

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035405

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.08

(21) Номер заявки
201792682

(22) Дата подачи заявки
2013.10.11

(51) Int. Cl. *A61K 47/48* (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ПИРРОЛБЕНЗОДИАЗЕПИНЫ И ИХ КОНЬЮГАТЫ

(31) 61/712,928

(32) 2012.10.12

(33) US

(43) 2018.08.31

(62) 201590424; 2013.10.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДИМЬОН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Ховард Филип Уилсон (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

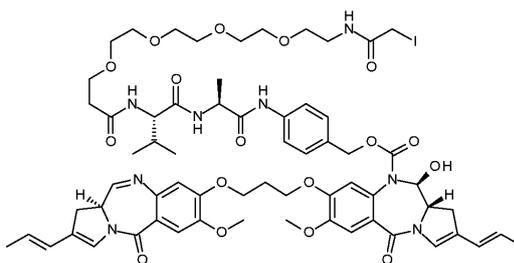
(56) WO-A1-2011130598

STEPHEN C. ALLEY ET AL.: "Contribution of Linker Stability to the Activities of Anticancer Immunoconjugates", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 19, no. 3, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 759-765, XP055037546, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc7004329, abstract and discussion

WO-A1-2005085251

WO-A1-2013053872

(57) Изобретение относится к пирролбензодиазепинам (PBD), в частности пирролбензодиазепинам, содержащим лабильную защитную группу в положении N10, представляющую собой линкер к связывающемуся с клетками агенту. В частности, предложено соединение А



A

его соли и сольваты, а также его конъюгаты со связывающимся с клетками агентом, содержащая его фармацевтическая композиция и способ получения конъюгатов.

B1

035405

035405

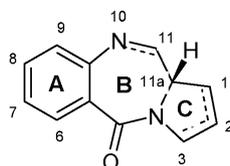
B1

Настоящее изобретение относится к пирролбензодиазепинам (PBD), в частности пирролбензодиазепинам, содержащим лабильную защитную группу в положении N10, представляющую собой линкер к связывающемуся с клетками агенту.

Уровень техники

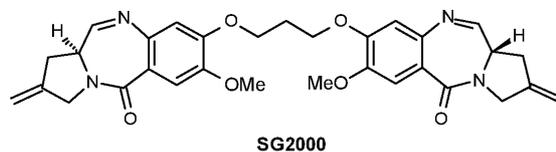
Пирролбензодиазепины.

Некоторые пирролбензодиазепины (PBD) способны распознавать конкретные последовательности ДНК и связываться с ними, при этом предпочтительная последовательность представляет собой PuGpu. Первый пирролбензодиазепиновый (PBD) противоопухолевый антибиотик, антрамицин, был открыт в 1965 году (Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965)). С тех пор был описан ряд природных PBD и было разработано более 10 способов синтеза различных их аналогов (Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994)); Antonow, D. and Thurston, D.E., Chem. Rev. 2011 111 (4), 2815-2864). Представители указанного семейства включают эбимицин (abbeymycin) (Hochlowski, et al., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), чикамицин (chicamycin) (Konishi, et al., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (патент Японии 58-180487; Thurston, et al., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose, et al., Tempahedron, 48, 751-758 (1992)), мазетрамицин (mazethramycin) (Kuminoto, et al., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), неотрамицины (neothramycin) A и B (Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), поротрамицин (porothramycin) (Tsunakawa, et al., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), протракарцин (prothracarcin) (Shimizu, et al., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley and Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), сибаномицин (sibanomicin) (DC-102) (Hara, et al., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh, et al., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), сибиромицин (sibiromycin) (Leber, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) и томамицин (tomamycin) (Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)). PBD имеют следующую общую структуру:



Они различаются по числу, типу и положению заместителей, как в своих ароматических А-кольцах, так и в пиррольных С-кольцах, и по степени насыщения С-кольца. В положении N10-C11 В-кольца, которое представляет собой электрофильный центр, ответственный за алкилирование ДНК, находится либо имин (N=C), либо карбиноламин (NH-CH(OH)), либо метиловый эфир карбиноламина (NH-CH(OMe)). Все известные природные продукты имеют (S)-конфигурацию хирального центра C11a, что обеспечивает правозакрученную "твист"-форму, если смотреть со стороны С-кольца в направлении А-кольца. Это придает им подходящую трехмерную форму для изоспиральности с малой бороздкой В-формы ДНК, что приводит к плотному прилеганию к сайту связывания (Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Их способность образовывать аддукт в малой бороздке ДНК позволяет им препятствовать процессингу ДНК, обеспечивая возможность их применения в качестве противоопухолевых агентов.

Особыми преимуществами обладает пирролбензодиазепиновое соединение, описанное в источнике Gregson et al., Chem. Commun. 1999, 797-798, как соединение 1, и в источнике Gregson et al. (J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174, как соединение 4a. Указанное соединение, также известное как SG2000, показано ниже:



В WO 2007/085930 описано получение димерных PBD соединений, содержащих линкерные группы для присоединения к связывающемуся с клетками агенту, такому как антитело. Линкер присутствует в мостике, связывающем мономерные звенья PBD димера.

Авторы настоящего изобретения описывали димерные PBD соединения, содержащие линкерные группы для присоединения к связывающемуся с клетками агенту, такому как антитело, в WO 2011/130598. В указанных соединениях линкер присоединен по одному из доступных положений N10, и они в целом расщепляются под действием фермента на линкерную группу.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

Терапия с использованием антител применяется для направленного лечения пациентов, страдающих раком, иммунологическими и ангиогенными нарушениями (Carter, P. (2006), Nature Reviews Immunology 6:343-357). Применение конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), т.е. иммуноконъюгатов, для местной доставки цитотоксических или цитостатических агентов, т.е. лекарственных средств для уничтожения или ингибирования опухолевых клеток при лечении рака, обеспечивает направленную

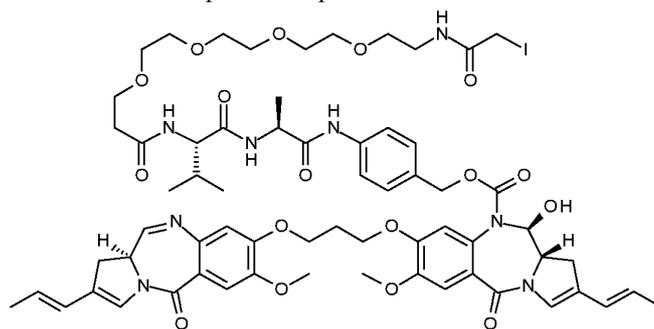
доставку фрагмента лекарственного средства к опухоли и внутриклеточное накопление в ней, тогда как системное введение указанных неконъюгированных лекарственных агентов может проводить к неприемлемым уровням токсичности по отношению к здоровым клеткам (Xie et al. (2006), Expert. Opin. Biol. Ther. 6(3):281-291; Kovtun et al. (2006), Cancer Res. 66(6):3214-3121; Law et al. (2006), CancerRes. 66(4):2328-2337; Wu et al. (2005), Nature Biotech. 23(9): 1137-1145; Lambert J. (2005), Current Opin. in Pharmacol. 5:543-549; Hamann P. (2005), Expert Opin. Ther. Patents 15(9): 1087-1103; Payne, G. (2003), Cancer Cell 3:207-212; Trail et al. (2003), Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Syrigos and Epenetos (1999), Anticancer research 19:605-614).

Таким образом, исследования направлены на получение препаратов с максимальной эффективностью при их минимальной токсичности. Попытки разработки и очистки ADC были сосредоточены на селективности моноклональных антител (mAb), а также на механизме действия лекарственного средства, свойствах связывания с лекарственным средством, отношении лекарственное средство/антитело (нагрузка) и высвобождения лекарственного средства (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al. (2009), Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO 2009/052249; McDonagh (2006), Protein Eng. Design & Sel. 19(7): 299-307; Doronina et al. (2006), Bioconj. Chem. 17:114-124; Erickson et al. (2006), Cancer res. 66(8): 1-8; Sanderson et al. (2005), Clin. Cancer res. 11:843-852; Jeffrey et al. (2005), J. Med. Chem. 48:1344-1358; Hamblett et al. (2004), Clin. Cancer res. 10:7063-7070). Фрагменты лекарственных средств могут оказывать свое цитотоксическое и цитостатическое действие по механизмам, включающим связывание тубулина, связывание ДНК, ингибирование протеасом и/или топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства склонны быть пассивными или становиться менее активными при конъюгировании с большими антителами или белковыми рецепторными лигандами.

Авторы настоящего изобретения разработали конкретные PBD димеры с линкерными группами для получения конъюгатов PBD со связывающимися с клетками агентами и, в частности, конъюгатов PBD с антителами.

Краткое описание изобретения

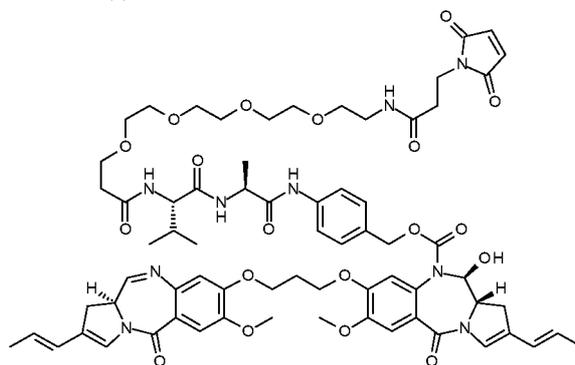
В первом аспекте в настоящем изобретении предложено соединение А



A

и/или его соли или сольваты.

В WO 2011/130598 описано соединение 80

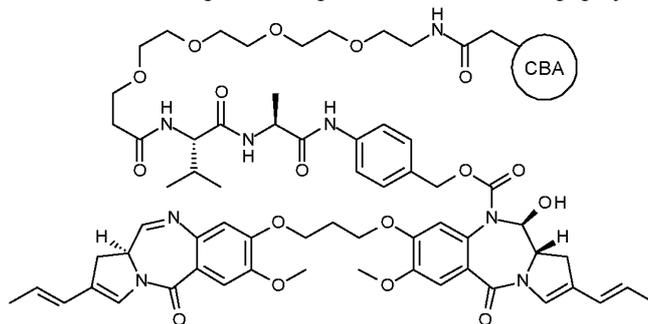


80

Соединение А отличается от этого соединения тем, что содержит йодацетамидную группу для присоединения к связывающемуся с клетками агенту. Указанная группа позволяет обеспечить некоторые преимущества по сравнению с соединением 80 в отношении его стабильности, когда связана со связывающимся с клетками агентом (см. ниже). Малеимидная группа в соединении 80 может подвергаться ретро-реакции Михаэля, становясь неконъюгированной со связывающимся с клетками агентом, и таким образом, восприимчивой к отщеплению другими тиолсодержащими биологическими молекулами, такими как альбумин и глутатион. Такое разрушение конъюгата не может произойти с соединением А. Также указанная йодацетамидная группа позволяет предотвратить другие нежелательные побочные реакции.

Оба соединения А содержит два центра sp^2 в каждом С-кольце, которые позволяют обеспечить более прочное связывание малой бороздки ДНК, по сравнению с соединениями, содержащими только один центр sp^2 в каждом С-кольце.

Во втором аспекте в настоящем изобретении предложен конъюгат формулы ConjA



ConjA

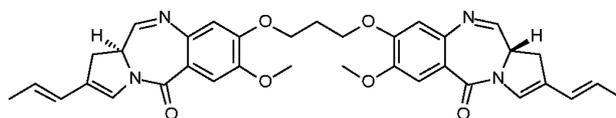
где CBA представляет собой связывающийся с клетками агент. Связь с показанным фрагментом обеспечивается посредством свободной S (активного тиола) на связывающемся с клетками агенте.

Также изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения пролиферативного заболевания, содержащей указанный выше конъюгат и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество, и к способу получения конъюгата.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предложен PBD димер с линкером, соединяемым через положение N10 на одном из фрагментов PBD, подходящий для образования PBD димера, конъюгированного через указанный линкер со связывающемся с клетками агентом.

Настоящее изобретение подходит для применения в обеспечении PBD соединения в предпочтительной области в субъекте. Конъюгат обеспечивает высвобождение активного PBD соединения, не содержащего каких-либо частей линкера. При этом не наблюдается каких-либо остатков, которые могли бы влиять на реакционную способность PBD соединения. Таким образом, ConjA будет высвобождать соединение ReIA



ReIA

В дополнительном аспекте настоящее изобретение представляет собой соединение ReIB и его соли и сольваты.

Указанная связь между PBD димером и связывающимся с клетками агентом, например антителом, согласно настоящему изобретению предпочтительно является стабильной вне клеток. До транспортировки или доставки в клетку конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) предпочтительно является стабильным и остается интактным, т.е. антитело остается связанным с фрагментом лекарственного средства. Линкеры являются стабильными вне клеток-мишеней и могут расщепляться с некоторой эффективной скоростью внутри клеток. Эффективный линкер (i) поддерживает свойства специфического связывания антитела; (ii) обеспечивает внутриклеточную доставку конъюгата или фрагмента лекарственного средства; (iii) остается стабильным и интактным, т.е. не расщепляется до момента доставки или транспортировки указанного конъюгата к области-мишени; и (iv) поддерживает цитотоксическое, приводящее к уничтожению клеток, действие или цитостатическое действие фрагмента PBD лекарственного средства. Стабильность ADC можно определить с помощью стандартных аналитических методов, таких как масс-спектрометрия, ВЭЖХ и метод разделения/анализа ЖХ/МС.

Доставка соединения формулы ReIA осуществляется к требуемому месту активации конъюгата формулы ConjA посредством воздействия фермента, такого как катепсин, на линкерную группу, и в частности, на дипептидный фрагмент валин-аланин.

Связывающийся с клетками агент.

Связывающийся с клетками агент может быть любого типа и включает пептиды и непептиды. Непептиды могут включать антитела или фрагмент антитела, который содержит по меньшей мере один сайт связывания, лимфокины, гормоны, миметики гормонов, витамины, факторы роста, молекулы переноса биогенных веществ или любые другие связывающиеся с клетками молекулы или вещества.

Пептиды.

Согласно одному из вариантов реализации указанный связывающийся с клетками агент представляет собой линейный или циклический пептид, содержащий 4-30, предпочтительно 6-20, смежных амино-

кислотных остатков. Согласно указанному варианту реализации один связывающийся с клетками агент предпочтительно связан с одним мономерным или димерным пирролбензодиазепиновым соединением.

Согласно одному варианту реализации связывающийся с клетками агент содержит пептид, который связывается с интегрином $\alpha_v\beta_6$. Указанный пептид может являться селективным в отношении $\alpha_v\beta_6$ по сравнению с XY5.

Согласно одному варианту реализации связывающийся с клетками агент содержит полипептид A20FMDV-Cys. Указанный полипептид A20FMDV-Cys имеет последовательность: NAV-PNLRGDLQVLAQKVARTC. Альтернативно, могут использоваться другие последовательности A20FMDV-Cys, в которых один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных остатков заменены другими аминокислотными остатками. Кроме того, указанный полипептид может иметь последовательность NAVXXXXXXXXXXXXXXXXXRTC.

Антитела.

Термин "антитело" в настоящем изобретении используется в широком смысле и в частности включает моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (Miller et al. (2003), *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Антитела могут быть мышинными, человеческими, гуманизированными, гибридными или произошедшими из других видов. Антитело представляет собой белок, продуцируемый клетками иммунной системы, способный распознавать и связываться со специфическим антигеном. (Janeway, C, Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001), *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Антиген-мишень в целом имеет многочисленные сайты связывания, также называемые эпитопами, которые распознают участки CDR множества антител. Каждое антитело, которое специфически связывается с отдельным эпитопом, имеет отличную структуру. Таким образом, один антиген может иметь более одного соответствующего ему антитела. Антитело включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, т.е. молекулу, которая содержит антигенсвязывающий сайт, иммуноспецифически связывающийся с антигеном интересующей мишени или его частью, при этом указанные мишени включают, но не ограничиваются ими, раковые клетки или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин может относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулинов. Иммуноглобулины могут иметь различное происхождение, включая иммуноглобулины человека, мыши или кролика.

"Фрагменты антител" включают часть полноразмерного антитела, в целом, его антигенсвязывающую или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты; диатела; линейные антитела; фрагменты, полученные из Fab-экспрессионной библиотеки, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (определяющую комплементарность область) и связывающиеся с эпитопом фрагменты любого из указанных выше фрагментов, которые иммуноспецифично связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

В настоящем описании термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, содержащие указанную популяцию, являются идентичными за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в минимальном количестве. Моноклональные антитела являются высоко специфичными, при этом они направлены против одного антигенного сайта. Более того, в отличие от составов поликлональных антител, которые содержат различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Помимо их специфичности преимуществом моноклональных антител является также в возможности их синтеза без загрязнения другими антителами. Определение "моноклональное" указывает характеристику антитела, полученного из, по существу, гомогенной популяции антител, при этом указанное определение не подразумевает продукцию антител каким-либо определенным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены с помощью гибридомных способов, впервые описанных в источнике Kohler et al. (1975), *Nature* 256:495, или могут быть получены с помощью способов рекомбинации ДНК (см. US 4816567). Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием методов, описанных в источнике Clackson et al. (1991), *Nature*, 352:624-628; Marks et al. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 или из трансгенных мышей, имеющих полностью гуманизированную систему иммуноглобулина (Lonberg (2008), *Curr. Opin.* 20(4):450-459).

В настоящем описании моноклональные антитела в частности включают "гибридные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенных видов или принадлежащих определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям антител, произошедших из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют

желаемую биологическую активность (US 4816567; и Morrison et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Гибридные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие вариабельные доменные антигенсвязывающие последовательности, произошедшие из последовательностей константной области примата, не представляющего собой человека (например, марьяшковых или человекообразных обезьян), и человека.

В настоящем описании "интактное антитело" представляет собой антитело, содержащее домены VL и VH, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут представлять собой константные домены нативных последовательностей (например, константные домены нативной последовательности человека) или вариантных аминокислотных последовательностей. Интактное антитело может иметь одну или более "эффекторных функций", которые относятся к биологическим активностям, свойственным Fc-области (нативной последовательности Fc-области или вариантной аминокислотной последовательностью Fc области) антитела. Примеры эффекторных функций антител включают C1q-связывание; комплементзависимую цитотоксичность; Fc-рецепторное связывание; антитело-зависимая опосредованная клетками цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз и понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности, таких как В-клеточный рецептор и BCR.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей интактные антитела могут быть отнесены к различным "классам". Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из указанных классов могут быть дополнительно разделены на "подклассы" (изоотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, называются α , δ , ϵ , γ и μ соответственно. Субъединичная структура и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Гуманизация.

Методики снижения иммуногенности *in vivo* нечеловеческого антитела или фрагмента антитела включают методики, называемые "гуманизация".

"Гуманизованное антитело" относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере часть модифицированной вариабельной области человеческого антитела, где часть указанной вариабельной области, предпочтительно, по существу, меньшая часть, чем интактный человеческий вариабельный домен, была заменена соответствующей последовательностью из не относящихся к человеку видов и где модифицированная вариабельная область связана с по меньшей мере другой частью другого белка, предпочтительно константной областью человеческого антитела. Выражение "гуманизованное антитело" включает человеческие антитела, в которых один или более аминокислотных остатков определяющей комплементарности области ("CDR") и/или один или более аминокислотных остатков каркасной области ("FW" или "FR") заменены на аминокислотные остатки из аналогичных мест грызунов или других нечеловеческих антител. Выражение "гуманизованное антитело" также включает их вариант или фрагмент с аминокислотной последовательностью иммуноглобулина, который содержит FR, имеющую, по существу, аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и CDR, имеющую, по существу, аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина.

"Гуманизованные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой гибридные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Или с другой стороны, гуманизованное антитело представляет собой человеческое антитело, которое также содержит выбранные последовательности из нечеловеческих (например, мышинных) антител вместо человеческих последовательностей. Гуманизованное антитело может включать консервативные аминокислотные замены или не природные остатки от того же или другого вида, которые в значительной степени не изменяют его связывающую и/или биологическую активность. Такие антитела представляют собой гибридные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческих иммуноглобулинов.

Существуют множество методик гуманизации, включая "CDR-прививание", "управляемая селекция", "деиммунизация", "перекладка домена" (также известная как "ремоделирование поверхности"), "композиционные антитела", "оптимизация содержания человеческой линии (Human String Content Optimisation)" и каркасная перетасовка.

CDR-прививание.

В данной методике гуманизованные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) антитело-реципиента заменены остатками из CDR не относящихся к человеку видов (антитело-донор), таких как мыши, крысы, верблюд, крупный рогатый скот, козы или кролики, имеющие требуемые свойства (в сущности, нечеловеческие CDR "прививают" на человеческий каркас). В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими нечеловеческими остатками (это может произойти когда, например, конкретный остаток FR значительно влияет на связывание антигена).

Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, которые не содержатся ни в ан-

тителе-реципиенте, ни во вносимых CDR или каркасной последовательностях. Указанные модификации выполняют для дополнительного улучшения и максимизации характеристик антитела. Таким образом, в целом, гуманизованное антитело будет содержать по меньшей мере один, и в одном аспекте, два вариабельных домена, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют петлям нечеловеческого иммуноглобулина и все или по существу все области FR представляют собой области последовательности человеческого иммуноглобулина. Указанные гуманизированные антитела необязательно также будут содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), или такую часть человеческого иммуноглобулина.

Управляемая селекция.

Данный способ состоит в комбинировании доменов VH или VL заданного нечеловеческого антитела, специфичного по отношению к конкретному эпитопу, с человеческой VH или VL библиотекой и специфичные человеческие V домены подбирают по отношению к интересующему антигену. Затем, указанный выбранный человеческий VH в комбинации с VL библиотекой с получением полностью человеческую комбинацию VH×VL. Данный способ описан в Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994), 899-903.

Композиционные антитела.

В данном способе два или более сегментов аминокислотной последовательности человеческого антитела объединяют в конечную молекулу антитела. Их конструируют путем комбинирования множества сегментов последовательностей человеческих VH и VL в комбинации, которые лимитируют или предотвращают возникновение человеческих Т-клеточных эпитопов в конечных V областях композиционного антитела. Если необходимо, Т-клеточные эпитопы лимитируют или предотвращают их возникновение путем замены сегментов V области, вносящих вклад или кодирующих Т-клеточный эпитоп, альтернативными сегментами, которые предотвращают возникновение Т-клеточных эпитопов. Данный способ описан в US 2008/0206239 A1.

Деиммунизация.

Данный способ включает удаление человеческих (или другого второго вида) Т-клеточных эпитопов из V областей терапевтического антитела (или другой молекулы). Последовательность V области терапевтических антител анализируют на присутствие связывающих мотивов МНС класса II путем, например, сравнения с базами данных МНС-связывающих мотивов (как, например, база данных "мотивов" на сайте www.who.edu.au). Альтернативно, связывающие мотивы МНС класса II могут быть идентифицированы с использованием методов вычислительной обработки, таких как описанные Altuvia et al. (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)); в указанных методах следующие подряд перекрывающиеся пептиды последовательностей V области исследуют на их энергию связи с МНС белками класса II. Эти данные можно затем комбинировать с информацией о других особенностях последовательностей, которые относятся к успешно представленным пептидам, таких как амфипатичность, мотивы Ротбарда и сайты расщепления для катепсина В и других процессинговых ферментов.

После определения Т-клеточных эпитопов потенциального второго вида (например, человека), их удаляют путем изменения одной или более аминокислот. Указанные модифицированные аминокислоты обычно находятся в самом Т-клеточном эпитопе, однако они также могут прилегать к эпитопу в первичной или вторичной структуре белка (и, следовательно, могут не прилегать в первичной структуре). Наиболее типично, изменение осуществляют путем замены, но в некоторых случаях добавление или делеция аминокислоты может быть более подходящим.

Все изменения могут быть осуществлены с помощью технологии рекомбинантных ДНК, так что конечная молекула может быть получена путем экспрессии из рекомбинантного хозяина с использованием хорошо известных способов, таких как сайт-направленный мутагенез. Тем не менее, также возможно использование химии белков или других средств молекулярного изменения.

Перекладка.

Данный способ включает:

(a) определение конформационной структуры вариабельной области нечеловеческого (например, грызунов) антитела (или его фрагмента) путем конструирования трехмерной модели вариабельной области указанного нечеловеческого антитела;

(b) выравнивание последовательностей с использованием распределений относительной доступности, полученных из рентгеновских кристаллографических структур, достаточного числа тяжелых и легких цепей вариабельной области нечеловеческого и человеческого антитела с получением набора каркасных позиций тяжелых и легких цепей, где выровненные позиции идентичны на 98% от достаточного числа тяжелых и легких цепей нечеловеческого антитела;

(c) определение набора поверхностных аминокислотных остатков тяжелой и легкой цепи, подлежащего гуманизации нечеловеческого антитела с использованием набора каркасных позиций, полученных на стадии (b);

(d) идентификация в аминокислотных последовательностях человеческого антитела набора поверхностных аминокислотных остатков тяжелой и легкой цепи, которые наиболее близко идентичны набору поверхностных аминокислотных остатков, определенных на стадии (c), где указанная тяжелая и легкая цепь человеческого антитела являются или не являются естественно спаренными;

(e) замену в аминокислотной последовательности подлежащего гуманизации нечеловеческого антигена набора поверхностных аминокислотных остатков тяжелой и легкой цепи, определенных на стадии (c), на набор поверхностных аминокислотных остатков тяжелой и легкой цепи, идентифицированных на стадии (d);

(f) конструирование трехмерной модели варибельного домена нечеловеческого антигена, полученного после замены, описанной на стадии (e);

(g) идентификацию, путем сравнения трехмерных моделей, полученных на стадиях (a) и (f), любых аминокислотных остатков из наборов, идентифицированных на стадиях (c) или (d), которые находятся в пределах 5 ангстрем от любого атома любого остатка определяющих комплементарность областей нечеловеческого антигена, подлежащего гуманизации; и

(h) изменение любых остатков, идентифицированных на стадии (g), от человеческих на исходные нечеловеческие аминокислотные остатки с определением, таким образом гуманизирующего набора поверхностных аминокислотных остатков нечеловеческого антигена; при условии, что указанная стадия (a) не должна проводиться первой, но должна быть проведена до стадии (g).

Супергуманизация.

В данном способе сравнивают нечеловеческую последовательность с репертуаром функциональных человеческих зародышевых генов. Выбирают указанные человеческие гены, кодирующие канонические структуры, идентичные или близкие с нечеловеческими последовательностями. Указанные выбранные человеческие гены с наивысшей гомологией по CDR выбирают в качестве FR доноров. Наконец, нечеловеческие CDR прививают на указанные человеческие FR. Данный способ описан в патенте WO 2005/079479 A2.

Оптимизация содержания человеческой линии.

В данном способе сравнивают нечеловеческую последовательность (например, мыши) с репертуаром человеческих зародышевых генов, и разницу записывают как Содержание человеческой линии (Human String Content) (HSC), где в последовательности подсчитано количество потенциальных MHC/T-клеточных эпитопов. Затем целевую последовательность гуманизируют путем максимизации ее HSC, вместо того, чтобы использовать меру общей идентичности с получением множества разнообразных гуманизированных вариантов (описано в *Molecular Immunology*, 44 (2007), 1986-1998).

Каркасная перетасовка.

CDR нечеловеческого антигена сливают в рамке с запасами кДНК, охватывающими все известные каркасы тяжелой и легкой цепи человеческой зародышевой линии. Затем гуманизированные антигена подбирают путем, например, пэннинга библиотек фаговых антигенов. Это описано в *Methods* 36, 43-60 (2005).

Примеры связывающихся с клетками агентов включают агенты, описанные для применения в WO 2007/085930, которая включена в настоящее изобретение.

Опухолеассоциированные антигены и родственные антигена для использования в вариантах реализации настоящего изобретения перечислены ниже.

Опухолеассоциированные антигены и родственные антигена

(1) VMPR1B (рецептор костного морфогенетического белка, тип IB).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_001203.

Номер версии Genbank NM_001203,2 GI:169790809.

Дата обновления записи Genbank Sep 23, 2012 02:06 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_001194.

Номер версии Genbank NP_001194,1 GI:4502431.

Дата обновления записи Genbank Sep 23, 2012 02:06 PM.

Перекрестные ссылки.

ten Dijke. P., et al., *Science* 264 (5155): 101-104 (1994), *Oncogene* 14 10 (11): 1377-1382 (1997); WO 2004/063362 (пункт 2); WO 2003/042661 (пункт 12); US2003/134790-A1 (страницы 38-39); WO 2002/102235 (пункт 13; страницы 296); WO 2003/055443 (страницы 91-92); WO 2002/99122 (пример 2; страницы 528-530); WO 2003/029421 (пункт 6); WO 2003/024392 (пункт 2; фиг. 112); WO 2002/98358 (пункт 1; страницы 183); WO 2002/54940 (страницы 100-101); WO 2002/59377 (страницы 349-350); WO 2002/30268 (пункт 27; страницы 376); 15 WO 2001/48204 (пример; фиг. 4); NP_001194 рецептор костного морфогенетического белка, тип IB/pid=NP_001194,1; MIM:603248; AY065994.

(2) E16 (LAT1, SLC7A5).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_003486.

Номер версии Genbank NM_003486,5 GI:71979931.

Дата обновления записи Genbank Jun 27, 2012 12:06 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_003477.

Номер версии Genbank NP_003477,4 GI:71979932.

Дата обновления записи Genbank Jun 27, 2012 12:06 PM.

Перекрестные ссылки.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al., 20 (1992), J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273; WO 2004/048938 (пример 2); WO 2004/032842 (пример IV); WO 2003/042661 (пункт 12); WO 2003/016475 (пункт 1); WO 2002/78524 (пример 2); WO 2002/99074 (пункт 19; страницы 127-129); WO 2002/86443 (пункт 27; страницы 222, 393); WO 2003/003906 (пункт 10; страница 293); WO 2002/64798 (пункт 33; страницы 93-95); WO 2000/14228 (пункт 5; страницы 133-136); US2003/224454 (фиг. 3); 25 WO 2003/025138 (пункт 12; страница 150); NP_003477 семейство носителей растворенных агентов 7 (транспортер катионных аминокислот, у+система), член 5/pid=NP_003477,3 - Homo sapiens; MIM:600182; NM_015923.

(3) STEAP1 (эпителиальный антиген предстательной железы с шестью трансмембранными сегментами).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_012449.

Номер версии Genbank NM_012449,2 GI:22027487.

Дата обновления записи Genbank Sep 9, 2012 02:57 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_036581.

Номер версии Genbank NP_036581,1 GI:9558759.

Дата обновления записи Genbank Sep 9, 2012 02:57 PM.

Перекрестные ссылки.

Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al. (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (25): 14523-14528; WO 2004/065577 (пункт 6); WO 2004/027049 (фиг. 1L); EP1394274 (пример 11); WO 2004/016225 (пункт 2); WO 2003/042661 (пункт 12); US2003/157089 (пример 5); US2003/185830 (пример 5); US2003/064397 (фиг. 2); WO 2002/89747 (пример 5; страницы 618-619); WO 2003/022995 (пример 9; фиг. 13A, 35 пример 53; страница 173, пример 2; фиг. 2A); эпителиальный антиген предстательной железы с шестью трансмембранными сегментами; MIM:604415.

(4) 0772P (CA125, MUC16).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AF361486.

Номер версии Genbank AF361486,3 GI:34501466.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 07:56 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAK74120.

Номер версии Genbank AAK74120.3 GI:34501467.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 07:56 AM.

Перекрестные ссылки.

J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001); WO 2004/045553 (пункт 14); WO 2002/92836 (пункт 6; фиг. 12); WO 2002/83866 (пункт 15; страницы 116-121); US2003/124140 (пример 16); GI:34501467.

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, мегакариоцит-потенцирующий фактор, мезотелин).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_005823.

Номер версии Genbank NM_005823,5 GI:293651528.

Дата обновления записи Genbank Sep 2, 2012 01:47 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_005814.

Номер версии Genbank NP_005814,2 GI:53988378.

Дата обновления записи Genbank Sep 2, 2012 01:47 PM.

Перекрестные ссылки.

Yamaguchi, N. et al. Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 10 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995); WO 2003/101283 (пункт 14); (WO 2002/102235 (пункт 13; страницы 287-288); WO 2002/101075 (пункт 4; страницы 308-309); WO 2002/71928 (страницы 320-321); WO 94/10312 (страницы 52-57); IM:601051.

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, семейство носителей растворимых агентов 34 (фосфат натрия), член 2, натрий-зависимый фосфатный транспортер 3b II типа).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_006424.

Номер версии Genbank NM_006424,2 GI:110611905.

Дата обновления записи Genbank Jul 22, 2012 03:39 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_006415.

Номер версии Genbank NP_006415.2 GI:110611906.

Дата обновления записи Genbank Jul 22, 2012 03:39 PM.

Перекрестные ссылки.

J. Biol. Chem. 277 (22): 19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al. (1999), Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582; WO 2004/022778 (пункт 2); EP1394274 (пример 11); WO 2002/102235 (пункт 13; страницы 20-326); EP0875569 (пункт 1; страницы 17-19); WO 2001/57188 (пункт 20; страница 329); WO 2004/032842 (пример IV); WO 2001/75177 (пункт 24; страницы 139-140); MIM:604217.

(7) Sema 5b (FU10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Нlog, сема-домен, семь повторов тромбоспондина (1 типа и подобного 1 типу), трансмембранный домен (TM) и короткий цитоплазматический домен, (семафорин) 5B).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AB040878.

Номер версии Genbank AB040878.1 GI:7959148.

Дата обновления записи Genbank Aug 2, 2006 05:40 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank BAA95969.

Номер версии Genbank BAA95969.1 GI:7959149.

Дата обновления записи Genbank Aug 2, 2006 05:40 PM.

Перекрестные ссылки.

Nagase T., et al. (2000), DNA Res. 7 (2):143-150; WO 2004/000997 (пункт 1); WO 2003/003984 (пункт 1); WO 2002/06339 (пункт 1; страница 50); WO 2001/88133 (пункт 1; страницы 41-43, 48-58); WO 2003/054152 (пункт 20); WO 2003/101400 (пункт 11); учетный номер: 30 Q9P283; Genew; HGNC:10737.

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN κДНК 2700050C12, RIKEN κДНК 2700050C12 ген).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AY358628.

Номер версии Genbank AY358628.1 GI:37182377.

Дата обновления записи Genbank Dec 1, 2009 04:15 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAQ88991.

Номер версии Genbank AAQ88991.1 GI:37182378.

Дата обновления записи Genbank Dec 1, 2009 04:15 AM.

Перекрестные ссылки.

Ross et al. (2002), Cancer Res. 62:2546-2553; US2003/129192 (пункт 2); US2004/044180 (пункт 12); US2004/044179 35 (пункт 11); US2003/096961 (пункт 11); US2003/232056 (пример 5); WO 2003/105758 16 (пункт 12); US2003/206918 (пример 5); EP1347046 (пункт 1); WO 2003/025148 (пункт 20); GI:37182378.

(9) ETBR (рецептор эндотелина типа B).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AY275463.

Номер версии Genbank AY275463.1 GI:30526094.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 02:26 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAR32295.

Номер версии Genbank AAR32295.1 GI:30526095.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 02:26 AM.

Перекрестные ссылки.

Nakamuta M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., et al., Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al., J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et al., J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al., Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al., Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al., Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., et al., Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger например, et al., Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al., Hum. Mol. Genet. 4, 2407-15 2409, 1995; Auricchio A., et al., Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J., et al., Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et al., Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al., Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al., Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V., et al. (2002), Hum. Genet. 111, 198-206; WO 2004/045516 (пункт 1); WO 2004/048938 (пример 2); WO 2004/040000 (пункт 151); WO 2003/087768 (пункт 1); WO 2003/016475 (пункт 1); WO 2003/016475 (пункт 1); WO 2002/61087 (фиг. 1); WO 2003/016494 (фиг. 6); WO 2003/025138 (пункт 12);

страница 144); WO 2001/98351 (пункт 1; страницы 124-125); EP0522868 (пункт 8; фиг. 2); WO 2001/77172 (пункт 1; страницы 297-299); US2003/109676; US6518404 (фиг. 3); US5773223 (пункт 1а; кол. 31-34); WO 2004/001004.

(10) MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_017763.

Номер версии Genbank NM_017763,4 GI:167830482.

Дата обновления записи Genbank Jul 22, 2012 12:34 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_060233.

Номер версии Genbank NP_060233,3 GI:56711322.

Дата обновления записи Genbank Jul 22, 2012 12:34 AM.

Перекрестные ссылки.

WO 2003/104275 (пункт 1); WO 2004/046342 (пример 2); WO 2003/042661 (пункт 12); WO 2003/083074 (пункт 14; страница 61); WO 2003/018621 (пункт 1); WO 2003/024392 (пункт 2; фиг. 93); WO 2001/66689 (пример 6); LocusID:54894.

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ассоциированный с раком предстательной железы ген 1, ассоциированный с раком предстательной железы белок 1, антиген эпителиальных клеток предстательной железы с шестью трансмембранными сегментами 2, белок предстательной железы с шестью трансмембранными сегментами).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AF455138.

Номер версии Genbank AF455138,1 GI:22655487.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 01:54 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAN04080.

Номер версии Genbank AAN04080,1 GI:22655488.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 01:54 AM.

Перекрестные ссылки.

Lab. Invest. 82 (11): 1573-1582 (2002); WO 2003/087306; US2003/064397 (пункт 1; фиг. 1); WO 2002/72596 (пункт 13; страницы 54-55); WO 2001/72962 (пункт 1; фиг. 4B); 35 WO 2003/104270 (пункт 11); WO 2003/104270 (пункт 16); US2004/005598 (пункт 22); WO 2003/042661 (пункт 12); US2003/060612 (пункт 12; фиг. 10); WO 2002/26822 (пункт 23; фиг. 2); WO 2002/16429 (пункт 12; фиг. 10); GI:22655488.

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, катионный канал транзиторного рецепторного потенциала, подсемейство M, член 4).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_017636.

Номер версии Genbank NM_017636,3 GI:304766649.

Дата обновления записи Genbank Jun 29, 2012 11:27 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_060106.

Номер версии Genbank NP_060106,2 GI:21314671.

Дата обновления записи Genbank Jun 29, 2012 11:27 AM.

Перекрестные ссылки.

Xu, X.Z., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (19): 10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003); US2003/143557 (пункт 4); WO 2000/40614 (пункт 14; страницы 100-103); WO 2002/10382 (пункт 1; фиг. 9A); WO 2003/042661 (пункт 12); WO 2002/30268 (пункт 27; страница 391); US2003/219806 (пункт 4); WO 2001/62794 (пункт 10 14; фиг. 1A-D); MIM:606936.

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор роста тератокарциномного происхождения).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_003212.

Номер версии Genbank NM_003212,3 GI:292494881.

Дата обновления записи Genbank Sep 23, 2012 02:27 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_003203.

Номер версии Genbank NP_003203,1 GI:4507425.

Дата обновления записи Genbank Sep 23, 2012 02:27 PM.

Перекрестные ссылки.

Ciccociola, A., et al., EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991); US2003/224411 (пункт 1); WO 2003/083041 (пример 1); WO 2003/034984 (пункт 12); WO 2002/88170 (пункт 2; страницы 52-53); WO 2003/024392 (пункт 2; фиг. 58); WO 2002/16413 (пункт 1; страницы 94-95,

105); WO 2002/22808 (пункт 2; фиг. 1); US5854399 (пример 2; кол. 17-18); US5792616 (фиг. 2); MIM:187395.

(14) CD21 (рецептор комплемента 2) или C3DR (C3d/рецептор к вирусу Эпштейна-Барра) или Hs.73792).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M26004.

Номер версии Genbank M26004,1 GI:181939.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA35786.

Номер версии Genbank AAA35786,1 GI:181940.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 AM.

Перекрестные ссылки.

Fujisaku et al. (1989), *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al., *J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al., *Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al. (1993), *J. Immunol.* 150, 5311-5320; WO 2004/045520 (пример 4); US2004/005538 (пример 1); WO 2003/062401 (пункт 9); WO 2004/045520 (пример 4); WO 91/02536 (фиг. 9,1-9,9); WO 2004/020595 (пункт 1); учетный номер: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786,1.

(15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (иммуноглобулин-ассоциированный бета), B29).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_000626.

Номер версии Genbank NM_000626,2 GI:90193589.

Дата обновления записи Genbank Jun 26, 2012 01:53 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_000617.

Номер версии Genbank NP_000617,1 GI:11038674.

Дата обновления записи Genbank Jun 26, 2012 01:53 PM.

Перекрестные ссылки.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003), 100 (7):4126-4131, *Blood* (2002), 100 (9):3068-3076, Muller et al. (1992), *Eur. J. Immunol.* 22 (6):1621-1625; WO 2004/016225 (пункт 2, фиг. 140); WO 2003/087768, US2004/101874 (пункт 1, страницы 102); WO 2003/062401 (пункт 9); WO 2002/78524 (пример 2); US2002/150573 (пункт 35, страница 15); US5644033; WO 2003/048202 (пункт 1, страницы 306 и 309); WO 99/58658, US6534482 (пункт 13, фиг. 17A/B); WO 2000/55351 (пункт 11, страницы 1145-1146); MIM:147245

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (содержащий SH2-домен фосфатазный якорный белок 1a), SPAP1B, SPAP1C).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_030764.

Номер версии Genbank NM_030764,3 GI:227430280.

Дата обновления записи Genbank Jun 30, 2012 12:30 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_110391.

Номер версии Genbank NP_110391,2 GI:19923629.

Дата обновления записи Genbank Jun 30, 2012 12:30 AM.

Перекрестные ссылки.

AU358130; *Genome Res.* 13 (10):2265-2270 (2003), *Immunogenetics* 54 (2):87-95 (2002), *Blood* 99 (8):2662-2669 (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al. (2001), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (3):768-775; WO 2004/016225 (пункт 2); WO 2003/077836; WO 2001/38490 (пункт 5; фиг. 18D-1-18D-2); WO 2003/097803 (пункт 12); 10 WO 2003/089624 (пункт 25); MIM:606509.

(17) HER2 (ErbB2).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M11730.

Номер версии Genbank M11730,1 GI:183986.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA75493.

Номер версии Genbank AAA75493,1 GI:306840.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 AM.

Перекрестные ссылки.

Coussens L., et al., *Science* (1985), 230(4730): 1132-1139; Yamamoto T., et al., *Nature* 319, 230-234, 1986; Semba K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al., *J. Cell Biol.* 165,

869- 15 880, 2004; Kuhns J.J., et al., J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al., Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et al. (1993), Genomics 15, 426-429; WO 2004/048938 (пример 2); WO 2004/027049 (фиг. 11); WO 2004/009622; WO 2003/081210; WO 2003/089904 (пункт 9); WO 2003/016475 (пункт 1); US2003/118592; WO 2003/008537 (пункт 1); WO 2003/055439 (пункт 29; фиг. 1A-B); WO 2003/025228 (пункт 37; фиг. 5C); 20 WO 2002/22636 (пример 13; страницы 95-107); WO 2002/12341 (пункт 68; фиг. 7); WO 2002/13847 (страницы 71-74); WO 2002/14503 (страницы 114-117); WO 2001/53463 (пункт 2; страницы 41-46); WO 2001/41787 (страница 15); WO 2000/44899 (пункт 52; фиг. 7); WO 2000/20579 (пункт 3; фиг. 2); US5869445 (пункт 3; кол. 31-38); WO 9630514 (пункт 2; страницы 56-61); EP1439393 (пункт 7); WO 2004/043361 (пункт 7); WO 2004/022709; WO 2001/00244 25 (пример 3; фиг. 4); учетный номер: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808,1.

АНТИТЕЛА

Abbott: US20110177095.

Например, антитело, содержащее CDR, имеющие в целом по меньшей мере 80% идентичность последовательностей, к CDR, имеющим аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 (CDR-H1), SEQ ID NO: 4 (CDR-H2), SEQ ID NO: 5 (CDR-H3), SEQ ID NO: 104 и/или SEQ ID NO: 6 (CDR-L1), SEQ ID NO: 7 (CDR-L2), и SEQ ID NO: 8 (CDR-L3), где анти-HER2 антитело или анти-HER2 связывающий фрагмент имеет сниженную иммуногенность по сравнению с антителом, имеющим VH с последовательностью SEQ ID NO: 1 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 2.

Biogen: US20100119511.

Например, ATCC учетные номера: PTA-10355, PTA-10356, PTA-10357, PTA-10358

Например, очищенная молекула антитела, которая связывается с HER2, содержащая все шесть CDR из антитела, выбранные из группы, состоящей из В1В71F10 (SEQ ID NO: 11, 13), В1В69A09 (SEQ ID NO: 15, 17); В1В67F10 (SEQ ID NO: 19, 21); В1В67F11 (SEQ ID NO: 23, 25), В1В66A12 (SEQ ID NO: 27, 29), В1В66C01 (SEQ ID NO: 31, 33), В1В65C10 (SEQ ID NO: 35, 37), В1В65H09 (SEQ ID NO: 39, 41) и В1В65B03 (SEQ ID NO: 43, 45), или CDR, которые идентичны или имеют не более двух изменений от указанных CDR.

Герцептин (Genentech) - US 6054297; учетный номер ATCC CRL-10463 (Genentech).

Пертузумаб (Genentech).

US20110117097

например, см. SEQ ID NO: 15&16, SEQ ID NO: 17&18, SEQ ID NO: 23&24&ATCC учетные номера HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12697.

US20090285837

US20090202546

например, ATCC учетные номера: HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12698.

US20060088523

например, ATCC учетные номера: HB-12215, HB-12216;

например, антитело, содержащее переменные легкие или переменные тяжелые аминокислотные последовательности в SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно;

например, антитело, содержащее аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 15 и 23, и аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 16 и 24.

US20060018899

например, ATCC учетные номера: (7C2) HB-12215, (7F3) HB-12216, (4D5) CRL-10463, (2C4) HB-12697;

например, антитело, содержащее аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 23, или его дезамидированный и/или окисленный вариант.

US2011/0159014

например, антитело, содержащее переменный домен легкой цепи, содержащий гиперпеременные области SEQ ID NO: 1";

например, антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий гиперпеременные области SEQ ID NO: 2.

US20090187007

Glycotop: TrasGEX антитело <http://www.glycotop.com/pipeline>.

Например, см. International Joint Cancer Institute and Changhai Hospital Cancer Cent: HMTI-Fc Ab - Gao J., et al., BMB Rep. 2009 Oct 31; 42(10):636-41.

Symphogen: US20110217305

Union Stem Cell &Gene Engineering, China - Liu HQ., et al., Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 2010 May; 26(5):456-8.

(18) NCA (CEACAM6).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M18728.

Номер версии Genbank M18728,1 GI:189084.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:48 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA59907.

Номер версии Genbank AAA59907,1 GI:189085.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:48 AM.

Перекрестные ссылки.

Barnett T., et al., Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16899-16903, 2002; WO 2004/063709; EP1439393 (пункт 7); WO 2004/044178 (пример 4); WO 2004/031238; WO 2003/042661 (пункт 12); WO 2002/78524 (пример 2); WO 2002/86443 (пункт 27; страница 427); WO 2002/60317 (пункт 2); учетный номер: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915,1.EMBL; M18728.

(19) MDP (DPEP1).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank BC017023.

Номер версии Genbank BC017023,1 GI:16877538.

Дата обновления записи Genbank Mar 6, 2012 01:00 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAN17023.

Номер версии Genbank AAN17023,1 GI:16877539.

Дата обновления записи Genbank Mar 6, 2012 01:00 PM.

Перекрестные ссылки.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (26): 16899-16903 (2002)); WO 2003/016475 (пункт 1); WO 2002/64798 (пункт 33; страницы 85- 87); JP05003790 (фиг. 6-8); WO 99/46284 (фиг. 9); MIM:179780.

(20) IL20R-alpha (IL20Ra, ZCYT0R7).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AF184971.

Номер версии Genbank AF184971,1 GI:6013324.

Дата обновления записи Genbank Mar 10, 2010 10:00 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAF01320.

Номер версии Genbank AAF01320,1 GI:6013325.

Дата обновления записи Genbank Mar 10, 2010 10:00 PM.

Перекрестные ссылки.

Clark H.F., et al., Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., et al., Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et al., Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L, et al., J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et al., J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et al. (2003), 10 Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., et al. (2004), J. Immunol. 172, 2006-2010; EP1394274 (пример 11); US2004/005320 (пример 5); WO 2003/029262 (страницы 74-75); WO 2003/002717 (пункт 2; страница 63); WO 2002/22153 (страницы 45-47); US2002/042366 (страницы 20-21); WO 2001/46261 (страницы 57-59); WO 2001/46232 (страницы 63-65); WO 98/37193 (пункт 1; страницы 55-59); учетный номер: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320,1.

(21) Brevican (BCAN, ВЕНАВ).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AF229053.

Номер версии Genbank AF229053,1 GI:10798902.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 12:58 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAG23135.

Номер версии Genbank AAG23135,1 GI:10798903.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 12:58 AM.

Перекрестные ссылки.

Gary S.C., et al., Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al., Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 16899-16903, 2002; US2003/186372 (пункт 11); US2003/186373 (пункт 11); US2003/119131 (пункт 1; фиг. 52); US2003/119122 (пункт 1; 20 Фиг 52); US2003/119126 (пункт 1); US2003/119121 (пункт 1; фиг. 52); US2003/119129 (пункт 1); US2003/119130 (пункт 1); US2003/119128 (пункт 1; фиг. 52); US2003/119125 (пункт 1); WO 2003/016475 (пункт 1); WO 2002/02634 (пункт 1).

(22) EphB2R (DRT, ERK, Нек5, EPHT3, Tyro5).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_004442.

Номер версии Genbank NM_004442,6 GI:111118979.

Дата обновления записи Genbank Sep 8, 2012 04:43 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_004433.

Номер версии Genbank NP_004433,2 GI:21396504.

Дата обновления записи Genbank Sep 8, 2012 04:43 PM.

Перекрестные ссылки.

Chan. J. and Watt, V.M., *Oncogene* 6 (6), 1057-1061 (1991), *Oncogene* 10 (5):897-905 (1995), *Annu. Rev. Neurosci.* 21:309-345 (1998), *Int. Rev. Cytol.* 196:177-244 (2000)); WO 2003042661 (пункт 12); WO 200053216 (пункт 1; страница 41); WO 2004065576 (пункт 1); WO 2004020583 (пункт 9); WO 2003004529 (страницы 128-132); WO 200053216 (пункт 1; страница 42); MIM:600997.

(23) ASLG659 (B7h).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AX092328.

Номер версии Genbank AX092328,1 GI:13444478.

Дата обновления записи Genbank Jan 26, 2011 07:37 AM.

Перекрестные ссылки.

US2004/0101899 (пункт 2); WO 2003104399 (пункт 11); WO 2004000221 (фиг. 3); US2003/165504 (пункт 1); US2003/124140 (пример 2); US2003/065143 (фиг. 60); WO 2002/102235 (пункт 13; страница 299); US2003/091580 (пример 2); WO 2002/10187 (пункт 6; фиг. 10); WO 2001/94641 (пункт 12; фиг. 7b); WO 2002/02624 (пункт 13; фиг. 1A-1B); US2002/034749 (пункт 54; страницы 45-46); WO 2002/06317 (пример 2; страницы 320-321, пункт 34; страницы 321-322); WO 2002/71928 (страницы 468-469); WO 2002/02587 (пример 1; фиг. 1); WO 2001/40269 (пример 3; страницы 190-192); WO 2000/36107 (пример 2; страницы 205-207); WO 2004/053079 (пункт 12); WO 2003/004989 (пункт 1); WO 2002/71928 (страницы 233-234, 452-453); WO 01/16318.

(24) PSCA (предшественник антигена стволовых клеток предстательной железы).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AJ297436.

Номер версии Genbank AJ297436,1 GI:9367211.

Дата обновления записи Genbank Feb 1, 2011 11:25 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank CAB97347.

Номер версии Genbank CAB97347,1 GI:9367212.

Дата обновления записи Genbank Feb 1, 2011 11:25 AM.

Перекрестные ссылки.

Reiter R.E., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al., *Oncogene* 19, 1288-1296, 2000; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000), 275(3): 783-788; WO 2004/022709; EP1394274 (пример 11); US2004/018553 (пункт 17); WO 2003/008537 (пункт 1); WO 2002/81646 (пункт 1; страница 164); WO 2003/003906 (пункт 10; страница 288); WO 2001/40309 (пример 1; фиг. 17); US2001/055751 (пример 1; фиг. 1b); WO 2000/32752 (пункт 18; фиг. 1); WO 98/51805 (пункт 17; страница 97); WO 98/51824 (пункт 10; страница 94); WO 98/40403 (пункт 2; фиг. 1B); учетный номер: 043653; EMBL AF043498; AAC39607,1.

(25) GEDA.

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AY260763.

Номер версии Genbank AY260763,1 GI:30102448.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 02:24 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAP14954.

Номер версии Genbank AAP14954,1 GI:30102449.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 02:24 AM.

Перекрестные ссылки.

AAP14954 белок подобный партнеру по слиянию липомы HMGIC/pid=AAP14954,1 -Homo sapiens (человек); WO 2003/054152 (пункт 20); WO 2003/000842 (пункт 1); WO 2003/023013 (пример 3, пункт 20); US2003/194704 (пункт 45); GI:30102449;

(26) BAFF-R (рецептор фактора активации В-клеток, B_LY_S рецептор 3, BR3).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AF116456.

Номер версии Genbank AF116456,1 GI:4585274.

Дата обновления записи Genbank Mar 10, 2010 09:44 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAD25356.

Номер версии Genbank AAD25356,1 GI:4585275.

Дата обновления записи Genbank Mar 10, 2010 09:44 PM.

Перекрестные ссылки.

BAFF рецептор/pid=NP_443177,1 - Homo sapiens: Thompson, J.S., et al., Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO 2004/058309; WO 2004/011611; WO 2003/045422 (пример; страница 32-33); WO 2003/014294 (пункт 35; фиг. 6B); WO 2003/035846 (пункт 70; страницы 615-616); WO 2002/94852 (кол. 136-137); WO 2002/38766 25 (пункт 3; страница 133); WO 2002/24909 (пример 3; фиг. 3); MIM:606269; NP_443177,1; NM_052945_1; AF132600.

(27) CD22 (В-клеточный рецептор, изоформа CD22-B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FU22814).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AK026467.

Номер версии Genbank AK026467,1 GI:10439337.

Дата обновления записи Genbank Sep 11, 2006 11:24 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank BAB15489.

Номер версии Genbank BAB15489,1 GI:10439338.

Дата обновления записи Genbank Sep 11, 2006 11:24 PM.

Перекрестные ссылки.

Wilson et al. (1991), J. Exp. Med. 173:137-146; 30 WO 2003/072036 (пункт 1; фиг. 1); IM:107266; NP_001762,1; NM_001771_1.

(27a) CD22 (CD22 молекула).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank X52785.

Номер версии Genbank X52785,1 GI:29778.

Дата обновления записи Genbank Feb 2, 2011 10:09 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank CAA36988.

Номер версии Genbank CAA36988,1 GI:29779.

Дата обновления записи Genbank Feb 2, 2011 10:09 AM.

Перекрестные ссылки.

Stamenkovic I. et al., Nature 345 (6270), 74-77 (1990).

Другая информация.

Официальное обозначение: CD22.

Другие названия: SIGLEC-2, SIGLEC2.

Другие обозначения: В-клеточный рецептор CD22; молекула клеточной адгезии В-лимфоцитов; BL-CAM; антиген CD22; поверхностный антиген Т-клеток Leu-14; связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 2; связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 2.

АНТИТЕЛА

G5/44 (инотузумаб): DiJoseph JF., et al., Cancer Immunol Immunother. 2005 Jan; 54(1):11-24.

Эпратузумаб - Goldenberg DM., et al., Expert Rev Anticancer Ther. 6(10): 1341-53, 2006.

(28) CD79a (CD79A, CD79альфа), иммуноглобулин-ассоциированный альфа, специфичный В-клеточный белок, который ковалентно взаимодействует с Ig-бета (CD79B) и образует комплекс на поверхности с 35 молекулами Ig M, передает сигнал, вовлеченный в дифференцировку В-клеток), pI: 4,84, MW: 25028 TM: 2 [P] Расположение гена в хромосоме: 19q13,2).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_001783.

Номер версии Genbank NM_001783,3 GI:90193587.

Дата обновления записи Genbank Jun 26, 2012 01:48 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_001774.

Номер версии Genbank NP_001774,1 GI:4502685.

Дата обновления записи Genbank Jun 26, 2012 01:48 PM.

Перекрестные ссылки.

WO 2003/088808, US2003/0228319; WO 2003/062401 (пункт 9); US2002/150573 (пункт 4, страницы 13-14); WO 99/58658 (пункт 13, фиг. 16); WO 92/07574 (фиг. 1); US5644033; Ha et al. (1992), J. Immunol. 148(5): 1526-1531; Muller et al. (1992), Eur. J. Immunol. 22:1621-1625; Hashimoto et al. (1994), Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al. (1992), Clin. Exp. 5 Immunol. 90(1):141-146; Yu et al. (1992), J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi et al. (1988), EMBO J. 7(11):3457-3464.

(29) CXCR5 (Рецептор лимфомы Беркитта1, связанный с G-белком рецептор, который активируется хемокином CXCL13, функционирует при миграции лимфоцитов и в гуморальных реакциях иммунитета, играет роль в инфекции HIV-2 и, возможно, развитии СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза); 372 aa, pI: 8,54 MW: 41959 TM: 7 [P] Расположение гена в хромосоме: 11q23,3.

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_001716.

Номер версии Genbank NM_001716,4 GI:342307092.

Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:49 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_001707.

Номер версии Genbank NP_001707,1 GI:4502415.

Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:49 PM.

Перекрестные ссылки.

WO 2004/040000; WO 2004/015426; US2003/105292 (пример 2); US6555339 (пример 2); WO 2002/61087 (фиг. 1); WO 2001/57188 (пункт 20, страница 269); WO 2001/72830 (страницы 12-13); WO 2000/22129 (пример 1, страницы 152-153, 15 пример 2, страницы 254-256); WO 99/28468 (пункт 1, страницы 38); US5440021 (пример 2, кол. 49-52); WO 94/28931 (страницы 56-58); WO 92/17497 (пункт 7, фиг. 5); Dobner et al. (1992), Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Varella et al. (1995), Biochem. J. 309:773-779.

(30) HLA-DOB (бета-субъединица молекулы MHC класса II (Ia антиген), которая связывает пептиды и представляет их CD4⁺ Т-лимфоцитам); 273 aa, pl: 6,56, MW: 30820. TM: 1 [P] Расположение гена в хромосоме: 6p21,3).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_002120.

Номер версии Genbank NM_002120,3 GI:118402587.

Дата обновления записи Genbank Sep 8, 2012 04:46 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_002111.

Номер версии Genbank NP_002111,1 GI:4504403.

Дата обновления записи Genbank Sep 8, 2012 04:46 PM.

Перекрестные ссылки.

Tonnelle et al. (1985), EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al. (1989), Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al. (1992), J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Serenius et al. (1987), J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al. (1996), J. Mol. Biol. 25 255:1-13; Naruse et al. (2002), Tissue Antigens 59:512-519; WO 99/58658 (пункт 13, фиг. 15); US6153408 (кол. 35-38); US5976551 (кол. 168-170); US6011146 (кол. 145-146); Kasahara et al. (1989), Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al. (1985), J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119.

(31) P2X5 (пуринергический рецепторный P2X лиганд-активируемый ионный канал 5, ионный канал, зависимый от внеклеточного АТФ, может быть вовлечен в синаптическую передачу и нейрогенез, недостаточность может вносить вклад в патофизиологию идиопатической нестабильности детрузора); 422 aa, pl: 7,63, MW: 47206 TM: 1 [P] Расположение гена в хромосоме: 17p13,3).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_002561.

Номер версии Genbank NM_002561,3 GI:325197202.

Дата обновления записи Genbank Jun 27, 2012 12:41 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_002552.

Номер версии Genbank NP_002552,2 GI:28416933.

Дата обновления записи Genbank Jun 27, 2012 12:41 AM.

Перекрестные ссылки.

Le et al. (1997), FEBS Lett. 418(1-2):195-199; WO 2004/047749; WO 2003/072035 (пункт 10); Touchman et al. (2000), Genome Res. 10:165-173; WO 2002/22660 (пункт 20); WO 2003/093444 (пункт 1); WO 2003/087768 (пункт 1); WO 2003/029277 (страница 82).

(32) CD72 (антиген В-клеточной дифференцировки CD72, Lyb-2); 359 aa, pl: 8,66, MW: 40225, TM: 1 [P] Расположение гена в хромосоме: 9p13,3).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_001782.

Номер версии Genbank NM_001782,2 GI:194018444.

Дата обновления записи Genbank Jun 26, 2012 01:43 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_001773.

Номер версии Genbank NP_001773,1 GI:4502683.

Дата обновления записи Genbank Jun 26, 2012 01:43 PM.

Перекрестные ссылки.

WO 2004042346 (пункт 65); WO 2003/026493 (страницы 51-52, 57-58); WO 2000/75655 (страницы 105-106); Von Hoegen et al. (1990), J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903.

(33) LY64 (антиген лимфоцитов 64 (RP105), мембранный белок I типа семейства лейцин-богатых повторов (LRR), регулирует активацию В-клеток и апоптоз, потеря функции связана с повышенной ак-

тивностью заболевания у пациентов, страдающих системной красной волчанкой); 661 aa, pl: 6,20, MW: 74147 TM: 1 [P] Расположение гена в хромосоме: 5q12).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_005582.

Номер версии Genbank NM_005582,2 GI:167555126.

Дата обновления записи Genbank Sep 2, 2012 01:50 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_005573.

Номер версии Genbank NP_005573,2 GI:167555127.

Дата обновления записи Genbank Sep 2, 2012 01:50 PM.

Перекрестные ссылки.

US2002/193567; WO 97/07198 (пункт 11, страницы 39-42); Miura et al. (1996), 15 Genomics 38(3):299-304; Miura et al. (1998), Blood 92:2815-2822; WO 2003/083047; WO 97/44452 (пункт 8, страницы 57-61); WO 2000/12130 (страницы 24-26).

(34) FcRH1 (белок, подобный Fc-рецептору 1, предполагаемый рецептор для Fc-домена иммуноглобулина, который содержит Ig-подобный домен типа C2 и ITAM-домен, может принимать участие в дифференцировке В-лимфоцитов); 429 aa, pl: 5,28, MW: 46925 TM: 1 [P] Расположение гена в хромосоме: 1q21-1q22).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_052938.

Номер версии Genbank NM_052938,4 GI:226958543.

Дата обновления записи Genbank Sep 2, 2012 01:43 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_443170.

Номер версии Genbank NP_443170,1 GI:16418419.

Дата обновления записи Genbank Sep 2, 2012 01:43 PM.

Перекрестные ссылки.

WO 2003/077836; WO 2001/38490 (пункт 6, фиг. 18E-1-18-E-2); Davis et al. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; WO 2003/089624 (пункт 8); EP1347046 (пункт 1); WO 2003/089624 (пункт 7).

(35) IRTA2 (рецептор иммуноглобулинового надсемейства, ассоциированный с транслокацией, 2, предполагаемый иммунорецептор, принимающий возможное участие в развитии В-клеток и лимфомагенезе; при некоторых злокачественных В-клеточных заболеваниях наблюдается дерегуляция гена транслокацией); 977 aa, pl: 6,88, MW: 106468, TM: 1 [P] Расположение гена в хромосоме: 1q21).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AF343662.

Номер версии Genbank AF343662,1 GI:13591709.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 01:16 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAK31325.

Номер версии Genbank AAK31325,1 GI:13591710.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 01:16 AM.

Перекрестные ссылки.

AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Mouse:AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571,1; WO 2003/024392 (пункт 2, фиг. 97); Nakayama et al. (2000), Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; WO 2003/077836; WO 2001/38490 (пункт 3, фиг. 18B-1-18B-2).

(36) TENB2 (TMEFF2, томорегулин, TPEF, HPP1, TR, предполагаемый трансмембранный протеогликан, относящийся к семейству факторов роста EGF/херегулин и фоллистатина); 374 aa).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AF179274.

Номер версии Genbank AF179274,2 GI:12280939.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 01:05 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAD55776.

Номер версии Genbank AAD55776,2 GI:12280940.

Дата обновления записи Genbank Mar 11, 2010 01:05 AM.

Перекрестные ссылки.

NCBI Учетный номер: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; AY358907, CAF85723, CQ782436; WO 2004/074320; JP2004113151; WO 2003/042661; WO 2003/009814; EP1295944 (страницы 69-70); WO 2002/30268 (страница 329); WO 2001/90304; US2004/249130; US2004/022727; WO 2004/063355; US2004/197325; US2003/232350; 5 US2004/005563; US2003/124579; Horie et al. (2000), Genomics 67:146-152; Uchida et al.

(1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:593-602; Liang et al. (2000), *Cancer Res.* 60:4907-12; Glynn-Jones et al. (2001), *Int J Cancer.* Oct 15; 94(2): 178-84.

(37) PSMA - FOLH1 (фолат гидролаза (специфический мембранный антиген клеток предстательной железы) 1).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M99487.

Номер версии Genbank M99487,1 GI:190663.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:48 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA60209.

Номер версии Genbank AAA60209,1 GI:190664.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:48 AM.

Перекрестные ссылки.

Israeli R.S., et al., *Cancer Res.* 53 (2), 227-230 (1993).

Другая информация.

Официальное обозначение: FOLH1.

Другие названия: GIG27, FGCP, FOLH, GCP2, GCP11, NAALAD1, NAALAdase, PSM, PSMA, mGCP.

Другие обозначения: N-ацетилированная альфа-связанная кислая дипептидаза 1; N-ацетилированная альфа-связанная кислая дипептидаза I; NAALADase I; белок 27 ингибирующего клеточный рост гена; фоллполи-гамма-глутамат карбоксипептидаза; глутаматкарбоксилаза II; глутаматкарбоксипептидаза 2; глутаматкарбоксипептидаза II; мембранная глутаматкарбоксипептидаза; вариант F специфического мембранного антигена простаты; птероилполи-гамма-глутаматкарбоксипептидаза.

АНТИТЕЛА

US 7666425:

антитела производятся гибридами, имеющими следующие ссылки ATCC: учетный номер ATCC NO HB-12101, учетный номер ATCC NO HB-12109, учетный номер ATCC NO HB-12127 и учетный номер ATCC NO HB-12126.

Proscan: моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из 8H12, 3E11, 17G1, 29B4, 30C1 и 20F2 (US 7,811,564; Moffett S., et al., *Hybridoma* (Larchmt). 2007 Dec; 26(6):363-72).

Cytogen: моноклональные антитела 7E11-C5 (учетный номер ATCC NO HB 10494) и 9H10-A4 (учетный номер ATCC NO HB11430) - US 5763202.

GlycoMimetics: NUH2 - учетный номер ATCC NO HB 9762 (US 7135301).

Human Genome Science: HPRAJ70 - учетный номер ATCC NO 97131 (US 6824993); аминокислотная последовательность, кодируемая клоном кДНК (HPRAJ70), депонированным Американской коллекцией клеточных культур ("ATCC") как Депозит NO 97131.

Medarex: Anti-PSMA антитела, которые не содержат остатков фукозила - US 7875278.

Мышинные анти-PSMA антитела включают 3F5,4G6, 3D7,1.1, 4E10-1,14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, и моноклональные антитела. Секреты гибридом 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6 или 4C8B9 были публично депонированы и описаны в патенте США № 6159508. Релевантные гибридомы были публично депонированы и описаны в патенте США № 6107090. Кроме того, гуманизированные анти-PSMA антитела, в том числе гуманизированную версию J591, описаны более подробно в публикации PCT WO 02/098897.

Другие мышиные антитела античеловеческие PSMA антитела были описаны в данной области техники, такие как mAb 107-1A4 (Wang, S. et al. (2001), *Int. J. Cancer* 92:871-876) и mAb 2C9 (Kato, K. et al. (2003), *Int. J. Urol.* 10:439-444). Примеры человеческих антител против ПСМА моноклональных антител включают 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 и 1C3 антитела, выделенные и структурно охарактеризованные, как первоначально описано в публикациях PCT WO 01/09192 и WO 03/064606 и в предварительной заявке на патент США № 60/654125, озаглавленной "Human Monoclonal Antibodies to Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA)", поданной 18 февраля 2005 г. Аминокислотные последовательности V.суб.Н 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 и 1C3 показаны в SEQ ID NO: 1-9 соответственно. Аминокислотные последовательности V.суб.Л 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 b 1C3 показаны в SEQ ID NO: 10-18 соответственно.

Другие человеческие анти-PSMA антитела включают антитела, описанные в публикации PCT WO 03/034903 и заявке на патент США № 2004/0033229.

NW Biotherapeutics: клеточная линия гибридомы, выбранная из группы, состоящей из 3F5, 4G6, имеющая учетный номер ATCC HB12060, 3D7-1.1, имеющая учетный номер ATCC HB12309, 4E10-1.14 имеющая учетный номер ATCC HB12310, 3E11 (ATCC HB12488), 4D8 (ATCC HB12487), 3E6 (ATCC HB12486), 3C9 (ATCC HB12484), 2C7 (ATCC HB12490), 1G3 (ATCC HB12489), 3C4 (ATCC HB12494), 3C6 (ATCC HB12491), 4D4 (ATCC HB12493), 1G9 (ATCC HB12495), 5C8B9 (ATCC HB12492) и 3G6 (ATCC HB12485) - см. US 6150508.

PSMA Development Company/Progenies/Cytogen - Seattle Genetics: mAb 3,9, полученное с помощью

гибридомы, депонированной под учетным номером ATCC NO PTA-3258 или mAb 10,3, полученное с помощью гибридомы, депонированной под учетным номером ATCC NO PTA-3347 - US 7850971.

PSMA Development Company - композиции PSMA антител (US 20080286284, табл. 1).

Данная заявка является выделенной заявкой на патент США № 10/395894, поданной 21 марта 2003 г. (US 7850971).

University Hospital Freiburg, Germany - mAbs 3/A12, 3/E7 и 3/F11 (Wolf P., et al., Prostate. 2010 Apr 1; 70(5):562-9).

(38) SST (Рецептор соматостатина; обратите внимание, что есть 5 подтипов).

(38.1) SSTR2 (Рецептор соматостатина 2).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_001050.

Номер версии Genbank NM_001050,2 GI:44890054.

Дата обновления записи Genbank Aug 19, 2012 01:37 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_001041.

Номер версии Genbank NP_001041,1 GI:4557859.

Дата обновления записи Genbank Aug 19, 2012 01:37 PM.

Перекрестные ссылки.

Yamada Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1), 251-255 (1992); Susini C, et al., Ann Oncol. 2006 Dec; 17(12): 1733-42.

Другая информация.

Официальное обозначение: SSTR2.

Другие обозначения: SRIF-1; SS2R; рецептор соматостатина тип 2.

(38.2) SSTR5 (рецептор соматостатина 5).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank D16827.

Номер версии Genbank D16827,1 GI:487683.

Дата обновления записи Genbank Aug 1, 2006 12:45 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank BAA04107.

Номер версии Genbank BAA04107,1 GI:487684.

Дата обновления записи Genbank Aug 1, 2006 12:45 PM.

Перекрестные ссылки.

Yamada Y., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 195 (2), 844-852 (1993).

Другая информация.

Официальное обозначение: SSTR5.

Другие названия: SS-5-R.

Другие обозначения: рецептор соматостатина подтип 5; рецептор соматостатина тип 5.

(38.3) SSTR1.

(38.4) SSTR3.

(38.5) SSTR4.

AvB6 - обе субъединицы (39+40)

(39) ITGAV (Интегрин, альфа V).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M14648 J02826 M18365.

Номер версии Genbank M14648,1 GI:340306.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:56 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA36808.

Номер версии Genbank AAA36808,1 GI:340307.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:56 AM.

Перекрестные ссылки.

Suzuki S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (22), 8614-8618 (1986).

Другая информация.

Официальное обозначение: ITGAV.

Другие названия: CD51, MSK8, VNRA, VTNR.

Другие обозначения: антиген, определенный моноклональным антителом L230; интегрин альфа-V; интегрин альфа-V-бета3; интегрин, альфа V (рецептор витронектина, альфа полипептид, антиген CD51); альфа субъединица рецептора витронектина.

(40) ITGB6 (интегрин, бета 6).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_000888.

Номер версии Genbank NM_000888,3 GI:9966771.

Дата обновления записи Genbank Jun 27, 2012 12:46 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_000879.

Номер версии Genbank NP_000879,2 GI:9625002.

Дата обновления записи Genbank Jun 27, 2012 12:46 AM.

Перекрестные ссылки.

Sheppard D.J., et al., Biol. Chem. 265 (20), 11502-11507 (1990).

Другая информация.

Официальное обозначение: ITGB6.

Другие обозначения: интегрин бета-6.

АНТИТЕЛА

Biogen: US 7943742 - гибридные клоны 6.3G9 и 6.8G6 были депонированы ATCC, учетные номера ATCC PTA-3649 и -3645 соответственно.

Biogen: US7465449 - согласно некоторым вариантам реализации антитело содержит те же последовательности полипептида тяжелой и легкой цепи, как антитело, продуцируемое гибридомой 6.1A8, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2B10, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 или 7.1C5.

Centocor (J&J): US 7550142; US 7163681.

например в US 7550142 - антитело, имеющее вариабельные области человеческого тяжелой цепи и человеческой легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8.

Seattle Genetics: 15H3 (Ryan MC, et al., Cancer Res April 15, 2012; 72(8 Supplement): 4630).

(41) CEACAM5 (молекула 5 клеточной адгезии, связанной с карциноэмбриональным антигеном).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M17303.

Номер версии Genbank M17303,1 GI:178676.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAB59513.

Номер версии Genbank AAB59513,1 GI:178677.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 AM.

Перекрестные ссылки.

Beauchemin N. et al., Mol. Cell. Biol. 7 (9), 3221-3230 (1987).

Другая информация.

Официальное обозначение: CEACAM5.

Другие названия: CD66e, SEA.

Другие обозначения: антиген мекония 100.

АНТИТЕЛА

AstraZeneca-MedImmune: IIS 20100330103; US20080057063;

US20020142359

например, антитело, имеющее определяющие комплементарность области (CDR) со следующей последовательностью: тяжелая цепь CDR1 - DNYMH, CDR2 - WIDPENGDTE YAPKFRG, CDR3 - LIYAGYLAMD Y; и легкая цепь CDR1 - SASSSVTYMH, CDR2 - STSNLAS, CDR3 - QQRSTYPLT.

гибридома 806,077 депонированная в Европейской коллекции клеточных культур (ECACC) как NO 96022936.

Research Corporation Technologies, Inc.: US5047507.

Bayer Corporation: US6013772.

BioAlliance: US7982017; US7674605.

US 7674605

антитело, содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и последовательность вариабельной области легкой цепи из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2;

антитело, содержащее последовательность вариабельной области тяжелой цепи из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и последовательность вариабельной области легкой цепи из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6.

Celltech Therapeutics Limited: US 5877293.

The Dow Chemical Company: US 5472693; US 6417337; US 6333405.

US5472693 - например, ATCC NO CRL-11215.

US 6417337 - например, ATCC CRL-12208.

US 6333405 - например, ATCC CRL-12208.

Immunomedics, Inc: US 7534431; US 7230084; US 7300644; US 6730300;

US 20110189085

антитело, имеющее CDR вариабельной области легкой цепи, содержат CDR1 содержит KASQDVGTSVA (SEQ ID NO: 20); CDR2 содержит WTSTRHT (SEQ ID NO: 21); и CDR3 содержит QQYSLYRS (SEQ ID NO: 22); и

CDR вариабельной области тяжелой цепи указанного анти-CEA антитела содержат CDR1 содержит TYWMS (SEQ ID NO: 23); CDR2 содержит EHPDSSTINYAPSLKD (SEQ ID NO: 24); и CDR3 содержит LYFGFPWFAY (SEQ ID NO: 25).

US20100221175; US20090092598; US20070202044; US20110064653;

US20090185974; US20080069775.

(42) MET (мет прото-онкоген; рецептор фактора роста гепатоцитов).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M35073.

Номер версии Genbank M35073,1 GI:187553.

Дата обновления записи Genbank Mar 6, 2012 11:12 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA59589.

Номер версии Genbank AAA59589,1 GI:553531.

Дата обновления записи Genbank Mar 6, 2012 11:12 AM.

Перекрестные ссылки.

Dean M., et al., Nature 318 (6044), 385-388 (1985).

Другая информация.

Официальное обозначение: MET.

Другие названия: AUTS9, HGFR, RCCP2, с-Met.

Другие обозначения: рецептор HGF; рецептор HGF/SF; SF рецептор; рецептор фактора роста гепатоцитов; мет прото-онкоген тирозинкиназа; прото-онкоген с-Met; рецептор рассеивающего фактора; тирозин-протеинкиназа Met.

АНТИТЕЛА

Abgenix/Pfizer: US20100040629

например, антитело, полученное с помощью гибридомы 13.3.2, имеющее American Type Culture Collection (ATCC) учетный номер PTA-5026; антитело, полученное с помощью гибридомы 9.1.2, имеющее учетный номер ATCC PTA-5027; антитело, полученное с помощью гибридомы 8.70.2, имеющее учетный номер ATCC PTA-5028; или антитело, полученное с помощью гибридомы 6.90.3, имеющее учетный номер ATCC PTA-5029.

Amgen/Pfizer: US20050054019

например, антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, где X2 представляет собой глутамат и X4 представляет собой серии, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4, где X8 представляет собой аланин, без сигнальных последовательностей; антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8, без сигнальных последовательностей; антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10, и легкую цепь имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, без сигнальных последовательностей; или антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16, без сигнальных последовательностей.

Agouron Pharmaceuticals (В настоящее время Pfizer): US20060035907.

Eli Lilly: US20100129369.

Genentech: US5686292; US20100028337; US20100016241; US20070129301;

US20070098707; US20070092520, US20060270594; US20060134104; US20060035278;

US20050233960; US20050037431

US 5686292 - например, ATCC HB-11894 и ATCC HB-11895

US 20100016241 - например, ATCC HB-11894 (гибридома 1A3.3.13) или HB-11895 (гибридома 5D5,11,6).

National Defense Medical Center, Taiwan: Lu RM., et al., Biomaterials. 2011 Apr; 32(12):3265-74.

Novartis: US20090175860

например, антитело, содержащее последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи 4687, где последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 тяжелой цепи 4687 представляют собой остатки 26-35, 50-65, и 98-102, соответственно, SEQ ID NO: 58; и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи 5097, где последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи 5097 представляют собой остатки 24-39,55-61 и 94-100 SEQ ID NO: 37.

Pharmacia Corporation: US20040166544.

Pierre Fabre: US20110239316, US20110097262, US20100115639.

Samsung: US 20110129481 - например, моноклональное антитело, полученное из клеток гибридомы, имеющей учетный номер KCLRF-BP-00219 или учетный номер KCLRF-BP-00223.

Samsung: US 20110104176 - например, антитело, полученное из клеток гибридомы, имеющей учетный номер: KCLRF-BP-00220.

University of Turin Medical School: DN-30 Pacchiana G., et al., J. Biol. Chem. 2010 Nov 12; 285(46):36149-57.

Van Andel Research Institute: Jiao Y., et al., Mol Biotechnol. 2005 Sep; 31(1):41-54.

(43) MUC1 (муцин 1, связанный с клеточной поверхностью).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank J05581.

Номер версии Genbank J05581,1 GI: 188869.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:48 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA59876.

Номер версии Genbank AAA59876,1 GI: 188870.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:48 AM.

Перекрестные ссылки.

Gendler S.J., et al. J. Biol. Chem. 265 (25), 15286-15293 (1990).

Другая информация.

Официальное обозначение: MUC1.

Другие названия: RP11-263K19,2, CD227, EMA, H23AG, KL-6, MAM6, MUC-1, MUC-1/SEC, MUC-1/X, MUC1/ZD, PEM, PEMT, PUM.

Другие обозначения: антиген DF3; антиген H23; антиген DF3 связанный с карциномой молочной железы; связанный с карциномой муцин; episialin; krebs von den Lungen-6; муцин 1, трансмембранный; муцин-1; арахис-реактивный муцин мочевого пузыря; полиморфный эпителиальный муцин; ассоциированный с опухолью эпителия муцин; ассоциированный с опухолью эпителия мембранный антиген; ассоциированный с опухолью муцин.

АНТИТЕЛА

AltaRex - Quest Pharma Tech: US 6,716,966 - например, антитело Alt-1, полученное с помощью гибридомы ATCC No PTA-975.

AltaRex- Quest Pharma Tech: US 7147,850 CRT: 5E5 - Sørensen AL., et al., Glycobiology vol. 16 NO 2 pp. 96-107, 2006; HMFG2 -Burchell J., et al., Cancer Res., 47, 5476-5482 (1987).

Glycotope GT-MAB: GT-MAB 2,5-GEX (Website: <http://www.glycotope.com/pipeline/pankomab-gex>).

Immunogen: US 7202346

например, антитело MJ-170: клеточной линии гибридомы MJ-170 учетный номер ATCC NO PTA-5286 Моноклональное антитело MJ-171: клеточной линии гибридомы MJ-171 учетный номер ATCC NO PTA-5287; monoclonal антитело MJ-172: клеточной линии гибридомы MJ-172 учетный номер ATCC NO PTA-5288; или моноклональное антитело MJ-173: клеточной линии гибридомы MJ-173 учетный номер ATCC NO PTA-5302.

Immunomedics: US 6653104.

Ramot Tel Aviv Uni: US 7897351.

Regents Uni. CA: US 7183388; US20040005647; US20030077676.

Roche GlycArt: US8.021.856.

Russian National Cancer Research Center: Imuteran- Ivanov PK., et al., Biotechnol J. 2007 Jul; 2(7):863-70.

Technische Univ Braunschweig: (HIB6, HT186-B7, HT186-D11, HT186-G2, HT200-3A-C1, HT220-M-D1, HT220-M-G8)-Thie H., et al., PLoS One. 2011 Jan 14; 6(1):e15921.

(44) CA9 (карбоангидраза IX).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank. X66839.

Номер версии Genbank X66839,1 GI:1000701.

Дата обновления записи Genbank Feb 2, 2011 10:15AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank CAA47315.

Номер версии Genbank CAA47315,1 GI:1000702.

Дата обновления записи Genbank Feb 2, 2011 10:15AM.

Перекрестные ссылки.

Pastorek J., et al., Oncogene 9 (10), 2877-2888 (1994).

Другая информация.

Официальное обозначение: CA9.

Другие названия: CAIX, MN.

Другие обозначения: CA-IX; P54/58N; RCC-ассоциированный антиген G250; RCC-ассоциированный белок G250; карбонатдегидратаза IX; карбоангидраза 9; карбоангидратаза; мембранный антиген MN; pMW1; ассоциированный с почечно-клеточной карциномой антиген G250.

АНТИТЕЛА

Abgenix/Amgen: US20040018198.

Affibody: Anti-CAIX Affibody molecules (<http://www.affibody.com/en/Product-Portfolio/Pipeline/>).

Bayer: US 7462696.

Bayer/Morphosys: 3ee9 mAb - Petrus HM., et al., Mol Cancer Ther. 2012 Feb; 11(2):340-9.

Harvard Medical School: Антитела G10, G36, G37, G39, G45, G57, G106, G119, G6, G27, G40 и G125. Xu C, et al., PLoS One. 2010 Mar 10; 5(3):e9625.

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences (Bayer) - US5955075

например, M75- учетный номер ATCC NO HB 11128 или MN12 -учетный номер ATCC NO HB 11647.

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences: US 7816493

например, M75 моноклональное антитело, которое секретируется из гибридомы VU-M75, которое было депонировано в American Type Culture Collection под номером ATCC NO HB 11128; или V/10 моноклональное антитело, которое секретируется из гибридомы V/10-VU, которое было депонировано в International Depository Authority of the Belgian Coordinated Collection of Microorganisms (BCCM) в Laboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie (LMBP) в Universiteit Gent in Gent, Belgium, под учетным номером NO LMBP 6009CB.

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences US20080177046; US20080176310; US20080176258; US20050031623.

Novartis: US20090252738.

Wilex: US 7691375 - например, антитело полученное с помощью гибридомы клеточной линии DSM ASC 2526.

Wilex: US20110123537; Rencarex: Kennett RH., et al., Curr Opin Mol. Ther. 2003 Feb; 5(1):70-5.

Xencor: US20090162382.

(45) EGFRvIII (рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), вариант транскрипта 3.

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_201283.

Номер версии Genbank NM_201283,1 GI:41327733.

Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:47 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_958440.

Номер версии Genbank NP_958440,1 GI:41327734.

Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:47 PM.

Перекрестные ссылки.

Batra SK., et al., Cell Growth Differ 1995; 6:1251-1259.

АНТИТЕЛА

US7628986 и US7736644 (Amgen)

например, аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 142 и вариантов, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144 и вариантов.

US20100111979 (Amgen)

например, антитело, содержащее аминокислотная последовательность тяжелой цепи, содержащую

CDR1, состоящая из последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей для области CDR1 антитела 13,1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16), и 333 (SEQ ID NO: 17);

CDR2 состоящая из последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей для области CDR2 антитела 13,1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16), и 333 (SEQ ID NO: 17); и

CDR3 состоящая из последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей для области CDR3 антитела 13,1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) и 333 (SEQ ID NO: 17).

US20090240038 (Amgen)

например, антитело, имеющее по меньшей мере один полипептид тяжелой и легкой цепи, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144 и любой их комбинации.

US20090175887 (Amgen)

например, антитело, имеющее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 13,1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) и 333 (SEQ ID NO: 17).

US20090156790 (Amgen)

например, антитело, имеющее полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи, в котором по меньшей мере один из полипептидов тяжелой и легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144 и любой их комбинации.

US20090155282, US20050059087 и US20050053608 (Amgen)

например, аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела, выбранную из группы, состоящей из аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела 13,1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) и 333 (SEQ ID NO: 17).

MR1-1 (US 7129,332; Duke)

например, вариант антитела, имеющего последовательность SEQ ID NO: 18 с заменами S98P-T99Y в CDR3 VH, и F92W в CDR3 VL.

L8A4, H10, Y10 (Wikstrand CJ., et al., Cancer Res. 1995 Jul. 15; 55(14):3140-8; Duke).

US20090311803 (Harvard University)

например, SEQ ID NO: 9 для последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела, и SEQ ID NO: 3 для последовательности вариабельной области легкой цепи антитела.

US20070274991 (EMD72000, также известный как matuzumab; Harvard University)

например, SEQ ID NO: 3 и 9 для легкой цепи и тяжелой цепи соответственно.

US6129915(Schering)

например, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

mAb CH12 - Wang H., et al., FASEB J. 2012 Jan; 26(1):73-80 (Shanghai Cancer Institute).

RAbDMvIII - Gupta P., et al., BMC Biotechnol. 2010 Oct 7; 10:72 (Stanford University Medical Center).

mAb Ua30 - Ohman L, et al., Tumour Biol. 2002 Mar-Apr; 23(2):61-9 (Uppsala University).

Han DG, et al., Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2010 Jan; 30(1):25-9 (Xi'an Jiaotong University).

(46) CD33 (молекула CD33).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M_23197.

Номер версии Genbank NM_23197,1 GI:180097.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA51948.

Номер версии Genbank AAA51948,1 GI:188098.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 AM.

Перекрестные ссылки.

Simmons D., et al., J. Immunol. 141 (8), 2797-2800 (1988).

Другая информация.

Официальное обозначение: CD33.

Другие названия: SIGLEC-3, SIGLEC3, p67.

Другие обозначения: CD33 антиген (gp67); gp67; миелоидный антиген CD33; связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 3; связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин.

АНТИТЕЛА

H195 (Lintuzumab)- Raza A., et al., Leuk Lymphoma. 2009 Aug; 50(8):1336-44; US6759045 (Seattle Genetics/Immunomedics).

mAb OKT9: Sutherland, D.R. et al. Proc Natl Acad Sci USA 78(7): 4515-4519 1981, Schneider. C, et al., J. Biol. Chem 257, 8516-8522 (1982).

mAb E6: Hoogenboom, H.R., et al., J Immunol 144, 3211-3217(1990).

US6590088 (Human Genome Sciences)

например, SEQ ID NO: 1 и 2 и учетный номер ATCC NO 97521.

US7557189 (Immunogen)

например, антитело или его фрагмент, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит три CDR, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-3 и вариабельную область легкой цепи, которая содержит три CDR, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4-6.

(47) CD19 (молекула CD19).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank NM_001178098.
 Номер версии Genbank NM_001178098,1 GI:296010920.
 Дата обновления записи Genbank Sep. 10, 2012 12:43 AM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank NP_001171569.
 Номер версии Genbank NP_001171569,1 GI:296010921.
 Дата обновления записи Genbank Sep 10, 2012 12:43 AM.
 Перекрестные ссылки.
 Tedder TF., et al., J. Immunol. 143(2): 712-7(1989).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: CD19.
 Другие названия: B4, CVID3.
 Другие обозначения: В-лимфоцитарный антиген CD19; В-лимфоцитарный поверхностный антиген B4; Т-клеточный поверхностный антиген Leu-12; дифференцировочный антиген CD19

АНТИТЕЛА

Immunogen: HuB4 - Al-Katib AM., et al., Clin Cancer Res. 2009 Jun. 15; 15(12):4038-45.
 4G7: Kügler M., et al., Protein Eng Des Sel. 2009 Mar; 22(3): 135-47.
 Например, последовательности на фиг. 3 в Knappik, A. et al. J. Mol. Biol. 2000 Feb; 296(1):57-86.
 AstraZeneca/MedImmune: MEDI-551 - Herbst R., et al., J. Pharmacol Exp. Ther. 2010 Oct; 335(1):213-22.
 Glenmark Pharmaceuticals: GBR-401 - Hou S., et al., Mol Cancer Ther November 2011 10 (Meeting Abstract Supplement) C164.
 US7109304 (Immunomedics)
 например, антитело, содержащее последовательность hA19Vк (SEQ ID NO:7) и последовательность hA19VH (SEQ ID NO: 10).
 US7902338 (Immunomedics)
 например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит последовательности определяющей комплементарности области CDR легкой цепи:
 CDR1 последовательности SEQ ID NO: 16 (KASQSVVDYDGDSYLN);
 CDR2 последовательности SEQ ID NO: 17 (DASNLVVS); и
 CDR3 последовательности SEQ ID NO: 18 (QQSTEDPWT) и
 последовательности CDR тяжелой цепи:
 CDR1 последовательности SEQ ID NO: 19 (SYWMN);
 CDR2 последовательности SEQ ID NO: 20 (QIWPGDGDТNYNGKFKG) и
 CDR3 последовательности SEQ ID NO: 21 (RETTTVGRYYYAMDY),
 а также содержит последовательности человеческой каркасной области антитела (FR) и константной области, где один или более аминокислотных остатков каркасной области, заменен из соответствующих последовательностей каркасной области исходного мышинового антитела, и где указанный замененные остатки FR содержат замену фенилаланина серином по остатку Кабат 91 варибельной области тяжелой цепи.
 Medarex: MDX-1342 - Cardarelli PM., et al., Cancer Immunol Immunother. 2010 Feb; 59(2):257-65.
 MorphoSys/Xencor: MOR-208/XmAb-5574 - Zalevsky J., et al., Blood. 2009 Apr 16; 113(16):3735-43.
 US7968687 (Seattle Genetics).
 Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий варибельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и варибельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.
 4G7 chim - Lang P., et al., Blood. 2004 May 15; 103(10):3982-5 (University of Tübingen). Например, фиг. 6 и SEQ ID NO: 80 в US20120082664.
 Zhejiang University School of Medicine: 2E8 - Zhang J., et al., J Drug Target. 2010 Nov; 18(9):675-8.

(48) IL2RA (рецептор интерлейкина 2, альфа); эталонная последовательность NCBI: NM_000417,2);
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank NM_000417.
 Номер версии Genbank NM_000417,2 GI:269973860.
 Дата обновления записи Genbank Sep 09, 2012 04:59 PM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank NP_000408.
 Номер версии Genbank NP_000408,1 GI:4557667.
 Дата обновления записи Genbank Sep 09, 2012 04:59 PM.
 Перекрестные ссылки.

Kuziel W.A., et al., *J. Invest. Dermatol.* 94 (6 SUPPL), 27S-32S (1990).

Другая информация.

Официальное обозначение: IL2RA.

Другие названия: RP11-536K7,1, CD25, IDDM10, IL2R, TCGFR.

Другие обозначения: FIL-2 рецептор субъединица альфа; IL-2-RA; IL-2R субъединица альфа; IL-2-RA; антиген TAC; рецептор интерлейкина 2 субъединица альфа; p55.

АНТИТЕЛА

US6383487 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect]).

US6521230 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect])

например, антитело, имеющее антигенсвязывающий сайт, содержит по меньшей мере один домен, который содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 7, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 8, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 9; или указанные CDR1, CDR2 и CDR3, взятые последовательно как целое, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, 8 и 9, взятые последовательно как целое.

Daclizumab - Rech A.J., et al., *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Sep; 1174:99-106 (Roche).

(49) AXL (рецептор тирозинкиназы AXL).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M76125.

Номер версии Genbank M76125,1 GI:292869.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:53 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA61243.

Номер версии Genbank AAA61243,1 GI:29870.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:53 AM.

Перекрестные ссылки.

O'Bryan J.P., et al., *Mol. Cell. Biol.* 11 (10), 5016-5031 (1991); Bergsagel P.L., et al., *J. Immunol.* 148 (2), 590-596 (1992).

Другая информация.

Официальное обозначение: AXL.

Другие названия: JTK11, UFO.

Другие обозначения: онкоген AXL; AXL трансформирующая последовательность/ген; oncogene AXL; рецептор тирозин протеинкиназы UFO.

АНТИТЕЛА

YW327.6S2 - Ye X., et al., *Oncogene.* 2010 Sep 23; 29(38):5254-64. (Genentech).

BergenBio: BGB324 (<http://www.bergenbio.com/BGB324>).

(50) CD30 - TNFRSF8 (надсемейство рецепторов фактора некроза опухоли, член 8).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M83554.

Номер версии Genbank M83554,1 GI:180095.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:53 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA51947.

Номер версии Genbank AAA51947,1 GI:180096.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:53 AM.

Перекрестные ссылки.

Durkop H., et al., *Cell* 68 (3), 421-427 (1992).

Другая информация.

Официальное обозначение: TNFRSF8.

Другие названия: CD30, D1S166E, Ki-1.

Другие обозначения: рецептор CD30L; антиген Ki-1; рецептор цитокина CD30; антиген CD30 активации лимфоцитов; член 8 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли.

(51) BCMA (антиген созревания В-клеток) - TNFRSF17 (надсемейство рецепторов фактора некроза опухоли, член 17).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank Z29574.

Номер версии Genbank Z29574,1 GI:471244.

Дата обновления записи Genbank Feb 02, 2011 10:40 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank CAA82690.

Номер версии Genbank CAA82690,1 GI:471245.

Дата обновления записи Genbank Feb 02, 2011 10:40 AM.

Перекрестные ссылки.
 Laabi Y., et al., *Nucleic Acids Res.* 22 (7), 1147-1154 (1994).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: TNFRSF17.
 Другие названия: BCM, BCMA, CD269.
 Другие обозначения: антиген созревания В-клеток; фактор созревания В-клеток; белок созревания В-клеток; член 17 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли.
 (52) CT Ags - CTA (антигены рака яичников).
 Перекрестные ссылки.
 Fratta E., et al., *Mol Oncol.* 2011 Apr; 5(2): 164-82; Lim SH., et al., *Am J Blood Res.* 2012; 2(1):29-35.
 (53) CD174 (антиген Ley) - FUT3 (фукозилтрансфераза 3 (галактозид 3(4)-L-фукозилтрансфераза, группа крови Льюиса)).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank NM000149.
 Номер версии Genbank NM000149,3 GI:148277008.
 Дата обновления записи Genbank Jun 26, 2012 04:49 PM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank NP_000140.
 Номер версии Genbank NP_000140,1 GI:4503809.
 Дата обновления записи Genbank Jun 26, 2012 04:49 PM.
 Перекрестные ссылки.
 Kukowska-Latallo, J.F., et al., *Genes Dev.* 4 (8), 1288-1303 (1990).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: FUT3.
 Другие названия: CD174, FT3B, FucT-III, LE, Les.
 Другие обозначения: FT Льюиса; альфа-(1,3/1,4)-фукозилтрансфераза; группа крови Льюиса альфа-4-фукозилтрансфераза; фукозилтрансфераза III; галактозид 3(4)-L-фукозилтрансфераза.
 (54) CLEC14A (семейство 14 доменов пектинов C-типа, член A; учетный номер Genbank NM175060).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank NM175060.
 Номер версии Genbank NM175060,2 GI:371123930.
 Дата обновления записи Genbank Apr 01, 2012 03:34 PM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank NP_778230.
 Номер версии Genbank NP_778230,1 GI:28269707.
 Дата обновления записи Genbank Apr 01, 2012 03:34 PM.
 Другая информация.
 Официальное обозначение: CLEC14A.
 Другие названия: UNQ236/PRO269, C14orf27, CEG1, EGFR-5.
 Другие обозначения: член A семейства 14 доменов лектинов C-типа; белок, содержащий C1ECT и EGF-подобный домен; рецептор эпидермального фактора роста 5.
 (55) GRP78 - HSPA5 (белок 5 теплового шока 70кДа (регулируемый глюкозой белок, 78 кДа).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank NM005347.
 Номер версии Genbank NM005347,4 GI:305855105.
 Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:42 PM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank NP_005338.
 Номер версии Genbank NP_005338,1 GI:16507237.
 Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:42 PM.
 Перекрестные ссылки.
 Ting J., et al., *DNA* 7 (4), 275-286 (1988).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: HSPA5.
 Другие названия: BIP, GRP78, MIF2.
 Другие обозначения: регулируемый глюкозой белок 78 кДа; Ca(2+)-связывающий белок grp78 полости эндоплазматического ретикулума; белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина.
 (56) CD70 (молекула CD70) L08096 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank L08096.
 Номер версии Genbank L08096,1 GI:307127.
 Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2012 08:54 AM.

Полипептид.
 Учетный номер Genbank AAA36175.
 Номер версии Genbank AAA36175,1 GI:307128.
 Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2012 08:54 AM.
 Перекрестные ссылки.
 Goodwin R.G., et al., Cell 73 (3), 447-456 (1993).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: CD70.
 Другие названия: CD27L, CD27LG, TNFSF7.
 Другие обозначения: лиганд CD27; CD27-L; антиген CD70; антиген Ki-24; поверхностный антиген CD70; суперсемейство факторов (лигандов) некроза опухолей, член 7; член 7 суперсемейства факторов (лигандов) некроза опухолей.

АНТИТЕЛА
 MDX-1411 против CD70 (Medarex).
 h1F6 (Ofazoglu, E., et al., Clin Cancer Res. 2008 Oct 1; 14(19):6171-80; Seattle Genetics).
 Например, см. US20060083736 SEQ ID NO: 1, 2, 11 и 12 и фиг. 1.
 (57) Специфические антигены стволовых клеток. Например:
 5T4 (см. запись (63) ниже).
 CD25 (см. запись (48) выше).
 CD32.

Полипептид.
 Учетный номер Genbank ABK42161.
 Номер версии Genbank ABK42161,1 GI:117616286.
 Дата обновления записи Genbank Jul 25, 2007 03:00 PM.
 LGR5/GPR49.

Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank NM_003667.
 Номер версии Genbank NM_003667,2 GI:24475886.
 Дата обновления записи Genbank Jul 22, 2012 03:38 PM.

Полипептид.
 Учетный номер Genbank NP_003658.
 Номер версии Genbank NP_003658,1 GI:4504379.
 Дата обновления записи Genbank Jul 22, 2012 03:38 PM.
 Prominin/CD133.

Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank NM_006017.
 Номер версии Genbank NM_006017,2 GI:224994187.
 Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:47 PM.

Полипептид.
 Учетный номер Genbank NP_006008.
 Номер версии Genbank NP_006008,1 GI:5174387.
 Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:47 PM.
 (58) ASG-5.

Перекрестные ссылки.
 (Smith L.M., et al., AACR 2010 Annual Meeting (abstract #2590); Gudas J.M., et al., AACR 2010 Annual Meeting (abstract #4393).

АНТИТЕЛА
 Ahtm-AGS-5 Антитело: M6.131 (Smith, L.M., et al., AACR 2010 Annual Meeting (abstract #2590).
 (59) ENPP3 (эктонуклеотид пирофосфатаза/фосфодиэстераза 3).

Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank AF005632.
 Номер версии Genbank AF005632,2 GI:4432589.
 Дата обновления записи Genbank Mar 10, 2010 09:41 PM.

Полипептид.
 Учетный номер Genbank AAC51813.
 Номер версии Genbank AAC51813,1 GI:2465540.
 Дата обновления записи Genbank Mar 10, 2010 09:41 PM.

Перекрестные ссылки.
 Jin-Hua P., et al., Genomics 45 (2), 412-415 (1997).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: ENPP3.
 Другие названия: RP5-988G15,3, B10, CD203c, NPP3, PD-IBETA, PDNP3.

- Другие обозначения: E-NPP 3; dJ1005H11,3 (фосфодиэстераза I/нуклеотид пирофосфатаза 3); dJ914N13,3 (фосфодиэстераза I/нуклеотид пирофосфатаза 3); член 3 семейства эктонуклеотид пирофосфатаза/фосфодиэстераза; gp130RB13-6; фосфодиэстераза I бета; фосфодиэстераза I/нуклеотид пирофосфатаза 3; фосфодиэстераза-I бета.
- (60) PRR4 (пролин-богатый 4 (лакримальный)).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank NM_007244.
 Номер версии Genbank NM_007244,2 GI:154448885.
 Дата обновления записи Genbank Jun 28, 2012 12:39 PM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank NP_009175.
 Номер версии Genbank NP_009175,2 GI:154448886.
 Дата обновления записи Genbank Jun 28, 2012 12:39 PM.
 Перекрестные ссылки.
 Dickinson D.P., et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36 (10), 2020-2031 (1995).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: PRR4.
 Другие названия: LPRP, PROLA.
 Другие обозначения: пролин-богатый лакримальный белок; носоглоточный карцинома-ассоциированный пролин-богатый белок 4; пролин-богатый полипептид 4; пролин-богатый белок 4.
- (61) GCC - GUCY2C (гуанилат циклаза 2C (рецептор термостабильного энтеротоксина)).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank NM_004963.
 Номер версии Genbank NM_004963,3 GI:222080082.
 Дата обновления записи Genbank Sep 02, 2012 01:50 PM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank NP_004954.
 Номер версии Genbank NP_004954,2 GI:222080083.
 Дата обновления записи Genbank Sep 02, 2012 01:50 PM.
 Перекрестные ссылки.
 De Sauvage F.J., et al., J. Biol. Chem. 266 (27), 17912-17918 (1991); Singh S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 179 (3), 1455-1463 (1991).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: GUCY2C.
 Другие названия: DIAR6, GUC2C, MUCIL, STAR.
 Другие обозначения: GC-C; рецептор STA; гуанилат циклаза C; hSTAR; рецептор термостабильного энтеротоксина; желудочно-кишечная гуанилат циклаза.
- (62) Liv-1 - SLC39A6 (семейство транспортёров растворённых веществ 39 (транспортёр цинка), член 6).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank U41060.
 Номер версии Genbank U41060,2 GI:12711792.
 Дата обновления записи Genbank Nov 30, 2009 04:35 PM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank AAA96258.
 Номер версии Genbank AAA96258,2 GI:12711793.
 Дата обновления записи Genbank Nov 30, 2009 04:35 PM.
 Перекрестные ссылки.
 Taylor KM., et al., Biochim Biophys Ada. 2003 Apr 1; 1611(1-2):16-30.
 Другая информация.
 Официальное обозначение: SLC39A6.
 Другие названия: LIV-1.
 Другие обозначения: LIV-1 белок, эстрогенрегулирующийся; ZIP-6; эстрогенрегулирующийся белок LIV-1; семейство транспортёров растворённых веществ 39 (транспортёр ионов металла), член 6; член 6 семейства транспортёров растворённых веществ 39; транспортёр цинка ZIP6; zrt- и lrt-подобный белок 6.
- (63) 5T4, Трофобластический гликопротеин, TPBG - TPBG (трофобластический гликопротеин).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank AJ012159.
 Номер версии Genbank AJ012159,1 GI:3805946.
 Дата обновления записи Genbank Feb 01, 2011 10:27 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank CAA09930.

Номер версии Genbank CAA09930,1 GI:3805947.

Дата обновления записи Genbank Feb 01, 2011 10:27 AM.

Перекрестные ссылки.

King K.W., et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1445 (3), 257-270 (1999).

Другая информация.

Официальное обозначение: TPBG.

Другие названия: 5T4, 5T4AG, M6P1.

Другие обозначения: онкоэмбриональный антиген 5T4; онкоэмбриональный трофобластический гликопротеин 5T4; онкоэмбриональный гликопротеин 5T4.

(64) CD56 - NCMA1 (нейрональная молекула клеточной адгезии 1).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_000615.

Номер версии Genbank NM_000615,6 GI:336285433.

Дата обновления записи Genbank Sep 23, 2012 02:32 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_000606.

Номер версии Genbank NP_000606,3 GI:94420689.

Дата обновления записи Genbank Sep 23, 2012 02:32 PM.

Перекрестные ссылки.

Dickson.G., et al., *Cell* 50 (7), 1119-1130(1987).

Другая информация.

Официальное обозначение: NCAM1.

Другие названия: CD56, MSK39, NCAM.

Другие обозначения: антиген, распознаваемый моноклональным антителом 5.1H11; нейрональная молекула клеточной адгезии, NCAM.

АНТИТЕЛА

Immunogen: HuN901 (Smith SV., et al., *Curr Opin Mol Ther* 2005 Aug; 7(4):394-401)

например, см. гуманизированный из мышинового антитела N901. См. фиг. 1b и 1e в Roguska, M.A., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* Feb 1994; 91:969-973.

(65) CanAg (опухолеассоциированный антиген CA242).

Перекрестные ссылки.

Haglund C, et al., *Br J Cancer* 60:845-851, 1989; Baeckstrom D., et al., *J Biol. Chem.* 266:21537-21547, 1991.

АНТИТЕЛА

huC242 (Tolcher AW et al., *J Clin Oncol.* 2003 Jan 15; 21(2):211-22; Immunogen)

например, см. US20080138898A1 SEQ ID NO: 1 и 2.

(66) FOLR1 (рецептор фолиевой кислоты 1).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank J05013.

Номер версии Genbank J05013,1 GM82417.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA35823.

Номер версии Genbank AAA35823,1 GI:182418.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 AM.

Перекрестные ссылки.

Elwood P.C., et al., *J. Biol. Chem.* 264 (25), 14893-14901 (1989).

Другая информация.

Официальное обозначение: FOLR1.

Другие названия: FBP, FOLR.

Другие обозначения: FR-альфа; FBP KB клетки; взрослый фолат-связывающий белок; фолат-связывающий белок; рецептор фолиевой кислоты альфа; рецептор фолиевой кислоты, у взрослого; ovarian антиген, ассоциированный с опухолью яичников MOv18.

АНТИТЕЛА

M9346A - Whiteman KR., et al., *Cancer Res* April 15, 2012; 72(8 Supplement): 4628 (Immunogen).

(67) GPNMB (гликопротеин (трансмембранный) nmb).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank X76534.

Номер версии Genbank X76534,1 GI:666042.

Дата обновления записи Genbank Feb 02, 2011 10:10 AM.

Полипептид.
 Учетный номер Genbank CAA54044.
 Номер версии Genbank CAA54044,1 GI:666043.
 Дата обновления записи Genbank Feb 02, 2011 10:10 AM.
 Перекрестные ссылки.
 Weterman M.A., et al., *Int. J. Cancer*60 (1), 73-81 (1995).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: GPNMB.
 Другие названия: UNQ1725/PRO9925, HGFIN, NMB.
 Другие обозначения: гликопротеин NMB; гликопротеин nmb-подобный белок; osteoactivin; транс-мембранный гликопротеин HGFIN; трансмембранный гликопротеин NMB.
АНТИТЕЛА
 Celldex Therapeutics: CR011 (Tse KF., et al., *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 15; 12(4): 1373-82). Например, см. EP1827492B1 SEQ ID NO: 22, 24, 26, 31, 33 и 35.
 (68) TIM-1 - HAVCR1 (клеточный рецептор 1 вируса гепатита А).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank AF043724.
 Номер версии Genbank AF043724,1 GI:2827453.
 Дата обновления записи Genbank Mar 10, 2010 06:24 PM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank AAC39862.
 Номер версии Genbank AAC39862,1 GI:2827454.
 Дата обновления записи Genbank Mar 10, 2010 06:24 PM.
 Перекрестные ссылки.
 Feigelstock D., et al., *J. Virol.* 72 (8), 6621-6628 (1998).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: HAVCR1.
 Другие названия: HAVCR, HAVCR-1, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1.
 Другие обозначения: Т клеточный белок 1 домена иммуноглобулина и домена муцина; Т-клеточный мембранный белок 1; молекула повреждения почек 1.
 (69) RG-1/мишень опухоли предстательной железы Миндин - Миндин/RG-1.
 Перекрестные ссылки.
 Papp R., et al., *Cancer Res.* 2005 Sep 15; 65(18):8397-405.
 (70) B7-H4 - VTCN1 (V-образный домен, содержащий ингибитор 1 активации Т клеток).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank BX648021.
 Номер версии Genbank BX648021,1 GI:34367180.
 Дата обновления записи Genbank Feb 02, 2011 08:40 AM.
 Перекрестные ссылки.
 Sica GL, et al., *Immunity.* 2003 Jun; 18(6):849-61.
 Другая информация.
 Официальное обозначение: VTCN1.
 Другие названия: RP11-229A19,4, B7-H4, B7H4, B7S1, B7X, B7h.5, PRO1291, VCTN1.
 Другие обозначения: член семейства B7, H4; член 1 суперсемейства B7; костимулирующая молекула Т клеток B7х; костимулирующая молекула Т клеток B7х; V-образный домен, содержащий ингибитор 1 активации Т клеток; иммунный костимулирующий белок B7-H4.
 (71) PTK7 (PTK7 протеин-тирозин киназа 7).
 Нуклеотид.
 Учетный номер Genbank AF447176.
 Номер версии Genbank AF447176,1 GI:17432420.
 Дата обновления записи Genbank Nov 28, 2008 01:51 PM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank AAL39062.
 Номер версии Genbank AAL39062,1 GM7432421.
 Дата обновления записи Genbank Nov 28, 2008 01:51 PM.
 Перекрестные ссылки.
 Park S.K., et al., *J. Biochem.* 119 (2), 235-239 (1996).
 Другая информация.
 Официальное обозначение: PTK7.
 Другие названия: ССК-4, ССК4.
 Другие обозначения: киназа 4 карциномы толстой кишки; инактивированная протеин-тирозин киназа 7; рецептор 7 псевдо протеин-тирозин киназы; протеин-тирозин киназа-подобный 7.

(72) CD37 (молекула CD37).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_001040031.

Номер версии Genbank NM_001040031,1 GI:91807109.

Дата обновления записи Genbank Jul. 29, 2012 02:08 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_001035120.

Номер версии Genbank NP_001035120,1 GI:91807110.

Дата обновления записи Genbank Jul 29, 2012 02:08 PM.

Перекрестные ссылки.

Schwartz-Albiez R., et al., J. Immunol. 140 (3), 905-914 (1988).

Другая информация.

Официальное обозначение: CD37.

Другие названия: GP52-40, TSPAN26.

Другие обозначения: антиген CD37; антиген клеточной дифференцировки 37; антиген лейкоцитов CD37; поверхностный антиген лейкоцитов CD37; тетраспанин-26; tspan-26.

АНТИТЕЛА

Boehringer Ingelheim: mAb 37,1 (Heider KH., et al., Blood. 2011 Oct 13; 118(15):4159-68).

Trubion: CD37-SMIP (G28-1 scFv-Ig) ((Zhao X., et al., Blood. 2007; 110: 2569-2577)

например, см. US20110171208A1 SEQ ID NO: 253 Immunogen: K7153A (Deckert J., et al., Cancer Res April 15, 2012; 72(8 Supplement): 4625).

(73) CD138-SDC1 (синдекан 1).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AJ551176.

Номер версии Genbank AJ551176,1 GI:29243141.

Дата обновления записи Genbank Feb 01, 2011 12:09 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank CAD80245.

Номер версии Genbank CAD80245,1 GI:29243142.

Дата обновления записи Genbank Feb 01, 2011 12:09 PM.

Перекрестные ссылки.

O'Connell FP., et al., Am J Clin Pathol. 2004 Feb; 121(2):254-63.

Другая информация.

Официальное обозначение: SDC1.

Другие названия: CD138, SDC, SYND1, синдекан.

Другие обозначения: антиген CD138; рецептор 1 фактора роста фибробластов гепарансульфатпротеогликана; синдекан протеогликана1; синдекан-1.

АНТИТЕЛА

Biotest: Химеризированное MAAb (nBT062) - (Jagannath S., et al., Poster ASH #3060, 2010;

WIPO заявка на патент WO/2010/128087)

например, см. US20090232810 SEQ ID NO: 1 и 2.

Immunogen: B-B4 (Tassone P., et al., Blood 104_3688-3696). Например, см. US20090175863A1 SEQ ID NO: 1 и 2

(74) CD74 (молекула CD74, главный комплекс гистосовместимости, инвариантная цепь класса II).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_004355.

Номер версии Genbank NM_004355,1 GI:343403784.

Дата обновления записи Genbank Sep 23, 2012 02:30 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_004346.

Номер версии Genbank NP_004346,1 GI:10835071.

Дата обновления записи Genbank Sep 23, 2012 02:30 PM.

Перекрестные ссылки.

Kudo, J., et al., Nucleic Acids Res. 13 (24), 8827-8841 (1985).

Другая информация.

Официальное обозначение: CD74.

Другие названия: DHLAG, HLAG, II, Ia-GAMMA.

Другие обозначения: антиген CD74 (инвариантный полипептид главного комплекса гистосовместимости, антиген-ассоциированный класс II); гамма цепь антигена гистосовместимости HLA класса II; HLA-DR антиген-ассоциированная инвариантная цепь; HLA-DR-гамма; Ia-ассоциированная инвариантная цепь; MHC HLA-DR гамма цепь; гамма цепь антигенов класса II; p33.

АНТИТЕЛА

Immunomedics: hLL1 (Milatuzumab,) - Berkova Z., et al., Expert Opin Investig Drugs. 2010 Jan; 19(1):141-9)

например, см. US20040115193 SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 и 24.

Genmab: HuMax-CD74 (см. интернет сайт).

(75) Claudins - CLs (клаудины).

Перекрестные ссылки.

Offner S., et al., Cancer Immunol Immunother. 2005 May; 54(5):431-45, Suzuki H., et al., Ann N Y Acad Sci. 2012 Jul; 1258:65-70).

У людей были описаны 24 члена семейства - см. ссылки на литературу.

(76) EGFR (рецептор эпидермального фактора роста).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_005228.

Номер версии Genbank NM_005228,3 GI:41927737.

Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:47 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_005219.

Номер версии Genbank NP_005219,2 GI:29725609.

Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:47 PM.

Перекрестные ссылки.

Dhomen N.S., et al., Crit RevOncog. 2012; 17(1):31-50.

Другая информация.

Официальное обозначение: EGFR.

Другие названия: ERBB, ERBB1, HER1, PIG61, mENA.

Другие обозначения: вирусный гомолог онкогена птичьего эритробластного лейкоза; белок 40, ингибирующий клеточный рост; белок 61, индуцирующий клеточную пролиферацию; прото-онкоген c-ErbB-1; рецептор тирозин-протеинкиназы ErbB-1.

АНТИТЕЛА

BMS: Cetuximab (Erbbitux) - Broadbridge VT., et al., Expert Rev Anticancer Ther. 2012. May; 12(5):555-65.

Например, см. US6217866 - ATTC депозит NO 9764.

Amgen: Panitumumab (Vectibix) - Argiles G., et al., Future Oncol. 2012 Apr; 8(4):373-89. Например, см. US6235883 SEQ ID NO: 23-38.

Genmab: Zalutumumab - Rivera F., et al., Expert Opin Biol Ther. 2009 May; 9(5):667-74.

YM Biosciences: Nimotuzumab - Ramakrishnan MS., et al., MAbs. 2009 Jan-Feb; 1(1):41-8. Например, см. US5891996 SEQ ID NO: 27-34.

(77) Her3 (ErbB3) - ERBB3 (v-erb-b2 вирусный гомолог онкогена эритробластного лейкоза 3 (птичьего)).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M34309.

Номер версии Genbank M34309,1 GI:183990.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA35979.

Номер версии Genbank AAA35979,1 GI:306841.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:47 PM.

Перекрестные ссылки.

Plowman G.D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (13), 4905-4909 (1990).

Другая информация.

Официальное обозначение: ERBB3.

Другие названия: ErbB-3, HER3, LCCS2, MDA-BF-1, c-erbB-3, c-ErbB3, erbB3-S, p180-ErbB3, p45-sErbB3, p85-sErbB3.

Другие обозначения: прото-онкоген-подобный белок c-ErbB-3; рецептор тирозин-протеинкиназы ErbB-3; рецептор клеточной поверхности типа тирозин-протеинкиназы HER3.

АНТИТЕЛА

Merimack Pharma: MM-121 (Schoeberl B., et al., Cancer Res. 2010 Mar 15; 70(6):2485-2494)

например, см. US2011028129 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

(78) RON - MST1R (рецептор 1, стимулирующий макрофагов (c-met-связанная тирозинкиназа)).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank X70040.

Номер версии Genbank X70040,1 GI:36109.

Дата обновления записи Genbank Feb 02, 2011 10:17 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank CCA49634.

Номер версии Genbank CCA49634,1 GI:36110.

Дата обновления записи Genbank Feb 02, 2011 10:17 PM.

Перекрестные ссылки.

Ronsin C, et al., *Oncogene* 8 (5), 1195-1202 (1993).

Другая информация.

Официальное обозначение: MST1R.

Другие названия: CD136, CDw136, PTK8, RON.

Другие обозначения: MSP рецептор; MST1R вариант RON30; MST1R вариант RON62; PTK8 протеин-тирозин киназа 8; RON вариант E2E3; с-met-связанная тирозинкиназа; рецептор макрофаг-стимулирующего белка; p185-Ron; растворимый RON вариант 1; растворимый RON вариант 2; растворимый RON вариант 3; растворимый RON.

Вариант 4.

(79) EPH A2 (рецептор EPH A2).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank BC037166.

Номер версии Genbank BC037166,2 GI:33879863.

Дата обновления записи Genbank Mar 06, 2012 01:59 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAN37166.

Номер версии Genbank AAN37166,1 GI:22713539.

Дата обновления записи Genbank Mar 06, 2012 01:59 PM.

Перекрестные ссылки.

Strausberg R.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (26), 16899-16903 (2002).

Другая информация.

Официальное обозначение: EPNA2.

Другие названия: ARCC2, CTPA, CTPP1, ECK.

Другие обозначения: рецептор 2 эфринов типа-A; рецепторная протеинтирозинкиназа эпителиальных клеток; растворимый EPNA2 вариант 1; рецепторная протеинтирозинкиназа ECK.

АНТИТЕЛА

Medimmune: 1C1 (Lee J.W., et al., *Clin Cancer Res.* 2010 May 1; 16(9):2562-2570). Например, см. US20090304721A1. Фиг. 7 и 8.

(80) CD20- MS4A1 (трансмембранные 4-домены, подсемейство A, член 1).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M27394.

Номер версии Genbank M27394,1 GI:179307.

Дата обновления записи Genbank Nov 30, 2009 11:16 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAA35581.

Номер версии Genbank AAA35581,1 GI:179308.

Дата обновления записи Genbank Nov 30, 2009 11:16 AM.

Перекрестные ссылки.

Tedder T.F., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1), 208-212 (1988).

Другая информация.

Официальное обозначение: MS4A1

Другие названия: B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7

Другие обозначения: В-лимфоцитарный антиген CD20; В-лимфоцитарный поверхностный антиген B1; антиген CD20; рецептор CD20; поверхностный антиген лейкоцитов Leu-16.

АНТИТЕЛА

Genentech/Roche: Rituximab - Abdulla NE., et al., *BioDrugs.* 2012 Apr 1; 26(2):71-82. Например, см. US5736137, АТСС депозит NO HB-69119.

GSK/Genmab: Ofatumumab - Nightingale G., et al., *Ann Pharmacother.* 2011 Oct; 45(10): 1248-55.

Например, см. US20090169550A1 SEQ ID NO: 2, 4 и 5.

Immunomedics: Veltuzumab - Goldenberg DM., et al., *Leuk Lymphoma.* 2010 May; 51 (5): 747-55.

Например, см. US7919273B2 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

(81) Tenascin C - TNC (Тенасцин С).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_002160.

Номер версии Genbank NM_002160,3 GI:340745336.

Дата обновления записи Genbank Sep 23, 2012 02:33 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_002151.

Номер версии Genbank NP_002151,2 GI:153946395.

Дата обновления записи Genbank Sep 23, 2012 02:33 PM.

Перекрестные ссылки.

Nies D.E., et al., J. Biol. Chem. 266 (5), 2818-2823 (1991); Siri A., et al., Nucleic Acids Res. 19 (3), 525-531 (1991).

Другая информация.

Официальное обозначение: TNC.

Другие названия: 150-225, GMEM, GP, HXB, JI, TN, TN-C.

Другие обозначения: GP 150-225; цитотактин; глиома-ассоциированный антиген внеклеточного матрикса; hexabrachion (тенасцин); мышечно-сухожильный антиген; neugonectin; тенасцин; тенасцин-С изоформа 14/AD1/16.

АНТИТЕЛА

Phylogen: G11 (von Lukowicz T., et al., J Nucl Med. 2007 Apr; 48(4):582-7) и F16 (Pedretti M., et al., Lung Cancer. 2009 Apr; 64(1):28-33)

например, см. US7968685 SEQ ID NO: 29, 35, 45 и 47.

(82) FAP (белок активации фибробластов, альфа).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank U09278.

Номер версии Genbank U09278,1 GI:1888315.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 09:22 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAB49652.

Номер версии Genbank AAB49652,1 GI:1888316.

Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 09:22 AM.

Перекрестные ссылки.

Scanlan, M.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (12), 5657-5661 (1994).

Другая информация.

Официальное обозначение: FAP.

Другие названия: DPPIV, FAPA.

Другие обозначения: 170 кДа меланомная мембраносвязанная желатиназа; интегральная мембранная серин-протеаза; сепраза.

(83) DKK-1 (гомолог 1 Dickkopf (Xenopus laevis).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_012242.

Номер версии Genbank NM_012242,2 GI:61676924.

Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:48 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_036374.

Номер версии Genbank NP_036374,1 GI:7110719.

Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:48 PM.

Перекрестные ссылки.

Fedi P. et al., J. Biol. Chem. 274 (27), 19465-19472 (1999).

Другая информация.

Официальное обозначение: DKK1

Другие названия: UNQ492/PRO1008, DKK-1, SK.

Другие обозначения: dickkopf-связанный белок-1; dickkopf-1 подобный; dickkopf-подобный белок 1; dickkopf-связанный белок 1; hDkk-1.

АНТИТЕЛА

Novartis: BHQ880 (Fulciniti M., et al., Blood. 2009 Jul 9; 114(2):371-379). Например, см. US20120052070A1 SEQ ID NO: 100 и 108.

(84) CD52 (молекула CD52).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_001803.

Номер версии Genbank NM_001803,2 GI:68342029.

Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:48 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_001794.

Номер версии Genbank NP_001794,2 GI:68342030.

Дата обновления записи Genbank Sep 30, 2012 01:48 PM.

Перекрестные ссылки.

Xia M.Q., et al., Eur. J. Immunol. 21 (7), 1677-1684 (1991).

Другая информация.

Официальное обозначение: CD52

Другие названия: CDW52

Другие обозначения: антиген CAMPATH-1; антиген CD52 (антиген CAMPATH-1); антиген CDW52 (антиген CAMPATH-1); Кембриджской патологии антиген 1; эпидидимальный секреторный белок E5; he5; белок 5, специфичный к придаткам человека.

АНТИТЕЛА

Alemtuzumab (Campath) - Skoetz N., et al., *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Feb 15; 2:CD008078.

Например, см. Drugbank Acc. NO DB00087 (BIOD00109, BTD00109).

(85) CS1 - SLAMF7 (член 7 семейства SLAM).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank NM_021181.

Номер версии Genbank NM_021181,3 GI:1993571.

Дата обновления записи Genbank Jun 29, 2012 11:24 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank NP_067004.

Номер версии Genbank NP_067004,3 GI:19923572.

Дата обновления записи Genbank Jun 29, 2012 11:24 AM.

Перекрестные ссылки.

Boles K.S., et al., *Immunogenetics* 52 (3-4), 302-307 (2001).

Другая информация.

Официальное обозначение: SLAMF7

Другие названия: UNQ576/PRO1138, 19A, CD319, CRACC, CS1

Другие обозначения: белок 19A24; подкласс 1 CD2; CD2-подобные ТС-лимфоциты, активирующие рецептор; CD2-подобные активирующие рецептор ТС-лимфоциты; мембранный белок FOAP-12; новый LY9 (антиген лимфоцитов 9)-подобный белок; белок 19A.

АНТИТЕЛА

BMS: elotuzumab/HuLuc63 (Benson DM., et al., *J Clin Oncol.* 2012 Jun 1; 30(16):2013-2015). Например, см. US20110206701 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 16.

(86) Эндоглин - ENG (эндоглин).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank AF035753.

Номер версии Genbank AF035753,1 GI:3452260.

Дата обновления записи Genbank Mar 10, 2010 06:36 PM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank AAC32802.

Номер версии Genbank AAC32802,1 GI:3452261.

Дата обновления записи Genbank Mar 10, 2010 06:36 PM.

Перекрестные ссылки.

Rius C, et al., *Blood* 92 (12), 4677-4690 (1998).

Официальное обозначение: ENG.

Другая информация.

Другие названия: RP11-228B15,2, CD105, END, NHT1, ORW, ORW1

Другие обозначения: антиген CD105

(87) Аннексии A1 - ANXA1 (Аннексии A1).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank X05908.

Номер версии Genbank X05908,1 GI:34387.

Дата обновления записи Genbank Feb 02, 2011 10:02 AM.

Полипептид.

Учетный номер Genbank CCA29338.

Номер версии Genbank CCA29338,1 GI:34388.

Дата обновления записи Genbank Feb 02, 2011 10:02 AM.

Перекрестные ссылки.

Wallner B.P., et al., *Nature* 320 (6057), 77-81 (1986).

Другая информация.

Официальное обозначение: ANXA1

Другие названия: RP11-71A24,1, ANX1, LPC1

Другие обозначения: аннексии I (липокортин I); аннексин-1; кальпактин II; кальпактин-2; хромобиндин-9; липокортин I; p35; фосфолипаза A2 ингибирующий белок.

(88) V-CAM (CD106) - VCAM1 (молекула адгезии сосудистого эндотелия типа 1).

Нуклеотид.

Учетный номер Genbank M60335.
 Номер версии Genbank M60335,1 GI:340193.
 Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:56 AM.
 Полипептид.
 Учетный номер Genbank AAA61269.
 Номер версии Genbank AAA61269,1 GI:340194.
 Дата обновления записи Genbank Jun 23, 2010 08:56 AM.
 Перекрестные ссылки.
 Hession C, et al., J. Biol. Chem. 266 (11), 6682-6685 (1991).
 Другая информация.
 Официальное обозначение VCAM1.
 Другие названия: CD106, INCAM-100.
 Другие обозначения: антиген CD106; белок адгезии сосудистого эндотелия типа 1.

Последовательности антител

Анти-интегрин $\alpha_v\beta_6$.

RHAB6.2.

QVQLVQSGSELKPKGASVKISCKASGFAFTDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTE
 YAPKFQGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVAG
 PYPFDYWGQGLTVTVSS

RHCB6.2.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGDTE
 YAPKFQGRVTITDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVAG
 PYPFDYWGQGLTVTVSS

RHF.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGDT
 EYAPKFQGRVFTTDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPTPGYFDYWGQGLTVTV
 SS

RHFB6.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGDT
 EYAPKFQGRVFTTDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVA
 GPYYFDYWGQGLTVTVSS

RHAY100bP.

QVQLVQSGSELKPKGASVKISCKASGFAFTDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTE
 YAPKFQGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTGPYPFDYWGQGLTVTVSS

RKF.

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQKPKGQAPRLLIYSTNLASGIPDRF
 SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

RKFL36L50.

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWLQKPKGQAPRLLIYLTSNLASGIPDRF
 SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

RKC.

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQKPKGQAPRLLIYSTNLASGIPDRFS
 GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

Анти-CD33.

CD33 Hum195 VH.

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTG
 YNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGRPAMDYWGQGLTVTVSS

CD33 Hum 195 VK.

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQKPKGKAPKLLIYAASNQSGS
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDFATYYCQQSKEVPWTFGGGKVEIK

Анти-CD19.

CD19 B4 переложенная VH.

QVQLVQPGAIEVVKPGASVKLSCKTSGYTFSTSNMHWVKQRPGQGLEWIGEIDPDSYTN
 YNQNFKGAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNPYYYAMDYWGQGLTVTV
 SS

CD19 B4 переложенная VK.

EIVLTQSPAIMSASPGERVMTCSASSGVNYMHWYQKPKGTPRRWIYDTSKLAGVPAR
 FSGSGSGTSYSLTISSMEPEDAATYYCHQRGSYTFGGGKLEIK

Анти-Her2.

VH цепь герцептина.

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVS
S

VL цепь герцептина.

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK

Анти-CD25.

Симулект YK (также известный как Базиликсимаб).

QIVSTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSRSYMQWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLAGVPAR
FSGSGSGTSYSLTISSMEAEADAATYYCHQRSSYTFGGGKLEIK

Симулект VH.

QLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTRYWMHWIKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYN
QKFEGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSAVYYCSRDIYGYDFWGGGTTLVSS

анти-PSMA.

Деиммунизированная VH '1.

EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKAPGKLEWIGNINPNNGGTTYN
QKFEDKATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGLLTVSS

Деиммунизированная VK '1.

DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGPSPKLLIYWASTRHTGIPSR
FSGSGSGTDFLTISLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGPGTKVDIK

Деиммунизированная VH1 '5.

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTGYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Деиммунизированная VH2 '5.

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Деиммунизированная VH3 '5.

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Деиммунизированная VH4 '5.

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Деиммунизированная VK1 '5.

NIVMTQFPSSMSASVGDRTITCKASENVGTYSVWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVDP
RFTGSGSATDFLTISLQTEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKEIMK

Деиммунизированная VK2 '5.

NIVMTQFPSSMSASVGDRTITCKASENVGTYSVWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVDP
RFSGSGSGTDFLTISLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKEIK

Деиммунизированная VK3 '5.

NIQMTQFPAMSASVGDRTITCKASENVGTYSVWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVDP
RFSGSGSGTDFLTISLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKEIK

Деиммунизированная VK4 '5.

NIQMTQFPAMSASVGDRTITCKASENVGTYSVWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVDP
RFSGSGSGTDFLTISLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKEIK

Деиммунизированная VK DI '5.

NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCASENVGTYSVWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGVDP
RFSGSGSGTDFLTISVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGKLEIMK

Деиммунизированная VH DI '5.

EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMNLSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированное RHA '5.

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKLEWVGEIRSQSNNFA
THYAESVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированное RHB '5.

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNLSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированное RHC '5.

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNLSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированное RHD '5.

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVGEIRSQSNNFA
 THYAESVKGRVVISRDDSNTVYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированное RHE '5.
 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFA
 THYAESVKGRFTISRDDSNTVYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированное RHF '5.
 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFA
 THYAESVKGRVVISRDDSNTAYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированное RHG '5.
 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFA
 THYAESVKGRVVISRDDSNTAYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированное RKA '5.
 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPSR
 FSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK
 Гуманизированное RKB '5.
 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPSR
 FSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK
 Гуманизированное RKC '5.
 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
 RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK
 Гуманизированное RKD '5.
 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
 RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK
 Гуманизированное RKD '5.
 RKE '5.
 NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPSR
 FTGSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK
 Гуманизированное RKD '5.
 RKF '5.
 NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPSR
 FSGSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK
 Гуманизированное RKD '5.
 RKG '5.
 NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPSR
 FTGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Исходное антитело также может представлять собой гибридный белок, содержащий последовательность альбуминсвязывающего пептида (ABP) (Dennis et al. (2002), "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J. Biol. Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Антитела согласно настоящему изобретению включают гибридные белки с последовательностью ABP, описанные в источниках: (i) Dennis et al. (2002), J. Biol. Chem. 277:35035-35043, табл. III и IV, стр. 35038; (ii) US 2004/0001827, [0076]; и (iii) WO 01/45746, стр. 12-13, все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Согласно одному варианту реализации антитело сконструировано как специфически направленное против связанного с опухолью антигена $\alpha_v\beta_6$.

Связывающийся с клетками агент может быть меченым, например, для облегчения обнаружения или очистки агента либо до его встраивания в конъюгат, либо в часть конъюгата. Метка может представлять собой биотиновую метку. Согласно другому варианту реализации связывающийся с клетками агент может быть меченым радиоактивным изотопом.

Варианты реализации настоящего изобретения включают ConjA, где указанный связывающийся с клетками агент выбран из антитела к любому из антигенов, описанных выше.

Варианты реализации настоящего изобретения включают ConjB, где указанный связывающийся с клетками агент выбран из антитела к любому из антигенов, описанных выше.

Варианты реализации настоящего изобретения включают ConjA, где указанный связывающийся с клетками агент выбран из любого из антител, описанных выше.

Варианты реализации настоящего изобретения включают ConjB, где указанный связывающийся с клетками агент выбран из любого из антител, описанных выше.

Настоящее изобретение может также относиться к конъюгатам, в которых связывающийся с клетками агент выбран из антитела к любому из антигенов, описанных выше, и любого из антител, описанных выше, связанных с различными лекарственными средствами.

Нагрузка лекарственного средства

Нагрузка лекарственного средства представляет собой среднее количество PBD лекарственного средства на связывающийся с клетками агент, то есть антитело. Если соединения согласно изобретению связаны с цистеинами, нагрузка лекарственного средства может варьироваться от 1 до 8 фрагментов лекарственного средства (D) на связывающийся с клетками агент, т.е. при этом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 фрагментов лекарственного средства ковалентно связаны со связывающимся с клетками агентом. Композиции конъюгатов включают совокупность связывающихся с клетками агентов, например антител, конъюгированных с фрагментами лекарственных средств в количестве от 1 до 8. Если соединения согласно изобретению связаны с лизинами, нагрузка лекарственного средства может варьироваться от 1 до 80 фрагментов лекарственного средства (D) на связывающийся с клетками агент, хотя может быть предпочтительным верхний предел в 40, 20, 10 или 8. Композиции конъюгатов включают совокупность связывающихся с клетками агентов, например антител, конъюгированных с фрагментами лекарственных средств в количестве от 1 до 80, от 1 до 40, от 1 до 20, от 1 до 10 или от 1 до 8.

Среднее число лекарственных средств на антитело в композициях ADC, полученных в результате реакций конъюгации, может быть определено традиционными способами, таким как UV, обращенно-фазовая ВЭЖХ, гидрофобная хроматография (HIC), масс-спектрометрия, ИФА-анализ (ELISA) и электрофорез. Также можно определить количественное распределение ADC в единицах ρ . Среднее значение ρ в конкретной композиции ADC можно определить с помощью ИФА (Hamblett et al. (2004), Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al. (2005), Clin. Cancer Res. 11:843-852). Однако распределение значений ρ (нагрузка лекарственного средства) невозможно определить вследствие связывания антитело-антиген и предела обнаружения ИФА. Также с помощью ИФА при использовании метода для выявления конъюгата антитело-лекарственное средство нельзя определить, в каких сайтах фрагменты лекарственного средства присоединены к антителу, например, к фрагментам тяжелых цепей или легких цепей или определенным аминокислотным остаткам. В некоторых примерах разделение, очистка и характеристика однородных ADC, где ρ принимает определенное значение, может достигаться такими способами, как обращенно-фазовая ВЭЖХ или электрофорез. Такие методики также подходят для других типов конъюгатов.

Для некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство ρ может ограничиваться числом сайтов присоединения на антителе. Например, антитело может содержать одну или несколько тиоловых групп цистеина или может содержать только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиоловых групп, через которые может присоединяться линкер. Более высокая нагрузка лекарственного средства, например, $\rho > 5$, может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю проницаемости в клетки определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Как правило, во время реакции конъюгации с антителом связывается число фрагментов лекарственного средства меньше теоретического максимума. Антитело может содержать, например, много остатков лизина, которые не взаимодействуют с интермедиатом лекарственное средство-линкер (D-L) или линкерным реагентом. Только наиболее реакционноспособные группы лизина могут реагировать с реакционноспособным по отношению к аминам линкерным реагентом. Подобным образом, только наиболее реакционноспособные тиоловые группы цистеина могут реагировать с реакционноспособным по отношению к тиоловым группам-линкерным реагентом. В целом антитела содержат немного, если вообще содержат, свободных и реакционноспособных тиоловых групп цистеина, которые могут связываться с фрагментом лекарственного средства. Большинство тиоловых групп остатков цистеина в антителах в указанных соединениях существуют в виде дисульфидных мостиков и должны восстанавливаться с помощью восстановителей, таких как дитиотреитол (ДТТ) или ТСЕР, в частично или полностью восстановительных условиях. Нагрузка (отношение лекарственное средство/антитело) в ADC может контролироваться несколькими различными способами, включая: (i) ограничение молярного избытка интермедиата лекарственное средство-линкер (D-L) или линкерного реагента по отношению к антителу, (ii) ограничение времени или температуры реакции конъюгации, и (iii) частичные или ограничивающие восстановительные условия для модификации тиоловых групп цистеина.

Некоторые антитела содержат способные к восстановлению межцепевые дисульфиды, т.е. цистеиновые мостики. Антитела можно активировать для конъюгирования с линкерными реагентами путем обработки восстановителем, таким как ДТТ (дитиотреитол). В результате каждый цистеиновый мостик теоретически сможет образовать два реакционноспособных тиоловых нуклеофила. В антитела можно вводить дополнительные нуклеофильные группы посредством реакции лизинов с 2-иминотиолоном (реагентом Траута), что приводит к превращению амина в тиол. Реакционноспособные тиоловые группы могут вводиться в антитело (или его фрагмент) путем введения одного, двух, трех, четырех или более цистеиновых остатков (например, при получении мутантных антител, содержащих один или более чужеродных цистеиновых аминокислотных остатков). В US 7521541 описано получение антитела путем введения реакционноспособных цистеиновых аминокислот.

В реакционноспособных сайтах антитела могут быть сконструированы цистеиновые аминокислоты, которые не образуют межцепевые или межмолекулярные дисульфидные связи (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al. (2009), Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO 2009/052249). Полученные тиоловые группы цистеинов могут взаимодействовать с линкерными реа-

гентами или соединениями лекарственное средство-линкерный реагент согласно настоящему изобретению, содержащими реакционноспособные по отношению к тиольным группам электрофильные группы, такие как малеимидная или альфа-галогенамиды, с образованием ADC со сконструированными на основе цистеина антителами и фрагментами PBD лекарственного средства. Положение фрагмента лекарственного средства, таким образом, может планироваться, контролироваться и быть известным. Нагрузку лекарственного средства можно контролировать, так как сконструированные тиоловые группы цистеина, как правило, взаимодействуют с реакционноспособными по отношению к тиоловым группам линкерными реагентами или соединениями лекарственное средство-линкерный реагент с высокой эффективностью. Конструирование антитела IgG с введением аминокислоты цистеина путем замещения одного сайта в тяжелой или легкой цепи приводит к появлению двух новых цистеинов в симметричном антителе. Можно достичь нагрузки лекарственного средства со значением около 2 и относительную однородность продукта конъюгации ADC.

Когда более одной нуклеофильной или электрофильной группы антитела реагирует с интермедиатом лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом с последующим взаимодействием с фрагментом лекарственного средства, полученный продукт представляет собой смесь ADC соединений с распределением фрагментов лекарственного средства, присоединенных к антителу, например 1, 2, 3 и т.д. С помощью методов жидкостной хроматографии, таких как полимерная обращенно-фазовая хроматография (PLRP) и хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC), можно разделять соединения в смеси в соответствии с нагрузкой лекарственного средства. Могут быть выделены композиции ADC с одним значением нагрузки лекарственного средства (ρ), однако указанные композиции ADC с одним значением нагрузки могут все еще представлять собой гетерогенные смеси, так как фрагменты лекарственного средства могут присоединяться с помощью линкера к различным сайтам антитела.

Таким образом, композиции конъюгатов антитело-лекарственное средство согласно изобретению включают смеси соединений конъюгатов антитело-лекарственное средство, где указанное антитело содержит один или более фрагментов PBD лекарственного средства и где фрагменты лекарственного средства могут быть присоединены к антителу на различных аминокислотных остатках.

Согласно одному из вариантов реализации среднее количество групп пирролбензодиазепинового димера на связывающийся с клетками агент составляет от 1 до 20. Согласно некоторым вариантам реализации диапазон выбран из от 1 до 8, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 4 и от 4 до 8.

Согласно некоторым вариантам реализации одна группа пирролбензодиазепинового димера на связывающийся с клетками агент.

Другие формы

Если не указано иное, указанные выше примеры включают хорошо известные ионные формы, формы солей, сольватов и защищенные формы указанных заместителей. Например, указание на карбоновую кислоту (-COOH) также включает анионную (карбоксилатную) форму (-COO⁻), соль или сольват, а также традиционные защищенные формы. Аналогично, указание на аминогруппу включает протонированную форму (-N⁺HR¹R²), соль или сольват аминогруппы, например, гидрохлоридную соль, а также традиционные защищенные формы аминогруппы. Аналогично, указание на гидроксильную группу также включает анионную форму (-O⁻), соль или сольват, а также традиционные защищенные формы.

Соли

Может быть удобным или желательным получать, очищать и/или обрабатывать соответствующую соль активного соединения, например, фармацевтически приемлемую соль. Примеры фармацевтически приемлемых солей описаны в источнике Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Например, если соединение является анионным или содержит функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может представлять собой -COO⁻), то может происходить образование соли с подходящим катионом. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но не ограничиваются ими, ионы щелочных металлов, такие как Na⁺ и K⁺, катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca²⁺ и Mg²⁺, и другие катионы, такие как Al³⁺. Примеры подходящих органических катионов включают, но не ограничиваются ими, ион аммония (т.е. NH₄⁺) и замещенные ионы аммония (например, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Примеры некоторых подходящих замещенных ионов аммония представляют собой ионы, полученные из: этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Пример обычного иона четвертичного аммония представляет собой N(CH₃)₄⁺.

Если соединение является катионным или содержит функциональную группу, которая может быть катионной (например, -NH₂ может представлять собой -NH₃⁺), то может происходить образование соли с подходящим анионом. Примеры подходящих неорганических анионов включают, но не ограничиваются ими, анионы, полученные из следующих неорганических кислот: соляной, бромоводородной, йодоводородной, серной, сернистой, азотной, азотистой, фосфорной и фосфористой.

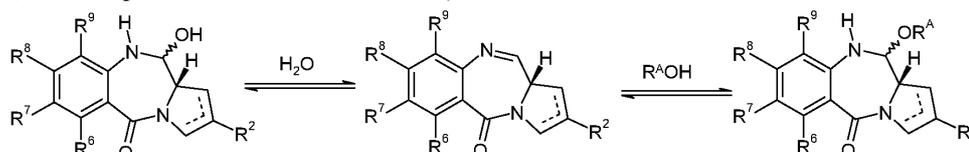
Примеры подходящих органических анионов включают, но не ограничиваются ими, анионы, полученные из следующих органических кислот: 2-ацетилоксибензойной, уксусной, аскорбиновой, аспарагиновой, бензойной, камфоросульфоновой, коричной, лимонной, этилендиаминтетрауксусной, этанди-

сульфоновой, этансульфоновой, фумаровой, глюкогептоновой, глюконовой, глутаминовой, гликолевой, гидроксималеиновой, гидроксинафталинкарбоновой, изэтионовой, молочной, лактобионовой, лауриновой, малеиновой, яблочной, метансульфоновой, муциновой, олеиновой, щавелевой, пальмитиновой, палмоевой, пантотеновой, фенилуксусной, фенилсульфоновой, пропионовой, пировиноградной, салициловой, стеариновой, сукциновой, сульфаниловой, винной, толуолсульфоновой, трифторуксусной кислоты и валериановой. Примеры подходящих полимерных органических анионов включают, но не ограничиваются ими, анионы, полученные из следующих полимерных кислот: танина, карбоксиметилцеллюлозы.

Сольваты

Может быть удобным или желательным получать, очищать и/или обрабатывать соответствующий сольват активного соединения. Термин "сольват" используется в настоящем описании в общепринятом смысле для указания на комплекс растворенного вещества (например, активного соединения, соли активного соединения) и растворителя. Если растворитель представляет собой воду, сольват может в общепринятом смысле называться гидратом, например, моногидратом, дигидратом, тригидратом и т.д.

Настоящее изобретение включает соединения, в которых растворитель присоединяется через иминную связь PBD фрагмента, что показано ниже, где растворитель представляет собой воду или спирт ($R^A\text{OH}$, где R^A представляет собой C_{1-4} алкил):



Указанные формы могут называться карбиноламинными и карбиноламинэфирными формами PBD (как описано в разделе, относящемся к R^{10} , как указано выше). Равновесие указанного обратимого процесса зависит от состояний, в которых указанные соединения выявлены, а также природы самого фрагмента.

Указанные конкретные соединения могут быть выделены в твердом виде, например, путем лиофилизации.

Изомеры

Конкретные соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в одной или более определенных геометрических, оптических, энантиомерных, диастереомерных, эпимерных, атроповых, стереоизомерных, таутомерных, конформационных или аномерных формах, включая, но не ограничиваясь ими, цис- и транс-формы; E- и Z-формы; c-, t- и g- формы; эндо- и экзо-формы; R-, S- и мезо-формы; D- и L-формы; d- и l-формы; (+) и (-) формы; кето-, енол-, и енолат-формы; син- и анти-формы; синклинальные и антиклинальные формы; α - и β -формы; аксиальные и экваториальные формы; форму ванны, кресла, твист-форму, форму конверта и полукресла, и их комбинации, которые в настоящем изобретении вместе называются "изомерами" (или "изомерными формами").

Термин "хиральный" относится к молекулам, которые имеют свойство не совпадать при наложении зеркальных отображений партнеров, тогда как термин "ахиральный" относится к молекулам, которые совпадают при наложении зеркальных отображений партнеров.

Термин "стереоизомеры" относится к соединениям, которые имеют одинаковый химический состав, но различаются с точки зрения организации атомов или групп в пространстве.

Термин "диастереомер" относится к стереоизомеру с двумя или более центрами хиральности, молекулы которого не являются зеркальными отображениями друг друга. Диастереомеры имеют разные физические свойства, например, температуру плавления, температуру кипения, спектральные свойства и реакционную способность. Смеси диастереомеров можно разделить с помощью аналитических методов с высоким разрешением, таких как электрофорез и хроматография.

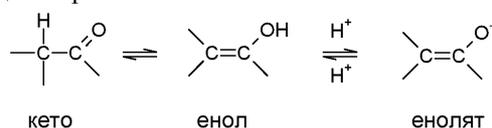
Термин "энантиомеры" относится к двум стереоизомерам соединения, которые не совпадают при наложении зеркальных отображений друг друга.

Определения и обозначения стереохимических структур, используемые в настоящем изобретении, в целом приведены в соответствии с S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984), McGraw-Hill Book Company, New York; and Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Соединение", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Соединения согласно настоящему изобретению могут содержать асимметричные или хиральные центры, и поэтому существовать в различных стереоизомерных формах. Предполагается, что все стереоизомерные формы соединений согласно настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, диастереомеры, энантиомеры и атропоизомеры, а также их смеси, такие как рацемические смеси, являются частью настоящего изобретения. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, т.е. способны вращать плоскость плоскополяризованного света. При описании оптически активных соединений префиксы D и L, или R и S, используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра (центров). Префиксы d и l или (+) и (-) используются для обозначения знака направления вращения плоскости плоскополяризованного света соединением, при этом (-) или l означает, что соединение является

левоповорачивающим. Соединение с префиксом (+) или d является правоповорачивающим. С точки зрения данной химической структуры указанные стереоизомеры являются идентичными, за исключением того, что они являются зеркальными отображениями друг друга. Определенный стереоизомер может также называться энантиомером, а смесь таких изомеров часто называется энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров 50:50 называется рацемической смесью или рацематом, который может образовываться при отсутствии стереоселекции или стереоспецифичности в процессе химической реакции или технологическом процессе. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" относятся к эквимольной смеси двух энантиомерных форм, лишенной оптической активности.

Необходимо отметить, что, за исключением описанного ниже для таутомерных форм, специально исключенных из термина "изомеры", в настоящем изобретении представлены структурные (или конституционные) изомеры (т.е. изомеры, которые различаются по связям между атомами, а не просто по положению атомов в пространстве). Например, указание на метокси-группу $-OCH_3$ не следует рассматривать как указание на ее структурный изомер гидроксиметильную группу $-CH_2OH$. Аналогично, указание на орто-хлорфенил не следует рассматривать как указание на его структурный изомер мета-хлорфенил. Однако указание на класс структур может включать структурные изомерные формы, входящие в указанный класс (например C_{1-7} -алкил включает n-пропил и изопропил; бутил включает n-, изо-, втор- и трет-бутил; метоксифенил включает орто-, мета- и параметоксифенил).

Приведенные выше исключения не относятся к таутомерным формам, например, кето-, енол- и енолят-формам, как, например, в следующих таутомерных парах: кето/енол (показанных ниже), имин/енамин, амид/иминоспирт, амидин/амидин, нитрозо/оксим, тиокетон/енетиол, N-нитрозо/гидроксиазо и нитро/аци-нитро.



Термин "таутомер" или "таутомерная форма" относится к структурным изомерам с разной энергией, которые являются взаимопревращающимися при прохождении через низкоэнергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) подвергаются взаимопревращениям, опосредованным миграцией протона, таким как кето-енольная и имин-енаминная изомеризация. Валентные таутомеры подвергаются взаимопревращениям за счет перераспределения некоторых из связывающих электронов.

Необходимо отметить, что в термин "изомер" специально включены соединения с одним или более изотопными заместителями. Например, H может быть представлен любой изотопной формой, включая ^1H , ^2H (D) и ^3H (T); C может быть представлен любой изотопной формой, включая ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C ; O может быть представлен любой изотопной формой, включая ^{16}O и ^{18}O ; и т.п.

Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения согласно настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, включая, но не ограничиваясь ими, ^2H (дейтерий, D), ^3H (тритий), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl и ^{125}I . Различные меченные изотопом соединения согласно настоящему изобретению, например, соединения, в которые введены радиоактивные изотопы, такие как ^3H , ^{13}C и ^{14}C . Такие изотопно-меченные соединения могут применяться в метаболических исследованиях, исследованиях кинетики реакций, методах определения или визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (СПЕКТ), включая анализ распределения в ткани лекарственного средства или субстрата или, лечения пациентов радиоактивными соединениями. Меченные или замеченные дейтерием терапевтические соединения согласно настоящему изобретению могут иметь улучшенные свойства ДМПК (метаболизма и фармакокинетики лекарственного средства), относящиеся к распределению, метаболизму и выведению (ADME). Замещение тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может предоставлять определенные терапевтические преимущества, проявляющиеся в большей метаболической стабильности, например, повышение периода полувыведения *in vivo* или снижение необходимой дозы. Меченное ^{18}F соединение может быть применимым для ПЭТ или СПЕКТ исследований. Меченные изотопами соединения согласно настоящему изобретению и их пролекарства могут в целом быть получены путем осуществления процедур, описанных ниже схемами или в примерами и составами, путем введения заместителя легко доступным меченым изотопом реагентом в не меченного изотопом реагента. Кроме того, замещение тяжелыми изотопами, в частности, дейтерием (т.е. ^2H или D), может предоставлять определенные терапевтические преимущества, проявляющиеся в большей метаболической стабильности, например, повышение периода полувыведения *in vivo* или снижение необходимой дозы или улучшение терапевтического индекса. Очевидно, что дейтерий в указанном контексте рассматривается как заместитель. Концентрация такого тяжелого изотопа, в частности, дейтерия, может быть определена с помощью коэффициента обогащения изотопом. Подразумевается, что в соединениях согласно настоящему изобретению любой атом, специально не обозначенный как конкретный изотоп, обозначает любой стабильный изотоп указанного атома.

Если не указано иное, указание на определенное соединение включает все такие изомерные формы, в том числе (полностью или частично) рацемические и другие их смеси. Способы получения (например, асимметрический синтез) и разделения (например, фракционная кристаллизация и хроматографические способы) указанных изомерных форм либо известны в данной области техники, либо с легкостью могут быть известным образом получены путем адаптации способов, описанных в настоящем изобретении, или известных способов.

Биологическая активность

Анализы клеточной пролиферации *in vitro*.

В целом цитотоксическую или цитостатическую активность конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) определяют путем: воздействия на клетки млекопитающих, имеющие рецепторные белки, например, HER2, антитела ADC в культуральной среде; культивирования клеток в течение периода от примерно 6 ч до примерно 5 дней; и измерения клеточной жизнеспособности. Клеточные анализы *in vitro* используют для определения жизнеспособности (пролиферации), цитотоксичности и индукции апоптоза (активации каспаз) ADC согласно настоящему изобретению.

Активность конъюгатов антитело-лекарственное средство *in vitro* можно измерить с помощью анализа клеточной пролиферации. Люминисцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® представляет собой коммерчески доступный (Promega Corp., Мэдисон, Висконсин, США) метод гомогенного анализа, основанный на экспрессии рекомбинантной люциферазы светляка *Coleoptera* (патенты США US 5583024; 5674713 и 5700670). С помощью указанного анализа клеточной пролиферации определяют число жизнеспособных клеток в культуре на основе количественной оценки присутствующего АТФ в качестве индикатора метаболически активных клеток (Crouch et al. (1993), *J. Immunol. Meth.* 160:81-88; US 6602677). Анализ CellTiter-Glo® проводили в 96-луночных планшетах с возможностью автоматизированного высокопроизводительного скрининга (HTS) (Cree et al. (1995), *AntiCancer Drugs* 6:398-404). Процедура гомогенного анализа включает добавление единственного реагента (CellTiter-Glo®) непосредственно в клетки, культивируемые в среде с добавлением сыворотки. Этапы промывки клеток, удаления среды и многократного пипетирования не требуются. Система выявляет до 15 клеток/лунку в 384-луночных планшетах через 10 мин после добавления реагента и перемешивания. Клетки можно непрерывно обрабатывать ADC, или же их можно обрабатывать и удалять ADC. В целом клетки, которые обрабатывали в течение короткого времени, т.е. в течение 3 ч, показали такую же эффективную активность, как и клетки, которые обрабатывали непрерывно.

Гомогенный анализ "добавление-смешивание-измерение" приводил к лизису клеток и генерации люминисцентного сигнала, пропорционального количеству присутствующего АТФ. Количество АТФ прямо пропорционально количеству клеток, присутствующих в культуре. В ходе анализа CellTiter-Glo® генерируется люминисцентный сигнал "накапливания" в результате реакции люциферазы, период полужизни которой в целом составляет более пяти часов, в зависимости от используемого типа клеток и среды. Количество жизнеспособных клеток выражают в относительных единицах люминесценции (RLU). Субстрат, люциферин жука, подвергается окислительному декарбоксилированию рекомбинантной люциферазой светляка с сопутствующим превращением АТФ в АМФ и генерацией фотонов.

Активность конъюгатов антитело-лекарственное средство *in vitro* можно также измерить с помощью анализа цитотоксичности. Культивированные адгезивные клетки промывают PBS, разделяют трипсином, разбавляют в полной среде, содержащей 10% FCS, центрифугируют, повторно суспендируют в свежей среде и подсчитывают с помощью гемоцитометра. Суспензионные культуры подсчитывают непосредственно. Для подсчета монодисперсных клеточных суспензий может потребоваться перемешивание суспензии путем повторяемого вакуумирования для разрушения скоплений клеток.

Клеточную суспензию разбавляют до требуемой плотности посева и распределяют (100 мкл на лунку) в черные 96-луночные планшеты. Планшеты адгезивных клеточных линий инкубируют в течение ночи для обеспечения адгезии. Суспензионные клеточные культуры можно использовать в день посева.

Маточный раствор (1 мл) ADC (20 мкг/мл) получают в подходящей культуральной клеточной среде. Последовательные 10-кратные разбавления маточного раствора ADC получают в 15 мл центрифужных пробирках путем последовательного переноса от 100 мкл до 900 мкл культуральной клеточной среды.

Четыре одинаковые лунки каждого разбавления ADC (100 мкл) распределяют в черные 96-луночные планшеты, в которые ранее помещали клеточную суспензию (100 мкл), получая в результате конечный объем 200 мкл. В контрольные лунки помещали культуральную клеточную среду (100 мкл).

Если время удвоения клеточной линии составляет более 30 ч, инкубацию ADC проводят в течение 5 дней, в противном случае инкубацию в течение четырех дней.

В конце периода инкубации жизнеспособность клеток оценивают с помощью анализа с аламаровым синим. Аламаровый синий (Invitrogen) распределяют по всему планшету (20 мкл на лунку) и инкубируют в течение 4 ч. Флуоресценцию аламарового синего измеряют при возбуждении при 570 нм, эмиссии при 585 нм на флеш планшет-ридере Varioskan. Процент клеточной выживаемости рассчитывают от средней флуоресценции в обработанных ADC лунках, по сравнению со средней флуоресценцией в контрольных

лунках.

Эффективность *in vivo*.

Эффективность *in vivo* конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему изобретению можно определить с помощью исследований ксенотрансплантата опухоли у мышей. Например, *in vivo* эффективность анти-HER2 ADC согласно настоящему изобретению можно определить с использованием модели трансгенных мышей, содержащих эксплантат, с повышенной экспрессией HER2. Аллогенный трансплантат получали из трансгенной мыши Fo5 mmtv, которая не отвечает, или слабо отвечает на терапию с использованием герцептина (HERCEPTIN®). Субъектам однократно вводят ADC определенных дозы (мг/кг) и воздействия PBD лекарственного средства (мкг/м²); и контрольным буфером-плацебо (Разбавитель), и наблюдали мышей в течение двух недель или более с целью определения времени увеличения опухоли в два раза, десятичного логарифма клеточной гибели и уменьшения размера опухоли.

Применение

Конъюгаты согласно настоящему изобретению могут использоваться для получения PBD соединений в области-мишени.

Область-мишень предпочтительно представляет собой популяцию пролиферирующих клеток. Антитело представляет собой антитело для антигена, присутствующего на популяции пролиферирующих клеток.

Согласно одному варианту реализации антиген отсутствует или присутствует на пониженном уровне в непролиферирующей клеточной популяции по сравнению с количеством антигена, присутствующим в пролиферирующей клеточной популяции, например, популяции опухолевых клеток.

В области-мишени линкер может расщепляться таким образом, что соединение ReIA или ReIB высвобождается. Таким образом, конъюгат может использоваться для селективного обеспечения соединения ReIA или ReIB в области-мишени.

Линкер может расщепляться ферментом, присутствующим в области-мишени. Область-мишень может представлять собой *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Соединения, представляющие собой конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему изобретению, включают соединения, оказывающие противораковое действие. В частности, соединения включают антитело, конъюгированное, т.е. ковалентно связанное с помощью линкера, с фрагментом PBD лекарственного средства, т.е. токсином. Когда лекарственное средство не конъюгировано с антителом, указанное PBD лекарственное средство обладает цитотоксическим действием. Биологическая активность фрагмента PBD лекарственного средства, таким образом, модулируется путем конъюгирования с антителом. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему изобретению селективно доставляет эффективную дозу цитотоксического агента к ткани опухоли, в результате чего может достигаться большая селективность, т.е. более низкая эффективная доза.

Таким образом, согласно одному аспекту настоящего изобретения, предложено соединение, представляющее собой конъюгат, как описано в настоящем изобретении, для применения в терапии.

Согласно другому аспекту также предложено соединение, представляющее собой конъюгат, как описано в настоящем изобретении, для применения для лечения пролиферативного заболевания. Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложено применение соединения, представляющего собой конъюгат, для получения лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания.

Средний специалист в данной области техники с легкостью определит, способен ли вероятный конъюгат лечить пролиферативное состояние для любого конкретного типа клеток. Например, испытания, которые могут удобно использоваться для оценки активности, обеспечиваемой определенным соединением, описаны в примерах ниже.

Термин "пролиферативное заболевание" относится к нежелательной или неконтролируемой пролиферации избыточных или аномальных клеток, которая является нежелательной, такой как неопластический или гиперпластический рост, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Примеры пролиферативных состояний включают, но не ограничиваются ими, доброкачественную, предраковую и злокачественную пролиферацию клеток, включая, но не ограничиваясь ими, неоплазмы и опухоли (например, гистiocитому, глиому, астроцитому, остеому), раковые заболевания (например, рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичек, рак печени, рак почки, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак мозга, саркому, остеосаркому, саркому Капоши, меланому), лимфомы, лейкозы, псориаз, заболевания костей, фибропролиферативные нарушения (например, соединительных тканей) и атеросклероз. Раковые заболевания, представляющие особый интерес, включают, но не ограничиваются ими, лейкозы и рак яичников.

Можно лечить клетки любого типа, включая, но не ограничиваясь ими, клетки легких, желудочно-кишечного тракта (включая, например, клетки кишечника, клетки толстой кишки), молочной железы (маммарные), яичников, предстательной железы, печени (печеночные), почки (почечные), мочевого пузыря, поджелудочной железы, мозга и кожи.

Согласно одному варианту реализации лечение представляет собой лечение рака поджелудочной

железы.

Согласно одному варианту реализации лечение представляет собой лечение опухоли, на поверхности клеток которой имеется $\alpha_v\beta_6$ интегрин.

Полагают, что конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему изобретению может применяться для лечения различных заболеваний или нарушений, которые, например, характеризуются гиперэкспрессией опухолевого антигена. Примеры состояний или гиперпролиферативных заболеваний включают доброкачественные или злокачественные опухоли, лейкоз, гематологические и лимфоидные злокачественные новообразования. Другие примеры включают нейрональные, глиальные, астроцитарные, гипоталамические, эндокринные, макрофагальные, эпителиальные, стромальные, blastocellular, воспалительные, ангиогенные и иммунологические, включая аутоиммунные, нарушения.

В целом заболевание или нарушение, поддающееся лечению, представляет собой гиперпролиферативное заболевание, такое как рак. Примеры рака, поддающегося лечению, согласно настоящему описанию включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфолейкозы. Более конкретные примеры указанных раковых заболеваний включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких и плоскоклеточную карциному легких, рак брюшины, гепатоклеточный рак, гастральный рак, или рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, цервикальный рак, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки или ренальный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, гепатокарциному, карциному заднего прохода, пенильную карциному, а также рак головы и шеи.

Аутоиммунные заболевания, для лечения которых могут применяться ADC соединения, включают ревматоидные нарушения (такие как, например, ревматоидный артрит, Синдром Шегрена, склеродермию, волчанку, такую как системная красная волчанка (SLE) и волчаночный нефрит, полимиозит/дерматомиозит, криоглобулинемия, синдром антифосфолипидных антител и псориазический артрит), остеоартрит, аутоиммунные нарушения желудочно-кишечного тракта и печени (такие как, например, воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозная анемия, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит и целиакия), васкулит (такой как, например, ANCA (антинейтрофильные цитоплазматические антитела)-ассоциированный васкулит, включая синдром Черджа-Строса, гранулематоз Вегенера и полиартериит), аутоиммунные неврологические нарушения (такие как, например, рассеянный склероз, синдром опсоклонус-миоклонус, миастения гравис, оптиконеуромиелит, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунные полиневропатии), почечные нарушения (такие как, например, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера и болезнь Бергера), аутоиммунные дерматологические нарушения (такие как, например, псориаз, крапивница, аллергическая сыпь, обыкновенная пузырчатка, буллезный пемфигоид и кожная красная волчанка), гематологические нарушения (такие как, например, тромбоцитопеническая пурпура, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура, и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные нарушения слуха (такие как, например, заболевания внутреннего уха и потеря слуха), синдром Бехчета, синдром Рейно, трансплантация органов и аутоиммунные эндокринные нарушения (такие как, например, связанные с диабетом аутоиммунные заболевания, такие как инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM), болезнь Аддисона, и аутоиммунные заболевания щитовидной железы (например, Болезнь Гравеса и тиреоидит)). Более предпочтительно указанные заболевания включают, например, ревматоидный артрит, язвенный колит, ANCA-ассоциированный васкулит, волчанку, рассеянный склероз, синдром Шегрена, болезнь Гравеса, IDDM, пернициозную анемию, тиреоидит и гломерулонефрит.

Способы лечения

Конъюгаты согласно настоящему изобретению могут использоваться в способах терапии. Также предложен способ лечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в указанном лечении, терапевтически эффективного количества соединения, представляющего собой конъюгат, согласно настоящему изобретению. Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает количество, достаточное для оказания благоприятного эффекта на организм пациента. Такой благоприятный эффект может представлять собой по меньшей мере облегчение по меньшей мере одного симптома. Вводимое в действительности количество и скорость и временная схема введения будет зависеть от природы и тяжести поддающегося лечению состояния. Предписание лечения, например определение дозы, находится в рамках компетенции врачей общей практики и других врачей.

Соединение согласно настоящему изобретению может вводиться индивидуально или в комбинации с другими схемами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от состояния, поддающегося лечению. Примеры схем лечения и терапий включают, но не ограничиваются ими, химиотерапию (введение активных агентов, включая, например лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты); хирургию и лучевую терапию.

"Химиотерапевтический агент" представляет собой химическое соединение, применимое для лече-

ния рака, независимо от механизма действия. Классы химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими: алкилирующие агенты, антиметаболиты, растительные алкалоиды, блокирующие митотическое веретено, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, антитела, фотосенсибилизаторы и ингибиторы киназ.

Химиотерапевтические агенты включают соединения, используемые в "направленной терапии" и традиционной химиотерапии.

Примеры химиотерапевтических агентов включают эрлотиниб (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, CAS NO 51-21-8), гемцитабин (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-диамин дихлорплатина(II), CAS No. 15663-27-1), карбоплатин (CAS No. 41575-94-4), паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), темозоломид (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабицикло-[4,3.0]нона-2,7,9-триен-9-карбоксамид, CAS No. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенилбут-1-енил)фенокси]-N,N-диметилэтанамин, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) и доксорубин (ADRIAMYCIN ®), Akti-1/2, HPPD и рапамицин.

Дополнительные примеры химиотерапевтических агентов включают оксалиплатин (ELOXATIN®, Sanofi), бортезомиб (VELCADE®, Millennium Pharm.), сугент (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), летрозол (FEMARA®, Novartis), иматиниб мезилат (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (ингибитор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (ингибитор Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (ингибитор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (ингибитор PI3K, Novartis), XL-147 (ингибитор PI3K, Exelixis), РТК787/ЗК 222584 (Novartis), фулвестрант (FASLODEX®, AstraZeneca), лейковорин (фолиновая кислота), рапамицин (сиролимус, RAPAMUNE®, Wyeth), лапатиниб (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарниб (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), сорафениб (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), гефитиниб (IRESSA®, AstraZeneca), иринотекан (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), типифарниб (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (без кремофора), лекарственные формы паклитаксела в виде связанных с альбумином наночастиц (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), вандетаниб (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), хлорамбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиролимус (TORISEL®, Wyeth), пазопаниб (GlaxoSmithKline), канфосфамид (TELCYTA®, Telik), тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN ®, NEOSAR®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллацинон); камптотетин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллестатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеотеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевина, такая как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как ендииновые антибиотики (например, калихеамицин, калихеамицин гамма II, калихеамицин омега II (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994), 33:183-186); динемидин, динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; есперамицин; а также неокарциностабиновый хромофор и родственные хромпротеиновые енедиинные хромофорные антибиотики), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, морфолинодоксорубин, цианоморфолинодоксорубин, 2-пирролинодоксорубин и дезоксидоксорубин), эпирубин, зорубин, идарубин, неморубин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; анти-метаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, меритиостан, тестолактон; антитела к гормонам надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; заместители фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевуленовая кислота; енилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазихон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; маитанзиноиды, такие как маитанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный ком-

плекс PSK® (JHS Natural Products, Юджин, Орегон, США); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновая кислота; триазилахон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, Т-2 токсин, веррацурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепа; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; платиновые аналоги, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; капецитабин (XELODA®, Roche); ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любых из указанных выше соединений.

Определение "химиотерапевтический агент" также включает: (i) анти-гормональные агенты, регулирующие или ингибирующие действие гормонов на опухоли, такие как анти-эстрогены и селективные модуляторы рецептора эстрогенов (SERM), включая, например, тамоксифен (включая NOLVADEX®, тамоксифен цитрат), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® (торемифин цитрат); (ii) ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулирующий продукцию эстрогенов в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклотетимид, MEGASE® (мегестрол ацетат), AROMASIN® (экземестан; Pfizer), форместан, фадрозол, RIVISOR® (ворозол), FEMARA® (летрозол; Novartis) и ARIMIDEX® (анастрозол; AstraZeneca); (iii) анти-андрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и госерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый аналог цитозинового нуклеозида); (iv) ингибиторы протеинкиназы, такие как ингибиторы MEK (WO 2007/044515); (v) ингибиторы липидкиназы; (vi) антисмысловые олигонуклеотиды, в частности, олигонуклеотиды, которые подавляют экспрессию генов в сигнальных путях, вовлеченных в нарушенную пролиферацию клеток, например, PKC-альфа, Raf и H-Ras, такие как облимерсен (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) рибозимы, такие как ингибиторы экспрессии VEGF (например, ANGIOZYME®) и ингибиторы экспрессии HER2; (viii) вакцины, такие как генотерапевтические вакцины, например, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, VAXID®, PROLEUKIN® rIL-2; ингибиторы топоизомеразы 1, такие как LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; (ix) антиангиогенные агенты, такие как бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любых из вышеуказанных соединений. Определение "химиотерапевтический агент" также включает терапевтические антитела, такие как алемтузумаб (Campath), бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); цетуксимаб (ERBITUX®, Imclone); панитумумаб (VECTIBIX®, Amgen), ритуксимаб (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), офатумумаб (ARZERRA®, GSK), пертузумаб (PERJETA™ OMNITARG™, 2C4, Genentech), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), тозитумомаб (Vectra, Corixa), и конъюгат антитело-лекарственное средство, гемтузумаб озогамидин (MYLOTARG®, Wyeth).

Гуманизированные моноклональные антитела, имеющие терапевтический потенциал для применения в качестве химиотерапевтических агентов в комбинации с конъюгатами согласно настоящему изобретению включают алемтузумаб, аполизумаб, азелизумаб, атлизумаб, бапинеизумаб, бевацизумаб, биватузумаб мертанзин, кантузумаб мертанзин, цеделизумаб, цетролизумаб пегол, цидфузитузумаб, цидтузумаб, даклизумаб, экулизумаб, эфализумаб, эпратузумаб, эрлизумаб, фелвизумаб, фонотоллизумаб, гемтузумаб озогамидин, инотузумаб озогамидин, ипилимумаб, лабетузумаб, линтузумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, мотовизумаб, натализумаб, нимотузумаб, ноловизумаб, нумавизумаб, окрелизумаб, омализумаб, паливизумаб, пасколизумаб, пекфузитузумаб, пектузумаб, пертузумаб, пекселизумаб, раливизумаб, ранибизумаб, ресливизумаб, реслизумаб, ресивизумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сибротузумаб, силлизумаб, сонтузумаб, такатузумаб тетракетан, тадоцизумаб, тализумаб, тефибазумаб, тоцилизумаб, торализумаб, трастузумаб, тукотузумаб целмолейкин, тукуситузумаб, умавизумаб, уртоксазумаб и визилизумаб.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению и для применения в соответствии с настоящим изобретением могут содержать кроме активного ингредиента, т.е. соединения, представляющего собой конъюгат, фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель, буфер, стабилизатор или другие вещества, хорошо известные специалистам в данной области техники. Указанные вещества должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Конкретная природа носителя или другого вещества зависит от способа введения, который может быть пероральным или инъекционным, например, кожной, подкожной или внутривенной инъекцией.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть представлены в форме таблетки, капсулы, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель или вспомогательное вещество. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, вазелин, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Может быть включен физиологический солевой раствор, декстроза или раствор другого сахара, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Капсула может содержать твердый носитель, такой как желатин.

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в место поражения активный

ингредиент может быть в форме подходящего для парентерального введения водного раствора, который является апирогенным и имеет подходящее значение pH, является изотоническим и стабильным. Специалисты в данной области техники могут получить подходящие растворы с использованием, например, изотонических разбавителей, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактированный раствор Рингера для инъекций. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Лекарственные формы

Несмотря на то, что соединение, представляющее собой конъюгат, возможно применять (например, вводить) отдельно, часто является предпочтительным применять его в виде композиции или лекарственной формы.

Согласно одному варианту реализации композиция представляет собой фармацевтическую композицию (например, лекарственную форму, препарат, лекарственное средство), содержащую соединение, представляющее собой конъюгат, описанное в настоящем изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

Согласно одному варианту реализации композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одно соединение, представляющее собой конъюгат, как описано в настоящем изобретении, вместе с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, фармацевтически приемлемые носители, разбавители, наполнители, вспомогательные вещества, основы, буферы, консерванты, антиоксиданты, смазывающие вещества, стабилизаторы, солюбилизаторы, поверхностно-активные вещества (например, смачивающие агенты), маскирующие агенты, красители, ароматизаторы и подсластители.

Согласно одному варианту реализации композиция дополнительно содержит другие активные агенты, например, другие терапевтические или профилактические агенты.

Подходящие носители, разбавители, наполнители и т.д. могут быть найдены в стандартных фармацевтических текстах. См., например, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2nd Edition (под ред. M. Ash и I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th edition, изд. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000 и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам получения фармацевтической композиции, включающим смешивание по меньшей мере одного [¹¹C]-радиоактивно меченого конъюгата или подобного конъюгату соединения, как определено в настоящем изобретении, вместе с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, например, носителями, разбавителями, наполнителями и т.д. Если указанная композиция представлена в виде дискретных единиц (например, таблеток и т.д.), каждая указанная единица содержит предопределенное количество (дозу) активного соединения.

В настоящем описании термин "фармацевтически приемлемый" относится к соединениям, ингредиентам, материалам, композициям, лекарственным формам и т.д., которые по результатам тщательной медицинской проверки являются подходящими для применения в контакте с тканями интересующего субъекта (например, человека) и не проявляют чрезмерной токсичности, не вызывают раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений в соответствии с разумным отношением польза/риск. Каждый носитель, разбавитель, наполнитель и т.д. также должен являться "приемлемым" с точки зрения совместимости с другими ингредиентами лекарственной формы.

Лекарственные формы могут быть получены с помощью способов, хорошо известных в области фармации. Указанные способы включают этап приведения во взаимодействие активного соединения с носителем, который включает один или более дополнительных ингредиентов. В целом лекарственные формы получают путем равномерного и тщательного приведения во взаимодействие активного соединения с носителями (например, жидкими носителями, мелкодисперсным твердым носителем и т.д.), а затем, при необходимости, придания формы продукту.

Лекарственная форма может быть приготовлена в форме с быстрым или медленным высвобождением; немедленным, отсроченным, регулируемым или замедленным высвобождением; или с их комбинацией.

Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения (например, путем инъекции), включают водные или неводные, изотонические, апирогенные, стерильные жидкости (например, растворы, суспензии), в которых активный ингредиент растворен, суспендирован или включен другим образом (например, в липосоме или другой микрочастице). Указанные жидкости могут дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые ингредиенты, такие как антиоксиданты, буферы, консерванты, стабилизаторы, бактериостатики, суспендирующие агенты, загустители и растворы, которые делают лекарственную форму изотоничной крови (или другой соответствующей жидкости тела) предполагаемого реципиента. Примеры наполнителей включают, например, воду, спирты, полиолы, глицерин, растительные масла и т.п. Примеры подходящих изотонических носителей для применения в указанных лекарственных формах включают раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера или лактированный

раствор Рингера для инъекций. Как правило, концентрация активного ингредиента в жидкости составляет от примерно 1 нг/мл до примерно 10 мкг/мл, например, от примерно 10 нг/мл до примерно 1 мкг/мл. Лекарственные формы могут быть представлены в однодозовых или многодозовых герметичных контейнерах, например, ампулах и флаконах, и могут храниться в виде высушенного сублимацией (лиофилизированного) продукта, к которому необходимо лишь добавить стерильный жидкий носитель, например, воду для инъекций, непосредственно перед применением. Растворы и суспензии для немедленного применения могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Дозировка

Специалистам в данной области техники будет понятно, что соответствующие дозы соединения, представляющего собой конъюгат, и композиций, содержащих соединение, представляющее собой конъюгат, могут варьироваться в зависимости от конкретного пациента. Определение оптимальной дозы в целом включает взвешивание отношения терапевтической пользы и риска или опасных побочных эффектов. Выбранная доза зависит от разных факторов, включая, но не ограничиваясь ими, активность определенного соединения, способ введения, время введения, скорость выведения соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или вещества, используемые в комбинации, тяжесть состояния и вид, пол, возраст, масса тела, состояние, общее состояние здоровья и история болезни пациента. Количество соединения и способ введения в конечном итоге определяется врачом, ветеринаром или клиницистом, несмотря на то, что обычно доза выбирается с целью достижения таких локальных концентраций в месте приложения действия, обеспечивающих достижением желаемого эффекта без существенных неблагоприятных или опасных побочных эффектов.

Можно осуществлять непрерывное или прерывистое (например, в дробных дозах с соответствующими интервалами) введение однократной дозы в течение курса лечения. Способы определения наиболее эффективных способов и дозы введения хорошо известны специалистам в данной области техники и варьируются в зависимости от используемой в терапии лекарственной формы, цели терапии, клетки-мишени (клеток-мишеней), подвергаемой лечению, и субъекта, подвергаемого лечению. Можно осуществлять однократное или многократное введение, при этом объем дозы и схема введения выбираются лечащим врачом, ветеринаром или клиницистом.

В целом подходящая доза активного соединения находится в диапазоне от примерно 100 нг до примерно 25 мг (как правило, от примерно 1 мкг до примерно 10 мг) на килограмм массы тела субъекта в сутки. Если активное соединение представляет собой соль, сложный эфир, амид, пролекарство или т.п., вводимое количество рассчитывают на основе исходного соединения, поэтому фактическая масса пропорционально увеличивается.

Согласно одному варианту реализации активное соединение вводят пациенту, представляющему собой человека, в соответствии со следующей схемой дозировки: примерно 100 мг, 3 раза в сутки.

Согласно одному варианту реализации активное соединение вводят пациенту, представляющему собой человека, в соответствии со следующей схемой дозировки: примерно 150 мг, 2 раза в сутки.

Согласно одному варианту реализации активное соединение вводят пациенту, представляющему собой человека, в соответствии со следующей схемой дозировки: примерно 200 мг, 2 раза в сутки.

Однако согласно одному варианту реализации соединение, представляющее собой конъюгат, вводят пациенту, представляющему собой человека, в соответствии со следующей схемой дозировки: примерно 50 или примерно 75 мг, 3 или 4 раза в сутки.

Согласно одному варианту реализации соединение, представляющее собой конъюгат, вводят пациенту, представляющему собой человека, в соответствии со следующей схемой дозировки: примерно 100 или примерно 125 мг, 2 раза в сутки.

Размер дозы, описанный выше, может относиться к конъюгату (включая конъюгат PBD фрагмента и линкера с антителом) или к эффективному количеству предложенного PBD соединения, например количеству соединения, которое может высвободиться после отщепления линкера.

Соответствующая дозировка ADC согласно настоящему изобретению для профилактики или лечения заболевания зависит от типа заболевания, подвергаемого лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, введения молекулы в целях профилактики или в терапевтических целях, предшествующего терапевтического лечения, истории болезни пациента и ответа на антитело и решения лечащего врача. Молекула подходящим образом вводится пациенту однократно или в течение нескольких этапов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания от примерно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-20 мг/кг) молекулы является начальной предполагаемой дозой для введения пациенту, например, путем одного или более отдельных введений или путем непрерывной инфузии. Обычно суточная доза может варьироваться от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, перечисленных выше. Пример дозы ADC для введения пациенту находится в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 10 мг/кг массы тела пациента. В случае повторных введений в течение нескольких дней или более в зависимости от состояния лечение поддерживается до достижения желаемого подавления симптомов заболевания. Пример схемы дозировки включает курс введения начальной нагрузочной дозы, составляющей примерно 4 мг/кг, с последующим введением дополнительных доз ADC каждую неделю, две недели, или три недели. Можно применять другие схемы дозировки. Изменения эффекта указанной терапии легко

наблюдать с помощью традиционных методов и испытаний.

Лечение

В настоящем описании термин "лечение" в контексте лечения состояния в целом относится к лечению и терапии человека или животного (например, при применении в ветеринарной медицине), при которой достигается некоторый желаемый терапевтический эффект, например, подавление прогрессирующего указанного состояния, и включает снижение скорости прогрессирования, прекращение прогрессирования, регрессию состояния, облегчение состояния и излечение состояния. Термин также включает лечение в качестве профилактической меры (т.е. профилактики, предупреждения).

В настоящем описании термин "терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству активного соединения или вещества, композиции или дозированной формы, содержащей активное соединение, которое является эффективным для достижения некоторого желаемого терапевтического эффекта, соразмерного разумному отношению польза/риск, при введении в соответствии с желаемой схемой лечения.

Аналогично, в настоящем описании термин "профилактически эффективное количество" относится к такому количеству активного соединения или вещества, композиции или дозированной формы, содержащей активное соединение, которое является эффективным для достижения некоторого желаемого профилактического эффекта соизмеримого с разумным отношением польза/риск, при введении в соответствии с желаемой схемой лечения.

Получение конъюгата лекарственного средства

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, а также конъюгаты другими связывающимися с клетками агентами, могут быть получены несколькими способами с использованием реакций органического синтеза, условий и реагентов, известных специалистам в данной области техники, включающими взаимодействие нуклеофильной группы антитела или связывающегося с клетками агента с линкерным реагентом лекарственного средства. Данный способ может быть использован с различными антителами и связывающимися с клетками агентами с получением конъюгатов антитело-лекарственное средство согласно изобретению.

Нуклеофильные группы антител включают, но не ограничиваются ими тиоловые группы боковых цепей, например, цистеина. Тиоловые группы являются нуклеофильными и способны взаимодействовать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами линкерных фрагментов, таких как линкерные фрагменты согласно настоящему изобретению. Определенные антитела содержат восстанавливаемые межцепевые дисульфидные группы, т.е. цистеиновые мостики. Для конъюгации с линкерными реагентами антитела можно активировать путем обработки восстановителем, таким как ДТТ (реагент Келланда, дитиотреитол) или ТСЕР (гидрохлорид трис-(2-карбоксиитил)фосфина; Getz et al. (1999), Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Беверли, Массачусетс). Теоретически, в результате указанной обработки каждый цистеиновый дисульфидный мостик образует две реакционноспособных тиоловых нуклеофильных группы. Дополнительные нуклеофильные группы можно вводить в антитела при взаимодействии лизинов с 2-иминотиолоном (реагентом Траута), что приводит к превращению аминокислоты в тиоловую.

Субъект/пациент

Субъект/пациент может представлять собой животное, млекопитающее, плацентарное млекопитающее, сумчатое (например, кенгуру, вомбат), однопроходное (например, утконос), грызуна (например, морская свинка, хомяк, крыса, мышь), мышинных (например, мышь), зайцеобразных (например, кролик), птиц (например, птица), псовых (например, собака), кошачьих (например, кошка), лошадиных (например, лошадь), свиных (например, свинья), овечьих (например, овца), бычьих (например, корова), примата, обезьяноподобных (например, обезьяна или мартышка), мартышку (например, игрунка, павиан), человекообразную обезьяну (например, горилла, шимпанзе, орангутанг, гиббон) или человека.

Более того, субъект/пациент может находиться на любой стадии развития, например, на стадии эмбриона. Согласно одному предпочтительному варианту реализации субъект/пациент представляет собой человека.

Согласно одному варианту реализации пациенты представляют собой популяцию, в которой каждый пациент страдает от опухоли, на поверхности клеток которой находится $\alpha_v\beta_6$.

Примеры

Общие экспериментальные методики для примеров 1 и 2.

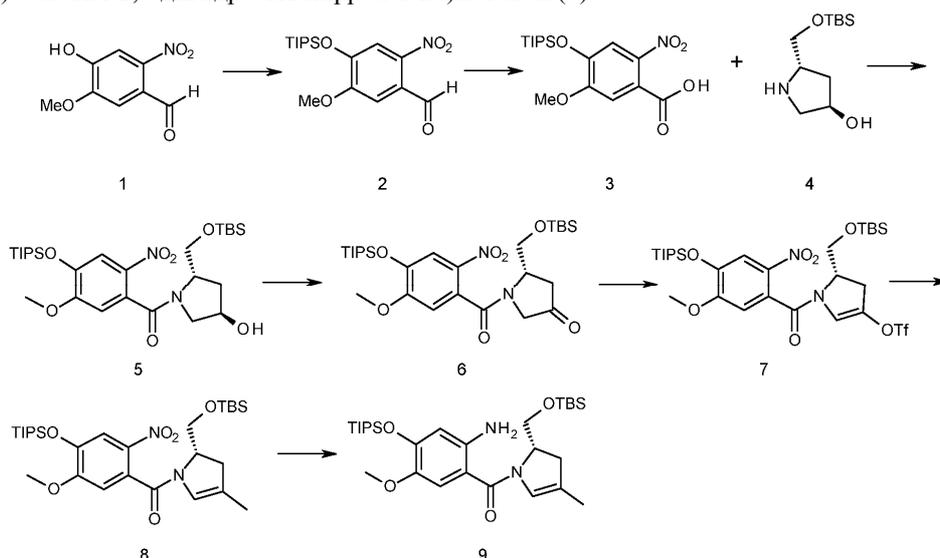
Оптическое вращение измеряли на поляриметре ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.), концентрации (с) представлены в виде г/100 мл. Температуру плавления измеряли при помощи цифрового измерителя температуры плавления (Electrothermal). ИК-спектры записывали на ИК спектрометре Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT. Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР получали при 300 К на ЯМР спектрометре Bruker Advance при 400 и 100 МГц соответственно. Химические сдвиги представлены относительно TMS ($\delta=0,0$ ppm), сигналы обозначены как с (синглет), д (дублет), т (триплет), дт (двойной триплет), дд (дублет дублетов), ддд (двойной дублет дублетов) или м (мультиплет), константы спин-спинового взаимодействия даны в герцах (Гц). Данные масс-спектрометрического анализа (МС) получали на оборудовании Waters Micromass

ZQ, соединенного с ВЭЖХ хроматографом Waters 2695 и детектором Waters 2996 PDA. Использовались следующие параметры системы Waters Micromass ZQ: капилляр (кВ), 3,38; конус (В), 35; экстрактор (В), 3,0; температура источника (°С), 100; температура десольватации (°С), 200; скорость потока подвижной фазы (л/ч), 50; расход десольватированного потока (л/ч), 250. Масс-спектрометрию высокого разрешения (HRMS) проводили в системе Waters Micromass QTOF Global в положительном W-режиме с использованием наконечников из борсиликатного стекла с металлическим покрытием для введения образцов в прибор. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на алюминиевых пластинах с силикагелем (Merck 60, F254), а для флэш-хроматографии использовали силикагель (Merck 60, 230-400 меш ASTM). За исключением НОВт (NovaBiochem) и реагентов на твердой подложке (Argonaut) все остальные химические реактивы и растворители приобретали в Sigma-Aldrich, и их применяли в поставляемом виде без дополнительной очистки. Безводные растворители получали путем перегонки в атмосфере сухого азота в присутствии соответствующего осушителя и хранили над молекулярными ситами 4Å или над натриевой проволокой. Петролейный эфир относится к фракции, кипящей при 40-60°С.

Общие условия ЖХ/МС: ВЭЖХ (Waters Alliance 2695) проводили с использованием в качестве подвижной фазы воды (А) (муравьиная кислота 0,1%) и ацетонитрила (В) (муравьиная кислота 0,1%). Градиент: исходный состав: 5% В в течение 1,0 мин, затем от 5% В до 95% В за 2,5 мин. Композицию выдерживали в течение 0,5 мин при 95% В, а затем возвращали к 5% В в течение 0,1 мин и выдерживали в течение 0,9 мин. Общее время градиентного анализа составило 5 мин. Скорость потока 3,0 мл/мин, с помощью тройника с нулевым мертвым объемом вводили в масс-спектрометр 400 мкл. Диапазон длин волн детектирования: 220-400 нм. Тип детектора: диодная матрица (535 сканирований). Колонка: Phenomenex® Onyx Monolithic C18, 50×4,60 мм

Пример 1.

(i) (S)-(2-амино-5-метокси-4-((триизопропилсилил)окси)фенил)(2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)метанон (9)



(a) 5-Метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)бензальдегид (2).

Чистый триизопропилсилилхлорид (56,4 мл, 262 ммоль) добавляли к смеси имидазола (48,7 г, 715,23 ммоль) и 4-гидрокси-5-метокси-2-нитробензальдегида 1 (47 г, 238 ммоль) (измельчали вместе). Указанную смесь нагревали до расплавления и переходили в раствор фенола и имидазола (100°С). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 15 мин и затем оставляли охлаждаться, после чего наблюдали образование твердого вещества на дне колбы (хлорид имидазола). Реакционную смесь разбавляли 5% EtOAc/гексаны и загружали непосредственно на силикагель и подложку элюировали 5% смесью EtOAc/гексаны, с последующим элюированием 10% EtOAc/гексаны (вследствие низкого выхода, в продукте был обнаружено совсем немного непрореагировавшего TIPSCl). Требуемый продукт элюировали 5% этилацетатом в гексане. Избыток элюента удаляли путем ротационного выпаривания при пониженном давлении, с последующим высушиванием в высоком вакууме с получением кристаллического светочувствительного твердого вещества (74,4 г, 88%). Удовлетворительная чистота по ЖХ/МС (4,22 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 353,88 ([M + H]⁺, 100));

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,43 (с, 1H), 7,60 (с, 1H), 7,40 (с, 1H), 3,96 (с, 3H), 1,35-1,24 (м, 3H), 1,10 (м, 18H).

(b) 5-Метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)бензойная кислота (3).

Раствор хлорита натрия (47,3 г, 523 ммоль, 80% техническая чистота) и дигидрофосфат натрия (35,2 г, 293 ммоль) (NaH₂PO₄) в воде (800 мл) добавляли к раствору соединения 2 (74 г, 209 ммоль) в тетрагидрофуране (500 мл) при комнатной температуре. Перекись водорода (60% мас./мас., 140 мл, 2,93 моль)

немедленно добавляли к интенсивно перемешиваемой двухфазной смеси. Реакционная смесь выделяла газ (кислород), исходное вещество растворилось и температура реакционной смеси возросла до 45°C. Через 30 мин завершение реакции было определено по результатам ЖХ/МС. Реакционную смесь охлаждали на ледяной бане и добавляли хлористоводородную кислоту (1 М) до понижения pH до 3 (было обнаружено, что данная стадия необходима во многих случаях, поскольку pH в конце реакции становился кислым; пожалуйста, проверьте pH до экстракции). Затем, реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (1 л) и органические фазы промывали солевым раствором (2×100 мл) и сушили над сульфатом магния. Органическую фазу фильтровали и избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 6 с количественным выходом в виде желтого твердого вещества. ЖХ/МС (3,93 мин (ES⁻) m/z (относительная интенсивность) 367,74 ([M - H]⁻, 100));

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,36 (с, 1H), 7,24 (с, 1H), 3,93 (с, 3H), 1,34-1,22 (м, 3H), 1,10 (м, 18H).

(с) ((2S,4R)-2-(((трет-Бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-гидроксипирролидин-1-ил)(5-метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)фенил)метанон (5).

DCC (29,2 г, 141 ммоль, 1,2 экв.) добавляли к раствору кислоты 3 (43,5 г, 117,8 ммоль, 1 экв.), и гидроксibenзотриазол гидрата (19,8 г, 129,6 ммоль, 1,1 экв.) в дихлорметане (200 мл) при 0°C. Холодную баню убирали и реакцию оставляли протекать в течение 30 мин при комнатной температуре, в ходе чего быстро добавляли раствор (2S,4R)-2-трет-бутилдиметилсилилоксиметил-4-гидроксипирролидина 4 (30 г, 129,6 ммоль, 1,1 экв.) и триэтиламина (24,66 мл, 176 ммоль, 1,5 экв.) в дихлорметане (100 мл) при -10 °C в атмосфере аргона (в большом масштабе, время добавления можно сократить путем дополнительного охлаждения реакционной смеси. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение от 40 мин до 1 ч и контролировали с помощью ЖХ/МС и ТСХ (EtOAc). Твердые вещества удаляли путем фильтрования над целитом и органическую фазу промывали холодной водной 0,1 М HCl до получения измеренного значения pH 4 или 5. Затем, органическую фазу промывали водой, с последующим промыванием насыщенным водным бикарбонатом натрия и солевым раствором. Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; градиент 40/60 этилацетат/гексан до 80/20 этилацетат/гексан). Избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением чистого продукта 13, (45,5 г чистого продукта 66%, и 17 г немного грязного продукта, 90% всего). ЖХ/МС 4,43 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 582,92 ([M + H]⁺, 100);

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,66 (с, 1H), 6,74 (с, 1H), 4,54 (с, 1H), 4,40 (с, 1H), 4,13 (с, 1H), 3,86 (с, 3H), 3,77 (д, J=9,2 Гц, 1H), 3,36 (дд, J=11,3, 4,5 Гц, 1H), 3,14-3,02 (м, 1H), 2,38-2,28 (м, 1H), 2,10 (дд, J=13,3, 8,4,2,2 Гц, 1H), 1,36-1,19 (м, 3H), 1,15-1,05 (м, 18H), 0,91 (с, 9H), 0,17-0,05 (м, 6H), (присутствие ротамеров).

(d) (S)-5-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-1-(5-метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)бензоил)пирролидин-3-он (6).

TCCA (8,82 г, 40 ммоль, 0,7 экв.) добавляли к перемешиваемому раствору 5 (31,7 г, 54 ммоль, 1 экв.) и TEMPO (0,85 г, 5,4 ммоль, 0,1 экв.) в сухом дихлорметане (250 мл) при 0°C. Реакционную смесь интенсивно перемешивали в течение 20 мин, после чего с помощью ТСХ (50/50 этилацетат/гексан) определили завершение расщепления исходного вещества. Реакционную смесь фильтровали через целит и фильтрат промывали водным насыщенным бикарбонатом натрия (100 мл), тиосульфатом натрия (9 г в 300 мл), солевым раствором (100 мл) и сушили над сульфатом магния. В результате ротационного выпаривания при пониженном давлении получали продукт 6 с количественным выходом. ЖХ/МС 4,52 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 581,08 ([M + H]⁺, 100);

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,78-7,60 (м, 1H), 6,85-6,62 (м, 1H), 4,94 (дд, J=30,8, 7,8 Гц, 1H), 4,50-4,16 (м, 1H), 3,99-3,82 (м, 3H), 3,80-3,34 (м, 3H), 2,92-2,17 (м, 2H), 1,40-1,18 (м, 3H), 1,11 (t, J=6,2 Гц, 18H), 0,97-0,75 (м, 9H), 0,15-(-0,06) (м, 6H), (присутствие ротамеров).

(e) (S)-5-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-1-(5-метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)бензоил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил трифторметасульфат (7).

Трифторметансульфоновый ангидрид (27,7 мл, 46,4 г, 165 ммоль, 3 экв.) вводили (с контролируемым температурой) в интенсивно перемешиваемую суспензию кетона 6 (31,9 г, 55 ммоль, 1 экв.) в сухом дихлорметане (900 мл) в присутствии 2,6-лутидина (25,6 мл, 23,5 г, 220 ммоль, 4 экв., высушенного с помощью сит) при -50°C (баня, содержащая смесь ацетон/сухой лед). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 1,5 ч, после чего в результате ЖХ/МС, с последующей мини обработкой (вода/дихлорметан), определяли завершение реакции. Воду добавляли к еще холодной реакционной смеси и органический слой разделяли и промывали насыщенным бикарбонатом натрия, солевым раствором и сульфатом магния. Органическую фазу фильтровали и избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 10/90 об./об. этилацетат/гексан), в результате удаления избытка элюента получали продукт 7 (37,6 г, 96%) ЖХ/МС, способ 2, 4,32 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность)

712,89 ($[M + H]^+$, 100);

1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,71 (с, 1H), 6,75 (с, 1H), 6,05 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 4,78 (дд, $J=9,8$, 5,5 Гц, 1H), 4,15-3,75 (м, 5H), 3,17 (ддд, $J=16,2$, 10,4, 2,3 Гц, 1H), 2,99 (ддд, $J=16,3$, 4,0, 1,6 Гц, 1H), 1,45-1,19 (м, 3H), 1,15-1,08 (м, 18H), 1,05 (м, 6H), 0,95-0,87 (м, 9H), 0,15-0,08 (м, 6H).

(f) (S)-(2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-ил)(5-метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)фенил)метанон (8).

Трифениларсин (1,71 г, 5,60 ммоль, 0,4 экв.) добавляли к смеси трифлата 7 (10,00 г, 14 ммоль, 1 экв.), метилбороновой кислоты (2,94 г, 49,1 ммоль, 3,5 экв.), оксида серебра (13 г, 56 ммоль, 4 экв.) и ортофосфата калия (17,8 г, 84 ммоль, 6 экв.) в сухом диоксане (80 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь продували аргоном 3 раза и добавляли бис-(бензонитрил)палладий(II) хлорид (540 мг, 1,40 ммоль, 0,1 экв.). Реакционную смесь продували аргоном еще 3 раза до немедленного нагревания до 110°C (нагревательный блок *dryrun* был заранее нагрет до 110°C установки добавления колбы). Через 10 мин реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через подложку из целита. Растворитель удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 10% этилацетатом/гексан). Чистые фракции собирали и объединяли, и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 8 (4,5 г, 55%). ЖХ/МС, 4,27 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 579,18 ($[M + H]^+$, 100);

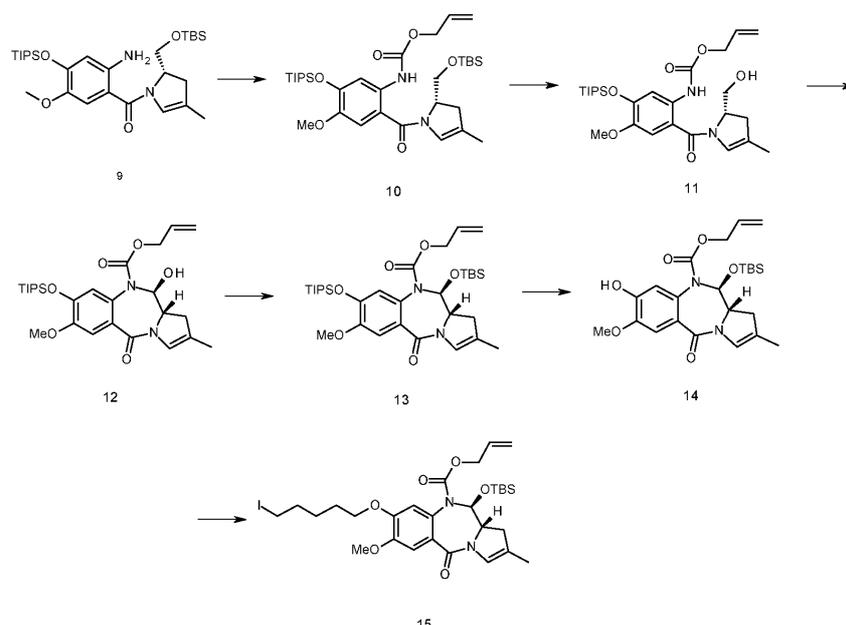
1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,70 (с, 1H), 6,77 (с, 1H), 5,51 (д, $J=1,7$ Гц, 1H), 4,77-4,59 (м, 1H), 3,89 (с, 3H), 2,92-2,65 (м, 1H), 2,55 (д, $J=14,8$ Гц, 1H), 1,62 (д, $J=1,1$ Гц, 3H), 1,40-1,18 (м, 3H), 1,11 (с, 9H), 1,10 (с, 9H), 0,90 (с, 9H), 0,11 (д, $J=2,3$ Гц, 6H).

(g) (S)-(2-амино-5-метокси-4-((триизопропилсилил)окси)фенил)(2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-ил)метанон (9).

Цинковую пыль (28 г, 430 ммоль, 37 экв.) добавляли к раствору соединения 8 (6,7 г, 11,58 ммоль) в 5% муравьиной кислоте этаноле об./об. (70 мл) при примерно 15°C. Полученную экзотерму контролировали с использованием ледяной бани с поддержанием температуры реакционной смеси ниже 30°C. Через 30 мин реакционную смесь фильтровали через подложку из целита. Фильтрат разбавляли этилацетатом и органическую фазу промывали водой, насыщенным водным бикарбонатом натрия и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 10% этилацетат в гексане). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 9 (5,1 г, 80%). ЖХ/МС, 4,23 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 550,21 ($[M + H]^+$, 100);

1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,28 (с, 1H), 6,67 (с, 1H), 6,19 (с, 1H), 4,64-4,53 (м, $J=4,1$ Гц, 1H), 4,17 (с, 1H), 3,87 (с, 1H), 3,77-3,69 (м, 1H), 3,66 (с, 3H), 2,71-2,60 (м, 1H), 2,53-2,43 (м, 1H), 2,04-1,97 (м, $J=11,9$ Гц, 1H), 1,62 (с, 3H), 1,26-1,13 (м, 3H), 1,08-0,99 (м, 18H), 0,82 (с, 9H), 0,03-(-0,03) (м, $J=6,2$ Гц, 6H).

(ii) (1S,11aS)-аллил-11-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-8-((5-йодпентил)окси)-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат



(a) (S)-аллил-(2-(2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-5-((триизопропилсилил)окси)фенил)карбамат (10).

Аллилхлорформиат (0,30 мл, 3,00 ммоль, 1,1 экв.) добавляли к раствору амина 9 (1,5 г, 2,73 ммоль) в присутствии сухого пиридина (0,48 мл, 6,00 ммоль, 2,2 экв.) в сухом дихлорметане (20 мл) при -78°C (баня, содержащая смесь ацетон/сухой лед). Через 30 мин баню убрали и реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и добавляли насыщенный водный сульфат меди. Затем органический слой последовательно промывали насыщенным водным бикарбонатом натрия и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 10, который непосредственно использовали на следующей стадии. ЖХ/МС, 4,45 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 632,91 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100).

(b) (S)-аллил-(2-(2-(гидроксиметил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-5-((триизопропилсилил)окси)фенил)карбамат (11).

Неочищенный 10 растворяли в смеси 7:1:1:2 уксусная кислота/метанол/тетрагидрофуран/вода (28:4:4:8 мл) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре. Через 3 ч, с помощью ЖХ/МС наблюдали полное исчезновение исходного вещества. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом и последовательно промывали водой (2×500 мл), насыщенным водным бикарбонатом натрия (200 мл) и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток этилацетата удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель, 25% этилацетат в гексане). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением требуемого продукта 11 (1 г, 71%). ЖХ/МС, 3,70 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 519,13 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 95);

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,34 (с, 1H), 7,69 (с, 1H), 6,78 (с, 1H), 6,15 (с, 1H), 5,95 (ддт, $J=17,2, 10,5, 5,7$ Гц, 1H), 5,33 (дк, $J=17,2, 1,5$ Гц, 1H), 5,23 (ддд, $J=10,4, 2,6, 1,3$ Гц, 1H), 4,73 (тт, $J=7,8, 4,8$ Гц, 1H), 4,63 (дт, $J=5,7, 1,4$ Гц, 2H), 4,54 (с, 1H), 3,89-3,70 (м, 5H), 2,87 (дд, $J=16,5, 10,5$ Гц, 1H), 2,19 (дд, $J=16,8, 4,6$ Гц, 1H), 1,70 (д, $J=1,3$ Гц, 3H), 1,38-1,23 (м, 3H), 1,12 (с, 10H), 1,10 (с, 8H).

(c) (11S,11aS)-аллил-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-8-((триизопропилсилил)окси)-11,11a-дигидро-1H-бензо[е]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (12).

Диметилсульфоксид (0,35 мл, 4,83 ммоль, 2,5 экв.) добавляли по каплям к раствору оксалилхлорида (0,2 мл, 2,32 ммоль, 1,2 экв.) в сухом дихлорметане (10 мл) при -78°C (баня, содержащая смесь сухой лед/ацетон) в атмосфере аргона. Через 10 мин медленно добавляли раствор 11 (1 г, 1,93 ммоль) в сухом дихлорметане (8 мл) при температуре, составляющей при -78°C . Через 15 мин добавляли по каплям триэтиламин (1,35 мл, высушенный через молекулярные сита 4\AA , 9,65 ммоль, 5 экв.) и баню сухой лед/ацетон убрали. Реакционную смесь оставляли до достижения комнатной температуры и экстрагировали холодной хлористоводородной кислотой (0,1 М), насыщенным водным бикарбонатом натрия и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток дихлорметана удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 12 (658 мг, 66%).

Крупномасштабный синтез.

Диметилсульфоксид (3,49 мл, 49,1 ммоль, 2,5 экв.) добавляли по каплям к раствору оксалилхлорида (2 мл, 23,5 ммоль, 1,2 экв.) в сухом дихлорметане (80 мл) при -78°C (баня сухой лед/ацетон) в атмосфере аргона. Через 15 мин медленно добавляли раствор 11 (10,2 г, 19,66 ммоль) в сухом дихлорметане (100 мл) при температуре, составляющей при -78°C . Через 20 мин добавляли по каплям триэтиламин (13,7 мл, высушенный через молекулярные сита 4\AA , 98,3 ммоль, 5 экв.) и баню сухой лед/ацетон убрали. Реакционную смесь оставляли до достижения комнатной температуры в течение 2 ч и экстрагировали холодной хлористоводородной кислотой (0,1 М, 400 мл), насыщенным водным бикарбонатом натрия (300 мл) и соевым раствором (400 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток дихлорметана удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 12 в неочищенном виде.

ЖХ/МС, 3,52 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 517,14 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100);

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,20 (с, 1H), 6,75-6,63 (м, $J=8,8, 4,0$ Гц, 2H), 5,89-5,64 (м, $J=9,6, 4,1$ Гц, 2H), 5,23-5,03 (м, 2H), 4,68-4,38 (м, 2H), 3,84 (с, 3H), 3,83-3,77 (м, 1H), 3,40 (с, 1H), 3,05-2,83 (м, 1H), 2,59 (д, $J=17,1$ Гц, 1H), 1,78 (д, $J=1,3$ Гц, 3H), 1,33-1,16 (м, 3H), 1,09 (д, $J=2,2$ Гц, 9H), 1,07 (д, $J=2,1$ Гц, 9H).

(d) (11S,11aS)-аллил-11-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-7-метокси-2-метил-5-оксо-8-((триизопропилсилил)окси)-11,11a-дигидро-1H-бензо[е]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (13).

трет-Бутилдиметилсилилтрифлат (0,70 мл, 3,00 ммоль, 3 экв.) добавляли к раствору соединения 12 (520 мг, 1,00 ммоль) и 2,6-лутидина (0,46 мл, 4,00 ммоль, 4 экв.) в сухом дихлорметане (40 мл) при 0°C в атмосфере аргона. Через 10 мин холодную баню убрали и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь экстрагировали водой, насыщенным водным бикарбонатом натрия и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; градиент, от 10% этилацетата в гек-

сане до 20% этилацетата в гексане). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 13 (540 мг, 85%).

Крупномасштабный синтез.

трет-Бутилдиметилсилилтрифлат (12,7 мл, 55,3 ммоль, 3 экв.) добавляли к раствору соединения 12 (9,40 г, 18,46 ммоль) и 2,6-лутидина (8,61 мл, 72,2 ммоль, 4 экв.) в сухом дихлорметане (180 мл) при 0°C в атмосфере аргона. Через 10 мин холодную баню убирали и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь экстрагировали лимонной кислотой (200 мл), насыщенным водным бикарбонатом натрия (200 мл) и соевым раствором (200 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной хроматографии (biotage 340 г с 34 г samplet). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 13 (7,00 г, 56% за 2 стадии).

ЖХ/МС, 4,42 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 653,14 ([M + Na]⁺, 100);

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,20 (с, 1H), 6,71-6,64 (м, J=5,5 Гц, 2H), 5,83 (д, J=9,0 Гц, 1H), 5,80-5,68 (м, J=5,9 Гц, 1H), 5,14-5,06 (м, 2H), 4,58 (дд, J=13,2, 5,2 Гц, 1H), 4,36 (дд, J=13,3, 5,5 Гц, 1H), 3,84 (с, 3H), 3,71 (тд, J=10,1, 3,8 Гц, 1H), 2,91 (дд, J=16,9, 10,3 Гц, 1H), 2,36 (д, J=16,8 Гц, 1H), 1,75 (с, 3H), 1,31-1,16 (м, 3H), 1,12-1,01 (м, J=7,4, 2,1 Гц, 18H), 0,89-0,81 (м, 9H), 0,25 (с, 3H), 0,19 (с, 3H).

(e) (11S,11aS)-аллил-11-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-8-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (14).

Ацетат лития (87 мг, 0,85 ммоль) добавляли к раствору соединения 13 (540 мг, 0,85 ммоль) во влажном диметилформамиде (6 мл, 50:1 ДМФА/вода). Через 4 ч реакция завершалась и реакционную смесь разбавляли этилацетатом (25 мл) и промывали водным раствором лимонной кислоты (pH ~ 3), водой и соевым раствором. Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток этилацетата удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; градиент, 25% до 75% этилацетат в гексане). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 14 (400 мг, количественный).

Крупномасштабный синтез.

Ацетат лития (1,13 г, 11,09 ммоль) добавляли к раствору соединения 13 (7 г, 11,09 ммоль) во влажном диметилформамиде (80 мл, 50:1 ДМФА/вода). Через 4 ч реакция завершалась и реакционную смесь концентрировали с удалением большей части ДМФА. Реакционную смесь затем разбавляли этилацетатом (200 мл) и промывали водным раствором лимонной кислоты (pH ~ 3, 0,1 М, 100 мл), водой (200 мл) и соевым раствором (100 мл). Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток этилацетата удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 14 в неочищенном виде.

ЖХ/МС, (3,33 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 475,26 ([M+H]⁺, 100).

(f) (11S,11aS)-аллил-11-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-8-((5-йодпентил)окси)-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (15).

Дийодпентан (0,63 мл, 4,21 ммоль, 5 экв.) и карбонат калия (116 мг, 0,84 ммоль, 1 экв.) добавляли к раствору фенола 14 (400 мг, 0,84 ммоль) в ацетоне (4 мл, сушили над молекулярными ситами). Затем реакционную смесь нагревали до 60°C и перемешивали в течение 6 ч. Ацетон удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 50/50, об./об., гексан/этилацетатом). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с получением 15 с выходом 90%.

Крупномасштабный синтез.

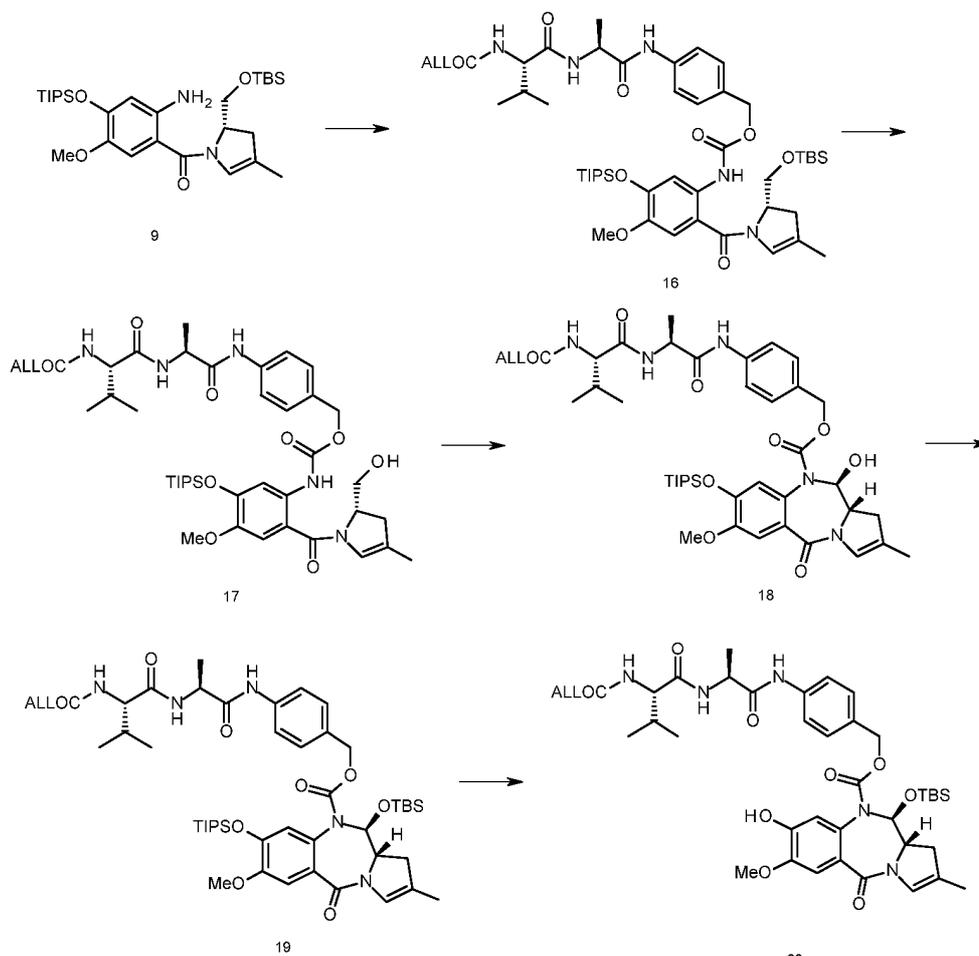
Дийодпентан (8,26 мл, 55,46 ммоль, 5 экв.) и карбонат калия (1,5 г, 11,09 ммоль, 1 экв.) добавляли к раствору фенола 14 (5,26 г, 11,09 ммоль) в 2-бутаноне (50 мл, высушенный над молекулярными ситами). Затем реакционную смесь нагревали до 70°C и перемешивали в течение 5 ч. 2-бутанон удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток растворяли в этилацетате (250 мл) и промывали водой (250 мл) и соевым раствором (250 мл). Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток этилацетата удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (Biotage 750 г с 80 г силикагеля для сухой загрузки). Чистые фракции собирали и объединяли и избыточный элюент удаляли с получением 15 (5,75 г, 77% за 2 стадии).

ЖХ/МС, 3,90 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 670,91 ([M]⁺, 100).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,23 (с, 1H), 6,69 (с, 1H), 6,60 (с, 1H), 5,87 (д, J=8,8 Гц, 1H), 5,83-5,68 (м, J=5,6 Гц, 1H), 5,15-5,01 (м, 2H), 4,67-4,58 (м, 1H), 4,45-4,35 (м, 1H), 4,04-3,93 (м, 2H), 3,91 (с, 3H), 3,73 (тд, J=10,0, 3,8 Гц, 1H), 3,25-3,14 (м, J=8,5, 7,0 Гц, 2H), 2,92 (дд, J=16,8, 10,3 Гц, 1H), 2,38 (д, J=16,8 Гц, 1H), 1,95-1,81 (м, 4H), 1,77 (с, 3H), 1,64-1,49 (м, 2H), 0,88 (с, 9H), 0,25 (с, 3H), 0,23 (с, 3H).

(iii) (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-аллилокси)-4-метил-1,2-диоксипентан-3-ил)амино)-1-оксопропан-2-

ил)гидразинил)бензил-11-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-8-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-10(5Н)-карбоксилат (20)



(а) Аллил-3-(2-(2-(4-(((2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-5-((триизопропилсилил)окси)фенил)карбамоил)окси)-метил)фенил)гидразинил)пропанамидо)-4-метил-2-оксопентаноат (16).

Триэтиламин (2,23 мл, 18,04 ммоль, 2,2 экв.) добавляли к перемешиваемому раствору амина 9 (4 г, 8,20 ммоль) и трифосгена (778 мг, 2,95 ммоль, 0,36 экв.) в сухом тетрагидрофуране (40 мл) при 5°C (ледяная баня). Ход изоцианатной реакции контролировали путем периодического отбора аликвот из реакционной смеси и гашения метанолом и проведения анализа ЖХ/МС. После завершения образования изоцианата раствор alloc-Val-Ala-PAВОН (4,12 г, 12,30 ммоль, 1,5 экв.) и триэтиламина (1,52 мл, 12,30 ммоль, 1,5 экв.) в сухом тетрагидрофуране (40 мл) быстро добавляли во свежеприготовленный изоцианат. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 40°C в течение 4 ч. Избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергли колоночной флэш-хроматографии (силикагель; градиент, 1% метанола до 5% метанола в дихлорметане). (Альтернативные условия хроматографии с использованием EtOAc и гексана также были успешны). Чистые фракции собирали и объединяли и избыточный элюент удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 16 (3,9 г, 50%). ЖХ/МС, 4,23 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 952,36 ([M + H]⁺, 100);

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,62 (ш. с, 1H), 8,46 (с, 1H), 7,77 (ш с, 1H), 7,53 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,32 (д, J=8,5 Гц, 2H), 6,76 (с, 1H), 6,57 (д, J=7,6 Гц, 1H), 6,17 (с, 1H), 6,03-5,83 (м, 1H), 5,26 (дд, J=33,8, 13,5 Гц, 3H), 5,10 (с, 2H), 4,70-4,60 (м, 2H), 4,58 (дд, J=5,7, 1,3 Гц, 2H), 4,06-3,99 (м, 1H), 3,92 (с, 1H), 3,82-3,71 (м, 1H), 3,75 (с, 3H), 2,79-2,64 (м, 1H), 2,54 (д, J=12,9 Гц, 1H), 2,16 (дкв, J=13,5, 6,7 Гц, 1H), 1,67 (с, 3H), 1,46 (д, J=7,0 Гц, 3H), 1,35-1,24 (м, 3H), 1,12 (с, 9H), 1,10 (с, 9H), 0,97 (д, J=6,8 Гц, 3H), 0,94 (д, J=6,8 Гц, 3H), 0,87 (с, 9H), 0,07-(-0,02) (м, 6H).

(б) Аллил-3-(2-(2-(4-(((2-((S)-2-(гидроксиметил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-5-((триизопропилсилил)окси)фенил)карбамоил)окси)метил)фенил)гидразинил)пропанамидо)-4-метил-2-оксопентаноат (17).

Эфир TBS 16 (1,32 г, 1,38 ммоль) растворяли в смеси 7:1:1:2 уксусная кислота/метанол/тетрагидрофуран/вода (14:2:2:4 мл) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре. Через 3 ч не наблюдали наличие исходного вещества по ЖХ/МС. Реакционную смесь разбавляли этил-

ацетатом (25 мл) и последовательно промывали водой, насыщенным водным бикарбонатом натрия и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток этилацетата удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель, 2% метанол в дихлорметане). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением требуемого продукта 17 (920 мг, 80%). ЖХ/МС, 3,60 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 838,18 ([M+H]⁺, 100).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,55 (с, 1H), 8,35 (с, 1H), 7,68 (с, 1H), 7,52 (д, J=8,1 Гц, 2H), 7,31 (д, J=8,4 Гц, 2H), 6,77 (с, 1H), 6,71 (д, J=7,5 Гц, 1H), 6,13 (с, 1H), 5,97-5,82 (м, J=5,7 Гц, 1H), 5,41-5,15 (м, 3H), 5,10 (д, J=3,5 Гц, 2H), 4,76-4,42 (м, 5H), 4,03 (т, J=6,6 Гц, 1H), 3,77 (с, 5H), 2,84 (дд, J=16,7, 10,4 Гц, 1H), 2,26-2,08 (м, 2H), 1,68 (с, 3H), 1,44 (д, J=7,0 Гц, 3H), 1,30 (дт, J=14,7, 7,4 Гц, 3H), 1,12 (с, 9H), 1,10 (с, 9H), 0,96 (д, J=6,8 Гц, 3H), 0,93 (д, J=6,8 Гц, 3H).

(с) (1S,11aS)-4-(2-(1-((1-аллилокси)-4-метил-1,2-диоксипентан-3-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)гидразинил)бензил-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-8-((триизопропилсилил)окси)-11,11а-дигидро-1H-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (18).

Диметилсульфоксид (0,2 мл, 2,75 ммоль, 2,5 экв.) добавляли по каплям к раствору оксалилхлорида (0,11 мл, 1,32 ммоль, 1,2 экв.) в сухом дихлорметане (7 мл) при -78°C (баня, содержащая смесь сухой лед/ацетон) в атмосфере аргона. Через 10 мин раствор 17 (920 мг, 1,10 ммоль) в сухом дихлорметане (5 мл) медленно добавляли при температуре, составляющей при -78°C. Через 15 мин добавляли по каплям триэтиламин (0,77 мл, высушенный через молекулярные сита 4Å, 5,50 ммоль, 5 экв.) и баню сухой лед/ацетон убрали. Реакционную смесь оставляли до достижения комнатной температуры и экстрагировали холодной хлористоводородной кислотой (0,1 М), насыщенным водным бикарбонатом натрия и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток дихлорметана удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; градиент 2% метанол до 5% метанол в дихлорметане). Чистые фракции собирали и объединяли и в результате удаления избытка элюента с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении получали продукт 18 (550 мг, 60%).

Крупномасштабный синтез.

Диметилсульфоксид (3,25 мл, 45,71 ммоль, 2,5 экв.) добавляли по каплям (7 мин) к раствору оксалилхлорида (1,86 мл, 21,94 ммоль, 1,2 экв.) в сухом дихлорметане (120 мл) при -78°C (баня, содержащая смесь сухой лед/ацетон) в атмосфере аргона. Через 15 мин медленно добавляли раствор 17 (15,34 г, 18,28 ммоль) в сухом дихлорметане (80 мл) (20 мин) все еще при температуре -78°C. Через 15 мин добавляли по каплям триэтиламин (12,7 мл, высушенный через молекулярные сита 4Å, 91,40 ммоль, 5 экв.) (6 мин) и баню сухой лед/ацетон убрали. Реакционную смесь оставляли до достижения комнатной температуры (2 ч) и экстрагировали холодной хлористоводородной кислотой (0,1 М, 500 мл), насыщенным водным бикарбонатом натрия (400 мл) и соевым раствором (400 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток дихлорметана удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (Biotage 340 г, samplet 34 г). Чистые фракции собирали и объединяли и в результате удаления избытка элюента с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении получали продукт 18 (12,8 г, 84%) и извлекали исходное вещество (1,57 г, 10,2% извлечение).

Дополнительный крупномасштабный синтез.

К раствору оксалилхлорида (0,77 л, 9,2 ммоль) в дихлорметане (49,5 мл) в атмосфере азота при -78°C добавляли по каплям диметилсульфоксид (1,41 мл, 20,0 ммоль) при поддержании температуры < -65°C, и указанную смесь оставляли перемешиваться при от -65 до -78°C в течение 10-15 мин. Раствор 17 (6,5 г, 7,8 ммоль) в дихлорметане (35,3 мл) добавляли при поддержании температуры реакционной смеси при от -65 до -78°C, и указанную смесь оставляли перемешиваться при от -65 до -78°C в течение 15-20 мин. Добавляли по каплям триэтиламин (5,4 мл) при поддержании температуры реакционной смеси при от -68 до -78°C. Затем реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали до реакционную смесь до завершения реакции, которое определлось с помощью ВЭЖХ. Органические вещества промывали 1н HCl (35,3 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (35,3 мл) и соевым раствором (35,3 мл). Объединенные органические вещества сушили над сульфатом магния (2,15 г; 17,9 ммоль), фильтровали, и фильтрационный остаток промывали дихлорметаном (35,3 мл). Затем фильтрат концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 23°C. Остаток очищали с помощью хроматографии Biotage (Si, 40 + m, 2 объема колонки в каждой фракции, 10 фракций 2% метанола в дихлорметане и 5 фракций 5% метанола в дихлорметане). Положительные фракции объединяли и концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C, с получением 18 липкого твердого вещества (5,0 г, 77%, 90% AUC).

ЖХ/МС, 3,43 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 836,01 ([M]⁺, 100).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,39 (с, 1H), 7,52-7,40 (м, 2H), 7,21-7,08 (м, J=11,5 Гц, 2H), 6,67 (с, 1H), 6,60-6,47 (м, J=7,4 Гц, 1H), 5,97-5,83 (м, 1H), 5,79-5,66 (м, 1H), 5,38-4,90 (м, 6H), 4,68-4,52 (м, J=18,4, 5,5

Гц, 4Н), 4,04-3,94 (м, J=6,5 Гц, 1Н), 3,87-3,76 (м, 5Н), 3,00-2,88 (м, 1Н), 2,66-2,49 (м, 2Н), 2,21-2,08 (м, 2Н), 1,76 (с, 3Н), 1,45 (д, J=7,0 Гц, 3Н), 1,09- 0,98 (м, J=8,9 Гц, 18Н), 0,96 (д, J=6,7 Гц, 3Н), 0,93 (д, J=6,9 Гц, 3Н).

(d) (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(Аллилокси)-4-метил-1,2-диоксипентан-3-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)гидразинил)бензил-11-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-7-метокси-2-метил-5-оксо-8-((тризопропилсилил)окси)-11,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazецин-10(5Н)-карбоксилат (19).

трет-Бутилдиметилсилилтрифлат (0,38 мл, 1,62 ммоль, 3 экв.) добавляли к раствору соединения 18 (450 мг, 0,54 ммоль) и 2,6-лутидина (0,25 мл, 2,16 ммоль, 4 экв.) в сухом дихлорметане (5 мл) при 0°C в атмосфере аргона. Через 10 мин холодную баню убирали и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь экстрагировали водой, насыщенным водным бикарбонатом натрия и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 50/50 об./об. гексан/этилацетат). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 19 (334 мг, 65%).

Крупномасштабный синтез.

трет-Бутилдиметилсилилтрифлат (10,5 мл, 45,91 ммоль, 3 экв.) добавляли к раствору соединения 18 (12,8 г, 15,30 ммоль) и 2,6-лутидина (7,12 мл, 61,21 ммоль, 4 экв.) в сухом дихлорметане (140 мл) при 0°C в атмосфере аргона. Через 10 мин, холодную баню убирали и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь промывали лимонной кислотой (0,1 М, 200 мл), насыщенным водным бикарбонатом натрия (200 мл) и соевым раствором (200 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 19 в неочищенном виде.

Дополнительный синтез.

К раствору 18 (5,0 г, 6,0 ммоль) в дихлорметане (55,6 мл) в атмосфере азота при 0-5°C добавляли 2,6-лутидина (2,8 мл, 23,9 ммоль) с последующим добавлением по каплям трет-бутилдиметилсилилтрифторметасульфата (4,94 мл, 21,5 ммоль) при поддержании температуры 0-5°C, и указанную смесь оставляли перемешиваться при 0-5°C в течение 15-30 мин. Затем реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч до завершения реакции, которое определялось с помощью ВЭЖХ. Органические вещества промывали водой (55,6 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (55,6 мл), и соевым раствором (55,6 мл). Объединенные органические вещества сушили над сульфатом магния (0,89 г; 7,4 ммоль), фильтровали и фильтрационный остаток промывали дихлорметаном (55,6 мл). Затем фильтрат концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C. Остаток очищали с помощью хроматографии Biotage (Si, 40 + m, 2 объема колонки в каждой фракции, 15 фракций 50% EtOAc в гептане. Положительные фракции объединяли и концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C, с получением 19 липкого твердого вещества (3,1 г, 54%, 93% AUC).

ЖХ/МС, 4,18 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 950,50 ([M]⁺, 100).

¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,53 (с, 1Н), 8,02 (с, 1Н), 7,44 (д, J=7,6 Гц, 2Н), 7,21 (с, 1Н), 7,08 (д, J=8,2 Гц, 2Н), 6,72-6,61 (м, J=8,9 Гц, 2Н), 6,16 (с, 1Н), 5,97-5,79 (м, J=24,4, 7,5 Гц, 2Н), 5,41-5,08 (м, 5Н), 4,86 (д, J=12,5 Гц, 1Н), 4,69-4,60 (м, 1Н), 4,57 (с, 1Н), 4,03 (т, J=6,7 Гц, 1Н), 3,87 (с, 3Н), 3,74 (тд, J=9,6, 3,6 Гц, 1Н), 2,43-2,09 (м, J=34,8, 19,4, 11,7 Гц, 3Н), 1,76 (с, 3Н), 1,43 (д, J=6,9 Гц, 3Н), 1,30-1,21 (м, 3Н), 0,97 (д, J=6,7 Гц, 3Н), 0,92 (т, J=8,4 Гц, 3Н), 0,84 (с, 9Н), 0,23 (с, 3Н), 0,12 (с, 3Н).

(e) (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-(Аллилокси)-4-метил-1,2-диоксипентан-3-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)гидразинил)бензил-11-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-8-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]diazецин-10(5Н)-карбоксилат (20).

Ацетат лития (50 мг, 0,49 ммоль) добавляли к раствору соединения 19 (470 мг, 0,49 ммоль) во влажном диметилформамиде (4 мл, 50:1 ДМФА/вода). Через 4 ч реакция завершалась и реакционную смесь разбавляли этилацетатом и промывали лимонной кислотой (pH ~ 3), водой и соевым раствором. Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток этилацетата удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; градиент, от 50/50 до 25/75 об./об. гексан/этилацетат). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 20 (400 мг, количественный).

Крупномасштабный синтез.

Ацетат лития (1,56 г, 15,31 ммоль) добавляли к раствору соединения 19 (15,31 ммоль) во влажном диметилформамиде (120 мл, 50:1 ДМФА/вода). Через 5 ч реакция завершалась и реакционную смесь концентрировали до содержания примерно 20 мл ДМФА. Затем реакционную смесь разбавляли этилацетатом (200 мл) и промывали лимонной кислотой (0,1 М, 200 мл), соевым раствором (200 мл). Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток этилацетата удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-

хроматографии (Biotage 750 г, 80 г силикагеля для загрузки). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 20 (7,7 г, 63% за 2 стадии).

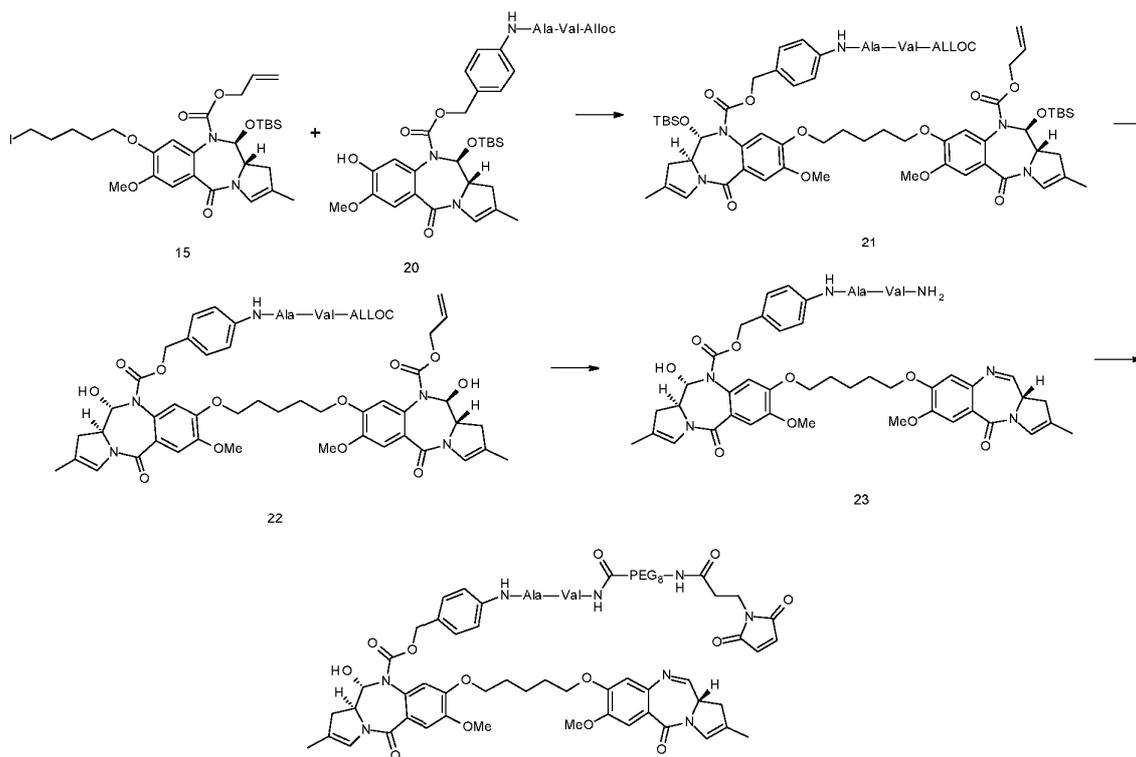
Дополнительный синтез.

К раствору 19 (3,1 г, 3,3 ммоль) в ДМФА (26,4 мл) и воды (0,53 мл) в атмосфере азота при 20-25°C добавляли ацетат лития (0,33 г, 5,0 ммоль), и указанную смесь оставляли перемешиваться до завершения реакции, которое определяли с помощью ВЭЖХ (10 ч). Добавляли этилацетат (33,0 мл) и водную лимонную кислоту (33,0 мл pH 3), и слои разделяли. Органические вещества промывали водой (33,0 мл) и соевым раствором (33,0 мл). Объединенные органические вещества сушили над сульфатом магния (1,69 г; 14,0 ммоль), фильтровали и фильтрационный остаток промывали этилацетатом (33,0 мл). Затем фильтрат концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C. Остаток очищали с помощью хроматографии Biotage (Si, 45 г, 3-4 объема колонки в каждой фракции, продукт с минимальным количеством дихлорметана, 3 фракции 50% этилацетата в гептане с последующим 75% этилацетатом в гептане до отсутствия видимого элюирования продукта из колонки. Положительные фракции объединяли и концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C, с получением 20 липкого твердого вещества (1,9 г, 73%, 94% AUC).

ЖХ/МС, 3,32 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 794,18 ($[M+H]^+$, 100).

1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8,53 (с, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,44 (д, $J=7,6$ Гц, 2H), 7,21 (с, 1H), 7,08 (д, $J=8,2$ Гц, 2H), 6,72-6,61 (м, $J=8,9$ Гц, 2H), 6,16 (с, 1H), 5,97-5,79 (м, $J=24,4, 7,5$ Гц, 2H), 5,41-5,08 (м, 5H), 4,86 (д, $J=12,5$ Гц, 1H), 4,69-4,60 (м, 1H), 4,57 (с, 1H), 4,03 (т, $J=6,7$ Гц, 1H), 3,87 (с, 3H), 3,74 (тд, $J=9,6, 3,6$ Гц, 1H), 2,43-2,09 (м, $J=34,8, 19,4, 11,7$ Гц, 3H), 1,76 (с, 3H), 1,43 (д, $J=6,9$ Гц, 3H), 1,30-1,21 (м, 3H), 0,97 (д, $J=6,7$ Гц, 3H), 0,92 (т, $J=8,4$ Гц, 3H), 0,84 (с, 9H), 0,23 (с, 3H), 0,12 (с, 3H).

(iv) (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаоксо-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-(((S)-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пентил)окси)-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (24)



(a) (11S)-аллил-8-((5-(((11S)-10-(((4-(2-(1-((1-аллилокси)-4-метил-1,2-диоксипентан-3-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)гидразинил)бензил)окси)карбонил)-11-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пентил)окси)-11-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (21).

Карбонат калия (70 мг, 0,504 ммоль, 1 экв.) добавляли к раствору 15 (370 мг, 0,552 ммоль, 1,2 экв.) и фенола 20 (400 мг, 0,504 ммоль) в сухом ацетоне (25 мл). Реакционную смесь перемешивали 8 ч при 70°C. ЖХ/МС показала, что не все исходное вещество было израсходовано, поэтому реакционную смесь

оставляли перемешиваться в течение ночи при комнатной температуре и перемешивали дополнительно в течение 2 ч на следующий день. Ацетон удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 80% этилацетата в гексане до 100% этилацетата). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 21 (385 мг, 57%).

Крупномасштабный синтез.

Карбонат калия (790 мг, 5,71 ммоль, 1 экв.) добавляли к раствору 15 (5,75 г, 8,57 ммоль, 1,5 экв.) и фенол 20 (4,54 г, 5,71 ммоль) в сухом 2-бутаноне (90 мл). Реакционную смесь перемешивали 40 ч при 75°C. Реакционную смесь фильтровали и промывали этилацетатом (90 мл). Растворитель удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (biotage 750 г). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 21 (6,1 г, 80%). Исходное вещество 15 также извлекали.

Дополнительный синтез.

К раствору 15 (1,8 г, 2,3 ммоль) и 20 (2,27 г, 3,5 ммоль) в ацетоне (144,0 мл) в атмосфере азота при 20-25°C добавляли карбонат калия (0,31 г, 2,3 ммоль), и указанную смесь нагревали до кипения и оставляли перемешиваться до завершения реакции, которое определялось с помощью ВЭЖХ (43 ч). После охлаждения до комнатной температуры указанную смесь фильтровали и фильтрационный остаток промывали ацетоном (36,0 мл). Затем фильтрат концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C. Остаток очищали с помощью хроматографии Biotage (2x, 1-й неочищенный продукт с последующими смешанными фракциями, 45 г Si, 2 объема колонки в каждой фракции, 8 фракций 80% EtOAc в гептане с последующими 5 фракциями этилацетата. Чистые фракции объединяли и концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C, с получением 21 липкого твердого вещества (3,0 г, 99%, 87% AUC).

ЖХ/МС, 4,07 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 1336,55 ([M+H]⁺, 50).

(b) (11S)-аллил-8-((5-(((11S)-10-(((4-(2-(1-(1-(аллилокси)-4-метил-1,2-диоксипентан-3-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)гидразинил)бензил)окси)карбонил)-1-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,10,11,11а-тетрагидро-1Н-бензо[е]пирропо[1,2-а][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пентил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-10(5Н)-карбоксилат (22) Фторид тетра-н-бутиламмония (1 М, 0,34 мл, 0,34 ммоль, 2 экв.) добавляли к раствору 21 (230 мг, 0,172 ммоль) в сухом тетрагидрофуране (3 мл). Исходное вещество полностью расходовалось через 10 мин. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (30 мл) и последовательно промывали водой и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния фильтровали и избыток этилацетата удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток 22 использовали в виде неочищенной смеси в следующей реакции.

Крупномасштабный синтез.

Буферный раствор фторид тетра-н-бутиламмония (1 М, 18,2 мл, 18,2 ммоль, 4 экв.) и уксусной кислоты (1,04 мл, 18,2 ммоль, 4 экв.) добавляли к раствору 21 (6,07 г, 4,54 ммоль, 1 экв.) в сухом тетрагидрофуране (40 мл). Исходное вещество полностью расходовалось через 24 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (140 мл) и последовательно промывали водой (100 мл), водным гидрокарбонатом натрия (100 мл) и соевым раствором (100 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом магния (12 г), фильтровали и избыток этилацетата удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (Biotage system, колонка: SNAP 340 г, загрузка: 34 г samplet, скорость потока: 100 мл/мин, метанол/этилацетат, равновесие 100% Этилацетат (6 CV), градиент от 0 до 8% в 14 CV). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением продукта 22 (3,16 г, 63%).

Дополнительный синтез.

К раствору 21 (1,50 г, 1,12 ммоль) в тетрагидрофуране (11,5 мл) в атмосфере азота при 20-25°C добавляли смесь TBAF (1М в ТГФ; 4,5 мл) и уксусной кислоты (0,51 мл), и указанную смесь оставляли перемешиваться до завершения реакции, которое определялось с помощью ВЭЖХ (89 h). Замечание: осуществляли две дополнительные загрузки смеси TBAF (1М в ТГФ; 2,5 мл) и уксусной кислоты (0,25 мл) на 42 и 60 ч. Добавляли этилацетат (34,6 мл). Органические вещества промывали водой (11,5 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (11,5 мл) и соевым раствором (11,5 мл). Объединенные органические вещества сушили над сульфатом магния (1,15 г; 9,6 ммоль), фильтровали и фильтрационный остаток промывали этилацетатом (5,8 мл). Затем фильтрат концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C. Остаток очищали с помощью хроматографии Biotage (Si, 2-3 объема колонки в каждой фракции, продукт с минимальным количеством дихлорметана, и элюировали 1% MeOH в EtOAc до отсутствия наблюдаемого элюирования продукта из колонки. Положительные фракции объединяли и концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C, с получением 22 липкого твердого вещества (1,17 г, 94%, 90% AUC).

ЖХ/МС, 2,87 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 1108,11 ($[M+H]^+$, 100).

(с) (11S)-4-(2-(1-((1-амино-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)гидразинил)-бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-((5-((7-метокси-2-метил-5-оксо-5,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пентил)окси)-2-метил-5-оксо-11,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-10(5Н)-карбоксилат (23).

тетраakis-(Трифенилфосфин)палладий(0) (12 мг, 0,01 ммоль, 0,06 экв.) добавляли к раствору неочищенного 22 (0,172 ммоль) и пирролидина (36 мкл, 0,43 ммоль, 2,5 экв.) в сухом дихлорметане (10 мл). Реакционную смесь перемешивали 20 мин и разбавляли дихлорметаном и последовательно промывали насыщенным водным хлоридом аммония и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток дихлорметана удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток 23 использовали в виде неочищенной смеси в следующей реакции.

Крупномасштабный синтез.

тетраakis-(Трифенилфосфин)палладий(0) (166 мг, 0,143 ммоль, 0,05 экв.) добавляли к раствору 22 (3,16 г, 2,85 ммоль) и пирролидина (0,59 мл, 7,18 ммоль, 2,5 экв.) в сухом дихлорметане (150 мл). Реакционную смесь продували аргоном три раза и перемешивали 27 минут при комнатной температуре. Затем реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (90 мл) и последовательно промывали насыщенным водным хлоридом аммония (95 мл) и соевым раствором (90 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом магния (5,4 г), фильтровали и избыток дихлорметана удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный неочищенный остаток 23 (4,1 г) растворяли в дихлорметане (310 мл) и добавляли смолу DeloXan, поглощающую металлы (16,7 г), и реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин. Указанную смесь фильтровали и избыток дихлорметана удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток 23 использовали в виде неочищенной смеси в следующей реакции.

Дополнительный синтез.

К раствору 22 (1,15 г, 1,04 ммоль) и пирролидина (0,21 мл, 2,5 ммоль) в дихлорметане (65,8 мл) в атмосфере азота при 20-25°C добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0) (0,072 г; 0,06 ммоль) и указанную смесь оставляли перемешиваться до завершения реакции, которое определялось с помощью ТСХ (< 1 ч). Дихлорметан (32,9 мл) загружали в реактор. Органические вещества промывали насыщенным хлоридом аммония (32,9 мл) и соевым раствором (32,9 мл). Объединенные органические вещества сушили над сульфатом магния (1,31 г; 10,9 ммоль), фильтровали и фильтрационный остаток промывали дихлорметаном (13,2 мл). Затем фильтрат концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C, с получением 23 липкого твердого вещества, которое непосредственно использовали на следующей стадии.

ЖХ/МС, 2,38 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 922,16 ($[M+H]^+$, 40).

(d) (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаоксо-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-((5-(((S)-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пентил)окси)-2-метил-5-оксо-11,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-10(5Н)-карбоксилат (24).

1-Этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид (EDCI, 33 мг, 0,172 ммоль) добавляли к раствору неочищенного 23 (0,172 ммоль) и $MaI-(PEG)_8$ -кислоты (100 мг, 0,172 ммоль) в сухом дихлорметане (10 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч и присутствие исходного вещества более не наблюдали посредством ЖХ/МС. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и последовательно промывали водой и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток дихлорметана удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; от 100% хлороформа до 10% метанол в хлороформе). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением 24.

(В) (60 мг, 25% за 3 стадии).

Крупномасштабный синтез.

1-Этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид (EDCI, 550 мг, 2,85 ммоль) добавляли к раствору неочищенного 23 (2,85 ммоль) и $MaI-(PEG)_8$ -кислоты (1,69 г, 2,85 ммоль) в сухом дихлорметане (120 мл). Реакционную смесь дегазировали три раза аргоном и перемешивали в течение 3 ч и присутствие исходного вещества все еще наблюдали посредством ЖХ/МС (72% конверсия). Добавляли дополнительное количество EDCI (150 мг) и $MaI-(PEG)_8$ -кислоты (475 мг) и реакционную смесь перемешивали в течение 13 ч. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (80 мл) и последовательно промывали водой (142 мл) и соевым раствором (80 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом магния (10 г), фильтровали и избыток дихлорметана удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (Biotage system, колонка: SNAP 340 г, загрузка: растворенный в 20 мл дихлорметана и введенный в хроматограф, скорость потока: 100 мл/мин, Метанол/Хлороформ, равновесие 2% (6 CV), градиент от 2% до 20% в 10 CV). Чистые фракции собирали

и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением 24 (B) (2,75 г, 64% за 2 стадии, 96% чистота). Однако количество одной примеси составляло более 2%, поэтому в результате проведения другой колоночной хроматографии получили 24 (B) (1,75 г, 41% за 2 стадии, 98% чистота).

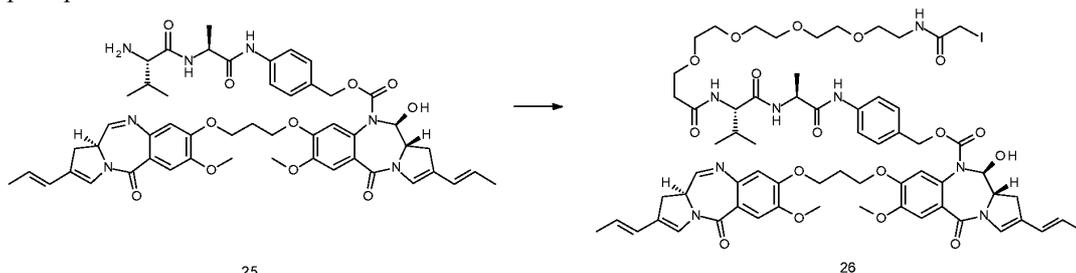
Дополнительный синтез.

К суспензии 23 (1,04 ммоль), Mal-(PEG)₈ кислоты (0,616 г; 1,04 ммоль; ChemPer; Lot 282808) и дихлорметан (65,9 мл) в атмосфере азота при 20-25°C добавляли EDCI (0,199 г; 1,04 ммоль; Sigma Aldrich) и указанную смесь оставляли перемешиваться до завершения реакции, которое определялось с помощью ВЭЖХ (16 ч). Дихлорметан (26,3 мл) загружали в реактор. Органические вещества промывали водой (51,7 мл) и солевым раствором (26,3 мл). Объединенные органические вещества сушили над сульфатом магния (1,32 г; 10,9 ммоль), фильтровали и фильтрационный остаток промывали дихлорметаном (13,2 мл). Затем фильтрат концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C. Остаток очищали с помощью хроматографии Biotage (Si, 40 + m, 2 объема колонки в каждой фракции, продукт с минимальным количеством дихлорметана (Sigma Aldrich), и элюировали 6-30% MeOH (Sigma Aldrich) в дихлорметане (Sigma Aldrich). Фракции 1-15: 6% MeOH в ДХМ. Фракции 16-19: 7,5% MeOH в ДХМ. Фракции 20-23: 10% MeOH в ДХМ. Картирование фракций использовали для определения фракций для объединения.

Объединенные фракции концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C. Метанол (10,0 мл) использовали для растворения остатка, который пропускали через 0,2 мк фильтр, который промывали дополнительным количеством метанола (10,0 мл). Объединенные фильтраты концентрировали досуха при температуре бани, не превышающей 22°C, с получением 24 (B) липкого твердого вещества (0,60 г, 39%, 91% AUC).

ЖХ/МС, способ 2, 2,65 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 1496,78 ([M+H]⁺, 20). [α]_D²⁴ = +262° (c=0,056, CHCl₃).

Пример 2.



Соединение 25 представляет собой соединение 79 из WO 2011/130598.

(11S)-4-(1-йод-20-изопропил-23-метил-2,18,21-триоксо-6,9,12,15-тетраокса-3,19,22-триазатетракозанамидо)бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-((7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-ен-1-ил)-5,11а-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2-((E)-проп-1-ен-1-ил)-11,11а-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (26).

N,N'-диизопропилкарбодимид (DIC, 4,71 мкл, 0,0304 ммоль) добавляли к раствору амина 25 (0,0276 ммоль) и йод-(PEG)₄-кислоты (13,1 мг, 0,0304 ммоль) в сухом дихлорметане (0,8 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч и присутствие исходного вещества более не наблюдали посредством ЖХ/МС. Реакционную смесь непосредственно загружали на пластинку для тонкослойной хроматографии (ТСХ) и очищали с помощью преп-ТСХ (10% метанол в хлороформе). Чистые полосы соскребали с пластины ТСХ, разбавляли в 10% метаноле в хлороформе, фильтровали и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением 26 (A) (20,9 мг, 56%). ЖХ/МС, способ 2, 3,08 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 1361,16 ([M+H]⁺, 100).

Общие экспериментальные методики для примера 3.

Данные ЖХМС получали с использованием серий ЖХ/МС Agilent 1200 с квадрупольной масс-спектрометрией Agilent 6110, с ионизацией электроспреем.

Подвижная фаза А-0,1% уксусной кислоты в воде. Подвижная фаза В -0,1% в ацетонитриле. Скорость потока 1,00 мл/мин. Градиент от 5% В повышают до 95% В в течение 3 мин, сохраняют на уровне 95% В в течение 1 мин и затем возвращают до 5% В в течение 6 с. Общее время хроматографирования составляет 5 мин. Колонка: Phenomenex Gemini-NX 3 мкм C18, 30×2,00 мм. Хроматограммы основаны на УФ обнаружении при 254 нм. Масс-спектры получали с использованием МС в положительном режиме. Значения химического сдвига протонного ЯМР измеряли по шкале дельта при 400 МГц с использованием Bruker AV400, Использовали следующие сокращения: s, синглет; d, дуплет; t, триплет; q, квартет; m, мультиплет; br, широкий. Константы взаимодействия представлены в Гц. Если не указано иное, колоночную хроматографию (посредством флеш процедуры) проводили на Merck Kieselgel silica (Art. 9385). Данные по масс-спектрологии (МС) получали с использованием инструмента Waters Micromass LCT, связанного с модулем разделения Waters 2795 ВЭЖХ. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили

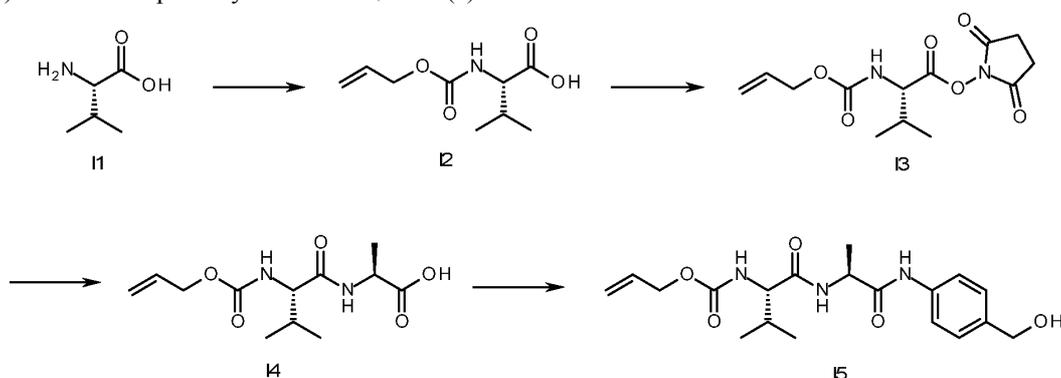
на алюминиевых пластинах с силикагелем (Merck 60, F254). Все остальные химические реактивы и растворители приобретали в Sigma-Aldrich или Fisher Scientific и их применяли в поставляемом виде без дополнительной очистки.

Оптическое вращение измеряли на поляриметре ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.), концентрации (с) представлены в виде г/100 мл. Температуру плавления измеряли при помощи цифрового измерителя температуры плавления (Electrothermal). ИК-спектры записывали на ИК спектрометре Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT. Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР получали при 300 К на ЯМР спектрометре Bruker Advance при 400 и 100 МГц соответственно. Химические сдвиги представлены относительно TMS ($\delta=0,0$ ppm), сигналы обозначены как с (синглет), д (дублет), т (триплет), дт (двойной триплет), дд (дублет дублетов), ддд (двойной дублет дублетов) или м (мультиплет), константы спин-спинового взаимодействия даны в герцах (Гц). Данные масс-спектрометрического анализа (МС) получали на оборудовании Waters Micromass ZQ, соединенного с ВЭЖХ хроматографом Waters 2695 и детектором Waters 2996 PDA. Использовались следующие параметры системы Waters Micromass ZQ: капилляр (кВ), 3,38; конус (В), 35; экстрактор (В), 3,0; температура источника ($^{\circ}\text{C}$), 100; температура десольватации ($^{\circ}\text{C}$), 200; скорость потока подвижной фазы (л/ч), 50; расход десольватированного потока (л/ч), 250. Масс-спектрометрию высокого разрешения (HRMS) проводили в системе Waters Micromass QTOF Global в положительном W-режиме с использованием наконечников из борсиликатного стекла с металлическим покрытием для введения образцов в прибор. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на алюминиевых пластинах с силикагелем (Merck 60, F254), а для флэш-хроматографии использовали силикагель (Merck 60, 230-400 меш ASTM). За исключением HOBt (NovaBiochem) и реагентов на твердой подложке (Argonaut) все остальные химические реактивы и растворители приобретали в Sigma-Aldrich, и их применяли в поставляемом виде без дополнительной очистки. Безводные растворители получали путем перегонки в атмосфере сухого азота в присутствии соответствующего осушителя и хранили над молекулярными ситами 4\AA или над натриевой проволокой. Петролейный эфир относится к фракции, кипящей при $40\text{-}60^{\circ}\text{C}$.

Общие условия ЖХ/МС: ВЭЖХ (Waters Alliance 2695) проводили с применением подвижных фаз: воды (А) (муравьиная кислота 0,1%) и ацетонитрила (В) (муравьиная кислота 0,1%). Градиент: начальный состав-5% В, через 1,0 мин, затем 5% В до 95% В, в течение 3 мин. Состав подвижной фазы сохраняли в течение 0,5 мин на уровне 95% В, а затем возвращали к уровню 5% В за 0,3 мин. Общее время градиентного анализа составляет 5 мин. Скорость потока: 3,0 мл/мин, 400 мкл вводили при помощи тройника с нулевым мертвым объемом в масс-спектрометр. Диапазон длин волн детектирования: 220-400 нм. Режим: диодная матрица (535 сканов). Колонка: Phenomenex® Onyx Monolithic C18 $50\times 4,60$ мм

Пример 3.

(i) Основные промежуточные вещества (а)



(a-i) (S)-2-(аллилоксикарбониламино)-3-метилбутановая кислота (12).

Аллилхлорформат (36,2 мл, 340,59 ммоль, 1,2 экв.) добавляли по каплям к перемешиваемому раствору L-валина (11) (33,25 г, 283,82 ммоль, 1,0 экв.) и карбоната калия (59,27 г, 425,74 ммоль, 1,5 экв.) в воде (650 мл) и ТГФ (650 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч, затем растворитель концентрировали при пониженном давлении и оставшийся раствор экстрагировали диэтиловым эфиром (3×100 мл). Водную часть подкисляли до pH 2 с помощью конц. HCl и экстрагировали ДХМ (3×100 мл). Объединенные органические вещества промывали соевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением продукта в виде бесцветного масла (57,1 г, предположительно 100% выходом). ЖХ/МС (1,966 мин (ES^+)), m/z: 202,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 12,57 (ш. с, 1H), 7,43 (д, 1H, $J=8,6$ Гц), 5,96-5,86 (м, 1H), 5,30 (дд, 1H, $J=17,2, 3,4, 1,7$ Гц), 5,18 (дд, 1H, $J=10,4, 2,9, 1,6$ Гц), 4,48 (дт, 2H, $J=5,3, 1,5$ Гц), 3,85 (дд, 1H, $J=8,6, 6,0$ Гц), 2,03 (октет, 1H, $J=6,6$ Гц), 0,89 (д, 3H, $J=6,4$ Гц), 0,87 (д, 3H, $J=6,5$ Гц).

(a-ii) (S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил-2-(аллилоксикарбониламино)-3-метилбутаноат (13).

К перемешиваемому раствору защищенной кислоты 12 (60,6 г, 301,16 ммоль, 1,0 экв.) и N-гидроксисукцинимид (34,66 г, 301,16 ммоль, 1,0 экв.) в сухом ТГФ (800 мл) добавляли дициклогексил-

карбодимид (62,14 г, 301,16 ммоль, 1 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 18 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь фильтровали, твердое вещество промывали ТГФ и объединенный фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток повторно растворяли в ДХМ и оставляли отстаиваться при 0°C в течение 30 мин. Суспензию фильтровали и промывали холодным ДХМ. В результате концентрирования фильтрата при пониженном давлении получали продукт в виде вязкого бесцветного масла (84,7 г, предположительным 100% выходом), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ/МС (2,194 мин (ES⁺)), m/z: 321,0 [M+Na]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,0 (д, 1H, J=8,3 Гц), 5,97-5,87 (м, 1H), 5,30 (ддд, 1H, J=17,2, 3,0, 1,7 Гц), 5,19 (ддд, 1H, J=10,4,2,7, 1,4 Гц), 4,52 (дт, 2H, J=5,3, 1,4 Гц), 4,32 (дд, 1H, J=8,3, 6,6 Гц), 2,81 (м, 4H), 2,18 (октет, 1H, J=6,7 Гц), 1,00 (д, 6H, J=6,8 Гц),

(a-iii) (S)-2-((S)-2-(аллилоксикарбониламино)-3-метилбутанамидо)пропановая кислота (14).

Раствор сложного эфира сукцинимиды 13 (12,99 г, 43,55 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (50 мл) добавляли к раствору L-аланина (4,07 г, 45,73 ммоль, 1,05 экв.) и NaHCO₃ (4,02 г, 47,90 ммоль, 1,1 экв.) в ТГФ (100 мл) и H₂O (100 мл). Указанную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 72 ч, после чего ТГФ удаляли при пониженном давлении. рН доводили до 3-4 лимонной кислотой до выпадения белой смолы в осадок. После экстракции этилацетатом (6×150 мл), объединенные органические вещества промывали H₂O (200 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. В результате растирания с диэтиловым эфиром получали продукт в виде белого порошка, который собирали путем фильтрования и промывали диэтиловым эфиром (5,78 г, 49%).

ЖХ/МС (1,925 мин (ES⁺)), m/z: 273,1 [M+H]⁺.

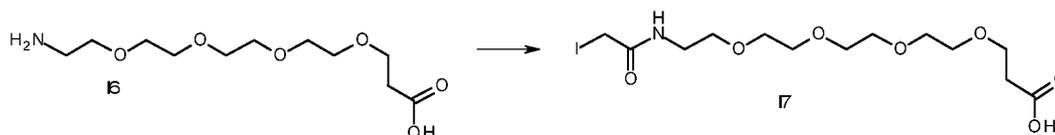
¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 12,47 (уш. с, 1H), 8,17 (д, 1H, J=6,8 Гц), 7,16 (д, 1H, J=9,0 Гц), 5,95-5,85 (м, 1H), 5,29 (дд, 1H, J=17,2, 1,7 Гц), 5,17 (дд, 1H, J=10,4, 1,5 Гц), 4,46 (м, 2H), 4,18 (квintет, 1H, J=7,2 Гц), 3,87 (дд, 1H, J=9,0, 7,1 Гц), 1,95 (октет, 1H, J=6,8 Гц), 1,26 (д, 3H, J=7,3 Гц), 0,88 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,83 (д, 3H, J=6,8 Гц).

(a-iv) Аллил-(S)-1-((S)-1-(4-(гидроксиметил)фениламино)-1-оксoproпан-2-иламино)-3-метил-1-оксobутан-2-илкарбамат (15).

EEDQ (5,51 г, 22,29 ммоль, 1,05 экв.) добавляли к раствору п-аминобензилового спирта (2,74 г, 22,29 ммоль, 1,05 экв.) и кислоты 14 (5,78 г, 21,23 ммоль, 1 экв.) в сухом ТГФ (100 мл), и перемешивали при комнатной температуре в течение 72 ч. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и полученное коричневое твердое вещество растирали с диэтиловым эфиром и фильтровали путем последовательного промывания избытком диэтилового эфира с получением продукта беловатого твердого вещества (7,1 г, 88%). ЖХ/МС (1,980 мин (ES⁺)), m/z: 378,0 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,89 (ш. с, 1H), 8,13 (д, 1H, J=7,0 Гц), 7,52 (д, 2H, J=8,5 Гц), 7,26 (м, 1H), 7,23 (д, 2H, J=8,5 Гц), 5,91 (м, 1H), 5,30 (м, 1H), 5,17 (м, 1H), 4,46 (м, 2H), 5,09 (т, 1H, J=5,6 Гц), 4,48 (м, 2H), 4,42 (м, 3H), 3,89 (дд, 1H, J=8,6, 6,8 Гц), 1,97 (м, 1H), 1,30 (д, 3H, J=7,1 Гц), 0,88 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,83 (д, 3H, J=6,7 Гц).

(b)

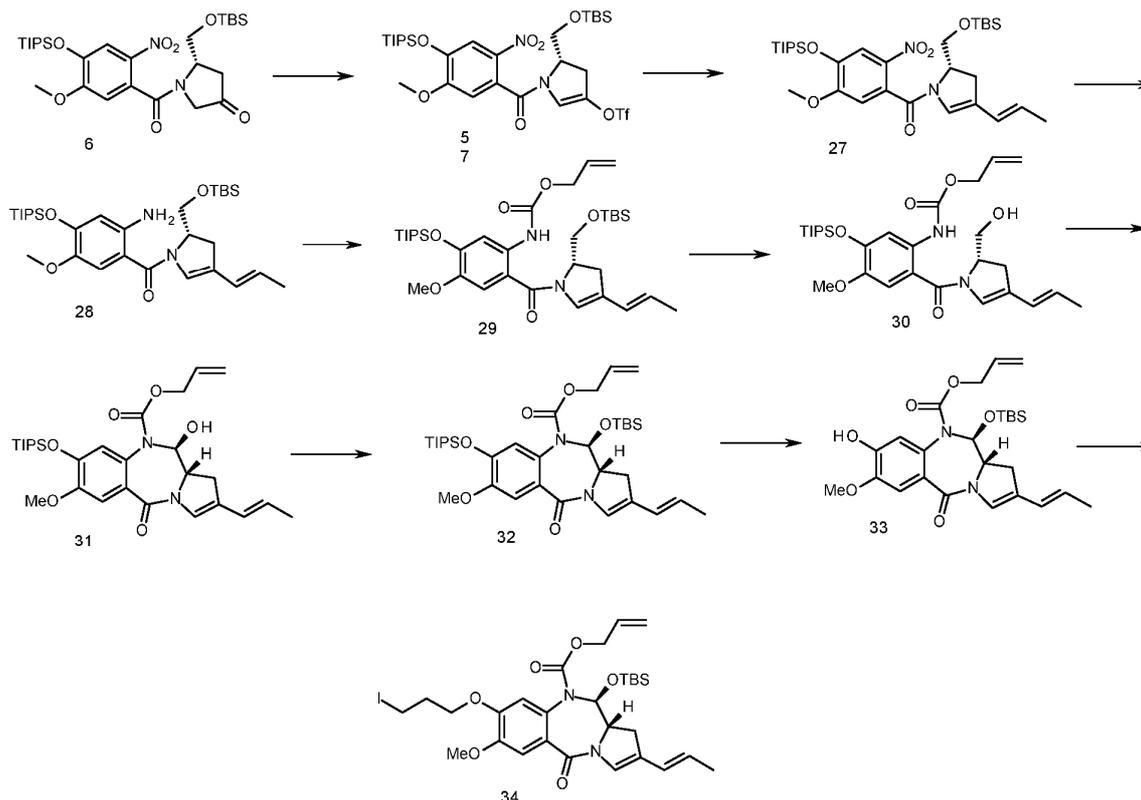


1-йод-2-оксо-6,9,12,15-тетраокса-3-азаоктадекан-18-овая кислота (17).

Раствор йодуксусного ангидрида (0,250 г, 0,706 ммоль, 1,1 экв.) в сухом ДХМ (1 мл) добавляли к амино-PEG₍₄₎-кислоте 16 (0,170 г, 0,642 ммоль, 1,0 экв.) в ДХМ (1 мл). Указанную смесь перемешивали в темноте при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь промывали 0,1 М HCl, водой, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 3% MeOH и 0,1% муравьиной кислоты в хлороформе до 10% MeOH и 0,1% муравьиной кислоты в хлороформе) с получением продукта в виде оранжевого масла (0,118 г, 42%). ЖХ/МС (1,623 мин (ES⁺)), m/z: 433,98 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,069 (с, 1H), 7,22 (ш. с, 1H), 3,79 (т, 2H, J=5,8 Гц), 3,74 (с, 2H), 3,72-3,58 (м, 14H), 3,50-3,46 (м, 2H), 2,62 (т, 2H, J=5,8 Гц).

(ii) (11S,11aS)-аллил-11-(трет-бутилдиметилсилилокси)-8-(3-йодпропокси)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (34)



(a) (S)-5-((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)-1-(5-метокси-2-нитро-4-(триизопропилсилилокси)-бензоил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-ил трифторметансульфонат (7).

Трифторметансульфовый ангидрид (28,4 г, 100,0 ммоль, 3,0 экв.) добавляли по каплям за 25 мин к интенсивно перемешиваемому раствору кетона 6 (19,5 г, 30,0 ммоль, 1,0 экв.) в ДХМ (550 мл), содержащего 2,6-лутидина (14,4 г, 130,0 ммоль, 4,0 экв.), при -50°C . Реакционную смесь перемешивали в течение 1,5 ч, после чего ЖХ/МС показала завершение реакции. Органическую фазу последовательно промывали водой (100 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (150 мл), соевым раствором (50 мл), и органическую фазу сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 90/10 об./об. н-гексан/ EtOAc) с получением продукта в виде светло-желтого масла (19,5 г, 82%). ЖХ/МС (4,391 мин (ES^+)), m/z : 713,25 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,68 (с, 1H), 6,72 (с, 1H), 6,02 (т, 1H, $J=1,9$ Гц), 4,75 (м, 1H), 4,05 (м, 2H), 3,87 (с, 3H), 3,15 (ддд, 1H, $J=16,2, 10,3, 2,3$ Гц), 2,96 (ддд, 1H, $J=16,2, 4,0, 1,6$ Гц), 1,28-1,21 (м, 3H), 1,07 (д, 18H, $J=7,2$ Гц), 0,88 (с, 9H), 0,09 (с, 3H), 0,08 (с, 3H).

(b) (S,E)-2-((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)-4-(проп-1-енил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-ил(5-метокси-2-нитро-4-(триизопропилсилилокси)фенил)метанон (27).

тетракис-(Трифенилфосфин)палладий(0) (0,41 г, 0,35 ммоль, 0,03 экв.) добавляли к смеси трифлата 7 (8,4 г, 11,8 ммоль, 1,0 экв.), Е-1-пропен-1-илбороновой кислоты (1,42 г, 16,5 ммоль, 1,4 экв.) и фосфата калия (5,0 г, 23,6 ммоль, 2,0 экв.) в сухом диоксане (60 мл) в атмосфере азота. Указанную смесь перемешивали при 25°C в течение 120 мин, после чего ЖХ/МС показала завершение реакции. Добавляли этилацетат (120 мл) и воду (120 мл), органическую фазу удаляли, промывали соевым раствором (20 мл), сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 95/5 об./об. н-гексан/ EtOAc до 90/10 об./об. н-гексан/ EtOAc) с получением продукта в виде желтой пены (4,96 г, 70%). ЖХ/МС (4,477 мин (ES^+)), m/z : 605,0 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,67 (с, 1H), 6,74 (с, 1H), 5,93 (д, 1H, $J=15,4$ Гц), 5,67 (с, 1H), 4,65 (м, 1H), 4,04 (м, 2H), 3,86 (с, 3H), 2,85 (м, 1H), 2,71 (м, 1H), 1,72 (дд, 3H, $J=6,8, 1,0$ Гц), 1,30-1,22 (м, 3H), 1,07 (д, 18H, $J=7,2$ Гц), 0,87 (с, 9H), 0,08 (с, 3H), 0,07 (с, 3H).

(c) (S,E)-2-(2-амино-5-метокси-4-(триизопропилсилилокси)фенил)-2-((трет-бутилдиметилсилилокси)-метил)-4-(проп-1-енил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-ил)метанон (28).

Цинковую пыль (22,0 г, 0,33 моль, 37 экв.) добавляли порциями за 20 мин к раствору пропенилового промежуточного соединения 27 (5,5 г, 9,1 ммоль, 1,0 экв.) в 5% об./об. муравьиной кислоте/этаноле (55 мл), с использованием ледяной бани с поддержанием температуры между $25-30^{\circ}\text{C}$. Через 30 мин реакционную смесь фильтровали через тонкую подложку из целита®. Целит® промывали этилацетатом (65 мл) и объединенные органические вещества последовательно промывали водой (35 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (35 мл) и соевым раствором (10 мл). Органическую фазу сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-

хроматографии (силикагель, 90/10 об./об. н-гексан/EtOAc) с получением продукта в виде светло-желтого масла (3,6 г, 69,0%). ЖХ/МС (4,439 мин (ES⁺)), m/z: 575,2 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 6,75 (m, 1H), 6,40 (ш. с, 1H), 6,28 (m, 1H), 6,11 (д, 1H, J=15,4 Гц), 5,53 (m, 1H), 4,67 (m, 1H), 4,36 (m, 2H), 3,93 (ш. с, 1H), 3,84 (ш. с, 1H), 3,73 (с, 3H), 2,86 (дд, 1H, J=15,7, 10,4 Гц), 2,73 (дд, 1H, J=15,9, 4,5 Гц), 1,80 (дд, 3H, J=6,8, 1,3 Гц), 1,35-1,23 (m, 3H), 1,12 (д, 18H, J=7,3 Гц), 0,89 (с, 9H), 0,08 (с, 3H), 0,07 (с, 3H).

(d) (S,E)-аллил-2-(2-((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)-4-(проп-1-енил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-5-(триизопропилсилилокси) фенилкарбамат (29).

Аллилхлорформат (0,83 г, 6,88 ммоль, 1,1 экв.) добавляли к раствору амина 28 (3,6 г, 6,26 ммоль, 1,0 экв.) в сухом ДХМ (80 мл), содержащего сухой пиридин (1,09 г, 13,77 ммоль, 2,2 экв.), при -78°C. Сухой лед удаляли и реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры. После перемешивания в течение дополнительных 15 мин ЖХ/МС показала завершение реакции. Органическую фазу последовательно промывали 0,01 N HCl (50 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (50 мл), соевым раствором (10 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением светло-желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки (4,12 г, предположительный выход 100%). ЖХ/МС (4,862 мин (ES⁺)), m/z: 659,2 [M+H]⁺.

(e) (S,E)-аллил-2-(2-(гидроксиметил)-4-(проп-1-енил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-5-(триизопропилсилилокси)фенилкарбамат (30).

Неочищенное промежуточное соединение 29 (предположительный 100% выход, 4,12 г, 6,25 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в смеси уксусной кислоты (70 мл), метанола (10 мл), ТГФ (10 мл) и воды (20 мл) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре. Через 6 ч реакционную смесь разбавляли этилацетатом (500 мл) и последовательно промывали водой (2×500 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (300 мл) и соевым раствором (50 мл). Органическую фазу сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 1/99 об./об. метанол/ДХМ до 5/95 об./об. метанол/ДХМ) с получением продукта в виде желтого масла и дополнительно извлекали 1 г непрореагировавшего исходного вещества. Указанное вещество подвергали таким же условиям реакции, как описано выше, но оставляли перемешиваться в течение 16 ч. После обработки и очистки дополнительный продукт выделяли (2,7 г, 79%, 2 стадии) ЖХ/МС (3,742 мин (ES⁺)), m/z: 545,2 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,38 (m, 1H), 7,72 (m, 1H), 6,81 (с, 1H), 6,37 (m, 1H), 6,10 (д, 1H, J=15,8 Гц), 5,97 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,36 (дд, 1H, J=17,2, 3,1, 1,5 Гц), 5,25 (дд, 1H, J=10,4, 2,5, 1,3 Гц), 4,78 (m, 1H), 4,65 (дт, 2H, J=5,7, 1,3 Гц), 3,84 (m, 3H), 3,79 (с, 3H), 3,04 (дд, 1H, J=16,7, 10,5 Гц), 2,40 (дд, 1H, J=16,0, 4,5 Гц), 1,82 (дд, 3H, J=6,8, 1,0 Гц), 1,36-1,26 (m, 3H), 1,14 (д, 18H, J=7,3 Гц).

(f) (11S,11aS)-аллил-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-8-(триизопропилсилилокси)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (31).

Сухой диметилсульфоксид (1,16 г, 14,87 ммоль, 3,0 экв.) добавляли по каплям к раствору оксалилхлорида (0,94 г, 7,43 ммоль, 1,5 экв.) в ДХМ (25 мл) при -78°C в атмосфере азота. При поддержании температуры при -78°C через 10 мин добавляли по каплям раствор первичного спирта 30 (2,7 г, 4,96 ммоль, 1,0 экв.) в ДХМ (20 мл). Через дополнительные 15 мин добавляли сухой триэтиламин (2,5 г, 24,78 ммоль, 5,0 экв.) и реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры. Реакционную смесь последовательно промывали холодной 0,1N HCl (50 мл), насыщенным гидрокарбонатом натрия (50 мл) и соевым раствором (10 мл) и органический слой сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением продукта в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки (2,68 г, предположительный 100% выход). ЖХ/МС (3,548 мин (ES⁺)), m/z: 543,2 [M+H]⁺.

(g) (11S,11aS)-аллил-11-(трет-бутилдиметилсилилокси)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-8-(триизопропилсилилокси)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (32).

трет-Бутилдиметилсилитрифторметан сульфонат (3,93 г, 14,87 ммоль, 3,0 экв.) добавляли к раствору карбиноламина 31 (предположительный 100% выход, 2,68 г, 4,96 ммоль, 1,0 экв.) и 2,6-лутидина (2,12 г, 19,83 ммоль, 4,0 экв.) в сухом ДХМ (40 мл) при 0°C в атмосфере азота. Через 10 мин реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение дополнительных 60 мин. Органическую фазу последовательно промывали водой (10 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (10 мл) и соевым раствором (5 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, хлороформ до 2/98 об./об. Метанол/хлороформ) с получением продукта в виде желтого масла (2,0 г, 63%, 2 стадии). ЖХ/МС (4,748 мин (ES⁺)), m/z: 657,2 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,19 (с, 1H), 6,86 (m, 1H), 6,66 (с, 1H), 6,22 (д, 1H, J=15,4 Гц), 5,81 (д, 1H, J=8,8 Гц), 5,78 (m, 1H), 5,48 (m, 1H), 5,11 (д, 1H, J=5,0 Гц), 5,08 (m, 1H), 4,58 (дд, 1H, J=13,4, 5,4 Гц), 4,35 (дд, 1H, J=13,2, 5,7 Гц), 3,83 (с, 3H), 3,76 (с, 1H), 3,00 (дд, 1H, J=15,6, 11,0 Гц), 2,53 (m, 1H), 1,81 (дд, 3H, J=6,8, 0,9 Гц), 1,30-1,18 (m, 3H), 1,08 (д, 9H, J=2,3 Гц), 1,06 (д, 9H, J=2,3 Гц), 0,86 (с, 9H), 0,25 (с, 3H),

0,18 (с, 3H).

(h) (11S,11aS)-аллил-11-(трет-бутилдиметилсилилокси)-8-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (33).

Дигидрат ацетата лития (0,31 г, 3,04 ммоль, 1,0 экв.) добавляли к раствору diaзепина 32 (2,0 г, 3,04 ммоль, 1,0 экв.) во влажном ДМФА (20 мл) при 25°C и перемешивали в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (200 мл) и последовательно промывали 0,1 М лимонной кислотой (50 мл, pH 3), водой (50 мл) и соевым раствором (10 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 50/50 об./об. н-гексан/EtOAc до 25/75 об./об. н-гексан/EtOAc) с получением продукта в виде светло-желтого твердого вещества (0,68 г, 45%). ЖХ/МС (3,352 мин (ES⁺)), m/z: 501,1 [M+H]⁺.

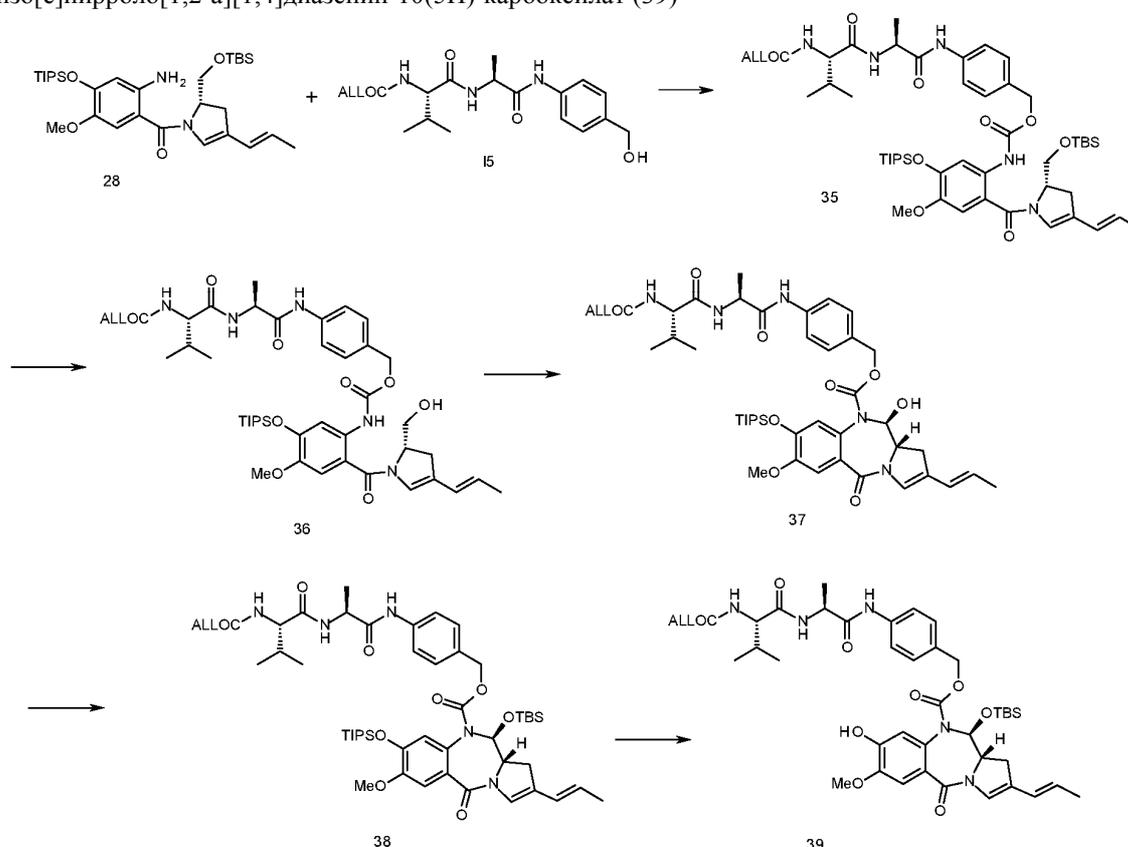
¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,02 (с, 1H), 6,66 (м, 1H), 6,53 (с, 1H), 6,03 (д, 1H, J=15,5 Гц), 5,80 (с, 1H), 5,63 (д, 1H, J=8,9 Гц), 5,55 (м, 1H), 5,29 (м, 1H), 4,87 (м, 2H), 4,39 (дд, 1H, J=13,5, 4,2 Гц), 4,20 (дд, 1H, J=13,2, 5,7 Гц), 3,73 (с, 3H), 3,59 (м, 1H), 2,81 (дд, 1H, J=16,1, 10,5 Гц), 2,35 (д, 1H, J=15,7 Гц), 1,61 (д, 3H, J=6,4 Гц), 0,67 (с, 9H), 0,05 (с, 3H), 0,00 (с, 3H).

(i) (11S,11aS)-аллил-11-(трет-бутилдиметилсилилокси)-8-(3-йодпропокси)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (34).

Дийодпропан (0,295 г, 1,00 ммоль, 5,0 экв.) и карбонат калия (0,028 г, 0,20 ммоль, 1,0 экв.) добавляли к раствору фенола 33 (0,100 г, 0,020 ммоль, 1,0 экв.) в сухом ацетоне (5 мл). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 6 ч, после чего ЖХ/МС показала завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали досуха при пониженном давлении и остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 75/25 об./об. н-гексан/EtOAc до 50/50 об./об. н-гексан/EtOAc) с получением продукта в виде бесцветного масла (0,074 г, 56%). ЖХ/МС (3,853 мин (ES⁺)), m/z: 669,0 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,26 (с, 1H), 6,90 (с, 1H), 6,68 (с, 1H), 6,24 (д, 1H, J=15,3 Гц), 5,87 (д, 1H, J=8,9 Гц), 5,78 (м, 1H), 5,53 (м, 1H), 5,12 (м, 2H), 4,65 (м, 2H), 4,41 (м, 1H), 4,11 (м, 1H), 3,93 (с, 3H), 3,81 (м, 1H), 3,40 (т, 2H, J=6,7 Гц), 3,05 (дд, 1H, J=16,3, 10,1 Гц), 2,57 (м, 1H), 2,34 (м, 2H), 1,84 (д, 3H, J=6,6 Гц), 0,92 (с, 9H), 0,28 (с, 3H), 0,26 (с, 3H).

(iii) (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(аллилкарбониламино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-11-(трет-бутилдиметилсилилокси)-8-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (39)



(a) Аллил-((S)-1-(((S)-1-(((4-(((2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-((E)-проп-1-ен-1-ил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-5-((триизопропилсилил)окси)фенил)карбамоил)-окси)метил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат (35).

Триэтиламин (0,256 мл, 1,84 ммоль, 2,2 экв.) добавляли к перемешиваемому раствору амина 28 (0,480 г, 0,835 ммоль, 1,0 экв.) и трифосгена (0,089 г, 0,301 ммоль, 0,36 экв.) в сухом ТГФ (15 мл) при 5°C

(ледяная баня). Ход изоцианатной реакции контролировали путем периодического отбора аликвот из реакционной смеси, и гашения метанолом и проведения ЖХМС анализа. После завершения изоцианатной реакции раствор Alloc-Val-Ala-PAВОН I5 (0,473 г, 1,25 ммоль, 1,5 экв.) и триэтиламина (0,174 мл, 1,25 ммоль, 1,5 экв.) в сухом ТГФ (10 мл) быстро добавляли путем введения в свежеполученный изоцианат. Реакцию оставляли перемешиваться при 40°C в течение 4 ч с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение ночи. Указанную смесь концентрировали при пониженном давлении и очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 20/80 об./об. н-гексан/ЕtОAc до 50/50 об./об. н-гексан/ЕtОAc, затем 1/99 об./об. ДХМ/МеОН до 5/95 об./об. ДХМ/МеОН) с получением продукта в виде желтого твердого вещества (0,579 г, 71%). ЖХ/МС (4,468 мин (ES⁺)), m/z: 978,55 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,63 (ш. с, 1H), 8,42 (с, 1H), 7,78 (ш. с, 1H), 7,53 (д, 2H, J=8,1 Гц), 7,31 (д, 2H, J=8,6 Гц), 6,76 (с, 1H), 6,59 (д, 1H, J=7,6 Гц), 6,36 (ш. с, 1H), 6,04 (д, 1H, J=15,9 Гц), 5,90 (м, 1H), 5,55 (м, 1H), 5,33-5,21 (м, 3H), 5,10 (с, 2H), 4,66 (м, 2H), 4,57 (дд, 2H, J=5,6, 1,0 Гц), 3,98 (дд, 1H, J=7,3, 6,8 Гц), 3,90 (м, 1H), 3,81 (м, 1H), 3,78 (с, 3H), 2,82 (дд, 1H, J=15,4, 9,6 Гц), 2,72 (дд, 1H, J=15,9, 3,5 Гц), 2,17 (м, 1H), 1,78 (дд, 3H, J=6,5, 0,8 Гц), 1,46 (д, 3H, J=7,1 Гц), 1,29 (м, 3H), 1,11 (д, 18H, J=7,1 Гц), 0,97 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,92 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,83 (с, 9H), 0,04 (с, 3H), 0,01 (с, 3H).

(b) Аллил-((S)-1-(((S)-1-((4-(((S)-2-(гидроксиметил)-4-((E)-проп-1-ен-1-ил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-5-((триизопропилсилилокси)фенил)карбамоил)-окси)метил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат (36).

Силиловый эфир 35 (1,49 г, 1,52 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в смеси 7:1:1:2 уксусная кислота/метанол/тетрагидрофуран/вода (14:2:2:4 мл) и оставляли перемешиваться при комнатной температуре. Через 2 ч реакционную смесь разбавляли EtOAc (100 мл), последовательно промывали водой, вод. бикарбонатом натрия, затем соевым раствором. Затем органическую фазу сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 100/0 затем 99/1 до 92/8 об./об. ДХМ/МеОН) с получением продукта в виде оранжевого твердого вещества (1,2 г, 92%). ЖХ/МС (3,649 мин (ES⁺)), m/z: 865,44 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,44 (с, 1H), 8,35 (с, 1H), 7,69 (ш. с, 1H), 7,53 (д, 2H, J=8,7 Гц), 7,32 (д, 2H, J=8,3 Гц), 6,78 (с, 1H), 6,56 (м, 2H), 6,32 (ш. с, 1H), 6,05 (д, 1H, J=14,9 Гц), 5,90 (м, 1H), 5,56 (м, 1H), 5,30 (м, 2H), 5,22 (м, 1H), 5,10 (д, 2H, J=3,1 Гц), 4,73 (м, 1H), 4,64 (м, 1H), 4,57 (д, 2H, J=5,8 Гц), 4,01 (м, 1H), 3,79 (м, 2H), 3,76 (с, 3H), 2,98 (дд, 1H, J=16,3, 10,2 Гц), 2,38 (дд, 1H, J=16,6, 4,1 Гц), 2,16 (м, 1H), 1,78 (дд, 3H, J=6,8, 0,9 Гц), 1,46 (д, 3H, J=7,1 Гц), 1,29 (м, 3H), 1,11 (д, 18H, J=7,4 Гц), 0,97 (д, 3H, J=6,7 Гц), 0,92 (д, 3H, J=6,8 Гц).

(c) (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(аллилоксикарбониламино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-8-(триизопропилсилилокси)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (37).

Сухой диметилсульфоксид (0,180 г, 2,3 ммоль, 3,0 экв.) добавляли по каплям к раствору оксалилхлорида (0,147 г, 1,1 ммоль, 1,5 экв.) в ДХМ (10 мл) при -78°C в атмосфере азота. При поддержании температуры при -78°C через 20 мин добавляли по каплям раствор первичного спирта 36 (0,666 г, 0,77 ммоль, 1,0 экв.) в ДХМ (10 мл). Через дополнительные 15 мин добавляли сухой триэтиламин (0,390 г, 3,85 ммоль, 5,0 экв.) и реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры. Реакционную смесь последовательно промывали холодной 0,1N HCl (10 мл), насыщенным гидроксидом натрия (10 мл) и соевым раствором (5 мл). Затем органический слой сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток затем очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 50/50 об./об. н-гексан/ЕtОAc до 25/75 об./об. н-гексан/ЕtОAc) с получением продукта в виде белого твердого вещества (0,356 г, 54%). ЖХ/МС (3,487 мин (ES⁺)), m/z: 862,2 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,34 (ш. с, 1H), 7,47 (д, 2H, J=7,6 Гц), 7,17 (с, 1H), 7,14 (д, 2H, J=7,5 Гц), 6,86 (ш. с, 1H), 6,65 (ш. с, 1H), 6,42 (д, 1H, J=7,6 Гц), 6,22 (д, 1H, J=14,4 Гц), 5,80 (м, 1H), 5,40 (м, 1H), 5,53 (м, 1H), 5,32 (м, 1H), 5,21 (д, 2H, J=9,6 Гц), 5,06 (д, 1H, J=12,3 Гц), 4,90 (м, 1H), 4,58 (м, 3H), 3,98 (м, 1H), 3,84 (м, 1H), 3,81 (с, 3H), 3,50 (м, 1H), 3,05 (дд, 1H, J=16,0, 10,3 Гц), 2,76 (м, 1H), 2,15 (м, 1H), 1,80 (дд, 3H, J=6,7, 0,8 Гц), 1,44 (д, 3H, J=7,1 Гц), 1,16 (м, 3H), 1,01 (д, 18H, J=6,6 Гц), 0,96 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,92 (д, 3H, J=6,8 Гц).

(d) (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(аллилоксикарбониламино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-11-(трет-бутилдиметилсилилокси)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-8-(триизопропилсилилокси)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (38).

трет-Бутилдиметилсилилтрифторметан сульфонат (0,46 г, 1,74 ммоль, 3,0 экв.) добавляли к раствору вторичного спирта 37 (0,5 г, 0,58 ммоль, 1,0 экв.) и 2,6-лутидина (0,25 г, 2,32 ммоль, 4,0 экв.) в сухом ДХМ (10 мл) при 0°C в атмосфере азота. Через 10 мин реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение дополнительных 120 мин. Затем органическую фазу последовательно промывали водой (10 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (10 мл) и соевым раствором (5 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 50/50 об./об. н-гексан/ЕtОAc) с получением продукта в виде белого твердого вещества (0,320 г, 57%). ЖХ/МС (4,415 мин (ES⁺)), m/z: 976,52 [M+H]⁺.

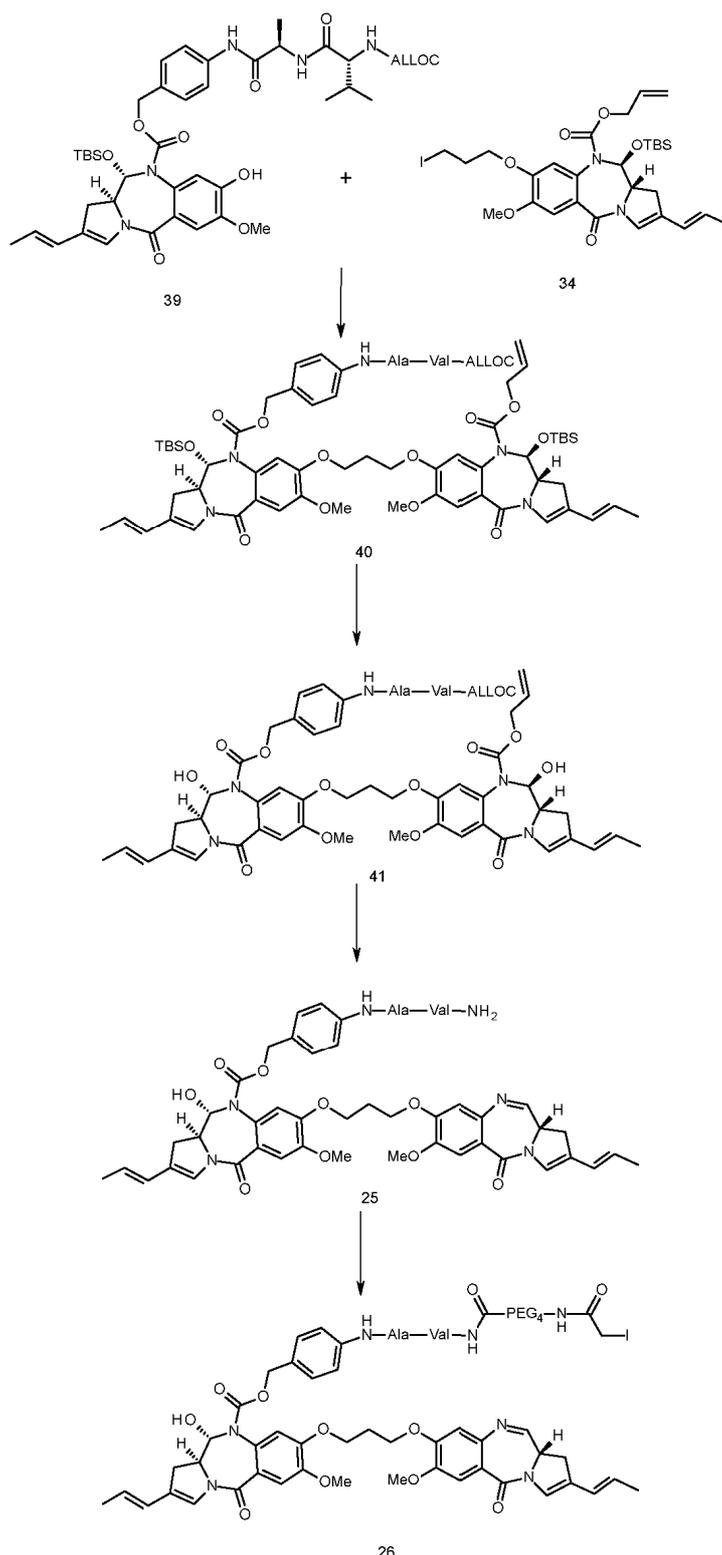
¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,31 (ш. с, 1H), 7,48 (д, 2H, J=8,0 Гц), 7,21 (с, 1H), 7,14 (д, 2H, J=8,3 Гц), 6,89 (с, 1H), 6,65 (с, 1H), 6,38 (д, 1H, J=7,3 Гц), 6,25 (д, 1H, J=14,6 Гц), 5,93 (м, 1H), 5,85 (д, 1H, J=8,8 Гц), 5,50 (м, 1H), 5,34 (м, 1H), 5,24 (м, 2H), 5,15 (д, 1H, J=12,5 Гц), 4,86 (д, 1H, J=12,2 Гц), 4,62 (м, 3H), 4,01 (м, 1H), 3,86 (с, 3H), 3,78 (м, 1H), 3,04 (м, 1H), 2,56 (м, 1H), 2,20 (м, 1H), 1,84 (дд, 3H, J=6,6, 0,7 Гц), 1,48 (д, 3H, J=6,8 Гц), 1,20 (м, 3H), 1,05 (д, 9H, J=2,9 Гц), 1,03 (д, 9H, J=2,9 Гц), 0,99 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,95 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,88 (с, 9H), 0,27 (с, 3H), 0,14 (с, 3H).

(е) (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(аллилкарбониламино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-11-(трет-бутилдиметилсилилокси)-8-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (39).

Дигидрат ацетата лития (0,010 г, 0,10 ммоль, 1,0 экв.) добавляли к раствору силилового эфира 38 (0,100 г, 0,10 ммоль, 1,0 экв.) во влажном ДМФА (2 мл) при 25°C в течение 3 ч. Затем реакцию смесь разбавляли этилацетатом (20 мл) и последовательно промывали 0,1 М лимонной кислотой (20 мл, pH 3), воду (20 мл) и соевым раствором (5 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 5/95 об./об. метанол/ДХМ) с получением продукта в виде светло-желтого масла (0,070 г, 83%). ЖХ/МС (3,362 мин (ES⁺)), m/z: 820,2 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,39 (с, 1H), 7,48 (д, 2H, J=8,2 Гц), 7,25 (с, 1H), 7,12 (д, 2H, J=8,1 Гц), 6,88 (с, 1H), 6,68 (с, 1H), 6,47 (д, 1H, J=7,6 Гц), 6,24 (д, 1H, J=15,2 Гц), 6,03 (с, 1H), 5,92 (м, 1H), 5,84 (д, 1H, J=8,9 Гц), 5,50 (м, 1H), 5,34 (м, 1H), 5,26 (м, 2H), 5,18 (д, 1H, J=12,3 Гц), 4,80 (д, 1H, J=12,4 Гц), 4,66-4,60 (м, 3H), 4,02 (м, 1H), 3,95 (с, 3H), 3,81 (м, 1H), 3,03 (м, 1H), 2,57 (м, 1H), 2,19 (м, 1H), 1,84 (дд, 3H, J=6,8, 0,8 Гц), 1,48 (д, 3H, J=7,1 Гц), 1,00 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,95 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,87 (с, 9H), 0,26 (с, 3H), 0,12 (с, 3H).

(iv) (11S,11aS)-4-((20S,23S)-1-йод-20-изопропил-23-метил-2,18,21-триоксо-6,9,12,15-тетраокса-3,19,22-триазатетракозанамидо)бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-((S)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-5,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]diazепин-8-илокси)пропокси)-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11а-дигидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (26, A)



(a) (11S,11aS)-аллил-8-(3-((11S,11aS)-10-((4-((R)-2-((R)-2-(аллилоксикарбониламино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензилокси)карбонил)-11-(трет-бутилдиметилсилилокси)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-илокси)пропокси)-11-(трет-бутилдиметилсилилокси)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (40).

Карбонат калия (0,030 г, 0,21 ммоль, 1,0 экв.) добавляли к раствору фенола 39 (0,175 г, 0,21 ммоль, 1,0 экв.) и йодного линкера 34 (0,214 г, 0,32 ммоль, 1,5 экв.) в ацетоне (10 мл). Реакционную смесь нагревали в атмосфере азота при 75°C в герметичной колбе в течение 17 ч. Реакционную смесь концентрировали досуха при пониженном давлении и очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 2/98 об./об. метанол/ДХМ до 5/95 об./об. метанол/ДХМ) с получением продукта в виде светло-желтого твер-

дого вещества (0,100 г, 35%). ЖХ/МС (4,293 мин (ES⁺)), m/z: 1359,13 [M]⁺.

(b) (11S,11aS)-аллил-8-(3-((11S,11aS)-10-((4-((R)-2-((R)-2-(аллилоксикарбониламино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензилокси)карбонил)-1-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-илокси)пропокси)-1-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (41).

Фторид тетра-н-бутиламония (1 М, 0,22 мл, 0,22 ммоль, 2,0 экв.) добавляли к раствору силилового эфира 40 (0,150 г, 0,11 ммоль, 1,0 экв.) в сухом ТГФ (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин, после чего ЖХ/МС показала завершение реакции. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (10 мл) и последовательно промывали водой (5 мл) и соевым раствором (5 мл). Органическую фазу сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением желтого твердого вещества. В результате очистки с помощью флэш-хроматографии (силикагель, 6/94 об./об. метанол/ДХМ до 10/90 об./об. метанол/ДХМ) получали продукт в виде светло-желтого твердого вещества (0,090 г, 73%). ЖХ/МС (2,947 мин (ES⁺)), m/z: 1154,0 [M+Na]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,39 (ш. с, 1H), 7,39 (д, 2H, J=7,6 Гц), 7,18 (д, 2H, J=10,6 Гц), 7,10 (м, 3H), 6,86 (д, 2H, J=10,0 Гц), 6,74 (с, 1H), 6,55 (с, 1H), 6,22 (дд, 2H, J=15,3, 6,6 Гц), 5,85 (м, 2H), 5,74 (м, 3H), 5,52 (м, 2H), 5,22 (м, 1H), 5,00 (м, 2H), 4,57 (м, 6H), 4,41 (м, 2H), 4,09 (м, 4H), 3,85 (м, 11H), 3,06 (м, 2H), 2,76 (м, 2H), 2,20 (м, 2H), 2,08 (м, 1H), 1,79 (д, 6H, J=6,4 Гц), 1,40 (д, 3H, J=6,1 Гц), 0,90 (м, 6H).

(c) (11S,11aS)-4-((R)-2-((R)-2-амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-((S)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-5,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-8-илокси)пропокси)-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (25).

тетракис-(Трифенилфосфин)палладий(0) (0,005 г, 0,005 ммоль, 0,06 экв.) добавляли к раствору бискарбиноламина 41 (0,090 г, 0,08 ммоль, 1,0 экв.) и пирролидина (16 мкл, 0,20 ммоль, 2,5 экв.) в сухом ДХМ (5 мл). Через 20 мин реакционную смесь разбавляли ДХМ (10 мл) и последовательно промывали насыщенным хлоридом аммония (5 мл) и соевым раствором (5 мл), сушили над MgSO₄, фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением неочищенного продукта в виде светло-желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки (0,075 г, предположительный 100% выход). ЖХ/МС (2,060 мин (ES⁺)), m/z: 947,2 [M+H]⁺.

(d) (11S,11aS)-4-((20S,23S)-1-йод-20-изопропил-23-метил-2,18,21-триоксо-6,9,12,15-тетраокса-3,19,22-триазатетракозанамидо)бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-((S)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-5,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-8-илокси)пропокси)-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (26, A).

EDCI (0,015 г, 0,08 ммоль, 1,0 экв.) добавляли к раствору амина 25 (предположительный выход 100%, 0,075 г, 0,08 ммоль, 1,0 экв.) и иодоацетамид-PEG₄-кислоты 17 (0,034 г, 0,08 ммоль, 1,0 экв.) в сухом дихлорметане (5 мл) и реакционную смесь перемешивали в темноте. Через 50 мин добавляли дополнительное количество иодоацетамид-PEG₄-кислоты 17 (0,007 г, 0,016 ммоль, 0,2 экв.) совместно с дополнительным количеством EDCI (0,003 г, 0,016 ммоль, 0,2 экв.). После в общей сложности 2,5 ч реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (15 мл) и последовательно промывали водой (10 мл) и соевым раствором (10 мл). Органическую фазу сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (силикагель, Хлороформ 100% до 90:10 об./об. хлороформ:метанол). Чистые фракции объединяли с получением продукта (0,0254 г, 23%, 2 стадии). Неочищенные фракции собирали и очищали с помощью препаративной ТСХ (силикагель, 90:10 об./об. хлороформ:метанол) с получением второй партии продукта (0,0036 г, 3%, 2 стадии). ЖХ/МС (2,689 мин (ES⁺)), m/z: 681,0 1/2[M+2H]⁺.

Общие экспериментальные методики для примера 4.

Протекание реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием силикагеля Merck Kieselgel 60 F254, с флуоресцентным индикатором на алюминиевых пластинах. Визуализацию ТСХ осуществляли с помощью УФ-света или паров йода, если не указано иное. Флэш-хроматографию проводили с использованием силикагеля Merck Kieselgel 60 F254. Растворители для экстракции и хроматографии покупали и использовали без дополнительной очистки у Fisher Scientific, U.K. Все химические реактивы приобретали у Aldrich, Lancaster или BDH.

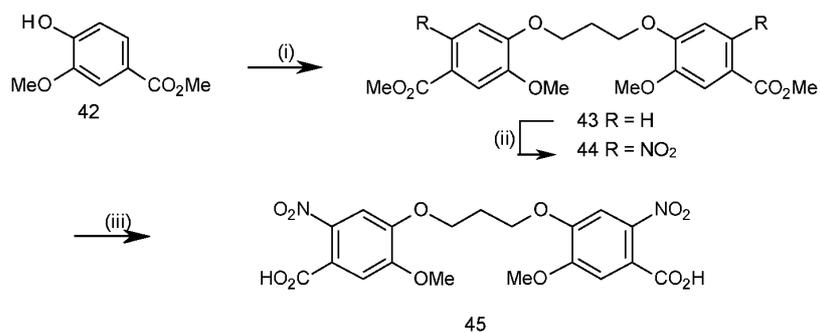
Значения химического сдвига протонного ЯМР измеряли по шкале дельта при 400 МГц с использованием Bruker AV400, Использовали следующие сокращения: с, синглет; д, дуплет; т, триплет; кв, квинтет; м, мультиплет; ш, широкий. Константы взаимодействия представлены в Гц. Если не указано иное, колоночную хроматографию (посредством флэш процедуры) проводили на Merck Kieselgel silica (Art. 9385). Данные по масс-спектрологии (МС) получали с использованием инструмента Waters Micromass LCT, связанного с модулем разделения Waters 2795 ВЭЖХ. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на алюминиевых пластинах с силикагелем (Merck 60, F254). Все остальные химические реактивы и растворители применяли в поставляемом виде без дополнительной очистки.

Данные ЖХМС получали с использованием серий ЖХ/МС Shimadzu Nexera с квадрупольной масс-спектрометрией Shimadzu ЖХМС-2020, с ионизацией электроспреем. Подвижная фаза А-0,1% в муравь-

иной кислоты в воде. Подвижная фаза В-0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Скорость потока 0,80 мл/мин. Градиент от 5% В повышают до 100% В в течение 2,00 мин, сохраняют на уровне 100% В в течение 0,50 мин затем возвращают до 5% В в течение 0,05 мин (сохраняют в течение 0,45 мин). Общее время хроматографирования составляет 3 мин. Колонка: Waters Aquity UPLC BEH Shield RP18 1,7 мкм, 2,1×50 мм; (система 1). Или градиент от 5% В повышают до 100% В в течение 10,00 мин, сохраняют на уровне 100% В в течение 2,00 мин и затем возвращают до 5% В в течение 0,10 мин (сохраняют в течение 2,90 мин). Общее время хроматографирования составляет 15 мин. Колонка: Gemini-NX 3 мкм C18, 30×2,00 мм; (система 2). Хроматограммы на основе УФ-обнаружения при 254 нм. Масс-спектры получали с использованием МС в положительном режиме.

Пример 4.

(a) 1',3'-бис-(4-карбокси-2-метокси-5-нитрофенокси)пропан (45)



(i) 1',3'-бис-[2-метокси-4-(метоксикарбонил)фенокси]пропан (43).

Диизопропил азодикарбоксилат (71,3 мл, 73,2 г, 362 ммоль) добавляли по каплям в течение периода времени в 60 мин к перемешиваемому с помощью верхнеприводной мешалки раствору метил ванилата 42 (60,0 г, 329 ммоль) и Ph₃P (129,4 г, 494 ммоль) в безводном ТГФ (800 мл) при 0-5°C (лед/ацетон) в атмосфере азота. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 0-5°C дополнительно в течение 1 ч, после чего добавляли по каплям раствор 1,3-пропандиола (11,4 мл, 12,0 г, 158 ммоль) в ТГФ (12 мл) в течение периода времени в 20 мин. Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 5 дней. Полученный белый осадок 43 собирали с помощью вакуумной фильтрации, промывали ТГФ и сушили в вакуумном осушителе до постоянной массы. Выход=54,7 г (84% в пересчете на 1,3-пропандиол). Удовлетворительная чистота посредством ЖХ/МС (3,20 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 427 ([M + Na]⁺, 10);

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,64 (дд, 2H, J=1,8, 8,3 Гц), 7,54 (д, 2H, J=1,8 Гц), 6,93 (д, 2H, J=8,5 Гц), 4,30 (т, 4H, J=6,1 Гц), 3,90 (с, 6H), 3,89 (с, 6H), 2,40 (р, 2H, J=6,0 Гц).

(ii) 1',3'-бис-[2-метокси-4-(метоксикарбонил)-5-нитрофенокси]пропан (44).

Твердый Cu(NO₃)₂·3H₂O (81,5 г, 337,5 ммоль) медленно добавляли к перемешиваемой с помощью верхнеприводной мешалки суспензии бис-сложного эфира 43 (54,7 г, 135 ммоль) в уксусном ангидриде (650 мл) при 0-5°C (лед/ацетон). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 1 ч при 0-5°C и затем оставляли нагреваться до комнатной температуры. На данной стадии наблюдали умеренную экзотерму (са. 40-50°C), сопровождающуюся запуском указанной смеси и выделением NO₂. Добавляли дополнительное количество уксусного ангидрида (300 мл) и реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 16 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь выливали в лед (~ 1,5 л), перемешивали и оставляли до возвращения комнатной температуры. Полученный желтый осадок собирали с помощью вакуумной фильтрации и сушили в осушителе с получением требуемого бис-нитро соединения 44 в виде желтого твердого вещества. Выход=66,7 г (100%). Удовлетворительная чистота посредством ЖХ/МС (3,25 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 517 ([M + Na]⁺, 40);

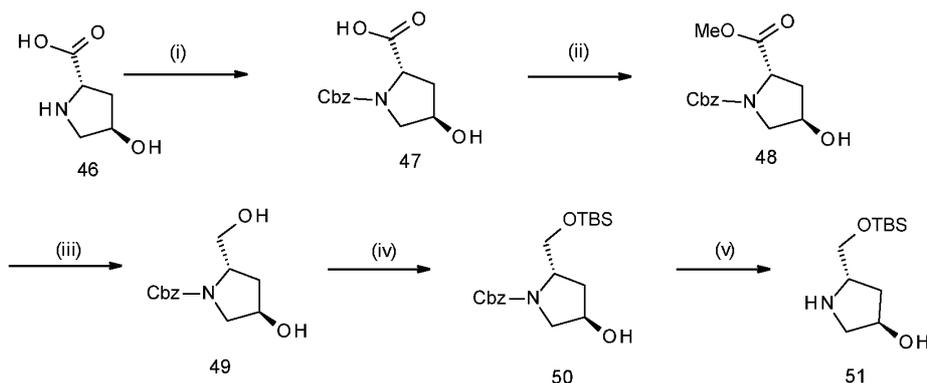
¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,49 (с, 2H), 7,06 (с, 2H), 4,32 (т, 4H, J=6,0 Гц), 3,95 (с, 6H), 3,90 (с, 6H), 2,45-2,40 (м, 2H).

(iii) 1',3'-бис-(4-карбокси-2-метокси-5-нитрофенокси)пропан (45).

Суспензию метилового сложного эфира 44 (66,7 г, 135 ммоль) в ТГФ (700 мл) обрабатывали 1N NaOH (700 мл) и реакционную смесь оставляли перемешиваться интенсивно при комнатной температуре. Через 4 дня перемешивания суспензия становилась темным раствором, который подвергали ротационному выпариванию при пониженном давлении с удалением ТГФ. Полученный водный остаток подкисляли до pH 1 с помощью концентрированной HCl и бесцветный осадок 45 собирали и тщательно сушили в вакуумном сушильном шкафу (50°C). Выход=54,5 г (87%). Удовлетворительная чистота посредством ЖХ/МС (2,65 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 489 ([M + Na]⁺, 30));

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7,62 (с, 2H), 7,30 (с, 2H), 4,29 (т, 4H, J=6,0 Гц), 3,85 (с, 6H), 2,30-2,26 (м, 2H).

(b) (2S,4R)-2-трет-Бутилдиметилсилилоксиметил-4-гидроксипирролидин (51)



(i) (2S,4R)-н-(Бензилоксикарбонил)-2-карбоксо-4-гидроксипирролидин (47).

Раствор бензилхлорформиата (12,5 мл, 14,9 г, 87,5 ммоль) в толуоле (40 мл) добавляли к раствору транс-4-гидрокси-L-пролина 46 (10 г, 76,3 ммоль) и NaHCO_3 (16 г, 190 ммоль) в H_2O (165 мл) в течение периода времени в 15 мин. После перемешивания при комнатной температуре в течение 12 ч две фазы оставляли разделяться. Водную фазу промывали диэтиловым эфиром (4×50 мл), охлаждали на ледяной бане, и затем подкисляли до pH 2 с помощью конц. HCl . Водный слой экстрагировали этилацетатом (5×50 мл) и объединенные органические экстракты сушили (MgSO_4) и избыточный растворитель выпаривали в вакууме с получением бесцветного вязкого масла 47 (20,30 г, 100%). $[\alpha]_D^{27} = -565^\circ$ (c=0,1, MeOH).

(ii) (2S,4R)-н-(Бензилоксикарбонил)-2-метоксикарбонил-4-гидроксипирролидин (48).

Каталитическое количество концентрированной H_2SO_4 (1,1 мл) добавляли к раствору (2S,4R)-н-(Бензилоксикарбонил)-2-карбоксо-4-гидроксипирролидина 47 (80 г, 302 ммоль) в безводном MeOH (462 мл) при 10°C . Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч, оставляли охлаждаться до комнатной температуры, и затем обрабатывали Et_3N (66 мл) и перемешивали в течение 1 ч. После удаления избытка MeOH с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении остаток растворяли в EtOAc (460 мл), промывали насыщенным солевым раствором и сушили (MgSO_4). В результате фильтрации и удаления избытка растворителя в вакууме получали сложный эфир 48 в виде вязкого масла. Выход 84,4 г (100%). $[\alpha]_D^{20} = -59,4^\circ$ (c=0,014, CHCl_3).

(iii) (2S,4R)-н-(Бензилоксикарбонил)-2-гидроксиметил-4-гидроксипирролидин (49).

Твердый LiBH_4 (9,89 г, 454 ммоль) добавляли порциями к раствору сложного эфира 48 (84,4 г, 302 ммоль) в безводном ТГФ (600 мл) при 0°C . После перемешивания образца в течение 30 мин при 0°C реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и затем перемешивали дополнительно в течение 2 ч при комнатной температуре. В течение этого времени образовывалась густая суспензия, несмотря на добавление дополнительного количества ТГФ (150 мл); TCX (EtOAc) в этот момент показала полное исчезновение исходного вещества. Суспензию охлаждали до 0°C , разбавляли водой (389 мл), и обрабатывали по каплям водной HCl (2 M, 400 мл) провоцируя активное выделение пузырьков. Избыток ТГФ удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении, и водный остаток экстрагировали EtOAc (4×250 мл). Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором (300 мл) и сушили над MgSO_4 . В результате фильтрации и удаления растворителя получали продукт 49 в виде бесцветного масла. Выход 73,2 г (96%). $[\alpha]_D^{26} = -42,5^\circ$ (c=1, CHCl_3);

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,45-7,29 (м, 5H), 5,26-5,01 (м, 2H), 4,72 (д, J=7,4 Гц, 1H), 4,50-4,30 (м, 1H), 4,27-4,03 (м, 1H), 3,84-3,68 (м, 1H), 3,60 (д, J=9,2 Гц, 2H), 3,47 (дд, J=12,1, 3,8 Гц, 1H), 2,56 (с, 1H), 2,14-1,93 (м, 1H), 1,80-1,62 (м, 1H).

(iv) (2S,4R)-н-(Бензилоксикарбонил)-2-трет-бутилдиметилсилилоксиметил-4-гидроксипирролидин (50).

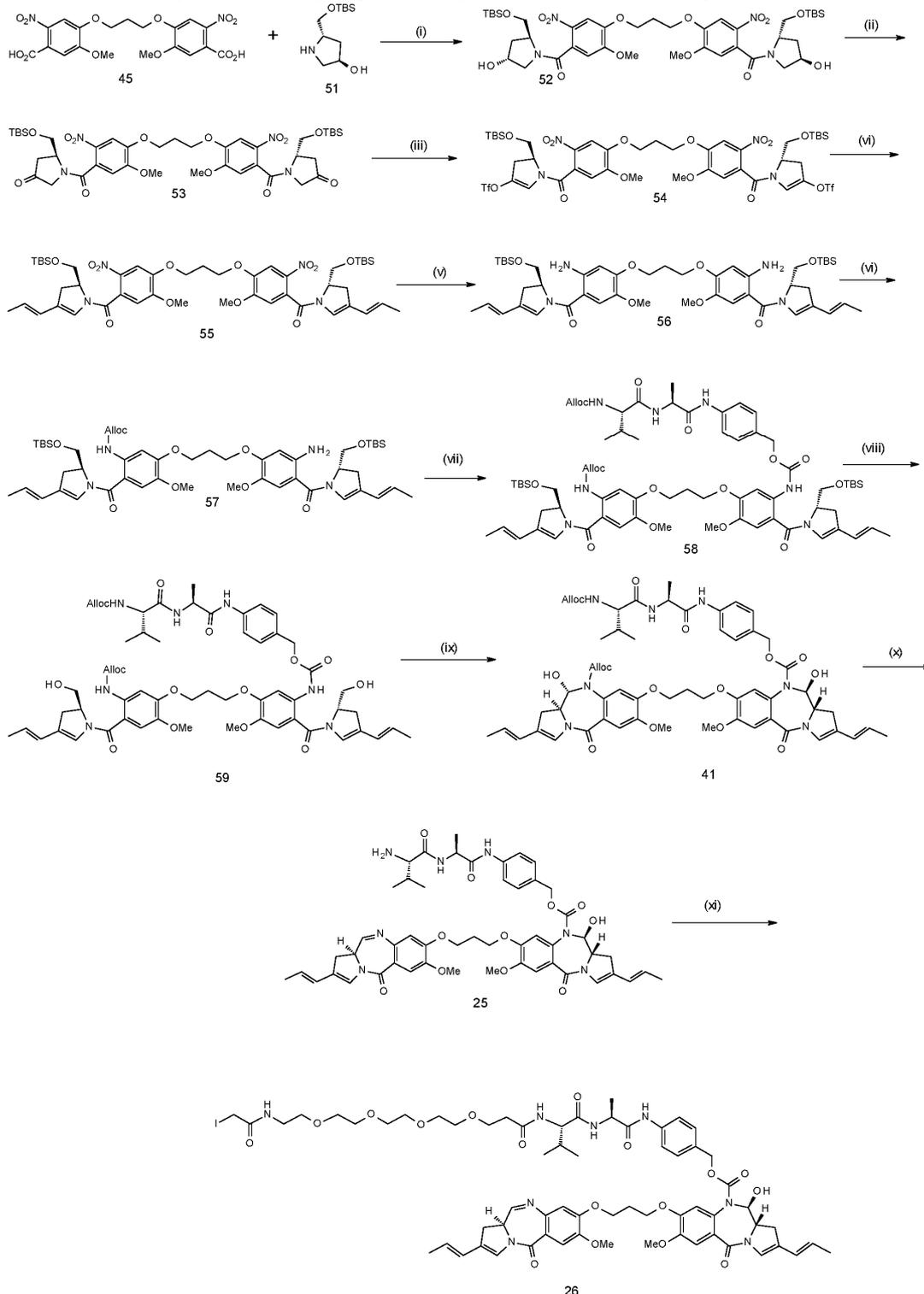
трет-Бутилдиметилсилилхлорид (35,9 г, 238 ммоль) добавляли к раствору диола 49 (77,8 г, 310 ммоль), Et_3N (43,7 мл, 31,7 г, 313 ммоль) и DBU (9,17 мл, 9,34 г, 61,3 ммоль) в свежеперегнанном безводном CH_2Cl_2 (650 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере N_2 . Реакционную смесь промывали насыщенным водным CH_4Cl (300 мл), солевым раствором (300 мл) и затем сушили (MgSO_4). В результате фильтрации и удаления растворителя получали неочищенный продукт, который подвергали колоночной флэш-хроматографии (80/20 об./об. гексан/этилацетат с удалением бис защищенное вещество, с последующей обработкой 50/50 об./об. гексан/этилацетат с элюированием требуемого продукта, и затем чистым EtOAc с извлечением исходного вещества) с выделением силилового эфира 50. Выход: 67,9 г (78% в пересчете на трет-бутилдиметилсилилхлорид). $[\alpha]_D^{25} = -47,5^\circ$ (c=1, CHCl_3).

(v) (2S,4R)-2-трет-Бутилдиметилсилилоксиметил-4-гидроксипирролидин (51).

Раствор силилового эфира 50 (100 г, 273 ммоль) в изопропанол (4×200 мл) над 10% Pd/C (5% мас./мас., 5 г) гидрировали под давлением (45 фунтов на квадратный дюйм) в устройстве Парра в течение

ние 30 мин. Реакционную смесь фильтровали через целит для удаления Pd/C, и фильтровальную подложку промывали изопропанолом. Избыток растворителя удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Остаток повторно растворяли в этилацетате и растворитель удаляли при пониженном давлении. Указанный этилацетатный цикл повторяли еще один раз с последующим высушиванием в высоком вакууме. Указанный продукт, 51, кристаллизировали в виде белого твердого вещества 57 г (90%). $[\alpha]_D^{22} = +35,6^\circ$ ($c=0,042$, CHCl_3).

(с) (1*S*,11*aS*)-4-((2*S*,23*S*)-1-йод-20-изопропил-23-метил-2,18,21-триоксо-6,9,12,15-тетраоксо-3,19,22-триазатетракозанамидо)бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-(((*S*)-7-метокси-5-оксо-2-((*E*)-проп-1-ен-1-ил)-5,11*a*-дигидро-1*H*-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]диазепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2-((*E*)-проп-1-ен-1-ил)-11,11*a*-дигидро-1*H*-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]диазепин-10(5*H*)-карбоксилат, 26



(i) (*S*,*R*)-(4,4'-(пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((2*S*,4*R*)-2-((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)-4-гидрокси-пирролидин-1-ил)метанон) (52).

Безводный ДМФА (приблиз. 0,5 мл, ~0,13 экв.) добавляли по каплям к перемешиваемой суспензии 4,4'-(пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитробензойной кислоты) (45) (23,2 г, 49,9 ммоль) и оксалилхлорида (12,7 мл, 150 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДХМ (310 мл) до активного выделения пузырьков. Добавление того же количества безводного ДМФА повторяли через 2 ч и реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение ночи. Реакционную смесь выпаривали досуха и растирали с диэтиловым эфиром. Полученную желтый осадок отфильтровывали от раствора, промывали диэтиловым эфиром (100 мл) и немедленно добавляли к раствору (3R,5S)-5-((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)пирролидин-3-ола 51 и безводного триэтиламина (26,5 г, 115 ммоль, 2,3 экв.) в безводном ДХМ (200 мл) при -40°C. Полученную густую суспензию разбавляли безводным ДХМ (140 мл) и оставляли медленно нагреваться до комнатной температуры (в течение 90 мин) после чего, ЖХМС анализ показал завершение реакции. Добавляли ДХМ (300 мл) и указанную смесь переносили в делительную воронку. Органический слой последовательно промывали 0,1 М HCl (2×240 мл), насыщенным NaHCO₃ (240 мл) и соевым раствором (20 мл). После высушивания над MgSO₄ и фильтрования, выпаривания растворителя оставался продукт, 52, в виде пены цвета горчицы (42,6 г, 96%).

δ_{H} (CDCl₃): 7,64 (2H, c), 6,73 (2H, c), 4,47-4,52 (2H, m), 4,39 (2H, ш. c), 4,31-4,34 (2H, т, J=5,6), 4,12 (2H, m), 3,93-3,95 (2H, т, J=3,8), 3,92 (6H, c), 3,73-3,75 (2H, m), 3,27-3,31 (2H, m), 2,96-3,00 (2H, m), 2,55-2,56 (2H, m), 2,39-2,43 (4H, m), 2,27-2,33 (2H, m), 2,04-2,10 (2H, m), 0,89 (18H, c), 0,09 (6H, c), 0,07 (6H, c).

ЖХ/МС, Система 1: 96% чистота при 1,96 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 893,35 ([M+H]⁺, 100).

(ii) (S,R)-(4,4'-(пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-((S)-5-((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)-1-(4,5-диметокси-2-нитробензоил)пирролидин-3-он) (53).

Трихлоризоциануровую кислоту (8,1 г, 0,035 моль, 2,2 экв.) добавляли в одной порции к раствору диола 52 (14,2 г, 0,016 моль, 1,0 экв.) и ТЕМПО (0,5 г, 0,035 ммоль, 0,2 экв.) в безводном ДХМ (100 мл) в атмосфере азота при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 20 мин после чего, ЖХМС анализ реакционной смеси показал завершение реакции. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (100 мл) и указанную холодную смесь выливали в насыщенный бикарбонат натрия (200 мл). Указанную смесь перемешивали интенсивно в течение примерно 30 мин, затем переносили в делительную воронку. Органический слой удаляли и промывали 0,2 М тиосульфатом натрия (200 мл), соевым раствором (25 мл) и сушили (MgSO₄). В результате выпаривания растворителя получали неочищенный продукт 53 в виде светло-желтого твердого вещества (14,1 г, 100%). Продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

δ_{H} (CDCl₃): 7,76 (0,6H, c), 7,74 (2H, c), 7,74 (0,6H, c), 6,82 (0,6H, c), 6,74 (0,6H, c), 6,73 (2H, c), 4,95-4,98 (2H, ш. д., J=8,9), 4,36 (1H, д, J=18,4), 4,27-4,35 (10H, m), 3,96 (1,8H, c), 3,94 (6H, c), 3,94 (1,8H, c), 3,62-3,66 (1H, д, J=18,9), 3,70-3,73 (3H, дд, J=10,3, 1,9), 3,62-3,66 (3H, д, J=17), 3,42-3,46 (3,6H, д, J=17), 2,75-2,82 (4H, дд, J=17,8, 9,8), 2,52-2,57 (3H, д, J=17,8), 2,43-2,47 (4,6H, m), 0,86 (18H, c), 0,85 (8H, c), 0,10 (6H, c), 0,07 (6H, c), 0,02 (2H, c), 0,00 (2H, c).

ЖХ/МС, Система 1: 100% чистота при 2,05 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 889,20 ([M+H]⁺, 100).

(iii) (5S,5'S)-1,1'-(4,4'-(пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитробензоил))-бис-5-(((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)-4,5-дигидро-1H-пиррол-3,1-диил)-бис-(трифторметасульфат), (54).

Трифторметасульфоновый ангидрид (22,84 г, 0,08 моль, 4,0 экв.) добавляли по каплям к интенсивно перемешиваемому раствору неочищенного бис-кетона 53¹ (18,0 г, 0,02 моль, 1 экв.) в безводном ДХМ (350 мл), содержащему 2,6-лутидин (13,0 г, 0,12 моль, 6,0 экв.), при -50°C. Реакционную смесь перемешивали при -50°C в течение 1,5 ч, после чего ЖХМС анализ показал завершение реакции. Органическую фазу последовательно промывали 5% лимонной кислотой (300 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (400 мл) и соевым раствором (50 мл), сушили над MgSO₄ и выпаривали с получением коричневого масла, 54 (23,0 г, 99%), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

δ_{H} (CDCl₃): 7,76 (2H, c), 6,77 ("H, c), 6,08 (2H, m), 4,78 ("H, m), 4,34-4,37 (4H, т, J=5,8), 3,92-9,97 (4H, m), 3,95 (6H, c), 3,14-3,19 (2H, ддд, J=16,5, 10,5, 2,5), 2,96-3,02 (2H, ддд, J=16,2, 4,0, 1,5), 2,45-2,48 (2H, квинтет=5,8), 0,91 (18H, c), 0,11 (6H, c), 0,11 (6H, c).

(iv) (S,E)-(4,4'-(пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)-4-((E)-проп-1-енил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-ил)метанон) (55).

тетракис-(Трифенилфосфин)палладий (2,3 г, 1,99 ммоль, 0,1 экв.) добавляли к смеси неочищенного бис-трифлата 54 (23,0 г, 19,9 ммоль), фосфата калия (16,9 г, 79,6 ммоль, 4,0 экв.) и транс-1-пропен-1-илбороновой кислоты (4,28 г, 49,8 ммоль, 2,5 экв.) в сухом диоксане (200 мл) в атмосфере азота. Указанную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч, после чего, ЖХМС анализ показал образование требуемого продукта совместно с продуктом, образовавшимся по моносочетанию Сузуки. Добавляли дополнительное количество 10% катализатора и реакционную смесь перемешивали в течение ночи, после чего ЖХМС анализ показал завершение реакции. Добавляли воду (100 мл) и продукт экстрагировали этилацетатом (150 мл), промывали соевым раствором (50 мл) и сушили над MgSO₄. В результате выпаривания растворителя оставалось коричневое масло, которое очищали с помощью флэш-

хроматографии (1% об./об. метанол/дихлорметан) с получением продукта 55 в виде оранжевого твердого вещества. (11,4 г, 54,3% за 3 стадии от диола 52).

δ_{H} (CDCl₃): 7,75 (2H, c), 6,79 (2H, c), 5,94-5,98 (2H, ш. д., J=15,6), 5,73 (2H, ш. с., 5,51-5,99 (2H, дкв, J=15,6, 6,6), 4,69 (2H, м), 4,33-4,36 (4H, т, J=5,9), 3,76-4,15 (4H, м), 3,94 (6H, c), 2,86-2,92 (2H, м), 2,73-2,76 (2H, ш. д.), J=16,0), 2,43-2,49 (2H, квинтет, J=5,9), 1,74-1,76 (6H, дд, J=6,6, 0,7), 0,89 (18H, c), 0,11 (6H, c), 0,10 (6H, c).

ЖХ/МС, Система 1: 100% чистота при 2,36 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 1896,85 ([2M+Na]⁺, 100).

(v) (S,E)-(4,4'-(пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)-4-((E)-проп-1-енил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-ил)метанон) (56).

Цинковую пыль (39,9 г, 610 ммоль, 36,0 экв.) добавляли в одной порции к раствору бис-нитро соединения 55 (15,9 г, 17,0т моль, 1,0 экв.) в 5% муравьиной кислоте/метаноле (350 мл), поддерживая температуру между 25-30°C с помощью бани с холодной водой. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 20 мин после чего, ЖХМС показала завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали через тонкую подложку из целита с удалением избыточного цинка, который промывали этилацетатом (750 мл). Органические фракции промывали водой (750 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (750 мл) и соевым раствором (50 мл), сушили над MgSO₄ и выпаривали с получением коричневого масла. Указанный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (ДХМ:MeOH 96%) с получением бис-анилина 56 в виде светло-желтого твердого вещества (9,46 г, 63,9%).

δ_{H} (DMCO-d₆): 6,64 (2H, c), 6,46 (2H, ш. с.), 6,43 (2H, c), 6,17-6,21 (2H, ш. д., J=15), 5,39-5,48 (2H, дкв, J=15, 6,5), 5,14 (4H, c), 4,50-4,52 (2H, м), 4,05-4,08 (4H, т, J=6,0), 3,67-3,83 (4H, м), 3,62 (6H, c), 2,77-2,83 (2H, дд, J=15,5, 10), 2,54-2,59 (2H, дд, J=15,5, 3,5), 2,17-2,24 (2H, квинтет, J=6,0), 1,71-1,73 (6H, д, J=6,6), 0,83 (18H, c), 0,01 (6H, c), 0,00 (6H, c).

ЖХ/МС, Система 1: 100% чистота при 2,34 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 877,20 ([M+H]⁺, 100).

(vi) Аллил-5-(3-(5-амино-4-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)-4-((E)-проп-1-енил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пропокси)-2-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)-4-((E)-проп-1-енил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенилкарбамат (57).

Пиридин (1,53 мл, 18,89 ммоль, 1,0 экв.) добавляли к раствору бис-анилина 56 (16,57 г, 18,89 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДХМ (240 мл) при -78°C в атмосфере азота. Через 5 мин, добавляли аллилхлорформат (1,50 мл, 14,17 ммоль, 0,75 экв.) в безводном ДХМ (10 мл) и реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры. Через 30 мин, органический слой последовательно промывали 5% лимонной кислотой (50 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (50 мл) и соевым раствором (10 мл), сушили над MgSO₄ и выпаривали с получением желтой пены. Указанный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (система очистки Biotage SP4, Biotage Snap Картридж HP-Sil 100 г, градиентное элюирование Гексан:EtOAc 70-0%) с получением 3 фракций:

Фракция один (бис-аллилоксикарбонил защищенный продукт) в виде беловатого твердого вещества (3,6 г).

Фракция два (требуемый продукт, 57) в виде желтого твердого вещества (7,1 г, 52,2%).

Фракция три (непрореагировавшее исходное вещество) в виде оранжевого твердого вещества (5,5 г).

δ_{H} (DMCO-d₆): 9,09 (1H, ш. с.), 7,23 (1H, ш. с.), 6,82 (1H, ш. с.), 6,47 (1H, ш. с.), 6,43 (1H, c), 6,10-6,28 (3H, м), 5,86-5,93 (1H, м), 5,40-5,48 (3H, м), 5,27-5,31 (1H, дд, J=17,2, 1,2), 5,15-5,19 (3H, м), 4,52 (4H, м), 4,12-4,15 (2H, т, J=6,0), 4,06-4,09 (2H, т, J=6,0), 3,66-3,87 (4H, м), 3,74 (3H, c), 3,62 (3H, c), 2,76-2,83 (2H, м), 2,54-2,58 (2H, ш. д., J=16,0), 2,19-2,25 (2H, квинтет, J=6,0), 1,71-1,73 (6H, д, J=6,2), 0,85 (9H, c), 0,83 (9H, c), 0,05 (3H, c), 0,03 (3H, c), 0,01 (3H, c), 0,00 (3H, c).

ЖХ/МС, Система 1: 100% чистота при 2,41 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 961,40 ([M+H]⁺, 100).

бис-Аллилоксикарбонил защищенное соединение и непрореагировавшее исходное вещество повторно использовали с применением следующей процедуры: тетраakis-(трифенилфосфин)палладий (0,350 г, 0,30 ммоль, 0,06 экв.) добавляли к раствору бис-аллилоксикарбонил защищенного анилина (5,27 г, 5,04 ммоль, 1 экв.) и пирролидина (1,04 мл, 12,6 ммоль, 2,5 экв.) в безводном ДХМ (50 мл) в атмосфере азота и указанную смесь перемешивали в течение 1 ч, после чего ЖХМС анализ показал завершение реакции. Указанную смесь разбавляли ДХМ и переносили в делительную воронку. Указанный продукт промывали насыщенным NH₄Cl (100 мл), насыщенным NaHCO₃ (100 мл) и соевым раствором (60 мл). После высушивания над MgSO₄, в результате выпаривания растворителя получали указанный продукт в виде оранжевого твердого вещества (4,5 г). Продукт с отдельной реакции (1 г) объединяли и указанную неочищенную смесь абсорбировали на силикагеле, затем очищали с помощью флэш-хроматографии (система очистки Biotage SP4, Biotage Snap Картридж HP-Sil 100g, градиентное элюирование Гексан:EtOAc 70%-0%) с получением бис-анилина 56 в виде оранжевого твердого вещества (3,1 г), который затем объ-

единяли извлеченным непрореагировавшим 56 в постановке защиты с помощью моноаллилоксикарбонила (с использованием 0,7 экв. аллилхлорформиата).

(vii) Аллил-4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-((S,E)-(пропан-1,3-д иил-бис-(окси))-бис-(2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-((E)-проп-1-ен-1-ил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-5,1-фенилен))дикарбамат (58).

Триэтиламин (2,26 мл, 16,2 ммоль, 2,2 экв.) добавляли к перемешиваемому раствору анилина 57 (7,1 г, 7,38 ммоль, 1,0 экв.) и трифосгена (0,79 г, 2,65 ммоль, 0,36 экв.) в безводном ТГФ (70 мл) в атмосфере азота при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. ЖХМС анализ аликвоты, гашеной метанолом, показал образование изоцианата. Раствор Alloc-Val-Ala-PAV-OH (4,18 г, 11,08 ммоль, 1,5 экв.) и триэтиламина (1,54 мл, 11,08 ммоль, 1,5 экв.) в сухом ТГФ (150 мл) добавляли в одной порции с использованием капельной воронки и полученную смесь перемешивали в течение ночи при 40°C. В результате выпаривания реакционной смеси оставалось коричневое масло, которое очищали с помощью флэш-хроматографии (ДХМ:MeOH 97,5%), с получением продукта, 58, в виде светло-желтого твердого вещества (6,7 г, 67,0%). Дополнительные 1,2 г (12%) выделяли из смешанной фракции.

δ_{H} (DMCO- d_6): 9,99 (1H, ш. с), 9,10 (2H, ш. с), 8,14-8,16 (1H, д, J=6,0), 7,56-7,58 (2H, д, J=8,5), 7,27-7,29 (2H, д, J=8,4), 7,22-7,24 (2H, д, J=8,8), 6,81 (2H, ш. с), 6,28 (2H, ш. с), 6,09-6,14 (2H, ш. д., J=16,0), 5,86-5,94 (2H, м), 5,41-5,50 (2H, м), 5,27-5,32 (2H, дд, J=17,0, 3,6, 1,6), 5,15-5,19 (2H, дд, J=10,4, 3,1, 1,5), 4,96-5,04 (2H, м), 4,40-4,52 (7H, м), 4,12-4,15 (4H, м), 3,83-3,91 (3H, м), 3,74 (6H, с), 3,64-3,72 (2H, м), 2,73-2,79 (2H, м), 2,51-2,58 (2H, м), 2,19-2,25 (2H, м), 1,93-2,01 (1H, м), 1,71-1,73 (6H, д, J=6,0), 1,29-1,30 (3H, д, J=7,0), 0,82-0,89 (24H, м), -0,02-0,04 (12H, м).

ЖХ/МС, Система 1: 100% чистота при 2,38 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 1387,15 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100).

(viii) Аллил-4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-((S,E)-(пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(2-((S)-2-(гидрокси)метил)-4-((E)-проп-1-ен-1-ил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-5,1-фенилен))дикарбамат (59).

(a) Способ 1: воду (12 мл) добавляли к раствору TBS эфира 58 (1,73 г, 1,27 ммоль) в AcOH (42 мл): MeOH (6 мл): ТГФ (6 мл) и указанную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь контролировали с помощью ЖХМС, которая показала образование требуемого продукта совместно с небольшими количествами непрореагировавшего исходного вещества и моно-незащищенных продуктов через 1 ч. Добавляли 10 мл AcOH:MeOH ТГФ: H_2O (7:1:1:2) и указанную смесь перемешивали еще час. ЖХМС анализа показал приближение завершения реакции, и были обнаружены только небольшие количества моно-незащищенных продуктов. Указанную смесь разбавляли EtOAc, переносили в делительную воронку, промывали водой, затем нас. NaHCO_3 до основного pH. Органический слой промывали соевым раствором, сушили над MgSO_4 и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт абсорбировали на диоксиде кремния и очищали с помощью флэш-хроматографии (градиентное элюирование CHCl_3 :MeOH 100-95%) с получением указанного продукт, 59, в виде твердого вещества кремового цвета (1,02 g, 71%).

(b) Способ 2: фторид тетра-н-бутиламмония (1 M, 9,19 мл, 9,19 ммоль, 2,0 экв.) добавляли к раствору TBS защищенного соединения 58 (6,25 г, 4,59 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ТГФ (75 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин, после чего ЖХМС показала образование указанного продукт, совместно с небольшими количествами моно-незащищенных соединений. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (500 мл) и последовательно промывали водой (250 мл) и соевым раствором (50 мл). Органическую фазу сушили над MgSO_4 и выпаривали с получением желтого твердого вещества. В результате очистки с помощью флэш-хроматографии (ДХМ:MeOH 94%) получали бис-спирт 59 в виде твердого вещества бледно-кремового цвета (3,43 г, 66,0%).

δ_{H} (DMCO- d_6): 9,99 (1H, ш. с), 9,08 (1H, ш. с), 9,05 (1H, ш. с), 8,14-8,16 (1H, д, J=6,8), 7,56-7,58 (2H, д, J=8,5), 7,28-7,30 (2H, д, J=8,5), 7,23-7,25 (2H, д, J=8,7), 7,19-7,24 (1H, м), 6,88 (2H, ш. с), 6,22 (2H, ш. с), 6,08-6,12 (2H, д, J=16,3), 5,86-5,94 (2H, м), 5,41-5,48 (2H, м), 5,26-5,32 (2H, м), 5,16-5,48 (2H, м), 5,00 (2H, ш. с), 4,84-4,88 (2H, м), 4,40-4,52 (7H, м), 4,11-4,15 (4H, м), 3,87-3,90 (1H, дд, J=8,9, 7,2), 3,75 (6H, с), 3,63-3,69 (2H, м), 3,48-3,54 (2H, м), 2,71-2,79 (2H, м), 2,55-2,61 (2H, тм), 2,20-2,25 (2H, м), 1,93-2,01 (1H, м), 1,71-1,73 (6H, д, J=6,0), 1,29-1,31 (3H, д, J=7,1), 0,87-0,89 (3H, д, J=6,8), 0,82-0,84 (3H, д, J=6,7).

ЖХ/МС, Система 1: 100% чистота при 1,74 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 1136,25 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100).

(ix) (11S,11aS)-аллил-8-(3-((11S,11aS)-10-((4-((S)-2-((S)-2-(аллилоксикарбониламино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензилокси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-илокси)пропокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-енил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (41).

Раствор оксалилхлорида (357 мг, 2,82 ммоль, 3,2 экв.) в безводном ТГФ¹ (~700 мкл) добавляли по каплям предварительно смешанному раствору безводного ДМСО (400 мкл, 5,63 ммоль, 6,4 экв.) в ТГФ

(12 мл) при -78°C в атмосфере азота и смесь перемешивали в течение 10 мин. Раствор диола 59 (1 г, 0,880 ммоль) в ТГФ (20 мл) добавляли по каплям за 10 мин и смесь перемешивали в течение дополнительных 20 мин до добавления триэтиламина (1,23 мл, 8,80 ммоль, 10 экв.). Затем смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и ход реакции контролировали с помощью ЖХМС, которая показала завершение реакции через 85 мин. Смесь разбавляли EtOAc и переносили в делительную воронку. Продукт промывали 1N HCl и водный слой экстрагировали EtOAc. Объединенные органические экстракты промывали насыщ. NaHCO_3 , соевым раствором и сушили над MgSO_4 . Неочищенный продукт растворяли в ДХМ:MeOH, абсорбировали на диоксиде кремния и очищали с помощью флэш-хроматографии (ДХМ:MeOH 98-97,5-97%)³ с получением циклизованного продукта 41 в виде бесцветного твердого вещества (561 мг, 56%).

δ_{H} (CDCl_3): 8,67 (1H, ш. с), 7,42 (1H, ш. с), 7,40 (1H, ш. с), 7,19-7,22 (2H, д, $J=10,2$), 7,10-7,16 (2H, м), 6,87-6,90 (2H, мм), 6,83 (1H, м), 6,76 (1H, ш. с), 6,54 (1H, ш. с), 6,25-6,27 (1H, д, $J=6,5$), 6,21-6,23 (1H, д, $J=7,0$), 5,84-5,94 (1H, м), 5,71-5,80 (3H, м), 5,44-5,59 (3H, м), 5,27-5,33 (2H, д, $J=17,7$), 5,19-5,29 (1H, д, $J=10,4$), 4,99-5,09 (2H, м), 4,68-4,76 (2H, м), 4,52-4,61 (4H, м), 4,39-4,45 (1H, м), 4,10-4,16 (2H, м), 4,00-4,04 (2H, м), 3,95-3,96 (1H, м), 3,86-3,89 (3H, м), 3,86 (3H, с), 3,84 (3H, с), 3,04-3,12 (2H, м), 2,75-2,82 (2H, м), 2,10-2,28 (3H, м), 1,81-1,82 (6H, д, $J=7,1$), 1,39-1,45 (3H, м), 0,94-0,96 (3H, д, $J=6,8$), 0,91-0,93 (3H, д, $J=7,0$).

ЖХ/МС, Система 1: 100% чистота при 1,72 мин (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 1132,25 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100). HRMS: $\text{C}_{59}\text{H}_{69}\text{N}_8\text{O}_{16}^+$ требуется 1132,4834, обнаружено 1132,2799 (MH^+), 1149,3333 ($\text{M}+\text{NH}_4^+$).

(x) (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-амино-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)гидразинил)бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-ен-1-ил)-5,11-а-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2-((E)-проп-1-ен-1-ил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (25).

тетракис-(Трифенилфосфин)палладий(0) (14 мг, 0,01 ммоль, 0,06 экв.) добавляли к раствору 41 (0,208 ммоль) и пирролидина (43 мкл, 0,52 ммоль, 2,5 экв.) в хлороформе (5 мл). Реакционную смесь перемешивали 20 мин и разбавляли хлороформом и последовательно промывали насыщенным водным хлоридом аммония и соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния фильтровали и избыток хлороформа удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении. Полученный остаток 25 использовали в виде неочищенной смеси в следующей реакции.

δ_{H} (DMCO-d_6): 10,26 (1H, с), 7,97 (1H, д, $J=5,9$), 7,59 (2H, д, $J=8,4$), 7,22 (3H, м), 7,08 (1H, с), 7,04 (1H, с), 7,00 (1H, м), 6,90 (2H, с), 6,77 (2H, м), 6,55 (1H, с), 6,30 (3H, м), 5,75 (2H, с), 5,55 (3H, м), 5,42 (1H, м), 5,23 (1H, д, $J=12,4$), 4,76 (1H, д, $J=12,1$), 4,33 (1H, м), 4,22 (2H, м), 4,10 (3H, м), 4,00 (3H, м), 3,80 (5H, м), 3,70 (3H, с), 3,17 (1H, д, $J=5,1$), 3,03 (3H, м), 2,87 (4H, м), 2,61 (3H, м), 2,26 (4H, м), 1,77 (10H, м), 1,19 (3H, д, $J=7,0$), 0,89 (3H, м), 0,79 (6H, т, $J=6,4$).

ЖХМС, Система 2: 1,23 мин.; m/z (ES^+): 946,35 ($\text{M}+\text{H}^+$).

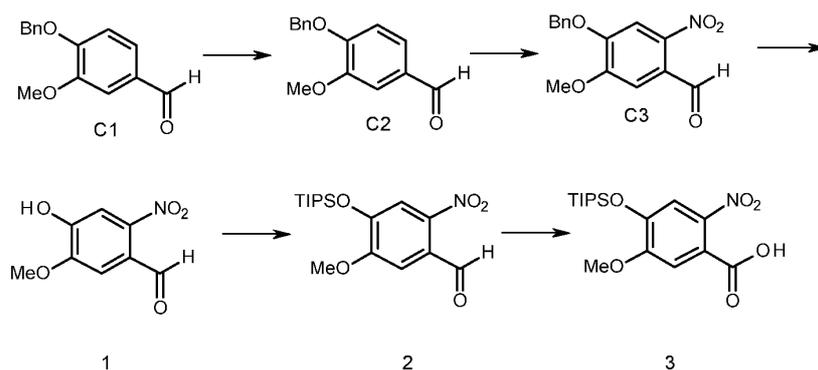
(xi) (11S,11aS)-4-((20S,23S)-1-йод-20-изопропил-23-метил-2,18,21-триоксо-6,9,12,15-тетраокса-3,19,22-триазетатракозанамидо)бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси-5-оксо-2-((E)-проп-1-ен-1-ил)-5,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2-((E)-проп-1-ен-1-ил)-11,11a-дигидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат, (26).

$\text{N,N}'$ -диизопропилкарбодиимид (DIC, 32 мкл, 0,208 ммоль) добавляли к раствору неочищенного 25 (0,208 ммоль) и иодоацетатамид(PEG)₄ кислоты (90 мг, 0,208 ммоль) в хлороформе (8 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч и присутствие исходного вещества все еще наблюдали посредством ЖХ/МС. Добавляли дополнительное количество $\text{N,N}'$ -диизопропилкарбодиимида (0,104 ммоль) и иодоацетатамид(PEG)₄ кислоты (0,104 ммоль) к реакционной смеси и оставляли взаимодействовать в течение ночи при 4°C . Реакционную смесь загружали непосредственно на силикагель и подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; от 100% дихлорметана до 5% метанола в дихлорметане). Чистые фракции собирали и объединяли и избыток элюента удаляли с помощью ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением 26 (149 мг, 53% за 2 стадии).

δ_{H} (DMCO-d_6): 9,92 (1H, с), 8,17 (1H, д, $J=6,5$), 7,97 (1H, д, $J=3,9$), 7,86 (1H, д, $J=8,6$), 7,54 (2H, м), 7,33 (1H, с), 7,17 (2H, м), 7,07 (1H, м), 6,88 (2H, ш. с), 6,78 (2H, м), 6,30 (2H, м), 5,56 (3H, м), 5,11 (1H, м), 4,86 (1H, м), 4,38 (2H, м), 4,20 (2H, м), 4,10 (2H, м), 4,06 (1H, с), 4,00 (1H, м), 3,80 (4H, м), 3,74 (2H, м), 3,64 (2H, с), 3,59 (2H, т, $J=6,4$), 3,49 (9H, м), 3,40 (4H, м), 3,25 (2H, м), 3,20 (2H, м), 3,00 (2H, м), 2,63 (2H, м), 2,40 (3H, м), 2,19 (3H, м), 1,95 (1H, м), 1,78 (5H, м), 1,28 (4H, м), 0,84 (6H, дд, $J=15,9, 6,7$).

ЖХМС, Система 2: 1,54 мин; m/z (ES^+): 1361,40 ($\text{M}+\text{H}^+$); Система 3: 6,14 мин; m/z (ES^+): 1361,40 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Пример 5. Дополнительный синтез 17 (i) 5-метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)бензойная кислота (3)



(a) C2.

1. Загружали 500 мл безводного CH_3CN (чистый для анализа реагент, 5 об.) в колбу объемом 2 л.
2. Загружали 99,0 г C1 (1,0 экв.) в колбу.
3. Загружали 99,6 г порошка K_2CO_3 (чистый для анализа реагент, 1,1 экв.) в колбу.
4. Нагревали до 40~50°C.
5. По каплям медленно 123,2 г бензилбромида (химически чистый, 95%, 1,1 экв.).
6. Нагревали до 50~60°C.
7. Перемешивали в течение 4 ч.
8. Образец для ИРС (условие приемлемости завершения: $\text{SM} \leq 2,0\%$ по ВЭЖХ).
9. Охлаждали до 20~25°C.
10. Выливали смесь в лед-воду (1,5 л, 15 об).
11. Перемешивали в течение примерно 1 ч.
12. Фильтровали.
13. Промывали фильтрационный остаток водой (50 мл, 0,5 об.).
14. Суспендировали фильтрационный остаток гексаном (200 мл, 2 об.).
15. Фильтровали и собирали твердое вещество.
16. Сушили продукт с использованием вакуумного сушильного шкафа при 25-30°C в течение 20 ч (внутреннее давление приблизительно 20-50 мм рт.ст.).
17. Информация о продукте (145,0 г, Чистота: 99%; Выход: 92%).

(b) C3.

1. Загружали 2,5 л конц. HNO_3 (70%, 5 об.) в колбу объемом 5 л.
2. Охлаждали до 2~7°C.
3. Загружали 500 г C2 (1,0 экв.) порцией при поддержании температуры при 2~7°C.
4. Перемешивали в течение 8 ч при 2~7°C.
5. Отбирали образец для ИРС (Условие приемлемости завершения: $\text{SM} \leq 2,0\%$ по ВЭЖХ).
6. Выливали смесь в лед-воду (7,5 л, 15 об).
7. Перемешивали в течение примерно 1 ч.
8. Фильтровали.
9. Промывали фильтрационный остаток водой (500 мл, 1 об.).
10. Сушили продукт в вакууме.
11. Перекристаллизовывали (перемешивали при 70~80°C в течение 1 ч, частичное растворение) твердый продукт с помощью EtOAc (1 л, 2 об.).
12. Фильтровали.
18. Сушили продукт Сушили продукт с использованием вакуумного сушильного шкафа при 20-30°C в течение 26 ч (внутреннее давление приблизительно 20-50 мм рт.ст.).
13. Информация о продукте (420,0 г, Чистота: 98%; Выход: 71%).

(c) 1.

1. Загружали 600 мл TFA (1,5 об.) в колбу объемом 2 л.
2. Нагревали до 40~50°C.
3. Загружали 400 г C3 (1,0 экв.) в колбу медленно порциями.
4. Нагревали до 75~85°C.
5. Перемешивали в течение 2 ч при 75~85°C.
6. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: $\text{SM} \leq 2,0\%$ по ВЭЖХ).
7. Охлаждали реакционную смесь до 40~50°C.
8. Концентрировали реакционную смесь в вакууме при 40~50°C.
9. Суспендировали неочищенный продукт с МТВЕ (400 мл, 1 об.).
10. Фильтровали и собирали твердое вещество.
11. Сушили продукт с использованием вакуумного сушильного шкафа при 20-30°C в течение 30 ч (внутреннее давление приблизительно 20-50 мм рт.ст.).

12. Информация о продукте (247,0 г, Чистота: 98%; Выход: 90%).

(d) 2.

1. Загружали 15,75 л CH_2Cl_2 (5 об.) в реактор объемом 50 л.

2. Загружали 3,15 кг 1 (1,0 экв.) в реактор.

3. Охлаждали до 0-10°C.

4. Загружали 1,78 кг безводного Et_3N (чистый для анализа реагент, 1,2 экв.) медленно в реактор.

5. Перемешивали в течение 0,5 ч.

6. Медленно загружали 3,08 кг TIPSCl (1,1 экв.) в реактор.

7. Нагревали до 5-15°C.

8. Перемешивали в течение 2 ч.

9. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: $\text{SM} \leq 2,0\%$ по ВЭЖХ).

10. Концентрировали указанную смесь в вакууме при 25-35°C.

11. Чистота неочищенный продукт с помощью колоночной хроматографии, элюируя 5% этилацетатом в петролейном эфире.

12. Суспендировали неочищенный продукт с гексаном (1,6 л, 0,5 об.).

13. Фильтровали и собирали твердое вещество.

14. Сушили продукт с использованием вакуумного сушильного шкафа при 25-30°C в течение 18 ч (внутреннее давление приблизительно 20-50 мм рт.ст.).

15. Информация о продукте (4,6 кг, Чистота: 98%; Выход: 81%).

(e) 3.

1. Загружали 1,4 л H_2O (7 об.) в колбу объемом 5 л.

2. Загружали 112,6 г NaClO_2 (твердый, чистый для анализа реагент, 82% активного реагента, 2,2 экв.) в колбу.

3. Загружали 88,2 г NaH_2PO_4 (1,3 экв.) в колбу.

4. Загружали раствор 2 (200,0 г, 1,0 экв.) в ТГФ (1,0 л, 5 об.) в колбу.

5. Загружали 115,5 мл H_2O_2 (чистый для анализа реагент, 30% мас./мас., 2,0 экв.) в колбу.

6. Нагревали до 40-50°C.

7. Перемешивали в течение 1 ч.

8. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: $\text{SM} \leq 2,0\%$ по ВЭЖХ).

9. Охлаждали до 20-30°C.

10. Подкисляли указанную смесь с использованием 1 М HCl до pH 2.

11. Отделяли органическую фазу.

12. Экстрагировали водную фазу этилацетатом (1,4 л, 7 об.).

13. Отделяли органическую фазу.

14. Экстрагировали водную фазу этилацетатом (1,0 л, 5 об.).

15. Отделяли органическую фазу.

16. Объединяли органическую фазу.

17. Промывали органическую фазу солевым раствором (1,0 л, 5 об.).

18. Сушили над Na_2SO_4 (Na_2SO_4 легче фильтровать).

19. Фильтровали и концентрировали указанную смесь в вакууме при 30-40°C.

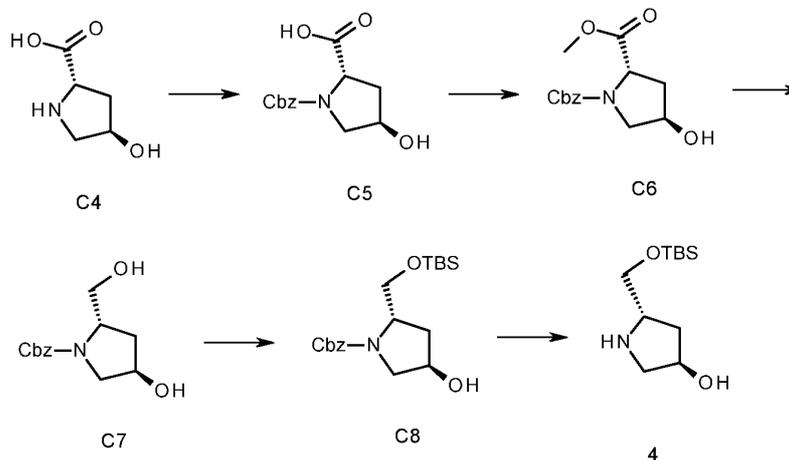
20. Суспендировали неочищенный продукт с гексаном (200 мл, 1 об.).

21. Фильтровали и собирали твердое вещество.

22. Сушили продукт с использованием вакуумного сушильного шкафа при 25-30°C в течение 16 ч (внутреннее давление приблизительно 20-50 мм рт.ст.).

23. Информация о продукте (188 г, чистота: 99%; выход: 90%).

(ii) 4



(a) C5.

1. Загружали транс-4-гидрокси-L-пролин C4 (100 г, 1,0 экв.) в реактор.
2. Загружали ледяную воду (1,2 л, 6 об./мас.) в реактор при перемешивании при $15\pm 5^\circ\text{C}$.
3. Загружали NaHCO_3 (160,3 г, 2,5 экв.) в виде твердого вещества в указанный раствор,
4. Добавляли по каплям раствор CbzCl (143,0 г, 1,1 экв.) в толуоле (400 мл, 4 об./мас.) за 30 мин.
5. Перемешивали указанную смесь при комнатной температуре в течение 18 ч.
6. Образец из водного слоя показал $\text{SM} < 2,0\%$. Разделяли указанные две фазы.
7. Промывали водную фазу EtOAc (1×3 об.), охлаждали на ледяной бане и затем подкисляли до pH 2 с помощью конц. HCl .
8. Экстрагировали водный слой EtOAc (3×4 об.) и объединенные органические экстракты и сушили над Na_2SO_4 .
9. Удаляли растворитель в вакууме с получением бесцветного вязкого масла. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 29,2^\circ$ ($c = 0,1$ г/100 мл в метаноле).

(b) C6.

1. Загружали C5 (90,0 г, 1,0 экв.) в реактор.
2. Загружали MeOH (540 мл, 6 об./мас.) в реактор при перемешивании при $15\pm 5^\circ\text{C}$.
3. Загружали H_2SO_4 (4,5 г, 0,05 экв.) в указанный раствор. Нагревали указанную смесь до $65\pm 5^\circ\text{C}$ и поддерживали кипение в течение 4 ч.
4. Отбирали образец для ИРС по ВЭЖХ (условие завершения: $\text{C5} < 2,0\%$).
5. Охлаждали указанную смесь до $25\pm 5^\circ\text{C}$.
6. Загружали Et_3N (18 г, 0,2 экв.) в реактор, перемешивали в течение дополнительных 30 мин.
7. Затем концентрировали указанную смесь до минимального объема в вакууме при $35\pm 5^\circ\text{C}$.
8. Растворяли остаток в EtOAc (5 об./мас.) и промывали его водой (1 об./мас.).
9. Отделяли органическую фазу и промывали ее солевым раствором (1 об./мас.).
10. Отделяли органическую фазу и сухой ее безводным Na_2SO_4 .
11. Концентрировали раствор до минимального объема в вакууме при $35\pm 5^\circ\text{C}$ с получением желтого вязкого масла. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -66,9^\circ$ ($c = 0,016$ г/100 мл в хлороформе).

(c) C7.

1. Загружали C6 (90,0 г, 1,0 экв.) в реактор.
2. Загружали ТГФ (450 мл, 5 об./мас.) в реактор при перемешивании при $0\pm 5^\circ\text{C}$.
3. Загружали LiBH_4 (11,0 г, 1,5 экв.) в указанный раствор.
4. Перемешивали смесь в течение 30 мин при $0\pm 5^\circ\text{C}$, оставляли указанную смесь нагреваться до комнатной температуры.
5. Перемешивали указанную смесь при комнатной температуре в течение 4 ч, отбирали образец для ИРС по ВЭЖХ через 4 ч (условие завершения: $\text{C6} < 2,0\%$).
6. Охлаждали до 0°C , разбавляли водой (5 об.), и обрабатывали каплями вод. HCl (4 об., 2 М), в ходе чего наблюдали активное выделение пузырьков.
7. Концентрировали в вакууме с удалением ТГФ, и экстрагировали указанный водный остаток $i\text{PrOAc}$ (3 об.×4).
8. Затем промывали органическую фазу солевым раствором (3 об.) и сушили над Na_2SO_4 .
9. Концентрировали в вакууме и получали бесцветный продукт. $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -41,6^\circ$ ($c = 0,93$ г/100 мл в хлороформе).

(d) C8.

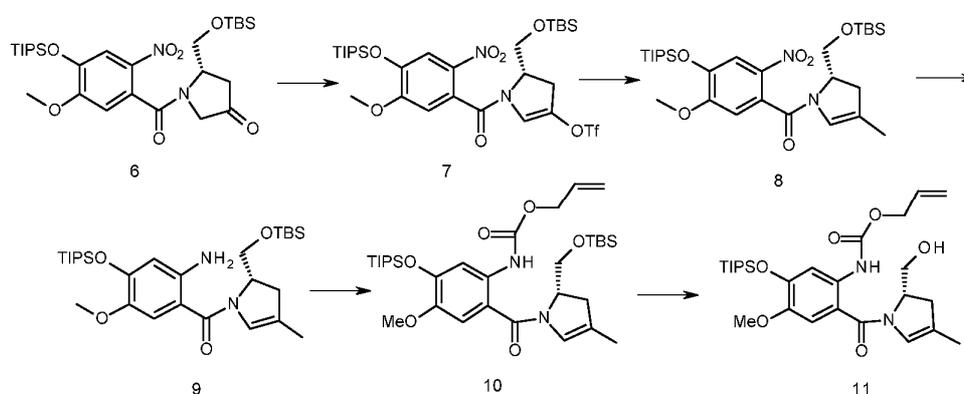
1. Загружали C7 (1,0 экв.) в реактор.
2. Загружали толуол (5 об./мас.) в реактор при перемешивании.
3. Загружали ТЕА (1,5 экв.) в указанный раствор.
4. Повышали до 50°C . Затем загружали TBSCl (1,1 экв.) в реактор.
5. Проводили взаимодействие в течение 18 ч при 60°C .
6. Отбирали образец для ИРС по ВЭЖХ (условие завершения: исходное вещество менее $5,0\%$).
7. Охлаждали до 30°C , гасили NH_4Cl (вод.) (3 об./мас.), отделяли органическую фазу.
8. Затем промывали солевым раствором (3 об.) и сушили над Na_2SO_4 . Концентрировали в вакууме и получали коричневый продукт. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = 52,4^\circ$ ($c = 0,94$ г/100 мл в хлороформе).

(e) 4

1. Загружали C8 (1,0 экв.) в реактор.
2. Загружали ИРА (8 об./мас.) в реактор при перемешивании.
3. Загружали Pd/C (0,05 мас./мас.) в указанный раствор.
4. Перемешивали при $10\text{--}20^\circ\text{C}$. Затем загружали H_2 в реактор.
5. Проводили взаимодействие в течение 18 ч при $10\text{--}20^\circ\text{C}$.
6. Отбирали образец для ИРС по ВЭЖХ (условие завершения: исходное вещество менее $1,0\%$).
7. Фильтровали реакционную смесь.
8. Концентрировали фильтрат при $35\pm 5^\circ\text{C}$ в вакууме.

15. Фильтровали и собирали фильтрат.
16. Промывали фильтрационный остаток МТВЕ (200 мл, 2 об.).
17. Объединяли органическую фазу.
18. Промывали органическую фазу насыщенным водным бикарбонатом натрия (300 мл, 3 об.).
19. Отделяли органическую фазу.
20. Экстрагировали водную фазу МТВЕ (100 мл, 1 об.).
21. Отделяли органическую фазу.
22. Объединяли органическую фазу.
23. Промывали органический слой насыщенным водным бикарбонатом натрия (300 мл, 3 об.).
24. Отделяли органическую фазу.
25. Промывали органическую фазу водой (300 мл, 3 об.).
26. Отделяли органическую фазу.
27. Сушили над Na_2SO_4 .
28. Фильтровали и концентрировали указанную смесь в вакууме при 25~35°C.
29. Сушили продукт в воздухе при комнатной температуре в течение 48 ч.
30. Информация о продукте (90 г, чистота: 98%; Выход: 90%) $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -25,1^\circ$ ($c=0,98$ г/100 мл в хлороформе).

(iv) 11



(a) 7.

1. Загружали 30 мл безводного ДХМ (чистый для анализа реагент)(6 об.) в колбу объемом 100 мл.
2. Загружали 5 г 6 (1,0 экв.) в колбу в атмосфере азота.
3. Охлаждали до -50°C.
4. Загружали 2,8 г Лутидина (химически чистый) (3,0 экв.) в колбу.
5. По каплям 6,1 г $(\text{Tf})_2\text{O}$ (химически чистый) (2,5 экв.) медленно при поддержании температуры при -55~-45°C.
6. Перемешивали в течение 2,0 ч при -50°C.
7. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: $6 \leq 2,0\%$ по ЖС-МС).
8. Выливали смесь в насыщ. водный NaHCO_3 (5 об.).
9. Перемешивали в течение примерно 15 мин.
10. Отделяли органическую фазу и промывали ее солевым раствором (5 об.).
11. Отделяли органическую фазу и сушили над безводным Na_2SO_4 .
12. Фильтровали и концентрировали органическую фазу в вакууме при 30~40°C досуха.
13. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель: 15/1, об./об., гексан/этилацетат).
14. Собирали чистые фракции и удаляли растворитель в вакууме при 30~40°C.
15. Сушили продукт в стеклянной бутылке с использованием испарителя в вакууме при 30~40°C до постоянного количества (внутреннее давление составляло приблизительно 20-50 мм рт.ст.).
16. Информация о продукте: коричневое масло (4,3 г, Чистота: 85,0%; Выход: 70,0%). $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -52,97^\circ$ ($c=0,202$ г/100 мл в хлороформе).

(b) 8.

1. Загружали 7,0 л безводного толуола (чистый для анализа реагент)(8 об.) в колбу объемом 20 л.
2. Загружали 880 г 7 (1,0 экв.), 258,6 г $\text{MeV}(\text{OH})_2$ (химически чистый) (3,5 экв.) и 1,57 кг K_3PO_4 (химически чистый)(6,0 экв.) в атмосфере азота.
3. Загружали 214,0 г $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (химически чистый) (0,15 экв.).
4. Перемешивали в течение примерно 30 мин при 60°C.
5. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: $7 \leq 2,0\%$ по ЖС-МС).
6. Фильтровали и собирали фильтрат.
7. Промывали фильтрат водой (5 об.).

8. Отделяли органическую фазу и промывали ее насыщ. водным NaHCO_3 (5 об.).
 9. Отделяли органическую фазу и промывали ее соевым раствором (5 об.).
 10. Отделяли органическую фазу и сушили над безводным Na_2SO_4 .
 11. Фильтровали и концентрировали органическую фазу в вакууме при 50~60°C досуха.
 12. Подвергали остаток колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 10/1, об./об., гексан/этилацетат).
 13. Собирали чистые фракции и концентрировали их в вакууме при 30~40°C.
 14. Сушили продукт в стеклянной бутылке с использованием испарителя в вакууме при 30~40°C до постоянного количества (внутреннее давление составляло приблизительно 20-50 мм рт.ст.).
 15. Информация о продукте: коричневое масло (470,0 г, Чистота: 93,4%; Выход: 66,0%).
- (с) 9.
1. Загружали 2,60 кг Zn (химически чистый)(37,0 экв.) в колбу объемом 20 л.
 2. Загружали 6,3 л EtOH (чистый для анализа реагент)/ HCO_2H (10/0,05)(10 об.).
 3. Охлаждали до 5°C.
 4. Добавляли раствор 8 (623 г, 1,0 экв.) в EtOH (1,5 л, 2,5 об.) к указанной смеси по каплям при перемешивании.
 5. Поддерживали температуру при 5±5°C и перемешивали в течение 1 ч.
 6. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: 8 ≤2,0% по ЖС-МС).
 7. Фильтровали и собирали фильтрат.
 8. Выливали фильтрат в EtOAc (20 об.) и промывали его водой (20 об.).
 9. Отделяли органическую фазу и промывали ее насыщ. водным NaHCO_3 (20 об.).
 10. Отделяли органическую фазу и промывали ее соевым раствором (20 об.).
 11. Отделяли органическую фазу и сушили над безводным Na_2SO_4 .
 12. Фильтровали и концентрировали органическую фазу в вакууме.
 13. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 5/1, об./об., гексан/этилацетат).
 14. Собирали чистые фракции и концентрировали их в вакууме при 30~40°C.
 15. Сушили продукт в стеклянной бутылке с использованием испарителя в вакууме при 30~40°C до постоянного количества (внутреннее давление составляло приблизительно 20-50 мм рт.ст.).
 16. Информация о продукте: коричневое масло (470,0 г, Чистота: 97,0% Выход: 79,6%). $[\alpha]_D^{23}$ -176,47° (с=0,187 г/100 мл в хлороформе).
- (d) 10.
1. Загружали 6,1 л ДХМ (чистый для анализа реагент) (13 об.) и 470 г 9 (1,0 экв.) в колбу объемом 10 л.
 2. Охлаждали до -85°C.
 3. Загружали в колбу 149,0 г пиридина (чистый для анализа реагент) (2,2 экв.).
 4. По каплям добавляли в колбу 113,5 г аллилхлорформиата (химически чистый) (1,1 экв.) медленно при поддержании температуры при -85~-75°C.
 5. Перемешивали в течение 30 мин при -85~-75°C.
 6. Нагревали до комнатной температуры.
 7. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: 9 ≤2,0% по ЖС-МС).
 8. Загружали ДХМ (чистый для анализа реагент) (10 об.) и насыщенный водный сульфат меди(20 об.).
 9. Отделяли органическую фазу и промывали ее насыщ. водным NaHCO_3 (20 об.).
 10. Отделяли органическую фазу и промывали ее соевым раствором (20 об.).
 11. Отделяли органическую фазу и сушили над безводным Na_2SO_4 .
 12. Фильтровали и концентрировали органическую фазу в вакууме при 25~35°C.
 13. Сушили продукт в стеклянной бутылке с использованием испарителя в вакууме при 30~40°C до постоянного количества (внутреннее давление составляло приблизительно 20-50 мм рт.ст.).
 14. Информация о продукте: коричневое масло (515,0 г, Чистота: 95,9% Выход: 95,0%). $[\alpha]_D^{23}$ -90,40° (с=0,177 г/100 мл в хлороформе).
- (e) 11.
1. Загружали 2,1 л $\text{AcOH/MeOH/THF/H}_2\text{O}$ (7:1:1:2)(4 об.) в колбу объемом 5 л.
 2. Загружали 515,0 г 10 в колбу.
 3. Перемешивали в течение 1 ч при 25~30°C.
 4. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: SM ≤2,0% по ЖС-МС).
 5. Загружали EtOAc (чистый для анализа реагент) (30 об.) и воду (20 об.).
 6. Отделяли органическую фазу и промывали ее насыщ. водным NaHCO_3 (20 об.).
 7. Отделяли органическую фазу и промывали ее соевым раствором (20 об.).
 8. Отделяли органическую фазу и сушили над безводным Na_2SO_4 .
 9. Фильтровали и концентрировали органическую фазу в вакууме.

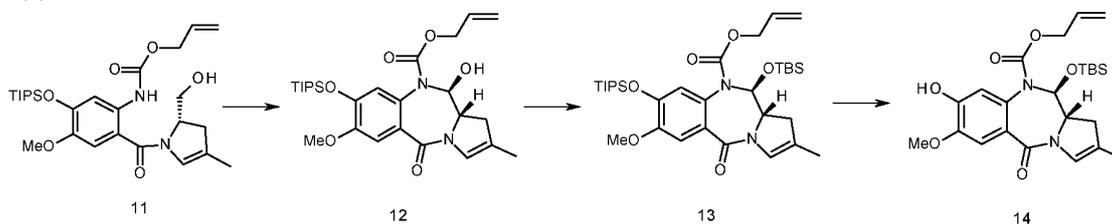
10. Подвергли остаток колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 4/1, об./об., гексан/этилацетат).

11. Собирали чистые фракции и концентрировали их в вакууме при 30~40°C.

12. Сушили продукт в стеклянной бутылке с использованием испарителя в вакууме при 30~40°C до постоянного количества (внутреннее давление составляло приблизительно 20-50 мм рт.ст.).

13. Информация о продукте (337,6 г, Чистота: 99,0%; Выход: 80,0%) [α]_D²⁸ -80,95° (с=0,231 г/100 мл в хлороформе).

(v) 14



(a) 12.

1. Загружали 500 мл безводного ДХМ (чистый для анализа реагент) (10 об.) в колбу объемом 2 л.

2. Загружали 14,7 г (COCl)₂ (химически чистый) (1,2 экв.) в колбу в атмосфере азота.

3. Охлаждали до -78°C.

4. По каплям 18,8 г безводного ДМСО (чистый для анализа реагент) (2,5 экв.) медленно при поддержании температуры при -78~-70°C.

5. По каплям 50,0 г 11 (1,0 экв.) в безводном ДХМ (чистый для анализа реагент) в колбу при поддержании температуры при -78~-70°C.

6. Перемешивали в течение 15 мин.

7. По каплям 50,0 г ТЕА (чистый для анализа реагент) (5,0 экв.) в колбу.

8. Перемешивали в течение 2 ч.

9. Отбирали образец для ИРС (условие приемлемости завершения: SM ≤2,0% по ЖС-МС).

10. Выливали смесь в 0,1 молярную смесь лед-хлористоводородная кислота (5 об.).

11. Перемешивали в течение примерно 15 мин.

12. Отделяли органическую фазу и промывали ее насыщ. водным NaHCO₃ (5 об.).

13. Отделяли органическую фазу и промывали ее солевым раствором (5 об.).

14. Отделяли органическую фазу и сушили над безводным Na₂SO₄.

15. Фильтровали и концентрировали органическую фазу в вакууме при 30~40°C досуха.

16. Подвергли остаток колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 1/3, об./об., гексан/этилацетат).

17. Собирали чистые фракции и концентрировали их в вакууме при 30~40°C досуха.

18. Информация о продукте (30,3 г, Чистота: 97,7%; Выход: 61,3%). [α]_D²⁵ 101,95° (с=0,205 г/100 мл в хлороформе).

(b) 13.

1. Загружали 1,1 л безводного ДХМ (чистый для анализа реагент) (20 об.) в колбу объемом 2 л.

2. Охлаждали до 0°C.

3. Загружали 55 г 12 (1,0 экв.) и лутидина (чистый для анализа реагент) (4,0 экв.).

4. Медленно по каплям 84,4 г TBSOTf (химически чистый) (3,0 экв.) при поддержании температуры при 0~5°C.

5. Перемешивали в течение примерно 15 мин при 0~5°C.

6. Перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч.

7. Отбирали образец для ИРС (Условие приемлемости завершения: 12 ≤2,0% по ЖС-МС).

8. Выливали смесь в воду (1,1 л, 20 об.).

9. Перемешивали в течение примерно 30 мин

10. Отделяли органическую фазу и промывали ее насыщ. водным NaHCO₃ (5 об.).

11. Отделяли органическую фазу и промывали ее солевым раствором (5 об.).

12. Отделяли органическую фазу и сушили над безводным Na₂SO₄.

13. Фильтровали и концентрировали органическую фазу в вакууме при 30~40°C досуха.

14. Информация о продукте (62,0 г неочищенного). [α]_D²⁵ 54,62° (с=0,216 г/100 мл в хлороформе).

(c) 14.

1. Загружали 12 мл ДМФА (чистый для анализа реагент)/H₂O(50/1) (12 об.) и 1 г 13 (1,0 экв.) в колбу объемом 50 мл.

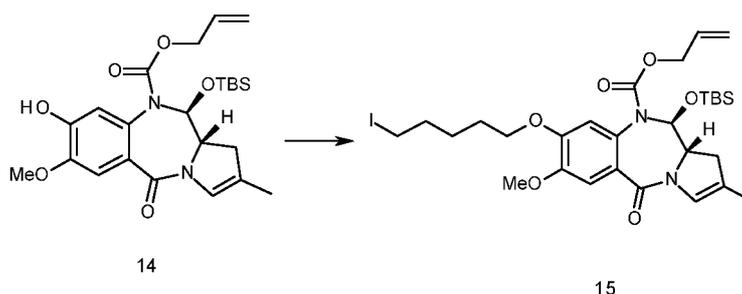
2. Загружали 0,16 г LiOAc (химически чистый) (1,0 экв.) в колбу.

3. Перемешивали в течение 4 ч при 25°C.

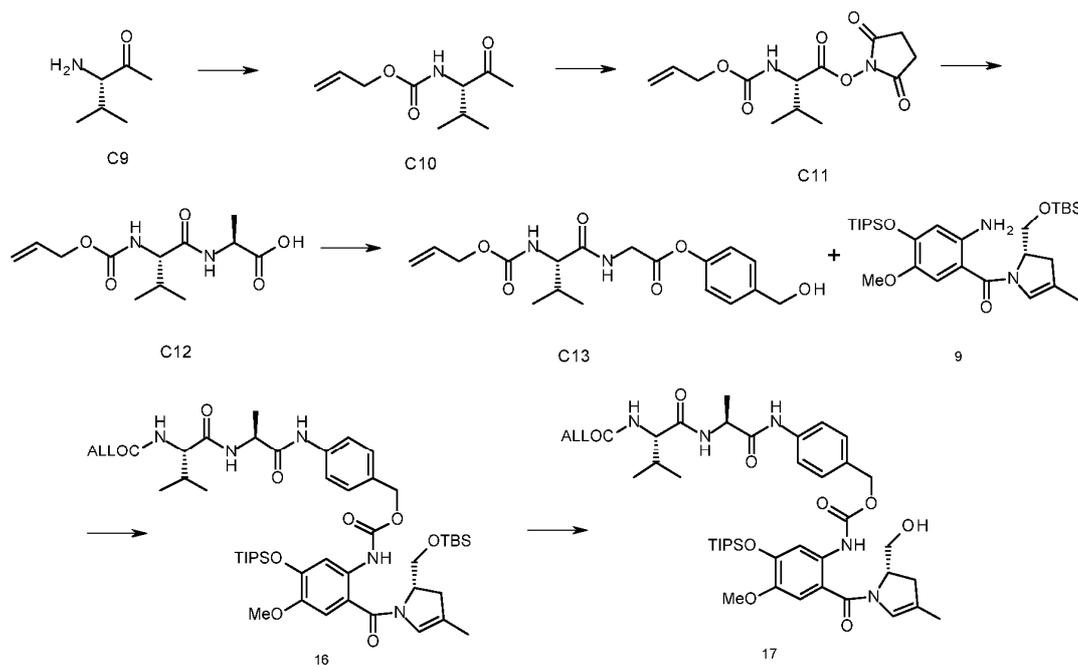
4. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: 13 ≤2,0% по ЖС-МС).

5. Выливали смесь в EtOAc (25 мл, 25 об.).

6. Промывали органическую фазу цитратным раствором (20 об.).
 7. Отделяли органическую фазу и промывали ее водой (20 об.).
 8. Отделяли органическую фазу и промывали ее солевым раствором (20 об.).
 9. Отделяли органическую фазу и сушили над безводным Na_2SO_4 .
 10. Фильтровали и концентрировали органическую фазу в вакууме.
 11. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 1/3, об./об., гексан/этилацетат).
 12. Собирали чистые фракции и концентрировали их в вакууме при 30–40°C досуха.
 13. Информация о продукте (0,6 г, Чистота: 99%; Выход: 80%). $[\alpha]_{\text{D}}^{28} 59,73^\circ$ ($c=0,216$ г/100 мл в хлороформе).
- (vi) 15



1. Загружали 400 мл безводного ацетона (чистый для анализа реагент, 10 об.) и 40 г 14 (1,0 экв.) в колбу объемом 1 л.
 2. Загружали в колбу 136,5 г дийодпентана (чистый для анализа реагент) (5,0 экв.) и измельченный K_2CO_3 (чистый для анализа реагент, 1 экв.).
 3. Нагревали до 60°C.
 4. Перемешивали в течение 10 ч.
 5. Отбирали образец для ИРС (условие приемлемости завершения: $14 \leq 2,0\%$ по ЖС-МС).
 6. Концентрировали указанную смесь с удалением растворителя в вакууме при 30–40°C.
 7. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (силикагель; 1/1, об./об., гексан/этилацетат).
 8. Собирали чистые фракции и концентрировали с удалением растворителя в вакууме при 30–40°C.
 9. Сушили продукт в стеклянной бутылке с использованием испарителя в вакууме при 30–40°C в течение 8 ч (внутреннее давление 20–40 мм рт.ст.).
 10. Информация о продукте (49,7 г, Чистота: 98,6%; Выход: 88,0%). $[\alpha]_{\text{D}}^{28} 60,21^\circ$ ($c=0,204$ г/100 мл в хлороформе).
- (vii) 17



(a) C10

1. Загружали 24 г L-валина C9 (1,0 экв.) в четырехгорлую круглодонную колбу объемом 2 л, снаб-

женную механической мешалкой и капельной воронки для выравнивания давления.

2. Загружали в колбу 480 мл ТГФ (чистый для анализа реагент, 20 об.).
3. Загружали в колбу 480 мл воды (20 об.).
4. Охлаждали раствор до 5°C.
5. Загружали в колбу 42,5 г порошка K_2CO_3 (чистый для анализа реагент, 1,5 экв.).
6. Добавляли в колбу по каплям 29,7 г аллилхлорформиата (химически чистый, 1,2 экв.) при перемешивании при 5~10°C.
7. Удаляли охлаждающую баню после завершения добавления.
8. Перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре.
9. Отбирали образец для ИРС (условие приемлемости завершения: $C9 \leq 3,0\%$ по ВЭЖХ).
10. Выпаривали ТГФ при пониженном давлении
11. Экстрагировали оставшийся раствор МТВЕ (3V×2).
12. Подкисляли водную часть до pH 2 с помощью конц. HCl
13. Экстрагировали водным раствором ДХМ (5 об.×3).
14. Промывали объединенные органические экстракты соевым раствором (4 об.),
15. Отделяли органическую фазу.
16. Сушили над Na_2SO_4 .
17. Фильтровали и концентрировали указанную смесь в вакууме при 25~35°C с получением бесцветного масла (38 г, Чистота: 92%, Выход: 88%), $[\alpha]_D^{23} -4,5^\circ$ ($c=0,229$ г/100 мл в MeOH).

(b) C11

1. Загружали 18 г C11 (1,0 экв.) в колбу объемом 500 мл, снабженную механической мешалкой и капельной воронки для выравнивания давления.
2. Загружали 180 мл ТГФ (чистый для анализа реагент, 10 об.).
3. Загружали 10,3 г HOSu (1,0 экв.).
4. Охлаждали до 2~7°C.
5. Добавляли раствор DCC (18,4 г, 1,0 экв.) в ТГФ (чистый для анализа реагент, 70 мл, 4 об.) к указанной смеси по каплям при перемешивании.
6. Перемешивали в течение 3 ч при 2~7°C.
7. Удаляли охлаждающую баню.
8. Перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч.
9. Отбирали образец для ИРС (Условие приемлемости завершения: $C10 \leq 2,0\%$ по ВЭЖХ).
10. Отфильтровывали осадок.
11. Промывали фильтрационный остаток ТГФ (20 мл, 1V).
12. Концентрировали объединенный фильтрат при пониженном давлении.
13. Растворяли остаток в ДХМ (чистый для анализа реагент, 3 об.).
14. Перемешивали при 0°C в течение 30 мин.
15. Отфильтровывали твердое вещество.
16. Промывали фильтрационный остаток ДХМ (20 мл, 1 об.).
17. Концентрировали объединенный фильтрат при пониженном давлении с получением белого твердого вещества
18. Информация о продукте (26 г, Чистота: 88%, Выход: 100%).

(c) C12

1. Загружали 18 г L-аланина (1,0 экв.) в колбу объемом 1 л.
2. Загружали в колбу 8,1 г $NaHCO_3$ (1,1 экв.).
3. Загружали 260 мл ТГФ (чистый для анализа реагент, 10 об.).
4. Загружали 260 мл воды (10 об.).
5. Охлаждали до 2~7°C.
6. Добавляли по каплям раствор C11 (26 г, 1,0 экв.) в ТГФ (100 мл, 4 об.) к указанной смеси при перемешивании.
7. Перемешивали в течение 1 ч при 2~7°C.
8. Удаляли охлаждающую баню.
9. Перемешивали в течение 18 ч при 20~30°C.
10. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: $C11 \leq 2,0\%$ по ВЭЖХ).
11. Концентрировали реакционную смесь в вакууме до 10 об. при 40~50°C.
12. Подкисляли указанную смесь 20% HCl до pH 2~3 с выпадением в осадок продукта;
13. Фильтровали и собирали твердое вещество.
14. Промывали водой.
15. Сушили продукт с использованием вакуумного сушильного шкафа при 45-50°C в течение 30 ч (внутреннее давление приблизительно 20-50 мм рт.ст.).
16. Информация о продукте (твердое вещество, 13 г, Чистота: 89%; Выход: 57%, за 3 стадии). $[\alpha]_D^{23} -51,71^\circ$ ($c=0,205$ г/100 мл в MeOH).

(d) C13

1. Загружали C12 (20 г, 1,0 экв.) в реактор объемом 1 л.
2. Загружали в реактор п-аминобензиловый спирт (9,6 г, 1,0 экв.).
3. Загружали в реактор ТГФ (400 мл, 20 об.).
4. Загружали в реактор EEDQ (19,2 г, 1,0 экв.).
5. Перемешивали в течение 60 ч при 20-30°C.
6. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: C12 \leq 2,0% по ВЭЖХ).
7. Выливали реакционную смесь в МТВЕ (1,2 л, 60 об.) при перемешивании с выпадением в осадок продукта.
8. Фильтровали и собирали твердое вещество.
9. Промывали фильтрационный остаток МТВЕ (1,6 л, 0,5 об.).
10. Сушили продукт с использованием вакуумной печи при 25-30°C в течение 18 ч до постоянного количества (внутреннее давление приблизительно 20-50 мм рт.ст.).
11. Информация о продукте (твердое вещество, 20,0 г, Чистота: 96,0%; Выход: 72%). $[\alpha]_D^{23}$ -83,01° (с=0,206 г/100 мл в MeOH).

(e) 16

1. Загружали 9 (40 г, 1,0 экв.) в колбу объемом 3 л.
2. Загружали в колбу ДХМ (чистый для анализа реагент, 400 мл, 10 об.) в атмосфере N₂.
3. Охлаждали до -10°C.
4. Загружали трифосген (чистый для анализа реагент, 7,8 г, 0,36 экв.) к указанной смеси в атмосфере N₂.
5. Добавляли ТЕА (чистый для анализа реагент, 16,2 г, 2,2 экв.) к указанной смеси по каплям при -5±5°C.
6. Перемешивали в течение 10 мин при -5±5°C.
7. Отбирали образец для ИРС для контролирования образования изоцианата (гасили метанолом, условие завершения: 9 \leq 10,0% по ЖС-МС).
8. Загружали раствор C13 (41 г, 1,5 экв.) и триэтиламина (чистый для анализа реагент, 1,5 экв.) в су-хом ТГФ (чистый для анализа реагент, 20 об.) в колбу одной порцией при -5±5°C.
9. Перемешивали в течение 10 мин при -5±5°C.
10. Удаляли охлаждающую баню.
11. Перемешивали в течение 16 ч при 25±5°C.
12. Отбирали образец для ИРС (гасили метанолом, условие завершения: 9 \leq 10,0% по ЖС-МС).
13. Фильтровали и промывали фильтрационный остаток ДХМ (чистый для анализа реагент, 2 об.).
14. Концентрировали объединенный фильтрат в вакууме.
15. Подвергали остаток колоночной хроматографии (силикагель; 3/1, об./об., гексан/этилацетат).
16. Собирали чистые фракции и концентрировали в вакууме при 30~40°C.
17. Сушили продукт в вакуумной печи при 35-40°C в течение 10 ч до постоянного количества (внутреннее давление составляло приблизительно 20-50 мм рт.ст.).
18. Информация о продукте: беловатое твердое вещество (36 г, Чистота: 97,2%; Выход: 53%). $[\alpha]_D^{23}$ -86,43° (с=0,221 г/100 мл в хлороформе).

(f) 17

1. Загружали 6 л AcOH/MeOH ЛТФ/H₂O (10 об.:1 об.:1 об.:2 об.) в колбу объемом 10 л.
2. Загружали в колбу 416 г 16.
3. Перемешивали в течение 2 ч при 25~30°C.
4. Отбирали образец для ИРС (условие завершения: 17 \leq 2,0% по ЖС-МС).
5. Загружали EtOAc (чистый для анализа реагент, 30 об.) и воду (20 об.).
6. Отделяли органическую фазу и промывали насыщенным водным NaHCO₃ (20 об.).
7. Отделяли органическую фазу и промывали солевым раствором (20 об.).
8. Отделяли органическую фазу и сушили над безводным Na₂SO₄.
9. Фильтровали и концентрировали органическую фазу в вакууме.
10. Подвергали остаток колоночной флэш-хроматографии (силикагель; гексан/этилацетат, 1/2, об./об.).
11. Собирали чистые фракции и концентрировали в вакууме при 30~40°C.
12. Сушили продукт в вакуумной печи при 35-40°C в течение 20 ч до постоянного количества (внутреннее давление составляло приблизительно 20-30 мм рт.ст.).
13. Информация о продукте (308,8 г, Чистота: 98,1%; Выход: 85,1%).

Общие экспериментальные методики для примера 6

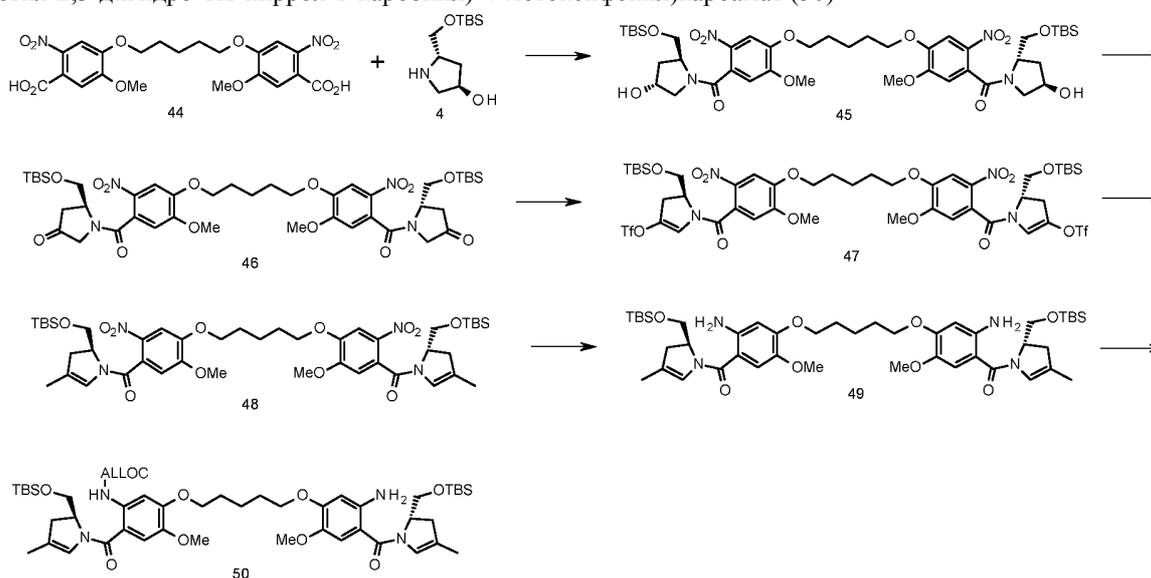
Оптическое вращение измеряли на поляриметре ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.), концентрации (с) представлены в виде г/100 мл. Температуру плавления измеряли при помощи цифрового измерителя температуры плавления (Electrothermal). ИК-спектры записывали на ИК спектрометре Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT. Спектры ¹H и ¹³C ЯМР получали при 300 К на ЯМР спектрометре Bruker Advance при 400

и 100 МГц соответственно. Химические сдвиги представлены относительно TMS ($\delta=0,0$ ppm), сигналы обозначены как с (синглет), т (дублет), т (триплет), дт (двойной триплет), тт (дублет дублетов), дд (двойной дублет дублетов) или м (мультиплет), константы спин-спинового взаимодействия даны в герцах (Гц). Данные масс-спектрометрического анализа (МС) получали на оборудовании Waters Micromass ZQ, соединенного с ВЭЖХ хроматографом Waters 2695 и детектором Waters 2996 PDA. Использовались следующие параметры системы Waters Micromass ZQ: капилляр (кВ), 3,38; конус (В), 35; экстрактор (В), 3,0; температура источника ($^{\circ}\text{C}$), 100; температура десольватации ($^{\circ}\text{C}$), 200; скорость потока подвижной фазы (л/ч), 50; расход десольватированного потока (л/ч), 250. Масс-спектрометрию высокого разрешения (HRMS) проводили в системе Waters Micromass QTOF Global в положительном W-режиме с использованием наконечников из борсиликатного стекла с металлическим покрытием для введения образцов в прибор. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на алюминиевых пластинах с силикагелем (Merck 60, F254), а для флэш-хроматографии использовали силикагель (Merck 60, 230-400 меш ASTM). За исключением HOBt (NovaBiochem) и реагентов на твердой подложке (Argonaut) все остальные химические реактивы и растворители приобретали в Sigma-Aldrich, и их применяли в поставляемом виде без дополнительной очистки. Безводные растворители получали путем перегонки в атмосфере сухого азота в присутствии соответствующего осушителя и хранили над молекулярными ситами 4Å или над натриевой проволокой. Петролейный эфир относится к фракции, кипящей при 40-60 $^{\circ}\text{C}$.

Общие условия ЖХ/МС: ВЭЖХ (Waters Alliance 2695) проводили с применением подвижных фаз: воды (А) (муравьиная кислота 0,1%) и ацетонитрила (В) (муравьиная кислота 0,1%). Градиент: начальный состав-5% В, за 1,0 мин, затем 5% В до 95% В за 2,5 мин. Состав подвижной фазы сохраняли в течение 0,5 мин на уровне 95% В, а затем возвращали к уровню 5% В за 0,1 мин, и удерживали в течение 0,9 мин. Общее время градиентного анализа составляет 5 мин. Скорость потока: 3,0 мл/мин, 400 мкл вводили при помощи тройника с нулевым мертвым объемом в масс-спектрометр. Диапазон длин волн детектирования: 220-400 нм. Режим: диодная матрица (535 сканов). Колонка: Phenomenex® Onyx Monolithic C18 50x4,60 мм

Пример 6.

(i) Аллил-(5-((5-(5-амино-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентил)окси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (50)



(a) (S,R)-((пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((2S,4R)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-гидрокси-пирролидин-1-ил)метанон) (45).

Безводный ДМФА (приблиз. 0,5 мл) добавляли по каплям к перемешиваемой суспензии 4,4'-(пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитробензойной кислоты) (44) (36,64 г, 74,0 ммоль) и оксалилхлорида (18,79 мл, 0,222 моль, 3,0 экв.) в безводном ДХМ (450 мл) до активного выделения пузырьков и реакцию смесь оставляли перемешиваться в течение ночи. Реакционную смесь выпаривали досуха и растирали с диэтиловым эфиром. Полученный желтый осадок отфильтровывали от раствора, промывали диэтиловым эфиром (100 мл) и немедленно добавляли к раствору (3R,5S)-5-(((трет-бутилдиметилсилилокси)метил)пирролидин-3-ола) (4) (39,40 г, 0,170 моль, 2,3 экв.) и безводного триэтиламина (82,63 мл, 0,592 моль, 8 экв.) в безводном ДХМ (400 мл) при -40 $^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь оставляли медленно нагреваться до комнатной температуры (в течение 2,5 ч), после чего ЖХМС анализ показал завершение реакции. Добавляли ДХМ (250 мл) и указанную смесь переносили в делительную воронку. Органический слой последовательно промывали 0,1 М HCl (2x800 мл), насыщенным NaHCO₃ (500 мл) и

солевым раствором (300 мл). После высушивания над $MgSO_4$ и фильтрования, выпаривания растворитель оставался продукт в виде желтой пены (62,8 г, 92%).

ЖХ/МС, Система 1: RT 1,96 мин; MS (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 921,45 ($[M+H]^+$, 100).

(b) (5S,5'S)-1,1'-(4,4'-(пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитробензоил))-бис-(5-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролин-3-он) (46).

Трихлоризоциануровую кислоту (21,86 г, 94,07 ммоль, 1,4 экв.) добавляли одной порцией к раствору диола 45 (61,90 г, 67,20 ммоль) и ТЕМПО (2,10 г, 13,44 ммоль, 0,2 экв.) в безводном ДХМ (500 мл) в атмосфере аргона при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 20 мин, после чего ЖХМС анализ реакционной смеси показал завершение реакции. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (400 мл) и промывали насыщенным бикарбонатом натрия (500 мл), 0,2 М раствором тиосульфата натрия (600 мл), солевым раствором (400 мл) и сушили ($MgSO_4$). В результате выпаривания растворителя получали неочищенный продукт. В результате флэш-хроматографии [градиентное элюирование от 80% н-гексан/20% этилацетат до 100% этилацетата] получали чистое 46 в виде желтого твердого вещества (49,30 г, 80%). ЖХ/МС: RT 2,03 мин; MS (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 917,55 ($[M+H]^+$, 100).

(c) (5S,5'S)-1,1'-(4,4'-(пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитробензоил))-бис-(5-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3,1-диил) бис-(трифторметасульфат), (47)

Трифторметансульфоновый ангидрид (24,19 мл, 0,144 моль, 6,0 экв.) добавляли по каплям к интенсивно перемешиваемому раствору бис-кетона 46 (21,98 г, 23,96 ммоль) в безводном ДХМ (400 мл), содержащему 2,6-лутидина (22,33 мл, 0,192 моль, 8,0 экв.), при -40°C. Реакционную смесь перемешивали при -40°C в течение 30 мин, после чего ЖХМС анализ показал завершение реакции. Реакционную смесь быстро разбавляли ДХМ (500 мл) и промывали смесью ледяной водой (600 мл), ледяным насыщенным бикарбонатом натрия (400 мл) и солевым раствором (500 мл), сушили над $MgSO_4$, фильтровали и выпаривали с получением неочищенного коричневого масла. В результате флэш-хроматографии [градиентное элюирование от 80% н-гексан/20% этилацетат до 66% н-гексан/33% этилацетат] получали чистое 47 в виде коричневой пены (16,40 г, 58%). ЖХ/МС: RT 2,28 мин; MS (ES^+) m/z (относительная интенсивность) нет данных.

(d) (S)-((пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)метанон) (48).

Трифлат 47 (5,06 г, 4,29 ммоль), метилбороновую кислоту (1,80 г, 30,00 ммоль, 7 экв.) и трифенилларсин (1,05 г, 3,43 ммоль, 0,8 экв.) растворяли в безводном диоксане и перемешивали в атмосфере аргона. Затем добавляли бисбензонитрилхлорид Pd (II) и реакционную смесь быстро нагревали до 80°C в течение 20 мин. Реакционную смесь охлаждали, фильтровали через целит (промывали этилацетатом), фильтрат промывали водой (500 мл), солевым раствором (500 мл), сушили над $MgSO_4$, фильтровали и выпаривали. В результате флэш-хроматографии [градиентное элюирование 50% н-гексан/50% этилацетат] получали чистое 48 в виде коричневой пены (4,31 г, 59%). ЖХ/МС: RT 2,23 мин; MS (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 913,50 ($[M+H]^+$, 100).

(e) (S)-((пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)метанон) (49).

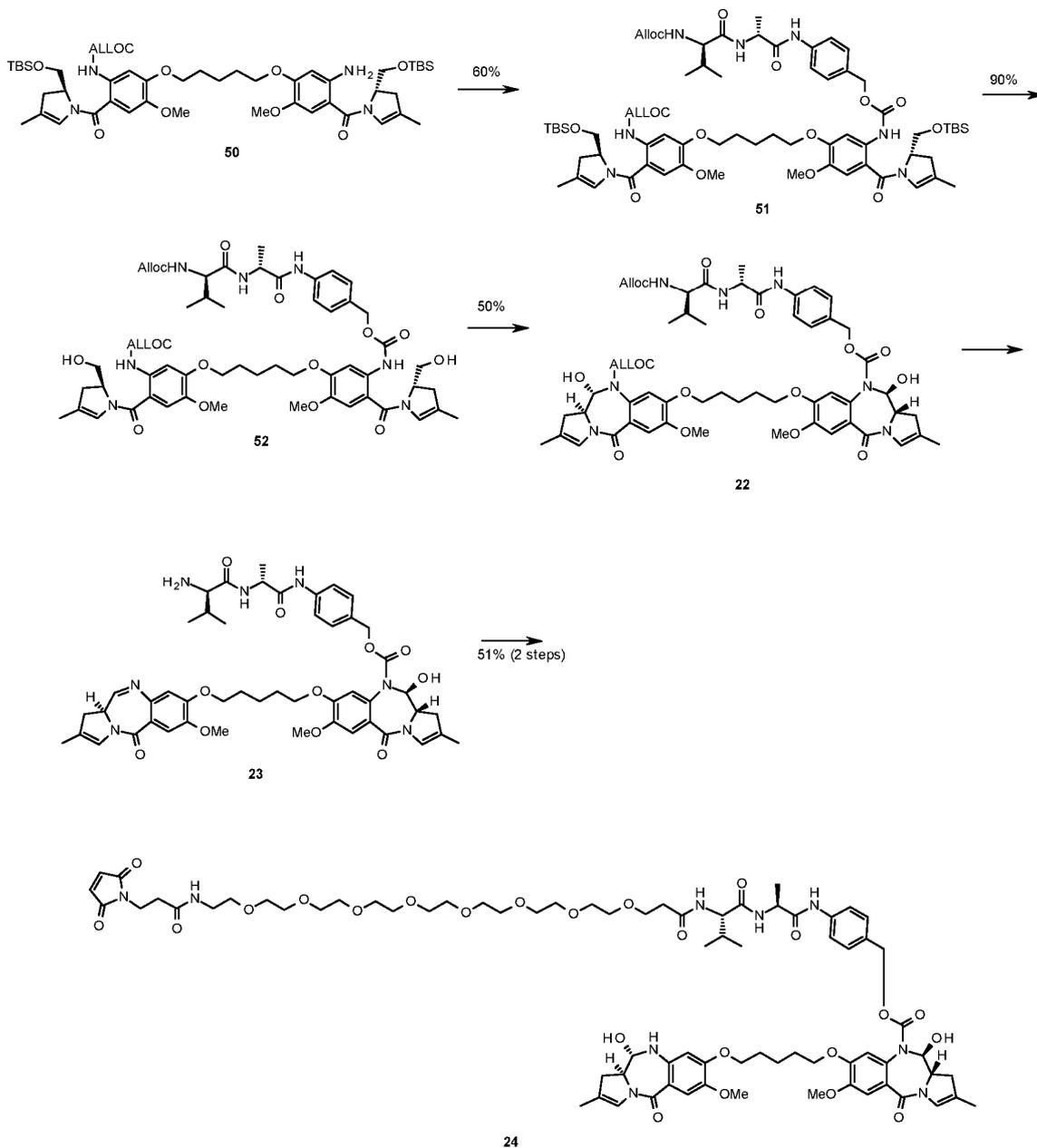
Цинковую пыль (26,48 г, 0,405 моль, 36,0 экв.) добавляли одной порцией к раствору бис-нитро соединения 48 (10,26 г, 11,24 ммоль) в 5% муравьиной кислоте/метаноле (200 мл), поддерживая температуру между 25-30°C с помощью бани с холодной водой. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 20 мин, после чего ЖХМС показала завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали через целит для удаления избыточного цинка, который промывали этилацетатом (600 мл). Органические фракции промывали водой (500 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (500 мл) и солевым раствором (400 мл), сушили над $MgSO_4$ и выпаривали. В результате флэш-хроматографии [градиентное элюирование от 100% хлороформа до 99% хлороформ/1% метанол] получали чистое 49 в виде оранжевой пены (6,22 г, 65%). ЖХ/МС: RT 2,20 мин; MS (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 853,50 ($[M+H]^+$, 100).

(f) Аллил-(5-((5-(5-амино-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифеноксипентил)окси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (50).

Пиридин (1,156 мл, 14,30 ммоль, 1,5 экв.) добавляли к раствору бис-анилина 49 (8,14 г, 9,54 ммоль) в безводном ДХМ (350 мл) при -78°C в атмосфере аргона. Через 5 мин добавляли аллилхлорформиат (0,911 мл, 8,58 ммоль, 0,9 экв.) и реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (250 мл), промывали насыщенным раствором $CuSO_4$ (400 мл), насыщенным бикарбонатом натрия (400 мл) и солевым раствором (400 мл), сушили над $MgSO_4$. В результате флэш-хроматографии [градиентное элюирование от 66% н-гексан/33% этилацетат до 33% н-гексан/66% этилацетат] получали чистое 50 в виде оранжевой пены (3,88 г, 43%). ЖХ/МС: RT 2,27 мин MS (ES^+) m/z (относительная интенсивность) 937,55 ($[M+H]^+$, 100).

(ii) Общая схема для (11S,11aS)-4-((2S,5S)-37-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаоксо-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил-11-гидрокси-7-метокси-8-((5-(((S)-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,11a-

дигидро-1H-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пентил)окси)-2-метил-5-оксо-11,11а-дигидро-1H-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилата (24)



Соединение 24 может быть синтезировано по схеме, показанной выше, с использованием способов, описанных предыдущих примерах.

Пример 7. Активность выделенных соединений.

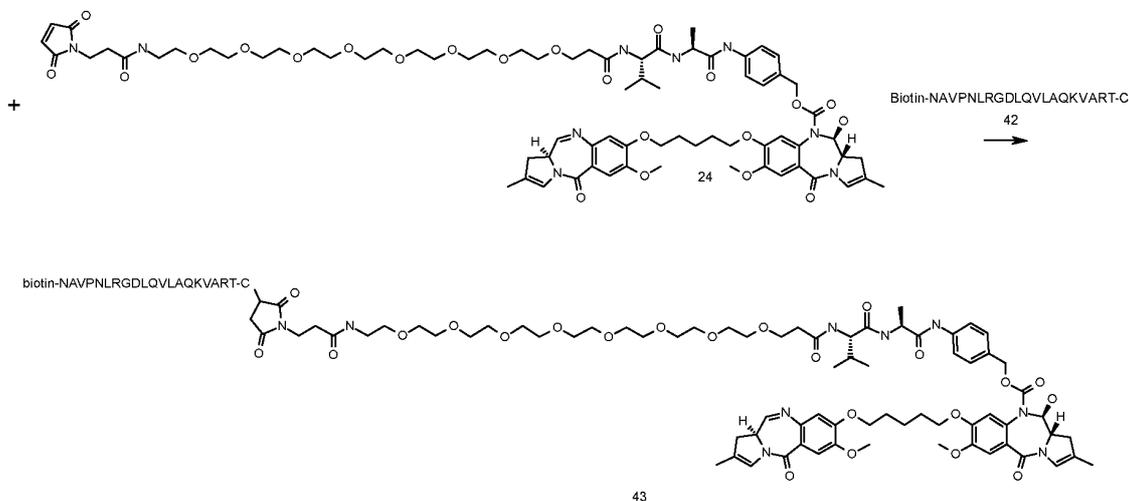
K562 анализ.

Клетки человеческого хронического миелоидного лейкоза K562 выдерживали в среде RPM1 1640, дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой и 2 мМ глутамин при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, и инкубировали с конкретной дозой лекарственного средства в течение 1 ч или 96 ч при 37°C в темноте. Инкубацию завершали центрифугирование (5 мин, 300 г) и клетки промывали один раз средой, не содержащей лекарственное средство. После соответствующей обработки лекарственным средством, клетки переносили в 96-луночные микротитровальные планшеты (10⁴ клеток на лунку, 8 лунок на образец). Затем планшеты оставляли в темноте при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Анализ основан на способности жизнеспособных клеток восстанавливать желтую растворимую соль тетразолия, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2H-тетразолий бромид (MTT, Aldrich-Sigma), в нерастворимый фиолетовый осадок формазана. После инкубации планшетов в течение 4 дней (для обеспечения увеличения количества контрольных клеток в приблизительно 10 раз), в каждую лунку добавляли 20 мкл раствор MTT (5 мг/мл в фосфатно-солевом буфере) и планшеты дополнительно инкубировали в течение 5 ч. Затем планшеты центрифугировали в течение 5 мин при 300 г и объем среды пипетировали от сгустка клеток, оставляя 10-20 мкл на лунку. В каждую лунку добавляли ДМСО (200

мкл) и образцы перемешивали для обеспечения полного смешивания. Затем считывали оптическую плотность при длине волны 550 нм на ИФА планшет-ридере Titertek Multiscan, и строили кривую доза-ответ. Для каждой кривой значение IC_{50} считали как дозу, необходимую для снижения конечной оптической плотности до 50% от контрольного значения.

Соединение ReIb имело IC_{50} 0,425 нМ в данном анализе.

Пример 8.



Биотин-A20FMDV-Cys-2 (43).

Раствор пептида 42 (12,06 мг, 4,8 мкмоль, 1,0 экв.) в 1/1 смеси ацетонитрил/вода (1 мл) добавляли к раствору 24 (12,06 мг, 4,8 мкмоль, 1,0 экв.) в 1/1 смеси ацетонитрил/вода (1 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Смесь ацетонитрил/вода удаляли путем лиофилизации с получением желтой пены. В результате очистки с помощью перпаративной ВЭЖХ с последующей лиофилизацией получали продукт в виде белой пены (7,4 мг, 38%)

Методика препаративной ВЭЖХ: обращено-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (UPLC) проводили на колонках Phenomenex Gemini NX 5 μ C-18 со следующим размерами: 150 \times 4,6 мм для анализа, и 150 \times 21,20 мм для препаративной работы. Все эксперименты с UPLC проводили с градиентами: начальный состав 13% В до 75% В за 15 мин, сохраняли в течение 2,0 мин при 75% В, затем 75% В до 13% В за 0,10 мин, сохраняли при 13% в течение 2,90 мин. Общее время градиентного анализа составляет 20,00 мин. Используемые элюенты представляли собой растворитель А (H₂O с 0,1% муравьиной кислотой) и растворитель В (CH₃CN с 0,1% муравьиной кислотой). Применяемая скорость потоков составляла 1,0 мл/мин для аналитической, и 20,0 мл/мин для препаративной ВЭЖХ. Детектирование осуществляли при 254 и 280 нм.

Аналитические данные: ЖХМС 1,17 мин (ES⁺) m/z (относительная интенсивность) 1330([M + 2]^{+/3}, 5%); 998([M + 3]^{+/4}, 70); 798([M + 4]^{+/5}, 100); 665([M + 5]^{+/6}, 20).

Пример 9. Образование конъюгатов.

Общая процедура конъюгации антител.

Антитела разбавляют до 1-5 мг/мл в восстановительном буфере (примеры: фосфатно-солевой буферный раствор PBS, гистидиновый буфер, буфер бората натрия, TRIS буфер). Свежеприготовленный раствор ТСЕР (трис(2-карбоксиил)фосфин гидрохлорид) добавляют для селективного восстановления цистеиновых дисульфидных мостиков. Количество ТСЕР пропорционально целевой степени восстановления, от 1 до 4 молярных эквивалента на антитело, с получением от 2 до 8 реакционноспособных тиолов. После восстановления в течение нескольких часов при 37 $^{\circ}$ C, указанную смесь охлаждают до комнатной температуры и избыточный лекарственное средство-линкер (А, В) добавляют в виде разбавленного раствора ДМСО (конечное содержание ДМСО составляет до 10% об./об. реакционной смеси). Указанную смесь аккуратно встряхивают либо при 4 $^{\circ}$ C, либо комнатной температуре в течение подходящего периода времени, как правило, в течение 1-3 ч, для соединения В и 10-30 ч для соединения А. Избыточные реакционноспособные тиолы могут подвергаться взаимодействию с "реагентом, блокирующим тиолы", например N-этилmaleимидом (NEM) в конце конъюгации. Конъюгаты антитело-лекарственное средство концентрируют с использованием центрифужных фильтров с отсечением по молекулярной массе 10 кДа или более, затем очищают с помощью тангентальной поточной фильтрации (TFF) или жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC). Соответствующие конъюгаты антитело-лекарственное средство могут быть определены путем анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ) для оценки соотношения количества лекарственного средства-на-антитело (DAR) с использованием обращено-фазовой хроматографии (RP) или гидрофобной хроматографии (HIC), в сочетании с детектированием на основе УФ-видимого излучения, флуоресценции или масс-спектрометрии; степень агрегации и мономерную чистоту

можно проанализировать с помощью ВЭЖХ или УВЭЖХ с использованием эксклюзионной хроматографии в сочетании с детектированием на основе УФ-видимого излучения, флуоресценции или масс-спектрометрии. Конечную концентрацию конъюгата определяют с помощью комбинации спектроскопического (поглощение при 280, 214 и 330 нм) и биохимического анализа (анализ с бидинхониновой кислотой BCA; Smith, P.K., et al. (1985), Anal. Biochem. 150 (1): 76-85; с использованием известной концентрации IgG антитела в качестве контроля). Конъюгаты антитело-лекарственное средство в целом фильтруют со стерилизацией с использованием 0,2-мкм фильтров в асептических условиях и хранят при 4, -20 или -80°C.

Примеры конкретных конъюгатов описаны ниже.

ADC1A.

Антитело 1 (15 мг, 102 наномоль) разбавляли в 12,0 мл восстановительного буфера, содержащего 10 mM бората натрия pH 8,4, 2,5 mM EDTA и конечную концентрацию антитела 1,25 мг/мл. Добавляли 10 mM раствор ТСЕР (2 молярных эквивалента/антитело, 204 наномоль, 20 мкл) и восстановительную смесь нагревали при 37°C в течение двух часов в орбитальном инкубаторе. После охлаждения до комнатной температуры, соединение А добавляли в виде раствора ДМСО (5 молярных эквивалента/антитело, 510 наномоль, в 1,2 мл ДМСО). Раствор перемешивали 18 ч при комнатной температуре, затем переносили в 15 мл центробежный фильтр Amicon Ultracell 50 кДа MWCO, концентрировали до примерно 2,0 мл и вводили в АКТА™FPLC с использованием колонки GE Healthcare XK16/70, наполненной Superdex 200 PG, с элюированием 1,5 мл/мин отфильтрованным со стерилизацией фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Фракции, соответствующие требуемым пикам мономеров ADC объединяли, анализировали и фильтровали со стерилизацией. В результате анализа BCA определили концентрацию конечного ADC1A при 0,67 мг/мл в 12,5 мл, и получили массу 8,4 мг (56% выход). Анализ ВЭЖХ на системе Waters Alliance с использованием колонки Agilent PLRP-S 1000 A 8 мкм 150×2,1 мм, с элюированием градиентом вода и ацетонитрил на восстановленном образце ADC1A при 280 нм, показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенный к нескольким молекулам А, соответствующим соотношению лекарственное средство-на-антитело (DAR) 2,2 молекулы А на антитело. Анализа SEC на АКТА™FPLC с использованием колонки GE Healthcare XK16/70, наполненной Superdex 200 PG, с элюированием отфильтрованным со стерилизацией фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) на образце ADC1A при 280 нм показал мономерную чистоту 95,3% с 4,7% агрегатов.

ADC1B.

Антитело 1(15 мг, 102 наномоль) разбавляли в 12,0 мл восстановительного буфера, содержащего 10 mM бората натрия pH 8,4, 2,5 mM EDTA и конечную концентрацию антитела 1,25 мг/мл. Добавляли 10 mM раствор ТСЕР (2 молярных эквивалента/антитело, 204 наномоль, 20 мкл) и восстановительную смесь нагревали при 37°C в течение двух часов в орбитальном инкубаторе. После охлаждения до комнатной температуры, соединение В добавляли в виде раствора ДМСО (5 молярных эквивалента/антитело, 510 наномоль, в 1,2 мл ДМСО). Раствор перемешивали 5 ч при комнатной температуре, затем добавляли второе количество соединения В в виде раствора ДМСО (2 молярных эквивалента/антитело, 200 наномоль, в 0,6 мл ДМСО). Раствор перемешивали 15 ч при комнатной температуре, затем переносили в 15 мл центробежный фильтр Amicon Ultracell 50 кДа MWCO, концентрировали до са. 2,0 мл и вводили в АКТА™FPLC с использованием колонки GE Healthcare XK16/70, наполненной Superdex 200 PG, с элюированием 1,5 мл/мин отфильтрованным со стерилизацией фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Фракции, соответствующие требуемым пикам мономеров ADC1B объединяли, анализировали и фильтровали со стерилизацией. В результате анализа BCA определили концентрацию конечного ADC1B при 1,02 мг/мл в 10,5 мл, и получили массу 10,7 мг (71% выход). Анализ ВЭЖХ на системе Waters Alliance с использованием колонки Agilent PLRP-S 1000 A 8 мкм 150×2,1 мм, с элюированием градиентом вода и ацетонитрил на восстановленном образце ADC1B при 280 и 330 нм (специфичная по отношению к лекарственному средства-линкеру) показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенный к нескольким молекулам В, соответствующим соотношению лекарственное средство-на-антитело (DAR) 2,2 молекулы В на антитело. Анализа SEC на АКТА™FPLC с использованием колонки GE Healthcare XK16/70, наполненной Superdex 200 PG, элюирование с отфильтрованным со стерилизацией фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) на образце ADC1B при 280 нм показал мономерную чистоту 94,9% с 5,1% агрегатов.

В настоящем документе "Антитело 1" представляет собой антитело анти-Her2, содержащее VH домен, имеющий последовательность согласно SEQ ID NO: 1, и VL домен, имеющий последовательность согласно SEQ ID NO: 2.

Пример 10. Исследования эффективности ADC in vivo.

В мышей линии CB.17 SCID в возрасте 8-12 недель подкожно в бок вводили фрагменты опухоли в 1 мм³, полученные из клеточной линии BT-474. После того, как опухоли достигали среднего размера 100-150 мм³, начинали обработку. Мышей взвешивали дважды в неделю. Размер опухоли измеряли дважды в неделю. Животных контролировали индивидуально. Окончание эксперимента считали объем опухоли 1000 мм³ или 60 дней, смотря что наступит раньше. Субъекты с терапевтическим эффектом могли про-

должать обработке.

Группам 10 ксенотрансплантированных мышей вводили в.в. 0,2 мл конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), только антитело, в фосфатно-солевом буферном растворе (носитель) или 0,2 мл только носителя. Концентрацию ADC довели до получения, например, 0,3 или 1,0 мг ADC/кг массы тела в одной дозе. Каждой мыши могут быть введены три одинаковые дозы с интервалом, например, в 1 неделю.

На фиг. 1 показан эффект на средний объем опухоли в группах 10 мышей, которым вводили ADC1A в дозировке 0,3 (зеленая) или 1,0 мг/кг (красная), по сравнению с носителем (черная) или чистыми Ig (синяя) контролями.

На фиг. 2 показан эффект на средний объем опухоли в группах 10 мышей, которым ADC1B в дозировке 0,3 (голубая) или 1,0 мг/кг (зеленая), по сравнению с носителем (черная) или чистыми Ig (темно синяя) контролями.

Все документы и другие ссылки, упомянутые выше, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Сокращения

Ac	ацетил
AcM	ацетамидометил
Alloc	аллилоксикарбонил
Woc	ди-трет-бутилдикарбонат
t-Bu	трет-бутил
Bzl	бензил, где Bzl-OMe представляет собой метоксибензил и Bzl-Me представляет собой метилбензол
Cbz или Z	Бензилоксикарбонил, где Z-Cl и Z-Br представляют собой хлор- и бромбензилоксикарбонил, соответственно
DMFA	<i>N,N</i> -диметилформаид
Dnp	динитрофенил
DTT	дитиотреитол
Fmoc	9 <i>H</i> -флуорен-9-илметоксикарбонил
imp	<i>N</i> -10 защитная группа имида: 3-(2-метоксиэтокси)пропаноат-Val-Ala-PAB
MC-OSu	малеимидокапроил-О- <i>n</i> -сукцинимид
Moc	метоксикарбонил
MP	малеимидопропанамид
Mtr	4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил
PAB	пара-аминобензилоксикарбонил
PEG	этиленокси
PNZ	<i>p</i> -нитробензилкарбамат
Psec	2-(фенилсульфонил)этоксикарбонил
TBDMS	трет-бутилдиметилсилил
TBDPS	трет-бутилдифенилсилил
Teoc	2-(триметилсилил)этоксикарбонил
Tos	тозил
Troc	2,2,2-трихлорэтоксикарбонилхлорид
Trt	третил
Xan	ксантил

Последовательности

SEQ ID NO 1 (Her VH):

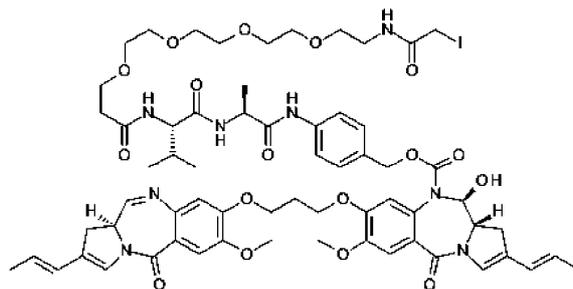
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
 ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTS
 S

SEQ ID NO 2 (Her VL):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
 FSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

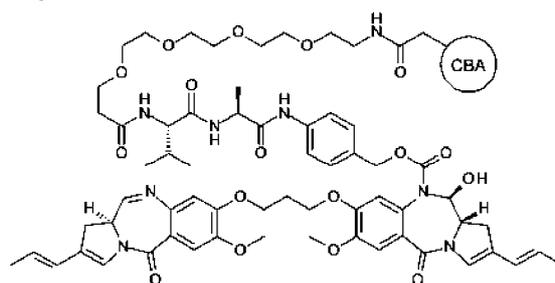
1. Соединение А



А

или его соли или сольваты.

2. Конъюгат формулы ConjA



ConjA

где CBA представляет собой антитело или активный фрагмент антитела, которые связываются с одним или более опухолеассоциированными антигенами.

3. Конъюгат по п.2, отличающийся тем, что антитело или фрагмент антитела связываются с одним или более опухолеассоциированными антигенами, выбранными из (1)-(88):

- (1) VMPR1B;
- (2) E16;
- (3) STEAP1;
- (4) 0772P;
- (5) MPF;
- (6) Napi3b;
- (7) Sema 5b;
- (8) PSCA hlg;
- (9) ETBR;
- (10) MSG783;
- (11) STEAP2;
- (12) TrpM4;
- (13) CРИТО;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;
- (16) FcRH2;
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20R-альфа;
- (21) Brevican;

- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R;
- (27) CD22;
- (28) CD79a;
- (29) CXCR5;
- (30) HLA-DOB;
- (31) P2X5;
- (32) CD72;
- (33) LY64;
- (34) FcRH1;
- (35) IRTA2;
- (36) TENB2;
- (37) PSMA-FOLH1;
- (38) SST;
- (38.1) SSTR2;
- (38.2) SSTR5;
- (38.3) SSTR1;
- (38.4) SSTR3;
- (38.5) SSTR4;
- (39) ITGAV;
- (40) ITGB6;
- (41) CEACAM5;
- (42) MET;
- (43) MUC1;
- (44) CA9;
- (45) EGFRvIII;
- (46) CD33;
- (47) CD19;
- (48) IL2RA;
- (49) AXL;
- (50) CD30 - TNFRSF8;
- (51) BCMA - TNFRSF17;
- (52) CT Ags - CTA;
- (53) CD174 (Lewis Y) - FUT3;
- (54) CLEC14A;
- (55) GRP78 - HSPA5;
- (56) CD70;
- (57) специфические антигены стволовых клеток;
- (58) ASG-5;
- (59) ENPP3;
- (60) PRR4;
- (61) GCC - GUCY2C;
- (62) Liv-1 - SLC39A6;
- (63) 5T4;
- (64) CD56 - NCMA1;
- (65) CanAg;
- (66) FOLR1;
- (67) GPNMB;
- (68) TIM-1 - HAVCR1;
- (69) RG-1/мишень опухоли предстательной железы Миндин - Миндин/RG-1;
- (70) B7-H4 - VTCN1;
- (71) PTK7;
- (72) CD37;
- (73) CD138 - SDC1;
- (74) CD74;
- (75) Клаудины - CLs;
- (76) EGFR;
- (77) Her3;
- (78) RON - MST1R;

- (79) EPHA2;
- (80) CD20 - MS4A1;
- (81) Тенасцин С - TNC;
- (82) FAP;
- (83) DKK-1;
- (84) CD52;
- (85) CS1 - SLAMF7;
- (86) Эндоглин - ENG;
- (87) Аннексии А1 - ANXA1;
- (88) V-CAM (CD106) - VCAM1.

4. Конъюгат по любому из пп.2, 3, отличающийся тем, что антитело представляет собой модифицированное цистеином антитело.

5. Конъюгат по любому из пп.2-4, отличающийся тем, что нагрузка лекарственного средства соединением А на антитело составляет целое число от 1 до 8.

6. Конъюгат по п.5, отличающийся тем, что нагрузка лекарственного средства составляет 1, 2, 3 или 4.

7. Композиция для применения в получении лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания, содержащая смесь конъюгатов по любому из пп.2-6, в которой средняя нагрузка лекарственного средства на антитело в указанной смеси соединений конъюгатов антитело-лекарственное средство составляет от 1 до 8.

8. Конъюгат по любому из пп.2-6 для применения в лечении пролиферативного заболевания.

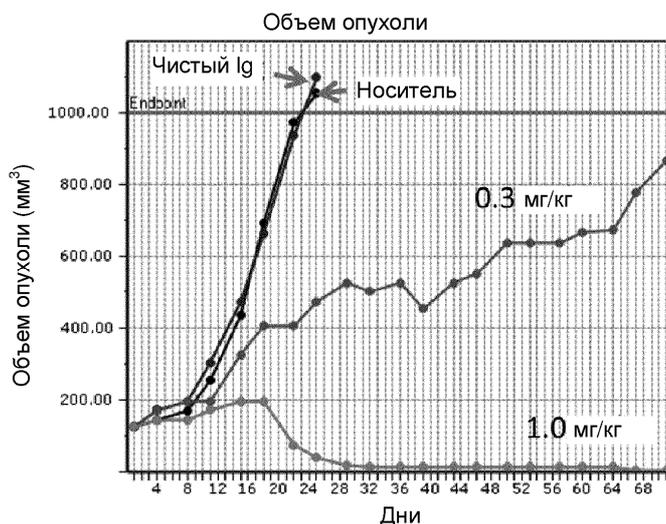
9. Конъюгат по любому из пп.2-6 для применения в получении лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания.

10. Конъюгат по п.9, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой рак.

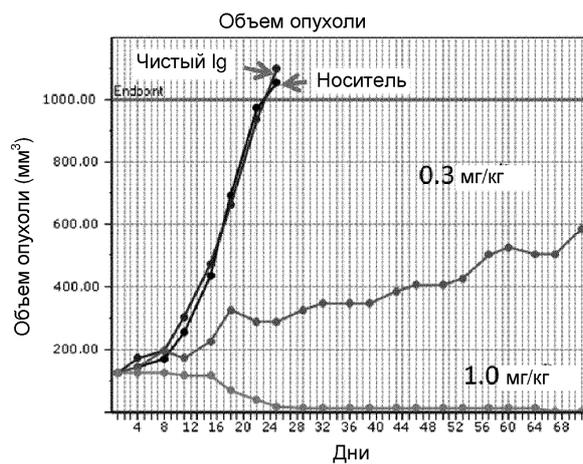
11. Фармацевтическая композиция для лечения пролиферативного заболевания, содержащая конъюгат по любому из пп.2-6 или композицию по п.7 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, дополнительно содержащая терапевтически эффективное количество химиотерапевтического агента.

13. Способ получения конъюгата по любому из пп.2-6, включающий стадию взаимодействия антитела или активного фрагмента антитела, которые связываются с одним или более опухолеассоциированными антигенами, с соединением А, определенным в п.1.



Фиг. 1



Фиг. 2

