



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97794** (13) **C2**
(51) МПК
C07D 487/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2008 10591**
(22) Дата подання заявки: **22.01.2007**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **26.03.2012**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **06290154.1**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **25.01.2006**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.11.2008, Бюл.№ 21**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.03.2012, Бюл.№ 6**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/IB2007/000142, 22.01.2007**
(72) Винахідник(и):
**Гозі Лоранс (FR),
Чжао Роберт (US),
Ден Юнхун (US),
Лі Вей (US),
Бушар Ерве (FR),
Чарі Раві В.Дж. (US),
Коммерсон Ален (FR)**
(73) Власник(и):
**САНОФІ-АВЕНТИС,
174, avenue de France, F-75013 Paris,
France (FR)**
(74) Представник:
**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.
№115**

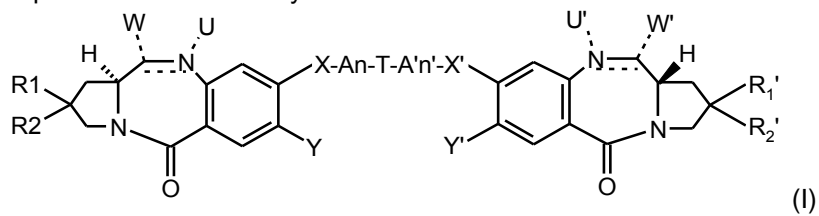
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO2005085250 A 15.09.2005
WO2005110423 A 24.11.2005
WO2005040170 A 06.05.2005
WO2004087716 A 14.10.2004
GREGSON S J ET AL: "Synthesis of a novel C2/C2'-exo unsaturated pyrrolobenzodiazepine cross-linking agent with remarkable DNA binding affinity and cytotoxicity" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, CHEMICAL SOCIETY. LETCHWORTH, GB, 1999, pages 797-798, XP002136001 ISSN: 0022-4936
KAMAL A ET AL: "The effect of C2-fluoro group on the biological activity of DC-81 and its dimers" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 14, no. 10, 17 May 2004 (2004-05-17), pages 2669-2672, XP004841263 ISSN: 0960-894X
GREGSON S J ET AL: "Linker Length Modulates DNA Cross-Linking Reactivity and Cytotoxic Potency of C8/C8' Ether-Linked C2-exo-Unsaturated Pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine (PBD) Dimers" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON, US, vol. 47, 2004, pages 1161-1174, XP002316295 ISSN: 0022-2623
KAMAL A ET AL: "Synthesis of fluorinated analogues of SJG-136 and their DNA-binding potential" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 14, no. 22, 15 November 2004 (2004-11-15), pages 5699-5702, XP004598621 ISSN: 0960-894X
FARMER J D ET AL: "SYNTHESIS AND DNA CROSSLINKING ABILITY OF A DIMERIC ANTHRAMYCIN ANALOG" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 29, no. 40, 1988, pages 5105-5108, XP000196344 ISSN: 0040-4039
KAMAL ET AL: "DNA binding potential and cytotoxicity of newly designed pyrrolobenzodiazepine dimers linked through a piperazine side-armed-alkane spacer" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 14, no. 2, 15 January 2006 (2006-01-15), pages 385-394, XP005202849 ISSN: 0968-0896
WO2005085259 A 15.09.2005
KUMAR R ET AL: "Design, synthesis and in vitro cytotoxic studies of novel bis-pyrrolo[2,1][1,4]benzodiazepine-pyrrole and imidazole polyamide conjugates" EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, EDITIONS SCIENTIFIQUE ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 40, no. 7, July 2005 (2005-07), pages 641-654, XP004921371 ISSN: 0223-5234

UA 97794 C2

(54) ЦИТОТОКСИЧНІ АГЕНТИ, ЯКІ ВКЛЮЧАЮТЬ ПОХІДНІ ТОМАЙМІЦИНУ, І ЇХ ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Даний винахід належить до нових похідних томайміцину формули (I), способу їх отримання і їх терапевтичного застосування.



Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід належить до нових цитотоксичних агентів і їх терапевтичного застосування. Більш конкретно, винахід належить до нових цитотоксичних агентів, що включають похідні томайміцину, і їх терапевтичного застосування. Ці нові цитотоксичні агенти мають терапевтичне застосування в результаті доставки похідних томайміцину до певної популяції клітин «націленим» чином хімічним зв'язуванням похідного томайміцину зі зв'язуючим клітини агентом.

Рівень техніки

З'явилося багато повідомлень по зроблених специфічних «націлюваннях» на пухлинні клітини кон'югатами моноклональне антитіло-лікарський засіб (Sela et al., in *Immunoconjugates*, 189-216 (C. Vogel, ed. 1987); Ghose et al., in *Targeted Drugs* 1-22 (E. Goldberg, ed. 1983); Diener et al., in *Antibody mediated delivery systems*, 1-23 (J. Rodwell, ed. 1988); Pietersz et al., in *Antibody mediated delivery systems*, 25-53 (J. Rodwell, ed. 1988); Bumol et al., in *Antibody mediated delivery systems*, 55-79 (J. Rodwell, ed. 1988); G.A. Pietersz & K. Krauer, 2, *J. Drug Targeting*, 183-215 (1994); R.V.J. Chari, 31 *Adv. Drug Delivery Revs.*, 89-104 (1998); W.A. Blattler & R.V.J. Chari, in *Anticancer Agents, Frontiers in Cancer Chemotherapy*, 317-338, ACS Symposium Series 796; and I. Ojima et al. eds, American Chemical Society 2001). Всі цитовані посилання і патенти включені в опис як посилання.

Цитотоксичні лікарські засоби, такі як метотрексат, даунорубіцин, доксорубіцин, вінкристин, вінбластин, мелфалан, мітоміцин С і хлорамбуцил, були кон'юговані з різними мишачими моноклональними антитілами. У деяких випадках молекули лікарського засобу зв'язували з молекулами антитіла через молекулу проміжного носія, такого як сироватковий альбумін (Garnett et al., 46, *Cancer Res.* 2407-2412 (1986); Ohkawa et al. 23, *Cancer Immunol. Immunother.* 81-86 (1986); Endo et al., 47 *Cancer Res.* 1076-1080 (1980)), дектран (Hurwitz et al., 2 *Appl Biochem.* 25-35 (1980); Manabi et al., 34 *Biochem. Pharmacol.* 289-291 (1985); Dillman et al., 46 *Cancer Res.*, 4886-4891 (1986); Shoal et al., 85, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 8276-8280 (1988)), або поліглутамінова кислота (Tsukada et al., 73, *J. Natl. Cane. Inst.* 721-729 (1984); Kato et al. 27 *J. Med. Chem.*, 1602-1607 (1984); Tsukada et al., 52, *Br. J. Cancer*, 111-116(1985)).

Застосовували широкий ряд лінкерних методик для отримання таких імункон'югатів і досліджували як розщеплювані, так і нерозщеплювані лінкери. Однак, в більшості випадків повний цитотоксичний потенціал лікарських засобів могли вивчити тільки в тих випадках, якщо молекули лікарського засобу могли вивільнитися з кон'югатів в немодифікованій формі у місця мішені.

Одним з розщеплюваних лінкерів, які застосовували для отримання кон'югатів антитіло-лікарський засіб, є лабільний в кислотному середовищі лінкер на основі цис-аконітової кислоти, для якого вигідним є кислотне навколишнє середовище різних внутрішньоклітинних компартментів, таких як цитоплазматичні тільця, що зустрічаються під час опосередкованого рецептором ендцитозу, і лізосоми. Shen і Ryser ввели цей спосіб для отримання кон'югатів даунорубіцину з макромолекулярними носіями (102 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1048-1054 (1981)). Yang і Reisfeld застосовували таку ж методику для кон'югації даунорубіцину з антитілами проти меланоми (80 *J. Natl. Canc. Inst.* 1154-1159 (1988)). Dillman et al. також застосовували лабільний в кислотному середовищі лінкер аналогічним чином для отримання кон'югатів даунорубіцину з антитілом проти Т-клітин (48 *Cancer Res.* 6097-6102 (1988)).

Альтернативний підхід, досліджений Trouet et al., включав зв'язування даунорубіцину з антитілом через пептидну проміжну ланку (79 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 626-629 (1982)). Це було зроблене відповідно до передумови, що вільний лікарський засіб може вивільнитися з такого кон'югата під впливом лізосомних пептидаз.

Випробування цитотоксичності *in vitro*, однак, показали, що кон'югати антитіло-лікарський засіб рідко досягали такої ж цитотоксичної активності, як вільні, некон'юговані лікарські засоби. Це дозволило передбачити, що механізми, якими молекули лікарського засобу звільняються від антитіла, можуть бути дуже неефективними. Було виявлено, що в області імунотоксинів кон'югати, утворені за допомогою дисульфідних містків між моноклональними антитілами і каталітично активними білковими токсинами, є більш цитотоксичними, ніж кон'югати, що містять інші лінкери. Див. Lambert et al., 260 *J. Biol. Chem.* 12035-12041 (1985); Lambert et al., in *Immunotoxins* 175-209 (A. Frankel, ed. 1988); Ghetie et al., 48, *Cancer Res.* 2610-2617 (1988). Цей факт приписали високій внутрішньоклітинній концентрації глутатіону, сприяючого ефективному розриву дисульфідного зв'язку між молекулою антитіла і токсином. Незважаючи на це, є тільки декілька описаних прикладів застосування дисульфідних містків для отримання кон'югатів між лікарськими засобами і макромолекулами. Shen et al. (260, *J. Biol. Chem.* 10905-10908 (1985)) описали перетворення метотрексату в меркаптоетиламідне похідне з подальшим кон'югуванням з полі-D-лізином через дисульфідний зв'язок. У іншому повідомленні описане отримання

кон'югата, що містить трисульфід токсичного лікарського засобу каліхеаміцину з антитілом (Hinman et al., 53 Cancer Res. 3336-3342 (1993)).

Однією причиною недоліку зв'язаних дисульфідом кон'югатів антитіло-лікарський засіб є недоступність цитотоксичних лікарських засобів, що мають залишок, який містить атом сірки, який можна легко застосовують для зв'язування лікарського засобу з антитілом за допомогою дисульфідного містка. Крім того, хімічна модифікація існуючих лікарських засобів є нелегкою без зниження їх цитотоксичного потенціалу.

Іншим основним недоліком існуючих кон'югатів антитіло-лікарський засіб є їх нездатність доставляти достатню концентрацію лікарського засобу до місця мішені внаслідок обмеженого числа антигенів, які є мішенями, і відносно помірної цитотоксичності канцеростатичних лікарських засобів, подібних до метотрексату, даунорубіцину і вінкристину. Для досягнення значної цитотоксичності зв'язок більшого числа молекул лікарського засобу або безпосередньо з антитілом, або через молекулу полімерного носія стає необхідним. Однак, такі сильно модифіковані антитіла часто виявляють ослаблене зв'язування з антигеном-мішенню і швидке виведення in vivo з кровотоку.

Незважаючи на описані вище труднощі, були описані корисні цитотоксичні агенти, що включають зв'язуючі клітини частини і групу цитотоксичних лікарських засобів, відомих як майтанзиноїди (патент США 5208020, патент США 5416064 і R. V. J. Chari, 31 Advanced Drug Delivery Reviews 89-104 (1998)). Аналогічно цьому, описані корисні цитотоксичні агенти, що включають зв'язуючі клітини частини і аналоги і похідні сильнодіючого протипухлинного антибіотика CC-1065 (патент США 5475092, патент США 5585499 і патент США 6756397).

Похідними томайміцину є піроло[1,4]бензодіазепіни (PBD), новий клас сполук, які виявляють свої біологічні властивості при ковалентному зв'язуванні з N2 гуаніну через малу борозенку спіралі ДНК. PBD включають ряд сполук-зв'язувачів через малу борозенку ДНК, такі як антраміцин, неотраміцин і DC-81. Протипухлинна активність томайміцину, однак, обмежена внаслідок його неспецифічної токсичності відносно нормальних клітин. Тому існує потреба в підвищенні терапевтичної активності і зменшенні неспецифічних токсичних дій томайміцинових сполук. Автори даного винаходу виявили, що таку проблему можна вирішити направленою доставкою до мішені томайміцинових сполук зв'язуванням їх з агентами, які зв'язують клітини. Крім того, існує потреба в розробці похідних томайміцину, які є розчинними і стабільними у водних розчинах. Крім того, томайміцин не є досить сильнодіючим засобом, який можна застосовувати в кон'югатах агентів, які зв'язують клітини.

Недавно були описані деякі нові похідні PBD і їх протипухлинна активність в преклінічних моделях (WO 00/12508 і WO2005/085260). Однак первинні клінічні випробування на людях показують, що сполуки цього класу є сильно токсичними з розрахунку на дуже низьку дозу, яку можна ввести людям (I. Puzanov, Proc. AACR-NCI-EORTC International Conference, Philadelphia, USA 2005, Abstract #B117). Таким чином, бажано надати альтернативні похідні, які є більш сильнодіючими і/або які можна зв'язати зі зв'язуючими клітини агентами.

Відповідно до цього, існує величезна потреба в способі лікування захворювань похідними томайміцину, у яких їх побічні дії ослаблені без погіршення їх цитотоксичності.

Суть винаходу

Як описано в першому варіанті здійснення винаходу, однією задачею даного винаходу є створення похідних томайміцину, які є високотоксичними, але які все ж можна ефективно застосовувати при лікуванні багатьох захворювань.

Іншою задачею даного винаходу є створення нових похідних томайміцину, необов'язково здатних зв'язуватися або зв'язаних зі зв'язуючим клітини агентом.

У другому варіанті здійснення даний винахід пропонує терапевтичну композицію, яка включає:

(А) ефективну кількість одного або декількох похідних томайміцину, необов'язково здатних зв'язуватися або зв'язаних зі зв'язуючим клітини агентом, і

(В) фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або ексципієнт.

У третьому варіанті здійснення даний винахід пропонує спосіб кілінгу вибраних популяцій клітин, що включає контактування клітин-мішеней або тканини, що містить клітини-мішені, з цитотоксичною кількістю цитотоксичного агента, що включає одне або декілька похідних томайміцину, необов'язково здатних зв'язуватися або зв'язаних зі зв'язуючим клітини агентом.

Докладний опис винаходу

Даний винахід оснований на синтезі нових похідних томайміцину, які зберігають високу токсичність і які можна ефективно зв'язати з агентами, які зв'язують клітини. Раніше було виявлено, що зв'язування високотоксичних лікарських засобів з антитілами із застосуванням розщеплюваного зв'язку, такого як дисульфідний зв'язок, гарантує вивільнення повністю

активних лікарських засобів всередині клітини, і такі кон'югати є цитотоксичними в антиген-специфічному способі (патент США 6340701; патент США 6372738; патент США 6436931). Однак даний спосіб показує, що дуже важко модифікувати існуючі лікарські засоби без зменшення їх цитотоксичного потенціалу. Даний описаний винахід долає цю проблему

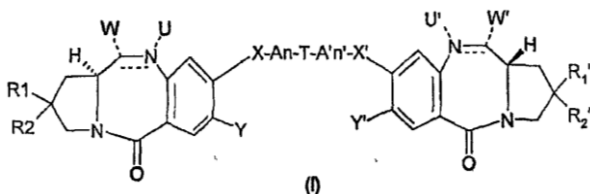
5 модифікацією описаних похідних томайміцину хімічними залишками. У результаті цього описані нові похідні томайміцину зберігають і в деяких випадках можуть навіть підвищувати цитотоксичну активність похідних томайміцину. Комплекси зв'язуючий клітини агент-похідне томайміцину дозволяють повністю оцінити цитотоксичну дію похідних томайміцину, які застосовують способом направленої в мішень дії проти тільки небажаних клітин, тим самим

10 запобігаючи побічній дії по пошкодженню здорових клітин, що не є мішенями. Таким чином, винахід пропонує корисні агенти для ліквідації патологічних або аномальних клітин, які повинні вбивати або лізувати, наприклад, пухлинні клітини (особливо, клітини солідних пухлин).

Цитотоксичний агент згідно з даним винаходом включає одне або декілька похідних томайміцину, необов'язково здатних зв'язуватися або зв'язаних зі зв'язуючим клітини агентом за допомогою зв'язувальної групи. Зв'язувальна група є частиною хімічного залишку, який ковалентно зв'язується з похідним томайміцину за допомогою загальноприйнятих методів. У переважному варіанті здійснення винаходу хімічний залишок може бути ковалентно зв'язаний з похідним томайміцину через дисульфідний зв'язок.

Похідні томайміцину, придатні в даному винаході, є сполуками, що мають формулу (I),

20 показану нижче:



де

---- являє собою необов'язковий одинарний зв'язок;

----- являє собою або одинарний зв'язок, або подвійний зв'язок;

за умови, що коли ---- являє собою одинарний зв'язок, то U і U', однакові або різні, незалежно являють собою H і W і W', однакові або різні, незалежно вибрані з групи, яка складається з OH, простого ефіру, такого як -OR, складного ефіру (наприклад, ацетату), такого як -OCOR, карбонату, такого як -OCOOR, карбамату, такого як -OCONRR', циклічного карбамату, так що N10 і C11 є частиною циклу, сечовини, такої як -NRCONRR', тіокарбамату, такого як -OCSNHR, циклічного тіокарбамату, так що N10 і C11 є частиною циклу, -SH, сульфіді, такого як -SR, сульфоксиду, такого як -SOR, сульфону, такого як -SOOR, сульфонату, такого як -SO₃⁻, сульфонаміді, такого як -NRSOOR, аміну, такого як -NRR', необов'язково циклічного аміну, так що N10 і C11 є частиною циклу, похідного гідроксиламіну, такого як -NROR', аміду, такого як -NRCOR, азида, такого як -N₃, ціано, галогену, триалкіл- або триарилфосфонію, групи, утвореної з амінокислоти; переважно W і W' є однаковими або різними і являють собою OH, OMe, OEt, NHCONH₂, SMe;

і коли ----- являє собою подвійний зв'язок, то U і U' відсутні і W і W' являють собою H.

- R₁, R₂, R₁', R₂' є однаковими або різними і незалежно вибрані з галогеніду або алкілу, необов'язково заміщеного одним або декількома замісниками з Hal (атома галогену), CN, NRR', CF₃, OR, арилу, Het, S(O)_qR, або R₁ і R₂ і R₁' і R₂' утворюють разом групу, яка містить подвійний зв'язок =B і =B', відповідно.

Переважно, R₁ і R₂ і R₁' і R₂' утворюють разом групу, яка містить подвійний зв'язок =B і =B', відповідно.

- B і B' є однаковими або різними і незалежно вибрані з алкенілу, необов'язково заміщеного одним або декількома замісниками з атома галогену, CN, NRR', CF₃, OR, арилу, Het, S(O)_qR, або B і B₁ являє собою атом кисню.

Переважно, B=B'.

Більш переважно, B=B'==CH₂ або =CH-CH₃.

- X, X' є однаковими або різними і незалежно вибрані з однієї або декількох груп -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q-.

Переважно, X=X'.

Більш переважно, X=X'=O.

- A, A' є однаковими або різними і незалежно вибрані з алкілу або алкенілу, що необов'язково містить атом кисню, азоту або сірки, причому кожний необов'язково заміщений одним або декількома замісниками з атома галогену, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, арилу, Het, алкілу, алкенілу.

5 Переважно, A=A'.

Більш переважно, A=A'-нерозгалужений, незаміщений алкіл.

- Y, Y' є однаковими або різними і незалежно вибрані з H, OR.

Переважно, Y=Y'.

Більш переважно, Y=Y'=Oалкіл, більш переважно Ометил.

10 - Т являє собою -NR-, -O-, -S(O)_q- або 4-10-членний арил, циклоалкіл, гетероцикліл або гетероарил, причому кожний необов'язково заміщений одним або декількома замісниками з атома галогену, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, і/або лінкер(ами), або розгалужений алкіл, необов'язково заміщений одним або декількома замісниками з атома галогену, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR і/або лінкер(ами), або нерозгалужений алкіл, заміщений одним або декількома замісниками з атома галогену. CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR і/або лінкер(ами).

15 Переважно, Т являє собою 4-10-членний арил або гетероарил, більш переважно феніл або піридил, необов'язково заміщений одним або декількома лінкерами(ами).

Вказаний лінкер є зв'язувальною групою. Прийнятні зв'язувальні групи добре відомі в даній галузі і включають тіольну, сульфідну, дисульфідну групи, прості тіоефірні групи, лабільні під дією кислот групи, фотолабільні групи, лабільні під дією пептидаз групи і лабільні під дією естераз групи. Переважними є дисульфідні групи і прості тіоефірні групи.

20 Коли зв'язувальною групою є група, що містить тіол, сульфід (або так званий простий тіоефір -S-) або дисульфід (-S-S-), бічний ланцюг, що містить тіольну, сульфідну або дисульфідну групу, може бути нерозгалуженою або розгалуженою, ароматичною або гетероциклічною. Середній фахівець в даній галузі може легко ідентифікувати прийнятні бічні ланцюги.

Переважно, вказаний лінкер має формулу:

-G-D-(Z)p-S-Z',

30

де

G являє собою одинарний або подвійний зв'язок, -O-, -S- або -NR-;

D являє собою одинарний зв'язок або -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

35 де E і F є однаковими або різними і незалежно вибрані з нерозгалужених або розгалужених -
(OCH₂CH₂)_iалкіл(OCH₂CH₂)_j-, алкіл(OCH₂CH₂)_iалкіл-, (OCH₂CH₂)_i-,
(OCH₂CH₂)_iциклоалкіл(OCH₂CH₂)_j-, (OCH₂CH₂)_iгетероцикліл(OCH₂CH₂)_j-,
(OCH₂CH₂)_iарил(OCH₂CH₂)_j-, (OCH₂CH₂)_iгетероарил(OCH₂CH₂)_j-, алкіл-
(OCH₂CH₂)_iалкіл(OCH₂CH₂)_j-, алкіл-(OCH₂CH₂)_i-, алкіл-(OCH₂CH₂)_iциклоалкіл(OCH₂CH₂)_j-,
40 алкіл(OCH₂CH₂)_iгетероцикліл(OCH₂CH₂)_j-, алкіл-(OCH₂CH₂)_iарил(OCH₂CH₂)_j-,
алкіл(OCH₂CH₂)_iгетероарил(OCH₂CH₂)_j-, циклоалкілалкіл-, алкілциклоалкіл-,
гетероциклілалкіл-, алкілгетероцикліл-, алкіларил-, арилалкіл-, алкілгетероарил-,
гетероарилалкіл-;

де i і j, однакові або різні, є цілими числами і незалежно вибрані з 0, 1-2000;

45 Z являє собою нерозгалужений або розгалужений -алкіл-;

p дорівнює 0 або 1;

Z' являє собою H, тіолзахисну групу, таку як COR, R₂₀ або SR₂₀, де R₂₀ являє собою H, метил, алкіл, необов'язково заміщений циклоалкіл, арил, гетероарил або гетероцикліл, за умови, що коли Z' являє собою H, вказана сполука знаходиться в рівновазі з відповідною сполукою, утвореною внутрішньомолекулярною циклізацією, що є результатом приєднання тіольної групи -SH до імінного зв'язку -NH= одного із залишків PBD;

- n, n', однакові або різні, які дорівнюють 0 або 1;

- q дорівнює 0, 1 або 2;

55 - R, R' є однаковими або різними і незалежно вибрані з H, алкілу, арилу, причому кожний необов'язково заміщений атомом галогену, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, арилом, Het;

або їх фармацевтично прийнятними солями, гідратами або гідратованими солями або поліморфними кристалічними структурами цих сполук або їх оптичними ізомерами, рацематами, діастереомерами або енантіомерами.

Даний винахід належить до наступних переважних варіантів здійснення або будь-якої комбінації будь-якого з них:

60

- G являє собою одинарний зв'язок або -O- або -NR-;
 - G являє собою -O-;
 - D являє собою одинарний зв'язок або -E-, -E-NR-CO-, -ECO-, -CO-E-;
 - D являє собою -E-, -E-NR-CO-;
 - 5 - D являє собою -E-NR-CO-;
 - E являє собою нерозгалужений або розгалужений -алкіл-, $-(OCH_2CH_2)_j$ - або -алкілгетероцикліл;
 - E являє собою нерозгалужений або розгалужений -алкіл-;
 - Z являє собою $-(CH_2)_2$ - $C(CH_3)_2$ -;
 - 10 - p дорівнює 0 або 1;
 - Z' являє собою H або SR_{20} , де R_{20} являє собою алкіл, арил, гетероцикліл або гетероарил;
 - Z' являє собою H або SR_{20} , де R_{20} являє собою алкіл.
- Конкретні приклади тіол-, сульфід- або дисульфідвмісних лінкерів включають:
- 15 $-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - $-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18}CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - $-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}COCR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - $-(CR_{13}R_{14})_t(OCOR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - $-(CR_{13}R_{14})_t(COCR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - $-(CR_{13}R_{14})_t(CCONR_{19}CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - 20 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -феніл-CO $(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 - $-(CR_{13}R_{14})_t$ -фурил-CO $(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 - $-(CR_{13}R_{14})_t$ -оксазоліл-CO $(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$ -тіазоліл-CO $(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$ -тієніл-CO $(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$ -імідазоліл-CO $(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$ -морфоліно-CO $(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 - 25 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -піперазино-CO $(CR_{15}R_{16})_uSZ'$, $-(CR_{13}R_{14})_t$ -N-метилпіперазин-CO $(CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 - $-(CR_{13}R_{14})_t$ -феніл-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$ -фурил-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$ -оксазоліл-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$ -тіазоліл-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$ -тієніл-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$ -імідазоліл-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$ -морфоліно-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$ -піперазино-QSZ', $-(CR_{13}R_{14})_t$ -N-метилпіперазино-QSZ', або
 - $-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - $-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}COCR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - 30 $-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18}CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - O-феніл-QSZ', -O-фурил-QSZ', -O-оксазоліл-QSZ', -O-тіазоліл-QSZ', -O-тієніл-QSZ', -O-імідазоліл-QSZ', -O-морфоліно-QSZ', -O-піперазино-QSZ', -O-N-метилпіперазино-QSZ',
 - $-OCO(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)_y(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - $-OCO-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18}CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - 35 $-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - OCO-феніл-QSZ', -OCO-фурил-QSZ', -OCO-оксазоліл-QSZ', -OCO-тіазоліл-QSZ', -OCO-тієніл-QSZ', -OCO-імідазоліл-QSZ', -OCO-морфоліно-QSZ', -OCO-піперазино-QSZ', -OCO-N-метилпіперазино-QSZ' або
 - $-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - 40 $-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18}CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - CONR₁₂ $(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - CO-феніл-QSZ', -CO-фурил-QSZ', -CO-оксазоліл-QSZ', -CO-тіазоліл-QSZ', -CO-тієніл-QSZ', -CO-імідазоліл-QSZ', -CO-морфоліно-QSZ', -CO-піперазино-QSZ', -CO-піперидино-QSZ', -CO-N-метилпіперазино-QSZ',
 - 45 -NR₁₉ $(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - NR₁₉CO $(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - NR₁₉ $(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18}CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - NR₁₉CO $(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18}CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - NR₁₉CONR₁₂ $(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - 50 -NR₁₉CONR₁₂ $(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18}CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - NR₁₉CO-феніл-QSZ', -NR₁₉CO-фурил-QSZ', -NR₁₉CO-оксазоліл-QSZ', -NR₁₉CO-тіазоліл-QSZ', -NR₁₉CO-тієніл-QSZ', -NR₁₉CO-імідазоліл-QSZ', -NR₁₉CO-морфоліно-QSZ', -NR₁₉CO-піперазино-QSZ', -NR₁₉CO-піперидино-QSZ', -NR₁₉CO-N-метилпіперазино-QSZ', -NR₁₉-феніл-QSZ', -NR₁₉-фурил-QSZ', -NR₁₉-оксазоліл-QSZ', -NR₁₉-тіазоліл-QSZ', -NR₁₉-тієніл-QSZ', -NR₁₉-імідазоліл-QSZ',
 - 55 -NR₁₉-морфоліно-QSZ', -NR₁₉-піперазино-QSZ', -NR₁₉-піперидино-QSZ', -NR₁₉-N-метилпіперазино-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-феніл-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-оксазоліл-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-тіазоліл-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-тієніл-QSZ', -NR₁₉CO-NR₁₂-піперидино-QSZ',
 - $-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - $-S(O)_q(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18}CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 - 60 -SCONR₁₂ $(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

-SCO-морфоліно-QSZ', -SCO-піперазино-QSZ', -SCO-піперидино-QSZ' і -SCO-N-метилпіперазино-QSZ', де

Z¹ являє собою H, тіолзахисну групу, таку як COR, R₂₀' або SR₂₀', де R₂₀' являє собою H, алкіл, арил, гетероцикліл або гетероарил,

де Q являє собою прямий зв'язок або нерозгалужений алкіл або розгалужений алкіл, що має 1-10 атомів вуглецю, або поліетиленгліколева спейсерна (зв'язувальна) група з 2-20 повторюваними етиленоксиланками;

R₁₉ і R₁₂ є однаковими або різними і являють собою нерозгалужений алкіл, розгалужений алкіл або циклічний алкіл, що має від 1 до 10 атомів вуглецю, або незаміщений або заміщений арил або гетероцикліл і R₁₂ крім цього може бути H,

R₁₃, R₁₄, R₁₅ і R₁₆ є однаковими або різними і являють собою H або нерозгалужений або розгалужений алкіл, що має від 1 до 4 атомів вуглецю,

R₁₇ і R₁₈ являють собою H або алкіл,

и дорівнює цілому числу від 1 до 10 і може бути також рівним 0,

t дорівнює цілому числу від 1 до 10 і може бути також рівним 0,

у дорівнює цілому числу від 1 до 20 і може бути також рівним 0.

Коли сполука формули (I) знаходиться в формі іона (наприклад, сульфонату), може бути присутнім протиіон (наприклад, Na⁺ або K⁺).

Згідно з переважним аспектом, сполуками винаходу є сполуки формули (I), де T являє собою арил, необов'язково заміщений одним або декількома замісниками з атома галогену, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, і/або лінкер(ами), і A, A', X, X', U, U', W, W, m, m', n, n', ---, ----- мають значення, вказані вище.

Згідно з іншим переважним аспектом, сполуки винаходу вибрані з групи, яка складається з:

8,8'-[1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[5-метокси-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[1,4-бутандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[3-метил-1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[2,6-піридиндіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[4-(3-трет-бутоксисарбоніламінопропілокси)-2,6-піридиндіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[5-(3-амінопропілокси)-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[5-[3-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)пропілокси]-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[5-ацетилтіометил-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

трет-бутилового ефіру біс-{2-[(S)-2-метилен-7-метокси-5-оксо-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-8-ілокси]етил}карбамінової кислоти

8,8'-[3-(2-ацетилтіоетил)-1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

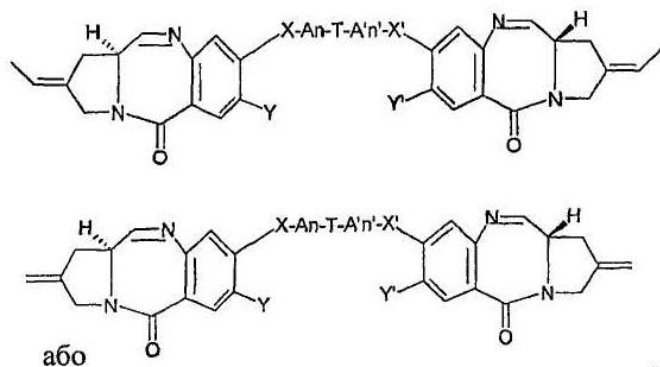
8,8'-[5-(N-4-метилдитіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[5-(N-метил-N-(2-меркапто-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[5-(N-метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[(4-(2-(4-меркапто-4-метил)пентанамідоетокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

8,8'-[(1-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-
 біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-
 біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 5 8,8'-[(4-(4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідобутоксипіридин-2,6-диметил)діокси)-
 біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 8,8'-[(4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїл]піперазин-1-іл)пропіл)піридин-2,6-
 диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
 с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 10 8,8'-[(1-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїл]піперазин-1-іл)пропіл)бензол-3,5-
 диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
 с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїламіно]етокси}етокси)етокси)піридин-
 2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
 15 с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-(4-метил-4-
 метилдисульфаніл)пентаноїламіно]етокси}етокси)етокси)етокси)етокси)етокси)-бензол-3,5-
 диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
 с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 20 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїламіно]етокси}етокси)етокси)бензол-
 3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
 с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-(4-метил-4-
 метилдисульфаніл)пентаноїламіно]етокси}етокси)етокси)етокси)етокси)етокси)-піридин-2,6-
 25 диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
 с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 8,8'-[(1-(2-[метил-(2-метил-2-метилдисульфаніл)пропіл)аміно]етокси)бензол-3,5-
 диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
 с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 30 8,8'-[(4-(3-[метил-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїл)аміно]пропіл)піридин-2,6-
 диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
 с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 8,8'-[(4-(3-[метил-(2-метил-2-метилдисульфаніл)пропіл)аміно]пропіл)піридин-2,6-
 диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
 35 с][1,4]бензодіазепін-5-ону]
 8,8'-[(1-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідо)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-
 (E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 а також їх відповідних меркаптопохідних
 або їх фармацевтично прийнятних солей, гідратів або гідратованих солей, або поліморфних
 40 кристалічних структур цих сполук, або їх оптичних ізомерів, рацематів, діастереомерів або
 енантіомерів.
 Переважними сполуками є сполуки формули:



де X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' мають значення, вказані вище.

Застосовувані в описі вище або нижче терміни мають наступні значення:

Алк являє собою алкіл, алкен або алкін.

"Алкіл" означає аліфатичну вуглеводневу групу, яка може бути нерозгалуженою або розгалуженою і містить 1-20 атомів вуглецю в ланцюгу, або циклічною і містить 3-10 атомів вуглецю. Переважні алкільні групи містять 1-12 атомів вуглецю в ланцюгу. "Розгалужена" означає, що одна або декілька нижчих алкільних груп, таких як метил, етил або пропіл, приєднані до нерозгалуженого алкільного ланцюга. Приклади алкільних груп включають метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, трет-бутил, н-пентил, 3-пентил, октил, ноніл, децил, циклопенгил і циклогексил.

"Алкен" означає аліфатичну вуглеводневу групу, яка містить подвійний вуглець-вуглецевий зв'язок і може бути нерозгалуженою або розгалуженою і має 2-15 атомів вуглецю в ланцюгу. Переважні алкенільні групи мають 2-12 атомів вуглецю в ланцюгу і, більш переважно, приблизно 2-4 атоми вуглецю в ланцюгу. Приклади алкенільних груп включають етеніл, пропеніл, н-бутеніл, ізобутеніл, 3-метилбут-2-еніл, н-пентеніл, гептеніл, октеніл, ноненіл, деценіл.

"Алкін" означає аліфатичну вуглеводневу групу, яка містить потрійний вуглець-вуглецевий зв'язок і може бути нерозгалуженою або розгалуженою і має 2-15 атомів вуглецю в ланцюгу. Переважні алкінільні групи мають 2-12 атомів вуглецю в ланцюгу і більш переважно 2-4 атоми вуглецю в ланцюгу. Приклади алкінільних груп включають етиніл, пропініл, н-бутиніл, 2-бутиніл, 3-метилбутиніл, н-пентиніл, гептиніл, октиніл і дециніл.

"Атом галогену" належить до атомів фтору, хлору, броду або йоду; переважно атому фтору і хлору.

"Арил" означає ароматичну моноциклічну або поліциклічну вуглеводневу систему з 6-14 атомів вуглецю, переважно 6-10 атомів вуглецю. Приклади арильних груп включають феніл або нафтил.

"Het" означає гетероцикл або гетероарил.

Застосовувані в описі терміни "гетероцикл" або "гетероциклічний" належать до насичених, частково ненасичених або ненасичених, неароматичних стабільних 3-14-, переважно 5-10-членних моно-, бі- або поліциклічних кільцець, де щонайменше одним членом кільця є гетероатом. Звичайно гетероатоми включають, але не обмежуються перерахованим, атоми кисню, азоту, сірки, селену і фосфору. Переважними гетероатомами є атоми кисню, азоту або сірки.

Прийнятні гетероцикли описані також в The Handbook of Chemistry and Physics, 76th Edition, CRC Press, Inc., 1995-1996, pp.2-25 - 2-26, опис яких таким чином включений як посилання.

Переважні неароматичні гетероцикли включають, але не обмежуються перерахованим, піролідініл, піразолідініл, імідазолідініл, оксираніл, тетрагідрофураніл, діоксоланіл, тетрагідропіраніл, діоксаніл, діоксоланіл, піперидил, піперазиніл, морфолініл, піраніл, імідазолініл, піролініл, піразолініл, тіазолідініл, тетрагідротіопіраніл, дитіаніл, тіоморфолініл, дигідропіраніл, тетрагідропіраніл, дигідропіраніл, тетрагідропіридил, дигідропіридил, тетрагідропіридиніл, дигідротіопіраніл, азепааніл, а також конденсовані системи, що є результатом конденсації з фенільною групою.

Застосовуваний в описі термін «гетероарил» або ароматичні гетероцикли належить до 5-14-, переважно 5-10-членного ароматичного гетероциклічного моно-, бі- або поліциклічного кільця. Приклади його включають піроліл, піридил, піразоліл, тієніл, піримідиніл, піразиніл, тетразоліл, індоліл, хінолініл, пуриніл, імідазоліл, тієніл, тіазоліл, бензотіазоліл, фураніл, бензофураніл, 1,2,4-тіадіазоліл, ізотіазоліл, триазоліл, тетразоліл, ізохіноліл, бензотієніл, ізобензофурил, піразоліл, карбазоліл, бензімідазоліл, ізоксазоліл, піридил-N-оксид, а також конденсовані системи, що є результатом конденсації з фенільною групою.

Терміни «алкіл», «циклоалкіл», «алкеніл», «алкініл», «арил», «гетероарил», «гетероцикл» і тому подібне належать також до відповідного «алкілену», «циклоалкілену», «алкенілену», «алкінілену», «арилінену», «гетероарилінену», «гетероциклінену» і тому подібне, які утворюються видаленням двох атомів водню.

Застосовуваний вираз «зв'язуючий агент, який зв'язується з клітиною» належить до похідних томайміцину, що включають щонайменше одну зв'язувальну групу або її попередник, прийнятний для зв'язування вказаних похідних зі зв'язуючим клітину агентом; переважними зв'язувальними групами є тіольні, сульфідні або дисульфідні групи або їх попередники.

Застосовуваний в описі вираз «зв'язаний зі зв'язуючим клітини агентом» належить до молекули кон'югата, що включає щонайменше одне похідне томайміцину, зв'язане зі зв'язуючим клітини агентом через прийнятну зв'язувальну групу або її попередник; переважними зв'язувальними групами є тіольні або дисульфідні групи або їх попередники.

Застосовуваний в описі термін «попередник» даної групи належить до будь-якої групи, яку можна перетворити в таку групу будь-якою реакцією зняття захисту, хімічної модифікації або поєднання.

Застосовуваний в описі термін «пацієнт» належить до будь-якої тварини, такої як цінна тварина для цілей розведення, компанії або охорони або переважно людина або дитина, яка уражена або має потенціал бути ураженою одним або декількома описаними в описі захворюваннями або станами.

Застосовуваний в описі вираз «терапевтично ефективна кількість» належить до кількості сполуки даного винаходу, яка є ефективною при профілактиці, ослабленні, усуненні, лікуванні або регуляції симптомів описаних в описі захворювань або станів. Передбачається, що термін «регулювання» належить до всіх способів, при яких може бути сповільнення, переривання, затримка, зупинка прогресу описаних в описі захворювань і станів, але не обов'язково означає загальне усунення всіх симптомів захворювання і стану і передбачається, що він включає профілактичне лікування.

Застосовуваний в описі термін «фармацевтично прийнятний» належить до тих сполук, речовин, ексципієнтів, композицій лікарських форм, які в межах ретельної медичної оцінки є прийнятними для контактування з тканинами людей або тварин без надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції або інших проблемних ускладнень, пропорційних з прийнятим відношенням користь/ризик.

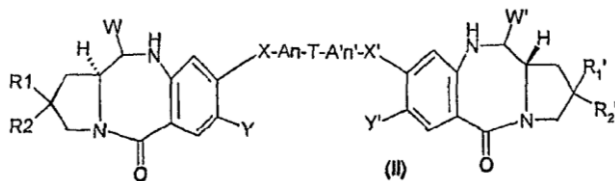
Застосовуваний в описі вираз «фармацевтично прийнятні солі» належить до похідних описаних сполук, де «батьківську» сполуку модифікують утворенням солей кислоти або основи. Фармацевтично прийнятні солі включають загальноприйняті нетоксичні солі або четвертинні амонієві солі «батьківської» сполуки, утворені, наприклад, з нетоксичних неорганічних або органічних кислот. Такі загальноприйняті нетоксичні солі включають, наприклад, солі, отримані з неорганічних кислот, таких як хлористоводнева, бромистоводнева, сірчана, сульфамінова, фосфорна, азотна і подібні кислоти; і солі, отримані з органічних кислот, таких як оцтова, пропіонова, янтарна, винна, лимонна, метансульфонова, бензолсульфонова, глюкуронова, глутамінова, бензойна, саліцилова, толуолсульфонова, щавлева, фумарова, малеїнова, молочна і подібні кислоти. Додаткові адитивні солі включають амонієві солі, такі як солі трометаміну, меглуміну, еполаміну і т. д., солі металів, такі як солі натрію, калію, кальцію, цинку або магнію.

Фармацевтично прийнятні солі даного винаходу можна синтезувати з вихідної сполуки, яка містить основну або кислотну частину, загальноприйнятими хімічними методами. Звичайно такі солі можна отримати реакцією вільних кислотних або основних форм цих сполук зі стехіометричною кількістю прийнятої основи або кислоти у воді або в органічному розчиннику або в суміші двох з них. Звичайно переважними є неводні середовища, подібні до простого ефіру, етилацетату, етанолу, ізопропанолу або ацетонітрилу. Перелік прийнятних солей можна знайти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, р.1418, опис якої таким чином включений як посилання.

Сполуки загальної формули (I), які мають геометричні ізомери і стереоізомери, також є частиною винаходу.

Відомо, що похідні томайміцину формули (I) з N-10, C-11-подвійним зв'язком є легко перетворюваними оборотним чином у відповідні імінові аддукти в присутності води, спирту, тіолу, первинного або вторинного аміну, сечовини і інших нуклеофілів. Цей процес є оборотним і відповідні похідні томайміцину можна легко отримати в присутності дегідратуючого агента в непротонному органічному розчиннику, у вакуумі або при високій температурі (Z. Tozuka, 36, J. Antibiotics, 276(1983).

Таким чином, даний винахід пропонує також оборотні похідні похідних томайміцину загальної формули (II):



де A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' мають такі ж значення, як в формулі (I), і W, W' є однаковими або різними і вибрані з групи, яка складається з OH, простого ефіру, такого як -OR, складного ефіру (наприклад, ацетату), такого як -OCOR, -COOR, карбонату, такого як -OCOOR,

карбамату, такого як -OCONRR', циклічного карбамату, так що N10 і C11 є частиною циклу, сечовини, такої як -NRCONRR', тіокарбамату, такого як -OCSNHR, циклічного тіокарбамату, так що N10 і C11 є частиною циклу, -SH, сульфиду, такого як -SR, сульфоксиду, такого як -SOR, сульфону, такого як -SOOR, сульфонату, такого як -SO₃⁻, сульфонаміду, такого як -NRSOOR, аміну, такого як -NRR', необов'язково циклічного аміну, так що N10 і C11 є частиною циклу, похідного гідроксиламіну, такого як -NROR', аміду, такого як -NRCOR, -NRCONRR', азидо, такого як -N₃, ціано, галогену, триалкіл- або триарилфосфонію, групи, утвореної з амінокислоти. Переважно, W і W' є однаковими або різними і являють собою OH, OMe, OEt, NHCONH₂, SMe.

Сполуки формули (II) можна таким чином розглядати як сольвати, включаючи сольвати, коли розчинником є вода; ці сольвати можуть бути особливо корисними.

Згідно з ще однією наступною задачею, даний винахід належить також до способу отримання сполук формули (I).

Сполуки і способи даного винаходу можна отримати великим числом шляхів, добре відомих фахівцям в даній галузі. Сполуки можна синтезувати, наприклад, застосуванням або адаптацією способів, описаних нижче, або їх варіантів, відомих фахівцям в даній галузі. Прийнятні модифікації і заміни повинні бути легко очевидні і добре відомі фахівцям в даній галузі або легко можуть бути отримані ним з наукової літератури.

Зокрема, такі способи можна знайти в R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Повинно бути зрозумілим, що сполуки даного винаходу можуть містити один або декілька асиметрично заміщених атомів вуглецю і можуть бути виділені в оптично активних або рацемічних формах. Таким чином, передбачаються всі хіральні, діастереомерні, рацемічні форми і всі геометричні ізомерні форми структури, якщо не вказана конкретна стереохімія або ізомерна форма. У даній галузі техніки добре відомо, як отримати і виділити такі оптично активні форми. Наприклад, суміші стереоізомерів можна розділити стандартними методиками, які включають, але не обмежуються перерахуванням, розділення рацемічних форм, хроматографію з нормальною, оберненою і хіральною фазою, утворення переважної солі, перекристалізацію і тому подібне або хіральний синтез або з хіральних вихідних речовин або навмисним синтезом цільових хіральних центрів.

Сполуки даного винаходу можна отримати різними синтетичними шляхами. Реагенти і вихідні речовини є комерційно доступними або їх легко синтезують методиками, добре відомими фахівцям в даній галузі. Всі заміни, якщо не обумовлено особливо, визначені попередньо.

У реакціях, описаних нижче, може бути необхідно захистити реакційноздатні функціональні групи, наприклад, гідрокси-, аміно-, іміно-, тіо-або карбоксигрупи, які є бажаними в кінцевому продукті, щоб уникнути їх небажаної участі в реакціях. Загальноприйняті захисні групи можна застосовувати згідно зі стандартною практикою, див., наприклад, T.W. Greene and P.G.M. Wuts in *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3rd ed., John Wiley and Sons, 1999; J.F.W. McOmie in *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, 1973.

Деякі реакції можна провести в присутності основи. Немає конкретного обмеження за природою основи, яку застосовують в даній реакції, і будь-яку основу, що звичайно застосовується в реакціях цього типу, можна в рівній мірі застосовувати тут, за умови, що не існує негативного впливу на інші частини молекули. Приклади прийнятних основ включають гідроксид натрію, карбонат калію, триетиламін, гідриди лужних металів, такі як гідрид натрію і гідрид калію; алкіллітієві сполуки, такі як метиллітій і бутиллітій, і алкоксиди лужних металів, такі як метоксид натрію і етоксид натрію.

Реакції звичайно проводять у прийнятному розчиннику. Можна застосовувати різні розчинники, за умови, що він не впливає негативним чином на реакцію або реагенти, що беруть участь в реакції. Приклади прийнятних розчинників включають вуглеводні, які можуть бути ароматичними, аліфатичними або циклоаліфатичними вуглеводнями, такими як гексан, циклогексан, бензол, толуол і ксилол; аміді, такі як диметилформамід; спирти, такі як етанол і метанол, і прості ефіри, такі як діетиловий простий ефір і тетрагідрофуран.

Реакції можуть протікати протягом широкого діапазону температур. Загалом, авторами винаходу виявлено, що реакцію зручно проводити при температурі від -20°C до 150°C (більш переважно, від приблизно кімнатної температури до 100°C). Час, необхідний для реакції, може також широко варіювати в залежності від багатьох чинників, особливо температури реакції і природи реагентів. Однак, за умови, що реакцію проводять в переважних умовах, описаних вище, період від 3 годин до 20 годин звичайно буває достатнім.

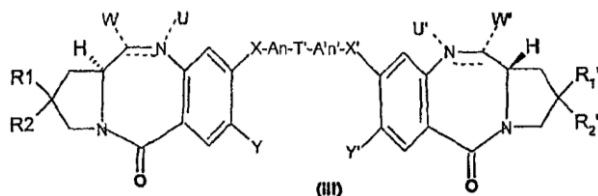
Сполуку, отриману таким чином, можна виділити з реакційної суміші загальноприйнятими методами. Наприклад, сполуку можна виділити відгонкою розчинника з реакційної суміші або,

якщо необхідно, після відгонки розчинника з реакційної суміші виливанням залишку у воду з подальшою екстракцією органічним розчинником, що не змішується з водою, і відгонкою розчинника з екстракту. Крім того, продукт можна, якщо необхідно, додатково очищати різними відомими методиками, такими як перекристалізація, переосадження або різні хроматографічні

методики, особливо колонкова хроматографія або препаративна тонкошарова хроматографія.

Спосіб отримання сполуки формули (I) винаходу є наступною задачею даного винаходу.

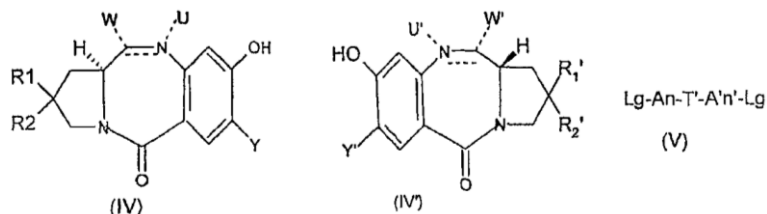
Згідно з першим аспектом, спосіб отримання сполук формули (I) включає стадію зняття захисту у відповідних сполук формули (III)



де Y, Y', X, A, A', X', n, n', W, W', U, U', ----, R1, R2, R1', R2', ---- мають такі ж значення, як в формулі (I), і T' відповідає T, де функціональна група(и) була захищена.

Функціональну групу SH переважно захищають і захисною групою переважно є ацетил, бензоїл, метансульфоніл, метилтіо, піридилтіо, нітропіридилтіо, триізопропілсиліл (TIPS). Стадію видалення захисної групи звичайно проводять із застосуванням класичних умов, таких як застосування основи для видалення ацетильної, бензоїльної і метансульфонільної захисних груп, відновлювального агента, такого як дитіотреїт або трис-(2-карбоксіетил)фосфін (TCEP) для відщеплення метилтіозахисної групи, або, як відомо, реакцією сполук з фторидом амонію для видалення TIPS.

Сполуки формули (II) можна отримати сполученням відповідних сполук формул (IV), (IV') і (V)



де Y, Y', A, A', n, n', T', W, W', U, U', ----, ----, R1, R2, R1', R2' мають значення, вказані для формули (III), і Lg являє собою відхідну групу, таку як галоген, OMs, OTs або $OPPh_3^+$ (проміжна сполука, утворена в реакції Міцунобу).

Сполуки формул (IV) і (IV') є звичайно відомими, як описано, наприклад, в заявках на патенти WO 00/12508, WO 00/12507, WO 2005/040170, WO 2005/085260 або є комерційно доступними, і/або є доступними загальним синтезом (M. Mori et al., 42 Tetrahedron, 3793-3806, 1986), або отримують із застосуванням Streptomyces species, зокрема, по методиці патенту Франції Fr. 1516743, або їх можна отримати застосуванням або адаптацією ілюстративних методик, вказаних в прикладах.

Сполуки формули (V) можна отримати з відповідних сполук формули (VI)



де A, A', n, n', T' мають значення, вказані для формули (III).

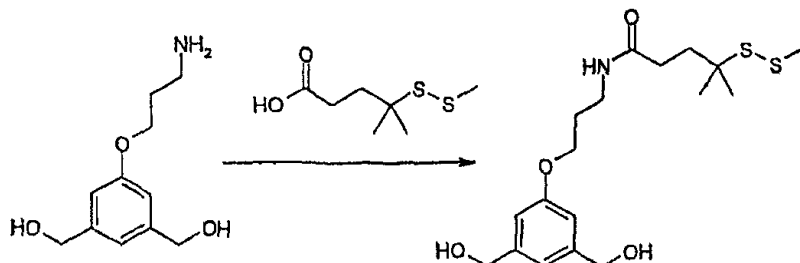
Дану реакцію звичайно проводять в присутності PPh_3 і $CNaH_4$ або реакцією з хлорсульфонатом в присутності основи, такої як триетиламін або гідроксид калію, переважно триетиламін.

Сполуки формули (VI) можна отримати з відповідних сполук формули (VII):



де A, A', n, n' мають значення, як в формулі (III), і T'' являє собою група-попередник для T. Група-попередник для T належить до будь-якої групи, яку можна перетворити в T будь-яким

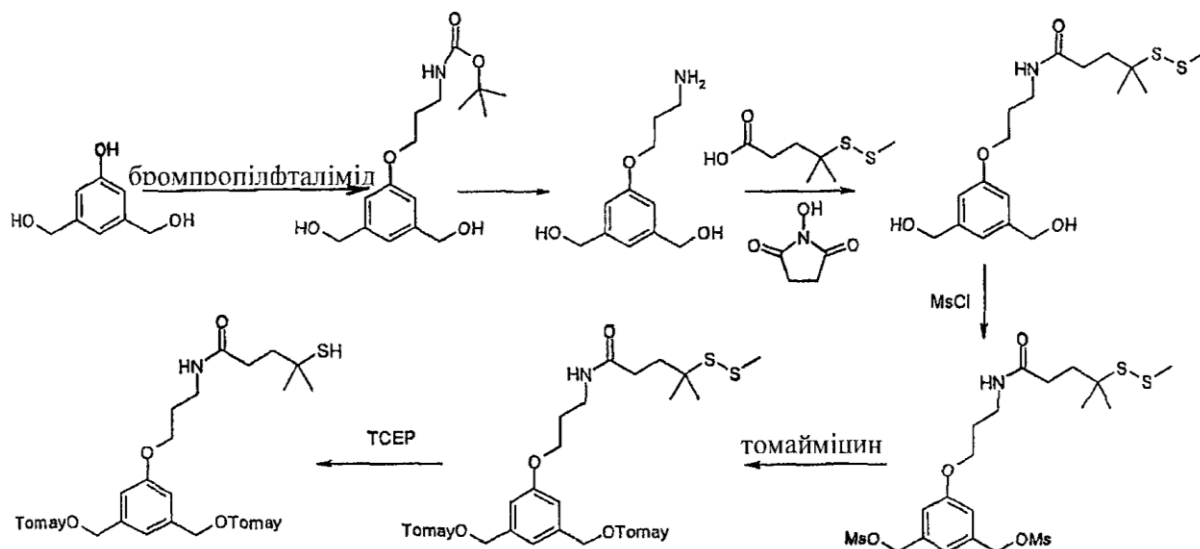
видаленням захисної групи, хімічною модифікацією або сполученням. Т переважно отримують сполученням Т' з додатковою частиною, де Т' і додаткова частина включають функціональні групи, які реагують одна з одною, наприклад, Т' включає амінну функціональну групу і додаткова частина включає кислотну функціональну групу. Репрезентативним прикладом даної реакції є



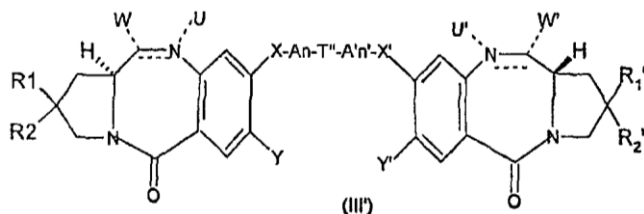
Дану реакцію звичайно проводять в присутності N-гідроксисукциніміду і НОВТ.

Сполуки формули (VII) можуть бути комерційно доступними або їх можна отримати адаптацією або застосуванням відомих методів або згідно з прикладами.

Зразкова необмежувальна схема для даного варіанту здійснення способу винаходу приводиться нижче



Згідно з другим аспектом, сполуку формули (I) можна отримати з відповідної сполуки формули (III')

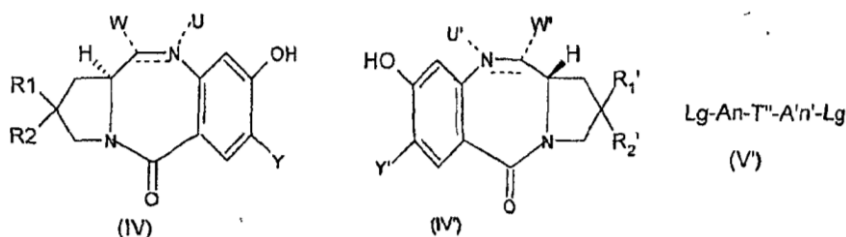


де Y, Y', X, A, A', X', n, n1, W, W', U, U', ----, -----, R1, R2, R1', R2' мають значення, вказані для формули (I), і Т'' являє собою необов'язково захищену групу-попередник для Т.

Група-попередник для Т належить до будь-якої групи, яку можна перетворити в Т хімічною модифікацією або сполученням. Т переважно отримують сполученням Т' з відповідною додатковою частиною, де Т' і додаткова частина включають функціональні групи, які реагують одна з одною, наприклад, Т' включає амінну функціональну групу і додаткова частина включає кислотну функціональну групу.

Реакцію звичайно проводять в присутності N-гідроксисукциніміду і Новт.

Сполуки формули (III') можна отримати сполученням відповідних сполук формул (IV), (IV') і (V')



5

де Y, Y', A, A', n, n', W, W', U, U', ----, -----, R1, R2, R1', R2' мають значення, вказані для формули (III'), T'' являє собою необов'язково захищену групу-попередник для T і Lg являє собою відхідну групу, таку як галоген або OMs, OTs або PPh_3^+ (проміжну сполуку, отриману реакцією Міцунобу).

10 Сполуки формул (IV) і (IV') є звичайно відомими і доступними загальним синтезом (M. Mori et al., 42 Tetrahedron, 3793-3806, 1986) або їх отримують із застосуванням *Streptomyces species*, зокрема, по методиці патенту Франції Fr. 1516743.

Сполуки формули (V) можна отримати з відповідних сполук формули (VII)



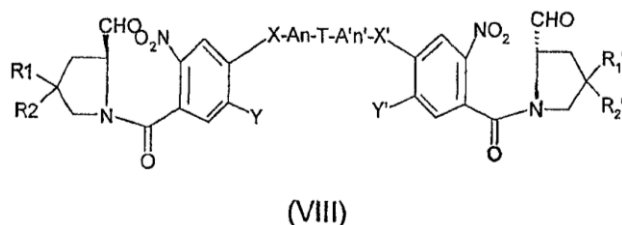
15

де A, A', n, n' мають такі ж значення, як в формулі (I), T'' являє собою необов'язково захищену групу-попередник для T'.

Дану реакцію звичайно проводять в присутності PPh_3 і $CHAl_4$.

20 Сполуки формули (VII) можуть бути комерційно доступними або можуть бути отримані адаптацією або застосуванням відомих методів або згідно з прикладами.

Згідно з третім аспектом, спосіб отримання сполуки формули (I) включає стадію циклізації відповідної сполуки формули (VIII)

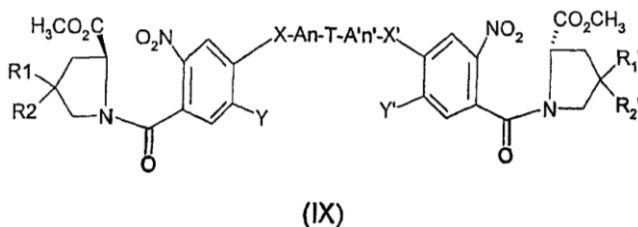


25

де Y, Y', X, A, A', X', n, n', R1, R2, R1', R2', T мають значення, вказані для формули (I). Дану реакцію звичайно проводять в присутності реагенту, такого як гідросульфід натрію ($Na_2S_2O_4$), у прийнятному розчиннику, такому як суміш ТГФ і води, з подальшим доданням метанолу і $AcCl$.

Сполуку формули (VIII) можна отримати з відповідної сполуки формули (IX)

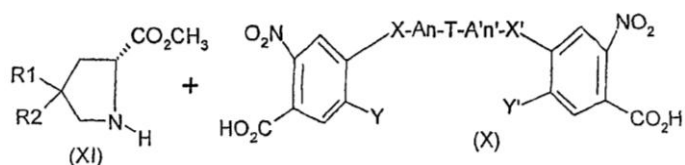
30



де Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T мають такі ж значення, як в формулі (I). Дану реакцію звичайно проводять в присутності такого реагенту, як DIBAL-H, у прийнятному розчиннику, такому як толуол.

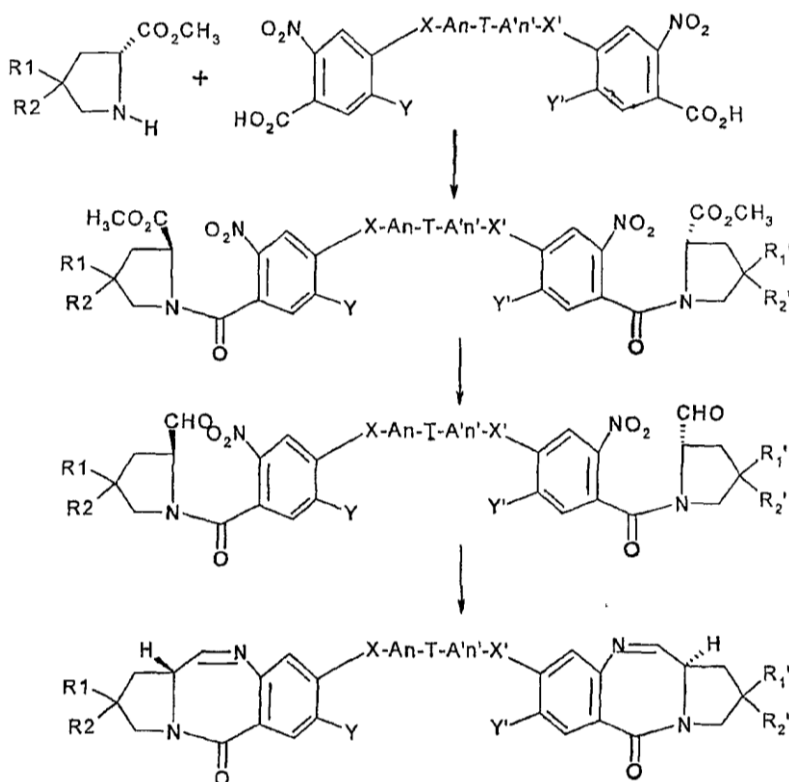
35

Сполуку формули (IX) можна отримати сполученням відповідних сполук формул (X) і (XI)



де Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', T мають такі ж значення, як в формулі (I).

- 5 Реакцію звичайно проводять доданням до (X) такого реагенту, як оксалілхлорид, у прийнятному розчиннику, такому як ДМФА з подальшим доданням (XI) у прийнятному розчиннику, такому як ТГФ. Репрезентативна схема представлена нижче:



- 10 Вказані вище реакції можуть бути проведені фахівцем в даній галузі застосуванням або адаптацією методів, ілюстрованих у вказаних нижче прикладах.

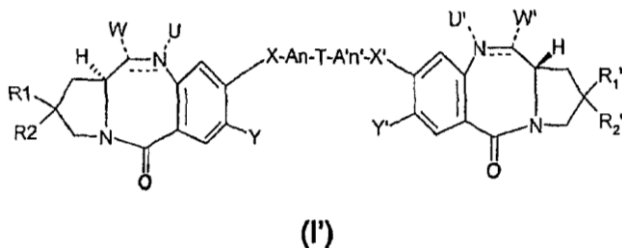
Крім того, спосіб винаходу може також включати додаткову стадію виділення сполук формул (I) і (II). Це може здійснити фахівець в даній галузі будь-якими відомими загальноприйнятими методами, такими як методи виділення, описані вище.

- 15 Вихідні продукти є комерційно доступними або їх можна отримати застосуванням або адаптацією будь-яких відомих методів або методами, описаним в прикладах.

Синтез можна також провести в одному реакторі як багатокомпонентну реакцію.

- 20 Згідно з іншою задачею, даний винахід належить до молекули кон'югата, що включає щонайменше одне похідне томайміцину, ковалентно зв'язане зі зв'язуючим клітини агентом за допомогою зв'язувальної групи. Вказаний кон'югат включає одне або декілька похідних томайміцину згідно з винаходом, що мають лінкер, що включає зв'язувальну групу, таку як -S- або S-S-. Вказана зв'язувальна група ковалентно зв'язує агент, який зв'язує клітини, з лінкером похідного томайміцину. Згідно з переважним аспектом, вказане похідне томайміцину є сполукою формули (I')

25



де

---- являє собою необов'язковий одинарний зв'язок;

5 ----- являє собою або одинарний зв'язок, або подвійний зв'язок;

за умови, що коли ----- являє собою одинарний зв'язок, то U і U', однакові або різні, незалежно являють собою H і W і W', однакові або різні, незалежно вибрані з групи, яка складається з OH, простого ефіру, такого як -OR, складного ефіру (наприклад, ацетату), такого як -OCOR, карбонату, такого як -OCOOR, карбамату, такого як OCONRR', циклічного карбамату, так що N10 і C11 є частиною циклу, сечовини, такої як -NRCONRR', тіокарбамату, такого як -OCSNHR, циклічного тіокарбамату, що N10 і C11 є частиною циклу, -SH, сульфідну, такого як -SR, сульфоксиду, такого як -SOR, сульфону, такого як -SOOR, сульфонату, такого як -SO₃⁻, сульфонамідну, такого як -NRSOOR, аміну, такого як -NRR', необов'язково циклічного аміну, так що N10 і C11 є частиною циклу, похідного гідроксиламіну, такого як -NROR', амідну, такого як -NRCOR, азидну, такого як -N₃, ціано, галогену, триалкіл- або триарилфосфонію, групи, утвореної з амінокислоти; переважно W і W' є однаковими або різними і являють собою OH, OMe, OEt, NHCONH₂, SMe;

і коли ----- являє собою подвійний зв'язок, то U і U' відсутні і W і W' являють собою H;

20 - R1, R2, R1', R2' є однаковими або різними і незалежно вибрані з галогеніду або алкілу, необов'язково заміщеного одним або декількома замісниками з атома галогену, CN, NRR', CF₃, OR, арилу, Het, S(O)_qR, або R1 і R2 і R1' і R2' утворюють разом групу, яка містить подвійний зв'язок =B і =B', відповідно.

Переважно, R1 і R2 і R1' і R2' утворюють разом групу, яка містить подвійний зв'язок =B і =B', відповідно.

25 - B і B' є однаковими або різними і незалежно вибрані з алкенілу, необов'язково заміщеного одним або декількома замісниками з атома галогену, CN, NRR', CF₃, OR, арилу, Het, S(O)_qR, або B і B1 являє собою атом кисню.

Переважно, B=B'.

Більш переважно, B=B=CH₂ або =CH-CH₃.

30 - X, X' є однаковими або різними і незалежно вибрані з однієї або декількох груп -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q-.

Переважно, X=X'.

Більш переважно, X=X'=O.

35 - A, A' є однаковими або різними і незалежно вибрані з алкілу або алкенілу, причому кожний необов'язково містить атом кисню, азоту або сірки і необов'язково заміщений одним або декількома замісниками з атома галогену, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, арилу, Het, алкілу, алкенілу.

Переважно, A=A'.

Більш переважно, A=A-нерозгалужений, незаміщений алкіл.

40 - Y, Y' є однаковими або різними і незалежно вибрані з H, OR.

Переважно, Y=Y'.

Більш переважно, Y=Y'=Оалкіл, більш переважно Ометил.

45 - T являє собою алкіл-, -NR-, -O-, -S(O)_q- або 4-10-членний арил, циклоалкіл, гетероцикліл або гетероарил, причому кожний необов'язково заміщений одним або декількома замісниками з атома галогену, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR і заміщений одним або декількома лінкерами.

Переважно, T являє собою 4-10-членний арил або гетероарил, більш переважно феніл або піридил, заміщений одним або декількома лінкерами.

50 Вказаний лінкер є зв'язувальною групою. Прийнятні зв'язувальні групи добре відомі в даній галузі і включають тіольну, сульфідну, дисульфідну групи, прості тіоефірні групи, лабільні під дією кислот групи, фотолабільні групи, лабільні під дією пептидаз групи і лабільні під дією естераз групи. Переважними є дисульфідні групи або прості тіоефірні групи.

Коли зв'язувальною групою є група, що містить тіол, сульфід або дисульфід, бічний ланцюг, що містить тіольну або дисульфідну групу, може бути нерозгалуженим або розгалуженим,

ароматичним або гетероциклічним. Середній фахівець в даній галузі може легко ідентифікувати прийнятні бічні ланцюги. Переважно, вказана зв'язувальна група має формулу:

-G-D-(Z)p-S-Z',

5

де G являє собою одинарний або подвійний зв'язок, -O-, -S- або -NR-;

D являє собою одинарний зв'язок або -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

де E і F є однаковими або різними і незалежно вибрані з нерозгалужених або розгалужених -
 10 (OCH₂CH₂)_iалкіл(OCH₂CH₂)_j-, -алкіл(OCH₂CH₂)_iалкіл-, -(OCH₂CH₂)_i-,
 (OCH₂CH₂)_iциклоаліл(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iгетероцикліл(OCH₂CH₂)_j-,
 (OCH₂CH₂)_iарил(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iгетероарил(OCH₂CH₂)_j-, -алкіл-
 (OCH₂CH₂)_iалкіл(OCH₂CH₂)_j-, -алкіл-(OCH₂CH₂)_i-, -алкіл-(OCH₂CH₂)_iциклоалкіл(OCH₂CH₂)_j-,
 алкіл(OCH₂CH₂)_iгетероцикліл(OCH₂CH₂)_j-, -алкіл-(OCH₂CH₂)_iарил(OCH₂CH₂)_j-,
 15 алкіл(OCH₂CH₂)_iгетероарил(OCH₂CH₂)_j-, -циклоалкілалкіл-, -алкілциклоалкіл-,
 гетероциклілалкіл-, -алкілгетероцикліл-, -алкіларил-, -арилалкіл-, -алкілгетероарил-,
 гетероарилалкіл-;

де i і j, однакові або різні, є цілими числами і незалежно вибрані з 0, 1-2000;

Z являє собою нерозгалужений або розгалужений -алкіл-;

20 р дорівнює 0 або 1;

Z' являє собою H, тіолзахисну групу, таку як COR, R₂₀ або SR₂₀, де R₂₀ являє собою H, метил, алкіл, необов'язково заміщений циклоалкіл, арил, гетероарил або гетероцикліл, за умови, що коли Z' являє собою H, вказана сполука знаходиться в рівновазі з відповідною сполукою, утвореною внутрішньомолекулярною циклізацією, що є результатом приєднання

25 тіольної групи -SH до імінного зв'язку -NH= одного із залишків PBD.

- n, n', однакові або різні, які дорівнюють 0 або 1 з m=m' і n=n'.

- q дорівнює 0, 1 або 2.

- R, R' є однаковими або різними і незалежно вибрані з H, алкілу, арилу, причому кожний необов'язково заміщений атомом галогену, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, арилом, Het;

30 або її фармацевтично прийнятними солями, гідратами або гідратованими солями або поліморфними кристалічними структурами цих сполук або їх оптичними ізомерами, рацематами, діастереомерами або енантіомерами,

причому вказане похідне ковалентно зв'язане зі зв'язуючим клітини агентом за допомогою вказаного лінкера.

35 Лінкер переважно зв'язаний зі зв'язуючим клітини агентом за допомогою функціональної групи, реакційноздатної відносно тіольного, сульфідного або дисульфідного зв'язку.

Даний винахід належить до наступних переважних варіантів здійснення або будь-якої комбінації будь-якого з них:

40 - G являє собою одинарний зв'язок або -O- або -NR-;

- G являє собою -O-;

- D являє собою одинарний зв'язок або -E-, -E-NR-, -E-NR-CO-, -E-CO-, -CO-E-;

- D являє собою -E-, -E-NR-CO-, -CO-E-, -E-CO-;

- D являє собою -E-NR-CO-;

45 - E являє собою нерозгалужений або розгалужений -алкіл-, -(OCH₂CH₂)_i- або -алкілгетероцикліл-;

- E являє собою нерозгалужений або розгалужений -алкіл-;

- Z являє собою -(CH₂)₂-C(CH₃)₂-;

- р дорівнює 0 або 1;

- Z' являє собою H або SR₂₀, де R₂₀ являє собою алкіл, арил, гетероцикліл або гетероарил;

50 - Z' являє собою H або SR₂₀, де R₂₀ являє собою алкіл.

Конкретні приклади тіол-, сульфід- або дисульфідвмісних лінкерів включають:

-(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',

-(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈CR₁₅R₁₆)_y(OCH₂CH₂)_ySZ',

-(CR₁₃R₁₄)_t(NR₁₉COCR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',

55 -(CR₁₃R₁₄)_t(OCOR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',

-(CR₁₃R₁₄)_t(COCR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',

-(CR₁₃R₁₄)_t(CONR₁₉CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',

-(CR₁₃R₁₄)_t-феніл-(COCR₁₅R₁₆)_uSZ',

-(CR₁₃R₁₄)_t-фурил-(COCR₁₅R₁₆)_uSZ',

$-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-оксазоліл-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-тіазоліл-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-тієніл-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-імідазоліл-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-морфоліно-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
 $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-піперазино-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-N-метилпіперазино-CO}(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u\text{SZ}'$,
 $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-феніл-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-фурил-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-оксазоліл-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-тіазоліл-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-тієніл-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-імідазоліл-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-морфоліно-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-піперазино-QSZ}'$, $-(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t\text{-N-метилпіперазино-QSZ}'$ або

$-\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{SZ}'$,
 $-\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{NR}_{19}\text{COCR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{O}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18}\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_t(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{SZ}'$,
 $-\text{O-феніл-QSZ}'$, $-\text{O-фурил-QSZ}'$, $-\text{O-оксазоліл-QSZ}'$, $-\text{O-тіазоліл-QSZ}'$, $-\text{O-тієніл-QSZ}'$, $-\text{O-імідазоліл-QSZ}'$, $-\text{O-морфоліно-QSZ}'$, $-\text{O-піперазино-QSZ}'$,
 $-\text{O-N-метилпіперазино-QSZ}'$,

$-\text{OCO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{NR}_{19}\text{CO})_y(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{OCO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18}\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_t(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{OCONR}_{12}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{OCO-феніл-QSZ}'$, $-\text{OCO-фурил-QSZ}'$, $-\text{OCO-оксазоліл-QSZ}'$, $-\text{OCO-тіазоліл-QSZ}'$, $-\text{OCO-тієніл-QSZ}'$, $-\text{OCO-імідазоліл-QSZ}'$, $-\text{OCO-морфоліно-QSZ}'$, $-\text{OCO-піперазино-QSZ}'$, $-\text{OCO-N-метилпіперазино-QSZ}'$ або

$-\text{CO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{CO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18}\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_t(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{CONR}_{12}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{CO-феніл-QSZ}'$, $-\text{CO-фурил-QSZ}'$, $-\text{CO-оксазоліл-QSZ}'$, $-\text{CO-тіазоліл-QSZ}'$, $-\text{CO-тієніл-QSZ}'$, $-\text{CO-імідазоліл-QSZ}'$, $-\text{CO-морфоліно-QSZ}'$, $-\text{CO-піперазино-QSZ}'$, $-\text{CO-піперидино-QSZ}'$, $-\text{CO-N-метилпіперазино-QSZ}'$,

$-\text{NR}_{19}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{NR}_{19}\text{CO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{NR}_{19}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18}\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_t(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{NR}_{19}\text{CO}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18}\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_t(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{NR}_{19}\text{CONR}_{12}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,

$-\text{NR}_{19}\text{CONR}_{12}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18}\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_t(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{NR}_{19}\text{CO-феніл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-фурил-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-оксазоліл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-тіазоліл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-тієніл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-імідазоліл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-морфоліно-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-піперазино-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-піперидино-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-N-метилпіперазино-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{-феніл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{-фурил-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{-оксазоліл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{-тіазоліл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{-тієніл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{-імідазоліл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{-морфоліно-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{-піперазино-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{-піперидино-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{-N-метилпіперазино-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-NR}_{12}\text{-феніл-QSZ}'$, $\text{NR}_{19}\text{CO-NR}_{12}\text{-оксазоліл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-NR}_{12}\text{-тіазоліл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-NR}_{12}\text{-тієніл-QSZ}'$, $-\text{NR}_{19}\text{CO-NR}_{12}\text{-піперидино-QSZ}'$,

$-\text{S}(\text{O})_q(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{S}(\text{O})_q(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{17}=\text{CR}_{18}\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_t(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{SCONR}_{12}(\text{CR}_{13}\text{R}_{14})_t(\text{CR}_{15}\text{R}_{16})_u(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{SZ}'$,
 $-\text{SCO-морфоліно-QSZ}'$, $-\text{SCO-піперазино-QSZ}'$, $-\text{SCO-піперидино-QSZ}'$ і $-\text{SCO-N-метилпіперазино-QSZ}'$, де

Z' являє собою Н, тіолзахисну групу, таку як COR, R_{20}' або SR_{20}' , де R_{20}' являє собою алкіл, арил, гетероцикліл або гетероарил;

де Q являє собою прямий зв'язок або нерозгалужений алкіл або розгалужений алкіл, що має 1-10 атомів вуглецю, або поліетиленгліколева зв'язувальна група з 2-20 повторюваними етиленоксидними ланками;

R_{19} і R_{12} є однаковими або різними і являють собою нерозгалужений алкіл, розгалужений алкіл або циклічний алкіл, що має від 1 до 10 атомів вуглецю, або незаміщений або заміщений арил або гетероцикліл, і R_{12} крім цього може бути Н,

R_{13} , R_{14} , R_{15} і R_{16} є однаковими або різними і являють собою Н або нерозгалужений або розгалужений алкіл, що має від 1 до 4 атомів вуглецю,

R_{17} і R_{18} являють собою Н або алкіл,
 u дорівнює цілому числу від 1 до 10 і може бути також рівним 0,
 t дорівнює цілому числу від 1 до 10 і може бути також рівним 0,
 y дорівнює цілому числу від 1 до 20 і також може бути рівним 0.

Згідно з даною задачею, репрезентативними сполуками формули (I') є:

8,8'-[5-[3-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)пропілокси]-1,3-бензолдіїлбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

8,8'-[5-ацетилтіометил-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

8,8'-[3-(2-ацетилтіоетил)-1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

5 8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]біс-[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

8,8'-[4-(N-4-метилдитіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]біс-[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

10 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-меркапто-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

8,8'-[5-(N-метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

8,8'-[(4-(2-(4-меркапто-4-метил)пентанамідоетокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

15 8,8'-[(1-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

20 8,8'-[(4-(4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідобутоксипіридин-2,6-диметил)діокси)-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїл]піперазин-1-іл)пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

25 8,8'-[(1-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїл]піперазин-1-іл)пропіл)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїламіно]етокси}етокси)етокси)етокси)етокси)етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

30 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїламіно]етокси}етокси)етокси)етокси)етокси)етокси)етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

35 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїламіно]етокси}етокси)етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

40 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїламіно]етокси}етокси)етокси)етокси)етокси)етокси)етокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

8,8'-[(1-(2-[метил-(2-метил-2-метилдисульфаніл)пропіл]аміно)етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

45 8,8'-[(4-(3-[метил-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентаноїл]аміно)пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

8,8'-[(4-(3-[метил-(2-метил-2-метилдисульфаніл)пропіл]аміно)пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

50 8,8'-[(1-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідо)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он],

а також їх відповідні меркаптопохідні,

55 або їх фармацевтично прийнятні солі, гідрати або гідратовані солі, або поліморфні кристалічні структури цих сполук або їх оптичні ізомери, рацемати, діастереомери або енантіомери.

Зв'язуючі клітини агенти можуть бути будь-якого типу і включають пептиди і не пептиди. Звичайно вони бувають антитілами (особливо, моноклональними антитілами) або фрагментом антитіла, який містить щонайменше один сайт зв'язування, лімфокінами, гормонами, факторами росту, молекулами перенесення поживних речовин (такими як трансферин) або будь-якою 60 іншою зв'язуючою клітини молекулою або речовиною. Більш конкретні приклади зв'язуючих

клітини агентів, які можна застосовувати, включають моноклональні антитіла, химерні антитіла; гуманізовані антитіла; повністю людські антитіла; одноланцюжкові антитіла; фрагменти антитіл, такі як Fab, Fab', F(ab')₂ і Fv {Parham, 131 J. Immunol. 2895-2902 (1983); Spring et al., 113 J. Immunol. 470-478 (1974); Nisonoff et al., 89 Arch. Biochem. Biophys. 230-244 (1960)}; інтерферони; пептиди; лімфокіни, такі як IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; гормони, такі як інсулін, TRH (тиротропінвільняючі гормони), MSH (метаноцит-стимулюючий гормон), стероїдні гормони, такі як андрогени і естрогени; фактори росту і колонієстимулюючі фактори, такі як EGF, TGF α , подібний до інсуліну фактор росту (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF і GM-CSF {Burgess, 5 Immunology Today 155-158 (1984)}; вітаміни, такі як фолат і трансферин {O'Keefe et al., 260 J. Biol. Chem. 932-937(1985)}.

Вираз «зв'язуючий клітини агент», включений в описі, включає також модифіковані, зв'язуючі клітини агенти, де зв'язуючий клітини агент модифікований модифікуючим агентом для посилення реакційної здатності вказаного зв'язуючого клітини агента відносно зв'язувальної групи лінкера похідного томайміцину. Вказані модифікуючі агенти включають N-сульфосукцинімідил-4-(5-нітро-2-піридилдитіо)бутаноат (SSNPB), сукцинімідил-4-[N-малеїмідометил]циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), N-гідроксисукцинімідилловий ефір 4-(2-піридилдитіо)бутанової кислоти (SPDB) і т. д., як описано нижче.

Технологія отримання моноклонального антитіла дозволяє отримувати дуже селективні зв'язуючі клітини агенти в формі специфічних моноклональних антитіл. Особливо добре відомими в даній галузі є методики отримання моноклональних антитіл, продукованих шляхом імунізації мишей, щурів, хом'ячків або будь-яких інших ссавців антигеном, що представляє інтерес, таким як інтактна клітина-мішень, антигени, виділені з клітини-мішені, цілий вірус, ослаблений цілий вірус і вірусні білки, такі як білки вірусної оболонки.

Вибір прийнятного зв'язуючого клітини агента залежить від конкретної клітинної популяції, яка повинна бути мішенню, але звичайно переважними є моноклональні антитіла, якщо прийнятне моноклональне антитіло є доступним.

Наприклад, моноклональним антитілом MY9 є мишаче антитіло IgG₁, яке специфічно зв'язується з антигеном CD₃₃ {J.D. Griffin et al. 8 Leukemia Res., 521 (1984)} і його можна застосовувати, якщо клітини-мішені експресують CD₃₃, як при захворюванні гострим мієлобластним лейкозом (AML). Аналогічно цьому моноклональне антитіло анти-B4 є мишачим IgG₁, який зв'язується з антигеном CD19 на В-клітинах {Nadler et al., 131 J. Immunol. 244-250 (1983)}, і його можна застосовувати, якщо клітинами-мішенями є В-клітини або патологічні клітини, які експресують такий антиген, як при неходжкінській лімфомі або хронічному лімфобластному лейкозі. Як вказано вище, MY9 і анти-B4-антитіла можуть бути мишачими, химерними, гуманізованими або повністю людськими.

Крім того, GM-CSF, який зв'язується з мієлоїдними клітинами, можна застосовувати як зв'язуючий клітини агент для патологічних клітин при гострому мієлобластному лейкозі. IL-2, який зв'язується з активованими Т-клітинами, можна застосовувати для профілактики відторгнення трансплантата, для терапії і профілактики гомологічної хвороби і для лікування гострого Т-клітинного лейкозу. MSH, який зв'язується з меланоцитами, можна застосовувати для лікування меланоми.

Молекули кон'югатів винаходу можна отримувати будь-якими методиками. Похідні томайміцину за винаходом можна зв'язувати з антитілом або іншим зв'язуючим клітини агентом за допомогою лабільного під дією кислоти лінкера або фотолабільного лінкера. Похідні можна конденсувати з пептидом, що має прийнятну послідовність і потім зв'язати зі зв'язуючим клітини агентом для отримання лабільного під дією пептидази лінкеру. Можна отримати кон'югати, які містять первинну гідроксильну групу, яку можна суццинувати і зв'язати зі зв'язуючим клітини агентом для отримання кон'югата, який можна розщепити внутрішньоклітинними естеразами для виділення вільного похідного. Переважно синтезують похідні, які містять вільну або захищену тіольну групу, і потім одне або декілька дисульфід- або тіолвмісних похідних, кожне, ковалентно зв'язують зі зв'язуючим клітини агентом за допомогою дисульфідного зв'язку або простого тіоефірного зв'язку.

Численні методи кон'югування вказуються в патенті США 5416064 і патенті США 5475092. Похідні томайміцину можна модифікувати для утворення вільної аміногрупи і потім зв'язати з антитілом або іншим зв'язуючим клітини агентом за допомогою лабільного під дією кислоти лінкера або фотолабільного лінкера. Похідні томайміцину з вільною аміногрупою або карбоксильною групою можна конденсувати з пептидом і потім зв'язати зі зв'язуючим клітини агентом для утворення лабільного під дією пептидази лінкера. Похідні томайміцину з вільною гідроксильною групою на лінкер можна суццинувати і зв'язати зі зв'язуючим клітини агентом для отримання кон'югата, який можна розщепити внутрішньоклітинними естеразами для виділення

вільного лікарського засобу. Найбільш переважно, похідні томайміцину обробляють для утворення вільної або захищеної тіольної групи і потім димери дисульфід- або тіолвмісного томайміцину зв'язують зі зв'язуючим клітини агентом за допомогою дисульфідних зв'язків.

Репрезентативними кон'югатами винаходу є антитіло-похідне томайміцину, фрагмент антитіла-похідне томайміцину, похідне фактора епідермального росту (EGF)-похідне томайміцину, меланоцитстимулюючий гормон (MSH)-похідне томайміцину, тироїдстимулюючий гормон (TSH)-похідне томайміцину, естроген-похідне томайміцину, аналог естрогену-похідне томайміцину, андроген-похідне томайміцину, аналог андрогену-похідне томайміцину і фолат-похідне томайміцину.

Кон'югати похідного томайміцину і антитіл, фрагментів антитіл, білкових або пептидних гормонів, білкових або пептидних факторів росту і інших білків отримують таким же шляхом відомими методами. Наприклад, пептиди і антитіла можна модифікувати звивальними реагентами, такими як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат, N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноат (SPP), 4-сукцинімідилоксикарбоніл- α -метил- α -(2-піридилдитіо)толуол (SMPT), N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)бутират (SDPB), сукцинімідилпіридилдитіопропіонат (SPDP), N-гідроксисукцинімідил ефір 4-(2-піридилдитіо)бутанової кислоти (SPDB), сукцинімідил-4-[N-малеїдометил]циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), N-сульфосукцинімідил-3-(2-(5-нітропіридилдитіо)бутират (SSNPB), 2-імінотіолан або S-ацетилантарний ангідрид, відомими методами. Див. Carlsson et al., 173 Biochem. J. 723-737 (1978); Blattler et al., 24 Biochem. 1517-1524 (1985); Lambert et al., 22 Biochem. 3913-3920 (1983); Klotz et al., 96 Arch. Biochem. Biophys. 605 (1962); i Liu et al., 18 Biochem. 690 (1979), Blakey and Thorpe, 1 Antibody, Immunoconjugates & Radiopharmaceuticals, 1-16 (1988), Worrell et al. 1 Anti-Cancer Drug Design 179-184 (1986). Таким чином отриманий зв'язуючий клітини агент, який містить вільний або захищений тіол, можна потім піддати реакції з дисульфід- або тіолвмісним похідним томайміцину для отримання кон'югатів. Кон'югати можна очистити ВЕРХ або гель-фільтруванням.

Кон'югатами моноклональне тіло- або зв'язуючий клітини агент-похідне томайміцину переважно є кон'югати, які з'єднані через дисульфідний зв'язок, як описано вище, які здатні доставляти похідні томайміцину. Такі зв'язуючі клітини кон'югати отримують відомими методами, наприклад, модифікацією моноклональних антитіл сукцинімідилпіридилдитіопропіонатом (SPDP) (Carlsson et al., 173 Biochem. J. 723-737 (1978)). Тіопіридилну групу, що утворилася, потім замінюють обробкою тіолвмісними похідними томайміцину для отримання зв'язаних дисульфідом кон'югатів. Альтернативно, у випадку похідних арилдитіотомайміцину отримання зв'язуючого клітини кон'югата виконують прямою заміною арилтіолу похідного томайміцину сульфгідрильними групами, попередньо введеними в молекули антитіла. Кон'югати, що містять 1-10 лікарських похідних томайміцину, зв'язаних через дисульфідний місток, легко отримують будь-яким методом.

Більш конкретно, розчин дитіонітропіридилмодифікованого антитіла при концентрації 2,5 мг/мл в буфері 0,05 М фосфату калію з рН 7,5, що містить 2 мМ EDTA, обробляють тіолвмісним похідним томайміцину (1,3 мол. екв./дитіопіридилну групу). Моніторинг вивільнення тіонітропіридину з модифікованого антитіла проводять спектрофотометричним методом при 325 нм і завершують приблизно через 16 годин. Кон'югат антитіло-похідне томайміцину очищають і звільняють від лікарського засобу, який не прореагував, і іншої речовини з низькою молекулярною масою гель-фільтруванням через колонку сефадекс G-25 або сефакрил S300. Число зв'язків залишків похідного томайміцину на молекулу антитіла можна визначити вимірюванням відношення поглинання при 230 і 275 нм. Вказаним методом через дисульфідний зв'язок можна зв'язати в середньому 1-10 молекул похідного томайміцину на молекулу антитіла.

Вплив кон'югування на зв'язуючу афінність відносно антиген-експресуючих клітин можна визначити застосуванням методів, раніше описаних Liu et al., 93 Proc. Natl. Acad. Sci 8618-8623 (1996). Цитотоксичність похідних томайміцину і їх кон'югатів з антитілом відносно клітинних ліній можна виміряти зворотною екстраполяцією кривих проліферації клітин, як описано в Goldmacher et al., 135 J. Immunol. 3648-3651 (1985). Цитотоксичність вказаних сполук для прилипаючих клітинних ліній можна визначити клоногенними аналізами, як описано в Goldmacher et al., 102 J. Cell Biol. 1312-1319 (1986).

Репрезентативними кон'югатами винаходу є кон'югати похідних томайміцину з антитілами, фрагментами антитіл, фактором епідермального росту (EGF), меланоцитостимулюючим гормоном (MSH), тироїдстимулюючим гормоном (TSH), естрогеном, аналогами естрогену, андрогеном і аналогами андрогену.

Репрезентативні приклади отримання різних кон'югатів похідних томайміцину і зв'язуючих клітини агентів описуються нижче.

Дисульфідні лінкери. Наприклад, моноклональним антитілом MY9 є мишаче антитіло Ig₁, яке специфічно зв'язується з антигеном CD33 {J.D. Griffin et al. 8 Leukemia Res., 521 (1984)}, і його можна застосовувати, якщо клітини-мішені експресують CD33, як при захворюванні гострий мієлоїдний лейкоз (AML). Аналогічно цьому моноклональним антитілом анти-B4 є мишачий IgG₁, який зв'язується з антигеном CD19 на В-клітинах {Nadler et al., 131 J. Immunol. 244-250 (1983)}, і його можна застосовувати, якщо клітинами-мішенями є В-клітини або патологічні клітини, які експресують такий антиген, як при неходжкінській лімфомі або хронічному лімфобластному лейкозі.

Крім того, GM-CSF, який зв'язується з мієлоїдними клітинами, можна застосовувати як зв'язуючий клітини агент для патологічних клітин при гострому мієлобластному лейкозі. IL-2, який зв'язується з активованими Т-клітинами, можна застосовувати для профілактики відторгнення трансплантата, для терапії і профілактики гомологічної хвороби і для лікування гострого Т-клітинного лейкозу. MSH, який зв'язується з меланоцитами, можна застосовувати для лікування меланоми.

Антитіло або інший зв'язуючий клітини агент модифікують N-сукцинімідил-3-піридилдитіопропіонатом, як раніше описано {J. Carlsson, H. Drevin & R. Axen, Biochem. J., 173:723 (1978)}, для введення в середньому 4-піридилдитіогруп на молекулу антитіла. Модифіковане антитіло піддають реакції з тіолвмісним похідним для отримання дисульфідзв'язаного кон'югата.

У альтернативному випадку кон'югати можна отримати застосуванням і/або адаптацією методу, описаного в WO 2004/103272, зміст якої включений в описі як посилання.

Прості тіоефірні лінкери. Тіолвмісні похідні даного винаходу можуть зв'язуватися з антитілами і іншими зв'язуючими клітини агентами через простий тіоефірний зв'язок, як описано раніше (патент США № 5208020). Антитіло або інший зв'язуючий клітини агент можна модифікувати комерційно доступною сполукою, такою як N-сукцинімідил-4-(малеїмідометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбокси-(6-амідокапроат), який є аналогом з «довгим ланцюгом» SMCC (LC-SMCC). Ці зшивальні реагенти утворюють нерозщеплювані лінкери, утворені із залишків на основі малеїмідів.

Зшивальні реагенти, які містять залишок на основі галогенацетила, включають N-сукцинімідил-4-(йодацетил)амінобензоат (SIAB), N-сукцинімідилйодацетат (SIA), N-сукцинімідилбромацетат (SBA) і N-сукцинімідил-3-(бромацетамідо)пропіонат (SBAP). Ці зшивальні реагенти утворюють нерозщеплювані лінкери, утворені із залишків на основі галогенацетила.

Лінкери, лабільні під дією кислоти. Похідні даного винаходу, які містять аміногрупу, можна зв'язати з антитілами і іншими зв'язуючими клітини агентами через лабільний під дією кислоти лінкер, як раніше описано {W. A. Blattler et al., Biochemistry 24, 1517-1524 (1985); патенти США № 4542225, 4569789, 4618492, 4764368}.

Аналогічно цьому похідне даного винаходу, яке містить гідразидогрупу, можна зв'язати з вуглеводною частиною антитіла і інших зв'язуючих клітини агентів через лабільний під дією кислоти гідразоновий лінкер {прикладі гідразонових лінкер див. в публікаціях B. C. Laguzza et al., J. Med. Chem., 32, 548-555 (1989); R. S. Greenfield et al., Cancer Res., 50, 6600-6607 (1990)}.

Фотолабільні лінкери. Похідні даного винаходу, які містять аміногрупу, можна зв'язати з антитілами і іншими зв'язуючими клітини агентами через фотолабільний лінкер, як описано раніше {P. Senter et al., Photochemistry and Photobiology, 42, 231-237 (1985); патент США № 4625014}.

Лінкери, лабільні під дією пептидази. Похідні даного винаходу, які містять аміногрупу, можна також зв'язати зі зв'язуючими клітини агентами через пептидні зв'язувальні групи. Раніше було виявлено, що короткі пептидні зв'язувальні групи між лікарськими засобами і макромолекулярними білковими носіями є стабільними в сироватці, але легко гідролізуються внутрішньоклітинними пептидазами {A. Trouet et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 626-629 (1982)}. Похідні, які містять аміногрупу, можна конденсувати з пептидами із застосуванням конденсуючих агентів, таких як 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімід-HCl (EDC-HCl), щоб отримати похідне пептиду, яке можна зв'язати зі зв'язуючими клітини агентами.

Лінкери, лабільні під дією естерази. Похідні даного винаходу, що мають гідроксіалкільну групу, можна сукцинувати янтарним ангідридом і потім зв'язати зі зв'язуючим клітини агентом для отримання кон'югата, який може розщеплюватися внутрішньоклітинними естеразами з виділенням вільного лікарського засобу (див., наприклад, E. Aboud-Pirak et al., Biochem Pharmacol, 38, 641-648 (1989)).

Кон'югати, отримані вказаними вище методами, можна очищати стандартними методами хроматографії, такими як хроматографія з виключенням по розміру, адсорбційна хроматографія, яка включає, але не обмежується перерахованим, іонообмінну хроматографію, хроматографію з гідрофобною взаємодією, афінну хроматографію, хроматографію на керамічному гідроксиапатиті або на порпаку або ВЕРХ. Можна також застосовувати очищення діалізом або діалізуванням.

Переважаючими кон'югатами між моноклональними антитілами або зв'язуючими клітини агентами і похідними даного винаходу є кон'югати, які з'єднані через дисульфідний зв'язок, як обговорювалося раніше. Такі зв'язуючі клітини кон'югати отримують відомими методами, такими як модифікація моноклональних антитіл сукцинімідилпіридилдитіопропіонатом (SPDP) {Carlsson et al., 173 Biochem. J. 723-737 (1978)}. Тіопіридилну групу, що утворилася, потім замінюють обробкою тіолвмісним похідним для отримання зв'язаних дисульфідом кон'югатів. Даним методом легко отримують кон'югати, що містять 1-10 похідних, зв'язаних через дисульфідний місток. Кон'югування даним методом повністю описане в патенті США 5585499, який включений як посилання.

Згідно з переважним аспектом, зв'язуючим клітини агентом є антитіло, зокрема, моноклональне антитіло.

Згідно з іншим переважним аспектом, зв'язуючим клітини агентом є антигенспецифічний фрагмент антитіла, такий як sFV, Fab, Fab' або F(ab')₂.

Згідно з наступною задачею, даний винахід належить також до фармацевтичних композицій, що включають молекулу кон'югата винаходу або сполуку формули (I), вказаної вище, разом з фармацевтично прийнятним носієм.

Згідно з наступною задачею, даний винахід належить також до способу клінігу або інгібування зростання клітин, переважно вибраних популяцій клітин, що включає контактування клітин-мішеней або тканини, що містить клітини-мішені з ефективною кількістю фармацевтичної композиції згідно з винаходом.

Вибраною популяцією клітин є популяція злоякісних і/або проліферативних клітин.

Згідно з наступною задачею, даний винахід належить також до способу лікування, переважно селективного лікування, раку, що включає введення ефективної кількості фармацевтичної композиції згідно з винаходом потребуючому цього пацієнту.

Згідно з даним винаходом вираз «селективне лікування раку» належить до клінігу ракових і/або проліферативних клітин, по суті без клінігу нормальних і/або непроліферативних клітин.

Згідно з наступною задачею, даний винахід належить також до застосування молекули кон'югата винаходу або сполуки формули (I), вказаної вище, для виготовлення лікарського засобу для лікування раку.

Спосіб інгібування зростання вибраних популяцій клітин можна провести на практиці *in vitro*, *in vivo* або *ex vivo*.

Приклади застосувань *in vitro* включають обробку культур клітин для клінігу всіх клітин, за винятком бажаних варіантів, якими не експресують антиген-мішень, або клінігу варіантів, які експресують небажаний антиген.

Умови неклінічного застосування *in vitro* легко визначає фахівець в даній галузі.

Приклади застосувань *ex vivo* включають обробки аутогенного кісткового мозку перед його трансплантацією тому ж самому пацієнту для клінігу патологічних або злоякісних клітин; обробки кісткового мозку перед його трансплантацією для клінігу компетентних Т-клітин і профілактики гомологічної хвороби (GVHD).

Клінічну обробку *ex vivo* для видалення пухлинних клітин або лімфоїдних клітин з кісткового мозку перед аутогенною трансплантацією при лікуванні раку або при лікуванні аутоімунного захворювання, або для видалення Т-клітин і інших лімфоїдних клітин з аlogenного кісткового мозку або тканини перед трансплантацією, щоб запобігти GVHD, можна проводити таким чином. Кістковий мозок відбирають у пацієнта або іншого індивідуума і потім інкубують в середовищі, що містить сироватку, в яку додають цитотоксичний агент винаходу з діапазоном концентрацій від приблизно 10 мкМ до 1 нМ, протягом від приблизно 30 хвилин до приблизно 48 годин при 37°C. Точні умови концентрації і часу інкубації (= доза) легко визначає фахівець в даній галузі. Після інкубації клітини кісткового мозку промивають середовищем, що містить сироватку крові і повертають пацієнту внутрішньовенною інфузією згідно з відомими методами. У випадках, коли пацієнт отримує інше лікування, таке як курс ампутаційної хіміотерапії або опромінення всього тіла між часом відбору кісткового мозку і реінфузії оброблених клітин, оброблені клітини кісткового мозку зберігають замороженими в рідкому азоті із застосуванням стандартного медичного обладнання.

Для клінічного застосування *in vivo* цитотоксичний агент винаходу треба подавати у вигляді розчинів, які тестують на стерильність і рівні ендотоксинів, або у вигляді ліофілізованої твердої речовини, яку можна знов розчинити в стерильній воді для ін'єкції. Приклади прийнятних протоколів введення кон'югата є наступними. Кон'югати дають щотижня протягом 6 тижнів у вигляді внутрішньовенного болюсу. Дози болюсу дають в 50-400 мл нормальних фізіологічних розчини, в які можна додати сироватковий альбумін людини (наприклад, 0,5-1 мл концентрованого розчину сироваткового альбуміну людини, 100 мг/мл). Дози будуть приблизно від 50 мкг до 10 мг/кг маси тіла на тиждень при внутрішньовенному введенні (діапазон від 10 мкг до 100 мг/кг на ін'єкцію). Через шість тижнів після лікування пацієнт може отримати другий курс лікування. Конкретні клінічні протоколи відносно шляху введення, ексципієнтів, розріджувачів, доз, часу і т. д. може визначити фахівець в даній галузі як припис для клінічних станів.

Приклади медичних станів, які можна лікувати згідно зі способами кілінгу вибраних популяцій клітин *in vivo* і *ex vivo*, включають злоякісність будь-якого типу, в тому числі, наприклад, рак легень, молочної залози, товстої кишки, простати, нирок, підшлункової залози, яєчників і лімфатичних органів; меланоми; аутоімунні захворювання, такі як системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит і розсіяний склероз; відторгнення трансплантата, таке як відторгнення ниркового трансплантата, відторгнення печінкового трансплантата, відторгнення легеневого трансплантата, відторгнення серцевого трансплантата і відторгнення трансплантата кісткового мозку; гомологічну хворобу; вірусні інфекції, такі як CMV-інфекція, ВІЛ-інфекція, СНІД і т. д.; бактерійну інфекцію і інфекції паразитів, такі як ляблійоз, амебіоз, шистосомоз і інші інфекції, що визначаються фахівцем в даній галузі.

Можливість ідентифікації тих суб'єктів, які потребують лікування описаними в цьому документі захворюваннями і станами, знаходиться повністю в межах уміння і знання фахівця в даній галузі. Ветеринар або лікар, що є фахівцем в даній галузі, може легко ідентифікувати із застосуванням клінічних аналізів, об'єктивного обстеження, історії хвороби, сімейного анамнезу або біологічних і діагностичних тестів тих суб'єктів, які потребують такого лікування.

Терапевтично ефективну кількість може легко визначити штатний діагност, як діагност в даній галузі, із застосуванням загальноприйнятих методик і результатів обстеження, отриманих в аналогічних випадках. При визначенні терапевтично ефективної кількості штатний діагност враховує ряд чинників, що включають, але не обмежуються перерахованим, вид суб'єкта; його розмір, вік і загальний стан здоров'я; конкретне захворювання; ступінь розвитку або тяжкість захворювання; реакцію окремого суб'єкта; конкретну сполуку, що вводиться; спосіб введення; характеристику біологічної доступності препарату, що вводиться; вибрану схему прийому лікарського засобу; застосування супутньої лікарської терапії і інші споріднені фактори.

Кількість сполуки формули (I) або кон'югата, яка необхідна для досягнення необхідної біологічної дії, буде варіювати в залежності від ряду факторів, що включають хімічні характеристики (наприклад, гідрофобність) застосовуваних сполук, активність сполук, тип захворювання, вид, до якого належить пацієнт, патологічний стан пацієнта, шлях введення, біологічну доступність сполуки при вибраному шляху, всі фактори, які приписують необхідні кількості доз, доставку і схему, по якій треба вводити лікарський засіб.

Терміни «фармацевтично» або «фармацевтично прийнятний» належать до молекулярних сполук і композицій, які не викликають негативну, алергічну або іншу несприятливу реакцію при введенні за потреби тварині або людині.

Застосовуваний в описі вираз «фармацевтично прийнятний ексципієнт» включає будь-які носії, розріджувачі, ад'юванти або наповнювачі, такі як консервуючі або антиокислювальні агенти, наповнювачі, дезінтегруючі агенти, зволожувальні агенти, емульгуючі агенти, суспендуючі агенти, розчинники, диспергуючі середовища, покриття, антибактерійні і протигрибкові агенти, ізотонічні і сповільнюючі абсорбцію агенти і тому подібне. Застосування таких середовищ і агентів для фармацевтично активних речовин добре відоме в даній галузі. Передбачається застосування будь-якого загальноприйнятого середовища або агента в терапевтичних композиціях, за винятком випадків, коли вони є несумісними з активним агентом. У композиції у вигляді прийнятних терапевтичних комбінацій можна також включити додаткові активні інгредієнти.

У контексті винаходу термін «лікування», що застосовується в описі, означає зворотний розвиток, ослаблення, інгібування прогресу або профілактику порушення або стану, для якого такий термін застосовують, або одного або декількох симптомів такого порушення або стану.

Вираз «терапевтично ефективна кількість» означає кількість сполуки/лікарського засобу згідно з даним винаходом, ефективну при запобіганні або лікуванні вказаного в описі патологічного стану.

Згідно з винаходом термін «пацієнт» або «пацієнт, потребує цього», призначається для тварини або людини, яка страждає або, можливо, буде страждати вказаним в описі патологічним станом. Пацієнтом переважно є людина.

У загальних термінах сполуки даного винаходу можуть бути представлені у водному фізіологічному буферному розчині, що містить 0,1-10% мас./об. сполуки і призначений для парентерального введення. Типовий діапазон доз складає від 1 мкг/кг до 0,1 г/кг маси тіла на день; переважний діапазон доз складає від 0,01 мг/кг до 10 мг/кг маси тіла на день або еквівалентної дози для дитини. Переважна доза лікарського засобу, що вводиться, ймовірно, залежить від таких параметрів, як тип і ступінь прогресу захворювання або порушення, загальний стан здоров'я конкретного пацієнта, відносна біологічна ефективність вибраної сполуки, препарат сполуки, шлях введення (внутрішньовенний, внутрішньом'язовий або інший), фармакокінетичні властивості сполуки при вибраному шляху доставки і швидкість (болюс або безперервна інфузія) і схема введення (число повторень в даний період часу).

Сполуки даного винаходу можна також вводити в стандартних дозах, де термін «стандартна доза» означає разову дозу, яка придатна для введення пацієнту, з якою легко працювати і яку легко упакувати, яка зберігається у вигляді фізично і хімічно стабільної стандартної дози і включає або саму активну сполуку або її фармацевтично прийнятну композицію, як описано далі. Як такі, діапазони типових загальних добових доз складають від 0,01 до 100 мг/кг маси тіла. Як загальне керівництво, стандартні дози для людей складають від 1 мг до 3000 мг на день. Діапазон стандартних доз переважно складає 1-500 мг, причому таку дозу вводять один-шість разів на день, ще більш переважна доза від 10 мг до 500 мг, яку вводять один раз на день. Сполуки, запропоновані в описі, можна виготовити в складі фармацевтичних композицій змішуванням з одним або декількома фармацевтично прийнятними ексципієнтами. Такі композиції у вигляді стандартних доз можна отримати для застосування пероральним введенням, особливо в формі таблеток, простих капсул або м'яких гелевих капсул; або інтраназальним введенням, особливо в формі порошків, крапель для носа або аерозолів, або дермальним введенням, наприклад, місцевим шляхом в формі мазей, кремів, лосьйонів, гелів або спреїв або за допомогою черезшкірних пластирів.

Композиції можна відповідним чином вводити в формі стандартної дози, їх можна виготовити будь-якими методами, добре відомими в фармацевтичній галузі, наприклад, як описано в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed.; Gennaro, A. R., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000.

Переважні препарати включають фармацевтичні препарати сполук даного винаходу, виготовлені для перорального або парентерального введення.

Таблетки, пілюлі, порошки, капсули, пастилки і тому подібне для перорального введення можуть містити один або декілька з будь-яких наступних інгредієнтів або сполук подібної природи: зв'язувальну речовину, таку як мікрокристалічна целюлоза або трагакантова камедь; розривувач, такий як крохмаль або лактоза; дезінтегруючу речовину, таку як крохмаль і похідні целюлози; змащувальну речовину, таку як стеарат магнію; речовину, що додає ковзання, таку як колоїдальний діоксид кремнію; підсолоджувальний агент, такий як сахароза або сахарин; або коригент, такий як перцева м'ята або метилсаліцилат. Капсули можуть бути в формі твердої капсули або м'якої капсули, які звичайно виготовляють з суміші желатину, необов'язково змішаного з пластифікаторами, а також крохмальної капсули. Крім того, дозовані лікарські форми можуть містити різні інші матеріали, які модифікують фізичну форму стандартної дози, наприклад, покриття з цукру, шелаку або ентросолубільних агентів. Інші пероральні лікарські форми, сироп або еліксир, можуть містити підсолоджувальні агенти, консерванти, барвники, фарбувальні речовини і коригенти. Крім того, активні сполуки можуть бути включені в препарати і композиції з швидким розчиненням, модифікованим вивільненням або вивільненням, що стійко підтримується, і такі препарати з вивільненням, що стійко підтримується, переважно є бімодальними. Переважні таблетки містять лактозу, кукурудзяний крохмаль, силікат магнію, натрієву сіль кроскармелози, повідон, стеарат магнію або тальк в будь-якій комбінації.

Рідкі препарати для парентерального введення включають стерильні водні або неводні розчини, суспензії і емульсії. Рідкі композиції можуть включати також зв'язувальні речовини, буфери, консерванти, хелатуючі агенти, підсолоджувальні речовини, коригенти і фарбувальні агенти і тому подібне. Неводні розчинники включають спирти, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні олії, такі як оливкова олія, і органічний складний ефір, такий як етилолеат. Водні носії включають суміші спиртів і води, що містять буфери середовища і сольовий розчин. Для регулювання вивільнення активних сполук придатними ексципієнтами можуть бути, зокрема, біосумісний, біоруйнований лактидний полімер, співполімер лактиду і гліколіду або співполімери поліоксєтилен-поліоксипропілен. Наповнювачі для

внутрішньовенного введення можуть включати рідкі і поживні наповнювачі, електролітні наповнювачі, такі як наповнювачі на основі декстрази Рінгера і тому подібне.

Інші потенційно придатні системи для парентеральної доставки цих активних сполук включають частинки співполімеру етилену і вінілацетату, осмотичні насоси, імплантовані системи інфузії і ліпосоми.

Препарати для альтернативних способів введення включають препарати для інгаляції, які включають такі форми, як сухий порошок, аерозоль або краплі. Вони можуть бути водними розчинами, що містять, наприклад, поліоксіетилен-9-лауриловий ефір, глікохолат і деоксихолат, або маслянистими розчинами для введення в формі крапель для носа, або у вигляді гелю для внутрішньоносового застосування. Препаратами для трансбукального введення можуть бути наприклад, коржики або пастилки, такі препарати можуть включати також основу, яка додає смаку і запаху, таку як сахароза або аравійська камедь, і інші ексципієнти, такі як глікохолат. Препарати, прийнятні для ректального введення, переважно випускають у вигляді однодозових супозиторіїв з твердою основою, такою як какао-масло, вони можуть включати саліцилат. Препарати для місцевого нанесення на шкіру переважно мають форму мазі, крему, лосьйону, пасти, гелю, спрею, аерозолю або масла. Носії, які можна застосовувати, включають вазелін, ланолін, поліетиленгліколі, спирти або їх комбінації. Препарати, прийнятні для трансдермального введення, можуть бути представлені у вигляді окремих пластирів і можуть бути ліпофільними емульсіями або водними розчинами, які містять буфер, розчиненими і/або диспергованими в полімері або клейкій речовині.

Фігури

На Фіг. 1a представлена активність *in vitro* кон'югата huB4-SPDB-сполука прикладу 16 відносно антиген-позитивних BJAB-клітин і антиген-негативних MOLT-4-клітин.

На Фіг. 1b представлена активність *in vitro* кон'югата huB4-SMCC-сполука прикладу 16 відносно антиген-позитивних BJAB-клітин і антиген-негативних MOLT-4-клітин.

На Фіг. 1c представлена активність *in vitro* вільної сполуки прикладу 16 відносно клітин BJAB і MOLT-4.

На Фіг. 2a представлена активність *in vitro* кон'югата huB4-SPOB-сполука прикладу 17 відносно антиген-позитивних BJAB-клітин і антиген-негативних MOLT-4-клітин.

На Фіг. 2b представлена активність *in vitro* кон'югата huB4-SMCC-сполука прикладу 17 відносно антиген-позитивних BJAB-клітин і антиген-негативних MOLT-4-клітин.

На Фіг. 2c представлена активність *in vitro* вільної сполуки прикладу 17 відносно клітин BJAB і MOLT-4.

На Фіг. 3a представлена активність *in vitro* кон'югата huMy9-6-SPDB-сполука прикладу 16 відносно антиген-позитивних HL60/GC-клітин і антиген-негативних клітин Рамоса.

На Фіг. 3b представлена активність *in vitro* вільної сполуки прикладу 16 відносно клітин HL60/GC і клітин Рамоса.

Винахід далі ілюструється, але не обмежується, описом в наступних прикладах.

Експериментальна частина

40 - Метод A1: високоефективна рідинна хроматографія-мас-спектрометрія (PX-MC)

Застосовують програмне забезпечення Micromass MassLynx і аналіз проводять на хроматографі BEPX Agilent 1100 series з колонкою (50×3 мм) THERMO Hypersil Gold, C18, 3 мкм, застосовуючи градієнтне елюювання сумішшю (A) ацетонітрилу і (B) розчину вода/0,1% мурашина кислота (градієнт: від 5% A: 95% B до 95% A: 5% B протягом 5 хвилин, 95% A: 5% B протягом 0,5 хвилини, від 95% A: 5% B до 5% A: 95% B протягом 1 хвилини, 5% A: 95% B протягом 0,5 хвилини) при швидкості потоку 0,8 мл/хв.; спектрометрі Waters-Micromass Platform I, Platform II або ZQ з електророзпиленням (позитивна і негативна іонізація); в ряду подвійної матриці (190-490 нм); допоміжний детектор Sedere (France) Model SEDEX 65 Evaporative Light Scattering (ELS) detector.

50 - Метод A2: високоефективна рідинна хроматографія-мас-спектрометрія (PX-MC)

Застосовують програмне забезпечення Micromass MassLynx і аналіз проводять на хроматографі Waters Alliance HPLC з колонкою (100×3 мм) WATERS XBridge, C18, 3,5 мкм, застосовуючи градієнтне елюювання сумішшю (A) метанолу (B) розчину вода/0,1% мурашина кислота (градієнт: від 5% A: 95% B до 95% A: 5% B протягом 10 хвилин, від 95% A: 5% B до 5% A: 95% B протягом 1 хвилини, 5% A: 95% B протягом 2 хвилин) при швидкості потоку 1,1 мл/хв.; спектрометрі Waters-Micromass Platform II з електророзпиленням (позитивна і негативна іонізація); в ряду подвійної матриці (190-500 нм); допоміжний детектор Sedere (France) Model SEDEX 85 Evaporative Light Scattering (ELS) detector.

- Метод A3: високоефективна рідинна хроматографія-мас-спектрометрія (PX-MC)

Застосовують програмне забезпечення Micromass MassLynx і аналіз проводять на хроматографі Agilent 1100 серії HPLC з колонкою (50×3 мм) XBridge C18, 2,5 мкм, застосовуючи градієнтне елюювання сумішшю (А) ацетонітрилу (В) розчину вода/0,1% мурашина кислота (градієнт: від 5% А: 95% В до 100% А протягом 5 хвилин, 100% А протягом 0,5 хвилини, від 100% А до 5% А: 95% В протягом 1 хвилини, 5% А: 95% В протягом 0,5 хвилини) при швидкості потоку 1,1 мл/хв.; спектрометрі Waters-Micromass ZQ з електророзпиленням; в ряду подвійної матриці (210-254 нм).

- Метод В: очищення високоефективної рідинної хроматографією (ВЕРХ)

Очищення ВЕРХ проводять на колонці (21×100 мм, кат. № 762101) Macherey Nagel Nucleodur, C18 Gravity, 5 мкм, елюючи сумішшю (А) ацетонітрилу і (В) води (градієнт: 5% А: 95% В протягом 5 хвилин, від 5% А: 95% В до 100% А протягом 20 хвилин, 100% А протягом 8 хвилин, від 100% А до 5% А: 95% В протягом 1 хвилини, 5% А: 95% В протягом 11 хвилин) при швидкості потоку 15 мл/хвилину (метод В1) або 20 мл/хвилину (метод В2).

- Метод С: мас-спектроскопія з електронною іонізацією (EI)

Мас-спектри EI реєстрували із застосуванням мас-спектрометра Finnigan SSQ 7000 (метод EI: 70 еВ, температура джерела = 150°C, пряме введення).

- Метод D: мас-спектроскопія з хімічною іонізацією (CI)

Мас-спектри реєстрували із застосуванням мас-спектрометра Finnigan SSQ 7000 (аміак).

- Метод Е: спектроскопія ¹Н ядерного магнітного резонансу (ЯМР)

Спектри ¹Н ЯМР реєстрували на будь-якому спектрометрі з Bruker Avance Drx-500, Bruker Avance Drx-400 або Bruker Avance Drx-300.

- Метод F: очищення високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ)

Очищення ВЕРХ проводили на колонці Macherey Nagel VP 250/40 мм NUCLEODUR GRAVITY 100-10 C18 (кат. № 762250), елюючи сумішшю (А) ацетонітрилу і (В) розчину вода/HCOONH₄, 0,01 М/NH₄OH, рН 9-10 (градієнт: 10% А: 90% В протягом 3 хвилин, від 10% А: 90% В до 95% А: 5% В протягом 37 хвилин, 95% А: 5% В протягом 8 хвилин, від 95% А: 5% В до 10% А: 90% В протягом 1 хвилини, 10% А: 90% В протягом 1 хвилини) при швидкості потоку 70 мл/хвилину.

- Метод G1: високоефективна рідинна хроматографія-мас-спектрометрія (PX-МС)

Застосовують програмне забезпечення Micromass MassLynx і аналіз проводять на приладі Acquity UPLC з колонкою (2,1×100 мм) Acquity UPLC BEH, C18, 1,7 мкм, застосовуючи градієнтне елюювання сумішшю (А) ацетонітрилу і (В) розчину вода/0,1% мурашина кислота (градієнт: від 5% А: 95% В до 95% А: 5% В протягом 4,7 хвилини, від 95% А: 5% В до 5% А: 95% В протягом 0,5 хвилини, 5% А: 95% В протягом 0,8 хвилини) при швидкості потоку 1,1 мл/хв.; спектрометр Quattro Premier з електророзпиленням; в ряду подвійної матриці (210-400 нм).

- Метод G2: високоефективна рідинна хроматографія-мас-спектрометрія (PX-МС)

Застосовують програмне забезпечення Micromass MassLynx і аналіз проводять на хроматографі Acquity UPLC з колонкою (2,1×100 мм) Acquity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, застосовуючи градієнтне елюювання сумішшю (А) ацетонітрилу і розчину (В) вода/0,1% мурашина кислота (градієнт: від 5% А: 95% В до 95% А: 5% В протягом 10 хвилин, 95% А: 5% В до 5% А: 95% В протягом 1 хвилини, 5% А: 95% В протягом 2 хвилин) при швидкості потоку 0,6 мл/хв.; спектрометр Quattro Premier з електророзпиленням; в ряду подвійної матриці (210-400 нм).

- Метод Н: метод очищення високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ)

Очищення ВЕРХ проводили на Varian HPLC із застосуванням колонки (250×21,2 мм, PN A0490-250×212, Lot. № DT0259. SN 9772196) Kromasil 16 мкм C18, елюючи сумішшю (А) води і (В) ацетонітрилу при швидкості потоку 20 мл/хвилину. Час збору становив 80 секунд. Мас-спектри сполук отримували на приладі Bruker Esquire 3000. ЯМР-спектри реєстрували на приладі Bruker Avance, діючому при 400 МГц.

Градiєнти для елюювання сполук з колонки:

1. Очищення 8,8'-[5-(N-4-метилдитіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

Суміш 55% А: 45% В протягом 8 хвилин, від 55% А: 45% В до 50% А: 50% В протягом 14 хвилин, від 50% А: 50% В до 10% А: 90% В протягом 4 хвилин, 10% А: 90% В протягом 5 хвилин, від 10% А: 90% В до 55% А: 45% В протягом 1 хвилини, 55% А: 45% В протягом 3 хвилин.

2. Очищення 8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

Суміш 60% А: 40% В протягом 4 хвилин, від 60% А: 40% В до 55% А: 45% В протягом 5 хвилин, 55% А: 45% В протягом 4 хвилин, від 55% А: 45% В до 50% А: 50% В протягом 13 хвилин, від 50% А: 50% В до 10% А: 90% В протягом 10 секунд, 10% А: 90% В протягом 5 хвилин, від 10% А: 90% В до 60% А: 40% В протягом 10 секунд, 60% А: 40% В протягом 3 хвилин.

3. Очищення 8,8'-[5-(N-метил-N-(4-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси))-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

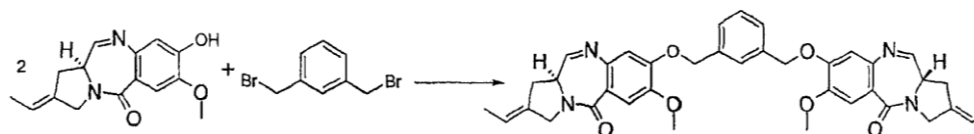
Суміш 60% А: 40% В протягом 8 хвилин, від 60% А: 40% В до 45% А: 55% В протягом 16 хвилин, від 45% А: 55% В до 10% А: 90% В протягом 2 хвилин, 10% А: 90% В протягом 5 хвилин, від 10% А: 90% В до 60% А: 40% В протягом 1 хвилини, 60% А: 40% В протягом 3 хвилин.

4. Очищення 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-меркапто-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси))-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]

Суміш від 65% А: 35% В до 60% А: 40% В протягом 8 хвилин, від 60% А: 40% В до 50% А: 50% В протягом 19 хвилин, від 50% А: 50% В до 10% А: 90% В протягом 10 секунд, 10% А: 90% В протягом 5 хвилин, від 10% А: 90% В до 65% А: 35% В протягом 10 секунд, 65% А: 35% В протягом 3 хвилин.

Приклад 1

8,8'-[1,3-бензолдіілбіс(метиленокси))-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



Карбонат калію (22,8 мг), α,α' -дибром-м-ксилол (7,3 мг) і йодид калію (9,1 мг) додають до перемішаного розчину попередника томайміцину (15 мг) в диметилформаміді (0,5 мл). Реакційну суміш перемішують протягом 20 годин при 30°C. Тверду речовину відділяють фільтруванням, промивають двічі диметилформамідом (0,2 мл), потім вивантажують. До об'єднаного розчину в диметилформаміді додають воду (0,4 мл) і розчин, що утворився, вводять для очищення ВЕРХ згідно з методом В1. Прийнятні фракції об'єднують і концентрують упарюванням на апараті-центрифузі Jouan Model RC10.10, отримуючи при цьому 8,8'-[1,3-бензолдіілбіс(метиленокси))-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] у вигляді білого порошку (3,33 мг).

PX/MC (метод A1, Platform II):

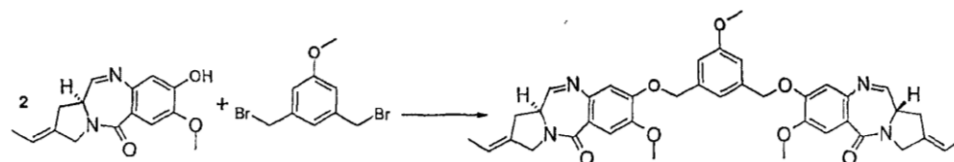
ES: $m/z=647 \text{ MH}^+$

Час утримування=3,53 хвилини

^1H ЯМР (500 МГц, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ в м. ч.): 1,75 (д, $J=7,0$ Гц, 6H); 2,96 (м, 4H); 3,89 (м, 2H); 3,96 (с, 6H); 4,27 (ушир.с, 4H); 5,17 (д, $J=12,5$ Гц, 2H); 5,23 (д, $J=12,5$ Гц, 2H); 5,60 (м, 2H); 6,85 (с, 2H); від 7,36 до 7,43 (м, 3H); 7, 51 (ушир.с, 1H); 7,53 (с, 2H); 7,63 (д, $J=4,5$ Гц, 2H).

Приклад 2

8,8'-[5-метокси-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси))-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[5-метокси-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси))-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[1,3-бензолдіілбіс(метиленокси))-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону], виходячи з 1,3-бісбромметил-5-метоксибензолу.

PX/MC (метод A1, Platform II):

ES: $m/z=677 \text{ MH}^+$

Час утримування=4,17 хвилини

^1H ЯМР (300 МГц, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ в м. ч.): 1,75 (д, $J=7,0$ Гц, 6H); 2,96 (м, 4H); 3,81 (с, 3H); 3,89 (м, 2H); 3,96 (с, 6H); 4,26 (ушир.с, 4H); 5,14 (д, $J=12,5$ Гц, 2H); 5,21 (д, $J=12,5$ Гц, 2H); 5,60 (м, 2H); 6,82 (с, 2H); 6,95 (ушир.с, 2H); 7,07 (ушир.с, 1H); 7,53 (с, 2H); 7,63 (д, $J=4,5$ Гц, 2H).

1,3-бісбромметил-5-метоксибензол можна отримати таким чином:

5



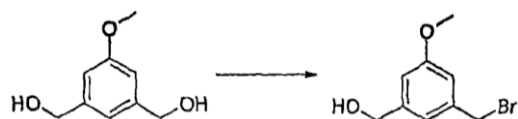
Тетрабромід вуглецю (663 мг) додають до перемішаного розчину 1-бромметил-3-гідроксиметил-5-метоксибензолу (420 мг) в безводному дихлорметані (10 мл) в атмосфері аргону. Після охолодження розчину, що утворився, при 0°C по краплях додають розчин трифенілфосфіну (500 мл) в безводному дихлорметані (10 мл). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 20 годин і потім концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioFlash, 30 г, Si60 15-40 мкм, елювання сумішшю дихлорметан/гептан, 40:60), отримуючи при цьому 1,3-бісбромметил-5-метоксибензол (170 мг).

ЕІ (метод С): $m/z=292\text{ M}^+$
 $m/z=213\text{ [M-Br]}^+$
 $m/z=134\text{ [213-Br]}^+$

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6 , δ в м. ч.): 3,77 (с, 3H); 4,65 (с, 4H); 6,98 (ушир.с, 2H); 7,10 (ушир.с, 1H).

1-Бромметил-3-гідроксиметил-5-метоксибензол можна отримати таким чином.

20



Тетрабромід вуглецю (3,47 г) додають до перемішаного розчину 1,3-дигідроксиметил-5-метоксибензолу (800 мг) в безводному дихлорметані (16 мл) в атмосфері аргону. Після охолодження розчину, що утворився, при 0°C по краплях додають розчин трифенілфосфіну (2,68 г) в безводному дихлорметані (16 мл). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 20 годин і потім концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioPrep, 90 г, Si60 15-40 мкм, елювання сумішшю метанол/дихлорметан, 4:96), отримуючи при цьому 1-бромметил-3-гідроксиметил-5-метоксибензол (420 мг).

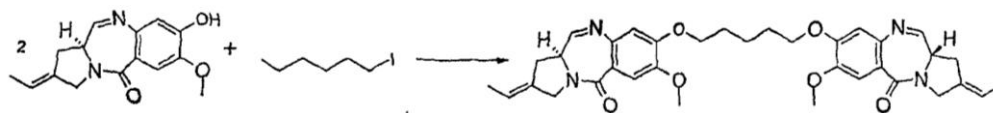
ЕІ (метод С): $m/z=230\text{ M}^+$
 $m/z=151\text{ [M-Br]}^+$

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6 , δ в м. ч.): 3,75 (с, 3H); 4,46 (ушир.д, $J=5,5$ Гц, 2H); 4,65 (с, 2H); 5,22 (ушир.т, $J=5,5$ Гц, 1H); 6,83 (ушир.с, 1H); 6,88 (ушир.с, 1H); 6,97 (ушир.с, 1H).

Приклад 3

8,8'-[1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

35



Карбонат калію (22,8 мг) і 1,5-дйодпентан (8,2 мкл) додають до перемішаного розчину попередника томайміцину (15 мг) в диметилформаміді (0,5 мл). Реакційну суміш перемішують протягом 20 годин при кімнатній температурі і додають додаткову порцію карбонату калію (8 мг). Реакційну суміш перемішують протягом ще 20 годин при кімнатній температурі.

Тверді речовини відділяють фільтруванням і розчин в диметилформаміді вводять для очищення ВЕРХ по методу В2. Прийнятні фракції об'єднують і концентрують упарюванням при центрифугуванні на апараті Jouan Model RC10.10, отримуючи при цьому 8,8'-[1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] у вигляді білого порошку (4 мг).

PX/MC (метод A2):

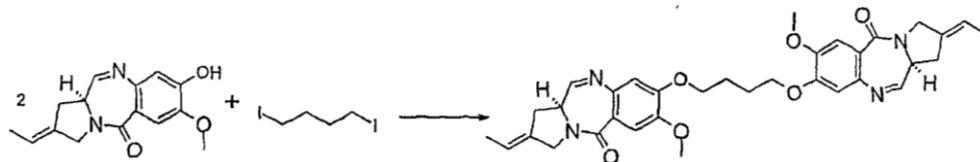
ES: $m/z=613 \text{ MH}^+$

Час утримування=9,04 хвилини

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): 1,66 (м, частково прихований, 2H); 1,75 (ушир.д, J=7,0 Гц, 6H); 1,96 (м, 4H); 2,97 (ушир.д, J=7,0 Гц, 4H); 3,89 (м, 2H); 3,94 (с, 6H); 4,06 (м, 2H); 4,13 (м, 2H); 4,26 (ушир.с, 4H); 5,60 (м, 2H); 6,80 (с, 2H); 7,50 (с, 2H); 7,66 (д, J=4,5 Гц, 2H).

Приклад 4

8,8'-[1,4-бутандіілбіс(окси)]-біс[(8)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[1,4-бутандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] (приклад 3), виходячи з 1,4-дйодбутану.

PX/MC (метод A1, Platform II):

ES: $m/z=599 \text{ MH}^+$

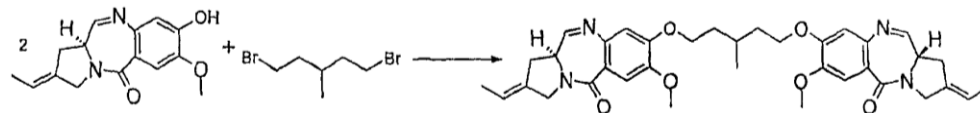
$m/z=318,5(\text{M}+\text{H}^+\text{K})^{2+}/2$

Час утримування=3,23 хвилини

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): 1,75 (ушир.д, J=7,0 Гц, 6H); 2,10 (м, 4H); 2,98 (ушир.д, J=7,0 Гц, 4H); 3,90 (м, 2H); 3,93 (с, 6H); 4,11 (м, 2H); 4,20 (м, 2H); 4,27 (ушир.с, 4H); 5,60 (м, 2H); 6,82 (с, 2H); 7,50 (с, 2H); 7,66 (д, J=4,5 Гц, 2H).

Приклад 5

8,8'-[3-метил-1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[3-метил-1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] (приклад 1), виходячи з 1,5-дибром-3-метилпентану.

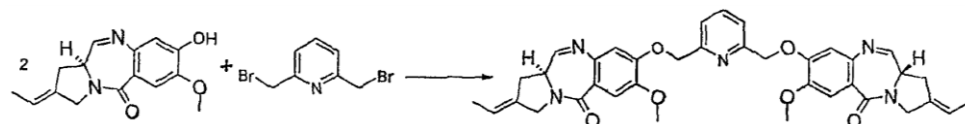
PX/MC (метод A1, Platform II):

ES: $m/z=627 \text{ MH}^+$

Час утримування=3,92 хвилини

Приклад 6

8,8'-[2,6-піридиндіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[2,6-Піридиндіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] (приклад 1), виходячи з 2,6-бісбромметилпіридину.

PX/MC (метод A1,ZQ):

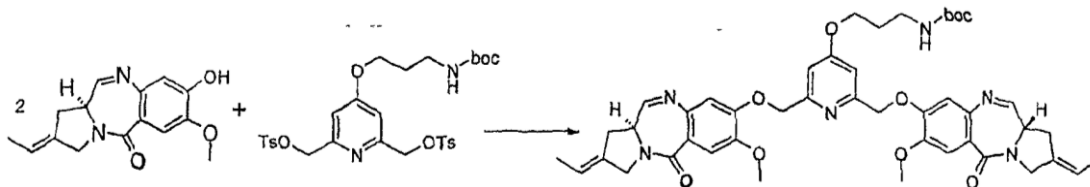
ES: $m/z=648 \text{ MH}^+$

Час утримування=3,21 хвилини

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): 1,75 (ушир.д, J=6,5 Гц, 6H); від 2,94 до 2,99 (м, 4H); 3,90 (м, 2H); 3,99 (с, 6H); 4,27 (ушир.с, 4H); 5,32 (с, 4H); 5,60 (м, 2H); 6,86 (с, 2H); 7,48 (д, J=8,0 Гц, 2H); 7,56 (с, 2H); 7,64 (д, J=4,5 Гц, 2H); 7,74 (т, J=8,0 Гц, 1H).

Приклад 7

- 5 8,8'-[4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)]-2,6-піридинділбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-іліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



- 10 До перемішаного розчину попередника томайміцину (30 мг) в диметилформаміді (0,5 мл) додають карбонат калію (45,7 мг), розчин 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(тозилоксиметил)піридину (41 мг) в диметилформаміді (0,5 мл) і йодид калію (18,3 мг). Реакційну суміш перемішують протягом 20 годин при 30°C. Тверді речовини відділяють фільтруванням і промивають диметилформамідом (0,2 мл). До об'єднаного розчину в
- 15 диметилформаміді додають воду (0,5 мл) і додають мурашину кислоту до повного розчинення осаду. Розчин, що утворився, вводять для очищення ВЕРХ згідно з методом В1. Прийнятні фракції об'єднують і концентрують упарюванням при центрифугуванні на апараті Jouan Model RC10.10, отримуючи при цьому 8,8'-[4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)]-2,6-піридинділбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-іліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-
- 20 піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] (8,3 мг).

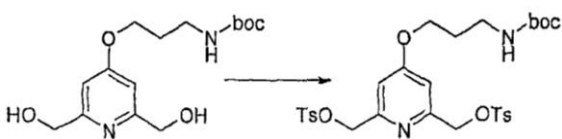
PX/MC (метод A1, Platform I):

ES: m/z=857 MH⁺ + 2H₂O
m/z=839 MH⁺ + H₂O
m/z=821 MH⁺
m/z=721 [M-C₅O₂H₈]+H⁺

Час утримування=3,67 хвилини

- ¹H ЯМР (500 МГц, CD₃CO₂D-d₄, δ в м. ч.): 1,41 (с, 9H); 1,71 (д, J=6,5 Гц, 6H); 2,08 (м, 2H); 2,95 (м, 4H); 3,34 (м, 2H); 3,90 (с, 6H); 4,06 (м, 2H); 4,18 (м, 2H); від 4,24 до 4,36 (м, 4H); 4,43 (т, J=6,0 Гц, 2H); 5,50 (ушир.с, 4H); 5,61 (м, 2H); від 6,80 до 7,70 (дуже ушир.м, 2H); 6,95 (ушир.с, 2H); від 7,48 до 7,58 (м, 4H).
- 25

4-(3-Бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс-(тозилоксиметил)піридин можна отримати таким чином:



30

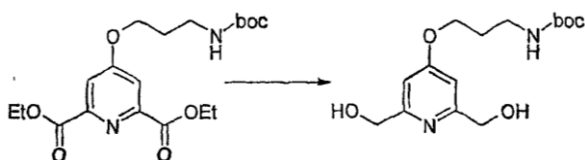
- До попередньо охолодженого (0°C) розчину 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину (76 мг) в дихлорметані (0,7 мл) додають розчин гідроксиду калію (30 мг) у воді (0,3 мл). Додають тозилхлорид (93,7 мг) і гетерогенну суміш, що утворилася, енергійно струшують протягом 1 години і потім промивають в ділільній лійці із застосуванням дихлорметану і води. Шари розділяють і водний шар екстрагують три рази дихлорметаном. Об'єднані органічні розчини сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищують хроматографією на силікагелі (колонка Interchrom Puriflash, 10 г, SiOH 15-35 мкм) із застосуванням градієнтного елюювання сумішшю гептану (А) і етилацетату (В) (градієнт: від 90% А: 10% В до 50% А: 50% В), отримуючи при цьому 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(тозилоксиметил)піридин (56 мг).
- 35

PX/MC (метод A1, Platform I):

ES: m/z=621 MH⁺

Час утримування=4,90 хвилини

- 45 4-(3-Бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати таким чином:



До розчину діетилового ефіру 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)піридин-2,6-
 5 дикарбонової кислоти (150 мг) в абсолютному етанолі (5 мл) додають борогідрид натрію (43 мг)
 і хлорид кальцію (128 мг). Після перемішування протягом 4 годин виділення водню
 припиняється і реакцію гасять водою. Розчинник випарюють при зниженому тиску. Залишок
 потім промивають в ділільній лійці із застосуванням дихлорметану і води. Шари розділяють і
 водний шар екстрагують три рази дихлорметаном. Об'єднані органічні розчини сушать над
 10 сульфатом магнію і концентрують у вакуумі, отримуючи при цьому 4-(3-трет-
 бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин (80 мг).

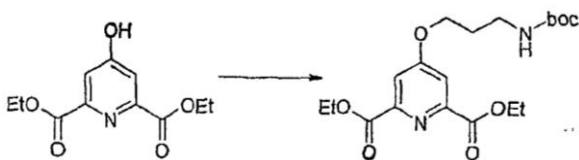
PX/MC (метод A1, ZQ):

ES: $m/z=313 \text{ MH}^+$

Час утримування=1,90 хвилини

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6 , δ в м. ч.): 1,37 (с, 9H); 1,84 (м, 2H); 3,08 (кв, $J=6,5$ Гц, 2H); 4,05
 15 (т, $J=6,5$ Гц, 2H); 4,45 (д, $J=6,0$ Гц, 4H); 5,32 (т, $J=6,0$ Гц, 2H); 6,84 (с, 2H); 6,90 (ушир.т, $J=6,5$ Гц,
 1H).

Діетиловий ефір 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти
 можна отримати таким чином:



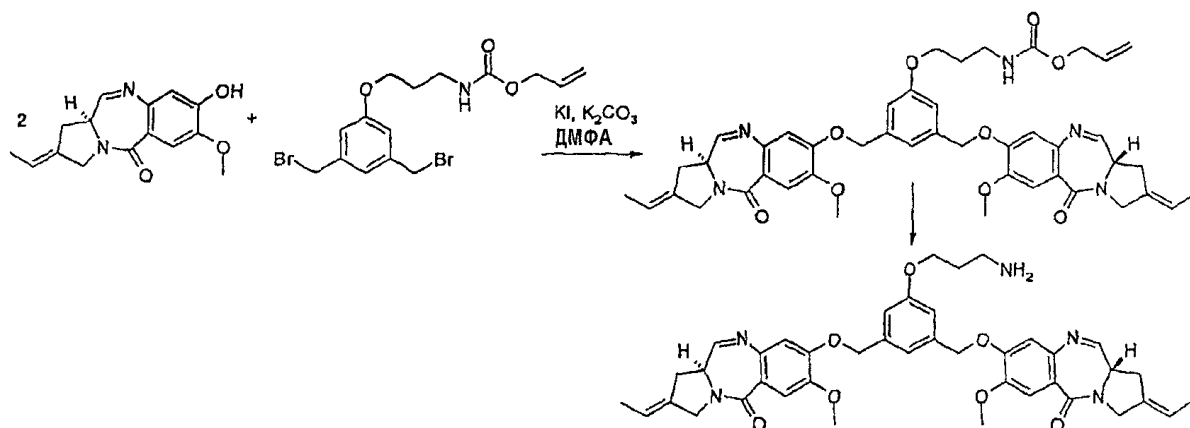
Діетиловий ефір хелідамової кислоти (Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Vendrame, T. J.
 Org. Chem. 1989, 54, 5988) (150 мг) розчиняють в сухому диметилформаміді (2 мл). Додають 3-
 25 (трет-бутоксіаміно)пропілбромід (164 мг) і карбонат калію (130 мг). Суміш, що утворилася,
 перемішують протягом 15 годин при 70°C. Реакцію гасять насиченим водним розчином хлориду
 амонію і потім промивають в ділільній лійці із застосуванням етилацетату. Шари розділяють і
 водний шар екстрагують 3 рази етилацетатом. Об'єднані органічні розчини сушать над
 сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищають
 30 хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioFlash, 30 г, Si60 15-40 мкм) із
 застосуванням градієнтного елюювання сумішшю гептану (A) і етилацетату (B) (градієнт: від
 60% A: 40% B до 50% A: 50% B), отримуючи при цьому діетиловий ефір 4-(3-трет-
 бутоксикарбоніламінопропокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти (150 мг).

CI (метод D): $m/z=397 \text{ MH}^+$

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6 , δ в м. ч.): 1,34 (т, $J=7,0$ Гц, 6H); 1,36 (с, 9H); 1,86 (м, 2H); 3,10
 35 (кв, $J=6,5$ Гц, 2H); 4,21 (т, $J=6,5$ Гц, 2H); 4,37 (кв, $J=7,0$ Гц, 4H); 6,89 (ушир.м, 1H); 7,71 (с, 2H).

Приклад 8

8,8'-[5-(3-амінопропілокси)-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-
 1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати таким чином:



До перемішаного розчину попередника томайміцину (21 мг) в диметилформаміді (0,7 мл) додають карбонат калію (32 мг), 1-(3-алілоксикарбоніламінопропілокси)-3,5-біс(бромметил)бензол (16,2 мг) і йодид калію (12,8 мг). Реакційну суміш перемішують протягом 20 годин при 30°C. Тверді речовини відділяють фільтруванням, промивають двічі диметилформамідом (0,2 мл), потім вивантажують. До об'єднаного розчину в диметилформаміді додають воду (0,5 мл) і осад, що утворився, відділяють фільтруванням, промивають водою і сушать упарюванням при центрифугуванні на апараті Jouan Model RC10.10.

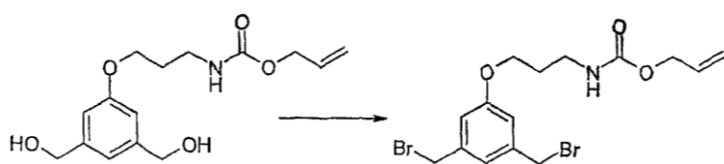
До неочищеної сполуки (27 мг), розчиненої в диметилформаміді (0,8 мл), додають тетракіс(трифенілфосфін)паладій (2 мг), трифенілфосфін (0,9 мг) і піролідін (5,6 мкл). Після перемішування протягом 15 годин при 30°C додають тетракіс(трифенілфосфін)паладій (2 мг), трифенілфосфін (1 мг) і піролідін (2,8 мкл) і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ще 15 годин. До розчину в диметилформаміді додають воду (0,4 мл) і додають мурашину кислоту до повного розчинення осаду. Розчин, що утворився, вводять для очищення ВЕРХ згідно з методом В1. Прийнятні фракції об'єднують і концентрують упарюванням при центрифугуванні на апараті Jouan Model RC10.10, отримуючи при цьому 8,8'-[5-(3-амінопропілокси)-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] (0,2 мг).

PX/MC (метод A1, Platform II):

ES: $m/z=800\text{ MH}^+$

Час утримування=2,84 хвилини

1-(3-Аллілоксикарбоніламінопропілокси)-3,5-біс(бромметил)бензол можна отримати таким чином:



До суспензії 1-(3-алілоксикарбоніламінопропілокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу (70 мг) в дихлорметані (3 мл) додають тетрабромід вуглецю (248 мг) і розчин трифенілфосфіну (199 мг) в дихлорметані (2 мл). Після кип'ятіння із зворотним холодильником протягом 3 годин реакційну суміш очищають хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioFlash, 25 г, Si60 15-40 мкм) з елююванням дихлорметаном, отримуючи при цьому 1-(3-алілоксикарбоніламінопропілокси)-3,5-біс(бромметил)бензол (52 мг).

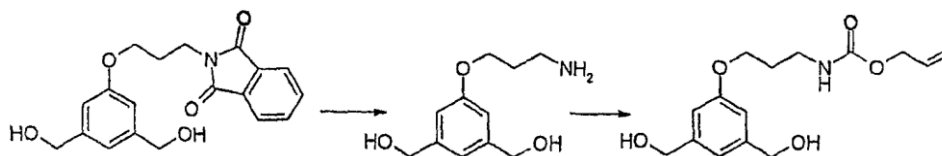
PX/MC (метод A1, Platform II):

ES $m/z=420\text{ MH}^+$

Час утримування=4,50 хвилини

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6 , δ в м. ч.): 1,85 (м, 2H); 3,15 (кв, $J=6,5$ Гц, 2H); 3,99 (т, $J=6,5$ Гц, 2H); 4,46 (ушир.д, $J=5,5$ Гц, 2H); 4,65 (с, 4H); 5,16 (ушир.д, $J=11,0$ Гц, 1H); 5,26 (ушир.д, $J=17,5$ Гц, 1H); 5,90 (м, 1H); 6,96 (д, $J=1,5$ Гц, 2H); 7,09 (т, $J=1,5$ Гц, 1H); 7,29 (ушир.т, $J=6,5$ Гц, 1H).

1-(3-Аллілоксикарбоніламінопропілокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати таким чином.



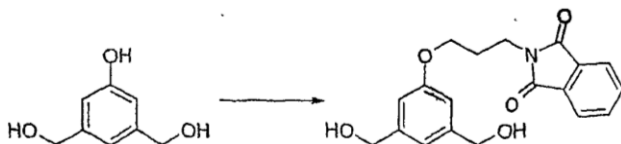
5-(3-Фталімідопропілокси)-1,3-біс(гідроксиметил)бензол (1,45 г) розчиняють в суміші дихлорметану і етанолу (25 мл, 25:75). Додають гідразин-гідрат (0,62 мл) і реакційну суміш кип'яють із зворотним холодильником протягом 1 години. Розчинник видаляють у вакуумі і залишок розчиняють в дихлорметані. Нерозчинний залишок відділяють фільтруванням і очищують хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioPrep, 70 г, Si60 15-40 мкм) з елюванням сумішшю метанол/дихлорметан, 20:80, потім сумішшю гідроксид амоній/метанол/дихлорметан, 0,5:25:75, отримуючи при цьому 1-(3-амінопропілокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол (1 г), прийнятний для подальшого перетворення.

Зразок 1-(3-амінопропілокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу (100 мг) розчиняють в метанолі (5 мл). До охолодженого розчину (0°C) додають розчин карбонату натрію (120 мг) у воді (5 мл) і алілхлорформат (42 мкл). Після перемішування протягом 30 хвилин при 0°C реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ще 15 годин. Розчинник видаляють у вакуумі. Залишок потім промивають в ділильній лійці із застосуванням етилацетату і води. Шари розділяють і водний шар екстрагують двічі етилацетатом. Об'єднані органічні розчини сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі, отримуючи при цьому 5-(3-алілоксикарбоніламінопропілокси)-2,6-біс(гідроксиметил)бензол (75 мг).

EI (метод C): $m/z=295 M^+$
 $m/z=142 (M-C_8H_9O_3)^+$
 $m/z=41 C_3H_5^+$

1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ в м. ч.): 1,85 (м, 2H); 3,14 (кв, $J=6,5$ Гц, 2H); 3,96 (т, $J=6,5$ Гц, 2H); від 4,41 до 4,48 (м, 6H); 5,11 (т, частково прихований, $J=5,5$ Гц, 2H); 5,16 (квд, $J=1,5$ і 10,5 Гц, 1H); 5,26 (квд, $J=1,5$ і 17,0 Гц, 1H); 5,90 (м, 1H); 6,72 (ушир.с, 2H); 6,83 (ушир.с, 1H); 7,26 (ушир.т, $J=6,5$ Гц, 1H).

5-(3-Фталімідопропілокси)-1,3-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати таким чином.



3,5-біс-гідроксиметилфенол (Felder, D.; Gutierrez Nava, M.; del Pilar Carreon, M.; Eckert, J.F.; Tuccisano, M.; Schall, C; Masson, P.; Gallani, J.L.; Heinrich, B.; Guillon, D.; Nierengarten, J.F. *Helv. Chimica Acta* 2002, 85, 288) (2,35 г), N-(3-бромпропіл)фталімід (4,49 г) і карбонат калію (10,53 г) змішують в ацетонітрилі (25 мл) і кип'яють із зворотним холодильником протягом 12 годин. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури і розчинник видаляють при зниженому тиску. Залишок знов розчиняють в дихлорметані і нерозчинний залишок відділяють фільтруванням. Фільтрат промивають водою, сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі, отримуючи при цьому залишок. Залишок очищують хроматографією на силікагелі (колонка Merck Super VarioPrep, 90 г, Si60 15-40 мкм) з елюванням сумішшю метанол/дихлорметан, 4:96, отримуючи при цьому 5-(3-фталімідопропілокси)-1,3-біс(гідроксиметил)бензол (1,45 г).

PX/MC (метод A1, Platform II):

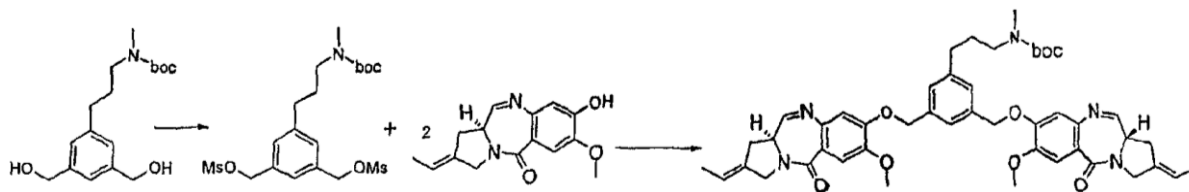
ES $m/z=342 MH^+$
 $m/z=324 (MH^+-H_2O)$

Час утримування=2,90 хвилини

1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ в м. ч.): 2,05 (м, 2H); 3,76 (т, $J=6,5$ Гц, 2H); 3,99 (т, $J=6,5$ Гц, 2H); 4,40 (д, $J=5,5$ Гц, 4H); 5,09 (т, $J=5,5$ Гц, 2H); 6,59 (ушир.с, 2H); 6,82 (ушир.с, 1H); від 7,80 до 7,90 (м, 4H).

Приклад 9

8,8'-[5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)1-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати таким чином:



До охолодженого (0°C) розчину 5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)-1,3-біс(гідроксиметил)бензолу (50 мг) і триетиламіну (113 мкл) в дихлорметані (2 мл) додають метансульфонілхлорид (26 мкл). Через 30 хвилин реакційну суміш двічі промивають водою і розчин, що утворився, в дихлорметані сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання в'язкого масла (50,3 мг).

Розчин попередника томайміцину (15 мг) в дим етил формаміді (0,5 мл) додають до суміші неочищеної сполуки (13 мг), карбонату калію (23 мг) і йодиду калію (9 мг). Реакційну суміш перемішують протягом 20 годин при 30°C. Додають іншу частину неочищеної сполуки (6 мг) і реакційну суміш перемішують протягом 20 годин при 30°C. Тверді речовини відділяють фільтруванням, промивають диметилформамідом (0,2 мл), потім вивантажують. До об'єднаного розчину в диметилформаміді додають воду (0,4 мл), одну краплю мурашиної кислоти і ще воду (1,5 мл).

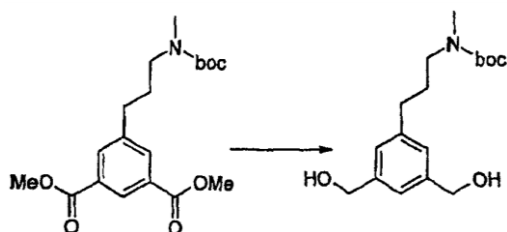
Зразок суспензії (2 мл), що утворилася, фільтрують і тверду речовину, що утворилася, сушать у вакуумі, отримуючи при цьому 8,8'-[5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] (3,1 мг).

PX/MC (метод A1, Platform II):

ES: $m/z=818 \text{ MH}^+$

Час утримування=4,11 хвилини

5-(N-Метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)-1,3-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати таким чином:

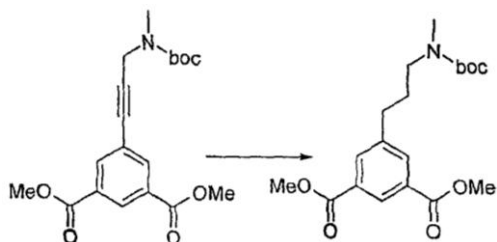


До охолодженого розчину (-5°C) діетилового ефіру 5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти (100 мг) в тетрагідрофурані (2 мл) повільно додають 1М розчин літіялюмінійгідриду в діетиловому ефірі (0,55 мл). Через 10 хвилин після закінчення додати додають декагідрат сульфату натрію до припинення виділення газу. Тверду речовину відділяють фільтруванням, промивають двічі етилацетатом і об'єднані органічні розчини концентрують у вакуумі, отримуючи при цьому 5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)-1,3-біс(гідроксиметил)бензол (66,8 г) у вигляді в'язкого масла.

CI (метод D): $m/z=327 \text{ MNH}_4^+$
 $m/z=310 \text{ MH}^+$
 $m/z=271 (\text{MNH}_4^+-\text{C}_4\text{H}_8)$

^1H ЯМР (300 МГц, DMCO-d_6 , δ в м. ч.): 1,37 (ушир.с, 9H); 1,75 (м, 2H); від 2,45 до 2,54 (м, прихований, 2H); 2,77 (с, 3H); 3,18 (т, $J=7,0$ Гц, 2H); 4,45 (д, $J=5,5$ Гц, 4H); 5,08 (т, $J=5,5$ Гц, 2H); 7,00 (ушир.с, 2H); 7,08 (ушир.с, 1H).

Діетиловий ефір 5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти можна отримати таким чином:

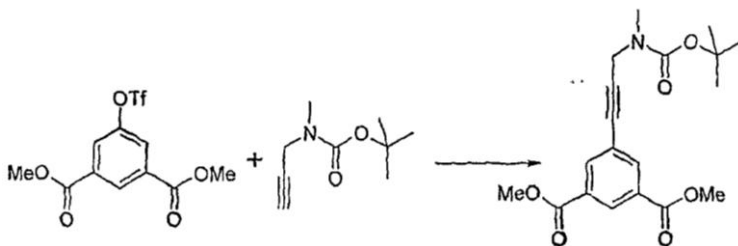


До розчину діетилового ефіру 5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропін-1-іл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти (890 мг) в метанолі (10 мл) додають 10% паладій-на-вугіллі (89 мг) і розчин перемішують при кімнатній температурі в атмосфері водню (1 бар) протягом 18 годин. Тверду речовину відділяють фільтруванням і розчинник видаляють у вакуумі, отримуючи при цьому діетиловий ефір 5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти (767 мг) у вигляді жовтого масла.

EI (метод C): $m/z=365$ M^+
 $m/z=309$ $(M-C_4H_8)^+$
 $m/z=265$ $(m/z=309-CO_2)^+$
 $m/z=57$ $C_4H_9^+$
 $m/z=44$ $C_2H_6N^+$

1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$, δ в м. ч.): 1,32 (ушир.с, 9H); 1,79 (м, 2H); 2,70 (т, $J=7,0$ Гц, 2H); 2,76 (с, 3H); 3,16 (м, 2H); 3,87 (с, 6H); 8,06 (д, $3=2,0$ Гц, 2H); 8,32 (т, $J=2,0$ Гц, 1H).

Діетиловий ефір 5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл-1-іл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти можна отримати таким чином:



15

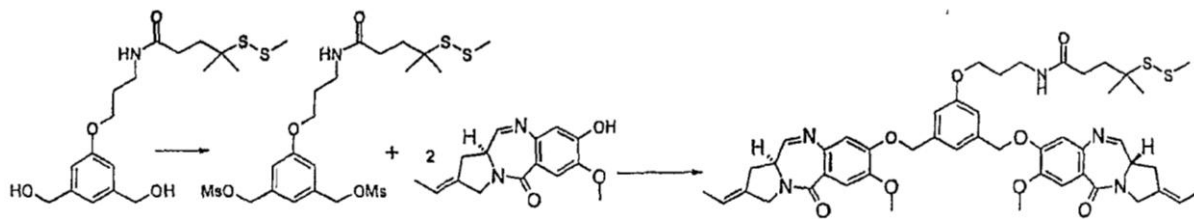
Диметилловий ефір 5-трифторметансульфонілоксиізофталевої кислоти (Bodwell, G.J.; Fleming, J.J.; Mannion, M.R.; Miller, D.O. J. Org. Chem. 2000, 65 (17), 5360) (1 г) розчиняють в 2 мл ацетонітрилу. Додають N-метил-N-трет-бутоксикарбонілпропаргіламін (Bradbury, B.J.; Baumgold, J.; Jacobsen, K.A. J. Med. Chem. 1990, 33 (2), 741) (643 мг), біс(трифенілфосфін)паладійхлорид (205 мг), йодид міді (56 мг) і триетиламін (591 мг). Суміш, що утворилася, перемішують протягом 15 годин при кімнатній температурі. Розчинник видаляють випарюванням при зниженому тиску і залишок потім промивають в ділільній лійці із застосуванням етилацетату і води. Шари розділяють і водний шар екстрагують один раз етилацетатом. Об'єднані органічні розчини промивають насиченим водним розчином хлориду натрію, сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (колонок Biotage FLASH 40+M, 100 г, SiOH 32-63 мкм, елювання сумішшю етилацетат/гептан, 20:80), отримуючи при цьому діетиловий ефір 5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл-1-іл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти (896 мг).

1H ЯМР (300 МГц, $DMCO-d_6$, δ в м. ч.): 1,43 (с, 9H); 2,90 (с, 3H); 3,90 (с, 6H); 4,30 (с, 2H); 8,16 (д, $J=1,5$ Гц, 2H); 8,42 (т, $J=1,5$ Гц, 1H).

Приклад 10

8,8'-[5-[3-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)пропілокси]-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-іліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати таким чином

35



До охолодженого (0°C) розчину 1-[3-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)пропілокси]-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу (45 мг) і триетиламіну (49 мкл) в дихлорметані (1,5 мл) додають метансульфонілхлорид (19 мкл). Через 30 хвилин реакційну суміш промивають двічі водою і розчин, що утворився, в дихлорметані сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі, отримуючи при цьому в'язке масло (39 мг).

До розчину попередника томайміцину (26 мг) в диметилформаміді (0,9 мл) додають карбонат калію (40 мг), йодид калію (16 мг) і порцію неочищеної сполуки (31 мг). Реакційну суміш перемішують протягом 20 годин при 30°C. Додають іншу порцію неочищеної сполуки (6 мг) і реакційну суміш перемішують протягом ще 20 годин при 30°C. Тверді речовини відділяють фільтруванням, промивають диметилформамідом (0,3 мл), потім вивантажують. До об'єднаного розчину в диметилформаміді додають воду (1,6 мл) і тверду речовину, що утворилася, відділяють фільтруванням, промивають водою і сушать у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (колонка Interchrom Puriflash, 2 г, SiOH 15-35 мкм, елювання сумішшю дихлорметан/метанол, 95/5), потім піддають іншому очищенню хроматографією на силікагелі (колонка Chromabond OH, 2 г, 45 мкм, елювання дихлорметаном), отримуючи при цьому 8,8'-[5-[3-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)пропілокси]-1,3-бензолдіїлбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] (0,2 мг).

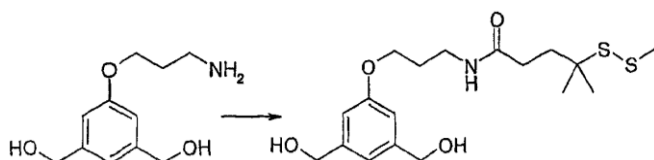
PX/MC (метод A1, Platform I):

ES: m/z=896 MH⁺

Час утримування=4,09 хвилини

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): 1,29 (с, 6H); 1,75 (д, J=6,5 Гц, 6H); від 1,92 до 2,03 (м, 4H); 2,28 (м, 2H); 2,39 (с, 3H); 2,97 (м, 4H); 3,45 (кв, J=6,0 Гц, 2H); 3,89 (кв, J=5,5 Гц, 2H); 3,96 (с, 6H); 4,04 (т, J=5,0 Гц, 2H); 4,27 (ушир.с, 4H); 5,14 (д, J=12,5 Гц, 2H); 5,20 (д, J=12,5 Гц, 2H); 5,60 (м, 2H); 5,84 (ушир.т, J=6,0 Гц, 1H); 6,83 (с, 2H); 6,94 (с, 2H); 7,09 (с, 1H); 7,53 (с, 2H); 7,64 (д, J=5,0 Гц, 2H).

1-[3-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)пропілокси]-3,5-біс(гідроксиметил)бензол



До розчину 1-(3-амінопропілокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу (50 мг) в диметилформаміді (1 мл) додають 4-метил-4-метилдисульфанілпентанову кислоту (44 мг), N,N'-діізопропілкарбодіїмід (35 мл) і гідрати 1-гідроксибензотриазолу (5,8 мг). Після втримування суміші при кімнатній температурі протягом 15 годин до реакційної суміші додають воду і водний розчин екстрагують двічі етилацетатом. Об'єднані органічні розчини промивають насиченим водним розчином хлориду натрію, сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (колонка Interchrom Puriflash, 5 г, SiOH 15-35 мкм) з елюванням сумішшю метанол/дихлорметан, 5:95, отримуючи при цьому 1-[3-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)пропілокси]-3,5-біс(гідроксиметил)бензол (48 мг).

PX/MC (метод A1, ZQ):

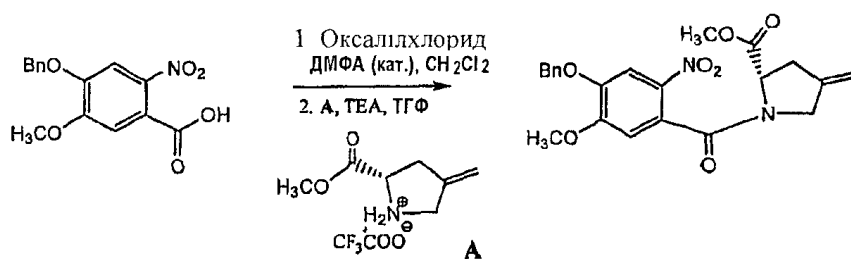
ES m/z=388 MH⁺

Час утримування=3,03 хвилини

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆, δ в м. ч.): 1,24 (с, 6H); від 1,76 до 1,87 (м, 4H); 2,16 (м, 2H); 2,40 (с, 3H); 3,19 (кв, J=6,5 Гц, 2H); 3,95 (т, J=6,5 Гц, 2H); 4,44 (ушир.д, J=5,5 Гц, 4H); 5,12 (д, J=5,5 Гц, 2H); 6,73 (ушир.с, 2H); 6,83 (ушир.с, 1H); 7,92 (ушир.т, J=5,5 Гц, 1H).

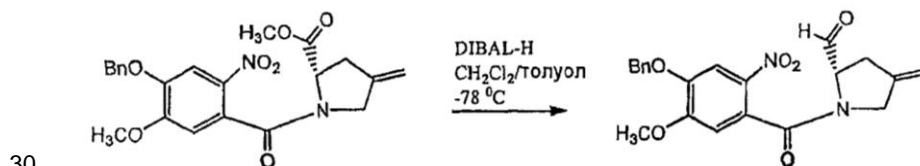
Приклад 11

Отримання вихідних продуктів і/або проміжних сполук

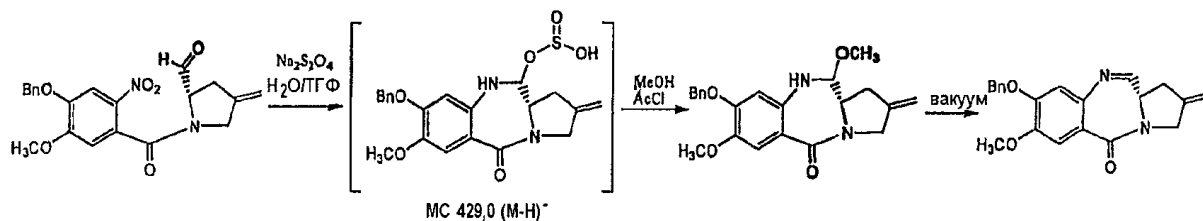


5 До розчину 4-бензилокси-5-метокси-2-нітробензойної кислоти (4,8 г, 16 ммоль) в безводному дихлорметані (80 мл) і ТГФ (5 мл) додають оксалилхлорид (2,8 мл, 32 ммоль) і ДМФА (30 мкл, 0,38 ммоль) при кімнатній температурі. Після додання ДМФА відбувається утворення великої кількості пухирців. Суміш перемішують протягом ночі, потім розчинники видаляють роторним випарюванням у вакуумі. Залишок ще раз піддають спільному упарюванню доданням безводного дихлорметану, отримуючи при цьому ацетилхлорид у вигляді жовтої твердої речовини.

10 До розчину метилового ефіру 4-метилєн-L-проліну, сполука А (3,95 г, 15,5 ммоль) в безводному ТГФ (80 мл) додають триетиламін (6,7 мл, 48 ммоль) при 0°C. Через 2 хвилини швидко, за 10 хвилин через канюлю при такій же температурі додають вказаний вище ацетилхлорид в безводному ТГФ (80 мл). Отриманий жовтий каламутний розчин перемішують при 0~5°C протягом 30 хвилин, потім при кімнатній температурі протягом 4 годин. Реакційний розчин розбавляють етилацетатом і водою. Водний шар екстрагують двічі етилацетатом і об'єднані органічні шари промивають 2% розчином HCl і насиченим розчином солі, сушать над безводним сульфатом магнію. Розчин фільтрують і розчинники видаляють. Залишок очищають флеш-хроматографією (гексани/АсОEt, 1:1, 1:1,5), отримуючи при цьому метиловий ефір (2S)-4-(метилєн)-1-[5-метокси-2-нітро-4-(фенілметокси)бензоїл]-2-піролідінкарбонової кислоти у вигляді жовтої твердої речовини (5,6 г, вихід=85%). ¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃): сполука утворюється у вигляді пари індивідуальних ротамерів. δ 7,76 (с, 0,7H), 7,73 (с, 0,3H), 7,43-7,29 (м, 5H), 6,83 (с, 0,7H), 6,80 (с, 0,3H), 5,17 (с, 1,4H), 5,16 (с, 0,6H), 5,10-4,89 (м, 2,7H), 4,57 (д, J=16 Гц, 0,3H), 4,19-4,12 (м, 0,7H), 3,95-3,77 (м, 6,3H), 3,57 (с, 1H), 3,06-2,96 (м, 1H), 2,73-2,62 (м, 1H); ¹³C ЯМР (400 Гц, CDCl₃): 171,8, 171,7, 166,5, 166,2, 154,9, 154,4, 148,25, 148,18, 141,7, 141,3, 137,19, 137,13, 135,3, 135,2, 128,7, 128,43, 128,41, 127,5, 127,3, 109,5, 109,1, 109,0, 108,9, 71,3, 60,6, 58,1, 56,7, 56,5, 52,39, 52,37, 52,0, 50,2, 37,1, 35,5; МС (ESI): m/z 449,3 (M+Na)⁺.

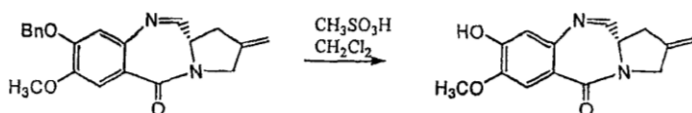


30 До розчину складного ефіру (3,15 г, 7,39 ммоль) в безводному дихлорметані (9 мл) і толуолі (27 мл) по краплях через шприц за 30 хвилин при -78°C додають dibal-H (15 мл, 1,0 М в толуолі). Суміш продовжують перемішувати при -78°C протягом 2 годин і ТШХ (гексани/АсОEt, 1:1,5) показує, що вся вихідна речовина витрачена. Реакцію гасять метанолом (0,3 мл, 7,4 ммоль) при -78°C і додають 5% HCl (20 мл) з подальшим доданням АсОEt (50 мл). Баню сухий лід/ацетон видаляють і суміш нагрівають до 0°C і перемішують протягом 15 хвилин. Водний шар двічі екстрагують АсОEt і об'єднані органічні шари промивають холодною 5% HCl і насиченим розчином солі, сушать над безводним сульфатом натрію. Розчин фільтрують через целіт і розчинники видаляють. Залишок очищають флеш-хроматографією (гексани/АсОEt, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 100% АсОEt), отримуючи при цьому (2S)-4-(метилєн)-1-[5-метокси-2-нітро-4-(фенілметокси)бензоїл]-2-піролідінкарбоксальдегід у вигляді пухнастої жовтої твердої речовини (2,69 г, вихід=92%). ¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃): сполука утворюється у вигляді пари індивідуальних ротамерів. δ 9,75 (с, 0,7H), 9,32 (с, 0,3H), 7,76 (с, 0,7H), 7,69 (с, 0,3H), 7,45-7,31 (м, 5H), 6,85 (с, 0,7H), 6,80 (с, 0,3H), 5,19-4,82 (м, 4,7H), 4,56 (д, J=16 Гц, 0,3H), 4,14-3,79 (м, 5H), 2,99-2,68 (м, 2H); ¹³C ЯМР (400 Гц, CDCl₃): 198,3, 197,1, 167,1, 155,0, 154,6, 148,4, 141,3, 140,4, 137,2, 135,2, 128,7, 128,5, 128,4, 127,5, 126,9, 126,6, 109,8, 109,4, 109,3, 109,2, 109,1, 71,3, 66,6, 64,3, 56,7, 56,6, 52,2, 50,6, 33,2, 31,9; МС (ESI): m/z 419,2 (M+Na)⁺.



Методика 1: До розчину (2S)-4-(метилєн)-1-[5-метокси-2-нїтро-4-(фєнїлметокси)бензоїл]-2-пїролїдинкарбоксальдеїду (1,0 еквівалєнт) в сумїші ТГФ/Н₂О (об./об., 1,7:1, 0,03 М) порціями додають гідросульфїт натрію (5-8 еквівалєнтів) за час 2 хвилини при кїмнатній температурї. Сумїш додатково перемїшують протягом 6-20 годїн і монїторинг реакції проводять ТШХ (гексани/АсОЕт, 1:2, і СН₂Сl₂/МеОН, 5:1). Пїсля майже повної витрати альдеїду реакцію гасять метанолом (приблизно таким же об'ємом, як застосовуваний ТГФ). Розчинники видаляють роторним випаровуванням у вакуумї (температура <40°C) і тверду речовину, що залишилася, вміщують у високий вакуум, щоб перетворити його в повністю суху сполуку. Тверду речовину суспендують в безводному метанолї (0,03М) і при кїмнатній температурї по краплях додають АсСl (8-10 еквівалєнтів). Пїсля перемїшування протягом 15 хвилин каламутний розчин фільтрують і тверду речовину промивають безводним метанолом. Прозорий жовтий фільтрат перемїшують при кїмнатній температурї протягом 1-2 годїн і гасять насиченим бїкарбонатом натрію. Пїсля видалення бїльшої частини метанолу роторним випаровуванням частину, що залишилася, розбавляють дихлорметаном і водою. Водний шар екстрагують АсОЕт. Об'єднані органїчні шари сушать над безводним сульфатом натрію і фільтрують. Розчинники видаляють і залишок очищають флєш-хроматографїєю (гексани/АсОЕт, 1:3, 1:5), отримуючи при цьому (11aS)-7-метокси-2-метилєн-8-(фєнїлметокси)-1,2,3,11a-тетрагїдро-5H-пїроло[2,1-c][1,4]бензодїазепїн-5-он з виходом 70%-85%. ЯМР-спектри узгоджуються з лїтературними спектрами. МС (ESI): m/z 371,2 (M+Na)⁺. МС (ESI, з СН₃ОН): m/z 403,3 (M⁺ СН₃ОН+Na)⁺. МС (ESI, з Н₂О): m/z 389,2 (M+H₂О+Na)⁺.

Методика 2. До розчину (2S)-4-(метилєн)-1-[5-метокси-2-нїтро-4-(фєнїлметокси)бензоїл]-2-пїролїдинкарбоксальдеїду (1,0 еквівалєнт) в сумїші МеОН/Н₂О (об./об., 3,2:1, 0,03 М) додають порціями гідросульфїт натрію (6~8 еквівалєнтів) за 2 хвилини при кїмнатній температурї з подальшим доданням гідросульфату натрію (0,5-1,0 еквівалєнт). Сумїш додатково перемїшують протягом 12-20 годїн і монїторинг реакції проводять ТШХ (гексани/АсОЕт, 1:2, і СН₂Сl₂/МеОН, 5:1). Пїсля того як промїжну сполуку [МС (ESI): 459,0 (M-H)] буде майже витрачено, реакцію гасять насиченим бїкарбонатом натрію до рН 5~6. Розчинники видаляють роторним випаровуванням у вакуумї (температура <40°C) і тверду речовину, що залишилася, вміщують у високий вакуум, щоб зробити його повністю сухим. Тверду речовину суспендують в безводному метанолї (0,03М) і при кїмнатній температурї по краплях додають АсСl (8-10 еквівалєнтів). Пїсля перемїшують протягом 15 хвилин каламутний розчин фільтрують і тверду речовину промивають безводним метанолом. Прозорий жовтий фільтрат перемїшують при кїмнатній температурї протягом 1-2 годїн і гасять насиченим бїкарбонатом натрію. Пїсля видалення бїльшої частини метанолу роторним випаровуванням частину, що залишилася, розбавляють дихлорметаном і водою. Водний шар екстрагують АсОЕт. Об'єднані органїчні шари сушать над безводним сульфатом натрію і фільтрують. Розчинники видаляють і залишок очищають флєш-хроматографїєю (гексани/АсОЕт, 1:3, 1:5), отримуючи при цьому (11aS)-7-метокси-2-метилєн-8-(фєнїлметокси)-1,2,3,11a-тетрагїдро-5H-пїроло[2,1-c][1,4]бензодїазепїн-5-он з виходом 65%-80%.

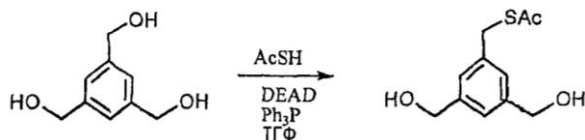


До розчину вихідної речовини (98 мг, 0,28 ммоль) в безводному дихлорметанї (2 мл) додають свіжоприготований розчин метансульфонової кислоти (2 мл) в безводному дихлорметанї (4 мл) при кїмнатній температурї. Сумїш перемїшують при кїмнатній температурї протягом 1,5 годїн і виливають на лїд (~30 г), гасять насиченим NaHCO₃ і розбавляють дихлорметаном. Водний шар екстрагують один раз дихлорметаном і об'єднані органїчні шари сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і розчинники видаляють. Залишок очищають флєш-хроматографїєю (СН₂Сl₂/МеОН, 15:1), отримуючи при цьому продукт у вигляді

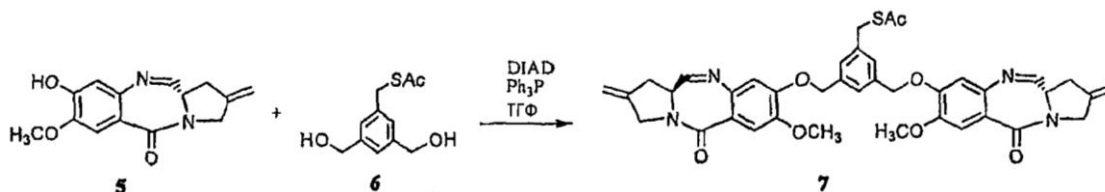
жовтої твердої речовини (29 мг). Вказаний вище водний розчин перемішують при кімнатній температурі протягом ночі і екстрагують послідовно дихлорметаном і AcOEt. Об'єднаний шар дихлорметану і AcOEt сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і розчинники видаляють, отримуючи при цьому (11aS)-8-гідрокси-7-метокси-2-метилен-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-он (25 мг). Загальний вихід 74%. ^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3): δ 7,65 (д, $J=4,8$ Гц, 1H), 7,48 (с, 1H), 6,87 (с, 1H), 6,35 (ушир.с, 1H), 5,17 (т, $J=1,6$ Гц, 1H), 5,14 (7, $J=1,6$ Гц, 1H), 4,26 (с, 2H), 3,93 (с, 3H), 3,87-3,83 (м, 1H), 3,12-3,05 (м, 1H), 2,91 (д, $J=16$ Гц, 1H); МС (ESI): m/z 281,0 ($\text{M}+\text{Na}^+$). МС (ESI, з водою): m/z 258,9 ($\text{M}+\text{H}^+$), m/z 299,1 ($\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}^+$).

Приклад 12

8,8'-[5-ацетилтіометил-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-он]



До розчину трифенілфосфіну (577 мг, 2,2 ммоль) в безводному ТГФ (5 мл) по краплях при 0°C додають діетилазодикарбоксилат (2,2М в толуолі, 791 мкл, 1,7 ммоль). Після перемішування при 0°C протягом 50 хвилин додають по краплях розчин 1,3,5-три(гідроксиметил)бензоли (269 мг, 1,6 ммоль, отриманий відновленням триметил-1,3,5-бензолтрикарбоксилату літійалюмінійгідридом в ТГФ, спільно упарений з сухим бензолом і висушений у високому вакуумі протягом двох годин перед застосуванням) і тіоцтової кислоти (108 мкл, 1,45 ммоль) в сухому ТГФ (4 мл). Через 1 годину баню лід/вода видаляють і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 15 годин. Розчинники видаляють роторним випаровуванням у вакуумі. Залишок очищають флеш-хроматографією, отримуючи при цьому 5-ацетилтіометил-1,3-біс(гідроксиметил)бензол у вигляді безбарвної твердої речовини (110 мг). ^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3): δ 7,13-6,99 (м, 3H), 4,45 (приблизно т, $J=20,4$ Гц, 4H), 3,98 (приблизно т, $J=20,4$ Гц, 4H), 3,73 (ушир.с, 2H), 2,24 (apt, $J=20,4$ Гц, 3H); МС (ESI): m/z 249,0 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

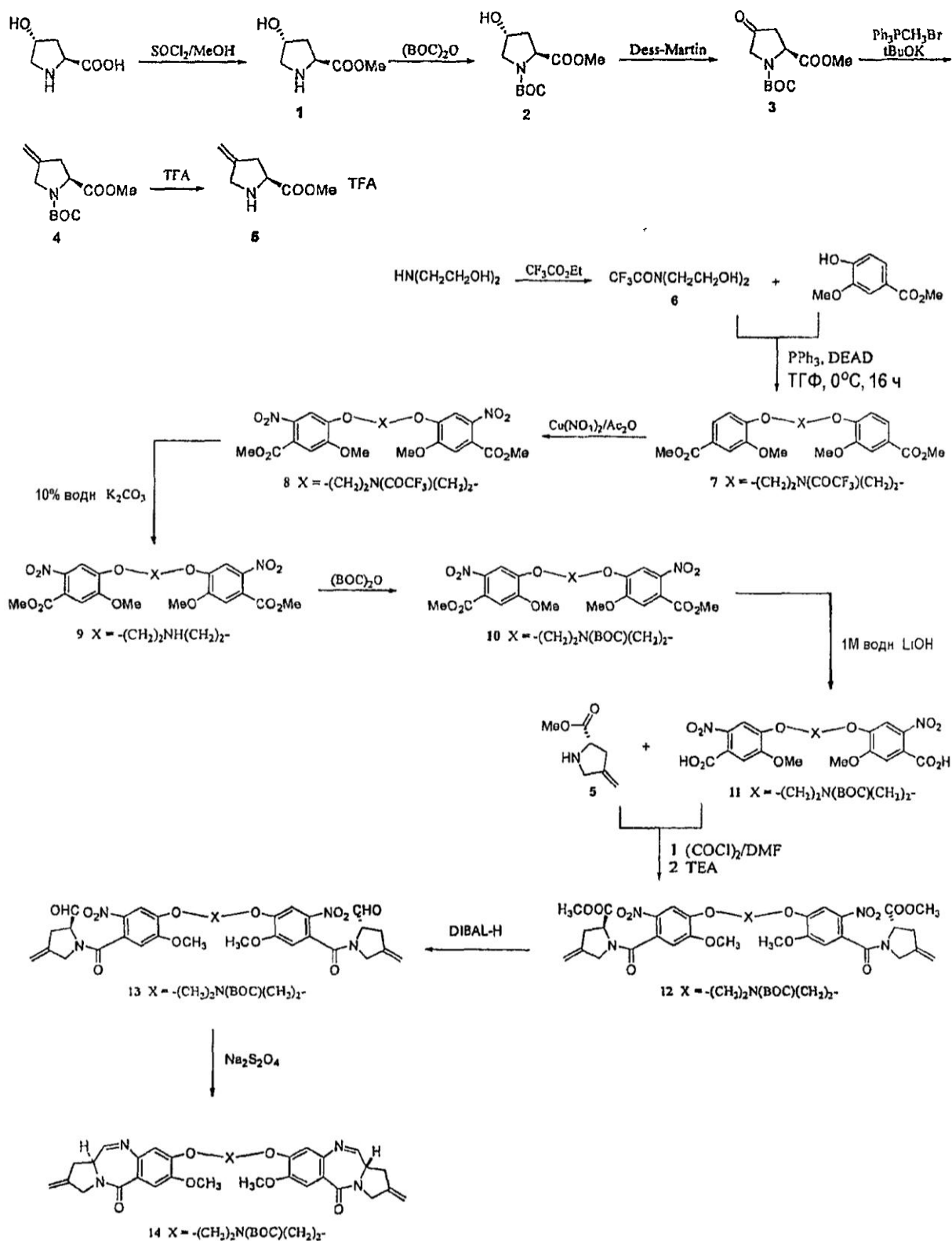


До розчину трифенілфосфіну (28 мг, 0,1 ммоль) в безводному ТГФ (0,3 мл) по краплях при 0°C додають діізопропілазодикарбоксилат (19 мкл, 0,09 ммоль). Після перемішування при 0°C протягом 35 хвилин додають розчин (11aS)-8-гідрокси-7-метокси-2-метилен-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-ону, сполука 5 (18 мг, 0,07 ммоль, випарений спільно з сухим бензолом і висушений у високому вакуумі протягом двох годин перед застосуванням) в сухому ТГФ (0,2 мл). Суміш продовжують перемішувати протягом 10 хвилин перед доданням 5-ацетилтіометил-1,3-біс(гідроксиметил)бензолу, сполука 6 (6,6 мг, 0,03 ммоль, спільно упареного з сухим бензолом і висушеного у високому вакуумі протягом двох годин перед застосуванням), в сухому ТГФ (0,2 мл). Реакційну суміш залишають для перемішування при 0°C протягом 35 хвилин. Баню лід/вода видаляють і розчин перемішують при кімнатній температурі протягом 21 години. Розчинники видаляють роторним випаровуванням у вакуумі. Залишок очищають флеш-хроматографією з отриманням неочищеного продукту, який далі очищають препаративною ВЕРХ (колонка C18, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$), отримуючи при цьому 0,7 мг 8,8'-[5-ацетилтіометил-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-он], сполука 7. МС (ESI, з H_2O): m/z 765,3 ($\text{M}+2\text{H}_2\text{ONa}^+$), 747,3 ($\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}^+$), 729,2 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 707,3 ($\text{M}+\text{H}^+$), 663,2 ($\text{M}-\text{Ac}^-$).

Приклад 13

трет-Бутиловий ефір біс-{2-[(S)-2-метилен-7-метокси-5-оксо-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-8-ілокси]етил}карбамінової кислоти

Схема 1



5 Сполука 1. Тіонілхлорид (5,6 мл, 76,3 ммоль) додають по краплях до сухого метанолу (76 мл) при -20°C з подальшим доданням транс-4-гідрокси-L-проліну (5,0 г, 38,1 ммоль). Суміші, що утворилася, дають можливість нагрітися до кімнатної температури (к. т.) і перемішують протягом 20 годин. Розчинник видаляють при зниженому тиску і залишок далі сушать у високому вакуумі, отримуючи при цьому метиловий ефір 1 транс-4-гідрокси-L-проліну у вигляді

білої твердої речовини. ^1H ЯМР (300 МГц, DMCO-d_6) δ 2,18-2,23 (м, 2H), 3,06 (м, 1H), 3,32-3,36 (м, 2H), 3,76 (с, 3H), 4,42 (ушир.с, 1H), 4,48 (дд, $J=5,4$, 8,1 Гц, 1H), 5,56 (ушир.с, 1H); EIMS m/z 146 ($[\text{M}]^+ + 1$).

Сполука 2. До розчину метилового ефіру 1 транс-4-гідрокси-L-проліну (4,48 г, 30,9 ммоль) і бікарбонату натрію (1,56 г, 18,5 ммоль) в безводному ДМФА (42 мл) додають розчин $(\text{BOC})_2\text{O}$ в ДМФА (20 мл) при 0°C в атмосфері аргону. Після перемішування протягом ночі при к. т. реакційну суміш гасять доданням 100 мл H_2O при 0°C і екстрагують EtOAc (4×80 мл). Об'єднаний органічний шар промивають насиченим розчином солі (100 мл), сушать (MgSO_4), фільтрують і концентрують роторним випарником. Залишок очищають флеш-хроматографією (силікагель, гексани/ EtOAc , 1:1), отримуючи при цьому метиловий ефір 2 N-BOC-захищеного транс-4-гідрокси-L-проліну у вигляді безбарвного масла. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , ротамери) δ 1,38 і 1,43 (2хс, 9H), 2,04-2,07 (м, 1H), 2,23-2,27 (м, 2H), 3,54-3,63 (м, 2H), 3,70 (с, 3H), 4,34-4,38 (м, 1H), 4,46 (ушир.с, 1H).

Сполука 3. (Franco Manfre, Jean-Marc Kern, and Jean-Francois Biellmann J. Org. Chem. 1992, 57, 2060-2065). Метиловий ефір N-BOC захищеного транс-4-гідрокси-L-проліну, сполука 2 (3,24 г, 13,2 ммоль), розчиняють в CH_2Cl_2 (132 мл) і розчин охолоджують до 0°C . Додають піридин і періодинат Десс-Мартіна (Dess-Martin) і перемішування продовжують доти, поки ТШХ не покаже, що SM не залишилося. Реакційну суміш розбавляють CH_2Cl_2 , промивають 10% водним $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (3×50 мл), 1н водним HCl (50 мл), насиченим водним NaHCO_3 (50 мл), насиченим розчином солі (50 мл), сушать над MgSO_4 , фільтрують і концентрують. Очищення залишку флеш-хроматографією (силікагель, гексани/ EtOAc , 7:3), отримуючи при цьому метиловий ефір 3 N-BOC-захищеного 4-оксо-L-проліну у вигляді світло-жовтого масла: ^1H ЯМР (300 МГц CDCl_3 , ротамери) δ 1,44 (с, 9H), 2,53-2,57 (м, 1H), 2,85-2,96 (м, 1H), 3,72 і 3,74 (2хс, 3H), 3,85-3,87 (м, 2H), 4,67-4,77 (м, 1H).

Сполука 4. (Kuei-Ying Lin, Mark Matteucci US 5414077). Розчин трет-бутоксиду калію (2,51 г, 22,3 ммоль) в безводному ТГФ (40 мл) додають до суспензії броміду метилтрифенілфосфонію (7,99 г, 22,3 ммоль) в ТГФ (40 мл) при 0°C . Жовту суспензію іліду, яка утворилася, перемішують при 0°C протягом 2 години перед доданням розчину метилового ефіру 3 N-BOC-захищеного 4-оксо-L-проліну (2,72 г 11,2 ммоль) в ТГФ (32 мл). Після перемішування при к.т. протягом 1 години реакційну суміш розбавляють EtOAc (100 мл), промивають H_2O (80 мл), насиченим розчином солі (80 мл), сушать (MgSO_4) і концентрують. Очищення залишку флеш-хроматографією (силікагель, гексани/ EtOAc , 9:1) дає метиловий ефір N-BOC-захищеного 4-метилен-L-проліну, сполука 4, у вигляді безбарвного масла: ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , ротамери) δ 1,40 і 1,45 (2хс, 9H), 2,58-2,62 (м, 1H), 2,88-2,98 (м, 1H), 3,69 і 3,70 (2хс, 3H), 4,03-4,06 (м, 2H), 4,36-4,49 (м, 1H), 4,97-4,99 (м, 2H); EIMS m/z 264 ($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

Сполука 5. Метиловий ефір N-BOC-захищеного 4-метилен-L-проліну, сполука 4 (0,8 г, 3,31 ммоль), розчиняють в CH_2Cl_2 (6,5 мл) і охолоджують до 0°C . По краплях додають розчин трифтороцтової кислоти (6,5 мл) в CH_2Cl_2 (6,5 мл) і суміш, що утворилася, перемішують при к.т. протягом 1,5 години. Після видалення летких розчинників роторним випарником коричневий залишок розчиняють в 10 мл H_2O , промивають Et_2O (3×5 мл). Водний розчин концентрують, концентрат далі сушить у високому вакуумі, отримуючи при цьому метиловий ефір 5 4-метилен-L-проліну у вигляді солі TFA: ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , ротамери) δ 2,83-2,87 (м, 1H), 3,05-3,11 (м, 1H), 3,80 і 3,81 (2хс, 3H), 4,00-4,10 (м, 2H), 4,55 (дд, $J=5,7$, 5,7 Гц, 1H), 5,17-5,21 (м, 2H); ^{13}C ЯМР δ 34,0, 49,1, 53,8, 59,3, 111,7, 137,6, 169,8; EIMS m/z 142 ($[\text{M}]^+ + 1$).

Сполука 6. (Kamal, A.; et al. J. Med. Chem. 2002, 45, 4679-4688). Диетаноламін (3,57 г, 34 ммоль) розчиняють в метанолі (20 мл) і розчин обробляють Et_3N (4,7 мл, 34 ммоль) і етилтрифторацетатом (4,90 г, 34 ммоль) протягом 20 годин при к.т. з подальшим доданням ще 1 мл CF_3COOEt . Через ще 20 годин видалення летких розчинників у високому вакуумі дає N-трифторацетилдиетаноламін, сполука 6, у вигляді світло-жовтого масла, яке застосовують без додаткового очищення.

Сполука 7. Діетилазодикарбоксилат (7,66 г, 44 ммоль) додають по краплях до перемішаного розчину метилванілату (7,30 г, 40,1 ммоль) і трифенілфосфіну (15,67 г, 59,7 ммоль) в безводному ТГФ (57 мл) при 0°C і суміш, що утворилася, перемішують протягом 1 години при такій температурі з подальшим доданням розчину N-трифторацетилдиетаноламіну 6 (7,30 г, 40,1 ммоль) в безводному ТГФ (20 мл). Після перемішування протягом ночі при к.т. реакцію гасять H_2O (100 мл) і екстрагують Et_2O (3×80 мл). Об'єднані шари Et_2O промивають насиченим розчином солі (100 мл), сушать (MgSO_4) і концентрують. Очищення залишку флеш-хроматографією (силікагель, гексани/ EtOAc , 8:2-7:3) дає N-трифторацетил-N,N-ди-[2-(4-метоксикарбоніл-2-метоксифенокс)етил]амін, сполука 7, у вигляді білої твердої речовини: ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 3,81 (с, 3H), 3,84 (с, 3H), 3,87 (с, 3H), 3,88 (с, 3H), 4,04-4,08 (м, 4H), 4,28-

4,32 (м, 4H), 6,84 і 6,85 (2хд, J=6,3 Гц, 2H), 7,50 і 7,51 (2хд, J=1,5 Гц, 2H), 7,61 (дд, J=1,5, 6,3 Гц, 2H).

Сполука 8. Твердий $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (2,33 г, 12,41 ммоль) додають до перемішаного розчину N-трифторацетил-N,N-ди-[2-(4-метоксикарбоніл-2-метоксифенокси)етил]аміну 7 (2,62 г, 4,96 ммоль) в оцтовому ангідриді (50 мл) при 0°C. Реакційну суміш перемішують при 0°C протягом 1 години і при к.т. протягом 2 годин, потім виливають в 200 мл суміші лід-вода. Перемішування продовжують протягом ще 1 години. Жовтий осад, що утворився, збирають фільтруванням. Додаткове очищення флеш-хроматографією (силікагель, гексани/EtOAc, 6:4) дає N-трифторацетил-N,N-ди-[2-(4-метоксикарбоніл-2-метокси-5-нітрофенілокси)етил]амін, сполука 8, у вигляді світло-жовтої твердої речовини: ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 3,86 (с, 3H), 3,88 (с, 3H), 3,886 (с, 3H), 3,890 (с, 3H), 4,04-4,09 (м, 4H), 4,30-4,35 (м, 4H), 6,98 і 6,99 (2хс, 2H), 7,37 і 7,40 (2хс, 2H).

Сполука 9. Розчин N-трифторацетил-N,N-ди-[2-(4-метоксикарбоніл-2-метокси-5-нітрофенілокси)етил]аміну 8 (2,58 г, 4,16 ммоль) в суміші ТГФ-MeOH (1:2, 48 мл) обробляють 10% водним K_2CO_3 (16 мл) при к.т. протягом 12 годин. Після видалення летких компонентів роторним випарником залишок розбавляють 100 мл H_2O , екстрагують EtOAc (3х100 мл). Об'єднані шари EtOAc промивають насиченим розчином солі (100 мл), сушать (MgSO_4) і концентрують, отримуючи при цьому N,N-ди-[2-(4-метоксикарбоніл-2-метокси-5-нітрофенілокси)етил]амін, сполука 9, у вигляді жовтої твердої речовини, яку застосовують без додаткового очищення: ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 3,17 (т, J=3,9 Гц, 4H), 3,89 (с, 6H), 3,93 (с, 6H), 4,19 (т, J=3,9 Гц, 4H), 7,05 (с, 2H), 7,47 (с, 2H).

Сполука 10. N,N-ди-[2-(4-метоксикарбоніл-2-метокси-5-нітрофенілокси)етил]амін, сполука 9 (неочищена, 4,16 ммоль), і NaHCO_3 (210 мг, 2,50 ммоль) суспендують в ТГФ і обробляють $(\text{BOC})_2\text{O}$ (999 мг, 4,58 ммоль) при 0°C і перемішування продовжують при к.т. протягом 3 годин. Після видалення ТГФ залишок розподіляють між H_2O і EtOAc (100/100 мл). Водний шар додатково екстрагують EtOAc (2х50 мл). Об'єднані шари EtOAc промивають насиченим розчином солі (80 мл), сушать (MgSO_4) і концентрують. Очищення залишку флеш-хроматографією (силікагель, гексани/EtOAc, 6:4), отримуючи при цьому N-трет-бутоксикарбоніл-N,N-ди-[2-(4-метоксикарбоніл-2-метокси-5-нітрофенілокси)етил]амін, сполука 10, у вигляді світло-жовтої твердої речовини: ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 1,44 (с, 9H), 3,77 (м, 4H), 3,83, 3,86 і 3,87 (3хс, 12H), 4,20 і 4,26 (2хт, J=3,9 Гц, 4H), 6,97 і 6,99 (2хс, 2H), 7,36 і 7,40 (2хс, 2H); EIMS m/z 646($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

Сполука 11. N-трет-Бутоксикарбоніл-N,N-ди-[2-(4-метоксикарбоніл-2-метокси-5-нітрофенілокси)етил]амін, сполука 10 (2,11 г 3,39 ммоль) суспендують в суміші ТГФ-MeOH- H_2O (3:1:1, 65 мл) і обробляють 1М водним LiOH (14 мл) при к.т. протягом 3 годин. Після видалення летких розчинників залишок розбавляють H_2O (25 мл). Водний розчин, що утворився, підкисляють до pH~1 концентрованою HCl. Осаджений N-трет-бутоксикарбоніл-N,N-ди-[2-(4-карбокси-2-метокси-5-нітрофенілокси)етил]амін, сполука 11, збирають фільтруванням, промивають H_2O і далі сушать у високому вакуумі: ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , ротамери) δ 1,39 (с, 9H), 3,70 (м, 4H), 3,88 і 3,89 (2хс, 6H), 4,29 (м, 4H), 7,29 і 7,31 (2хс, 2H), 7,63 (с, 2H), 13,60 (ушир.с, 2H); ^{13}C ЯМР δ 27,8, 46,2 і 46,6, 56,3 і 56,4, 67,2, 79,2, 107,9 і 108,0, 111,3, 141,4, і 141,5, 149,1, 151,7, 154,5, 165,9; HRMS m/z обчислене для $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{Na}$ 618,1547, знайдене 618,1552 ($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

Сполука 12. Каталітичну кількість ДМФА (2 краплі) додають до розчину N-трет-бутоксикарбоніл-N,N-ди-[2-(4-карбокси-2-метокси-5-нітрофенілокси)етил]аміну 11 (194 мг, 0,33 ммоль) і оксалілхлориду (72,7 мкл, 0,81 ммоль) в безводному ТГФ (6,5 мл) і суміш, що утворилася, перемішують при к.т. протягом ночі. Надмірний ТГФ і оксалілхлорид видаляють роторним випарником. Ацилхлорид знов суспендують в свіжому ТГФ (4 мл) і додають по краплях до розчину метилового ефіру 4-метилєн-L-проліну 5 (206,7 мг, 0,81 ммоль), Et_3N (0,19 мл, 1,39 ммоль) і H_2O (0,4 мл) в ТГФ (1 мл) при 0°C в атмосфері аргону. Реакційній суміші дають можливість нагрітисся до к.т. і перемішування продовжують протягом 2 годин. Після видалення ТГФ залишок розподіляють між H_2O і EtOAc (10/10 мл). Водний шар додатково екстрагують EtOAc (2х8 мл). Об'єднані органічні шари промивають насиченим розчином солі (10 мл), сушать (MgSO_4) і концентрують. Очищення залишку флеш-хроматографією (силікагель, гексани/EtOAc, 2:8) дає трет-бутиловий ефір 12 біс-{2-[5-метокси-2-нітро-4-[(S)-4-метилєн-2-метоксикарбоніл-1-піролідинілкарбоніл]фенілокси]етил}карбаїнової кислоти у вигляді світло-жовтого масла (ротамери): ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , ротамери) δ 1,46 (с, 9H), 2,68-2,75 (м, 2H), 2,99-3,10 (м, 2H), 3,60-4,28 (м, 24H), 4,56-5,12 (м, 6H), 6,78-6,83 (м, 2H), 7,63-7,71 (м, 2H); EIMS m/z 864 ($[\text{M}]^+ + \text{Na}$).

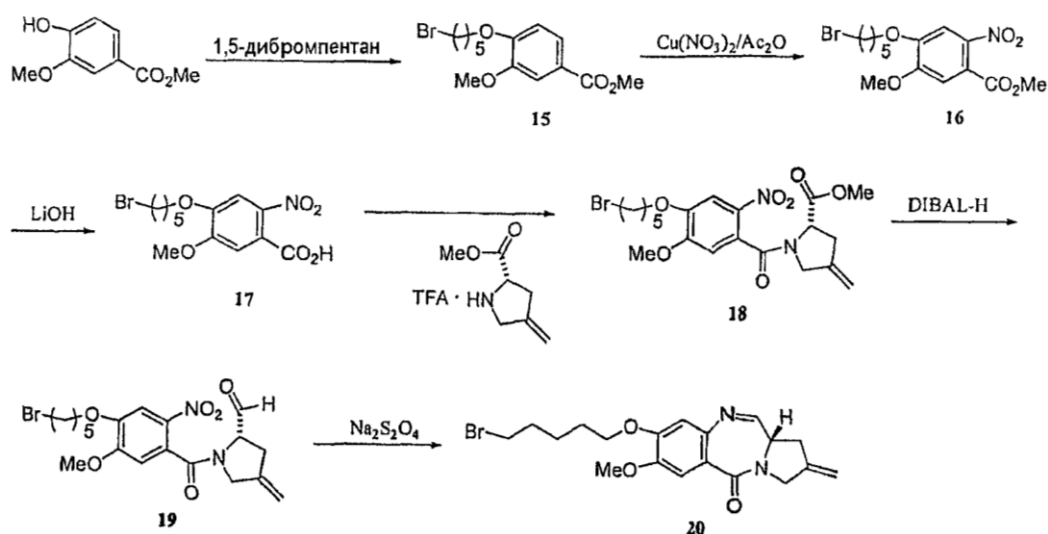
Сполука 13. До енергійно перемішаного розчину трет-бутилового ефіру 12 біс-{2-[5-метокси-2-нітро-4-[(S)-4-метилєн-2-метоксикарбоніл-1-піролідинілкарбоніл]фєнілокси]єтил}карбамінової кислоти (100 мг, 0,12 ммоль) в безводному толуолі (2,4 мл) додають по краплях розчин DIBAL-H (480 мкл 1М розчини в толуолі) при -78°C в атмосфері аргону. Після перемішування суміші протягом додаткових 45 хв. надмірний реагент розкладають доданням п'яти крапель метанолу з подальшим доданням 5% HCl (4 мл). Суміші, що утворилася, дають можливість нагрітися до 0°C. Шари розділяють і водний шар додатково екстрагують CH₂Cl₂ (3×3 мл). Об'єднані органічні шари промивають насиченим розчином солі, сушать (MgSO₄) і концентрують. Очищення залишку флєш-хроматографією (силікагель, CHCl₃/MeOH, 95:5) дає трет-бутиловий ефір 13 біс-{2-[5-метокси-2-нітро-4-[(S)-4-метилєн-2-форміл-1-піролідинілкарбоніл]фєнілокси]єтил}карбамінової кислоти у вигляді світло-жовтого масла (84 мг, 91%).

Сполука 14. Суміш трет-бутилового ефіру 13 біс-{2-[5-метокси-2-нітро-4-[(S)-4-метилєн-2-форміл-1-піролідинілкарбоніл]фєнілокси]єтил}карбамінової кислоти (180 мг, 0,23 ммоль), Na₂S₂O₄ (1,84 ммоль, 8 екв.), 3,5 мл ТГФ і 2,2 мл H₂O перемішують при к.т. протягом 20 годин. Розчинники видаляють у високому вакуумі. Залишок ресуспендують в MeOH (30 мл) і по краплях додають AcCl до досягнення pH~2. Суміш, яка утворилася, перемішують при к.т. протягом 1 години. Реакційну суміш обробляють видаленням більшої частини MeOH, потім розбавленням EtOAc (25 мл). Розчин в EtOAc промивають насиченим водним NaHCO₃, насиченим розчином солі, сушать (MgSO₄) і концентрують. Очищення залишку флєш-хроматографією (силікагель, CHCl₃/MeOH, 97/3) дає трет-бутиловий ефір 14 біс-{2-[(S)-2-метилєн-7-метокси-5-оксо-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-8-илокси]єтил}карбамінової кислоти у вигляді білої твердої речовини (86 мг, 50%).

Приклад 14

(11aS)-7-(5-бромпєтилокси)-2-метилєн-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он

Схема 2



Сполука 15. До розчину метилванілату (9,109 г, 50 ммоль) в ацетоні (200 мл) додають K₂CO₃ (27,64 г, 200 ммоль) і 1,5-дибромпєтан (20,4 мл, 150 ммоль). Суміш, що утворилася, нагрівають для кип'ятіння із зворотним холодильником. Через 6 годину ТШХ показує відсутність вихідної сполуки. Суміш охолоджують до к.т. і тверду речовину видаляють фільтруванням. Фільтрат концентрують. Очищення флєш-хроматографією (силікагель, гексани/EtOAc, 8:2) дає метиловий ефір 15 4-(5-бромпєтилокси)-3-метоксибензойної кислоти у вигляді білої твердої речовини (13,65 г, 82%). ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 1,60-1,66 (м, 2H) 1,85 1,97 (м, 4H), 3,42 (т, J=5,0 Гц, 2H), 3,87 (с, 3H), 3,89 (с, 3H), 4,06 (т, J=5,0 Гц, 2H), 6,85 (д, J=6,3 Гц, 1H), 7,52 (д, J=1,5 Гц, 1H), 7,63 (дд, J=6,3, 1,5 Гц, 1H); EIMS m/z 353 і 355 ([M]⁺+Na).

Сполука 16. Твердий Cu(NO₃)₂·xH₂O (3,64 г, 19,42 ммоль) додають до перемішаного розчину метилового ефіру 15 4-(5-бромпєтилокси)-3-метоксибензойної кислоти (5,36 г, 16,18 ммоль) в оцтовому ангідриді (81 мл) при 0°C. Реакційну суміш перемішують при 0°C протягом 1 години і при к.т. протягом 2 годин, потім виливають в 200 мл суміші лід-вода. Перемішування

продовжують протягом ще 1 години. Жовтий осад, що утворився, збирають фільтруванням і промивають водою. Додаткове висушування у високому вакуумі дає метиловий ефір 4-(5-бромпентилокси)-5-метокси-2-нітробензойної кислоти, сполука 16, у вигляді світло-жовтої твердої речовини (5,98 г), яку застосовують безпосередньо в наступній стадії. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 1,59-1,70 (м, 2H), 1,85-1,98 (м, 4H), 3,43 (т, J=5,1 Гц, 2H), 3,89 (с, 3H), 3,94 (с, 3H), 4,08 (т, J=4,8 Гц, 2H), 7,05 (с, 1H), 7,42 (с, 1H). EIMS m/z 398 і 400 ([M]⁺+Na).

Сполука 17. Метиловий ефір 16 4-(5-бромпентилокси)-5-метокси-2-нітробензойної кислоти (5,98 г, 15,9 ммоль) суспендують в суміші ТГФ-МеОН-Н₂O (3:1:1, 157 мл) і обробляють 1М водним LiOH (31 мл) при к.т. протягом 5 години. Після видалення летких розчинників залишок розбавляють Н₂O (70 мл). Водний розчин, що утворився, підкисляють до рН~2 концентрованою HCl. Осаждену 4-(5-бромпентилокси)-5-метокси-2-нітробензойну кислоту 17 збирають фільтруванням, промивають Н₂O і далі сушать у високому вакуумі (5,47 г). ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 1,64-1,68 (м, 2H), 1,87-1,98 (м, 4H), 3,43 (т, J=4,8 Гц, 2H), 4,08 (с, 3H), 4,10 (т, J=5,1 Гц, 2H), 7,21 (с, 1H), 7,35 (с, 1H), 13,60 (ушир.с, 1H); EIMS m/z 384 і 386 ([M]⁺+Na).

Сполука 18. Каталітичну кількість ДМФА (2 краплі) додають до розчину 4-(5-бромпентилокси)-5-метокси-2-нітробензойної кислоти 17 (270 мг, 0,74 ммоль) і оксалілхлориду (80 мкл, 0,89 ммоль) в безводному ТГФ (7,5 мл) і суміш, що утворилася, перемішують при к.т. протягом ночі. Надмірний ТГФ і оксалілхлорид видаляють роторним випарником. Ацетилхлорид знов суспендують в свіжому ТГФ (6 мл) і додають по краплях до розчину метилового ефіру 5 4-метилєн-L-проліну (228 мг, 0,89 ммоль), Et₃N (0,32 мл, 2,31 ммоль) і Н₂O (0,15 мл) в ТГФ (1,5 мл) при 0°C в атмосфері аргону. Реакційній суміші дають можливість нагрітися до к.т. і перемішування продовжують протягом 4 годин. Після видалення ТГФ залишок розподіляють між Н₂O і EtOAc (20/20 мл). Водний шар додатково екстрагують EtOAc (3×10 мл). Об'єднані органічні шари промивають насиченим розчином солі (20 мл), сушать (MgSO₄) і концентрують. Очищення залишку флеш-хроматографією (силікагель, гексани/EtOAc, 6:4) дає метиловий ефір 1-[4-(5-бромпентилокси)-5-метокси-2-нітробензоїл]-4-метилєн-L-проліну 18 у вигляді світло-жовтого масла (ротамери). ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃, ротамери) δ 1,62-1,68 (м, 2H), 1,86-1,98 (м, 4H), 2,64-2,75 (м, 1H), 2,99-3,08 (м, 1H), 3,43 (т, J=5,1 Гц, 2H), 3,59-3,96 (м, 7H), 4,05-4,21 (м, 3H), 4,57-4,61 і 4,90-5,12 (м, 3H), 6,80 і 6,83 (2с, 1H), 7,64 і 7,67 (2с, 1H); EIMS m/z 507 і 509 ([M]⁺+Na).

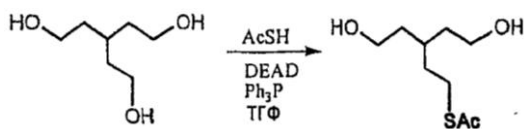
Сполука 19. До енергійно перемішаного розчину метилового ефіру 18 1-[4-(5-бромпентилокси)-5-метокси-2-нітробензоїл]-4-метилєн-L-проліну (61 мг, 0,12 ммоль) в суміші безводний толуол-CH₂Cl₂ (3:1, 2,5 мл) по краплях додають розчин DIBAL-H (188 мкл 1М розчину в толуолі) при -78°C в атмосфері аргону. Після перемішування суміші протягом додаткових 45 хв. надмірний реагент розкладають доданням трьох крапель метанолу з подальшим доданням 5% HCl (2 мл). Суміші, що утворилася, дають можливість нагрітися до 0°C. Шари розділяють і водний шар додатково екстрагують CH₂Cl₂ (3×2 мл). Об'єднані органічні шари промивають насиченим розчином солі і сушать (MgSO₄) і концентрують. Очищення залишку флеш-хроматографією (силікагель, гексани/EtOAc, 1:1) дає (S)-1-[4-(5-бромпентилокси)-5-метокси-2-нітробензоїл]-4-метилєн-2-піролідінкарбоксальдегід 19 у вигляді світло-жовтого масла (44 мг, 80%).

Сполука 20. Суміш (S)-1-[4-(5-бромпентилокси)-5-метокси-2-нітробензоїл]-4-метилєн-2-піролідінкарбоксальдегіду 19 (43,7 мг, 0,096 ммоль), Na₂S₂O₄ (0,58 ммоль, 6 екв.), 1,5 мл ТГФ і 0,9 мл Н₂O перемішують при к.т. протягом 18 години. Розчинники видаляють у високому вакуумі. Залишок знов суспендують в МеОН (6 мл) і по краплях додають AcCl до досягнення рН~2. Суміш, яка утворилася, перемішують при к.т. протягом 1 години. Реакційну суміш обробляють видаленням більшої частини МеОН, потім розбавленням EtOAc (20 мл). Розчин в EtOAc промивають насиченим водним NaHCO₃, насиченим розчином солі, сушать (MgSO₄) і концентрують. Очищення залишку флеш-хроматографією (силікагель, CHCl₃/МеОН, 98/2) дає (11aS)-7-(5-бромпентилокси)-2-метилєн-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-он 20 у вигляді світло-жовтого масла (31 мг, 74%): ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 1,58-1,66 (м, 2H), 1,84-1,99 (м, 4H), 2,91 2,95 (м, 1H), 3,08-3,14 (м, 1H), 3,42 (т, J=5,1 Гц, 2H), 3,93 (с, 3H), 3,87-4,27 (м, 5H), 5,15 (ушир.с, H), 5,18 (ушир.с, 1H), 6,84 (с, 1H), 7,49 (с, 1H), 7,71 (д, J=4,0 Гц, 1H); EIMS m/z 429 і 431 ([M]⁺+Na).

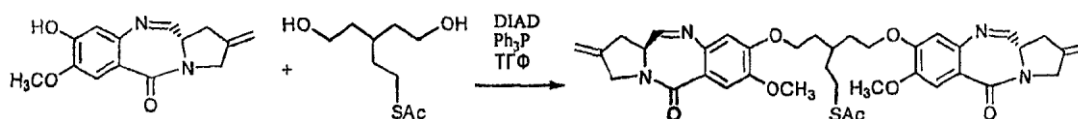
Сполука 20 можна потім поєднувати з PBD-частиною, отриманою як в прикладі 11, з отриманням сполуки винаходу.

Приклад 15

8,8'-[3-(2-ацетиліоетил)-1,5-пентандіілбіс(окси)]-1-біс[(S)-2-метилєн-7-метокси-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-он]



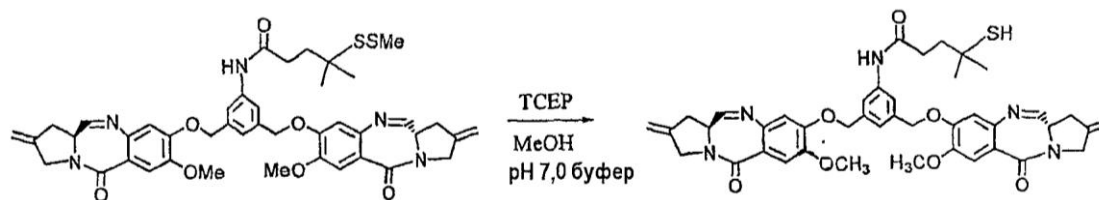
До розчину трифенілфосфіну (1,77 г, 6,8 ммоль) в безводному ТГФ (15 мл) додають діетилазодикарбоксилат (2,2М в толуолі, 2,4 мл, 5,4 ммоль) при 0°C. Після перемішування при 0°C протягом 55 хвилин по краплях додають розчин 3-(2-гідроксіетил)пентан-1,5-діолу (740 мг, 5 ммоль) і тіооцтової кислоти (335 мкл, 4,5 ммоль) в сухому ТГФ (7 мл). Через 1 годину баню лід/вода видаляють і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Розчинники видаляють роторним випаровуванням у вакуумі. Залишок очищають флеш-хроматографією (CHCl₃/MeOH, 20:1, 15:1, 10:1, 4:1), отримуючи при цьому 3-(2-ацетилтіоетил)пентан-1,5-діол у вигляді білої твердої речовини (350 мг), і виділяють вихідний триол (406 мг). ¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃): δ 3,65-3,63 (м, 4H), 3,45 (ушир.с, 2H), 2,84-2,80 (м, 2H), 2,28 (с, 3H), 1,73-1,67 (м, 1H), 1,55-1,49 (м, 6H). МС (ESI): m/z 229,0 (M+Na)⁺.



До розчину трифенілфосфіну (53 мг, 0,2 ммоль) в безводному ТГФ (0,4 мл) при 0°C по краплях додають діізопропілазодикарбоксилат (36 мкл, 0,17 ммоль). Після перемішування при 0°C протягом 25 хвилин додають розчин (11aS)-8-гідрокси-7-метокси-2-метилен-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-ону, мономера PBD (38 мг, 0,14 ммоль, упарений разом з сухим бензолом і висушений у високому вакуумі протягом двох годин перед застосуванням), в сухому ТГФ (0,2 мл). Суміш продовжують перемішувати протягом 10 хвилин перед доданням тіоацетатної сполуки (12 мг, 0,058 ммоль, упареної разом з сухим бензолом і висушеної у високому вакуумі протягом двох годин перед застосуванням) в сухому ТГФ (0,2 мл). Реакційну суміш залишають для перемішування при 0°C протягом 35 хвилин. Баню лід/вода видаляють і розчин перемішують при кімнатній температурі протягом 12 годин. Розчинники видаляють роторним випаровуванням у вакуумі. Залишок очищають флеш-хроматографією (CHCl₃/MeOH, 100:1, 50:1, 25:1, 20:1), отримуючи при цьому 8,8'-[3-(2-ацетилтіоетил)-1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-он] (19 мг, вихід=47%). ¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃): δ 7,66 (д, J=4,4 Гц, 2H), 7,46 (с, 2H), 6,78 (с, 2H), 5,17 (с, 2H), 5,14 (с, 2H), 4,26 (с, 4H), 4,17-4,09 (м, 4H), 3,88 (с, 6H), 3,87-3,83 (м, 2H), 3,13-3,06 (м, 2H), 2,94-2,90 (м, 4H), 2,29 (с, 3H), 1,95 (ушир.с, 3H), 1,68 (ушир.с, 4H). МС (ESI, з H₂O): m/z 745,3 (M+2H₂O+Na)⁺, 727,3 (M+H₂O+Na)⁺, 709,2 (M+Na)⁺.

Приклад 16

8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати, як зазначено нижче

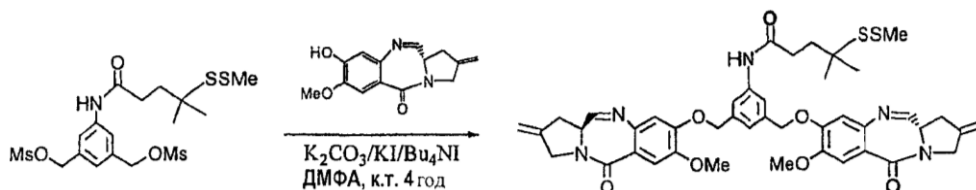


До суспензії гідрохлориду трис-(2-карбоксіетил)фосфіну (TCEP, 52 мг, 0,18 ммоль) у воді (0,3 мл) додають по краплях насичений бікарбонат натрію (~0,6 мл) до встановлення pH 6~7. Потім до неї додають фосфатний буфер (pH 7,0, 10 мМ, Na₂HPO₄/H₃PO₄, 0,5 мл). Даний отриманий розчин TCEP додають до суміші 8,8'-[5-(N-4-метилдитіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-ону] (29 мг, 0,036 ммоль) в метанолі (2,2 мл) і суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 3 годин. Реакційну суміш гасять фосфатним буфером (pH 6,5) і екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні шари промивають насиченим розчином солі, сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і розчинники видаляють при зниженому тиску, отримуючи при цьому білу тверду речовину. Тверду речовину розчиняють в суміші

дихлорметан/MeOH (2:1) і знов упарюють. Додають дихлорметан і випарюють. Залишок витримують у високому вакуумі і очищають хроматографією на колонці C18 із оберненою фазою {CH₃CN/H₂O, тверду речовину розчиняють в суміші CH₃CN/H₂O (3:1, 2 мл) і перемішують протягом 30 хвилин перед завантаженням в колонку}, отримуючи при цьому 8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноат)аміно-1,3-бензолдіїлбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] (11 мг) у вигляді білої твердої речовини (метод Н).

МС (ESI): m/z -786,3 MNa⁺
 m/z =804,2MNa⁺+H₂O

8,8'-[5-(N-4-Метилдітіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіїлбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати таким чином:

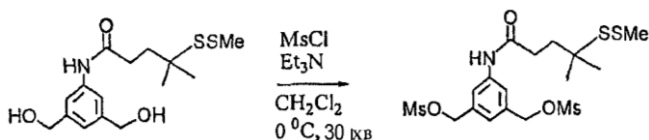


До розчину 5-(N-метилдітіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-біс(мезилоксиметил)бензолу (89 мг, 0,18 ммоль), розчиненому в безводному ДМФА (2 мл) додають 8-гідрокси-7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он (93 мг, 0,36 ммоль), порошок карбонату калію (100 мг, 0,72 ммоль), порошок йодиду калію (15 мг, 0,09 ммоль) і йодид тетрабутиламонію (13 мг, 0,036 ммоль) при кімнатній температурі. Після перемішування суміші протягом однієї години додають другу порцію 8-гідрокси-7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону (22 мг, 0,085 ммоль). Розчин продовжують перемішувати при кімнатній температурі протягом ще 3 годин. Реакційну суміш потім гасять водою і розбавляють дихлорметаном. Органічний шар відділяють і водний шар екстрагують дихлорметаном. Об'єднаний органічний шар промивають насиченим розчином солі, сушать над безводним сульфатом натрію. Його фільтрують і фільтрат упарюють при зниженому тиску з подальшим витриманням у високому вакуумі для видалення залишкового ДМФА. Залишок потім очищають на колонці C18 із оберненою фазою (CH₃CN/H₂O), отримуючи при цьому 8,8'-[5-(N-4-метилдітіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіїлбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] (29 мг) у вигляді білої твердої речовини (метод Н).

МС (ESI): m/z =832,2 MNa⁺
 m/z =850,2 MNa⁺+H₂O

¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): 7,67 (ушир.с, 2H), 7,58-7,26 (м, 5H), 6,82 (с, 2H), 5,21-5,14 (м, 8H), 4,30 (с, 4H), 4,02-3,88 (м, 9H), 3,16-3,10 (м, 2H), 2,97-2,93 (м, 2H), 2,45-2,40 (м, 5H), 2,09-2,03 (м, 2H), 1,34 (с, 6H).

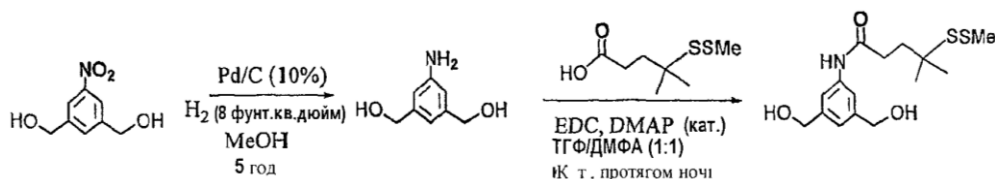
5-(N-4-Метилдітіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-біс(мезилоксиметил)бензол можна отримати таким чином:



До суспензії 5-(N-4-метилдітіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-біс(гідроксиметил)бензолу (329 мг, 1,0 ммоль) в безводному дихлорметані (7 мл) додають триетиламін (348 мкл, 2,5 ммоль) з подальшим доданням по краплях протягом 10 хвилин при -2°C метансульфонілхлориду (193 мкл, 2,5 ммоль). Розчин перемішують при 0°C протягом ще 30 хвилин і потім гасять сумішшю льоду і води. Суміш екстрагують холодним дихлорметаном і об'єднані шари дихлорметану промивають холодною водою, сушать над безводним сульфатом натрію. Шар фільтрують і фільтрат упарюють роторним випаровуванням у вакуумі. Залишок швидко очищають на короткій колонці з силікагелем (дихлорметан/гексани/етилацетат, 1:2:4), отримуючи при цьому 5-(N-4-метилдітіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-біс(мезилоксиметил)бензол у вигляді безбарвного масла (410 мг).

MC (ESI): $m/z=508,0 \text{ MNa}^+$
 $m/z=483,9 \text{ M-H}$
 $m/z=519,9 \text{ M-H}+2\text{H}_2\text{O}$

5-(N-4-Метилдитіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати таким чином



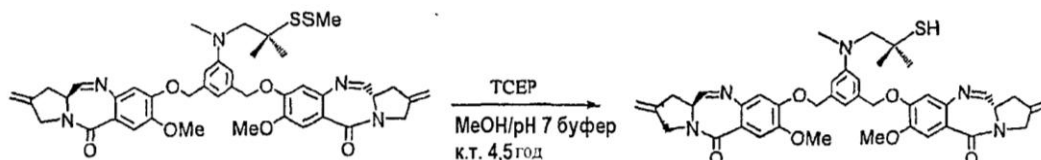
До розчину 5-нітро-м-ксилол- α,α' -діолу (890 мг, 5,4 ммоль) в метанолі (50 мл) додають Pd/C (10%, 287 мг). В систему вводять водень і суміш гідрують під тиском (H_2 , 5~8 фунт/кв.дюйм) протягом 5 годин при кімнатній температурі. Розчин фільтрують через целіт і фільтрат упарюють роторним випаровуванням у вакуумі, отримуючи при цьому 5-аміно-м-ксилол- α,α' -діол, який потім розчиняють в суміші ТГФ (10 мл)/ДМФА (15 мл). При кімнатній температурі додають 4-метилдитіо-4,4-диметилбутанову кислоту (1,05 г, 5,4 ммоль), розчинену в ТГФ (5 мл), з подальшим доданням гідрохлориду 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодііміду (2,1 г, 10,8 ммоль) і 4-диметиламінопіридину (66 мг, 0,54 ммоль). Отриману суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі, потім гасять 10% хлоридом амонію, екстрагують етилацетатом, промивають і сушать. Екстракт фільтрують і розчинники видаляють роторним випаровуванням у вакуумі. Залишок очищають флеш-хроматографією ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 15:1, 10:1, 7:1), отримуючи при цьому 5-(N-4-метилдитіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-біс(гідроксиметил)бензол у вигляді білої твердої речовини (729 мг).

MC (ESI): $m/z=352,1 \text{ MNa}^+$

^1H ЯМР (400 Гц, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ в м. ч.): 7,47 (с, 2H), 7,10 (с, 1H), 4,58 (с, 4H), 2,52-2,47 (м, 2H), 2,42 (с, 3H), 2,02-1,98 (м, 2H), 1,34 (с, 6H).

Приклад 17

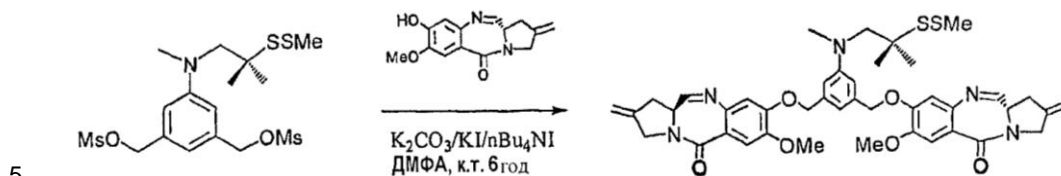
8,8'-[5-(N-метил-N-(2-меркапто-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси))-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]] можна отримати таким чином



До суспензії гідрохлориду трис-(2-карбоксіетил)фосфіну (TCEP, 64 мг, 0,22 ммоль) у воді (0,05 мл) додають по краплях насичений бікарбонат натрію (~0,7 мл) до встановлення pH 6~7. Потім до неї додають фосфатний буфер (pH 7,0, 10 мМ, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, 0,8 мл). Даний отриманий розчин TCEP додають до суміші 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси))-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону]] (35 мг, 0,045 ммоль) в метанолі (5 мл) і суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 4,5 години. Реакцію гасять фосфатним буфером (pH 6,5) і екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні шари промивають насиченим розчином солі, сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і розчинники видаляють при зниженому тиску, отримуючи при цьому білу тверду речовину. Тверду речовину розчиняють в суміші дихлорметан/MeOH (2:1) і знов упарюють. Додають і випарюють дихлорметан. Залишок витримують у високому вакуумі і очищають на колонці C18 із оберненою фазою ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, тверду речовину розчиняють в суміші $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (3:1, 2 мл) і перемішують протягом 30 хвилин перед завантаженням в колонку}, отримуючи при цьому 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-меркапто-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси))-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]] (10,5 мг, вихід=32%) у вигляді білої твердої речовини (метод Н).

MC (ESI): $m/z=758,2 \text{ MNa}^+$
 $m/z=776,2 \text{ MNa}^++\text{H}_2\text{O}$
 $m/z=794,3 \text{ MNa}^++2\text{H}_2\text{O}$

8,8'-[5-(N-Метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси))-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]] можна отримати таким чином:

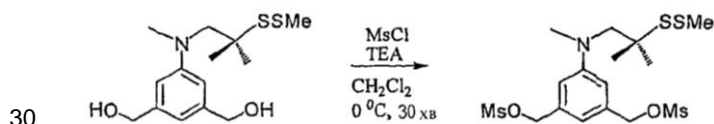


До розчину 5-(N-метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-біс(мезилоксиметил)бензолу (105 мг, 0,23 ммоль) в безводному ДМФА (2,5 мл) додають 8-гідрокси-7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он (119 мг, 0,46 ммоль), порошок карбонату калію (127 мг, 0,92 ммоль), порошок йодиду калію (20 мг, 0,12 ммоль) і йодид тетрабутиламонію (17 мг, 0,046 ммоль) при кімнатній температурі. Після перемішування суміші протягом 1,5 години, додають другу порцію 8-гідрокси-7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону (23 мг, 0,089 ммоль). Розчин продовжують перемішувати при кімнатній температурі протягом ще 4,5 години. Реакцію потім гасять водою і розбавляють дихлорметаном. Органічний шар відділяють і водний шар екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні шари промивають насиченим розчином солі і сушать над безводним сульфатом натрію. Розчин фільтрують і фільтрат упарюють при зниженому тиску, потім сублімують у високому вакуумі для видалення залишкового ДМФА. Залишок суспендують в суміші CH₃CN/H₂O (10:1) і фільтрують. Фільтрат упарюють і неочищений продукт очищають на колонці C18 із оберненою фазою (CH₃CN/H₂O), отримуючи при цьому 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси))-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]] (39 мг) у вигляді білої твердої речовини (метод Н).

МС (ESI): m/z=804,2 MNa⁺
m/z=822,2 MNa⁺+H₂O
m/z=840,2 MNa⁺+2H₂O

¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): 7,64 (ушир.с, 2H), 7,50 (с, 2H), 6,83-6,76 (м, 5H), 5,18-5,10 (м, 8H), 4,27 (с, 4H), 3,95 (с, 6H), 3,90-3,84 (м, 3H), 3,51 (с, 2H), 3,13-3,07 (м, 2H), 3,01 (с, 3H), 2,94-2,90 (м, 2H), 2,41 (с, 3H), 1,30 (с, 6H).

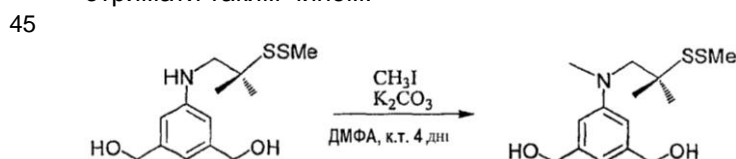
5-(N-Метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-біс(мезилоксиметил)бензол можна отримати таким чином:



До розчину 5-(N-метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-біс(гідроксиметил)бензолу (135 мг, 0,45 ммоль) в безводному дихлорметані (3 мл) додають триетиламін (153 мкл, 1,1 ммоль) з подальшим доданням по краплях протягом 10 хвилин при -2°С метансульфонілхлориду (87 мкл, 1,1 ммоль). Розчин перемішують при 0°С протягом ще 30 хвилин і потім гасять сумішшю лід/воду. Суміш екстрагують холодним дихлорметаном і об'єднані шари дихлорметану промивають холодною водою і сушать над безводним сульфатом натрію. Екстракт потім фільтрують і фільтрат упарюють роторним випаровуванням у вакуумі. Залишок очищають на пластинці препаративною ТШХ (гексани/етилацетат, 1:1,5), отримуючи при цьому 5-(N-метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-біс(мезилоксиметил)бензол у вигляді безбарвного масла (105 мг).

МС (ESI): m/z=480,0 MNa⁺

5-(N-Метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати таким чином:

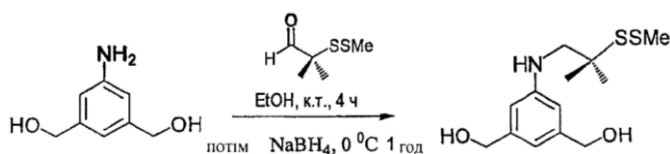


До розчину 5-(N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-біс(гідроксиметил)бензолу (226 мг, 0,78 ммоль) в ДМФА (4 мл) додають йодметан (149 мкл, 2,4 ммоль) з подальшим доданням порошку карбонату калію (108 мг, 0,78 ммоль). Після перемішування при кімнатній температурі протягом 4 днів суміш гасять насиченим хлоридом амонію і потім розбавляють дихлорметаном. Органічний шар відділяють і водний шар екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні шари промивають насиченим розчином солі, сушать над безводним сульфатом натрію. Розчин фільтрують і фільтрат упарюють при зниженому тиску. Залишок очищають флеш-хроматографією (гексани/етилацетат, 1:2), отримуючи при цьому 5-(N-метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-біс(гідроксиметил)бензол у вигляді безбарвної піни (152 мг).

МС (ESI): $m/z=324,1 \text{ MNa}^+$

^1H ЯМР (400 Гц, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ в м. ч.): 6,70 (с, 2H), 6,66 (с, 1H), 4,06 (с, 4H), 3,54 (с, 2H), 3,04 (с, 3H), 2,46 (с, 3H), 1,37 (с, 6H).

5-(N-(2-Метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати таким чином:

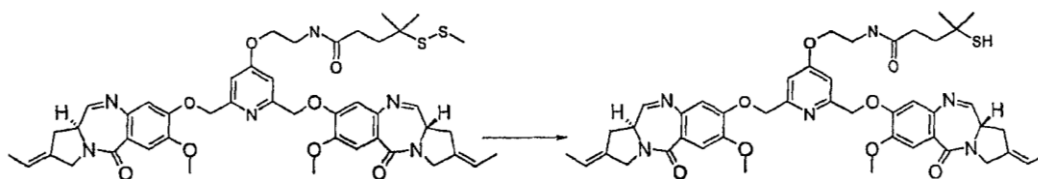


До розчину 5-аміно-1,3-бісгідроксиметилбензолу (765 мг, 5 ммоль) в абсолютному етанолі (25 мл) додають 2-(метилдитіо)ізобутиральдегід (751 мг, 5 ммоль). Після перемішування при кімнатній температурі протягом 4 годин розчин охолоджують до 0°C банею лід/вода і додають боргідрид натрію (220 мг, 5,8 ммоль). Суміш продовжують перемішувати при 0°C протягом однієї години і потім гасять холодною 5% хлористоводневою кислотою і розбавляють дихлорметаном. Додають насичений бікарбонат натрію, щоб зробити розчин слабко основним. Органічний шар відділяють і водний шар екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні шари промивають насиченим розчином солі, сушать над безводним сульфатом натрію. Розчин фільтрують і фільтрат упарюють при зниженому тиску. Залишок очищають флеш-хроматографією ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 15:1, 10:1), отримуючи при цьому 5-(N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-біс(гідроксиметил)бензол у вигляді безбарвного масла (832 мг).

МС (ESI): $m/z=310,0 \text{ MNa}^+$

Приклад 18

8,8'-[(4-(2-(4-меркапто-4-метил)пентанамідоетокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати таким чином:



До розчину 8,8'-[(4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] (60 мг) в метанолі (1,6 мл) додають ДМФА (0,2 мл) і розчин гідрохлориду трис-(2-карбоксіетил)фосфіну (48 мг) в 0,2 мл води. Реакційну суміш перемішують протягом 18 годин при кімнатній температурі і розчинник видаляють у вакуумі, отримуючи при цьому залишок, який очищають хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioFlash, 10 г, Si60, 15-40 мкм) із застосуванням градієнтного елювання сумішшю метанол(А)/дихлорметан/ацетонітрил, 9:1, (В) (градієнт: від 100% В до 10% А: 90% В), отримуючи при цьому 8,8'-[(4-(2-(4-меркапто-4-метил)пентанамідоетокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] (17 мг).

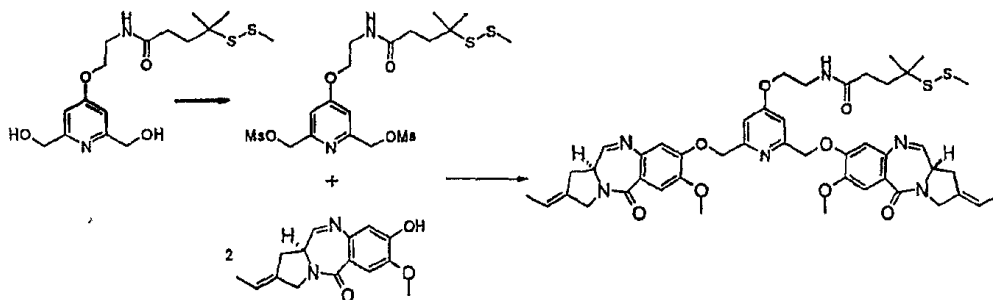
РХ/МС (метод А1, ZQ):

ES: $m/z=855 \text{ MH}^+ + \text{H}_2\text{O}$

$m/z=837 \text{ MH}^+$

Час утримування=3,70 хвилини.

8,8'-[(4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати таким чином:



5

До охолодженого (0°C) розчину 4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину (360 мг) і триетиламіну (810 мкл) в дихлорметані (4 мл) додають розчин метансульфонілхлориду (298 мкл) в дихлорметані (4 мл). Через 2 години додають воду. Шари розділяють і водний шар двічі екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні розчини сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (колонка Interchrom Puriflash 20 г, SiOH 15-35 мкм), застосовуючи градієнтне елювання сумішшю метанол(А)/дихлорметан(В) (градієнт: від 100% В до 3% А: 97% В), з отриманням 280 мг мезилатної сполуки.

10

До розчину попередника томайміцину (120 мг) в диметилформаміді (4 мл) додають карбонат калію (244 мг), йодид калію (147 мг) і зразок мезилатної сполуки (137 мг). Реакційну суміш перемішують протягом 20 годин при 30°C. Додають воду (20 мл) і тверду речовину, що утворилася, відділяють фільтруванням, промивають водою і сушать у вакуумі, отримуючи при цьому залишок. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (колонка Interchrom Puriflash 20 г, SiOH 15-35 мкм), застосовуючи градієнтне елювання сумішшю метанол(А)/дихлорметан(В) (градієнт: від 100% В до 6% А: 94% В), з отриманням неочищеної сполуки, яку розчиняють в суміші вода/ацетонітрил, 1:1, концентрують у вакуумі, отримуючи при цьому 8,8'-[(4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] (120 мг).

15

20

25

PX/MC (метод A1, ZQ):

ES: $m/z=919 \text{ MH}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$

$m/z=901 \text{ MH}^+ + \text{H}_2\text{O}$

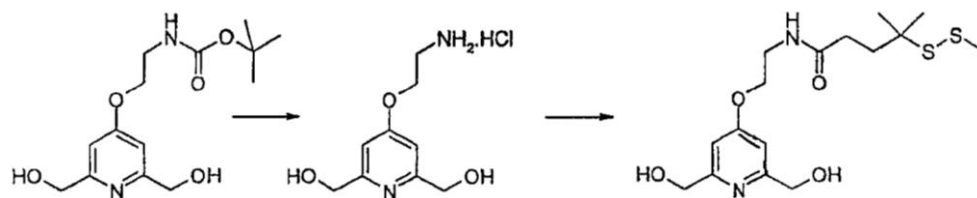
$m/z=883 \text{ MH}^+$

Час утримування=3,82 хвилини

^1H ЯМР (500 МГц, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ в м. ч.): δ = 1,28 (с, 6H); 1,75 (д, $J=6,5$ Гц, 6H); 1,94 (м, 2H); 2,29 (м, 2H); 2,39 (с, 3H); 2,97 (м, 4H); від 3,50 до 4,20 (м, 6H); 4,00 (с, 6H); 4,27 (с, 4H); 5,27 (м, 4H); 5,61 (м, 2H); 5,87 (ушир.т, $J=5,5$ Гц, 1H); 6,83 (с, 2H); 6,97 (с, 2H); 7,55 (с, 2H); 7,64 (д, $J=4,5$ Гц, 2H).

30

4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати таким чином:



35

До розчину 4-(2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину (656 мг) в діоксані (3,5 мл) додають 4 н розчин хлористоводневої кислоти в діоксані (5,5 мл). Після втримування 20 годин при кімнатній температурі реакційну суміш концентрують у вакуумі до отримання залишку (603 мг).

40

До розчину зразка раніше отриманого залишку (150 мг) в диметилформаміді (3,5 мл) додають триетиламін (267 мкл), 4-метил-4-метилдисульфанілпентанову кислоту (149 мг), N,N'-діізопропілкарбодіімід (119 мкл) і гідрат 1-гідроксибензотриазолу (49 мг). Після втримування 15

годин при кімнатній температурі до реакційної суміші додають воду і водний розчин екстрагують три рази етилацетатом. Об'єднані органічні розчини промивають насиченим водним розчином хлориду натрію, сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (колонка Interchrom Puriflash 20 г, SiOH 15-35 мкм) із застосуванням градієнтного елюювання сумішшю метанол(А)/дихлорметан(В) (градієнт: від 100% В до 10% А: 90% В), отримуючи при цьому 4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин (81 мг):

PX/MC (метод А3):

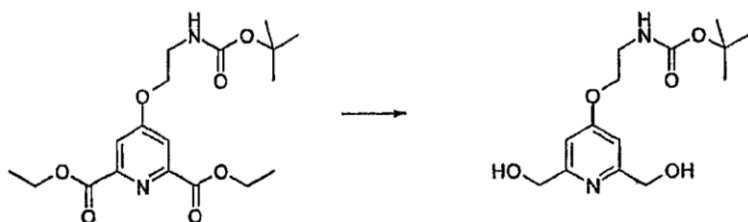
ES $m/z=375 \text{ MH}^+$

$m/z=156 \text{ C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$

Час утримування=2,2 хвилини.

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ в м. ч.): δ = 1,22 (с, 6H); 1,79 (м, 2H); 2,19 (м, 2H); 2,39 (с, 3H); 3,43 (кв, $J=5,5$ Гц, 2H); 4,06 (т, $J=5,5$ Гц, 2H); 4,45 (ушир.д, $J=6,0$ Гц, 4H); 5,33 (д, $J=6,0$ Гц, 2H); 6,84 (с, 2H); 8,13 (ушир.т, $J=5,5$ Гц, 1H).

4-(2-Бутоксикарбоніламіноетокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



4-(2-Бутоксикарбоніламіноетокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці для отримання 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину, виходячи з діетилового ефіру 4-(2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти.

PX/MC (метод А3):

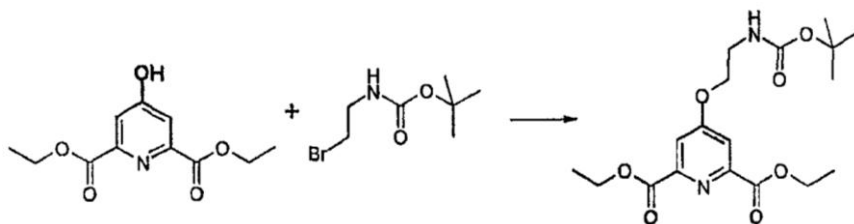
ES $m/z=299 \text{ MH}^+$

$m/z=156 \text{ C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$

Час утримування=1,7 хвилини

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ в м. ч.): δ = 1,39 (с, 9H); 3,32 (м, частково прихований, 2H); 4,03 (т, $J=6,0$ Гц, 2H); 4,46 (д, $J=6,0$ Гц, 4H); 5,30 (т, $J=6,0$ Гц, 2H); 6,83 (с, 2H); 7,00 (ушир.т, $J=6,0$ Гц, 1H).

Діетиловий ефір 4-(2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти



Діетиловий ефір 4-(2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти отримують по методиці отримання діетилового ефіру 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти із застосуванням 2-трет-бутоксикарбоніламіноетилброміду.

PX/MC (метод А3):

ES $m/z=383 \text{ MH}^+$

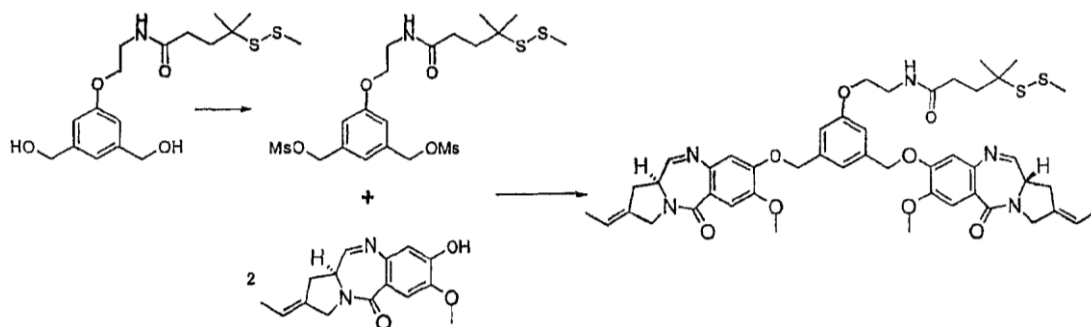
$m/z=240 \text{ C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_5^+$

Час утримування=3,6 хвилини.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ в м. ч.): δ = 1,23 (т, $J=7,0$ Гц, 6H); 1,37 (с, 9H); 3,33 (м, частково перекрите, 2H); 4,22 (т, $J=5,5$ Гц, 2H); 4,38 (кв, $J=7,0$ Гц, 4H); 7,01 (ушир.т, $J=5,5$ Гц, 1H); 7,71 (с, 2H).

Приклад 19

8,8'-[(1-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[(1-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-
 5 біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]
 можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-
 диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону], виходячи з 1-(2-(4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

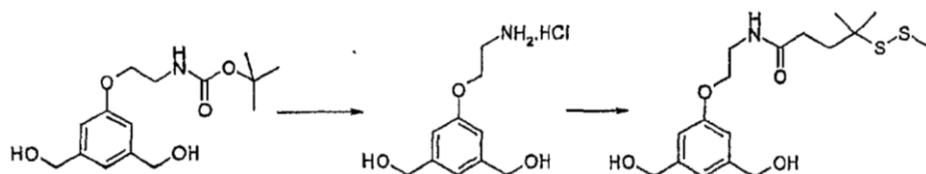
10 PX/MC (метод A1, Platform I):

ES: $m/z=882 \text{ MH}^+$

Час утримування=4,13 хвилини.

^1H ЯМР (500 МГц, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ в м. ч.): 1,30 (с, 6H); 1,75 (д, $J=6,5$ Гц, 6H); 1,96 (м, 2H); 2,31 (м, 2H); 2,40 (с, 3H); 2,97 (м, 4H); 3,66 (м, 2H); 3,89 (м, 2H); 3,97 (с, 6H); 4,04 (т, $J=5,5$ Гц, 2H);
 15 4,27 (ушир.с, 4H); 5,14 (д, $J=12,5$ Гц, 2H); 5,19 (д, $J=12,5$ Гц, 2H); 5,61 (м, 2H); 5,93 (т, $J=6,0$ Гц, 1H); 6,82 (с, 2H); 6,94 (ушир.с, 2H); 7,09 (ушир.с, 1H); 7,53 (с, 2H); 7,64 (д, $J=4,5$ Гц, 2H).

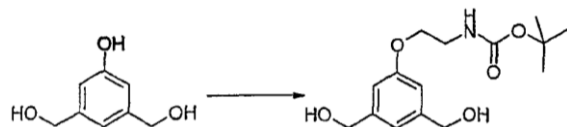
1-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол



1-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати по методиці для отримання 4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин із застосуванням 1-(2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

25 ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ в м. ч.): $\delta=1,22$ (с, 6H); 1,80 (м, 2H); 2,20 (м, 2H); 2,39 (с, 3H); 3,40 (кв, $J=6,0$ Гц, 2H); 3,95 (т, $J=6,0$ Гц, 2H); 4,44 (д, $J=6,0$ Гц, 4H); 5,11 (ушир.т, $J=6,0$ Гц, 2H); 6,73 (ушир.с, 2H); 6,84 (ушир.с, 1H); 8,09 (ушир.т, 1H).

1-(2-Бутоксикарбоніламіноетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол



1-(2-Бутоксикарбоніламіноетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати по методиці для отримання 5-(3-фталімідопропокси)-1,3-біс(гідроксиметил)бензолу із застосуванням 2-трет-бутоксикарбоніламіноетилброміду.

35 PX/MC (метод A3):

ES $m/z=298 \text{ MH}^+$

$m/z=242 (\text{M}+2\text{H-tBu})^+$

$m/z=224 (m/z=242-\text{H}_2\text{O})^+$

$m/z=206 (m/z=224-\text{H}_2\text{O})^+$

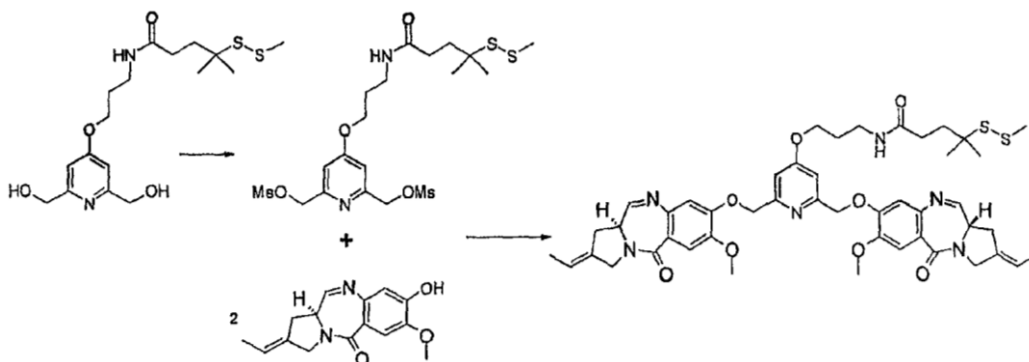
$m/z=162 (m/z=206-\text{CO}_2)^+$

Час утримування=2,7 хвилини

^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6 , δ в м. ч.): δ = 1,39 (с, 9H); 3,28 (кв, J =6,0 Гц, 2H); 3,91 (т, J =6,0 Гц, 2H); 4,44 (д, J =6,0 Гц, 4H); 5,14 (т, J =6,0 Гц, 2H); 6,72 (ушир.с, 2H); 6,83 (ушир.с, 1H); 7,01 (ушир.т, J =7,0 Гц, 1H).

Приклад 20

- 5 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-[2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]] можна отримати таким чином:



10

До охолодженого (0°C) розчину 4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину (55 мг) і триетиламіну (99 мкл) в дихлорметані (2 мл) додають метансульфонілхлорид (36 мкл). Через 30 хвилин додають воду. Шари розділяють і водний шар екстрагують двічі дихлорметаном. Об'єднані органічні розчини сушать сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання залишку (95 мг).

15

До перемішаного розчину попередника томайміцину (50 мг) в диметилформаміді (0,75 мл) додають карбонат калію (114 мг), розчин попередньо отриманого залишку (55 мг) в диметилформаміді (1 мл) і йодид калію (46 мг). Реакційну суміш перемішують протягом 20 годин при 30°C. Тверді речовини відділяють фільтруванням і промивають диметилформамідом. До об'єднаного розчину в диметилформаміді додають воду і додають мурашину кислоту до повного розчинення осаду. Розчин, що утворився, вводять для очищення ВЕРХ згідно з методом В. Прийнятні фракції об'єднують і концентрують випаровуванням на центрифугі Jouan Model RC10.10, отримуючи при цьому 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] (13,5 мг).

20

25

PX/MC (метод A3):

ES m/z =897 MH^+

m/z =664 ($\text{M-C}_{10}\text{H}_{20}\text{NOS}_2 + 2\text{H}^+$)

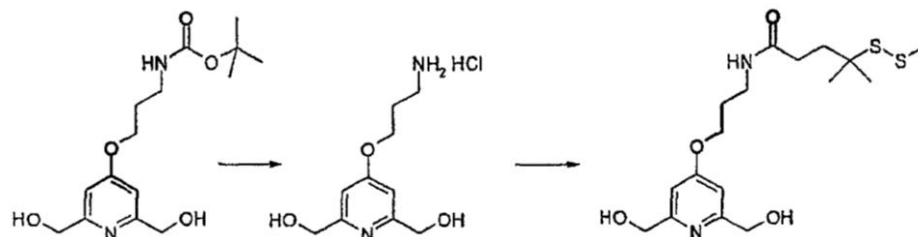
m/z =234 $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NOS}_2^+$

Час утримування=3,7 хвилини

^1H ЯМР (500 МГц, $\text{CD}_3\text{COOD-d}_4$, δ в м. ч.): δ = 1,25 (с, 6H); від 1,60 до 2,20 (м, частково прихований, 10H); 2,35 (м, 5H); від 2,80 до 4,44 (м, 14H); 3,91 (с, 6H); 5,40 (с, 4H); 5,62 (м, 2H); від 6,83 до 7,95 (м, 8H).

30

4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



35

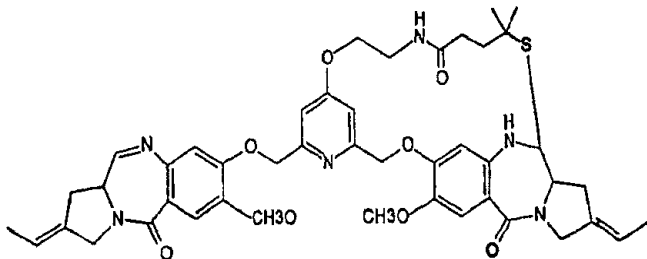
4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці для отримання 4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину із застосуванням 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину

PX/MC (метод A3):

ES $m/z=389 \text{ MH}^+$
 $m/z=234 (\text{M}-\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_3)^+$
 $m/z=156 \text{ C}_7\text{H}_{10}\text{NO}_3^+$

Час утримування=2,3 хвилини

Тиополідне (SH), отримане із сполуки прикладу 20, знаходиться в рівновазі із сполукою формули:

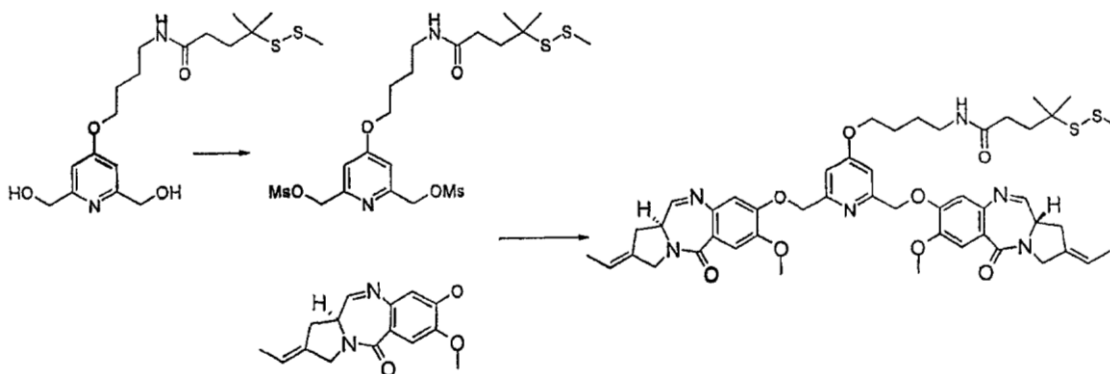


5

Приклад 21

8,8'-[(4-(4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідобутоксипіридин-2,6-диметилдіокси)-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]

10



8,8'-[(4-(4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідобутоксипіридин-2,6-диметилдіокси)-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці отримання 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропоксипіридин-2,6-диметилдіокси)-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] із застосуванням 4-(4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідобутоксипіридин-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

15

PX/MC (метод A1, Platform II):

ES: $m/z=947 \text{ MH}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$
 $m/z=929 \text{ MH}^+ + \text{H}_2\text{O}$
 $m/z=911 \text{ MH}^+$

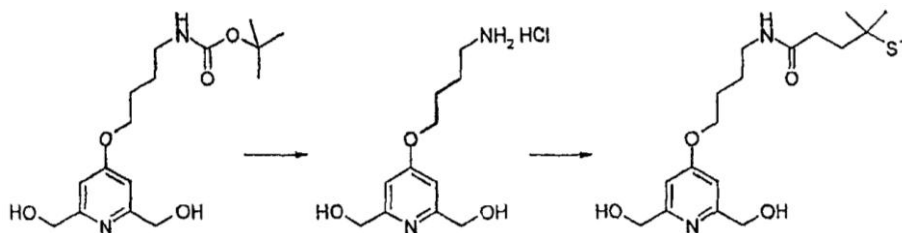
Час утримування=3,74 хвилини

20

^1H ЯМР (500 МГц, $\text{CD}_3\text{COOD}-d_4$, δ в м. ч.): $\delta = 1,26$ (с, 6H); від 1,59 до 1,76 (м, 8H); від 1,81 до 1,94 (м, 4H); 2,35 (м, 5H); від 2,80 до 4,40 (м, 14H); 3,92 (с, 6H); 5,39 (м, 4H); 5,50 (м, 2H); від 6,72 до 7,95 (м, 8H).

4-(4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідобутоксипіридин-2,6-біс(гідроксиметил)піридин

25



4-(4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідобутоксипіридин-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці для отримання 4-(2-(4-метил-4-

метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину із застосуванням 4-(4-трет-бутоксикарбоніламінобутокс)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

PX/MC (метод A3):

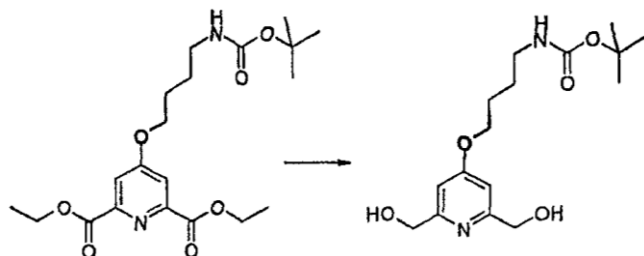
ES $m/z=403$ MH^+

$m/z=248$ $(M-C_7H_8NO_3)^+$

$m/z=156$ $C_7H_{10}NO_3^+$

Час утримування=2,3 хвилини

5 4-(4-Бутоксикарбоніламінобутокс)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



10 4-(4-Бутоксикарбоніламінобутокс)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці отримання 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокс)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину, виходячи з діетилового ефіру 4-(4-трет-бутоксикарбоніламінобутокс)піридин-2,6-дикарбонової кислоти.

PX/MC (метод A3):

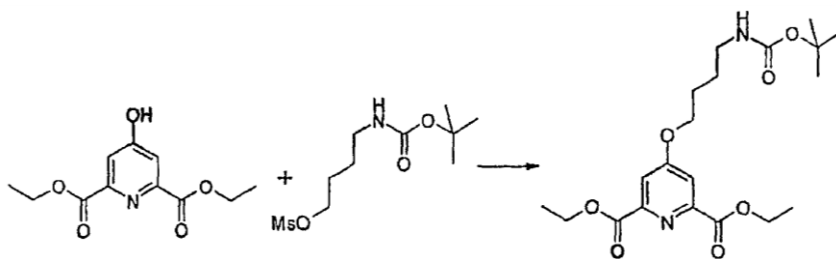
ES $m/z=411$ MH^+

$m/z=355$ $(M+2H-tBu)^+$

$m/z=240$ $C_{11}H_{14}NO_5^+$

Час утримування=3,9 хвилини.

15 Діетиловий ефір 4-(4-трет-бутоксикарбоніламінобутокс)піридин-2,6-дикарбонової кислоти



20 Діетиловий ефір 4-(4-трет-бутоксикарбоніламінобутокс)піридин-2,6-дикарбонової кислоти отримують по методиці отримання діетилового ефіру 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокс)піридин-2,6-дикарбонової кислоти із застосуванням 4-трет-бутоксикарбоніламінобутилового ефіру метансульфонової кислоти (Cazenave Gassiot, A.; Charton, J.; Girault-Mizzi, S.; Gilleron, P.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Sergheraert, C; Melnyk, P. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005, 15(21), 4828).

25 PX/MC (метод A3):

ES $m/z=327$ MH^+

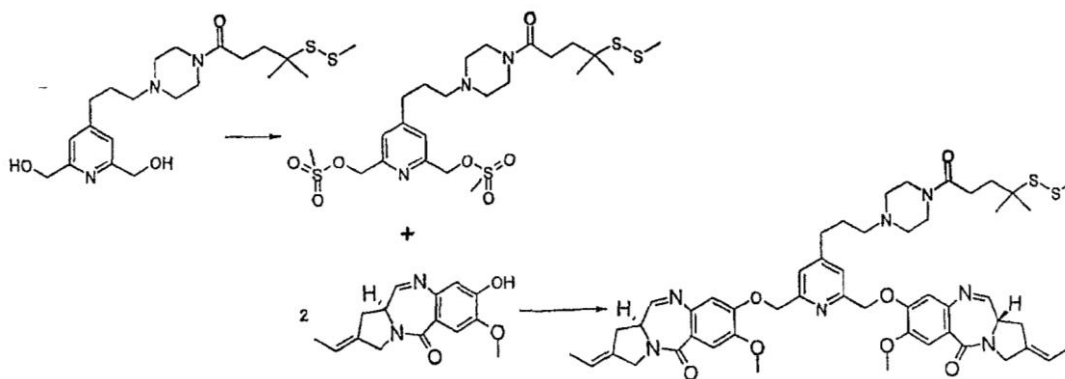
$m/z=271$ $(M+2H-tBu)^+$

$m/z=156$ $C_7H_{10}NO_3^+$

Час утримування=2,0 хвилини

Приклад 22

30 8,8'-[(4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11a-тетрагідропіроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[(4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] із застосуванням 4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

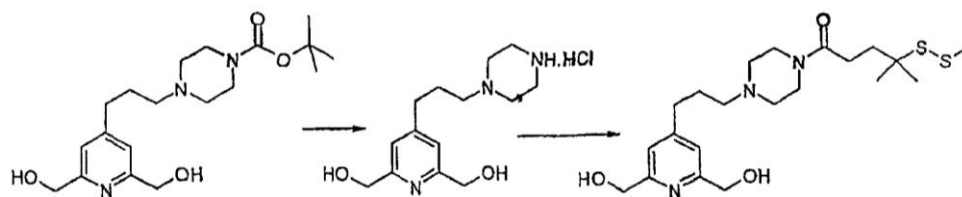
PX/MC (метод A1, Platform II):

ES: $m/z=950 \text{ MH}^+$

Час утримування=3,32 хвилини

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ в м. ч.): δ = 1,32 (с, 6H); 1,76 (д, $J=6,5$ Гц, 6H); 1,80 (м, 2H); 1,94 (м, 2H); від 2,27 до 2,46 (м, 11H); 2,67 (м, 2H); 2,97 (м, 4H); від 3,40 до 3,70 (м, 4H); 3,90 (м, 2H); 4,00 (с, 6H); 4,27 (ушир.с, 4H); 5,29 (ушир.с, 4H); 5,60 (ушир.кв, $J=6,5$ Гц, 2H); 6,86 (с, 2H); 7,30 (с, 2H); 7,56 (с, 2H); 7,65 (д, $J=4,5$ Гц, 2H).

4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати таким чином:



До розчину 4-(3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину (610 мг) в діоксані (10 мл) додають 4н розчин хлористоводневої кислоти в діоксані (2,5 мл). Після витримання 4 години при кімнатній температурі реакційну суміш концентрують у вакуумі до отримання залишку (560 мг).

До розчину зразка раніше отриманого залишку (160 мг) в диметилформаміді (2,5 мл) додають N,N-діізопропілетиламін (181 мкл), 4-метил-4-метилдисульфанілпентанову кислоту (158 мг), N,N'-діізопропілкарбодіїмід (88 мкл) і гідрат 1-гідроксибензотриазолу (15 мг). Після витримання 15 годин при кімнатній температурі тверді речовини відділяють фільтруванням і розчин в диметилформаміді вводять для очищення ВЕРХ згідно з методом F. Прийнятні фракції об'єднують і концентрують сушінням виморожуванням, отримуючи при цьому 4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин (105 мг).

PX/MC (метод A3):

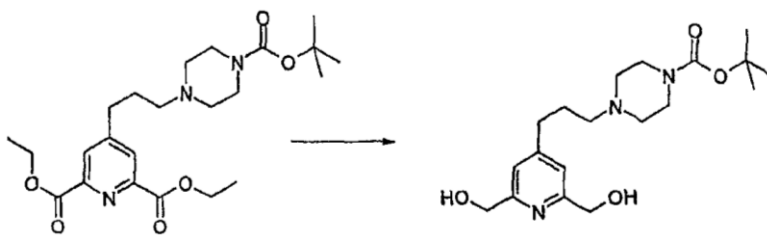
ES $m/z=442 \text{ MH}^+$

$m/z=266 (\text{M}+2\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{13}\text{OS}_2)^+$

Час утримування=2,3 хвилини

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$, δ в м. ч.): δ = 1,27 (с, 6H); від 1,70 до 1,83 (м, 4H); від 2,25 до 2,39 (м, 8H); 2,40 (с, 3H); 2,63 (м, 2H); 3,43 (м, 4H); 4,49 (с, 4H); 5,28 (ушир.м, 2H); 7,18 (с, 2H).

4-(3-(4-трет-Бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



4-(3-(4-трет-Бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл)-2,6-біс-(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці для отримання 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину, виходячи з діетилового ефіру 4-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл]піридин-2,6-дикарбонової кислоти.

PX/MC (метод A3):

ES $m/z=366 \text{ MH}^+$

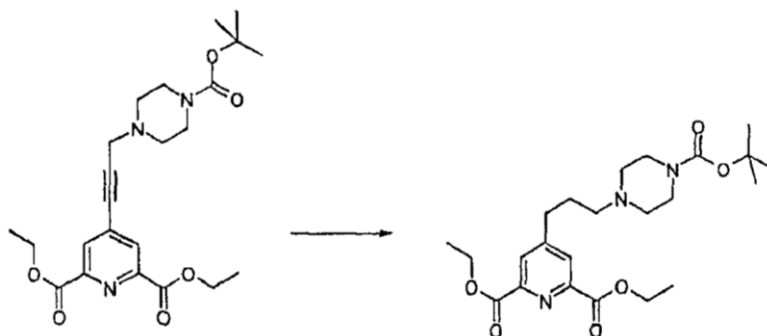
$m/z=310 \text{ (M+2H-tBu)}^+$

$m/z=266 \text{ (M+2H-CO}_2\text{tBu)}^+$

Час утримування=0,5 хвилини

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ в м. ч.): δ = 1,39 (с, 9H); 1,73 (м, 2H); 2,29 (м, 6H); 2,61 (м, 2H); 3,30 (м, частково прихований, 4H); 4,49 (д, $J=6,0$ Гц, 4H); 5,30 (ушир.т, $J=6,0$ Гц, 2H); 7,18 (с, 2H).

Діетиловий ефір 4-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл]піридин-2,6-дикарбонової кислоти



Діетиловий ефір 4-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл]піридин-2,6-дикарбонової кислоти отримують по методиці для отримання діетилового ефіру 5-(3-трет-бутоксикарбоніл-N-метиламінопропіл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти, виходячи з діетилового ефіру 4-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)проп-1-ініл]піридин-2,6-дикарбонової кислоти.

PX/MC (метод A3):

ES $m/z=450 \text{ MH}^+$

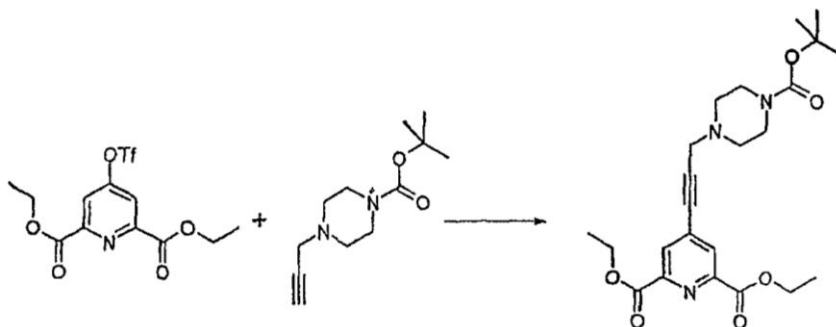
$m/z=394 \text{ (M+2H-tBu)}^+$

$m/z=350 \text{ (M+2H-CO}_2\text{tBu)}^+$

Час утримування=2,4 хвилини

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ в м. ч.): δ = 1,35 (т, $J=7,0$ Гц, 6H); 1,39 (с, 9H); 1,79 (м, 2H); 2,27 (м, 6H); 2,80 (м, 2H); 3,29 (м, 4H); 4,39 (кв, $J=7,0$ Гц, 4H); 8,12 (с, 2H).

Діетиловий ефір 4-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)проп-1-ініл]піридин-2,6-дикарбонової кислоти

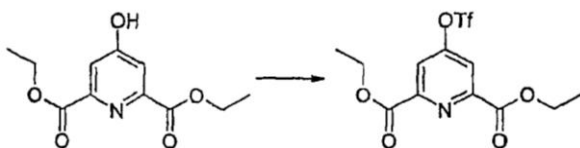


Діетиловий ефір 4-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)проп-1-ініл]піридин-2,6-дикарбонової кислоти отримують по методиці для отримання діетилового ефіру 5-(3-трет-бутоксикарбоніл-N-метиламінопропін-1-іл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти, виходячи з діетилового ефіру 4-трифторметансульфонілоксипіридин-2,6-дикарбонової кислоти і трет-бутилу-4-пропаргилпіперазин-1-карбоксилату (Zheng, H.; Weiner, L.M.; Bar-Am, O.; Epsztejn, S.; Cabantchik, Z.I.; Warshawsky, A.; Youdim, M.B.H.; and Fridkin, M. Bioorg. Med. Chem. 2005, 3, 773).

ЕІ (метод С) $m/z=445$ M+
 $m/z=388$ (M-C₄H₉)⁺
 $m/z=344$ (m/z=388-CO₂)⁺
 $m/z=57$ C₄H₉⁺

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): δ = 1,46 (т, J=7,0 Гц, 6H); 1,48 (с, 9H); 2,60 (ушир.м, 4H); 3,52 (ушир.м, 4H); 3,62 (ушир.с, 2H); 4,49 (кв, J=7,0 Гц, 4H); 8,23 (с, 2H).

Діетиловий ефір 4-трифторметансульфонілоксипіридин-2,6-дикарбонової кислоти можна отримати таким чином.



До охолодженого (0°C) розчину діетилового ефіру хелідамової кислоти (Chaubet, F.; Nguyen van duong, M.; Gref, A.; Courtieu, J.; Crumbliss, A.L.; Gaudemer, A. Terphedron Lett. 1990, 31(40), 5729-5732) (3,5 г) в піридин (35 мл) додають по краплях трифторметансульфонілхлорид (2,6 мл). Реакційну суміш потім перемішують при кімнатній температурі протягом 3 годин. Додають воду і етилацетат. Шари розділяють і водний шар екстрагують двічі етилацетатом. Об'єднані органічні розчини сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioPrep 90 г, Si60 15-40 мкм) з елюванням дихлорметаном, отримуючи при цьому діетиловий ефір 4-трифторметансульфонілоксипіридин-2,6-дикарбонової кислоти (4,2 г).

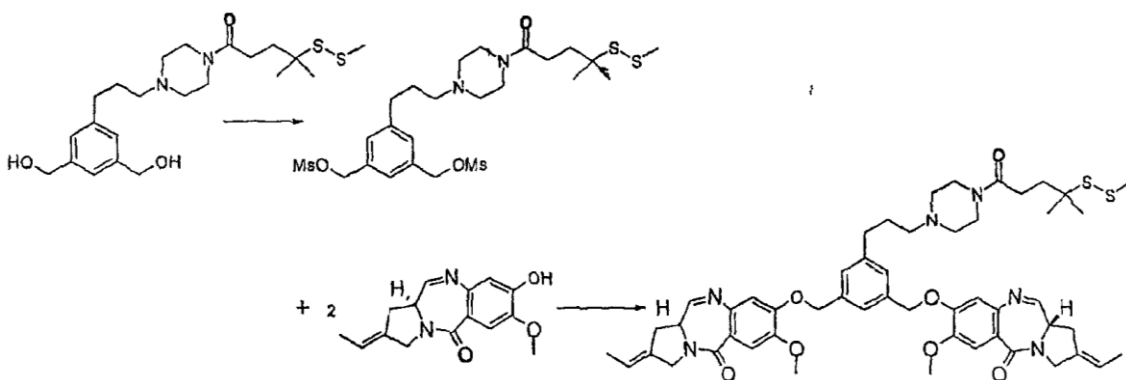
PX/MC (метод A1, Platform I):

ES $m/z=372$ MH⁺

Час утримування=4,38 хвилини

Приклад 23

8,8'-[(1-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-іліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[(1-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-іліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-іліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] із застосуванням 1-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

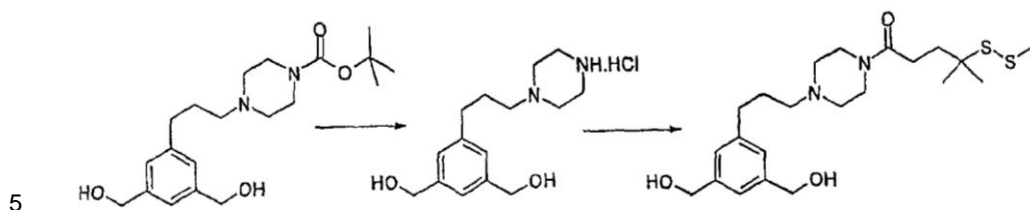
PX/MC (метод A3):

ES $m/z=949$ MH⁺

$$m/z=475,3 (M+2H)^{2+}/2$$

Час утримування=3,3 хвилини

1-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол



1-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати по методиці для отримання 4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину, виходячи з 1-(3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

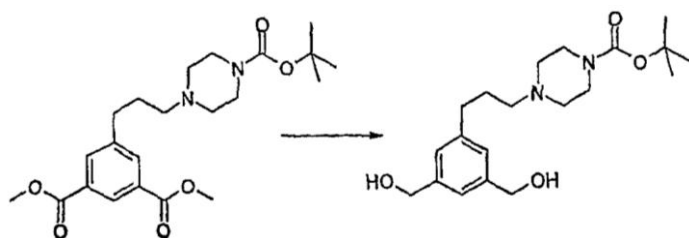
PX/MC (метод A3):

ES $m/z=441 \text{ MH}^+$

Час утримування=2,4 хвилини

15 ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ в м. ч.): δ = 1,26 (с, 6H); 1,71 (м, 2H); 1,79 (м, 2H); від 2,22 до 2,40 (м, 8H); 2,39 (с, 3H); 2,58 (м, 2H); 3,44 (м, 4H); 4,45 (д, $J=6,0$ Гц, 4H); 5,09 (т, $J=6,0$ Гц, 2H); 7,00 (ушир.с, 2H); 7,08 (ушир.с, 1H).

1-(3-(4-трет-Бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл)-3,5-біс-(гідроксиметил)бензол



1-(3-(4-трет-Бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати по методиці для отримання 5-(3-трет-бутоксикарбошл-К-метиламінопропіл)-1,3-біс(гідроксиметил)бензолу, виходячи з диметилового ефіру 5-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл]ізофталевої кислоти.

PX/MC (метод A3):

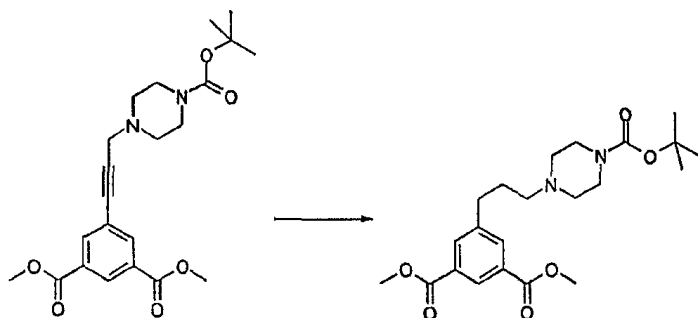
ES $m/z=365 \text{ MH}^+$

$m/z=309 (M+2H-tBu)^+$

Час утримування=2,0 хвилини

30 ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6 , δ в м. ч.): δ = 1,39 (с, 9H); 1,71 (м, 2H); 2,28 (м, 6H); 2,57 (м, 2H); 3,29 (м, частково перекрите, 4H); 4,44 (д, $J=6,0$ Гц, 4H); 5,08 (т, $J=6,0$ Гц, 2H); 7,00 (ушир.с, 2H); 7,08 (ушир.с, 1H).

Диметилловий ефір 5-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл]ізофталевої кислоти



Диметилловий ефір 5-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)пропіл]ізофталевої кислоти можна отримати по методиці для отримання діетиллового ефіру 5-(3-трет-бутоксикарбоніл-N-

метиламінопропіл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти, виходячи з диметилового ефіру 5-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)проп-1-ініл]ізофталевої кислоти.

PX/MC (метод A3):

ES $m/z=421 \text{ MH}^+$

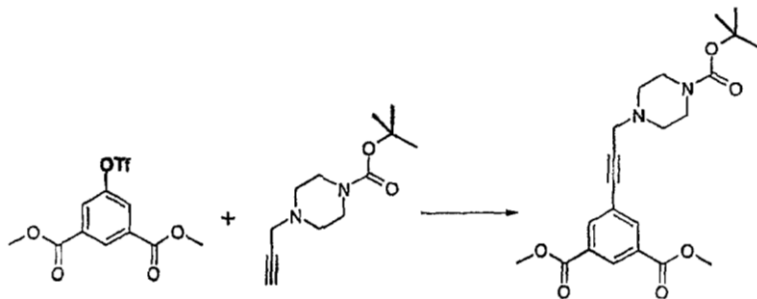
$m/z=365 \text{ (M+2H-tBu)}^+$

$m/z=321 \text{ (M+2H-CO}_2\text{tBu)}^+$

Час утримування=2,7 хвилини

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆, δ в м. ч.): δ =1,39 (с, 9H); 1,74 (м, 2H); 2,28 (м, 6H); 2,75 (м, 2H); 3,30 (м, частково прихований, 4H); 3,89 (с, 6H); 8,08 (д, J=2,0 Гц, 2H); 8,32 (т, J=2,0 Гц, 1H).

Диметильовий ефір 5-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)проп-1-ініл]ізофталевої кислоти



Диметильовий ефір 5-[3-(4-трет-бутоксикарбонілпіперазин-1-іл)проп-1-ініл]ізофталевої кислоти можна отримати по методиці для отримання діетильового ефіру 5-(3-трет-бутоксикарбоніл-N-метиламінопропіл-1-іл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти, виходячи з трет-бутил-4-пропаргилпіперазинкарбоксилату.

PX/MC (метод A3):

ES $m/z=417 \text{ MH}^+$

$m/z=361 \text{ (M+2H-tBu)}^+$

$m/z=317 \text{ (M+2H-CO}_2\text{tBu)}^+$

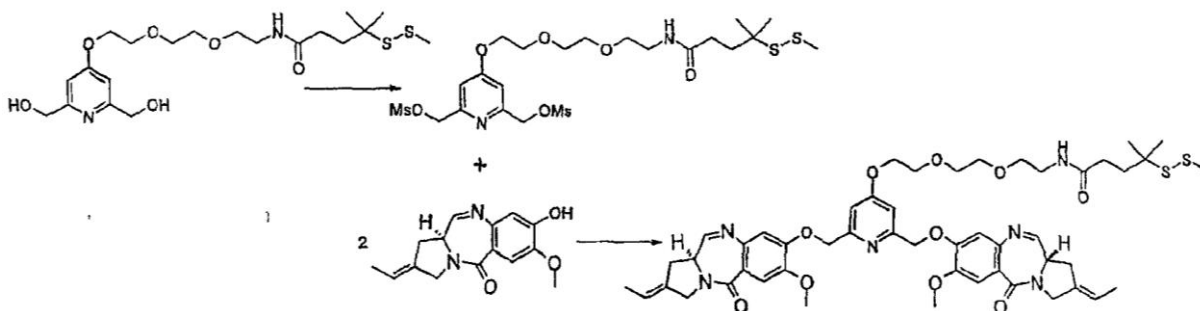
Час утримування=3,1 хвилини

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆, δ в м. ч.): δ =1,40 (с, 9H); 2,50 (м, прихований, 4H); 3,35 (м, 4H); 3,61 (с, 2H); 3,90 (с, 6H); 8,14 (ушир.с, 2H); 8,40 (ушир.с, 1H).

Приклад 24

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)піридин-2,6-

диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] із застосуванням 4-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

PX/MC (метод A3):

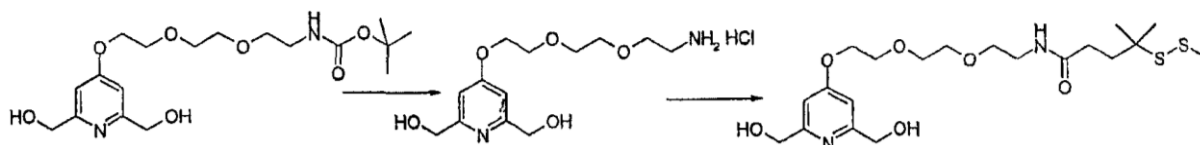
ES $m/z=971 \text{ MH}^+$

$$m/z=486,3 (M+2H)^{2+}/2$$

Час утримування=3,60 хвилини.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): δ =1,28 (с, 6H); 1,76 (д, J=6,5 Гц, 6H); 1,94 (м, 2H); 2,26 (м, 2H); 2,40 (с, 3H); 2,98 (м, 4H); від 3,36 до 3,95 (м, 12H); 4,00 (с, 6H); 4,18 (м, 2H); 4,28 (ушир.с, 4H); 5,27 (м, 4H); 5,61 (м, 2H); 5,97 (ушир.м, 1H); 6,84 (с, 2H); 7,01 (ушир.с, 2H); 7,56 (с, 2H); 7,64 (д, J=4,5 Гц, 2H).

4-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



4-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці отримання 4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину, виходячи з 4-(2-{2-[2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

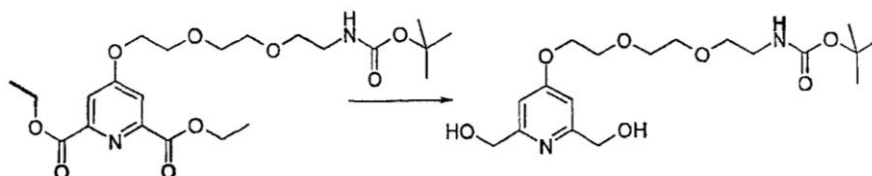
PX/MC (метод A3):

ES $m/z=463 \text{ MH}^+$

Час утримування=2,3 хвилини

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆, δ в м. ч.): δ =1,22 (с, 6H); 1,79 (м, 2H); 2,15 (м, 2H); 2,39 (с, 3H); 3,18 (кв, J=6,0 Гц, 2H); 3,40 (т, J=6,0 Гц, 2H); 3,52 (м, 2H); 3,60 (м, 2H); 3,76 (м, 2H); 4,18 (м, 2H); 4,45 (с, 4H); 5,32 (ушир.м, 2H); 6,85 (с, 2H); 7,90 (ушир.т, J=6,0 Гц, 1H).

4-(2-{2-[2-Бутоксикарбоніламіноетокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



4-(2-{2-[2-Бутоксикарбоніламіноетокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці для отримання 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину, виходячи з діетилового ефіру 4-(2-{2-[2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси]етокси}етокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти.

PX/MC (метод A3):

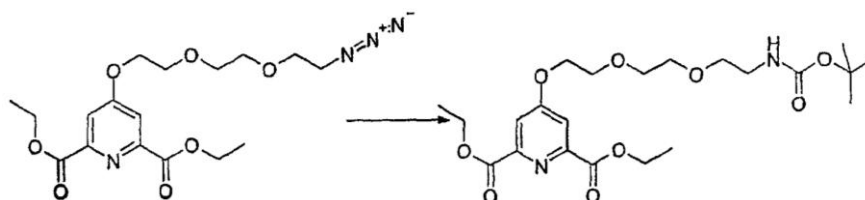
ES $m/z=387 \text{ MH}^+$

$m/z=331 (M+2H-t\text{Bu})^+$

Час утримування=2,0 хвилини

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆, δ в м. ч.): δ =1,37 (с, 9H); 3,07 (кв, J=6,0 Гц, 2H); 3,39 (т, J=6,0 Гц, 2H); 3,51 (м, 2H); 3,59 (м, 2H); 3,73 (м, 2H); 4,18 (м, 2H); 4,45 (д, J=6,0 Гц, 4H); 5,31 (т, J=6,0 Гц, 2H); 6,73 (ушир.т, J=6,0 Гц, 1H); 6,85 (с, 2H).

Діетиловий ефір 4-(2-{2-[2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси]етокси}етокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти можна отримати таким чином:



До розчину діетилового ефіру 4-(2-{2-[2-азидоетокси]етокси}етокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти (Roy, B.C.; Santos, M.; Mallik, S.; D. Campiglia, A.D. J. Org. Chem. 2003, 68(10), 3999) (900 мг) в етилацетаті (18 мл) додають ди-трет-бутилдикарбонат (545 мг) і 10% паладій-на-вугіллі (73 мг). Розчин перемішують при кімнатній температурі в атмосфері водню (2 бари) протягом 18 годин. Тверду речовину відділяють фільтруванням і розчинник видаляють у вакуумі до

отримання залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (Analogix Super Flash SiO₂ SF25-34 г) із застосуванням градієнтного елюювання сумішшю дихлорметану (А) і метанолу (В) (градієнт: від 100% А до 97,5% А: 2,5% В), отримуючи при цьому діетиловий ефір 4-(2-{2-[2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси]етокси}етокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти (760 мг).

PX/MC (метод А3):

ES $m/z=471 \text{ MH}^+$

$m/z=415 \text{ (M+2H-tBu)}^+$

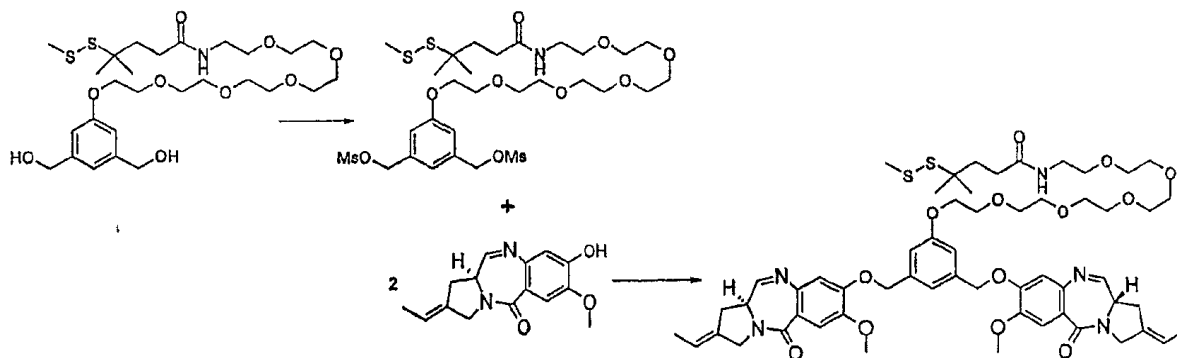
$m/z=371 \text{ (M+2H-CO}_2\text{tBu)}^+$

Час утримування=3,6 хвилини

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆, δ в м. ч.): δ = 1,32 (т, J=7,0 Гц, 6H); 1,36 (с, 9H); 3,04 (кв, J=6,0 Гц, 2H); 3,38 (т, J=6,0 Гц, 2H); 3,51 (м, 2H); 3,59 (м, 2H); 3,79 (м, 2H); 4,25 (м, що перекривається, 2H); 4,29 (кв, J=7,0 Гц, 4H); 6,70 (ушир.т, J=6,0 Гц, 1H); 7,73 (с, 2H).

Приклад 25

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)етокси)етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]діазепін-5-он]



8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-(2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси)етокси)етокси)етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] із застосуванням 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)етокси)етокси)етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

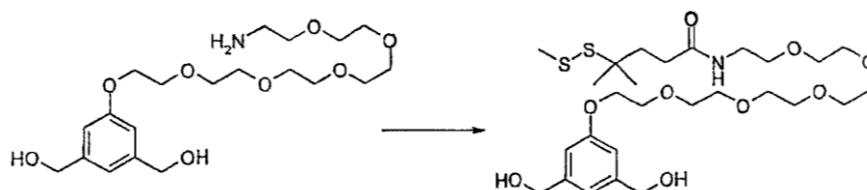
PX/MC (метод А1, Platform II):

ES: $m/z=1102 \text{ MH}^+$

Час утримування=4,49 хвилини

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): δ = 1,30 (с, 6H); 1,75 (д, J=6,5 Гц, 6H); 1,95 (м, 2H); 2,28 (м, 2H); 2,41 (с, 3H); 2,97 (м, 4H); від 3,33 до 3,96 (м, 24H); 3,96 (с, 6H); 4,12 (м, 2H); 4,27 (ушир.с, 4H); від 5,07 до 5,24 (ч, 4H); 5,60 (м, 2H); 6,21 (ушир.м, 1H); 6,81 (с, 2H); 6,96 (с, 2H); 7,07 (с, 1H); 7,51 (с, 2H); 7,65 (д, J=4,5 Гц, 2H).

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)етокси)етокси)етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол



1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати по методиці отримання 1-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу, виходячи з 1-(2-{2-[2-

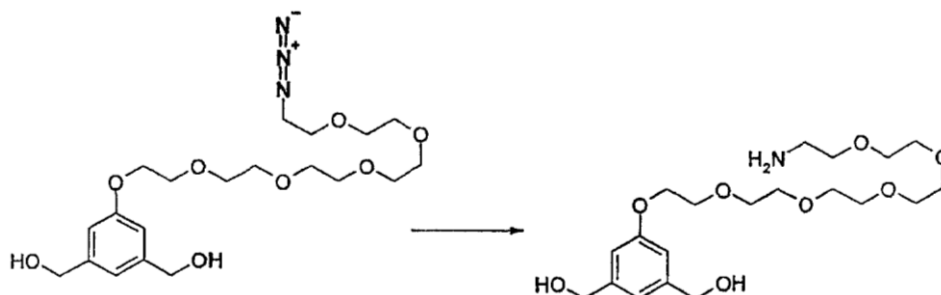
5 (2-{2-[2-аміноетокси]етокси}етокси)етокси]етокси)етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

PX/MC (метод G1):

ES $m/z=594$ MH^+

Час утримування=1,9 хвилини.

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-аміноетокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати таким чином:



До розчину 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-азидоетокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу (540 мг) в ТГФ (5,5 мл) додають трифенілфосфін (320 мг) і воду (22 мкл). Розчин перемішують при кімнатній температурі протягом 18 годин і розчинник видаляють у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищують хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioFlash 30 г, Si60 15-40 мкм) з елюванням сумішшю дихлорметан/метанол, 95:5, потім сумішшю дихлорметан/метанол/ NH_4OH , 75:25:2,5, отримуючи при цьому 1-(2-{2-[2-

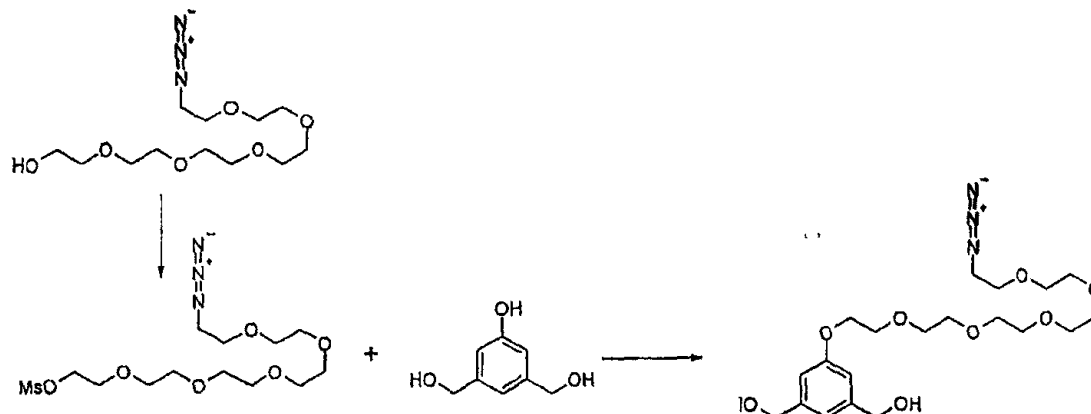
20 (2-{2-[2-аміноетокси]етокси}етокси)етокси]етокси)етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол (430 мг).

PX/MC (метод A3):

ES: $m/z=418$ MH^+

Час утримування=1,3 і 1,7 хвилин.

1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-Азидоетокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати таким чином:

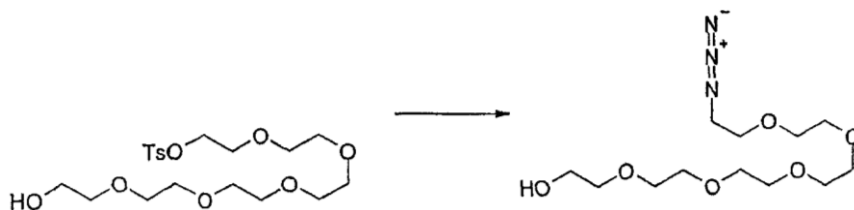


До охолодженого ($0^\circ C$) розчину 2-[2-(2-{2-[2-(2-азидоетокси)етокси]етокси}етокси)етанолю (1,6 г) і триетиламіну (1,45 мл) в дихлорметані (40 мл) додають метансульфонілхлорид (617 мкл). Через 1 годину додають воду. Шари розділяють і органічний шар сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання залишку (1,83 г). Зразок залишку (1,4 г), 3,5-бісгідроксиметилфенол (510 мг) і карбонат калію (686 мг) змішують в диметилформаміді (8 мл) і нагрівають при $70^\circ C$ протягом 15 годин. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, додають воду і водний розчин екстрагують три рази етилацетатом. Об'єднані органічні розчини промивають насиченим водним розчином хлориду натрію, сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищують хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioPrep 70 г, Si60 15-40 мкм) з елюванням сумішшю метанол(А)/дихлорметан(В)

(градієнт: від 2%A: 98%B до 10%A: 90%B), отримуючи при цьому 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-азидоетокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол (540 мг).

CI (метод D): $m/z=461$ MNH_4^+ .

2-[2-(2-[2-(2-Азидоетокси)етокси]етокси)етокси]етанол можна отримати таким чином:

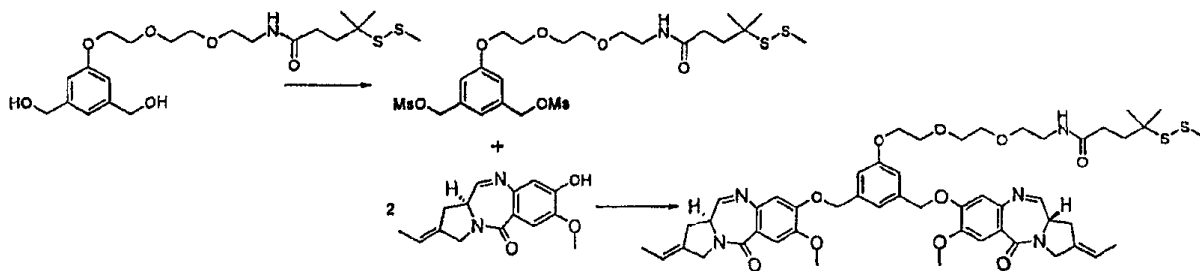


До розчину 2-[2-(2-[2-(2-тозилоксиетокси)етокси]етокси)етокси]етанолу (Loiseau, Hii, Hill, A. M. J. Org. Chem. 2004, 69, 639) (4,5 г) в диметилформаміді (30 мл) додають азид натрію (0,89 г). Розчин перемішують при 70°C протягом 18 годин і розчинник потім видаляють у вакуумі до отримання залишку. Додають дихлорметан і осад, що утворився, відділяють фільтруванням. Органічний шар концентрують у вакуумі, отримуючи при цьому 2-[2-(2-[2-(2-азидоетокси)етокси]етокси)етокси]етанол (3,1 г).

CI (метод D): $m/z=325$ MNH_4^+ .

Приклад 26

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] із застосуванням 1-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

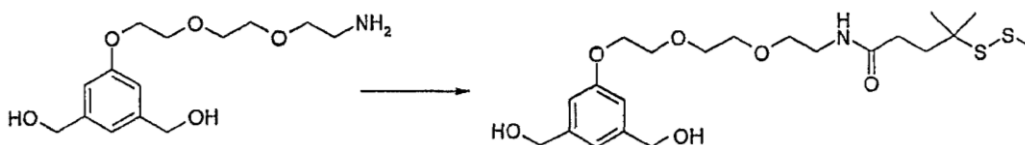
PX/MC (метод A1, Platform II):

ES: $m/z=970$ MH^+

Час утримування=3,89 хвилини

1H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3-d_1$, δ в м. ч.): δ = 1,27 (с, 6H); 1,75 (д, $J=6,5$ Гц, 6H); 1,94 (м, 2H); 2,26 (м, 2H); 2,40 (с, 3H); 2,98 (м, 4H); від 3,35 до 3,92 (м, 12H); 3,96 (с, 6H); 4,15 (м, 2H); 4,28 (ушир.с, 4H); від 5,10 до 5,23 (м, 4H); 5,60 (ушир.кв, $J=6,5$ Гц, 2H); 6,05 (ушир.т, $J=6,0$ Гц, 1H); 6,81 (с, 2H); 6,98 (с, 2H); 7,09 (с, 1H); 7,53 (с, 2H); 7,64 (д, $J=4,5$ Гц, 2H).

1-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол



1-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати по методиці для отримання 1-(3-(4-метил-4-

метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу, виходячи з 1-(2-{2-[2-аміноетокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

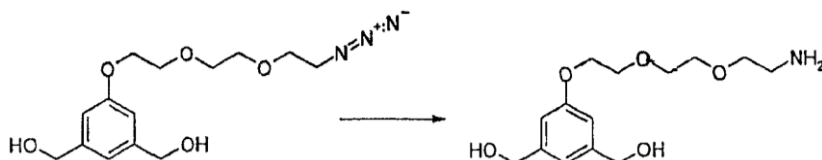
PX/MC (метод A3):

ES: $m/z=462 \text{ MH}^+$

$m/z=444 \text{ (M+H-H}_2\text{O)}^+$

Час утримування=3,0 хвилини.

5 1-(2-{2-[2-аміноетокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол



10 1-(2-{2-[2-аміноетокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати по методиці для отримання 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-аміноетокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу, виходячи з 1-(2-{2-[2-азидоетокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

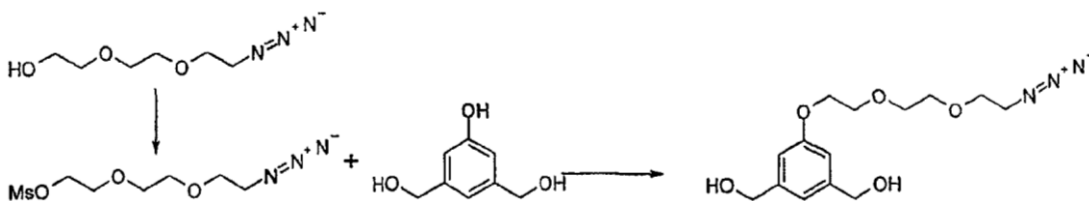
PX/MC (метод A3):

ES: $m/z=286 \text{ MH}^+$

$m/z=268 \text{ (M+H-H}_2\text{O)}^+$

Час утримування=0,8 хвилини.

15 1-(2-{2-[2-Азидоетокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол

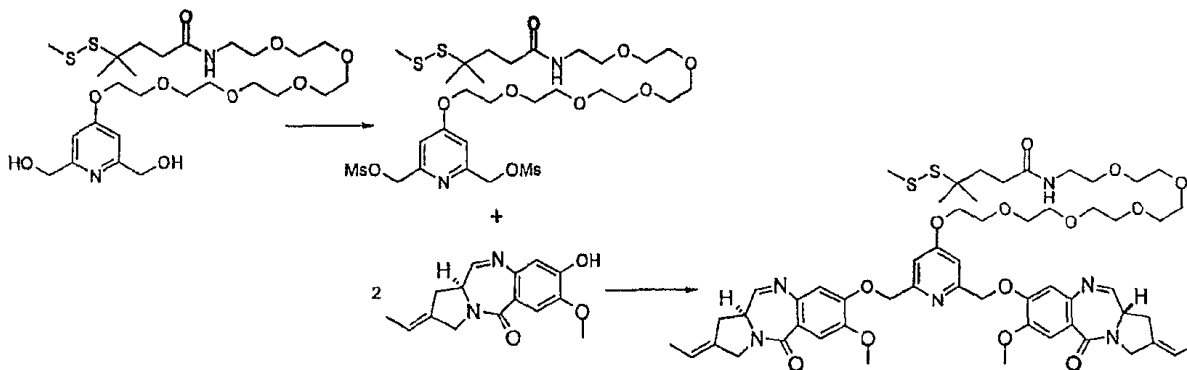


20 1-(2-{2-[2-Азидоетокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати по методиці для отримання 1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-азидоетокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу, виходячи з 2-[2-(2-азидоетокси)етокси]етанолу (Roy, B.C; Santos, M.; Mallik, S.; Campiglia, A.D. J. Org. Chem. 2003, 68(10), 3999):

Cl (метод D) $m/z=329 \text{ MNH}_4^+$.

Приклад 27

25 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)етокси]етокси)етокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



30

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)етокси]етокси)етокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-

35

метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] із застосуванням 4-(2-{2-[2-(2-{2-[4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

PX/MC (метод A3):

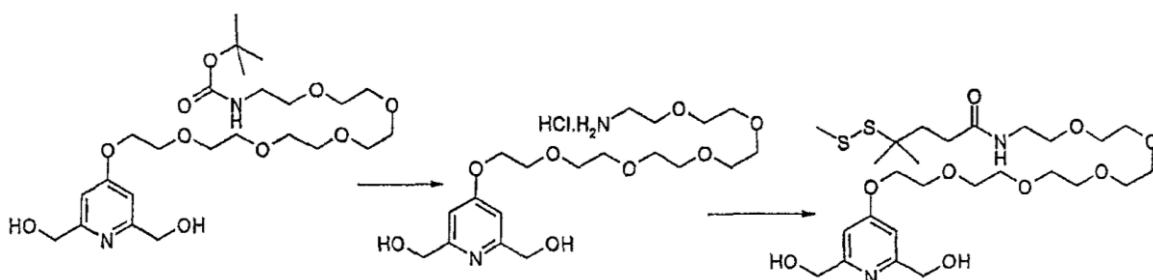
ES: $m/z=1103\text{MH}^+$

$m/z=552\text{ (M+2H)}^{2+}/2$

Час утримування=3,7 хвилини.

^1H ЯМР (500 МГц, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ в м. ч.): δ = 1,29 (с, 6H); 1,75 (д, $J=6,5$ Гц, 6H); 1,94 (м, 2H); 2,28 (м, 2H); 2,40 (с, 3H); 2,97 (м, 4H); від 3,33 до 3,95 (м, 24H); 3,99 (с, 6H); 4,18 (м, 2H); 4,28 (ушир.с, 4H); 5,27 (м, 4H); 5,60 (м, 2H); 6,19 (ушир.м, 1H); 6,82 (с, 2H); 7,00 (ушир.с, 2H); 7,55 (с, 2H); 7,64 (д, $J=4,5$ Гц, 2H).

4-(2-{2-[2-(2-{2-[4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



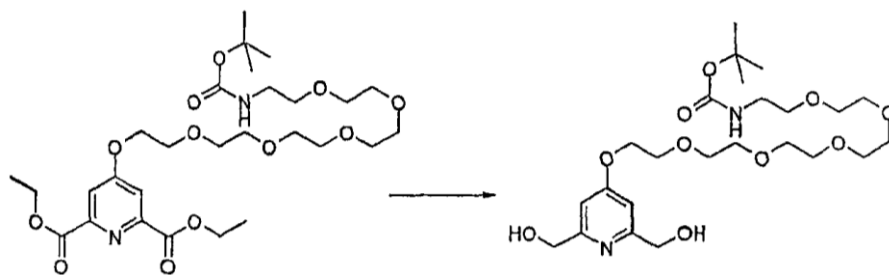
4-(2-{2-[2-(2-{2-[4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці для отримання 4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину, виходячи з 4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

PX/MC (метод A3):

ES: $m/z=596\text{MH}^+$

Час утримування=2,4 хвилини

4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-Бутоксикарбоніламіноетокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



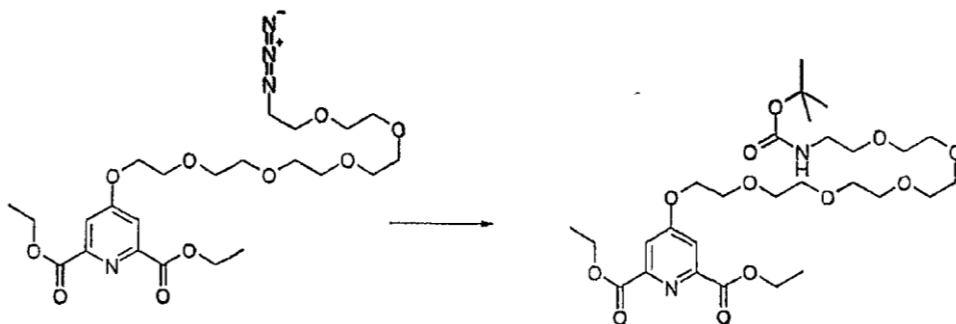
4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-Бутоксикарбоніламіноетокси]етокси}етокси)етокси]етокси}етокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці для отримання 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину, виходячи з діетилового ефіру 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси)етокси]етокси}етокси)етокси]етокси}піридин-2,6-дикарбонової кислоти.

PX/MC (метод A3):

ES: $m/z=519\text{MH}^+$

Час утримування=2,2 хвилини.

Діетиловий ефір 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-трет-бутоксикарбоніламіноетокси)етокси]етокси}етокси)етокси]етокси}-піридин-2,6-дикарбонової кислоти



Діетиловий ефір 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-трет-
 5 бутоксикарбоніламіноетокси)етокси]етокси]етокси]етокси}піридин-2,6-дикарбонової
 кислоти можна отримати по методиці для отримання діетилового ефіру 4-(2-{2-[2-трет-
 бутоксикарбоніламіноетокси]етокси]етокси)піридин-2,6-дикарбонової кислоти, виходячи з
 діетилового ефіру 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-азидоетокси)етокси]етокси]етокси]етокси}піридин-
 2,6-дикарбонової кислоти.

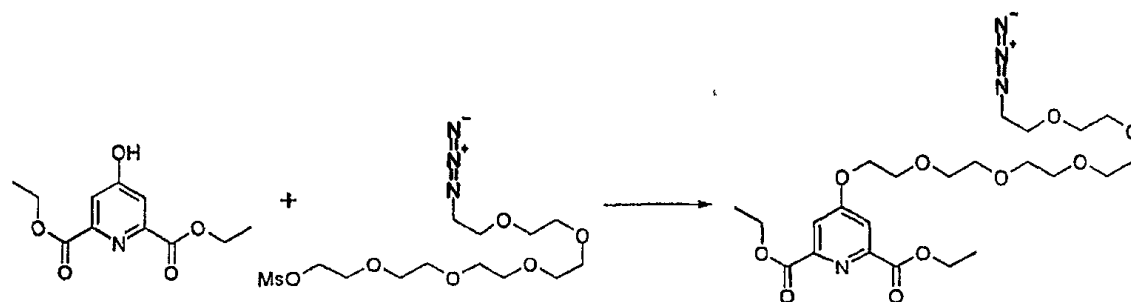
PX/MC (метод A3):

ES: $m/z=603 \text{ MH}^+$

$m/z=271 \text{ (M+2H-CO}_2\text{tBu)}^+$

Час утримування=3,6 хвилини

Діетиловий ефір 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-азидоетокси)етокси]етокси]етокси]етокси}піридин-
 2,6-дикарбонової кислоти можна отримати таким чином:



До розчину діетилового ефіру хелідамової кислоти (1,03 г) в диметилформаміді (10 мл)
 додають 2-[2-(2-[2-[2-(2-азидоетокси)етокси]етокси]етокси]етокси]етилловий ефір
 метансульфонової кислоти (1,82 г) і карбонат калію (893 мг). Суміш, що утворилася, нагрівають
 20 при 70°C протягом 15 годин, потім охолоджують до кімнатної температури. Додають воду і
 водний розчин екстрагують три рази етилацетатом. Об'єднані органічні розчини промивають
 насиченим водним розчином хлориду натрію, сушать над сульфатом магнію і концентрують у
 вакуумі до отримання залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі (колонка
 Merck SuperVarioPrep 70 г, Si60 15-40 мкм) з елюванням сумішшю
 25 метанолу(А)/дихлорметану(В) (градієнт: від 3%А: 97%В до 5%А: 95% В), отримуючи при цьому
 діетиловий ефір 4-{2-[2-(2-{2-[2-(2-азидоетокси)етокси]етокси]етокси]етокси]етокси}піридин-2,6-
 дикарбонової кислоти (2,19 г).

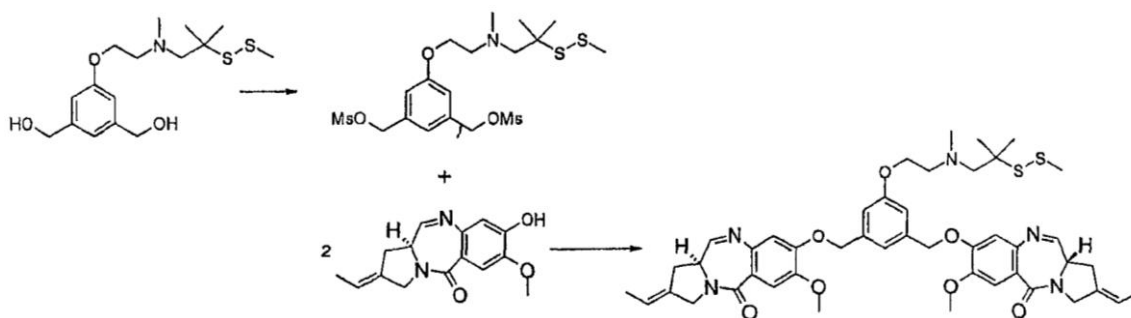
PX/MC (метод A3):

ES: $m/z=529 \text{ MH}^+$

Час утримування=3,4 хвилини.

Приклад 28

8,8'-[(1-(2-[Метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]етокси)бензол-3,5-
 диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
 с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[(1-(2-[Метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] із застосуванням 1-(2-[метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

PX/MC (метод A1, Platform I):

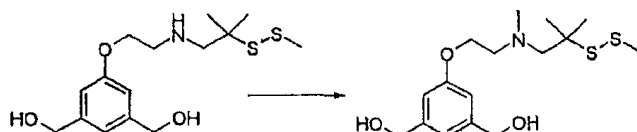
ES: $m/z=872 \text{ MH}^+ + \text{H}_2\text{O}$

$m/z=854 \text{ MH}^+$

Час утримування=3,40 хвилини.

^1H ЯМР (500 МГц, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$, δ в м. ч.): $\delta = 1,31$ (с, 6H); 1,75 (д, $J=6,5$ Гц, 6H); 2,39 (с, 3H); 2,45 (с, 3H); 2,62 (с, 2H); 2,92 (т, $J=6,5$ Гц, 2H); 2,97 (м, 4H); 3,89 (м, 2H); 3,96 (с, 6H); 4,06 (т, $J=6,5$ Гц, 2H); 4,26 (ушир.с, 4H); 5,12 (д, $J=12,5$ Гц, 2H); 5,19 (д, $J=12,5$ Гц, 2H); 5,60 (ушир.кв, $J=6,5$ Гц, 2H); 6,82 (с, 2H); 6,95 (ушир.с, 2H); 7,06 (ушир.с, 1H); 7,52 (с, 2H); 7,64 (д, $J=4,5$ Гц, 2H).

1-(2-[Метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати таким чином:



До охолодженої (5°C) суспензії 1-(2-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміноетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу (280 мг) в формальдегіді (228 мкл) додають мурашину кислоту (319 мкл). Суміш, що утворилася, нагрівають при 100°C протягом 1 час 15 хв., потім охолоджують до кімнатної температури. Додають воду і лід з подальшим доданням водного розчину гідроксиду натрію до $\text{pH}=12$. Водний розчин, що утворився, екстрагують три рази етилацетатом і об'єднані органічні розчини сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок очищують хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioFlash 25 г, Si60 15-40 мкм) з елююванням сумішшю метанол(А)/дихлорметан(В) (градієнт: від 2%А: 98%В до 5%А: 95%В), отримуючи при цьому 1-(2-[метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]етокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол (210 мг).

PX/MC (метод A3):

ES: $m/z=346 \text{ MH}^+$

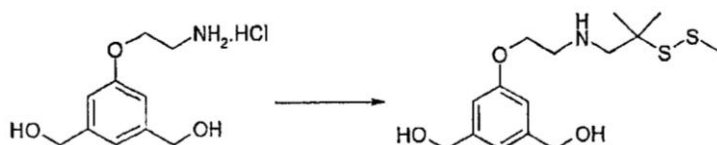
$m/z=212 (\text{M}+2\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{11}\text{S}_2)^+$

$m/z=135 \text{ C}_5\text{H}_{11}\text{S}_2^+$

Час утримування=2,1 хвилини

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6 , δ в м. ч.): $\delta = 1,27$ (с, 6H); 2,39 (с, 3H); 2,40 (с, 3H); 2,60 (с, 2H); 2,85 (т, $J=6,0$ Гц, 2H); 4,02 (т, $J=6,0$ Гц, 2H); 4,44 (д, $J=6,0$ Гц, 4H); 5,10 (т, $J=6,0$ Гц, 2H); 6,72 (ушир.с, 2H); 6,82 (ушир.с, 1H).

1-(2-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміноетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол можна отримати таким чином:

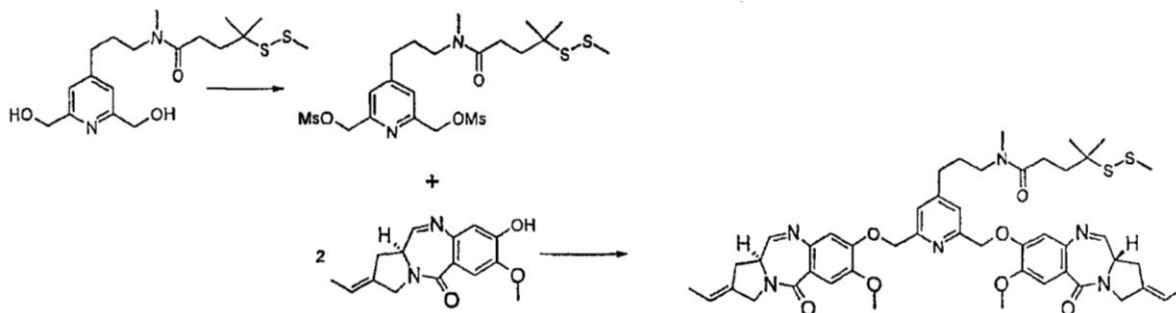


До суспензії гідрохлориду 1-(2-аміноетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу (900 мг) в тетрагідрофурані (4,5 мл) додають триетиламін (1,07 мл). Після перемішування протягом 15 хв. додають 2-(метилдитіо)ізобутиральдегід (530 мкл) і ізопропоксид титану (1,42 мг) і суміш, що утворилася, перемішують при кімнатній температурі протягом 2 годин. Додають етанол (9 мл) і ціаноборгідрид натрію (242 мг) і знову утворену суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 18 годин. Тверді речовини відділяють фільтруванням і фільтрат концентрують у вакуумі до отримання залишку. Залишок потім розбавляють в етилацетаті і тверді речовини, що утворилися, відділяють фільтруванням. Органічний розчин потім промивають водою і насиченим водним розчином хлориду натрію, сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі, отримуючи при цьому знову утворений залишок, який очищають хроматографією на силікагелі (колонка Merck SuperVarioFlash 30 г, Si60 15-40 мкм) з елюванням сумішшю метанол(А)/дихлорметан(В), (градієнт: від 4%А: 96%В до 10%А: 90%В), отримуючи при цьому 1-(2-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміноетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензол (290 мг).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆, δ в м. ч.): δ = 1,27 (с, 6H); 1,82 (ушир.м, 1H); 2,39 (с, 3H); 2,67 (с, 2H); 2,91 (т, J=6,0 Гц, 2H); 4,00 (т, J=6,0 Гц, 2H); 4,43 (д, J=6,0 Гц, 4H); 5,10 (т, J=6,0 Гц, 2H); 6,73 (ушир.с, 2H); 6,83 (ушир.с, 1H).

Приклад 29

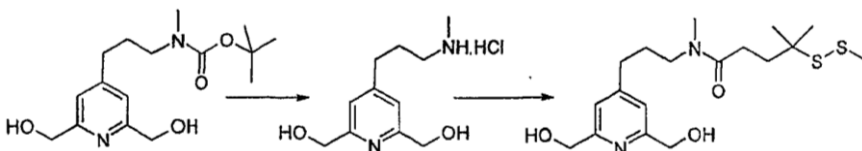
8,8'-[(4-(3-[Метил-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)аміно]пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]біс-[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[(4-(3-[Метил-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)аміно]пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]біс-[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]біс-[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] із застосуванням 4-(3-[метил-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)аміно]пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): δ = 1,32 (с, 6H); 1,75 (д, J=6,5 Гц, 6H); 1,94 (м, 4H); від 2,20 до 4,30 (м, 18H); 4,00 (с, 6H); 4,27 (ушир.с, 4H); від 5,21 до 5,68 (м, 6H); від 6,80 до 7,70 (м, 8H).

4-(3-[Метил-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)аміно]пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



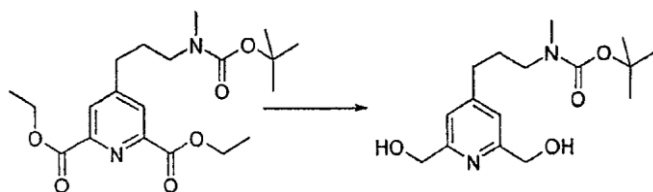
4-(3-[Метил-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)аміно]пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці для отримання 4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину із застосуванням 4-(3-(трет-бутоксикарбонілметиламіно)пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

PX/МС (метод А3):

ES: m/z=387 MH⁺

Час утримування=2,5 хвилини.

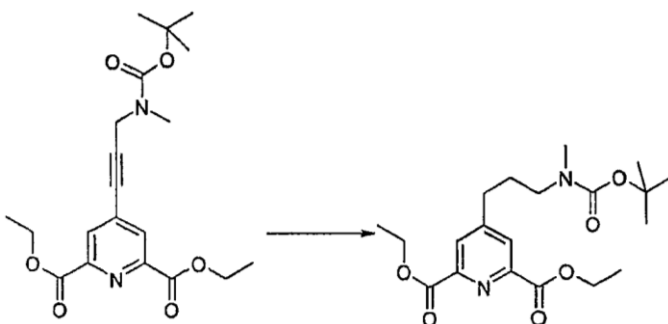
4-(3-(Бутоксикарбонілметиламіно)пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



4-(3-(Бутоксикарбонілметиламіно)пропіл)-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці для отримання 4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропокси)-2,6-біс(гідроксиметил)піридину із застосуванням діетилового ефіру 4-(3-(трет-бутоксикарбонілметиламіно)пропіл)піридин-2,6-бісдикарбонової кислоти.

CI (метод D) $m/z=311$ MH^+

Діетиловий ефір 4-(3-(трет-бутоксикарбонілметиламіно)пропіл)піридин-2,6-біс-дикарбонової кислоти



Діетиловий ефір 4-(3-(трет-бутоксикарбонілметиламіно)пропіл)піридин-2,6-біс-дикарбонової кислоти можна отримати по методиці для отримання діетилового ефіру 5-(3-трет-бутоксикарбоніл-N-метиламінопропіл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти, виходячи з діетилового ефіру 4-[3-(трет-бутоксикарбонілметиламіно)проп-1-ініл]піридин-2,6-дикарбонової кислоти.

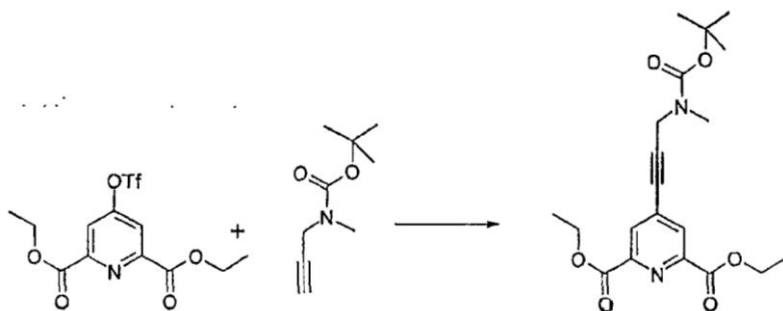
PX/MC (метод G2):

ES: $m/z=395$ MH^+

$m/z=339$ ($M+2H-tBu$) $^+$

Час утримування=7,5 хвилини

Діетиловий ефір 4-[3-(трет-бутоксикарбонілметиламіно)-проп-1-ініл]піридин-2,6-дикарбонової кислоти

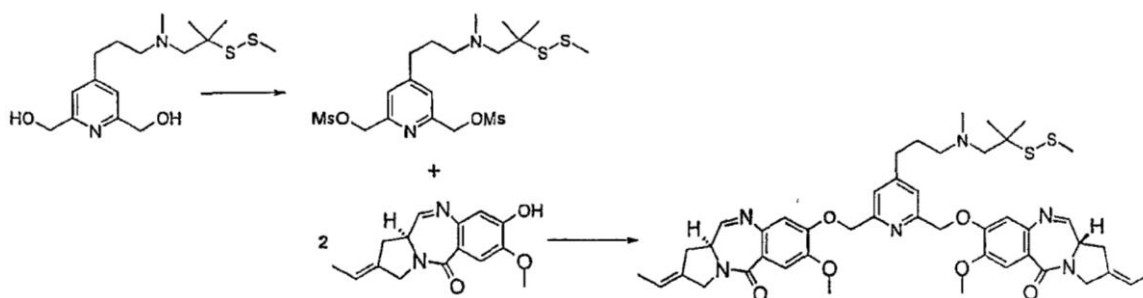


Діетиловий ефір 4-[3-(трет-бутоксикарбонілметиламіно)проп-1-ініл]піридин-2,6-дикарбонової кислоти можна отримати по методиці для отримання діетилового ефіру 5-(3-трет-бутоксикарбоніл-N-метиламінопропіл-1-іл)бензол-1,3-дикарбонової кислоти, виходячи з трет-бутоксикарбоніл-N-метилпропаргіламіну.

CI (метод D) $m/z=391$ MH^+

Приклад 30

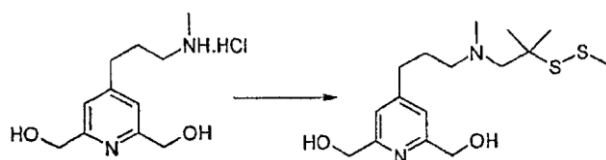
8,8'-[(4-(3-[Метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он]



8,8'-[(4-(3-[Метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]пропіл)піридин-2,6-
диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-
с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-
метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-
диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] із застосуванням 4-{3-
[метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]пропіл}-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): δ = 1,28 (с, 6H); 1,65 (м, частково прихований, 2H); 1,75 (д, J=6,5 Гц, 6H); 2,29 (с, 3H); 2,38 (с, 3H); 2,46 (м, 4H); 2,65 (м, 2H); 2,97 (м, 4H); 3,89 (м, 2H); 4,00 (с, 6H); 4,27 (ушир.с, 4H); 5,29 (с, 4H); 5,60 (ушир.кв, J=6,5 Гц, 2H); 6,86 (с, 2H); 7,30 (с, 2H); 7,55 (с, 2H); 7,64 (д, J=4,5 Гц, 2H).

4-{3-[Метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]пропіл}-2,6-біс(гідроксиметил)піридин



P-34409-034-3

4-{3-[Метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]пропіл}-2,6-біс(гідроксиметил)піридин можна отримати по методиці для отримання 1-(2-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміноетокси)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу із застосуванням 4-{3-[метиламіно]пропіл}-2,6-біс(гідроксиметил)піридину.

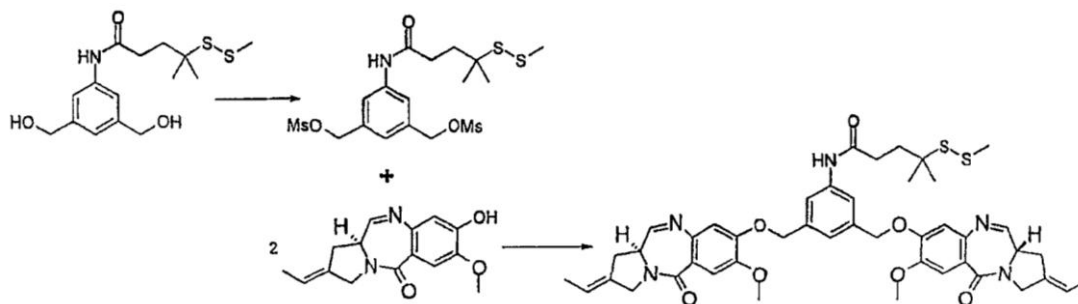
PX/MC (метод A1, Platform II):

ES m/z=345 MH⁺

Час утримування=1,15 хвилини.

Приклад 31

8,8'-[(1-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідо)бензол-3,5-диметил)діокси]біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати таким чином:



8,8'-[(1-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідо)бензол-3,5-диметил)діокси]біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-он] можна отримати по методиці для отримання 8,8'-[(4-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону], виходячи з (1-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідо)-3,5-біс(гідроксиметил)бензолу.

PX/MC (метод A1, Platform I):

ES: $m/z=838 \text{ MH}^+$

Час утримування=4,11 хвилини

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃-d₁, δ в м. ч.): δ =1,33 (с, 6H); 1,76 (д, J=6,5 Гц, 6H); 2,03 (м, 2H); 2.43 (с, 3H); 2,46 (м, 2H); 2,97 (м, 4H); 3,89 (м, 2H); 3,95 (с, 6H); 4,27 (ушир.с, 4H); 5,14 (д, J=12,5 Гц, 2H); 5,19 (д, J=12,5 Гц, 2H); 5,60 (кв, J=6,5 Гц, 2H); 6,81 (с, 2H); від 7,20 до 7,60 (м, 6H); 7,64 (д, J=4,5 Гц, 2H).

Відповідні меркаптопохідні сполук прикладів 19-31 можна отримати застосуванням методики, описаної в прикладі 18.

10 Приклад А: загальна методика отримання кон'югатів

Для кон'югування похідних томайміцину вибирають антитіла проти В4, які зв'язуються з антигеном CD 19, який переважно експресується на поверхні клітин лімфоми людини.

На першій стадії антитіло піддають реакції з модифікуючим агентом, N-сульфосукцинімідил-5-нітро-2-піридилдитіобутаноатом (SSNPB), для введення нітропіридилдитіогруп. Розчин антитіла huC242 при концентрації 8 мг/мл у водному буфері, що містить 0,05 М фосфат калію, 0,05 М хлорид натрію і 2 мМ етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA), рН 6,5, (65,6 мл) обробляють 8-кратним надлишком розчину SSNPB в диметилацетаміді (DMA). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 90 хв. і потім завантажують в колонку для гел'є-фільтрування через сефадекс G25 (колонок 50 мм × 35,5 мм), який попередньо приводили в стан рівноваги водним буфером, що містить 0,05М фосфат калію, 0,05М хлорид натрію і 2 мМ EDTA, рН 7,5. Фракції, що містять модифіковане антитіло, збирають і об'єднують для отримання продукту. Невелику аліквоту модифікованого антитіла обробляють дитіотреїтом для розщеплення нітропіридилдисульфідів і вивільнення нітропіридин-2-тіон аналізують спектрофотометрично ($\epsilon_{323 \text{ нм}}=4,299 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280 \text{ нм}}=565 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для сполуки і $\epsilon_{280 \text{ нм}}=217,560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для антитіла). В середньому 4-6 молекул нітропіридилдисульфідів звичайно зв'язуються з однією молекулою антитіла.

Модифіковане антитіло розводять до 2,5 мг/мл у вказаному вище буфері при рН 7,5 і потім обробляють розчином похідного томайміцину в DMA, так щоб кінцева концентрація DMA в буфері була 20%. Суміш кон'югатів перемішують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Реакційну суміш очищають пропусканням через колонку для гел'є-фільтрування сефакрилу S300 (колонок 50 мм × 42 см попередньо приводили в стан рівноваги забуференим фосфатом сольовим розчином (PBS) при рН 6,5). Фракції, що містять кон'югат мономерне антитіло-похідне томайміцину, об'єднують і діалізують в буфері PBS. Кінцевий кон'югат аналізують спектрофотометрично із застосуванням коефіцієнтів екстинкції, які визначають окремо для кожного похідного томайміцину.

Кон'югати сполук винаходу з SPDB-PBD і SMCC-PBD

huB4-SPDB-сполука прикладу 16

40 Приклад А1: для кон'югування похідних томайміцину вибирають антитіло проти В4, яке зв'язується з антигеном CD 19, яке переважно експресується на поверхні клітин лімфоми людини.

Антитіло спочатку модифікували N-гідроксисукцинімідилловим ефіром 4-(2-піридилдитіо)бутанової кислоти (SPDB) для введення піридилдитіогруп. До розчину huB4 (8 мг, 0,055 ммоль) у водному буфері, що містить 50 мМ фосфат калію, 50 мМ хлорид натрію і 2 мМ етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA), рН 6,5, (0,95 мл) додавали 4,5-кратний молярний надлишок SPDB (0,25 мкмоль, 81,1 мкг) в диметилацетаміді (DMA) (50 мкл). Кінцева концентрація білка була 8 мг/мл з 5% DMA в буфері. Продукт модифікації обертали при кімнатній температурі протягом 90 хвилин і потім очищали на колонці для гел'є-фільтрування з сефадексом G25, урівноваженим у водному буфері, що містить 50 мМ фосфат калію, 50 мМ хлорид натрію і 2 мМ EDTA, рН 7,5. Невелику аліквоту модифікованого антитіла обробляли дитіотреїтом (DTT) для розщеплення піридилдисульфідних груп. Модифіковане антитіло і вивільнений піридинтіол аналізували спектрофотометрично ($\epsilon_{343}=8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для вивільненого піридинтіолу, $\epsilon_{280}=5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для модифікованих піридилтіогруп і $\epsilon_{280}=222960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для антитіла). В середньому 3,36 молекул піридилдисульфідів звичайно зв'язувалися з молекулою антитіла.

55 Модифіковане антитіло (2,29 мг, 0,016 мкмоль) розбавляли у вказаному вище буфері при рН 7,5 (732,8 мкл) і DMA (91,6 мкл, 10% об./об.) і потім обробляли розчином 8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолділбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилена-1,2,3,11а-тетрагідро-5H-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] (сполука прикладу 16) (0,157 мкмоль, 0,12 мг) в DMA (91,6 мкл, 10% об./об.). Кінцева концентрація білка була 2,5 мг/мл з 20% DMA в буфері. Кон'югат обертали при кімнатній температурі протягом ночі і потім освітляли

седиментацією (13200 об./хв. протягом 4 хв.). Супернатант потім очищали на колонці для гель-фільтрування з сефадексом G25, урівноваженим в фізіологічному розчині з фосфатним буфером (PBS) при pH 6,5. Очищений кон'югат діалізували в буфері PBS з pH 6,5 (розведення ~1:650) з чотирма замінами буфера. Кон'югат освітлювали пропусканням через фільтр-шприц 0,22 мкм і аналізували спектрофотометрично ($\varepsilon_{280}=7743 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{318}=9137 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для PBD і $\varepsilon_{280}=222960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для антитіла). В середньому 1,76 молекули PBD (сполука прикладу 16) зв'язувалися з молекулою антитіла.

HuB4-SMCC-сполука прикладу 16

Приклад A2: для кон'югування похідних томайміцину вибирають антитіло проти B4, яке зв'язується з антигеном CD 19, який переважно експресується на поверхні клітин лімфоми людини.

У першій стадії антитіло піддають реакції з модифікуючим агентом сукцинімідил-4-[N-малеїмідометил]циклогексан-1-карбоксилатом (SMCC) для введення малеїмідних груп. Розчин антитіла huB4 при концентрації 6 мг/мл у водному буфері, що містить 0,05M фосфат калію, 0,05M хлорид натрію і 2 mM етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA), pH 6,7 (1 мл), обробляють 6,5-молярним надлишком розчину SMCC в диметилацетаміді (DMA). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 90 хв. і потім завантажують в колонку для гель-фільтрування (NAP 10) з сефадексом G25, який попередньо врівноважували у водному буфері, що містить 0,10 MN-(2-гідроксиетил)піперазин-N'-2-етансульфонову кислоту (HEPES), pH 8,0. Фракції, що містять модифіковане антитіло, збирають і об'єднують, отримуючи таким чином продукт. Невелику аліквоту модифікованого антитіла обробляють β -меркаптоетанолом протягом 10 хв. з подальшим доданням 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (DTNB) для аналізу тіолу, що залишився ($\varepsilon_{412 \text{ нм}}=14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для 5-тіо-2-нітробензойної кислоти (TNB) і $\varepsilon_{280 \text{ нм}}=222960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для антитіла). Кількість тіолу, витраченого в реакції з малеїмідом на антитіло (в порівнянні з контролем без антитіла), дорівнює молям малеїмїду, приєднаного до .. антитіла (субтрактивний аналіз Еллмана). Приблизно 3,2 реакційноздатних малеїмідних груп зв'язувалися з молекулою антитіла.

Модифіковане антитіло (3 мг, 0,021 мкмоль) розбавляють до 3,0 мг/мл в буфері HEPES при pH 8,0 і потім обробляють розчином сполуки прикладу 16 в DMA (5 mM), так щоб кінцева концентрація DMA в буфері становила 15%. Три молярних еквіваленти 8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіїлбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-ону] (сполука прикладу 16) додають на лінкер (9,6 екв. на антитіло, 0,202 мкмоль, 149 мкг). Суміш кон'югатів перемішують при кімнатній температурі протягом 20 годин. Реакційну суміш очищають пропусканням через колонку з G25 (NAP 5), який був попередньо урівноважений в буфері 0,05 M фосфату калію (KPi), 0,05M NaCl, 0,002M EDTA при pH 6,7. Фракції, що містять кон'югат huB4-сполуки прикладу 16, об'єднують і діалізують в буфері Kpi із 3 замінами (24 години). Кінцевий кон'югат (2,2 мг, 2,3 мг/мл) аналізують спектрофотометрично із застосуванням коефіцієнтів екстинкції, які визначають для саолуки прикладу 16 ($\varepsilon_{318 \text{ нм}}=9137 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{280 \text{ нм}}=7743 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) і антитіла B4 ($\varepsilon_{280 \text{ нм}}=222960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). В середньому 2,8 молекул PBD (сполука прикладу 16) зв'язувалися з молекулою антитіла.

HuB4-SPDB-сполука прикладу 17

Приклад A3: для кон'югування похідних томайміцину вибирають антитіло проти B4, яке зв'язується з антигеном CD19, який переважно експресується на поверхні клітин лімфоми людини.

Антитіло спочатку модифікують N-гідроксисукцинімідоловим ефіром 4-(2-піридилдитіо)бутанової кислоти (SPDB) для введення піридилдитіогруп. До розчину huB4 (4 мг, 0,028 мкмоль) у водному буфері, що містить 50 mM фосфат калію, 50 mM хлорид натрію і 2 mM EDTA, pH 6,5 (0,475 мл), додавали 4,5-кратний молярний надлишок SPDB (0,124 мкмоль, 40,6 мкг) DMA (25 мкл). Кінцева концентрація білка була 8 мг/мл з 5% DMA в буфері. Продукт модифікації обертали при кімнатній температурі протягом 90 хвилин і потім очищали на колонці для гель-фільтрування з сефадексом G25, урівноваженим у водному буфері, що містить 50 mM фосфат калію, 50 mM хлорид натрію і 2 mM EDTA, pH 7,5. Невелику аліквоту модифікованого антитіла обробляли DTT для розщеплення піридилдисульфідних груп. Модифіковане антитіло і вивільнений піридинтіол аналізували спектрофотометрично ($\varepsilon_{343}=8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для вивільненого піридинтіолу, $\varepsilon_{280}=5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для модифікованих піридилдитіогруп і $\varepsilon_{280}=222960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для антитіла). В середньому 3,31 молекули піридилдисульфїду зв'язувалися з молекулою антитіла.

Модифіковане антитіло (3,06 мг, 0,021 мкмоль) розбавляли у вказаному вище буфері при pH 7,5 (0,976 мл) і DMA (122 мкл, 10% об./об.) і потім обробляли розчином 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-меркапто-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдіїл(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-ону] (сполука прикладу 17) (0,209

мкмоль, 0,154 мг) в DMA (122 мкл, 10% об./об.). Кінцева концентрація білка становила 2,5 мг/мл з 20% DMA в буфері. Кон'югат обертали при кімнатній температурі протягом ночі і потім освітлювали седиментацією (13200 об./хв. протягом 4 хв.). Супернатант потім очищали на колонці для гель-фільтрування з сефадексом G25, урівноваженим в буфері PBS при pH 6,5.

Очищений кон'югат діалізували в буфері PBS з pH 6,5 (розведення ~1:1200) з трьома замінами буфера. Кон'югат освітлювали пропусканням через фільтр-шприц 0,22 мкм і аналізували спектрофотометрично ($\epsilon_{280}=10736 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{318}=12053 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для PBD і $\epsilon_{280}=222960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для антитіла). В середньому 3,05 молекул PBD (сполука прикладу 17) зв'язувалися з молекулою антитіла.

huB4-SMCC-сполука прикладу 17

Приклад A4: для кон'югування похідних томайміцину вибирають антитіло проти B4, яке зв'язується з антигеном CD19, який переважно експресується на поверхні клітин лімфоми людини.

У першій стадії антитіло піддають реакції з модифікуючим агентом сукцинімідил 4-[N-малеїмідометил]циклогексан-1-карбоксилатом (SMCC) для введення малеїмідних груп. Розчин антитіла huB4 при концентрації 6 мг/мл у водному буфері, що містить 0,05M фосфат калію, 0,05M хлорид натрію і 2 mM етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA), pH 6,7 (1 мл), обробляють 7-кратним молярним надлишком розчину SMCC в диметилацетаміді (DMA). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 90 хв. і потім завантажують в колонку для гель-фільтрування (NAP10) з сефадексом G25, який був попередньо урівноважений у водному буфері, що містить 0,10 MN-(2-гідроксиетил)піперазин-N'-2-етансульфонову кислоту (HEPES), pH 8,0. Фракції, що містять модифіковане антитіло, збирають і об'єднують, отримуючи таким чином продукт. Невелику аліквоту модифікованого антитіла обробляють β -меркаптоетанолом протягом 10 хв. з подальшим доданням 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (DTNB) для аналізу тіолу, що залишився ($\epsilon_{412 \text{ нм}}=14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для 5-тіо-2-нітробензойної кислоти (TNB) і $\epsilon_{280 \text{ нм}}=222960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для антитіла). Кількість тіолу, витраченого в реакції з малеїмідом на антитілі (в порівнянні з контролем без антитіла), дорівнює молям малеїмїду, приєднаного до антитіла (субтрактивний аналіз Еллмана). Приблизно 3,7 реакційноздатних малеїмідних групи зв'язувалися з молекулою антитіла.

Модифіковане антитіло (4,4 мг, 0,03 мкмоль) розбавляють до 8,7 мг/мл в буфері HEPES при pH 8,0 і потім обробляють розчином сполуки прикладу 17 в DMA (5,4 mM), так щоб кінцева концентрація DMA в буфері становила 20%. Два молярних еквіваленти 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-меркапто-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолділ(метиленоксид))-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11a-тетрагідро-5H-піроло[2,1-c][1,4]бензодіазепін-5-ону] (сполука прикладу 17) додають на лінкер (7,4 екв. на антитіло, 0,222 мкмоль, 164 мкг). Суміш кон'югатів перемішують при кімнатній температурі протягом 20 годин. Реакційну суміш очищають пропусканням через колонку G25 (NAP 5), яка була попередньо урівноважена в буфері 0,05 M фосфату калію (KPi), 0,05 M NaCl, 0,002 M EDTA при pH 6,7. Фракції, що містять кон'югат huB4-сполуки прикладу 17, об'єднують і діалізують в буфері KPi із 3 замінами (24 години). Кінцевий кон'югат (2,25 мг, 2,25 мг/мл) аналізують спектрофотометрично із застосуванням коефіцієнтів екстинкції, які визначають для сполуки прикладу 17 ($\epsilon_{318 \text{ нм}}=12053 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{280 \text{ нм}}=10736 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) і антитіла B4 ($\epsilon_{280 \text{ нм}}=222960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). В середньому 2,8 молекули PBD (сполука прикладу 17) зв'язувалися з молекулою антитіла.

HuMy9-6-SPDB-сполука прикладу 16

Приклад A5. Антитіло спочатку модифікували N-гідроксисукцинімідоловим ефіром 4-(2-піридилдитіо)бутанової кислоти (SPDB) для введення піридилдитіогруп. До розчину huMy9-6 (8 мг, 0,055 мкмоль) у водному буфері, що містить 50 mM фосфат калію, 50 mM хлорид натрію і 2 mM EDTA, pH 6,5, (0,950 мл) додавали 4,5-кратний молярний надлишок SPDB (0,246 мкмоль, 80,1 мкг) в DMA (50 мкл). Кінцева концентрація білка була 8 мг/мл з 5% DMA в буфері. Продукт модифікації перемішували при кімнатній температурі протягом 90 хвилин і потім очищали на колонці для гель-фільтрування з сефадексом G25, урівноваженим у водному буфері, що містить 50 mM фосфат калію, 50 mM хлорид натрію і 2 mM EDTA, pH 8,5. Невелику аліквоту модифікованого антитіла обробляли DTT для розщеплення піридилдисульфідних груп. Модифіковане антитіло і вивільнений піридинтіол аналізували спектрофотометрично ($\epsilon_{343}=8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для вивільненого піридинтіолу, $\epsilon_{280}=5100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для модифікованих піридилтіогруп і $\epsilon_{280}=206460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для антитіла). В середньому 3,32 молекули піридилдисульфїду зв'язувалися з молекулою антитіла.

Модифіковане антитіло (3,05 мг, 0,208 мкмоль) розбавляли у вказаному вище буфері при pH 8,5 (976 мкл) і DMA (122 мкл, 10% об./об.) і потім обробляли розчином 8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолділбіс(метиленоксид))-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11a-

тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону] (сполука прикладу 16) (0,207 мкмоль, 0,158 мг) в DMA (122 мкл, 10% об./об.). Кінцева концентрація білка становила 2,5 мг/мл з 20% DMA в буфері. Кон'югат перемішували при кімнатній температурі протягом ночі і потім освітлювали седиментацією (13200 об./хв. протягом 4 хв.). Супернатант потім очищали на колонці для гел'є-фільтрування з сефадексом G25, урівноваженим в буфері PBS при pH 6,5. Очищений кон'югат діалізували в буфері PBS з pH 6,5 (розведення $\sim 1:600$) з трьома замінами буфера. Кон'югат освітлювали пропусканням через фільтр-шприц 0,22 мкм і аналізували спектрофотометрично ($\epsilon_{280}=7743 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{318}=9137 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для PBD і $\epsilon_{280}=206460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для антитіла). В середньому 2,58 молекули PBD (сполука прикладу 16) зв'язувалися з молекулою антитіла.

Приклад В: аналіз зв'язування

Відносну зв'язувальну афінність антитіла проти В4 і його кон'югата з томайміцином на експресуючих антиген клітинах Рамоса визначають застосуванням аналізу на основі флуоресценції. Кон'югат антитіло-томайміцин і незв'язане антитіло при початковій концентрації $1 \times 10^7 \text{ M}$ додають в 96-ямкові круглодонні планшети і титрують із застосуванням 3-кратного серійного розведення так, щоб були дублети для кожної концентрації. Клітини Рамоса додають в кількості 50000 клітин на кожну ямку, до кожної ямки, що містить різні концентрації антитіла або кон'югата, а також до контрольної ямки. Планшети інкубують на льоду протягом 3 годин. Після періоду інкубації клітини в планшеті промивають і додають мічене флуоресценцією «друге» антитіло, яке зв'язується з гуманізованим IgG, подібним до анти-В4, і планшети інкубують протягом 1 години на льоду. Планшети після періоду інкубації знов промивають і клітини фіксують розчином 1% формальдегід/PBS. Флуоресценцію кожної ямки планшетів зчитують із застосуванням аналізатора флуоресценції Becton Dickinson FACSCalibur. Дані наносять на графік як процент максимальної флуоресценції, отриманої при найвищій концентрації антитіла або кон'югата.

Приклад С. Активність і специфічність похідного томайміцину або кон'югатів похідного томайміцину *in vitro*. Застосовують загальний протокол.

Зразки вільного похідного томайміцину або кон'югата похідного томайміцину додають в 96-ямковий плоскодонний планшет для культури тканин і титрують із застосуванням серійного розведення в межах від $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ до $3 \times 10^{-7} \text{ M}$. Антиген-позитивні пухлинні клітини або антиген-негативні пухлинні клітини додають в ямку таким чином, щоб були триплікатні зразки для кожної концентрації лікарського засобу для кожної клітинної лінії. Планшети інкубують при 37°C в атмосфері 5% CO_2 протягом 4 днів.

У кінці періоду інкубації в кожну ямку додають 20 мкл тетразолієвого реагента WST-8 (мононатрієвої солі 2-(2-метоксинітрофеніл)-3-(4-нітрофеніл)-5-(2,4-дисульфофеніл)-2-тетразолію) і планшети повертають в інкубатор на 2 години. Поглинання в кожній ямці планшетів потім вимірюють застосуванням планшет-рідера Molecular Devices при 450 нм. Частину виживання клітин при кожній концентрації похідного томайміцину або кон'югата наносять на діаграму.

Сполука	A549 (IC_{50})	KB (IC_{50})	MCF7 (IC_{50})
Приклад 5	$7 \times 10^{-11} \text{ M}$	$1 \times 10^{-10} \text{ M}$	$1 \times 10^{-10} \text{ M}$
Приклад 1	$< 10^{-12} \text{ M}$	$< 10^{-12} \text{ M}$	$< 10^{-12} \text{ M}$
Приклад 2	$< 10^{-12} \text{ M}$	$< 10^{-12} \text{ M}$	$< 10^{-12} \text{ M}$

Випробовували специфічну цитотоксичність сполук в порівнянні з кон'югатами винаходу проти клітинних ліній MOLT-4 і BJAB або HL60/GC і Рамос. Результати показані на Фіг. 1a-с, 2a-с і 3a-с.

На Фіг. 1a представлена активність *in vitro* huB4-SPDB-сполука прикладу 16 відносно антиген-позитивних BJAB-клітин і антиген-негативних MOLT-4-клітин.

На Фіг. 1b представлена активність *in vitro* huB4-8MCC-сполука прикладу 16 відносно антиген-позитивних BJAB-клітин і антиген-негативних MOLT-4-клітин.

На Фіг. 1c представлена активність *in vitro* вільної сполуки прикладу 16 відносно клітин BJAB і MOLT-4.

На Фіг. 2a представлена активність *in vitro* huB4-SPDB-сполука прикладу 17 відносно антиген-позитивних BJAB-клітин і антиген-негативних MOLT-4-клітин.

На Фіг. 2b представлена активність *in vitro* huB4-SMCC-сполука прикладу 17 відносно антиген-позитивних BJAB-клітин і антиген-негативних MOLT-4-клітин.

На Фіг. 2c представлена активність *in vitro* вільної сполуки прикладу 17 відносно клітин BJAB і MOLT-4.

На Фіг. 3а представлена активність *in vitro* huMy9-6-SPDB-сполука прикладу 16 відносно антиген-позитивних HL60/GC-клітин і антиген-негативних Ramos-клітин.

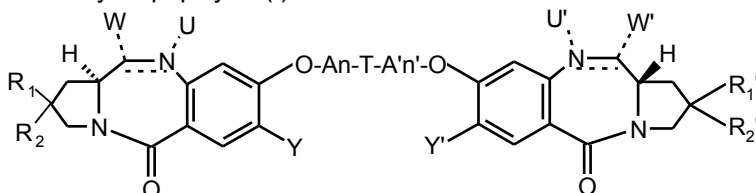
На Фіг. 3b представлена активність *in vitro* вільної сполуки прикладу 16 відносно клітин HL60/GC і Рамос.

- 5 Приклад D: ефективність *in vivo* похідного томайміцину або кон'югата похідного томайміцину
Випробування можна провести застосуванням і/або адаптацією протоколу, описаного в WO 2004/103272, і з huB4 як антитіла і прийнятних антиген-позитивних клітинних ліній, таких як клітинні лінії лімфоми Рамос і Rajii Burkitt.

10

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполуки формули (I)



де

- 15 ---- являє собою необов'язковий одинарний зв'язок;
 ---- являє собою або одинарний зв'язок, або подвійний зв'язок;
 за умови, що, коли ---- являє собою одинарний зв'язок, то U і U', однакові або різні, незалежно
 являють собою H, і W і W', однакові або різні, незалежно вибрані з групи, яка складається з OH,
 20 -OR, -OCOR, -OCOOR, -OCONRR', циклічного карбамату, так що N10 і C11 є частиною циклу, -
 NRCONRR', -OCSNHR, циклічного тіокарбамату, так що N10 і C11 є частиною циклу, -SH, -SR,
 SOR, -SOOR, -SO₃⁻, -NRSOOR, -NRR', необов'язково циклічного аміну, так що N10 і C11 є
 частиною циклу -NROR', -NRCOR, -N₃, ціаногрупа, триалкіл- або триарилфосфонію;
 і, коли ---- являє собою подвійний зв'язок, то U і U' відсутні і W і W' являють собою H;
 • R₁, R₂, R₁', R₂' є однаковими або різними і незалежно вибрані з алкілу, необов'язково
 25 заміщеного одним або декількома замісниками з CN, NRR', CF₃, OR, арилу, Het, S(O)_qR, або R₁ і
 R₂ і R₁' і R₂' утворюють разом групу, яка містить подвійний зв'язок =B і =B', відповідно;
 • B і B' є однаковими або різними і незалежно вибрані з алкенілу, необов'язково заміщеного
 одним або декількома замісниками з CN, R, CF₃, OR, арилу, Het, S(O)_qR, або B і B' являють
 собою атом кисню;
 30 • A, A' є однаковими або різними і незалежно вибрані з алкілу або алкенілу, причому кожний
 необов'язково заміщений одним або декількома замісниками з CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR,
 арилу, Het, алкілу, алкенілу;
 • Y, Y' є однаковими або різними і незалежно вибрані з H, OR;
 • T являє собою -NR- або 4-10-членний арил, циклоалкіл, гетероцикліл або гетероарил, причому
 35 кожний необов'язково заміщений одним або декількома замісниками з CN, NRR', CF₃, OR,
 S(O)_qR, і кожний заміщений одним або більше лінкером(ами);
 • n, n', однакові або різні, дорівнюють 0 або 1;
 • q дорівнює 0, 1 або 2;
 • R, R' є однаковими або різними і незалежно вибрані з H, алкілу, арилу, причому кожний
 40 необов'язково заміщений CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, арилом, Het;
 причому вказаний лінкер включає тіол-, сульфід- або дисульфідвмісні замісники і
 представлений формулою
 -G-D-(Z)_p-S-Z'
 де G являє собою одинарний або подвійний зв'язок, -O-, -S- або -NR-;
 45 D являє собою одинарний зв'язок або -E-, -E-NR-,
 -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-,
 -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;
 де E і F є однаковими або різними і незалежно вибрані з нерозгалужених або розгалужених
 -(OCH₂CH₂)_iалкіл(OCH₂CH₂)_j-, алкіл(OCH₂CH₂)_i-алкіл-, -(OCH₂CH₂)_i-,
 50 -(OCH₂CH₂)_iциклоалкіл(OCH₂CH₂)_j-, (OCH₂CH₂)_iгетероцикліл(OCH₂CH₂)_j-,
 (OCH₂CH₂)_iарил(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iгетероарил(OCH₂CH₂)_j-,
 -алкіл-(OCH₂CH₂)_iалкіл-(OCH₂CH₂)_j-, -алкіл-(OCH₂CH₂)_i-, -алкіл-(OCH₂CH₂)_iциклоалкіл(OCH₂CH₂)_j-,
 , -алкіл(OCH₂CH₂)_iгетероцикліл(OCH₂CH₂)_j-, -алкіл-(OCH₂CH₂)_iарил(OCH₂CH₂)_j-,
 алкіл(OCH₂CH₂)_iгетероарил(OCH₂CH₂)_j-, -циклоалкілалкіл-, -алкілциклоалкіл-,

-гетероцикліалкіл-, -алкілгетероцикліл-, -алкіларил-,
 -арилалкіл-, -алкілгетероарил-, -гетероарилалкіл-;
 де i і j , однакові або різні, є цілими числами і незалежно вибрані з 0, 1-2000;
 Z являє собою нерозгалужений або розгалужений -алкіл-;

- 5 r дорівнює 0 або 1;
 Z' являє собою H, тіолзахисну групу, таку як COR, R_{20} або SR_{20} , де R_{20} являє собою H, метил, алкіл, циклоалкіл, арил, гетероарил або гетероцикліл, за умови, що, коли Z' являє собою H, вказана сполука знаходиться в рівновазі з відповідною сполукою, утвореною внутрішньомолекулярною циклізацією, яка є результатом приєднання тіольної групи -SH до
- 10 імінного зв'язку -NH= одного з залишків PBD;
 або лінкер вибраний з наступних груп:
- 15 $-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t(CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t(CONR_{19})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -феніл-CO($CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -фурил-CO($CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -оксазоліл-CO($CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
- 20 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -тіазоліл-CO($CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -тієніл-CO($CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -імідазоліл-CO($CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -морфоліно-CO($CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -піперазино-CO($CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
- 25 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -N-метилпіперазино-CO($CR_{15}R_{16})_uSZ'$,
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -феніл-QSZ',
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -фурил-QSZ',
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -оксазоліл-QSZ',
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -тіазоліл-QSZ',
- 30 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -тієніл-QSZ',
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -імідазоліл-QSZ',
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -морфоліно-QSZ',
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -піперазино-QSZ',
 $-(CR_{13}R_{14})_t$ -N-метилпіперазино-QSZ',
- 35 $-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-O(CR_{13}R_{14})_t(NR_{19}CO)(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-O(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-O$ -феніл-QSZ',
 $-O$ -фурил-QSZ',
- 40 $-O$ -оксазоліл-QSZ',
 $-O$ -тіазоліл-QSZ',
 $-O$ -тієніл-QSZ',
 $-O$ -імідазоліл-QSZ',
 $-O$ -морфоліно-QSZ',
- 45 $-O$ -піперазино-QSZ',
 $-O$ -N-метилпіперазино-QSZ',
 $-OCO-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-OCONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-OCO$ -феніл-QSZ',
- 50 $-OCO$ -фурил-QSZ',
 $-OCO$ -оксазоліл-QSZ',
 $-OCO$ -тіазоліл-QSZ',
 $-OCO$ -тієніл-QSZ',
 $-OCO$ -імідазоліл-QSZ',
- 55 $-OCO$ -морфоліно-QSZ',
 $-OCO$ -піперазино-QSZ',
 $-OCO$ -N-метилпіперазино-QSZ',
 $-CO(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
 $-OCO-(CR_{13}R_{14})_t(CR_{17}=CR_{18})(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,
- 60 $-CONR_{12}(CR_{13}R_{14})_t(CR_{15}R_{16})_u(OCH_2CH_2)_ySZ'$,

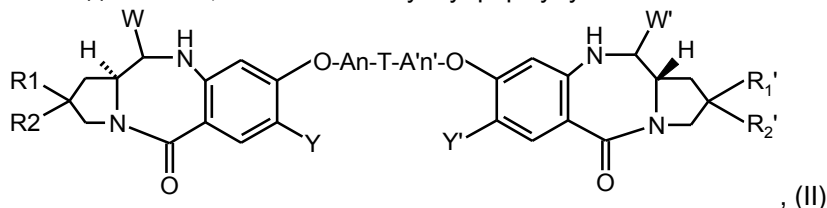
- CO-феніл-QSZ',
- CO-фурил-QSZ',
- CO-оксазоліл-QSZ',
- CO-тіазоліл-QSZ',
- 5 -CO-тієніл-QSZ',
- CO-імідазоліл-QSZ',
- CO-морфоліно-QSZ',
- CO-піперазино-QSZ',
- CO-піперидино-QSZ',
- 10 -CO-N-метилпіперазино-QSZ',
- NR₁₉(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
- NR₁₉CO(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
- NR₁₉(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
- NR₁₉CO(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
- 15 -NR₁₉CONR₁₂(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
- NR₁₉CONR₁₂(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₇=CR₁₈)(CR₁₅R₁₆)_t(OCH₂CH₂)_ySZ',
- NR₁₉CO-феніл-QSZ',
- NR₁₉CO-фурил-QSZ',
- NR₁₉CO-оксазоліл-QSZ',
- 20 -NR₁₉CO-тіазоліл-QSZ',
- NR₁₉CO-тієніл-QSZ',
- NR₁₉CO-імідазоліл-QSZ',
- NR₁₉CO-морфоліно-QSZ',
- NR₁₉CO-піперазино-QSZ',
- 25 -NR₁₉CO-піперидино-QSZ',
- NR₁₉CO-N-метилпіперазино-QSZ',
- NR₁₉-феніл-QSZ',
- NR₁₉-фурил-QSZ',
- NR₁₉-оксазоліл-QSZ',
- 30 -NR₁₉-тіазоліл-QSZ',
- NR₁₉-тієніл-QSZ',
- NR₁₉-імідазоліл-QSZ',
- NR₁₉-морфоліно-QSZ',
- NR₁₉-піперазино-QSZ',
- 35 -NR₁₉-піперидино-QSZ',
- NR₁₉-N-метилпіперазино-QSZ',
- NR₁₉CO-NR₁₂-феніл-QSZ',
- NR₁₉CO-NR₁₂-оксазоліл-QSZ',
- NR₁₉CO-NR₁₂-тіазоліл-QSZ',
- 40 -NR₁₉CO-NR₁₂-тієніл-QSZ',
- NR₁₉CO-NR₁₂-піперидино-QSZ',
- SCONR₁₂(CR₁₃R₁₄)_t(CR₁₅R₁₆)_u(OCH₂CH₂)_ySZ',
- SCO-морфоліно-QSZ',
- SCO-піперазино-QSZ',
- 45 -SCO-піперидино-QSZ' і
- SCO-N-метилпіперазино-QSZ',

де:

- Z' являє собою H, тіолзахисну групу, R₂₀' або SR₂₀', де R₂₀' являє собою алкіл, арил, гетероцикліл або гетероарил;
- 50 де Q являє собою прямий зв'язок або нерозгалужений алкіл або розгалужений алкіл, що має 1-10 атомів вуглецю, або поліетиленгліколеву зв'язувальну групу з 2-20 повторюваними етиленоксиданками;
- R₁₉ і R₁₂ є однаковими або різними і являють собою нерозгалужений алкіл, розгалужений алкіл або циклічний алкіл, який має від 1 до 10 атомів вуглецю, або простий або заміщений арил або
- 55 гетероцикліл, і R₁₂ крім цього може бути H,
- R₁₃, R₁₄, R₁₅ і R₁₆ є однаковими або різними і являють собою H або нерозгалужений або розгалужений алкіл, який має від 1 до 4 атомів вуглецю,
- R₁₇ і R₁₈ являють собою H або алкіл,
- и дорівнює цілому числу від 1 до 10 і може також дорівнювати 0,
- 60 t дорівнює цілому числу від 1 до 10 і може також дорівнювати 0,

у дорівнює цілому числу від 1 до 20 і може також дорівнювати 0, або їх фармацевтично прийнятні солі, гідрати або гідратовані солі або поліморфні кристалічні структури цих сполук, або їх оптичні ізомери, рацемати, діастереомери або енантіомери.

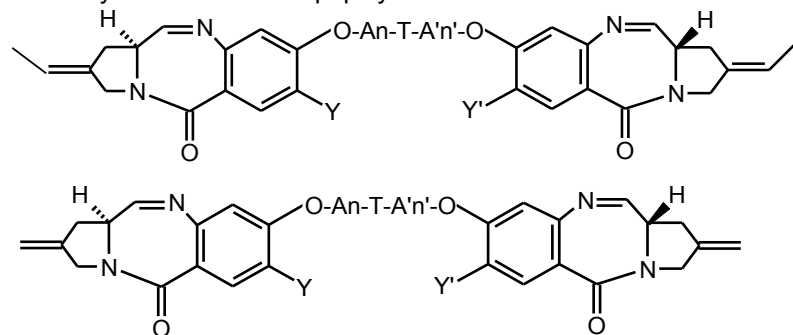
2. Похідні за п. 1, які мають наступну формулу II



де Y, Y', A, A', n, n', R1, R2, R1', R2', W, W', T мають такі ж значення, як в п.1.

3. Сполуки за п. 1 або 2, де B = B' являє собою =CH₂ або =CH-CH₃.

4. Сполуки за п. 1 або 2 формули



де A, A', Y, Y', T, n, n' мають такі ж значення, як в п. 1.

5. Сполуки за будь-яким з попередніх пунктів, де n=n'=1.

6. Сполуки за будь-яким з попередніх пунктів, де A=A'.

7. Сполуки за будь-яким з попередніх пунктів, де A=A' = нерозгалужений незаміщений алкіл.

8. Сполуки за будь-яким з попередніх пунктів, де Y=Y'.

9. Сполуки за будь-яким з попередніх пунктів, де Y=Y' = Оалкіл.

10. Сполуки за п. 8, де Y=Y' = OMe.

11. Сполуки за будь-яким з попередніх пунктів, де T являє собою феніл або піридил.

12. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, де G являє собою одинарний зв'язок або -O-, або -NR-.

13. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, де G являє собою -O-.

14. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, де D являє собою одинарний зв'язок або -E-, -E-NR-, -E-CO-, -CO-E-, -E-NR-CO-.

15. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, де D являє собою -E-NR-CO-.

16. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, де E являє собою нерозгалужений або розгалужений -алкіл-, -(OCH₂CH₂)- або -алкілгетероцикліл.

17. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, де Z являє собою -(CH₂)₂-C(CH₃)₂-.

18. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, де р дорівнює 1.

19. Сполука за будь-яким з попередніх пунктів, вибрана з

8,8'-[1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],

8,8'-[5-метокси-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],

8,8'-[1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],

8,8'-[1,4-бутандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],

8,8'-[3-метил-1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],

8,8'-[2,6-піридиндіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],

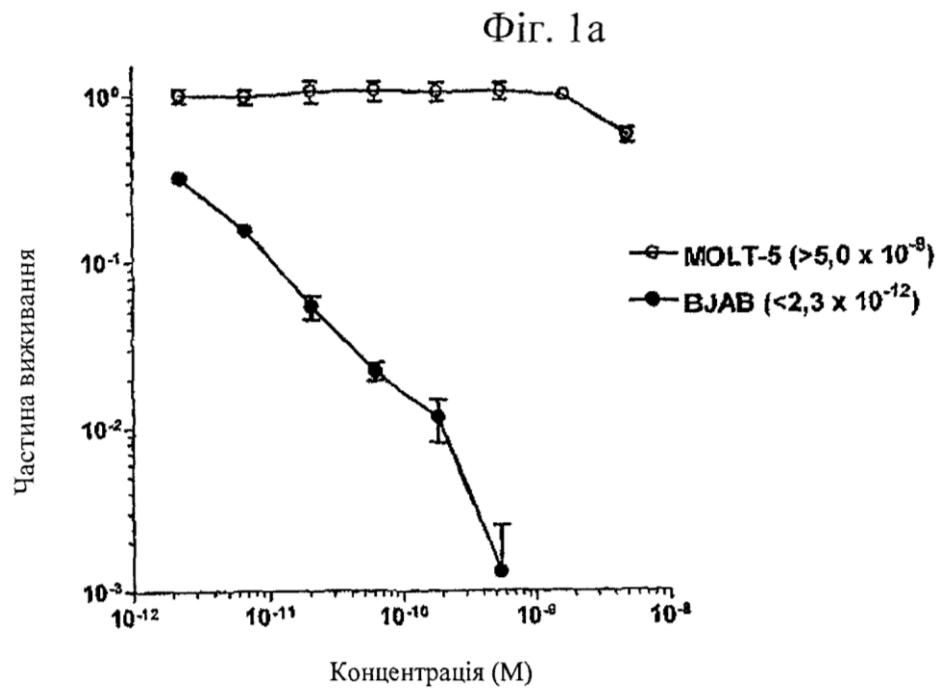
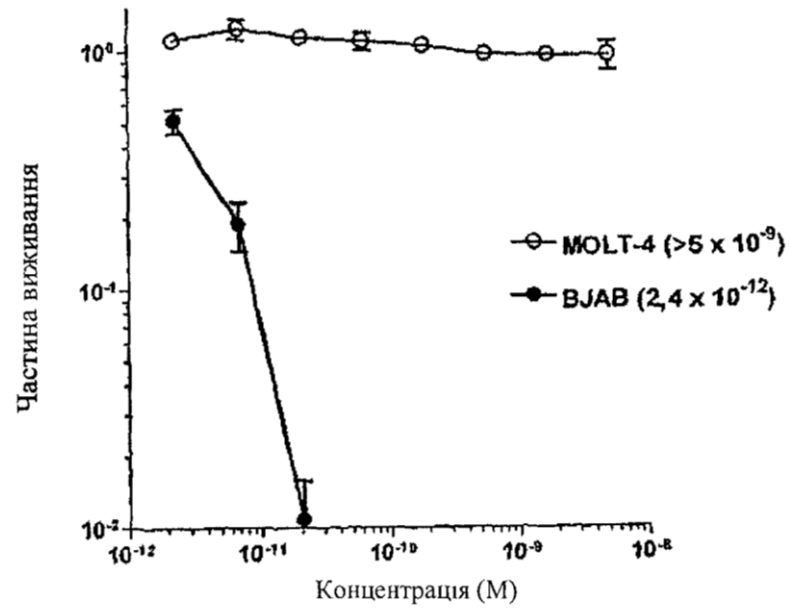
8,8'-[4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропілокси)-2,6-піридиндіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],

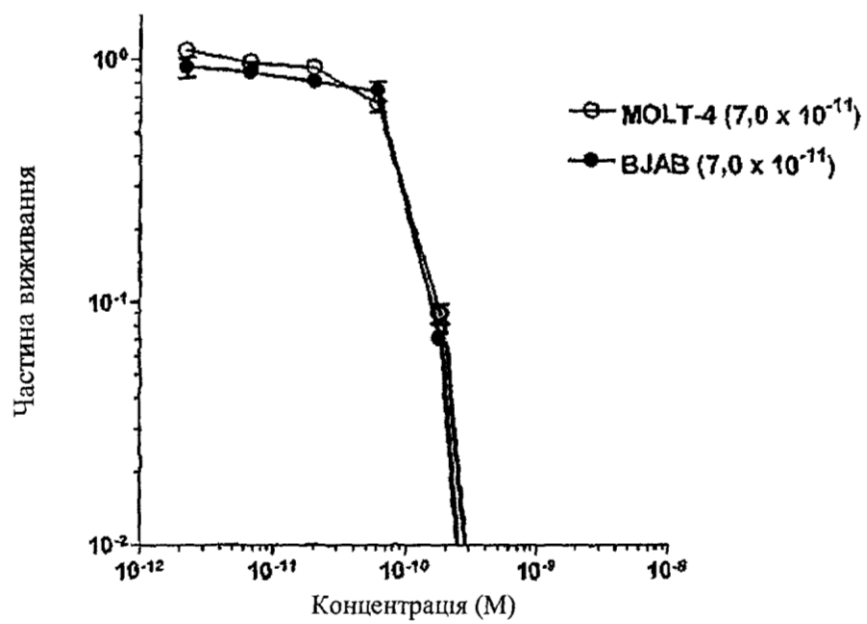
8,8'-[5-(3-амінопропілокси)-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],

- 8,8'-[5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[5-[3-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)пропілокси]-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[5-ацетилтіометил-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 трет-бутилового ефіру біс-{2-[(S)-2-метилен-7-метокси-5-оксо-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-8-ілоксі]етил}карбаїмінової кислоти,
 8,8'-[3-(2-ацетилтіоетил)-1,5-пентандіілбіс(окси)]-біс[(S)-2-метилен-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[5-(N-4-меркапто-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[5-(N-4-метилдитіо-4,4-диметилбутаноїл)аміно-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-меркапто-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[5-(N-метил-N-(2-метилдитіо-2,2-диметилетил)аміно-1,3-бензолдііл(метиленокси)]-біс[7-метокси-2-метилен-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(4-(2-(4-меркапто-4-метил)пентанамідоетокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(1-(2-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідоетокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(4-(3-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідопропокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(4-(4-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідобутокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(4-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(1-(3-[4-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)піперазин-1-іл]пропіл)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етоксі]етоксі}етокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етоксі]етоксі}етоксі)етоксі]етоксі}етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етоксі]етоксі}етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїламіно)етоксі]етоксі}етоксі)етоксі]етоксі}етокси)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(1-(2-[метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]етокси)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(4-(3-[метил-(4-метил-4-метилдисульфанілпентаноїл)аміно]пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(4-(3-[метил-(2-метил-2-метилдисульфанілпропіл)аміно]пропіл)піридин-2,6-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 8,8'-[(1-(4-метил-4-метилдисульфаніл)пентанамідо)бензол-3,5-диметил)діокси]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-диметокси-1,2,3,11а-тетрагідропіроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону],
 або їх фармацевтично прийнятних солей, гідратів або гідратованих солей, або поліморфних кристалічних структур цих сполук, або їх оптичних ізомерів, рацематів, діастереомерів або енантіомерів.
20. Сполука, вибрана з

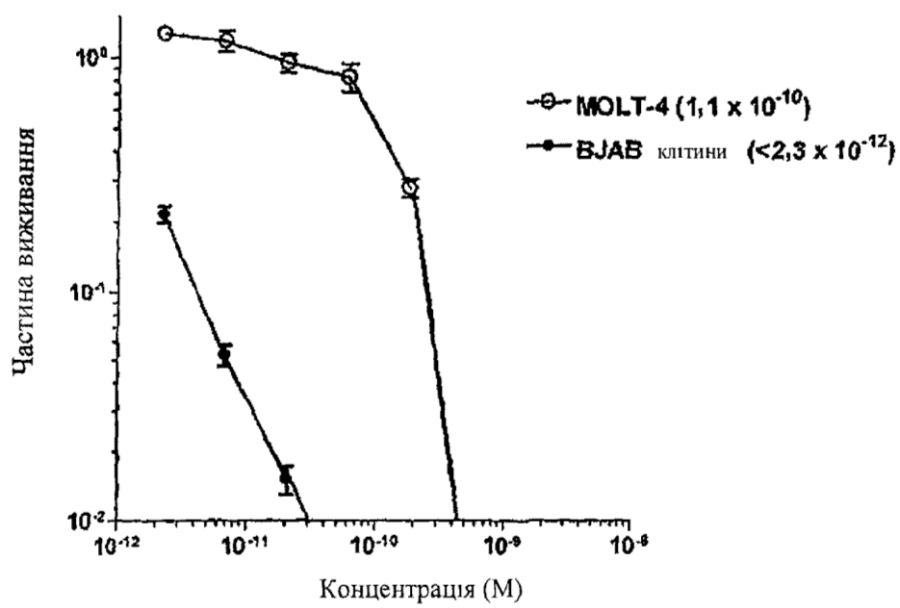
- 8,8'-[4-(3-трет-бутоксикарбоніламінопропілокси)-2,6-піридиндіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону];
8,8'-[5-(3-амінопропілокси)-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону];
- 5 8,8'-[5-(N-метил-3-трет-бутоксикарбоніламінопропіл)-1,3-бензолдіілбіс(метиленокси)]-біс[(S)-2-ет-(E)-иліден-7-метокси-1,2,3,11а-тетрагідро-5Н-піроло[2,1-с][1,4]бензодіазепін-5-ону].
21. Кон'югат, який включає одну або декілька сполук за будь-яким з пунктів 1-20, ковалентно зв'язаних зі зв'язуючим клітини агентом через лінкер, який включає тіол-, сульфід- або дисульфідзв'язувальну групу як лінкерну групу.
- 10 22. Кон'югат за п. 21, де агент, який зв'язує клітини, модифікований модифікуючим агентом для покращення реактивності агента, який зв'язує клітини.
23. Кон'югат за п. 21 або 22, де агент, що зв'язує клітини, вибраний з антитіла або фрагмента антитіла, який містить щонайменше один сайт зв'язування, лімфокінів, гормонів, факторів росту, молекул-переносників поживних речовин.
- 15 24. Кон'югат за пп. 21-23, де вказаний агент, який зв'язує клітини, вибраний з моноклональних антитіл; химерних антитіл; гуманізованих антитіл; повністю людських антитіл; одноланцюгових антитіл; фрагментів антитіл, таких як Fab, Fab', F(ab')₂ і F_v; інтерферонів; пептидів; лімфокінів, таких як IL-2, IL-3, IL-4, IL-6; гормонів, таких як інсулін, TRH (тиротропінривільняючі гормони), MSH (меланоцитстимулюючий гормон), стероїдних гормонів, таких як андрогени і естрогени;
- 20 факторів росту і колонієстимулюючих факторів, таких як EGF, TGFα, подібного інсуліну фактора росту (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF і GM-CSF; вітамінів, таких як фолат і трансферин.
- 25 25. Спосіб одержання кон'югата за будь-яким з пп. 21-24, який включає стадію, в якій сполуку формули (I), де Т являє собою сульфідну, дисульфідну або тіольну групу, або її попередник піддають взаємодії з агентом, який зв'язує клітини, що включає функціональну реакційноздатну відносно дисульфиду або тіолу групу, так, що сполука і агент, який зв'язує клітини, зв'язуються разом через сульфідний або дисульфідний зв'язок.
26. Спосіб одержання кон'югата, де вільний або захищений тіолвмісний агент, який зв'язує клітини, взаємодіє з дисульфід- або тіолвмісною сполукою за будь-яким з пунктів 1-20, причому агент, який зв'язує клітини, є пептидом або антитілом, модифікованим за допомогою
- 30 зшивального реагента.
27. Спосіб за п. 26, де зшивальним реагентом є N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат, N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноат (SPP), 4-сукцинімідилдоксикарбоніл-α-метил-α-(2-піридилдитіо)толуол (SMPT), N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)бутират (SDPB), сукцинімідилпіридилдитіопропіонат (SPDP), N-гідроксисукцинімідилловий ефір 4-(2-піридилдитіо)бутанової кислоти (SPDB), сукцинімідил-4-[N-малеїдометил]циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), N-сульфосукцинімідил-3-(2-(5-нітропіридилдитіо)бутират (SSNPB), 2-імінотіолан або S-ацетилянтарний ангідрид.
- 35 28. Спосіб за п. 26, де
- тіопіридилъну групу моноклонального антитіла, модифікованого сукцинімідилпіридилдитіопропіонатом, замінюють шляхом обробки тіолвмісною сполукою за
- 40 будь-яким з пунктів 1-19 з одержанням дисульфідзв'язаного кон'югата;
- арилтіольну групу сполуки за будь-яким з пунктів 1-19 замінюють сульфгідрильними групами, попередньо введеними в антитіло, з одержанням дисульфідзв'язаного кон'югата.
29. Спосіб за п. 26, де тіолвмісна сполука за будь-яким з пунктів 1-20 зв'язується через простий
- 45 тіоефірний зв'язок з антитілом або агентом, який зв'язує клітини, модифікованим N-сукцинімідил-4-(малеїдометил)циклогексанкарбоксилатом, N-сукцинімідил-4-(N-малеїдометил)циклогексан-1-карбокси-(6-амідокапроатом), N-сукцинімідил-4-(йодацетил)-амінобензоатом, N-сукцинімідилйодацетатом, N-сукцинімідилбромацетатом або N-сукцинімідил-3-(бромацетамідо)пропіонатом.
- 50 30. Спосіб за пп. 26-29, де кон'югат очищують стандартними методами хроматографії або діалізом, або діалізуванням.
31. Спосіб за п. 30, де методи хроматографії являють собою ВЕРХ, хроматографію з виключенням за розміром, адсорбційну хроматографію, іонообмінну хроматографію, хроматографію з гідрофобною взаємодією, афінну хроматографію, хроматографію на
- 55 керамічному гідроксіапатиті.
32. Фармацевтична композиція, яка включає кон'югат за будь-яким з пп. 21-24 або сполуку формули (I) за будь-яким з пп. 1-20 разом з фармацевтично прийнятним носієм.
33. Застосування ефективної кількості кон'югата за будь-яким з пп. 21-24 або сполуки формули (I) за будь-яким з пп. 1-20 для виготовлення лікарського засобу для лікування раку.
- 60 34. Кон'югат за будь-яким з пунктів 21-24 для використання як протиракового агента.

35. Сполука за будь-яким з пунктів 1-20 для використання як протиракового агента.

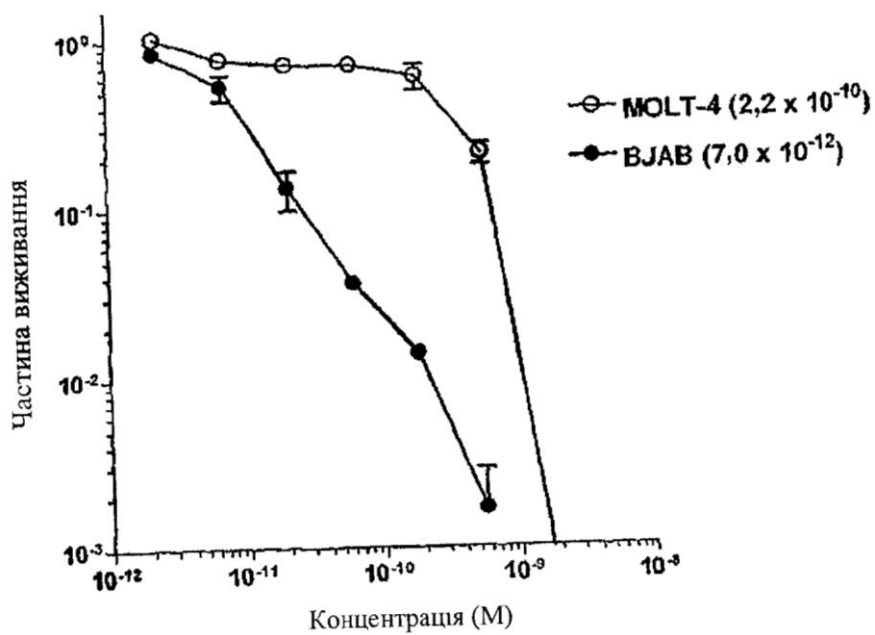




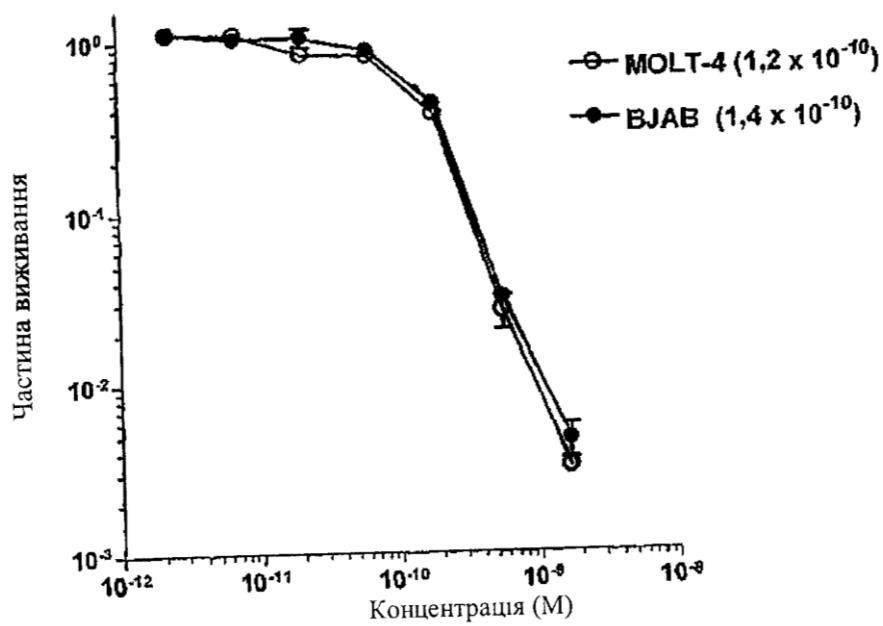
Фіг. 1с



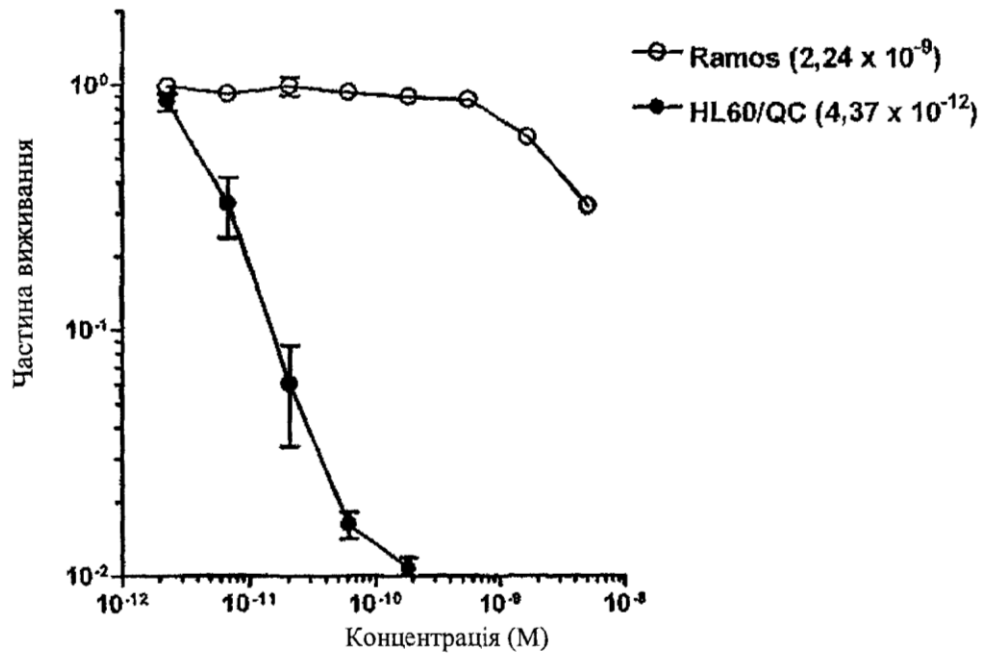
Фіг. 2а



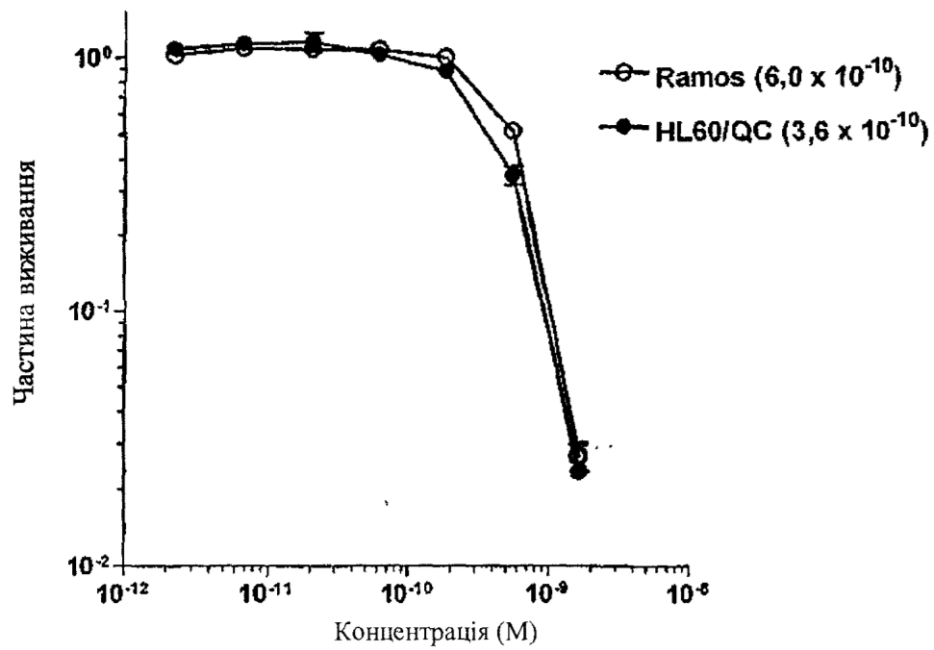
Фіг. 2b



Фіг. 2c



Фіг. 3а



Фіг. 3б

Комп'ютерна верстка О. Гапоненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601