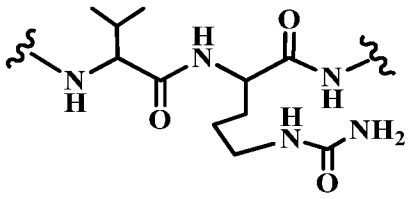
тиомалеидо,



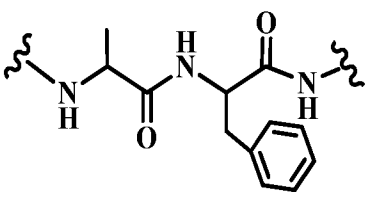
тиоаминооксобутановая кислота,



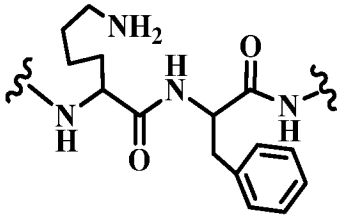
тиоаминооксобутеновая кислота,



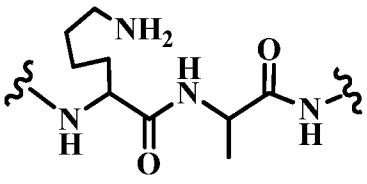
валин-цитруллин (val-cit),

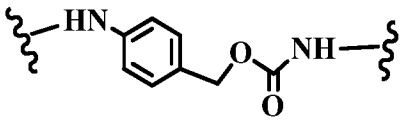


аланин-фенилаланин (ala-phe),

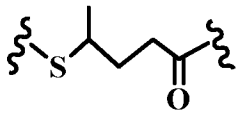


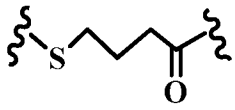
лизин-фенилаланин (lys-phe) ,

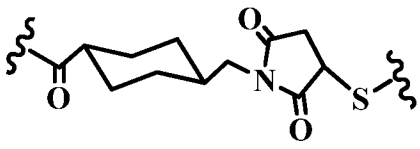


лизин-аланин (lys-ala), 

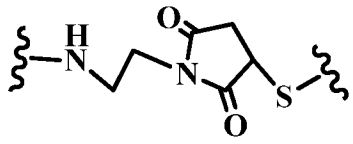
пара-ами-

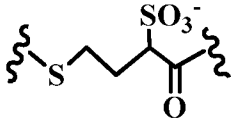
нобензилоксикарбонил (PAB), 

4-тиопентаноат (SPP), 

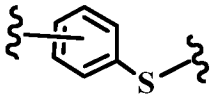
4-тиобутират (SPDB), 

4- (N-малеимидометил)циклогексан-

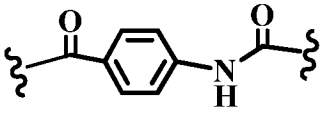
1-карбоксилат (MCC), 

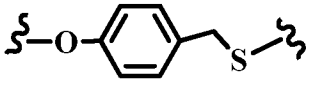
малеимидоэтил (ME), 

4-

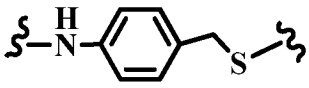
тио-2-гидроксисульфонилбутират (2-сульфо-SPDB), 

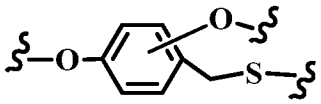
арилтиол (PySS),



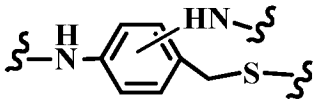
(4-ацетил)аминобензоат (SIAB), 

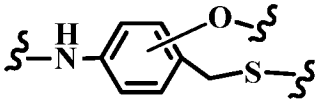
оксилбен-

зилтио, 

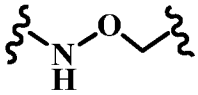
аминобензилтио, 

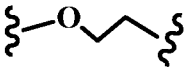
диоксилбензил-

тио, 

диаминобензилтио, 

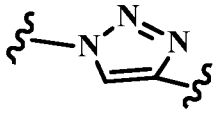
аминооксилбензи-

лтио, 

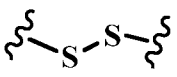
алкоксиамино (AOA), 

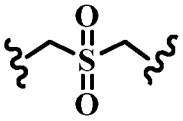
этиленокси (EO),

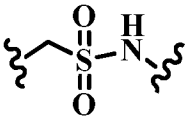


4-метил-4-дитиопентаноил (MPDP), 

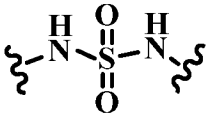
триазол,

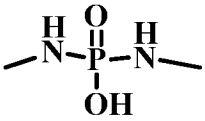


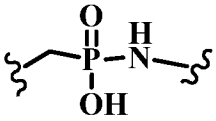
дитио, 

алкилсульфонил, 

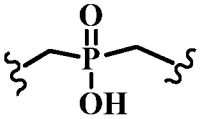
алкилсульфонамид,

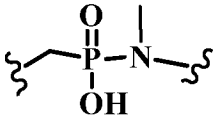


сульфон-бисамид, 

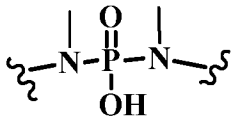
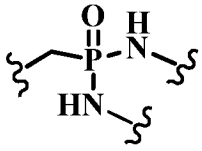
фосфондиамид, 

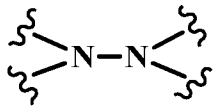
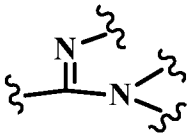
алкил-

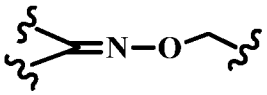
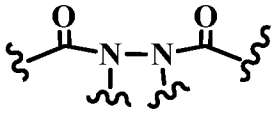
фосфонамид, 

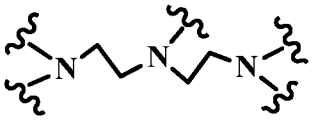
фосфиновая кислота, 

N-метилфосфонамидная

кислота,  N,N'-диметилфосфонамидная кислота,  N,N'-ди-

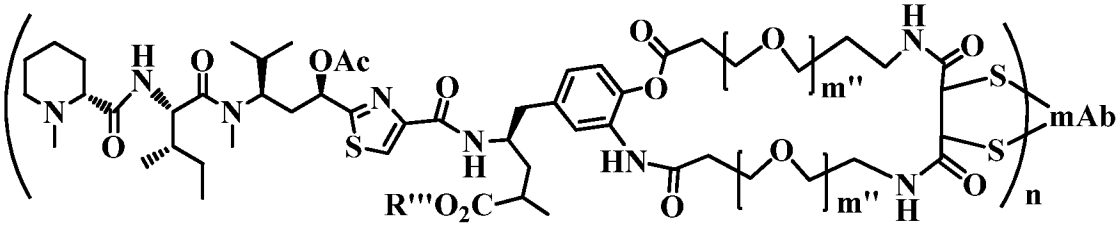
метилфосфондиамид,  гидразин,  ацетимидамид;

 оксим,  ацетилацетогидразид,  ами-

ноэтиламин,  аминоэтиламиноэтиламин и L- или D-, природные или неприродные пептиды, содержащие 1-20 аминокислот; где связующая связь между атомами означает, что она может соединять любые соседние углеродные связи; волнистая линия является местом, с которым может быть связана другая связь;

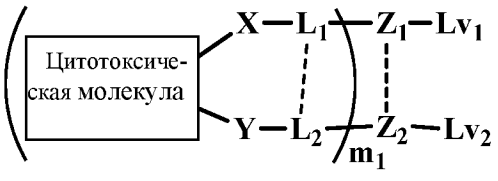
Альтернативно, X, Y, L_1, L_2, Z_1, или Z_2 могут независимо отсутствовать, но L_1 и Z_1, или L_2 и Z_2 не отсутствуют одновременно;

причем указанный коньюгат согласно Формуле (I) настоящего изобретения прямо исключает следующие структуры:



где n = 1-30; m'' = 1-3; R''' = H, CH_3 или C_2H_5.

2. Конъюгат Формулы (I) по п. 1, полученный из легкореакционноспособного бис-линкерного соединения, содержащего цитотоксическую молекулу нижеуказанной Формулы (II), в котором два или более остатка молекулы, связывающейся с клеткой, могут одновременно или последовательно реагировать с образованием Формулы (I):



(II)

в которой:

«——» представляет собой одинарную связь; «-----» представляет собой необязательно либо одинарную связь, либо двойную связь, либо тройную связь или может необязательно отсутствовать;

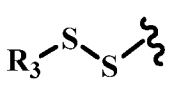
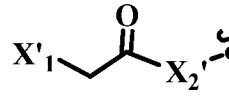
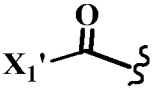
При условии, что когда ----- представляет собой тройную связь, оба Lv_1 и Lv_2 отсутствуют;

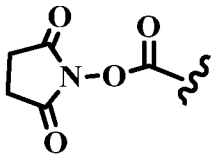
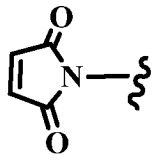
Цитотоксическая молекула в каркасе, m_1, X, Y, L_1, L_2, Z_1, и Z_2 определены так же, как в п. 1;

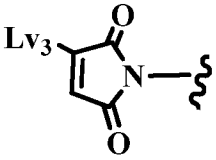
Lv_1 и Lv_2 представляют собой одинаковую или различную уходящую группу, которая может реагировать с тиольной, амино, карбоксильной, селенольной, фенольной или гидроксильной группой в молекуле, связывающейся с клеткой. Lv_1 и Lv_2 независимо выбраны из OH; F; Cl; Br; I; нитрофенола; N-гидроксисукцинимида (NHS); фенола; динитрофенола; пентафторфенола; тетрафторфенола; дифторфенола; монофторфенола; пентахлорфенола; трифлата; имидазола; дихлорфенола; тетрахлорфенола; 1-гидроксибензотриазола; тозилата; мезилата; 2-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфоната, простых и смешанных ангидридов, уксусного ангидрида или формил ангидрида; или молекулы интермедиата, полученной с использованием реагента конденсации для реакций пептидного сочетания или для реакций Мицунобу, выбранных из: EDC (N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид), DCC (дициклогексилкарбодиимид), N, N'-диизопропилкарбодиимид (DIC), N-циклогексил-N'-(2-морфолино-этил)карбодиимид мезо п-толуолсульфонат (CMC или CME-CDI), 1,1'-карбонилдиимидазол (CDI), TBTU (O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония тетрафторборат), N,N,N',N'-тетраметил-O- (1H-бензотриазол-1-ил)урония гексафторфосфат (HBTU), (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфонийгексафторфосфат(BOP), (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфонийгексафторфосфат (PyBOP), диэтилцианофосфонат (DEPC), хлор-N,N,N',N'-тетраметилформамидинийгексафторфосфат, 1-[бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния-3-оксид гексафторфосфат (HATU), 1-[(диметиламино)(морфолино)метилен]-1H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-1-ий 3-оксид гексафторфосфат (HDMA), 2-хлор-1,3-диметилимидазолидиния гексафторфосфат (CIP), хлортрипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyCloP), фтор-N,N,N',N'-бис(тетраметилен)формамидиния гексафторфосфат (BTFFH), N,N,N′,N′-тетраметил-S-(1-оксидо-2-пиридил)тиуроний гексафторфосфат, O-(2-оксо-1(2H)пиридил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний тетрафторборат (TPTU), S-(1-оксидо-2-пиридил)-N,N,N',N'-тетраметилтиуроний тетрафторборат, O-[(этоксикарбонил)-цианометиленамино]-N,N,N',N'-тетраметилуронийгексафторфосфат (HOTU), (1-циано-2-этокси-2-оксоэтилиденаминокси)диметиламиноморфолинокарбений гексафторфосфат (COMU), O-(бен-

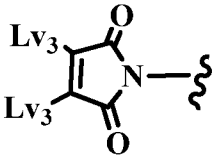
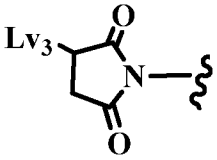
зотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-бис(тетраметилен)уроний гексафторфосфат (HBPyU), N-бензил-N'-циклогексилкарбодиимид (связанный или нет с полимером), дипирролидино (N-сукцинимидилокси)карбений гексафторфосфат (HSPyU), хлордипирролидинокарбения гексафторфосфат (PyClU), (2-хлор-1,3-диметилимидазолидин тетрафторбират (CIB), (бензотриазол-1-илокси)дипиперидинокарбений гексафторфосфат (HBPipU), O- (6-хлорбензотриазол-1-ил)-N,N,N′,N′-тетраметилуроний тетрафторборат (TCTU), бромтрис(диметиламино)фосфоний гексафторфосфат (BroP) пропилфосфоновый ангидрид PPACA, T3P®), 2-морфолиноэтилизоцианид (MEI), N,N,N′,N′-тетраметил-O-(N-сукцинимидил)уроний гексафторфосфат (HSTU), 2-бром-1-этилпиридиний тетрафторборат (BEP) , O-[(этоксикарбонил)цианометиленамино]-N,N,N′,N′-тетраметилуроний тетрафторборат (TOTU), 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолинийхлорид (MMTM, DMTMM), N,N,N′,N′-тетраметил-O-(N-сукцинимидил)уроний тетрафторборат (TSTU), O-(3,4-дигидро-4-оксо-1,2,3-бензотриазин-3-ил)-N,N,N′,N′-тетраметилуроний тетрафторборат (TDBTU), 1,1'-(азодикарбонил)дипиперидин (ADD), ди- (4-хлорбензил)азодикарбоксилат (DCAD), ди-трет-бутилазодикарбоксилат (DBAD), диизопропилазодикарбоксилат (DIAD), диэтилазодикарбоксилат (DEAD). Кроме того, Lv_1 и Lv_2 могут быть простым или смешанным ангидридом, кислот C_1~C_8;

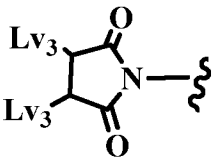
или Lv_1 и Lv_2 могут быть независимо выбранными из галогенида (фторида, хлорида, бромида и йодида), метансульфонила (мезила), толуолсульфонила (тозила), трифторметилсульфонила (трифлата), трифторметилсульфоната, нитрофеноксила, N-сукцинимидилгидроксила (NHS) феноксила; динитрофеноксила; пентафторфеноксила, тетрафторфеноксила, трифторфеноксила, дифторфеноксила, монофторфеноксила, пентахлорфеноксила, 1H-имидазол-1-ила, хлорфеноксила, дихлорфеноксила, трихлорфеноксила, тетрахлорфеноксила, N-(бензотриазол-ил)оксила, 2-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфонила, фенилоксадиазолсульфонила (-сульфон-ODA), 2-этил-5-фенилизоксазолий-ила, фенилоксадиазолила (ODA), оксадиазолила, ненасыщенного атома углерода (двойная или тройная связь между атомами углерод-углерод, углерод-азот, углерод-сера, углерод-фосфор, сера-азот, фосфор-азот, кислород-азот или углерод-кислород) или одной из следующих структур:

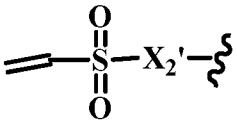
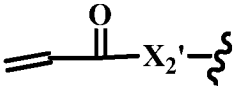
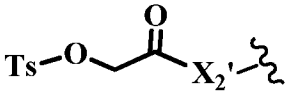
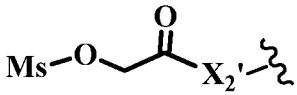
 дисульфид;  галогенацетил;  ацилгалогенид (галогенангидрид);

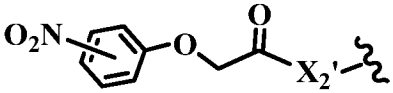
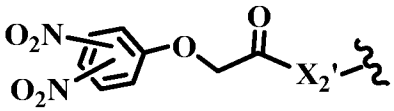
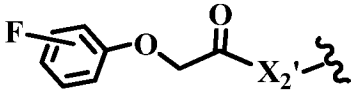

сложный эфир *N*-гидроксисукцинимида; 
малеимид;

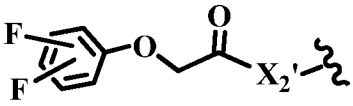
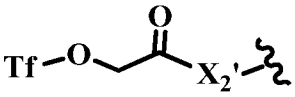
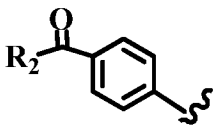
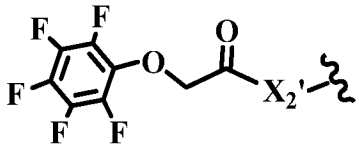
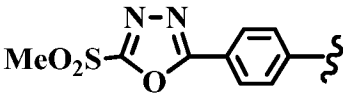


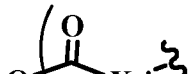
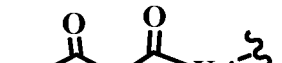
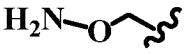
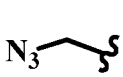

монозамещенный малеимид; 
дизамещенный малеимид;


монозамещенный сукцинимид; дизамещенный сукцинимид; -CHO альдегид;

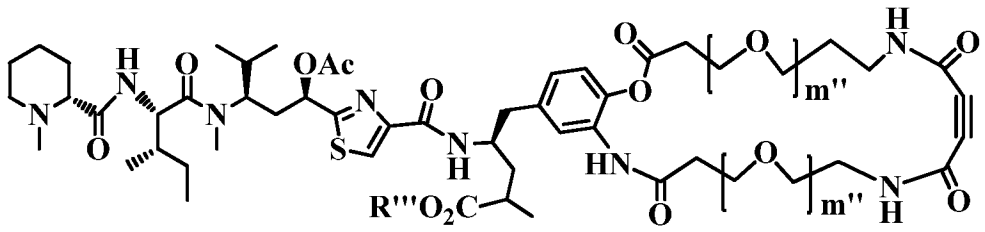

этенсульфонил; 
акрил (акрилоил); 
2-(тозилокси)ацетил; 
2-мезилокси)ацетил;


2-(нитрофенокси)ацетил; 
2-динитрофенокси)ацетил; 
2-(фторфенокси)ацетил;


2-(дифторфенокси)ацетил; 
2-(трифторметил)сульфонил)окси)ацетил; 
кетон или альдегид, 
2-(пентафторфенокси)ацетил; 
, метилсульфонфенилоксадиазол

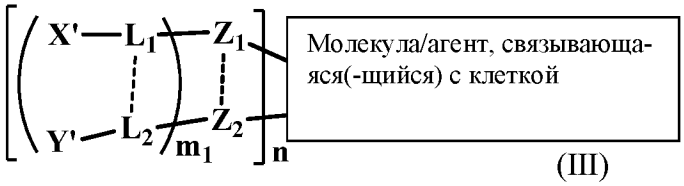
(ODA);  ,  ангидрид кислоты,  алкилокси-амино;  азидо,  алкинил или  гидразид, где X_1' представляет собой F, Cl, Br, I или Lv_3; X_2' представляет собой O, NH, N(R_1), или CH_2; R_3 независимо представляет собой H, ароматическую, гетероароматическую или ароматическую группу, где один или более атомов H независимо заменены на -R_1, -галоген, -OR_1, -SR_1, -NR_1R_2, - NO_2, -S(O)R_1,-S(O)$_2R_1$, или -$COOR_1$; Lv_3 представляет собой уходящую группу, выбранную из F, Cl, Br, I, нитрофенола; N-гидроксисукцинимида (NHS); фенола; динитрофенола; пентафторфенола; тетрафторфенола; дифторфенола; монофторфенола; пентахлорфенола; трифлата; имидазола; дихлорфенола; тетрахлорфенола; 1-гидроксибензотриазола; тозилата; мезилата; 2-этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфоната; R_1 и R_2 независимо выбраны из H, C_1-C_8алкила, C_2-C_8 алкенила, гетероалкила, алкилциклоалкила или гетероциклоалкила; C_3-C_8 арила, Ar-алкила, гетероциклила, карбоциклила, циклоалкила, гетероалкилциклоалкила, алкилкарбонила или гетероарила, или C_2-C_8 сложных эфиров, простого эфира или амида; или пептидов, содержащих 1-8 аминокислот; или полиэтиленоксигруппы, имеющей формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 0 до около 5000, или комбинации из вышеуказанных групп,

причем указанный коньюгат согласно Формуле (II) настоящего изобретения прямо исключает следующие структуры:



где m'' = 1-3; R''' = H, CH_3 или C_2H_5.

3. Конъюгат Формулы (I) по п. 1, полученный из реакционноспособного бис-линкера, конъюгированного с молекулой, связывающейся с клеткой, нижеуказанной Формулы (III), в котором две или более функциональных группы цитотоксической молекулы могут контактировать с ним одновременно или последовательно с образованием Формулы (I):



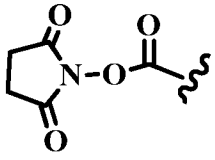
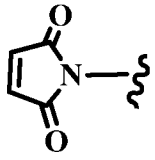
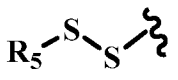
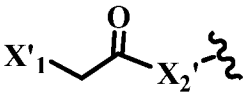
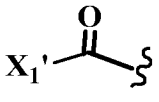
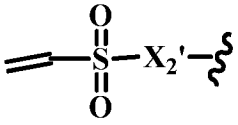
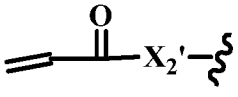
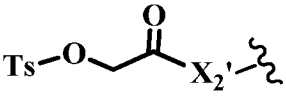
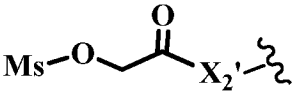
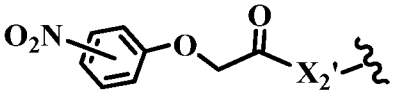
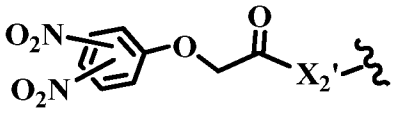
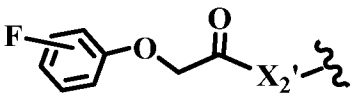
(III)

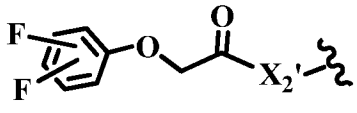
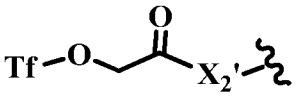
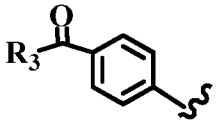
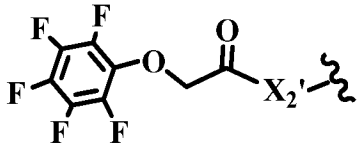
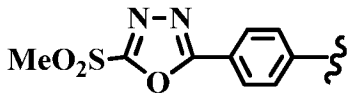
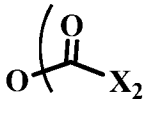
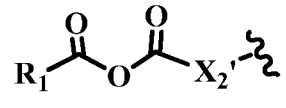
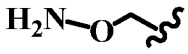
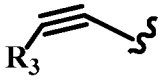
в которой:

m_1, n, «-----», агент/молекула, связывающийся с клеткой, L_1, L_2, Z_1и Z_2 являются такими, как определено в п. 1;

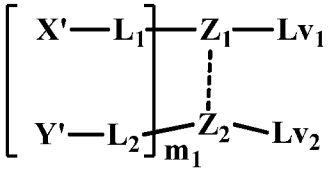
X 'и Y' представляют собой функциональную группу, которая может независимо или последовательно контактировать с группами остатков цитотоксического лекарственного средства с образованием X и Y соответственно, причем X и Y определены в Формуле (I);

X‘ и Y' независимо выбраны из дисульфидного заместителя, малеимидо, галогенацетила, алкоксиамина, азидо, кетона, альдегида, гидразина, амино, гидроксил, карбоксилата, имидазола, тиола или алкина; или сложного эфира N-гидроксисукцинимида, п-нитрофенилового сложного эфира, динитрофенилового сложного эфира, пентафторфенилового сложного эфира, пентахлорфенилового сложного эфира; тетрафторфенилового сложного эфира; дифторфенилового сложного эфира; монофторфенилового сложного эфира; или пентахлорфенилового сложного эфира, дихлорфенилового сложного эфира, тетрахлорфенилового сложного эфира или 1-гидроксибензотриазольного сложного эфира; трифлата, мезилата или тозилата; 2-этил-5-фенилизоксазолиум-3'-сульфоната; пиридилдисульфида или нитропиридилдисульфида; малеимида, галогенацетата, ацетилендикарбоксильной группы или галогената карбоновой кислоты (фторида, хлорида, бромида или йодида) или одной из следующих структур:


N-гидроксисукцинимидного сложного эфира;

малеиимида;

дисульфида;

галогенацетила;

ацилгалогенида (галогенангидрида);

этенсульфонила;

акрила (акрилоила);

2-(тозилокси)ацетила;

2-(мезилокси)ацетила;

2-(нитрофенокси)ацетила;

2-(динитрофенокси)ацетила;

2-(фторфенокси)ацетила;

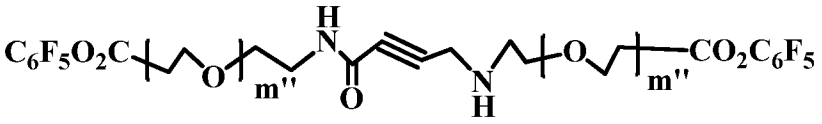
 2-(дифторфенокси)ацетила;  2-(((трифторметил)сульфонил)окси)ацетил;  кетона или альдегида,  2-(пентафторфенокси)ацетила;  , метилсульфонфенилоксадиазола (ODA);  ,  ангидрида кислоты,  алкилоксиамино; азидо,  алкинила или  гидразида, где X_1' представляет собой F, Cl, Br, I или Lv_3; X_2' представляет собой O, NH, N(R_1), или CH_2; R_3 и R_5 представляют собой H, R_1, ароматическую, гетероароматическую или ароматическую группу, где один или более атомов H независимо заменены на -R_1, -галоген, -OR_1, -SR_1, -NR_1R_2, - NO_2, -S(O)R_1, -$S(O)_2R_1$, или -$COOR_1$; Lv_3 представляет собой уходящую группу, выбранную из метансульфонила (мезила), толуолсульфонила (тозила), трифторметилсульфонила (трифлата), трифторметилсульфоната, нитрофеноксила; N-гидроксисукцинимидила (NHS); феноксила; динитрофеноксила; пентафторфеноксила, тетрафторфеноксила, трифторфеноксила, дифторфеноксила, монофторфеноксила, пентахлорфеноксила, 1H-имидазол-1-ила; хлорфеноксила, дихлорфеноксила, трихлорфеноксила, тетрахлорфеноксила, N-(бензотриазолил)оксила, 2-этил-5-фенилизоксазолий-ила, фенилоксадиазолила (ODA), оксадиазолила или молекулы интермедиата, полученной с помощью реагента конденсации для реакций Мицунобу, где R_1 и R_2 представляют собой как определено выше;

4. Конъюгат Формулы (I) по п. 1 получен из реакционноспособной молекулы бис-линкера нижеуказанной Формулы (IV), в котором цитотоксическая молекула или молекула, связывающаяся с клеткой, могут контактировать с ним одновременно или последовательно с образованием Формулы (I):

 (IV).

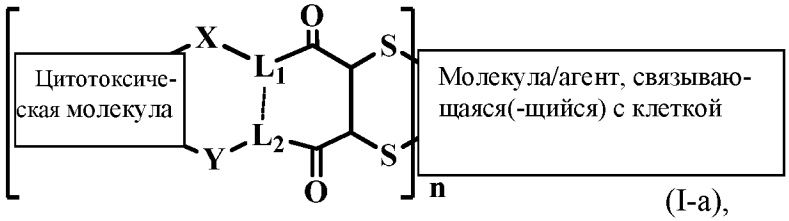
где «-----», m_1, L_1, L_2, Z_1 и Z_2 представляют собой как определено в п. 1; Lv_1 и Lv_2 представляют собой как определено в п.2, и X ’и Y’ представляют собой как определено в п.3;

причем указанный коньюгат согласно Формуле (IV) настоящего изобретению прямо исключает следующие структуры:

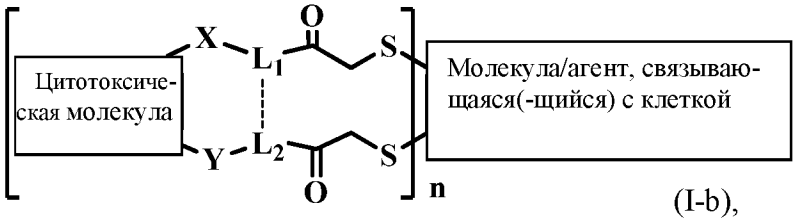


, где m’’ = 1-3.

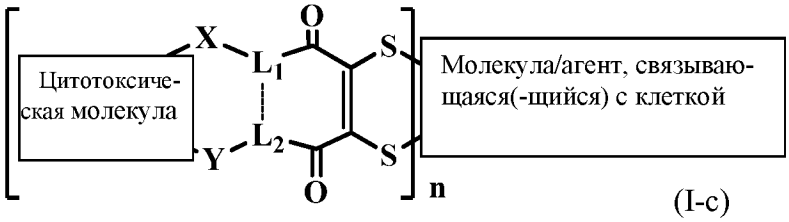
5. Конъюгат Формулы (I) по п. 1 имеющий структуру, представленную формулой (I-a), (I-b), (I-c), (I-d), (I-e), (I-f), (I-g), (I-h), (I-i), (I-j), (I-k), (I-m), (I-n), (I-o), (I-p), (I-q), (I-r), (I-s), (I-t), (I-u), (I-v) и (I-w) ниже:



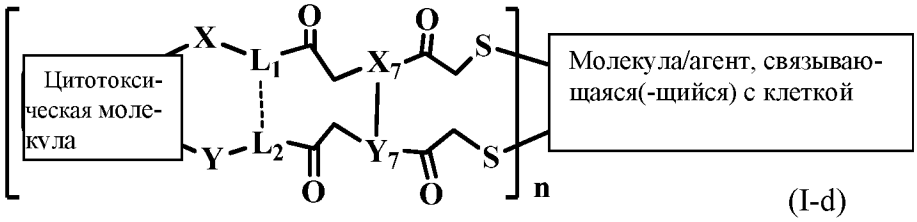
(I-a),



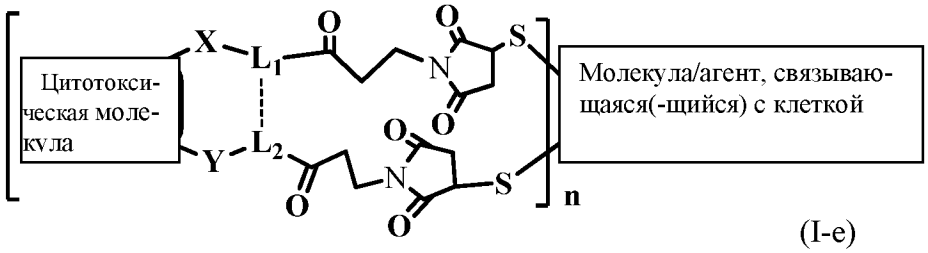
(I-b),



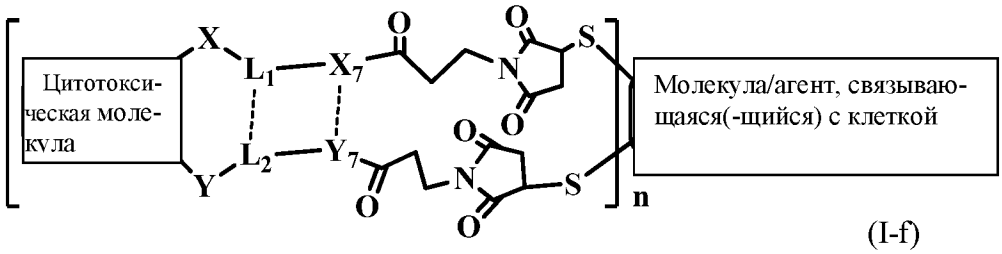
(I-c)



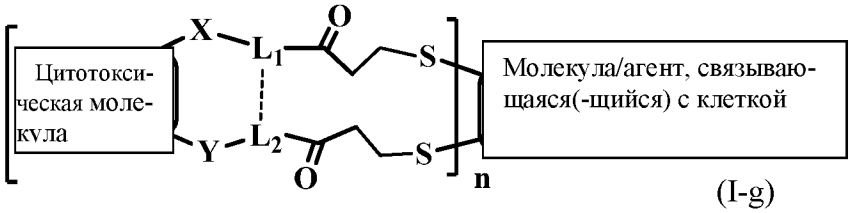
(I-d)



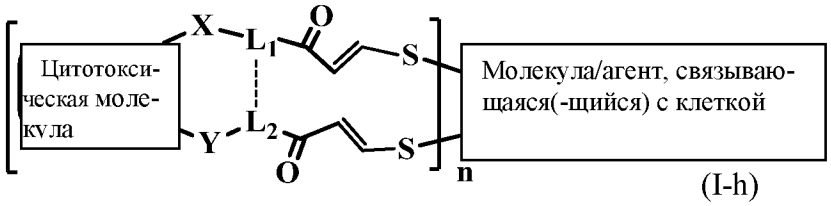
(I-e)



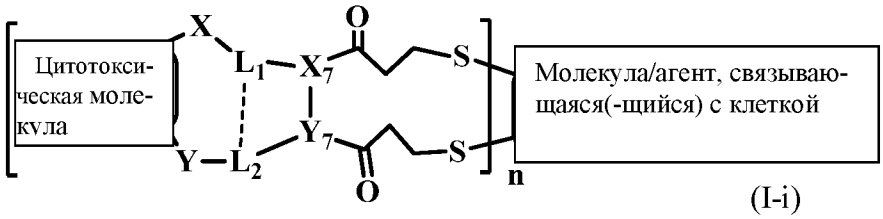
(I-f)



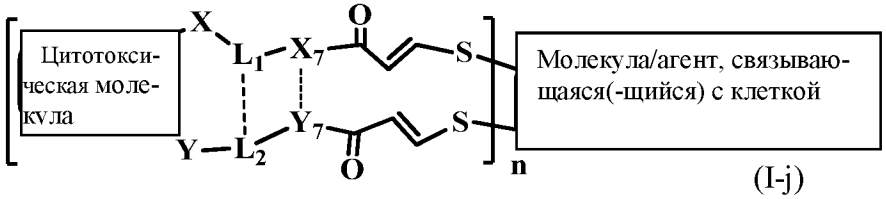
(I-g)



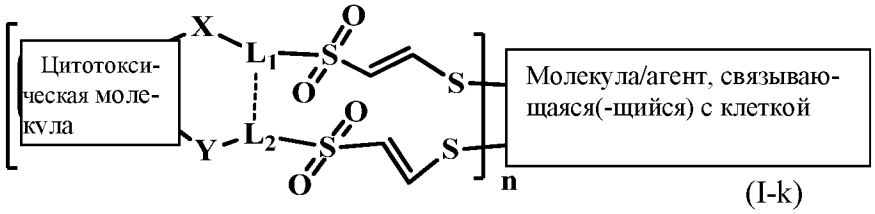
(I-h)



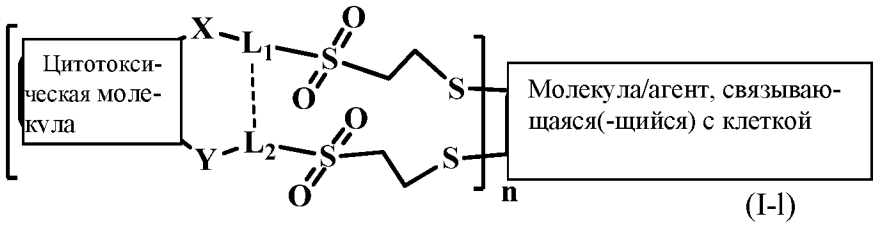
(I-i)



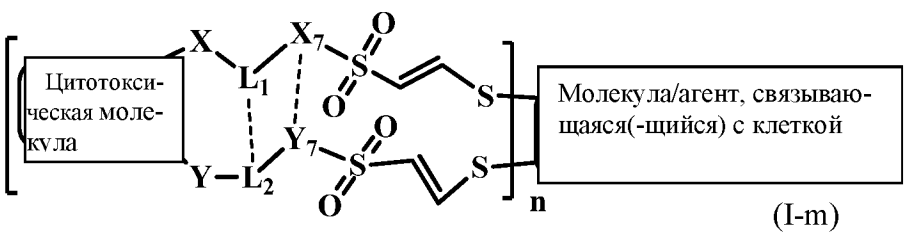
(I-j)



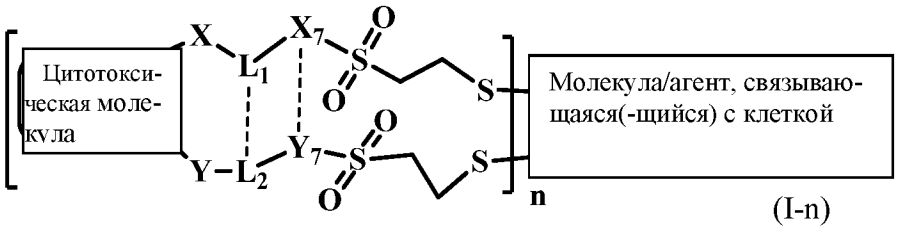
(I-k)



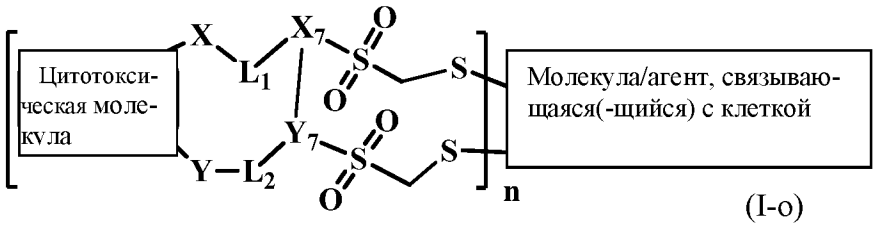
(I-l)



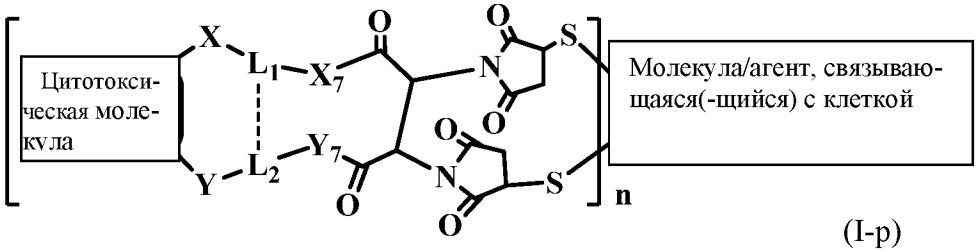
(I-m)



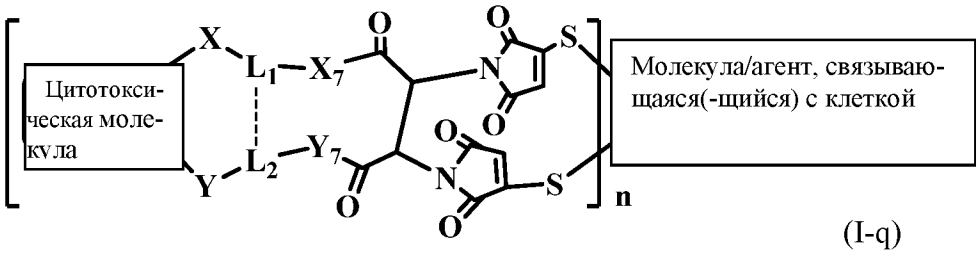
(I-n)



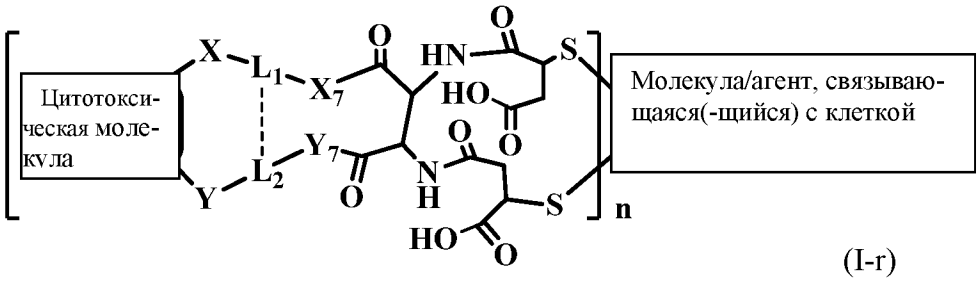
(I-o)



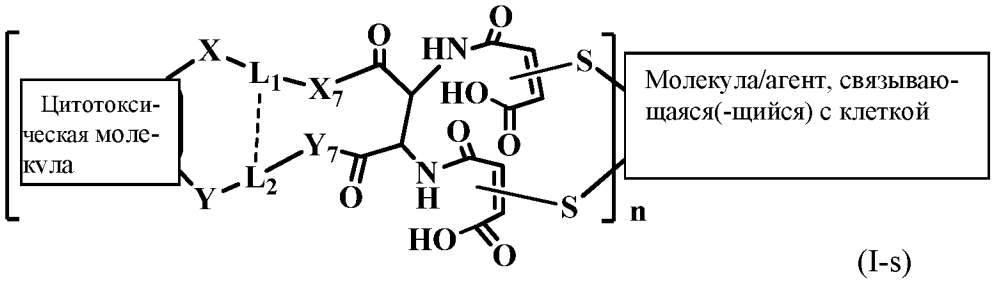
(I-p)



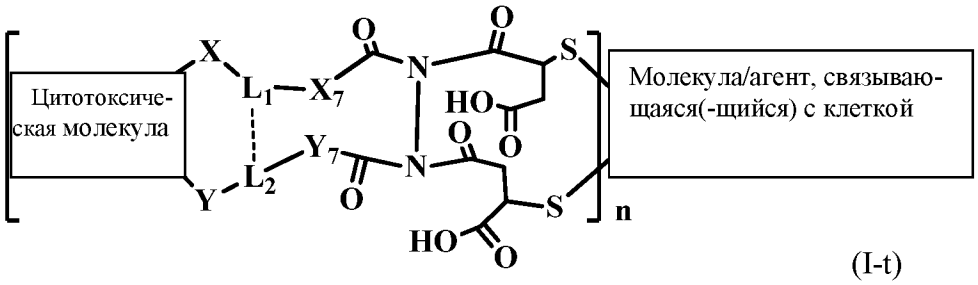
(I-q)



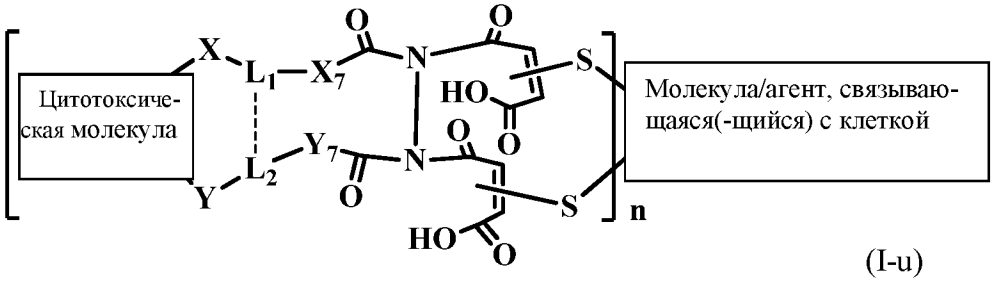
(I-r)



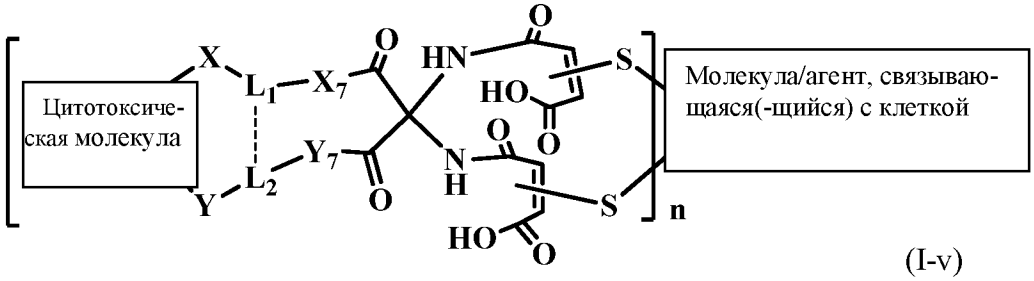
(I-s)



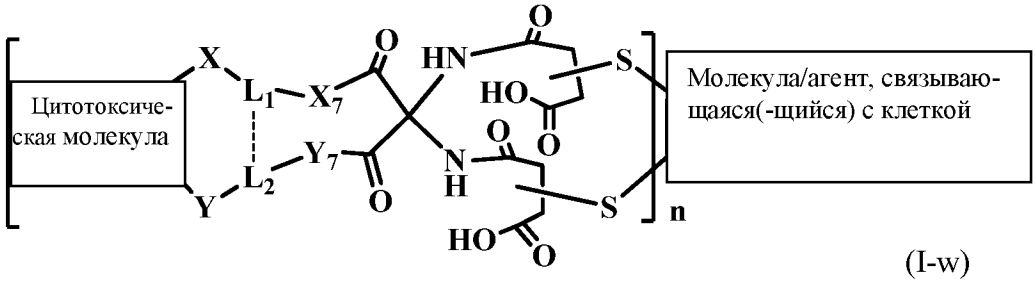
(I-t)



(I-u)



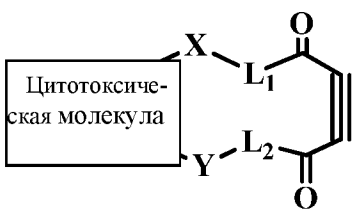
(I-v)



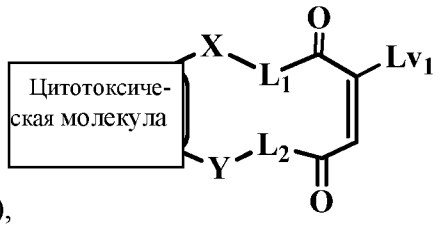
(I-w)

где X_7 и Y_7 независимо представляют собой CH, CH_2, NH, O, S, NHNH, $N(R_1)$ и N; химическая связь между двумя атомов означает, что она может соединять любые смежные атомы; «-----», X, Y, R_1, n, L_1 и L_2 представляют собой как описано в п. 1; цитотоксический агент представляет собой ту же самую цитотоксическую молекулу, описанную в п. 1.

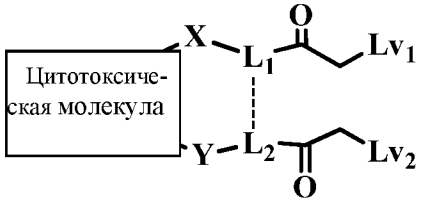
6. Соединение Формулы (II) по п. 2 имеющее структуру, представленную формулой (II-a), (II-b), (II-c), (II-d), (II-e), (II-f), (II-g), (II-h), (II-i), (II-j), (II-k), (II-m), (II-n), (II-o), (II-q), (II-r), (II-s), (II-t), (II-u), (II-v), (II-w), (II-x), (II-y), (II-z), (II-a1), (II-a2), (II-a3) и (II-a4):



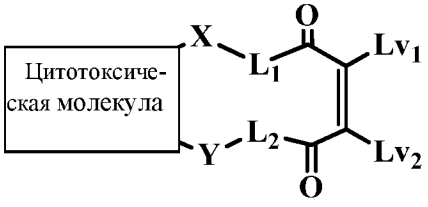
(II-a),



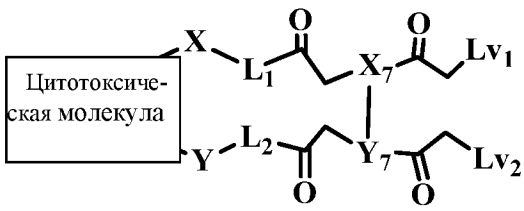
(II-b),



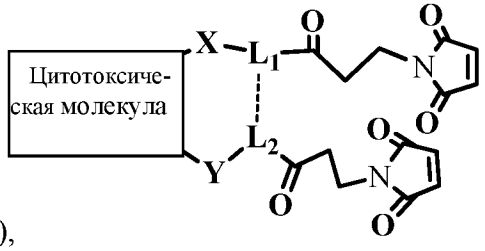
(II-c),



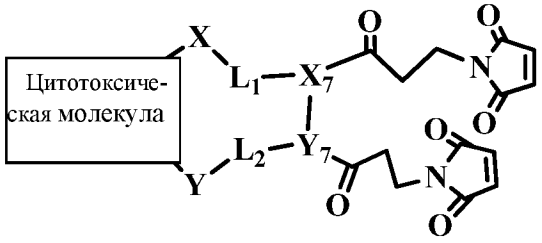
(II-d),



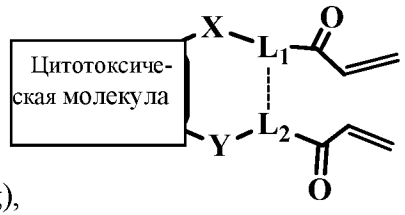
(II-e),



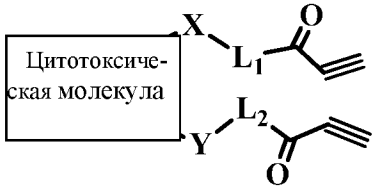
(II-f),



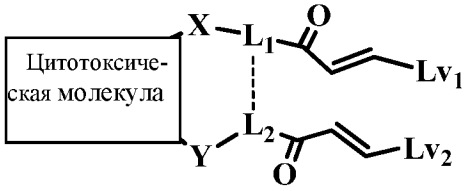
(II-g),



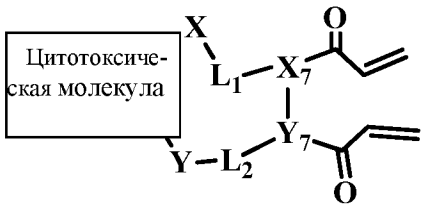
(II-h),



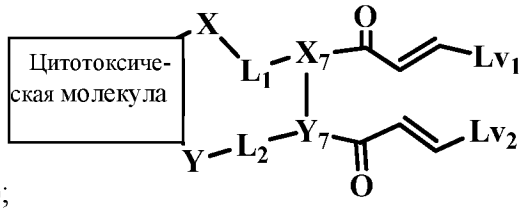
(II-i),



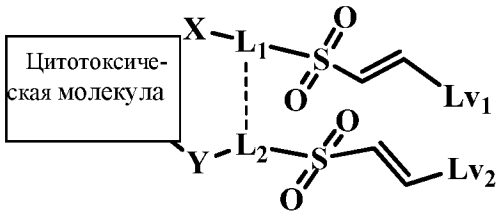
(II-j),



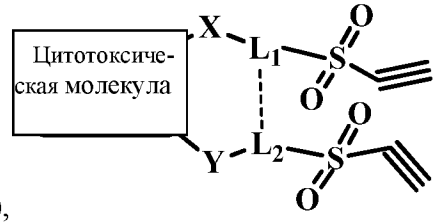
(II-k);



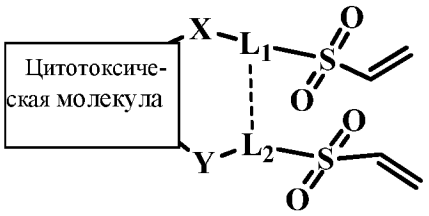
(II-l);



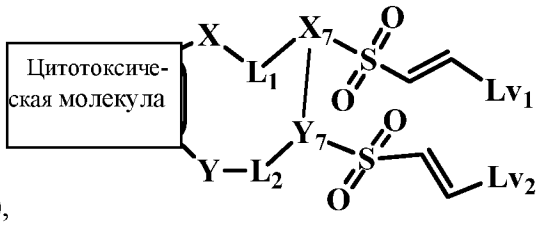
(II-m),



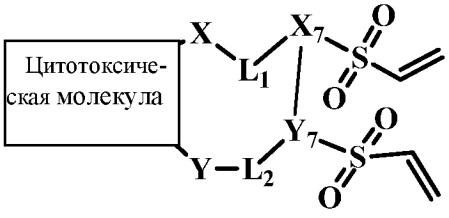
(II-o),



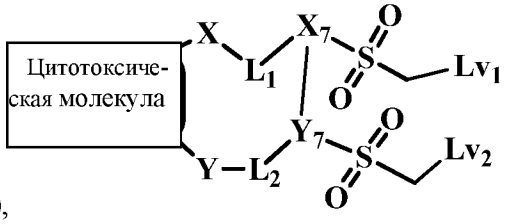
(II-p),



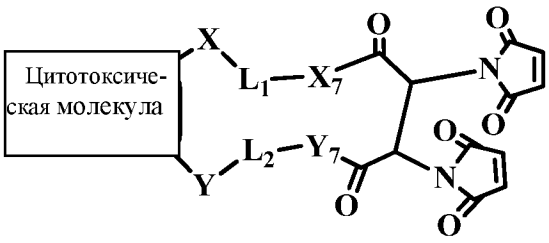
(II-q),



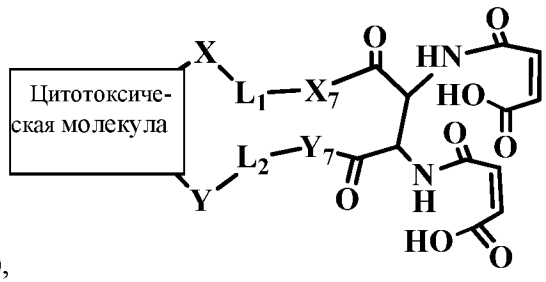
(II-r),



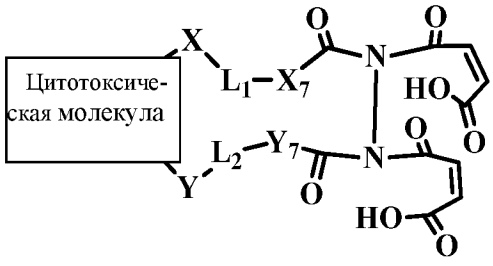
(II-s)



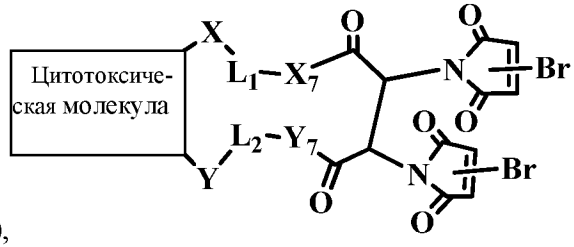
(II-t),



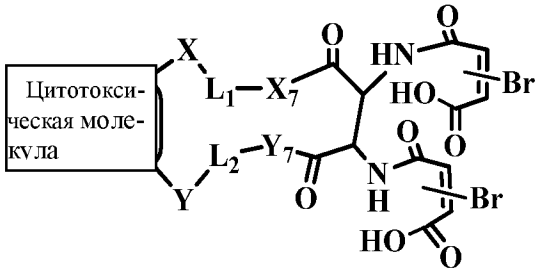
(II-u),



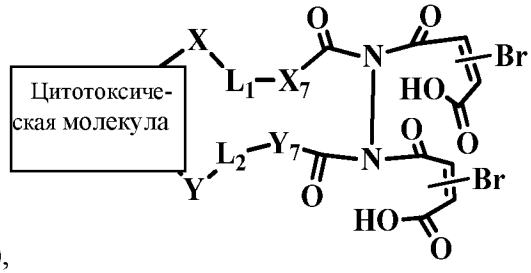
(II-v),



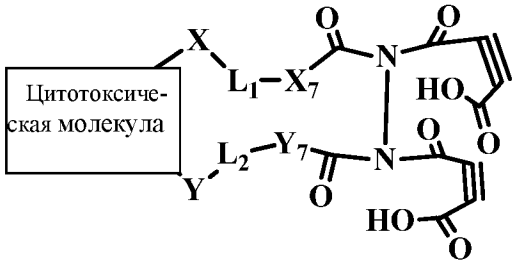
(II-w),



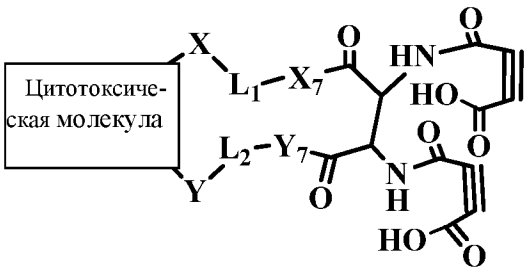
(II-x),



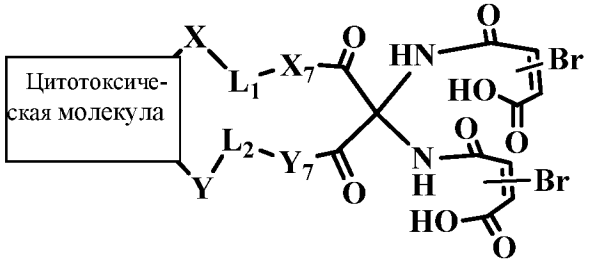
(II-y),



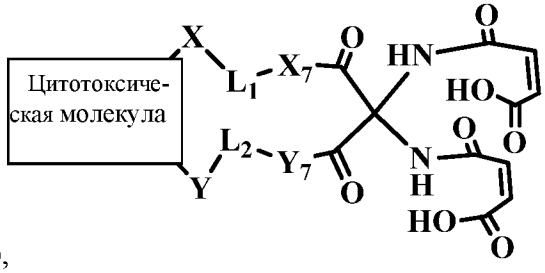
(II-z),



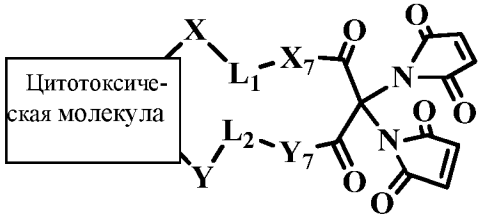
(II-a1),



(II-a2),



(II-a3),

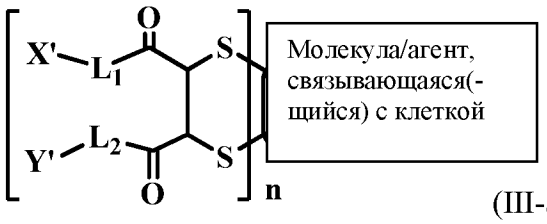


(II-a4),

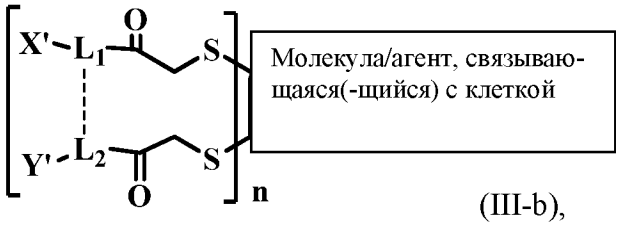
где X_7 и Y_7 независимо представляют собой CH, CH_2, NH, O, S, NHNH, $N(R_1)$ и N; химическая связь между двумя атомами означает, что она может связывать любой из

смежных двух атомов; «-----», цитотоксический агент, R_1, X, Y, n, L_1, L_2, Lv_1 и Lv_2 являются таким же, как описано в п. 1 и 2.

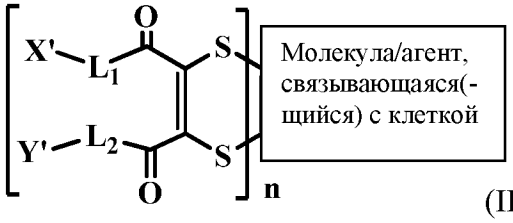
7. Соединение формулы (III) по п. 3, имеющее структуру, представленную формулой (III-a), (III-b), (III-c), (III-d), (III-e), (III-f), (III-g), (III-h), (III-i), (III-j), (III-k), (III-l), (III-m), (III-n), (III-o), (III-p), (III-r), (III-s), (III-t), (III-u), (III-v) и (III-w) ниже:



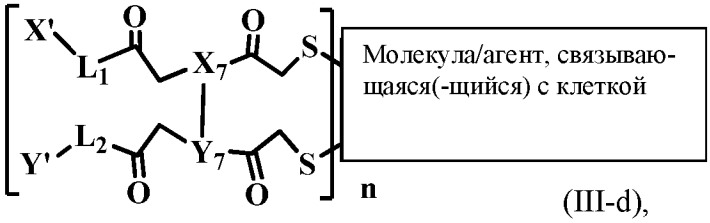
(III-a),



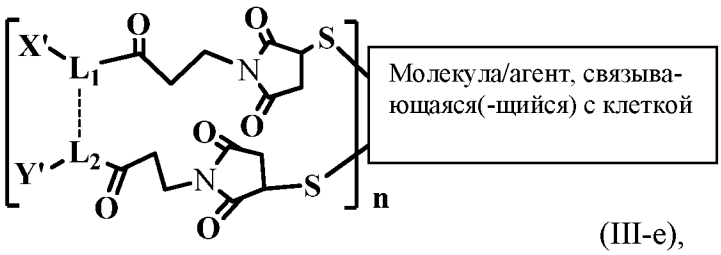
(III-b),



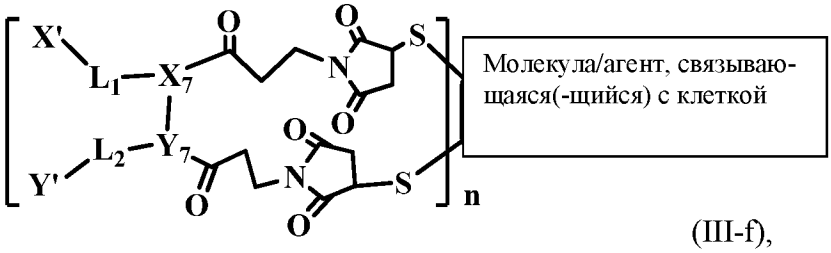
(III-c),



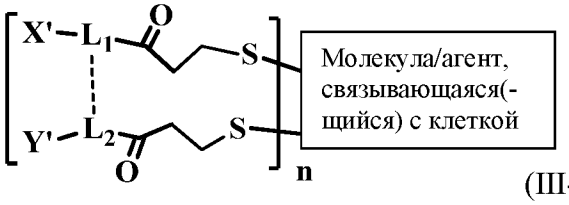
(III-d),



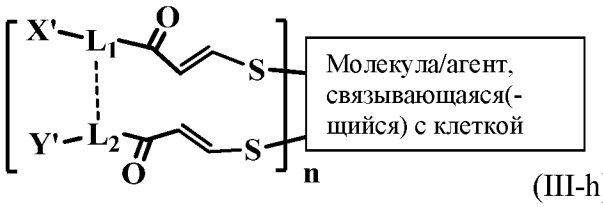
(III-e),



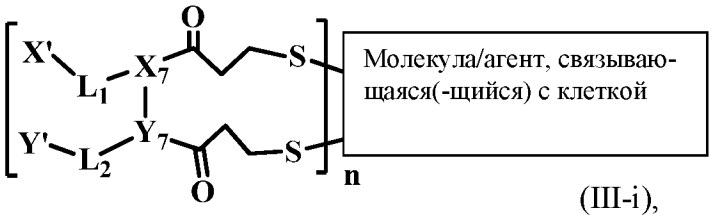
(III-f),



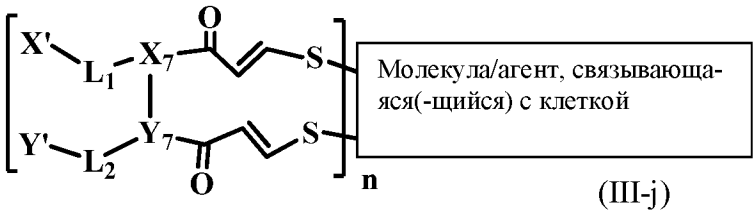
(III-g),



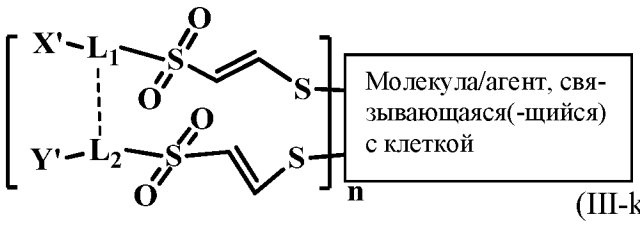
(III-h),



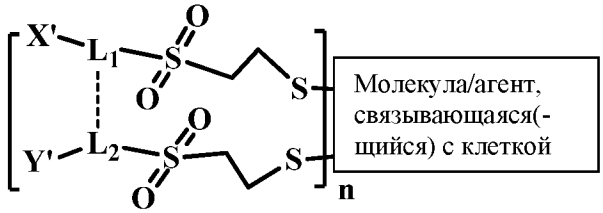
(III-i),

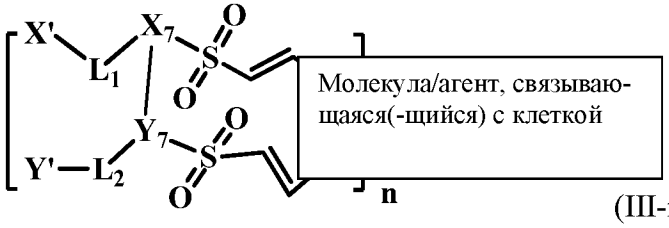


(III-j)

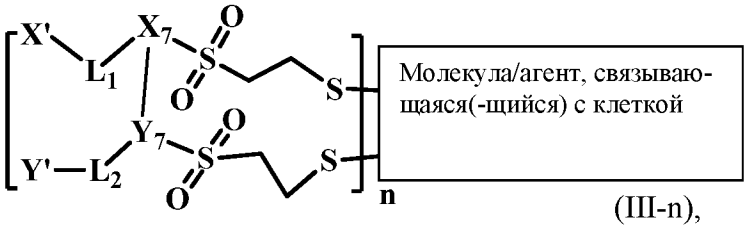


(III-k),

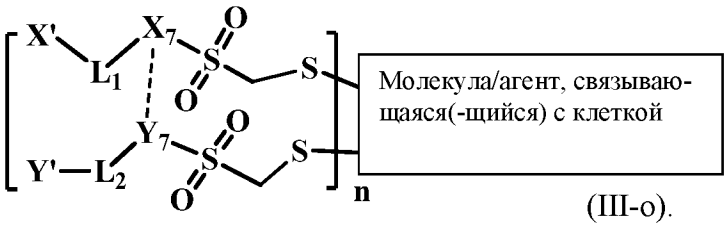




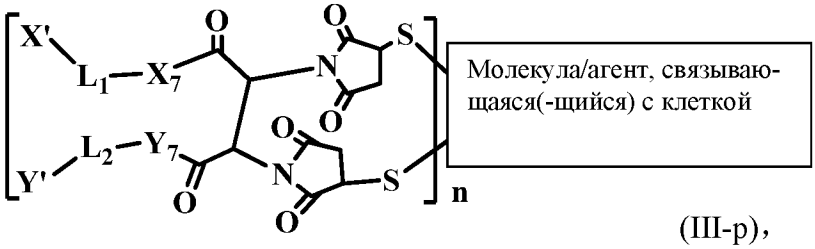
(III-l), (III-m),



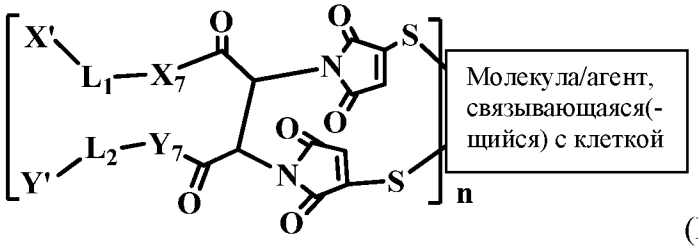
(III-n),



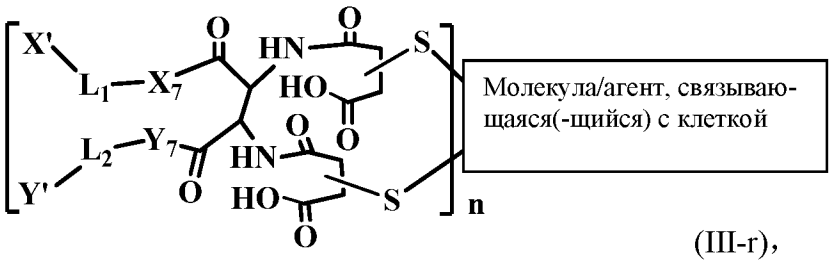
(III-o).



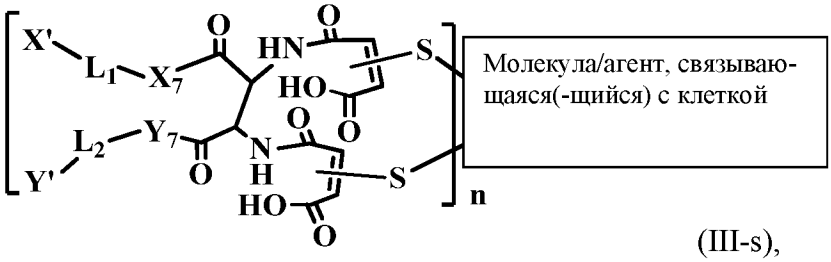
(III-p),



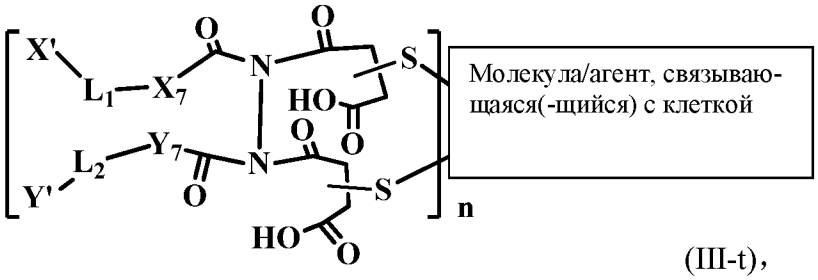
(III-q),



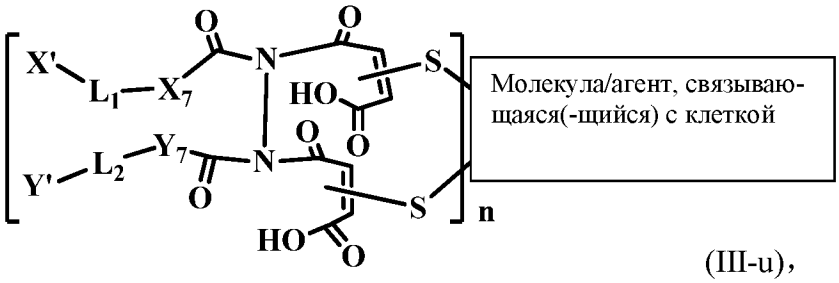
(III-r),



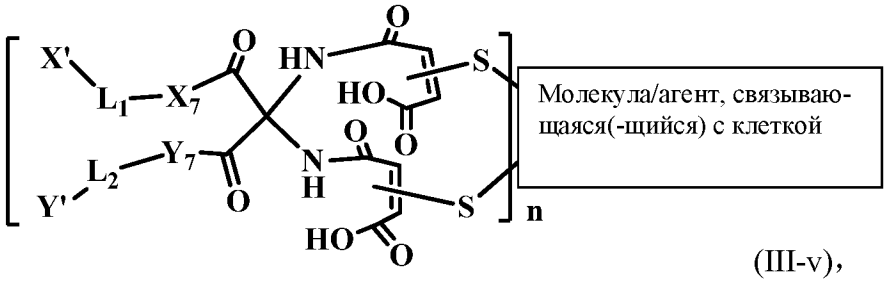
(III-s),



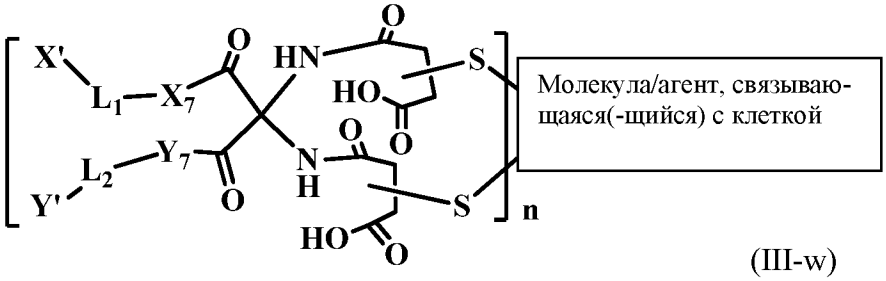
(III-t),



(III-u),



(III-v),

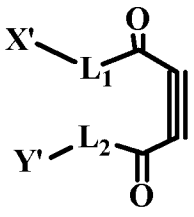
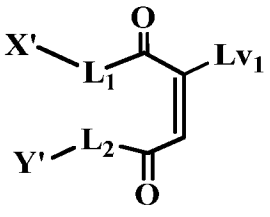
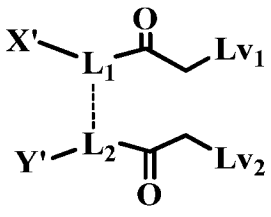


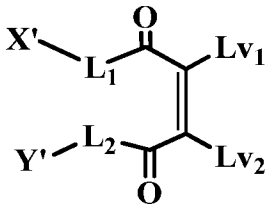
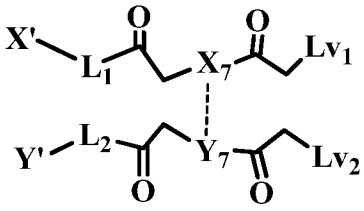
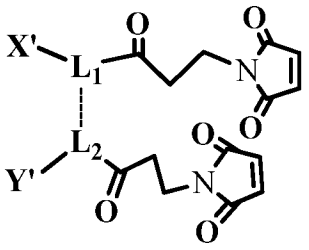
(III-w)

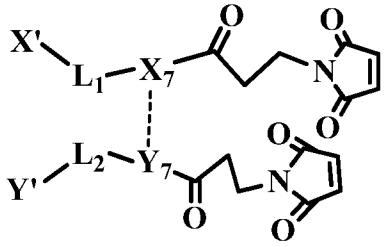
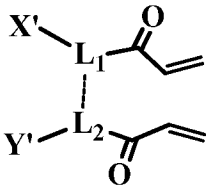
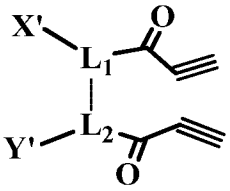
где X_7 и Y_7 независимо представляют собой CH, CH_2, NH, O, S, NHNH, $N(R_1)$ и N; химическая связь между двумя атомами означает, что она может связывать любой из смежных

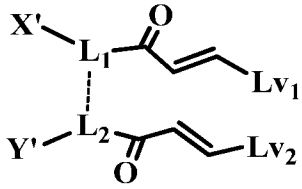
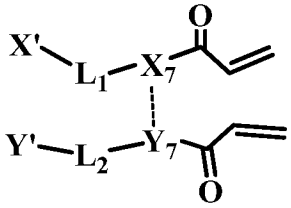
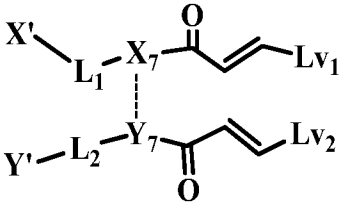
двух атомов; молекула, связывающаяся с клеткой, R_1, X', Y', n, L_1 и L_2 являются таким же, как описано в пп. 1 и 2.

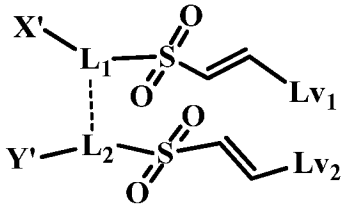
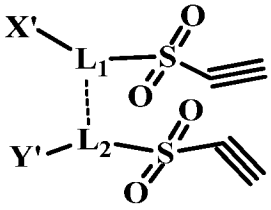
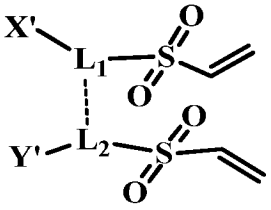
8. Соединение формулы (IV) по п. 4, имеющее структуру, представленную формулой (IV-a), (IV-b), (IV-c), (IV-d), (IV-e), (IV-f), (IV-g), (IV-h), (IV-i), (IV-j), (IV-k), (IV-m), (IV-n), (IV-o), (IV-p), (IV-q), (IV-r), (IV-s), (IV-t), (IV-u), (IV-v), (IV-w), (IV-x), (IV-y), (IV-z), (IV-a1), (IV-a2), (IV-a3) и (IV-a4) ниже:

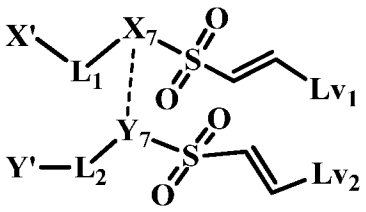
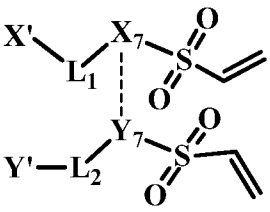
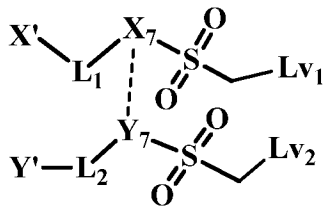

(IV-a),

(IV-b),

(IV-c),

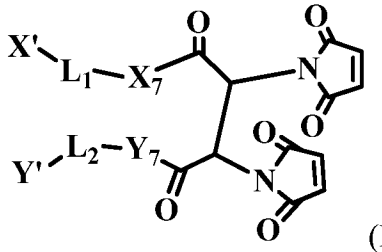

(IV-d),

(IV-e),

(IV-f),


(IV-g),

(IV-h),

(IV-i),

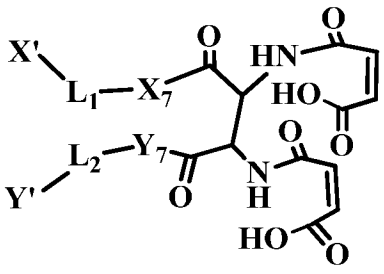

(IV-j),

(IV-k);

(IV-l);


(IV-m),

(IV-o),

(IV-p),


(IV-q),

(IV-r),

(IV-

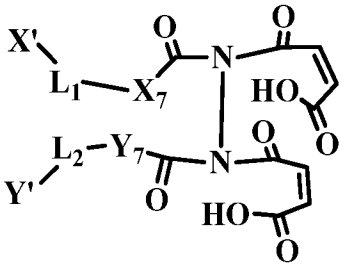


s),

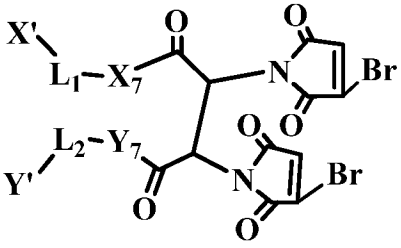


(IV-t),

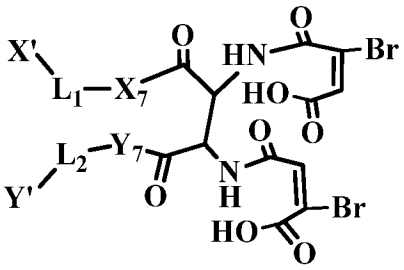
(IV-u),



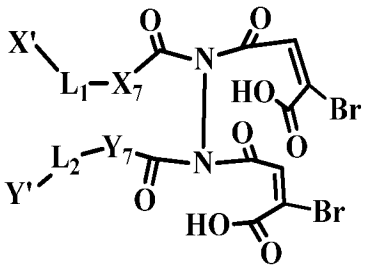
(IV-v),



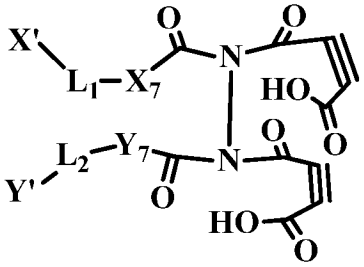
(IV-w),



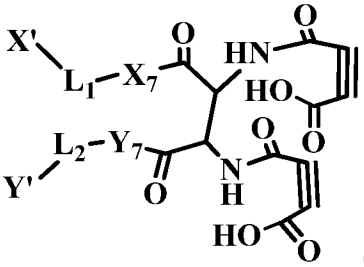
(IV-x),



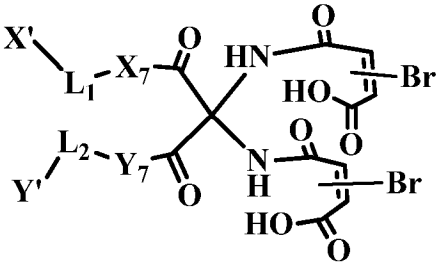
(IV-y),



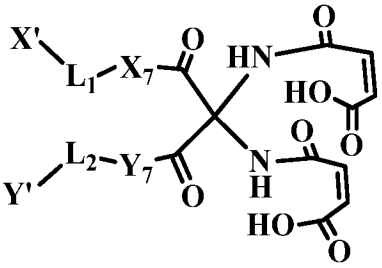
(IV-z),



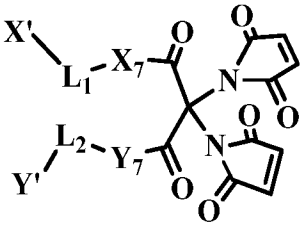
(IV-a1),



(IV-a2),



(IV-a3),



(IV-a4),

где X_7 и Y_7 независимо представляют собой CH, CH_2, NH, O, S, NHNH, $N(R_1)$ и N; химическая связь между двумя атомами означает, что она может связывать любой из

смежных двух атомов; «-----», R_1, X', Y', n, L_1 и L_2 являются таким же, как описано в пп. 1 и 2.

9. Конъюгат по п. 1, в котором пара тиолов из дисульфидных связей внутренней цепи агента, связывающегося с клеткой, восстановлена посредством восстанавливающего агента, выбранного из дитиотреитола (DTT), дитиоэритритола (DTE), дитиолбутиламина (DTBA), L- глютатиона (GSH), трис(2-карбоксиэтил)фосфина *(TCEP),* 2- меркаптоэтиламина (β-MEA), или/и бета меркаптоэтанола **(**β-ME, 2-ME**)**.

10. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула выбрана из:

(1). Химиотерапевтического средства выбранного из группы, состоящей из:

a). алкилирующих агентов, выбранных из группы, состоящей из азотистых ипритов: хлорамбуцила, хлорнафазина, циклофосфамида, дакарбазина, эстрамустина, ифосфамида, мехлоретамина, мехлорэтамин оксид гидрохлорида, манномустина, митобронитола, мельфалана, митолактола, пипобромана, новембихина, фенестерина, преднимустина, тиотепы, трофосфамида, урацильного иприта; CC-1065 и адозелезина, карзелезина, бизелезина или его синтетических аналогов; дуокармицина и его синтетических аналогов, димеров KW-2189, CBI-TMI и CBI; димеров бензодиазепина или димеров пирролобензодиазепина (PBD), димеров томаймицина, димеров индолинобензодиазепина, димеров имидазобензотиадиазепина или димеров оксазолидинобензодиазепина; нитрозомочевины: включая кармустин, ломустин, хлорозотоцин, фотемустин, нимустин, ранимустин; алкилсульфонатов: включая бусульфан, треосульфан, импросульфан и пипосульфан; триазенов или дакарбазинов; платиносодержащих соединений: включая карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин; азиридинов, бензодопы, карбоквона, метуредопы и уредопы; этилениминов и метиламеламинов, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилоломеламин];

b). Растительных алкалоидов: выбранных из группы, состоящей из алкалоидов барвинка: включая винкристин, винбластин, виндезин, винорелбин, навелбин; таксоидов: включая паклитаксел, доцетаксол и их аналоги, майтанзиноидов, включая DM1, DM2, DM3, DM4, DM5, DM6, DM7, майтанзина, ансамитоцинов и их аналогов, криптофицинов (включая группу состоящую из криптофицина 1 и криптофицина 8); эпотилона, элеутеробина, дискодермолида, бриостатинов, долостатинов, ауристатинов, тубулизинов, цефалостатинов; панкратистатина; саркодиктина; спонгистатина;

c). Ингибиторов ДНК-топоизомеразы: выбранных из группы эпиподофиллинов: включая 9-аминокамптотецин, камптотецин, криснатол, дауномицин, этопозид, этопозид фосфат, иринотекан, митоксантрон, новантрон, ретиноевые кислоты (или ретинолы), тенипозид, топотекан, 9-нитрокамптотецин или RFS 2000; и митомицины, и их аналоги;

d). Анти-метаболитов: выбранных из группы, состоящей из {[анти-фолатов: (ингибиторы DHFR: включая метотрексат, триметрексат, деноптерин, птероптерин, аминоптерин (4-аминоптероевая кислота) или других аналогов фолиевой кислоты); ингибиторов IMP-дегидрогеназы: (включая в себя микофеноловая кислота, тиазофурин, рибавирин, EICAR); ингибиторов рибонуклеотидредуктазы: (включая гидроксимочевину, дефероксамин)]; [аналогов пиримидина: аналогов урацила: (включая в себя анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, капецитабин (кселода), кармофур, цитарабин, дидезоксуридин, доксифлуридин, эноцитабин, 5-фторурацил, флоксуридин, ратитрексед (томудекс)); аналогов цитозина: (включая в себя цитарабин, цитозинарабинозид, флударабин); аналогов пурина: (включая в себя азатиоприн, флударабин, меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин)]; пополнителей запаса фолиевой кислоты, фролиновой кислоты};

e). Гормональной терапии: выбранной из группы, состоящей из {антагонистов рецепторов: [антиэстрогенов: (включая в себя мегестрол, ралоксифен, тамоксифен); агонистов LHRH: (включая в себя госкрклин, лейпролид ацетат); антиандрогенов: (включая в себя бикалутамид, флутамид, калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, гозерелин, лейпролид, мепитиостан, нилутамид, тестолактон, трилостан и другие ингибиторы андрогенов)]; ретиноидов/дельтоидов: [аналогов витамина D3: (включая в себя CB 1093, EB 1089 KH 1060, холекальциферол, эргокальциферол); фотодинамической терапии: (включая в себя вертепорфин, фталоцианин, фотосенсибилизатор Pc4, деметоксигипокреллин A); цитокинов: (включая в себя интерферон-альфа, интерферон-гамма, фактор некроза опухолей (TNF), белки человека, содержащие домен TNF)]};

f). ингибитора киназы, выбранного из группы состоящей из BIBW 2992 (анти-EGFR/Erb2), иматиниба, гефитиниба, пегаптаниба, сорафениба, дазатиниба, сунитиниба, эрлотиниба, нилотиниба, лапатиниба, акситиниба, пазопаниба, вандетаниба, E7080 (анти-VEGFR2), мумбритиниба, понатиниба (AP24534), бафетиниба (INNO-406), бозутиниба (SKI-606), кабозантиниба, висмодегиба, инипариба, руксолитиниба, CYT387, акситиниба, тивозаниба, сорафениба, бевацизумаба, цетуксимаба, трастузумаба, ранибизумаба, панитумумаба, испинесиба;

g). Ингибиторов поли(АДФ-рибозо)полимеразы (ПАРП), выбранных из группы состоящей из олапариба, нирапариба, инипариба, талазопариба, велипариба, велипариба, CEP 9722 (Цефалон), E7016 (Эизаи), BGB-290 (БеиГен), 3-аминобензамида.

h). Антибиотиков, выбранных из группы, состоящей из энедииновых антибиотиков (выбранных из группы, состоящей из калихеамицина, калихеамицина $\gamma 1$, $\delta 1$, $\alpha 1$ или $\beta 1$; динемицина, включая динемицин A и дезоксидинемицин; эсперамицина, кедарцидина, C-

1027, мадуропептина или неокарзиностатинового хромофора и родственных хромопротеиновых хромофоров энедииновых антиобиотиков), аклациномизинов, актиномицинов, аутрамицинов, азасеринов, блеомицинов, кактиномицинов, карабицинов, карминомицинов, карзинофилинов; хромомицинов, дактиномицинов, даунорубицинов, деторубицинов, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцина, доксорубицина, морфолино-доксорубицина, цианоморфолино-доксорубицина, 2-пирролинодоксорубицина и дезоксидоксорубицина, эпирубицина, эзорубицина, идарубицина, марцелломицина, нитомицинов, микофенолокислоты, ногаламицина, оливомицинов, пепломицина, потфиромицина, пуромицина, келамицина, родорубицина, стрептонигрина, стрептозоцина, туберцидина, убенимекса, зиностатина, зорубицина;

i). Поликетида (ацетогенина), булатацина и булатацинона; гемцитабина, эпоксомицинов и карфилзомиба, бортезомиба, талидомида, леналидомида, помалидомида, тозедостата, зибрестата, PLX4032, STA-9090, стимувакса, алловектин-7, ксегевы, провенжа, йервоя, ингибиторов изопренилирования и ловастатина, допаминергичных нейротоксинов и 1-метил-4-фенилпиридиниевого иона, ингибиторов клеточного цикла (выбранных из стауроспорина), актиномицинов (включая актиномицин D, дактиномицин), аманитинов, блеомицинов (включая блеомицин A2, блеомицин B2, пепломицин), антрациклинов (включая даунорубицин, доксорубицин (адриамицин), идарубицина, эпирубицина, пирарубицина, зорубицина, метоксантрона, ингибиторов MDR или верапамила, ингибиторов Ca^{2+}-АТФазы или тапсигаргинв, ингибиторов гистондеацетилазы (включая вориностат, ромидепсин, панобиностат, вальпруевую кислоту, моцетиностат (MGCD0103), белиностат, PCI-24781, энтиностат, SB939, ресминостат, гивиностат, AR-42, CUDC-101, сульфорафан, трихостатин A); тапсигаргина, целекоксиба, глитазонов, эпигаллокатехина галлат, дисульфирама, салиноспорамида A; антиадреналовых средств, выбранных из группы, состоящей из аминоглутетимида, митотана, трилостана; ацеглатона; альдофосфамидного гликозида; аминолевулиновой кислоты; амсакрина; арабинозида, бестрабуцила; бизантрена; эдатраксата; дефофамина; демеколцина; диазиквона; эфлорнитина (DFMO), эльфомитина; эллиптиния ацетата, этоглюцида; нитрата галлия; гацитозина, гидроксимочевины; ибандроната, лентинана; лонидамина; митогуазона; митоксантрона; мопидамола; нитракрина; пентостатина; фенамета; пирарубицина; подофиллиновой кислоты; 2-этилгидразида; прокарбазина; PSK®; разоксана; ризоксина; сизофирана; спирогермания; тенуазоновой кислоты; триазиквона; 2,2',2''-трихлортриэтиламина; трихотеценов (включая группу, состоящую из токсина T-2, веррукарина A, роридина A и ангуидина); уретана, миРНК, антисмысловых лекарственных средств;

(2). Агента против аутоиммуных заболеваний: циклоспорина, циклоспорина A, аминокапроновой кислоты, азатиоприна, бромокриптина, хлорамбуцила, хлорохина, циклофосфамида, кортикостероидов (включая группу, состоящую из амцинонида, бетаметазона, будезонида, гидрокортизона, флунизолида, флутиказона пропионата, флуокортолона даназола, дексаметазона, триамцинолона ацетонида, беклометазона дипропионата), DHEA, энанерцепта, гидроксихлорохина, инфликсимаба, мелоксикама, метотрексата, мофетила, микофенилата, преднизона, сиролимуса, такролимуса.

(3). Агентов против инфекционного заболевания, включающих:

a). Аминогликозиды: амикацин, астромицин, гентамицин (нетилмицин, сизомицин, изепамицин), гигромицин B, канамицин (амикацин, арбекацин, беканамицин, дибекацин, тобрамицин), неомицин (фрамицетин, паромомицин, рибостамицин), нетилмицин, спектиномицин, стрептомицин, тобрамицин, вердамицин;

b). Амфениколы: азидамфеникол, хлорамфеникол, флорфеникол, тиамфеникол;

c). Ансамицины: гелданамицин, гербимицин;

d). Карбапенемы: биапенем, дорипенем, эртапенем, имипенем/циластатин, меропенем, панипенем;

e). Цефемы: карбацефем (лоракарбеф), цефацетрил, цефаклор, цефрадин, цефадроксил, цефалониум, цефалоридин, цефалотин или цефалосин, цефалексин, цефалоглицин, цефамандол, цефапирин, цефатризин, цефазафлур, цефаседон, цефазолин, цефбуперазон, цефкапен, цефальдоксим, цефепим, цефминокс, цефокситин, цефпрозил, цефроксадин, цефтезол, цефуроксим, цефиксим, цефдинир, цефдиторен, цефепим, цефетамет, цефменоксим, цефодизим, цефоницид, цефоперазон, цефоранид, цефотаксим, цефотиам, цефозопран, цефалексин, цефпимизол, цефпирамид, цефпиром, цефподоксим, цефпрозил, цефхином, цефсулодин, цефтазидим, цефтерам, цефтибутен, цефтиолен, цефтизоксим, цефтобипрол, цефтриаксон, цефуроксим, цефузонам, цефамицин (цефокситин, цефотетан, цефметазол), оксацефем (фломоксеф, латамоксеф);

f). Гликопептиды: блеомицин, ванкомицин (оритаванцин, телаванцин), тейкопланин (далбаванцин), рамопланин;

g). Глицилциклины: тигециклин;

h). Ингибиторы β-лактамазы: пенам (сульбактам, тазобактам), клавам (клавулановая кислота);

i). Линкозамиды: клиндамицин, линкомицин;

j). Липопептиды: даптомицин, A54145, кальций-зависимые антибиотики (CDA);

k). Макролиды: азитромицин, цетромицин, кларитромицин, диритромицин, эритромицин, флуритромицин, джозамицин, кетолид (телитромицин, цетромицин), мидекамицин,

миокамицин, олеандомицин, рифамицин (рифампицин рифампин, рифабутин, рифапентин), рокитамицин, рокситромицин, спектиномицин, спирамицин, такролимус (FK506), тролеандомицин, телитромицин;

l). Монобактамы: азтреонам, тигемонам;

m). Оксазолидиноны: линезолид;

n). Пенициллины: амоксициллин, ампициллин, пивампицилин, гетациклин, бакампициллин, метампициллин, талампициллин, азидоциллин, азлоциллин, бензилпенициллин, бензатин бензилпенициллин, бензатин феноксиметил-пенициллин, клометоциллин, прокаин бензилпенициллин, карбенициллин (кариндациллин), клоксациллин, диклоксациллин, эпициллин, флуклоксациллин, мециллинам (пивмециллинам), мезлоциллин, метициллин, нафциллин, оксациллин, пенамециллин, пенициллин, фенетилциллин, феноксиметилпенициллин, пиперациллин, пропициллин, сульбенициллин, темоциллин, тикарциллин;

o). Полипептиды: бацитрацин, колистин, полимиксин B;

p). Хинолоны: алатрофлоксацин, балофлоксацин, ципрофлоксацин, клинафлоксацин, данофлоксацин, дифлоксацин, эноксацин, энрофлоксацин, флоксин, гареноксацин, гатифлоксацин, гемифлоксацин, грепафлоксацин, кано тровафлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, марбофлоксацин, моксифлоксацин, надифлоксацин, норфлоксацин, орбифлоксацин, офлоксацин, пефлоксацин, тровафлоксацин грепафлоксацин, ситафлоксацин, спарфлоксацин, темафлоксацин, тосуфлоксацин, тровафлоксацин;

q). Стрептограмины: пристинамицин, хинупристин/дальфопристин;

r). Сульфонамиды: мафенид, пронтозил, сульфацетамид, сульфаметизол, сульфанилимид, сульфасалазин, сульфизоксазол, триметоприм, триметоприм-сульфаметоксазол (котримоксазол);

s). Стероидные антибактериальные средства: выбранные из фузидовой кислоты;

t). Тетрациклины: доксициклин, хлортетрациклин, кломоциклин, демеклоциклин, лимециклин, меклоциклин, метациклин, миноциклин, окситетрациклин, пенимециклин, ролитетрациклин, тетрациклин, глицилциклины (включая тигециклин);

u). Другие типы антибиотиков: аннонацин, арсфенамин, ингибиторы бактопренола (бацитрацин), ингибиторы DADAL/AR (циклосерин), диктиостатин, дискодермолид, элейтеробин, эпотилон, этамбутол, этопозид, фаропенем, фузидиевая кислота, фуразолидон, изониазид, лаулималид, метронидазол, мупироцин, миколактон, ингибиторы синтеза NAM (фосфомицин), нитрофурантоин, паклитаксел, платенсимицин, пиразинамид, квинупристин/дальфопристин, рифампицин (рифампин), тазобактам тинидазол, уварицин;

(4). Противовирусных лекарственных средств, включающих:

a). Ингибиторы входа/слияния: аплавирок, маравирок, викривирок, *gp41* (энфувиртид), PRO 140, CD4 (ибализумаб);

b). Ингибиторы интегразы: ралтегравир, элвитегравир, глобоиднан А;

c). Ингибиторы созревания: бевиримат, вивекон;

d). Ингибиторы нейраминидазы**:** осельтамивир, занамивир, перамивир;

e). Нуклеозиды и нуклеотиды: абакавир, ацикловир, адефовир, амдоксовир, априцитабин, бривудин, цидофовир, клевудин, дексельвуцитабин, диданозин (ddI), элвуцитабин, эмтрицитабин (FTC), энтекавир, фамцикловир, фторурацил (5-FU), 3'-фтор-замещенные 2',3'-дидезоксинуклеозидные аналоги (включая группу состоящую из 3'-фтор-2',3'-дидезокситимидин (FLT) и 3'-фтор-2',3'-дидезоксигуанозин (FLG), фомивирсен, ганцикловир, идоксуридин, ламивудин (3TC), l-нуклеозиды (включая группу состоящую из *β*-l -тимидин и *β*-l -2'-дезоксицитидин), пенцикловир, рацивир, рибавирин, стампидин, ставудин (d4T), тарибавирин (вирамидин), телбивудин, тенофовир, трифлуридин валацикловир, валганцикловир, зальцитабин (ddC), зидовудин (AZT);

f). Ненуклеозиды: амантадин, атевиридин, каправирин, диарилпиримидины (этравирин, рилпивирин), делавирдин, докозанол, эмивирин, эфавиренц, фоскарнет (фосфономуравьина кислота), имиквимод, интерферон-альфа, ловирид, лоденозин, метизазон, невирапин, NOV-205, пэгинтерферон альфа подофиллотоксин, рифампицин, римантадин, ресиквимод (R-848), тромантадин;

g). Ингибиторы протеазы: ампренавир, атазанавир, боцепревир, дарунавир, фосампренавир, индинавир, лопинавир, нелфинавир, плеконарил, ритонавир, саквинавир, телапревир (VX-950), типранавир;

h). Другие типы антивирусных лекарственных средств: абзим, арбидол, каланолид А, церагенин, циановирин-н, диарилпиримидины, эпигаллокатехин галлат (EGCG), фоскарнет, гриффитсин, тарибавирин (вирамидин), гидроксимочевина, KP-1461, милтефозин, плеконарил, комбинированные гибридные ингибиторы рибавирин, селицилиб.

(5). Радиоизотопа, который может быть выбран из группы, состоящей из (радионуклидов) ^{3}H, ^{11}C, ^{14}C, ^{18}F, ^{32}P, ^{35}S, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{133}Xe, ^{177}Lu, ^{211}At или ^{213}Bi.

(6). Молекулы хромофора, которая обладает способностью поглощать ультрафиолетовый свет, флуоресцентный свет, инфракрасный свет, ближний инфракрасный свет, видимый свет; класс или подкласс ксантофоров, эритрофоров, иридофоров, лейкофоров, меланофоров, цианофоров, молекулы флуорофоров, которые представляют собой флуоресцентные химические соединения, переизлучающие свет после облучения, молекулы видимой фототрансдукции, фотофорные молекулы, люминесцентные молекулы; соединения

люциферина; небелковые органические флуорофоры, выбранные из: производных ксантена (включая флуоресцеин, родамин, орегоновый зеленый, эозин и техаский красный); производных цианина: (включая цианин, индокарбоцианин, оксакарбоцианин, тиакарбоцианин и мероцианин); производные скварина и замещенные в кольце сквараины, включая красители Seta, SeTau и Square; производных нафталина (включая производные дансила и продана); производных кумарина; производных оксадиазола (включая пиридилоксазол, нитробензоксадиазол и бензоксадиазол); производных антрацена (включая антрахиноны, включая DRAQ5, DRAQ7 и CyTRAK Orange); производных пирена (включая каскадный синий); производных оксазина (включая нильский красный, нильский синий, крезиловый фиолетовый, оксазин 170). Производных акридина (включая профлавин, акридиновый оранжевый, акридиновый желтый). Производных арилметина (включая аурамин, кристаллический фиолетовый, малахитовый зеленый). Производных тетрапиррола (включая порфин, фталоцианин, билирубин); любые аналоги и производные следующих флуорофорных соединений, включающих CF краситель, зонды DRAQ и CyTRAK, BODIPY, Alexa Fluor, DyLight Fluor, Atto и Tracy, FluoProbes, красители Abberior, красители DY и MegaStokes, красители Sulfo Cy, HiLyte Fluor, Seta, SeTau и Square Dyes, красители Quasar Cal Fluor, красители SureLight (APC, RPEPerCP, Phycobilisomes), APC, APCXL, RPE, BPE, аллофикоцианин (APC), аминокумарин, конъюгаты APC-Cy7, BODIPY-FL, Cascade Blue, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy3B, Cy5, Cy5.5, Cy7, флуоресцеин, FluorX, гидроксикумарин, лисамин родамин B, люциферин овый желтый, метоксикумарин, NBD, Pacific Blue, Pacific Orange, конъюгаты PE-Cy5, конъюгаты PE-Cy7, PerCP, R-фикоэритрин (PE), красный 613, Seta-555-азид, Seta-555-DBCO, Seta-555-NHS, Seta-580-NHS, Seta-680-NHS, Seta-780-NHS, Seta-APC-780, Seta-PerCP-680, Seta-R-PE-670, SeTau-380-NHS, SeTau-405-малеимид, SeTau-405-NHS, SeTau-425-NHS, SeTau-647-NHS, техаский красный, TRITC, TruRed, X-родамин, 7-AAD (7- аминоактиномицин D, CG- селективный), акридиновый оранжевый, хромомицин A3, CyTRAK оранжевый (красный свет возбуждения темный), DAPI, DRAQ5, DRAQ7, бромид этидия, Hoechst33258, Hoechst33342, LDS 751, митрамицин, пропидиум йодид (PI), SYTOX Blue, SYTOX Green, SYTOX Orange, тиазольный оранжевый, TO-PRO: цианиновый мономер, TOTO-1, TO-PRO-1, TOTO-3, TO-PRO-3, YOSeta-1, YOYO-1; флуорофорное соединение: включающее DCFH (дихородигидрофлуоресцеин, окисленная форма), DHR (дигидродамин 123, окисленная форма, свет катализирует окисление), Fluo-3 (AM сложный эфир pH > 6), Fluo-4 (AM сложный эфир pH 7.2), Indo-1 (AM сложный эфир, низкий/высокий уровень кальция (Ca2+)), SNARF(pH 6/9), аллофикоцианин (APC), AmCyan1 (тетрамер, Clontech), AsRed2 (тетрамер, Clontech), Azami Green (мономер), азурит, B-фикоэритрин (BPE), Cerulean, CyPet, DsRed мономер (Clontech),

DsRed2 ("RFP"), EBFP, EBFP2, ECFP, EGFP (слабый димер), Emerald (слабый димер), EYFP (слабый димер), GFP (мутация S65A), GFP (мутация S65C), GFP (мутация S65L), GFP (мутация S65T), GFP (мутация Y66F), GFP (мутация Y66H), GFP (мутация Y66W), GFPuv, HcRed1, J-Red, Katusha, Kusabira Orange (мономер, MBL), mCFP, mCherry, mCitrine, Midoriishi Cyan (димер, MBL), mKate (TagFP635, мономер), mKeima-Red (мономер), mKO, mOrange, mPlum, mRaspberry, mRFP1 (мономер), mStrawberry, mTFP1, mTurquoise2, P3 (комплекс фикобилизомы), Peridinin Chlorophyll (PerCP), R- фикоэритрин (RPE), T-Sapphire, TagCFP (димер), TagGFP (димер), TagRFP (димер), TagYFP (димер), tdTomato (тандемный димер), Topaz, TurboFP602 (димер), TurboFP635 (димер), TurboGFP (димер), TurboRFP (димер), TurboYFP (димер), Venus, GFP дикого типа, YPet, ZsGreen1 (тетрамер), ZsYellow1 (тетрамер) и их производные.

(7). Лигандов, связывающихся с клеткой, или агонистов рецепторов, которые могут быть выбраны из: Производных фолата; производных мочевино глутаминовой кислоты; соматостатина и его аналогов (выбранные из группы, состоящей из октреотида (сандостатин) и ланреотида (соматулин); ароматических сульфонамидов; пептидов, активирующих аденилатциклазу гипофиза (PACAP) (PAC1); вазоактивных кишечных пептидов (VIP/PACAP) (VPAC1, VPAC2); меланоцит-стимулирующего гормона (α-MSH); агонистов холецистокининовых (CCK) /гастриновых рецепторов; бомбезинов (выбранных из группы, состоящей из Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2)/ гастрин-высвобождающий пептид (GRP); Нейротензиновых рецепторных лигандов (NTR1, NTR2, NTR3); лигандов вещества P (NK1 рецептор); нейропептидов Y (Y1–Y6); хоминг пептидов включающих RGD (Arg-Gly-Asp), NGR (Asn-Gly-Arg), димерных и мультимерных циклических пептидов RGD (выбранных из cRGDfV), TAASGVRSMH и LTLRWVGLMS (рецептор хондроитинсульфата протеогликана NG2) и F3 пептидов; проникающих в клетки (CPPs); пептидных гормонов, выбранных из группы, состоящей из агонистов и антагонистов рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (LHRH) и агониста гонадотропин-рилизинг-гормона (GnRH), воздействующих на выработку фолликулостимулирующего гормона (FSH) и выработку лютеинизирующего гормона (LH), а также на выработку тестостерона, выбранных из группы, состоящей из бусерелина (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(OtBu)-Leu-Arg-Pro-NHEt), гонадорелина (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2), гозерелина (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(OtBu)-Leu-Arg-Pro-AzGly-NH_2), гистрелина (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-His(N-бензил)-Leu-Arg-Pro-NHEt), лейпролида (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt), нафарелина (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-2Nal-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2), трипторелина (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2), нафарелина, деслорелина, абареликса (Ac-D-2Nal-D-4- хлор Phe-D-3-(3- пиридил)Ala-Ser-(N-Me)Tyr-D-

Asn-Leu-изопропилLys-Pro-DAla-NH_2), цетрореликса (Ac-D-2Nal-D-4-хлорPhe-D-3-(3- пиридил)Ala-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH_2), дегареликса (Ac-D-2Nal-D-4-хлорPhe-D-3-(3- пиридил)Ala-Ser-4-аминоPhe(L- гидрооротил)-D-4-аминоPhe(карбамоил l)-Leu-изопропилLys-Pro-D-Ala-NH2) ганиреликса (Ac-D-2Nal-D-4-хлорPhe-D-3-(3- пиридил Ala-Ser-Tyr-D-(N9, N10- диэтил)-гомоArg-Leu-(N9, N10- диэтил)-гомоArg-Pro-D-Ala-NH_2); рецепторов распознавания патернов (PRRs), выбранных из группы, состоящей из Toll-подобных рецепторов (TLRs), лектинов С-типа и Nodlike-рецепторов (NLRs); агонистов рецепторов кальцитонина; рецепторов интегрина и подтипов его рецепторов (выбранных из группы, состоящей из агонистов $\alpha_V\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_{IIb}\beta_3$) (выбранных из группы, состоящей из GRGDSPK, цикло(RGDfV) (L1) и его производных [цикло(-N(Me)R-GDfV), цикло(R-Sar-DfV), цикло(RG-N(Me)D-fV), цикло(RGD-N(Me)f-V), цикло(RGDf-N(Me)V-)(силенгитид)]; нанотела (производного VHH (Ig верблюдовых)); доменных антител (dAb, производное домена VH или VL); биспецифического рекрутера Т-клеток (BiTE, биспецифическое диателo); переориентирующегося антитела с двойной аффинностью (DART, биспецифическое диателo); четырехвалентных тандемных антител (TandAb, димеризованное биспецифичное диателo); антикалин (производного липокалинов); аднектинов (10th FN3 (фибронектин)); разработанных белков с анкириновым повтором (DARPins); авимеров; рецепторов EGF и агонистов рецептора VEGF.

(8). Фармацевтически приемлемых солей, кислот, производных, гидратной или гидратированной соли; или кристаллической структуры; или оптического изомера, рацемата, диастереомера или энантиомера любого из вышеуказанных лекарственных средств.

11. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой молекулу хромофора, причем конъюгат используется для обнаружения, мониторинга или изучений взаимодействий и/или функций молекулы, связывающейся с клеткой, и/или взаимодействий конъюгата с клеткой-мишенью.

12. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой полиалкиленгликоли [включая поли(этиленгликоли) (ПЭГ), поли(пропиленгликоль), сополимер этиленоксида и пропиленоксида, или их аналоги], причем конъюгат используется для увеличения периода полувыведения молекулы, связывающейся с клеткой, при введении млекопитающему.

13. Конъюгат по п. **1**, в котором цитотоксическая молекула представляет собой лиганд, связывающийся с клеткой, агонист клеточного рецептора или молекулу, связывающуюся с клеточным рецептором, причем конъюгат используется в качестве нацеливающего проводника/ориентанта для доставки конъюгата в злокачественные клетки или для модуляции или костимуляции желаемого иммунного ответа или изменения сигнальных путей.

14. Конъюгат по любому из пп. 1 или 2, в котором цитотоксическая молекула выбрана из группы, состоящей из тубулизинов, калихеамицинов, ауристатинов, майтанзиноидов, аналогов CC-1065, даунорубицинов и доксорубицинов, таксаноидов (таксанов), криптофицинов, эпотилонов, димеров бензодиазепинов (включая димеры пиролобензодиазепина (PBD), димеры томаямицина, димеры антрамицина, димеры индолинобензодиазепина, димеры имидазолобензотиазепина или димеры оксазолидинобензодиазепина и их аналоги), калихеамицинов и энедииновых антибиотиков, актиномицина, аматоксинов, аманитинов, азасериново, блеомицинов, эпирубицина, эрибулина, тамоксифена, идарубицина, доластатинов/ауристатинов (включая монометилауристатин E, MMAE , MMAF, ауристатин PYE, ауристатин TP, ауристатины 2-AQ, 6-AQ, EB (AEB), EFP (AEFP) и их аналоги), дуокармицинов, гелданамицинов, метотрексатов, тиотепы, виндезинов, винкристинов, гемиастерлинов, назумамидов, микрогининов, радиозуминов, альтеробактинов, микросклеродерминов, теонелламидов, эсперамицинов, миРНК, микроРНК, пиРНК, нуклеолитических ферментов и/или их фармацевтически приемлемых солей, кислот или/и их аналогов, производных, гидрата или гидратированной соли; или кристаллической структуры; или оптического изомера, рацемата, диастереомера или энантиомера любого из вышеуказанных лекарственных средств.

15. Конъюгат по п. 1 или 3, в котором агент, связывающийся с клеткой/молекулой, выбраны из группы, состоящей из антитела, белка, проантитела, нанотела, витамина (включая фолат), пептидов, полимерных мицел, липосом, носителя на основе липопротеина, носителя на основе наночастиц, дендримера и молекулы или частицы вышеуказанного покрытия с лигандами, связывающимися с клеткой, или комбинации вышеуказанного.

16. Конъюгат по любому из пп. **1** или **3,** или **15,** в котором агент/молекула, связывающийся с клеткой, выбран из антитела, антитело-подобного белка, полноразмерного антитела (поликлонального антитела, моноклонального антитела, димеров антител, мультимеров антител) или мультиспецифичного антитела (выбранного из биспецифичного антитела, триспецифичного антитела или тетраспецифичного антитела); одноцепочечного антитела; фрагмента антитела, который связывается с клеткой-мишенью, моноклонального антитела; одноцепочечного моноклонального антитела или фрагмента моноклонального антитела, который связывается с клеткой-мишенью, химерного антитела; фрагмента химерного антитела, который связывается с клеткой-мишенью, домена антитела; фрагмент домена антитела, который связывается с клеткой-мишенью, антитела с измененной поверхностью, одноцепочечного антитела с измененной поверхностью или фрагмента антитела с измененной поверхностью, который связывается с клеткой-мишенью, гуманизиро-

ванного антитела или антитела с измененной поверхностью, гуманизированного одноцепочечного антитела или фрагмента гуманизированного антитела, который связывается с клеткой-мишенью, антиидиотипических (анти-Id) антител, CDR, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, проантитела, фрагмента проантитела, малых иммунных белков (SIP), лимфокина; гормона; витамина; фактора роста; колониестимулирующего фактора; или молекулы, переносящей питательные вещества в клетку, белка с большой молекулярной массой, наночастиц или полимеров, модифицированных антителами, или белками с большой молекулярной массой.

17. Конъюгаты по любому из пп. **1, 3, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15** или **16,** в которых агент/молекула, связывающийся с клеткой, способны связываться с опухолевыми клетками, инфицированными вирусом клетками, инфицированные микроорганизмами клетками, инфицированные паразитом клетками, аутоиммунными клетками, активированными клетками, миелоидными клетками, активированными Т-клетками, В-клетками или меланоцитами, или любыми клетками, экспрессирующими любой из следующих антигенов или рецепторов: : CD2, CD2R, CD3, CD3gd, CD3e, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD12, CD12w, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD15u, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RO, CD46, CD47, CD47R, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55,CD56, CD57, CD58, CD59, CD60, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD74, CD75, CD75s, CD76, CD77, CD78, CD79, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CDw84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD99R, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CDw113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CDw119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CDw121b, CD122, CD123, CDw123, CD124, CD125, CDw125, CD126, CD127, CD128, CDw128, CD129, CD130, CD131, CDw131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CDw136, CD137, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CD145, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CDw156c, CD157, CD158a, CD158b, CD159a, CD159b, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD162R, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173,

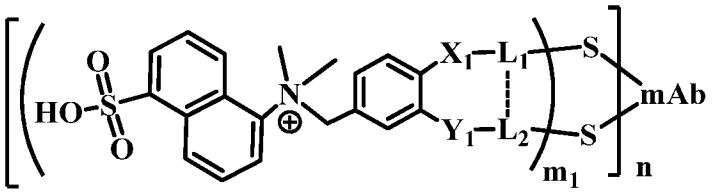
CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CDw186, CD187, CD188, CD189, CD190, Cd191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CD198, CDw198, CD199, CDw199, CD200, CD200a, CD200b, CD201, CD202, CD202b, CD203, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210, CDw210, CD212, CD213a1, CD213a2, CDw217, CDw218a, CDw218b, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235ab, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240, CD240CE, CD240D, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD252, CD253, CD254, CD256, CD257, CD258, CD261, CD262, CD263, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD271, CD273, CD274, CD275, CD276 (B7-H3), CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD289, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300a, CD300c, CD300e, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD324, CDw325, CD326, CDw327, CDw328, CDw329, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CDw338, CD339, 4-1BB, 5AC,5T4 ((гликопротеин трофобласта, TPBG, Wnt-активируемый ингибиторный фактор 1 или WAIF1), антиген аденокарциномы, AGS-5, AGS-22M6, киназа 1, подобная рецептору активина, AFP, AKAP-4, ALK, альфа-интергрин, альфа- v бета6, аминопептидазу N, амилоид бета, рецептор андрогена, ангиопоэтин 2, ангиопоэтин 3, аннексин A1, токсин-защитный антиген сибирской язвы, рецептор анти-трансферрина, AOC3 (VAP-1), B7-H3, возбудитель сибирской язвы (Bacillus anthracis anthrax), BAFF (фактор активации B-клеток) , BCMA, клетку B-лимфомы, bcr-abl, бомбезин, BORIS, C5, антиген C242, CA125 (углеводный антиген 125, MUC16), CA-IX (или CAIX, карбоангидраза 9), CALLA, CanAg, Canis lupus familiaris IL31, карбоангидраза IX, сердечный миозин, CCL11 (CC-мотив, хемокина 11), CCR4 (рецептор C-C хемокина типа 4), CCR5, CD3E (эпсилон), CEA (карциноэмбриональный антиген), CEACAM3, CEACAM5 (карциноэмбриональный антиген), CFD (фактор D), Ch4D5, холецистокинин 2 (CCK2R), CLDN18 (клаудин-18), агглютинирующий фактор A, CRIPTO, FCSF1R (рецептор колониестимулирующего фактора 1), CSF2 (колониестимулирующий фактор 2, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF)), CSP4,CTLA4 (цитотоксический белок 4, ассоциированный с T-лимфоцитами), опухолевый антиген CTAA16.88, CXCR4, C-X-C хемокиновый рецептор типа 4, циклическую АДФ-рибоза гидролазу, циклин B1, CYP1B1, цитомегаловирус, цитомегаловирусный гликопротеин B, дабигатран, DLL3 (дельта-подобный лиганд 3), DLL4 (дельта-подобный лиганд 4), DPP4 (дипептидил-пептидаза 4) DR5 (рецептор смерти 5), токсин типа 1 кишечной палочки E.coli , токсин типа 2 кишечной палочки E.coli , ED-

B, EGFL7 (EGF-подобный белок, содержащий домен 7), EGFR, EGFRII, EGFRvIII, эндоглин, рецептор эндотелина B, эндотоксин, EpCAM (молекула адгезии эпителиальных клеток), EphA2, эпизиалин, ERBB2 (рецептор эпидермального фактора роста 2), ERBB3, ERG (ген слияния TMPRSS2 ETS), Escherichia coli, ETV6-AML, FAP (белок альфа активации фибробластов), FCGR1, альфа-фетопротеин, фибрин II, бета-цепь, дополнительный домен фибронектина-B, FOLR (фолатный рецептор), альфа-рецептор фолата, фолатгидролаза, Fos-ассоциированный антиген 1, белок F респираторно-синцитиального вируса, связанный с ожогом рецептор, фукозил GM1, GD2 ганглиозид, G-28 (антиген гликолипида клеточной поверхности), GD3 идиотип, GloboH, глипикан 3, N-гликолилнейраминовую кислоту, GM3, α-цепь рецептора GMCSF, фактор дифференцировки роста 8, GP100, GPNMB (трансмембранный гликопротеин NMB), GUCY2C (гуанилатциклаза 2C, гуанилилциклаза C (GC-C), кишечная гуанилатциклаза, рецептор гуанилатциклаза C, рецептор термостабильного энтеротоксина (hSTAR)), белки теплового шока, гемагглютинин, поверхностный антиген гепатита B, вирус гепатита B, HER1 (рецептор 1 эпидермального фактора роста человека), HER2, HER2/neu, HER3 (ERBB-3), IgG4, HGF/SF (фактор роста гепатоцитов/фактор рассеяния), HHGFR, ВИЧ-1, комплекс гистонов, HLA-DR (антиген лейкоцитов человека), HLA-DR10, HLA-DRB, HMWMAA, хорионический гонадотропин человека, HNGF, киназа рецептора фактора рассеяния человека, HPV E6/E7, Hsp90, hTERT, ICAM-1 (молекула межклеточной адгезии 1), идиотип, IGF1R (IGF-1, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1), IGHE, IFN-γ, гемаглютинин вируса гриппа, IgE, IgE область Fc, IGHE, интерлейкины (например, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-17A, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 или IL-28), IL31RA, ILGF2 (инсулиноподобный фактор роста 2), интегрины (α4, $\alpha_{IIb}\beta3$, αvβ3, $\alpha_4\beta_7$, α5β1, α6β4, α7β7,αIIβ3, α5β5, αvβ5), интерферон гамма-индуцированный белок, ITGA2, ITGB2, KIR2D , каппа Ig, LCK, Le, Legumain, антиген Lewis-Y, LFA-1 (антиген 1, ассоциированный с функцией лимфоцитов, CD11a), LHRH, LINGO-1, липотейхоевую кислоту, LIV1A, LMP2, LTA, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE A1, MAGE A3, MAGE 4, MART1, MCP-1, MIF (фактор, ингибирующий миграцию макрофагов, или фактор, ингибирующий гликозилирование) (GIF)), MS4A1 (мембранного охвата 4-х доменный член 1 подсемейства A), MSLN (мезотелин), MUC1 (Mucin 1, ассоциированный с клеточной поверхностью (MUC1) или полиморфный эпителиальный муцин (PEM)), MUC1-KLH, MUC16 (CA125), MCP1 (хемотаксический белок 1 моноцитов), Melan-A/MART1, ML-IAP, MPG, MS4A1 (белок мембранного охвата 4-х доменный подсемейства A), MYCN, миелин-ассоциированный гликопротеин, миостатин, NA17, NARP-1, NCA-90 (гранулоцитарный антиген), нектин-4 (ASG-22ME), NGF, нейрональная апоптоз-

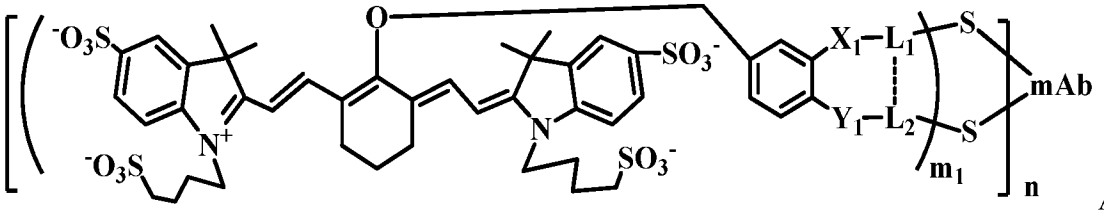
регулируемая протеиназа 1, NOGO-A, Notch-рецептор, нуклеолин, онкогенный продукт Neu, NY-BR-1, NY-ESO-1, OX- 40, OxLDL (окисленный липопротеин низкой плотности), OY-TES1, P21, не мутантный p53, P97, Page4, PAP, паратоп анти-(N-гликолилнейраминовой кислоты), PAX3, PAX5, PCSK9, PDCD1 (PD-1, белок запрограммированной клетки 1), PDGF-Rα (рецептор фактора роста тромбоцитов альфа-типа), PDGFR-β, PDL-1, PLAC1, PLAP-подобную щелочную фосфатазу яичка, тромбоцитарный рецептор фактора роста бета, фосфат-натриевый котранспортер, PMEL 17, полисиаловая кислота d, протеиназа 3 (PR1), рак предстательной железы, PS (фосфатидилсерин), клетки карциномы предстательной железы, Pseudomonas aeruginosa, PSMA, PSA, PSCA, гликопротеин вируса бешенства, RHD (Rh полипептид 1 (RhPI)), резус-фактор, RANKL, RhoC, мутант Ras, RGS5, ROBO4, респираторно-синцитиальный вирус, RON, ROR1, точки инициации транслокации саркомы, SART3, склеростин, SLAMF7 (член семейства SLAM 7), селектин P, SDC1 (синдекан 1), sLe(a), соматомедин C, SIP (сфингозин-1-фосфат), соматостатин, белок 17 сперматозоидов, SSX2, STEAP1 (шести трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 1), STEAP2, STn, TAG-72 (ассоциированный с опухолью гликопротеин 72) , сурвивин, Т-клеточный рецептор, Т-клеточный трансмембранный белок, TEM1 (опухолевый эндотелиальный маркер 1), TENB2, тенасцин C (TN-C), TGF-α, TGF-β (трансформирующий фактор роста бета), TGF-β1, TGF -β2 (трансформирующий фактор роста-бета 2), Tie (CD202b), Tie2, TIM-1 (CDX-014), Tn, TNF, TNF-α, TNFRSF8, TNFRSF10B (член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 10B), TNFRSF13B (член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 13B), TPBG (гликопротеин трофобласта), TRAIL-R1 (рецептор 1 лиганда индуцирующего некроз апоптоз опухоли), TRAILR2 (рецептор смерти 5 (DR5)), ассоциированный с опухолью кальциевый сигнальный преобразователь 2, специфичное для опухоли гликозилирование MUC1, рецептор TWEAK, TYRP1 (гликопротеин 75), TRP-2, тирозиназу, VCAM-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-2, VEGFR- 1, VEGFR2 или виментин, WT1, XAGE 1 или клетки, экспрессирующие любые рецепторы инсулинового фактора роста или любые рецепторы эпидермального фактора роста.

18. Клетки рака по п. 17. выбранные из группы, состоящей из клеток лимфомы, клеток миеломы, клеток почек, клеток рака молочной железы, клеток рака предстательной железы, клеток рака яичников, клеток колоректального рака, клеток рака желудка, клеток плоскоклеточного рака, клеток мелкоклеточного рака, клеток немелкоклеточного рака, клеток рака яичников, злокачественных клеток или любых клеток, которые растут и делятся в нерегулируемой, ускоренной манере приводя к раку.

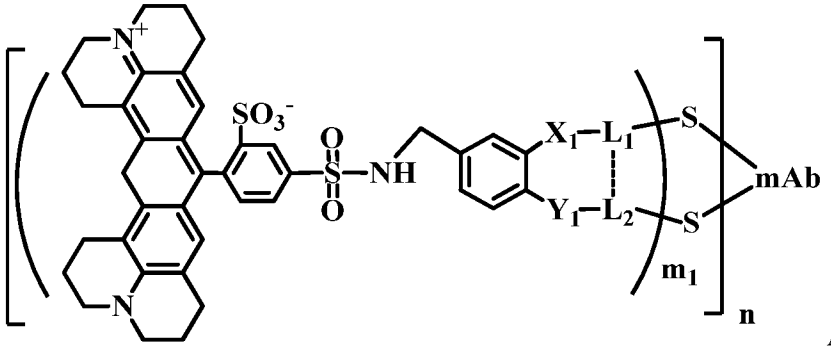
19. Конъюгаты по п. 1, в которых цитотоксическая молекула представляет собой молекулу хромофора, причем конъюгат Формулы (I) выбран из группы, состоящей из следующих структур Ac01, Ac02, Ac03, Ac04, Ac05, Ac06 и Ac07:



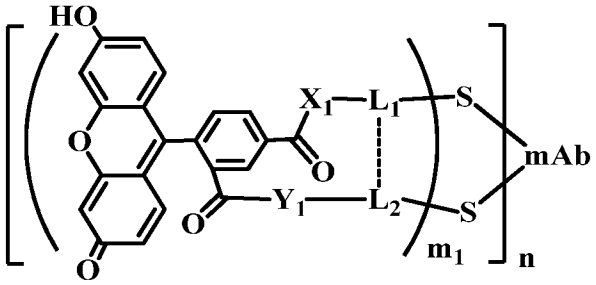
Ac01



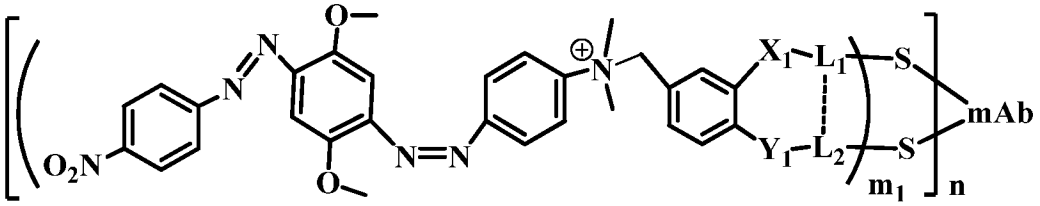
Ac02



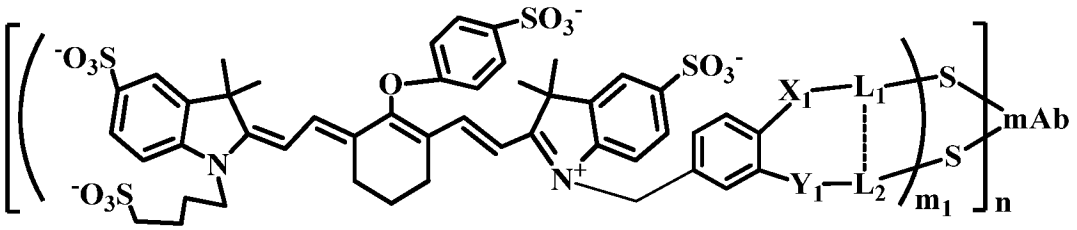
Ac03



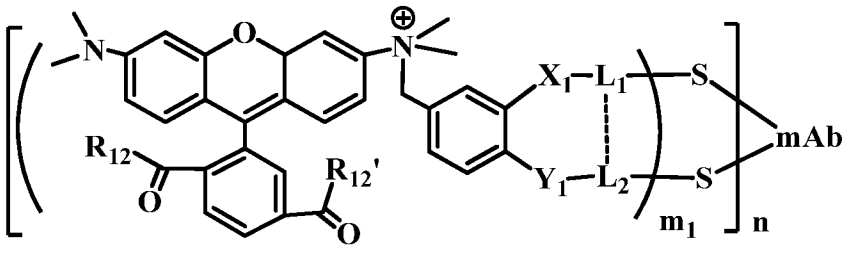
Ac04



Ac05



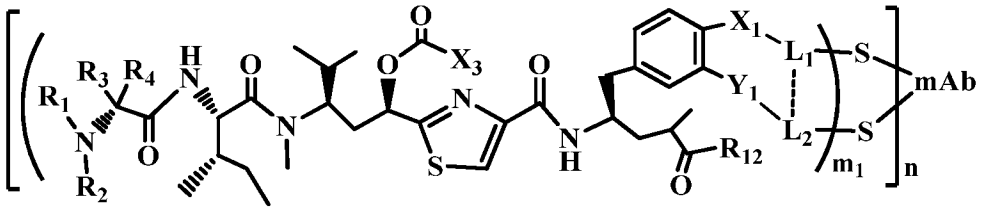
Ac06 (конъюгат IR800CW)



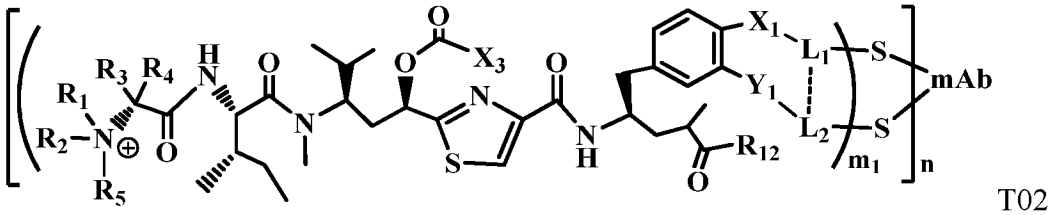
Ac07

где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; R_{12} и R_{12}' независимо представляют собой OH, NH_2, NHR_1, $NHNH_2$, NHNHCOOH, O-R_1-COOH, NH-R_1-COOH, NH-$(Aa)_n$COOH, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, R_1-$NHSO_3H$, NH-R_1-$NHSO_3H$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, R_1-$NHPO_3H_2$, R_1-OPO_3H_2, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, OR_1-$NHPO_3H_2$, NH-R_1-$NHPO_3H_2$, NH-Ar-COOH, NH-Ar-NH_2, где p = 0-5000, Aa представляет собой аминокислоты; R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в п. 1.

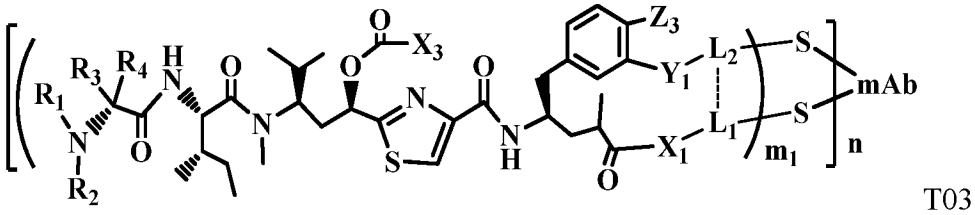
20. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой аналог Тубулизина, причем конъюгат Формулы (I) выбран из следующих структур T01, T02, T03, T04, T05, T06, T07, T08, T09, T10 и T11:



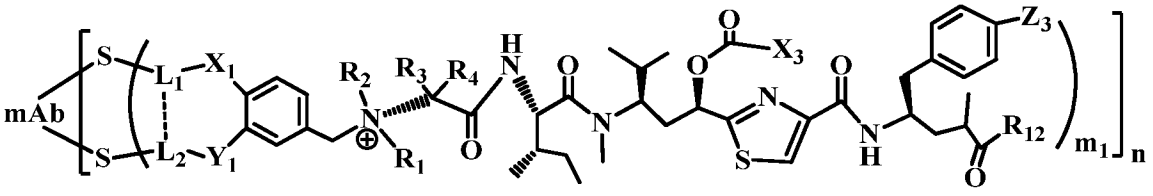
T01



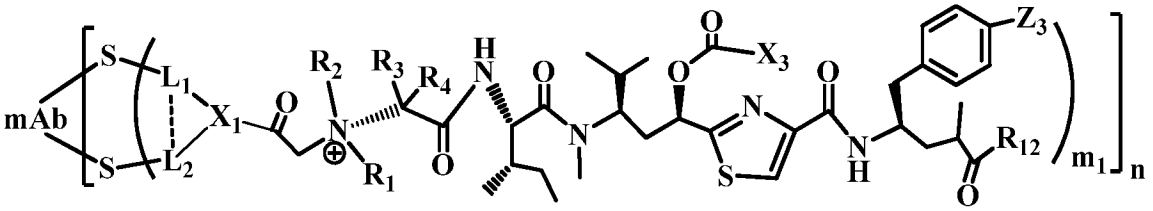
T02



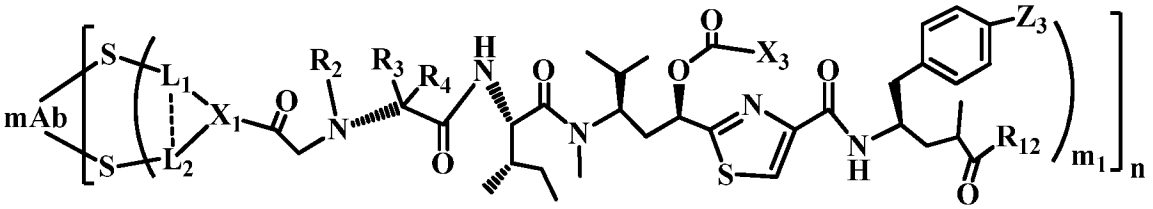
T03



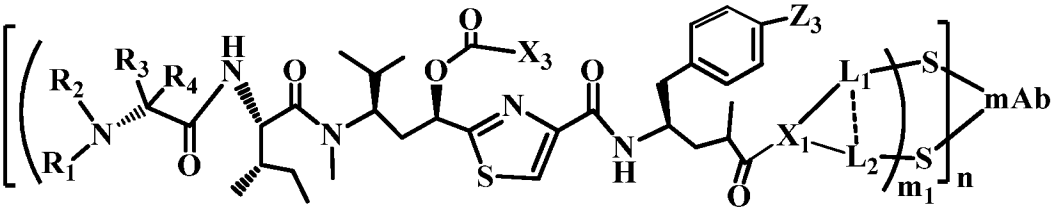
T04



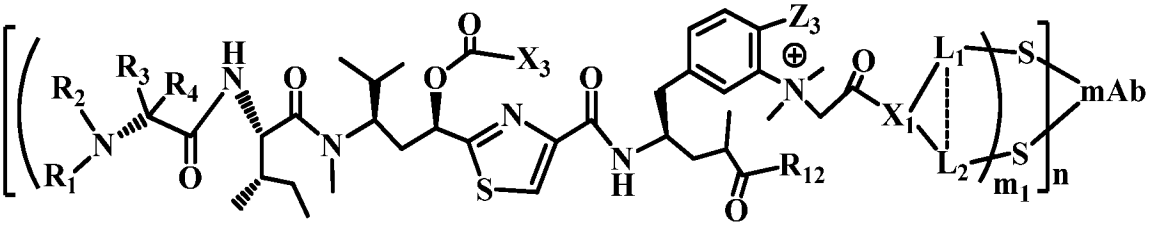
T05



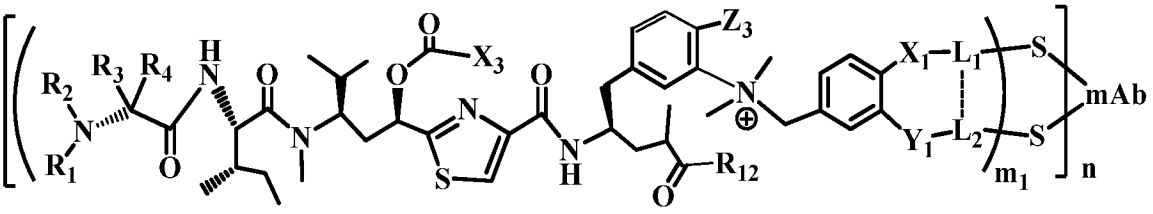
T06



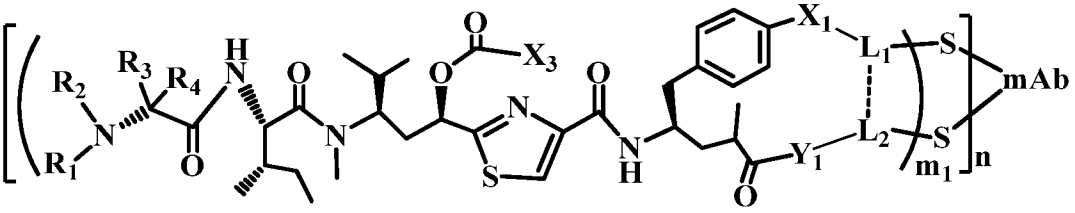
T07



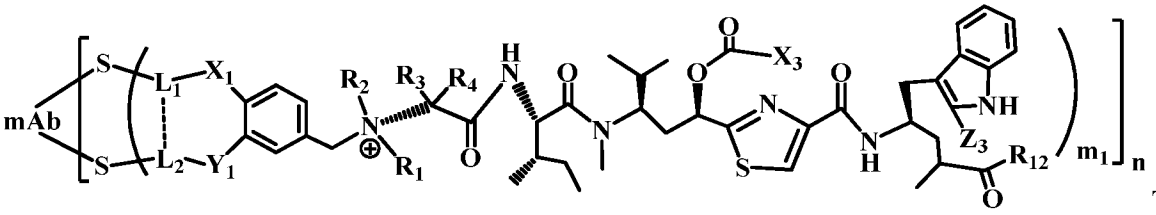
T08



T09



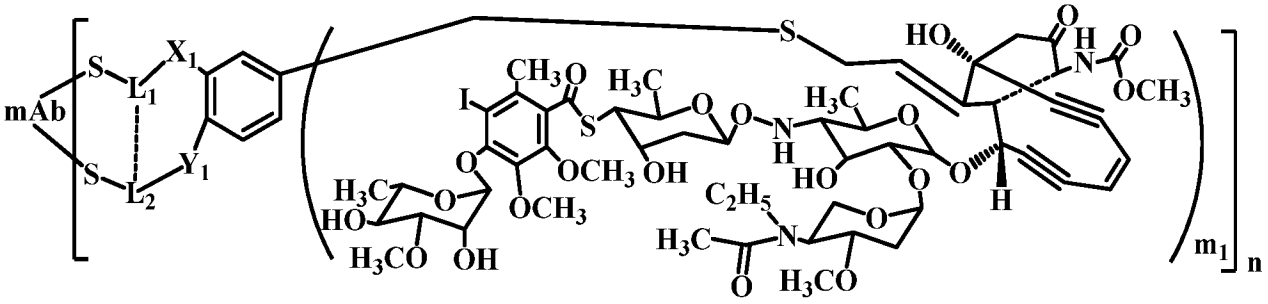
T10



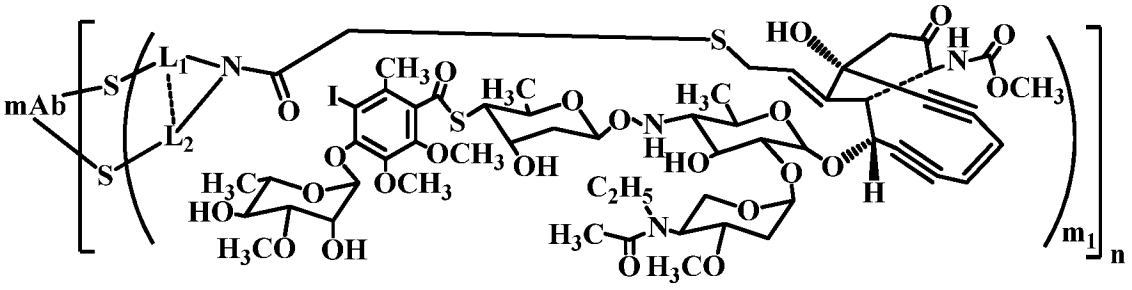
T11

где «-----» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело; R_{12} представляет собой OH, NH_2, NHR_1, $NHNH_2$, NHNHCOOH, O-R_1-COOH, NH-R_1-COOH, NH-$(Aa)_n$COOH, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, NR_1R_1', NHOH, $NHOR_1$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, NH-Ar-COOH, NH-Ar-$NH_2$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, R_1-$NHSO_3H$, NH-R_1-$NHSO_3H$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, OR_1, R_1-$NHPO_3H_2$, R_1-OPO_3H_2, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OPO_3H_2$, OR_1-$NHPO_3H_2$, NH-R_1-$NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2OH$, $NH(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2OH$, NH-$R_1$-$NH_2$, или $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$ где Aa представляет собой 1-8 аминокислот; n и m_1 независимо представляют собой 1-20; p равно 1-5000; R_1, R_1', R_2, R_3, и R_4 независимо представляют собой H, C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, амид или амины; C_2-C_8 арил, алкенил, алкинил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил, сложный эфир, простой эфир, гетероциклоалкил или ацилоксиламины; или пептиды содержащие 1-8 аминокислот, или полиэтиленоксигруппу имеющую формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 1 до около 5000; два Rs: R_1R_2, R_2R_3, R_1R_3 или R_3R_4 могут образовывать 3-8 членное циклическое кольцо алкильной, арильной, гетероарильной, гетероалкильной или алкилциклоалкильной группы; X_3 представляет собой H, CH_3, CH_2CH_3, C_3H_7, или $X_1'R_1'$, где X_1' представляет собой NH, $N(CH_3)$, NHNH, O или S; R_1' представляет собой H или C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, арил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил или ацилоксиламины; R_3' представляет собой H или C_1-C_6 линейный или разветвленный алкил; Z_3 представляет собой H, $COOR_1$, NH_2, NHR_1, OR_1, $CONHR_1$,$NHCOR_1$, $OCOR_1$, $OP(O)(OM_1)(OM_2)$, $OCH_2OP(O)(OM_1)(OM_2)$, OSO_3M_1, R_1, O-гликозид (глюкозид, галактозид, маннозид, глюкуронозид/глюкуронид, аллозид, фруктозид), NH-гликозид, S-гликозид или CH_2-гликозид; M_1 и M_2 независимо представляют собой H, Na, K, Ca, Mg, NH_4, $NR_1R_2R_3$; L_1, и L_2 являются такими, как определено в п. 1.

21. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой аналог калихамицина, конъюгат Формулы (I) выбран из следующих структур C01 и C02:



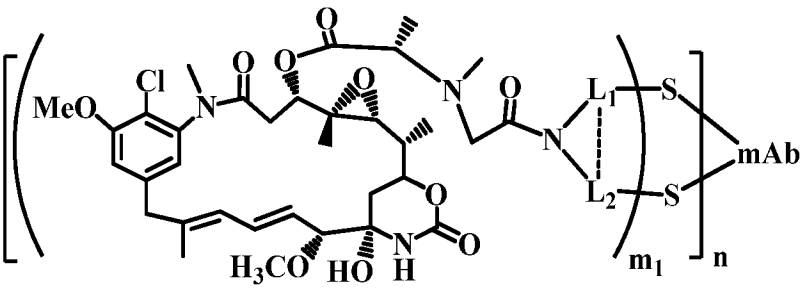
C01.



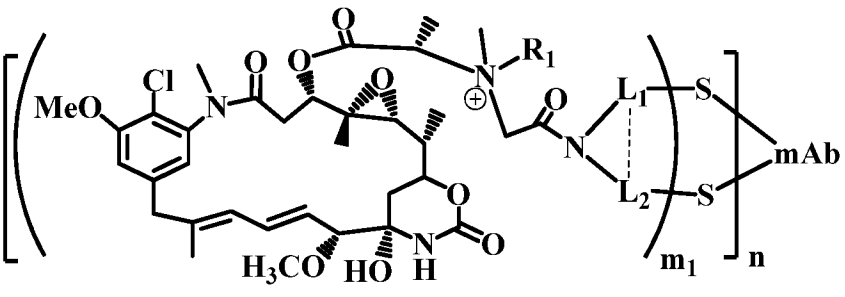
C02

где «▪▪▪▪▪» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, OC(O)N(R_1), N(R_1)C(O)N(R_1), CH, C(O)NHNHC(O) и C(O)NR_1; mAb представляет собой антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; p равно 1-5000, R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в п. 1.

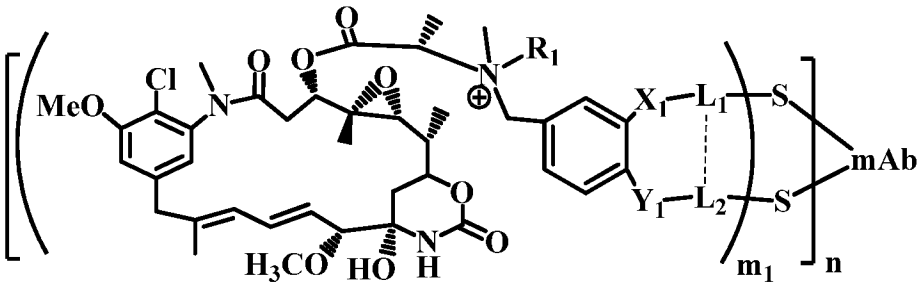
22. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой аналог майтанзиноида, причем конъюгат выбран из следующих структур My01, My02, My03, My04, My05 и My06:



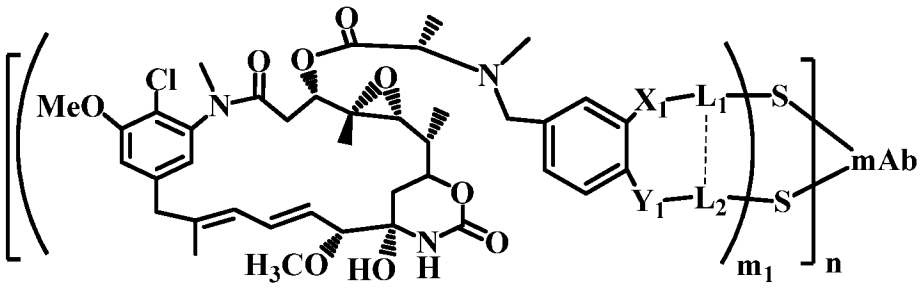
My01,



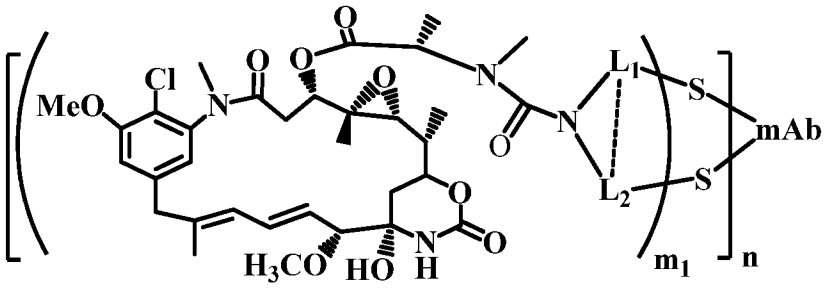
My02



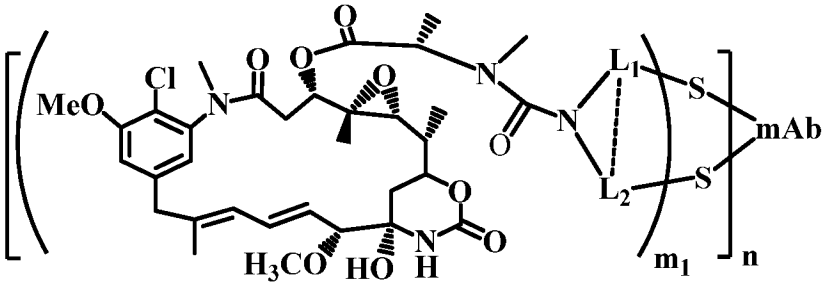
My03



My04



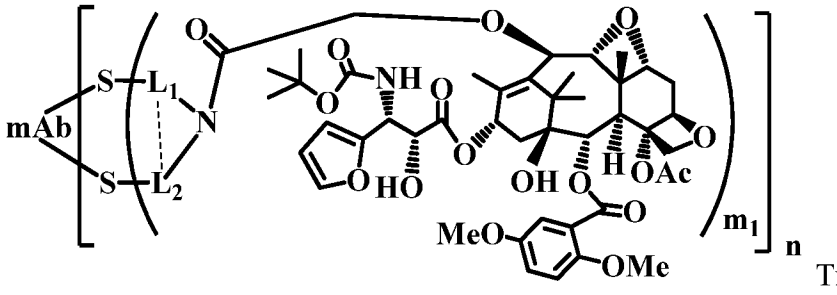
My05



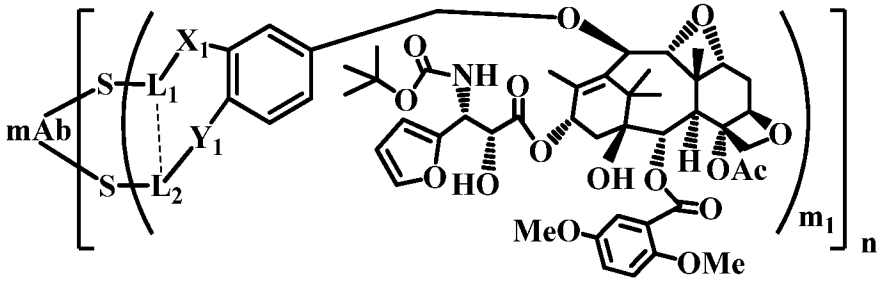
M06

где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; p равно 1-5000, R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в п. 1.

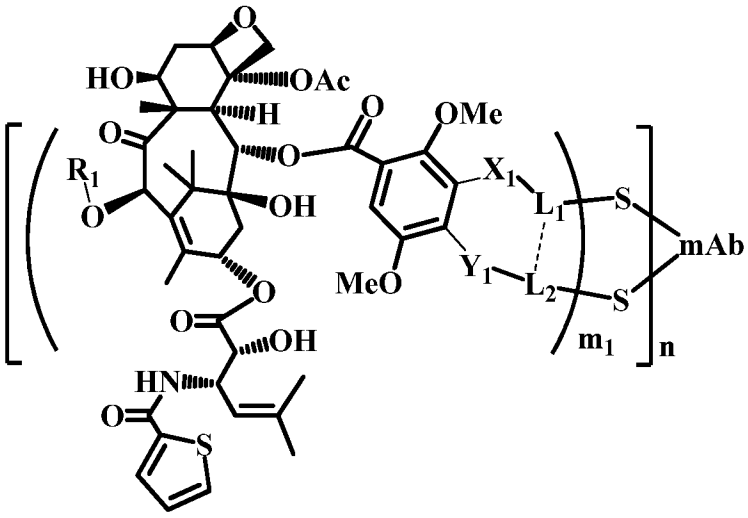
23. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой аналог таксана, конъюгат выбран из следующих структур Tx01, Tx02 и Tx03:



Tx01



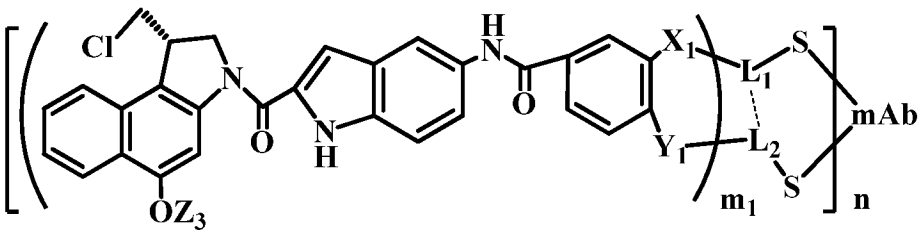
Tx02



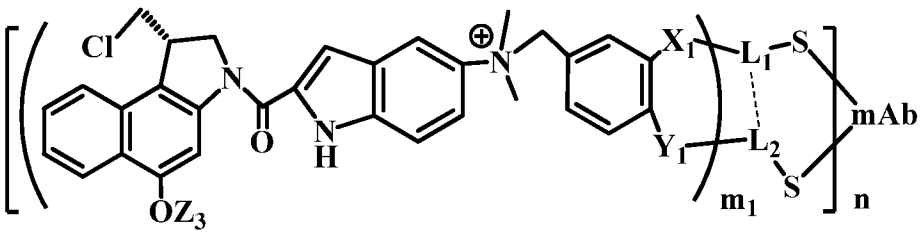
Tx03

где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, OC(O)N(R_1), N(R_1)C(O)N(R_1), CH, C(O)NHNHC(O) и C(O)NR_1; mAb представляет собой антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в п. 1.

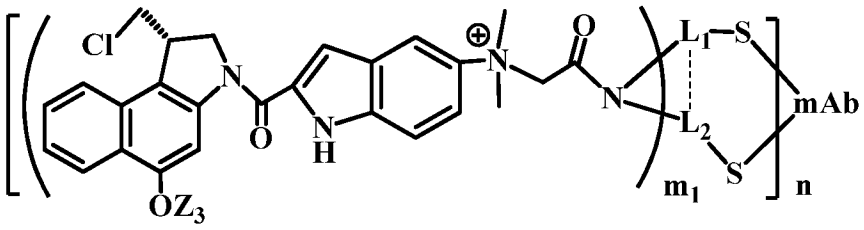
24. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой аналог CC-1065 и/или дуокармицина, конъюгат выбран из следующих структур CC01, CC02 и CC03 :



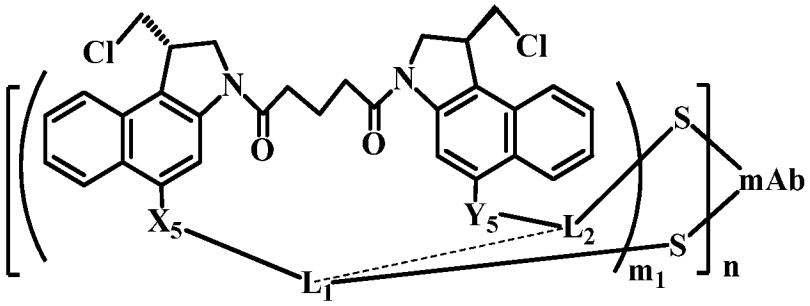
CC01



CC02



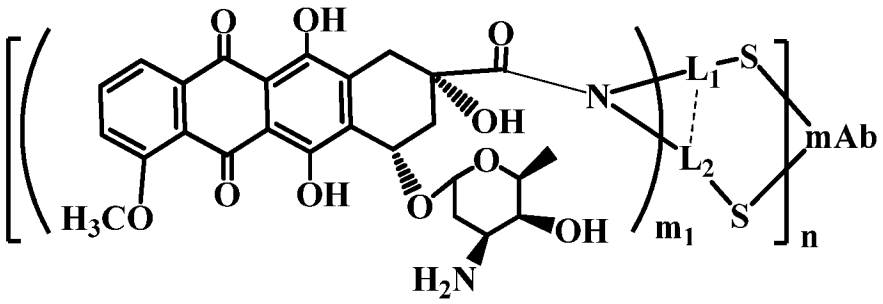
CC03



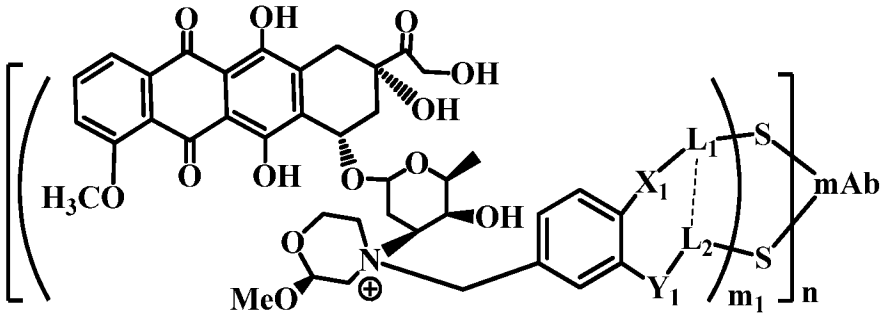
CC04

где mAb представляет собой антитело; Z_3 представляет собой H, $PO(OM_1)(OM_2)$, SO_3M_1, $CH_2PO(OM_1)(OM_2)$, $CH_3N(CH_2CH_2)_2NC(O)$-, $O(CH_2CH_2)_2NC(O)$-, R_1 или гликозид; и где «-----» представляет собой либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1,X_5, Y_1 и Y_5 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, $OC(O)N(R_1)$, $N(R_1)C(O)N(R_1)$, CH, C(O)NHNHC(O) и $C(O)NR_1$; mAb представляет собой антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в п. **1**.

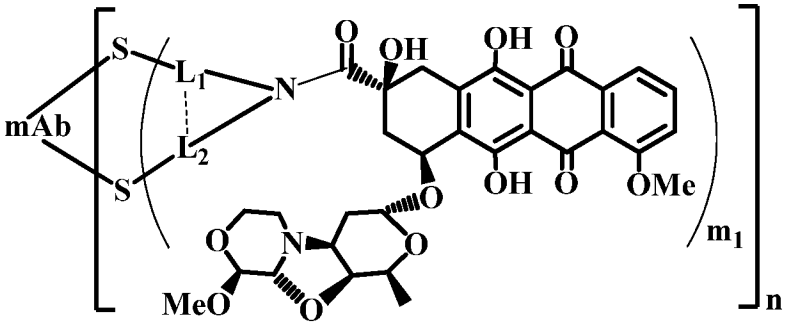
25. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой аналог даунорубицина или доксорубицина, конъюгат Формулы выбран из следующих структур Da01, Da02, Da03 Da04, Da05, Da06, Da07 и Da08:



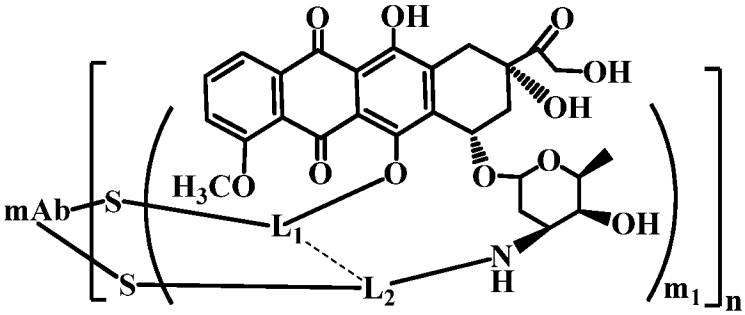
Da01



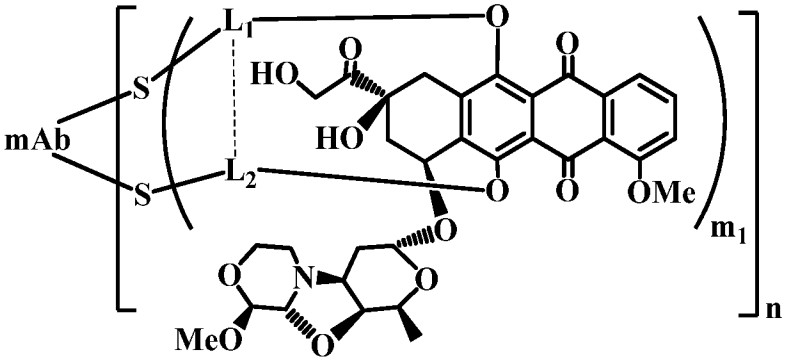
Da02



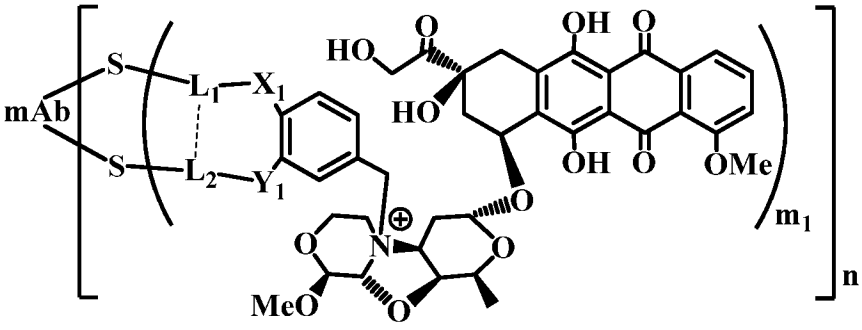
Da03



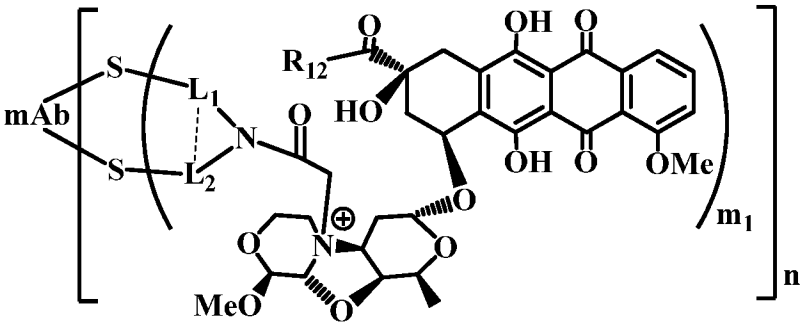
Da04



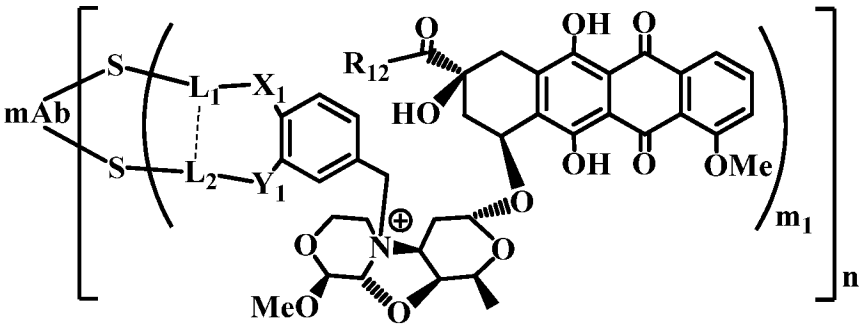
Da05



Da06



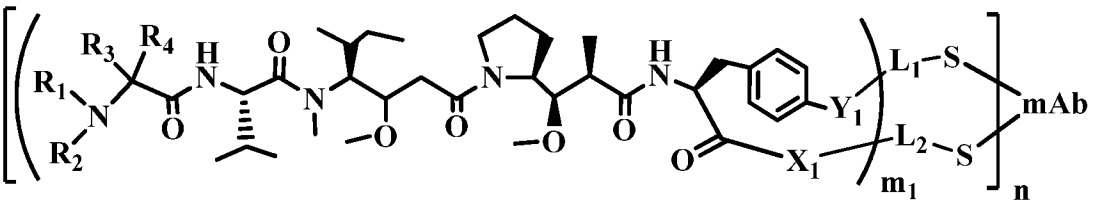
Da07



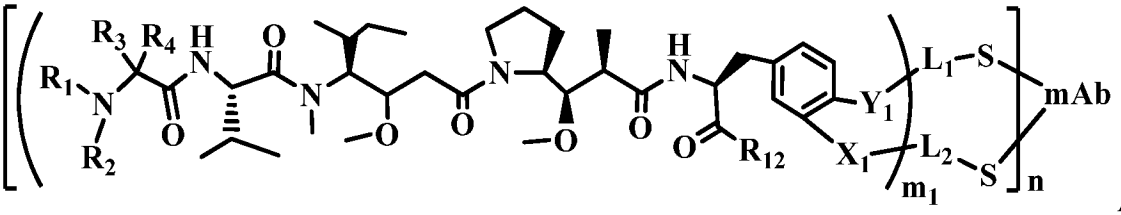
Da08

где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, OC(O)N(R_1), N(R_1)C(O)N(R_1), CH, C(O)NHNHC(O) и C(O)NR_1; R_{12} представляет собой OH, NH_2, NHR_1, $NHNH_2$, NHNHCOOH, O-R_1-COOH, NH-R_1-COOH, NH(Aa)$_n$COOH, O$(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OH$, O$(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, NH$(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, N$R_1R_1$', NHOH, NHO$R_1$, O$(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, NH$(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, NH-Ar-COOH, NH-Ar-$NH_2$, O$(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, NH$(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2$NH-$SO_3H$, R_1-NHSO_3H, NH-R_1-NHSO_3H, O$(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, NH$(CH_2CH_2O)_pCH_2$-$CH_2NHPO_3H_2$, O$R_1$, R_1-NHPO_3H_2, R_1-OPO_3H_2, O$(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OPO_3H_2$, O$R_1$-N$HPO_3H_2$, NH-$R_1$-N$HPO_3H_2$, NH$(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2NH_2$, NH$(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2NH_2$, NH$(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2OH$, NH$(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2OH$, NH-$R_1$-$NH_2$, или NH$(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, где Aa представляет собой 1-8 аминокислот; p равно 1-5000; mAb представляет собой антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в п. **1**.

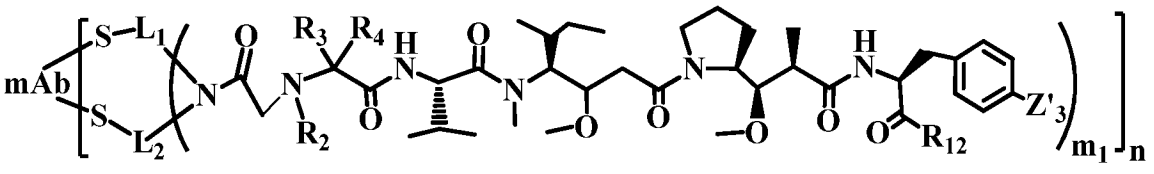
26. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой аналог ауристатина или доластатина, причем конъюгат выбран из следующих структур Au01, Au02, Au03, Au04, Au05, Au06, Au07, Au08, Au09, Au10, Au11, Au12 и Au13:



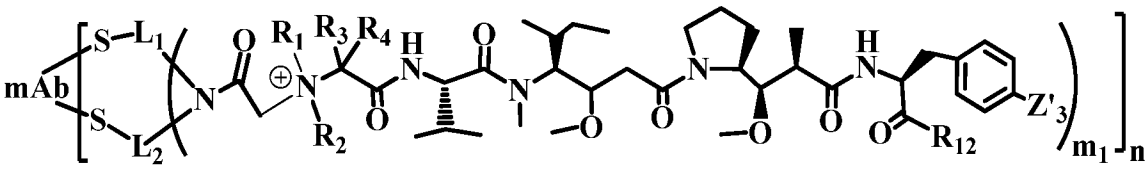
Au01

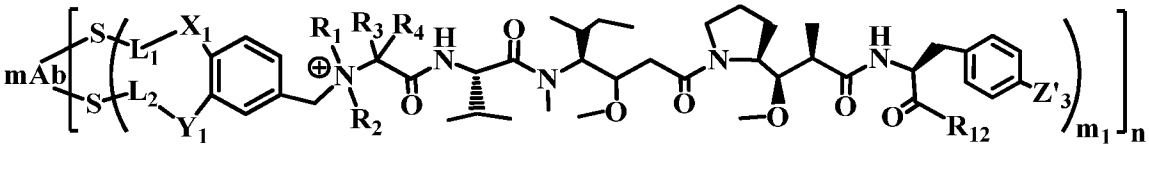


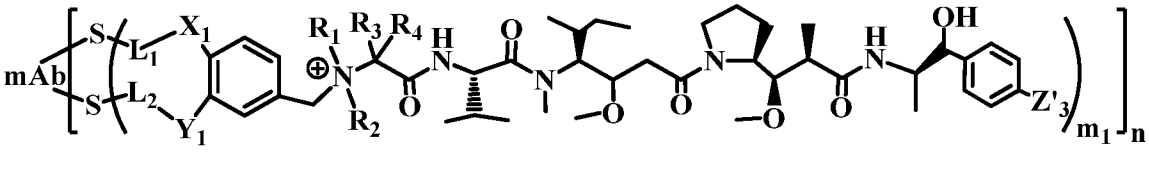
Au02

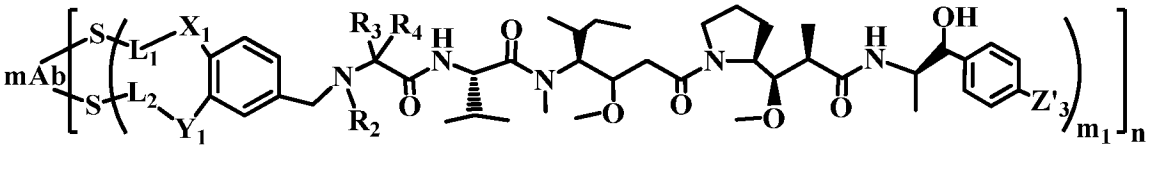


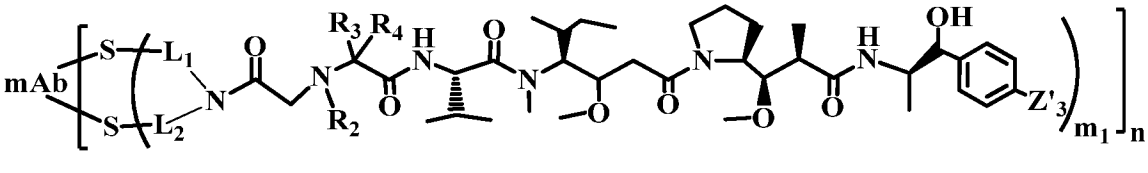
Au03

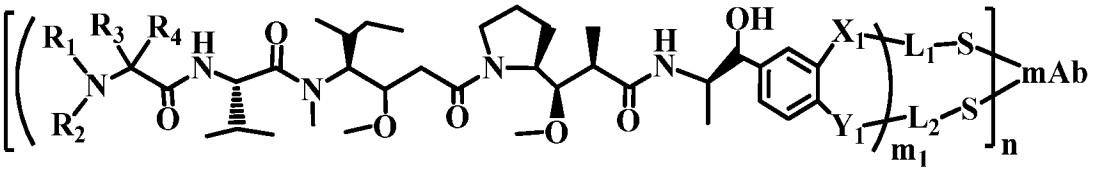

Au04

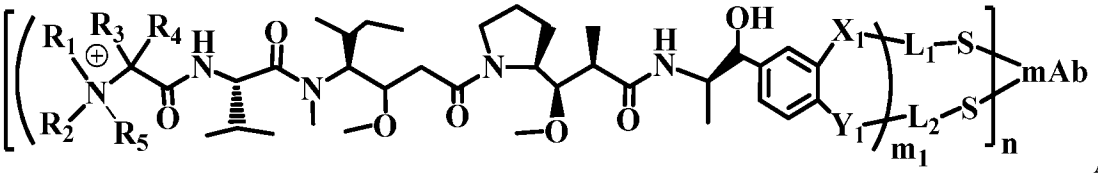

Au05

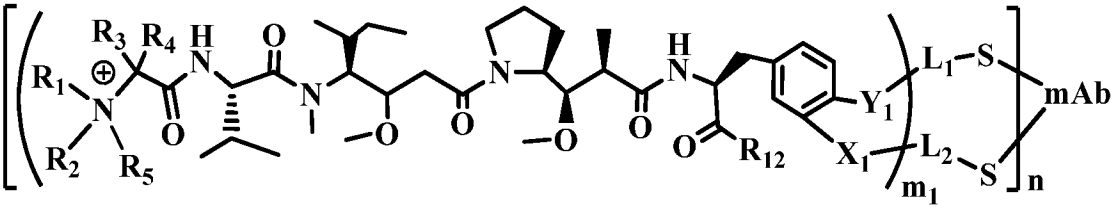

Au06

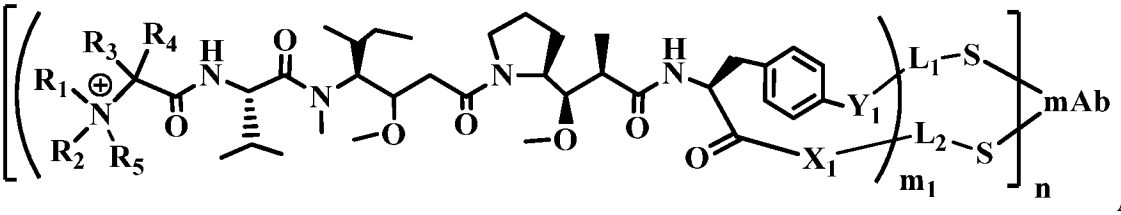

Au07

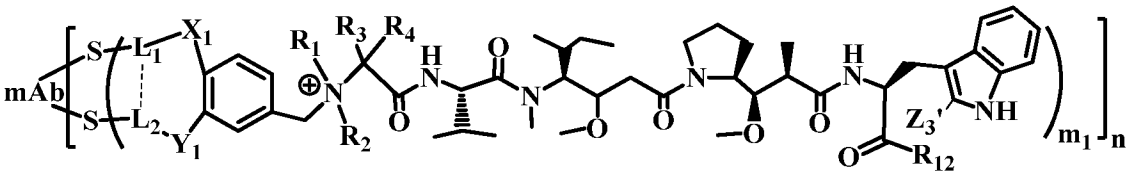

Au08


Au09


Au10


Au11


Au12

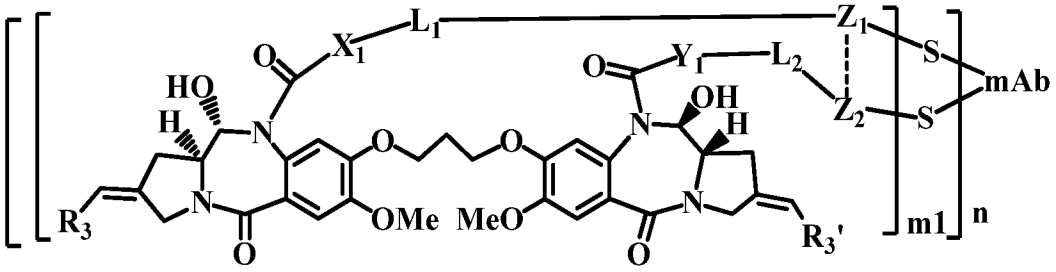


Au13

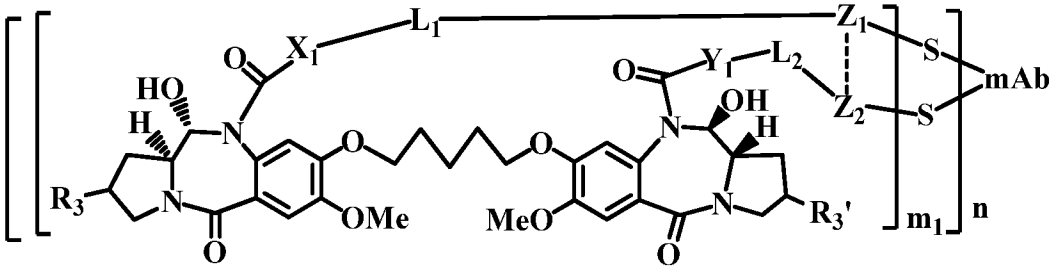
где «▬▬▬» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, OC(O)N(R_1), N(R_1)C(O)N(R_1), CH, C(O)NHNHC(O) и C(O)NR_1; R_{12} представляет собой OH, NH_2, NHR_1, $NHNH_2$, NHNHCOOH, O-R_1-COOH, NH-R_1-COOH, NH-$(Aa)_n$COOH, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, NR_1R_1', NHOH, NHOR_1, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, NH-Ar-COOH, NH-Ar-$NH_2$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, R_1-$NHSO_3H$, NH-R_1-$NHSO_3H$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, O$R_1$, R_1-$NHPO_3H_2$, R_1-OPO_3H_2, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OPO_3H_2$, O$R_1$-$NHPO_3H_2$, NH-$R_1$-$NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2NH)_pCH_2CH_2OH$, $NH(CH_2CH_2S)_pCH_2CH_2OH$, NH-$R_1$-$NH_2$ или $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, где Aa представляет собой 1-8 аминокислот; p равно 1-5000; mAb представляет собой антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; p равно 1-5000; R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляют собой H, C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, арил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил, сложный эфир, простой эфир, амид, амины, гетероциклоалкил или ацилоксиламины; или пептиды содержащие 1-8 аминокислот, или полиэтиленоксигруппу имеющую формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 1 до около 5000. Два Rs: R_1R_2, R_2R_3, R_1R_3 или R_3R_4 могут образовывать 3-8 членное циклическое кольцо алкильной, арильной, гетероарильной, гетероалкильной или алкилциклоалкильной группы; X_3 представляет собой H, CH_3, или X_1'R_1', где X_1' представляет собой NH, N(CH_3), NHNH, O или S, и R_1' представляет собой H или C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, арил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил, ацилоксиламины; R_3' представляет собой H или C_1-C_6 линейный или разветвленный алкил; Z_3 представляет собой H, $COOR_1$, NH_2, NHR_1, OR_1, CONHR_1,NHCOR_1, OCOR_1, OP(O)(OM_1)(OM_2), $OCH_2OP(O)(OM_1)(OM_2)$, OSO_3M_1, R_1 или O-гликозид (глюкозид, галактозид, маннозид, глюкуронозид/глюкуронид, аллозид, фруктозид), NH-гликозид, S-гликозид или CH_2-гликозид; M_1 и M_2 независимо представляют собой H, Na, K, Ca, Mg, NH_4, $NR_1R_2R_3$; L_1 и L_2 являются такими, как определено в п. **1**.

27. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой аналог димера бензодиазепина, причем конъюгат выбран из структур PB01, PB02, PB03, PB04,

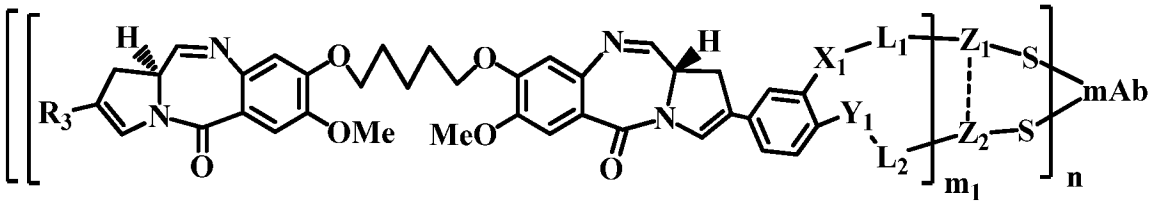
PB05, PB06, PB07, PB08, PB09, PB10, PB11, PB12, PB13, PB14, PB15, PB16, PB17, PB18, PB19, PB20, PB21 и PB22.



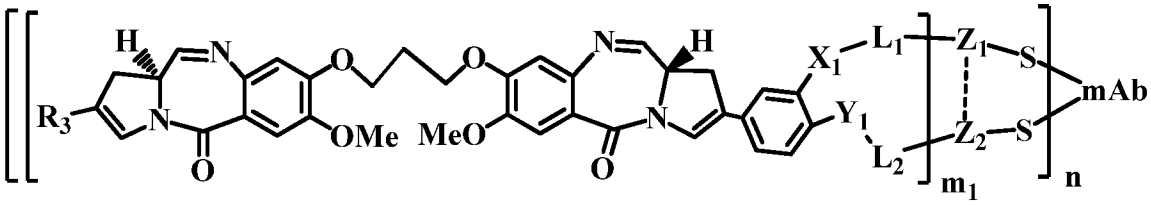
PB01



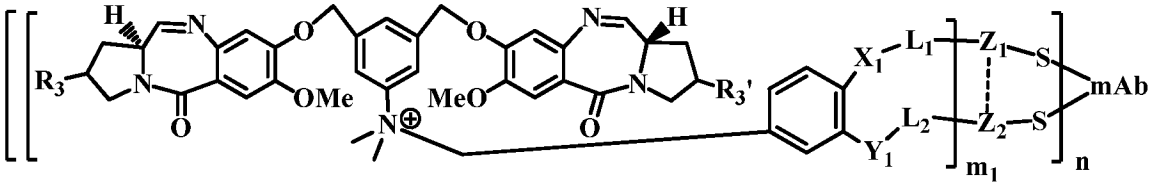
PB02



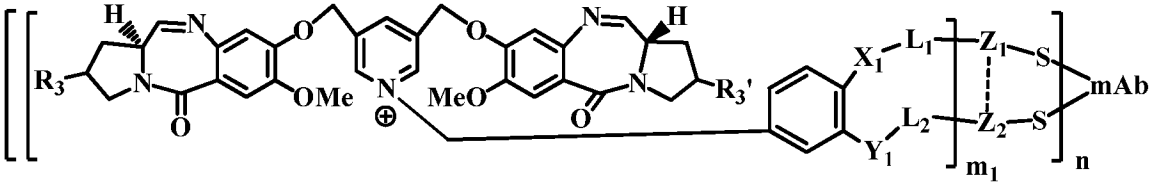
PB03



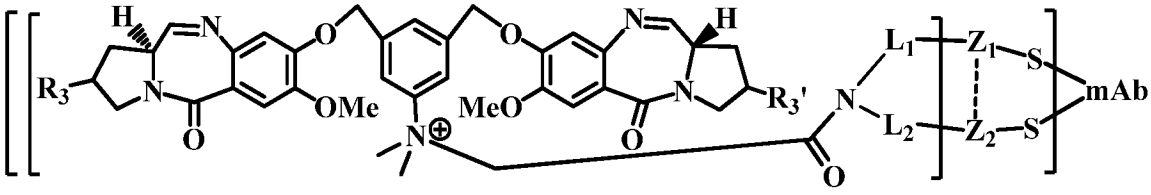
PB04



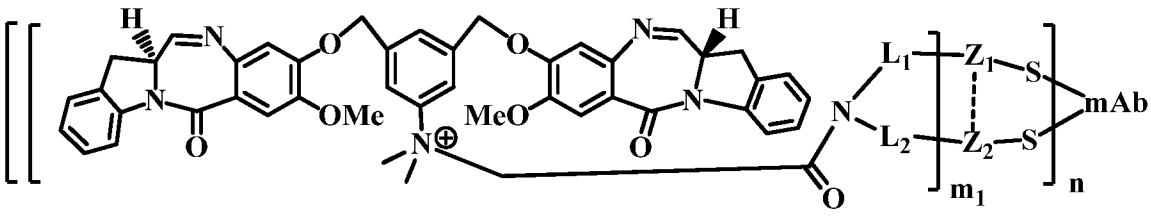
PB05



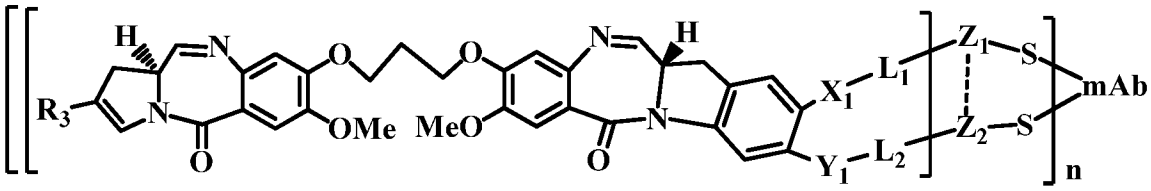
PB06



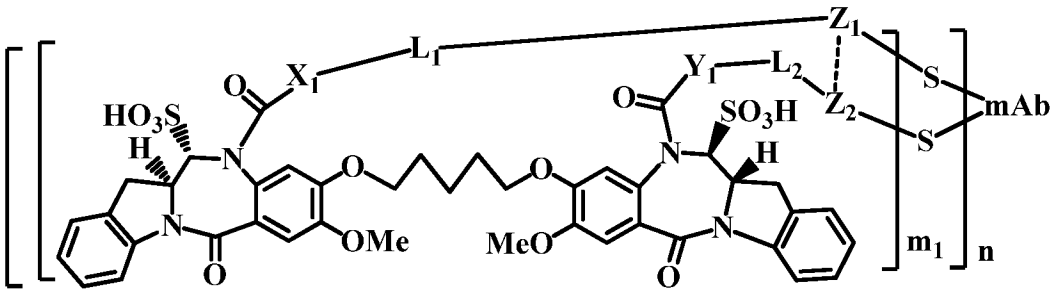
PB07



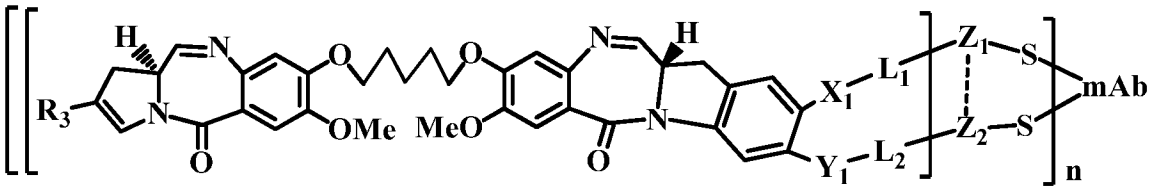
PB08



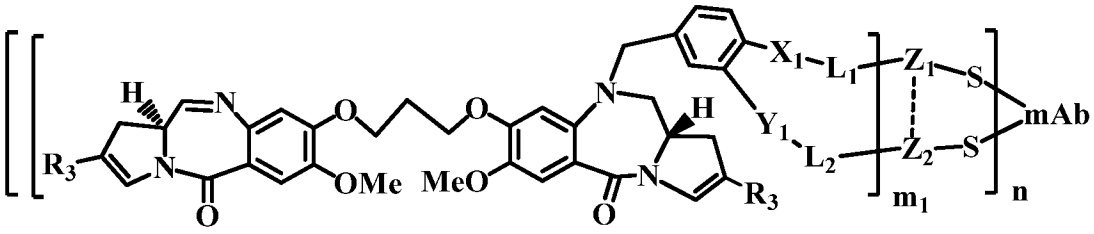
PB09



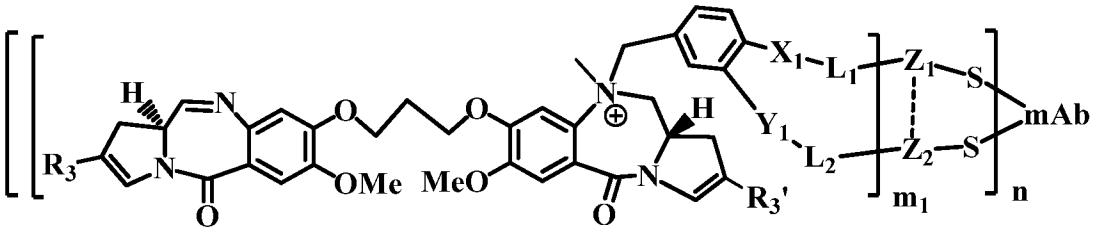
PB10



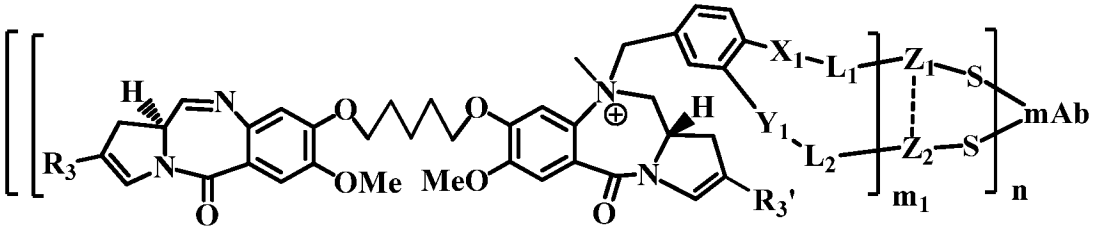
PB11



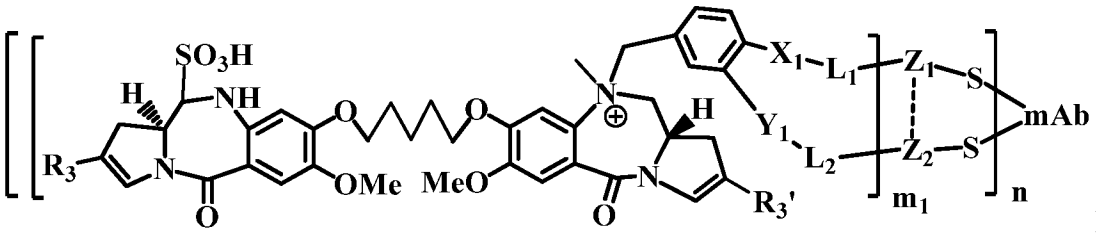
PB12



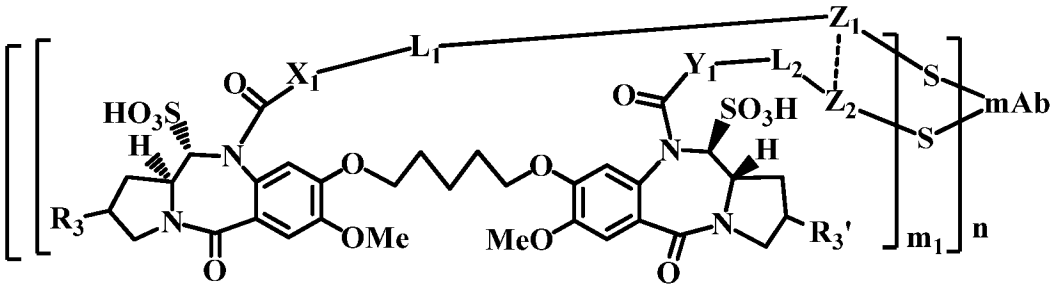
PB13



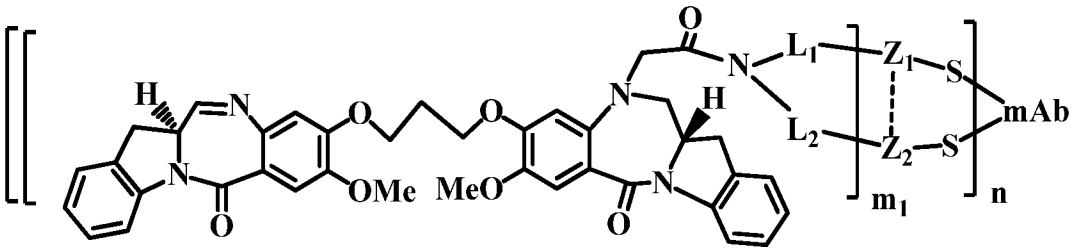
PB14



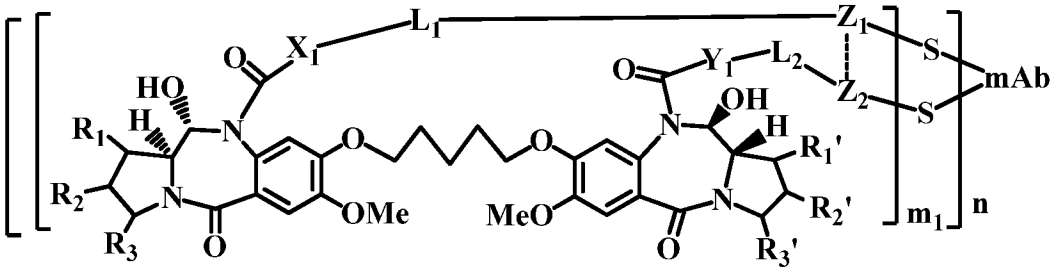
PB15



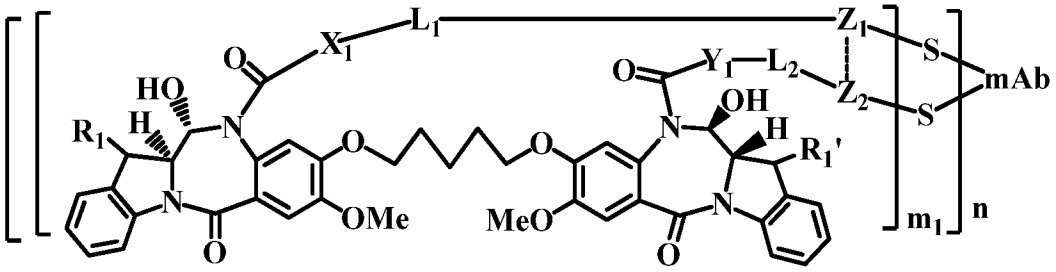
PB16



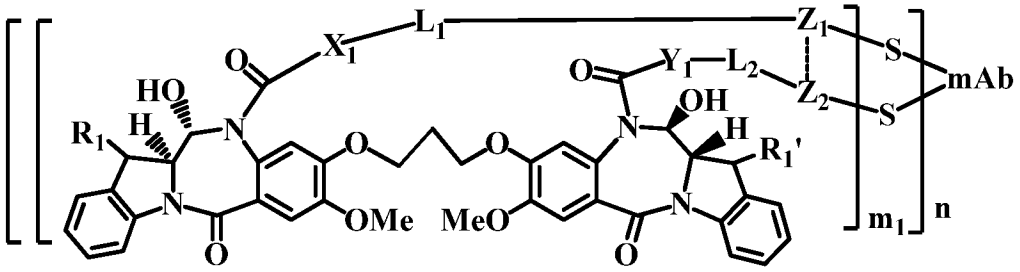
PB17



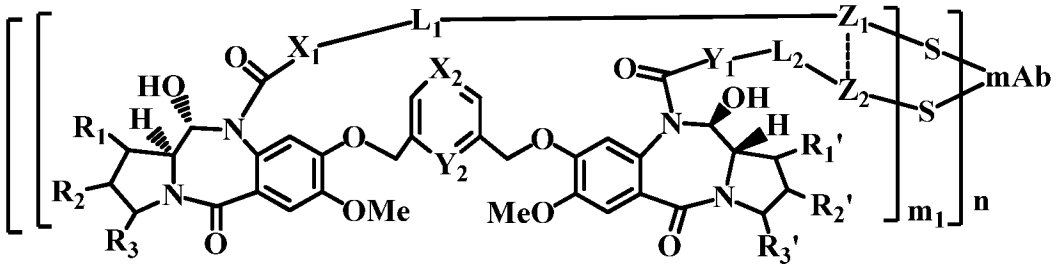
PB18



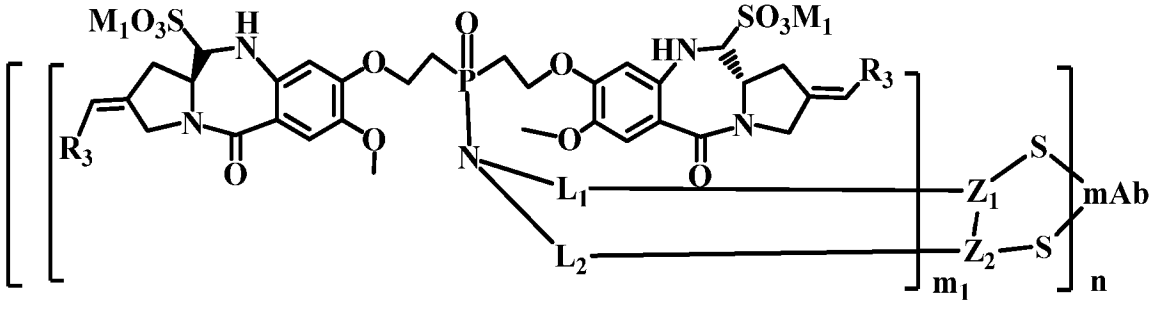
PB19



PB20



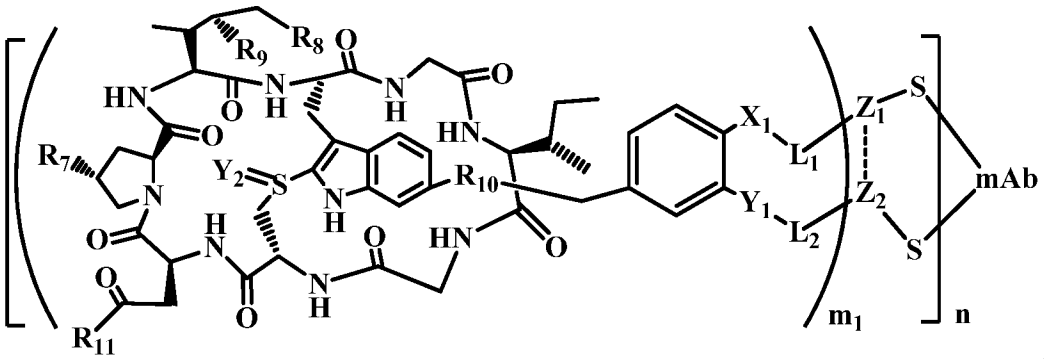
PB21



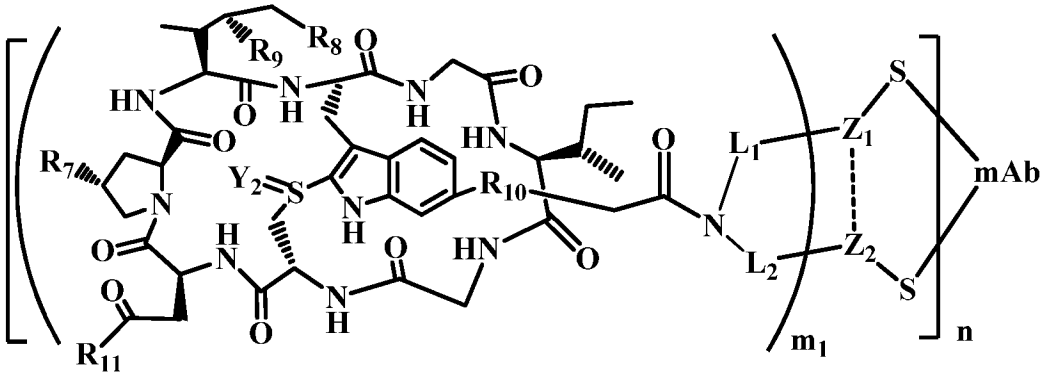
PB22

где «-----» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, OC(O)N(R_1), N(R_1)C(O)N(R_1), CH, C(O)NHNHC(O) и C(O)NR_1; mAb представляет собой антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; L_1, L_2, Z_1, и Z_2, являются такими, как определено в п. **1**; R_1, R_2, R_3, R_1', R_2' и R_3' независимо представляют собой H; F; Cl; =O; =S; OH; SH; C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, арил, алкенил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил, сложный эфир ($COOR_5$ или –OC(O)R_5), простой эфир(OR_5), амид ($CONR_5$), карбамат ($OCONR_5$), амины (NHR_5, NR_5R_5'), гетероциклоалкил или ацилоксиламины (-C(O)NHOH, -ONHC(O)R_5); или пептиды, содержащие 1-8 природных или неприродных аминокислот, или полиэтиленоксигруппу, имеющую формулу $(OCH_2CH_2)_p$ или $(OCH_2CH(CH_3))_p$, где p равно целому числу от 1 до около 5000. два Rs: R_1R_2, R_2R_3, R_1R_3. R_1'R_2', R_2'R_3' или R_1'R_3' могут образовывать 3-8 членное циклическое кольцо алкильной, арильной, гетероарильной, гетероалкильной или алкилциклоалкильной группы; X_2 и Y_2 независимо представляют собой N, CH_2 или CR_5, где R_5 представляет собой H, OH, NH_2, $NH(CH_3)$, $NHNH_2$, COOH, SH, OZ_3, SZ_3 или C_1-C_8 линейный или разветвленный алкил, арил, гетероарил, гетероалкил, алкилциклоалкил или ацилоксиламины; Z_3 представляет собой H, $OP(O)(OM_1)(OM_2)$, $OCH_2OP(O)(OM_1)(OM_2)$, OSO_3M_1 или O-гликозид (глюкозид, галактозид, маннозид, глюкуронозид/глюкуронид, аллозид, фруктозид), NH-гликозид, S-гликозид или CH_2-гликозид; M_1 и M_2 независимо представляют собой H, Na, K, Ca, Mg, NH_4, $NR_1R_2R_3$.

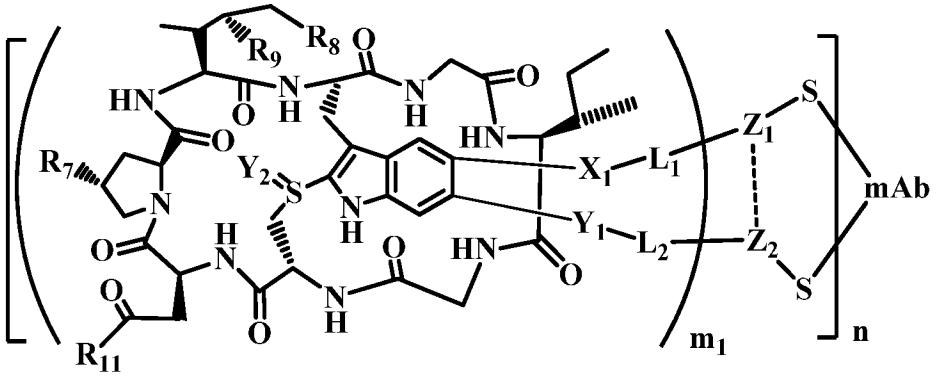
28. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой аналог аманитина, причем конъюгат выбран из представленных ниже структур Am01, Am02, Am03 и Am04:



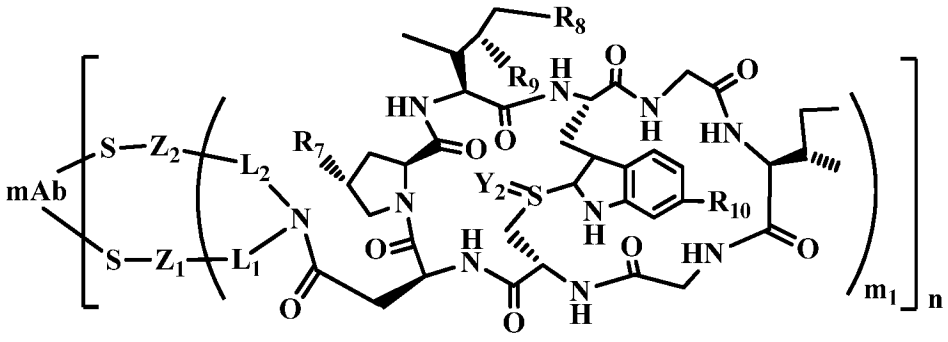
Am01



Am02



Am03

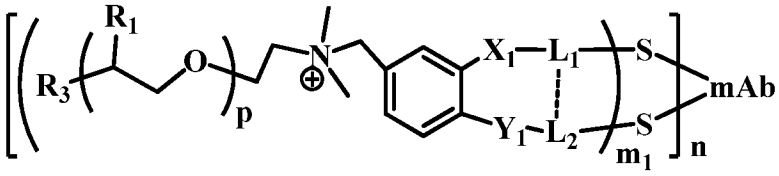


Am04

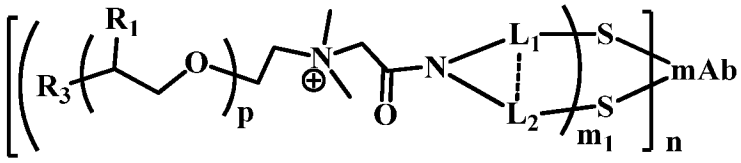
где«-----» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или может необязательно отсутствовать; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, OC(O)N(R_1), N(R_1)C(O)N(R_1), CH, C(O)NHNHC(O) и C(O)NR_1; mAb представляет собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; R_7, R_8 и R_9 независимо представляют собой H, OH, OR_1, NH_2, NHR_1, C_1-C_6 алкил или отсутствуют; Y_2 представляет собой O, O_2, NR_1, NH или отсутствует; R_{10} представляет собой CH_2, O, NH, NR_1,

NHC(O), NHC(O)NH, NHC(O)O, OC(O)O, C(O), OC(O), OC(O)(NR_1), (NR_1)C(O)(NR_1), C(O)R_1 или отсутствует; R_{11} представляет собой OH, NH_2, NHR_1, $NHNH_2$, NHNHCOOH, O-R_1-COOH, NH-R_1-COOH, NH-$(Aa)_n$COOH, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OH$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NH_2$, NR_1R_1', $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2COOH$, NH-Ar-COOH, NH-Ar-$NH_2$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHSO_3H$, R_1-$NHSO_3H$, NH-R_1-$NHSO_3H$, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, OR_1, R_1-$NHPO_3H_2$, R_1-OPO_3H_2, $O(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2OPO_3H_2$, OR_1-$NHPO_3H_2$, NH-R_1-$NHPO_3H_2$ или $NH(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2NHPO_3H_2$, где Aa представляет собой 1-8 аминокислот; n и m_1 независимо равны 1-20; p равен 1 -5000; R_1, L_1 и L_2 являются такими, как определено в Формуле (I). L_1, L_2, R_1, Z_1 и Z_2 являются такими, как определено в п. 1.

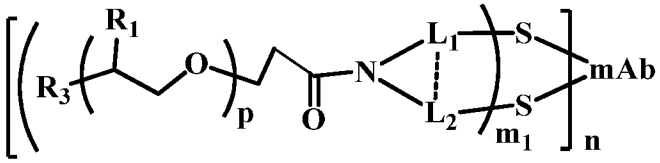
29. Конъюгат по п. 1 или п. 12, в котором цитотоксическая молекула представляет собой аналог полиалкиленгликоля, причем конъюгат выбран из структур Pg01, Pg02 и Pg03.



Pg01



Pg02

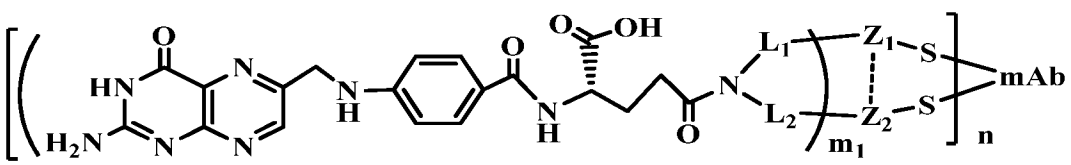


Pg03

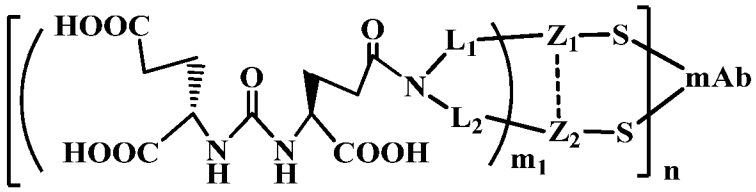
где «-----» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, OC(O)N(R_1), N(R_1)C(O)N(R_1), CH, C(O)NHNHC(O) и C(O)NR_1; mAb представляет собой антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; p равно 1-5000; R_1 и R_3 независимо представляют собой H, OH, OCH_3, CH_3, или OC_2H_5; L_1 и L_2 являются такими, как определено в п. **1**.

30. Конъюгат по п. **1**, в котором цитотоксическая молекула представляет собой лиганд, связывающийся с клеткой, или агонист клеточного рецептора, и его аналоги, причем конъюгат выбран из структур: LB01 (конъюгат с фолатом), LB02 (конъюгат с лигандом PMSA), LB03 (конъюгат с лигандом PMSA), LB04 (конъюгат с лигандом PMSA), LB05

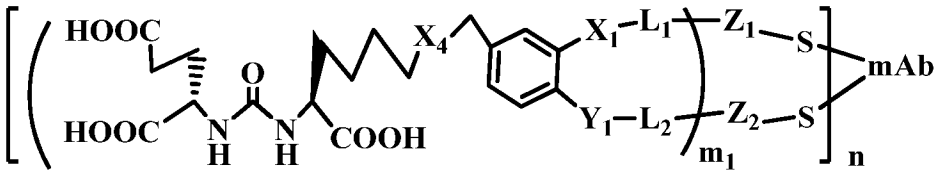
(конъюгат с соматостатином), LB06 (конъюгат с соматостатином), LB07 (октреотид, конъюгат с аналогом соматостатина), LB08 (ланреотид, конъюгат с аналогом соматостатина), LB09 (вапреотид(санвар), конъюгат с аналогом соматостатина), LB10 (конъюгат с лигандом CAIX), LB11 (конъюгат с лигандом CAIX), LB12 (рецептор высвобождающего гастрин пептида (GRPr), конъюгат MBA) LB13 (конъюгат лиганд рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LH-RH) и GnRH), LB14 (конъюгат лиганд рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LH-RH) и GnRH-лиганда), LB15 (антагонист GnRH, абареликс конъюгат), LB16 (кобаламин, конъюгат с аналогом витамина B12), LB17 (кобаламин, конъюгат с аналогом витамина B12), LB18 (пентапептидный циклический RGD конъюгат для рецептора интегрина $\alpha_v\beta_3$), LB19 (конъюгат гетеро-двухвалентного пептидного лиганда рецептора VEGF), LB20 (конъюгат нейромедина B), LB21 (конъюгат бомбезина для рецептора, сопряженного с G-белком), LB22 (конъюгат TLR_2 для Toll-подобного рецептора), LB23 (для рецептора андрогена), LB24 (циленгитид/цикло(-RGDfV-) конъюгат для рецептора интергрина α_v), LB23 (конъюгат с флудрокортизоном), LB25 (конъюгат с аналогом рифабутина), LB26 (конъюгат с аналогом рифабутина), LB27 (конъюгат с аналогом рифабутина), LB28 (конъюгат с флудрокортизоном), LB29 (конъюгат с дексаметазоном), LB30 (конъюгат с флутиказоном пропионатом), LB31 (конъюгат с беклометазоном дипропионатом), LB32 (конъюгат с триамцинолоном ацетонидом), LB33 (конъюгат с преднизоном), LB34 (конъюгат с преднизолоном), LB35 (конъюгат с метилпреднизолоном), LB36 (конъюгат с бетаметазоном), LB37 (конъюгат с аналогом иринотекана), LB38 (конъюгат с аналогом кризотиниба), LB39 (конъюгат с аналогом бортезомиба), LB40 (конъюгат с аналогом карфилзомиба), LB41 (конъюгат с аналогом карфилзомиба), LB42 (конъюгат с аналогом лейпролида), LB43 (конъюгат с аналогом трипторелина), LB44 (конъюгат с клиндамицина), LB45 (конъюгат с аналогом лираглутида) , LB46 (конъюгат с аналогом семаглутида), LB47 (конъюгат с аналогом ретапамулина), LB48 (конъюгат с аналогом инбулина), LB49 (конъюгат с аналогом винбластина), LB50 (конъюгат с аналогом ликсисенатида), LB51 (конъюгат с аналогом осимертиниба), LB52 (конъюгат с аналогом неуклеозида), LB53 (конъюгат с аналогом эрлотиниба) и LB54 (конъюгат с аналогом лапатиниба), которые представлены следующими структурами:



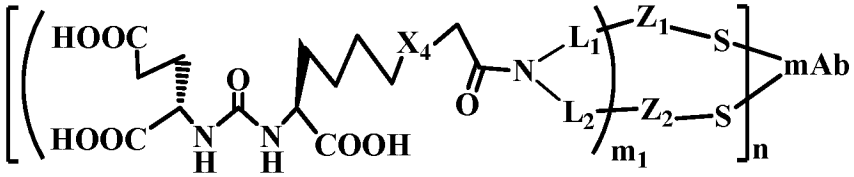
LB01 (конъюгат с фолатом),



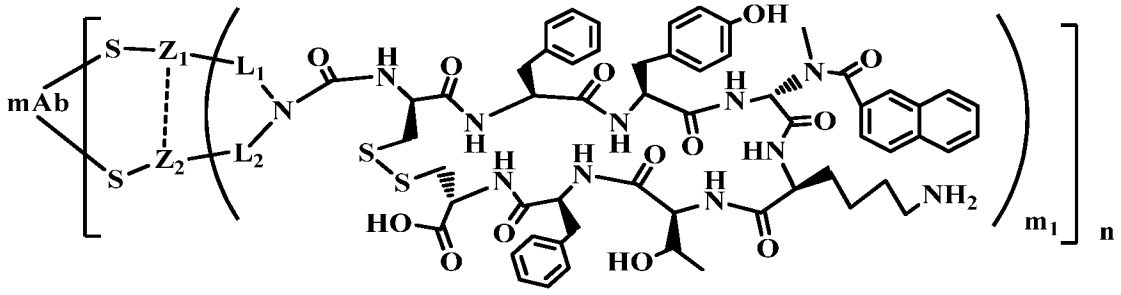
LB02 (конюгат с лигандом PMSA),



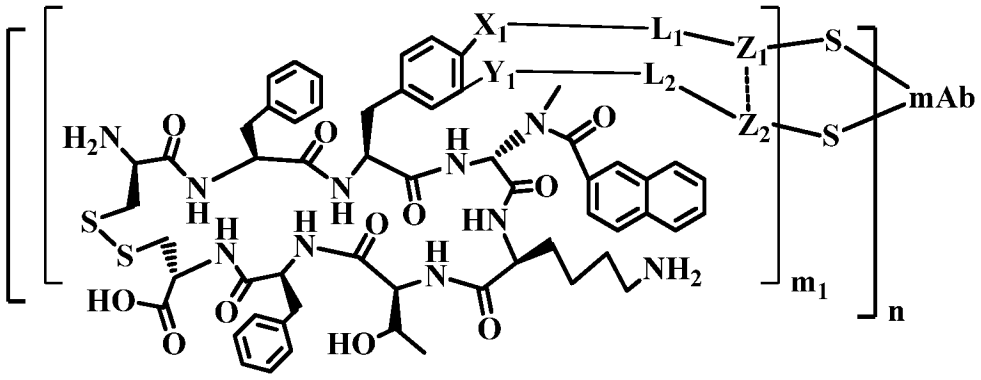
LB03 (конюгат с лигандом PMSA),



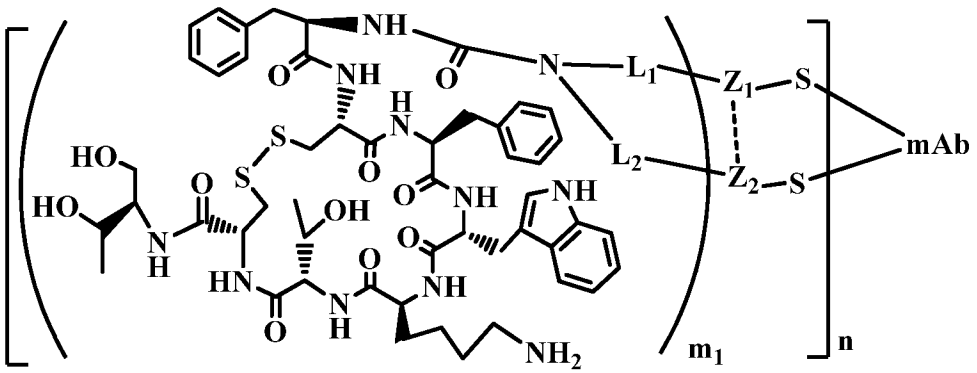
LB04 (конюгат с лигандом PMSA),



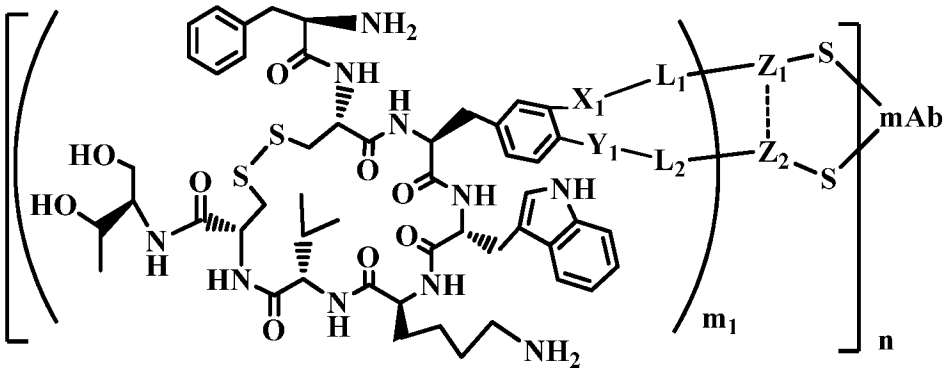
LB05 (конюгат с соматостатином),



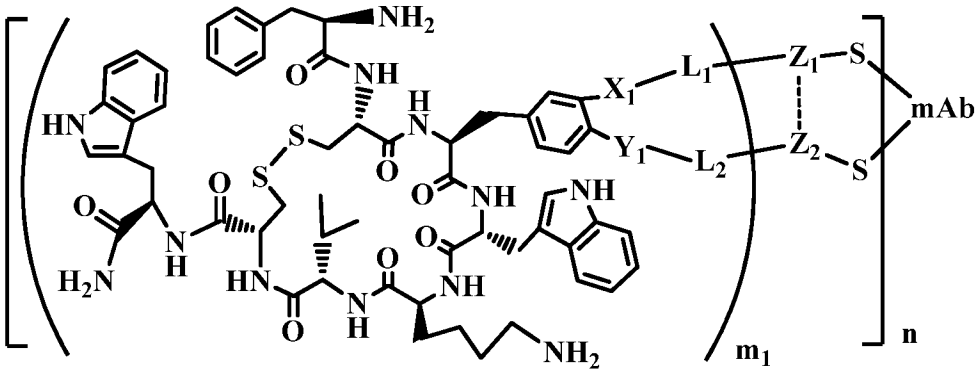
LB06 (конюгат с соматостатином),



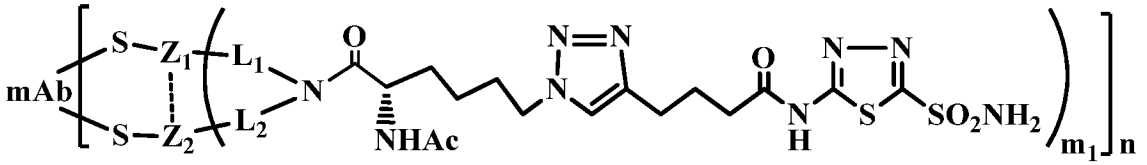
LB07 (октреотид, конъюгат с аналогом соматостатина),



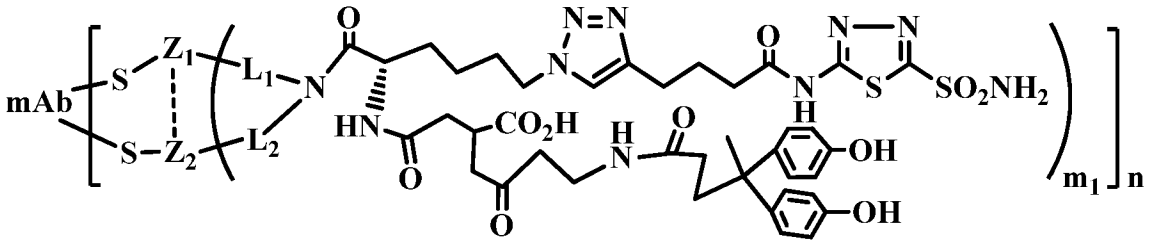
LB08 (ланреотид, конъюгат с аналогом соматостатина),



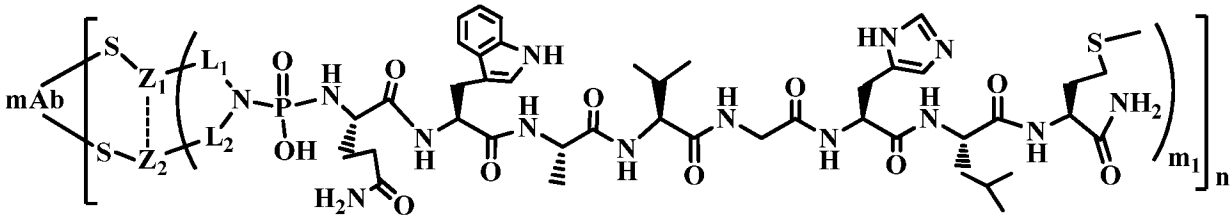
LB09 (вапреотид(санвар), конъюгат с аналогом соматостатина),



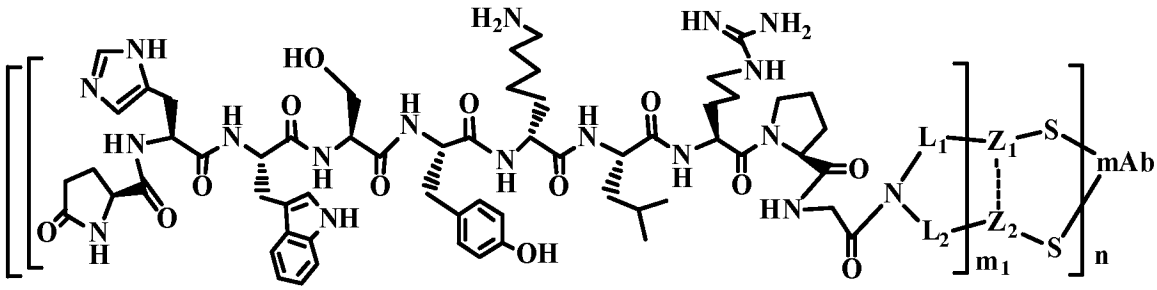
LB10 (конъюгат с лигандом CAIX),



LB11 (конъюгат с лигандом CAIX),

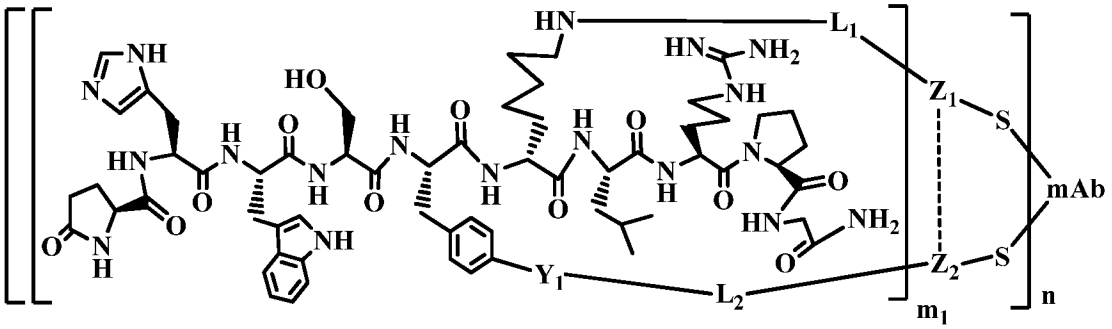


LB12 (рецептор высвобождающего гастрин пептида (GRPr), конъюгат MBA),

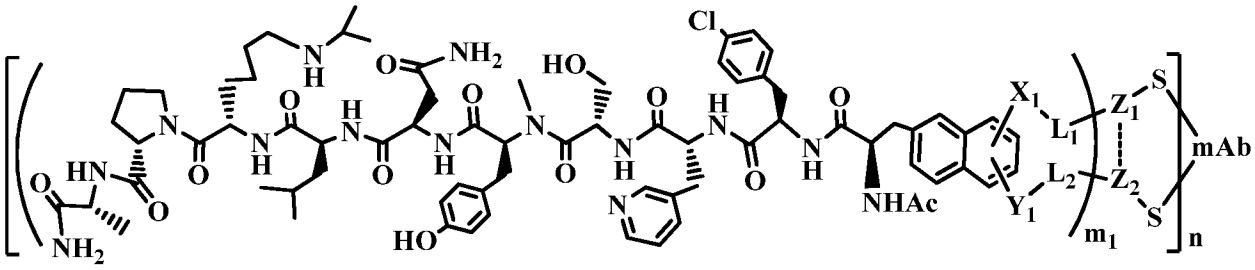


LB13

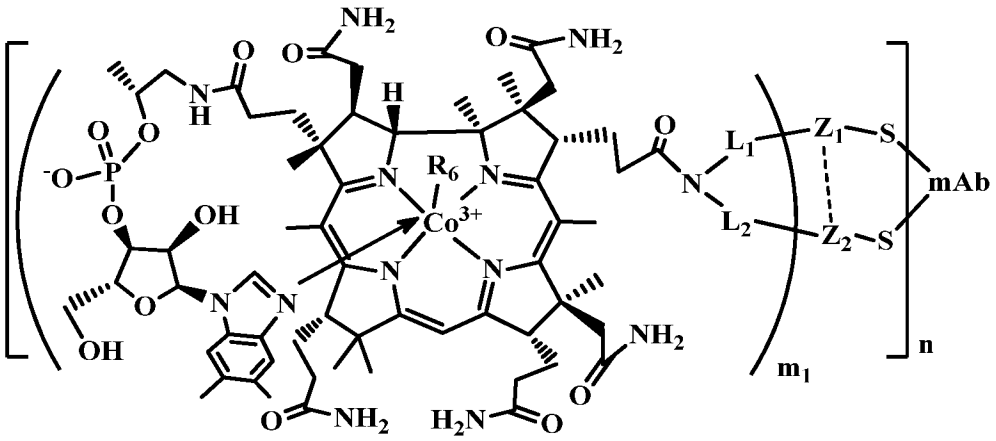
(конъюгат лиганд рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LH-RH) и GnRH),



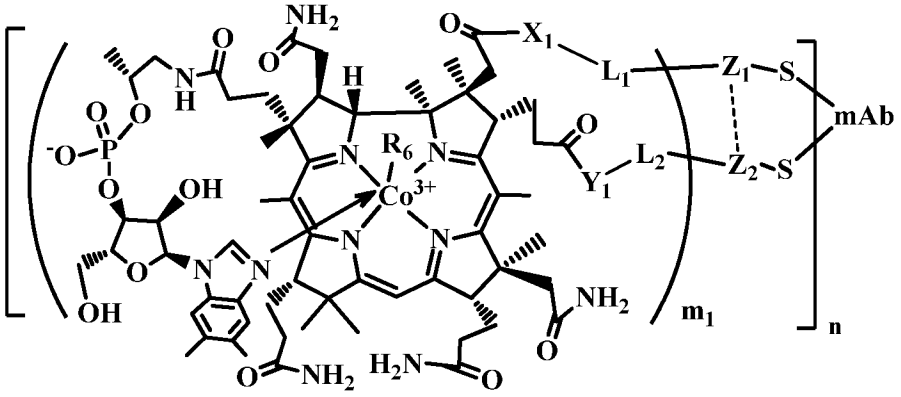
LB14 (конъюгат лиганд рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LH-RH) и GnRH-лиганда),



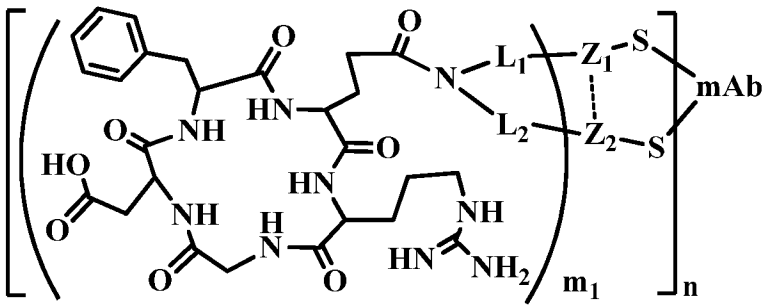
LB15 (антагонист GnRH, абареликс конъюгат),



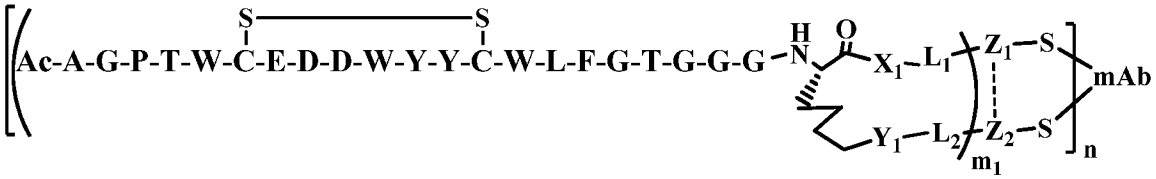
LB16 (кобаламин, конъюгат с аналогом витамина B12),



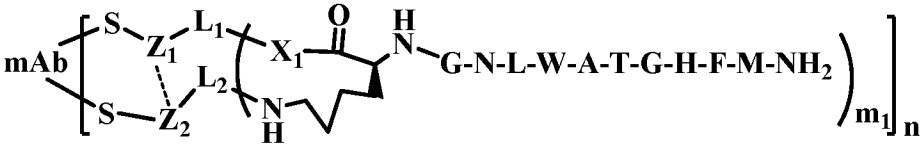
LB17 (кобаламин, конъюгат с аналогом витамина B12),



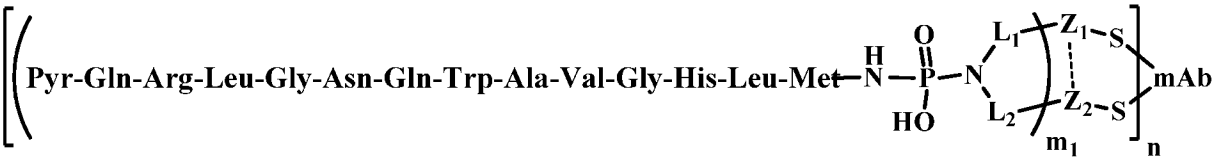
LB18 (пентапептидный циклический RGD конъюгат для рецептора интегрина αvβ3),



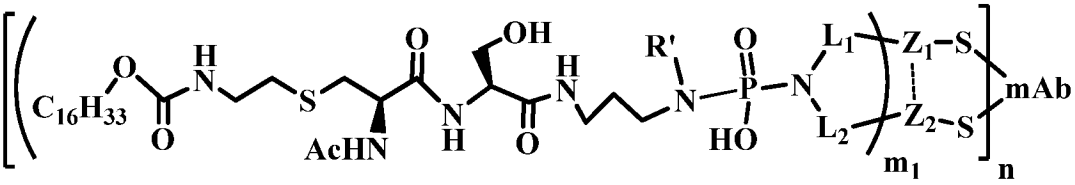
LB19 (конъюгат гетеро-двухвалентного пептидного лиганда рецептора VEGF),



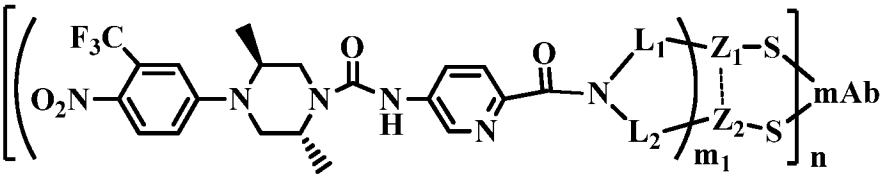
LB20 (конъюгат нейромедина B),



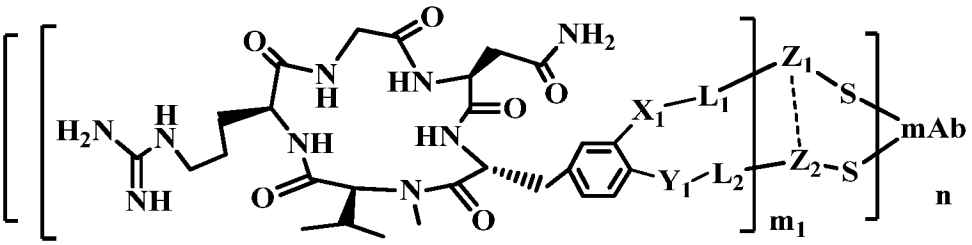
LB21 (конъюгат бомбезина для рецептора, сопряженного с G-белком),



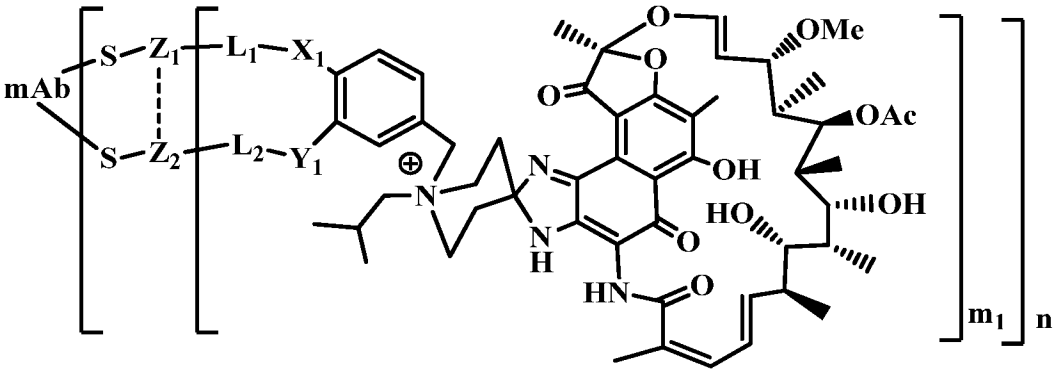
LB22 (конъюгат TLR_2 для Toll-подобного рецептора)



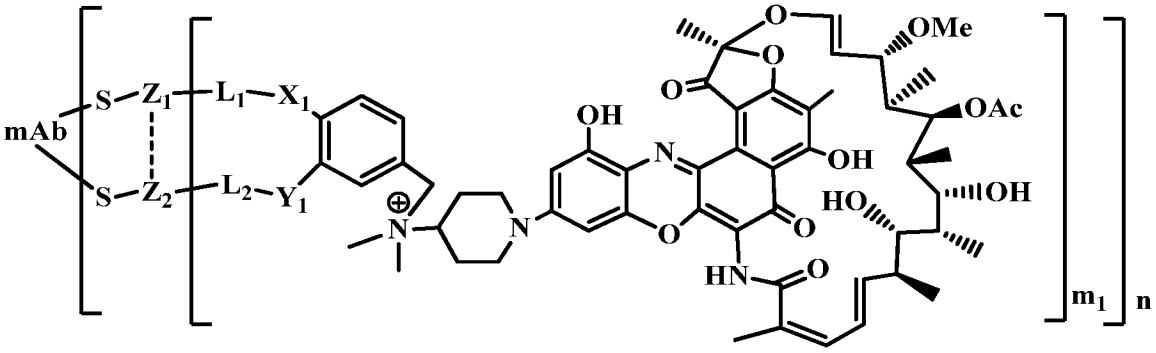
LB23 (для рецептора андрогена),



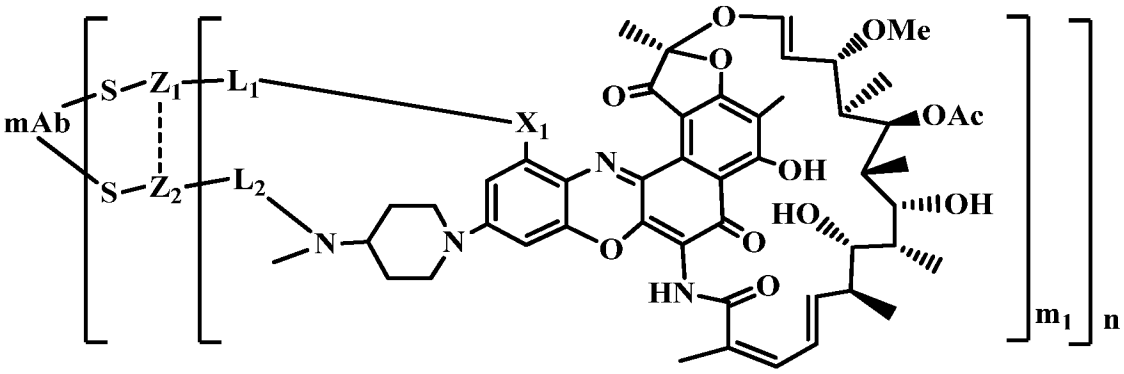
LB24 (циленгитид/цикло(-RGDfV-) конъюгат для рецептора интергрина α_v)



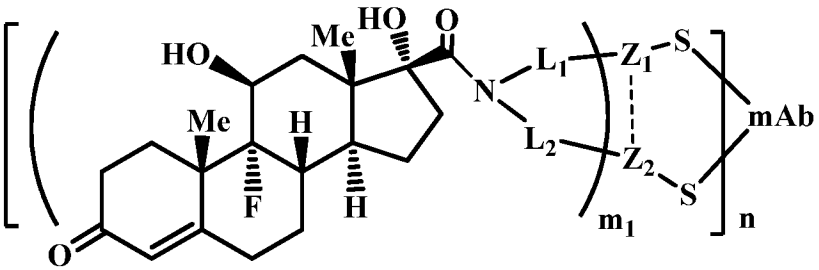
LB25 (конъюгат с аналогом рифабутина),



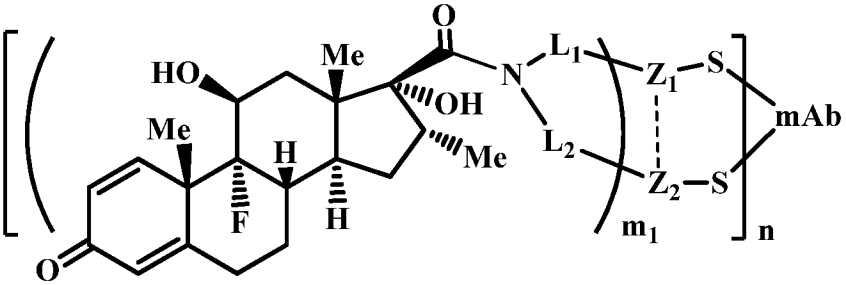
LB26 (конъюгат с аналогом рифабутина),



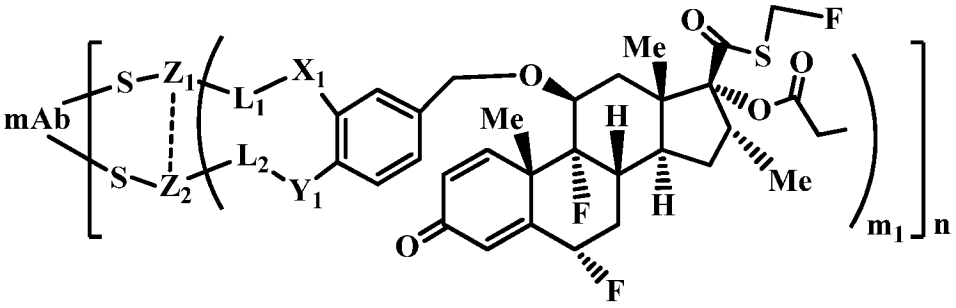
LB27 (конъюгат с аналогом рифабутина),



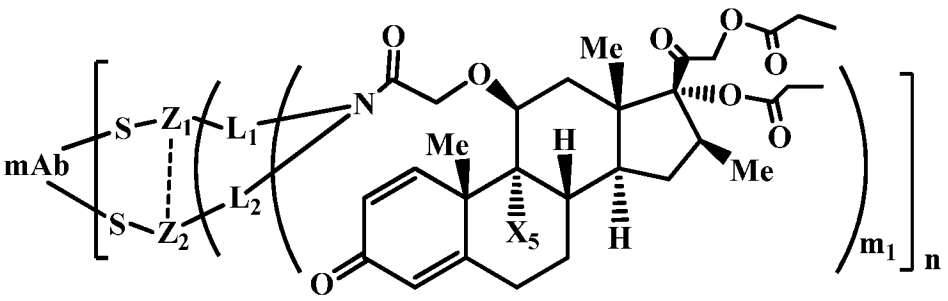
LB28 (конъюгат с флудрокортизоном),



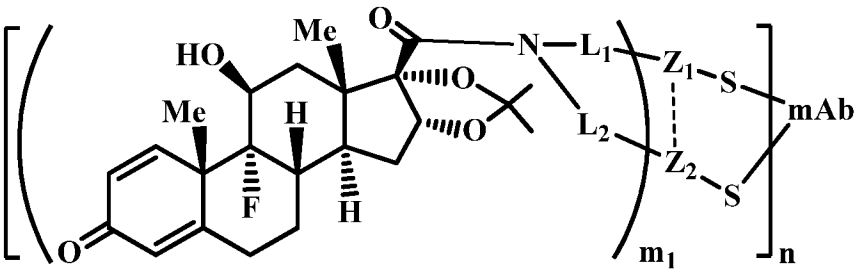
LB29 (конъюгат с дексаметазоном),



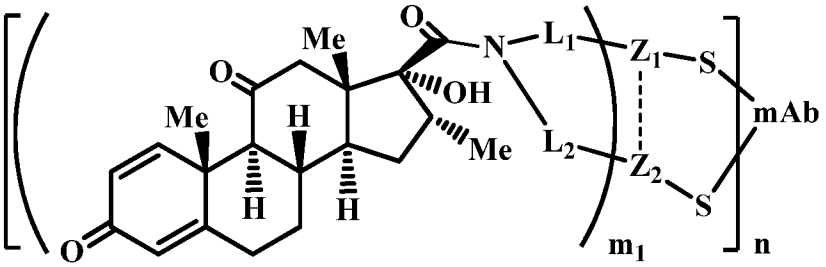
LB30 (конъюгат с флутиказоном пропионатом),



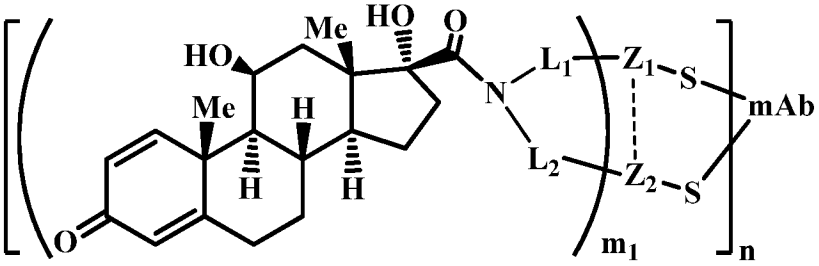
LB31 (конъюгат с беклометазоном дипропионатом),



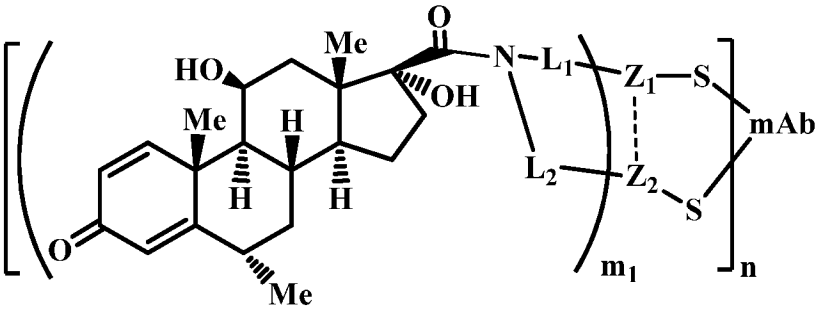
LB32 (конъюгат с триамцинолоном ацетонидом),



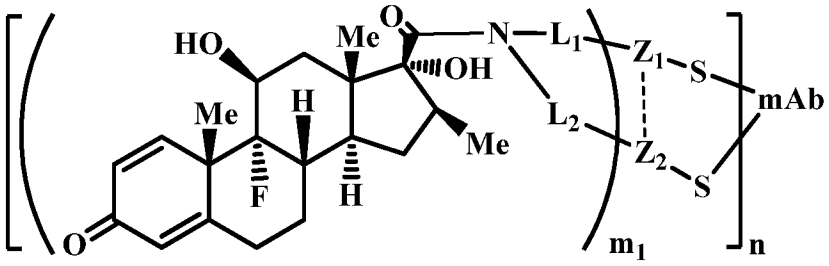
LB33 (конъюгат с преднизоном),



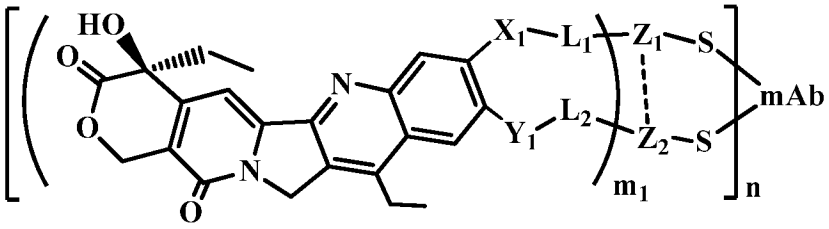
LB34 (конъюгат с преднизолоном),



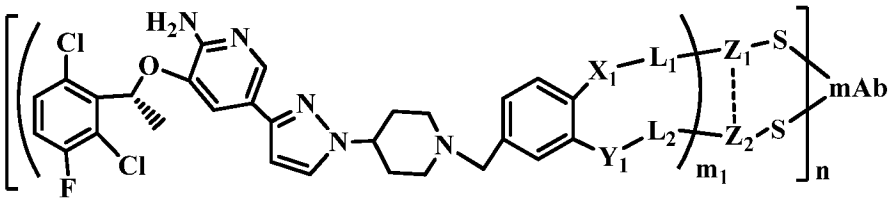
LB35 (конъюгат с метилпреднизолоном),



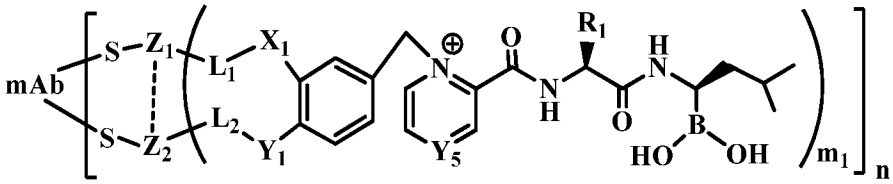
LB36 (конъюгат с бетаметазоном),



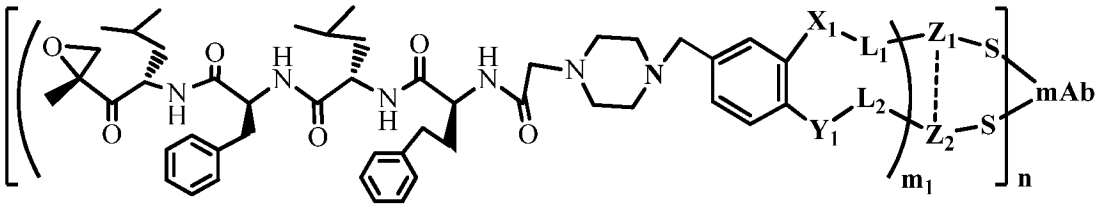
LB37 (конъюгат с аналогом иринотекана),



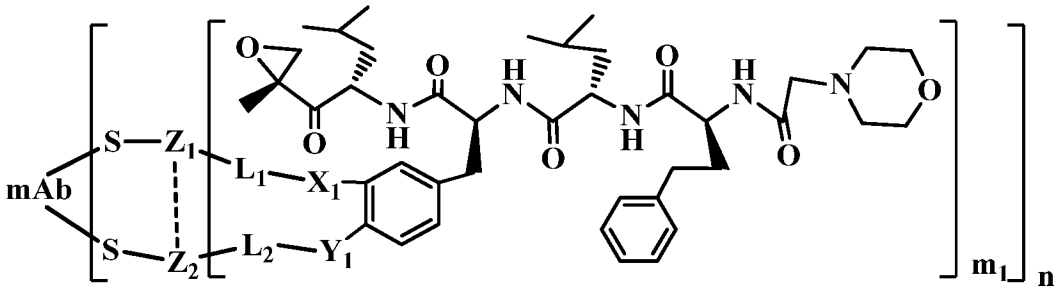
LB38 (конъюгат с аналогом кризотиниба),



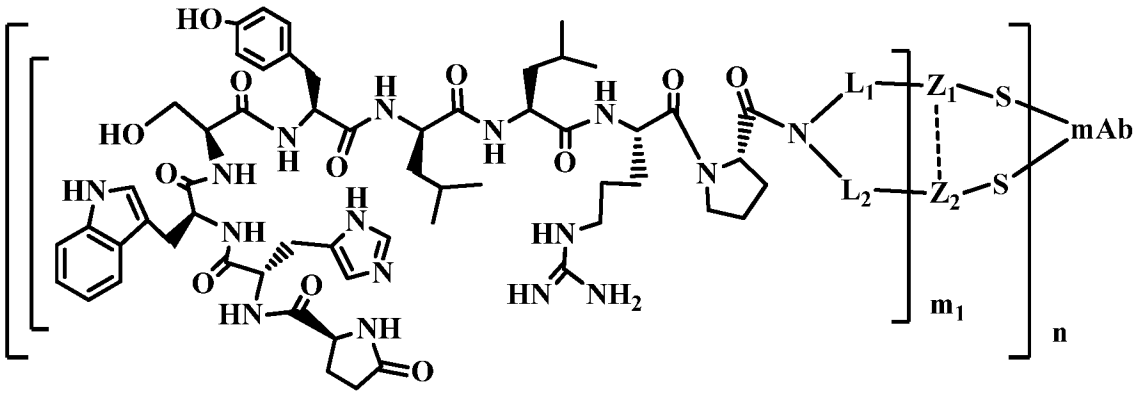
LB39 (конъюгат с аналогом бортезомиба), где Y_5 представляет собой N, CH, C(Cl), $C(CH_3)$ или $C(COOR_1)$; R_1 представляет собой H, C_1-C_6 алкил, C_3-C_8 Ar;



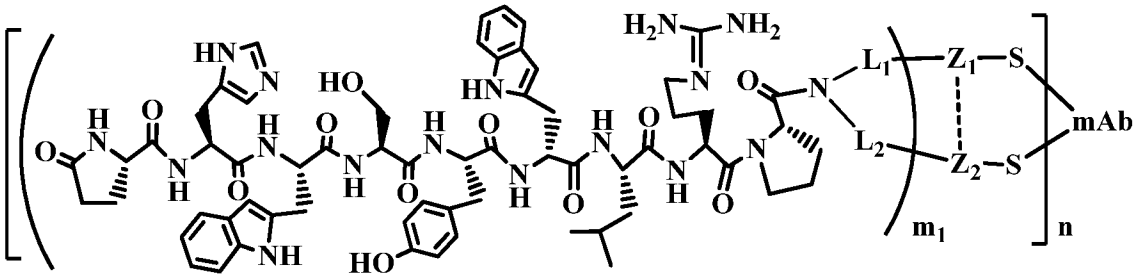
LB40 (конъюгат с аналогом карфилзомиба),



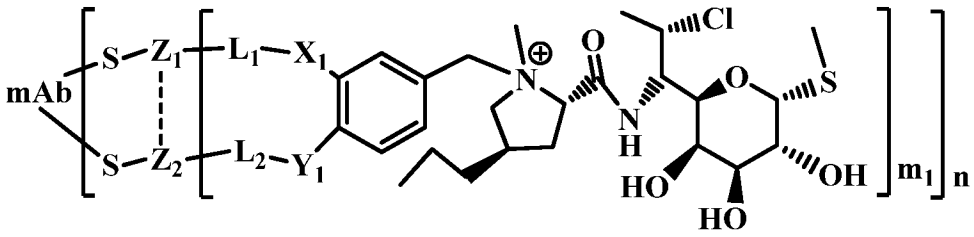
LB41 (конъюгат с аналогом карфилзомиба),



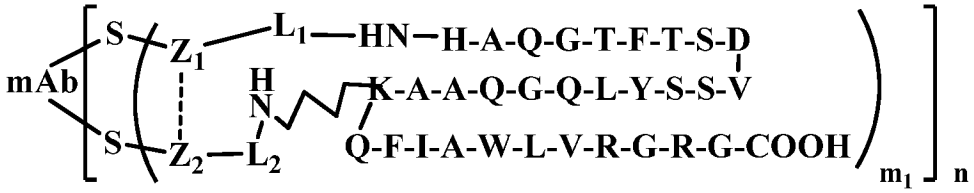
LB42 (конъюгат с аналогом лейпролида),



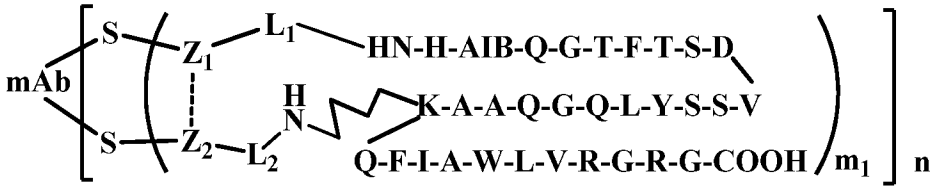
LB43 (конъюгат с аналогом трипторелина),



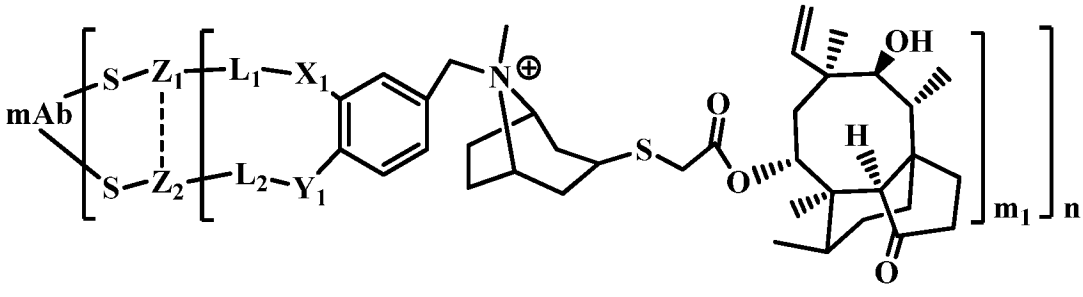
LB44 (конъюгат с клиндамицином),



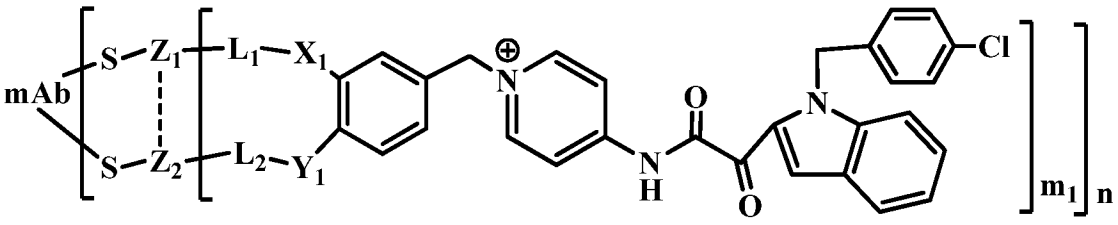
LB45 (конъюгат с аналогом лираглутида),



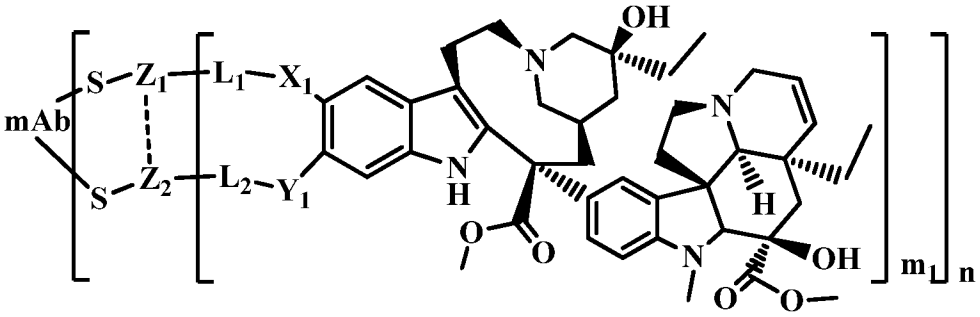
LB46 (конъюгат с аналогом семаглутида),



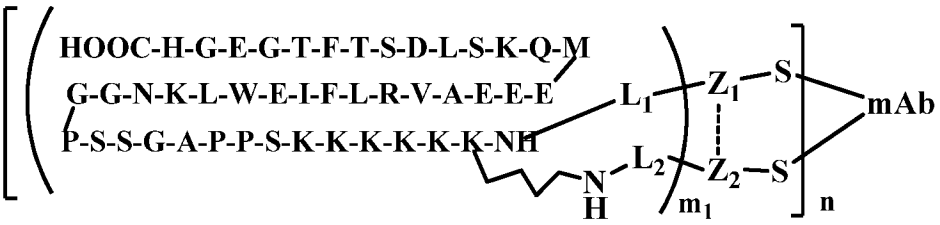
LB47 (конъюгат с аналогом ретапамулина),



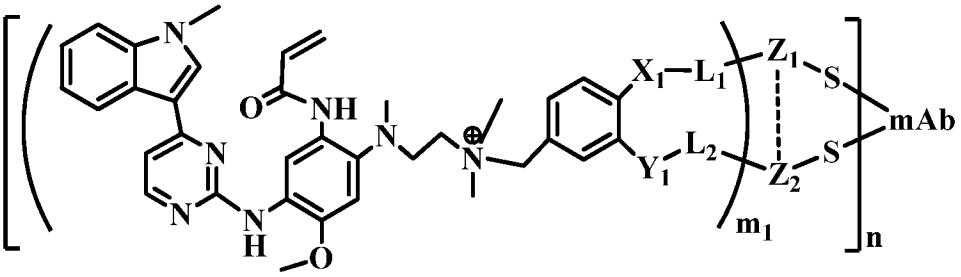
LB48 (конъюгат с аналогом инбулина),



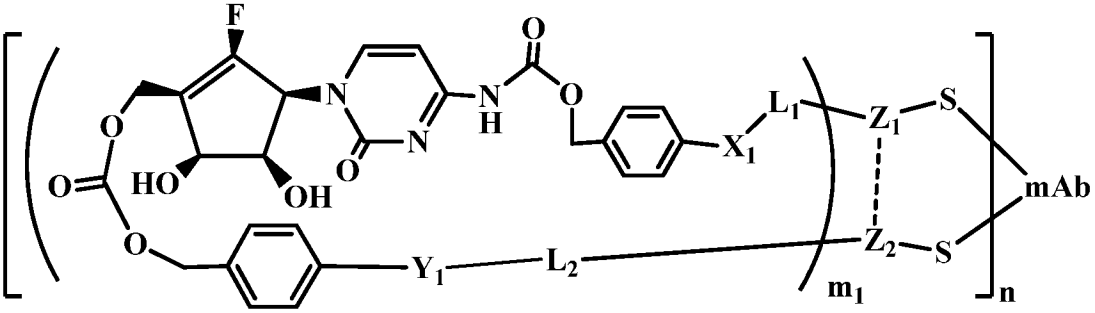
LB49 (конъюгат с аналогом винбластина),



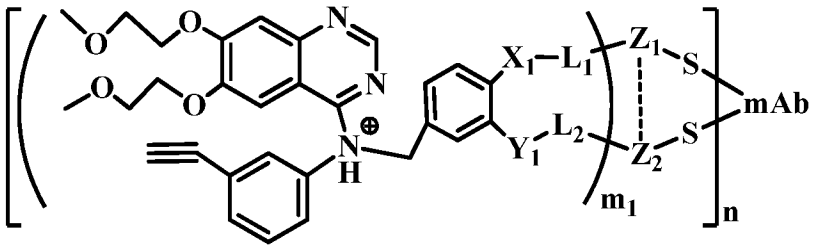
LB50 (конъюгат с аналогом ликсисенатида),



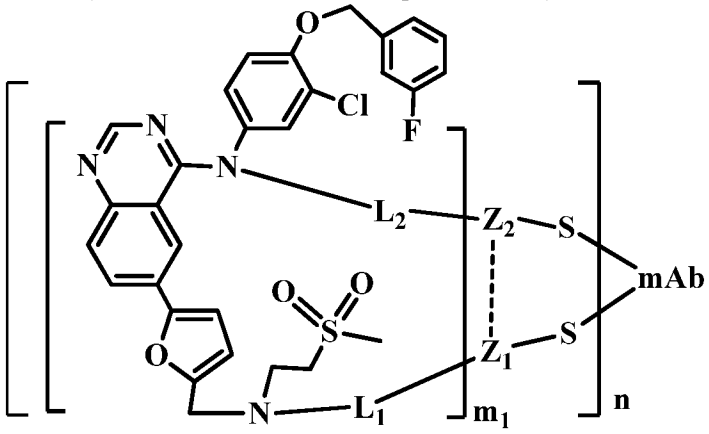
LB51 (конъюгат с аналогом осимертиниба),



LB52 (конъюгат с аналогом неуклеозида),



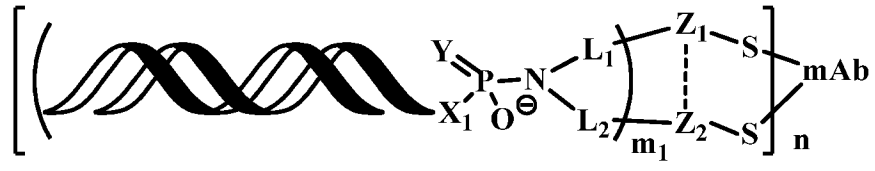
LB53 (конъюгат с аналогом эрлотиниба),



LB54 (конъюгат с аналогом лапатиниба),

где «-----» представляет собой необязательно либо простую связь, либо двойную связь, или отсутствует; X_1 и Y_1 независимо представляют собой O, NH, NHNH, NR_5, S, C(O)O, C(O)NH, OC(O)NH, OC(O)O, NHC(O)NH, NHC(O)S, OC(O)N(R_1), N(R_1)C(O)N(R_1), CH, C(O)NHNHC(O) и C(O)NR_1; mAb представляет собой антитело; n и m_1 независимо равны 1-20; X_3 представляет собой CH_2, O, NH, NHC(O), NHC(O)NH, C(O), OC(O), OC(O)(NR_3), R_1, NHR_1, NR_1, C(O)R_1 или отсутствует; X_4 представляет собой H, CH_2, OH, O, C(O), C(O)NH, C(O)N(R_1), R_1, NHR_1, NR_1, C(O)R_1 или C(O)O; X_5 представляет собой H, CH_3, F, или Cl; M_1 и M_2 независимо представляют собой H, Na, K, Ca, Mg, NH_4, $NR_1R_2R_3$; R_6 представляет собой 5'-деоксиаденозил, Me, OH, или CN; L_1, L_2, R_1, R_1', R_2, Z_1 и Z_2 являются такими, как определено в п. **1**.

31. Конъюгат по п. 1, в котором цитотоксическая молекула представляет собой ДНК, РНК, мРНК, малую интерферирующую РНК (миРНК), микроРНК (микроРНК), или PIWI взаимодействующие РНК (пиРНК); конъюгат выбран из структуры SI-1.

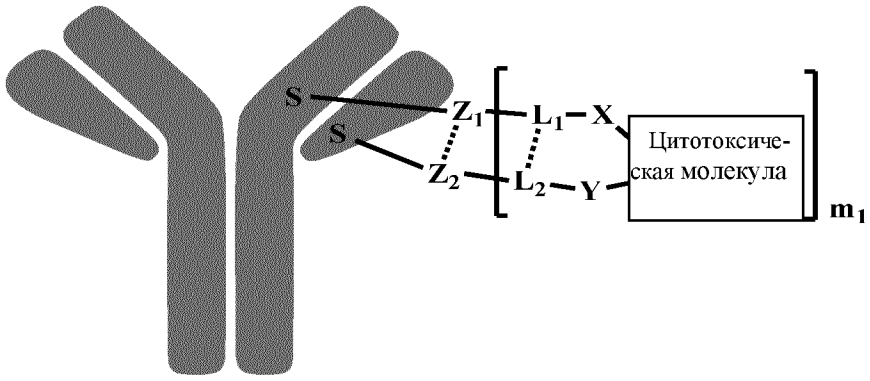


SI-1,

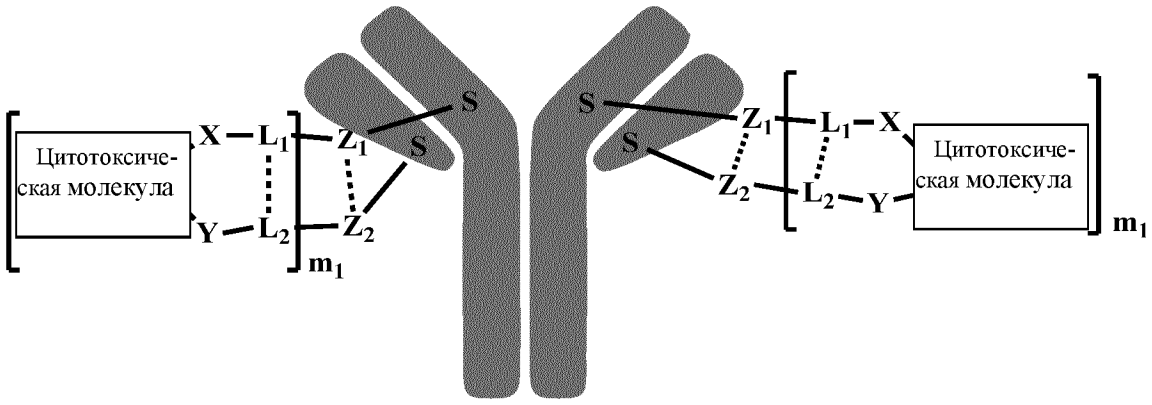
где mAb, m_1, n, X_1, L_1, L_2, Z_1, Z_2, «-----» являются такими, как определено в п. 1;

 представляет собой одинарные или двуцепочечные ДНК, РНК, мРНК, миРНК, микроРНК или пиРНК; Y представляет собой O, S, NH или CH_2.

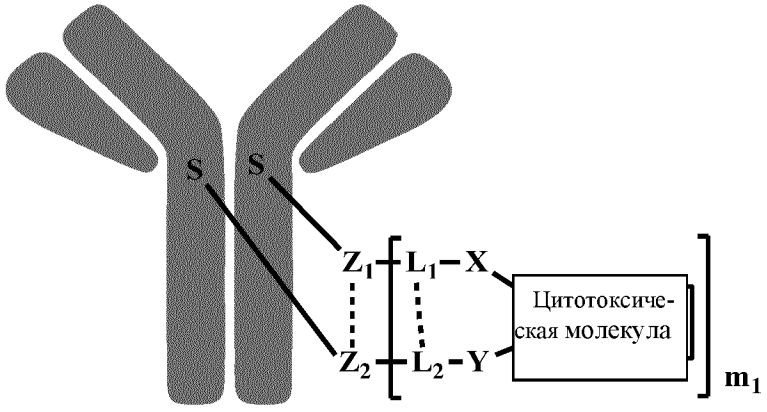
32. Конъюгат по любому из пп. **1, 3**, **5,** 7, **10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30** или **31,** в котором молекула/агент, связывающаяся с клеткой, выбрана из IgG антитела, моноклонального антитела или IgG антитело-подобного белка, конъюгат, который специфически конъюгирован с парой тиолов, полученных с помощью восстановления дисульфидных связей молекулы/агента, связывающейся с клеткой, между легкой цепью и тяжелой цепью, верхней дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями и нижней дисульфидной связи между двумя тяжелыми цепями, имеющими следующую структуру ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 или ST6:



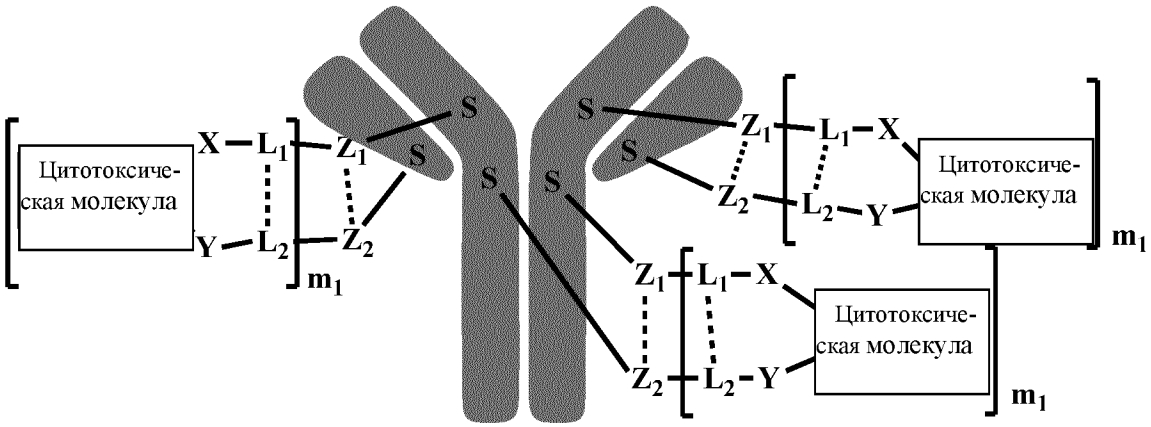
ST1,



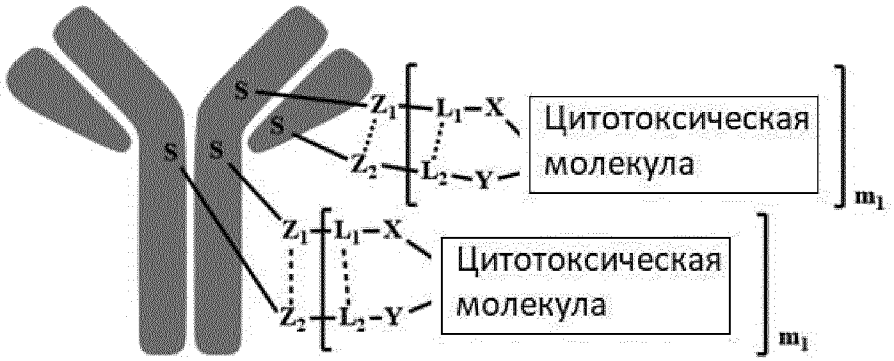
ST2,



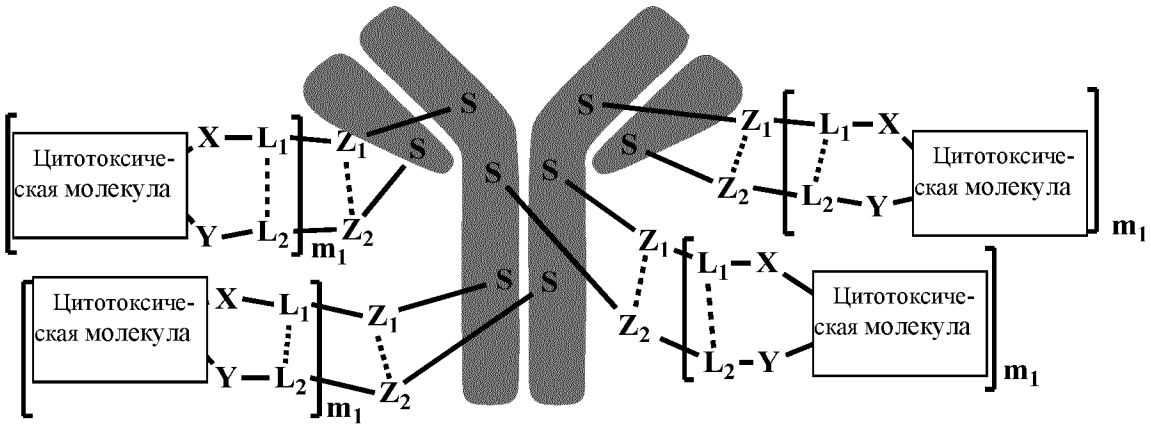
ST3,



ST4,



ST5



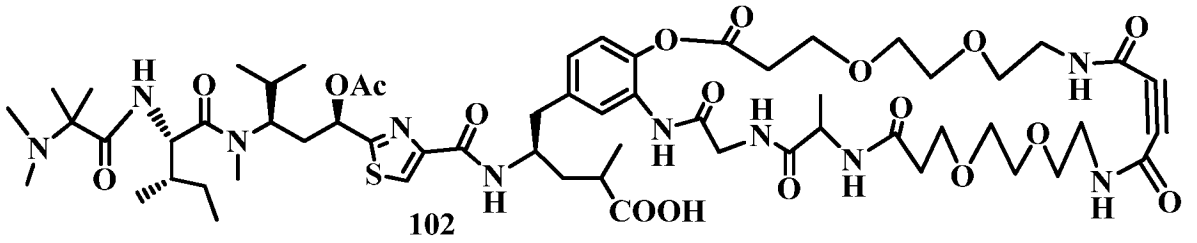
ST6,

где Z_1, Z_2, X, Y, L_1, L_2, «-----», m_1 и цитотоксическая молекула являются такими, как определено в п. 1.

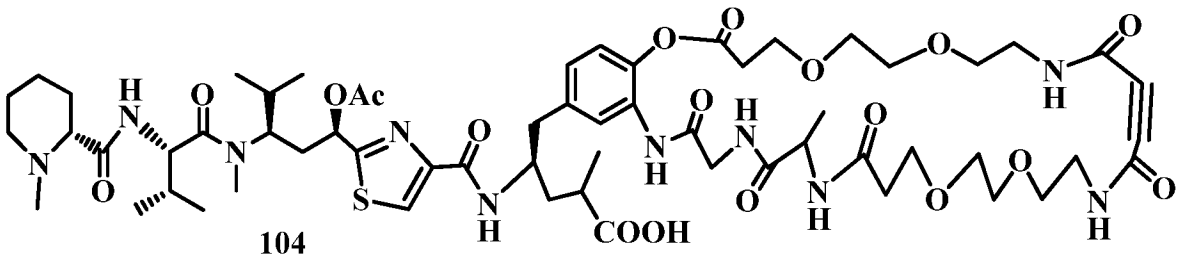
33. Конъюгат по п. **32**, в котором цитотоксические молекулы и m_1 в разных сайтах конъюгирования молекулы, связывающейся с клеткой, могут отличаться, когда цитотоксические молекулы, содержащие одинаковые или разные бис-линкеры, последовательно конъюгируют с молекулой, связывающейся с клеткой, или когда разные цитотоксические молекулы, содержащие одни и те же или разные бис-линкеры добавляют поэтапно в реакционную смесь для конъюгирования, содержащую молекулу, связывающуюся с клеткой.

34. Конъюгат по любому из пп. **32** или **33**, в котором цитотоксический агент выбран из тубулизинов, майтансиноидов, таксаноидов (таксанов), аналогов CC-1065, даунорубицинов и доксорубицинов, индолкарбоксамида, димеров бензодиазепинов, димеров пирролобензодиазепина (PBD), димеров томаямицина, димеров антрамицинов, димеров индолинобензодиазепинов, димеров имидазолобензотиазепинов или димеров оксазолидинобензодиазепинов, калихеамицинов и энедииновых антибиотиков, актиномицинов, азасеринов, блеомицинов, эпирубицинов, эрибулина, тамоксифена, идарубицина, доластатинов, ауристатинов (включая монометилауристатин E, MMAE , MMAF, ауристатин PYE, ауристатин TP, ауристатины 2-AQ, 6-AQ, EB (AEB), EFP (AEFP) и их аналоги), дуокармицинов, гелданамицинов или других ингибиторов HSP90 , сентанамицинов, метотрексатов, тиотепы, виндезинов, винкристинов, гемиастерлинов, назумамидов, микрогининов, радиозуминов, стрептонигтина, SN38 или других аналогов, или метаболитов камптотецина, альтеробактинов, микросклеродерминов, теонелламидов, эсперамицинов, PNU-159682, и их аналогов или производных, фармацевтически приемлемых солей, кислот, производных, гидрата или гидратированной соли, кристаллической структуры, оптического изомера, рацемата, диастереомера или энантиомера любого из его вышеуказанных лекарственных средств; или цитотоксической молекулы/соединения, описанного в п. **10**.

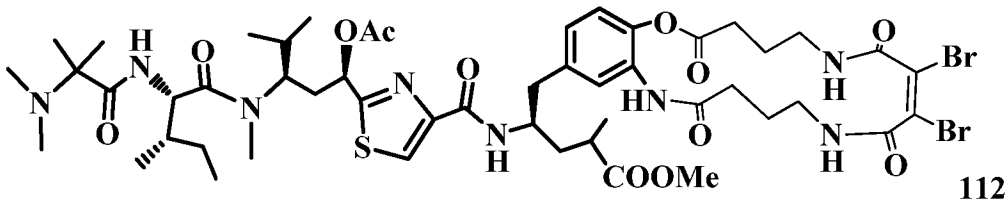
35. Соединение Формулы (II) по п. 2, имеющее следующие структуры:



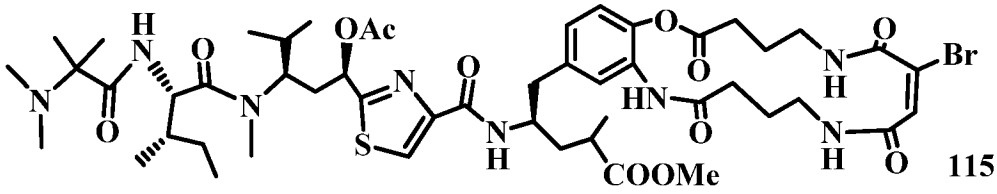
102,



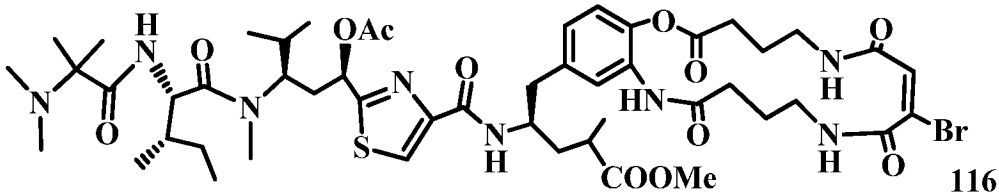
104,



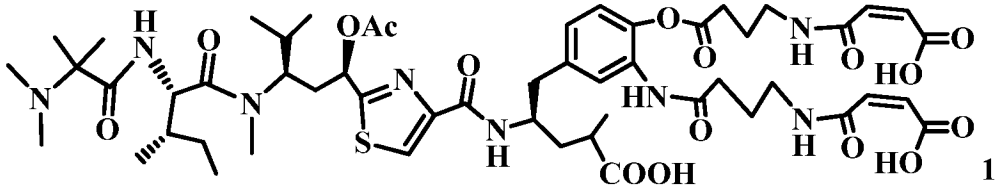
112,



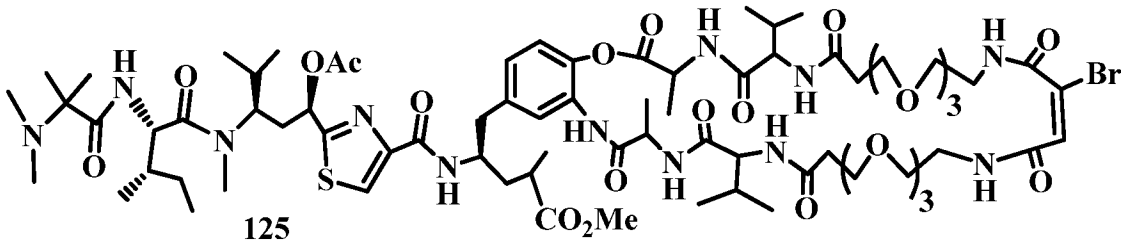
115,



116,

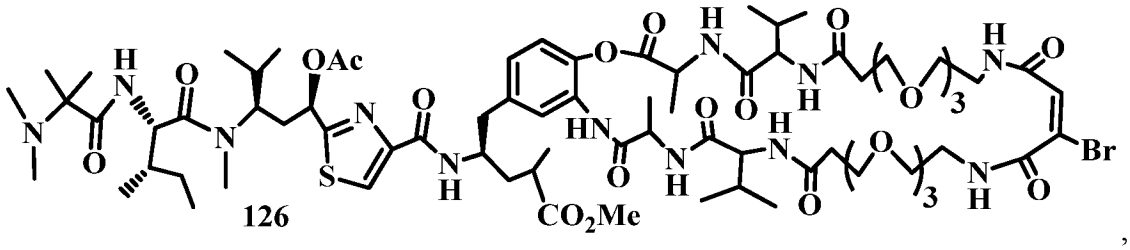


119,



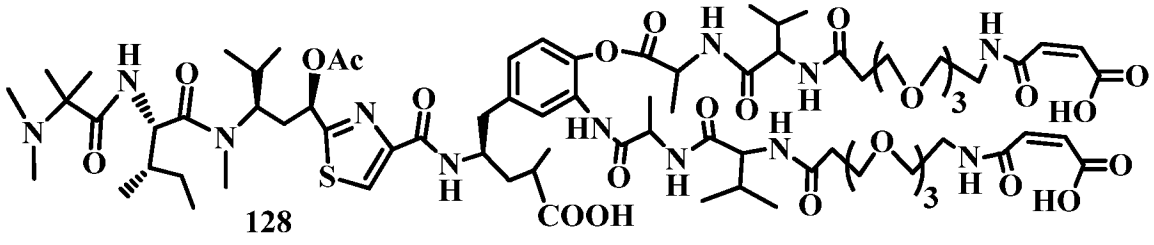
125

,



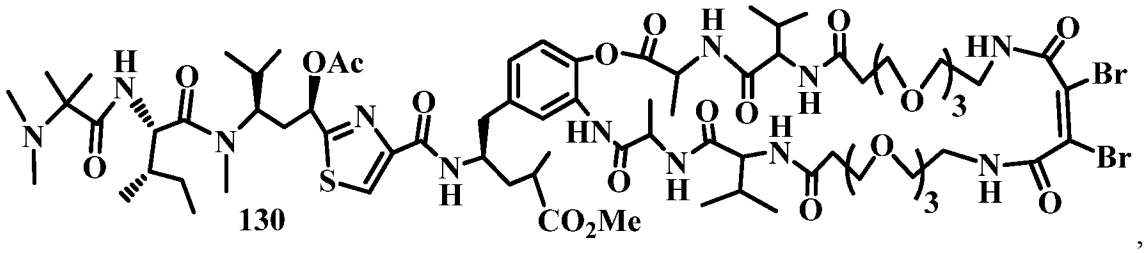
126

,



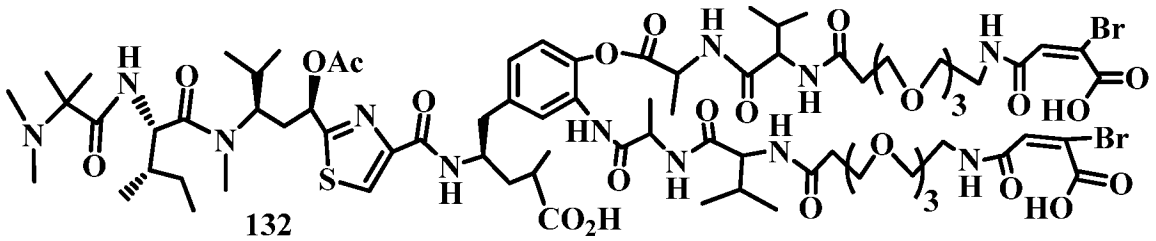
128

,

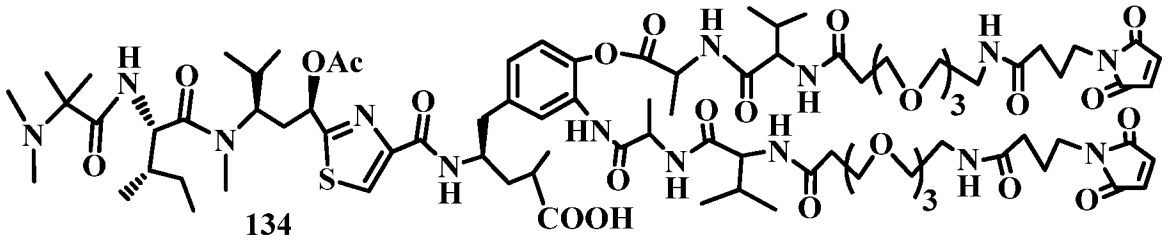


130

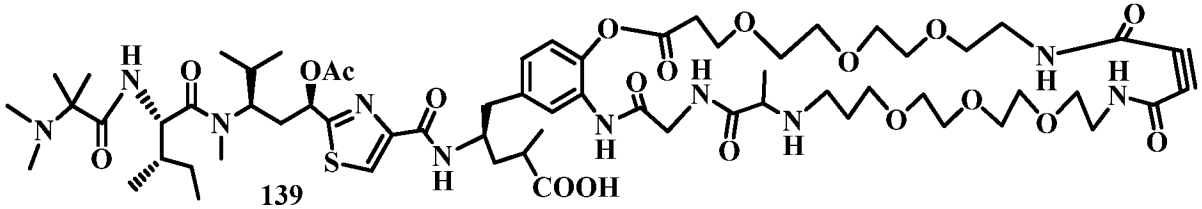
,



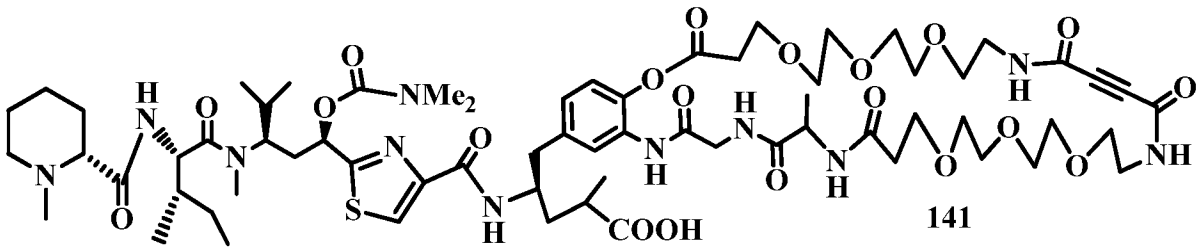
132 ,



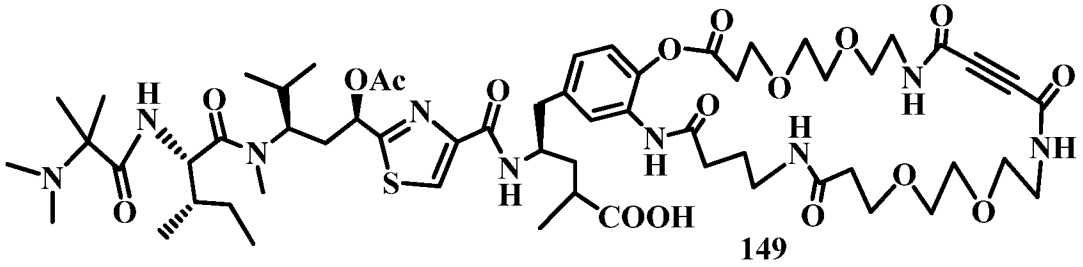
134 ,



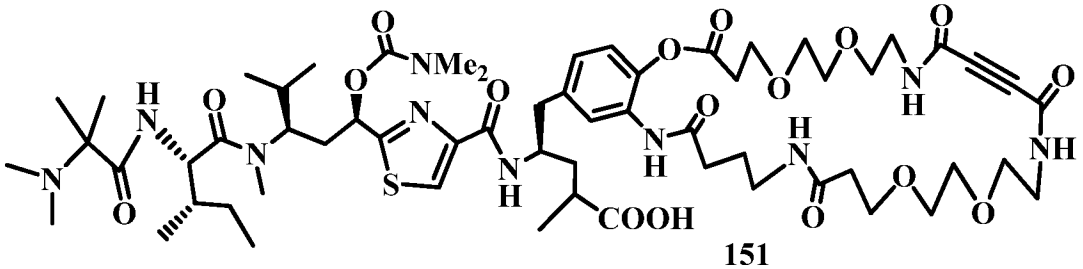
139 ,



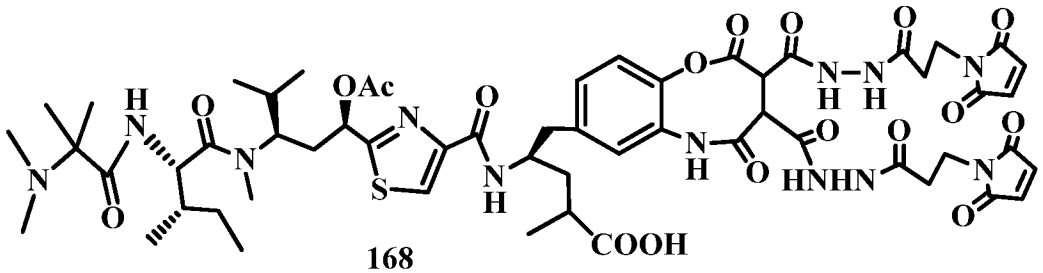
141 ,



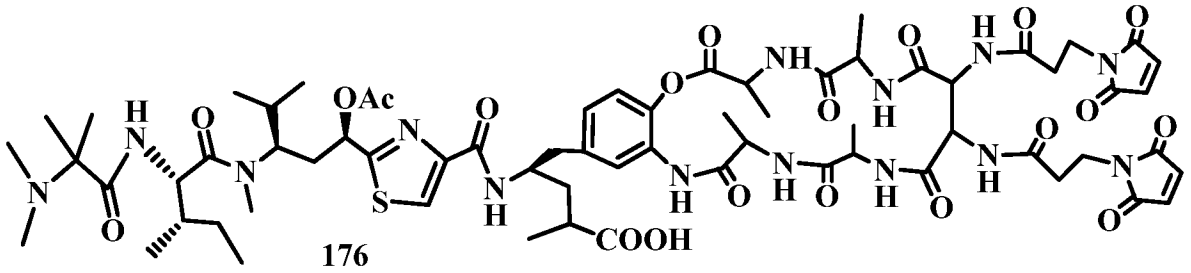
149 ,



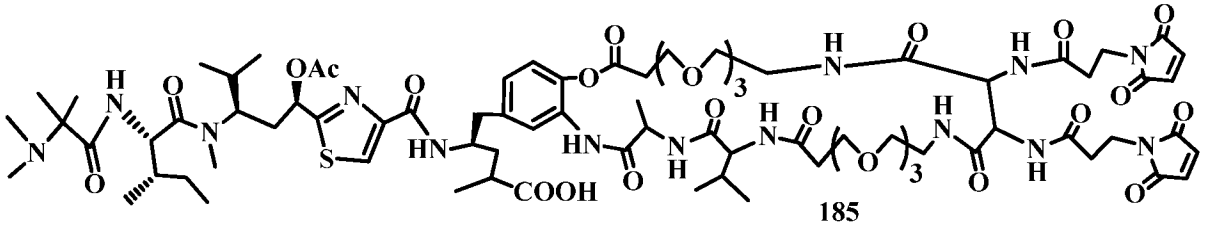
151 ,



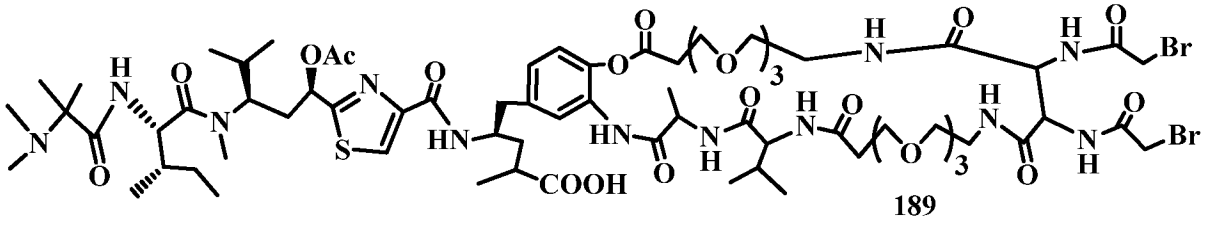
168 ,



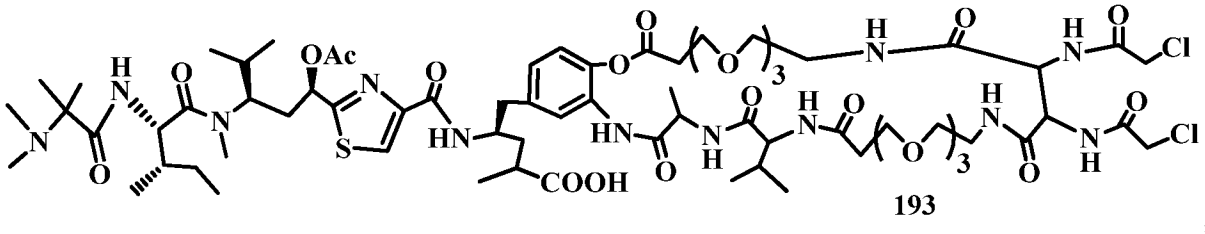
176 ,



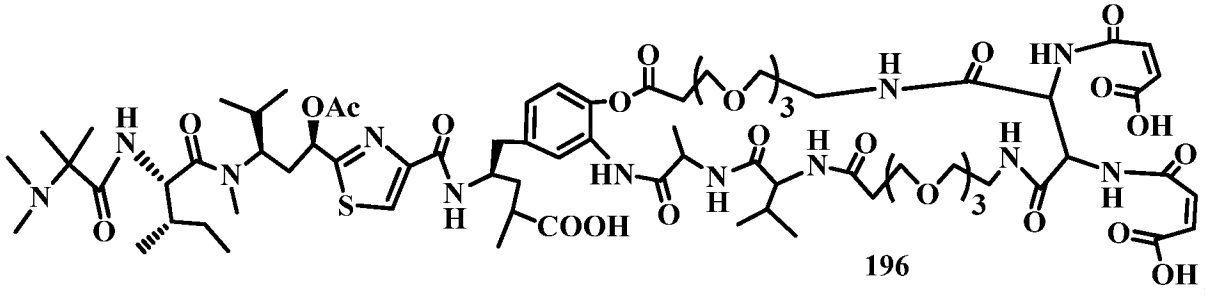
185 ,



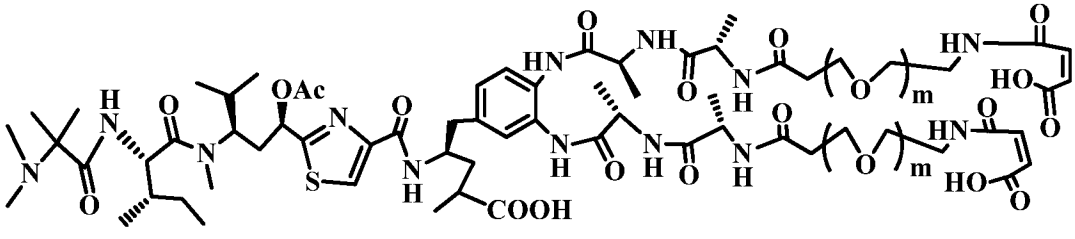
189 ,



193 ,

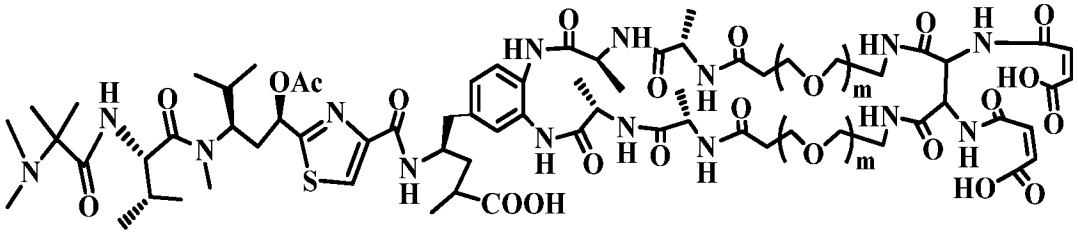


196 ,



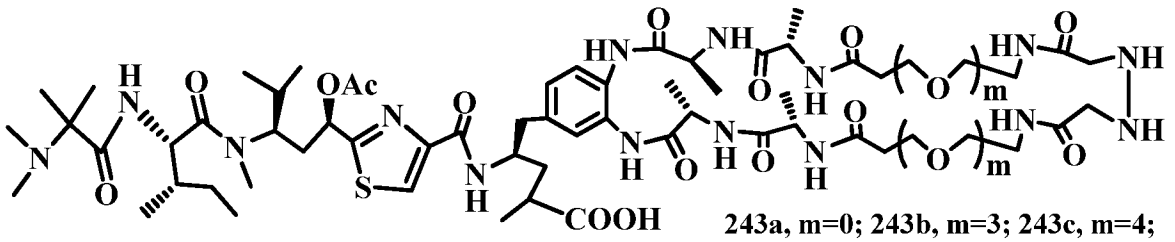
216a, m=0
216b, m=3
216c, m=4
216d, m=6
216d, m=8
216e, m=12

,



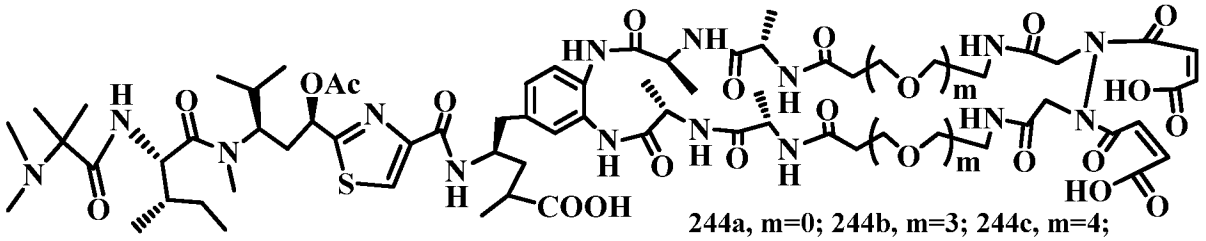
222a, m=0
222b, m=3
222c, m=4
222d, m=6
222d, m=8
222e, m=12

,



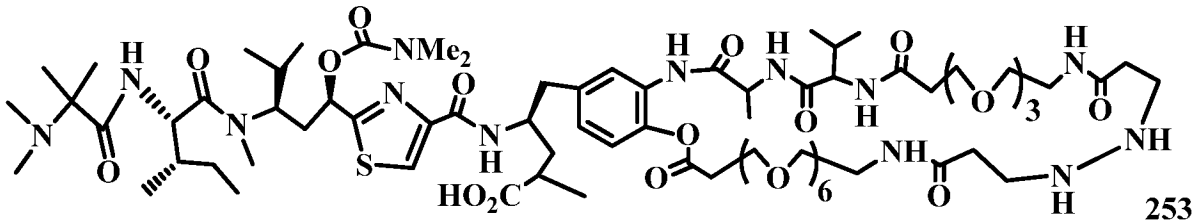
243a, m=0; 243b, m=3; 243c, m=4;
243d, m=6; 243d, m=8; 243e, m=12.

,



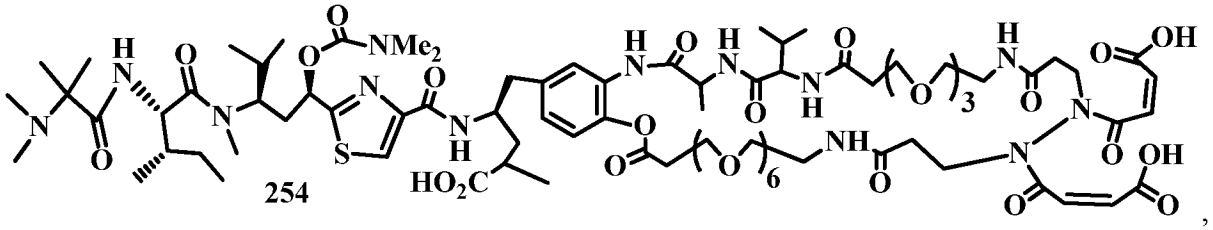
244a, m=0; 244b, m=3; 244c, m=4;
244d, m=6; 244d, m=8; 244e, m=12.

,



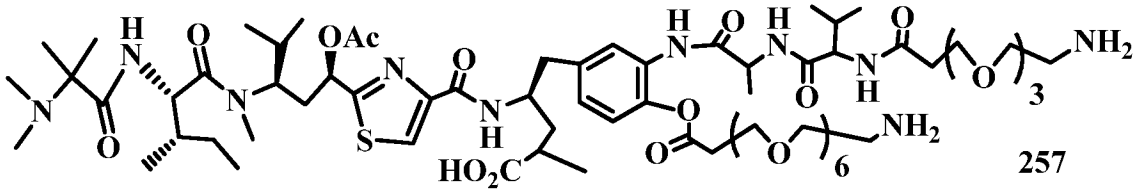
253

,



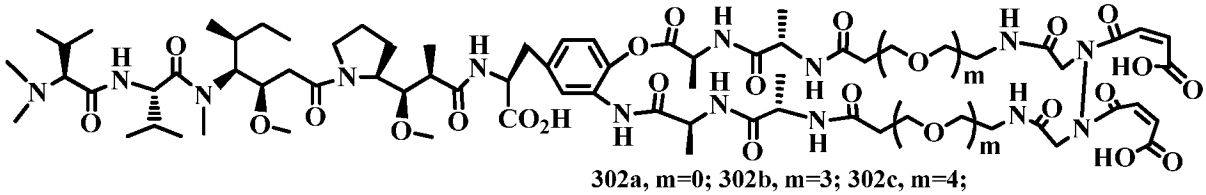
254

,



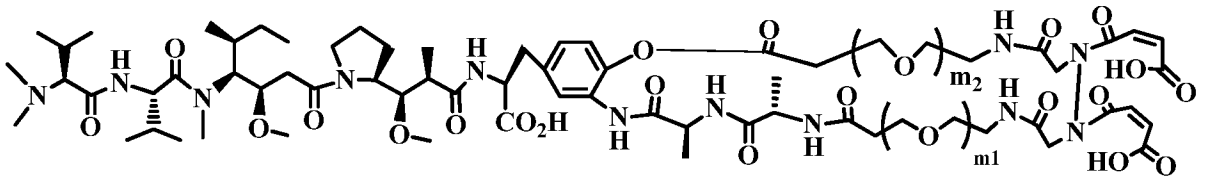
257

,

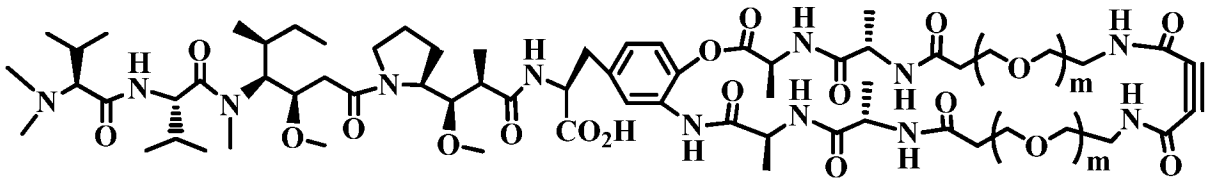


302a, m=0; 302b, m=3; 302c, m=4;
302d, m=6; 302d, m=8; 302e, m=12

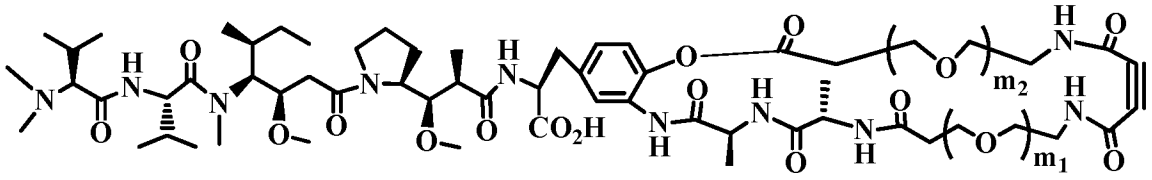
,



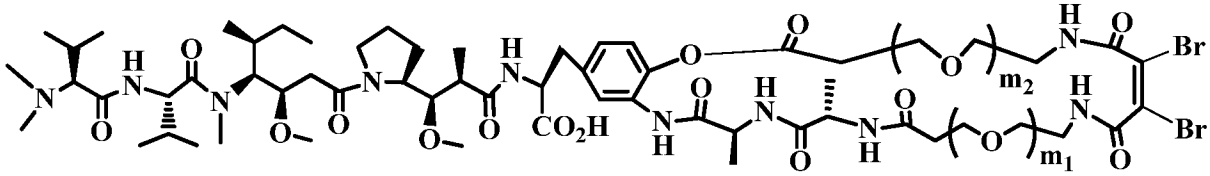
311a, m_1=0, m_2=4; 311b, m_1=2, m_2=6; 311c, m_1=4, m_2=12



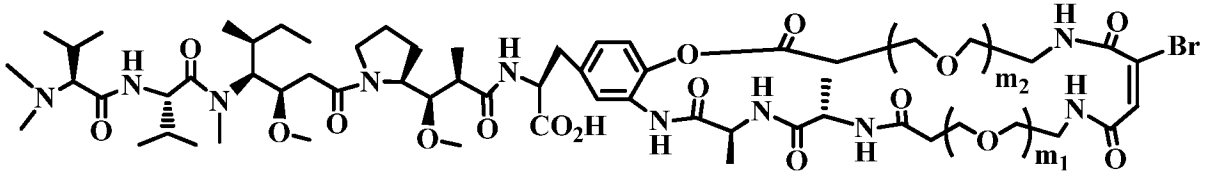
315a, m=0; 315b, m=3; 315c, m=4;
315d, m=6; 315d, m=8; 315e, m=12



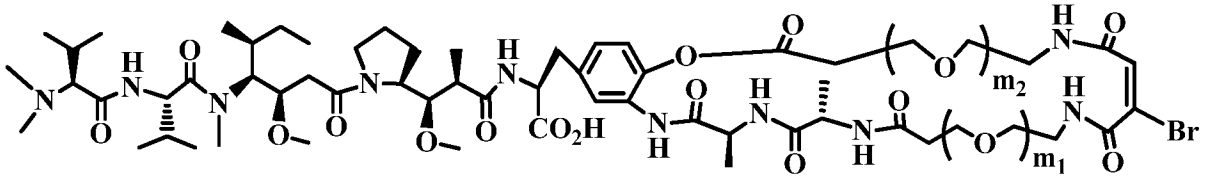
319a, m_1=0, m_2=4; 319b, m_1=2, m_2=6; 319c, m_1=4, m_2=12.



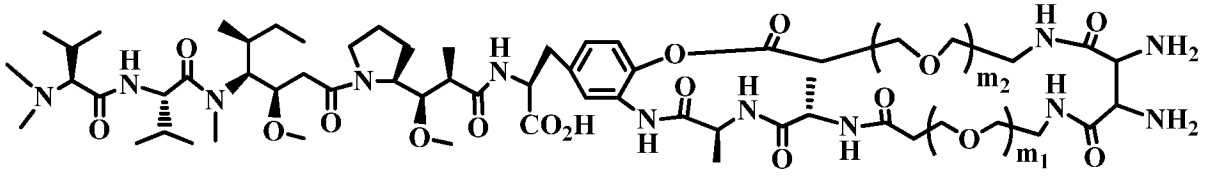
324a, m_1=0, m_2=4; 324b, m_1=2, m_2=6; 324c, m_1=4, m_2=12.



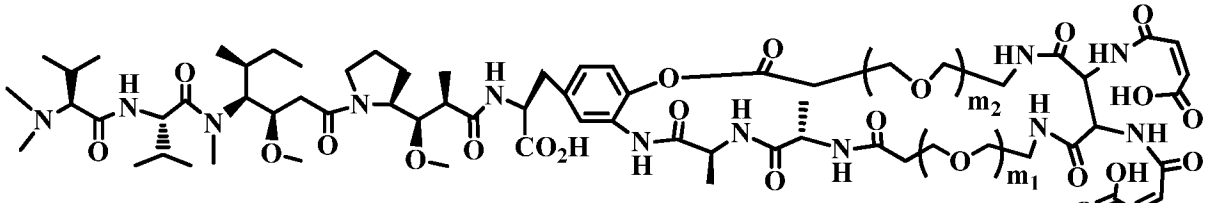
332a, m_1=0, m_2=4; 332b, m_1=2, m_2=6; 332c, m_1=4, m_2=12.



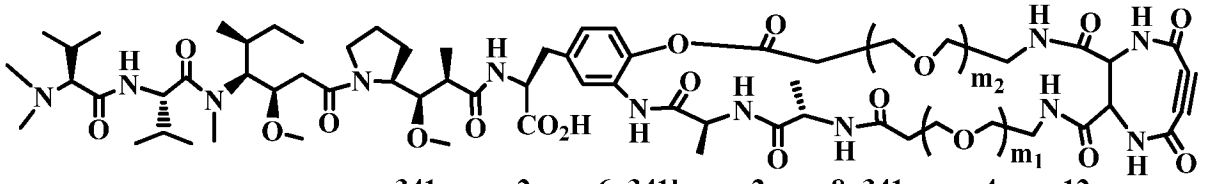
333a, m_1=0, m_2=4; 333b, m_1=2, m_2=6; 333c, m_1=4, m_2=12.



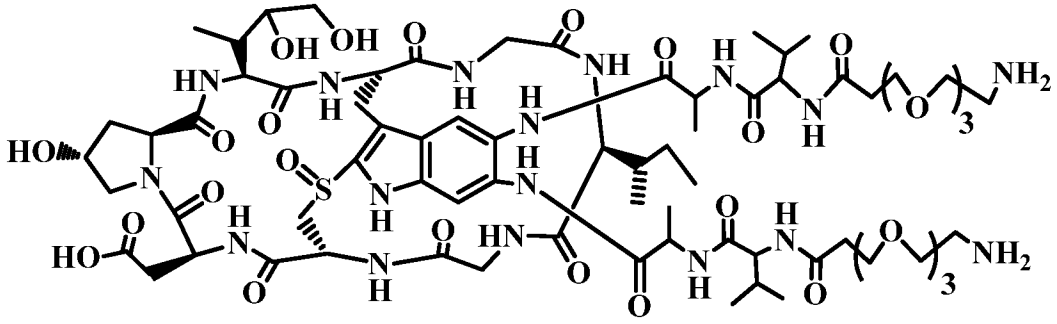
338a, m_1=2, m_2=6; 338b, m_1=2, m_2=8; 338c, m_1=4, m_2=12.



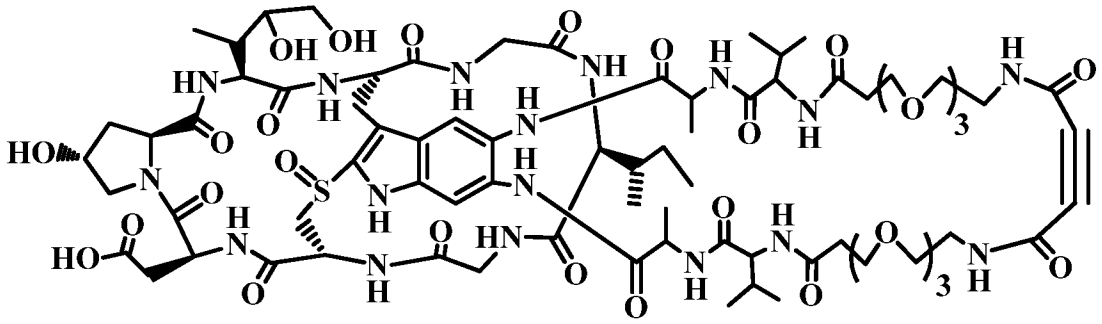
339a, m_1=2, m_2=6; 339b, m_1=2, m_2=8; 339c, m_1=4, m_2=12.



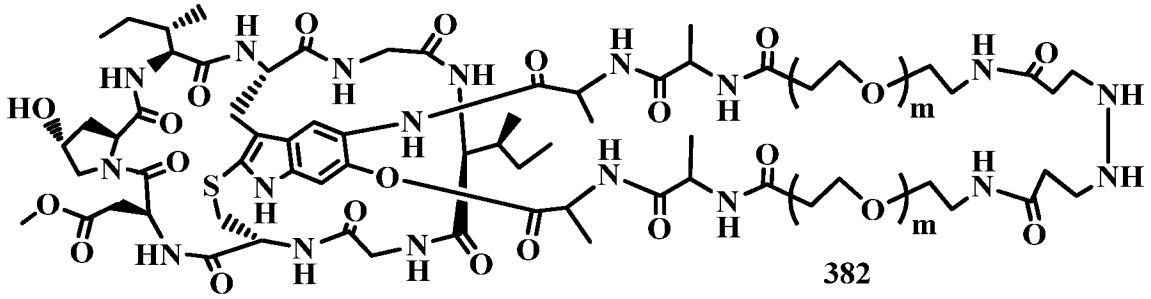
341a, m_1=2, m_2=6; 341b, m_1=2, m_2=8; 341c, m_1=4, m_2=12.



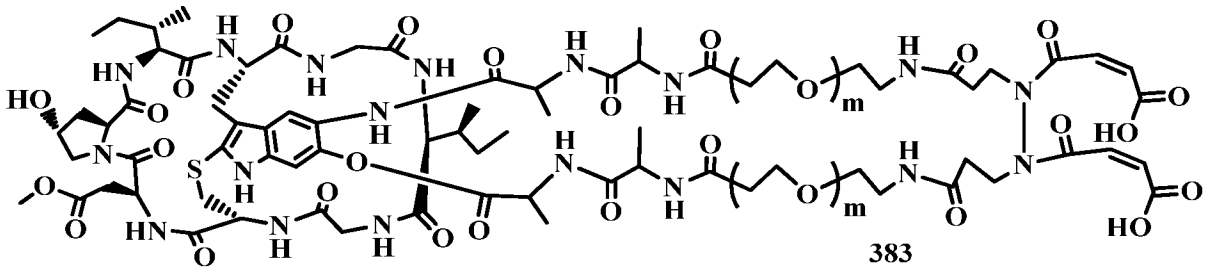
354



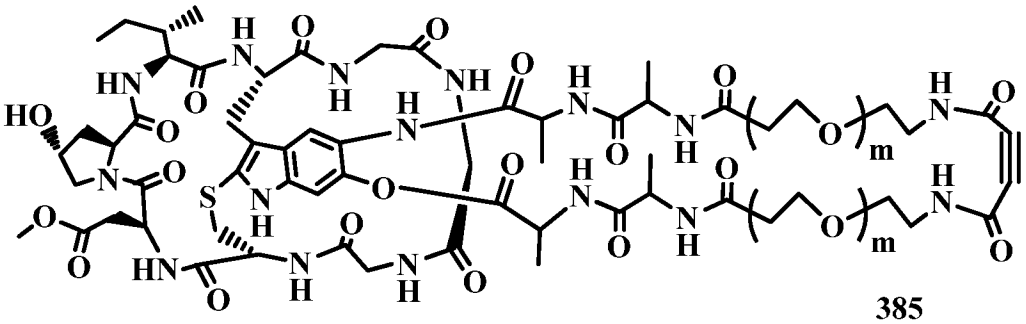
355



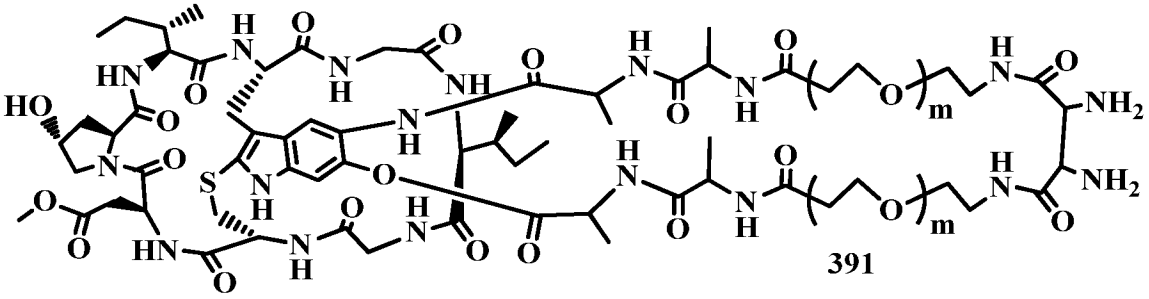
382



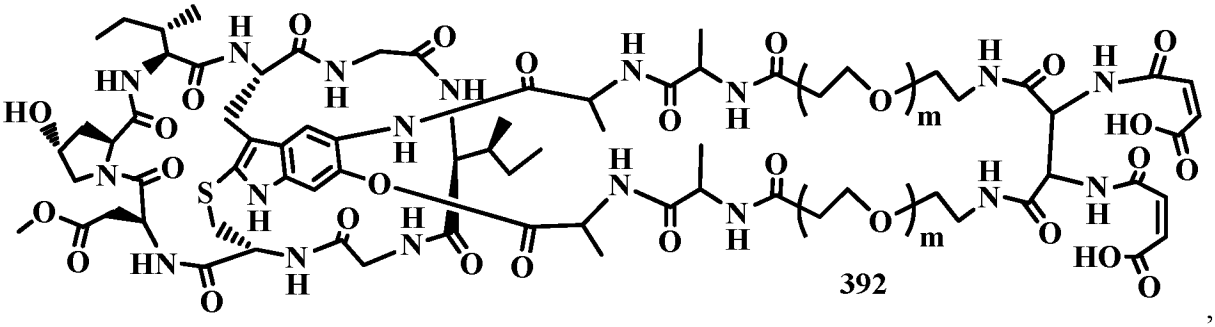
383



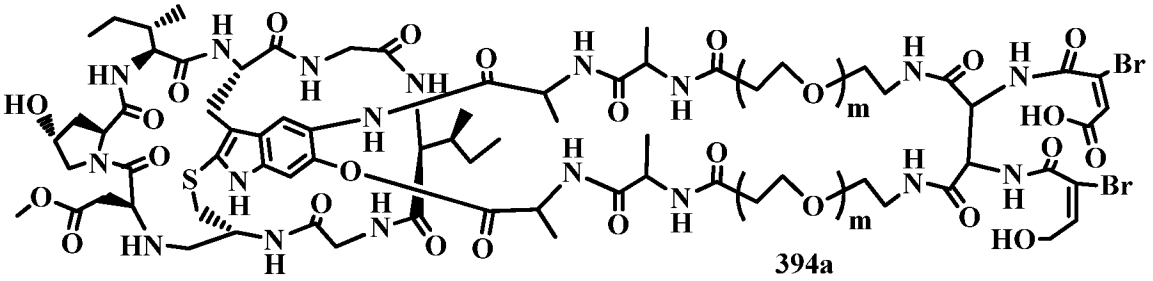
385 ,



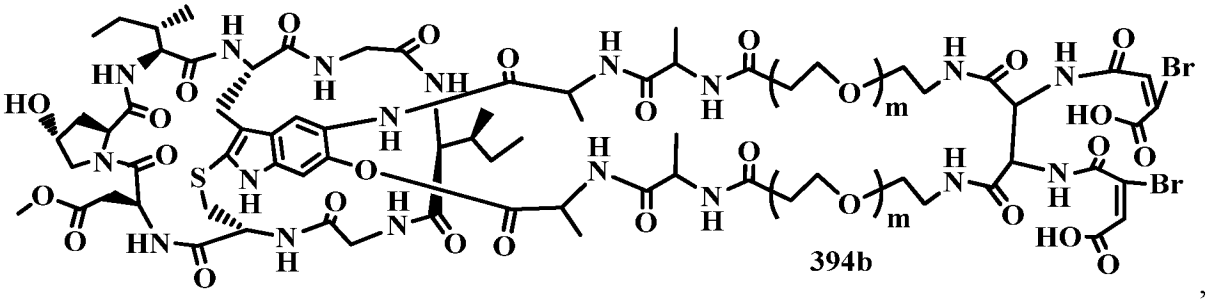
391 ,



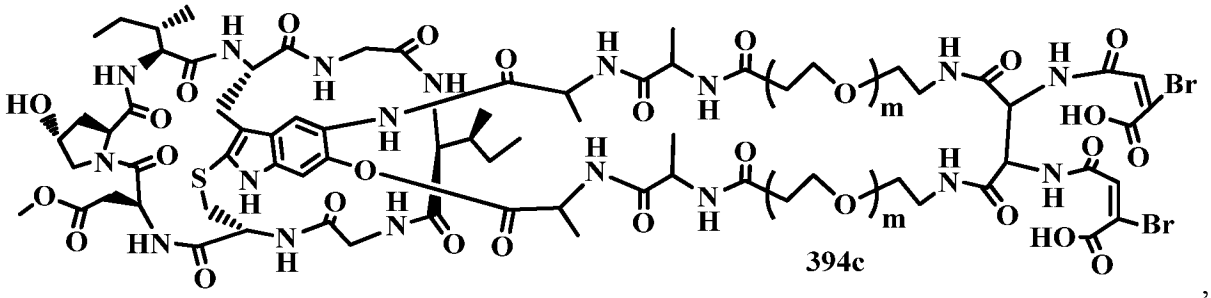
392 ,



394a ,

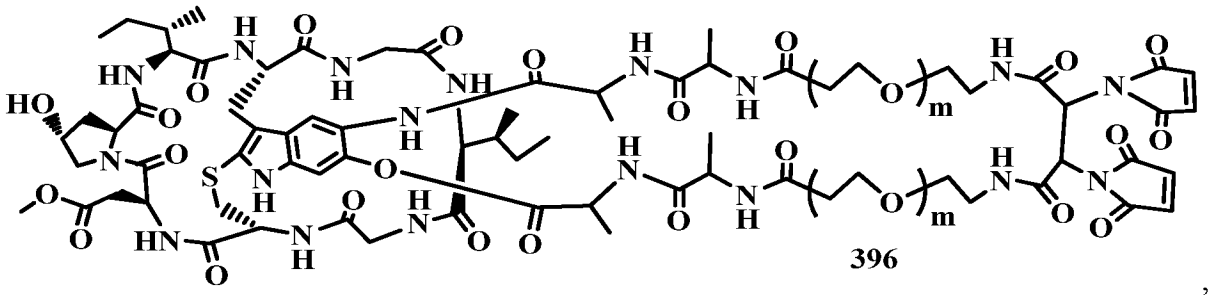


394b ,



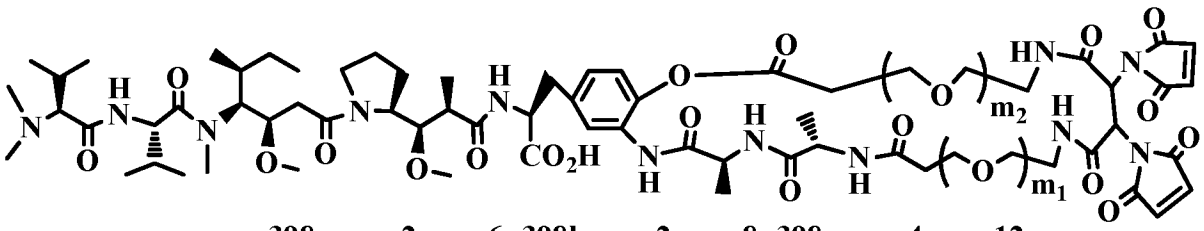
394c

,

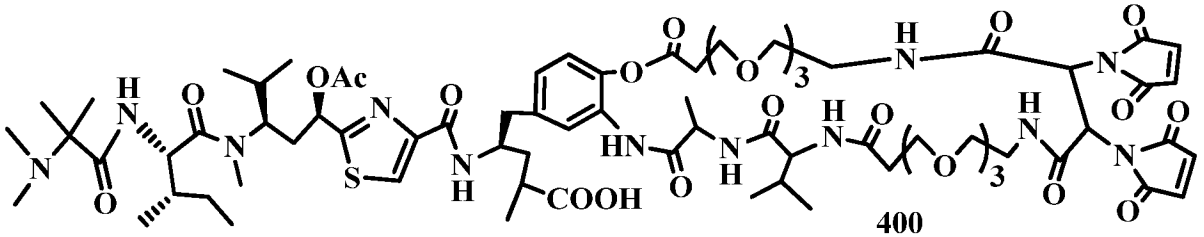


396

,

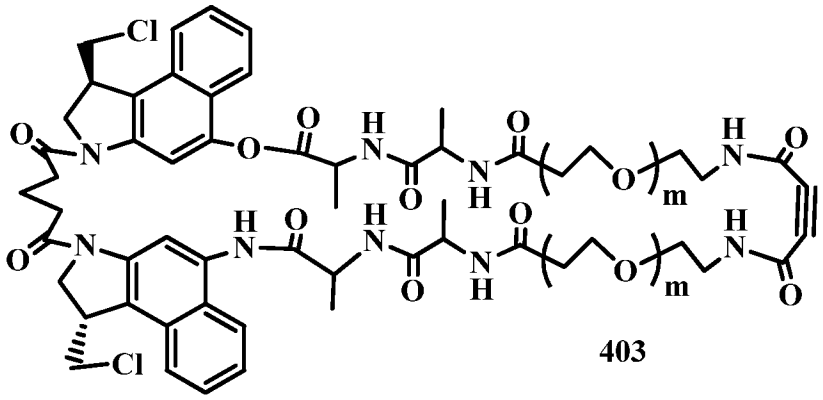


398a, m_1=2, m_2=6; 398b, m_1=2, m_2=8; 398c, m_1=4, m_2=12.



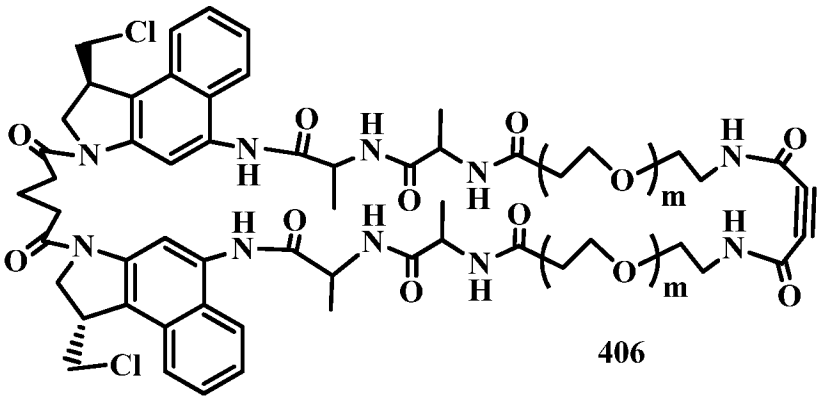
400

,



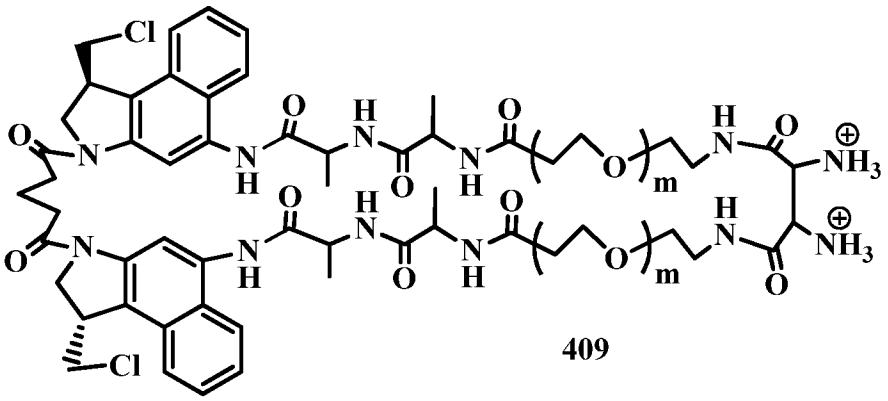
403

,



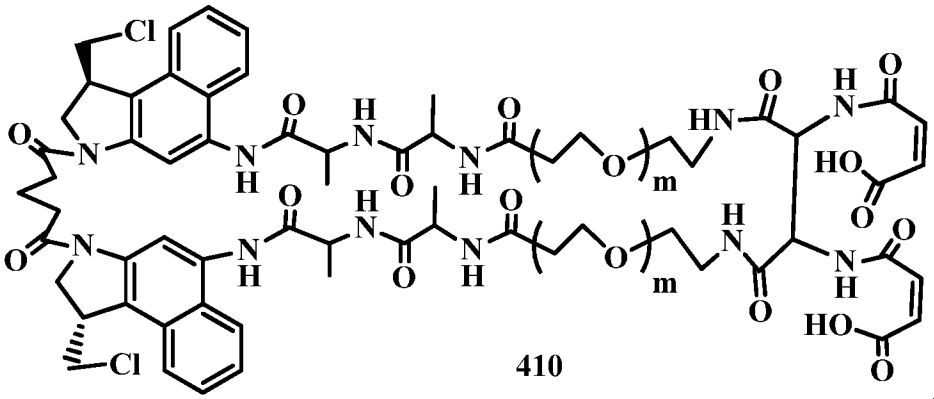
406

,



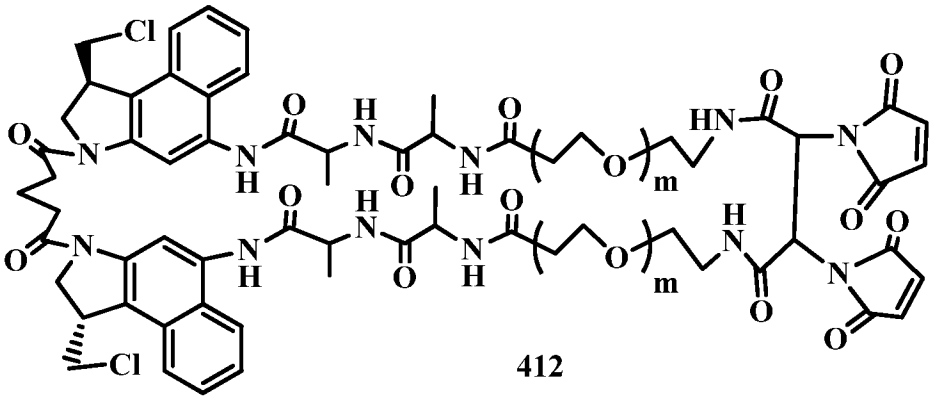
409

,



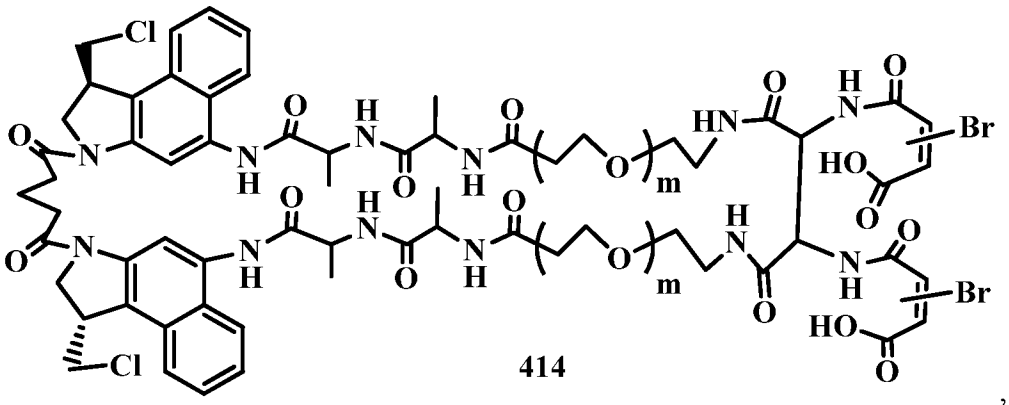
410

,



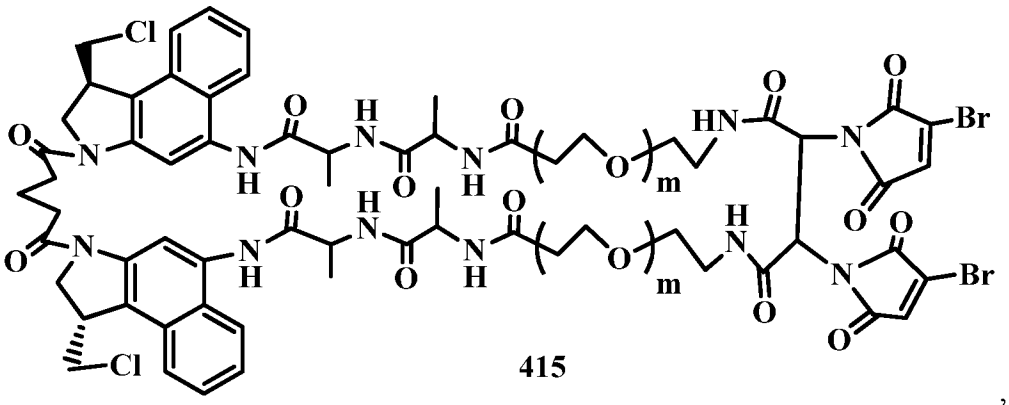
412

,



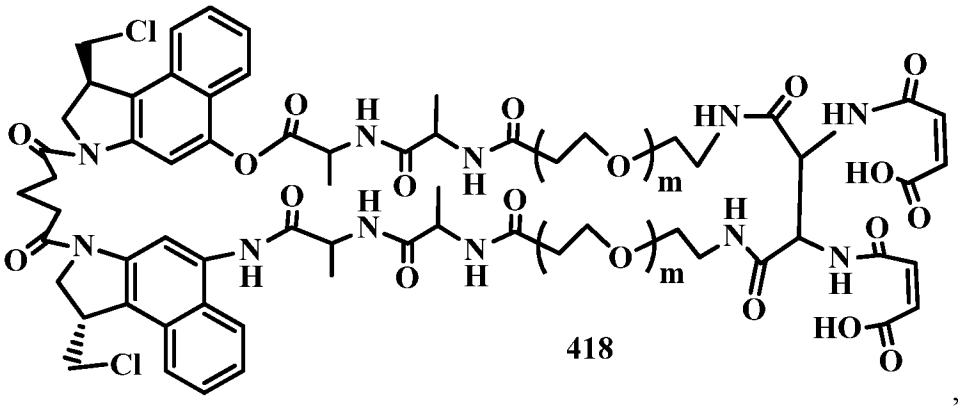
414

,



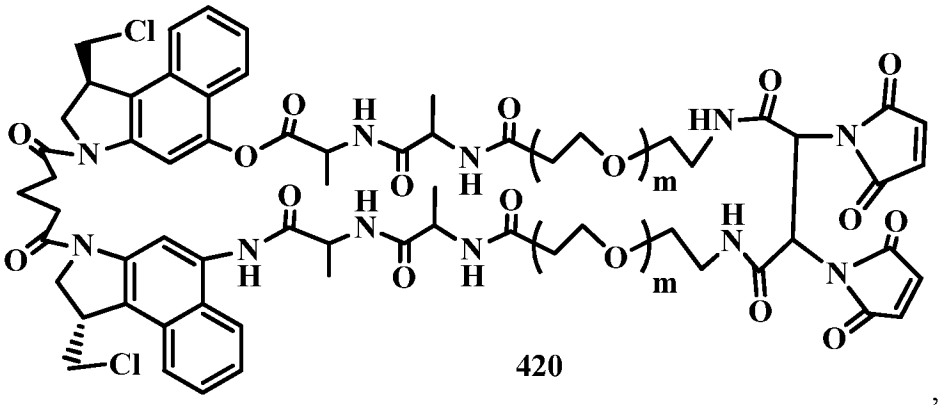
415

,



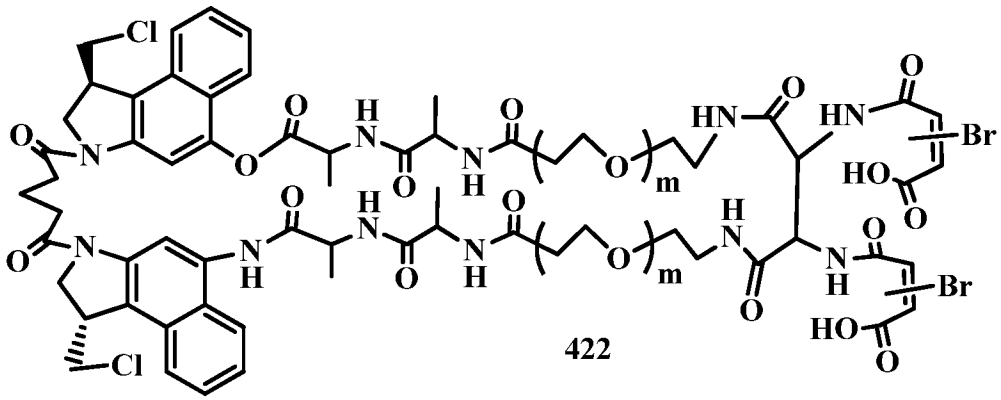
418

,



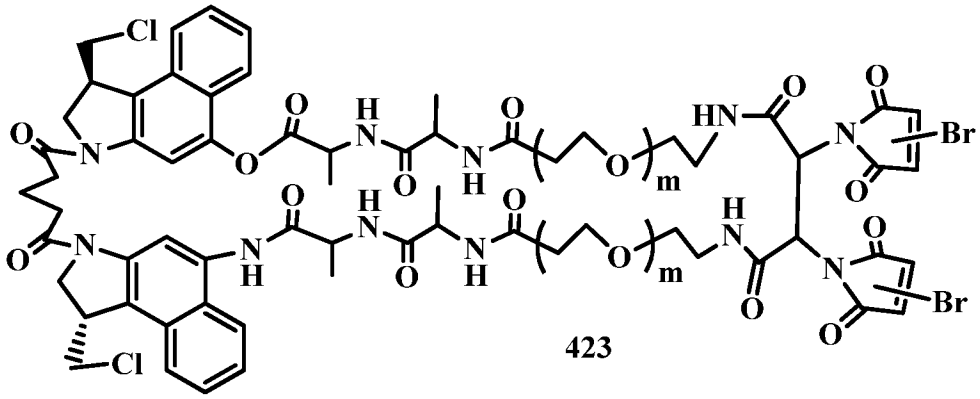
420

,

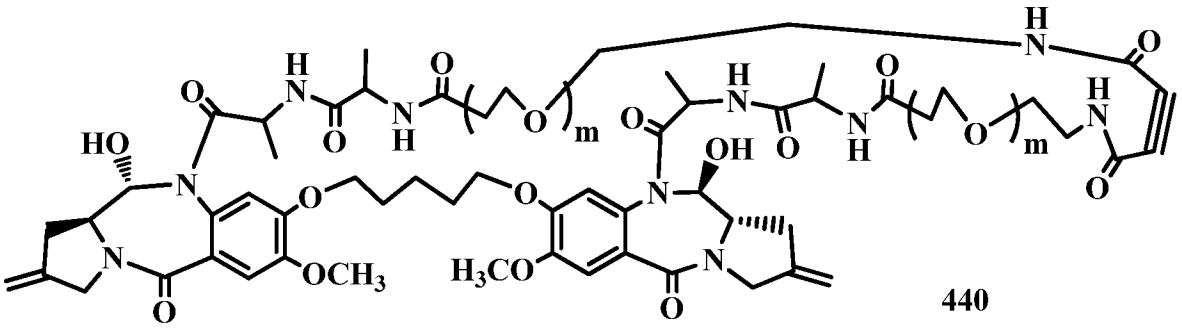


422

,

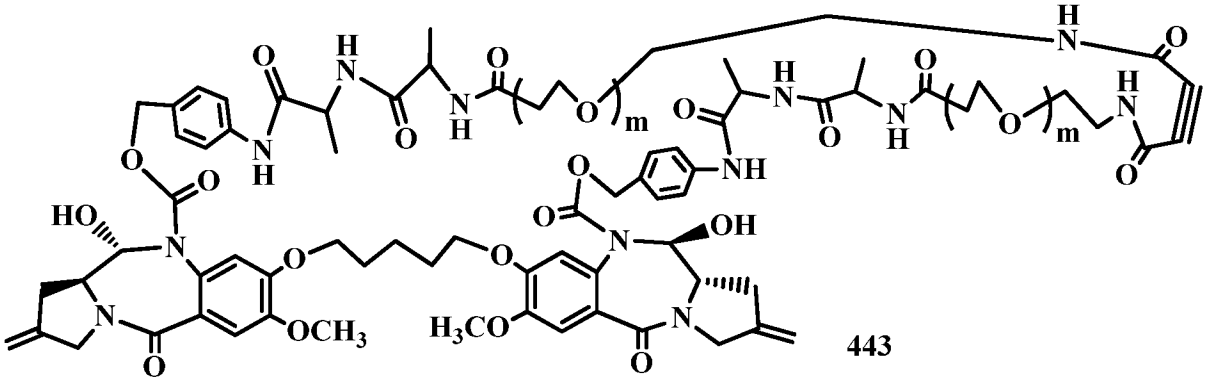


423



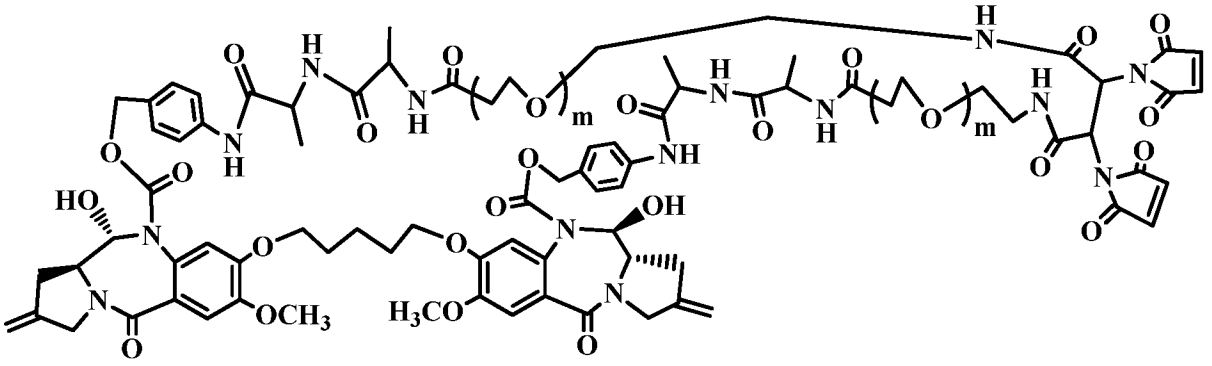
440

,



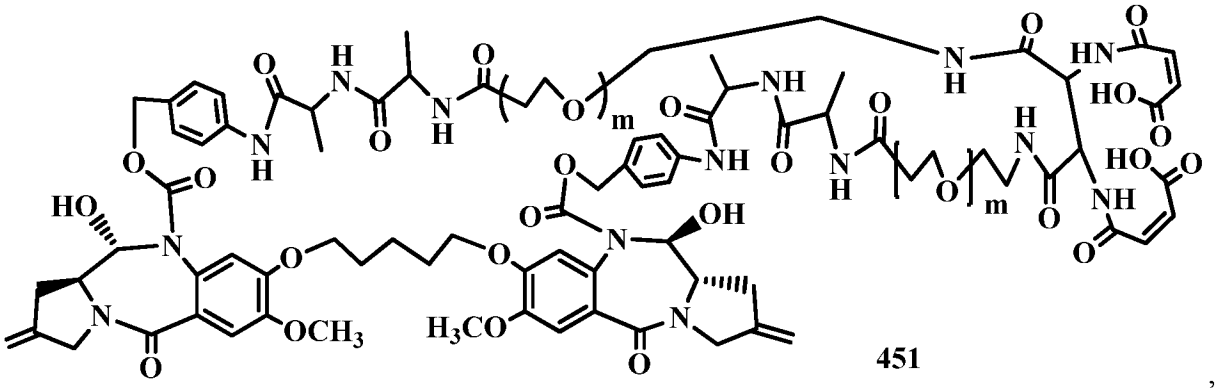
443

,



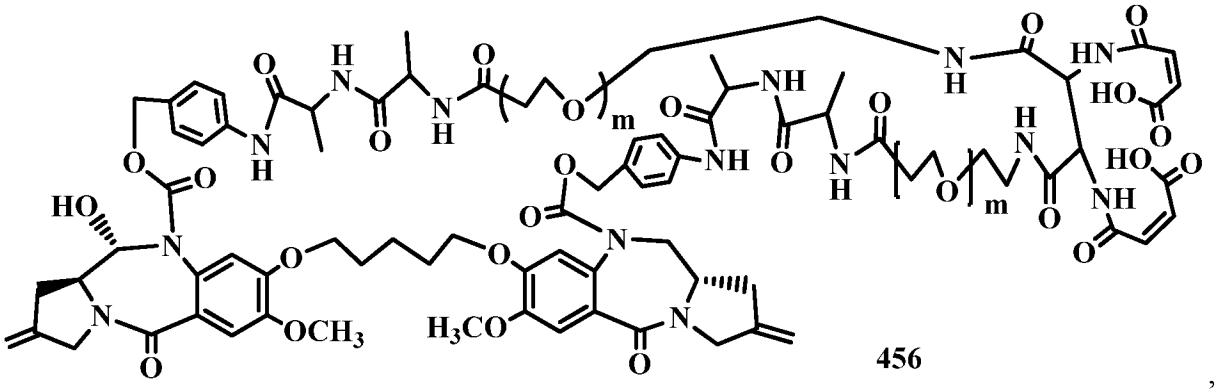
448

,



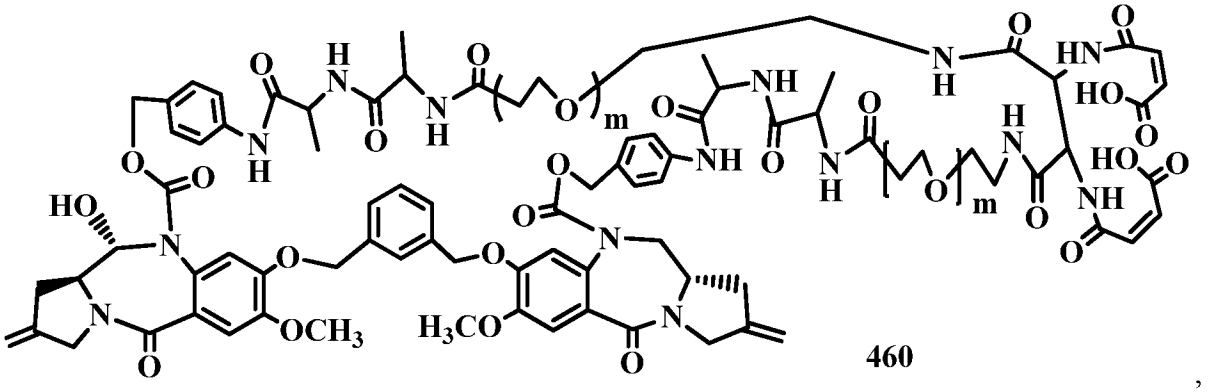
451

,



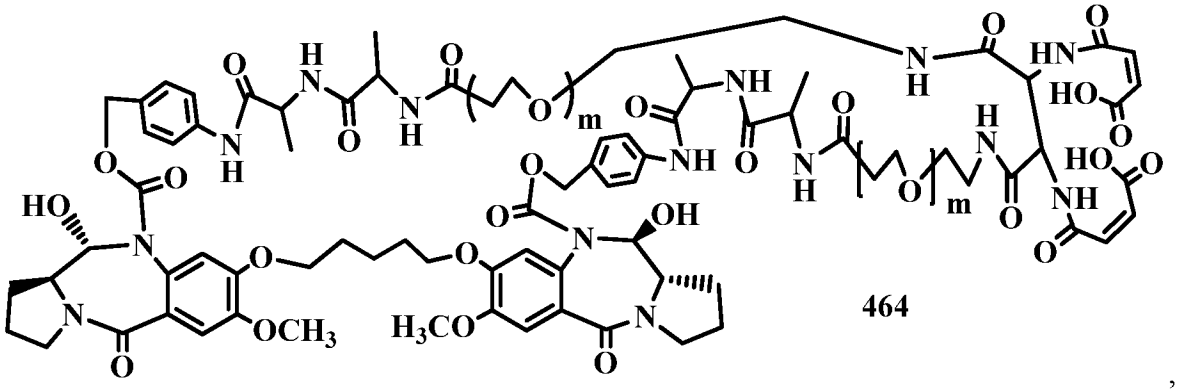
456

,



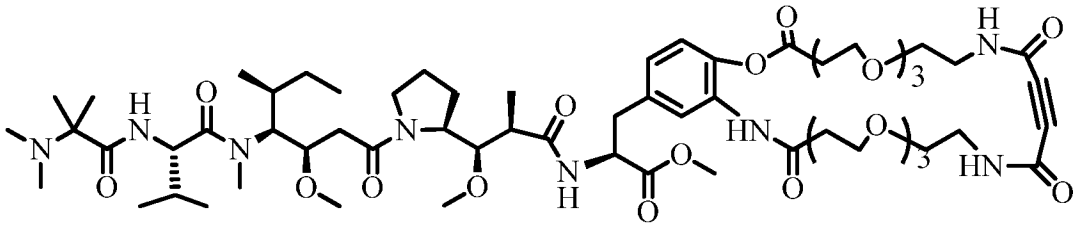
460

,

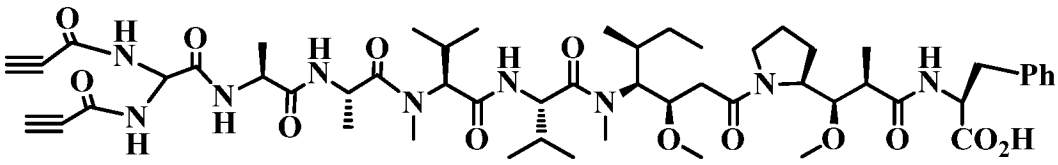


464

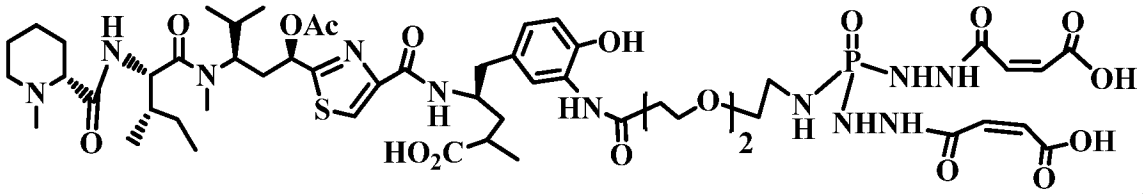
,



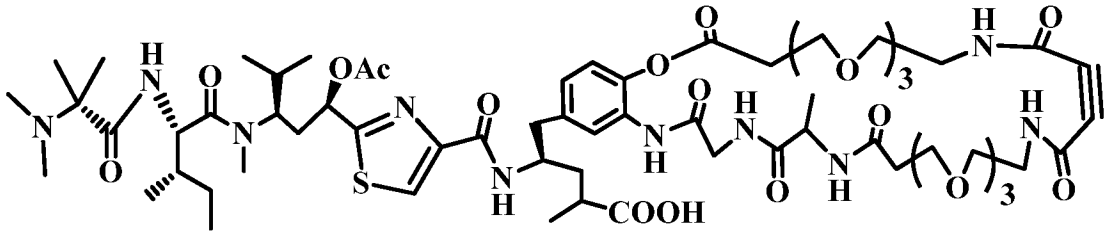
A-3



A-4.

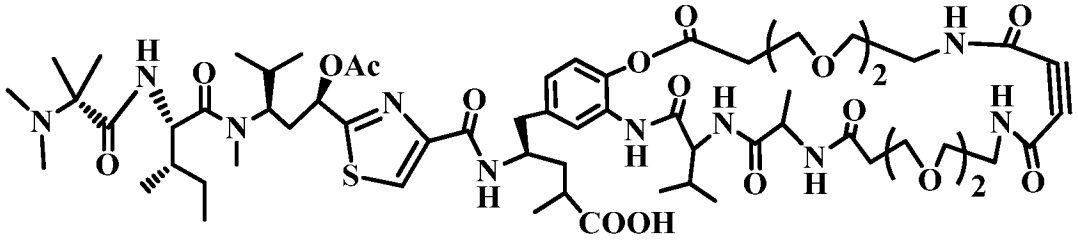


A-5,



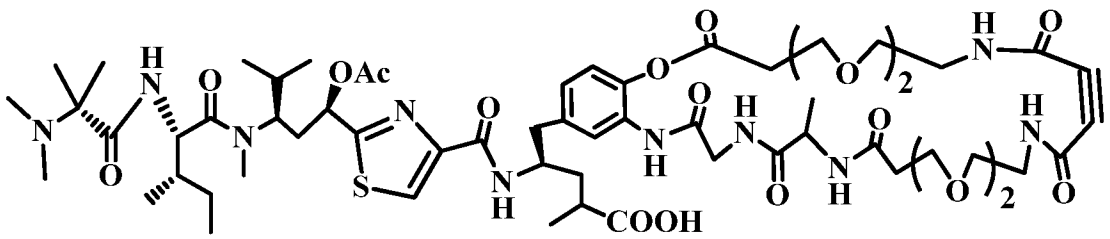
B-3

,



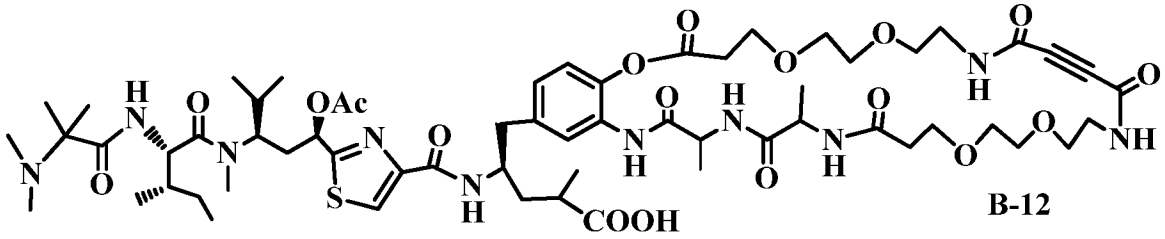
B-6

,



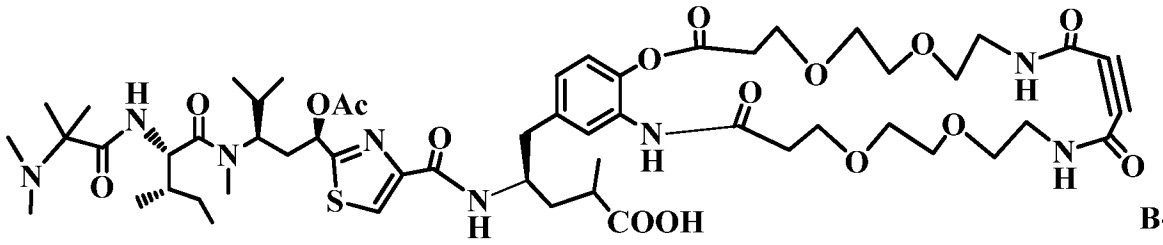
B-9

,



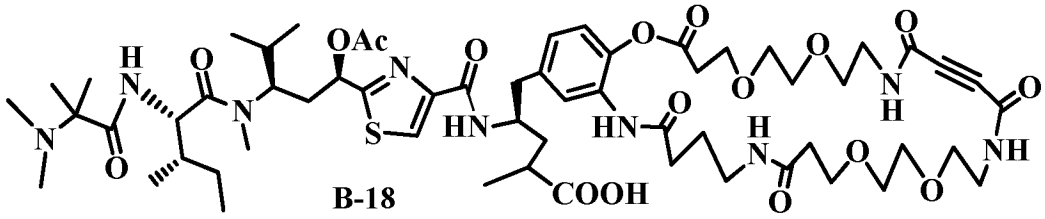
B-12

,



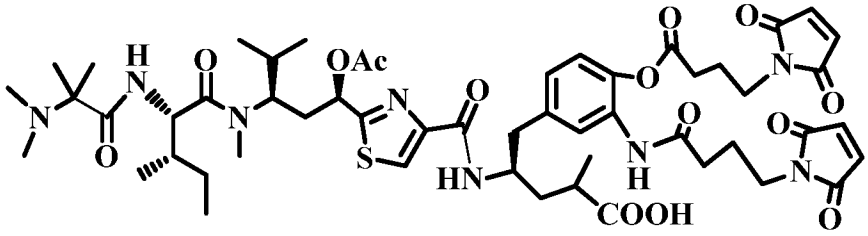
B-15

,



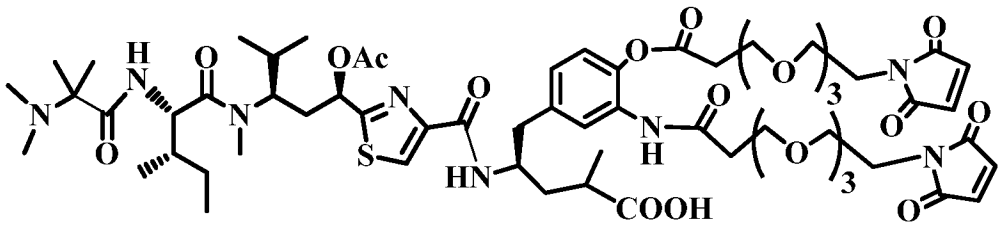
B-18

,



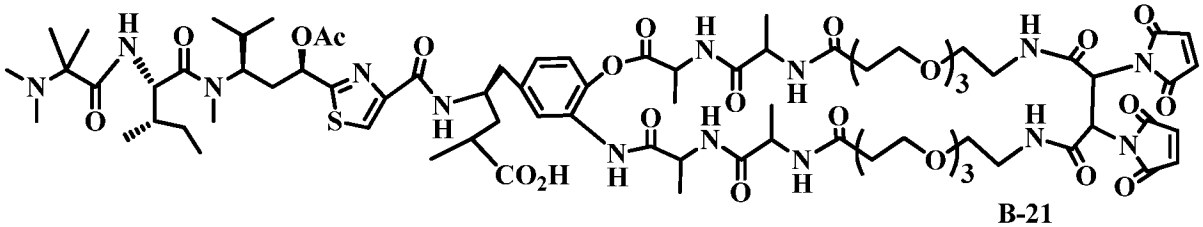
B-19

,



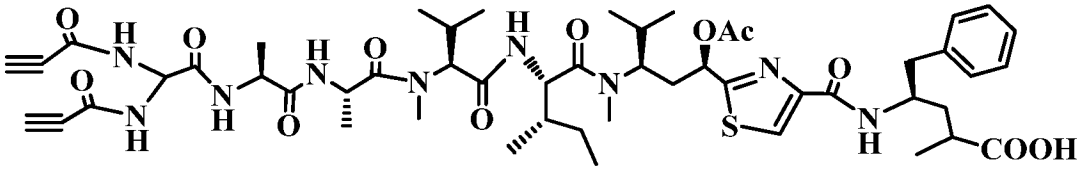
B-20

,



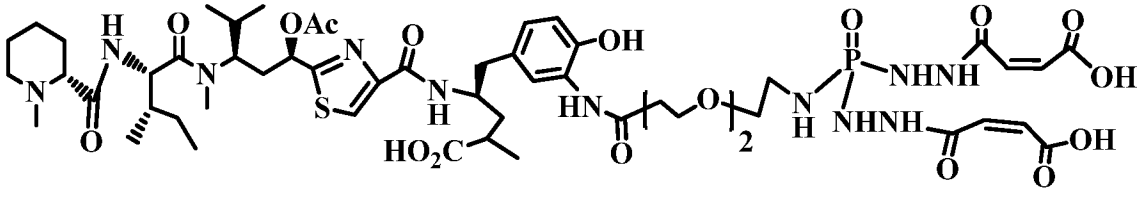
B-21

,

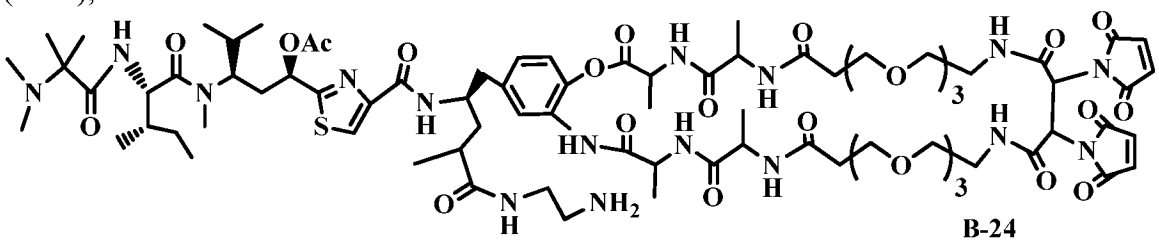


(B-22)

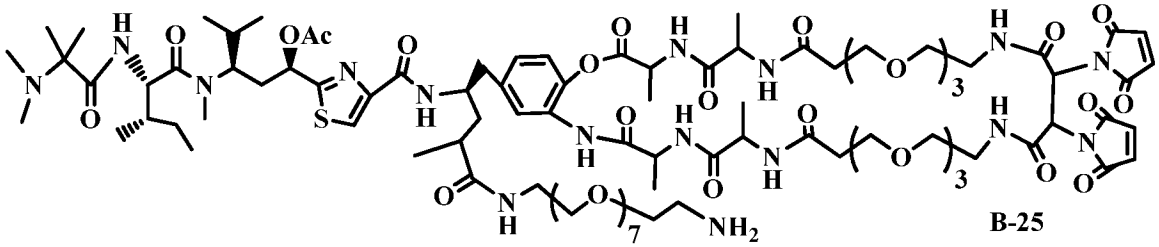
,



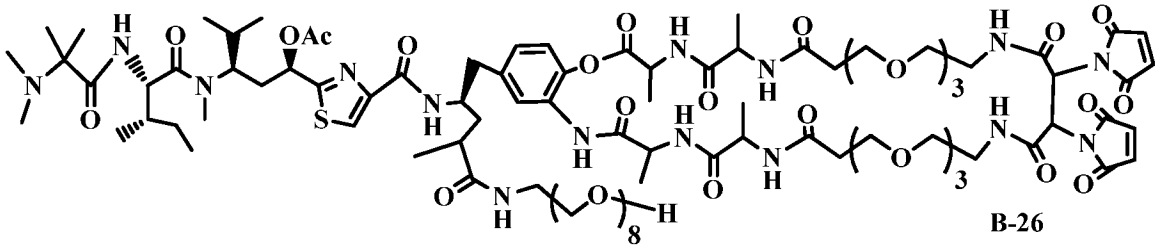
(**B-23**),



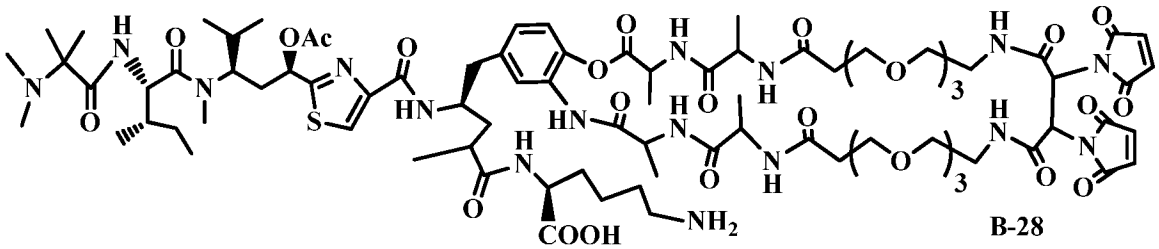
B-24



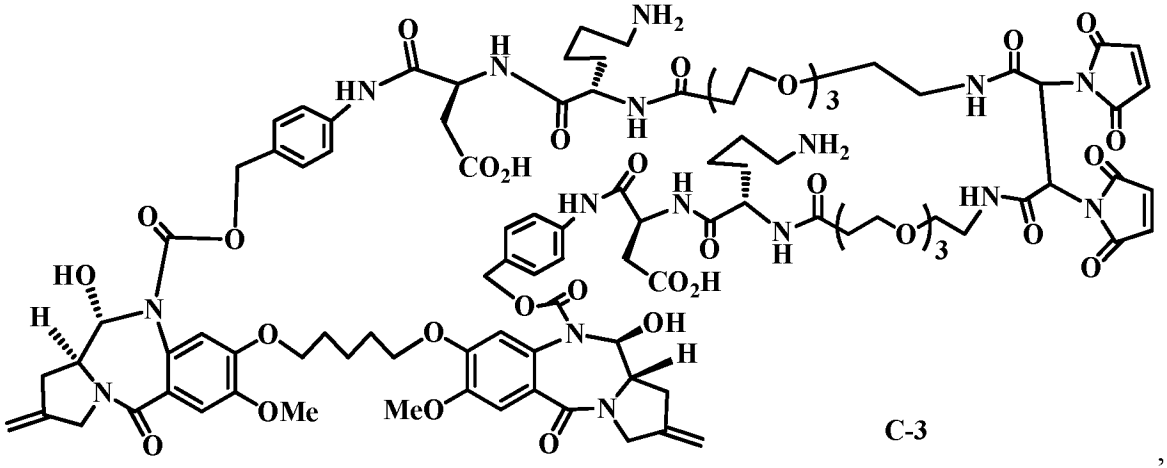
B-25



B-26

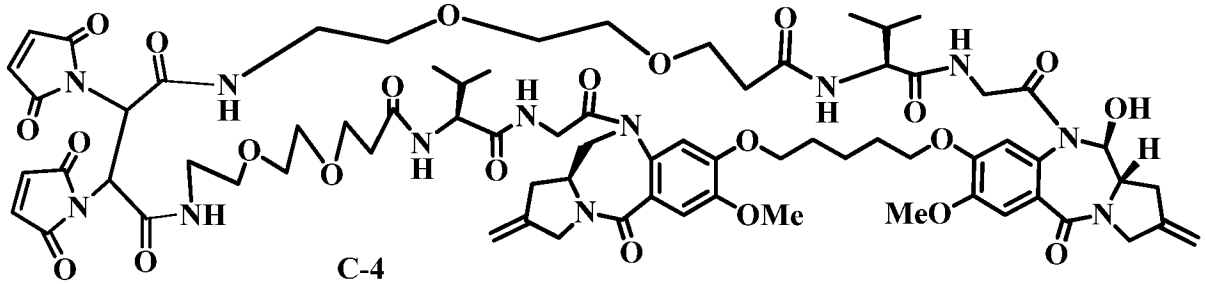


B-28



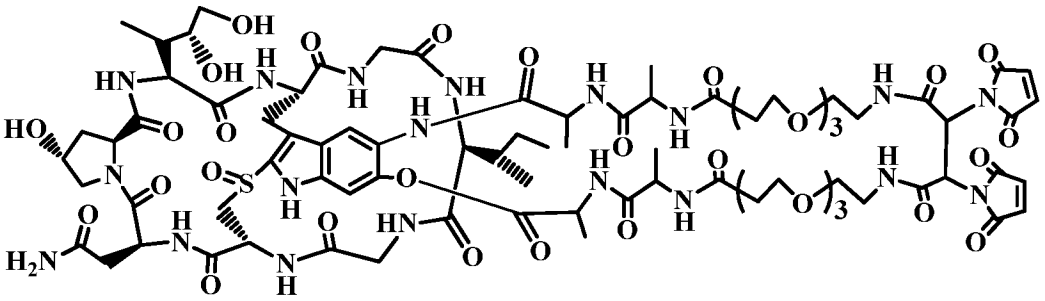
C-3

,



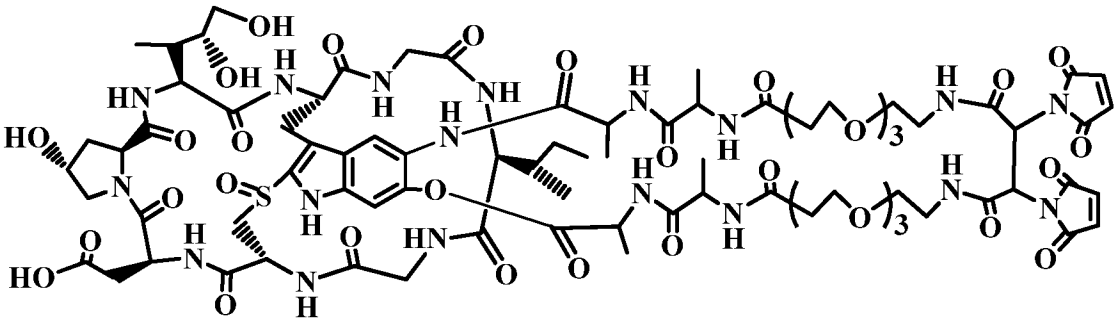
C-4

,



D-1

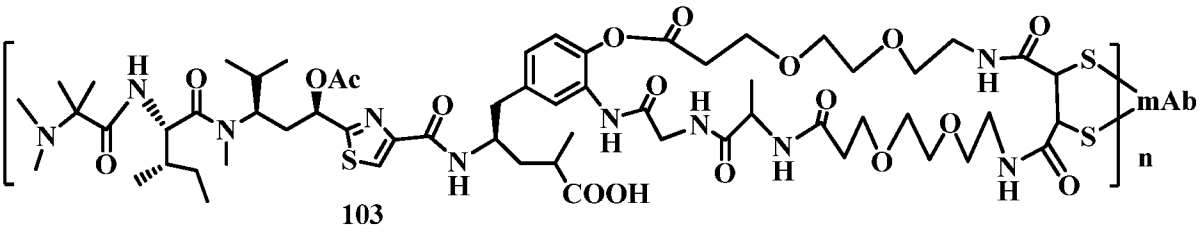
,



D-2

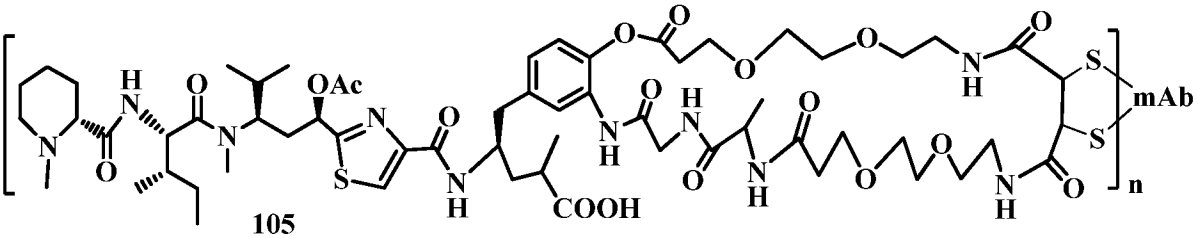
,

36. Конъюгаты Формулы (I) по. **1**, имеющие формулу 103, 105, 113, 117, 120, 127, 129, 131, 133, 135, 140, 142, 150, 152, 169, 177, 186, 190, 197, 217a, 217b, 217c, 217d, 217e, 217f, 223a, 223b, 223c,223d, 223e, 223f, 245a, 245b, 245c, 245d, 245e, 245f, 255, 303a, 303b, 303c, 303d, 303e, 303f, 312a, 312b, 312c, 316a, 316b, 316c, 316d, 316e, 316f, 320a, 320b, 320c, 325a, 325b, 325c, 340a, 340b, 340c, 342a, 342b, 342c, 356, 384, 386, 393, 395a, 395b, 397, 399a, 399b, 399c, 401, 404, 407, 411, 413, 416, 419, 421, 424, 441, 449, 452, 457, 461, 465, A-3a, A-4a, A-5a, B-3a, B-6a, B-9a, B-12a, B-15a, B-18a, B-19a, B-20a, B-21a, B-22a, B-23a, B-24a, B-25a, B-26a, B-28a, C-3a, C-4a, D-1a и D-2a, проиллюстрированную следующими структурами:



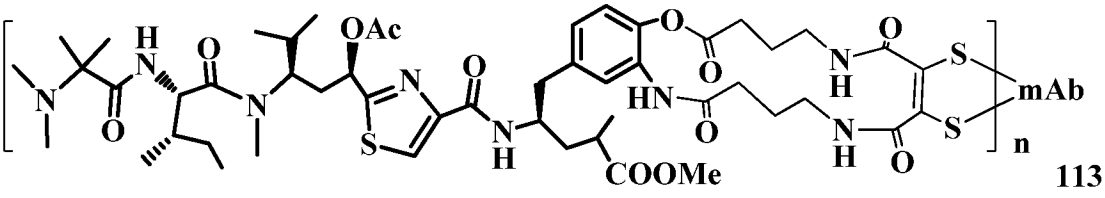
103

,



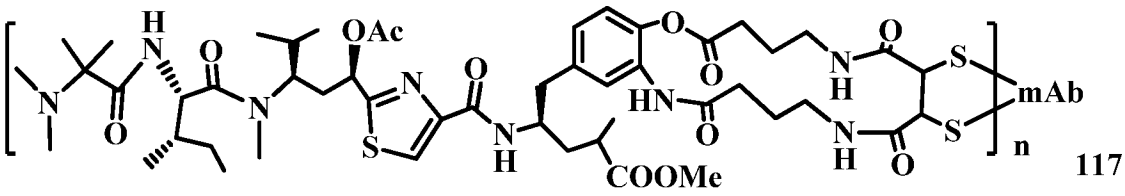
105

,

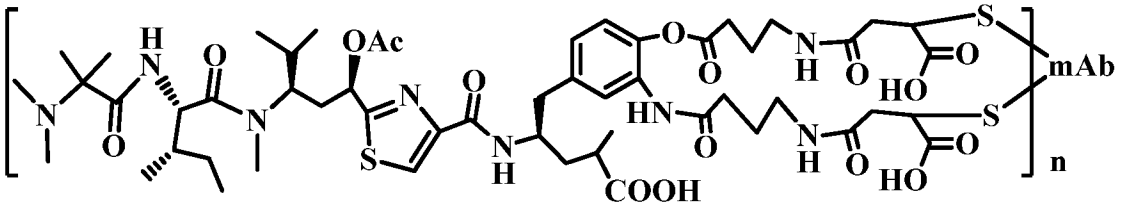


113

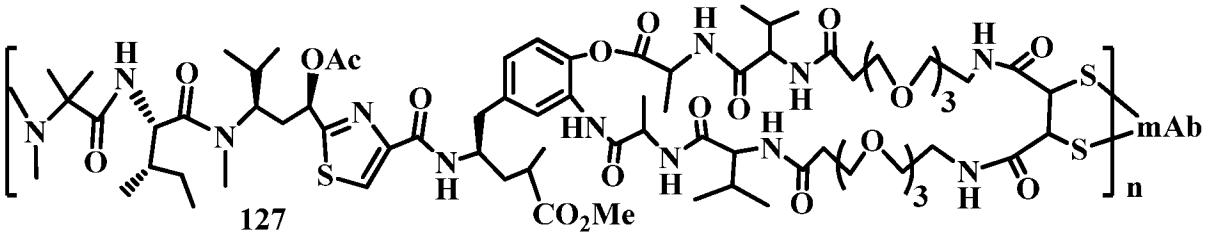
,



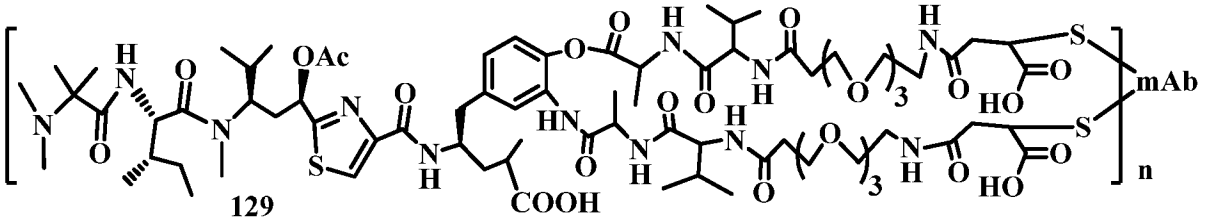
117,



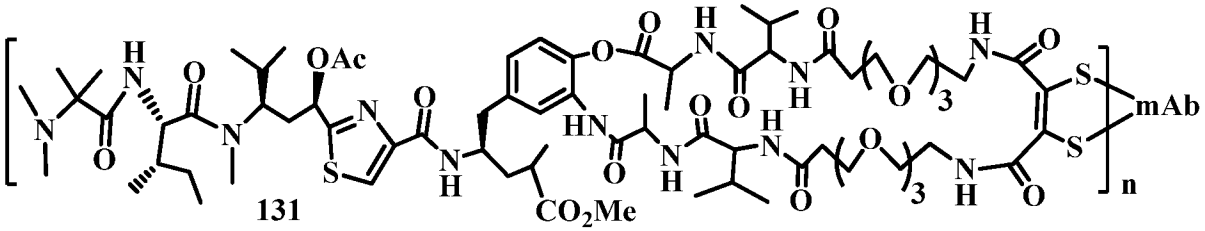
120,



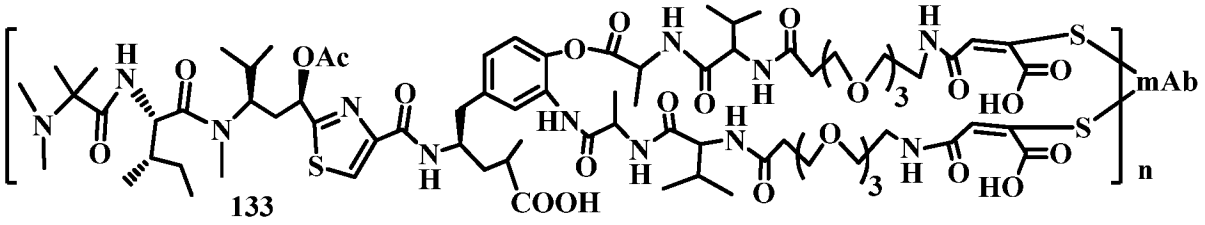
127,



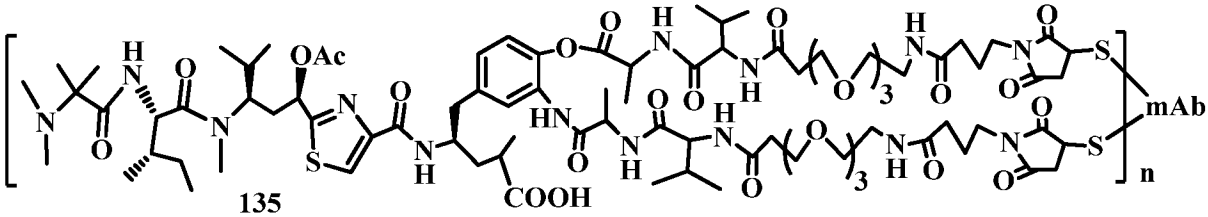
129,



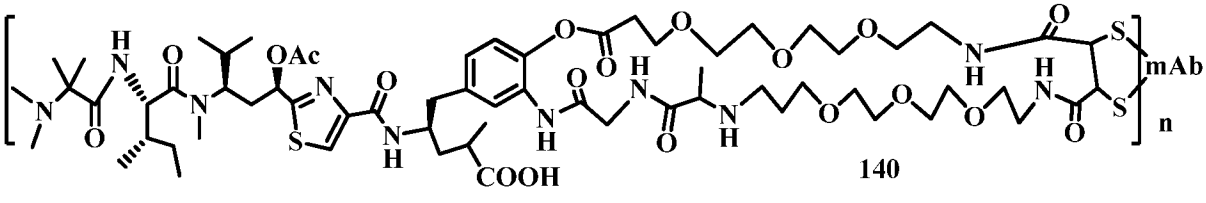
131,



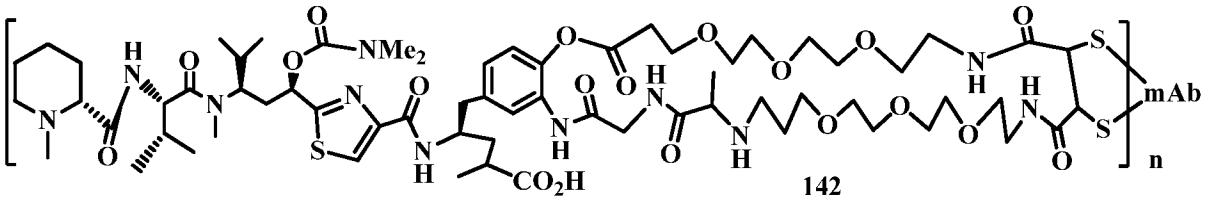
133,



135,

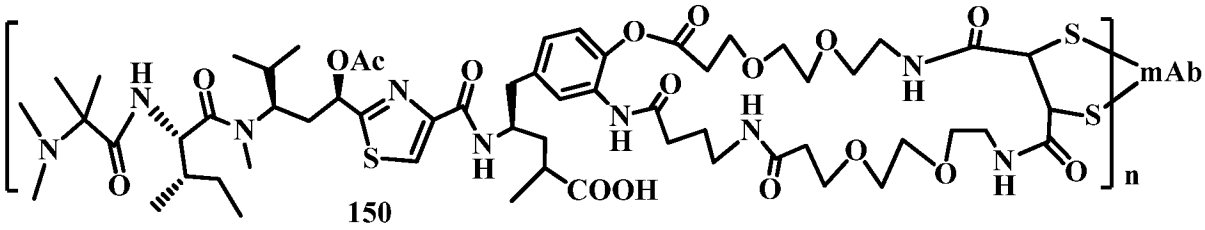


140,



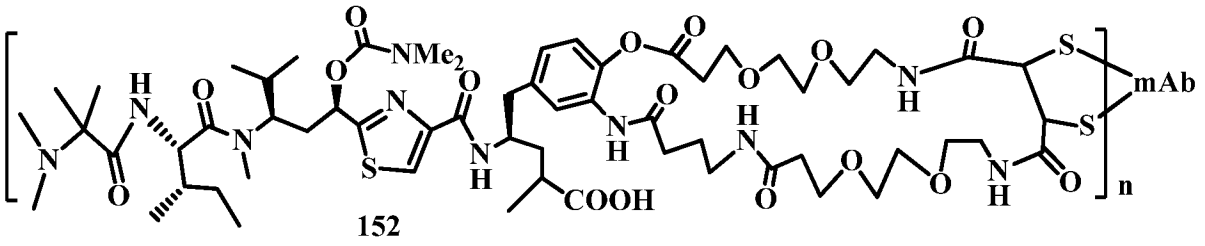
142

,



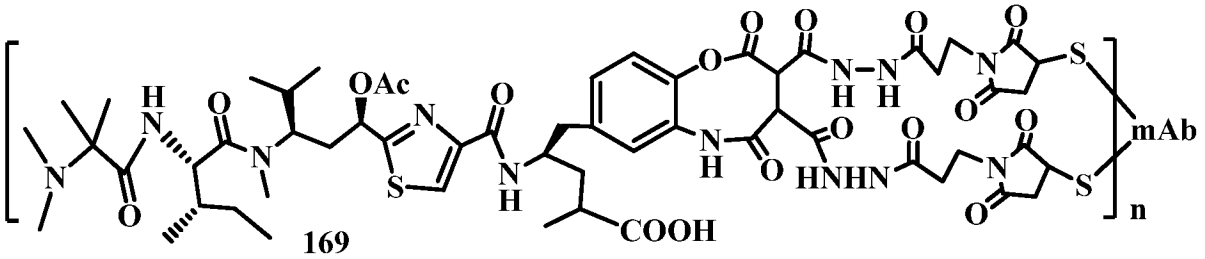
150

,



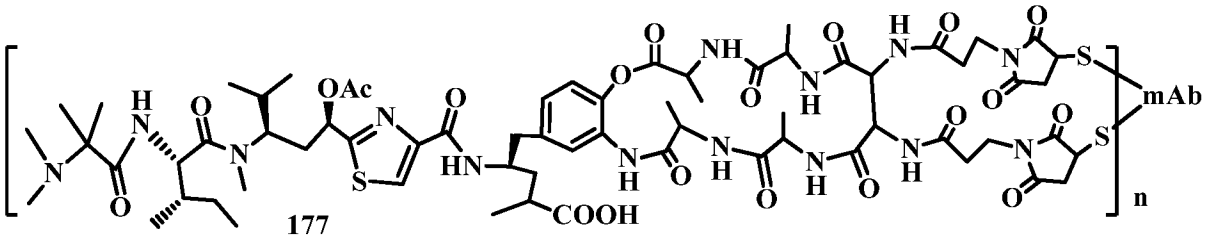
152

,



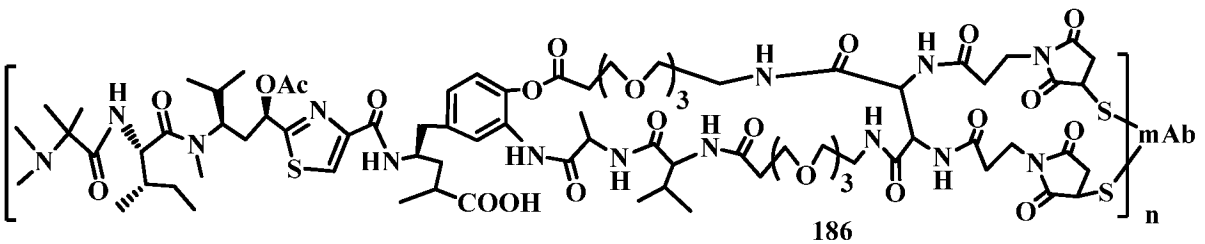
169

,



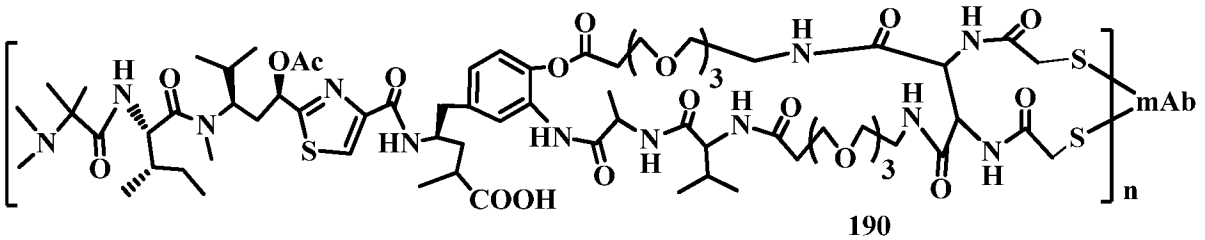
177

,



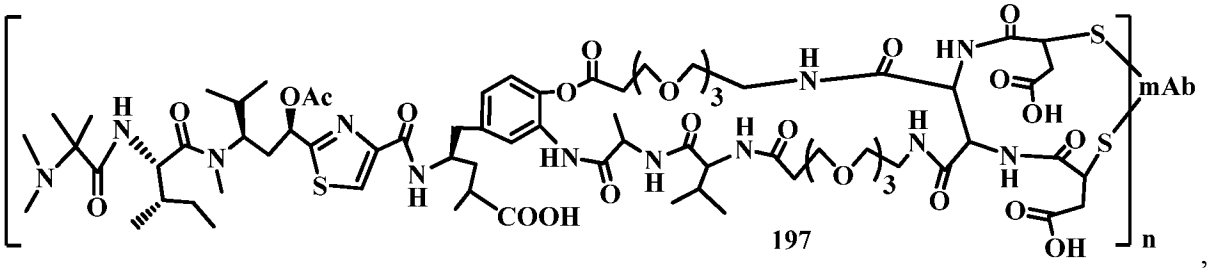
186

,



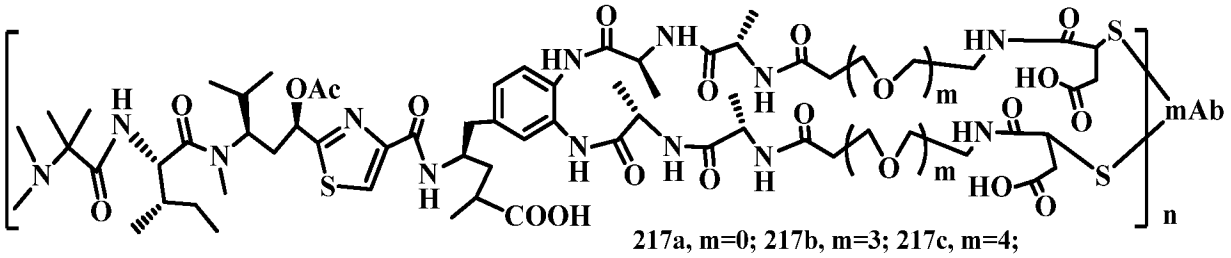
190

,



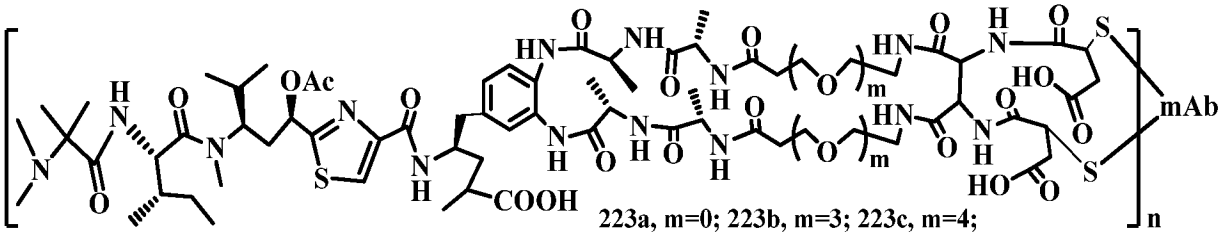
197

,



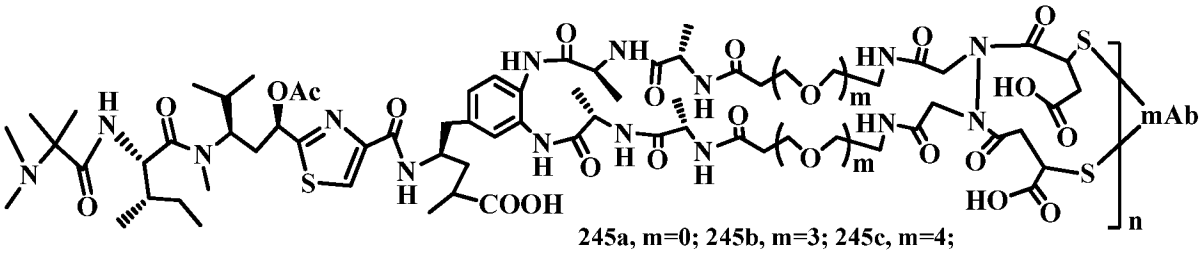
217a, m=0; 217b, m=3; 217c, m=4;
217d, m=6; 217e, m=8; 217f, m=12.

,



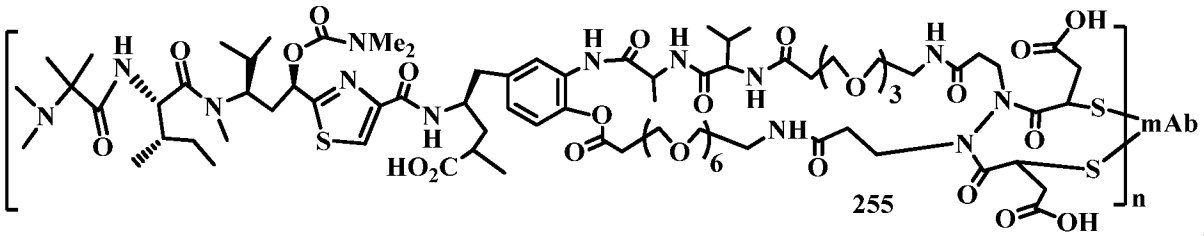
223a, m=0; 223b, m=3; 223c, m=4;
223d, m=6; 223e, m=8; 223f, m=12;

,



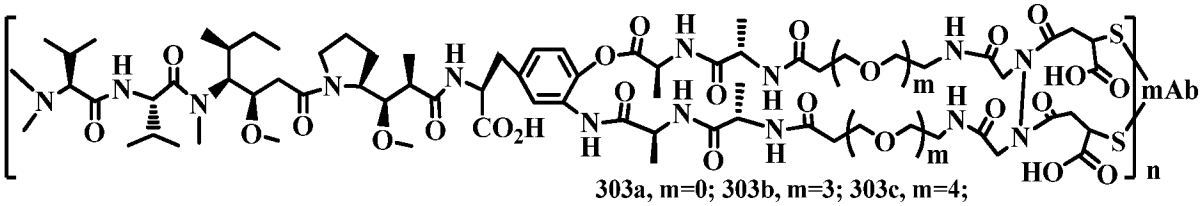
245a, m=0; 245b, m=3; 245c, m=4;
245d, m=6; 245e, m=8; 245f, m=12;

,



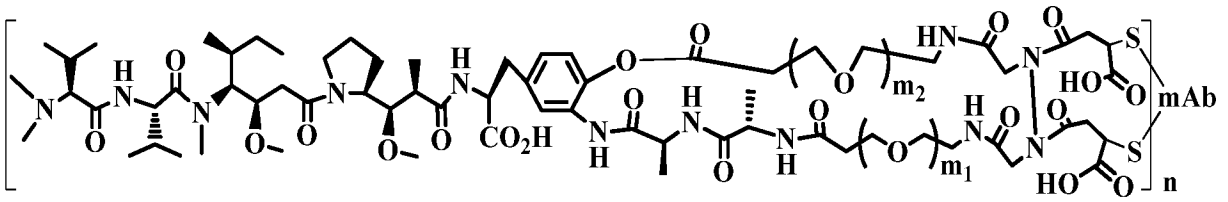
255

,

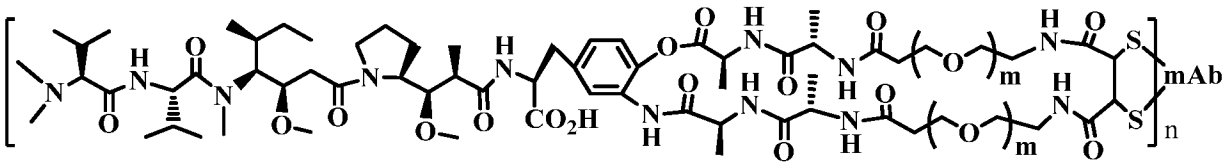


303a, m=0; 303b, m=3; 303c, m=4;
303d, m=6; 303e, m=8; 303f, m=12;

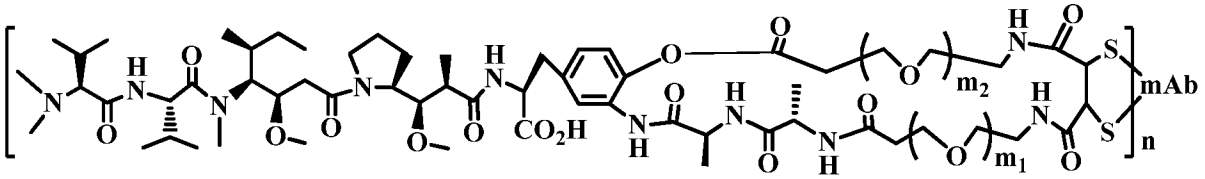
,



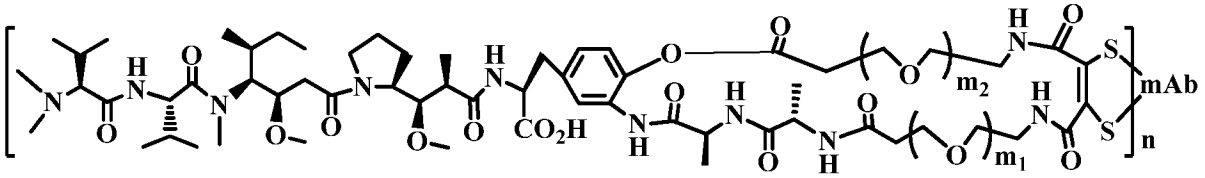
312a, m_1=0, m_2=4; 312b, m_1=2, m_2=6; 312c, m_1=4, m_2=12



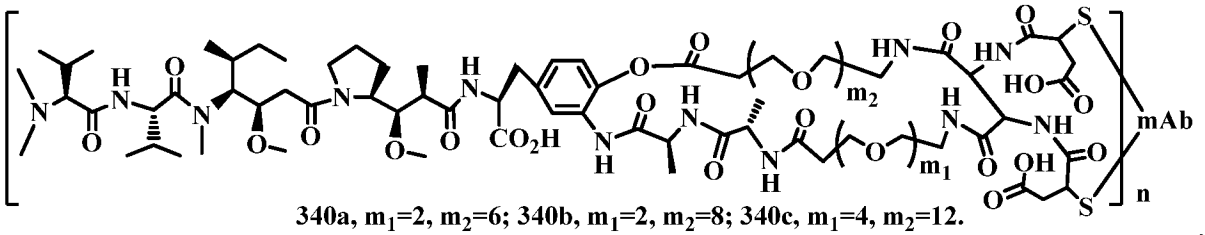
316a, m=0; 316b, m=3; 316c, m=4;
316d, m=6; 316e, m=8; 316f, m=12



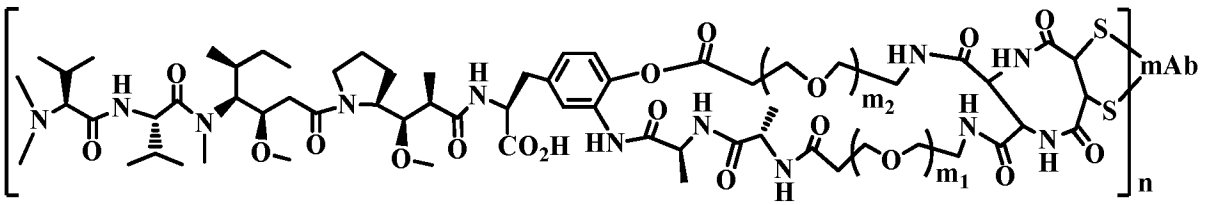
320a, m_1=0, m_2=4; 320b, m_1=2, m_2=6; 320c, m_1=4, m_2=12.



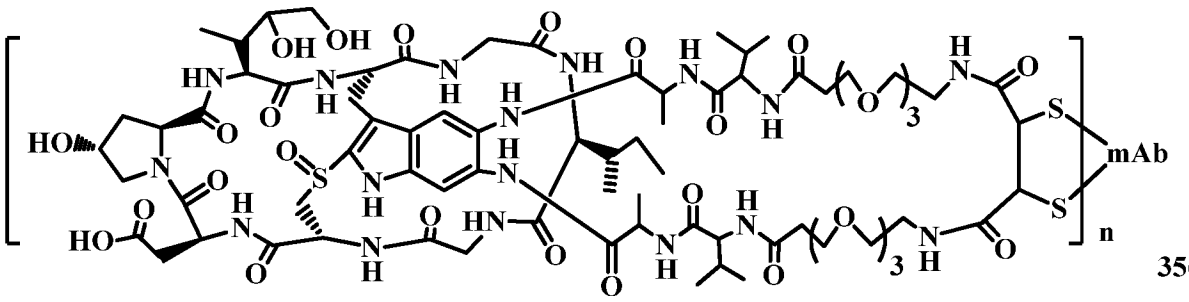
325a, m_1=0, m_2=4; 325b, m_1=2, m_2=6; 325c, m_1=4, m_2=12.



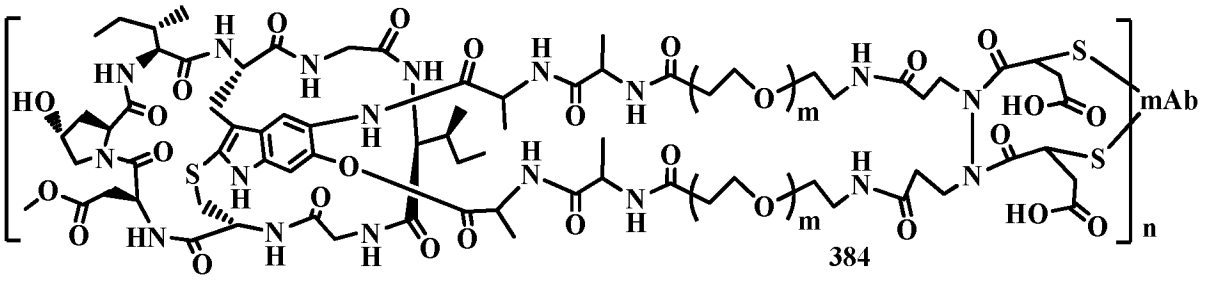
340a, m_1=2, m_2=6; 340b, m_1=2, m_2=8; 340c, m_1=4, m_2=12.



342a, m_1=2, m_2=6; 342b, m_1=2, m_2=8; 342c, m_1=4, m_2=12.

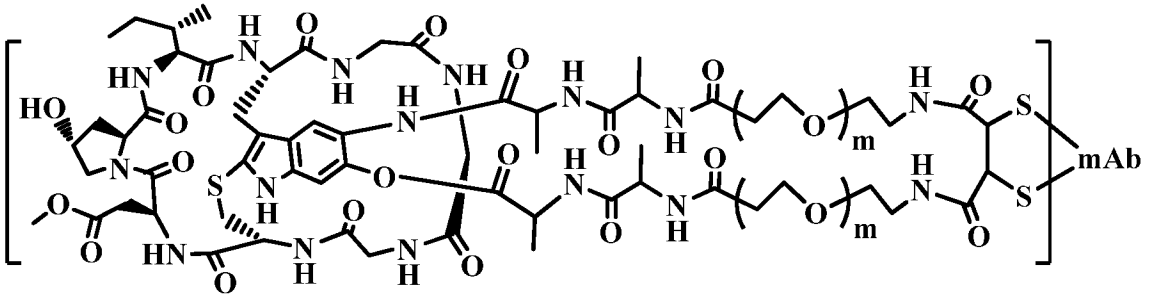


356



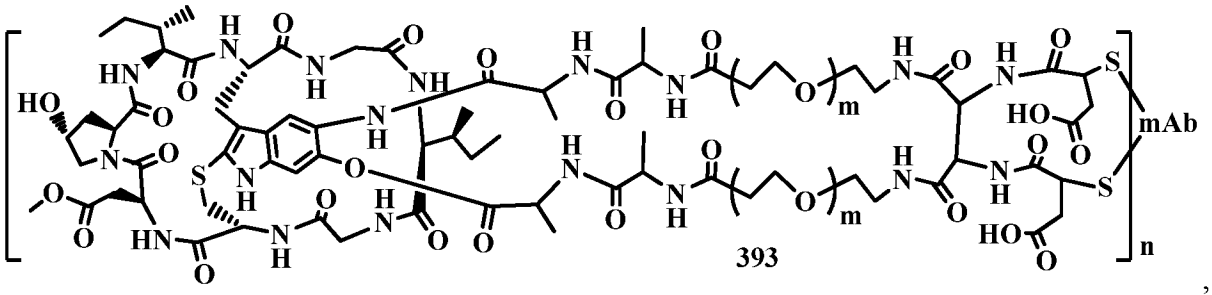
384

,



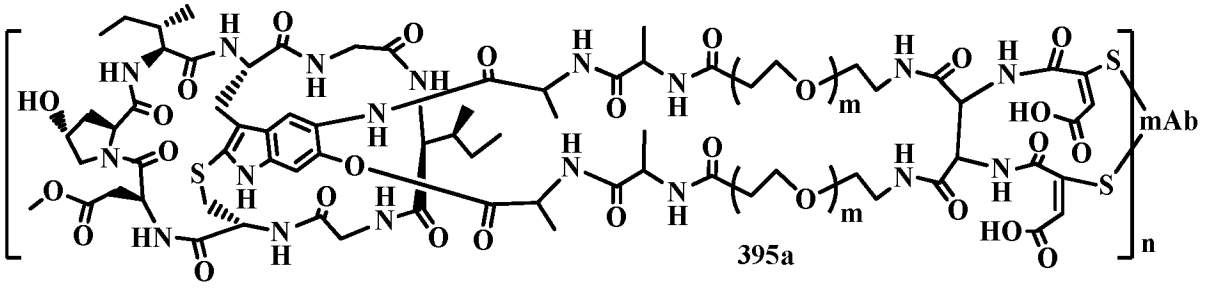
386

,



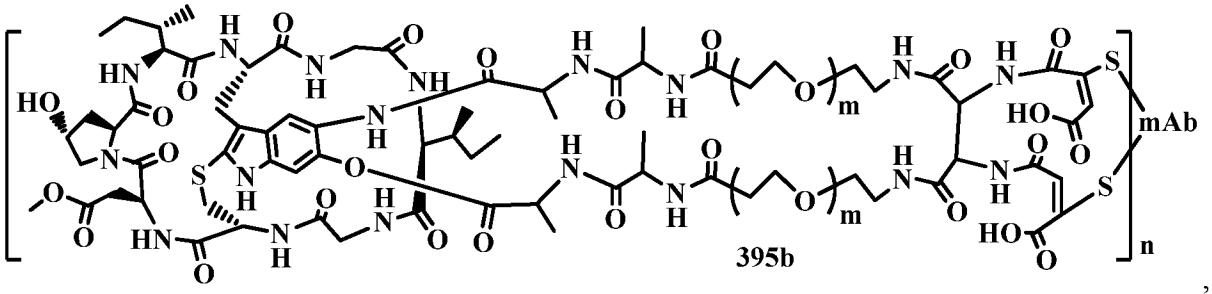
393

,



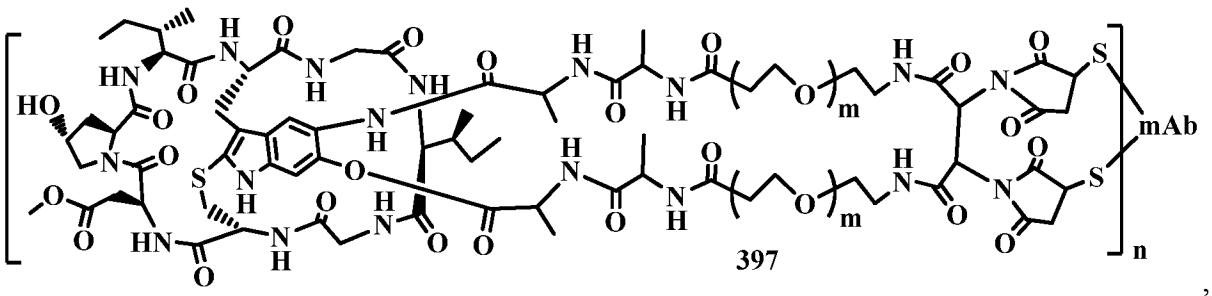
395a

,



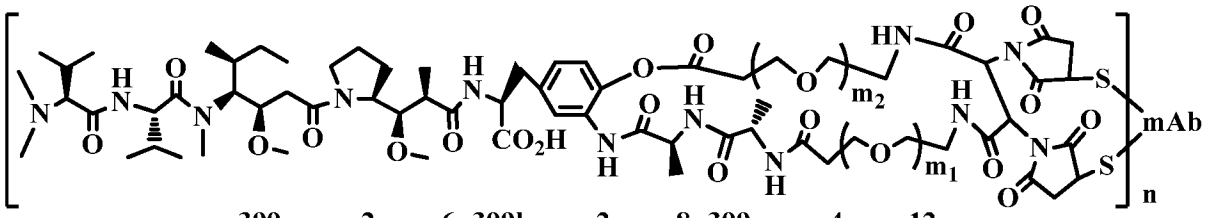
395b

,



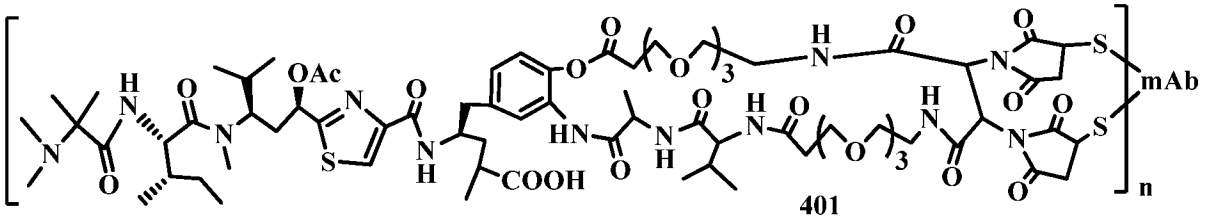
397

,



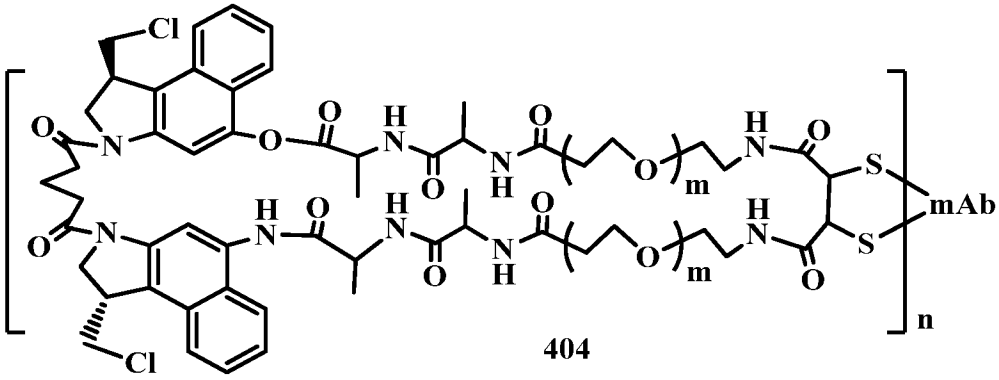
399a, m_1=2, m_2=6; 399b, m_1=2, m_2=8; 399c, m_1=4, m_2=12.

,



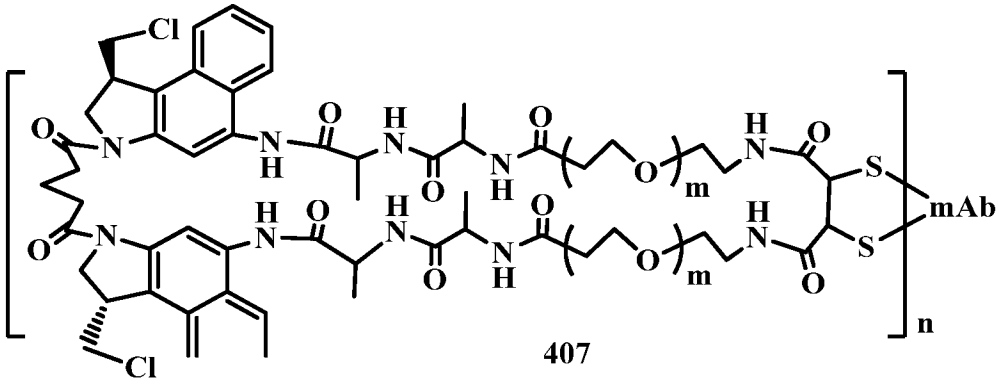
401

,



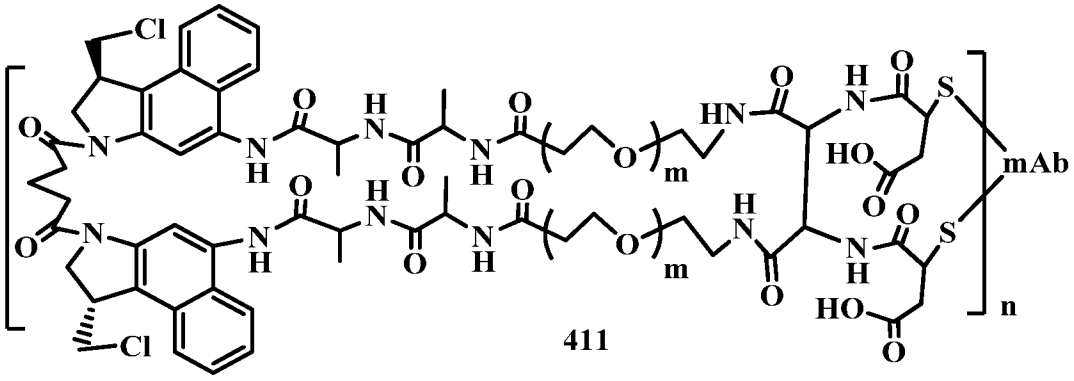
404

,



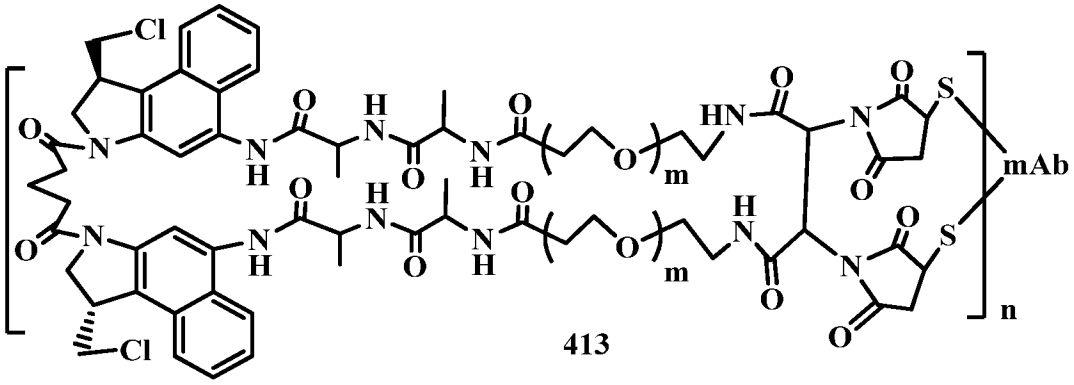
407

,



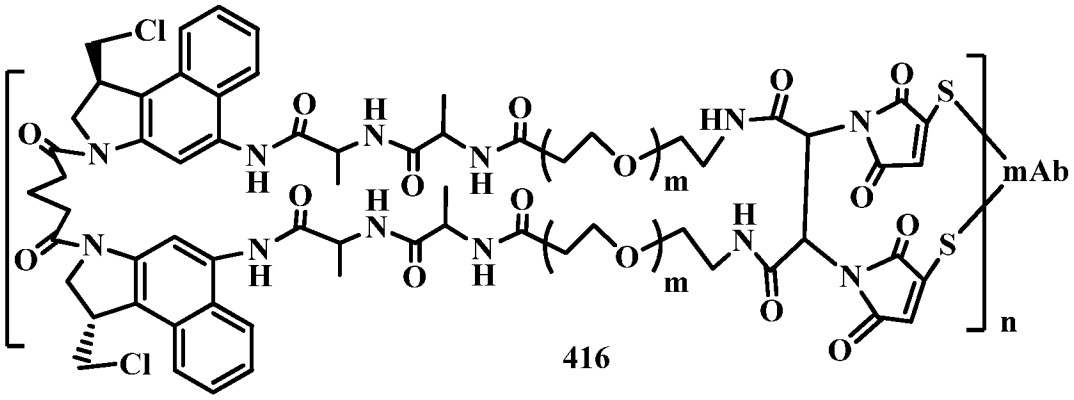
411

,



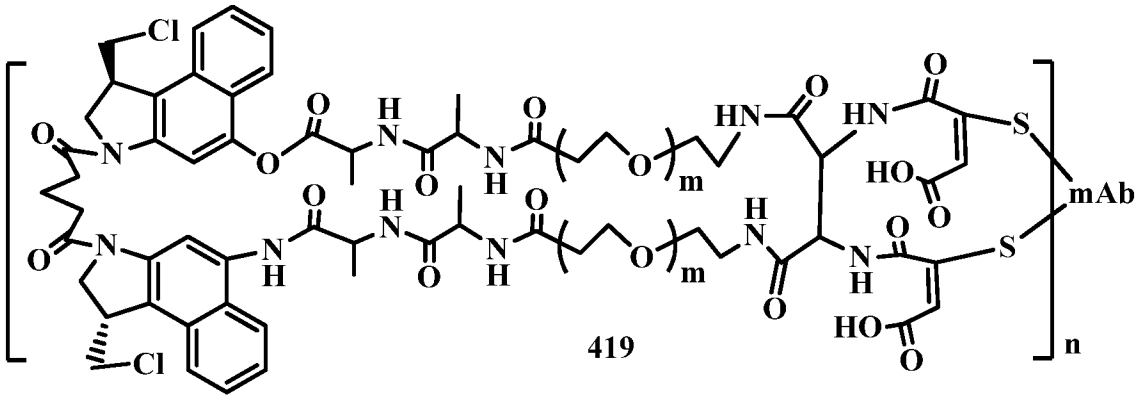
413

,



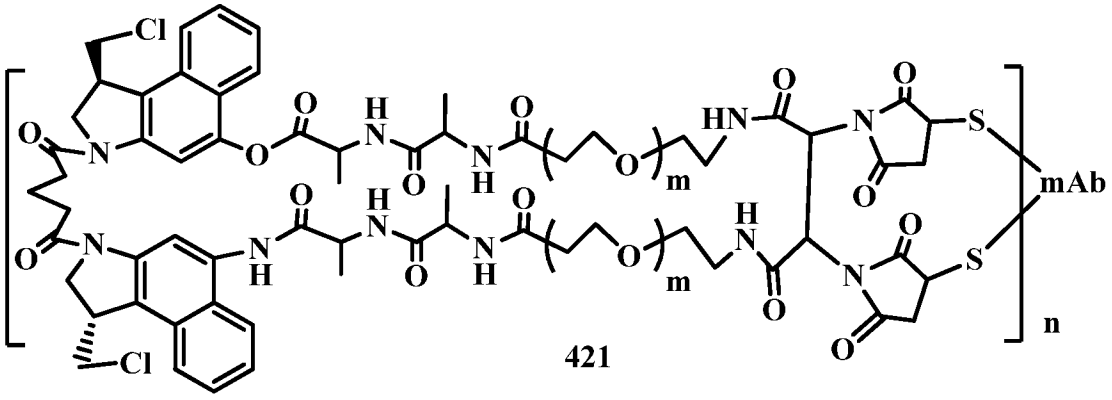
416

,



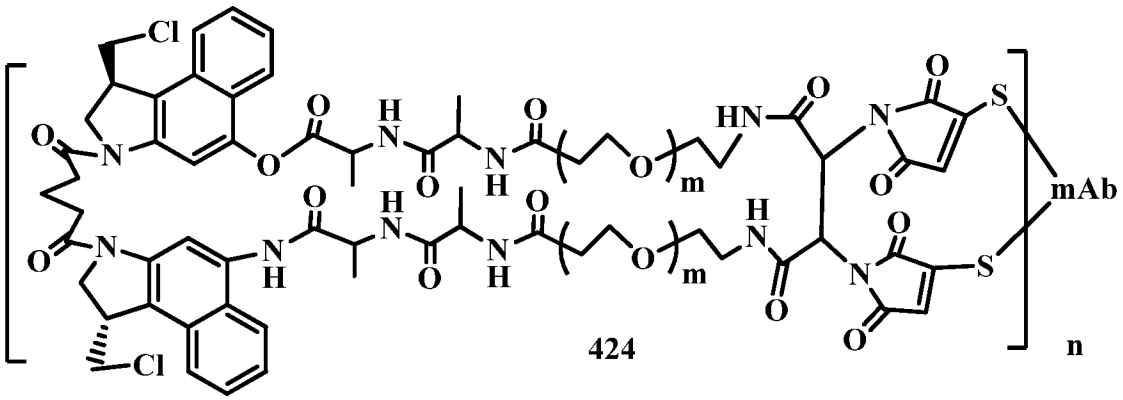
419

,



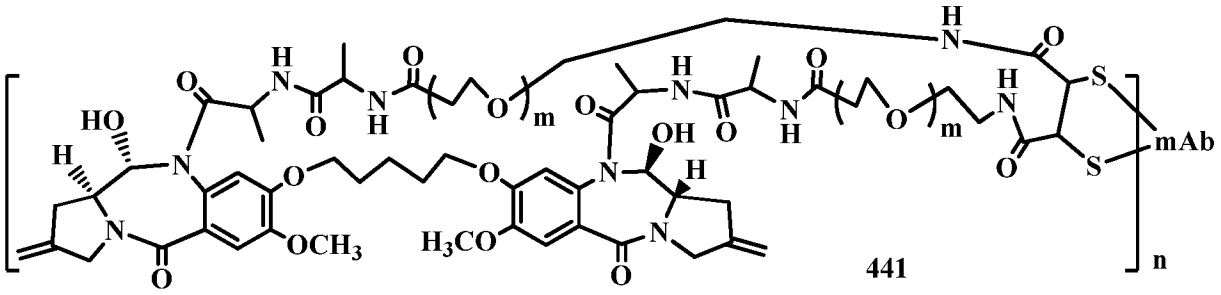
421

,



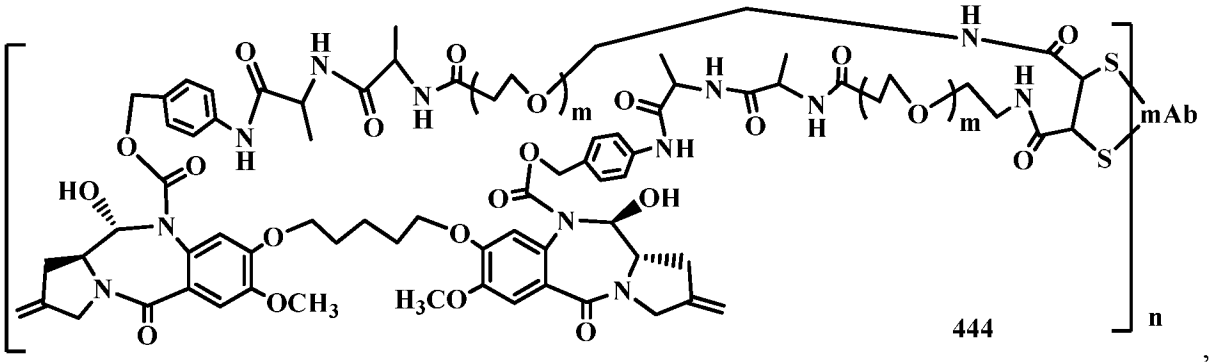
424

,



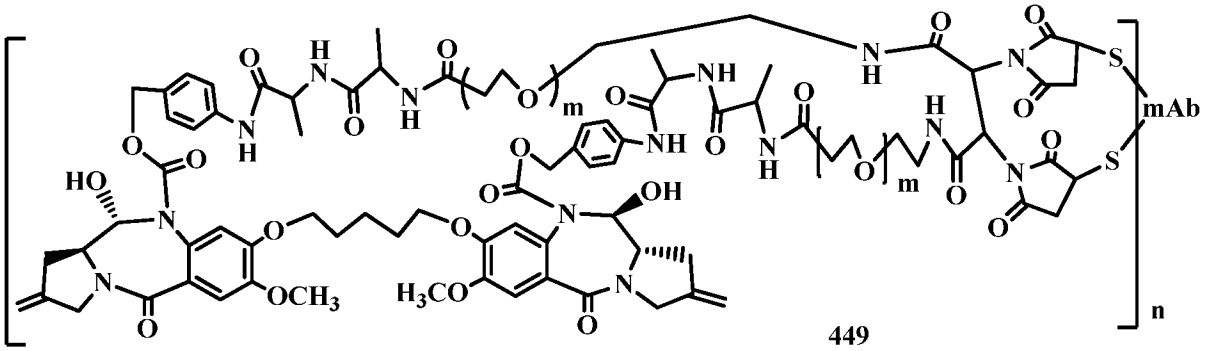
441

,



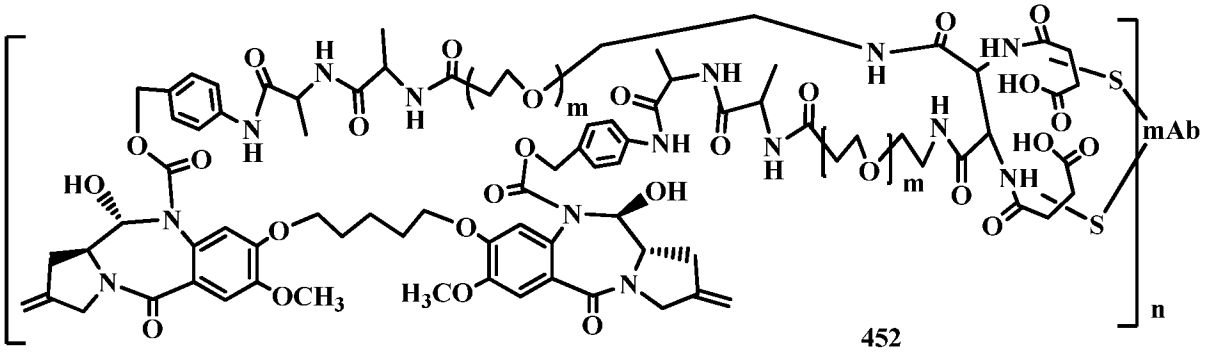
444

,



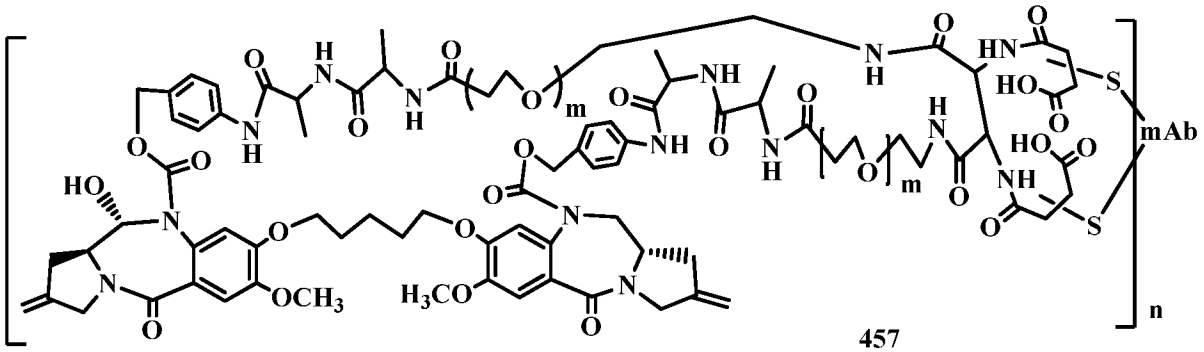
449

,



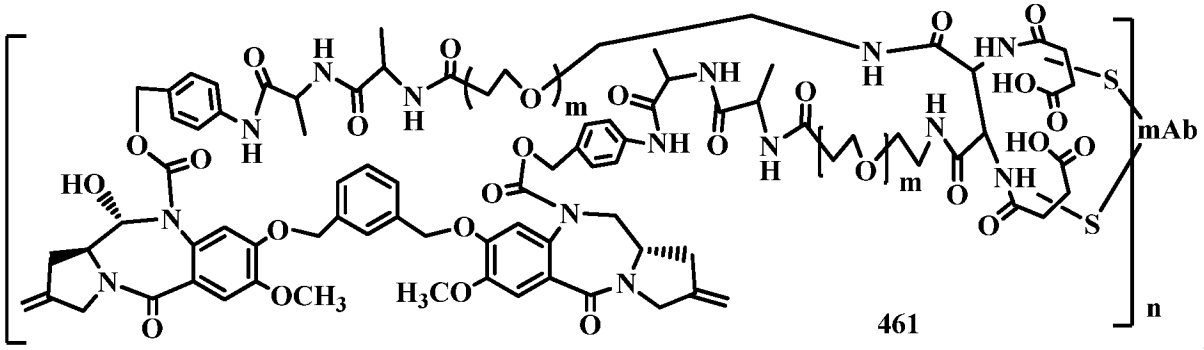
452

,



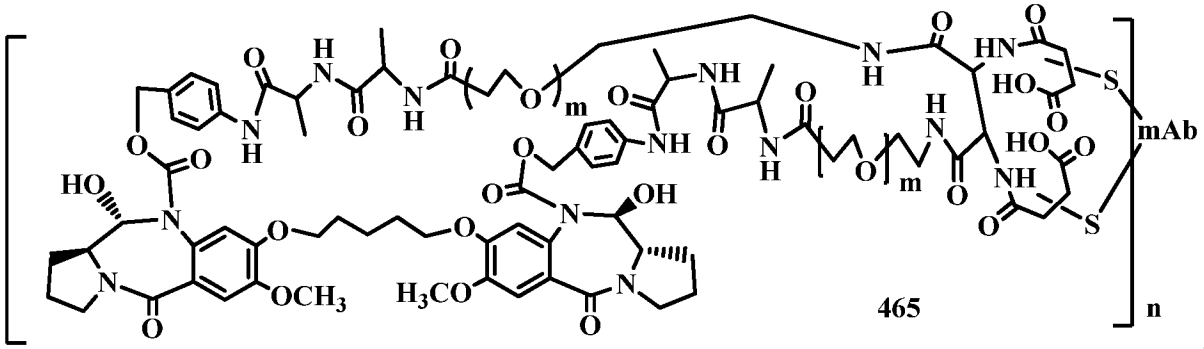
457

,



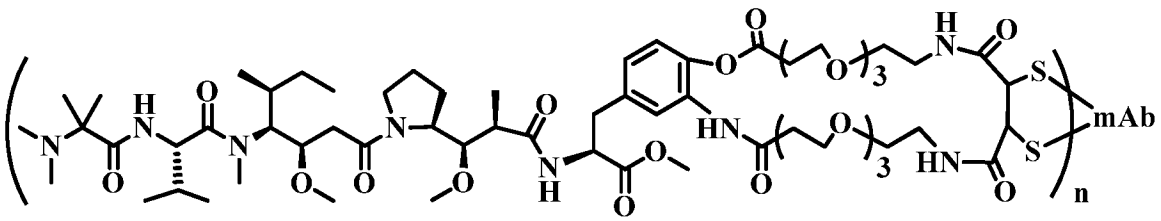
461

,

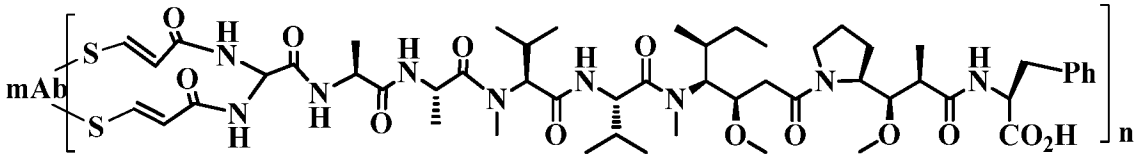


465

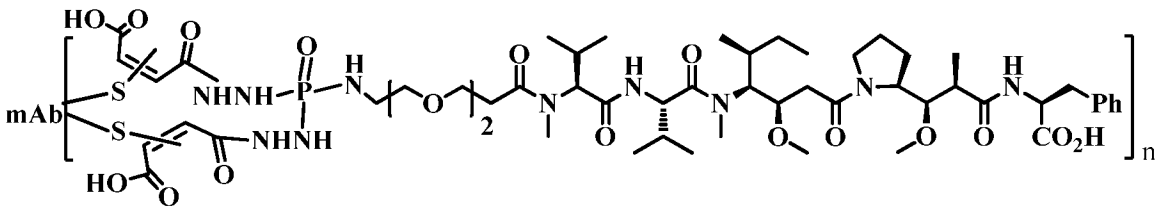
,



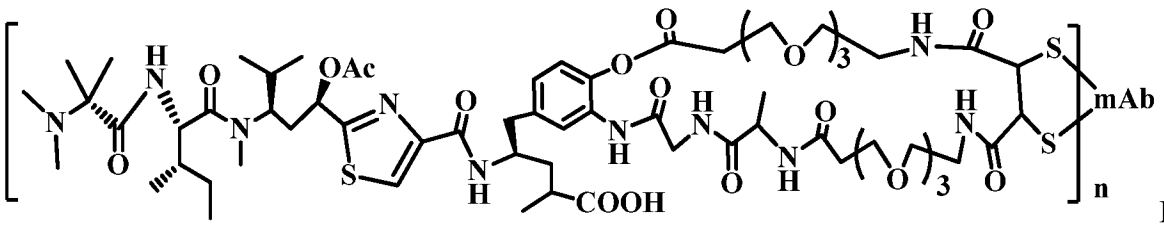
A-3a,



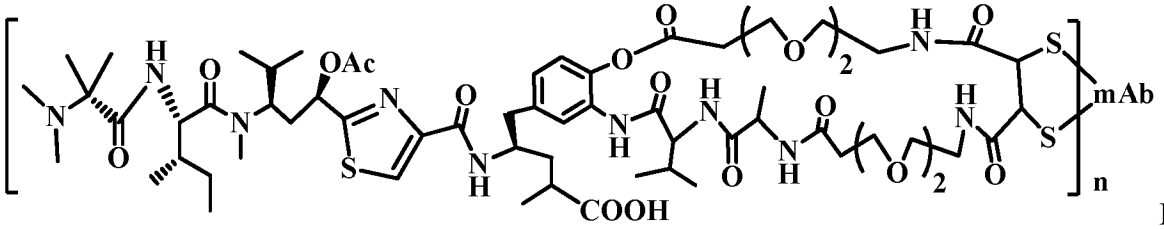
A-4a,,



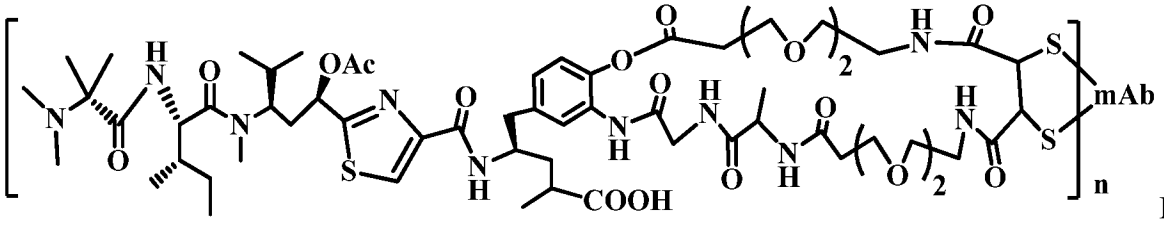
A-5a,



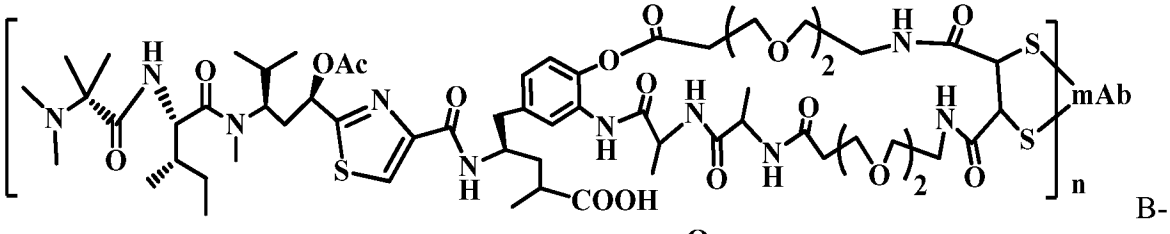
B-3a,



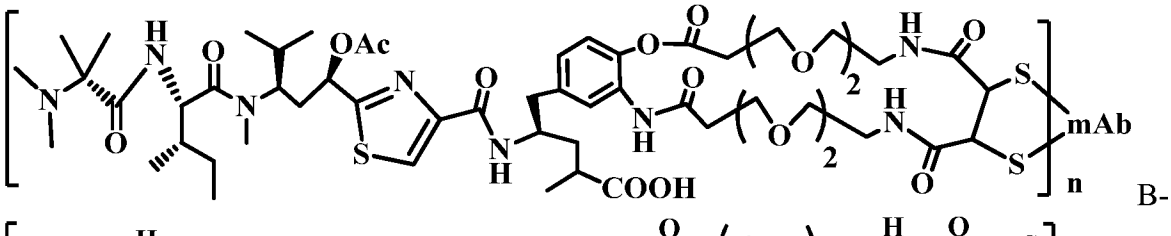
B-6a,



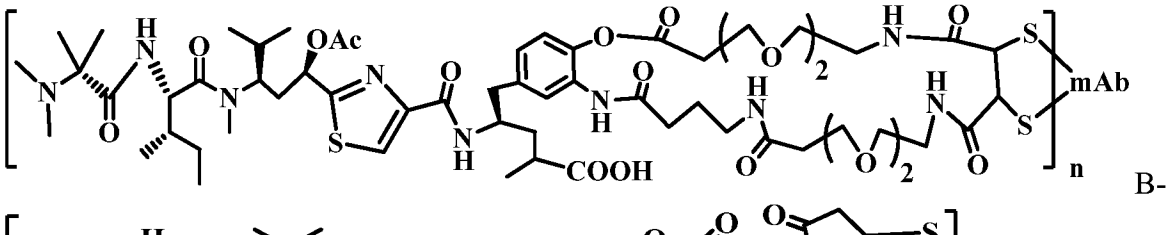
B-9a,



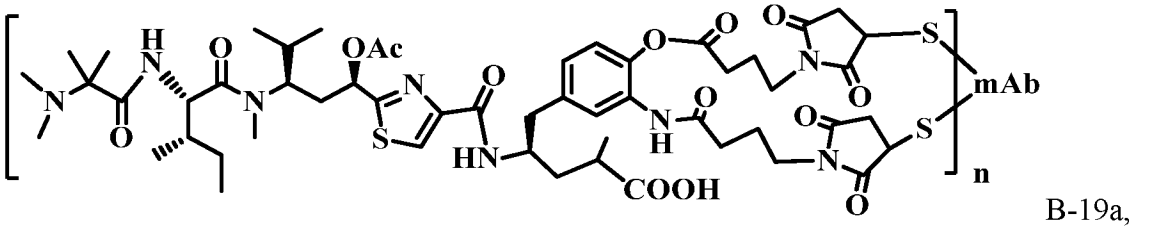
B-12a,



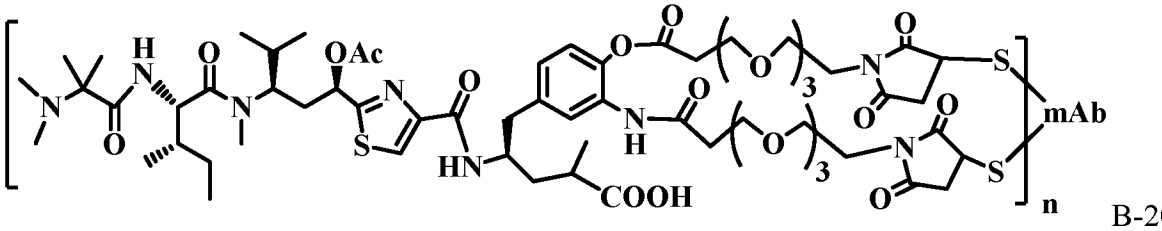
B-15a,



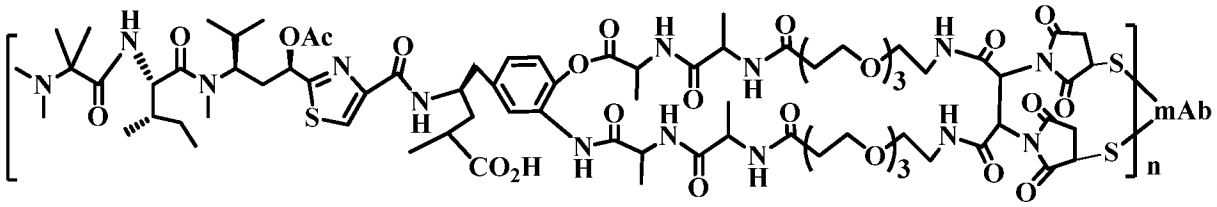
B-18a,



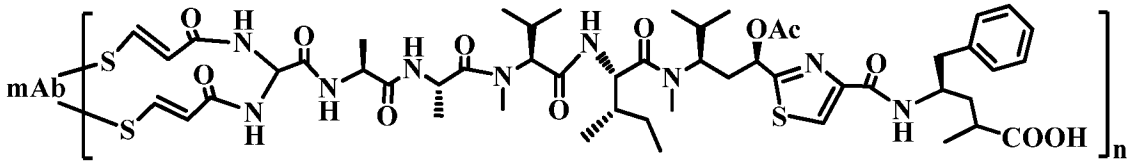
B-19a,



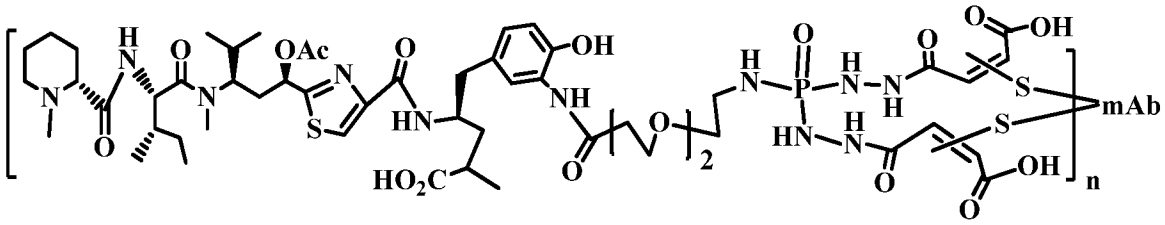
B-20a,



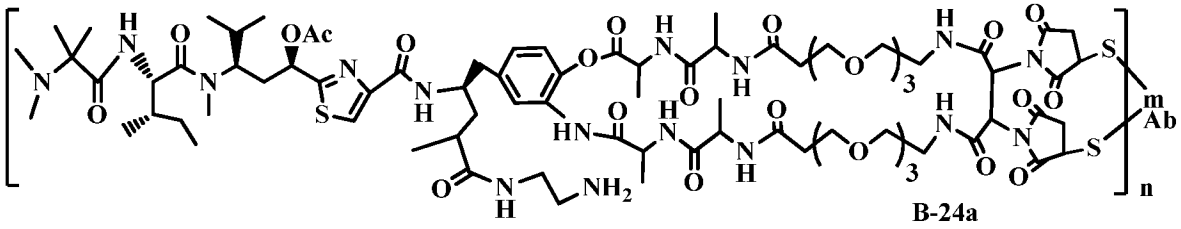
B-21a,



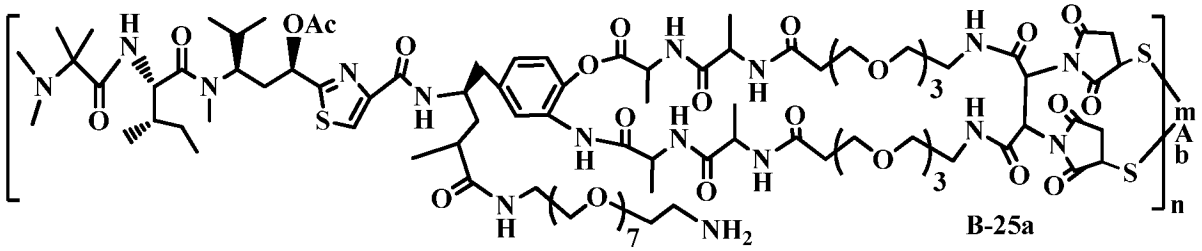
B-22a,



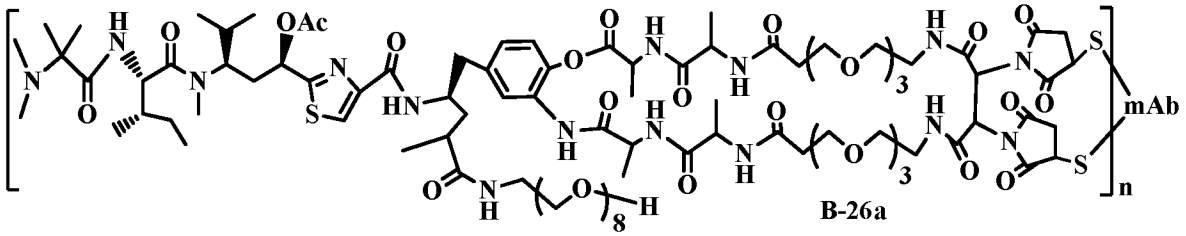
B-23a,



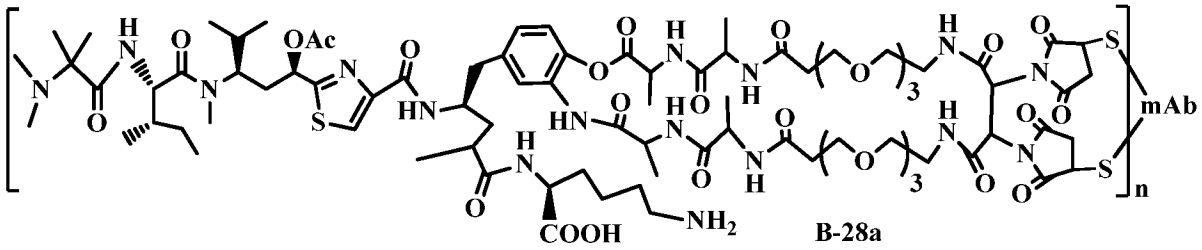
B-24a,



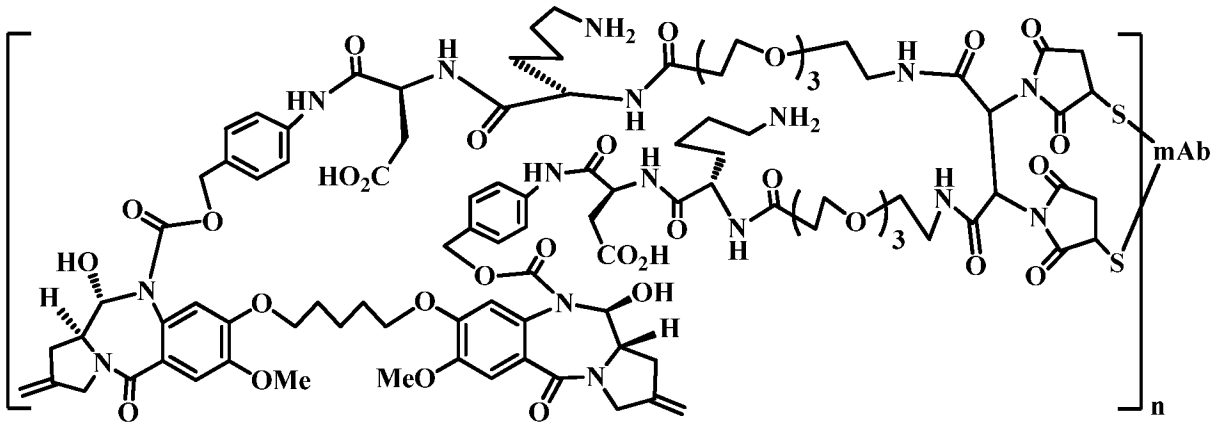
B-25a,



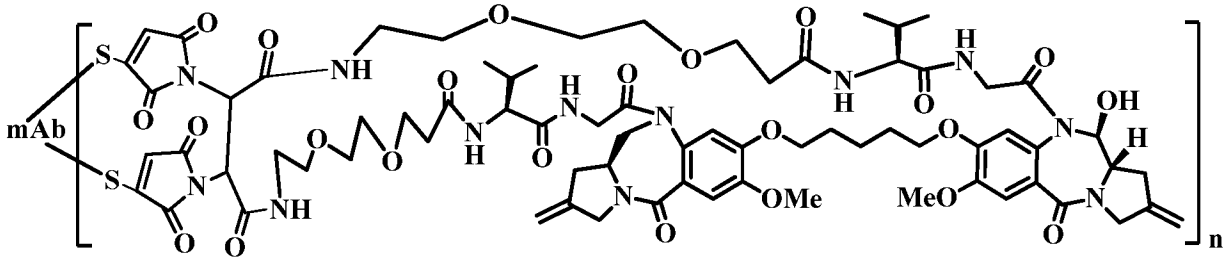
B-26a,



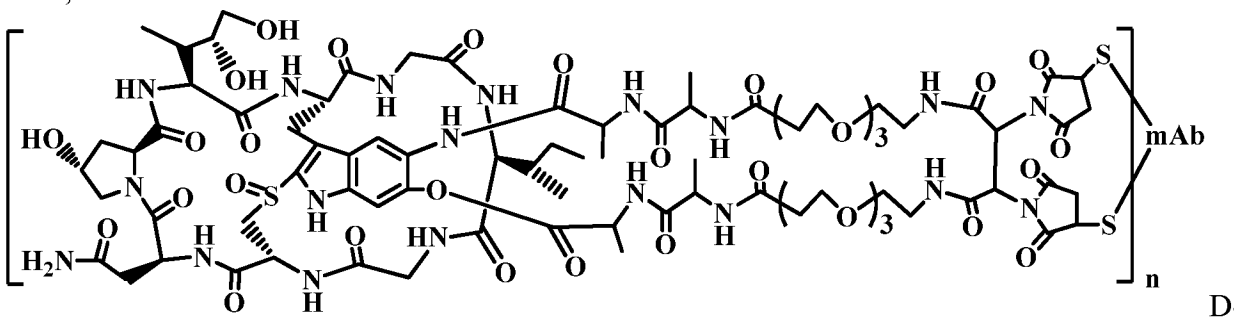
B-28a



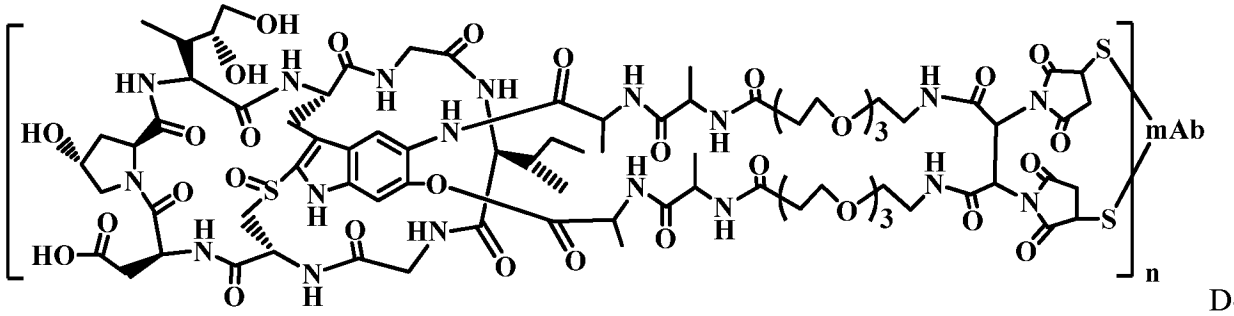
C-3a,



C-4a,



D-1a



D-2a

где m равно 0-20, если не указано в формуле; mAb, m_1 и n определены так же, как в п. **1**.

37. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество конъюгата по любому из пп. **1, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34** или **36,** и его фармацевтически приемлемой соли, носитель, разбавитель или вспомогательное вещество, или комбинацию конъюгатов для лечения или профилактики рака, или аутоиммунного заболевания, или инфекционного заболевания.

38. Фармацевтическая композиция по п. **37**, содержащая 0,1 г/л ~300 г/л концентрации конъюгата по любому одному или более пп. **1, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22,**

23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или **36;** буферный агент с pH от 4,5 до 7,5 при концентрации 10 мМ–500 нМ; 0%–15% одного или более полиолов (включая фруктозу, маннозу, мальтозу, лактозу, арабинозу, ксилозу, рибозу, рамнозу, галактозу, глюкозу, сахарозу, трегалозу, сорбозу, мелезитозу, рафинозу, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, лактит, эритрит, треит, сорбит, глицерин или L-глюконат, и его соли металлов); 0–1,0% поверхностно-активного вещества [выбранного из полисорбата (включая полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 или полисорбат 85), полоксамера (включая полоксамер188, поли(этиленоксид)-поли(пропиленоксид) или полоксамер 407 или полиэтилен-полипропиленгликоль и тому подобное); Тритон; додецилсульфат натрия (SDS); лаурилсульфат натрия; октилгликозид натрия; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсульфобетаин; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарил-саркозин; линолеил-, миристил- или цетил-бетаин; лауроамидопропил-, кокамидопропил-, линолеамидопропил-, миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилбетаин (лауроамидопропил); миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилдиметиламин; метил кокоил натрия или метил олеил таурат динатрия; додецилбетаин, додецилдиметиламиноксид, кокамидопропилбетаин и кокоамфо глицинат; или и серии MONAQUAT^{TM} (изостеарилэтилимидония этосульфат); полиэтилгликоль, полипропилгликоль и сополимеры этилена и пропиленгликоля (Pluronics, PF68)]; 0–5 мг/мл антиоксиданта (выбранного из аскорбиновой кислоты и/или метионина); 0–2 мМ хелатирующего агента(выбранного из ЭДТА или ЭГТК); 0–5% консерванта (выбранного из бензилового спирта, октадецилдиметилбензиламмонийхлорида, гексаметонийхлорида, хлорида бензалкония, хлорида бензетония, фенола, бутилового и бензилового спирта, алкилпарабенов, например, метил или пропилпарабен, катехола, резорцина, циклогексанола, 3-пентанола или м-крезола); 0–5% свободной аминокислоты; и/или тонизирующий агент (выбранный из маннита, сорбита, ацетата натрия, хлорида калия, фосфата натрия, фосфата калия, тринатрийцитрата или NaCl) для контроля осмотического давления от около 250 до 350 мОсм конечного состава.

39. Фармацевтическая композиция по п. **37** или **38,** содержащаяся во флаконе, бутылке, предварительно заполненном шприце или предварительно заполненном шприце с автоинжектором, в виде раствора или лиофилизированного твердого вещества.

40. Конъюгат по п. **1, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36,** или в виде фармацевтической композиции по п. **37** или **38,** обладающий активностью уничтожения клетки in vitro, in vivo или ex vivo.

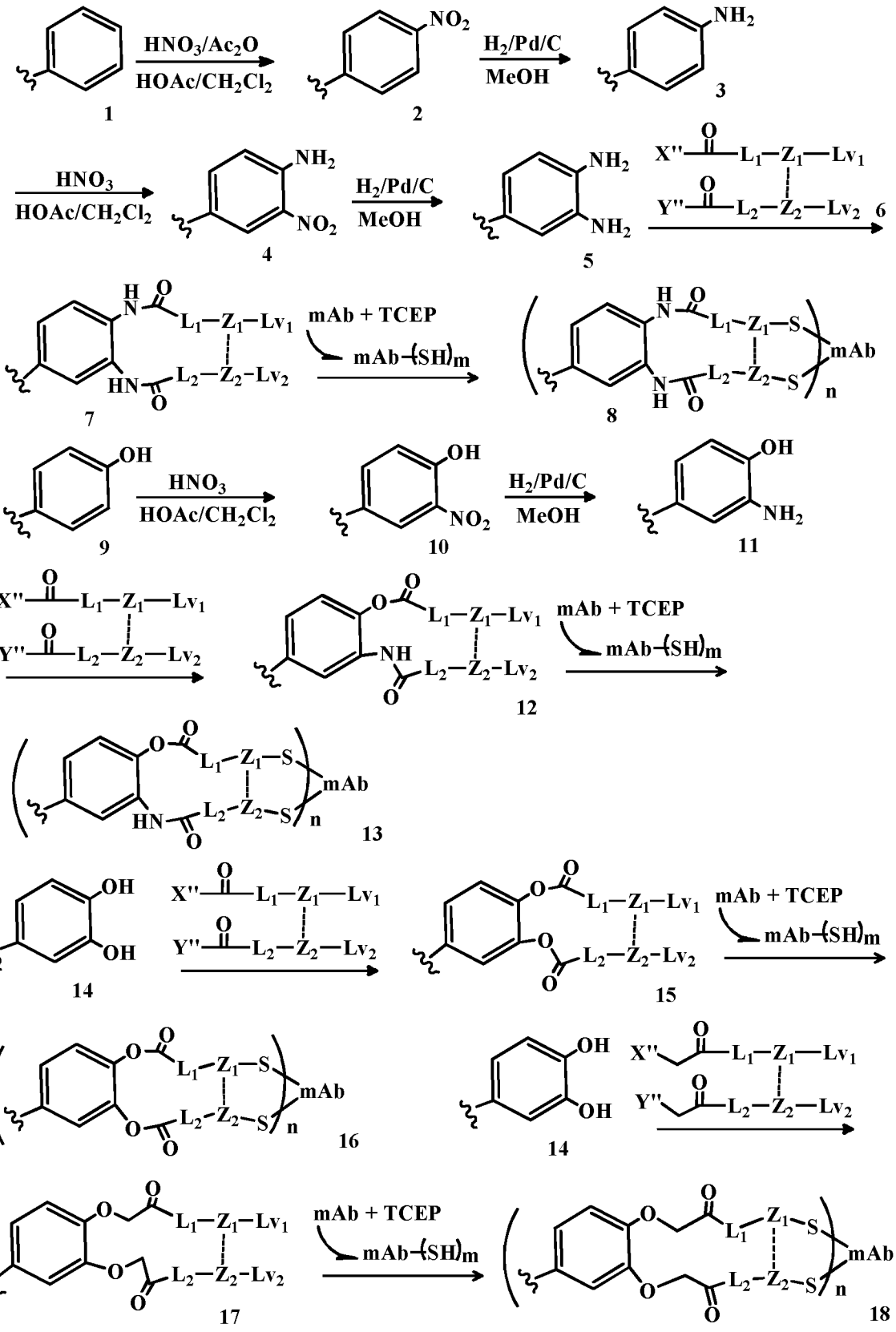
41. Фармацевтическая композиция по п. **37** или **38,** введенная одновременно с химиотерапевтическим агентом, лучевой терапией, иммунотерапевтическим агентом, агентом

аутоиммунного расстройства, антиинфекционными агентами или другими конъюгатами для синергетически эффективного лечения или профилактики рака, или аутоиммунного заболевания, или инфекционного заболевания.

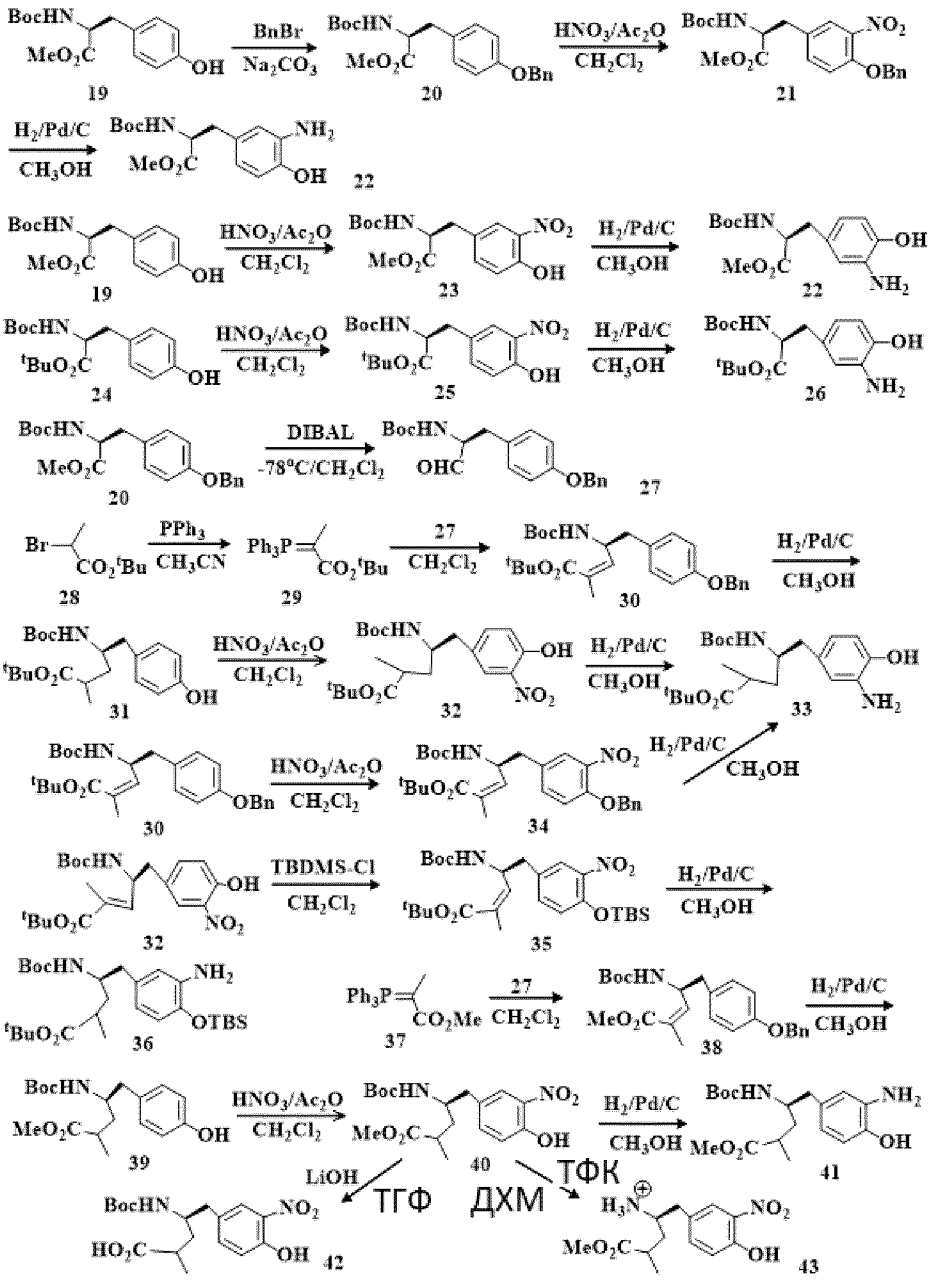
42. Синергетические агенты по п.41, выбраны из одного или более следующих лекарственных средств: абатацепт (Оренсия), абиратерона ацетат (Zytiga®), ацетаминофен/гидрокодон, Адуканумаб, адалимумаб, ADXS31-142 (Advaxis'), ADXS-HER2 (Advaxis'), афатиниб дималеат (Gilotrif®), алемтузумаб (Campath®), алитретиноин (Panretin®), адо-трастузумаб эмтанзин (Kadcyla™), смешанные соли амфетамина (амфетамин/ декстроамфетамин или адерал XR), анастрозол (Arimidex®), арипипразол, атазанавир, атезолизумаб (MPDL3280A), аторвастатин, акситиниб (Inlyta®), авелумаб, белиностат (Beleodaq™), бевацизумаб (Avastin®), кабазитаксел (Jevtana®), кабозантиниб (Cometriq™), бексаротен (Targretin®), блинатумомаб (Blincyto™), бортезомиб (Velcade®), бозутиниб (Bosulif®), брентуксимаб ведотин (Adcetris®), будезонид, будезонид/формотерол, бупренорфин, капецитабин, карфилзомиб (Kyprolis®), целекоксиб, церитиниб (LDK378/Zykadia), цетуксимаб (Erbitux®), циклоспорин, цинакальцет, кризотиниб (Xalkori®), косентикс, CTL019, дабигатран, дабрафениб (Tafinlar®), даратумумаб (Darzalex), дарбэпоэтин альфа, дарунавир, иматиниба мезилат (Gleevec®), дазатиниб (Sprycel®), денилейкин-дифтитокс (Ontak®)деносумаб (Xgeva®), депакот, декслансопразол, дексметилфенидат, дексаметазон, система охлаждения Dignitana DigniCap, динутуксимаб (Unituxin™), доксициклин, дулоксетин, дувелисиб, элотузумаб, эмтрицитабин/рилпивирин/тенофовира дизопроксил фумарат, эмтрицитабин/тенофовир/эфавиренз, эноксапарин, энзалутамид (Xtandi®), эпоэтин альфа, эрлотиниб (Tarceva®), эзомепразол, эсзопиклон, этанерцепт, эверолимус (Afinitor®), эксеместан (Aromasin®), эверолимус (Afinitor®), эзетимиб, эзетимиб/симвастатин, фенофибрат, филграстим, финголимод, флутиказона пропионат, флутиказон/сальметерол, фулвестрант (Faslodex®), газива, гефинитиб (Iressa®), глатирамер, гозерелин ацетат (Zoladex), икотиниб, иматиниб (Gleevec), ибритутомаб тиуксетан (Zevalin®), ибрутиниб (Imbruvica™), иделалисиб (Zydelig®), инфликсимаб, инипариб, инсулин аспарт, инсулин детемир, инсулин гларгин, инсулин лизпро, интерферон бета−1a, интерферон бета-1b, лапатиниб (Tykerb®), ипилимумаб (Yervoy®), ипратропия бромид/сальбутамол, иксазомиб (Ninlaro®), Канума, ланреотид ацеатат (Somatuline® Depot), леналидомид, леналиомид (Revlimid®), ленватиниб мезилат (Lenvima™), летрозол (Femara®), левотироксин, левотироксин, лидокаин, линезолид, лираглутид, лиздексамфетамин, LN-144 (Lion Biotech.), MEDI4736 (AstraZeneca, Celgene), мемантин, метилфенидат, метопролол, мекинист, модафинил, мометазон, нилотиниб (Tasigna®), нирапариб, ниволумаб (Opdivo®), офатумумаб (Arzerra®), обинутузумаб (Gazyva™), олапариб (Lynparza™), олмесартан, олмесартан

/ гидрохлоротиазид, омализумаб, этиловые эфиры омега-3 жирных кислот, осельтамивир, оксикодон, палбоциклиб (Ibrance®), паливизумаб, панитумумаб (Vectibix®), панобиностат (Farydak®), пазопаниб (Votrient®), пембролизумаб (Keytruda®), пеметрексед (Alimta), пертузумаб (Perjeta™), конъюгированная пневмококковая вакцина, помалидомид (Pomalyst®), прегабалин, проскавакс, пропранолол кветиапин, рабепразол, хлорид радия 223 (Xofigo®), ралоксифен, ралтегравир, рамуцирумаб (Cyramza®), ранибизумаб, регорафениб (Stivarga®), ритуксимаб (Rituxan®), ривароксабан, ромидепсин (Istodax®), розувастатин, руксолитиниб фосфат (Jakafi™), сальбутамол, севеламер, силденафил, силтуксимаб (Sylvant™), ситаглиптин, ситаглиптин/метформин, солифенацин, соланезумаб, сорафениб (Nexavar®), сунитиниб (Sutent®), тадалафил, тамоксифен, тафинлар, талазопариб, телапревир, темсиролимус (Torisel®), тенофовир/эмтрицитабин, Тестостерон гель, талидомид (Immunoprin, Talidex), Тиотропия бромид, торемифен (Fareston®), траметиниб (Mekinist®), трастузумаб, третиноин (Vesanoid®), устекинумаб, валсартан, велипариб, вандетаниб (Caprelsa®), вемурафениб (Zelboraf®), венетоклакс, вориностат (Zolinza®), зив-афлиберцепт (Zaltrap®), зоставакс, и их аналоги, производные, фармацевтически приемлемые соли, носители, разбавители или их вспомогательные вещества, или комбинация вышеуказанного.

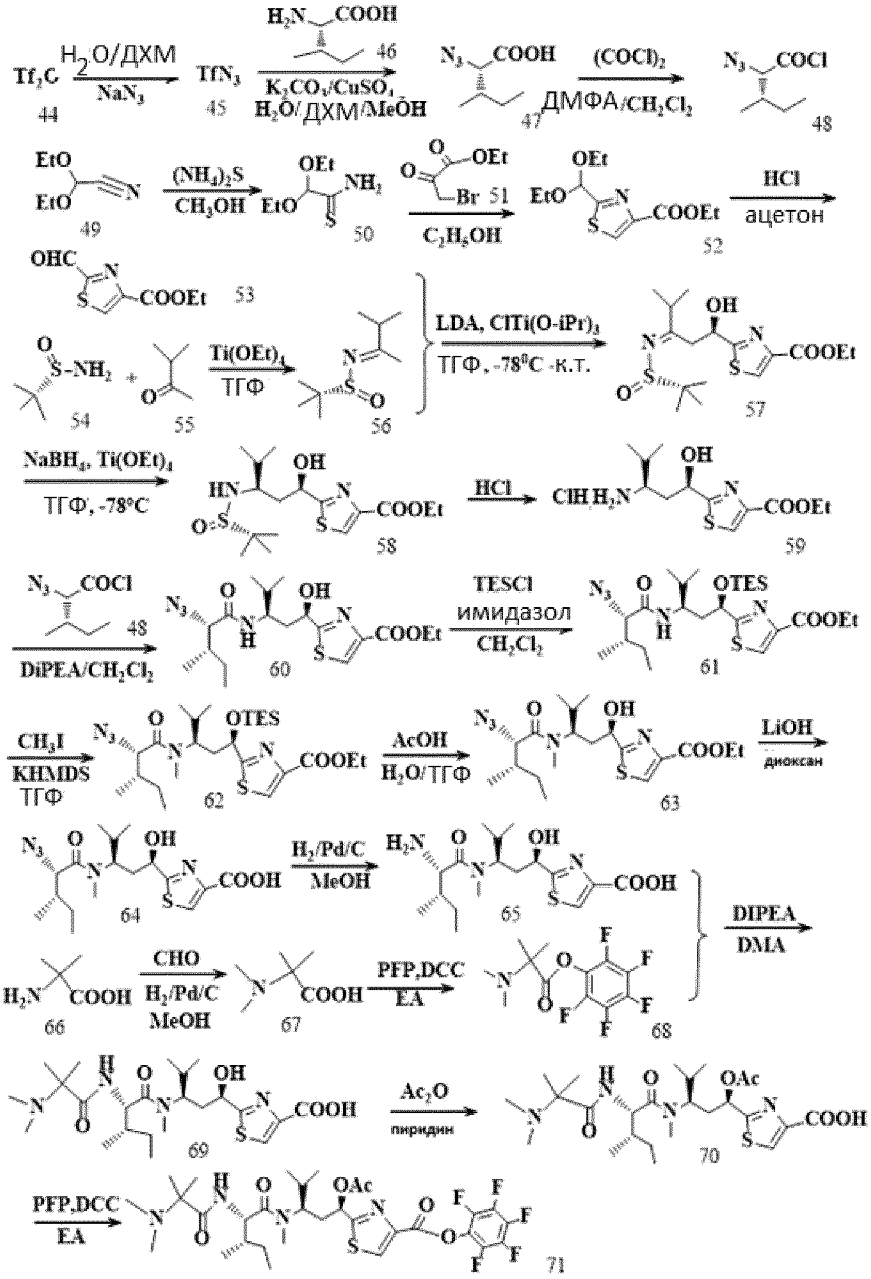
ФИГУРЫ


HNO3/Ac2O
HOAc/CH2Cl2
H2/Pd/C
MeOH
HNO3
HOAc/CH2Cl2
H2/Pd/C
MeOH
mAb + TCEP
mAb-(SH)m
HNO3
HOAc/CH2Cl2
H2/Pd/C
MeOH
mAb + TCEP
mAb-(SH)m
mAb + TCEP
mAb-(SH)m
mAb + TCEP
mAb-(SH)m

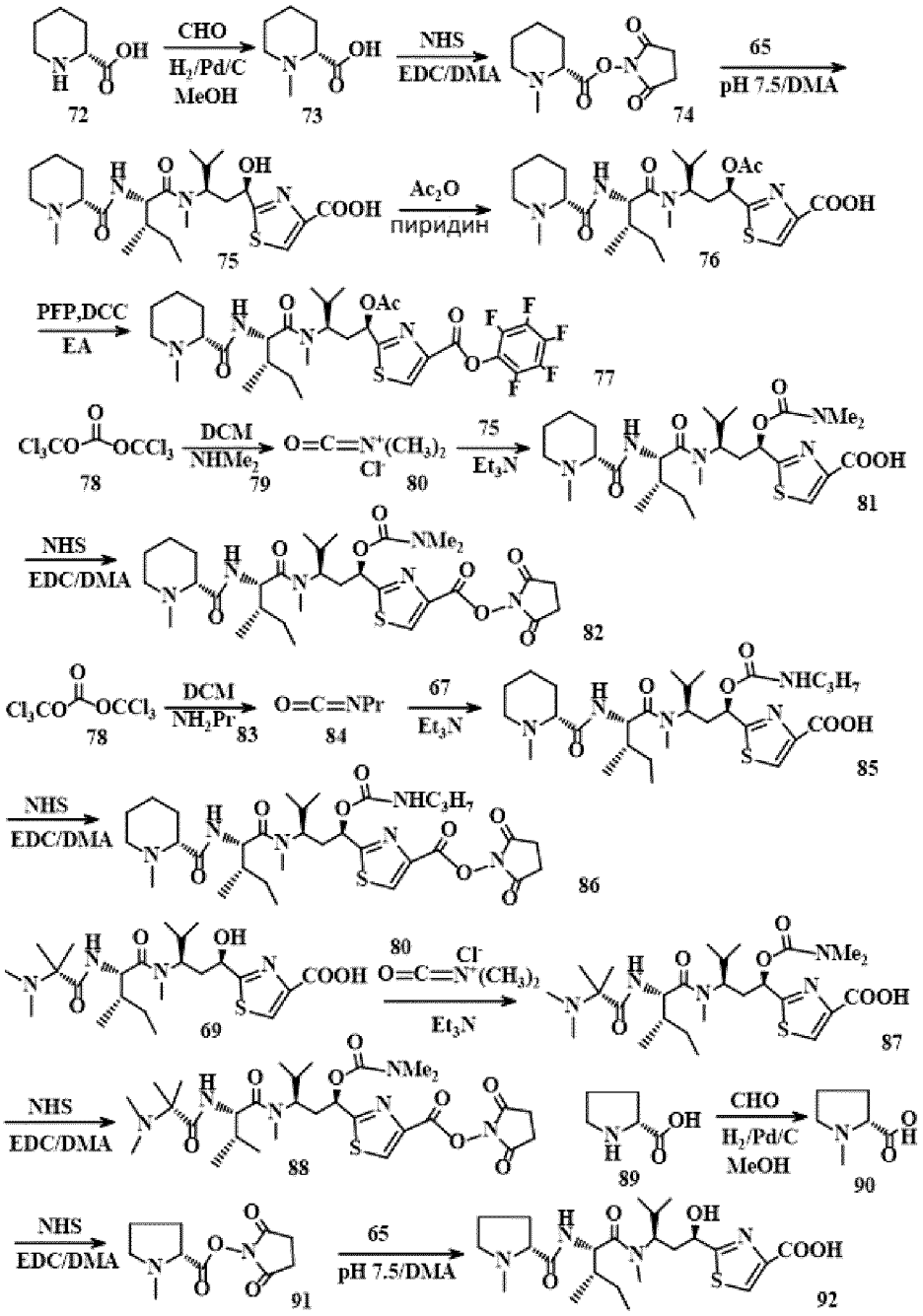
Фиг. 1


BocHN
MeO2C
OH
BnBr
Na2CO3
OBn
HNO3/Ac2O
CH2Cl2
NO2
H2/Pd/C
CH3OH
NH2
19
20
21
22
23
24
25
26
DIBAL
-78°C/CH2Cl2
OHC
27
Br
CO2tBu
PPh3
CH3CN
Ph3P
29
28
30
31
32
33
34
TBDMS-Cl
OTBS
35
36
37
38
39
40
41
42
43
LiOH
ТГФ
ДХМ
ТФК
H3N
HO2C

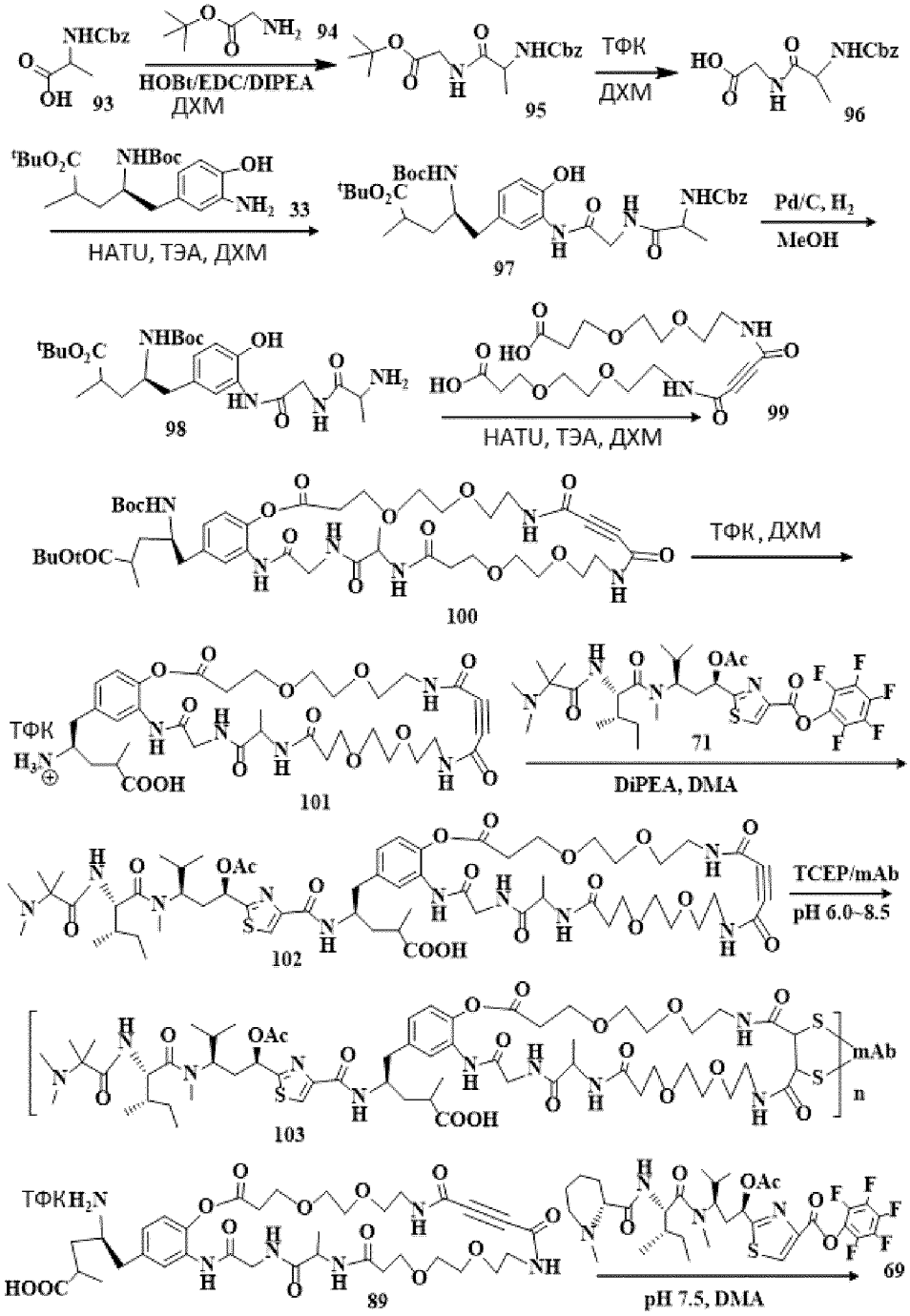
Фиг. 2



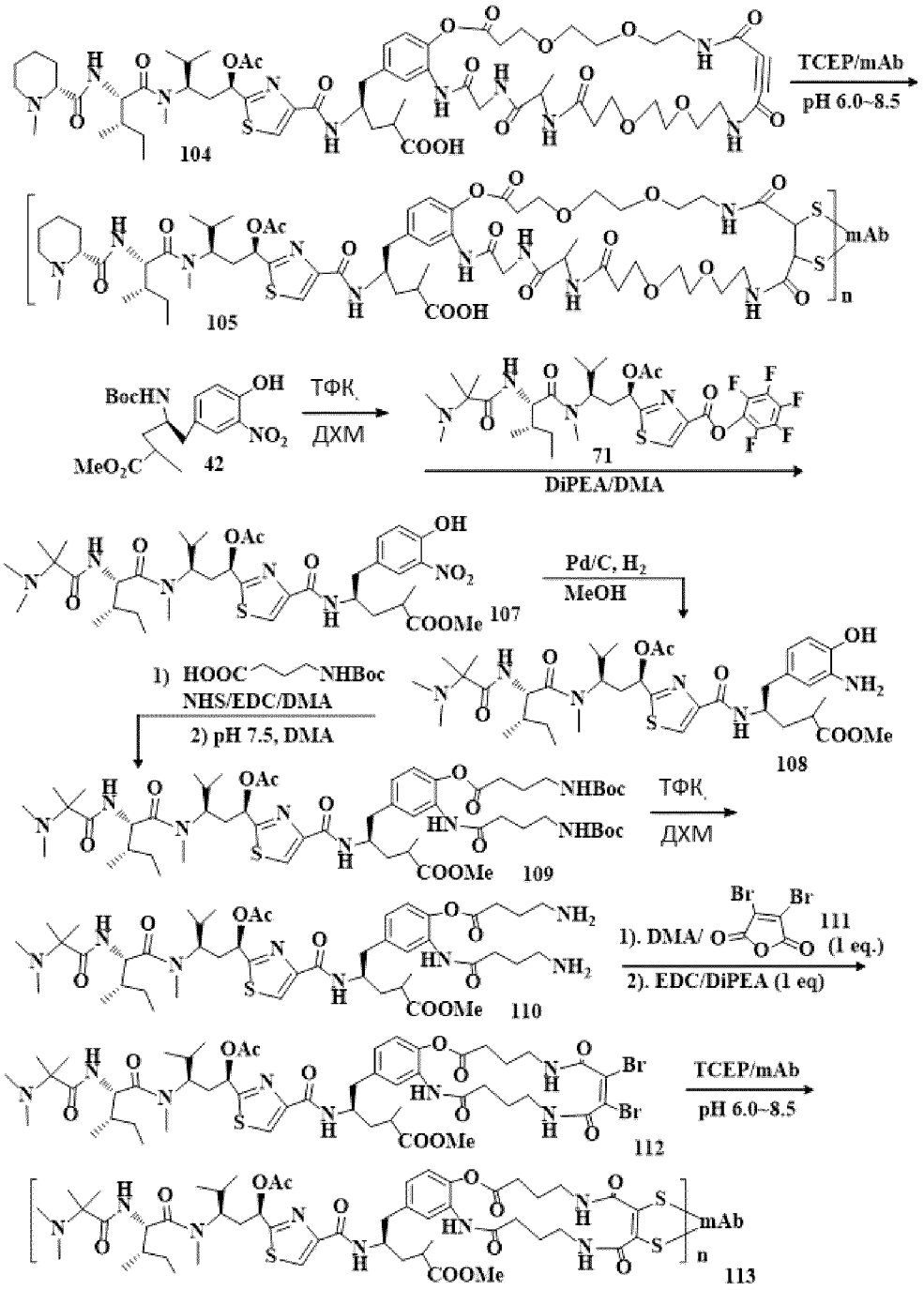
Фиг. 3.


CHO
H2/Pd/C
MeOH
NHS
EDC/DMA
65
pH 7.5/DMA
Ac2O
пиридин
PFP,DCC
EA
DCM
NHMe2
Et3N
DCM
NH2Pr
67
80
Cl-
72
73
74
75
76
77
78
79
81
82
83
84
85
86
69
87
88
89
90
91
92
COOH
OAc
NMe2
NHC3H7

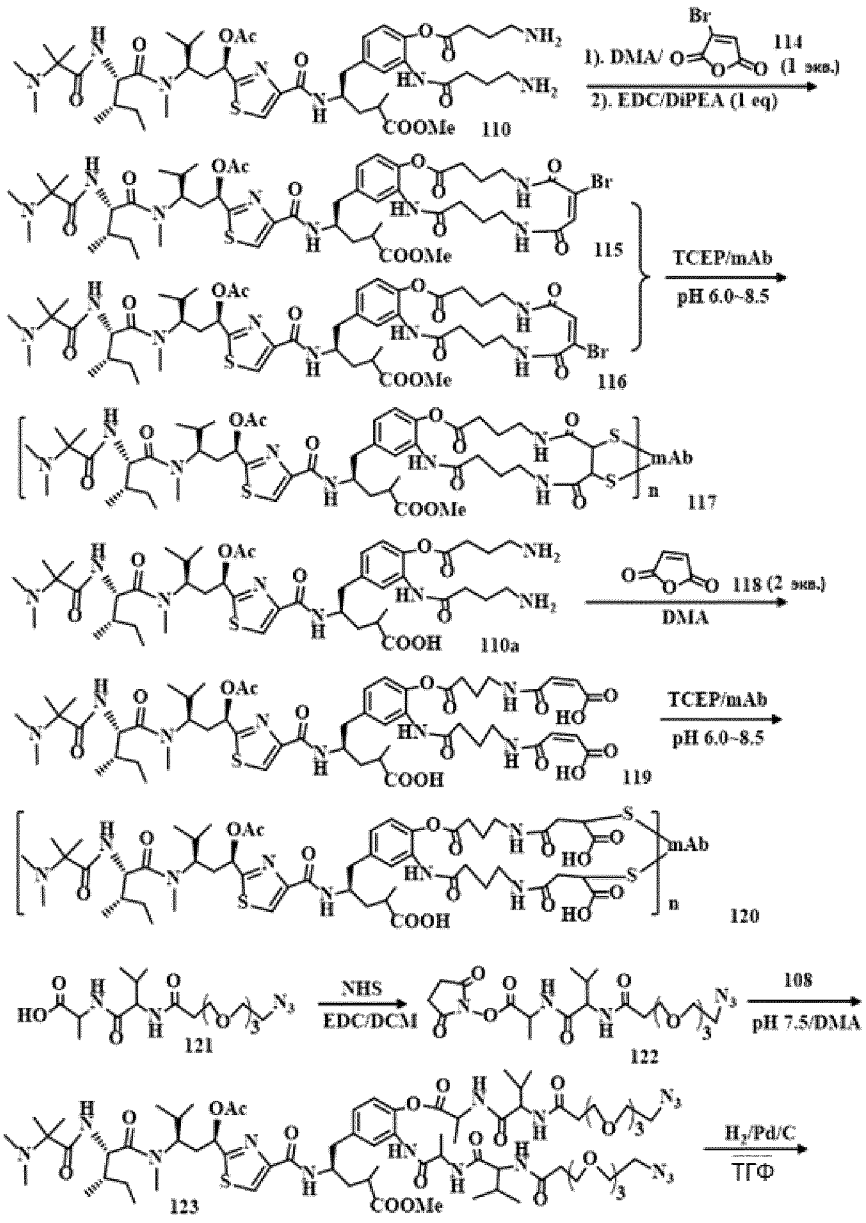
Фиг. 4.


NHCbz
OH
93
94
NH2
HOBt/EDC/DIPEA
ДХМ
95
ТФК
ДХМ
HO
96
tBuO2C
NHBoc
OH
NH2
33
HATU, ТЭА, ДХМ
BocHN
97
Pd/C, H2
MeOH
98
HO
99
HATU, ТЭА, ДХМ
BocHN
BuOtOC
100
ТФК, ДХМ
ТФК
H3N
COOH
101
OAc
71
DiPEA, DMA
102
TCEP/mAb
pH 6.0~8.5
mAb
n
103
ТФКH2N
HOOC
89
pH 7.5, DMA
69

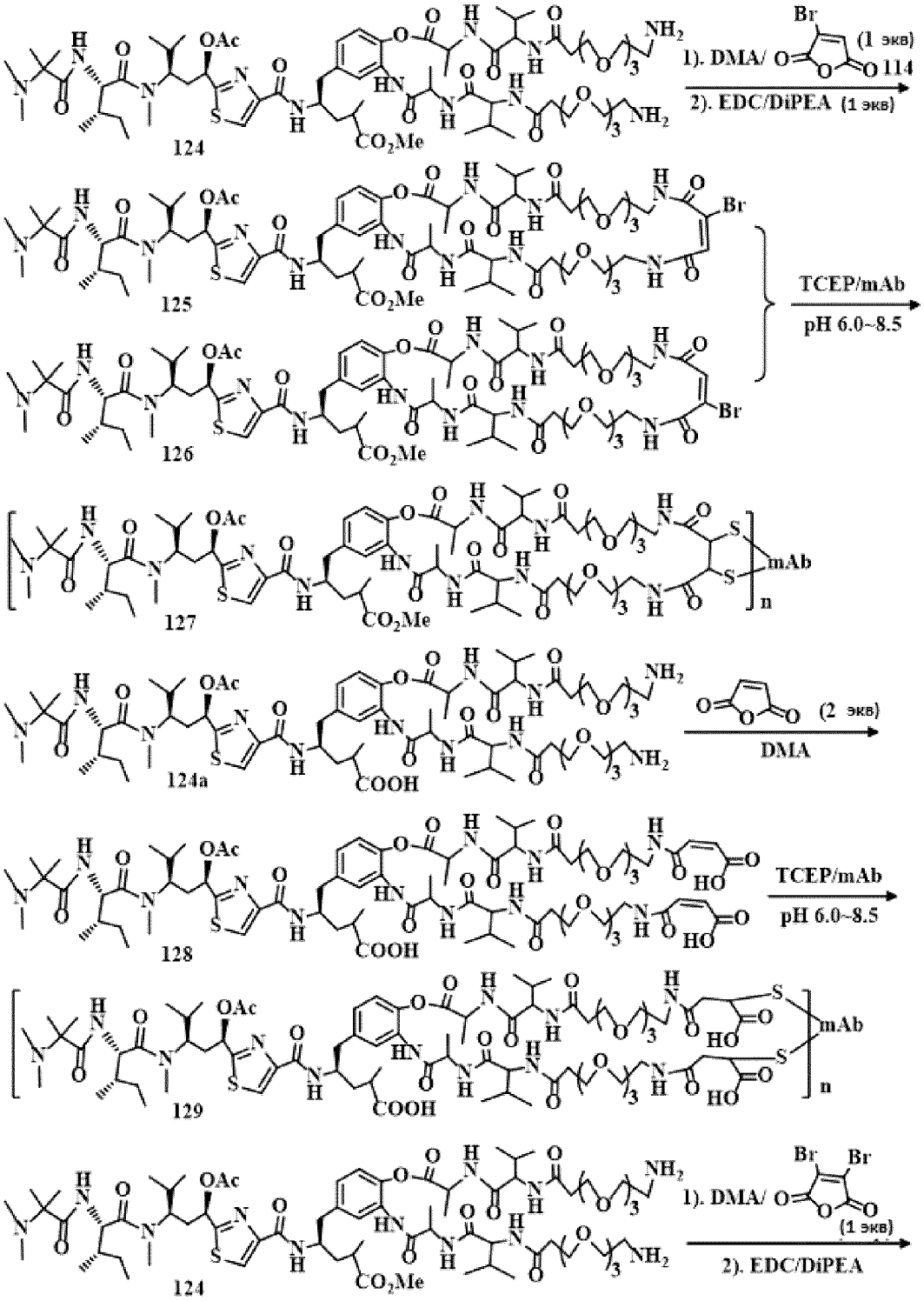
Фиг. 5.


TCEP/mAb
pH 6.0–8.5
104
105
mAb
n
BocHN
OH
NO2
MeO2C
42
ТФК,
ДХМ
71
DiPEA/DMA
107
Pd/C, H2
MeOH
1) HOOC NHBoc
NHS/EDC/DMA
2) pH 7.5, DMA
108
109
110
111
1). DMA/
(1 eq.)
2). EDC/DiPEA (1 eq)
112
113
COOMe

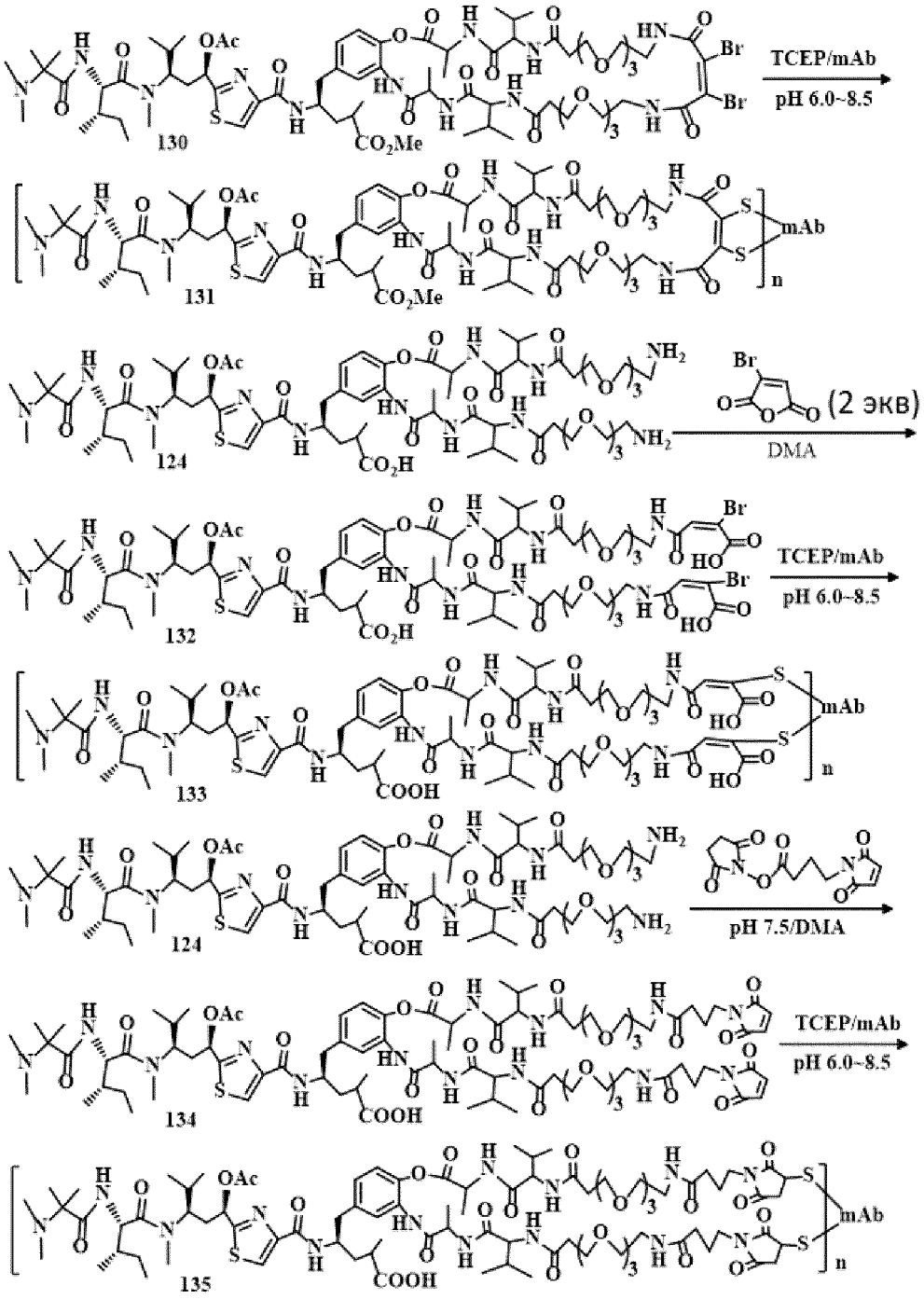
Фиг. 6.


1). DMA/
114
(1 экв.)
2). EDC/DiPEA (1 eq)
110
115
116
TCEP/mAb
pH 6.0~8.5
117
118 (2 экв.)
DMA
110a
119
120
NHS
EDC/DCM
121
122
108
pH 7.5/DMA
123
H2/Pd/C
ТГФ

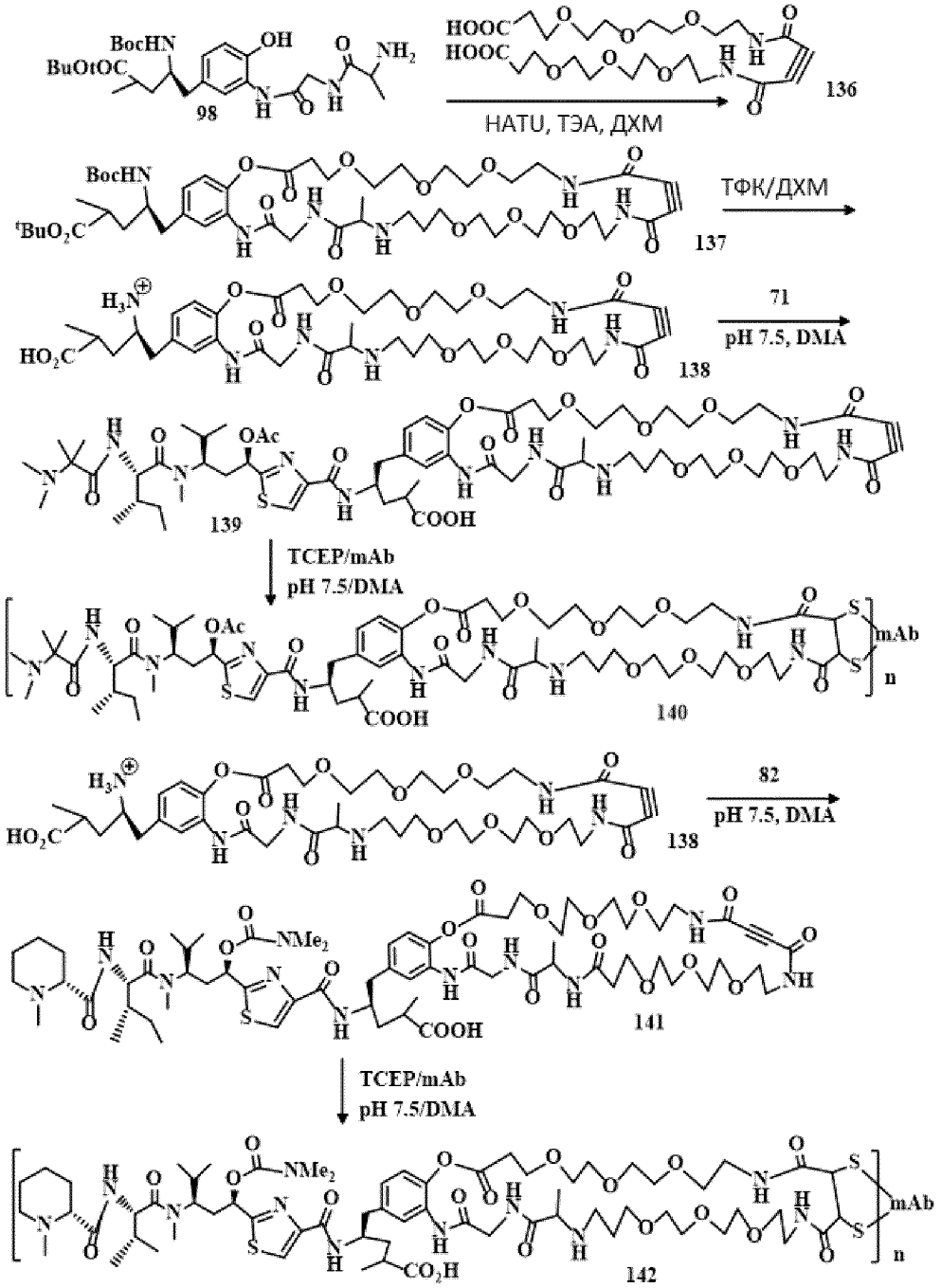
Фиг. 7.


124
1). DMA/
(1 экв)
114
2). EDC/DiPEA (1 экв)
125
126
TCEP/mAb
pH 6.0~8.5
127
mAb
n
124a
(2 экв)
DMA
128
TCEP/mAb
pH 6.0~8.5
129
mAb
n
124
1). DMA/
(1 экв)
2). EDC/DiPEA

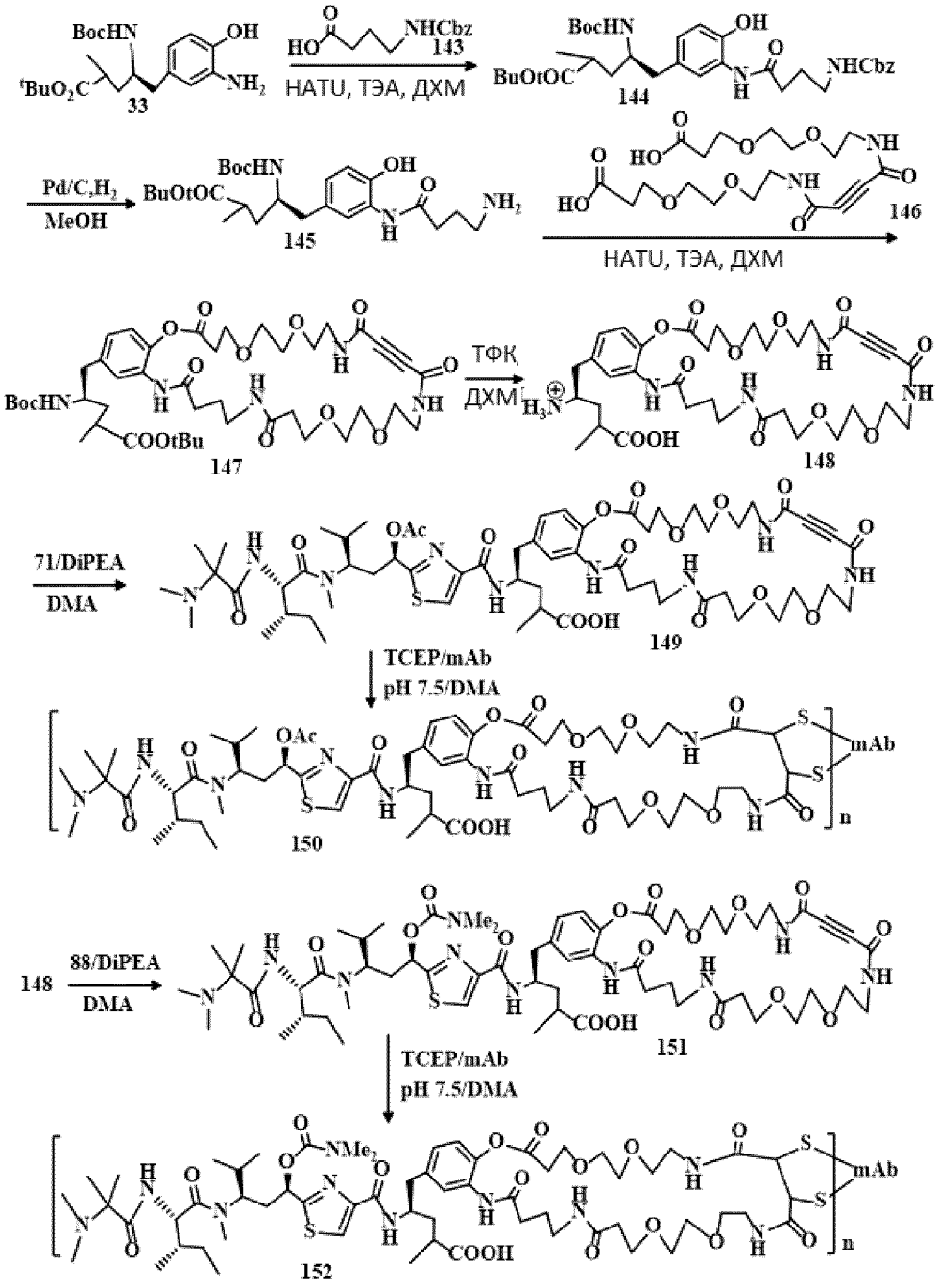
Фиг. 8.


TCEP/mAb
pH 6.0~8.5
130
131
124
(2 экв)
DMA
132
133
pH 7.5/DMA
134
135
mAb
n

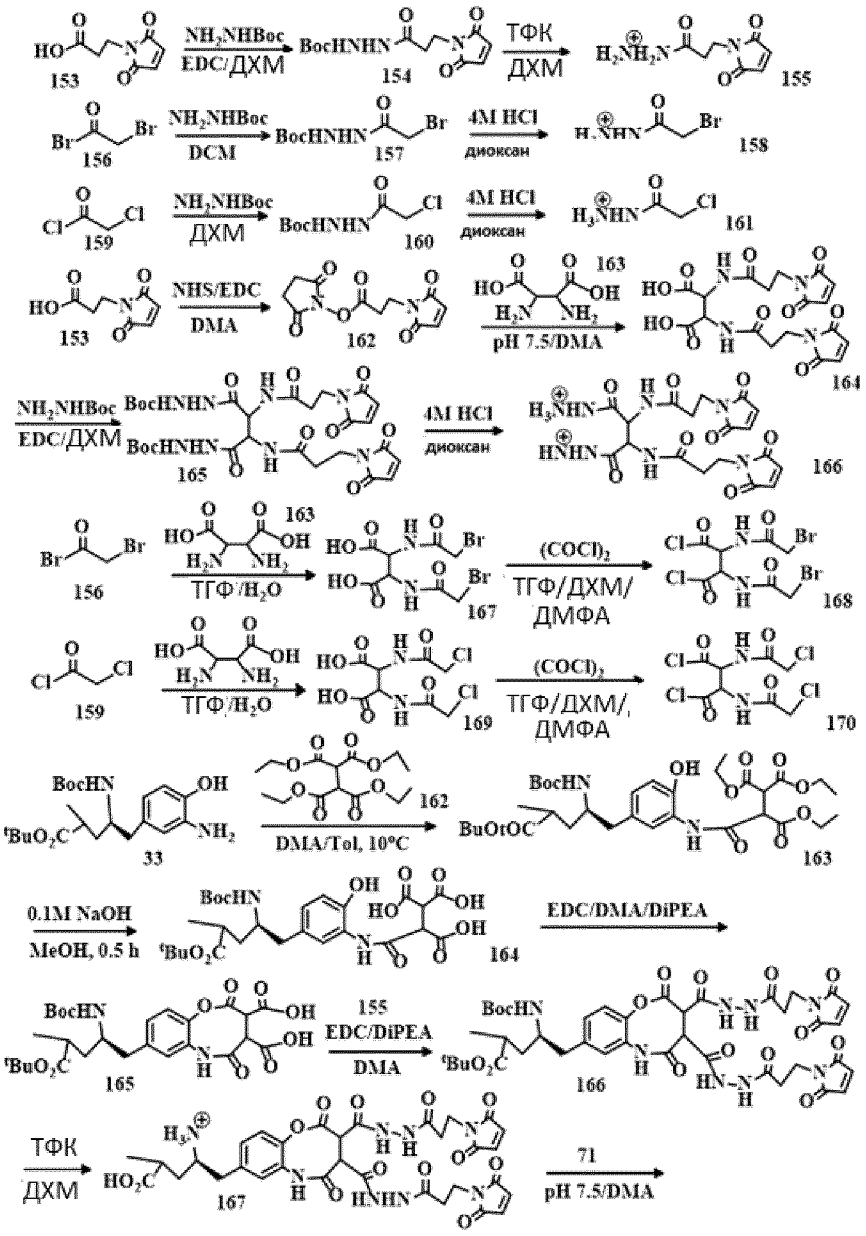
Фиг. 9


98
136
HATU, ТЭА, ДХМ
137
ТФК/ДХМ
138
71
pH 7.5, DMA
139
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA
140
82
141
142

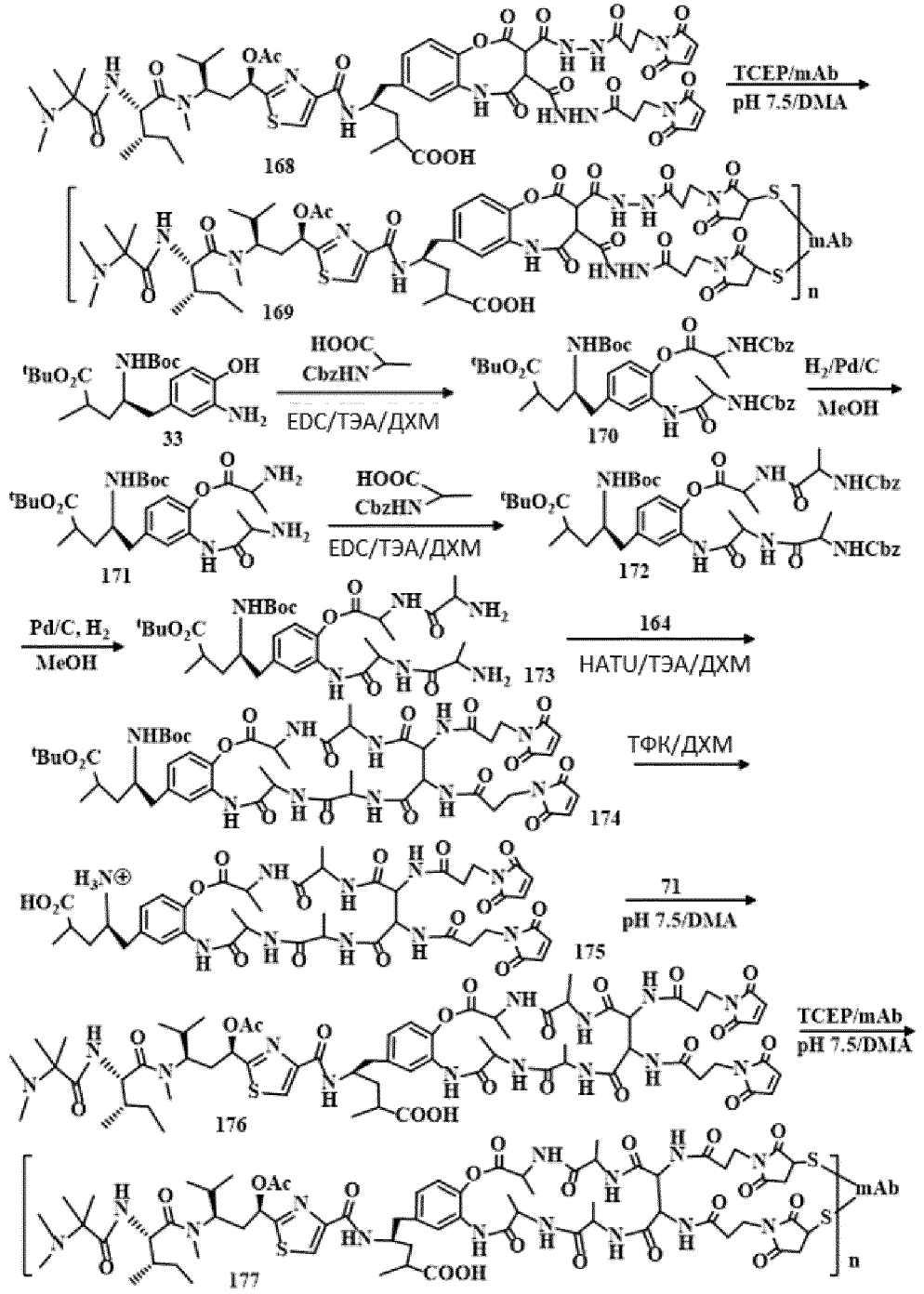
Фиг. 10.


BocHN
OH
tBuO2C
NH2
33
NHCbz
143
HATU, ТЭА, ДХМ
BocHN
OH
BuOtOC
NHCbz
144
Pd/C,H2
MeOH
BocHN
OH
BuOtOC
NH2
145
146
HATU, ТЭА, ДХМ
ТФК
ДХМ
BocHN
COOtBu
147
COOH
148
71/DiPEA
DMA
OAc
COOH
149
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA
OAc
COOH
mAb
n
150
148
88/DiPEA
DMA
NMe2
COOH
151
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA
NMe2
COOH
mAb
n
152

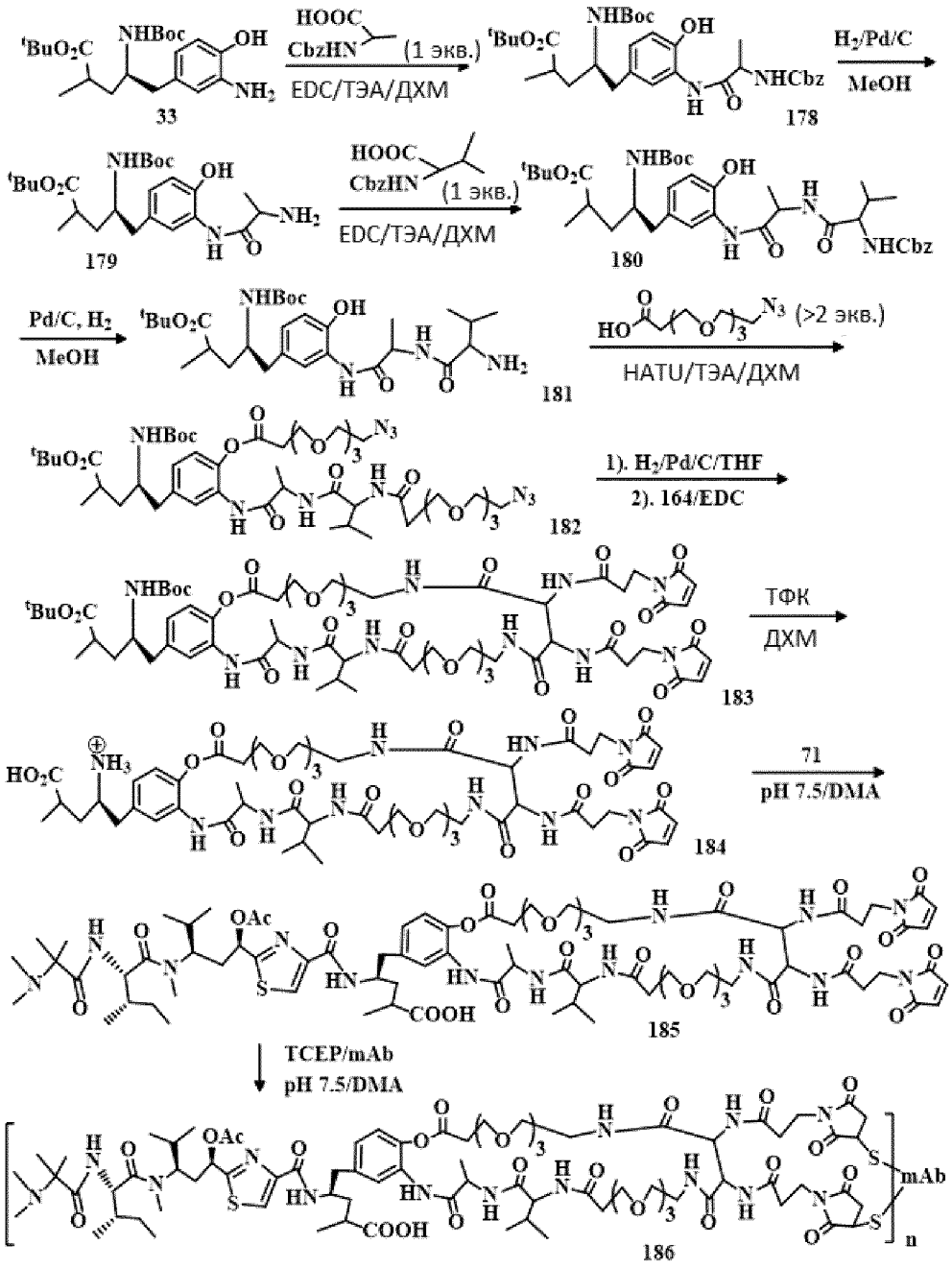
Фиг.11



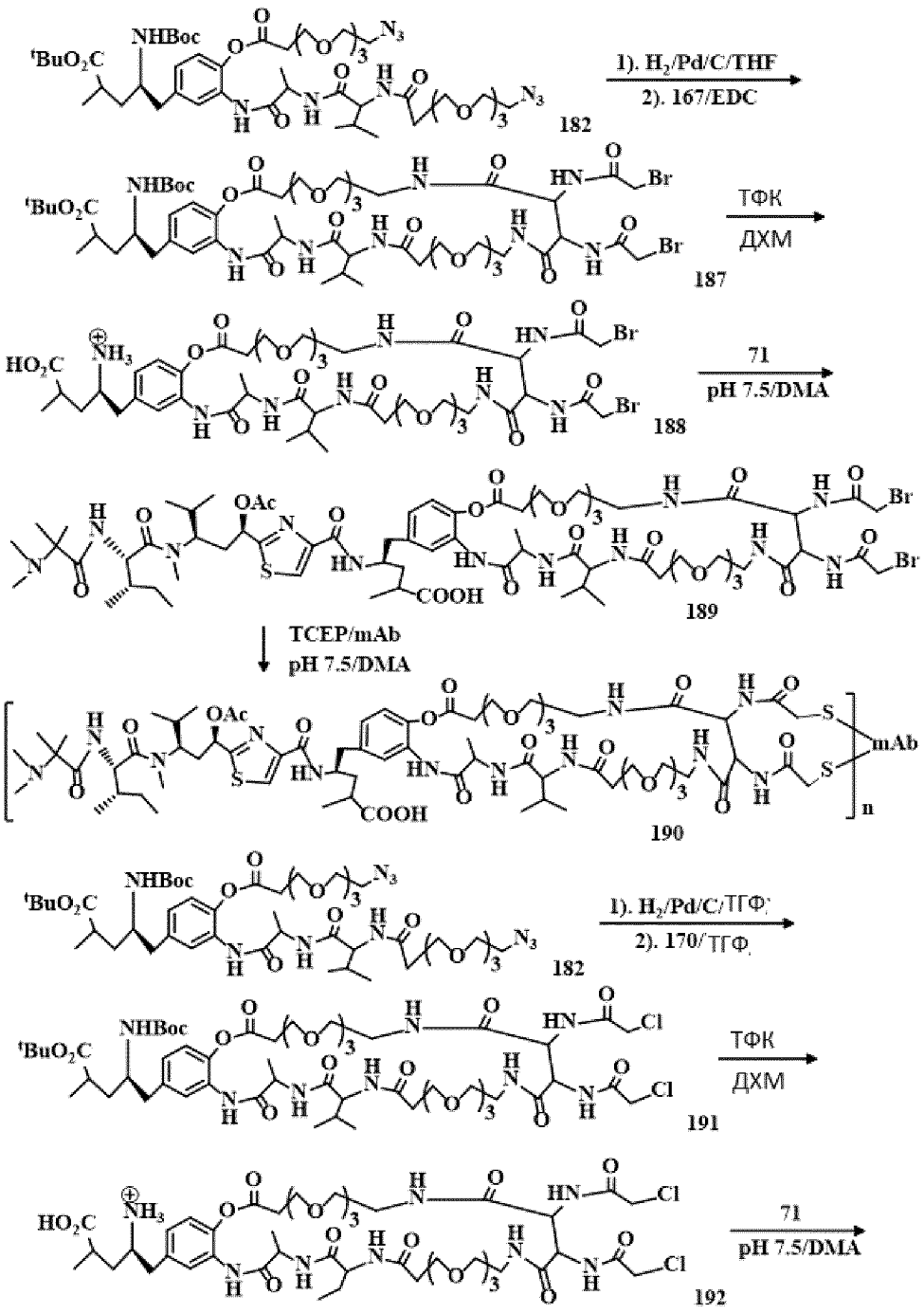
Фиг.12


TCEP/mAb
pH 7.5/DMA
168
169
mAb
n
HOOC
CbzHN
EDC/ТЭА/ДХМ
33
170
H2/Pd/C
MeOH
171
172
Pd/C, H2
MeOH
173
164
HATU/ТЭА/ДХМ
ТФК/ДХМ
174
175
71
pH 7.5/DMA
176
177

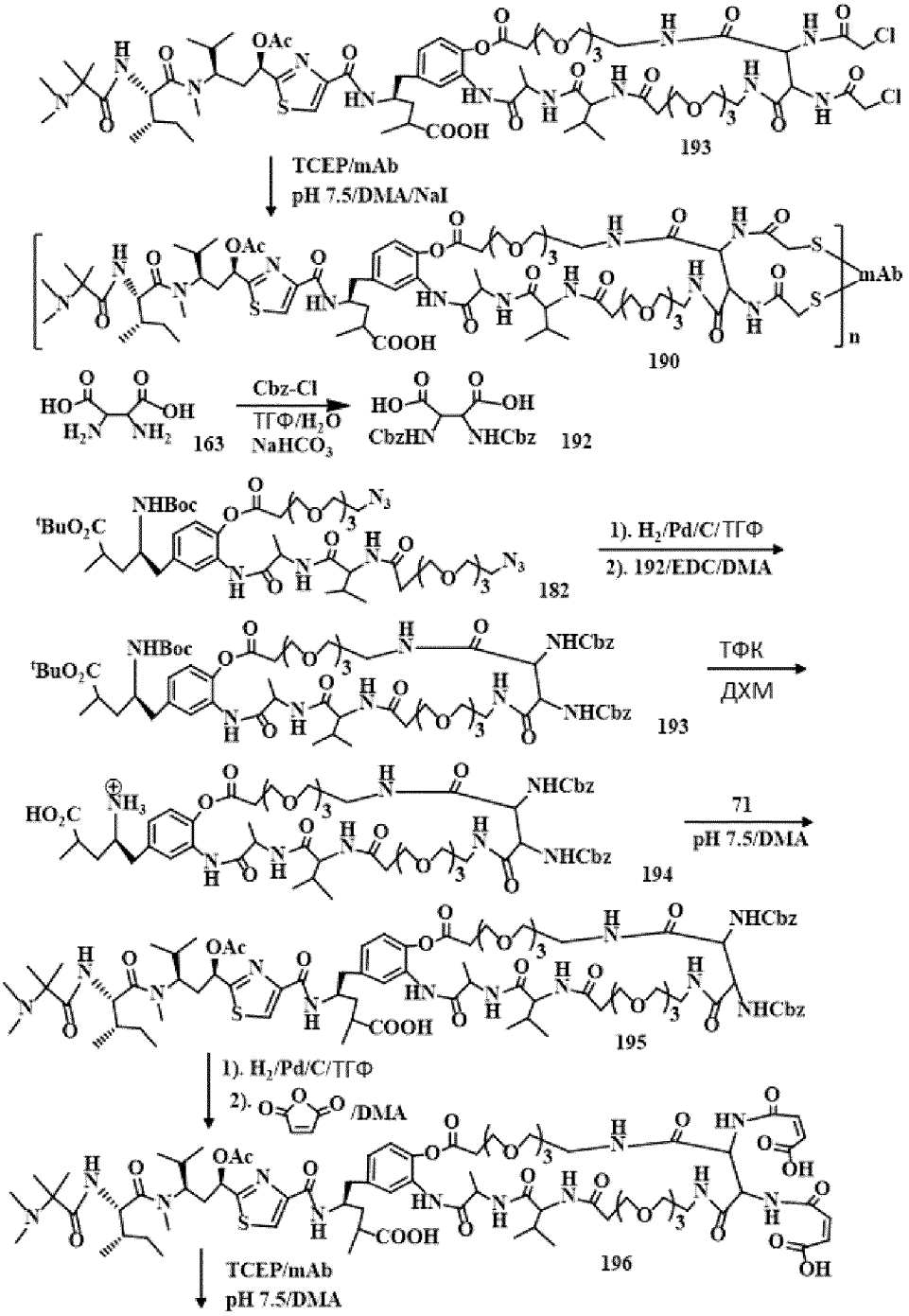
Фиг. 13


HOOC
CbzHN
(1 экв.)
EDC/ТЭА/ДХМ
H2/Pd/C
MeOH
Pd/C, H2
MeOH
(>2 экв.)
HATU/ТЭА/ДХМ
1). H2/Pd/C/THF
2). 164/EDC
ТФК
ДХМ
71
pH 7.5/DMA
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA
33
178
179
180
181
182
183
184
185
186

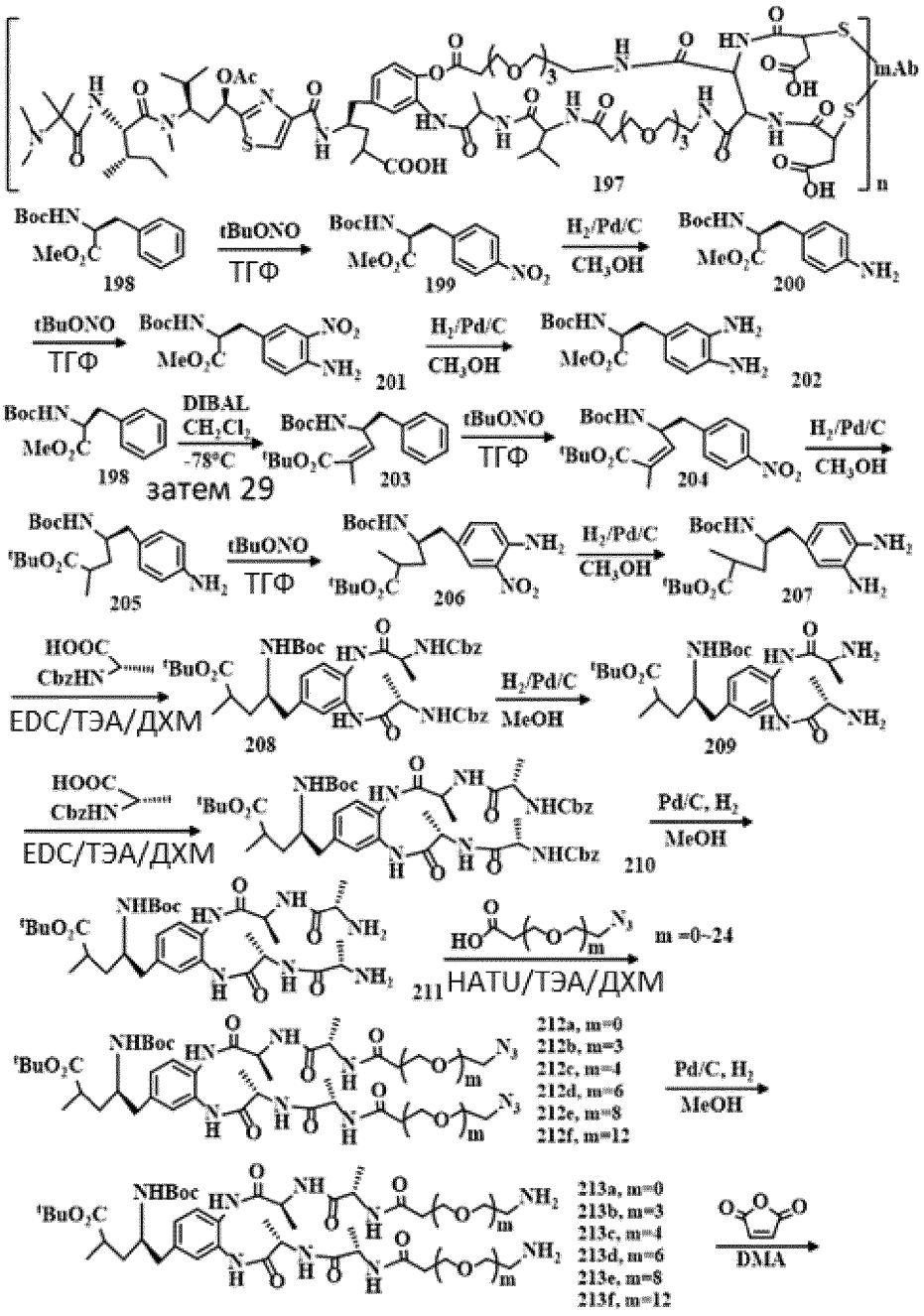
Фиг. 14.


NHBoc
tBuO2C
182
1). H2/Pd/C/THF
2). 167/EDC
Br
187
ТФК
ДХМ
HO2C
188
71
pH 7.5/DMA
OAc
COOH
189
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA
mAb
n
190
1). H2/Pd/C/ТГФ
2). 170/ТГФ
Cl
191
192

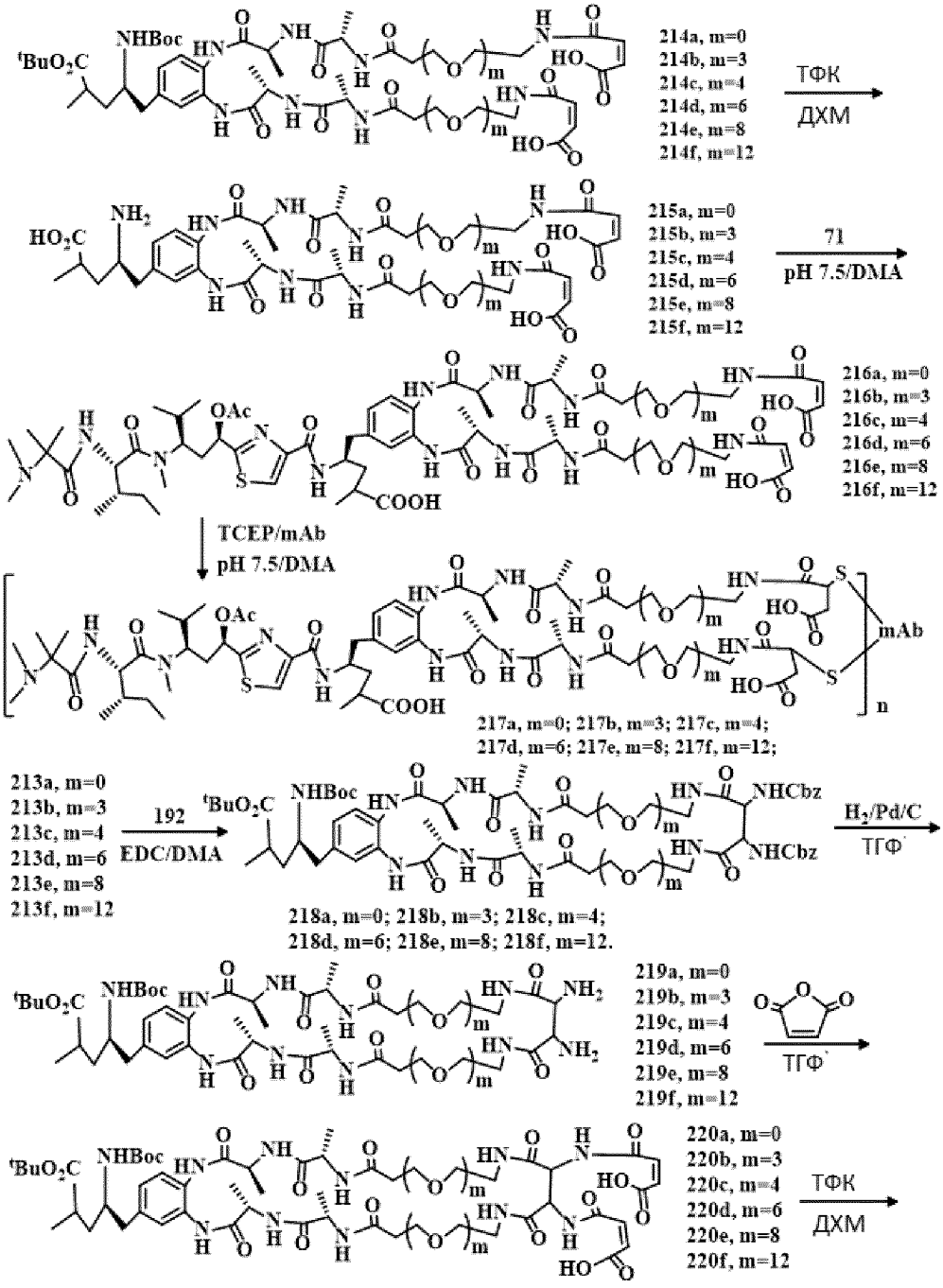
Фиг. 15.


193
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA/NaI
190
Cbz-Cl
ТГФ/H2O
NaHCO3
163
192
182
1). H2/Pd/C/ТГФ
2). 192/EDC/DMA
ТФК
ДХМ
193
71
pH 7.5/DMA
194
195
1). H2/Pd/C/ТГФ
2).
/DMA
196
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA

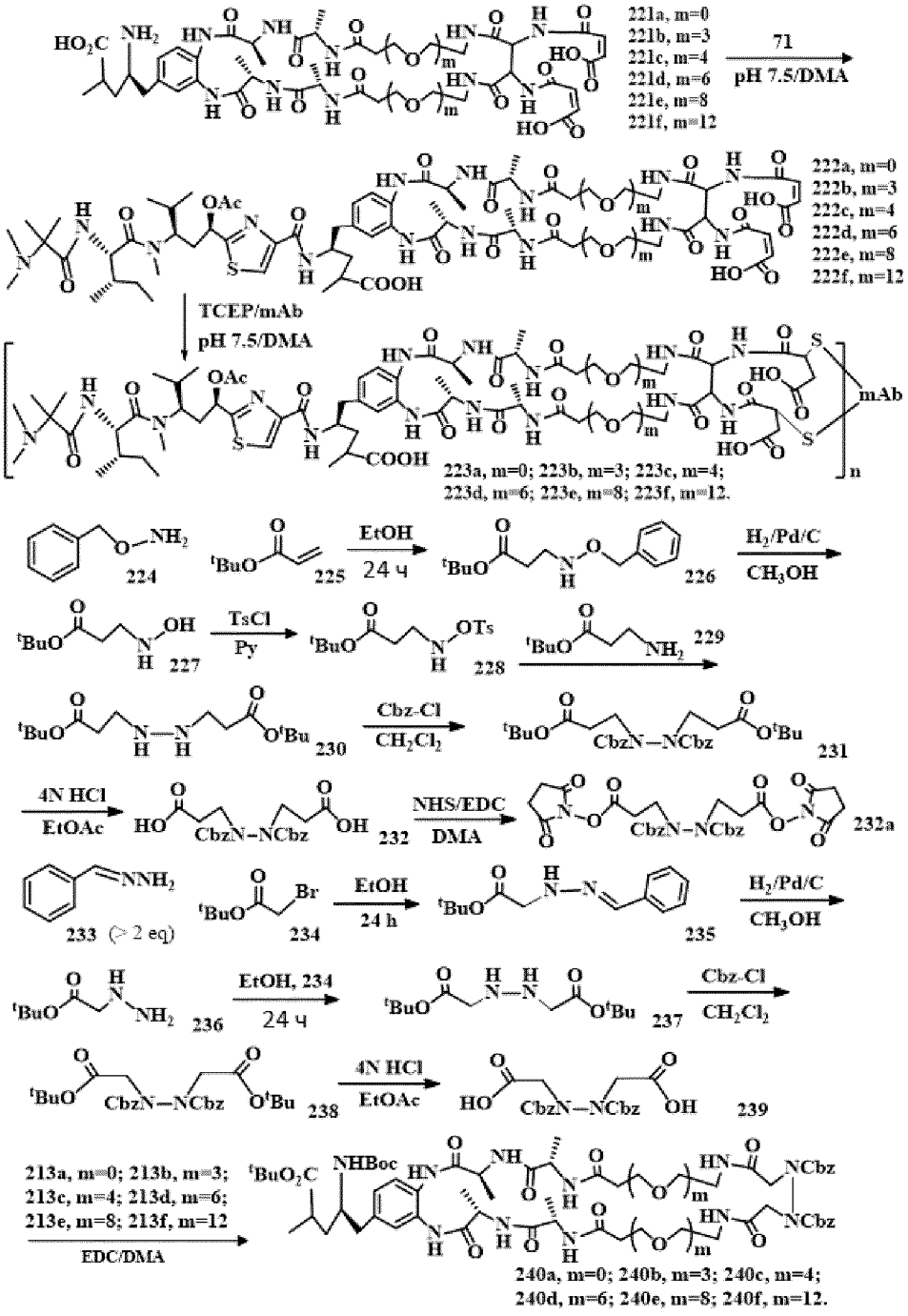
Фиг. 16.


197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212a, m=0
212b, m=3
212c, m=4
212d, m=6
212e, m=8
212f, m=12
213a, m=0
213b, m=3
213c, m=4
213d, m=6
213e, m=8
213f, m=12
m =0~24
затем 29
EDC/ТЭА/ДХМ
HATU/ТЭА/ДХМ
ТГФ
DMA
MeOH

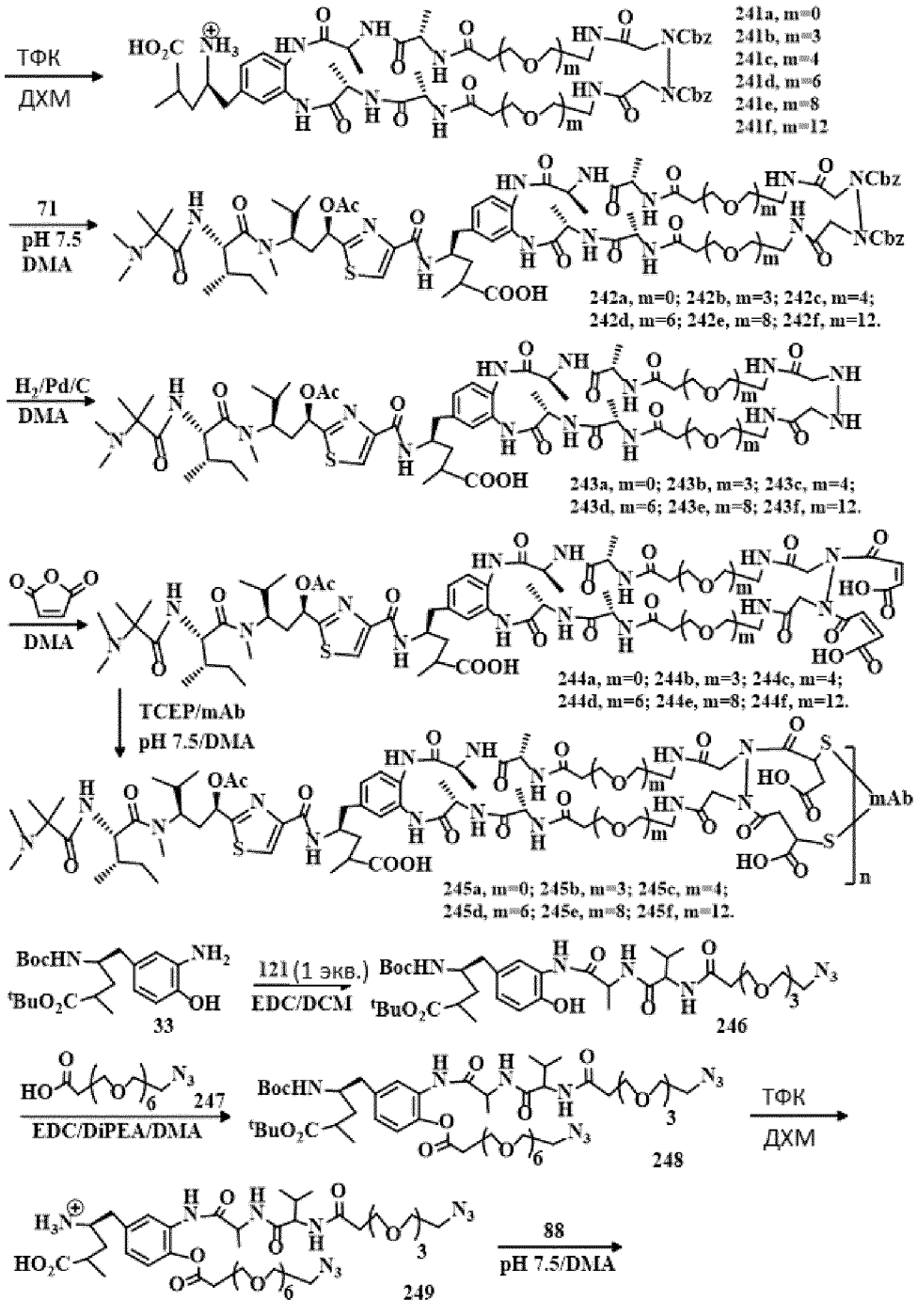
Фиг. 17.


214a, m=0
214b, m=3
214c, m=4
214d, m=6
214e, m=8
214f, m=12
ТФК
ДХМ
215a, m=0
215b, m=3
215c, m=4
215d, m=6
215e, m=8
215f, m=12
71
pH 7.5/DMA
216a, m=0
216b, m=3
216c, m=4
216d, m=6
216e, m=8
216f, m=12
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA
mAb
217a, m=0; 217b, m=3; 217c, m=4;
217d, m=6; 217e, m=8; 217f, m=12;
213a, m=0
213b, m=3
213c, m=4
213d, m=6
213e, m=8
213f, m=12
192
EDC/DMA
H2/Pd/C
ТГФ
218a, m=0; 218b, m=3; 218c, m=4;
218d, m=6; 218e, m=8; 218f, m=12.
219a, m=0
219b, m=3
219c, m=4
219d, m=6
219e, m=8
219f, m=12
ТГФ
220a, m=0
220b, m=3
220c, m=4
220d, m=6
220e, m=8
220f, m=12
ТФК
ДХМ

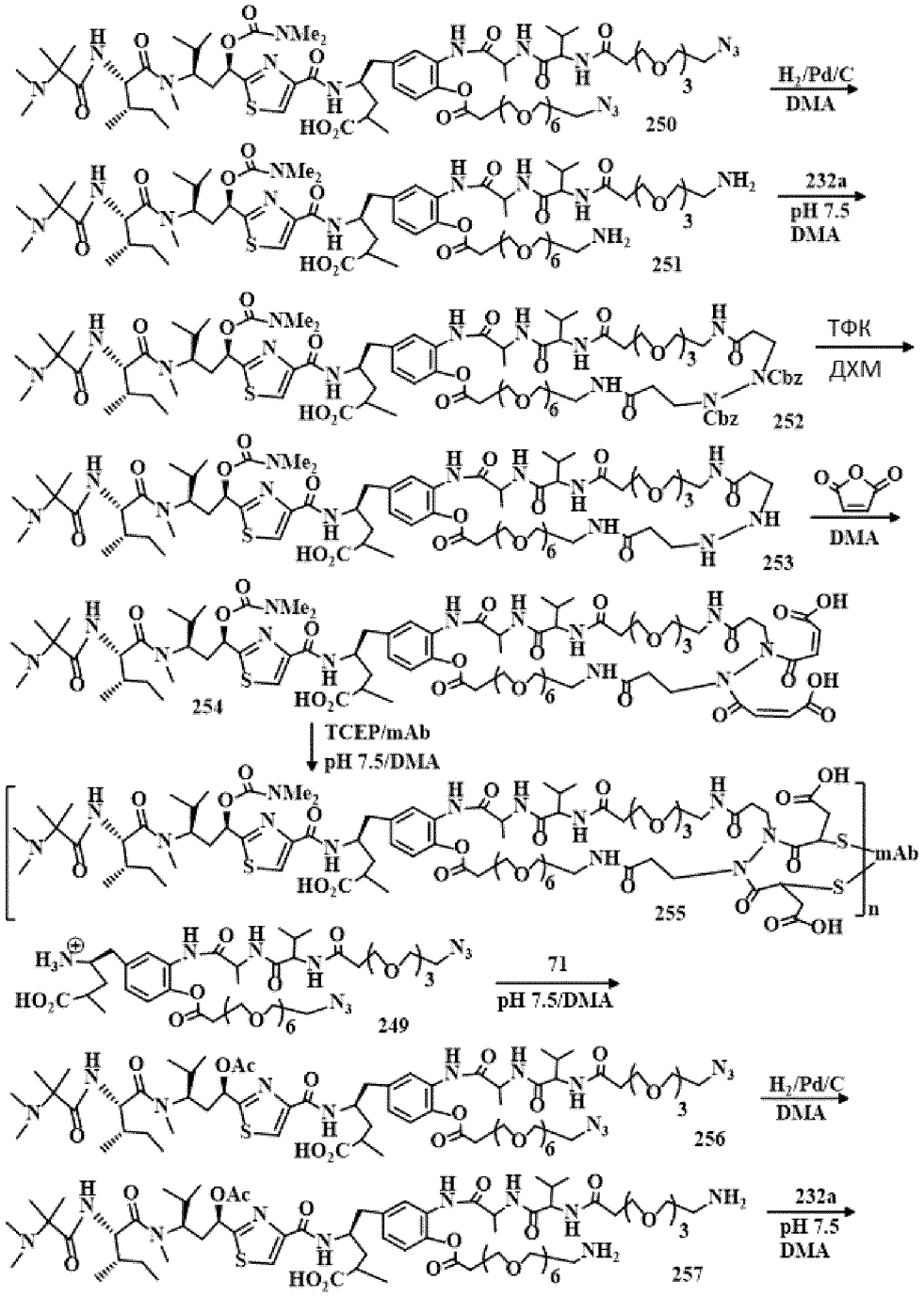
Фиг. 18.


221a, m=0
221b, m=3
221c, m=4
221d, m=6
221e, m=8
221f, m=12
71
pH 7.5/DMA
222a, m=0
222b, m=3
222c, m=4
222d, m=6
222e, m=8
222f, m=12
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA
223a, m=0; 223b, m=3; 223c, m=4;
223d, m=6; 223e, m=8; 223f, m=12.
224
225
EtOH
24 ч
226
H2/Pd/C
CH3OH
227
TsCl
Py
228
229
230
Cbz-Cl
CH2Cl2
231
4N HCl
EtOAc
232
NHS/EDC
DMA
232a
233 (> 2 eq)
234
EtOH
24 h
235
H2/Pd/C
CH3OH
236
EtOH, 234
24 ч
237
Cbz-Cl
CH2Cl2
238
4N HCl
EtOAc
239
213a, m=0; 213b, m=3;
213c, m=4; 213d, m=6;
213e, m=8; 213f, m=12
EDC/DMA
240a, m=0; 240b, m=3; 240c, m=4;
240d, m=6; 240e, m=8; 240f, m=12.

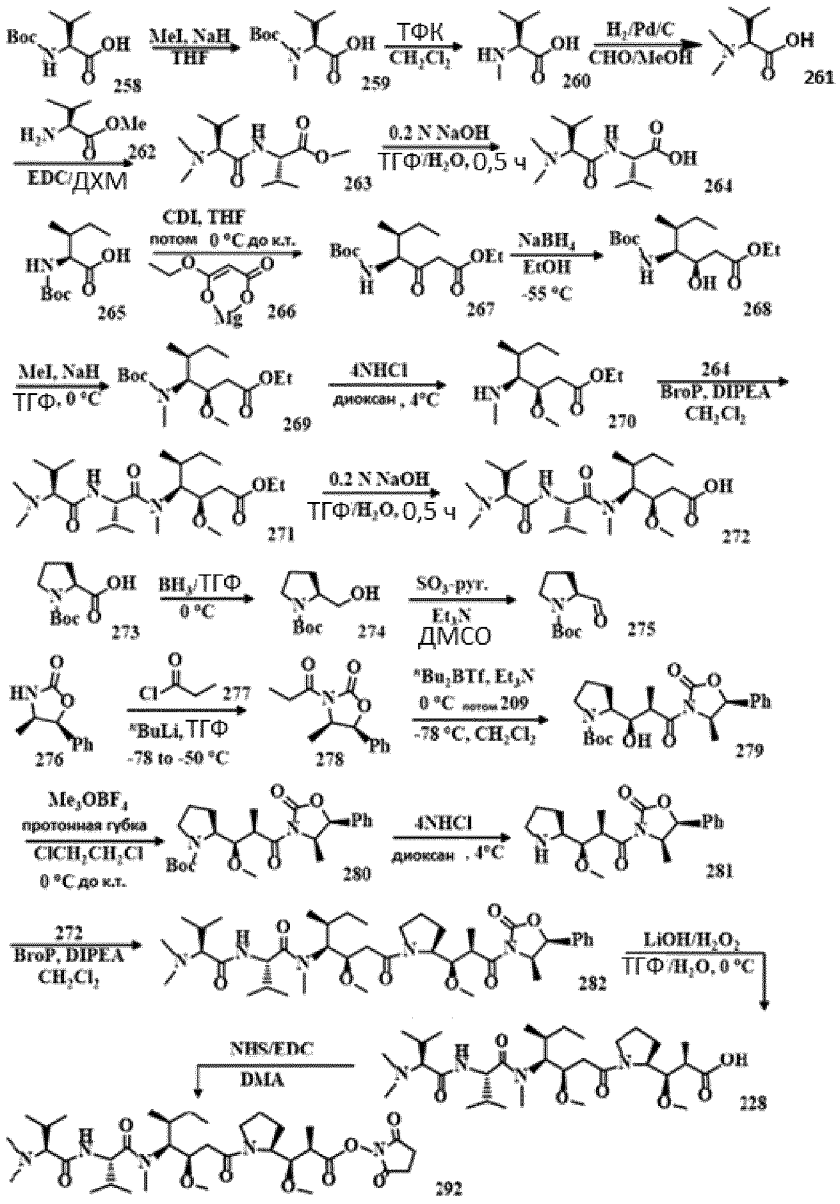
Фиг. 19.


ТФК
ДХМ
241a, m=0
241b, m=3
241c, m=4
241d, m=6
241e, m=8
241f, m=12
71
pH 7.5
DMA
242a, m=0; 242b, m=3; 242c, m=4;
242d, m=6; 242e, m=8; 242f, m=12.
H2/Pd/C
DMA
243a, m=0; 243b, m=3; 243c, m=4;
243d, m=6; 243e, m=8; 243f, m=12.
DMA
244a, m=0; 244b, m=3; 244c, m=4;
244d, m=6; 244e, m=8; 244f, m=12.
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA
245a, m=0; 245b, m=3; 245c, m=4;
245d, m=6; 245e, m=8; 245f, m=12.
121 (1 экв.)
EDC/DCM
33
246
247
EDC/DiPEA/DMA
248
ТФК
ДХМ
88
pH 7.5/DMA
249

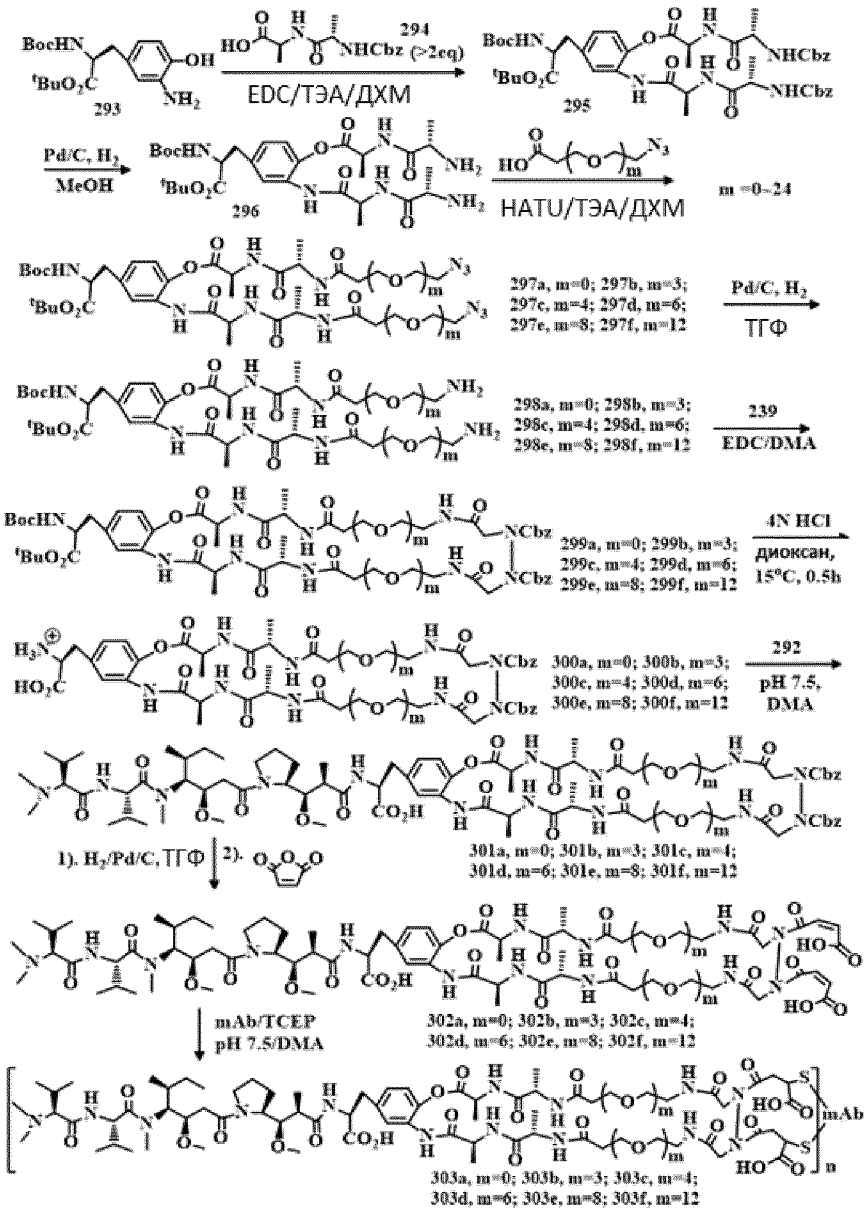
Фиг. 20


H2/Pd/C
DMA
250
232a
pH 7.5
DMA
251
ТФК
ДХМ
252
DMA
253
254
TCEP/mAb
pH 7.5/DMA
255
mAb
71
pH 7.5/DMA
249
H2/Pd/C
DMA
256
232a
pH 7.5
DMA
257

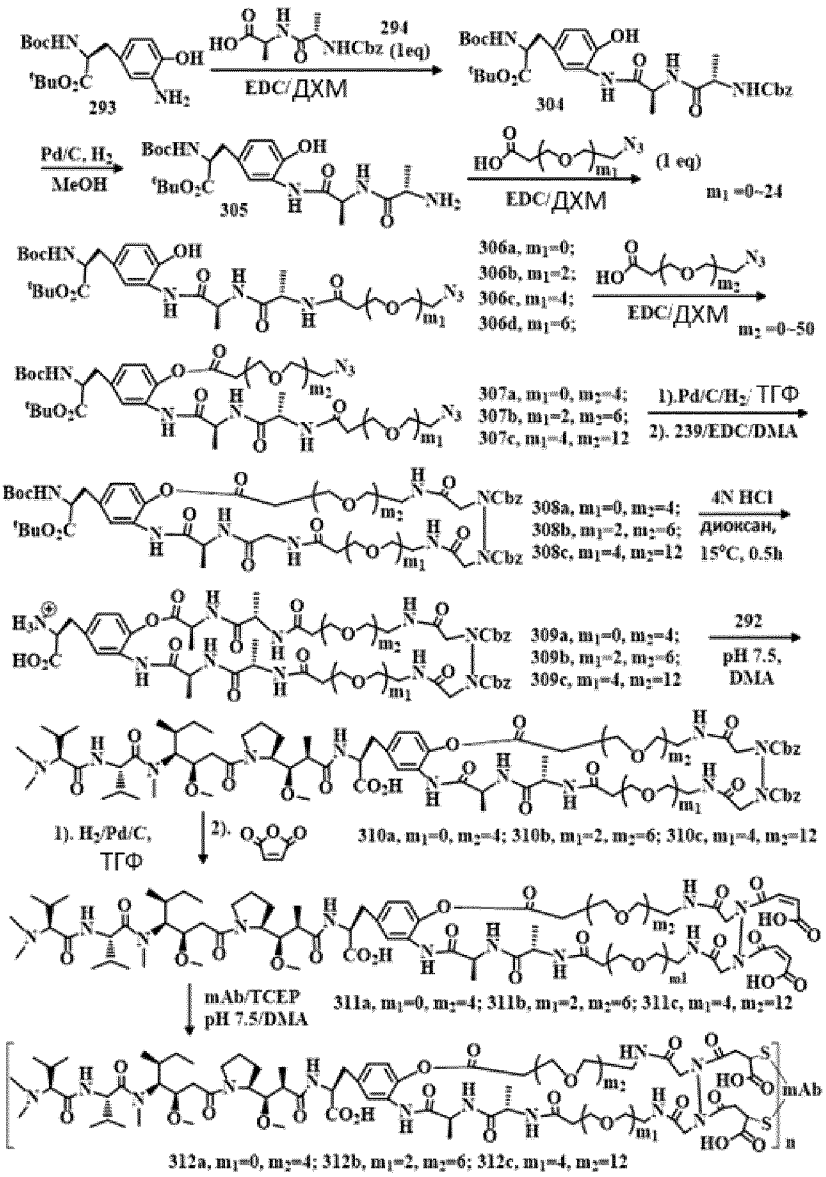
Фиг. 21


MeI, NaH
THF
ТФК
CH_2Cl_2
H_2/Pd/C
CHO/MeOH
EDC/ДХМ
0.2 N NaOH
ТГФ/H_2O, 0,5 ч
CDI, THF
потом 0 °C до к.т.
$NaBH_4$
EtOH
-55 °C
4NHCl
диоксан , 4°C
BroP, DIPEA
CH_2Cl_2
BH_3/ТГФ
0 °C
SO_3-пуг.
Et_3N
ДМСО
^{n}BuLi, ТГФ
-78 to -50 °C
^{n}Bu$_2$BTf, Et_3N
0 °C потом 209
-78 °C, CH_2Cl_2
Me_3OBF_4
протонная губка
$ClCH_2CH_2Cl$
0 °C до к.т.
LiOH/H_2O_2
ТГФ/H_2O, 0 °C
NHS/EDC
DMA

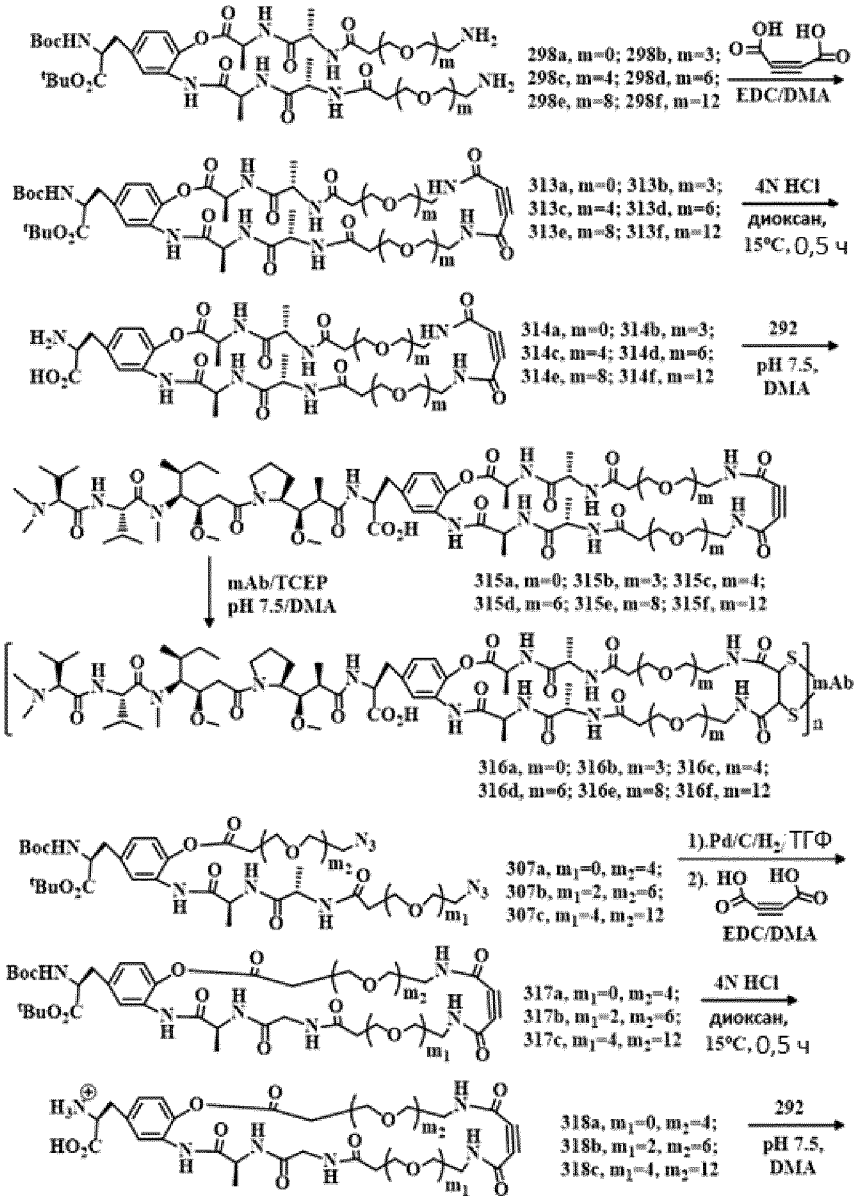
Фиг. 22.


BocHN
tBuO2C
OH
NH2
293
294
HO
NHCbz (>2eq)
EDC/ТЭА/ДХМ
295
NHCbz
Pd/C, H2
MeOH
296
NH2
HO
N3
m
HATU/ТЭА/ДХМ
m =0~24
297a, m=0; 297b, m=3;
297c, m=4; 297d, m=6;
297e, m=8; 297f, m=12
Pd/C, H2
ТГФ
298a, m=0; 298b, m=3;
298c, m=4; 298d, m=6;
298e, m=8; 298f, m=12
239
EDC/DMA
NCbz
299a, m=0; 299b, m=3;
299c, m=4; 299d, m=6;
299e, m=8; 299f, m=12
4N HCl
диоксан,
15°C, 0.5h
H3N
HO2C
300a, m=0; 300b, m=3;
300c, m=4; 300d, m=6;
300e, m=8; 300f, m=12
292
pH 7.5,
DMA
1). H2/Pd/C, ТГФ
2).
O
CO2H
301a, m=0; 301b, m=3; 301c, m=4;
301d, m=6; 301e, m=8; 301f, m=12
mAb/TCEP
pH 7.5/DMA
302a, m=0; 302b, m=3; 302c, m=4;
302d, m=6; 302e, m=8; 302f, m=12
S
mAb
n
303a, m=0; 303b, m=3; 303c, m=4;
303d, m=6; 303e, m=8; 303f, m=12

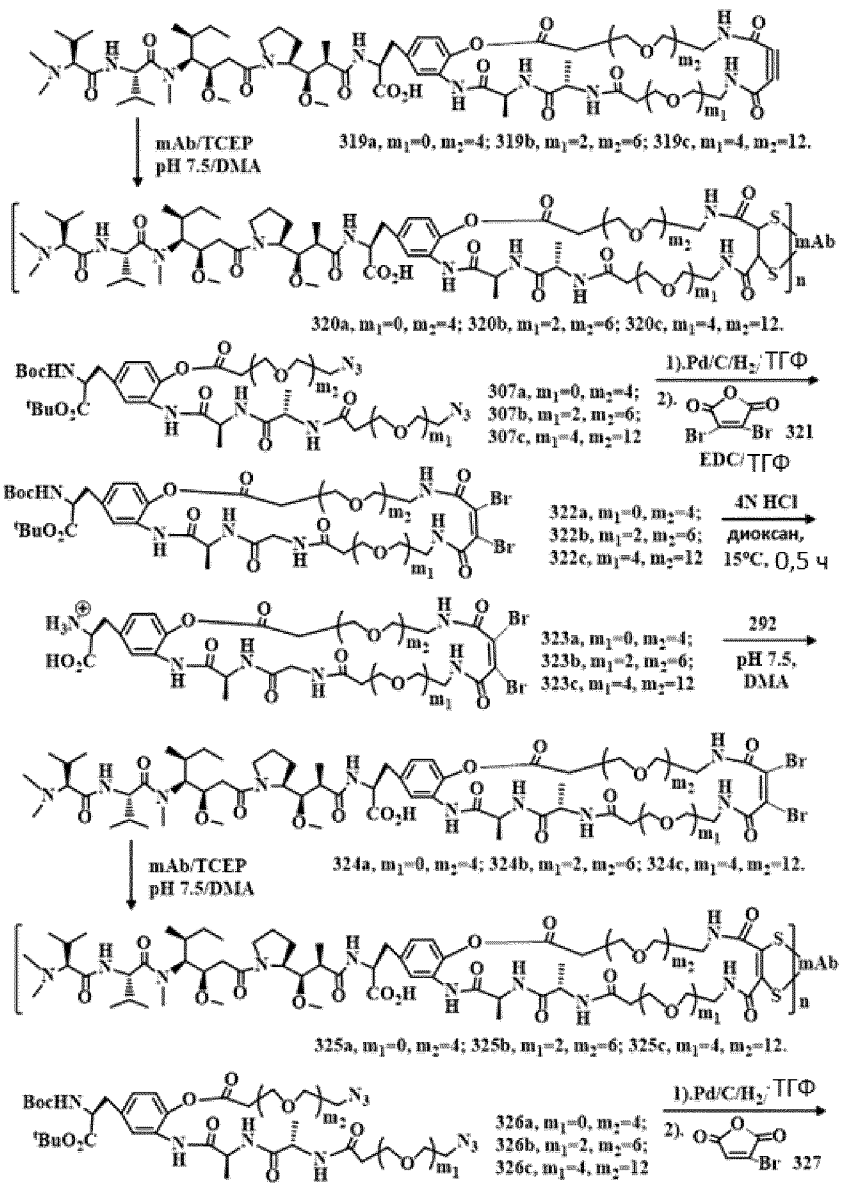
Фиг. 23


294
(1eq)
EDC/ДХМ
293
304
Pd/C, H2
MeOH
305
(1 eq)
EDC/ДХМ
m1 =0~24
306a, m1=0;
306b, m1=2;
306c, m1=4;
306d, m1=6;
m2 =0~50
307a, m1=0, m2=4;
307b, m1=2, m2=6;
307c, m1=4, m2=12
1).Pd/C/H2/ ТГФ
2). 239/EDC/DMA
308a, m1=0, m2=4;
308b, m1=2, m2=6;
308c, m1=4, m2=12
4N HCl
диоксан,
15°C, 0.5h
309a, m1=0, m2=4;
309b, m1=2, m2=6;
309c, m1=4, m2=12
292
pH 7.5,
DMA
1). H2/Pd/C,
ТГФ
2).
310a, m1=0, m2=4; 310b, m1=2, m2=6; 310c, m1=4, m2=12
mAb/TCEP
pH 7.5/DMA
311a, m1=0, m2=4; 311b, m1=2, m2=6; 311c, m1=4, m2=12
mAb
312a, m1=0, m2=4; 312b, m1=2, m2=6; 312c, m1=4, m2=12

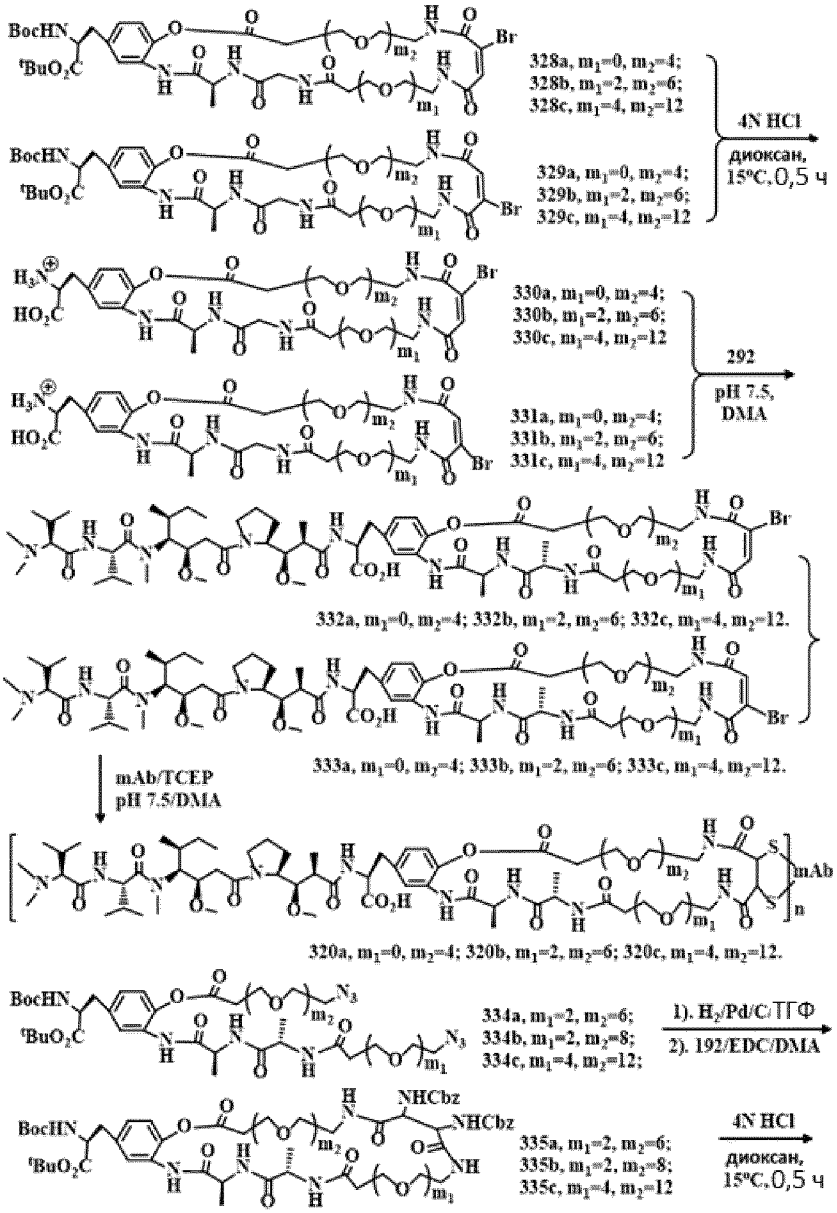
Фиг. 24.


298a, m=0; 298b, m=3;
298c, m=4; 298d, m=6;
298e, m=8; 298f, m=12
EDC/DMA
313a, m=0; 313b, m=3;
313c, m=4; 313d, m=6;
313e, m=8; 313f, m=12
4N HCl
диоксан,
15°C, 0,5 ч
314a, m=0; 314b, m=3;
314c, m=4; 314d, m=6;
314e, m=8; 314f, m=12
292
pH 7.5,
DMA
mAb/TCEP
pH 7.5/DMA
315a, m=0; 315b, m=3; 315c, m=4;
315d, m=6; 315e, m=8; 315f, m=12
mAb
316a, m=0; 316b, m=3; 316c, m=4;
316d, m=6; 316e, m=8; 316f, m=12
307a, m1=0, m2=4;
307b, m1=2, m2=6;
307c, m1=4, m2=12
1).Pd/C/H2/ ТГФ
2).
EDC/DMA
317a, m1=0, m2=4;
317b, m1=2, m2=6;
317c, m1=4, m2=12
4N HCl
диоксан,
15°C, 0,5 ч
318a, m1=0, m2=4;
318b, m1=2, m2=6;
318c, m1=4, m2=12
292
pH 7.5,
DMA

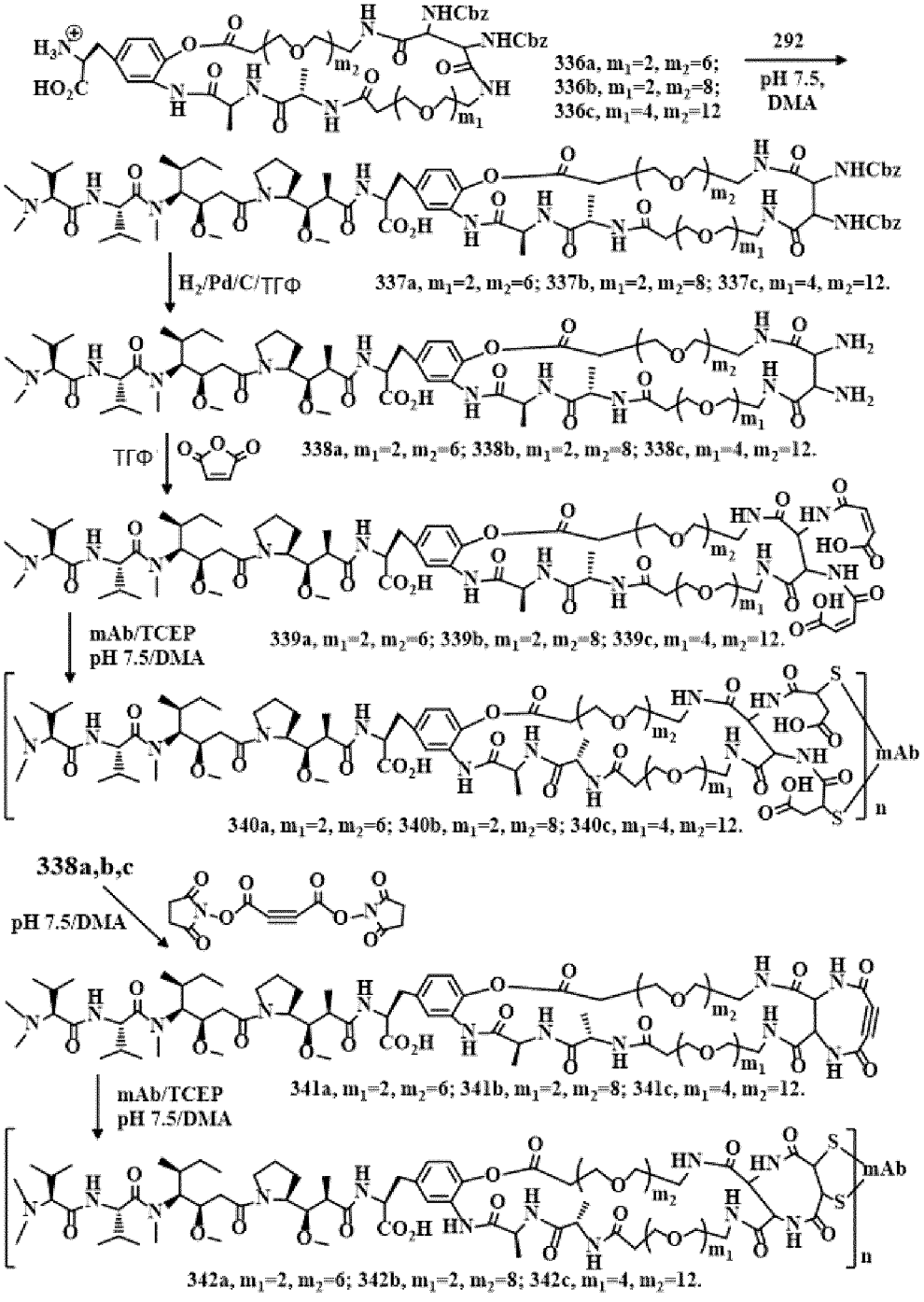
Фиг. 25.


mAb/TCEP
pH 7.5/DMA
319a, m1=0, m2=4; 319b, m1=2, m2=6; 319c, m1=4, m2=12.
320a, m1=0, m2=4; 320b, m1=2, m2=6; 320c, m1=4, m2=12.
1).Pd/C/H2/ТГФ
2).
307a, m1=0, m2=4;
307b, m1=2, m2=6;
307c, m1=4, m2=12
321
EDC/ТГФ
322a, m1=0, m2=4;
322b, m1=2, m2=6;
322c, m1=4, m2=12
4N HCl
диоксан,
15°C, 0,5 ч
323a, m1=0, m2=4;
323b, m1=2, m2=6;
323c, m1=4, m2=12
292
pH 7.5,
DMA
mAb/TCEP
pH 7.5/DMA
324a, m1=0, m2=4; 324b, m1=2, m2=6; 324c, m1=4, m2=12.
325a, m1=0, m2=4; 325b, m1=2, m2=6; 325c, m1=4, m2=12.
1).Pd/C/H2/ТГФ
2).
326a, m1=0, m2=4;
326b, m1=2, m2=6;
326c, m1=4, m2=12
327

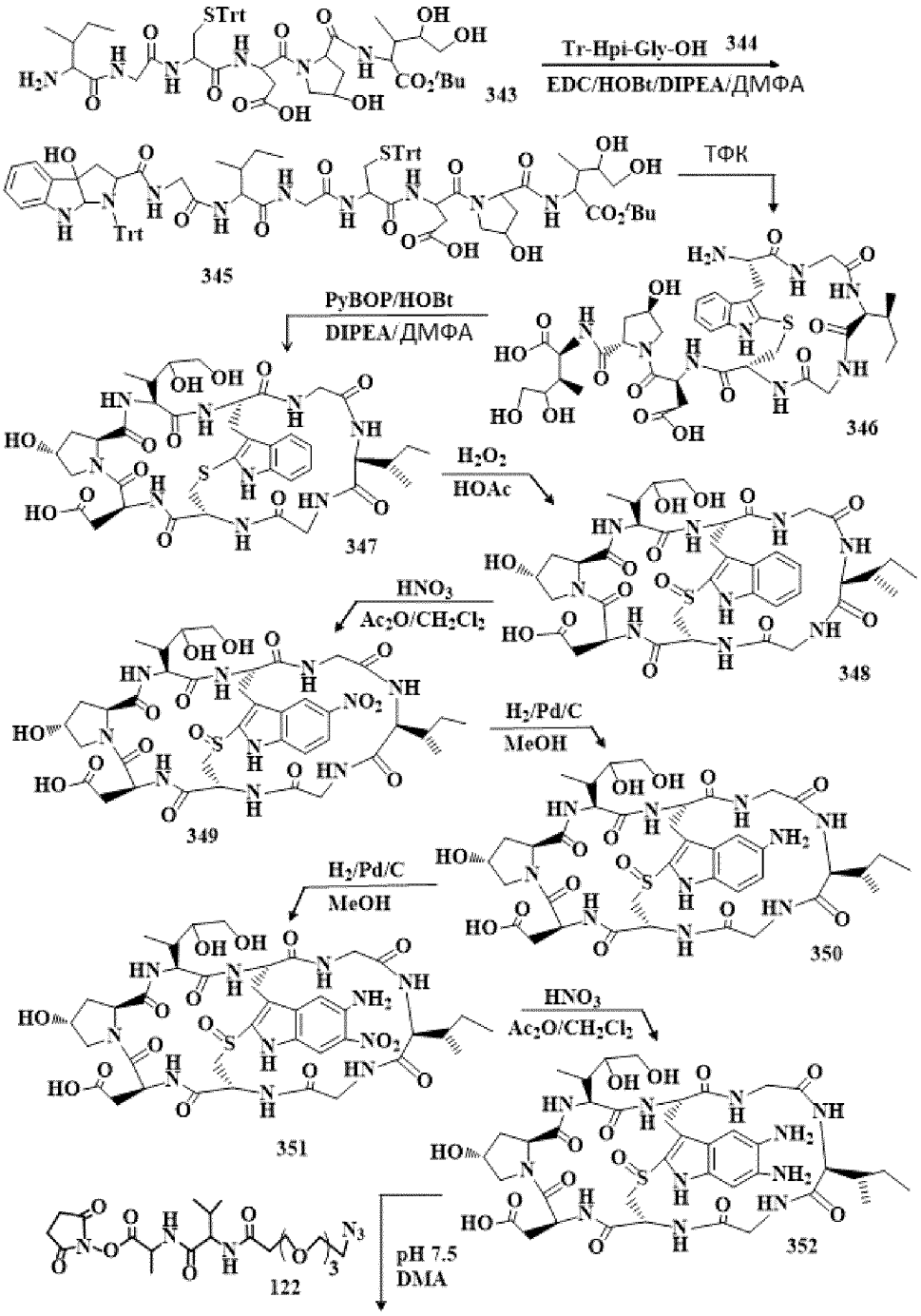
Фиг. 26.


328a, m1=0, m2=4;
328b, m1=2, m2=6;
328c, m1=4, m2=12
329a, m1=0, m2=4;
329b, m1=2, m2=6;
329c, m1=4, m2=12
4N HCl
диоксан,
15°C,0,5 ч
330a, m1=0, m2=4;
330b, m1=2, m2=6;
330c, m1=4, m2=12
331a, m1=0, m2=4;
331b, m1=2, m2=6;
331c, m1=4, m2=12
292
pH 7.5,
DMA
332a, m1=0, m2=4; 332b, m1=2, m2=6; 332c, m1=4, m2=12.
333a, m1=0, m2=4; 333b, m1=2, m2=6; 333c, m1=4, m2=12.
mAb/TCEP
pH 7.5/DMA
320a, m1=0, m2=4; 320b, m1=2, m2=6; 320c, m1=4, m2=12.
334a, m1=2, m2=6;
334b, m1=2, m2=8;
334c, m1=4, m2=12;
1). H2/Pd/C/ТГФ
2). 192/EDC/DMA
335a, m1=2, m2=6;
335b, m1=2, m2=8;
335c, m1=4, m2=12
4N HCl
диоксан,
15°C,0,5 ч

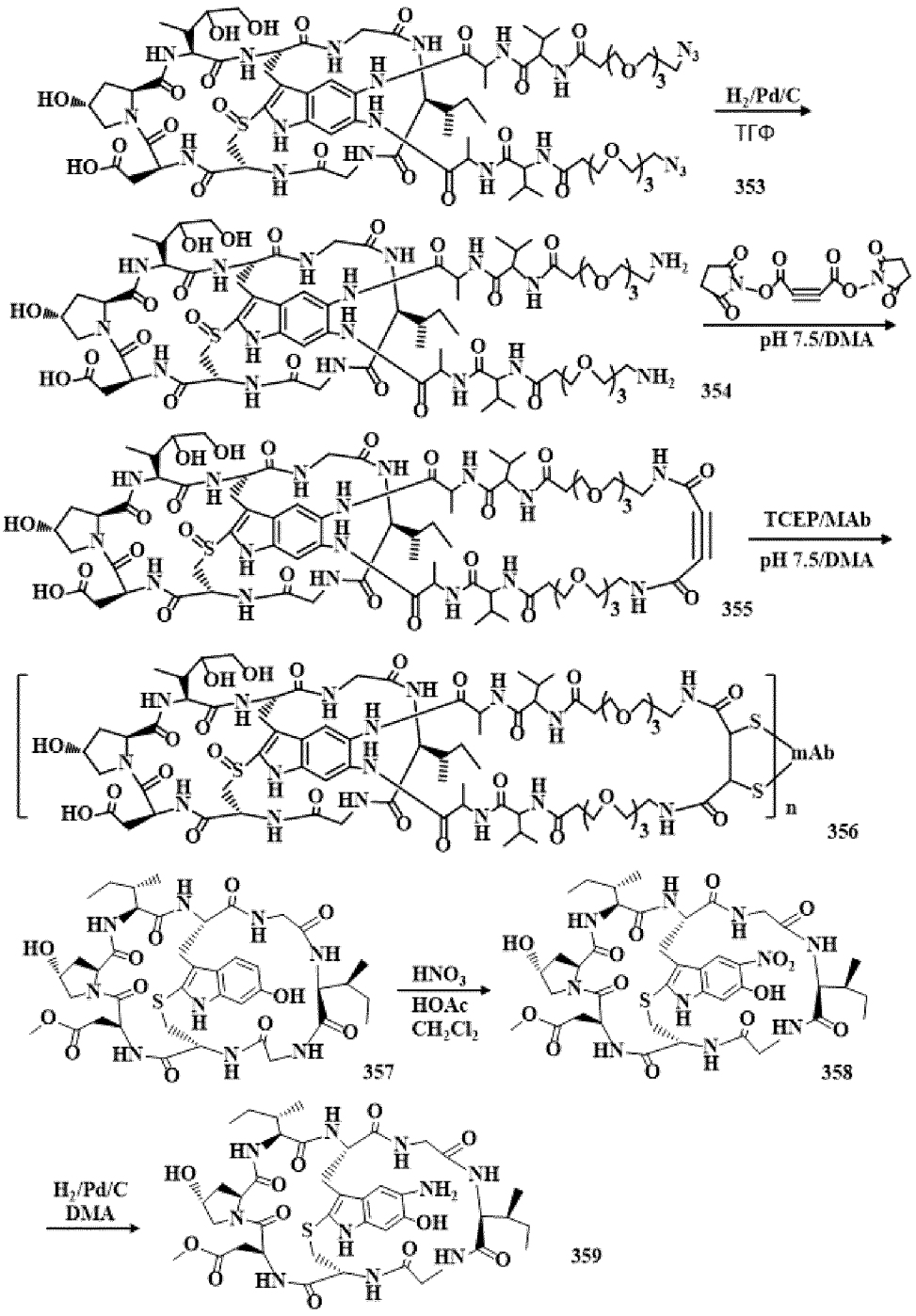
Фиг. 27.


336a, m1=2, m2=6;
336b, m1=2, m2=8;
336c, m1=4, m2=12
292
pH 7.5,
DMA
H2/Pd/C/ТГФ
337a, m1=2, m2=6; 337b, m1=2, m2=8; 337c, m1=4, m2=12.
ТГФ
338a, m1=2, m2=6; 338b, m1=2, m2=8; 338c, m1=4, m2=12.
mAb/TCEP
pH 7.5/DMA
339a, m1=2, m2=6; 339b, m1=2, m2=8; 339c, m1=4, m2=12.
340a, m1=2, m2=6; 340b, m1=2, m2=8; 340c, m1=4, m2=12.
338a,b,c
pH 7.5/DMA
341a, m1=2, m2=6; 341b, m1=2, m2=8; 341c, m1=4, m2=12.
mAb/TCEP
pH 7.5/DMA
342a, m1=2, m2=6; 342b, m1=2, m2=8; 342c, m1=4, m2=12.

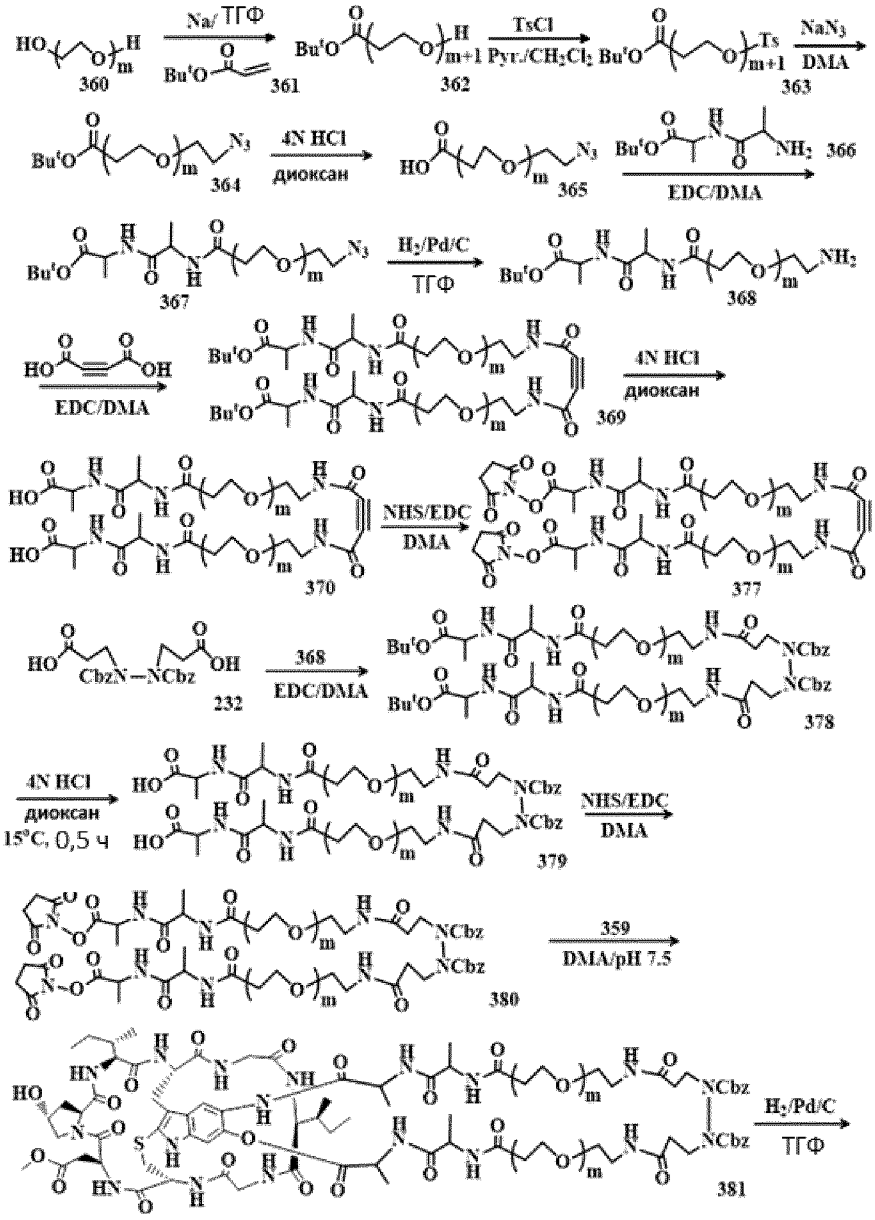
Фиг. 28


Tr-Hpi-Gly-OH 344
EDC/HOBt/DIPEA/ДМФА
ТФК
PyBOP/HOBt
DIPEA/ДМФА
H_2O_2
HOAc
HNO_3
Ac_2O/CH_2Cl_2
$H_2/Pd/C$
MeOH
$H_2/Pd/C$
MeOH
HNO_3
Ac_2O/CH_2Cl_2
pH 7.5
DMA
343
345
346
347
348
349
350
351
352
122

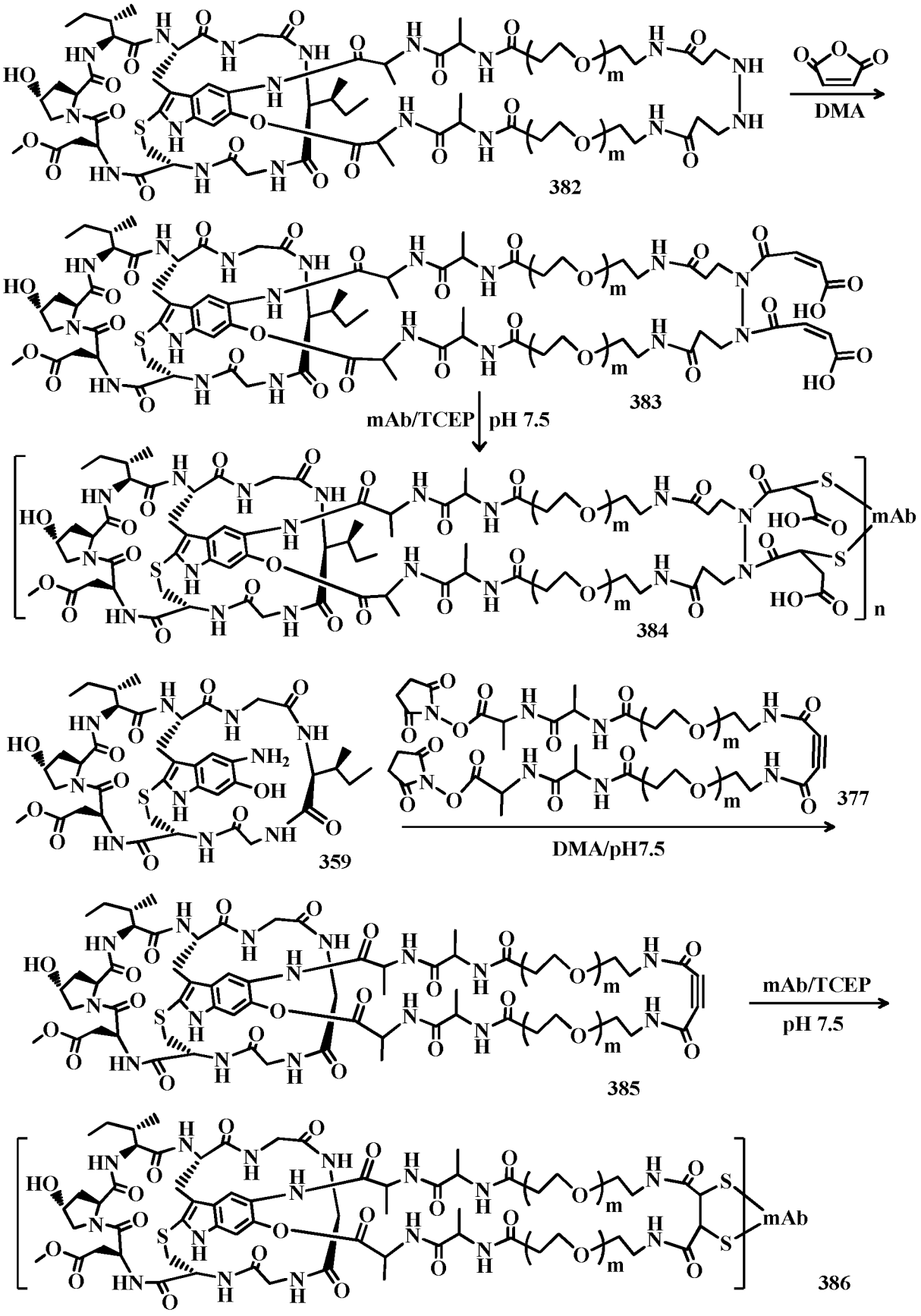
Фиг. 29


H2/Pd/C
ТГФ
353
pH 7.5/DMA
354
TCEP/MAb
pH 7.5/DMA
355
mAb
n
356
HNO3
HOAc
CH2Cl2
357
358
H2/Pd/C
DMA
359

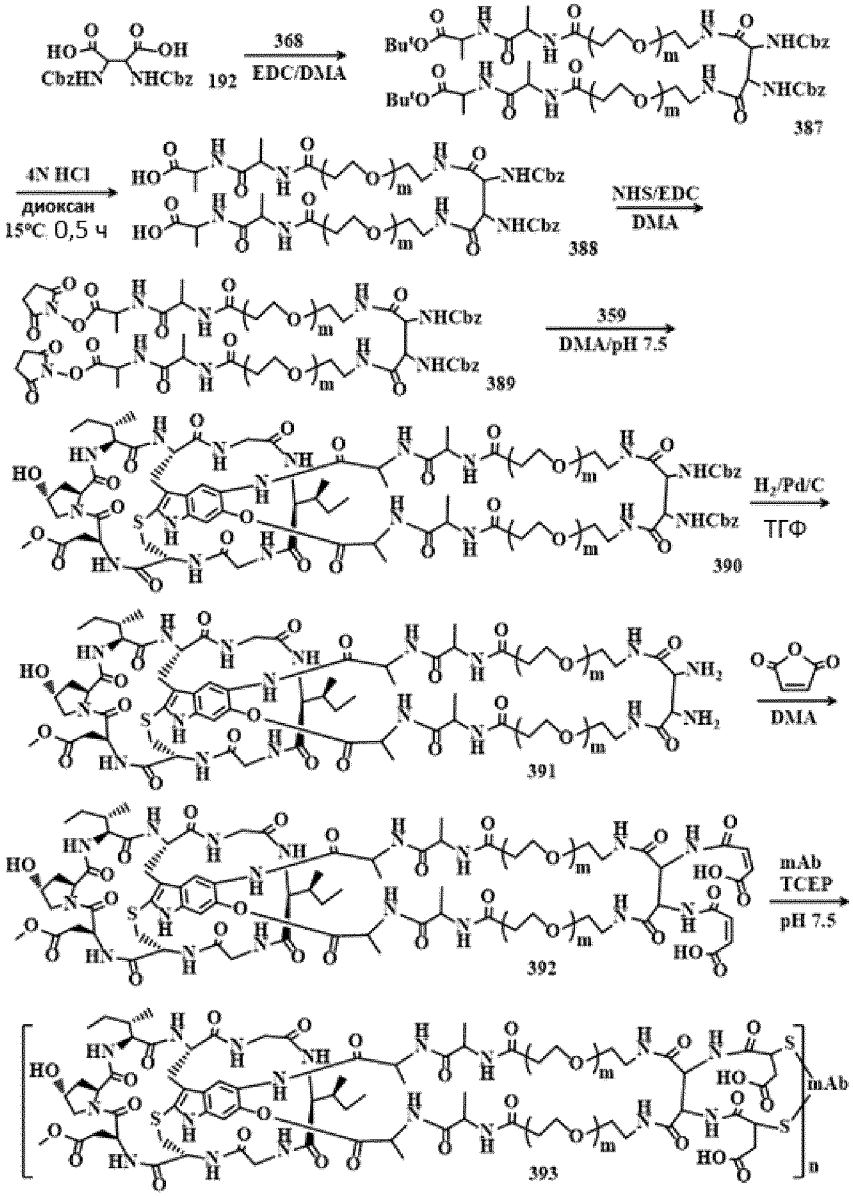
Фиг. 30


Na/ ТГФ
TsCl
Pyr./CH2Cl2
NaN3
DMA
4N HCl
диоксан
EDC/DMA
H2/Pd/C
ТГФ
NHS/EDC
DMA
359
DMA/pH 7.5

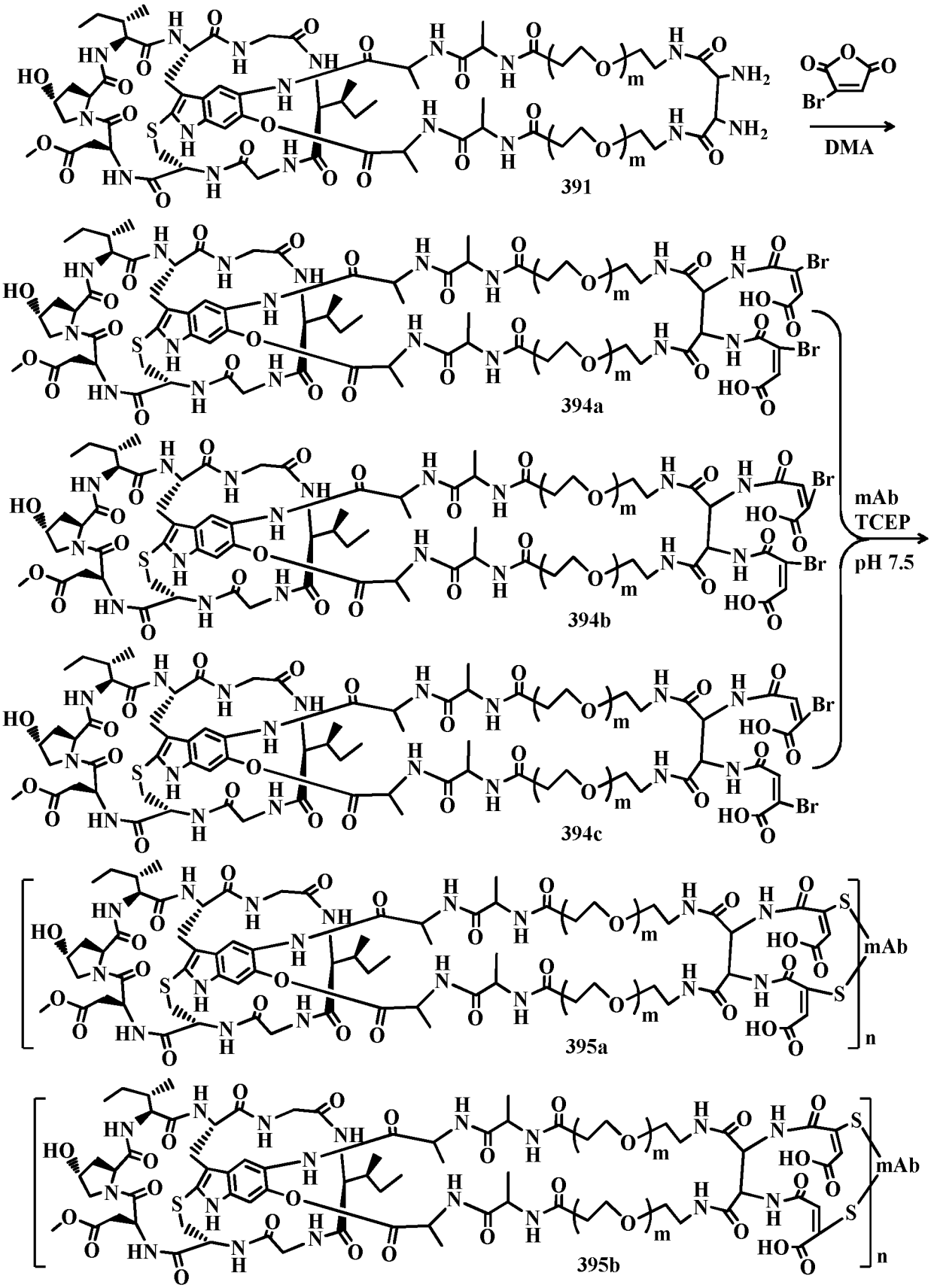
Фиг. 31


382
DMA
383
mAb/TCEP pH 7.5
384
mAb
n
359
377
DMA/pH7.5
385
mAb/TCEP
pH 7.5
386
mAb

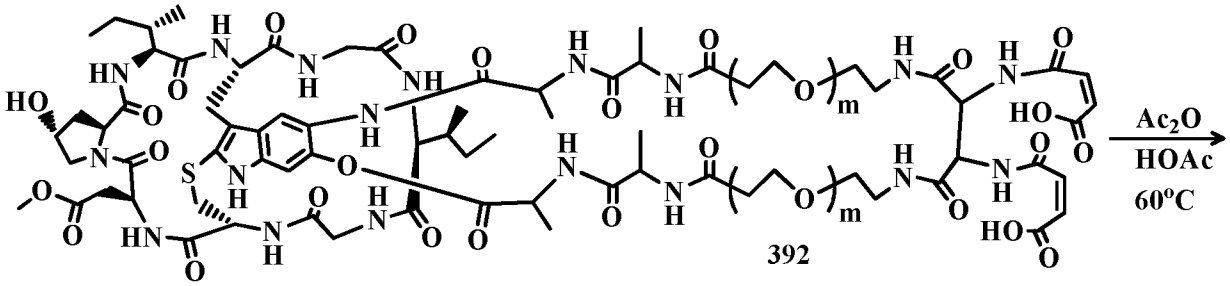
Фиг. 32


192
368
EDC/DMA
387
4N HCl
диоксан
15°C 0,5 ч
388
NHS/EDC
DMA
389
359
DMA/pH 7.5
390
H2/Pd/C
ТГФ
391
DMA
392
mAb
TCEP
pH 7.5
393

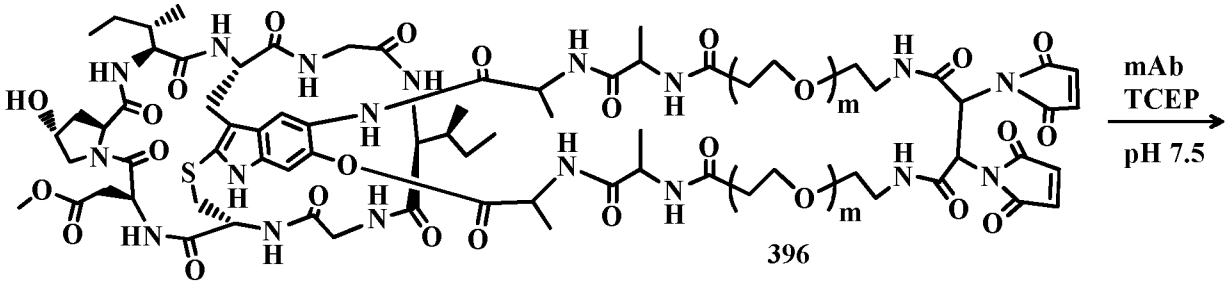
Фиг. 33.



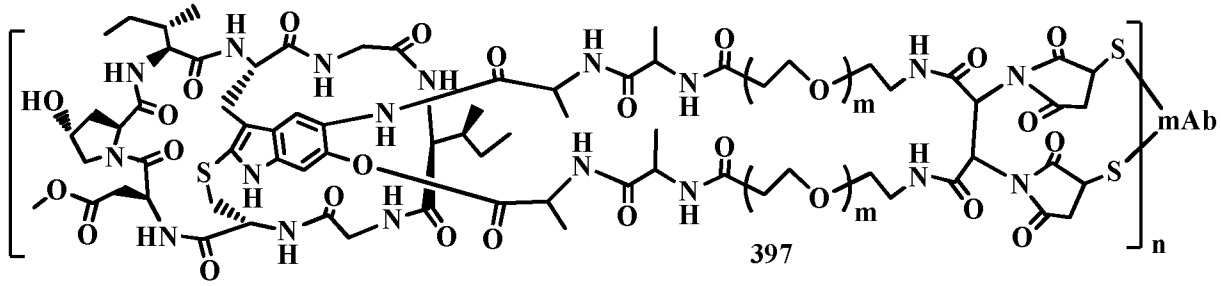
Фиг. 34



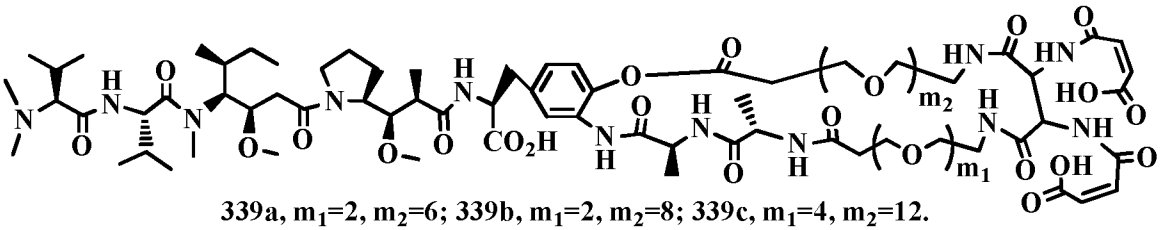
392



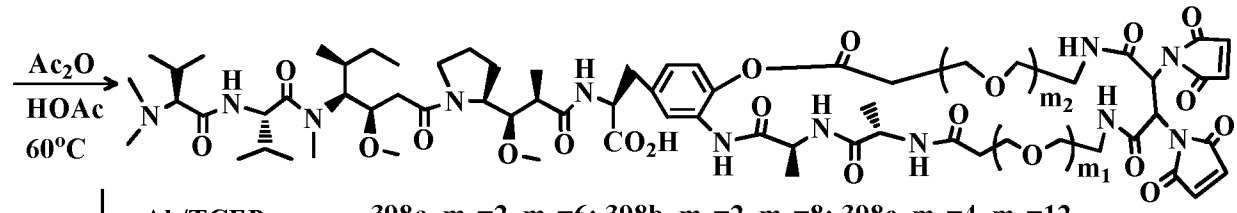
396



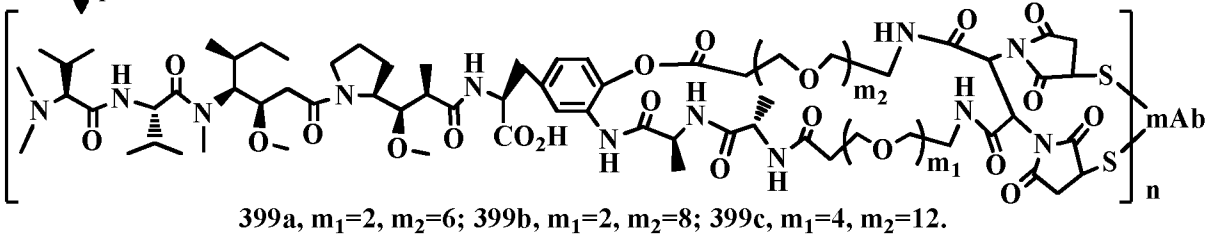
397



339a, m_1=2, m_2=6; 339b, m_1=2, m_2=8; 339c, m_1=4, m_2=12.

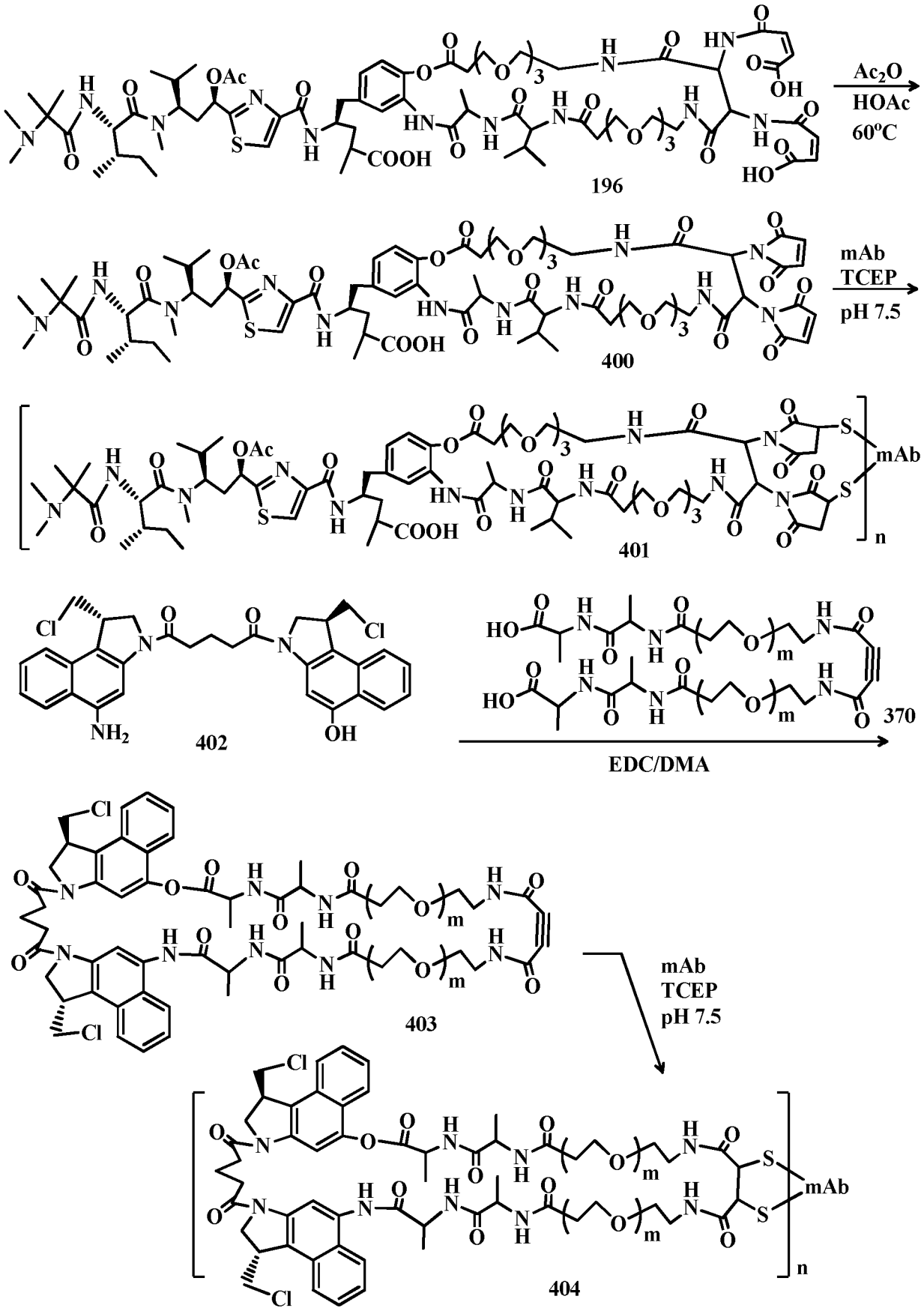


398a, m_1=2, m_2=6; 398b, m_1=2, m_2=8; 398c, m_1=4, m_2=12.

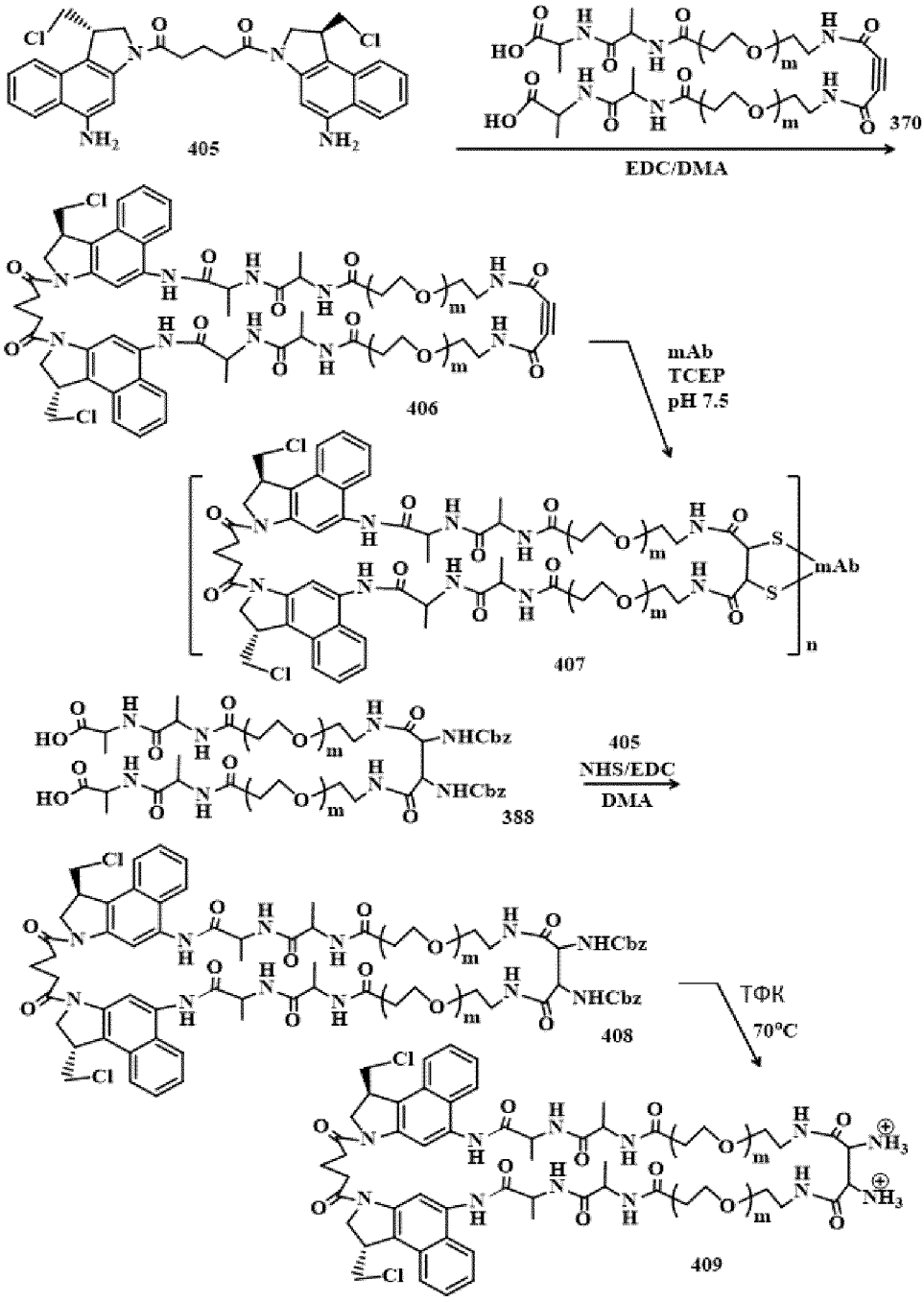


399a, m_1=2, m_2=6; 399b, m_1=2, m_2=8; 399c, m_1=4, m_2=12.

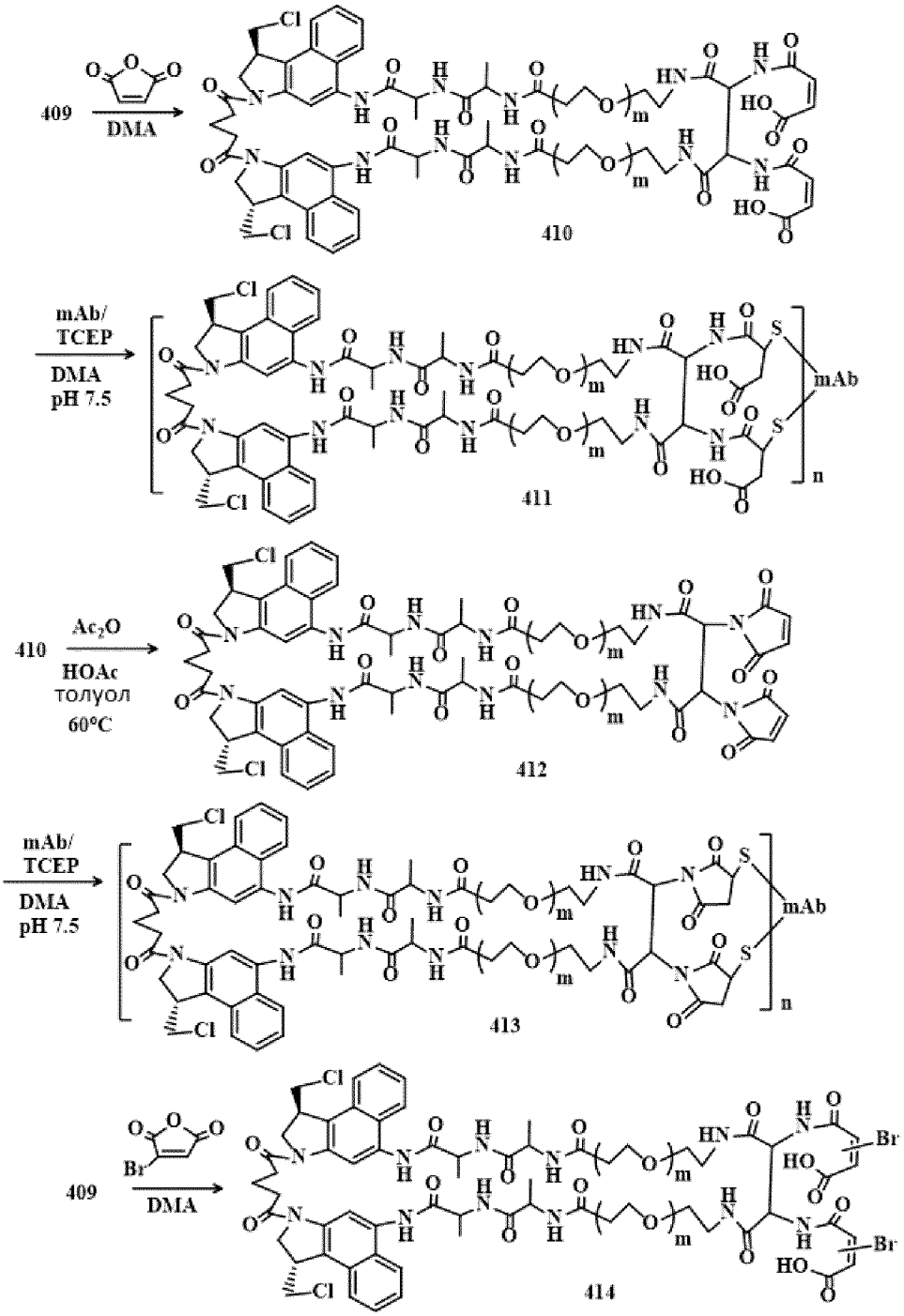
Фиг. 35


Ac2O
HOAc
60°C
196
mAb
TCEP
pH 7.5
400
401
mAb
n
402
370
EDC/DMA
403
mAb
TCEP
pH 7.5
404
n

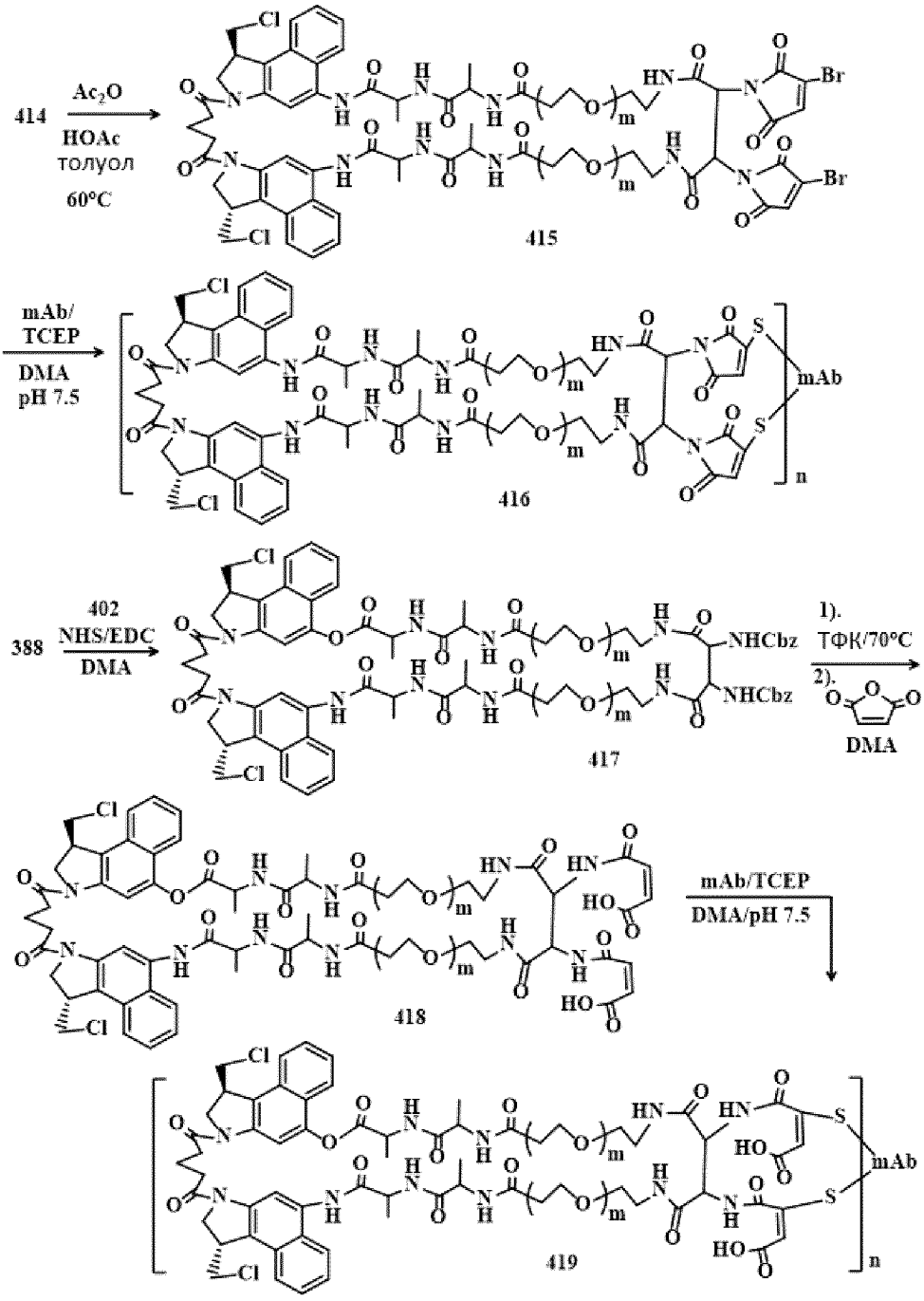
Фиг. 36


405
370
EDC/DMA
406
mAb
TCEP
pH 7.5
407
388
405
NHS/EDC
DMA
408
ТФК
70°C
409

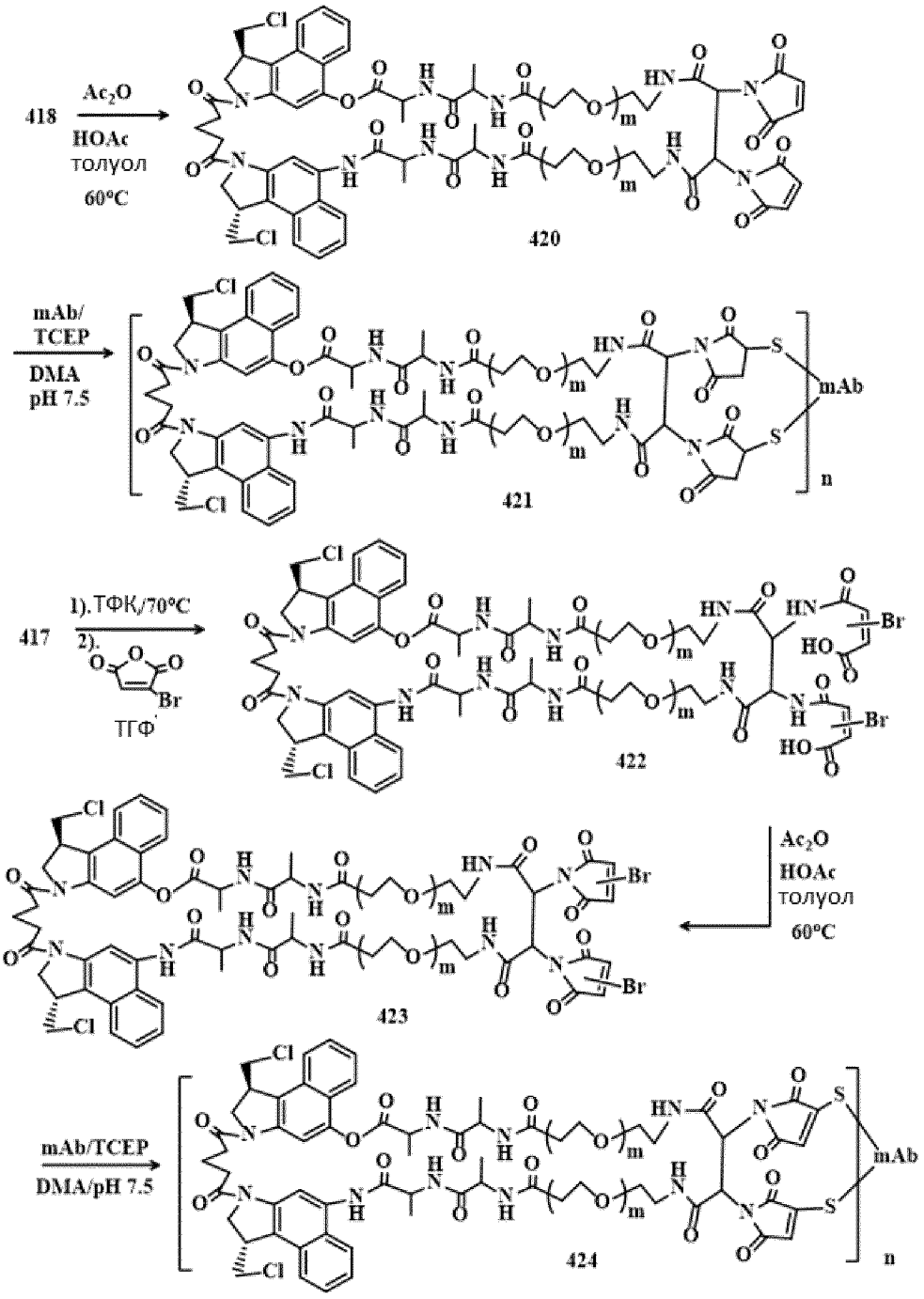
Фиг. 37


409
DMA
410
mAb/
TCEP
DMA
pH 7.5
411
mAb
n
410
Ac2O
HOAc
толуол
60°C
412
mAb/
TCEP
DMA
pH 7.5
413
mAb
n
409
DMA
414

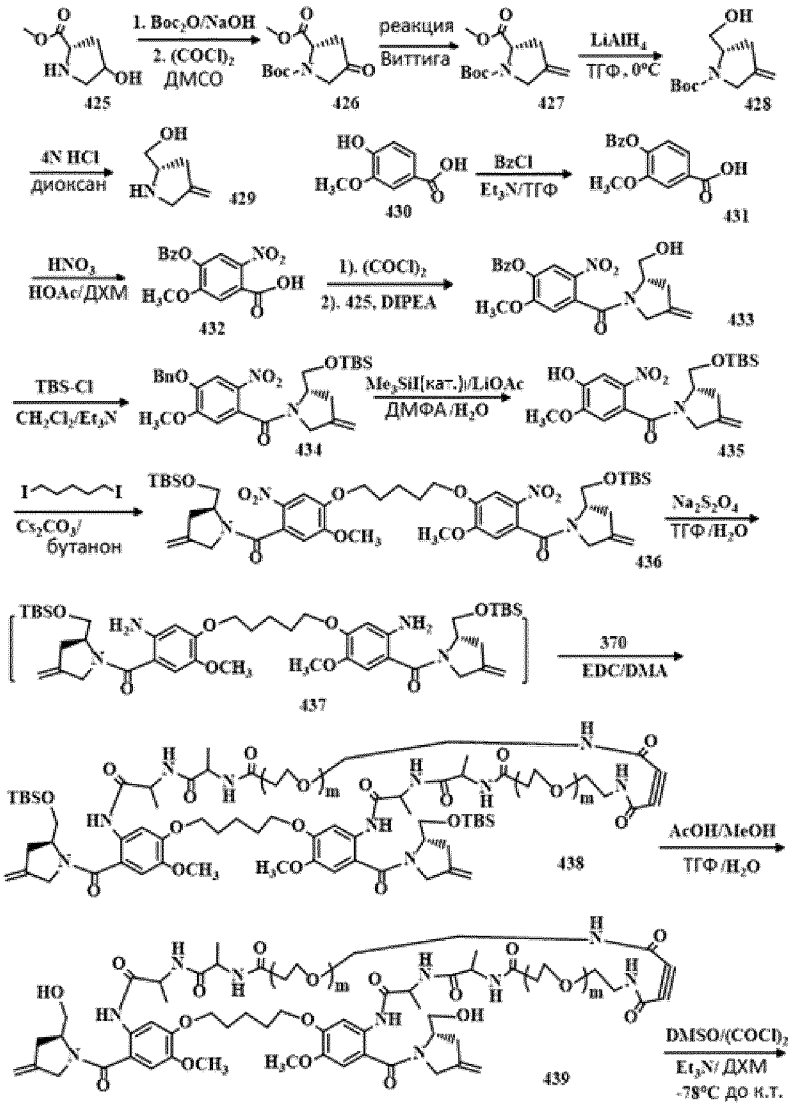
Фиг. 38


414
Ac2O
HOAc
толуол
60°C
415
mAb/
TCEP
DMA
pH 7.5
416
388
402
NHS/EDC
DMA
417
1).
ТФК/70°C
2).
DMA
418
mAb/TCEP
DMA/pH 7.5
419

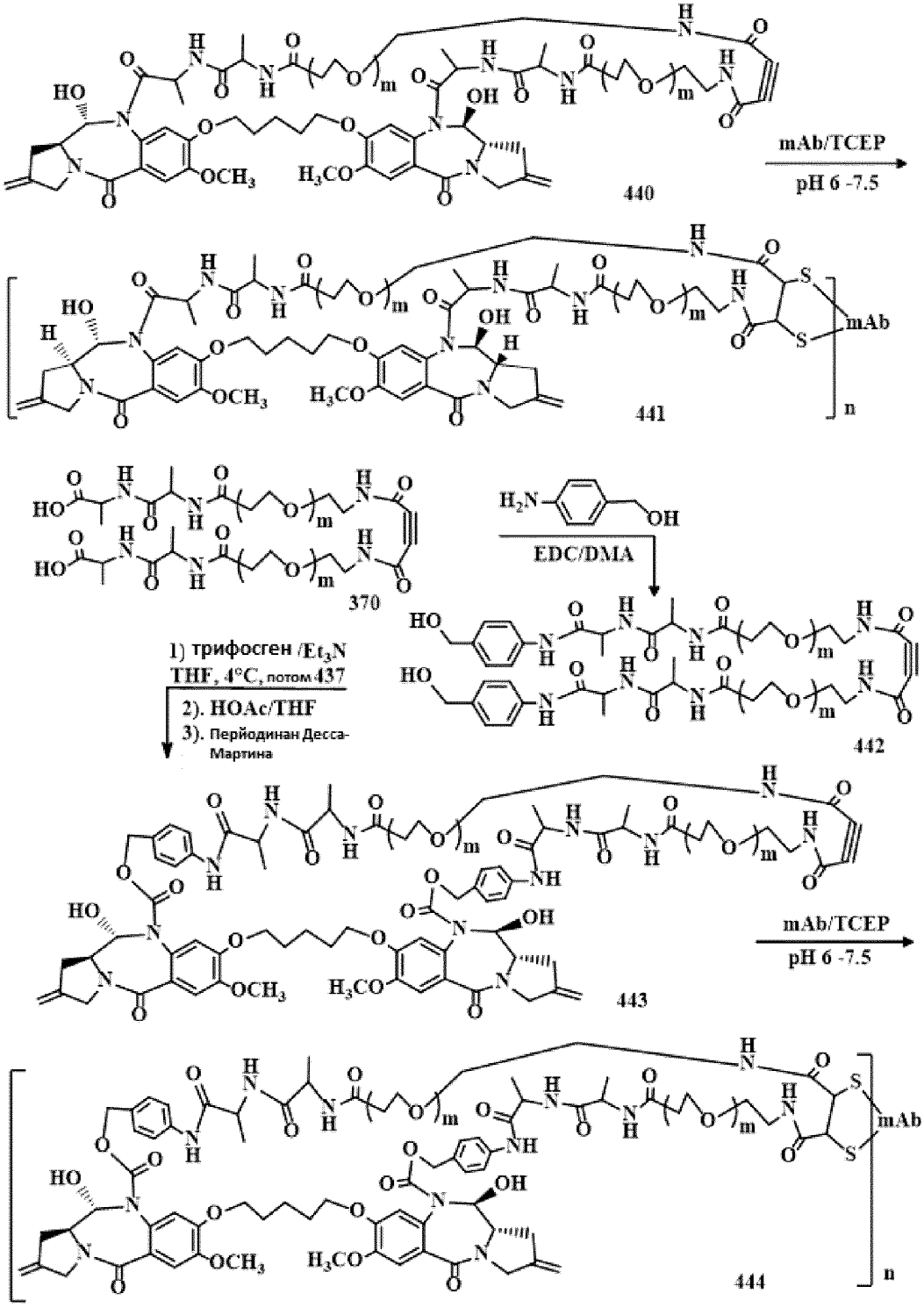
Фиг. 39


418
Ac2O
HOAc
толуол
60°C
420
mAb/
TCEP
DMA
pH 7.5
421
mAb
n
417
1). ТФК/70°C
2).
ТГФ
422
Ac2O
HOAc
толуол
60°C
423
mAb/TCEP
DMA/pH 7.5
424
mAb
n

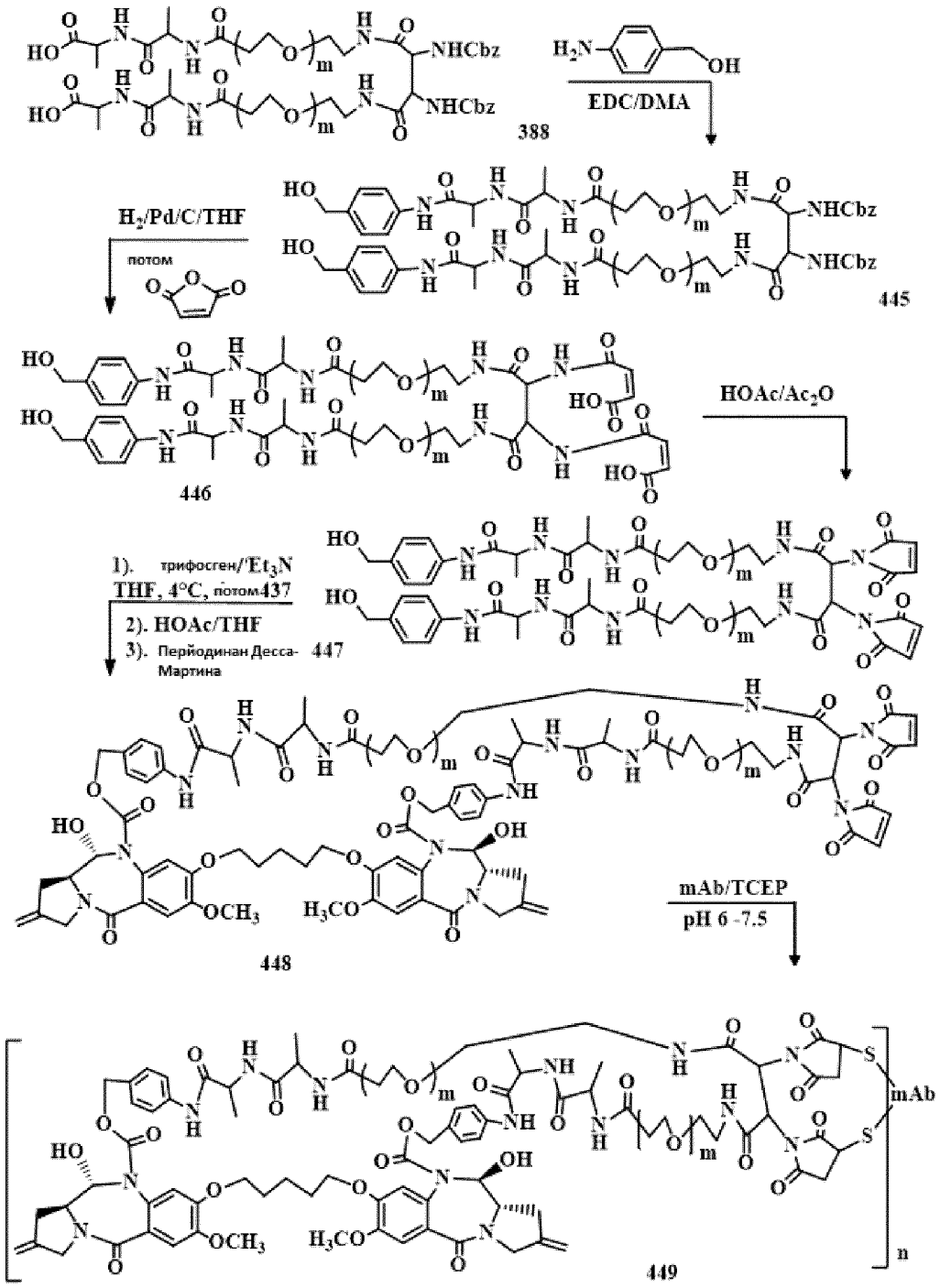
Фиг. 40


1. Boc2O/NaOH
2. (COCl)2 ДМСО
реакция Виттига
LiAlH4
ТГФ, 0°C
425
426
427
428
4N HCl
диоксан
429
430
BzCl
Et3N/ТГФ
431
HNO3
HOAc/ДХМ
432
1). (COCl)2
2). 425, DIPEA
433
TBS-Cl
CH2Cl2/Et3N
434
Me3SiI[кат.]/LiOAc
ДМФА/H2O
435
Cs2CO3/
бутанон
436
Na2S2O4
ТГФ/H2O
437
370
EDC/DMA
438
AcOH/MeOH
ТГФ/H2O
439
DMSO/(COCl)2
Et3N/ДХМ
-78°C до к.т.

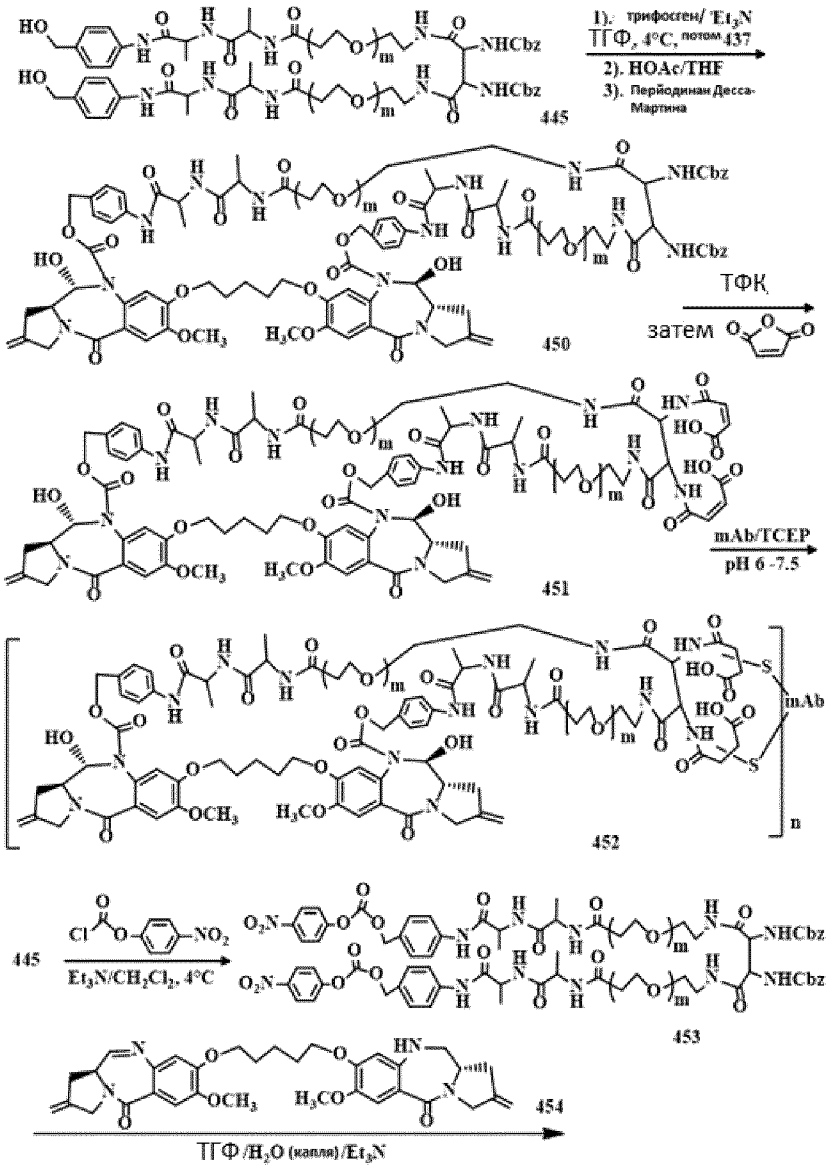
Фиг. 41.


mAb/TCEP
pH 6 -7.5
440
441
mAb
n
370
EDC/DMA
442
1) трифосген /Et3N
THF, 4°C, потом 437
2). HOAc/THF
3). Перйодинан Десса-Мартина
443
444

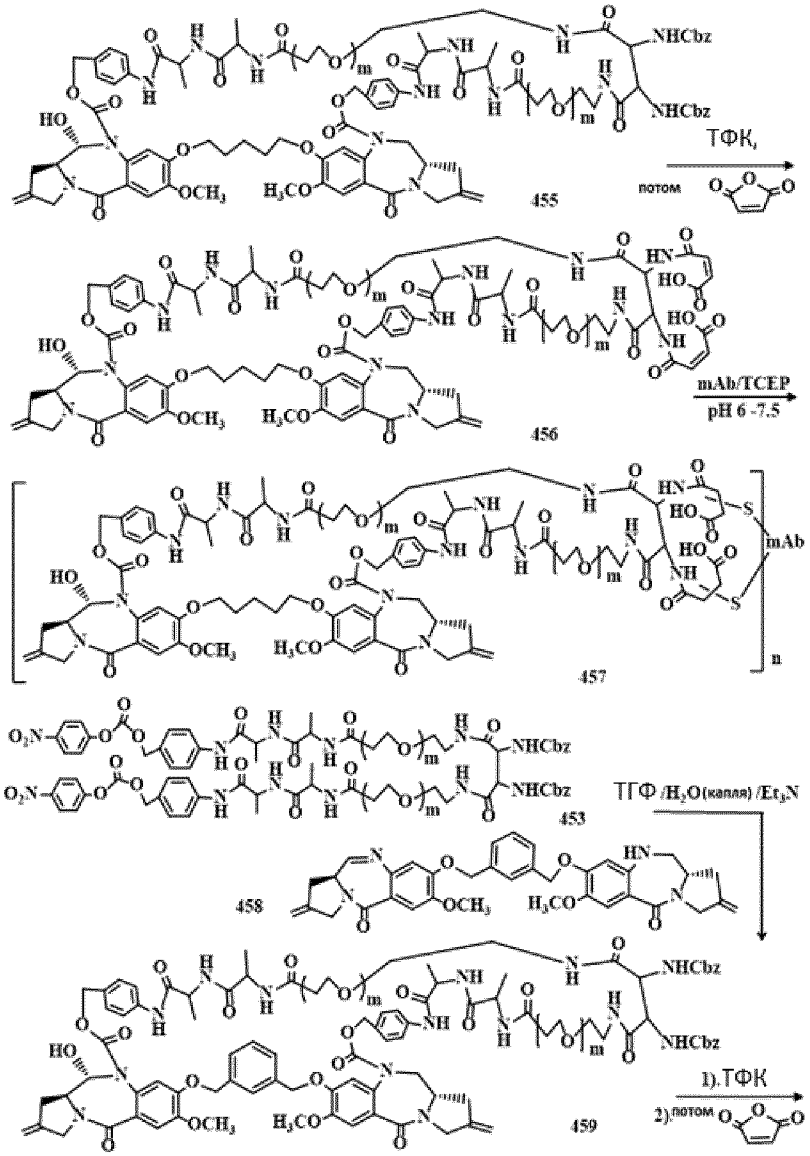
Фиг. 42.


388
EDC/DMA
H_2/Pd/C/THF
потом
445
446
$HOAc/Ac_2O$
1). трифосген/Et_3N
THF, 4°C, потом437
2). HOAc/THF
3). Перйодинан Десса-Мартина
447
448
mAb/TCEP
pH 6 -7.5
449
mAb

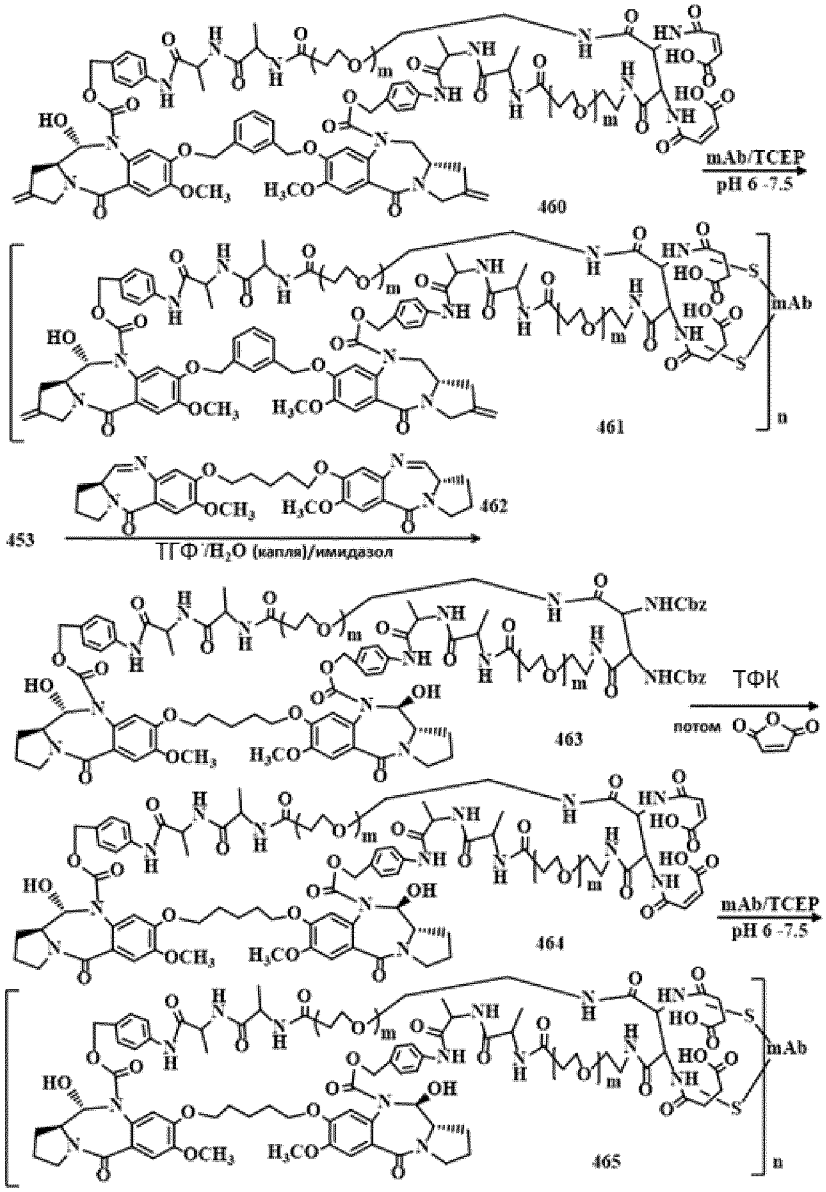
Фиг. 43.


1). трифосген/ Et3N
ТГФ, 4°C, потом 437
2). HOAc/THF
3). Перйодинан Десса-Мартина
445
NHCbz
450
ТФК
затем
451
mAb/TCEP
pH 6 -7.5
452
mAb
n
445
Et3N/CH2Cl2, 4°C
453
454
ТГФ /H2O (капля)/Et3N

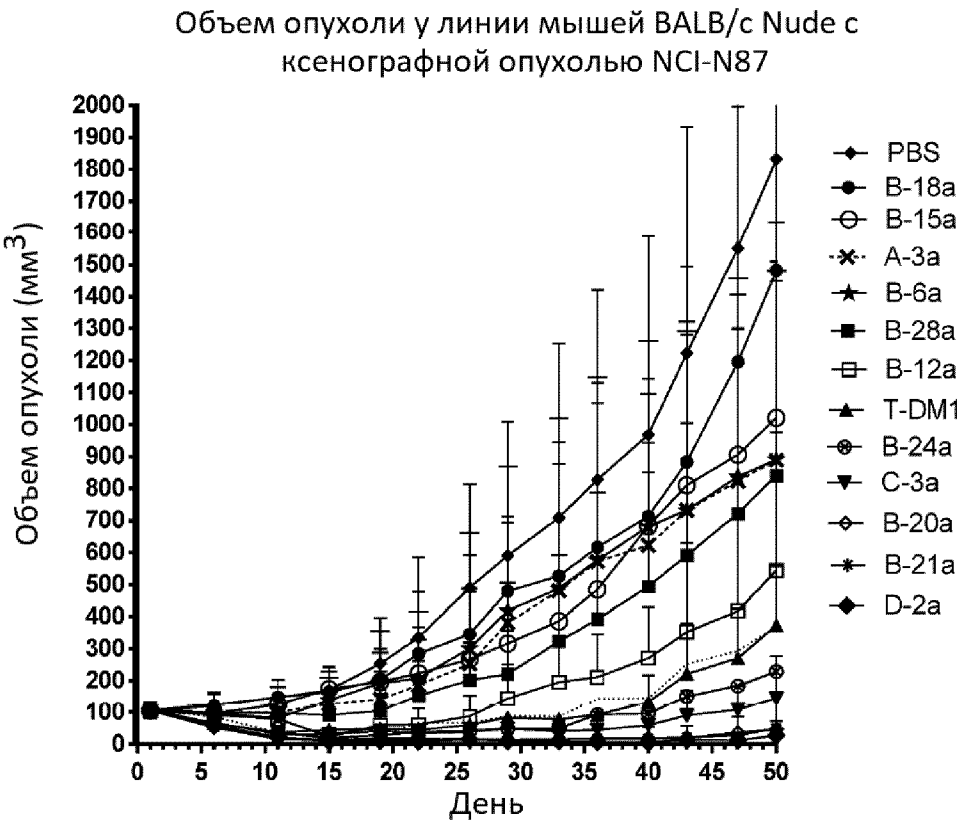
Фиг. 44.


455
ТФК,
потом
456
mAb/TCEP
pH 6 -7.5
457
mAb
n
453
ТГФ /H2O(капля) /Et3N
458
459
1).ТФК
2).потом

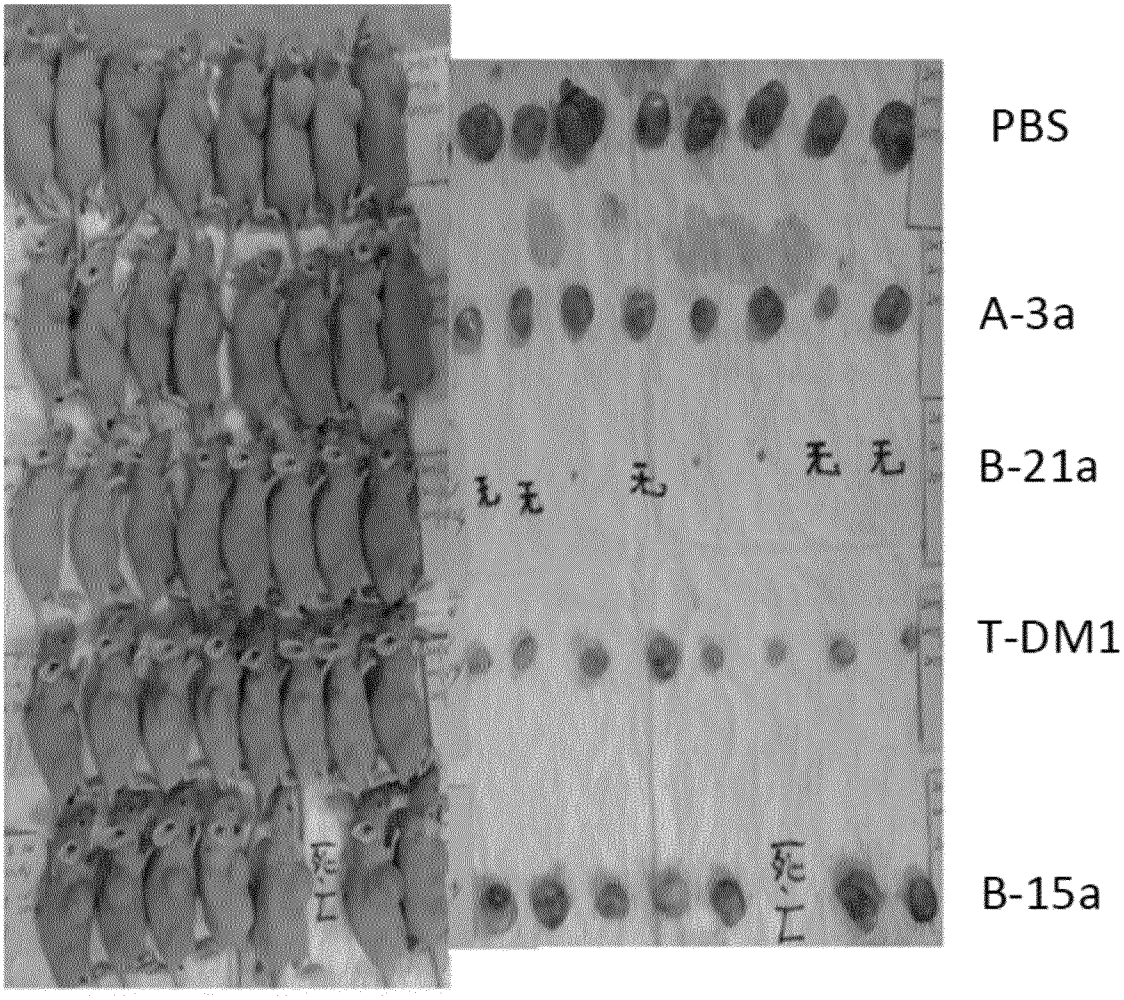
Фиг. 45.


mAb/TCEP
pH 6 -7.5
460
461
mAb
n
453
462
ТГФ /H2O (капля)/имидазол
NHCbz
NHCbz
ТФК
потом
463
464
mAb/TCEP
pH 6 -7.5
465
mAb
n

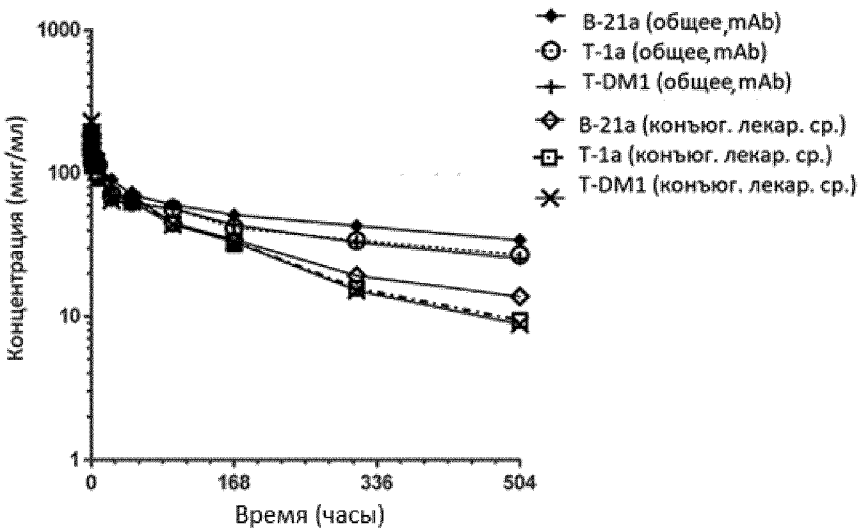
Фиг. 46.


Объем опухоли у линии мышей BALB/c Nude с ксенографной опухолью NCI-N87
Объем опухоли (мм3)
2000
1900
1800
1700
1600
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
День
PBS
B-18a
B-15a
A-3a
B-6a
B-28a
B-12a
T-DM1
B-24a
C-3a
B-20a
B-21a
D-2a

Фиг. 47


PBS
A-3a
B-21a
T-DM1
B-15a

Фиг. 48.


B-21a (общее,mAb)
T-1a (общее,mAb)
T-DM1 (общее,mAb)
B-21a (конъюг. лекар. ср.)
T-1a (конъюг. лекар. ср.)
T-DM1 (конъюг. лекар. ср.)
Концентрация (мкг/мл)
1000
100
10
1
0
168
336
504
Время (часы)

Фиг. 49.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference **2017-1**	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. **PCT/IB2017/051977**	International filing date *(day/month/year)* **06 April 2017**	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
Applicant **HANGZHOU DAC BIOTECH CO.,LTD**		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of **4** sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

   ☑ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

   c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

   ☑ the text is approved as submitted by the applicant.

   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

   ☐ the text is approved as submitted by the applicant.

   ☑ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

   ☐ as suggested by the applicant.

   ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

   ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

   b. ☑ none of the figures is to be published with the abstract.

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

What provided is the conjugation of cytotoxic to a cell-binding molecule with a bis-linker(dual-linker) as shown in Formula(I). It provides bis-linkage methods of making a conjugate of a cytotoxic drug molecule to a cell-binding agent in a specific manner. It also relates to application of the conjugates for the treatment of a cancer, or an autoimmune disease, or an infectious disease.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2017/051977

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 417/14(2006.01)i; A61P 31/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI; EPODOC; CNKI; CNABS; STN on the Web:ADC, antibody, conjugate, bis-linked, bis-linker, dual-linker, dual-linked, her2, linker, spacer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016059622 A2 (SUZHOU M-CONJ BIOTECH CO., LTD.ET AL.) 21 April 2016 (2016-04-21) the abstract, claims 1-38, Figure 28	1-42
X	WO 2015151078 A4 (HANGZHOU DAC BIOTECH CO., LTD.) 14 July 2016 (2016-07-14) the abstract, claims 1-31	1-42
A	CN 105592859 A (UNIVERSITY FRANCOIS RABELAIS) 18 May 2016 (2016-05-18) the abstract, claims 1-25	1-42
A	CN 104244718 A (IGENICA INC.) 24 December 2014 (2014-12-24) the abstract, claims 1-47	1-42
A	US 2012100161 A1 (FAULSTICH HEINZ ET AL.) 26 April 2012 (2012-04-26) claims 1-25	1-42
A	US 2015031861 A1 (UCL BUSINESS PLC) 29 January 2015 (2015-01-29) the abstract, claims 1-25	1-42

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 December 2017	**03 January 2018**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA **6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088** **China**	**CUI,Chuanming**
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No. **(86-10)62413775**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IB2017/051977

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016059622	A2	21 April 2016	WO	2016059622	A4	19 January 2017
				WO	2016059622	A3	08 December 2016
WO	2015151078	A4	14 July 2016	WO	2015151078	A2	08 October 2015
				WO	2015151078	A3	10 March 2016
CN	105592859	A	18 May 2016	JP	2016531094	A	06 October 2016
				CA	2917544	A1	15 January 2015
				WO	2015004400	A1	15 January 2015
				FR	3008408	A1	16 January 2015
				EP	3019202	A1	18 May 2016
				US	2016151515	A1	02 June 2016
CN	104244718	A	24 December 2014	KR	20140139480	A	05 December 2014
				US	2013224228	A1	29 August 2013
				IN	4961CHN2014	A	18 September 2015
				US	2016303247	A1	20 October 2016
				EP	2793585	A4	09 December 2015
				RU	2014124984	A	27 January 2016
				HK	1203309	A1	30 October 2015
				AU	2012348017	A1	03 July 2014
				MX	2014006739	A	05 June 2015
				CA	2857398	A1	13 June 2013
				EP	2793585	A1	29 October 2014
				JP	2015500287	A	05 January 2015
				PH	12014501229	A1	08 September 2014
				IL	232936	D0	31 July 2014
				SG	11201402686U	A	27 June 2014
				WO	2013085925	A1	13 June 2013
US	2012100161	A1	26 April 2012	CA	2970774	A1	14 October 2010
				CA	2758201	C	01 August 2017
				AU	2010234334	B2	09 October 2014
				CA	2758201	A1	14 October 2010
				US	2016089450	A1	31 March 2016
				EP	2416804	A2	15 February 2012
				ES	2621104	T3	03 July 2017
				WO	2010115629	A3	23 December 2010
				US	9233173	B2	12 January 2016
				WO	2010115629	A2	14 October 2010
				EP	2416804	B1	01 March 2017
				EP	3192529	A1	19 July 2017
				AU	2010234334	A1	10 November 2011
US	2015031861	A1	29 January 2015	EP	2822597	A1	14 January 2015
				CA	2866699	A1	12 September 2013
				WO	2013132268	A1	12 September 2013
				JP	2015510877	A	13 April 2015