

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 038267

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.02

(21) Номер заявки
201992182

(22) Дата подачи заявки
2018.04.18

(51) Int. Cl. C07D 519/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 5/062 (2006.01)

(54) ПИРРОЛОБЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ

(31) 1706133.4; 1721337.2

(32) 2017.04.18; 2017.12.19

(33) GB

(43) 2020.02.29

(86) PCT/EP2018/059846

(87) WO 2018/192944 2018.10.25

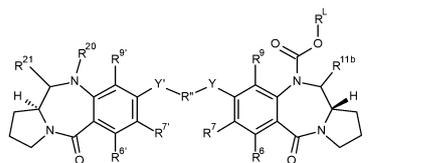
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДИМЬОН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Ховард Филип Уилсон, Грегсон
Стивен Джон (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2015052322
WO-A1-2016044560

(57) Соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемая соль, где R^6 и R^9 представляют собой H; R^7 представляет собой C_{1-4} алкоксигруппу; R^{11} представляет собой C_{3-12} алкиленовую группу, цепь которой может прерываться бензолом; Y и Y' представляют собой O; R^6 , R^7 , R^9 выбраны из тех же групп, что и R^6 , R^7 и R^9 соответственно; R^{11b} представляет собой OH и R^{11a} представляет собой линкер для соединения с клеточносвязывающим агентом, такой, как определено в формуле изобретения.

B1

038267

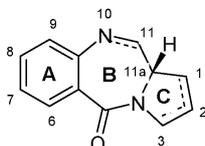
038267

B1

Данное изобретение относится к конъюгатам, содержащим пирролобензодиазепины и родственные димеры (PBD) и линкеры предшественника лекарственного средства, используемые для получения таких конъюгатов.

Уровень техники

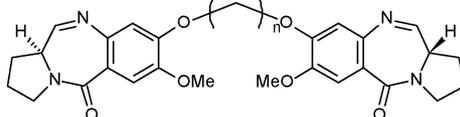
Некоторые пирролобензодиазепины (PBD) обладают способностью распознавать и связываться с определенными последовательностями ДНК; предпочтительной последовательностью является PuGPr. Первый PBD противоопухолевый антибиотик, антрамицин, открыт в 1965 году (Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc. 87, 5791-5793 (1965)). С тех пор описано множество природных PBD и разработано более 10 синтетических способов получения различных аналогов (Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994)). Члены семейства включают аббеймицин (Hochlowski, et al., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), чикамицин (Konishi, et al., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (японский патент 58-180, 487; Thurston, et al., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)), мазетрамицин (Kuminoto, et al., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), неотрамицины А и В (Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), поротрамицин (Tsunakawa, et al., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), протракарцин (Shimizu, et al., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley and Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), сибаномицин (DC-102) (Hara, et al., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh, et al., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), сибиромицин (Leber, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) и томамицин (Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)). PBD имеют общую структуру:



Они отличаются по количеству, типу и положению заместителей в ароматических кольцах А и пиррольных кольцах С, а также по степени насыщенности кольца С. В кольце В находится имин (N=C), карбиноламин (NH-CH(OH)) или метиловый эфир карбиноламина (NH-CH(OMe)) в положениях N10-C11, которые представляют собой электрофильный центр, отвечающий за алкилирование ДНК. Все известные природные продукты имеют (S)-конфигурацию в хиральном положении C11a, что обеспечивает их провостороннее скручивание, если смотреть с кольца С на кольцо А. Это придает им соответствующую трехмерную форму для изоспиральности с малой бороздкой В-формы ДНК, что приводит к точному совпадению у сайта связывания (Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, p. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Soc., 19, 230-237 (1986)). Их способность образовывать аддукт в малой бороздке обеспечивает возможность влиять на процессирование ДНК, вследствие чего их используют в качестве противоопухолевых агентов.

Ранее было описано, что биологическая активность указанных молекул может быть усилена посредством соединения двух фрагментов PBD друг с другом через их C8/C'-гидроксильные функциональные группы посредством гибкого алкиленового линкера (Bose, D.S., et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 4939-4941 (1992); Thurston, D.E., et al., J. Org. Soc., 61, 8141-8147 (1996)). Димеры PBD предположительно образуют последовательность-селективные повреждения ДНК, такие как палиндромная 5'-Pu-GATC-Py-3' межнитиевая поперечная сшивка (Smellie, M., et al., Biochemistry, 42, 8232-8239 (2003); Martin, C., et al., Biochemistry, 44, 4135-4147), которые предположительно несут главную ответственность за их биологическую активность.

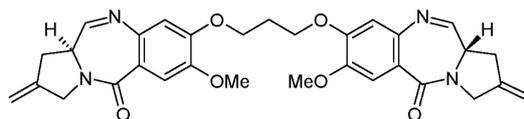
Первые димеры (Bose, D.S., et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 4939-4941 (1992)) общей формулы



где n равно от 3 до 6.

Соединения, где n равно 3 и 5, проиллюстрировали многообещающую цитотоксичность *in vitro*. Однако при изучении противоопухолевой активности с помощью соединения n=3 (DSB-120) (Walton, M., et al., Cancer Chemother Pharmacol. (1996), 38:431, doi: 10.1007/s002800050507) она оказалась не такой многообещающей. Считалось, что данный эффект является "следствием низкой селективности опухолей и потребления лекарственного средства в результате высокого связывания белка и/или широкого метаболизма лекарственного средства *in vivo*".

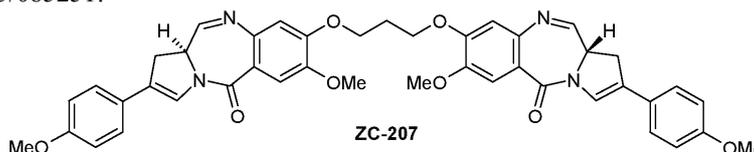
С целью улучшения данных соединений они были исследованы (Gregson, S.J., et al., Chem. Commun., 1999, 797-798, doi: 10.1039/A809791G) с "включением заместителей C2/C2', которые должны следовать контуру малой бороздки хозяина". Для данного соединения SG2000 (SJG-136)



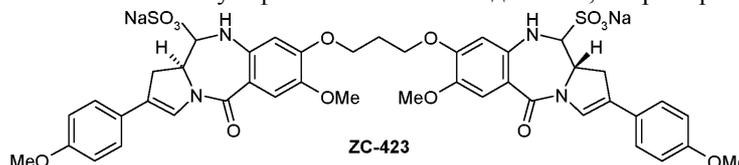
было обнаружено наличие "исключительной цитотоксичности в пиколярной области..., примерно в 9000 раз более сильной, чем DSB-120".

Данное соединение (также обсуждаемое в Gregson, S., et al., *J. Med. Chem.*, 44, 737-748 (2001); Alley, M.C., et al., *Cancer, Cancer Research*, 64, 6700-6706 (2004); и Hartley, J.A., et al., *Cancer Research*, 64, 6693-6699 (2004)) исследовалось в клинических испытаниях в качестве отдельного агента, например, NCT02034227, изучая его применение при лечении острого миелоидного лейкоза и хронического лимфоцитарного лейкоза (см.: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02034227>).

Димерные PBD соединения, содержащие C2 арильные заместители, такие как SG2202 (ZC-207), описаны в WO 2005/085251:



и в WO 2006/111759 описаны бисульфиты таких PBD соединений, например SG2285 (ZC-423):



Было показано, что данные соединения являются весьма подходящими цитотоксическими агентами (Howard, P.W., et al., *Bioorg. Med. Chem.* (2009), doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.012).

В обзоре PBD, содержащем ADC (Mantaj, J., et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* (2016), 55, 2-29; DOI: 10.1002/anie.201510610), обсуждается SAR димеров PBD. Краткое изложение SAR представлено на фиг. 3 - В "C2-экзо и C1-C2/C2-C3 ненасыщенность усиливают активность". Более подробное обсуждение находится в разделе 2.4, где говорится:

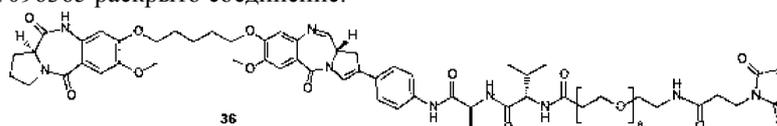
"DSB-120 обладает низкой активностью *in vivo*, что частично объясняется его высокой реакционной способностью с клеточными тиолсодержащими молекулами, такими как глутатион. Однако введение ненасыщенности C2/C2'-exo, как в SJG-136, привело к общему увеличению аффинности связывания с ДНК и цитотоксичности, а также к более низкой реакционной способности по отношению к клеточным нуклеофилам с большим количеством агента, потенциально достигающего его целевой ДНК".

В 2007/085930 описано получение димерных соединений PBD, содержащих линкерные группы для связи с клеточно-связывающим агентом, таким как антитело. Указанный линкер находится в мостиковой связи мономерных фрагментов PBD данного димера.

Димерные соединения PBD, содержащие линкерные группы для связывания с клеточно-связывающим агентом, таким как антитело, описаны в WO 2011/130598. Линкер в таких соединениях присоединен к одному из доступных положений N10, и обычно расщепляется под действием фермента на данную линкерную группу. Димерные соединения PBD имеют эндо- или экзоненасыщенность в C-кольце.

В WO 2014/057074 и WO 2015/052322 описаны специфические димерные конъюгаты PBD, связанные через положение N10 в одном мономере, и все данные соединения имеют экзоненасыщенность в C-кольце.

В WO 2014/096365 раскрыто соединение:

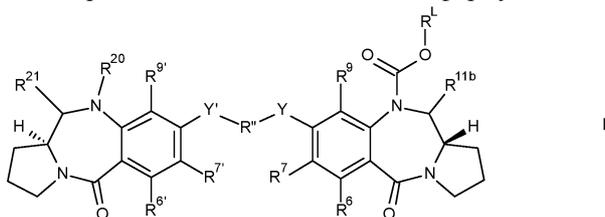


в котором отсутствие ненасыщенности в C-кольце связано с тем, что В-кольцо является дилактамом и, следовательно, не обладает способностью ковалентно связывать ДНК.

Сущность изобретения

Данное изобретение предлагает димерные линкеры лекарственного средства и конъюгаты PBD, в которых С-кольцо не имеет эндо- или экзоненасыщенности.

Первый аспект данного изобретения включает соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемую соль,

где R^6 и R^9 представляют собой H;

R^7 представляет собой C_{1-4} алкокси группу;

R'' представляет собой C_{3-12} алкиленовую группу, цепь которой может прерываться бензолом;

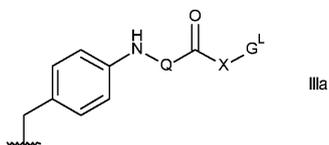
Y и Y' представляют собой O;

R^6 , R^7 , R^9 выбраны из тех же групп, что и R^6 , R^7 и R^9 соответственно;

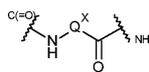
R^{11b} представляет собой OH;

R^L представляет собой линкер для связи с клеточно-связывающим агентом, который выбран из:

(IIIa)

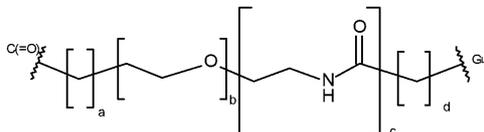


где Q представляет собой



Q^X является таким, что Q представляет собой остаток аминокислоты, дипептидный остаток или трипептидный остаток;

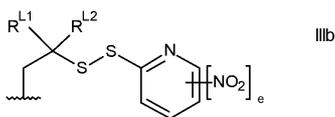
X представляет собой



где $a=0-5$, $b=0-16$, $c=0$ или 1, $d=0-5$;

G^L представляет собой линкер для связи с антителом или его активным фрагментом; и

(IIIb)



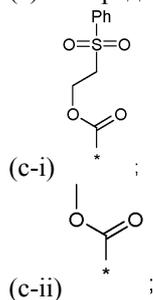
где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу;

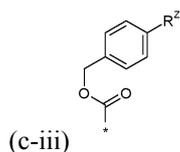
e равно 0 или 1; и

(a) R^{20} представляет собой H и R^{21} представляет собой OH или OR^A , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил; или

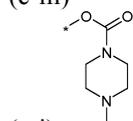
(b) R^{20} и R^{21} образуют двойную связь азот-углерод между атомами азота и углерода, с которыми они связаны; или

(c) R^{21} представляет собой OH или OR^A , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил и R^{20} выбран из:





(c-iii) где R^Z выбран из:



(z-i)

(z-ii) $OC(=O)CH_3$;

(z-iii) NO_2 ;

(z-iv) OMe ;

(z-v) глюкоронид;

(z-vi) $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-R^{ZC}$, где $-C(=O)-X_1-NH-$ и $-C(=O)-X_2-NH-$ представляют собой природные аминокислотные остатки и R^{ZC} выбран из Me , OMe , OCH_2CH_2OMe .

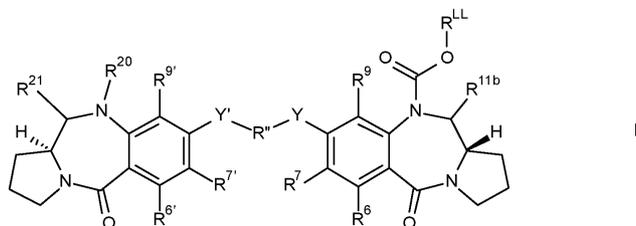
Было обнаружено, что такие линкеры лекарственных средств подвергаются быстрой конъюгации с лигандными единицами, такими как антитела.

Во втором аспекте данного изобретения предложены конъюгаты формулы II



где L представляет собой антитело или его активный фрагмент;

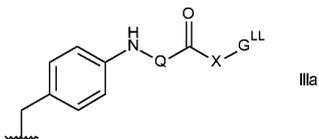
D^L представляет собой фрагмент линкера лекарственного соединения формулы I'



где R^6 , R^7 , R^9 , R^{11b} , Y, R'' , Y' , $R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$, R^{20} и R^{21} являются такими, как определено в любом из пп.1-4;

R^{11a} представляет собой линкер для соединения с клеточно-связывающим агентом, который выбран из:

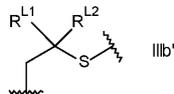
(IIIa')



где Q и X являются такими, как определено в любом из пп.1 и 6;

G^{LL} представляет собой линкер, связанный с антителом или его активным фрагментом; и

(IIIb')



где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено в первом аспекте; где p представляет собой целое число от 1 до 20.

Фрагмент лиганда, более подробно описанного ниже, представляет собой нацеливающий агент, который связывается с фрагментом-мишенью. Например, фрагмент лиганда может специфически связываться с клеточным компонентом (клеточно-связывающий агент) или с другими молекулами-мишенями, представляющими интерес. Фрагмент лиганда может представлять собой, например, белок, полипептид или пептид, такой как антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела или другой связывающий агент, такой как гибридный белок Fc.

Было обнаружено, что данные конъюгаты обладают высокой переносимостью, что приводит к высокому терапевтическому индексу, что делает их многообещающими кандидатами для клинической разработки.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по второму аспекту данного изобретения и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложено применение конъюгата по второму ас-

пекту данного изобретения или фармацевтической композиции по третьему аспекту настоящего изобретения для лечения пролиферативного заболевания, такого как рак, у субъекта.

Специалисты в данной области техники могут без труда определить, подходит или не подходит потенциальный конъюгат для лечения пролиферативного состояния для любого конкретного типа клеток. Например, анализы, которые можно удобно использовать для оценки активности, обеспечиваемой конкретным соединением, описаны ниже в примерах.

Определения

Заместители.

Выражение "необязательно замещенный" в данном контексте относится к исходной группе, которая может быть незамещенной или которая может быть замещенной.

Если не указано иное, термин "замещенная" в данном контексте относится к исходной группе, которая имеет один или более заместителей. Термин "заместитель" в данном контексте использован в обычном смысле и относится к химическому фрагменту, который ковалентно присоединен или, если это возможно, конденсирован с исходной группой. Хорошо известны многочисленные заместители, и также хорошо известны способы их получения и внедрения в различные исходные группы.

Примеры заместителей более подробно описаны ниже.

C₁₋₁₂алкил: Термин "C₁₋₁₂алкил" в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от атома углерода в углеводородном соединении, содержащем от 1 до 12 атомов углерода, которое может быть алифатическим или алициклическим и которое может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Термин "C₁₋₄алкил" в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от атома углерода в углеводородном соединении, содержащем от 1 до 4 атомов углерода, которое может быть алифатическим или алициклическим и которое может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Таким образом, термин "алкил" включает подклассы алкенила, алкинила, циклоалкила и т.д., рассмотренные ниже.

Примеры насыщенных алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, метил (C₁), этил (C₂), пропил (C₃), бутил (C₄), пентил (C₅), гексил (C₆) и гептил (C₇).

Примеры насыщенных линейных алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, метил (C₁), этил (C₂), н-пропил (C₃), н-бутил (C₄), н-пентил (C₅), н-гексил (C₆) и н-гептил (C₇).

Примеры насыщенных разветвленных алкильных групп включают изопропил (C₃), изобутил (C₄), втор-бутил (C₄), трет-бутил (C₄), изопентил (C₅) и неопентил (C₅).

C₂₋₁₂алкенил: Термин "C₂₋₁₂алкенил" в данном контексте относится к алкильной группе, содержащей одну или более двойных углерод-углеродных связей.

Примеры ненасыщенных алкенильных групп включают, но не ограничиваются этим, этенил (винил, -CH=CH₂), 1-пропенил (-CH=CHCH₃), 2-пропенил (аллил, CH₂=CHCH₂), изопрпенил (1-метилвинил, -C(CH₃)=CH₂), бутенил (C₄), пентенил (C₅) и гексенил (C₆).

C₂₋₁₂алкинил: Термин "C₂₋₁₂алкинил" в данном контексте относится к алкильной группе, содержащей одну или более тройных углерод-углеродных связей.

Примеры ненасыщенных алкинильных групп включают, но не ограничиваются этим, этинил (-C≡CH) и 2-пропинил (пропаргил, -CH₂-C≡CH).

C₃₋₁₂циклоалкил: Термин "C₃₋₁₂циклоалкил" в данном контексте относится к алкильной группе, которая также является циклической группой, т.е. к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от алициклического кольцевого атома циклического углеводородного (карбодиклического) соединения, и указанный фрагмент содержит от 3 до 7 атомов углерода, включая от 3 до 7 кольцевых атомов.

Примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваются этим, группы, полученные из:

насыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропан (C₃), циклобутан (C₄), циклопентан (C₅), циклогексан (C₆), циклогептан (C₇), метилциклопропан (C₄), диметилциклопропан (C₅), метилциклобутан (C₅), диметилциклобутан (C₆), метилциклопентан (C₆), диметилциклопентан (C₇) и метилциклогексан (C₇);

ненасыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропен (C₃), циклобутен (C₄), циклопентен (C₅), циклогексен (C₆), метилциклопропен (C₄), диметилциклопропен (C₅), метилциклобутен (C₅), диметилциклобутен (C₆), диметилциклопентен (C₇) и метилциклогексен (C₇); и

насыщенных полициклических углеводородных соединений:

норкаран (C₇), норпинан (C₇), норборнан (C₇).

C₃₋₂₀гетероциклил: Термин "C₃₋₂₀гетероциклил" в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от кольцевого атома гетероциклического соединения, и указанный фрагмент содержит от 3 до 20 кольцевых атомов, из которых от 1 до 10 являются кольцевыми гетероатомами. Предпочтительно каждое кольцо содержит от 3 до 7 кольцевых атомов, из которых от 1 до 4 являются кольцевыми гетероатомами.

В данном контексте приставки (например, C₃₋₂₀, C₃₋₇, C₅₋₆ и т.д.) означают количество кольцевых атомов или диапазон количества кольцевых атомов, будь то атомы углерода или гетероатомы. Например, термин "C₅₋₆гетероцикл" в данном контексте относится к гетероциклической группе, содержащей 5 или 6 кольцевых атомов.

Примеры моноциклических гетероциклических групп включают, но не ограничиваются этим, группы, полученные из:

N₁: азиридин (C₃), азетидин (C₄), пирролидин (тетрагидропиррол) (C₅), пирролин (например, 3-пирролин, 2,5-дигидропиррол) (C₅), 2Н-пиррол или 3Н-пиррол (изопиррол, изоазол) (C₅), пиперидин (C₆), дигидропиридин (C₆), тетрагидропиридин (C₆), азепин (C₇);

O₁: оксиран (C₃), оксетан (C₄), оксолан (тетрагидрофуран) (C₅), оксол (дигидрофуран) (C₅), океан (тетрагидропиран) (C₆), дигидропиран (C₆), пиран (C₆), оксепин (C₇);

S₁: тиран (C₃), тиетан (C₄), тиолан (тетрагидротииофен) (C₅), тиан (тетрагидротииопиран) (C₆), тиепан (C₇);

O₂: диоксолан (C₅), диоксан (C₆) и диоксепан (C₇);

O₃: триоксан (C₆)

N₂: имидазолидин (C₅), пиразолидин (диазолидин) (C₅), имидазолин (C₅), пиразолин (дигидропиразол) (C₅), пиперазин (C₆);

N₁O₁: тетрагидрооксазол (C₅), дигидрооксазол (C₅), тетрагидроизооксазол (C₅), дигидроизооксазол (C₅), морфолин (C₆), тетрагидрооксазин (C₆), дигидрооксазин (C₆), оксазин (C₆);

N₁S₁: тиазолин (C₅), тиазолидин (C₅), тиоморфолин (C₆);

N₂O₁: оксадиазин (C₆);

O₁S₁: оксатиол (C₅) и оксатиан (тиоксан) (C₆); и

N₁O₁S₁: оксатиазин (C₆).

Примеры замещенных моноциклических гетероциклических групп включают группы, полученные из сахаридов в циклической форме, например из фураноз (C₅), таких как арабинофураноза, ликсофураноза, рибофураноза и ксилофураноза, и пираноз (C₆), таких как аллопираноза, альтропираноза, глюкопираноза, маннопираноза, гулопираноза, идопираноза, галактопираноза и талопираноза.

C₅₋₂₀арил: Термин "C₅₋₂₀арил" в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от ароматического кольцевого атома ароматического соединения, и указанный фрагмент содержит от 3 до 20 кольцевых атомов. Термин "C₅₋₇арил" в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от ароматического кольцевого атома ароматического соединения, и указанный фрагмент содержит от 5 до 7 кольцевых атомов, а термин "C₅₋₁₀арил" в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от ароматического кольцевого атома ароматического соединения, и указанный фрагмент содержит от 5 до 10 кольцевых атомов. Предпочтительно каждое кольцо содержит от 5 до 7 кольцевых атомов.

В данном контексте приставки (например, C₃₋₂₀, C₅₋₇, C₅₋₆, C₅₋₁₀ и т.д.) означают количество кольцевых атомов или диапазон количества кольцевых атомов, будь то атомы углерода или гетероатомы. Например, термин "C₅₋₆арил" в данном контексте относится к арильной группе, содержащей 5 или 6 кольцевых атомов.

Все кольцевые атомы могут представлять собой атомы углерода, как в "карбоарильных группах".

Примеры карбоарильных групп включают, но не ограничиваются этим, группы, полученные из бензола (т.е. фенил) (C₆), нафталина (C₁₀), азулена (C₁₀), антрацена (C₁₄), фенантрена (C₁₄), нафтацена (C₁₈) и пирена (C₁₆).

Примеры арильных групп, которые содержат конденсированные кольца, по меньшей мере одно из которых является ароматическим кольцом, включают, но не ограничиваются этим, группы, полученные из индана (например, 2,3-дигидро-1Н-индена) (C₉), индена (C₉), изоиндена (C₉), тетралина (1,2,3,4-тетрагидронафталина) (C₁₀), аценафтена (C₁₂), флуорена (C₁₃), феналена (C₁₃), ацетфенантрена (C₁₅) и ацантрена (C₁₀).

Альтернативно, кольцевые атомы могут включать один или более гетероатомов, как в "гетероарильных группах". Примеры моноциклических гетероарильных групп включают, но не ограничиваются этим, группы, полученные из:

N₁: пиррол (азол) (C₅), пиридин (азин) (C₆);

O₁: фуран (оксол) (C₅);

S₁: тииофен (тиол) (C₅);

N₁O₁: оксазол (C₅), изооксазол (C₅), изооксазин (C₆);

N₂O₁: оксадиазол (фуразан) (C₅);

N₃O₁: оксатриазол (C₅).

N₁S₁: тиазол (C₅), изотиазол (C₅);

N₂: имидазол (1,3-диазол) (C₅), пиразол (1,2-диазол) (C₅), пиридазин (1,2-диазин) (C₆), пиримидин (1,3-диазин) (C₆) (например, цитозин, тимин, урацил), пиразин (1,4-диазин) (C₆);

N₃: триазол (C₅), триазин (C₆);

N₄: тетразол (C₅).

Примеры гетероарила, содержащего конденсированные кольца, включают, но не ограничиваются этим:

C₉ (с 2 конденсированными кольцами), полученный из бензофурана (O₁), изобензофурана (O₁), индола (N₁), изоиндола (N₁), индолизина (N₁), индолина (N₁), изоиндолина (N₁), пурина (N₄) (например, аденин, гуанин), бензимидазола (N₂), индазола (N₂), бензоксазола (N₁O₁), бензизоксазола (N₁O₁), бензодиоксила (O₂), бензофуразана (N₂O₁), бензотриазола (N₃), бензотиофурана (S₁), бензотиазола (N₁S₁), бензотиадиазола (N₂S);

C₁₀ (с 2 конденсированными кольцами), полученный из хромена (O₁), изохромена (O₁), хромана (O₁), изохромана (O₁), бензодиоксиана (O₂), хинолина (N₁), изохинолина (N₁), хинолизина (N₁), бензоксазина (N₁O₁), бензодиазин (N₂), пиридопиридина (N₂), хиноксалина (N₂), хиназолина (N₂), циннолина (N₂), фталазина (N₂), нафтиридина (N₂), птеридина (N₄);

C₁₁ (с 2 конденсированными кольцами), полученный из бензодиазепина (N₂);

C₁₃ (с 3 конденсированными кольцами), полученный из карбазола (N₁), полученный из карбазола (N₁), дибензофурана (O₁), дибензотиофена (S₁), карболина (N₂), перимидина (N₂), пиридоиндола (N₂); и

C₁₄ (с 3 конденсированными кольцами), полученный из акридина (N₁), ксантена (O₁), тиоксантена (S₁), оксантрена (O₂), феноксатиина (O₁S₁), феназина (N₂), феноксазина (N₁O₁), фенотиазина (N₁S₁), тиантрена (S₂), фенантридина (N₁), фенантролина (N₂), феназина (N₂).

Вышеперечисленные группы, отдельно или как часть другого заместителя, сами могут быть необязательно замещены одной или более группами, выбранными из них самих и дополнительных заместителей, перечисленных ниже.

Галоген: -F, -Cl, -Br и -I.

Гидроксид: -OH.

Простой эфир: -OR, где R представляет собой заместитель простого эфира, например C₁₋₇алкильную группу (также упоминаемый как C₁₋₇алкоксигруппа, как описано ниже), C₃₋₂₀гетероциклическую группу (также упоминаемый как C₃₋₂₀гетероциклилоксигруппа) или C₅₋₂₀арильную группу (также упоминаемый как C₅₋₂₀арилоксигруппа), предпочтительно C₁₋₇алкильную группу.

Алкокси: -OR, где R представляет собой алкильную группу, например C₁₋₇алкильную группу. Примеры C₁₋₇алкоксигрупп включают, но не ограничиваются этим, OMe (метокси), OEt (этокси), -O(nPr) (н-пропокси), -O(iPr) (изопропокси), O(nBu) (н-бутокси), O(sBu) (втор-бутокси), O(tBu) (изобутокси) и O(tBu) (трет-бутокси).

Ацеталь: -CH(OR¹)(OR²), где R¹ и R² независимо представляют собой заместители ацетала, например C₁₋₇алкильную группу, C₃₋₂₀гетероциклическую группу или C₅₋₂₀арильную группу, предпочтительно C₁₋₇алкильную группу, или в случае "циклической" ацетальной группы R¹ и R² вместе с двумя атомами кислорода, к которым они присоединены, и атомами углерода, к которым они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 кольцевых атомов. Примеры ацетальных групп включают, но не ограничиваются этим, C-CH(OMe)₂, -CH(OEt)₂ и -CH(OMe)(OEt).

Полуацеталь: -CH(OH)(OR¹), где R¹ представляет собой заместитель полуацетала, например C₁₋₇алкильную группу, C₃₋₂₀гетероциклическую группу или C₅₋₂₀арильную группу, предпочтительно C₁₋₇алкильную группу. Примеры полуацетальных групп включают, но не ограничиваются этим, CH(OH)(OMe) и -CH(OH)(OEt).

Кеталь: -CR(OR¹)(OR²), где R¹ и R² являются такими, как определено для ацеталей, и R представляет собой заместитель кетала, отличный от водорода, например C₁₋₇алкильную группу, C₃₋₂₀гетероциклическую группу или C₅₋₂₀арильную группу, предпочтительно C₁₋₇алкильную группу. Примеры кетальных групп включают, но не ограничиваются этим, -C(Me)(OMe)₂, -C(Me)(OEt)₂, -C(Me)(OMe)(OEt), -C(Et)(OMe)₂, -C(Et)(OEt)₂ и -C(Et)(OMe)(OEt).

Полукеталь: -CR(OH)(OR¹), где R¹ является таким, как определено для полуацеталей, и R представляет собой заместитель полукетала, отличный от водорода, например C₁₋₇алкильную группу, C₃₋₂₀гетероциклическую группу или C₅₋₂₀арильную группу, предпочтительно C₁₋₇алкильную группу. Примеры полуацетальных групп включают, но не ограничиваются этим, -C(Me)(OH)(OMe), -C(Et)(OH)(OMe), -C(Me)(OH)(OEt) и -C(Et)(OH)(OEt).

Оксо (кето, -он): =O.

Тион (тиокетон): =S.

Имино (имин): =NR, где R представляет собой заместитель иминогруппы, например водород, C₁₋₇алкильную группу, C₃₋₂₀гетероциклическую группу или C₅₋₂₀арильную группу, предпочтительно водород или C₁₋₇алкильную группу. Примеры сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются этим, =NH, =NMe, =NEt и =NPh.

Формил (карбальдегид, карбоксыальдегид): -C(=O)H.

Ацил (кето): C(=O)R, где R представляет собой заместитель ацила, например C₁₋₇алкильную группу (также упоминаемый как C₁₋₇алкилацил или C₁₋₇алканоил), C₃₋₂₀гетероциклическую группу (также упоминаемый как C₃₋₂₀гетероциклилацил) или C₅₋₂₀арильную группу (также упоминаемый как C₅₋₂₀арилацил), предпочтительно C₁₋₇алкильную группу. Примеры ацильных групп включают, но не ограничиваются

этим, $C(=O)CH_3$ (ацетил), $C(=O)CH_2CH_3$ (пропионил), $C(=O)C(CH_3)_3$ (трет-бутирил) и $C(=O)Ph$ (бензоил, фенол).

Карбокси (карбоновая кислота): $-C(=O)OH$.

Тиокарбокси (тиокарбоновая кислота): $-C(=S)SH$.

Тиолокарбокси (тиолокарбоновая кислота): $-C(=O)SH$.

Тионокрбокси (тионокрбоновая кислота): $-C(=S)OH$.

Имидокислота: $-C(=NH)OH$.

Гидроксамовая кислота: $-C(=NOH)OH$.

Сложный эфир (карбоксилат, сложный эфир карбоновой кислоты, оксикарбонил): $-C(=O)OR$, где R представляет собой сложноэфирный заместитель, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются этим, $-C(=O)OCH_3$, $-C(=O)OCH_2CH_3$, $-C(=O)OC(CH_3)_3$ и $-C(=O)OPh$.

Ацилокси (обратный сложный эфир): $-OC(=O)R$, где R представляет собой ацилоксизаменитель, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры ацилоксигрупп включают, но не ограничиваются ими, $-OC(=O)CH_3$ (ацетокси), $-OC(=O)CH_2CH_3$, $-OC(=O)C(CH_3)_3$, $-OC(=O)Ph$ и $-OC(=O)CH_2Ph$.

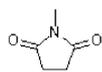
Оксикарбонил: $-OC(=O)OR$, где R представляет собой сложноэфирный заместитель, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются этим, $-OC(=O)OCH_3$, $-OC(=O)OCH_2CH_3$, $-OC(=O)OC(CH_3)_3$ и $-OC(=O)OPh$.

Амино: $-NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители для амина, например водород, C_{1-7} алкильную группу (также упоминаемый как C_{1-7} алкиламино или ди- C_{1-7} алкиламино), C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно H или C_{1-7} алкильную группу, или в случае "циклической" аминогруппы R^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 кольцевых атомов. Аминогруппы могут быть первичными ($-NH_2$), вторичными ($-NHR^1$) или третичными ($-NHR^1R^2$) и в катионной форме могут быть четвертичными ($-N^+R^1R^2R^3$). Примеры аминогрупп включают, но не ограничиваются ими, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-NHC(CH_3)_2$, $-N(CH_3)_2$, $-N(CH_2CH_3)_2$ и $-NHPh$. Примеры циклических аминогрупп включают, но не ограничиваются этим, азиридины, азетидины, пирролидины, пиперидины, пиперазины, морфолины и тиоморфолины.

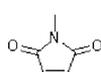
Амидо (карбамоил, карбамил, аминокрбонил, карбоксамид): $-C(=O)NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители для амина, как определено для аминогрупп. Примеры амидогрупп включают, но не ограничиваются этим, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NHCH_3$, $-C(=O)N(CH_3)_2$, $-C(=O)NHCH_2CH_3$ и $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$, а также амидогруппы, в которых R^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическую структуру, как, например, в пиперидинокарбониле, морфолинокарбониле, тиоморфолинокарбониле и пиперазинокарбониле.

Тиоамидо (тиокарбамил): $-C(=S)NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители для амина, как определено для аминогрупп. Примеры амидогрупп включают, но не ограничиваются этим, $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)NHCH_3$, $-C(=S)N(CH_3)_2$ и $-C(=S)NHCH_2CH_3$.

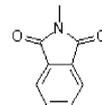
Ациламино (ациламино): $-NR^1C(=O)R^2$, где R^1 представляет собой заместитель амида, например водород, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно водород или C_{1-7} алкильную группу, и R^2 представляет собой заместитель ацила, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно водород или C_{1-7} алкильную группу. Примеры ациламидных групп включают, но не ограничиваются этим, $N-NHC(=O)CH_3$, $-NHC(=O)CH_2CH_3$ и $NHC(=O)Ph$. R^1 и R^2 могут вместе образовывать циклическую структуру, как, например, в сукцинимидиле, малеимидиле и фталиимидиле:



сукцинимидил



малеимидил



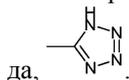
фталиимидил

Аминокрбонилокси: $-OC(=O)NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители аминогруппы, как определено для аминогрупп. Примеры аминокрбонилоксигрупп включают, но не ограничиваются этим, $-OC(=O)NH_2$, $-OC(=O)NHMe$, $-OC(=O)NMe_2$ и $-OC(=O)NEt_2$.

Уреидо: $-N(R^1)CONR^2R^3$, где R^2 и R^3 независимо представляют собой аминозаменители, как определено для аминогрупп, и R^1 представляет собой уреидозаменитель, например водород, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно водород или C_{1-7} алкильную группу. Примеры уреидогрупп включают, но не ограничиваются этим, $-NHCONH_2$, $-NHCONHMe$, $-NHCONHEt$, $-NHCONMe_2$, $-NHCONEt_2$, $-NMeCONH_2$, $-NMeCONHMe$, $-NMeCONHEt$, $-NMeCONMe_2$ и $-NMeCONEt_2$.

Гуанидино: $-NH-C(=NH)NH_2$.

Тетразолил: 5-членное ароматическое кольцо, содержащее четыре атома азота и один атом углеро-



да,

Имино: $=NR$, где R представляет собой заместитель иминогруппы, например водород, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно водород или C_{1-7} алкильную группу. Примеры иминогрупп включают, но не ограничиваются этим, $=NH$, $=NMe$ и $=NEt$.

Амидин (амидино): $-C(=NR)NR^2$, где каждый R представляет собой заместитель амидина, например водород, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно H или C_{1-7} алкильную группу. Примеры амидиновых групп включают, но не ограничиваются этим, $-C(=NH)NH_2$, $-C(=NH)NMe_2$ и $-C(=NMe)NMe_2$.

Нитро: $-NO_2$.

Нитрозо: $-NO$.

Азидо: $-N_3$.

Циано (нитрил, карбонитрил): $-CN$.

Изоциано: $-NC$.

Цианато: $-OCN$.

Изоцианато: $-NCO$.

Тиоциано (тиоцианато): $-SCN$.

Изотиоциано (изотиоцианато): $-NCS$.

Сульфгидрил (тиол, меркапто): $-SH$.

Простой тиоэфир (сульфид): $-SR$, где R представляет собой заместитель простого тиоэфира, например C_{1-7} алкильную группу (также упоминаемый как C_{1-7} алкилтиогруппа), C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры C_{1-7} алкилтио групп включают, но не ограничиваются этим, $-SCH_3$ и $-SCH_2CH_3$.

Дисульфид: $-SS-R$, где R представляет собой заместитель дисульфида, например, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу (также упоминаемую как C_{1-7} алкилдисульфид). Примеры C_{1-7} алкилдисульфидных групп включают, но не ограничиваются этим, $-SSCH_3$ и $-SSCH_2CH_3$.

Сульфин (сульфинил, сульфоксид): $-S(=O)R$, где R представляет собой сульфинильный заместитель, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сульфидных групп включают, но не ограничиваются этим, $-S(=O)CH_3$ и $-S(=O)CH_2CH_3$.

Сульфон (сульфонил): $-S(=O)_2R$, где R представляет собой сульфонильный заместитель, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу, включая, например, фторированную или перфторированную C_{1-7} алкильную группу.

Примеры сульфидных групп включают, но не ограничиваются ими, $-S(=O)_2CH_3$ (метансульфонил, мезил), $-S(=O)_2CF_3$ (трифлил), $-S(=O)_2CH_2CH_3$ (асил), $-S(=O)_2C_4F_9$ (нонафлил), $-S(=O)_2CH_2CF_3$ (трезил), $-S(=O)_2CH_2CH_2NH_2$ (таурил), $-S(=O)_2Ph$ (фенилсульфонил, бесил), 4-метилфенилсульфонил (тозил), 4-хлорфенилсульфонил (клозил), 4-бромфенилсульфонил (брозил), 4-нитрофенил (нозил), 2-нафталинсульфонат (напсил) и 5-диметиламино-нафталин-1-илсульфонат (дансил).

Сульфидная кислота (сульфино): $-S(=O)OH$, $-SO_2H$.

Сульфидная кислота (сульфо): $-S(=O)_2OH$, $-SO_3H$.

Сульфидат (сложный эфир сульфидной кислоты): $S(=O)OR$, где R представляет собой заместитель сульфидата, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сульфидатных групп включают, но не ограничиваются этим, $-S(=O)OCH_3$ (метоксисульфидил; метилсульфидат) и $-S(=O)OCH_2CH_3$ (этоксисульфидил; этилсульфидат).

Сульфидат (сложный эфир сульфидной кислоты): $-S(=O)_2OR$, где R представляет собой заместитель сульфидата, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сульфидатных групп включают, но не ограничиваются этим, $-S(=O)_2OCH_3$ (метоксисульфидил; метилсульфидат) и $-S(=O)_2OCH_2CH_3$ (этоксисульфидил; этилсульфидат).

Сульфидилокси: $-OS(=O)R$, где R представляет собой заместитель сульфидилокси группы, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сульфидилокси групп включают, но не ограничиваются этим, $-OS(=O)CH_3$ и $-OS(=O)CH_2CH_3$.

Сульфидилокси: $-OS(=O)_2R$, где R представляет собой заместитель сульфидилокси группы, например, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно

C_{1-7} алкильную группу. Примеры сульфиноксигрупп включают, но не ограничиваются этим, $-OS(=O)_2CH_3$ (мезилат) и $-OS(=O)_2CH_2CH_3$ (эзилат).

Сульфат: $-OS(=O)_2OR$; где R представляет собой заместитель сульфата, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сульфатных групп включают, но не ограничиваются этим, $-OS(=O)_2OCH_3$ и $-SO(=O)_2OCH_2CH_3$.

Сульфамил (сульфамоил; амид сульфоновой кислоты; сульфинамид): $-S(=O)NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители аминогруппы, как определено для аминогрупп. Примеры сульфамильных групп включают, но не ограничиваются этим, $-S(=O)NH_2$, $-S(=O)NH(CH_3)$, $-S(=O)N(CH_3)_2$, $-S(=O)NH(CH_2CH_3)$, $-S(=O)N(CH_2CH_3)_2$ и $-S(=O)NHPh$.

Сульфонамидо (сульфинамоил; амид сульфоновой кислоты; сульфонамид): $-S(=O)_2NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители аминогруппы, как определено для аминогрупп. Примеры сульфонамидных групп включают, но не ограничиваются этим, $-S(=O)_2NH_2$, $-S(=O)_2NH(CH_3)$, $-S(=O)_2N(CH_3)_2$, $-S(=O)_2NH(CH_2CH_3)$, $-S(=O)_2N(CH_2CH_3)_2$ и $-S(=O)_2NHPh$.

Сульфамино: $-NR^1S(=O)_2OH$, где R^1 представляет собой заместитель аминогруппы, как определено для аминогрупп. Примеры сульфаминогрупп включают, но не ограничиваются этим, $-NHS(=O)_2OH$ и $-N(CH_3)S(=O)_2OH$.

Сульфонамино: $-NR^1S(=O)_2R$, где R^1 представляет собой заместитель аминогруппы, как определено для аминогрупп, и R представляет собой заместитель сульфонаминогруппы, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сульфонаминогрупп включают, но не ограничиваются этим, $-NHS(=O)_2CH_3$ и $-N(CH_3)S(=O)_2C_6H_5$.

Сульфинамино: $-NR^1S(=O)R$, где R^1 представляет собой заместитель аминогруппы, как определено для аминогрупп, и R представляет собой заместитель сульфинаминогруппы, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сульфинаминогрупп включают, но не ограничиваются этим, $-NHS(=O)CH_3$ и $-N(CH_3)S(=O)C_6H_5$.

Фосфино (фосфин): $-PR_2$, где R представляет собой заместитель фосфиногруппы, например -H, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно -H, C_{1-7} алкильную группу или C_{5-20} арильную группу. Примеры фосфиногрупп включают, но не ограничиваются этим, $-PH_2$, $-P(CH_3)_2$, $-P(CH_2CH_3)_2$, $-P(t-Bu)_2$ и $-P(Ph)_2$.

Фосфо: $-P(=O)_2$.

Фосфинил (фосфиноксид): $-P(=O)R^2$, где R представляет собой заместитель фосфинила, например C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу или C_{5-20} арильную группу. Примеры фосфинильных групп включают, но не ограничиваются этим, $-P(=O)(CH_3)_2$, $-P(=O)(CH_2CH_3)_2$, $-P(=O)(t-Bu)_2$ и $-P(=O)(Ph)_2$.

Фосфоновая кислота (фосфоно): $-P(=O)(OH)_2$.

Фосфонат (фосфоновый сложный эфир): $-P(=O)(OR)_2$, где R представляет собой заместитель фосфоната, например -H, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно H, C_{1-7} алкильную группу или C_{5-20} арильную группу. Примеры фосфонатных групп включают, но не ограничиваются этим, $-P(=O)(OCH_3)_2$, $-P(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-P(=O)(O-t-Bu)_2$ и $-P(=O)(OPh)_2$.

Фосфорная кислота (фосфонокси): $-OP(=O)(OH)_2$.

Фосфат (сложный фосфонокси-эфир): $-OP(=O)(OR)_2$, где R представляет собой заместитель фосфата, например -H, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно H, C_{1-7} алкильную группу или C_{5-20} арильную группу. Примеры фосфатных групп включают, но не ограничиваются этим, $-OP(=O)(OCH_3)_2$, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(=O)(O-t-Bu)_2$ и $-OP(=O)(OPh)_2$.

Фосфористая кислота: $-OP(OH)_2$.

Фосфит: $-OP(OR)_2$, где R представляет собой заместитель фосфита, например -H, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно H, C_{1-7} алкильную группу или C_{5-20} арильную группу. Примеры фосфитных групп включают, но не ограничиваются этим, $-OP(OCH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(O-t-Bu)_2$ и $-OP(OPh)_2$.

Фосфорамидит: $-OP(OR^1)NR^2_2$, где R^1 и R^2 представляют собой заместители фосфорамидита, например, -H, (необязательно замещенную) C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно -H, C_{1-7} алкильную группу или C_{5-20} арильную группу. Примеры фосфорамидитных групп включают, но не ограничиваются этим, $-OP(OCH_2CH_3)N(CH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)N(i-Pr)_2$ и $-OP(OCH_2CH_2CN)N(i-Pr)_2$.

Фосфорамидат: $-OP(=O)(OR^1)NR^2_2$, где R^1 и R^2 представляют собой заместители фосфорамидата, например -H, (необязательно замещенную) C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно -H, C_{1-7} алкильную группу или C_{5-20} арильную группу. Примеры фосфорамидатных групп включают, но не ограничиваются этим, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)N(CH_3)_2$,

$-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$ и $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$.

Алкилен.

C_{3-12} алкилен: Термин " C_{3-12} алкилен" в данном контексте относится к бидентатному фрагменту, полученному посредством отщепления двух атомов водорода от одного и того же атома углерода или от двух разных атомов углерода углеводородного соединения, содержащего от 3 до 12 атомов углерода (если не указано иное), которое может быть алифатическим или алициклическим и которое может быть насыщенным, частично ненасыщенным или полностью ненасыщенным. Таким образом, термин "алкилен" включает подклассы алкенилена, алкинилена, циклоалкилена и т.д., рассмотренные ниже.

Примеры линейных насыщенных C_{3-12} алкиленовых групп включают, но не ограничиваются ими, $-(\text{CH}_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 3 до 12, например $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (пропилен), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (бутилен), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (пентилен) и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (гептилен).

Примеры разветвленных насыщенных C_{3-10} алкиленовых групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$.

Примеры линейных частично ненасыщенных C_{3-12} алкиленовых групп (C_{3-12} алкениленовых и алкиниленовых групп) включают, но не ограничиваются этим, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH}$, $-\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-\text{CH}=\text{CH}$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}$ и $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$.

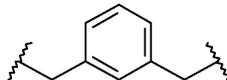
Примеры разветвленных частично ненасыщенных C_{3-12} алкиленовых групп (C_{3-12} алкениленовых и алкиниленовых групп) включают, но не ограничиваются этим, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_3)-$ и $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$.

Примеры алициклических насыщенных C_{3-12} алкиленовых групп (C_{3-12} циклоалкиленов) включают, но не ограничиваются этим, циклопентилен (например, циклопент-1,3-илен) и циклогексилен (например, циклогекс-1,4-илен).

Примеры алициклических частично ненасыщенных C_{3-12} алкиленовых групп (C_{3-12} циклоалкиленов) включают, но не ограничиваются этим, циклопентилен (например, 4-циклопентен-1,3-илен), циклогексилен (например, 2-циклогексен-1,4-илен; 3-циклогексен-1,2-илен; 2,5-циклогексадиен-1,4-илен).

В случае, если C_{3-12} алкиленовая группа прервана гетероатомом, нижний индекс относится к числу атомов в цепи, включая гетероатомы. Например, цепь $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4-$ будет группой C_5 .

Когда C_{3-12} алкиленовая группа прервана гетероатомом, нижний индекс относится к числу атомов непосредственно в цепи, включая ароматическое кольцо. Например, цепь будет группой C_5 .



Фрагмент лиганда.

Фрагмент лиганда может быть любого типа и включает белок, полипептид, пептид и непептидный агент, который специфически связывается с молекулой-мишенью. В некоторых вариантах реализации фрагмент лиганда может быть белком, полипептидом или пептидом. В некоторых вариантах реализации фрагмент лиганда может быть циклическим полипептидом. Указанные фрагменты лиганда могут включать антитела или фрагмент антитела, который содержит по меньшей мере один сайт, связывающий молекулу-мишень, лимфокины, гормоны, факторы роста или любую другую клеточно-связывающую молекулу или вещество, которое может специфически связываться с мишенью.

Термины "специфически связывается" и "специфическое связывание" относятся к связыванию антитела или другого белка, полипептида или пептида с определенной молекулой (например, антигеном). Обычно антитело или другая молекула связывается с аффинностью по меньшей мере около $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ и связывается с определенной молекулой с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем ее аффинность связывания с неспецифической молекулой (например, BSA, казеин), отличной от указанной определенной молекулы или близкородственной молекулы.

Примеры фрагментов лиганда включают агенты, описанные для применения в WO 2007/085930, включенной в данный документ.

В некоторых вариантах реализации фрагмент лиганда представляет собой клеточно-связывающий агент, который связывается с внеклеточной мишенью на клетке. Такой клеточно-связывающий агент, может быть белком, полипептидом, пептидом или непептидным агентом. В некоторых вариантах реализации клеточно-связывающий агент, может быть белком, полипептидом или пептидом. В некоторых вариантах реализации клеточно-связывающий агент может быть циклическим полипептидом. Клеточно-связывающий агент также может быть антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела. Так, в одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC).

Клеточно-связывающий агент.

Клеточно-связывающий агент может быть любого типа и включает пептиды и непептиды. Они могут включать антитела или фрагмент антитела, который содержит по меньшей мере один связывающий сайт, лимфокины, гормоны, миметики гормонов, витамины, факторы роста, молекулы, транспортирую-

щие питательные вещества или любую другую клеточно-связывающую молекулу или вещество.

Пептиды.

В одном варианте реализации клеточно-связывающий агент представляет собой линейный или циклический пептид, содержащий 4-30, предпочтительно 6-20 последовательных аминокислотных остатков. В данном варианте реализации предпочтительно, что один клеточно-связывающий агент связан с одним мономером или димером пирролобензодиазепинового соединения.

В одном варианте реализации клеточно-связывающий агент содержит пептид, который связывает интегрин $\alpha_v\beta_6$. Указанный пептид может быть селективным в отношении $\alpha_v\beta_6$ по сравнению с XYS.

В одном варианте реализации клеточно-связывающий агент содержит полипептид A20FMDV-Cys. A20FMDV-Cys имеет последовательность: NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. Альтернативно, можно использовать вариант последовательности A20FMDV-Cys, в которой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных остатков замещены другим аминокислотным остатком. Кроме того, указанный полипептид может иметь последовательность NAVXXXXXXXXXXXXXXXXXRTC.

Антитела.

Термин "антитело" в данном контексте использован в самом широком смысле и включает, в частности, моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител при условии, что они демонстрируют требуемую биологическую активность (Miller et al. (2003), *Jour. of Immunology*, 170:4854-4861). Антитела могут быть мышинными, человеческими, гуманизированными, химерными или полученными из других видов. Антитело представляет собой белок, созданный иммунной системой, который способен распознавать и связываться со специфическим антигеном. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001), *Immuno Biology*, 5-е изд., Garland Publishing, Нью-Йорк). Антиген мишени обычно имеет множество связывающих сайтов, также называемых эпитопами, которые распознаются определяющими комплементарность областями (CDR) различных антител. Каждое антитело, которое специфически связывается с другим эпитопом, имеет другую структуру. Так, один антиген может иметь более одного соответствующего антитела. Антитело включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, т.е. молекулу, которая содержит антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с антигеном рассматриваемой мишени или его частью, и такие мишени включают, но не ограничиваются ими, раковые клетки или клетки, которые вырабатывают аутоиммунные антитела, связанные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин может быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса иммуноглобулиновых молекул. Иммуноглобулины могут быть получены из любых видов животных, включая человека, мышей или кроликов.

"Фрагменты антител" содержат часть полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающую или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и scFv; диатела; линейные антитела; фрагменты, полученные экспрессионной библиотекой Fab, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (определяющую комплементарность область) и эпитопсвязывающие фрагменты любых вышеперечисленных, которые иммуноспецифически связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами, одноцепочечными молекулами антител; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин "моноклональное антитело" в данном контексте относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, т.е. отдельные антитела, образующие указанную популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, направленными против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые содержат различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Помимо их специфичности, моноклональные антитела имеют то преимущество, что их можно синтезировать без примеси других антител. Модификатор "моноклональное" указывает на характер антитела как полученный по существу из однородной популяции антител, и его не следует толковать как требующий получения указанного антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, подходящие для применения по данному изобретению, можно получать гибридомным способом, впервые описанным авторами Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, или можно получать способами рекомбинантных ДНК (см. US 4816567). Моноклональные антитела можно также выделять из библиотек фаговых антител с применением технологий, описанных в публикации Clackson et al. (1991), *Nature*, 352:624-628; Marks et al. (1991). *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, или из трансгенных мышей, несущих полностью человеческую иммуноглобулиновую систему (Lonberg (2008), *Curr. Opin.* 20(4):450-459).

Моноклональные антитела в данном контексте включают, в частности, "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенных видов животных, или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, а остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из других видов животных, или принадлежащих к друго-

му классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител при условии, что они демонстрируют требуемую биологическую активность (US 4816567 и Morrison et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Химерные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменного домена, полученные из примата, не являющегося человеком (например, мартышковых или человекообразных обезьян), и последовательности константной области человека.

"Интактное антитело" в данном контексте 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 нативной последовательности (например, константные домены человеческой нативной последовательности) или варианты их аминокислотной последовательности. Интактное антитело может иметь одну или более "эффекторных функций", которые относятся к биологической активности, связанной с областью Fc (областью Fc нативной последовательности или областью Fc варианта аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q; комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание рецептора Fc; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз и угнетающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности, таких как рецептор В-клеток и BCR.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей, интактные антитела можно разделить на различные "классы". Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно разделить на "подклассы" (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелых цепей, которые соответствуют различным классам антител, называют α , β , ϵ , γ и μ соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов являются общеизвестными.

Гуманизация.

Технологии снижения *in vivo* иммуногенности нечеловеческого антитела или фрагмента антитела включают технологии, называемые "гуманизацией".

Термин "гуманизованное антитело" относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере часть модифицированной переменной области человеческого антитела, в которой часть указанной переменной области, предпочтительно часть, которая значительно меньше интактного человеческого переменного домена, замещена соответствующей последовательностью из нечеловеческих видов, и при этом указанная модифицированная переменная область связана по меньшей мере с другой частью другого белка, предпочтительно с 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") замещены аминокислотными остатками из аналогичных сайтов антител грызунов или других нечеловеческих антител. Выражение "гуманизованное антитело" также включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмент, который содержит FR, содержащую по существу аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и CDR, имеющую по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина.

"Гуманизованные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные 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 содержать консервативные аминокислотные замещения или неприродные остатки из тех же или других видов, которые существенно не отличаются по своей связывающей и/или биологической активности. Такие антитела являются химерными антителами, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческих иммуноглобулинов.

Существует множество технологий гуманизации, включая "прививку CDR", "направленный выбор", "деиммунизацию", "изменение поверхности" (также известное как "рекомбинация поверхностных остатков"), "композиционные антитела", "оптимизацию состава человеческой цепочки" и перестановку в каркасе.

Прививка CDR.

В данной технологии гуманизованные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (принимающее антитело), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) принимающего антитела заменены на остатки из CDR нечеловеческих видов (донорное антитело), таких как мыши, крысы, верблюды, быки, козы или кролики, имеющие требуемые свойства (по факту, нечеловеческие CDR "прививают" на человеческий каркас). В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменяют на соответствующие нечеловеческие остатки (это может происходить, например, если определенный остаток FR имеет значительное влияние на связывание анти-

гена).

Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются ни в принимающем антителе, ни в импортированной CDR или каркасных последовательностях. Указанные модификации осуществляют для дополнительного улучшения и максимизации характеристик антитела. Таким образом, в общем, гуманизированное антитело содержит все из по меньшей мере одного и в одном аспекте двух переменных доменов, в которых все или все гипервариабельные петли соответствуют аналогичным структурам нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все области FR являются областями последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно также содержит по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина или человеческого иммуноглобулина.

Направленный отбор.

Указанный способ состоит из комбинирования домена V_H или V_L данного нечеловеческого антитела, специфичного в отношении определенного эпитопа, с библиотекой человеческого V_H или V_L , и специфические человеческие V домены отбирают по отношению к рассматриваемому антигену. Такой отобранный V_H затем комбинируют с библиотекой V_L с получением полной человеческой комбинации $V_H \times V_L$. Указанный способ описан в публикации Nature Biotechnology (N.Y.), 12, (1994), 899-903.

Композиционные антитела.

В указанном способе два или более сегмента аминокислотных последовательностей из человеческого антитела комбинируют с готовой молекулой антитела. Их конструируют посредством комбинирования множества сегментов человеческой последовательности V_H и V_L в комбинациях, которые ограничивают или исключают эпитопы Т-клеток человека в V областях готового композиционного антитела. При необходимости эпитопы Т-клеток ограничивают или устраняют посредством замены сегментов V области, способствующих или кодирующих эпитоп Т-клетки, на альтернативные сегменты, которые устраняют эпитопы Т-клеток. Указанный способ описан в US 2008/0206239A1.

Деиммунизация.

Указанный способ включает удаление эпитопов Т-клетки человека (или других вторичных видов) из V областей терапевтического антитела (или другой молекулы). Последовательность V -области терапевтических антител анализируют на наличие мотивов, связывающих МНС II класса, например сравнивая с базами данных МНС-связывающих мотивов (таких как база данных указанных "мотивов", размещенная на сайте www.who.edu.au). Альтернативно, мотивы, связывающие МНС II класса, можно идентифицировать с помощью методов вычислительного протягивания, описанных в публикации Altuvia et al. Mol. Biol. (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)); в указанных способах последовательные перекрывающиеся пептиды из последовательностей V -области проверяют на энергию их связывания с белками МНС II класса. Затем полученные данные можно объединять с информацией о других особенностях последовательности, которые относятся к успешно открытым пептидам, таких как амфипатичность, мотивы Ротбарда и сайты расщепления для катепсина В и других процессорирующих ферментов.

После идентификации возможных эпитопов Т-клеток вторичных видов (например, человека) их исключают посредством изменения одной или более аминокислот. Модифицированные аминокислоты обычно находятся в самом эпитопе Т-клетки, но также могут быть расположены вблизи эпитопа с точки зрения первичной или вторичной структуры белка (и, следовательно, могут не быть расположены рядом в первичной структуре). Наиболее типично такое изменение осуществляют посредством замены, но в некоторых случаях может быть более подходящим добавление или удаление аминокислоты.

Все изменения можно осуществлять технологией рекомбинантных ДНК, так что готовую молекулу можно получать экспрессией из рекомбинантного хозяина с применением хорошо известных способов, таких как сайт-направленный мутагенез. Однако возможно также применение белковой химии или любых других способов молекулярного изменения.

Изменение поверхности.

Указанный способ включает:

(a) определение конформационной структуры переменной области нечеловеческого (например, грызунов) антитела (или его фрагмента) посредством создания трехмерной модели переменной области нечеловеческого антитела;

(b) создание выравнивания последовательностей с применением распределений относительной доступности на основании рентгеновских кристаллографических структур достаточного количества тяжелых и легких цепей переменной области нечеловеческого и человеческого антитела с получением набора каркасных положений тяжелой и легкой цепей, в которых положения выравнивания идентичны на 98% относительно достаточного количества тяжелых и легких цепей нечеловеческого антитела;

(c) определение нечеловеческого антитела, подлежащего гуманизации, для чего поверхность набора тяжелой и легкой цепей подвергают действию аминокислотных остатков с использованием набора каркасных положений, полученного на стадии (b);

(d) идентификацию по аминокислотным остаткам человеческого антитела поверхности набора тяжелой и легкой цепей, подверженной действию аминокислотных остатков, которые наиболее близко идентичны указанной поверхности набора, подверженной действию аминокислотных остатков, опреде-

ленной на стадии (с), причем тяжелая и легкая цепи из человеческого антитела являются или не являются естественным образом спаренными;

(е) замещение в аминокислотной последовательности нечеловеческого антитела, подлежащего гуманизации, поверхности набора тяжелой и легкой цепей, подверженной действию аминокислотных остатков, определенной на стадии (с), на поверхность набора тяжелой и легкой цепей, подверженную действию аминокислотных остатков, определенную на стадии (d);

(f) построение трехмерной модели варибельной области нечеловеческого антитела, полученной в результате замещения, описанного на стадии (е);

(g) идентификацию, посредством сравнения трехмерных моделей, построенных на стадиях (а) и (f), любых аминокислотных остатков из наборов, идентифицированных на стадиях (с) или (d), которые находятся в пределах 5 ангстрем от любого атома любого остатка областей, определяющих комплементарность, данного нечеловеческого антитела, подлежащего гуманизации; и

(h) замену любых остатков, идентифицированных на стадии (g), из человеческого на исходный нечеловеческий аминокислотный остаток с получением гуманизирующего набора поверхности нечеловеческого антитела, подверженного действию аминокислотных остатков; при условии, что стадию (а) необязательно следует проводить первой, но ее следует проводить до стадии (g).

Супергуманизация.

В указанном способе сравнивают нечеловеческую последовательность с функциональным репертуаром генов зародышевой линии человека. Выбирают те человеческие гены, которые кодируют канонические структуры, идентичные или близкородственные к нечеловеческим последовательностям. Выбранные человеческие гены с наивысшей гомологией в CDR выбирают в качестве доноров FR. Наконец, нечеловеческие CDR прививают на указанные человеческие FR. Указанный способ описан в патенте WO 2005/079479A2.

Оптимизация состава человеческой цепочки.

В указанном способе сравнивают нечеловеческую (например, мышиную) последовательность с репертуаром генов зародышевой линии человека и оценивают различия как содержание человеческой цепочки (HSC), которое количественно определяет последовательность на уровне потенциальных эпитопов МНС/Т-клетки. Затем гуманизируют целевую последовательность, максимизируя ее HSC, вместо использования измерения общей идентичности для создания многочисленных различных гуманизированных вариантов (описано в публикации Molecular Immunology, 44, (2007), 1986-1998).

Перестановка в каркасе.

CDR нечеловеческого антитела гибридизуют внутри рамки с пулами кДНК, включающими все известные каркасы тяжелой и легкой цепей гена зародышевой линии человека. Затем гуманизированные антитела отбирают, например, посредством пэннинга фаг-дисплейной библиотеки антител. Указанный способ описан в публикации Methods, 36, 43-60 (2005).

Примеры клеточно-связывающих агентов включают агенты, описанные для применения в WO 2007/085930, включенном в данный документ.

Опухолеассоциированные антигены и когнатные антитела для применения в вариантах реализации данного изобретения перечислены ниже.

Опухолеассоциированные антигены и когнатные антитела

(1) VMРR1В (рецептор костного морфогенетического белка типа IВ).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_001203.

Genbank, версия номер NM_001203.2 GI: 169790809.

Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:06 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_001194.

Genbank, версия номер NP_001194.1 GI: 4502431.

Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:06 пп.

Перекрестные ссылки:

101-104 (1994), Oncogene, 14(11):1377-1382 (1997));

WO 2004/063362 (п.2); WO 2003/042661 (п.12);

US 2003/134790-A1 (с. 38-39); WO 2002/102235 (п.13; с. 296);

WO 2003/055443 (с. 91-92); WO 2002/99122 (пример 2; с. 528-530);

WO 2003/029421 (п.6); WO 2003/024392 (п.2; фиг. 112);

WO 2002/98358 (п.1; с. 183); WO 2002/54940 (с. 100-101);

WO 2002/59377(с. 349-350); WO 2002/30268 (п.27; с. 376);

WO 2001/48204 (пример; фиг. 4);

NP_001194, костного морфогенетического белка, тип IВ/pid=NP_001194.1;

MIM:603248; AY 065994.

(2) E16 (LAT1, SLC7A5).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_003486.

Genbank, версия номер NM_003486.5 GI: 71979931.

Genbank, дата обновления записи: 27 июня, 2012 г., 12:06 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_003477.

Genbank, версия номер NP_003477.4 GI: 71979932.

Genbank, дата обновления записи: 27 июня, 2012 г., 12:06 пп.

Перекрестные ссылки:

Biochem. Biophys. Res. Commun. 255(2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al. (1992), J. Biol. Chem. 267(16):11267-11273);

WO 2004/048938 (пример 2); WO 2004/032842 (пример IV);

WO 2003/042661 (п.12); WO 2003/016475 (п.1);

WO 2002/78524 (пример 2); WO 2002/99074 (п.19; с. 127-129);

WO 2002/86443 (п.27; с. 222, 393); WO 2003/003906 (п.10; с. 293);

WO 2002/64798 (п.33; с. 93-95); WO 2000/14228 (п.5; с. 133-136);

US 2003/224454 (фиг. 3); WO 2003/025138 (п.12; с. 150);

NP_003477 семейство носителей растворенных веществ 7 (катионный аминокислотный транспортер, у+система), член 5 /pid=NP_003477.3 - Homo sapiens.

MIM:600182; NM_015923.

(3) STEAP1 (шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_012449.

Genbank, версия номер NM_012449.2 GI: 22027487.

Genbank, дата обновления записи: 9 сентября, 2012 г., 02:57 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_036581.

Genbank, версия номер NP_036581.1 GI: 9558759.

Genbank, дата обновления записи: 9 сентября, 2012 г., 02:57 пп.

Перекрестные ссылки:

Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al. (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. Acad. Sci. U.S.A. 96(25):14523-14528);

WO 2004/065577 (п.6); WO 2004/027049 (фиг. 1L); EP 1394274 (пример 11); WO 2004/016225 (п.2); WO 2003/042661 (п.12);

US 2003/157089 (пример 5); US 2003/185830 (пример 5); US 2003/064397 (фиг. 2);

WO 2002/89747 (пример 5; с. 618-619); WO 2003/022995 (пример 9; фиг. 13A, 35, пример 53; с. 173, пример 2; фиг. 2A);

шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы;

MIM: 604415.

(4) 0772P (CA125, MUC16).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AF361486.

Genbank, версия номер AF361486.3 GI: 34501466.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г. г., 07:56 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа АКК74120.

Genbank, версия номер ALL74120.3 GI: 34501467.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г. г., 07:56 дп.

Перекрестные ссылки:

J. Biol. Chem. 276(29):27371-27375 (2001)); WO 2004/045553 (п.14);

WO 2002/92836 (п.6, фиг. 12); WO 2002/83866 (п.15; с. 116-121);

US 2003/124140 (пример 16);

GI: 34501467;

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, фактор стимуляции мегакариоцитов, мезотелин).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_005823.

Genbank, версия номер NM_005823.5 GI: 293651528.

Genbank, дата обновления записи: 2 сентября, 2012 г., 01:47 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_005814.

Genbank, версия номер NP_005814.2 GI: 53988378.

Genbank, дата обновления записи: 2 сентября, 2012 г., 01:47 пп.

Перекрестные ссылки:

Yamaguchi, N., et al. *Biol. Chem.* 269(2), 805-808 (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. США*, 96(20):11531-11536 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 93 (1):136-140 (1996), *J. Biol. Chem.* 270 (37):21984-21990 (1995));

WO 2003/101283 (п.14); (WO 2002/102235 (п.13; с. 287-288);
WO 2002/101075 (п.4; с. 308-309); WO 2002/71928 (с. 320-321);
WO 94/10312 (с. 52-57); IM:601051.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_006424.

Genbank, версия номер NM_006424.2 GI: 110611905.

Genbank, дата обновления записи: 22 июля, 2012 г., 03:39 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_006415.

Genbank, версия номер NP_006415.2 GI: 110611906.

Genbank, дата обновления записи: 22 июля, 2012 г., 03:39 пп.

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 (п.2); EP 1394274 (пример 11); WO 2002/102235 (п.13; с. 326);

EP 0875569 (п.1; с. 17-19); WO 2001/57188 (п.20; с. 329);

WO 2004/032842 (пример IV); WO 2001/75177 (п.24; с. 139-140); MIM: 604217.

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Нlog семафорина 5b, домен sema 25, из семи тромбоспондиновых повторов (типа 1 и подобных типу 1), трансмембранный домен (ТМ) и короткий цитоплазматический домен, (семафорин) 5B).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AB040878.

Genbank, версия номер AB040878.1 GI: 7959148.

Genbank, дата обновления записи: 2 августа, 2006 г., 05:40 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа BAA95969.

Genbank, версия номер BAA95969.1 GI: 7959149.

Genbank, дата обновления записи: 2 августа, 2006 г., 05:40 пп.

Перекрестные ссылки:

Nagase T., et al. (2000), *DNA Res.* 7(2):143-150); WO 2004/000997 (п.1);

WO 2003/003984 (п.1); WO 2002/06339 (п.1; с. 50); WO 2001/88133 (п.1; с. 41-43, 48-58);

WO 2003/054152 (п.20); WO 2003/101400 (п.11); образец: Q9P283;

Genew; HGNC: 10737.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AY358628.

Genbank, версия номер AY358628.1 GI: 37182377.

Genbank, дата обновления записи: 1 декабря, 2009 г., 04:15 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAQ88991.

Genbank, версия номер AAQ88991.1 GI: 37182378.

Genbank, дата обновления записи: 1 декабря, 2009 г., 04:15 дп.

Перекрестные ссылки:

Ross et al. (2002), *Cancer Res.* 62:2546-2553; US 2003/129192 (п.2); US 2004/044180 (п.12);

US 2004/044179 (п.11); US 2003/096961 (п.11); US 2003/232056 (пример 5);

WO 2003/105758 16 (п.12); US 2003/206918 (пример 5); EP 1347046 (п.1);

WO 2003/025148 (п.20); GI: 7182378.

(9) ETBR (рецептор эндотелина типа B).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AY275463.

Genbank, версия номер AY275463.1 GI: 30526094.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г. г., 02:26 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAR32295.

Genbank, версия номер AAR32295.1 GI: 30526095.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 201 г., 02:26 дп.

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. U.S.A.* 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 E.G., et al. *Cell*, 79, 1257-1266, 1994;
 Attie T., et al. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2407-2409, 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 (п.1); WO 2004/048938 (пример 2); WO 2004/040000 (п.151);
 WO 2003/087768 (п.1); WO 2003/016475 (п.1); WO 2003/016475 (п.1);
 WO 2002/61087 (фиг. 1); WO 2003/016494 (фиг. 6); WO 2003/025138 (п.12; с. 144);
 WO 2001/98351 (п.1; с. 124-125); EP 0522868 (п.8; фиг. 2);
 WO 2001/77172 (п.1; с. 297-299); US 2003/109676; US 6518404 (фиг. 3); U
 S5773223 (п.1а; кол. 31-34); WO 2004/001004.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_017763.

Genbank, версия номер NM_017763.4 GI: 167830482.

Genbank, дата обновления записи: 22 июля, 2012 г., 12:34 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_060233.

Genbank, версия номер NP_060233.3 GI: 56711322.

Genbank, дата обновления записи: 22 июля, 2012 г., 12:34 дп.

Перекрестные ссылки:

WO 2003/104275 (п.1); WO 2004/046342 (пример 2); WO 2003/042661 (п.12);

WO 2003/083074 (п.14; с. 61); WO 2003/018621 (п.1); WO 2003/024392 (п.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, шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2, шестой трансмембранный белок предстательной железы).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AF455138.

Genbank, версия номер AF455138.1 GI: 22655487.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г. г., 01:54 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAN04080.

Genbank, версия номер AAN04080.1 GI: 22655488.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г. г., 01:54 дп.

Перекрестные ссылки:

Lab. Invest. 82(11):1573-1582 (2002); WO 2003/087306;

US 2003/064397 (п.1; фиг. 1); WO 2002/72596 (п.13; с. 54-55);

WO 2001/72962 (п.1; фиг. 4B); WO 2003/104270 (п.11);

WO 2003/104270 (п.16); US 2004/005598 (п.22);

WO 2003/042661 (п.12); US 2003/060612 (п.12; фиг. 10);

WO 2002/26822 (п.23; фиг. 2); WO 2002/16429 (п.12; фиг. 10); GI: 22655488.

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, катионный канал тразиторного рецепторного потенциала 5, подсемейство M, член 4).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_017636.

Genbank, версия номер NM_017636.3 GI: 304766649.

Genbank, дата обновления записи: 29 июня, 2012 г., 11:27 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_060106.

Genbank, версия номер NP_060106.2 GI: 21314671.

Genbank, дата обновления записи: 29 июня, 2012 г., 11:27 дп.

Перекрестные ссылки:

Xu, X.Z., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(19):10692-10697 (2001), Cell 109(3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003));

US 2003/143557 (п.4); WO 2000/40614 (п.14; с. 100-103);

WO 2002/10382 (п.1; фиг. 9A); WO 2003/042661 (п.12);

WO 2002/30268 (п.27; с. 391); US 2003/219806 (п.4);

WO 2001/62794 (п.14; фиг. 1A-D); MIM: 606936.

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор роста, полученный из тератокарциномы).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_003212.

Genbank, версия номер NM_003212.3 GI: 292494881.

Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:27 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_003203.

Genbank, версия номер NP_003203.1 GI: 4507425.

Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:27 пп.

Перекрестные ссылки:

Ciccodicola, A., et al. EMBO J. 8(7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49(3):555-565 (1991));

US 2003/224411 (п.1); WO 2003/083041 (пример 1); WO 2003/034984 (п.12);

WO 2002/88170 (п.2; с. 52-53); WO 2003/024392 (п.2; фиг. 58);

WO 2002/16413 (п.1; с. 94-95, 105); WO 2002/22808 (п.2; фиг. 1);

US 5854399 (пример 2; Col 17-18); US 5792616 (фиг. 2); MIM: 187395.

Нс. 73792). (14) CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2) или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барра) или

Нс. 73792).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M26004.

Genbank, версия номер M26004.1 GI: 181939.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA35786.

Genbank, версия номер AAA35786.1 GI: 181940.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 дп.

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. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987;

Barel M., et al. Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998;

Weis J.J., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986;

Sinha S.K., et al. (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320;

WO 2004/045520 (пример 4); US 2004/005538 (пример 1);

WO 2003/062401 (п.9); WO 2004/045520 (пример 4);

WO 91/02536 (фиг. 9.1-9.9); WO 2004/020595 (п.1);

Присоединение: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_000626.

Genbank, версия номер NM_000626.2 GI: 90193589.

Genbank, дата обновления записи: 26 июня, 2012 г., 01:53 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_000617.

Genbank, версия номер NP_000617.1 GI: 11038674.

Genbank, дата обновления записи: 26 июня, 2012 г., 01:53 пп.

Перекрестные ссылки:

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (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 (п.2, фиг. 140); WO 2003/087768, US 2004/101874 (п.1, с. 102);

WO 2003/062401 (п.9); WO 2002/78524 (пример 2); US 2002/150573 (п.5, с. 15);

US 5644033; WO 2003/048202 (п.1, с. 306 и 309); WO 99/58658, US 6534482 (п.13, фиг. 17A/B);

WO 2000/55351 (п.11, с. 1145-1146); MIM: 147245.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_030764.

Genbank, версия номер NM_030764.3 GI: 227430280.

Genbank, дата обновления записи: 30 июня, 2012 г., 12:30 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_110391.

Genbank, версия номер NP_110391.2 GI: 19923629.

Genbank, дата обновления записи: 30 июня, 2012 г., 12:30 дп.

Перекрестные ссылки:

AY358130;

Genome Res. 13(10):2265-2270 (2003), Immunogenetics, 54(2):87-95 (2002), Blood, 99(8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98(17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al. (2001), Biochem. Biophys. Res. Commun. 280(3):768-775;

WO 2004/016225 (п.2); WO 2003/077836; WO 2001/38490 (п.5; фиг. 18D-1-18D-2); WO 2003/097803 (п.12); WO 2003/089624 (п.25); MIM: 606509.

(17) HER2 (ErbB2).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M11730.

Genbank, версия номер M11730.1 GI: 183986.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA75493.

Genbank, версия номер AAA75493.1 GI: 306840.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 дп.

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. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985;

Swiercz J.M., et al. J. Cell Biol. 165, 869-880, 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 (п.9); WO 2003/016475 (п.1); US 2003/118592;

WO 2003/008537 (п.1); WO 2003/055439 (п.29; фиг. 1A, B); WO 2003/025228 (п.37; фиг. 5C);

WO 2002/22636 (пример 13; с. 95-107); WO 2002/12341 (п.68; фиг. 7);

WO 2002/13847 (с. 71-74); WO 2002/14503 (с. 114-117); WO 2001/53463 (п.2; с. 41-46);

WO 2001/41787 (с. 15); WO 2000/44899 (п.52; фиг. 7); WO 2000/20579 (п.3; фиг. 2);

US 5869445 (п.3; Col 31-38); WO 9630514 (п.2; с. 56-61);

EP 1439393 (п.7); WO 2004/043361 (п.7); WO 2004/022709; WO 2001/00244 (пример 3; фиг. 4);

присоединение: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761. AAA35808.1.

Антигела.

Abbott - US 20110177095:

например, антитело, содержащее CDR, которые имеют, в целом, по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с CDR, имеющими 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), причем указанное анти-HER2 антитело или анти-HER2 связывающий фрагмент имеет сниженную иммуногенность по сравнению с антителом, имеющим V_H с последовательностью SEQ ID NO: 1 и V_L с последовательностью SEQ ID NO: 2.

Биоген - US 20100119511:

например, номера доступа ATCC: PTA-10355, PTA-10356, PTA-10357, PTA10358;

например, молекула очищенного антитела, которая связывается с HER2, содержащая все шесть CDR из антитела, выбранного 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 ВПВ65В03 (SEQ ID NO: 43, 45), или CDR, которые идентичны или которые имеют не более двух изменений относительно указанных CDR.

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

Пергузумаб (Genentech):

US 20110117097:

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

US 20090285837 US 20090202546;

например, номера доступа ATCC: HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12698;

US 20060088523:

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

например, антитело, содержащее аминокислотные последовательности вариабельной легкой и вариабельной тяжелой цепи 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;

US 20060018899:

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

например, антитело, содержащее аминокислотную последовательность в SEQ ID NO: 23, или ее де-замидированный и/или окисленный вариант;

US 2011/0159014:

например, антитело, имеющее вариабельный домен легкой цепи, содержащий гипервариабельные области SEQ ID NO: 1,

например, антитело, имеющее вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий гипервариабельные области SEQ ID NO: 2.

US 20090187007:

Гликопептид: TrasGEX антитела <http://www.glycotope.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: US 20110217305.

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:

Genbank, номер доступа M18728.

Genbank, версия номер M18728.1 GI: 189084.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:48 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA59907.

Genbank, версия номер AAA59907.1 GI: 189085.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:48 дп.

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. 99. 16899-16903, 2002;

WO 2004/063709; EP 1439393 (п.7); WO 2004/044178 (пример 4);

WO 2004/031238; WO 2003/042661 (п.12); WO 2002/78524 (пример 2);

WO 2002/86443 (п.27; стр. 427); WO 2002/60317 (п.2);

присоединение: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728.

(19) MDP (DPER1).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа BC017023.

Genbank, версия номер BC017023.1 GI: 16877538.

Genbank, дата обновления записи: 6 марта, 2012 г., 01:00 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAN17023.

Genbank, версия номер AAN17023.1 GI: 16877539.

Genbank, дата обновления записи: 6 марта, 2012 г., 01:00 пп.

Перекрестные ссылки:

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99(26):16899-16903 (2002);

WO 2003/016475 (п.1); WO 2002/64798 (п.33; с. 85-87);

JP 05003790 (фиг. 6-8); WO 99/46284 (фиг. 9); MIM: 179780.

(20) IL20R-alpha (IL20Ra, ZCYTOR7).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AF184971.

Genbank, версия номер AF184971.1 GI: 6013324.

Genbank, дата обновления записи: 10 марта, 2010 г., 10:00 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAF01320.

Genbank, версия номер AAF01320.1 GI: 6013325.

Genbank, дата обновления записи: 10 марта, 2010 г., 10:00 пп.

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), *Biochemistry* 42:12617-12624;

Sheikh F., et al. (2004), *J. Immunol.* 172, 2006-2010;

EP 1394274 (пример 11); US 2004/005320 (пример 5); WO 2003/029262 (с. 74-75);

WO 2003/002717 (п.2; с. 63); WO 2002/22153 (с. 45-47); US 2002/042366 (с. 20-21);

WO 2001/46261 (с. 57-59); WO 2001/46232 (с. 63-65); WO 98/37193 (п.1; с. 55-59);

образец: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

(21) Бревиканец (VCAN, ВЕНАВ).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AF229053.

Genbank, версия номер AF229053.1 GI: 10798902.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г., 12:58 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAG23135.

Genbank, версия номер AAG23135.1 GI: 10798903.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г., 12:58 дп.

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. U.S.A.* 99, 16899-16903, 2002;

US 2003/186372 (п.11); US 2003/186373 (п.11); US 2003/119131 (п.1; фиг. 52);

US 2003/119122 (п.1; фиг. 52); US 2003/119126 (п.1); US 2003/119121 (п.1; фиг. 52);

US 2003/119129 (п.1); US 2003/119130 (п.1); US 2003/119128 (п.1; фиг. 52);

US 2003/119125 (п.1); WO 2003/016475 (п.1); WO 2002/02634 (п.1).

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_004442.

Genbank, версия номер NM_004442.6 GI: 111118979.

Genbank, дата обновления записи: 8 сентября, 2012 г., 04:43 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_004433.

Genbank, версия номер NP_004433.2 GI: 21396504.

Genbank, дата обновления записи: 8 сентября, 2012 г., 04:43 пп.

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 2003/042661 (п.12); WO 2000/53216 (п.1; с. 41); WO 2004/065576 (п.1);

WO 2004/020583 (п.9); WO 2003/004529 (с. 128-132); WO 2000/53216 (п.1; стр. 42);

MIM:600997.

(23) ASLG659 (B7h).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AX092328.

Genbank, версия номер AX092328.1 GI: 13444478.

Genbank, дата обновления записи: 26 января, 2011, 07:37 дп.

Перекрестные ссылки:

US 2004/0101899 (п.2); WO 2003104399 (п.11); WO 2004000221 (фиг. 3);

US 2003/165504 (п.1); US 2003/124140 (пример 2); US 2003/065143 (фиг. 60);

WO 2002/102235 (п.13; с. 299); US 2003/091580 (пример 2);
 WO 2002/10187 (п.6; фиг. 10); WO 2001/94641 (п.12; фиг. 7b);
 WO 2002/02624 (п.13; фиг. 1A, 1B); US 2002/034749 (п.54; с. 45-46);
 WO 2002/06317 (пример 2; с. 320-321, п.34; с. 321-322);
 WO 2002/71928 (с. 468-469); WO 2002/02587 (пример 1; фиг. 1);
 WO 2001/40269 (пример 3; с. 190-192); WO 2000/36107 (пример 2; с. 205-207);
 WO 2004/053079 (п.12); WO 2003/004989 (п.1);
 WO 2002/71928 (с. 233-234, 452-453); WO 01/16318.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AJ297436.

Genbank, версия номер AJ297436.1 GI: 9367211.

Genbank, дата обновления записи: 1 февраля, 2011 г., 11:25 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа CAB97347.

Genbank, версия номер AJ297436.1 GI: 9367211.

Genbank, дата обновления записи: 1 февраля, 2011 г., 11:25 дп.

Перекрестные ссылки:

Reiter R.E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 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; EP 1394274 (пример 11); US 2004/018553 (п.17);

WO 2003/008537 (п.1); WO 2002/81646 (п.1; с. 164);

WO 2003/003906 (п.10; с. 288); WO 2001/40309 (пример 1; фиг. 17);

US 2001/055751 (пример 1; фиг. 1b); WO 2000/32752 (п.18; фиг. 1);

WO 98/51805 (п.17; с. 97); WO 98/51824 (п.10; с. 94); WO 98/40403 (п.2; фиг. 1B);

присоединение: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.

(25) GEDA.

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AY260763.

Genbank, версия номер AY260763.1 GI: 30102448.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г., 02:24 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAR14954.

Genbank, версия номер AAR14954.1 GI: 30102449.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г., 02:24 дп.

Перекрестные ссылки:

AP14954 lipoma HMGIC fusion-partnerlike protein/pid=AAR14954.1 - Homo sapiens (человек);

WO 2003/054152 (п.20); WO 2003/000842 (п.1); WO 2003/023013 (пример 3, п.20);

US 2003/194704 (п.45); GI: 30102449.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AF116456.

Genbank, версия номер AF116456.1 GI: 4585274.

Genbank, дата обновления записи: 10 марта, 2010 г., 09:44 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAD25356.

Genbank, версия номер AAD25356.1 GI: 4585275.

Genbank, дата обновления записи: 10 марта, 2010 г., 09:44 пп.

Перекрестные ссылки:

BAFF receptor/pid=NP_443177.1 - Homo sapiens: Thompson, J.S., et al. Science, (5537), 2108-2111 (2001);

WO 2004/058309; WO 2004/011611; WO 2003/045422 (пример; с. 32-33);

WO 2003/014294 (п.35; фиг. 6B); WO 2003/035846 (п.70; с. 615-616);

WO 2002/94852 (Col 136-137); WO 2002/38766 (п.3; с. 133);

WO 2002/24909 (пример 3; фиг. 3);

MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600.

(27) CD22 (изоформа В CD22 рецептора В-клеток, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AK026467.

Genbank, версия номер AK026467.1 GI: 10439337.

Genbank, дата обновления записи: 11 сентября, 2006 г., 11:24 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа BAB15489.

Genbank, версия номер BAB15489.1 GI: 10439338.

Genbank, дата обновления записи: 11 сентября, 2006 г., 11:24 пп.

Перекрестные ссылки:

Wilson et al. (1991). *J. Exp. Med.* 173:137-146; WO 2003/072036 (п.1; фиг. 1); IM:107266;

NP_001762.1; NM_001771_1.

(27a) CD22 (молекула CD22).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа X52785.

Genbank, версия номер X52785.1 GI: 29778.

Genbank, дата обновления записи: 2 февраля, 2011 г., 10:09 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа CAA36988.

Genbank, версия номер CAA36988.1 GI: 29779.

Genbank, дата обновления записи: 2 февраля, 2011 г., 10:09 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: CD22.

Другие названия: SIGLEC-2, SIGLEC2.

Другие обозначения: рецептор CD22 В-клеток; молекула клеточной адгезии В-лимфоцитов; BL-CAM; антиген CD22; антиген Leu-14 поверхности Т-клеток; Ig-подобный лектин 2 связывания сиаловой кислоты; Ig-подобный лектин 2, связывающий сиаловую кислоту.

Антитела.

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

Epratuzumab-Goldenberg D.M., et al. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 6(10):1341-53, 2006.

(28) CD79a (CD79A, CD79альфа), иммуноглобулин-ассоциированный альфа, специфичный к В-клеткам белок, который ковалентно взаимодействует с Ig бета (CD79B) и образует комплекс на поверхности с молекулами Ig M, 4,84, MM: 25028 TM: 2 [P] Хромосома гена: 19q13.2.

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_001783.

Genbank, версия номер NM_001783.3 GI: 90193587.

Genbank, дата обновления записи: 26 июня, 2012 г., 01:48 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_001774.

Genbank, версия номер NP_001774.1 GI: 4502685.

Genbank, дата обновления записи: 26 июня, 2012 г., 01:48 пп.

Перекрестные ссылки:

WO 2003/088808, US 2003/0228319; WO 2003/062401 (п.9);

US 2002/150573 (п.4, с. 13-14); WO 99/58658 (п.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. 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 1 лимфомы Беркитта, рецептор, связанный с белком Г, который активируется хемокином CXCL13, участвует в миграции лимфоцитов и гуморальной защите, играет роль в инфекции ВИЧ-2 и возможно развитии СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза);

372 aa, pl: 8,54 MM: 41959 TM: 7 [P] Хромосома гена: 11q23.3.

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_001716.

Genbank, версия номер NM_001716.4 GI: 342307092.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:49 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_001707.

Genbank, версия номер NP_001707.1 GI: 4502415.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:49 пп.

Перекрестные ссылки:

WO 2004/040000; WO 2004/015426; US 2003/105292 (пример 2);

US6555339 (пример 2); WO 2002/61087 (фиг. 1); WO 2001/57188 (п.20, с. 269);
 WO 2001/72830 (с. 12-13); WO 2000/22129 (пример 1, с. 152-153, пример 2, с. 254-256);
 WO 99/28468 (п.1 формулы изобретения, с. 38);
 US 54440021 (пример 2, столбец 49-52); WO 94/28931 (с. 56-58);
 WO 92/17497 (п.7 формулы изобретения, 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 II класса МНС (антиген 1a), которые связывает пептиды и предоставляет их в лимфоциты CD4⁺ T); 273 aa, pl: 6,56, MM: 30820. TM:1 [P] Хромосома гена: 6p21.3.

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_002120.

Genbank, версия номер NM_002120.3 GI: 118402587.

Genbank, дата обновления записи: 8 сентября, 2012 г., 04:46 pp.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_002111.

Genbank, версия номер NP_002111.1 GI: 4504403.

Genbank, дата обновления записи: 8 сентября, 2012 г., 04:46 pp.

Перекрестные ссылки:

Tonnelle et al. (1985). EMBOJ. 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;

Servenius et al. (1987), J. Biol. Chem. 262:8759-8766;

Beck et al. (1996), J. Mol. Biol. 255:1-13;

Naruse et al. (2002), Tissue Antigens 59:512-519;

WO 99/58658 (п.13, фиг. 15); US 6153408 (столб. 35-38);

US 5976551 (столб. 168-170); US 6011146 (столб. 145-146);

Kasahara et al. (1989), Immunogenetics, 30(1):66-68;

Larhammar et al. (1985), J. Biol. Chem. 260 (26):14111-14119.

P2X5 (лиганд-управляемый ионный канал пуринергического рецептора P2X, ионный канал, управляемый внеклеточной АТФ, может участвовать в синаптической трансмиссии и нейрогенезе, дефицит может способствовать патофизиологии идиопатической нестабильности детрузора);

422aa, pl:7,63,

MM:47206 TM: 1[P] Хромосома гена: 17p13.3.

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_002561.

Genbank, версия номер NM_002561.3 GI: 325197202.

Genbank, дата обновления записи: 27 июня, 2012 г., 12:41 dp.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_002552.

Genbank, версия номер NP_002552.2 GI: 28416933.

Genbank, дата обновления записи: 27 июня, 2012 г., 12:41 dp.

Перекрестные ссылки:

Le et al. (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199;

WO 2004/047749; WO 2003/072035 (п.10);

Touchman et al. (2000) Genome Res. 10:165-173; WO 2002/22660 (п.20); WO 2003/093444 (п.1);
 WO 2003/087768 (п.1); WO 2003/029277 (с. 82).

CD72 (антиген дифференцировки В-клеток CD72, Lyb-2); 359 aa, pl:8,66, MM: 40225, TM: 1[P] Хромосома гена: 9p13.3).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_001782.

Genbank, версия номер NM_001782.2 GI: 194018444.

Genbank, дата обновления записи: 26 июня, 2012 г., 01:43 pp.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_001773.

Genbank, версия номер NP_001773.1 GI: 4502683.

Genbank, дата обновления записи: 26 июня, 2012 г., 01:43 pp.

Перекрестные ссылки:

WO 2004042346 (п.65); WO 2003/026493 (с. 51-52, 57-58); WO 2000/75655 (с. 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.

LY64 (лимфоцитарный антиген 64 (RP105), мембранный белок I типа семейства с высоким содержанием лейцина (LRR), регулирует активацию и апоптоз В-клеток, потеря функции связана с повышенной активностью заболевания у пациентов с системной красной волчанкой);

661 aa, pl:6,20, MM:74147 TM: 1 [P]Хромосома гена: 5q12.

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_005582.

Genbank, версия номер NM_005582.2 GI: 167555126.

Genbank, дата обновления записи: 2 сентября, 2012 г., 01:50 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_005573.

Genbank, версия номер NP_005573.2 GM67555127.

Genbank, дата обновления записи: 2 сентября, 2012 г., 01:50 пп.

Перекрестные ссылки:

US 2002/193567; WO 97/07198 (п.11, с. 39-42);

Miura et al. (1996), Genomics 38(3):299-304;

Miura et al. (1998), Blood, 92:2815-2822;

WO 2003/083047; WO 97/44452 (п.8, с. 57-61); WO 2000/12130 (с. 24-26).

(34) FcRH1 (рецептор-подобный белок 1 Fc, предполагаемый рецептор к домену Fc иммуноглобулина, который содержит Ig-подобный домен типа C2 и домен ITAM, может играть роль в 5,28, MM:46925 TM:1[P]Хромосома гена: 1q21-1q22).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_052938.

Genbank, версия номер NM_052938.4 GI: 226958543.

Genbank, дата обновления записи: 2 сентября, 2012 г., 01:43 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_443170.

Genbank, версия номер NP_443170.1 GI: 16418419.

Genbank, дата обновления записи: 2 сентября, 2012 г., 01:43 пп.

Перекрестные ссылки:

WO 2003/077836; WO 2001/38490 (п.6, фиг. 18E-1-18-E-2);

Davis et al. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci USA, 98(17):9772-9777;

WO 2003/089624 (п.8); EP 1347046 (п.1); WO 2003/089624 (п.7).

(35) IRTA2 (рецептор иммуноглобулинового суперсемейства, ассоциированный с транслокацией 2, предполагаемый иммунорецептор с возможным участием в развитии В-клеток и лимфомагенезе; регуляция гена вследствие транслокации происходит при некоторых В-клеточных злокачественных заболеваниях); 977 aa, pl:

6,88, MM:106468, TM:1[P]Хромосома гена: 1q21.

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AF343662.

Genbank, версия номер AF343662.1 GI: 13591709.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г., 01:16 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAK31325.

Genbank, версия номер AAK31325.1 GI: 13591710.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г., 01:16 дп.

Перекрестные ссылки:

AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; мыши:AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1; WO 2003/024392 (п.2, фиг. 97);

Nakayama et al. (2000), Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127;

WO 2003/077836; WO 2001/38490 (п.3, фиг. 18B-1-18B-2).

(36) TENB2 (TMEFF2, томорегулин, TPEF, HPP1, TR, предполагаемый трансмембранный протеогликан, связанный с семейством EGF/геретулина факторов роста и фоллистатина); 374 aa).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AF179274.

Genbank, версия номер AF179274.2 GI: 12280939.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г., 01:05 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAD55776.

Genbank, версия номер AAD55776.2 GI: 12280940.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 г., 01:05 дп.

Перекрестные ссылки:

Доступ NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, эталонная последовательность NCBI:

NP_057276; NCBI.

Ген: 23671; OMIM:605734; SwissProt Q9UIK5; AY358907, CAF85723, CQ782436;

WO 2004/074320; JP 2004113151; WO 2003/042661; WO 2003/009814;

EP 1295944 (с. 69-70); WO 2002/30268 (с. 329); WO 2001/90304; US 2004/249130; US 2004/022727;

WO 2004/063355; US 2004/197325; US 2003/232350; US 2004/005563; US 2003/124579;

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;

Glynne-Jones et al. (2001), *Int. J. Cancer.* Oct 15; 94(2):178-84.

(37) PSMA - FOLH1 (Фолатгидролаза (простата-специфический мембранный антиген) 1).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M99487.

Genbank, версия номер M99487.1 GI: 190663.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:48 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA60209.

Genbank, версия номер AAA60209.1 GI: 190664.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:48 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: FOLH1.

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

Другие обозначения:

N-ацетилированная альфа-связанная кислотная дипептидаза 1;

N-ацетилированная-альфа-связанная кислотная дипептидаза I;

NAALADase I;

белок гена 27, ингибирующего рост клетки;

фолиполи-гамма-глутамат-карбоксипептидаза;

глутаматкарбоксилаза II; глутамат-карбоксипептидаза 2;

глутамат-карбоксипептидаза II; мембранная глутамат-карбоксипептидаза;

вариант F простата-специфического мембранного антигена; птероилполи-гамма-глутамат-карбоксипептидаза

Антитела.

US 7666425:

Антитела, получаемые с помощью гибридом, имеющих следующие ссылки ATCC:

номер доступа ATCC HB-12101, номер доступа ATCC HB-12109, номер доступа ATCC HB-12127 и номер доступа ATCC HB-12126.

Моноклональное антитело, выбранное из группы, состоящей из 8H12, 3E11, 17G1, 29B4, 30C1 и 20F2 (US 7811564; Moffett S., et al. *Hybridoma (Larchmt)*. 2007 Dec; 26(6):363-72).

Цитоген: моноклональные антитела 7E11-C5 (номер доступа ATCC HB 10494) и 9H10-A4 (номер доступа ATCC HB11430) - US 5763202.

GlycoMimetics: NUH2 - номер доступа ATCC HB 9762 (US 7135301).

Human Genome Science: HPRAJ70 - номер доступа ATCC 97131 (US 6824993); аминокислотная последовательность, кодируемая клоном кДНК (HPRAJ70), размещенным в Американской коллекции типовых культур ("ATCC") под депозитарным номером 97131.

Medarex: анти-PSMA антитела, не имеющие фукозильных остатков - US 7875278.

Мышиные 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. Гибридомы, секретирующие 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6 или 4C8B9, открыто внесены в депозитарий и описаны в патенте США № 6159508. Соответствующие гибридомы были публично депонированы и описаны в патенте США № 6107090. Кроме того, гуманизированные антит-PSMA антитела, включая гуманизированную версию J591, более подробно описаны в публикации PCT WO 02/098897.

В данной области техники описаны другие мышиные анти-человеческие антитела, 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 анти-PSMA моноклональных антител включают антитела 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 и 1C3, выделенные и структурно описанные так, как изначально описано в публикациях PCT WO 01/09192 и WO 03/064606 и в предварительной заявке на патент США с серийным номером № 60/654125, озаглавленный "Моноклональные антитела человека к простатическому специфическому мембранному антигену (PSMA)", поданный 18 февраля 2005 г. Аминокислотные последователь-

ности V_H 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 и 1C3 представлены в SEQ ID NO: 1-9 соответственно. Аминокислотные последовательности V_L 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 и 1C3 представлены в SEQ ID NO: 10-18 соответственно.

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

NW Biotherapeutics: Гибридная клеточная линия, выбранная из группы, состоящей из 3F5.4G6, имеющей номер доступа ATCC HB12060, 3D7-1.1, имеющей номер доступа ATCC HB12309, 4E10-1.14, имеющей номер доступа 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 mAb 3.9, вырабатываемое гибридомой, внесенной в депозитарий под номером доступа ATCC PTA-3258, или mAb 10.3, вырабатываемое гибридомой, внесенной в депозитарий под номером доступа ATCC PTA-3347 - US 7850971.

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

Указанная заявка представляет собой выделенную заявку из заявки на патент США с серийным номером 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; следует учитывать, что существует 5 подтипов).

(38.1) SSTR2 (рецептор соматостатина 2).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_001050.

Genbank, версия номер NM_001050.2 GI: 44890054.

Genbank, дата обновления записи: 19 августа, 2012, 01:37 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_001041.

Genbank, версия номер NP_001041.1 GI: 4557859.

Genbank, дата обновления записи: 19 августа, 2012, 01:37 пп.

Перекрестные ссылки:

Yamada Y., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89(1), 251-255 (1992);

Susini C., et al. Ann Oncol. 2006 Dec; 17(12):1733-42.

Прочая информация:

Официальный символ: SSTR2.

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

(38.2) SSTR5 (рецептор соматостатина 5).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа D16827.

Genbank, версия номер D16827.1 GI: 487683.

Genbank, дата обновления записи: 1 августа, 2006, 12:45 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа BAA04107.

Genbank, версия номер BAA04107.1 GI: 487684.

Genbank, дата обновления записи: 1 августа, 2006, 12:45 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: SSTR5.

Другие названия: SS-5-R.

Другие обозначения: рецептор соматостатина 5 подтипа; рецептор соматостатина 5 типа.

(38.3) SSTR1.

(38.4) SSTR3.

(38.5) SSTR4.

AvB6 - Обе субъединицы (39+40).

(39) ITGAV (интегрин, альфа V).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M14648 J02826 M18365.

Genbank, версия номер M14648.1 GI: 340306.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:56 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA36808.

Genbank, версия номер AAA36808.1 GI: 340307.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:56 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: ITGAV.

Другие названия: CD51, MSK8, VNRA, VTNR.

Другие обозначения: антиген, определяемый 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:

Genbank, номер доступа NM_000888.

Genbank, версия номер NM_000888.3 GI: 9966771.

Genbank, дата обновления записи: 27 июня, 2012 г., 12:46 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_000879.

Genbank, версия номер NP_000879.2 GI: 9625002.

Genbank, дата обновления записи: 27 июня, 2012 г., 12:46 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: ITGB6.

Другие обозначения: интегрин бета-6.

Антитела.

Биоген: US 7943742 - гибридные клоны 6.3G9 и 6.8G6 внесены в депозитарий ATCC с номерами доступа ATCC PTA-3649 и -3645 соответственно.

Биоген: US 7465449 - в некоторых вариантах реализации указанное антитело содержит такие же полипептидные последовательности тяжелой и легкой цепей, как антитело, вырабатываемое гибридомой 6.1A8, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2B10, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 или 7.1C5.

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

Например, в US 7550142 - антитело, имеющее вариабельные области человеческой тяжелой цепи и человеческой легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, представленные 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 клеточной адгезии 5, связанная с карциноэмбриональным антигеном).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M17303.

Genbank, версия номер M17303.1 GI: 178676.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAB59513.

Genbank, версия номер AAB59513.1 GI: 178677.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: CEACAM5.

Другие названия: CD66e, CEА

Другие обозначения: антиген мекония 100.

Антитела.

AstraZeneca-MedImmune: US 20100330103; US 20080057063; US 20020142359:

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

гибридома 806.077, внесенная в депозитарий Европейской коллекции клеточных культур (ECACC) под депозитарным номером 96022936.

Research Corporation Technologies, Inc.: US 5047507 Bayer Corporation: US 6013772.

BioAlliance: US 7982017; US 7674605 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 US 5472693 - например, ATCC № 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, которые 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, которые содержат:

CDR1 содержит TYWMS (SEQ ID NO: 23);

CDR2 содержит EIHPPDSSTINYAPSLKD (SEQ ID NO: 24) и

CDR3 содержит LYFGFPWFAY (SEQ ID NO: 25).

US 20100221175; US 20090092598; US; US 20110064653; US 20090185974; US 20080069775.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M35073.

Genbank, версия номер M35073.1 GI: 187553.

Genbank, дата обновления записи: 6 марта, 2012 г., 11:12 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA59589.

Genbank, версия номер AAA59589.1 GI: 553531.

Genbank, дата обновления записи: 6 марта, 2012 г., 11:12 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: MET.

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

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

Антитела.

Abgenix/Pfizer: US 20100040629,

например, антитело, вырабатываемое гибридомой 13.3.2, имеющей номер доступа Американской коллекции типовых культур (ATCC) PTA-5026;

антитело, вырабатываемое гибридомой 9.1.2, имеющей номер доступа ATCC PTA-5027;

антитело, вырабатываемое гибридомой 8.70.2, имеющей номер доступа ATCC PTA-5028; или антитело, вырабатываемое гибридомой 6.90.3, имеющей номер доступа ATCC PTA-5029.

Amgen/Pfizer: US 20050054019,

например, антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, где X2 представляет собой глутамат и X4 представляет собой серин, 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): US 20060035907 Eli Lilly: US 20100129369.

Genentech: US5686292; US 20100028337; US 20100016241; US 20070129301; US 20070098707; US 20070092520, US 20060270594; US 20060134104; US 20060035278; US 20050233960; US 20050037431.

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, Тайвань: Lu RM., et al. Biomaterials. 2011 Apr; 32(12):3265-74.

Novartis: US 20090175860,

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, от 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 от SEQ ID NO: 37.

Pharmacia Corporation: US 20040166544.

Pierre Fabre: US 20110239316, US 20110097262, US 20100115639

Samsung: US 20110129481 - например, моноклональное антитело, вырабатываемое гибридной клеткой, имеющей номер доступа KCLRF-BP-00219 или номер доступа KCLRF-BP-00223.

Samsung: US 20110104176 - например, антитело, вырабатываемое гибридной клеткой, имеющей номер доступа: 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.

MUC1 (муцин 1, связанный с клеточной поверхностью).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа J05581.

Genbank, версия номер J05581.1 GI: 188869.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:48 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA59876.

Genbank, версия номер AAA59876.1 GI: 188870.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:48 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: 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; муцин, связанный с карциномой; эписиалин; Krebs von den Lungen-6; муцин 1, трансмембранный; муцин-1; арахис-реактивный муцин мочевого пузыря; полиморфный эпителиальный муцин; опухолеассоциированный эпителиальный муцин; опухолеассоциированный мембранный антиген; опухолеассоциированный муцин.

Антитела.

AltaRex - Quest Pharma Tech: US 6716966 - например, антитело Alt-1, вырабатываемое гибридомой с номером ATCC PTA-975.

AltaRex - Quest Pharma Tech: US 7147850.

CRT: 5E5 - Sorensen A.L., et al. Glycobiology, vol. 16, no. 2, p. 96-107, 2006; HMFG2 - Burchell J., et al. Cancer Res., 47, 5476-5482 (1987); see WO 2015/159076.

Гликотоп GT-MAВ: GT-MAВ 2.5-GEX (веб-сайт: <http://www.glycotope.com/pipeline/pankomab-gex>).

Immunogen: US 7202346,

например, антитело MJ-170: гибридная клеточная линия MJ-170, ATCC номер доступа. PTA-5286.

Моноклональное антитело MJ-171: гибридная клеточная линия MJ-171, номер доступа ATCC. PTA-5287; моноклональное антитело MJ-172: гибридная клеточная линия MJ-172, номер доступа ATCC. PTA-5288; или моноклональное антитело MJ-173: гибридная клеточная линия MJ-173, номер доступа ATCC. PTA-5302.

Immunomedics: US 6653104.

Ramot Tel Aviv Uni: US 7897351.

Regents Uni. CA: US 7,183,388; US 20040005647; US 20030077676.

Roche GlycArt: US 8021856.

Российский онкологический научный центр: Imuteran- Ivanov P.K., et al. Biotechnol. J. 2007 Jul; 2(7):863-70

Technische Univ Braunschweig: (IIB6, 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 (карбонангидраза IX).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа X66839.

Genbank, версия номер X66839.1 GI: 1000701.

Genbank, дата обновления записи: 2 февраля, 2011 г., 10:15 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа CAA47315.

Genbank, версия номер CAA47315.1 GI: 1000702.

Genbank, дата обновления записи: 2 февраля, 2011 г., 10:15 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: CA9.

Другие названия: CAIX, MN.

Другие обозначения: CA-IX; P54/58N; RCC-ассоциированный антиген G250; RCC-ассоциированный белок G250; карбонат-дегидратаза IX; карбонангидраза 9; карбонгидраза; мембранный антиген MN; pMW1; антиген G250, ассоциированный с почечноклеточной карциномой.

Антитела.

Abgenix/Amgen: US 20040018198.

Аффитело: молекулы анти-CAIX аффитела (<http://www.affibody.com/en/Product-Portfolio/Pipeline/>).

Bayer: US 7462696.

Bayer/Morphosys: 3ee9 mAb - Petrus H.M., 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.

Институт вирусологии, Словацкая академия наук (Bayer) - US 5955075,

например, M75, номер доступа ATCC HB 11128, или MN12, номер доступа ATCC HB 11647.

Институт вирусологии, Словацкая академия наук: US 7816493,

например, моноклональное антитело M75, которое секретируется из гибридомы VU-M75, внесенной в депозитарий Американской коллекции типовых культур под номером ATCC HB 11128; или моноклональное антитело V/10, секретируемое из гибридомы V/10-VU, внесенной в Бельгийскую координированную коллекцию микроорганизмов Международной депозитарной организации в лаборатории Laboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie (LMBP) Гентского университета в г. Гент, Бельгия, под номером доступа LMBP 6009CB.

Институт вирусологии, Словацкая академия наук US 20080177046; US 20080176310; US 20080176258; US 20050031623.

Novartis: US 20090252738.

Wilex: US 7691375 - например, антитело, вырабатываемое гибридомной клеточной линией DSM ASC 2526.

Wilex: US 20110123537; Rencarex: Kennett R.H., et al. *Curr Opin Mol. Ther.* 2003 Feb; 5(1):70-5.

Xencor: US 20090162382.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_201283.

Genbank, версия номер NM_201283.1 GI: 41327733.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:47 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_958440.

Genbank, версия номер NP_958440.1 GI: 41327734.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:47 пп.

Перекрестные ссылки:

Vatra S.K., et al. *Cell Growth Differ.* 1995; 6:1251-1259.

Антитела.

US 7628986 и US 7736644 (Amgen):

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

US 20100111979 (Amgen):

например, антитело, содержащее аминокислотную последовательность тяжелой цепи, содержащую:

CDR1, состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей для области CDR1 антител 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, состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей для области CDR2 антител 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, состоящую из последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей для области CDR3 антител 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).

US 20090240038 (Amgen):

например, антитело, имеющее по меньшей мере один из полипептидов тяжелой или легкой цепи, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную 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.

US 20090175887 (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).

US 20090156790 (Amgen),

например, антитело, имеющее полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи, причем по меньшей мере один из полипептидов тяжелой или 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.

США 20090155282, США 20050059087 и США 20050053608 (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).

MR1-1 (US 7129332; Duke):

например, вариантное антитело, имеющее последовательность SEQ ID NO: 18 с замещениями S98P-T99Y в VH CDR3, и F92W в VL CDR3.

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

US 20090311803 (Гарвардский университет):

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

US 20070274991 (EMD72000, также известный как матузумаб; Гарвардский университет):

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

US 6129915 (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; (2):61-9 (Uppsala University).

Han D.G., 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:

Genbank, номер доступа M_23197.

Genbank, версия номер NM_23197.1 GI: 180097.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA51948.

Genbank, версия номер AAA51948.1 GI: 188098.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: CD33.

Другие названия: SIGLEC-3, SIGLEC3, p67.

Другие обозначения: антиген CD33 (gp67); gp67; поверхностный антиген миелоидной клетки CD33; Ig-подобный лектин 3, связывающий сиаловую кислоту; Ig-подобный лектин 3 связывания сиаловой кислоты.

Антитела.

H195 (линтузумаб) - Raza A., et al. Leuk Lymphoma. 2009 Aug; 50(8):1336-44; US 6759045 (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).

US 6590088 (Human Genome Sciences):

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

US 7557189 (Immunogen):

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

(47) CD19 (молекула CD19).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_001178098.

Genbank, версия номер NM_001178098.1 GI: 296010920.

Genbank, дата обновления записи: 10 сентября, 2012 г., 12:43 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_001171569.

Genbank, версия номер NP_001171569.1 GI: 296010921.

Genbank, дата обновления записи: 10 сентября, 2012 г., 12:43 дп.

Перекрестные ссылки:

Tedder T.F., et al. *J. Immunol.* 143(2):712-7 (1989).

Прочая информация:

Официальный символ: CD19.

Другие названия: B4, CVID3.

Другие обозначения: В-лимфоцитарный антиген CD19; антиген B4 поверхности В-лимфоцитов; антиген Leu-12 поверхности Т-клеток; дифференцировочный антиген CD19.

Антитела.

Immunogen: HuB4 - Al-Katib A.M., 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 публикации Knappik, A. et al. *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.

Гленмарк Фармацевтика: GBR-401 - Hou S., et al. *Mol. Cancer.* November 2011 (Meeting Abstract Supplement) C164.

US 7109304 (Immunomedics):

например, антитело, содержащее последовательность hA19Vk (SEQ ID NO: 7) и последовательность hA19VH (SEQ ID NO: 10).

US 7902338 (Immunomedics):

например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который содержит последовательности определяющих комплементарность областей CDR легкой цепи CDR1 SEQ ID NO: 16 (KASQSVYDYG-DSYLN); CDR2 of SEQ ID NO: 17 (DASNLVS); и CDR3 SEQ ID NO: 18 (QQSTEDPWT) и CDR тяжелой цепи последовательности CDR1 SEQ ID NO: 19 (SYWMN); CDR2 SEQ ID NO: 20 (QIWPGDGDTNYNGKFKG) и CDR3 SEQ ID NO: 21 (RETTTVGRYYYAMDY), а также содержит каркасный участок (FR) человеческого антитела и последовательности константной области с одним или более аминокислотными остатками каркасной области, замещенными из соответствующих последовательностей каркасной области исходного мышинового антитела, и причем указанные замещенные остатки FR содержат замещение серина на фенилаланин по остатку 91 Kabat переменной области тяжелой цепи.

Medarex: MDX-1342 - Cardarelli P.M., 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.

US 7968687 (Seattle Genetics):

антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменный 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 US 20120082664.

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:

Genbank, номер доступа NM_000417.

Genbank, версия номер NM_000417.2 GI: 269973860.

Genbank, дата обновления записи: 09 сентября, 2012 г., 04:59 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_000408.

Genbank, версия номер NP_000408.1 GI: 4557667.

Genbank, дата обновления записи: 09 сентября, 2012 г., 04:59 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: IL2RA.

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

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

Антитела.

US 6383487 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect]).

US 6521230 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect]).

н антитело, имеющее антиген-связывающий сайт, который содержит по меньшей мере один домен, содержащий CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; или указанные CDR1, CDR2 и CDR3 в последовательности в целом содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7, 8 и 9 в последовательности в целом.

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

(49) AXL (рецепторная тирозинкиназа AXL).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M76125.

Genbank, версия номер M76125.1 GI: 292869.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:53 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA61243.

Genbank, версия номер AAA61243.1 GI: 29870.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:53 дп.

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).

Прочая информация:

Официальный символ: AXL.

Другие названия: JTK11, UFO.

Другие обозначения: онкоген AXL; AXL-трансформирующая последовательность/ген; AXL-онкоген; рецептор UFO тирозинпротеинкиназы.

Антитела.

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

(Genentech).

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

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M83554.

Genbank, версия номер M83554.1 GI: 180095.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:53 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA51947.

Genbank, версия номер AAA51947.1 GI: 180096.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:53 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: TNFRSF8.

Другие названия: CD30, D1S166E, Ki-1.

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

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа Z29574.

Genbank, версия номер Z29574.1 GI: 471244.

Genbank, дата обновления записи: 02 февраля, 2011 г., 10:40 дп.
 Полипептид:
 Genbank, номер доступа CAA82690.
 Genbank, версия номер CAA82690.1 GI: 471245.
 Genbank, дата обновления записи: 02 февраля, 2011 г., 10:40 дп.
 Перекрестные ссылки:
 Laabi Y., et al. *Nucleic Acids Res.* 22(7), 1147-1154 (1994).
 Прочая информация:
 Официальный символ: TNFRSF17.
 Другие названия: BCM, BCMA, CD269.
 Другие обозначения: Другие обозначения: антиген созревания В-клеток; фактор созревания В-клеток; белок созревания В-клеток; 17 член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли. (52) CT Ags -СТА (антигены рака яичек).
 Перекрестные ссылки:
 Fratta E., et al. *Mol Oncol.* 2011 Apr; 5(2):164-82; Lim S.H., et al. *Am. J. Blood Res.* 2012; 2(1):29-35.
 (53) CD174 (Льюис Y) - FUT3 (фукозилтрансфераза 3 (галактозид-3(4)-L-фукозилтрансфераза, группа крови Льюиса).
 Нуклеотид:
 Genbank, номер доступа NM000149.
 Genbank, версия номер NM000149.3 GI: 148277008.
 Genbank, дата обновления записи: 26 июня, 2012 г., 04:49 пп.
 Полипептид:
 Genbank, номер доступа NP_000140.
 Genbank, версия номер NP_000140.1 GI: 4503809.
 Genbank, дата обновления записи: 26 июня, 2012 г., 04:49 пп.
 Перекрестные ссылки:
 Kukowska-Latallo, J.F., et al. *Genes Dev.* 4(8), 1288-1303 (1990).
 Прочая информация:
 Официальный символ: FUT3.
 Другие названия: CD174, FT3B, FucT-III, LE, Les.
 Другие обозначения: FT Льюиса; альфа-(1,3/1,4)-фукозилтрансфераза; альфа-4-фукозилтрансфераза группы крови Льюиса; фукозилтрансфераза III; галактозид-3(4)-L-фукозилтрансфераза.
 CLEC14A (член А семейства 14 лектиновых доменов С-типа; Genbank, номер доступа NM175060).
 Нуклеотид:
 Genbank, номер доступа NM175060.
 Genbank, версия номер NM175060.2 GI: 371123930.
 Genbank, дата обновления записи: 01 апреля, 2012, 03:34 пп.
 Полипептид:
 Genbank, номер доступа NP_778230.
 Genbank, версия номер NP_778230.1 GI: 28269707.
 Genbank, дата обновления записи: 01 апреля, 2012, 03:34 пп.
 Прочая информация:
 Официальный символ: CLEC14A.
 Другие названия: UNQ236/PRO269, C14orf27, CEG1, EGFR-5.
 Другие обозначения: член А семейства 14 пектинового домена С-типа; C1ECT и белок, содержащий EGF-подобный домен; рецептор 5 эпидермального фактора роста.
 (55) GRP78 - HSPA5 (белок 5 теплового шока 70 кДа (глюкозорегулируемый белок, 78 кДа).
 Нуклеотид:
 Genbank, номер доступа NM005347.
 Genbank, версия номер NM005347.4 GI: 305855105.
 Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:42 пп.
 Полипептид:
 Genbank, номер доступа NP_005338.
 Genbank, версия номер NP_005338.1 GI: 16507237.
 Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:42 пп.
 Перекрестные ссылки:
 Ting J., et al. *DNA*, 7(4), 275-286 (1988).
 Прочая информация:
 Официальный символ: HSPA5.
 Другие названия: BIP, GRP78, MIF2.
 Другие обозначения: глюкозорегулируемый белок 78 кДа; белок grp78, связывающий полостной Ca(2+) эндоплазматического ретикулума; белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина.

(56) CD70 (молекула CD70) L08096.

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа L08096.

Genbank, версия номер L08096.1 GI: 307127.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2012 г., 08:54 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA36175.

Genbank, версия номер AAA36175.1 GI: 307128.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2012 г., 08:54 дп.

Перекрестные ссылки:

Goodwin R.G., et al. Cell, 73(3), 447-456 (1993).

Прочая информация:

Официальный символ: CD70.

Другие названия: CD27L, CD27LG, TNFSF7.

Другие обозначения: лиганд CD27; CD27-L; антиген CD70; антиген Ki-24; поверхностный антиген CD70; 7 член суперсемейства фактора (лиганда) некроза опухоли; 7 член суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли.

Антитела.

MDX-1411 против CD70 (Medarex).

h1F6 (Oflazoglu, E., et al., Clin Cancer Res. 2008 Oct 1; 14(19):6171-80; Seattle Genetics). Например, см. US 20060083736, SEQ ID NO: 1, 2, 11 и 12 и фиг. 1.

Антигены, специфические для стволовых клеток.

Например: 5T4 (см. строку (63) ниже), CD25 (см. строку (48) ниже), CD32.

Полипептид:

Genbank, номер доступа ABK42161.

Genbank, версия номер ABK42161.1 GI: 117616286.

Genbank, дата обновления записи: 25 июля, 2007, 03:00 пп.

LGR5/GPR49.

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_003667.

Genbank, версия номер NM_003667.2 GI: 24475886.

Genbank, дата обновления записи: 22 июля, 2012 г., 03:38 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_003658.

Genbank, версия номер NP_003658.1 GI: 4504379.

Genbank, дата обновления записи: 22 июля, 2012 г., 03:38 пп.

Проминин/CO133.

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_006017.

Genbank, версия номер NM_006017.2 GI: 224994187.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:47 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_006008.

Genbank, версия номер NP_006008.1 GI: 5174387.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:47 пп.

(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.

Анти-AGS-5 антитело: M6.131 (Smith, L.M., et.al AACR 2010, Annual Meeting (abstract #2590).

(59) ENPP3 (эктонуклеотидная пирофосфатаза/фосфодиэстераза 3).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AF005632.

Genbank, версия номер AF005632.2 GI: 4432589.

Genbank, дата обновления записи: 10 марта, 2010 г., 09:41 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAC51813.

Genbank, версия номер AAC51813.1 GI: 2465540.

Genbank, дата обновления записи: 10 марта, 2010 г., 09:41 пп.

Перекрестные ссылки:

Jin-Hua P., et al. Genomics, 45(2), 412-415 (1997).

Прочая информация:

Официальный символ: 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); 3 член семейства эктонуклеотидных пирофосфатаз/фосфодиэстераз; gp130RB13-6; бета-фосфодиэстераза I; фосфодиэстераза I/нуклеотид-пирофосфатаза 3; бета-фосфодиэстераза-I.

(60) PRR4 (пролин-богатый 4 (лакримальный)).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_007244.

Genbank, версия номер NM_007244.2 GI: 154448885.

Genbank, дата обновления записи: 28 июня, 2012 г., 12:39 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_009175.

Genbank, версия номер NP_009175.2 GM54448886.

Genbank, дата обновления записи: 28 июня, 2012 г., 12:39 пп.

Перекрестные ссылки:

Dickinson D.P., et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36(10), 2020-2031 (1995).

Прочая информация:

Официальный символ: PRR4.

Другие названия: LPRP, PROLA.

Другие обозначения: лакримальный пролин-богатый белок; пролин-богатый белок 4, ассоциированный с карциномой носоглотки; пролин-богатый полипептид 4; пролин-богатый белок 4.

(61) GCC - GUCY2C (гуанилатциклаза 2C (рецептор термостабильного энтеротоксина)).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_004963.

Genbank, версия номер NM_004963.3 GI: 222080082.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:50 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_004954.

Genbank, версия номер NP_004954.2 GI: 222080083.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:50 пп.

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).

Прочая информация:

Официальный символ: GUCY2C.

Другие названия: DIAR6, GUC2C, MUCIL, STAR.

Другие обозначения: GC-C; рецептор STA; гуанилилциклаза C; hSTAR; рецептор термостабильного энтеротоксина; кишечная гуанилатциклаза.

(62) Liv-1- SLC39A6 (6 член семейства носителей растворенных веществ 39 (транспортер цинка)).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа U41060.

Genbank, версия номер U41060.2 GI: 12711792.

Genbank, дата обновления записи: 30 ноября, 2009 г., 04:35 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA96258.

Genbank, версия номер AAA96258.2 GI: 12711793.

Genbank, дата обновления записи: 30 ноября, 2009 г., 04:35 пп.

Перекрестные ссылки:

Taylor K.M., et al. Biochim Biophys Acta. 2003 Apr 1; 1611(1-2):16-30.

Прочая информация:

Официальный символ: SLC39A6.

Другие названия: LIV-1.

Другие обозначения: белок LIV-1, регулируемый эстрогеном; ZIP-6; эстроген-регулируемый белок LIV-1; 6 член семейства носителей растворенных веществ 39 (транспортер ионов металлов); 6 член семейства носителей растворенных веществ 36; транспортер цинка ZIP6; zrt- и lrt-подобный белок 6.

(63) 5T4, трофобластный гликопротеин, TPBG - TPBG (трофобластный гликопротеин).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AJ012159.

Genbank, версия номер AJ012159.1 GI: 3805946.

Genbank, дата обновления записи: 01 февраля, 2011 г., 10:27 пп.

Полипептид:
 Genbank, номер доступа CAA09930.
 Genbank, версия номер CAA09930.1 GI: 3805947.
 Genbank, дата обновления записи: 01 февраля, 2011 г., 10:27 дп.
 Перекрестные ссылки:
 King K.W., et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1445(3), 257-270 (1999).
 Прочая информация:
 Официальный символ: TPBG.
 Другие названия: 5T4, 5T4AG, M6P1.
 Другие обозначения: онкофетальный антиген 5T4; онкофетальный трофобластный гликопротеин 5T4; онкотрофобластный гликопротеин 5T4.
 См. WO 2015/155345.
 (64) CD56 - NCMA1 (молекула адгезии нервных клеток 1).
 Нуклеотид:
 Genbank, номер доступа NM_000615.
 Genbank, версия номер NM_000615.6 GI: 336285433.
 Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:32 пп.
 Полипептид:
 Genbank, номер доступа NP_000606.
 Genbank, версия номер NP_000606.3 GI: 94420689.
 Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:32 пп.
 Перекрестные ссылки:
 Dickson, G., et al., *Cell*, 50(7), 1119-1130 (1987).
 Прочая информация:
 Официальный символ: NCAM1.
 Другие названия: CD56, MSK39, NCAM антиген, распознаваемый моноклональным антителом 5.1H11; молекула адгезии нервных клеток, NCAM.
 Антитела.
 Immunogen: HuN901 (Smith S.V., et al. *Curr Opin. Mol. Ther.* 2005 Aug; 7(4):394-401).
 Например, см. гуманизованное из мышиноного N901 антитело. См. фиг. 1b и 1e в публикации 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 A.W. et al., *J. Clin. Oncol.* 2003 Jan 15; 21(2):211-22; Immunogen).
 Например, см. US 20080138898A1, SEQ ID NO: 1 и 2.
 (66) FOLR1 (фолатный рецептор 1).
 Нуклеотид:
 Genbank, номер доступа J05013.
 Genbank, версия номер J05013.1 GM82417.
 Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 дп.
 Полипептид:
 Genbank, номер доступа AAA35823.
 Genbank, версия номер AAA35823.1 GI: 182418.
 Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 дп.
 Перекрестные ссылки:
 Elwood P.C., et al. *J. Biol. Chem.* 264(25), 14893-14901 (1989).
 Прочая информация:
 Официальный символ: FOLR1.
 Другие названия: FBP, FOLR.
 Другие обозначения: FR-альфа; FBP клеток KB; фолат-связывающий белок взрослых; фолат-связывающий белок; фолатный рецептор альфа; фолатный рецептор взрослых; антиген MOv18, ассоциированный с опухолью яичника.
 Антитела.
 M9346A - Whiteman K.R., et al. *Cancer Res.* April 15, 2012; 72(8 Supplement): 4628 (Immunogen).
 (67) GPNMB (гликопротеин (трансмембранный) nmb).
 Нуклеотид:
 Genbank, номер доступа X76534.
 Genbank, версия номер X76534.1 GI: 666042.
 Genbank, дата обновления записи: 02 февраля, 2011 г., 10:10 дп.

Полипептид:
 Genbank, номер доступа CAA54044.
 Genbank, версия номер CAA54044.1 GI: 666043.
 Genbank, дата обновления записи: 02 февраля, 2011 г., 10:10 дп.
 Перекрестные ссылки:
 Weterman M.A., et al. *Int. J. Cancer* 60(1), 73-81 (1995).
 Прочая информация:
 Официальный символ: GPNMB.
 Другие названия: UNQ1725/PRO9925, HGFIN, NMB.
 Другие обозначения: гликопротеин NMB; гликопротеин pmb-подобный белок; остеоактивин; трансмембранный гликопротеин HGFIN; трансмембранный гликопротеин NMB.

Антитела.
 Celldex Therapeutics: CR011 (Tse K.F., 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-NAVC1 (клеточный рецептор 1 вируса гепатита А).

Нуклеотид:
 Genbank, номер доступа AF043724.
 Genbank, версия номер AF043724.1 GI: 2827453.
 Genbank, дата обновления записи: 10 марта, 2010 г., 06:24 пп.

Полипептид:
 Genbank, номер доступа AAC39862.
 Genbank, версия номер AAC39862.1 GI: 2827454.
 Genbank, дата обновления записи: 10 марта, 2010 г., 06:24 пп.

Перекрестные ссылки:
 Feigelstock D., et al. *J. Virol.* 72(8), 6621-6628 (1998).
 Прочая информация:
 Официальный символ: NAVC1.
 Другие названия: NAVC1, NAVC1-1, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1.
 Другие обозначения: белок 1 домена Т-клеточного иммуноглобулина и муцинового домена; белок 1 Т-клеточной мембраны; молекула 1 почечного повреждения.
 (69) RG-1/мишень опухоли предстательной железы Mindin - Mindin/RG-1.

Перекрестные ссылки:
 Parry R., et al. *Cancer Res.* 2005 Sep 15; 65(18):8397-405.
 (70) B7-H4 - VTCN1 (ингибитор 1 активации Т-клеток, содержащий V-образный домен)

Нуклеотид:
 Genbank, номер доступа BX648021.
 Genbank, версия номер BX648021.1 GI: 34367180.
 Genbank, дата обновления записи: 02 февраля, 2011 г., 08:40 дп.

Перекрестные ссылки:
 Sica G.L., et al. *Immunity.* 2003 Jun; 18(6):849-61.
 Прочая информация:
 Официальный символ: VTCN1.
 Другие названия: RP11-229A19.4, B7-H4, B7H4, B7S1, B7X, B7h.5, PRO1291, VCTN1.
 Другие обозначения: член H4 семейства B7; член 1 суперсемейства B7; костимулирующая молекула B7x Т-клеток; костимулирующая молекула B7x Т-клеток; ингибитор 1 активации Т-клеток, содержащий V-образный домен; иммунный костимулирующий белок B7-H4.
 PTK7 (протеинтирозинкиназа 7 PTK7).

Нуклеотид:
 Genbank, номер доступа AF447176.
 Genbank, версия номер AF447176.1 GI: 17432420.
 Genbank, дата обновления записи: 28 ноября, 2008 г., 01:51 пп.

Полипептид:
 Genbank, номер доступа AAL39062.
 Genbank, версия номер AAL39062.1 GM7432421.
 Genbank, дата обновления записи: 28 ноября, 2008 г., 01:51 пп.

Перекрестные ссылки:
 Park S.K., et al. *J. Biochem.* 119(2), 235-239 (1996).
 Прочая информация:
 Официальный символ: PTK7.
 Другие названия: CCK-4, CCK4.
 Другие обозначения: киназа 4 карциномы толстой кишки; неактивная тирозин-протеинкиназа 7; псевдорептор 7 тирозинкиназы; белок 7, подобный тирозин-протеинкиназе.

CD37 (молекула CD37).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_001040031.

Genbank, версия номер NM_001040031.1 GI: 91807109.

Genbank, дата обновления записи: 29 июля, 2012 г., 02:08 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_001035120.

Genbank, версия номер NP_001035120.1 GI: 91807110.

Genbank, дата обновления записи: 29 июля, 2012 г., 02:08 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: CD37.

Другие названия: GP52-40, TSPAN26.

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

Антигела.

Boehringer Ingelheim: mAb 37.1 (Heider K.H., 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. US 20110171208A1 SEQ ID NO: 253.

Immunogen: K7153A (Deckert J., et al. *Cancer Res April* 15, 2012 г.; 72(8 Supplement): 4625) (73) CD138-SDC1 (синдекан 1).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AJ551176.

Genbank, версия номер AJ551176.1 GI: 29243141.

Genbank, дата обновления записи: 01 февраля, 2011 г., 12:09 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа CAD80245.

Genbank, версия номер CAD80245.1 GI: 29243142.

Genbank, дата обновления записи: 01 февраля, 2011 г., 12:09 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: SDC1.

Другие названия: CD138, SDC, SYND1, синдекан.

Другие обозначения: антиген CD138; гепарансульфат-протеогликан, рецептор фактора роста фибробластов; синдекан протеогликан 1; синдекан-1.

Антигела.

Biotest: химеризованное MAб (nBT062) - (Jagannath S., et al. Poster ASH #3060, 2010; WIPO патентная заявка WO 2010/128087).

Например, см. US 20090232810, SEQ ID NO: 1 и 2.

Immunogen: B-B4 (Tassone P., et al. *Blood* 104_3688-3696).

Например, см. US 20090175863A1, SEQ ID NO: 1 и 2.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_004355.

Genbank, версия номер NM_004355.1 GI: 343403784.

Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:30 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_004346.

Genbank, версия номер NP_004346.1 GI: 10835071.

Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:30 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: CD74.

Другие названия: DHLAG, HLAG, IIa-GAMMA.

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

Антигела.

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

Например, см. US 20040115193, SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 и 24.

Genmab: HuMax-CD74 (см. веб-сайт).

(75) Клаудины - CL (клаудины).

Перекрестные ссылки:

Offner S., et al. Cancer Immunol Immunother. 2005 May; 54(5):431-45;

Suzuki H., et al. Ann NY Acad Sci. 2012 Jul; 1258:65-70).

У людей описаны 24 члена указанного семейства - см. литературные ссылки.

(76) EGFR (рецептор эпидермального фактора роста).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_005228.

Genbank, версия номер NM_005228.3 GI: 41927737.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:47 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_005219.

Genbank, версия номер NP_005219.2 GI: 29725609.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:47 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: EGFR.

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

Другие обозначения: гомолог вирусного онкогена эритробластного лейкоза птиц (v-erb-b); белок 40, ингибирующий рост клеток; белок b1, вызывающий клеточную пролиферацию; прото-онкоген c-ErbB-1; рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-1.

Антитела.

BMS: Цетуксимаб (эрбитукс) - Broadbridge V.T., et al. Expert Rev Anticancer Ther. 2012 May; 12(5):555-65.

Например, см. US 6217866 - депозитарный номер ATTC 9764.

Amgen: Панитумумаб (вектибикс) - Argiles G., et al. Future Oncol. 2012 Apr; 8(4):373-89.

Например, см. US 6235883, SEQ ID NO: 23-38.

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

YM Biosciences: Нимотузумаб - Ramakrishnan M.S., et al. MAbs. 2009 Jan-Feb; 1(1):41-8.

Например, см. US5891996, SEQ ID NO: 27-34.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M34309.

Genbank, версия номер M34309.1 GI: 183990.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA35979.

Genbank, версия номер AAA35979.1 GI: 306841.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:47 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: 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: протоонкоген-подобный белок c-ErbB-3; рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-3; рецептор HER3 клеточной поверхности тирозинкиназного типа

Антитела.

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

Например, см. US 2011028129, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

(78) RON - MST1R (макрофаг-стимулирующий рецептор 1 (c-met-родственная тирозинкиназа)).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа X70040.

Genbank, версия номер X70040.1 GI: 36109.

Genbank, дата обновления записи: 02 февраля, 2011 г., 10:17 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа CCA49634.

Genbank, версия номер CCA49634.1 GI: 36110.

Genbank, дата обновления записи: 02 февраля, 2011 г., 10:17 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: MST1R.

Другие названия: CD136, CDw136, PTK8, RON.

Другие обозначения: рецептор MSP; MST1R, вариант RON30; MST1R, вариант RON62; протеин-тирозинкиназа 8 PTK8; RON, вариант E2E3; с-met-родственная тирозинкиназа; рецептор макрофаг-стимулирующего белка; p185-Ron; растворимый вариант 1 RON; растворимый вариант 2 RON; растворимый вариант 3 RON; растворимый вариант 4 RON.

(79) ERHA2 (EPH рецептор A2).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа BC037166.

Genbank, версия номер BC037166.2 GI: 33879863.

Genbank, дата обновления записи: 06 марта, 2012 г., 01:59 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAN37166.

Genbank, версия номер AAN37166.1 GI: 22713539.

Genbank, дата обновления записи: 06 марта, 2012 г., 01:59 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: ERHA2.

Другие названия: ARCC2, CTRA, CTRP1, ECK.

Другие обозначения: рецептор 2 эфринового типа A; рецепторная протеин-тирозинкиназа эпителиальных клеток; растворимый вариант 1 ERHA2; рецептор ECK тирозин-протеинкиназы.

Антитела.

Medimmune: 1C1 (Lee J.W., et al. *Clin Cancer Res.* 2010 May 1; 16(9):2562-2570).

Например, см. US 20090304721A1, фиг. 7 и 8.

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M27394.

Genbank, версия номер M27394.1 GI: 179307.

Genbank, дата обновления записи: 30 ноября, 2009 г., 11:16 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA35581.

Genbank, версия номер AAA35581.1 GI: 179308.

Genbank, дата обновления записи: 30 ноября, 2009 г., 11:16 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: MS4A1.

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

Другие обозначения: антиген CD20 В-лимфоцитов; антиген B1 клеточной поверхности В-лимфоцитов; антиген CD20; рецептор CD20; антиген Leu-16 поверхности лейкоцитов.

Антитела.

Genentech/Roche: Ритуксимаб - Abdulla N.E., et al. *BioDrugs.* 2012 Apr 1; (2):71-82.

Например, см. US 5736137, депозитарный номер ATCC HB-69119.

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

Например, см. US 20090169550A1, SEQ ID NO: 2, 4 и 5.

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

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

(81) Тенасцин С - TNC (тенасцин С).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_002160.

Genbank, версия номер NM_002160.3 GI: 340745336.

Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:33 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_002151.

Genbank, версия номер NP_002151.2 GI: 153946395.

Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:33 пп.

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).

Прочая информация:

Официальный символ: TNC.

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

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

Антитела.

Philogen: 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 (альфа-белок активации фибробластов).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа U09278.

Genbank, версия номер U09278.1 GI: 1888315.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 09:22 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAB49652.

Genbank, версия номер AAB49652.1 GI: 1888316.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 09:22 дп.

Перекрестные ссылки:

Scanlan, M.J., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(12), 5657-5661 (1994).

Прочая информация:

Официальный символ: FAP.

Другие названия: DPPIV, FAPA.

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

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_012242.

Genbank, версия номер NM_012242.2 GI: 61676924.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:48 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_036374.

Genbank, версия номер NP_036374.1 GI: 7110719.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:48 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: DKK1.

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

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

Антитела.

Novartis: ВНQ880 (Fulciniti M., et al. *Blood.* 2009 Jul 9; 114(2):371-379).

Например, см. US 20120052070A1, SEQ ID NO: 100 и 108.

(84) CD52 (молекула CD52).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_001803.

Genbank, версия номер NM_001803.2 GI: 68342029.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:48 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_001794.

Genbank, версия номер NP_001794.2 GI: 68342030.

Genbank, дата обновления записи: 30 сентября, 2012 г., 01:48 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: CD52.

Другие названия: CDW52.

Другие обозначения: антиген CAMPATH-1; антиген CD52 (антиген CAMPATH-1); антиген CDW52 (антиген CAMPATH-1); антиген 1 Cambridge pathology; эпидидимальный секреторный белок E5; he5; человеческий эпидидимис-специфический белок 5.

Антитела.

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

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

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_021181.

Genbank, версия номер NM_021181.3 GI: 1993571.

Genbank, дата обновления записи: 29 июня, 2012 г., 11:24 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_067004.

Genbank, версия номер NP_067004.3 GI: 19923572.

Genbank, дата обновления записи: 29 июня, 2012 г., 11:24 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: SLAMF7.

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

Другие обозначения: белок 19A24; CD2, субпопуляция 1; CD2-подобный рецептор, активирующий цитотоксичные клетки; CD2-подобный рецептор активации цитотоксичных клеток; мембранный белок FOAP-12; новый LY9 (антиген 9 лимфоцитов)-подобный белок; белок 19A.

Антитела.

BMS: elotuzumab/Hul_uc63 (Benson D.M., et al. *J. Clin. Oncol.* 2012 Jun 1; 30(16):2013-2015).

Например, см. US 20110206701, SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 16.

Эндоглин - ENG (эндоглин).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AF035753.

Genbank, версия номер AF035753.1 GI: 3452260.

Genbank, дата обновления записи: 10 марта, 2010 г., 06:36 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAC32802.

Genbank, версия номер AAC32802.1 GI: 3452261.

Genbank, дата обновления записи: 10 марта, 2010 г., 06:36 пп.

Перекрестные ссылки:

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

Официальный символ: ENG.

Прочая информация:

Другие названия: RP11-228B15.2, CD105, END, HHT1, ORW, ORW1.

Другие обозначения: антиген CD105.

Аннексии A1 - ANXA1 (аннексии A1).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа X05908.

Genbank, версия номер X05908.1 GI: 34387.

Genbank, дата обновления записи: 02 февраля, 2011 г., 10:02 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа CCA29338.

Genbank, версия номер CCA29338.1 GI: 34388.

Genbank, дата обновления записи: 02 февраля, 2011 г., 10:02 дп.

Перекрестные ссылки:

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

Прочая информация:

Официальный символ: ANXA1.

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

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

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

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M60335.

Genbank, версия номер M60335.1 GI: 340193.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:56 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA61269.

Genbank, версия номер AAA61269.1 GI: 340194.

Genbank, дата обновления записи: 23 июня, 2010 г., 08:56 дп.

Перекрестные ссылки:

Hession C., et al. J. Biol. Chem. 266(11), 6682-6685 (1991).

Прочая информация: Официальный символ: VCAM1.

Другие названия: CD106, INCAM-100

Другие обозначения: антиген CD106; васкулярный белок клеточной адгезии 1.

Последовательности антител

Анти-интегрин $\alpha_v\beta_6$

RHAB6.2

QVQLVQSGSELKPGASVKISCKASGFATDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTTEYA
PKFQGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVAGPYPF
YWGQGTLLTVSS

RHCB6.2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGDTTEYA
PKFQGRVTITDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVAGPYPF
DYWGQGTLLTVSS

RHF

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGDTTEYA
PKFQGRVFTTDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLLTVSS

RHFB6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGDTTEYA
PKFQGRVFTTDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVAGPYPF
DYWGQGTLLTVSS

RHAY100bP

QVQLVQSGSELKPGASVKISCKASGFATDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTTEYA
PKFQGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTGPYPFDYWGQGTLLTVSS

RKF

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSG
SGSGDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

RKFL36L50

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWLQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGS
SGSGDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

RKC

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGS
SGSGDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

Анти-CD33

CD33 Hum195 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCASGYTFTDYNMHWRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYN
QKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGRPAMDYWGQGLTLTVSS

CD33 Hum195 VK

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK

Анти-CD19

CD19 В4 с измененной поверхностью VH

QVQLVQPGAIEVVKPGASVKLSCKTSGYFTSNWMHWWKQRPQGLEWIGIDPDSYTNYN
QNFKFKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDAVYYCARGSNPYYYAMDYWGQGSTVTVSS

CD19 В4 с измененной поверхностью VK

EIVLTQSPAIMASPGERVMTCSASSGVNYMHWWYQQKPGTSPRRWIYDTSKLAGVPARFS
GSGSGTSYSLTISSMEPEDAATYYCHQRGSYTFGGGTKLEIK

Анти-Her2

VH цепь герцептина

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADDAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTLTVSS

VL цепь герцептина

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS
GSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

Анти-CD25

VK симулекта (также известного как базиликсимаб)

QIVSTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSRSYMQWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLAGVPARFS
GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYTFGGGTKLEIK

VH симулекта

QLQQSGTVLARPASVKMSCKASGYFTRYWMHWIKQRPQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQK
FEGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSAVYYCSRDIYGYFDYDFWQGGTTLTVSS

Анти-PSMA

Деиммунизированный VH '1

EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYFTFEYTIHWVKQAPGKLEWIGNINPNNGGTTYNQK
FEDKATLTVDKSTDATAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGLLTVSS

Деиммунизированный VK '1

DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGSPKLLIYWASTRHTGIPSRFS
SGSGTDFTLTISSLQPEDFADYQCQQYNSYPLTFGPGTKVDIK

Деиммунизированный VH1 '5

EVKLVEGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSNYWMNWWRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
YAESVKGRVTISRDDSKSIVYLMNNLRAEDTGVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Деиммунизированный VH2 '5

EVKLVEGGGLVQPGGSLKLSVASGFTFSNYWMNWWRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
YAESVKGRVTISRDDSKSIVYLMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Деиммунизированный VH3 '5

EVQLVEGGGLVQPGGSLKLSVASGFTFSNYWMNWWRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
YAESVKGRVTISRDDSKSIVYLMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Деиммунизированный VH4 '5

EVQLVEGGGLVQPGGSLKLSVASGFTFSNYWMNWWRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
YAESVKGRFTISRDDSKSIVYLMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Деиммунизированный VK1 '5

NIVMTQFPSSMSASVGDRVTITCKASENVGTYSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFT
SGSATDFTLTISSLQTEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEMK

Деиммунизированный VK2 '5

NIVMTQFPSSMSASVGDRVTITCKASENVGTYSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFS
SGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

Деиммунизированный VK3 '5

NIQMTQFPSSMSASVGDRVTITCKASENVGTYSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVPDRF
SGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

Деиммунизированный VK4 '5

NIQMTQFPSSMSASVGDRVTITCKASENVGTYSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVPDRF
SGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

Деиммунизированный VK DI '5

NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENVGTYSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGVPDRF
SGSGSGTDFILTISSVQAEDLVDDYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK

Деиммунизированный VH D1 '5

EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWRQASPEKGLEWVAEIRSQSNNFATH
YAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированный RHA '5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWRQASGKGLEWVGEIRSQSNNFATH
YAESVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированный RHB '5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
YAESVKGRVIISRDDSKNTVYLMNSLRTEDEAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированный RHC '5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
YAESVKGRVIISRDDSKNTVYLMNSLRTEDEAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированный RHD '5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWRQASGKGLEWVGEIRSQSNNFATH
YAESVKGRVIISRDDSKNTVYLMNSLRTEDEAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированный RHE '5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
YAESVKGRFTISRDDSKNTVYLMNSLRTEDEAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированный RHF '5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
YAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNSLRTEDEAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированный RHG '5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
YAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNSLRTEDEAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

Гуманизированный RKA '5

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPDRF
SGSATDFTLTINLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGGGTKVEIK

Гуманизированный RKB '5

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPSRFS
GSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированный RKC '5

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPSRFS
GSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированный RKD '5

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPSRFS
GSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированный RKE '5

NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPDRFT
GSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированный RKF '5

NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPSRFS
GSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированный RKG '5

NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPDRFT
GSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Исходное антитело также может быть слитым белком, содержащим последовательность альбумин-связывающего пептида (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 по данному изобретению включают слитые белки с последовательностями АБР, описанными в публикациях:

(i) Dennis et al. (2002), J. Biol. Chem. 277:35035-35043 в табл. III и IV, с. 35038;

(ii) US 2004/0001827 в [0076] и

(iii) WO 01/45746 на с. 12, 13,

и все указанные публикации включены в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте реализации антитело образовано для направленного специфического воздействия на связанный с опухолью антиген $\alpha_v\beta_6$.

Клеточно-связывающий агент может иметь метку, например, для облегчения обнаружения или очистки указанного агента либо до внедрения в конъюгат, либо в составе конъюгата. Метка может быть биоотиновой меткой. В другом варианте реализации клеточно-связывающий агент, может иметь радиоизотопную метку.

Связывание линкерного фрагмента с фрагментом лиганда.

Фрагмент лиганда связан с фрагментом линкера через дисульфидную связь.

В одном варианте реализации связь между фрагментом лиганда и линкером лекарственного средства образуется между тиольной группой цистеинового остатка в фрагмента лиганда и малеимидной группой в фрагменте линкера лекарственного средства.

Цистеиновые остатки фрагмента линкера могут быть доступны для приведения в контакт с функциональной группой фрагмента линкера с образованием связи. В других вариантах реализации, например, если фрагмент лиганда представляет собой антитело, тиольные группы антитела могут быть частью межцепочечных дисульфидных связей. Указанные межцепочечные связи можно превращать в свободные тиольные группы, например, посредством обработки антитела агентом DTT перед осуществлением реакции с функциональной группой фрагмента линкера.

В некоторых вариантах реализации цистеиновый остаток внедряют в тяжелую или легкую цепь антитела. Положения для вставки цистеина посредством замещения в тяжелых или легких цепях антитела включают положения, описанные в опубликованной заявке США № 2007-0092940 и в публикации международного патента WO 2008070593, которые включены в данный документ.

Способы лечения.

Соединения по данному изобретению можно использовать в способе терапии. Также предложен способ лечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества конъюгата формулы II. Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество, достаточное для обеспечения благоприятного эффекта для пациента. Такой благоприятный эффект может представлять собой облегчение по меньшей мере одного симптома. Фактически введенное количество, а также частота и схема введения зависят от природы и тяжести патологического состояния, подлежащего лечению. Назначение лечения, например определение дозы, входит в ответственность врачей общей практики и другого медицинского персонала.

Конъюгат можно вводить отдельно или в комбинации с другими способами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению. Примеры способов лечения и терапий включают, но не ограничиваются ими, химиотерапию (введение активных агентов, включая, например, лекарства); хирургические операции; и лучевую терапию.

Фармацевтические композиции по данному изобретению и для применения в соответствии с данным изобретением могут содержать, помимо активного ингредиента, т.е. конъюгата формулы I, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала зависит от способа введения, который может быть пероральным, или посредством инъекции, например, кожной, подкожной или внутривенной.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблетки, капсулы, порошка или в жидкой форме. Таблетка может содержать твердый носитель или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, нефтяной, животный или растительный жир, минеральное масло или синтетическое масло. Может быть включен физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или 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 очаг поражения активный ингредиент должен быть в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апиrogenным и имеет подходящий pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники могут получить подходящие растворы с применением, например, изотоничных сред, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактатный раствор Рингера для инъекций. При необходимости можно добавлять консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Указанные конъюгаты можно использовать для лечения пролиферативного заболевания и аутоиммунного заболевания. Термин "пролиферативное заболевание" относится к нежелательной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или патологических клеток, которая является нежелательной, такой как неопластический или гиперпластический рост *in vitro* или *in vivo*.

Примеры пролиферативных патологических состояний включают, но не ограничиваются ими, доброкачественную, предзлокачественную и злокачественную клеточную пролиферацию, включая, но не ограничиваясь этим, неоплазмы и опухоли (например, гистiocитому, глиому, астроцитому, остеому), рак (например, рак легких, мелкоклеточный рак легких, желудочно-кишечный рак, рак кишечника, рак толстой кишки, карцинома молочной железы, карцинома яичника, рак предстательной железы, рак яичек, рак печени, рак почек, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, саркома, остеосаркома, саркома Капоши, меланома), лейкозы, псориаз, болезни костей, фибропролиферативные расстройства (например, соединительных тканей) и атеросклероз. Другие раковые заболевания, представляющие интерес, включают, но не ограничиваются ими, гематологические заболевания; злокачественные заболевания, такие как лейкозы и лимфомы, такие как неходжкинская лимфома и подтипы, такие как DLBCL, лимфома клеток маргинальной зоны, клеток мантийной зоны и фолликулярная лимфома, лимфома Ходжкина, AML и другие раковые заболевания из В- или Т-клеток.

Примеры аутоиммунного заболевания включают следующие: ревматоидный артрит, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания (например, рассеянный склероз, аллергический энцефаломиелит), псориаз, псориазический артрит, эндокринную офтальмопатию, увеоретинит, системную красную волчанку, миастению гравис, болезнь Грейса, гломерулонефрит, аутоиммунное гепатологическое расстройство, воспалительную болезнь кишечника (например, болезнь Крона), анафилаксию, аллергическую реакцию, синдром Шегрена, сахарный диабет I типа, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, фибромиалгию, полимиозит, дерматомиозит, множественную эндокринную недостаточность, синдром Шмидта, аутоиммунный увеит, болезнь Аддисона, адреналит, тиреоидит, тиреоидит Хашимото, аутоиммунную болезнь щитовидной железы, пернициозную анемию, желудочную атрофию, хронический гепатит, волчаночный гепатит, атеросклероз, подострую кожную красную волчанку, гипопаратиреоз, синдром Дресслера, аутоиммунную тромбоцитопению, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, гемолитическую анемию, обыкновенную пузырчатку, пузырчатку, герпетический дерматит, очаговую алопецию, пемфигоид, склеродермию, прогрессирующий системный склероз, CREST-синдром (кальциноз, феномен Рейно, пищеводная дискинезия, склеродактилия и телеангиэктазия), аутоиммунное бесплодие мужчин и женщин, анкилозирующий спондилит, язвенный колит, смешанную болезнь соединительной ткани, нодозный полиартериит, системный некротизирующий васкулит, атопический дерматит, атопический ринит, синдром Гудпасчера, болезнь Шагаса, саркоидоз, ревматическую лихорадку, астму, привычный выкидыш, антифосфолипидный синдром, аллергический альвеолит фермеров, мультиформную эритему, посткардиотомный синдром, синдром Кушинга, аутоиммунный хронический активный гепатит, легочную аллергию птицеводов, токсический эпидермальный некролиз, синдром Альпорта, альвеолит, аллергический альвеолит, фиброзирующий альвеолит, интерстициальную болезнь легких, нодозную эритему, гангренозную пиодермию, трансфузионную реакцию, артериит Такаюсу, ревматическую полимиал-

гию, височный артериит, шистозомоз, гигантоклеточный артериит, аскаридоз, аспергиллоз, синдром Самптера, экзему, лимфоматозидный гранулематоз, болезнь Бехчета, синдром Каплана, болезнь Кавасаки, денге, энцефаломиелит, эндокардит, эндокардиальный фиброз, эндофтальмит, стойко возвышающуюся эритему, псориаз, эритробластоз плода, эозинофильный фасциит, синдром Шульмана, синдром Фелти, филяриоз, циклит, хронический циклит, гетерохронический циклит, циклит Фукса, нефроматию IgA, пурпuru Геноха-Шонлейна, болезнь "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата, кардиомиопатию, синдром Итона-Ламберта, рецидивирующий полихондрит, криоглобулинемию, макроглобулинемию Вальденстрема, синдром Эванса и аутоиммунную гонадную недостаточность.

В некоторых вариантах реализации аутоиммунное заболевание представляет собой расстройство В-лимфоцитов (например, системная красная волчанка, синдром Гудпасчера, ревматоидный артрит и диабет I типа), Th1-лимфоцитов (например, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз вегенера, туберкулез или болезнь "трансплантат против хозяина") или Th2-лимфоцитов (например, atopический дерматит, системная красная волчанка, atopическая астма, риноконъюнктивит, аллергический ринит, синдром Оменна, системный склероз или хроническая болезнь "трансплантат против хозяина"). В целом, расстройства, затрагивающие дендритные клетки, включают расстройства Th1-лимфоцитов или Th2-лимфоцитов. В некоторых вариантах реализации аутоиммунное расстройство представляет собой иммунологическое расстройство, опосредованное Т-клетками.

В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,01 до около 10 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,01 до около 5 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,05 до около 5 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,1 до около 5 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,1 до около 4 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,05 до около 3 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,1 до около 3 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,1 до около 2 мг/кг на одну дозу.

Нагрузка лекарственным средством.

Нагрузка лекарственным средством (р) представляет собой среднее количество PBD лекарственных средств на один клеточно-связывающий агент, например, антитело. Если соединения по изобретению связаны с цистеинами, то содержание лекарственного средства может составлять от 1 до 8 единиц лекарственного средства (D) на один клеточно-связывающий агент, т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 фрагментов лекарственного средства ковалентно связаны с агентом, связывающимся с клеткой. Композиции конъюгатов включают совокупности агентов, связывающихся с клеткой, например антител, конъюгированных с лекарственным средством в количестве от 1 до 8. Если соединения по изобретению связаны с лизинами, то нагрузка лекарственного средства может составлять от 1 до 80 единиц лекарственного средства (D) на один клеточно-связывающий агент, хотя предпочтительным может быть верхний предел 40, 20, 10 или 8. Композиции конъюгатов включают совокупности агентов, связывающихся с клеткой, например, антител, конъюгированных с лекарственным средством в количестве от 1 до 80, от 1 до 40, от 1 до 20, от 1 до 10 или от 1 до 8.

Среднее количество лекарственных средств на одно антитело в препаратах ADC, полученных в результате реакций конъюгирования, можно определить стандартными способами, такими как УФ, обратнo-фазовая ВЭЖХ, ГИХ, масс-спектрокопия, твердофазный иммуноферментный анализ и электрофорез. Также можно определить количественное распределение ADC с точки зрения р. С помощью твердофазного иммуноферментного анализа можно определить среднее значение р в конкретном препарате ADC (Hamblett et al. (2004), Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al. (2005), Clin. Cancer Res. 11:843-852). Однако распределение значений р (лекарственного средства) нельзя определить по связыванию антитело-антиген и из-за предела обнаружения твердофазного иммуноферментного анализа. Кроме того, твердофазный иммуноферментный анализ для обнаружения конъюгатов антитело-лекарственное средство не обеспечивает определение положений, в которых фрагменты лекарственного средства присоединены к антителу, таких как фрагменты тяжелой цепи или легкой цепи, конкретных аминокислотных остатков. В некоторых случаях разделение, очистку и определение характеристик гомогенного ADC, в котором р представляет собой определенное значение, полученное на основании ADC с другим содержанием лекарственного средства, можно осуществлять с помощью, например, обратнo-фазовой ВЭЖХ или электрофореза. Такие технологии также применимы к другим типам конъюгатов.

Для некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство р может быть ограничено количеством центров присоединения в антителе. Например, антитело может иметь только одну или более тиольных групп цистеина или может иметь только одну или более достаточно реакционноспособных тиольных групп, к которым может быть присоединен линкер. Более высокое содержание лекарственного средства, например $r > 5$, может приводить к агрегации, нестабильности, токсичности или снижению клеточной проницаемости некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Как правило, в реакции конъюгирования с антителом конъюгируется меньшее количество лекарственных фрагментов, чем теоретически возможное максимальное количество. Антитело может содержать, например, множество лизиновых остатков, которые не взаимодействуют с линкером лекарственного средства (А или В). Только самые реакционноспособные лизиновые группы могут взаимодействовать с аминокислотным линкерным реагентом. Также только самые реакционноспособные цистеиновые тиольные группы могут взаимодействовать с тиол-реакционным линкерным реагентом. В целом, антитела не содержат много, если вообще содержат, свободных и реакционноспособных цистеиновых тиольных групп, которые можно связывать с фрагментом лекарственного средства. Большинство цистеиновых тиольных остатков в антителах указанных соединений существуют в виде дисульфидных мостиков, и их необходимо восстанавливать восстановительным агентом, таким как дитиотреитол (ДТТ) или ТСЕР, в условиях частичного или полного восстановления. Нагрузку лекарственным средством (отношение лекарственное средство/антитело) в ADC можно регулировать несколькими различными способами, включая (i) ограничение молярного избытка линкера лекарственного средства (А или В) относительно антитела, (ii) ограничение времени или температуры реакции конъюгирования и (iii) условия частичного или ограниченного восстановления для модификации цистеинового тиола.

Некоторые антитела содержат способные к восстановлению межцепочечные дисульфиды, т.е. цистеиновые мостики. Антителам можно придавать реакционную способность для конъюгирования с линкерными реагентами посредством их обработки восстановительным агентом, таким как ДТТ (дитиотреитол). Каждый цистеиновый мостик теоретически будет образовывать два реакционноспособных тиольных нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы можно вводить в антитело посредством реакции лизинов с 2-иминотиолоном (реагент Траута), в результате чего амин превращается в тиол. Реакционноспособные тиольные группы можно вводить в антитело (или его фрагмент) посредством конструирования одного, двух, трех, четырех или более цистеиновых остатков (например, получения мутантных антител, содержащих один или более не природных цистеиновых аминокислотных остатков). В US 7521541 описано конструирование антител посредством введения реакционноспособных цистеиновых аминокислот.

Цистеиновые аминокислоты можно конструировать по реакционноспособным сайтам антитела, которые не образуют внутрицепочечные 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). Сконструированные цистеиновые тиолы могут взаимодействовать с линкерными реагентами или с реагентами лекарственное средство-линкер по данному изобретению, которые содержат тиол-реакционные электрофильные группы, такие как малеимид или альфа-галогенамиды, с образованием ADC с цистеин-сконструированными антителами и фрагментами лекарственных средств PBD. Таким образом, положение фрагмента лекарственного средства можно проектировать, контролировать и знать. Можно контролировать нагрузку лекарственным средством, поскольку тиольные группы сконструированного цистеина обычно взаимодействуют с тиол-реакционными линкерными реагентами или реагентами лекарственное средство-линкер с высоким выходом. Конструирование IgG антитела для внедрения цистеиновой аминокислоты посредством замещения в одном сайте тяжелой или легкой цепи обеспечивает два новых цистеина в симметричном антителе. Нагрузка лекарственным средством около 2 может быть обеспечена с почти полной гомогенностью продукта конъюгирования ADC.

Если более одной нуклеофильной или электрофильной группы антитела приводится в контакт с интермедиатом лекарственное средство-линкер, или с линкерным реагентом, а затем с фрагментом лекарственного средства, то полученный продукт представляет собой смесь ADC соединений с распределением фрагментов лекарственного средства, присоединенных к антителу, например, 1, 2, 3 и т.д. Методы жидкостной хроматографии, такие как полимерная обратно-фазовая (ПОФ) хроматография и хроматография гидрофобного взаимодействия (ГИХ), могут обеспечивать разделение соединений в смеси по значению нагрузки лекарственным средством. Можно выделять препараты ADC с одним значением нагрузки лекарственным средством (p), однако такое единственное значение содержания ADC все еще может означать гетерогенную смесь, поскольку фрагменты лекарственного средства могут быть присоединены через линкер в разных сайтах антитела.

Таким образом, композиции конъюгатов антитело-лекарственное средство по данному изобретению включают смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, в которых антитело имеет один или более фрагментов лекарственного средства PBD и в которых фрагменты лекарственного средства могут быть присоединены к антителу через различные аминокислотные остатки.

В одном варианте реализации среднее количество димерных пирролобензодиазепиновых групп на один клеточно-связывающий агент, составляет от 1 до 20. В некоторых вариантах реализации указанный диапазон выбран из диапазонов от 1 до 8, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 4 и от 4 до 8.

В некоторых вариантах реализации присутствует одна димерная пирролобензодиазепиновая группа на один клеточно-связывающий агент.

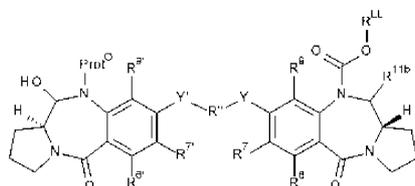
Общие способы синтеза.

Синтез PBD соединений подробно описан в следующих ссылках, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки:

- a) WO 00/12508 (с. 14-30);
 b) WO 2005/023814 (с. 3-10);
 c) WO 2004/043963 (с. 28-29) и
 d) WO 2005/085251 (с. 30-39).

Способ синтеза

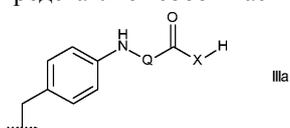
Соединения по данному изобретению формулы I, где R^{20} и R^{21} образуют двойную связь азот-углерод между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, могут быть получены из соединения формулы 2



Формула 2

где R^6 , R^7 , R^9 , R^6 , R^7 , R^9 , R^{11b} , Y , Y' и R'' являются такими, как определено для соединений формулы I, и R^{LL} представляет собой предшественник R^L - указанный способ особенно пригоден для соединений формулы I, где R^L имеет формулу IIIa.

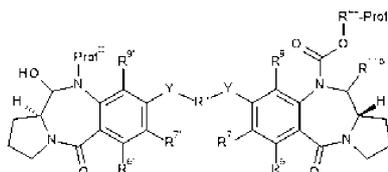
Для таких соединений R^{LL} обычно представляет собой часть R^L , такую как группа формулы IIIa'



IIIa'

В таком случае реакция включает присоединение группы G^L . Второй необходимый шаг является удалением группы Prot^o.

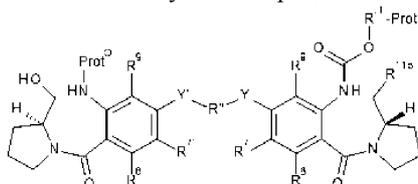
Соединения формулы 2 можно получить посредством снятия защитной группы с группы R^{LL} соединений формулы 3



Формула 3

где R^6 , R^7 , R^9 , R^6 , R^7 , R^9 , R^{11b} , Y , Y' и R'' являются такими, как определено для соединений формулы I, $R^{LL-Prot}$ представляет собой защищенную версию R^{LL} и Prot^N представляет собой защитную группу для атома азота (например, Fmoc, Boc), которая является ортогональной R^{LL} защитной группе.

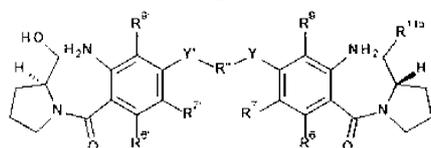
Соединения формулы 3 можно получать посредством замыкания кольца в соединениях формулы 4



Формула 4

где указанное замыкание кольца осуществляют посредством окисления, например, по Сверну.

Соединения формулы 4 можно синтезировать из соединений формулы 5



Формула 5

постепенным добавлением двух защитных групп, что можно осуществлять простой защитой амино-группы, которая приведет к иминосвязи в конечном соединении (например, Fmoc, Boc), с последующей постановкой желаемой защитной группы на другую аминогруппу.

Соединения формулы I, где R^L имеет формулу IIIb, можно синтезировать таким же способом, хотя можно установить всю R^L группу, исходя из соединения формулы 5, вместо того чтобы использовать защищенный предшественник.

Соединения формулы 5 можно синтезировать известными способами, такими как описано в WO 2011/130598.

Альтернативно, соединения формулы 4 можно синтезировать через мономерный путь, как представлено в примере 3.

Соединения по данному изобретению формулы I, где R^{20} и R^{21} не образуют двойную связь азот-

углерод между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, могут быть получены посредством модификаций вышеуказанных синтетических последовательностей.

Синтез конъюгатов лекарственных средств.

Конъюгаты можно получать так, как описано ранее. Антитела можно конъюгировать с линкерами лекарственных средств, как описано в публикации Doronina et al., Nature Biotechnology, 2003, 21, 778-784). Вкратце, антитела (4-5 мг/мл) в PBS, содержащем 50 мМ бората натрия при pH 7,4, восстанавливают гидрохлоридом трис-(карбоксииэтил)фосфина (ТСЕР) при 37°C. Ход реакции, в которой восстанавливают межцепочечные дисульфиды, контролируют по реакции с 5,5'-дителио-бис-(2-нитробензойной кислотой) и продолжают реакцию до достижения требуемого значения отношения тиолы/mAb. Затем восстановленное антитело охлаждают до 0°C и алкилируют, используя 1,5 экв. малеимидного линкера лекарственного средства на одну тиольную группу антитела. Через 1 ч реакцию останавливают добавлением 5 экв. N-ацетилцистеина. Остановленный линкер лекарственного средства удаляют геле-фильтрацией на колонке PD-10. Затем ADC стерильно фильтруют через шприц-фильтр 0,22 мкм. Концентрацию белка можно определять спектральным анализом при 280 и 329 нм соответственно с поправкой на вклад поглощения лекарственного средства при 280 нм. Можно использовать эксклюзионную хроматографию для определения степени агрегации антитела, и можно использовать ОФ-ВЭЖХ для определения содержания остаточного NAC-погашенного линкера лекарственного средства.

Дополнительные предпочтения.

Следующие предпочтения можно применять в отношении всех аспектов данного изобретения, описанных выше, или они могут относиться к одному аспекту. Предпочтения можно комбинировать друг с другом в любом сочетании.

В некоторых вариантах реализации R^6 , R^7 , R^9 и Y' выбраны из таких же групп, как R^6 , R^7 , R^9 и Y соответственно. В некоторых из таких вариантов реализации R^6 , R^7 , R^9 и Y' являются такими же, как R^6 , R^7 , R^9 и Y соответственно.

$N10'$ - $C11'$.

В некоторых вариантах реализации R^{20} представляет собой H и R^{21} представляет собой OH, OR^A , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил. В некоторых из таких вариантов реализации R^{21} представляет собой OH. В других из этих вариантов реализации R^{21} представляет собой OR^A , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил. В некоторых из таких вариантов реализации R^A представляет собой метил.

В некоторых вариантах реализации R^{20} представляет собой H и R^{21} представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации, где R^{20} представляет собой (d-iii), в бензольном кольце может быть дополнительная нитрогруппа, например орто к R^Z .

В некоторых вариантах реализации R^{21} представляет собой OH или OR^A , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил и R^{20} выбран из:

R ^{20a}	
R ^{20b}	
R ^{20c}	
R ^{20d}	
R ^{20e}	
R ^{20f}	
R ^{20g}	
R ^{20h}	

$-\text{C}(=\text{O})-\text{X}_1-\text{NHC}(=\text{O})\text{X}_2-\text{NH}-$ представляет собой дипептид. Аминокислоты в дипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. Дипептид представляет собой место действия катепсин-опосредованного расщепления.

В одном варианте реализации дипептид, $-\text{C}(=\text{O})-\text{X}_1-\text{NHC}(=\text{O})\text{X}_2-\text{NH}-$, выбран из:

- Phe-Lys-,
- Val-Ala-,
- Val-Lys-,
- Ala-Lys-,
- Val-Cit-,
- Phe-Cit-,
- Leu-Cit-,
- Ile-Cit-,

-Phe-Arg-,

-Trp-Cit-,

где Cit представляет собой цитруллин.

Предпочтительно дипептид, $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-$, выбран из:

-Phe-Lys-,

-Val-Ala-,

-Val-Lys-,

-Ala-Lys-,

-Val-Cit-.

Наиболее предпочтительно дипептид, $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-$, представляет собой -Phe-Lys- или -Val-Ala-.

Можно использовать другие дипептидные комбинации, включая комбинации, описанные в публикации Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869, включенной в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте реализации боковая цепь аминокислоты является химически защищенной, если это необходимо, например аминогруппа или карбоксигруппа боковой цепи аминокислоты могут быть дериватизированы.

В одном варианте реализации аминогруппа NH_2 аминокислоты с боковой цепью, такой как лизин, представляет собой дериватизированную форму, выбранную из группы, состоящей из NHR и NRR'.

В одном варианте реализации карбоксигруппа $COOH$ аминокислоты с боковой цепью, такой как аспарагиновая кислота, представляет собой дериватизированную форму, выбранную из группы, состоящей из $COOR$, $CONH_2$, $CONHR$ и $CONRR'$.

В одном варианте реализации боковая цепь аминокислоты является химически защищенной, если это необходимо. Защитная группа боковой цепи может представлять собой группу, описанную ниже. Настоящие изобретатели установили, что защищенные аминокислотные последовательности могут расщепляться ферментами. Например, дипептидная последовательность, содержащая остаток Lys с Вос-защищенной боковой цепью, расщепляется катепсином.

Защитные группы для боковых цепей аминокислот хорошо известны в данной области техники и описаны в каталоге Novabiochem. Дополнительные стратегии защитных групп изложены в "Защитных группах" в "Органическом синтезе", Greene и Wuts.

Возможные защитные группы боковой цепи показаны ниже для тех аминокислот, которые имеют реакционноспособную функциональность боковой цепи:

Arg: Z, Mtr, Tos;

Asn: Trt, Xan;

Asp: Bzl, трет-Bu;

Cys: Acm, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;

Glu: Bzl, трет-Bu;

Gin: Trt, Xan;

His: Boc, Dnp, Tos, Trt;

Lys: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z, Alloc;

Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;

Thr: Bz;

Trp: Boc;

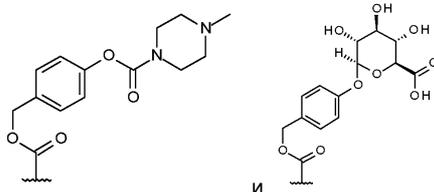
Tyr: Bzl, Z, Z-Br.

В одном варианте реализации защита боковой цепи выбирается так, чтобы она была ортогональной к группе, предоставляемой в качестве или в качестве части закрывающей группы, где она присутствует. Таким образом, удаление защитной группы боковой цепи не приводит к удалению закрывающей группы или какой-либо функциональности защитной группы, которая является частью закрывающей группы.

В других вариантах реализации изобретения выбранные аминокислоты представляют собой аминокислоты, не имеющие реакционноспособной функциональности боковой цепи. Например, аминокислоты могут быть выбраны из Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro и Val.

В настоящем изобретении особенно предпочтительно, чтобы, если L^1 содержит дипептид, тогда $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-$ является тем же дипептидом.

Другие предпочтительные группы R^{20} включают:

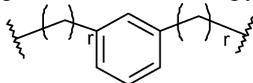


Димерная связь.

В некоторых вариантах реализации оба Y и Y' представляют собой O.

В некоторых вариантах реализации R'' представляет собой C₃₋₇алкиленовую группу без заместителей. В некоторых из таких вариантов реализации R'' представляет собой C₃, C₅ или C₇ алкилен. В частности, R'' может представлять собой C₃ или C₅ алкилен.

В других вариантах реализации R'' представляет собой группу формулы



где r равно 1 или 2.

Фениленовая группа может быть заменена пиридиленовой группой.

От R⁶ до R⁹.

В некоторых вариантах реализации R⁹ представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации R⁶ выбран из H, OH, OR, SH, NH₂, нитро и галогена, и может быть выбран из H или галогена. В некоторых из таких вариантов реализации R⁶ представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации R⁷ выбран из H, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR' и галогена. В некоторых из таких вариантов реализации R⁷ выбран из H, OH и OR, где R выбран из необязательно замещенных C₁₋₇алкильных, C₃₋₁₀гетероциклических и C₅₋₁₀арильных групп. Более предпочтительно R может представлять собой C₁₋₄алкильную группу, которая может быть или не быть замещенной. Пригодный заместитель представляет собой C₅₋₆арильную группу (например, фенил). Особенно предпочтительные заместители в 7-положениях представляют собой OMe и OCH₂Ph. Другие особенно пригодные заместители представляют собой диметиламино (т.е. -NMe₂); -(OC₂H₄)_qOMe, где q равен от 0 до 2; азотсодержащие C₆ гетероциклы, включая морфолино, пиперидинил и N-метилпиперазинил.

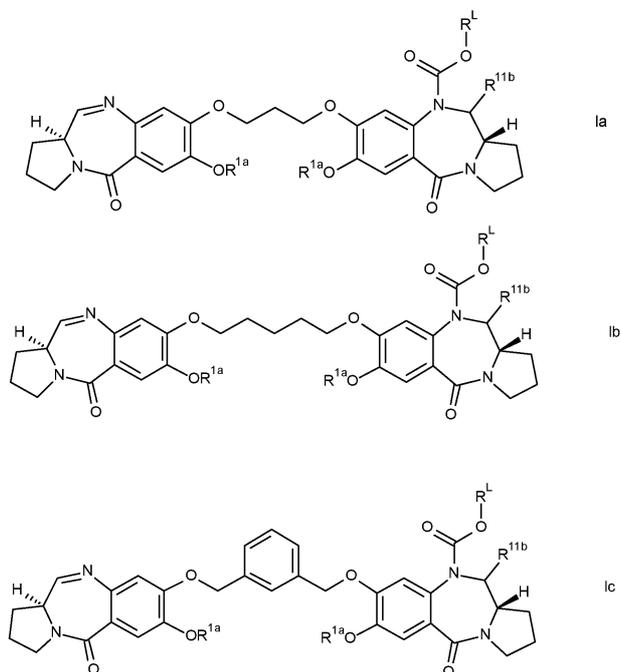
Указанные варианты реализации и предпочтения относятся к R⁹, R⁶ и R⁷ соответственно.

R^{11b}.

В некоторых вариантах реализации R^{11b} представляет собой OH.

В некоторых вариантах реализации R^{11b} представляет собой OR^A, где R^A представляет собой C₁₋₄алкил. В некоторых из таких вариантов реализации R^A представляет собой метил.

В некоторых вариантах реализации первого аспекта данного изобретения предложены соединения формулы Ia, Ib или Ic:



где R^{1a} выбран из метила и бензила;

R^L и R^{11b} являются такими, как определено выше.

Указанные варианты реализации и предпочтения также относятся ко второму аспекту данного изобретения.

Линкер (R^L).

В некоторых вариантах реализации R^L имеет формулу IIIa.

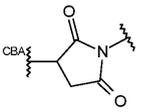
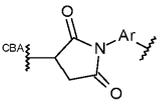
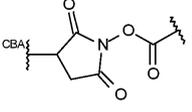
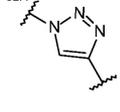
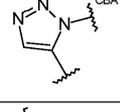
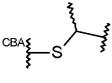
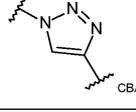
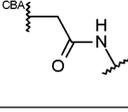
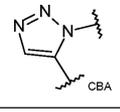
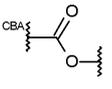
В некоторых вариантах реализации R^{LL} имеет формулу IIIa'.

G^L.

G^L может быть выбран из:

(G ^{L1-1})		(G ^{L4})	 Где Hal = I, Br, Cl
(G ^{L1-2})		(G ^{L5})	
(G ^{L2})		(G ^{L6})	
(G ^{L3-1})		(G ^{L7})	
(G ^{L3-2})		(G ^{L8})	
(G ^{L3-3})		(G ^{L9})	
(G ^{L3-4})			

где Ar представляет собой C₅₋₆ариленовую группу, например фенилен.
 В некоторых вариантах реализации G^L выбран из G^{L1-1} и G^{L1-2}. В некоторых из таких вариантов реализации G^L представляет собой G^{L1-1}.
 G^{LL}.
 G^{LL} может быть выбран из:

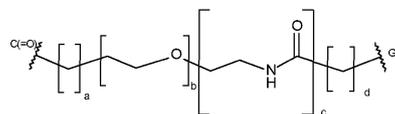
(G ^{LL1-1})		(G ^{LL6})	
(G ^{LL1-2})		(G ^{LL7})	
(G ^{LL2})		(G ^{LL8-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL4})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL5})			

где Ar представляет собой C₅₋₆ариленовую группу, например фенилен.

В некоторых вариантах реализации G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2}. В некоторых из таких вариантов реализации G^{LL} представляет собой G^{LL1-1}.

X.

X представляет собой:



где a=0-5, b=0-16, c=0 или 1, d=0-5;

a может быть равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

В некоторых вариантах реализации a равно от 0 до 3. В некоторых из таких вариантов реализации a равно 0 или 1. В других вариантах реализации a равно 0.

b может быть равно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах реализации b равно от 0 до 12. В некоторых вариантах реализации b равно от 0 до 8 и может быть равно 0, 2, 4 или 8.

c может быть равно 0 или 1.

d может быть равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах реализации d равно от 0 до 3. В некоторых из таких вариантов реализации d равно 1 или 2. В других вариантах реализации d равно 2.

В некоторых вариантах реализации группы X, a равно 0, c равно 1 и d равно 2, b может быть равно от 0 до 8. В некоторых из таких вариантов реализации b равно 0, 4 или 8.

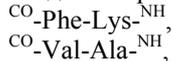
Q.

В одном варианте реализации Q представляет собой остаток аминокислоты. Аминокислота может быть природной аминокислотой или неприродной аминокислотой.

В одном варианте реализации Q выбран из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp, где Cit представляет собой цитруллин.

В одном варианте реализации Q содержит дипептидный остаток. Аминокислоты в дипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах реализации дипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой катепсин-лабильный линкер, то дипептид представляет собой место катепсин-опосредованного расщепления. В таком случае дипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина.

В одном варианте реализации Q выбран из:



CO-Val-Lys-NH,
 CO-Ala-Lys-NH,
 CO-Val-Cit-NH,
 CO-Phe-Cit-NH,
 CO-Leu-Cit-NH,
 CO-Ile-Cit-NH,
 CO-Phe-Arg-NH и
 CO-Trp-Cit-NH,

где Cit представляет собой цитруллин.

Предпочтительно Q выбран из:

CO-Phe-Lys-NH,
 CO-Val-Ala-NH,
 CO-Val-Lys-NH,
 CO-Ala-Lys-NH,
 CO-Val-Cit-NH.

Наиболее предпочтительно Q выбран из:

CO-Phe-Lys-NH,
 CO-Val-Cit-NH и
 CO-Val-Ala-NH.

Другие перспективные дипептидные комбинации включают:

CO-Gly-Gly-NH,
 CO-Pro-Pro-NH и
 CO-Val-Glu-NH.

Можно использовать другие дипептидные комбинации, включая комбинации, описанные в публикации Dubowchik et al., Bioconjugate Chemistry, 2002, 13,855-869, включенной в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации Q^X представляет собой трипептидный остаток. Аминокислоты в трипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах реализации трипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой катепсин-лабильный линкер, то трипептид представляет собой место катепсин-опосредованного расщепления. В таком случае трипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина.

В одном варианте реализации боковая цепь аминокислоты является химически защищенной, если это необходимо. Защитная группа боковой цепи может представлять собой группу, описанную ниже. Защищенные аминокислотные последовательности могут расщепляться ферментами. Например, дипептидная последовательность, содержащая остаток Lys с Вос-защищенной боковой цепью, расщепляется катепсином.

Защитные группы для боковых цепей аминокислот хорошо известны в данной области техники и описаны в каталоге Novabiochem, а также описаны выше в данном документе.

В некоторых вариантах реализации R^L имеет формулу IIIb. В некоторых вариантах реализации R^{L1} имеет формулу IIIb'.

R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила, или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу.

В некоторых вариантах реализации R^{L1} и R^{L2} представляют собой H.

В некоторых вариантах реализации R^{L1} представляет собой H и R^{L2} представляет собой метил.

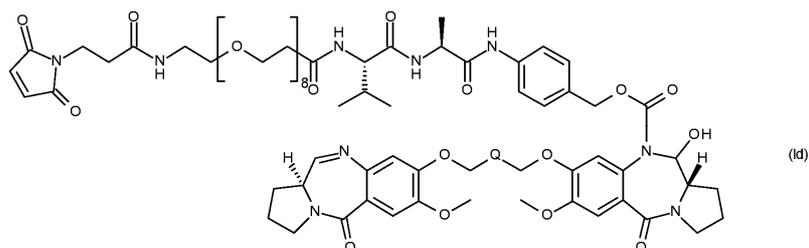
В некоторых вариантах реализации R^{L1} и R^{L2} представляют собой метил.

В некоторых вариантах реализации R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.

В некоторых вариантах реализации R^{L1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

В некоторых вариантах реализации в группе IIIb e равно 0. В других вариантах реализации e равно 1 и нитрогруппа может быть в любом доступном положении кольца. В некоторых из таких вариантов реализации она находится в орто-положении. В других из таких вариантов реализации она находится в пара-положении.

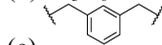
В одном конкретном варианте реализации первый аспект данного изобретения включает соединение формулы Id



где, Q выбран из:

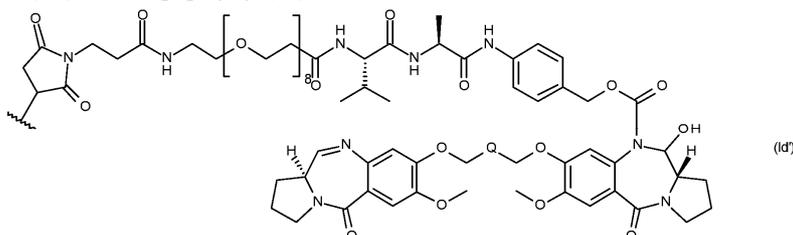
(a) $-\text{CH}_2-$;

(b) $-\text{C}_3\text{H}_6-$ и



(c)

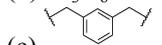
В одном конкретном варианте реализации второго аспекта данного изобретения линкер лекарственного соединения (D^L) имеет формулу (Id')



где Q выбран из:

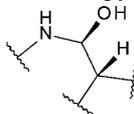
(a) $-\text{CH}_2-$;

(b) $-\text{C}_3\text{H}_6-$ и

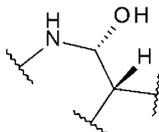


(c)

В некоторых вариантах реализации данного изобретения заместитель C11 может быть в следующем стереохимическом положении относительно соседних групп:



В других вариантах реализации заместитель C11 может быть в следующем стереохимическом положении относительно соседних групп:



Примеры

Общая информация.

Флэш-хроматографию проводили на приборе Biotage Isolera 1TM, используя градиентное элюирование, начиная с 88% смеси гексан/EtOAc или 99,9% смеси ДХМ/MeOH, до полного элюирования из колонки всех УФ-активных компонентов (обнаружение при 214 и 254 нм). Когда наблюдали значительное элюирование УФ-активного материала, градиент останавливали вручную. Чистоту фракций проверяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя силикагель Merck Kieselgel 60 F254, с флуоресцентным индикатором на алюминиевых пластинах. Визуализацию ТСХ осуществляли с помощью УФ света или паров йода, если не указано иное. Растворители для экстракции и хроматографии приобретали и использовали без дополнительной очистки у компании VWR, Великобритания. Все химические реактивы приобретали у компании Sigma-Aldrich или TCI Europe, если не указано иное. Пэгиллированные реагенты приобретали у компании Quanta Biodesign, США, через компанию Stratech, Великобритания.

¹H и ¹³C ЯМР спектры записывали на спектрометре Bruker Avance® 400. Константы расщепления указывали в герцах (Гц). Химические сдвиги записывали в миллионных долях (м.д.) в сторону слабого поля относительно сигнала тетраметилсилана. Спиновые мультиплетности записывали как с (синглет), уш.с (уширенный синглет), д (дублет), т (триплет) и м (мультиплет).

Использовали следующие условия аналитической ЖХ/МС (для проверки хода реакции и определения чистоты): Электрораспылительную масс-спектрометрию в режиме положительной ионизации проводили на приборе Shimadzu Nexera®/Prominence® LCMS-2020. В качестве подвижной фазы использовали растворитель А (H₂O с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (CH₃CN с 0,1% муравьиной кисло-

ты). Градиент для обычной 3-минутной хроматограммы: Первоначальный состав 5% В выдерживали в течение 25 с, затем повышали концентрацию от 5 до 100% В в течение 1 мин 35 с. Такой состав выдерживали в течение 50 с при 100% В, затем возвращались к 5% В в течение 5 с и выдерживали в течение 5 с. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 3,0 мин. Градиент для обычной 15-минутной хроматограммы: Первоначальное содержание 5% В выдерживали в течение 1 мин, затем повышали от 5 до 100% В за 9 мин. Такой состав выдерживали в течение 2 мин при 100% В, затем возвращались к 5% В в течение 10 с и выдерживали при 5% В в течение 2 мин 50 с. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 15,0 мин. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин (для 3-минутной хроматограммы) и 0,6 мл/мин (для 15-минутной хроматограммы). Обнаружение проводили при 254 нм. Колонки: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм при 50°C, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130A, 1,7 мкм, 2,1×5 мм (стандартный 3-минутный цикл); и ACE Excel 2 C18-AR, 2 мкм, 3,0×100 мм, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130A, 1,7 мкм, 2,1×5 мм (15-минутный цикл).

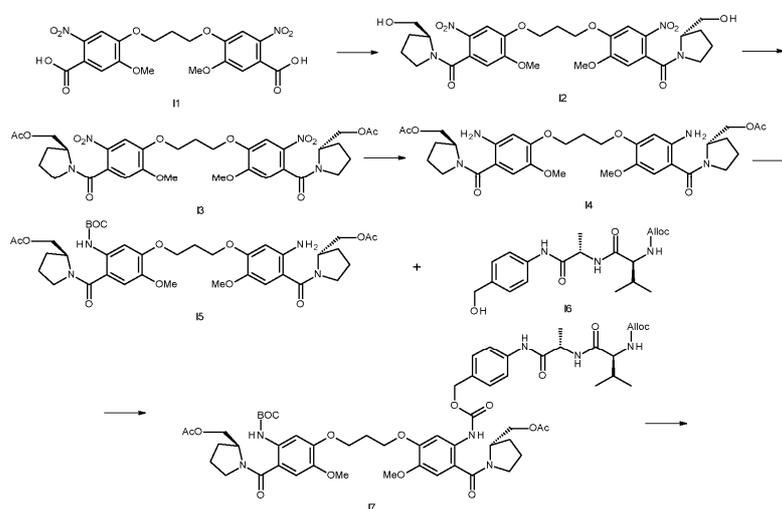
Использовали следующие условия препаративной ВЭЖХ. Обращенно-фазовую сверхскоростную высокоэффективную жидкостную хроматографию (СВЭЖХ) проводили на приборе Shimadzu Prominence®, используя колонку Phenomenex® Gemini NX, 5 мкм, C18 (при 50°C), 150×21,2 мм. В качестве элюентов использовали растворитель А (H₂O с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (CH₃CN с 0,1% муравьиной кислоты). Все эксперименты СВЭЖХ проводили, используя следующие условия градиента.

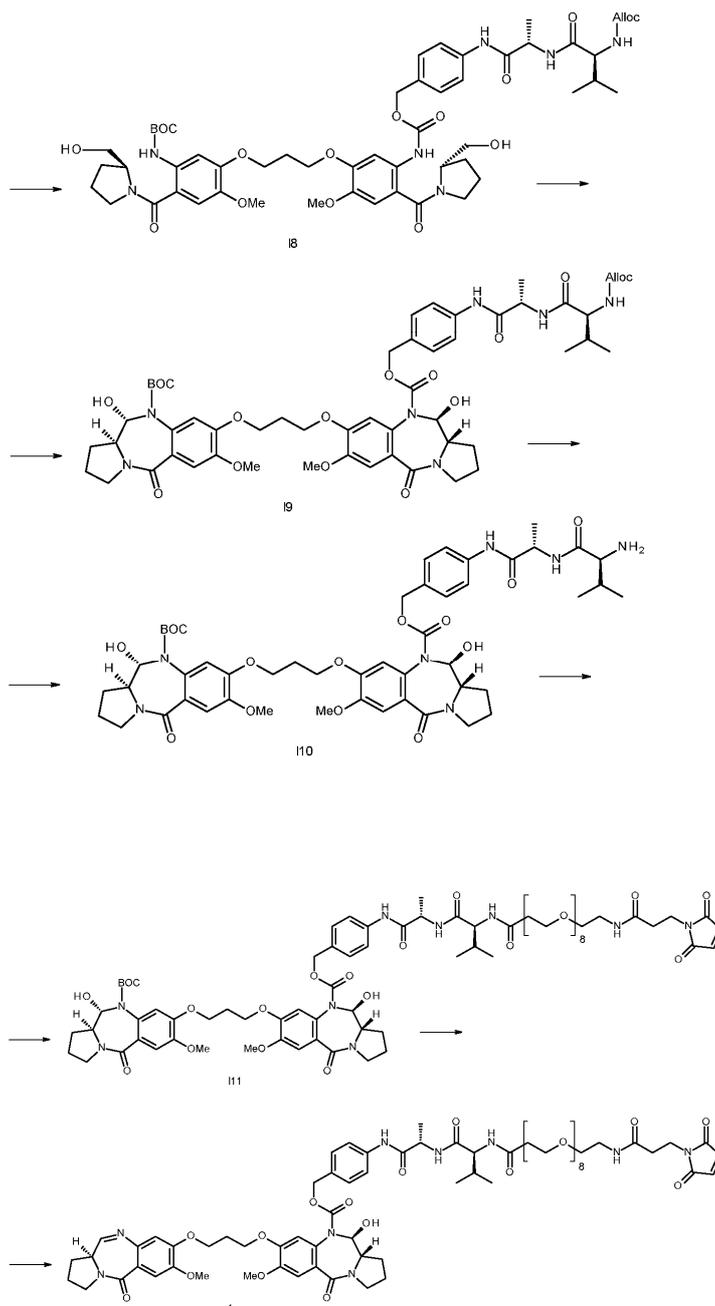
Метод А: Первоначальное содержание 13% В увеличивали до 60% В за 15 мин, затем увеличивали до 100% В за 2 мин. Выдерживали в течение 1 мин при 100% В, затем возвращали к 13% В за 0,1 мин и выдерживали в течение 1,9 мин. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 20,0 мин. Скорость потока составляла 20,0 мл/мин, и обнаружение проводили при 254 и 280 нм.

Метод В: Первоначальное содержание 13% В увеличивали до 70% В за 17 мин, выдерживали при данном содержании В в течение 2 мин, затем возвращали к 13% В за 0,1 мин и выдерживали в течение 1,9 мин. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 20,0 мин. Скорость потока составляла 20,0 мл/мин, и обнаружение проводили при 223 нм.

Метод С: Первоначальное содержание 13% В увеличивали до 75% В за 15 мин, затем увеличивали до 100% В за 2 мин. Выдерживали в течение 1 мин при 100% В, затем возвращали к 13% В за 0,1 мин и выдерживали в течение 1,9 мин. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 20,0 мин. Скорость потока составляла 20,0 мл/мин, и обнаружение проводили при 254 и 280 нм.

Пример 1.





(а) ((Пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-S)-2-(гидроксиметил)-пирролидин-1-ил)метанон) (12).

К перемешанной суспензии бис-нитробензойной кислоты II (10 г, 21,5 ммоль) и оксалилхлорида (5,6 мл, 8,2 г, 64,5 ммоль) в безводном ДХМ (150 мл) добавляли ДМФА (12 капель). После начального вспенивания реакционная суспензия превращалась в раствор, и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 16 ч. Большую часть растворителя удаляли выпариванием в вакууме, а полученный концентрированный раствор повторно растворяли в минимальном количестве сухого ДХМ и растирали с диэтиловым эфиром. Полученный желтый осадок отфильтровывали в вакууме, промывали холодным диэтиловым эфиром и сушили в течение 1 ч в вакуумной печи при 40°C. Твердый хлорангидрид по частям добавляли к перемешиваемой суспензии (S)-(+)-2-пирролидинметанола (5,0 г, 4,9 мл, 49,5 ммоль) и ТЭА (15,0 мл, 10,9 г, 108 ммоль) в ДХМ (100 мл) при -40°C (сухой лед/CH₃CN). После перемешивания в течение 1 ч реакцию завершали, что определяли с помощью ЖХ/МС с исключительно желаемым продуктом при времени удерживания 1,33 мин, ЭСИ+ m/z 655 [M+Na]⁺, 633 [M+H]⁺. Смесь разбавляли ДХМ (100 мл) и промывали 1н. HCl (2×50 мл), насыщенным NaHCO₃ (3×40 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме с получением очищенного продукта 12 в виде желтого твердого вещества (13,6 г, выход 100%).

(б) ((2S,2'S)-(4,4'-(Пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитробензоил))-бис-(пирролидин-1,2-диил))-бис-(метилден)диацетат (13).

Раствор As₂O (4,47 мл, 4,83 г, 47,3 ммоль) в сухом ДХМ (25 мл) добавляли по каплям к перемеши-

ваемому раствору бис-спирта 12 (13,6 г, 21,5 ммоль), DMAP (263 мг, 2,15 ммоль) и пиридина (4,17 мл, 4,08 г, 51,6 ммоль) в сухом ДХМ (125 мл) при 0°C (лед/ацетон) в атмосфере аргона. Реакционную смесь оставляли нагреться и через 1 ч при комнатной температуре анализ с помощью ЖХ/МС выявил завершение реакции и полное превращение в желаемый продукт при времени удерживания 1,55 мин, ЭСИ+ m/z 740 [M+Na]⁺, 717 [M+H]⁺. Смесь разбавляли ДХМ (20 мл) и промывали 1н. HCl (2×100 мл), H₂O (25 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме с получением неочищенного бис-ацетата 13 в виде желтого твердого вещества (14,4 г, 94% выход), который имел удовлетворительную чистоту для переноса на следующую стадию без дополнительной очистки.

(с) ((2S,2'S)-(4,4'-(Пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(2-амино-5-метоксибензоил))-бис-(пирролидин-1,2-диил))-бис-(метилена)диацетат (I4).

Образец 10% Pd-C (132 мг) осторожно обрабатывали EtOAc (10 мл) с получением суспензии, которую добавляли к раствору нитросоединения I3 (1,32 г, 1,84 ммоль) в EtOAc (20 мл) и EtOH (30 мл) в сосуде для гидрирования. Используя аппарат Рагг®, смесь обрабатывали газообразным водородом до 10 фунтов/кв.дюйм и встряхивали при комнатной температуре, затем дегазировали в вакууме, данный процесс повторяли еще два раза. Сосуд наполняли газообразным водородом до 45 фунтов/кв.дюйм, встряхивали и поддерживали давление при потреблении водорода. Анализ с помощью ЖХ/МС продемонстрировал неполное завершение реакции через 3 ч и ее оставляли встряхиваться при 45 фунт/кв.дюйм в течение 3 дней (выходные дни), после чего было достигнуто удовлетворительное превращение в продукт, время удерживания = 1,32 мин, ЭСИ+ m/z 657 [M+H]⁺. Реакционную смесь дегазировали в вакууме, а затем фильтровали через слой celite®. Фильтрат упаривали в вакууме, полученный остаток повторно растворяли в ДХМ (30 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме, получая неочищенный бис-анилин I4 в виде желтоватой пены (1,1 г, 91% выход), который содержал 8% примесей, но использовался на следующей стадии без дальнейшей очистки.

(d) ((S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(Ацетоксиметил)пирролидин-1-карбонил)-5-((трет-бутоксикарбонил)-амино)-2-метоксифенокси)пропокси)-2-амино-5-метоксибензоил)пирролидин-2-ил)метилацетат (I5).

Woc₂O (330 мг, 1,51 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору бис-анилина I4 (1,1 г, 1,68 ммоль) в сухом ТГФ (10 мл). Реакционную смесь нагревали и перемешивали при 75°C в течение 16 ч. Анализ с помощью ЖХ/МС выявил желаемый моно-Вос-продукт I5 при времени удерживания 1,58 мин, I%=50, ЭСИ+ m/z 779 [M+Na]⁺, 757 [M+H]⁺. Вместе с непрореагировавшим исходным веществом при времени удерживания 1,32 мин, I%=30, и бис-Вос вещество при времени удерживания 1,81 мин, I%=21, ЭСИ+ m/z 879 [M+Na]⁺, 857 [M+H]⁺. Реакционную смесь оставляли остыть до комнатной температуры и ТГФ упаривали в вакууме. Очистка с помощью Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 50 г, 100 мл/мин) дала моно-Вос-продукт I5 в виде оранжевой пены (519 мг, выход 46% в расчете на Woc₂O, элюирование при 97% ДХМ/MeOH) непрореагировавшего бис-анилин I4 (285 мг, элюирование при 95% ДХМ/MeOH) и бис-Вос (248 мг, элюирование при 98% ДХМ/MeOH).

(e) ((S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(Ацетоксиметил)пирролидин-1-карбонил)-5-(((4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-2-метоксифенокси)пропокси)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-5-метоксибензоил)пирролидин-2-ил)метилацетат (I7).

К перемешиваемому раствору моно-Вос продукта I5 (2,69 г, 3,56 ммоль) и ТЕА (1,09 мл, 791 мг, 7,83 ммоль) в сухом ДХМ (30 мл) при комнатной температуре добавляли трифосген (380 мг, 1,28 ммоль). После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ с помощью ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (отбор проб в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 1,66 мин, ЭСИ+ m/z 837 [M+Na]⁺, 815 [M+H]⁺). Смесь обрабатывали дополнительным количеством ТЕА (740 мкл, 539 мг, 5,34 ммоль) с последующим добавлением линкера 16 (1,34 г, 3,56 ммоль). После 2 ч перемешивания в атмосфере аргона ЖХ/МС продемонстрировал удовлетворительную степень превращения в карбамат I7 (время удерживания 1,74 мин, (ЭСИ+) m/z 1182 [M+Na]⁺, 1160 [M+H]⁺). Смесь разбавляли ДХМ (80 мл) и промывали насыщенным раствором NH₄Cl (2×30 мл), H₂O (30 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали упаривали в вакууме с получением неочищенного продукта. Очистка с помощью Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) давала очищенный карбамат I7 /элюирование при 65% гексан/EtOAc) в виде желтой пены (2,95 г, выход 71%).

(f) трет-Бутил(5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пропокси)-2-((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (I8).

Твердый K₂CO₃ (1,75 г, 12,7 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору защищенного ацетатом соединения I7 (2,93 г, 2,53 ммоль) в MeOH (60 мл) и H₂O (12 мл). После перемешивания в течение 1 ч при комнатной температуре реакцию считали завершённой, что определяли с помощью ЖХ/МС с желаемым продуктом при времени удерживания 1,57 мин, ЭСИ+ m/z 1098 [M+Na]⁺, 1076 [M+H]⁺. MeOH

удаляли выпариванием в вакууме и полученный остаток распределяли между водой (75 мл) и ДХМ (75 мл). Слои разделяли и водную фазу экстрагировали ДХМ (3×25 мл). Объединенные органические слои промывали водой (3×50 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (60 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и упаривали в вакууме, получая неочищенный продукт. Очистка с помощью Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) бис-спиртом I8 (элюирование при 97% ДХМ/MeOH) в виде белой пены (2,44 г, выход 90%).

(g) 4-((S)-2-((S)-2-((Аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-(11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(трет-бутоксикарбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пропокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат (I9).

Раствор безводного ДМСО (710 мкл, 780 мг, 9,99 ммоль) в сухом ДХМ (20 мл) добавляли по каплям к перемешиваемому раствору оксалилхлорида (2,72 мл 2,0 М раствора в ДХМ, 5,44 ммоль) в сухом ДХМ (20 мл) при -45°C (сухой лед/CH₃CN) в атмосфере аргона. После 15-минутного перемешивания при -45°C реакционную смесь по каплям обрабатывали раствором бис-спирта I8 (2,44 г, 2,27 ммоль) в сухом ДХМ (30 мл). После перемешивания при -45°C в течение еще 1 ч реакционную смесь по каплям обрабатывали раствором ТЕА (3,16 мл, 2,29 г, 22,7 ммоль) в сухом ДХМ (20 мл). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры в течение 1,5 ч и разбавляли ДХМ (100 мл), затем промывали насыщенным NH₄Cl (2×50 мл), насыщенным NaHCO₃ (50 мл), водой (30 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и упаривали в вакууме, получая неочищенный продукт. Очистка с помощью Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) давала циклизированное соединение I9 (элюирование при 95,7% ДХМ/MeOH) в виде желтоватой пены (1,61 г, выход 66%): ЖХ/МС I9 при времени удерживания 1,46 мин, ЭСИ+ m/z 1072 [M+H]⁺, 1094 [M+Na]⁺.

(h) 4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-(11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(трет-бутоксикарбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пропокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат (I10).

К перемешиваемому раствору пирролидина (29 мкл, 25 мг, 0,35 ммоль) и соединению Аллос I9 (300 мг, 0,28 ммоль) в сухом ДХМ (10 мл) добавляли Pd(PPh₃)₄ (6,47 мг, 5,6 мкмоль). После перемешивания в течение 4 ч в атмосфере аргона при комнатной температуре анализ с помощью ЖХ/МС показал завершение реакции с желаемым продуктом, наблюдаемым при времени удерживания 1,10 мин, ЭСИ+, m/z 1010 [M+Na]⁺, 988 [M+H]⁺. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (30 мл), затем промывали насыщенным NH₄Cl (2×20 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (30 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и упаривали в вакууме, получая неочищенный продукт. Растирание с диэтиловым эфиром с последующим выпариванием в вакууме давало неочищенный амин I10 (261 мг, выход 95%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки или анализа.

(i) трет-Бутил-(11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((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-октаокса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пропокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат (I11).

К перемешиваемому раствору MAL-dPEG®₈-кислоты (172 мг, 0,29 ммоль, Stratech Scientific Limited) и амина I10 (261 мг, 0,26 ммоль) в сухом ДХМ (10 мл) при комнатной температуре добавляли EDCI (56 мг, 0,29 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 2,5 ч, после чего анализ ЖХ/МС показал полное превращение в желаемый продукт при времени удерживания 1,38 мин, ЭСИ+ m/z 1585 [M+Na]⁺, 1563 [M+H]⁺. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (30 мл) и промывали H₂O (20 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (2×20 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и упаривали в вакууме с получением неочищенного продукта. Очистка Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 25 г, 75 мл/мин) давала амид I11 (элюирование при 91% ДХМ/MeOH) в виде белой пены (277 мг, выход 67%).

(j) 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-октаокса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил-(11S,11aS)-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси-5-оксо-2,3,5,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат (I).

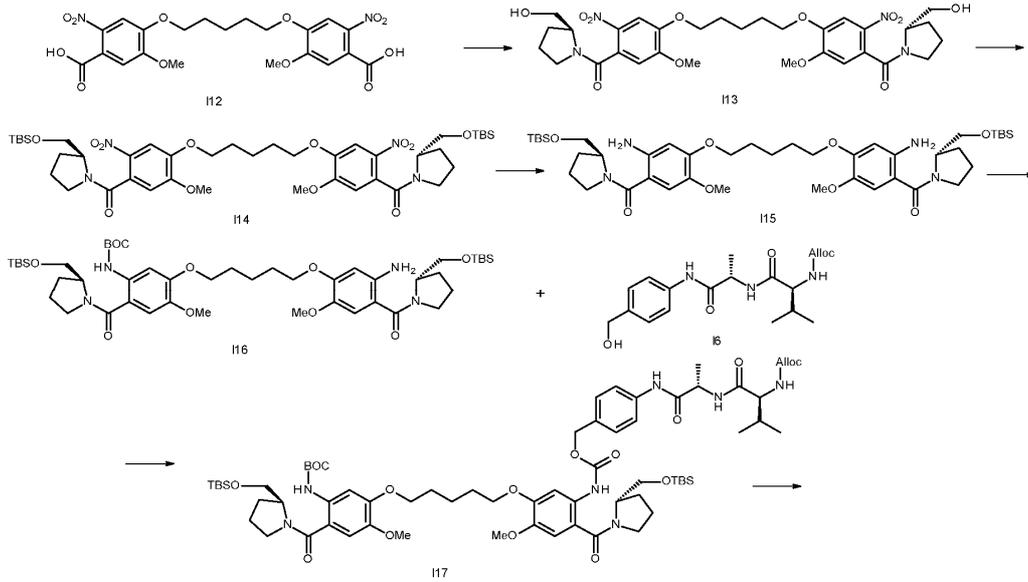
Раствор 95:5 об./об. ТФК/H₂O (2 мл) добавляли к неочищенному образцу Вос-защищенного соединения I11 (262 мг, 0,17 ммоль) при 0°C (лед/ацетон). После перемешивания при 0°C в течение 3 ч реакцию считали завершенной, что определяли по данным ЖХ/МС, пик желаемого продукта при времени удерживания 1,30 мин, ЭСИ+ m/z 1445 [M+H]⁺. Реакционную смесь выдерживали в холодном состоянии и по каплям добавляли к охлажденному насыщенному водному раствору NaHCO₃ (100 мл). Смесь экстрагировали ДХМ (3×30 мл) и объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (30 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и упаривали в вакууме с получением неочи-

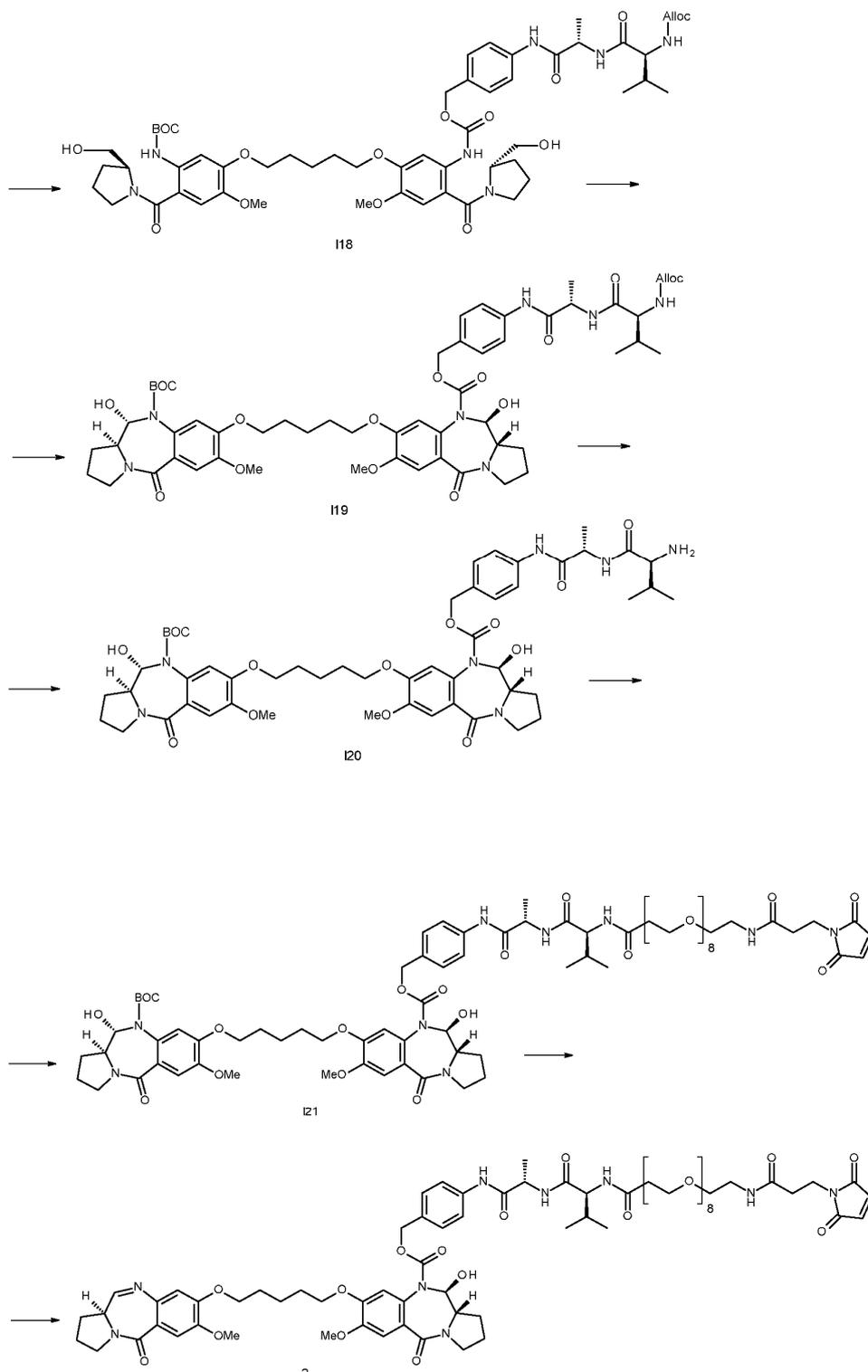
шенного продукта. Очистка Isolera™ (CHCl₃/MeOH, SNAP Ultra 25 г, 25 мл/мин) дала 1 (элюирование при 89,6% CHCl₃/MeOH) в виде желтой пены (170 мг, выход 70%). Дальнейшая очистка препаративной ВЭЖХ (метод А) давала 1 в виде светло-желтой пены (105 мг, выход 43%).

ЖХ/МС (15-минутный прогон), время удерживания 5,25 мин, ЭСИ+ m/z 1445 [M+H]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, d6-DMCO) δ 9,92 (с, 1H), 8,16 (д, 1H, J=6,8 Гц), 7,99 (т, 1H, J=5,7 Гц), 7,86 (д, 1H, J=8,6 Гц), 7,80 (д, 1H, J=4,5 Гц), 7,64-7,50 (м, 2H), 7,34 (с, 1H), 7,24-7,13 (м, 2H), 7,06 (с, 1H), 7,00 (с, 2H), 6,88 (с, 1H), 6,75 (с, 1H), 6,53-6,41 (м, 1H), 5,52-5,41 (м, 1H), 5,13 (д, 1H, J=12,2 Гц), 4,93-4,77 (м, 1H), 4,42-3,34 (м, 1H), 4,30-3,90 (м, 6H), 3,80-3,60 (м, 4H), 3,80 (с, 3H), 3,79 (с, 3H), 3,60 (т, 4H, J=7,3 Гц), 3,53-3,46 (м, 28H), 3,41-3,33 (м, 1H), 3,32-3,29 (м, 2H, перекрыт H₂O), 3,19-3,12 (м, 2H), 2,48-1,60, м, 15H), 1,35-1,20 (м, 3H), 0,87 (д, 3H, J=6,6 Гц), 0,83 (д, 3H, J=6,8 Гц).

Пример 2.





(a) ((Пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-ил)метанон) (113).

ДМФА (5 капля) добавляли к перемешиваемой суспензии бис-нитробензойной кислоты I12 (4,05 г, 8,192 ммоль, 1,0 экв.) и оксалилхлорида (12,3 мл 2 М раствора, 24,57 ммоль, 3,0 экв.) в безводном CH_2Cl_2 (65 мл). После начального вспенивания реакционная суспензия превращалась в раствор, и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь упаривали в вакууме и полученное твердое вещество растирали с Et_2O и сушили в вакуумной печи при 40°C в течение 3 ч. Твердый хлорангидрид по частям добавляли к перемешиваемой суспензии (S)-(+)-2-пирролидинметанола (1,78 мл, 18,02 ммоль, 2,2 экв.) и изо- Pr_2NEt (7,13 мл, 40,96 ммоль, 5,0 экв.) в CH_2Cl_2 (65 мл) при -40°C (сухой лед/ CH_3CN). После перемешивания в течение 1 ч температура реакции достигала 0°C и была завершена, как было определено с помощью ЖХ/МС, с исключительно желаемым продуктом при времени удерживания 1,44 мин, ЭСИ+ m/z 661 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 683 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Смесь разбавляли

CH_2Cl_2 (100 мл) и последовательно промывали H_2O , 1н. NaOH и HCl (50 мл), сушили (MgSO_4), фильтровали и растворитель выпаривали в вакууме, получая чистый продукт I13 в виде желтой пены (4,44 г, выход 82%), который использовали без дальнейшей очистки.

(b) ((Пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-ил)метанон) (I14).

Порциями добавляли имидазол (2,74 г, 40,32 ммоль, 6,0 экв.), затем TBSCI (3,04 г, 20,16 ммоль, 3,0 экв.) к перемешиваемому раствору бис-спирта I13 (4,44 г, 6,720 ммоль, 1,0 экв.) в атмосфере аргона. Через 90 мин реакционную смесь фильтровали и фильтрат промывали H_2O , сушили над MgSO_4 и упаривали в вакууме. Очистка с помощью колоночной флэш-хроматографии (50-80% EtOAc в гексане) давала продукт I14 в виде желтой пены (4,84 г, 5,443 ммоль, выход 81%)

Время удерживания при ЖХ/МС=2,18 мин, ЭСИ+ m/z 889 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 911 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(c) ((Пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-ил)метанон) (I15).

Порошок Zn добавляли к перемешиваемому раствору бис-нитросоединения I14 (1,32 г, 1,84 ммоль) в MeOH (40 мл) при 0°C. 5% HCO_2H в MeOH добавляли по каплям при 0°C и смесь перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали насыщенным раствором NaHCO_3 , органическую фазу сушили над MgSO_4 и упаривали в вакууме. Очистка с помощью колоночной флэш-хроматографии (0-2% MeOH в CHCl_3) давала продукт I15 в виде бледно-желтой пены (3,098 ммоль, 3,736 ммоль, выход 69%).

Время удерживания при ЖХ/МС=2,09 мин, ЭСИ+ m/z 415 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 829 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 851 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(d) трет-Бутил(5-(((5-(5-амино-4-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентилокси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат) (I16).

Wos_2O (734 мг, 3,362 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору бис-анилина I15 (3,098 г, 3,736 ммоль) в сухом ТГФ (20 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч и упаривали в вакууме. Очистка с помощью колоночной флэш-хроматографии (30-50% EtOAc в гексане) давала моно- Wos -продукт I16 в виде желтой пены (1,474 г, выход 47% на основе Wos_2O), непрореагировавшего бис-анилина I15 (1,043 г, 30%-ный выход) и бис- Wos (419 мг, 15% выход, время удерживания ЖХ/МС=2,37 мин).

Время удерживания ЖХ/МС I16=2,25 мин, ЭСИ+ m/z 929 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 951 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(e) трет-Бутил(5-(((5-(5-(((4-(((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((8)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-гидроксифенокси)пентилокси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат) (I17).

Трифосген (169 мг, 0,5710 ммоль, 0,36 экв.) добавляли к перемешиваемому раствору монопродукта Wos I16 (1,474 г, 1,586 ммоль, 1,0 экв.) и Et_3N (486 мкл, 3,489 ммоль, 2,2 экв.) в сухом CH_2Cl_2 (9 мл) при 10°C. После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ методом ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (отбор проб в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,30 мин, ЭСИ+ m/z 1009 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 987 $[\text{M}+\text{H}]^+$). Добавляли раствор I6 (898 мг, 2,379 ммоль, 1,5 экв.) и Et_3N (332 мкл, 2,379 ммоль, 1,5 экв.) в сухом CH_2Cl_2 (14 мл). Реакционную смесь постепенно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. 15-минутный анализ ЖХ/МС показал израсходование исходного вещества. Реакционную смесь фильтровали через слой SiO_2 (5% MeOH в элюировании CH_2Cl_2) для удаления избытка I6. Колоночная флэш-хроматография (20-80% EtOAc в гексане) дает I17 в виде желтой пены (1,439 г, выход 68%). Время удерживания ЖХ/МС=2,26 мин (3 мин прогона) и 10,43 мин (15 мин прогона) ЭСИ+ m/z 1355 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1333 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Наблюдали незначительное количество димера мочевины (время удерживания ЖХ/МС=12,11 мин, ЭСИ+ m/z 1906 $[\text{M}+\text{Na}]^+$), которое удаляли на последующих стадиях очистки.

(f) трет-Бутил(5-(((5-(5-(((4-(((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-2-гидрокси-4-((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-фенокси)пентилокси)-2-((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат) (I18).

Уксусную кислоту (124 мкл, 2,160 ммоль, 2,0 экв.) добавляли к 1 М раствору TBAF (3,2 мл, 3,200 ммоль, 3,0 экв.), а затем добавляли к перемешиваемому раствору I17 в ТГФ (67 мл) при 0°C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. ЖХ/МС показала завершение реакции. Добавляли TBAF (1,00 мл 1 М раствора, 1 ммоль, 1,0 экв.) и реакционную смесь перемешивали в течение еще 24 ч. Реакционную смесь упаривали в вакууме и очищали с помощью Isolera™ (0-5% MeOH в CH_2Cl_2), получая продукт I18 в виде бледно-желтой пены (916 мг, выход 77%).

Время удерживания при ЖХ/МС=1,62 мин, ЭСИ+ m/z 1126 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1104 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(g) 4-((S)-2-((S)-2-(((Аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил (11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(трет-бутоксикарбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11а-гексагидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пентилокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11а-тетрагидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4]diazепин-10(5Н)-карбоксилат) (I19).

IBX (1,14 г, 1,825 ммоль, 2,2 экв.) добавляли к перемешиваемому раствору диола I18 (916 мг,

0,8296 ммоль, 1,0 экв.) в ДМСО. Реакционную смесь нагревали до 35°C и перемешивали в течение 60 ч. Добавляли H₂O и водный слой несколько раз экстрагировали CHCl₃. Органические экстракты объединяли, промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ и сушили над MgSO₄. Очистка Isolera™ (1-8% MeOH в CH₂Cl₂) дала I19 в виде оранжевой пены (908 мг, выход 99%).

Время удерживания ЖХ/МС=1,50 мин, ЭСИ+ m/z 1122 [M+Na]⁺, 1100 [M+H]⁺.

(h) 4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил (11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(трет-бутоксикарбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пентилокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (I20).

Pd(PPh₃)₄ (15,8 мг, 13,64 мкмоль, 0,050 экв.) добавляли к перемешиваемому раствору пирролидина (56 мкл, 0,6818 ммоль, 2,5 экв.) и I19 (300 мг, 0,2727 ммоль) в CH₂Cl₂ (10 мл) под аргоном. Через 30 мин добавляли насыщенный водный раствор NH₄Cl, смесь энергично перемешивали и переносили в фазовый разделитель Isolute®. Собранную органическую фазу упаривали в вакууме, получая оранжевую пену I20, которую использовали без дальнейшей очистки.

(i) трет-Бутил(11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((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-октакса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пентилокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (I21).

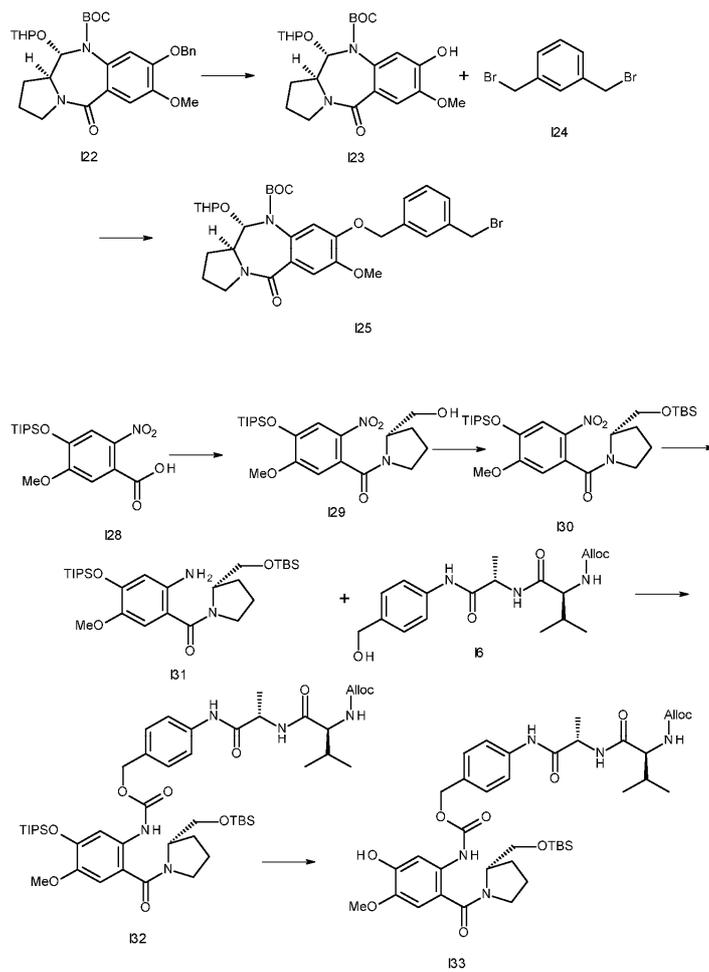
К перемешиваемому раствору MAL-dPEG₈-кислоты (360 мг, 0,6079 ммоль, Stratech Scientific Limited) и амина I20 (608 мг, 0,5526 ммоль) в CH₂Cl₂ (15 мл) при комнатной температуре добавляли EDCI.HCl (117 мг, 0,29 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 24 ч, после чего анализ методом ЖХ/МС показал полное израсходование I20. Реакционную смесь разбавляли CH₂Cl₂ и последовательно промывали насыщенным водным раствором NH₄Cl насыщенным водным раствором NaHCO₃, сушили над MgSO₄ и упаривали в вакууме, получая неочищенный продукт. Очистка Isolera™ (4-16% MeOH в CH₂Cl₂) дала амид I21 в виде белого твердого вещества (77 мг, чистота 79% (УФ-интеграция при 223 нм), выход 8,8% неочищенного продукта; 107 мг, чистота 88%, 12% выход неочищенного продукта; 224 мг, чистота 86%, выход неочищенного продукта 25%).

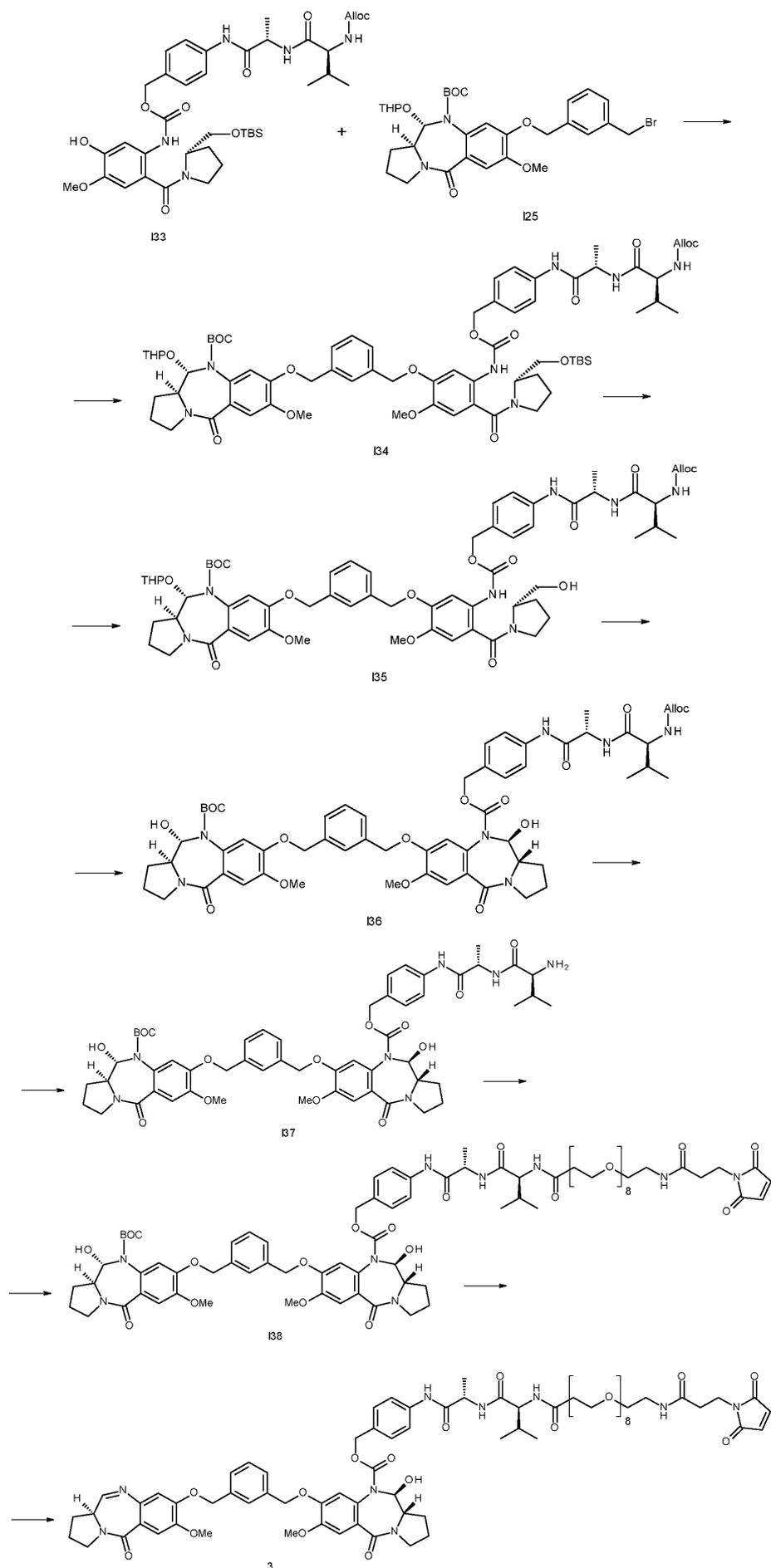
(j) 4-((2S,5S)-37-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октакса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил(11S,11aS)-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси-5-оксо-2,3,5,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодiazепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодiazепин-10(5H)-карбоксилат (2).

Охлажденный льдом раствор 95:5 об/об ТФК/H₂O (3 мл) добавляли к неочищенному образцу Вос-защищенного соединения I21 (107 мг, 67,51 мкмоль) при 0°C (лед/насыщенный водный раствор хлорида натрия). После перемешивания при 0°C в течение 30 ч реакцию считали завершенной, что определяли по данным ЖХ/МС, пик желаемого продукта при времени удерживания 1,38 мин, ЭСИ+ m/z 737 [M+2H]²⁺, 748 [M+H+Na]²⁺, 1472 [M+H]⁺. Реакционную смесь выдерживали в холодном состоянии и по каплям добавляли к охлажденному насыщенному водному раствору NaHCO₃. Смесь экстрагировали CH₂Cl₂, затем 10% MeOH в CH₂Cl₂, объединенные органические слои сушили над MgSO₄ и упаривали в вакууме с получением неочищенного продукта. Данный процесс повторяли для других партий I21, неочищенные продукты объединяли и очищали препаративной ВЭЖХ (метод В), получая соединение 2 в виде белого твердого вещества после лиофилизации (126 мг, выход 33%, чистота 96% по УФ при 223 нм).

ЖХ/МС (30 мин прогона), время удерживания = 10,96 мин, ЭСИ+ m/z 1472 [M+H]⁺.

Пример 3.





(a) I23.

Данная стадия может быть выполнена согласно указаниям в литературе (см., например, WO 2005085259A2; или Wells, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 18 (2008), 2147-2151). Способ включает гидрирование в аппарате Парра при комнатной температуре с 10% Pd/C в EtOH. Выход является количественным. Этанол удаляли с помощью повторного выпаривания (EtOH, а затем ДХМ).

(b) трет-Бутил(11S,11aS)-8-((3-(бромметил)бензил)окси)-7-метокси-5-оксо-11-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (I25).

Смесь фенола I23 (4 г, 8,91 ммоль, 1 экв.), 1,3-бис-(бромметил)бензола I24 (9,42 г, 35,7 ммоль, 4 экв.), карбоната калия (1,23 г, 8,91 ммоль, 1 экв.) и ацетона (40 мл) нагревали при 60°C в течение 5 ч. После завершения реакции, что подтвердили с помощью ЖХ/МС, твердые вещества удаляли фильтрованием и фильтрат упаривали досуха в вакууме. Остаток очищали хроматографией (Biotage Isolera, 100 г Ultra, градиент EtOAc/гексан от 30/70 до 80/20 в 12CV). Выход 4,25 г (75%). ЖХ/МС, 3 мин метод, 1,82 мин (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 631,15 ([M+H]⁺, 100), раздвоенный пик: ТНР диастереоизомеры.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7,67-7,27 (м, 4H), 7,20-6,57 (м, 2H), 5,72-5,57 (м, 1H), 5,24-4,84 (м, 3H), 4,72 (с, 2H), 3,91-3,73 (м, 4H), 3,61-3,33 (м, 4H), 2,20-1,75 (м, 4H), 1,74-1,57 (м, 2H), 1,55-1,01 (м, 13H).

I28 известен в литературе (см. WO 2013053872A1, соединение 2, с. 60).

(c) (S)-(2-(Гидроксиметил)пирролидин-1-ил)(5-метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)-фенил)метанон (I29).

EDCI (12,4 г, 65 ммоль, 1,2 экв.) добавляли к раствору кислоты I28 (20 г, 54,1 ммоль, 1 экв.) и гидрату гидроксibenзотриазола (8,05 г, 59,5 ммоль, 1,1 экв.) в дихлорметане (200 мл) при 0°C. Холодную баню убрали и реакцию оставляли в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего быстро добавляли раствор (S)-пирролидин-2-илметанола (5,87 мл, 59,5 ммоль, 1,1 экв.) и триэтиламина (11,32 мл, 81,1 ммоль, 1,5 экв.) в дихлорметане (100 мл) при -10°C в атмосфере аргона. 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 фильтрованием через целит и органическую фазу промывали холодной водной 0,1 M HCl до тех пор, пока pH не достиг значения при 4 или 5. Органическую фазу затем промывали водой, затем насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали, и избыток растворителя удаляли на ротаторном испарителе при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (Isolera Biotage, 340 г Ultra; градиент от 25/75 этилацетат/гексан до 100/0 этилацетат/гексан в 6 CV). Избыток растворителя удаляли на ротаторном испарителе при пониженном давлении, что давало чистый продукт I29 в виде бледно-желтой пены (15,7 г, 64%).

ЖХ/МС 1,92 мин (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 453,15 ([M+H]⁺, 30%; 328,15, 100%);

¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,70 (с, 1H), 6,77 (с, 1H), 4,57-4,24 (м, 2H), 4,01-3,69 (м, 5H), 3,25-3,06 (м, 2H), 2,18 (дт, J=7,5, 5,6 Гц, 1H), 1,96-1,62 (м, 3H), 1,42-1,18 (м, 3H), 1,10 (д, J=7,4 Гц, 18H).

(d) (S)-(2-((трет-Бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-ил)(5-метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)фенил)метанон (I30).

трет-Бутилдиметилсилилхлорид (10,39 г, 68,9 ммоль, 2 экв.) добавляли к раствору спирта I29 (15,6 г, 34,5 ммоль, 1 экв.) и имидазола (5,87 г, 86,2 ммоль, 2,5 экв.) в ДХМ (100 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь последовательно промывали водой (300 мл), 0,5 M лимонной кислотой (200 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл) и сушили (MgSO₄). Фильтрование и удаление избытка растворителя давали неочищенный продукт, который подвергали колоночной флэш-хроматографии (Biotage Isolera, KP-Sil 340 г; 10/90 об./об. этилацетат/гексан до 30/70 об./об. этилацетат/гексан) с выделением силилового простого эфира I30 в виде густого желтого масла. Выход: 18,9 г, 97%.

ЖХ/МС 2,32 мин (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 567,55 ([M+H]⁺, 100%)

(e) (S)-(2-Амино-5-метокси-4-((триизопропилсилил)окси)фенил)(2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-ил)метанон (I31).

Раствор нитросоединения I30 (18,9 г, 33,3 ммоль, 1 экв.) в этилацетате (200 мл) в 10% Pd/C (10% мас./мас. 1,89 г) гидрировали под давлением (45 фунт/кв.дюйм) на аппарате Парра в течение 6 ч. Реакционную смесь фильтровали через целит для удаления Pd/C и слой на фильтре промывали этилацетатом. Избыток растворителя удаляли на ротаторном испарителе при пониженном давлении с последующей сушкой в высоком вакууме с получением амина I31 в виде густого масла.

ЖХ/МС, 3 мин способ, 2,28 мин (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 537,30 ([M+H]⁺, 100);

¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 6,73 (с, 1H), 6,24 (с, 1H), 4,54-4,13 (м, 3H), 4,07-3,80 (м, 1H), 3,79-3,61 (м, 4H), 3,50 (дд, J=9,2, 4,2 Гц, 2H), 2,10-1,97 (м, 2H), 1,92 (дт, J=11,7, 6,2 Гц, 1H), 1,80-1,65 (м, 1H), 1,24 (ддт, J=13,7, 9,9, 6,4 Гц, 3H), 1,09 (д, J=7,3 Гц, 18H), 0,90 (с, 9H), 0,04 (д, J=2,8 Гц, 6H).

(f) Аллил ((S)-1-(((S)-1-((4-(((2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-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 (I32).

Триэтиламин (10,1 мл, 72,4 ммоль, 2,2 экв.) добавляли к перемешиваемому раствору амина I31 (17,68 г, 32,9 ммоль, 1 экв.) и трифосгена (3,51 г, 11,8 ммоль, 0,36 экв.) в сухом тетрагидрофуране (180 мл) при 5°C (ледяная баня). Реакцию получения изоцианата контролировали путем периодического изъятия аликвот из реакционной смеси и добавления метанола, и проведения анализа ЖХ/МС. После завершения образования изоцианата, к свежеприготовленному изоцианату быстро добавляли суспензию аллос-Val-Ala-РАВОН I6 (18,6 г, 49,4 ммоль, 1,5 экв.) и триэтиламина (6,88 мл, 49,4 ммоль, 1,5 экв.) в сухом тетрагидрофуране (70 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 40°C в течение 4 ч. Твердые вещества отфильтровывали. Избыток растворителя удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении. Полученный остаток сушили на силикагеле и подвергали ручной колоночной флэш-хроматографии; 40/60 об./об. этилацетат/гексан до 70/30 об./об. этилацетат/гексан. Чистые фракции собирали и объединяли, а избыток элюента удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении с получением продукта I32 8,17 г (26,4%).

ЖХ/МС, 3 мин способ, 2,29 мин (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 962,45 ([M+Na]⁺, 100; 940,40 ([M+H]⁺, 30);

¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,95 (с, 1H), 8,53 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,53 (д, J=8,1 Гц, 2H), 7,32 (д, J=8,3 Гц, 2H), 6,80 (с, 1H), 6,71 (д, J=7,5 Гц, 1H), 5,89 (тт, J=10,8, 5,3 Гц, 1H), 5,44-5,15 (м, 3H), 5,10 (с, 2H), 4,66 (п, J=7,2 Гц, 1H), 4,62-4,53 (м, 2H), 4,32 (с, 1H), 4,08-3,86 (м, 2H), 3,74 (с, 4H), 3,52 (дд, J=27,4, 7,6 Гц, 2H), 2,15 (г, J=6,8 Гц, 1H), 2,09-1,85 (м, 3H), 1,71 (с, 1H), 1,46 (д, J=7,0 Гц, 3H), 1,29 (д.кв., J=15,0, 7,4 Гц, 3H), 1,11 (д, J=7,4 Гц, 18H), 0,95 (дд, J=14,1, 6,8 Гц, 6H), 0,89 (с, 9H), 0,02 (д, J=13,1 Гц, 6H).

(g) Аллил ((S)-1-(((S)-1-((4-(((2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-5-гидрокси-4-метоксифенил)карбамоил)окси)метил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат (I33).

Ацетат лития (50 мг, 0,49 ммоль) добавляли к раствору соединения I32 (7 г, 7,44 ммоль, 1 экв.) во влажном диметилформамиде (61,2 мл, 50:1 ДМФА/вода). Через 4 ч реакция была завершена. Избыток ДМФА удаляли в вакууме, остаток разбавляли этилацетатом (300 мл) и промывали 0,5 М водной лимонной кислотой (100 мл), водой (300 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл). Органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток этилацетата удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (Biotage Isolera 100 г Ultra; градиент, от 40/60 до 80/20 об./об. этилацетат/гексан в 8 CV). Чистые фракции собирали и объединяли, а избыток элюента удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении с получением продукта I33 (5,13 г, 88%).

ЖХ/МС, 3 мин способ, 1,82 мин (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 784,40 ([M+H]⁺, 100);

¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 9,06 (с, 1H), 8,62 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,45 (д, J=8,2 Гц, 2H), 7,35-7,18 (м, 2H), 6,92 (д, J=7,5 Гц, 1H), 6,80 (с, 1H), 6,50 (с, 1H), 5,89 (ддд, J=16,2, 10,7, 5,4 Гц, 1H), 5,44 (д, J=8,1 Гц, 1H), 5,37-5,15 (м, 2H), 5,14-5,01 (м, 2H), 4,67 (п, J=7,1 Гц, 1H), 4,63-4,50 (м, 2H), 4,33 (с, 1H), 4,13-3,89 (м, 2H), 3,81 (с, 3H), 3,74-3,33 (м, 3H), 2,24-1,84 (м, 4H), 1,69 (д, J=21,2 Гц, 1H), 1,43 (д, J=7,0 Гц, 3H), 1,07-0,71 (м, 15H), 0,23-0,20 (м, 6H).

(h) трет-Бутил(11S,11aS)-8-((3-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифенокси)метил)бензил)окси)-7-метокси-5-оксо-1-1-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-10(5H)-карбоксилат (I34).

Карбонат калия (582 мг, 4,21 ммоль, 1,1 экв.) добавляли к раствору I25 (2,66 г, 4,21 ммоль, 1,1 экв.) и фенола I33 (3 г, 3,82 ммоль, 1 экв.) в ацетоне (18 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при 63°C. Твердые вещества удаляли фильтрованием через вату. Ацетон удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении.

Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (Biotage isolera, 100 г Ultra, силикагель; градиент, от 50/50 до 100/0 об./об. этилацетат/гексан в 8 CV, элюирование от 83%). Очищенные фракции собирали и объединяли, а избыток элюента удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении с получением продукта I34 (4,71 г, 92%).

ЖХ/МС, 3 мин способ, 2,08 мин (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 1335,15 ([M+H]⁺, 50);

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,98 (с, 1H), 9,20 (с, 1H), 8,13 (д, J=7,0 Гц, 1H), 7,68-7,50 (м, 3H), 7,50-7,37 (м, 3H), 7,32 (д, J=8,2 Гц, 2H), 7,28-7,01 (м, 2H), 6,86 (с, 2H), 5,90 (ддд, J=16,0, 10,7, 5,2 Гц, 1H), 5,64 (т, J=9,8 Гц, 1H), 5,30 (д, J=17,2 Гц, 1H), 5,23-4,84 (м, 8H), 4,57-4,36 (м, 3H), 4,11 (с, 1H), 3,95-3,59 (м, 9H), 3,56-3,34 (м, 4H), 1,94 (д, J=34,0 Гц, 10H), 1,74-1,06 (м, 21H), 1,01-0,59 (м, 15H), 0,03 (с, 6H).

(i) трет-Бутил(11S,11aS)-8-((3-(((5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифенокси)метил)бензил)окси)-7-метокси-5-оксо-1-1-((тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-2,3,11,11a-

тетрагидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4] diazepин-10(5Н)-карбоксилат (I35).

Фторид тетра-н-бутиламония (1 М, 6,94 мл, 6,94 ммоль, 2 экв.) добавляли к раствору I34 (4,63 г, 3,47 ммоль, 1 экв.) в тетрагидрофуране (28 мл). Исходное вещество полностью было израсходовано через 1 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (30 мл) и последовательно промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали, и избыток этилацетата удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (Biotage isolera, 50 г Ultra; градиент, от 98/2 до 90/10 об./об. этилацетат/метанол в 4 CV, элюирование из 10% метанола). Очищенные фракции собирали и объединяли, а избыток элюента удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении с получением продукта I35 (4,23 г, количественный).

ЖХ/МС, 3 мин способ, 1,75 мин (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 1220,30 ([M+H]⁺, 100);

¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,98 (с, 1Н), 9,17 (с, 1Н), 8,13 (д, J=7,0 Гц, 1Н), 7,70-7,49 (м, 3Н), 7,51-7,27 (м, 6Н), 7,21 (д, J=8,8 Гц, 1Н), 7,15-6,58 (м, 3Н), 5,90 (дт, J=10,9, 5,5 Гц, 1Н), 5,66 (д, J=9,3 Гц, 1Н), 5,38-4,82 (м, 9Н), 4,73 (т, J=5,8 Гц, 1Н), 4,59-4,34 (м, 3Н), 4,05 (дд, J=15,4, 8,3 Гц, 1Н), 3,96-3,68 (м, 8Н), 3,66-3,32 (м, 6Н), 2,16-1,72 (м, 8Н), 1,63 (д, J=9,8 Гц, 3Н), 1,54-1,02 (м, 18Н), 0,86 (дд, J=18,2, 6,7 Гц, 6Н).

(j) 4-((S)-2-((S)-2-((Аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил (11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(трет-бутоксикарбонил)-7-метокси-5-оксо-11-((тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-2,3,5,10,11,11а-гексагидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4] diazepин-8-ил)окси)метил)бензил)-окси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11а-тетрагидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4] diazepин-10(5Н)-карбоксилат (I36).

Стабилизированный IBX 45% (2,72 г, 4,36 ммоль, 1,2 экв.) добавляли к раствору I35 (4,44 г, 3,64 ммоль, 1 экв.) в ДМСО (2,6 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение ночи. Добавляли еще 0,2 экв. IBX (450 мг, 0,73 ммоль, 0,2 экв.) и раствор оставляли перемешиваться в течение дополнительных 18 ч до тех пор, пока ЖХ/МС не наблюдали завершение реакции. Раствор осаждали в воде (250 мл) и фильтровали. Продукт растворяли в ДХМ и остаточное белое твердое вещество удаляли с помощью фильтрования. Органическую фазу промывали водным раствором NaHCO₃, водой, насыщенным водным раствором хлорида натрия и сушили над сульфатом магния. Дихлорметан удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (Biotage Isolera 100 g Ultra; градиент, от 99/1 до 92/8 об./об. этилацетат/гексан в 10 CV). Очищенные фракции собирали и объединяли, а избыток элюента удаляли на роторном испарителе при пониженном давлении с получением продукта I36 (3,04 г, 69%).

ЖХ/МС, 15 мин, метод Ace Excel 2, 7,89 и 7,97 мин (ТПП диастереоизомеры) (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 1218,30 ([M]⁺, 100);

¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,93 (с, 1Н), 8,11 (д, J=6,9 Гц, 1Н), 7,68-7,27 (м, 6Н), 7,27-7,01 (м, 4Н), 7,01-6,32 (м, 3Н), 6,02-5,81 (м, 1Н), 5,71-5,57 (м, 1Н), 5,57-5,40 (м, 1Н), 5,29 (д, J=17,2 Гц, 1Н), 5,21-4,78 (м, 8Н), 4,58-4,32 (м, 3Н), 3,99-3,68 (м, 8Н), 3,58-3,31 (м, 8Н), 2,23-1,72 (м, 9Н), 1,72-1,04 (м, 18Н), 0,85 (дд, J=18,0, 6,7 Гц, 6Н).

(k) 4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил (11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(трет-бутоксикарбонил)-7-метокси-5-оксо-11-((тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-2,3,5,10,11,11а-гексагидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4] diazepин-8-ил)окси)метил)бензил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11а-тетрагидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4] diazepин-10(5Н)-карбоксилат (I37).

тетракис-(Трифенилфосфин)палладий(0) (11 мг, 0,01 ммоль, 0,02 экв.) добавляли к раствору I36 (600 мг, 0,49 ммоль, 1 экв.) и пирролидину (51 мкл, 0,62 ммоль, 1,25 экв.) в сухом дихлорметане (10 мл). Реакционную смесь трижды продували аргоном и перемешивали 20 мин при комнатной температуре. Затем реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (50 мл) и последовательно промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония (50 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (30 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и избыток дихлорметана удаляли с помощью роторного испарителя при пониженном давлении. Полученный остаток I37 использовали в качестве неочищенной смеси для следующей реакции.

ЖХ/МС, 3 мин метод, 1,29 мин (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 1134,35 ([M+H]⁺, 80).

(l) трет-Бутил (11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(((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-октаокса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11а-гексагидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4] diazepин-8-ил)окси)метил)бензил)окси)-7-метокси-5-оксо-11-((тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-2,3,11,11а-тетрагидро-1Н-бензо[е]пирроло[1,2-а][1,4] diazepин-10(5Н)-карбоксилат (I38).

1-Этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимид (94 мг, 0,79 ммоль, 1 экв.) добавляли к раствору неочищенного I37 (558 мг, 0,49 ммоль, 1 экв.) и MaI-(PEG)₈-кислоты (292 мг, 0,49 ммоль, 1 экв.) в хлороформе (12 мл). Реакционную смесь трижды дегазировали аргоном и перемешивали в течение 2 ч, после чего присутствие исходного материала больше не наблюдалось с помощью ЖХ/МС. Реакционную смесь

разбавляли дихлорметаном и последовательно промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали, и избыток дихлорметана удаляли с помощью роторного испарителя при пониженном давлении. Полученный остаток подвергли колоночной флэш-хроматографии (Biotage Isolera 50g Ultra; от 98/2 до 90/10 об./об. ДХМ/метанол 10 CV). Чистые фракции собирали и объединяли, и избыток элюента удаляли с помощью роторного испарителя при пониженном давлении, что давало продукт I38 (485 г, 58%).

ЖХ/МС, метод 3 мин, 1,58 мин (ЭСИ+) m/z (относительная интенсивность) 1709,30 ($[M+H]^+$, 100);

1H МР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 9,88 (с, 1H), 8,13 (д, $J=7,0$ Гц, 1H), 8,06-7,92 (м, 1H), 7,85 (д, $J=8,6$ Гц, 1H) 7,68-7,04 (м, 9H), 6,99 (с, 2H), 6,89 (д, $J=15,0$ Гц, 2H), 6,52 (с, 1H), 5,66 (д, $J=9,4$ Гц, 1H), 5,47 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 5,26-4,75 (м, 6H), 4,49-4,31 (м, 1H), 4,20 (т, $J=7,6$ Гц, 1H), 3,80 (д, $J=11,9$ Гц, 6H), 3,59 (т, $J=7,2$ Гц, 4H), 3,55-3,41 (м, 32H), 3,41-3,30 (м, 11H), 3,21-3,09 (м, 3H), 2,48-2,28 (м, 4H), 2,18-1,08 (м, 24H), 0,84 (дд, $J=15,0, 6,7$ Гц, 5H).

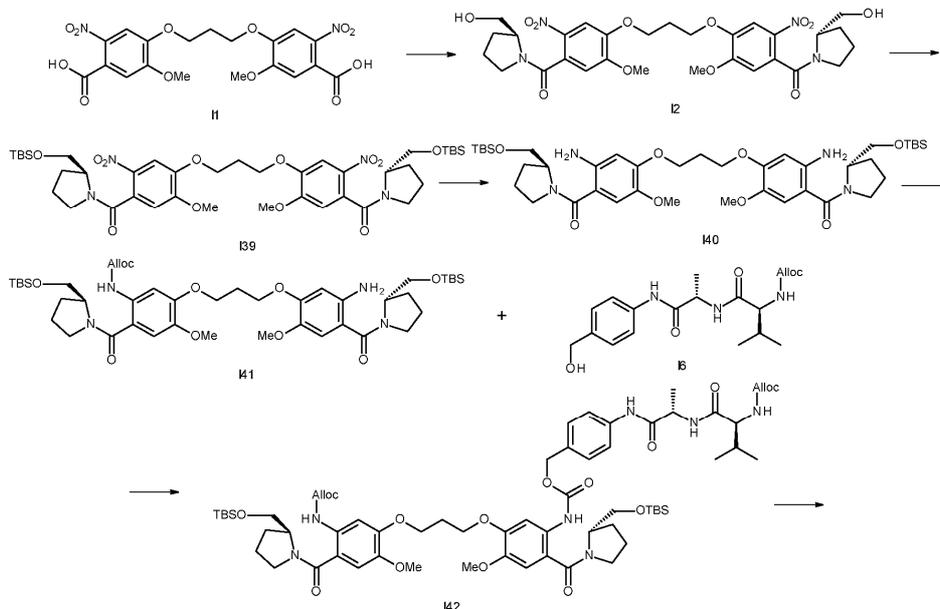
(m) 4-((2S,5S)-37-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октакса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил(11S,11aS)-11-гидрокси-7-метокси-8-(((S)-7-метокси-5-оксо-2,3,5,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-8-ил)окси)метил)бензил(окси)-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]диазепин-10(5H)-карбоксилат (3).

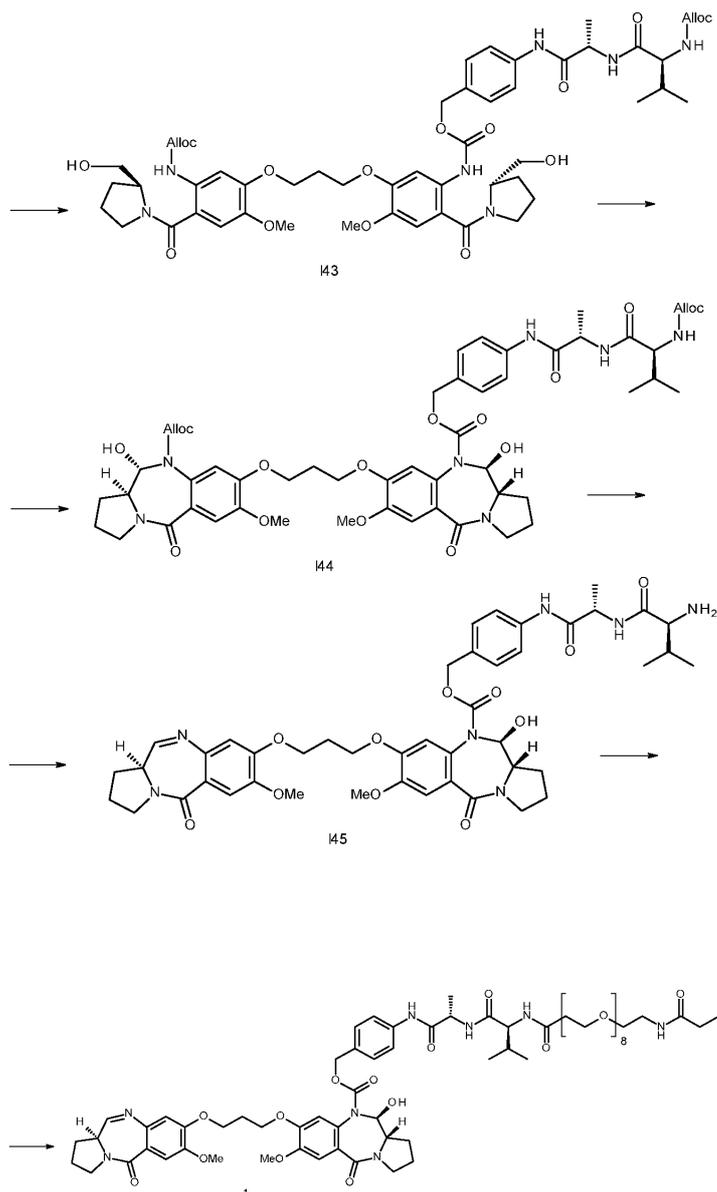
Холодную смесь ТФК/вода (6 мл) добавляли к I38 (460 мг, 0,27 ммоль, 1 экв.) и полученный раствор перемешивали при 0°C в течение 2 ч. Реакционную смесь нейтрализовали насыщенным водным $NaHCO_3$ (200 мл) и дихлорметаном (50 мл). Слой ДХМ промывали последовательно водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали, и избыток дихлорметана удаляли с помощью роторного испарителя при пониженном давлении. Полученный остаток подвергли колоночной флэш-хроматографии (Biotage Isolera 50g Ultra; от 98/2 до 88/12 об./об. ДХМ/метанол 10 CV). Чистые фракции собирали, объединяли (154 мг, 38%) и дополнительно очищали препаративной обратнофазовой ВЭЖХ (метод С) (градиент до 75/25 ацетонитрил/вода, 0,02% муравьиной кислоты) с получением чистого соединения 3 (78 мг, 19%).

ЖХ/МС, метод 15 мин, Асе-Excel2, 6,18 мин (ЭСИ+), m/z (относительная интенсивность) 1506,70 ($[M+H]^+$, 100);

1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 10,07-9,79 (м, 1H), 8,14 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 7,98 (т, $J=5,6$ Гц, 1H), 7,85 (д, $J=8,6$ Гц, 1H), 7,78 (д, $J=4,4$ Гц, 1H), 7,67-7,30 (м, 7H), 7,28-7,05 (м, 3H), 6,99 (с, 2H), 6,98-6,85 (м, 2H), 6,58-6,47 (м, 1H), 5,59-5,34 (м, 1H), 5,32-4,77 (м, 6H), 4,48-4,30 (м, 1H), 4,28-4,08 (м, 1H), 3,88-3,75 (м, 5H), 3,75-3,55 (м, 6H), 3,55-3,42 (м, 28H), 3,42-3,32 (м, 6H), 3,14 (кв, $J=5,8$ Гц, 2H), 2,48-2,16 (м, 6H), 2,08-1,77 (м, 6H), 1,36-1,17 (м, 4H), 0,84 (дд, $J=15,4, 6,7$ Гц, 6H).

Пример 4.





(а) ((Пропан-1,3-диил-бис-(окси)-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-ил) метан он) (I2).

ДМФА (12 капле) добавляли к перемешиваемой суспензии П1 (10 г, 21,5 ммоль) и оксалилхлорида (5,6 мл, 8,2 г, 64,5 ммоль) в безводном ДХМ (150 мл). После начального образования пузырьков реакционная суспензия превратилась в раствор и реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 16 ч. Основную часть растворителей удаляли с помощью роторного испарителя при пониженном давлении. Полученный концентрированный раствор повторно растворяли в минимальном количестве безводного ДХМ и растирали с диэтиловым эфиром. Желтый осадок собирали с помощью вакуумного фильтрования, промывали холодным диэтиловым эфиром и сушили в течение 1 ч в вакуумной печи при 40°C. Хлорангидрид порциями добавляли к перемешиваемой суспензии (S)-(+)-2-пирролидинметанола (5,0 г, 4,9 мл, 49,5 ммоль) и ТЭА (15,0 мл, 10,9 г, 108 ммоль) в безводном ДХМ (100 мл) при -40°C (сухой лед/CH₃CN). Полученный раствор перемешивали в течение дополнительных 60 мин, разбавляли ДХМ (100 мл) и промывали 1 н. HCl (2×50 мл), насыщенным NaHCO₃ (3×40 мл), водным насыщенным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили (MgSO₄) и растворитель удаляли в вакууме, получая чистый продукт I2 в виде желтого твердого вещества (13,6 г, выход 100%).

ЖХ/МС (метод А): время удерживания 1,33 мин (ЭСИ+), m/z 655 [M+Na]⁺, 633 [M+H]⁺ (см. Приложение).

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) 1,68-1,80 (м, 2H), 1,80-2,00 (м, 6H), 2,27 (д, 2H), 3,05-3,25 (м, 4H), 3,37-3,48 (м, 2H), 3,56-3,76 (м, 2H), 3,92 (с, 6H), 4,09 (дд, 2H), 4,25-4,31 (м, 4H), 4,82 (т, 2H), 7,08 (с, 2H), 7,73 (с, 2H).

(б) ((Пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-ил)метанон) (I39).

TBS-Cl (8,12 г, 53,90 ммоль) добавляли к раствору I2 (15,5 г, 24,50 ммоль) и имидазола (4,17 г, 61,25 ммоль) в ДХМ (300 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч. Добавляли воду (200 мл), удаляли органический слой и водную фазу экстрагировали ДХМ (2×300 мл). Объединенные органические фазы сушили (Na₂SO₄) и упаривали в вакууме, получая темный остаток, который очищали колоночной хроматографией (от 0 до 2% метанола/ДХМ). Чистые фракции упаривали в вакууме, получая I39 в виде коричневого твердого вещества (17,0 г, выход 81%).

ЖХ/МС (метод А): время удерживания 1,83 мин (ЭСИ+), m/z 861 [M+H]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) 0,09 (с, 12H), 0,91 (с, 18H), 1,70-1,81 (м, 2H), 1,87-1,99 (м, 6H), 2,22-2,30 (м, 2H) 3,10 (т, 4H), 3,40-3,51 (м, 2H), 3,59-3,67 (м, 2H), 3,88-3,95 (м, 2H), 3,91 (с, 6H), 4,28 (т, 6H), 6,96 (с, 2H), 7,72 (с, 2H).

(с) ((Пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))бис (((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-ил)метанон) (I40).

Цинк (25,8 г, 394,8 ммоль) и насыщенный раствор NH₄Cl (150 мл) добавляли к раствору I39 (17 г, 19,74 ммоль) в EtOH (300 мл) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при 50°C в течение 3 ч, охлаждали и фильтровали через слой целита, который затем промывали EtOAc (300 мл) и водой (300 мл). Органический слой отделяли, а водную фазу экстрагировали EtOAc (3×400 мл). Объединенные органические фазы сушили (MgSO₄) и упаривали в вакууме, получая желтый остаток, который очищали с помощью колоночной хроматографии (от 0 до 5% метанола/ДХМ). Чистые фракции упаривали досуха с получением I40 в виде желтого твердого вещества (13,00 г, выход 82%).

ЖХ/МС (метод А): время удерживания 2,30 мин (ЭСИ+) m/z 802,2 [M+H]⁺ ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) 0,06 (с, 12H), 0,85 (с, 18H), 1,52-1,78 (м, 2H), 1,81-2,00 (м, 6H), 2,14-2,22 (м, 2H), 3,41 (д, 4H), 3,61-3,75 (м, 4H), 3,63 (с, 6H), 4,01-4,16 (м, 6H), 4,98-5,22 (м, 4H), 6,40 (с, 2H), 6,66 (с, 2H).

(d) Аллил-5-(3-(5-амино-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пропокси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (I41).

Аллилхлорформиат (784 мкл, 0,9 г, 7,36 ммоль) по каплям добавляли к раствору I40 (5,9 г, 7,36 ммоль) и пиридина (715 мкл, 0,7 г, 8,84 ммоль) в ДХМ (100 мл) при 0°C. Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали еще 2 мин. Реакционную смесь промывали 0,5 М HCl (50 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (50 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл). Растворитель удаляли при пониженном давлении и полученное масло очищали с помощью колоночной хроматографии; (первоначальное элюирование смесью 50% этилацетат/гептан удаляло бис-allos защищенный амин, после чего следовало элюирование этилацетатом для удаления желаемого моно-allos защищенного продукта (I41)). Наконец, любой непрореагировавший исходный материал удаляли с помощью 5% метанола/ДХМ). Чистые фракции упаривали при пониженном давлении, с получением I41 в виде желтого твердого вещества (3,5 г, 54% выход).

ЖХ/МС (метод В): время удерживания 2,41 мин (ЭСИ+), m/z 886,5 [M+H]⁺

(е) Аллил (5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пропокси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (I42).

Трифосген (0,41 г, 1,4 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору I41 (3,5 г, 3,95 ммоль) в безводном ТГФ (70 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона. Добавляли триэтиламин (1,2 мл, 0,87 г, 8,6 ммоль) и полученную смесь перемешивали в течение 10 мин. Анализ с помощью ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (отбор проб в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,48 мин, (ЭСИ+) m/z 944,4 [M+H]⁺). Добавляли смесь I6 (1,64 г, 4,35 ммоль) и триэтиламина (0,83 мл, 0,6 г, 5,9 ммоль) в безводном ТГФ (30 мл). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при 40°C в течение 2 ч. Растворитель удаляли в вакууме и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (0,5-2,5% метанол/ДХМ) с получением I42 в виде белого твердого вещества (3,58 г, выход 70%).

ЖХ/МС (метод В): время удерживания 2,45 мин, (ЭСИ+) m/z 1290,0 [M+H]⁺.

(f) Аллил (5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-((S)-2-(((гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пропокси)-2-((S)-2-((S)-2-(((гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (I43).

Фторид тетра-н-бутиламмония (1 М, 6,1 мл, 6,1 ммоль) добавляли к раствору I42 (3,58 г, 2,78 ммоль) в тетрагидрофуране (35 мл) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали в течение 60 мин, затем выпаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (от 2 до 5% метанола/ДХМ) с получением I43 в виде белой пены (2,95 г, выход 98%).

ЖХ/МС (метод В): время удерживания 1,70 мин, (ЭСИ+) m/z 1061,3 [M+H]⁺.

(g) Аллил (11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пропокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (I44).

Раствор Stahl для аэробного окисления TEMPO 0,2 М в MeCN (5,47 мл, 1,1 ммоль), а затем тетра-кис-ацетонитрил трифлат меди(I) (0,41 г, 1,1 ммоль) добавляли к раствору I43 (2,9 г, 2,74 ммоль) в ДХМ (30 мл) и ацетонитрила (6 мл) и перемешивали при 35°C в течение 36 ч в атмосфере воздуха. Реакционную смесь промывали водой (25 мл), сушили (фазовый сепаратор biotage) и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (от 3 до 6% метанола/ДХМ) с получением окисленного продукта I44 в виде белого твердого вещества (2,46 г, 85% выход).

ЖХ/МС (метод В): время удерживания 1,60 мин, (ЭСИ+) m/z 1057,1 [M+H]⁺.

(h) 4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил(11S,11aS)-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси-5-оксо-2,3,5,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (I45).

Pd(Ph₃P)₄ (10 мг, 5 мол.%) добавляли к раствору I44 (200 мг, 0,19 ммоль) и пирролидину (40 мкл, 0,34 г, 0,48 ммоль) в ДХМ (10 мл) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали в течение 30 мин. Реакционную смесь промывали насыщенным хлоридом аммония (10 мл), сушили (biotage фазовый сепаратор) и упаривали досуха при пониженном давлении. Затем остаток выдерживали в высокой вакууме на 4 ч для удаления следов пирролидина. Полученное почти белое твердое вещество использовали на следующей стадии без дополнительной очистки (160 мг, 97% выход).

ЖХ/МС (метод В): время удерживания 1,17 мин, (ЭСИ+) m/z 871,1 [M+H]⁺.

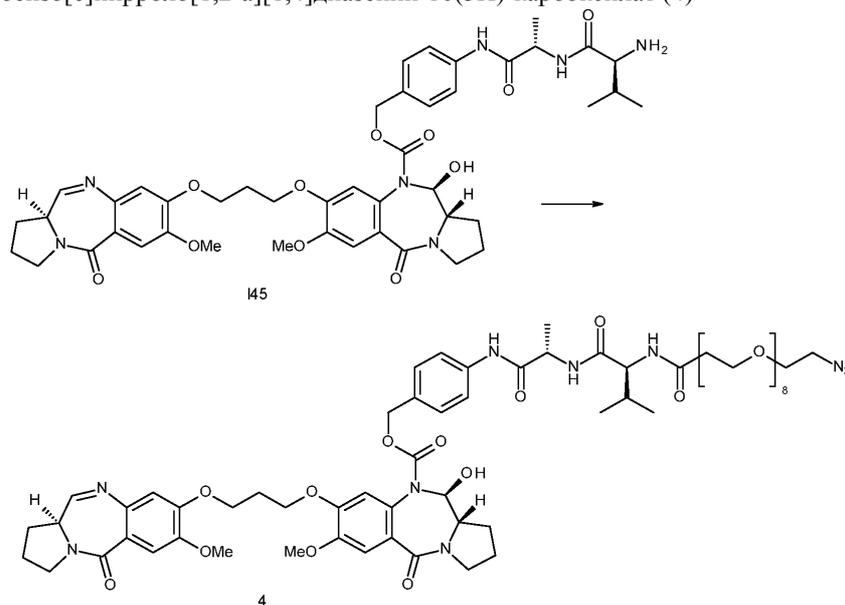
(i) 4-((2S,5S)-37-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октакса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил(11S,11aS)-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси-5-оксо-2,3,5,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4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

EDCl.HCl (46 мг, 0,24 ммоль) добавляли к раствору I45 и MaI-PEG₈-кислоты (130 мг, 0,22 ммоль) в CHCl₃ (10 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. ЖХ/МС показало, что 78% исходного материала все еще присутствовало. Еще 2 экв. EDCl.HCl добавляли порциями, чтобы довести реакцию до завершения. Реакционную смесь промывали водой (10 мл), сушили (Biotage PS) и упаривали досуха при пониженном давлении, с получением желтого твердого вещества, которое очищали препаративной ВЭЖХ и получали продукт 1 в виде почти белого твердого вещества (90 мг, 34% выход).

ЖХ/МС (метод В): время удерживания 1,47 мин, (ЭСИ+) m/z 1445,9 [M+H]⁺.

Пример 5.

(i) 4-((29S,32S)-1-Азидо-29-изопропил-32-метил-27,30-диоксо-3,6,9,12,15,18,21,24-октакса-28,31-дiazатриаконтан-33-амидо)бензил(11S,11aS)-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси-5-оксо-2,3,5,11a)-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (4)

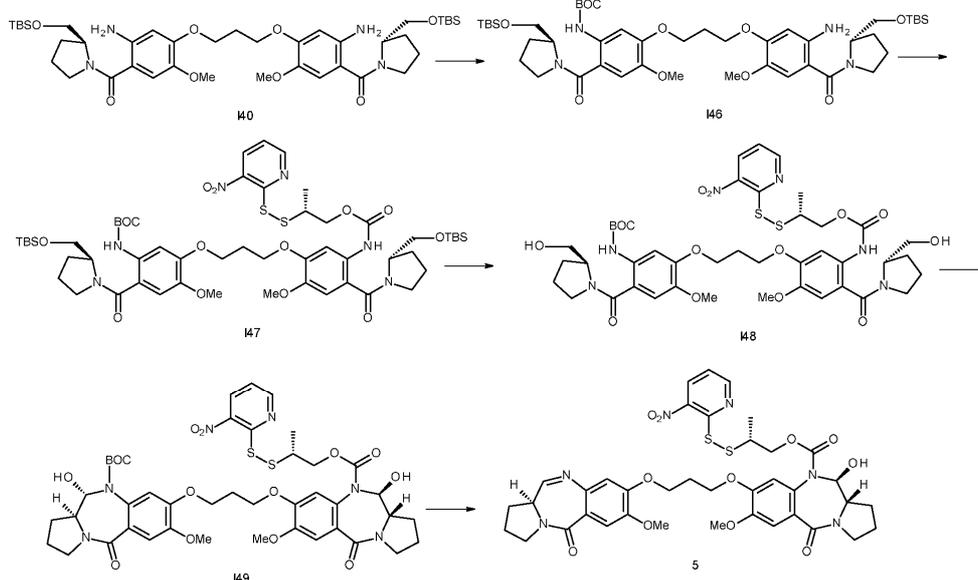


EDCl.HCl (27 мг, 0,14 ммоль) добавляли к раствору I45 и азидо-PEG₈-кислоты (49 мг, 0,10 ммоль) в CHCl₃ (6 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Растворитель упаривали при пониженном давлении с получением желтого пенообразного вещества. Очистка препаративной ВЭЖХ

давала продукт 4 в виде не совсем белого твердого вещества (20 мг, 17% выход).

ЖХ/МС (метод В): время удерживания 6,01 мин, (ЭСИ+) m/z 1320 $[M+H]^+$.

(ii) (R)-2-((3-Нитропиридин-2-ил)дисульфанил)пропил(11S,11aS)-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси)-5-оксо-2,3,5,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (5)



(a) трет-Бутил (5-(3-(5-амино-4-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пропокси)-2-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (I46).

Вос-ангидрид (0,5 мл, 2,3 ммоль, 1,0 экв.) добавляли к раствору I40 (1,9 г, 2,3 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (50 мл) и перемешивали при 55°C в течение 5 ч. Растворитель удаляли упариванием при пониженном давлении и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (50-100% этилацетат/гексан) с получением продукта в виде желтого твердого вещества, 1,7 г (80%).

ЖХ/МС (метод 1): в.у. 2,48 мин, m/z (902,5) $M+H$.

(б) трет-Бутил (2-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-5-(3-(4-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-метокси-5-(((R)-2-((3-нитропиридин-2-ил)дисульфанил)пропокси)карбонил)амино)фенокси)пропокси)-4-метоксифенил)-карбамат (I47).

Трифосген (0,135 г, 0,455 ммоль, 0,35 экв.) добавляли к раствору (2R)-2-[(3-нитро-2-пиридил)дисульфанил]пропан-1-ола (0,316 г, 1,28 ммоль, 1,05 экв.) и пиридина (111 мг, 1,4 ммоль, 1,15 экв.) в безводном дихлорметане (5 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем полученный раствор добавляли к раствору I46 (1,10 г, 1,22 ммоль, 1,0 экв.) и пиридина (106 мг, 1,34 ммоль, 1,1 экв.) в безводном дихлорметане (10 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 60 мин. Растворитель удаляли выпариванием при пониженном давлении и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (40-50% этилацетат/гексан) с получением продукта в виде желтой пены, 1,21 г (85%).

ЖХ/МС (метод 1): в.у. 2,53 мин, m/z (1174,5) $M+H$.

(с) трет-Бутил (2-(((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-5-(3-(4-(((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-2-метокси-5-(((R)-2-((3-нитропиридин-2-ил)дисульфанил)пропокси)карбонил)амино)фенокси)пропокси)-4-метоксифенил)карбамат (I48).

I47 (1,21 г, 1,03 ммоль) растворяли в смеси уксусной кислоты (5 мл), ТГФ (1 мл), метанола (1 мл) и воды (2 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 90 мин, затем упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток растворяли в этилацетате (50 мл), промывали водой (50 мл), затем насыщенным водным раствором NaHCO_3 (50 мл), сушили (MgSO_4) и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (4% метанол/ДХМ), с получением продукта в виде твердого вещества желтого цвета, 0,97 г (100%).

ЖХ/МС (метод 1): в.у. 1,87 мин, m/z (946,0) $M+H$.

(d) трет-Бутил (11S,11aS)-11-гидрокси-8-(3-(((11S,11aS)-11-гидрокси-7-метокси-10-(((R)-2-((3-нитропиридин-2-ил)дисульфанил)пропокси)карбонил)-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-8-ил)окси)пропокси)-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]diazепин-10(5H)-карбоксилат (I49).

Раствор Stahl для аэробного окисления ТЕМПО (2,05 мл, 0,4 ммоль, 0,2 моль/л), а затем тетраакс-ацетонитрил трифлат меди(I) (0,15 г, 0,40 ммоль) добавляли к раствору I48 (0,97 г, 1,0 ммоль) в ДХМ

(20 мл, 312,0 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 35°C в течение 15 ч. Органическую фазу промывали водой (25 мл), сушили (biotage) и упаривали досуха при пониженном давлении, и очищали с помощью колоночной хроматографии (3-6% метанола/ДХМ) с получением продукта в виде белового твердого вещества, 0,77 г (79%).

ЖХ/МС (метод 1): в.у. 1,70 мин, m/z (941,9) M+H.

(е) (R)-2-((3-Нитропиридин-2-ил)дисульфанил)пропил(11S,11aS)-11-гидрокси-7-метокси-8-(3-(((S)-7-метокси)-5-оксо-2,3,5,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-8-ил)окси)пропокси)-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат (5).

Трифторуксусную кислоту (4,5 мл) добавляли к воде (0,5 мл) и охлаждали до 0°C. Затем этот раствор добавляли к 149 (0,75 г, 0,80 ммоль) и полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч. Растворитель удаляли при пониженном давлении, остаток растворяли в ДХМ (10 мл) и реакционную смесь нейтрализовали добавлением насыщенного водного раствора NaHCO₃. После сушки (biotage) и упаривания при пониженном давлении остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (4-6% метанола/ДХМ), с получением продукта в виде твердого вещества ярко-желтого цвета, 0,6 г (91%).

ЖХ/МС (метод 2): в.у. 6,04 мин, m/z (824,0) M+H.

Аналитические условия ЖХ/МС для примера 5 (ii).

Электрораспылительную масс-спектрометрию с положительным режимом проводили с использованием Waters Aquity H-класса SQD2. В качестве подвижной фазы использовали растворитель А (вода с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты).

Способ 1.

Градиент для обычной 3-минутной хроматограммы: Первоначальный состав 5% В выдерживали в течение 25 с, затем повышали концентрацию от 5 до 100% В в течение 1 мин 35 с. Такой состав выдерживали в течение 50 с при 100% В, затем возвращались к 5% В в течение 5 с и выдерживали в течение 5 с. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 3,0 мин. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин. Обнаружение проводили при 254 нм. Колонка: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм при 50°C, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130A, 1,7 мкм, 2,1×5 мм.

Способ 2.

Градиент для обычной 15-минутной хроматограммы: Первоначальное содержание 5% В выдерживали в течение 1 мин, затем повышали от 5 до 100% В за 9 мин. Такой состав выдерживали в течение 2 мин при 100% В, затем возвращались к 5% В в течение 10 с и выдерживали при 5% В в течение 2 мин 50 с. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 15,0 мин. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин (для 3-минутной хроматограммы) и 0,6 мл/мин (для 15-минутной хроматограммы). Обнаружение проводили при 254 нм. Колонка: ACE Excel 2 C18-AR, 2 мкм, 3,0×100 мм, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130A, 1,7 мкм, 2,1×5 мм.

Пример 6. Конъюгирование.

Конъюгат-HER-1.

50 мМ раствор дитиотреитола (ДТТ) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 16 мкмоль, 0,32 мл 50 мМ раствора) к 12 мл раствора антитела герцептин (30 мг, 0,2 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 2,5 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 4 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменили буфер для восстановленного антитела посредством фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа на буфер повторного окисления, содержащий PBS с pH 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 15 мол.экв./антитело, 3 мкмоль, 0,08 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~1,5 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межпечочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 1 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 1,0 мкмоль в 1,5 мл ДМСО) к 13,5 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (15 мг, 0,1 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 3 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (15 мкмоль, 0,150 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа, в буфер, содержащий PBS с pH 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства, ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила на восстановленном образце конъюгата-HER-1 при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 1), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 1, что согласуется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,74 молекулы соединения 1 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца конъюгата-HER-1 при 280 нм, показал чистоту мономера более 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 1,39 мг/мл в 7,8 мл, полученная масса ADC составила 10,8 мг (72% выход).

Конъюгат-HER-2.

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 55,5 мкмоль, 1,11 мл 50 мМ раствора) к 11,8 мл раствора антитела герцептин (104 мг, 0,69 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 4,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 3,5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа на буфер повторного окисления, содержащий PBS с рН 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 20 мол.экв./антитело, 12,4 мкмоль, 0,25 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~2,4 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межцепочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 2 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 1,03 мкмоль в 1,40 мл ДМСО) к 14 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (15,5 мг, 0,103 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 1,5 ч при 25°C, а затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (5,15 мкмоль, 0,051 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли с помощью установки тангенциальной проточной фильтрации (TFF), используя mPES, волоконный фильтр MidiKros® 30 кДа с площадью поверхности 115 см², в буфер, содержащий PBS с рН 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства, ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила на восстановленном образце конъюгата-HER-2 при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 2), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 2, что согласуется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,85 молекулы соединения 2 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца конъюгата-HER-2 при 280 нм, показал чистоту мономера более 98%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 0,88 мг/мл в 8,5 мл, полученная масса ADC составила 7,5 мг (48% выход).

Конъюгат-HER-3.

50 мМ раствор трис-(2-карбоксиил)фосфина гидрохлорида (ТСЕР) в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 (PBS) добавляли (40 мол.экв./антитело, 40 мкмоль, 0,08 мл при 50 мМ) к 1,39 мл раствора антитела герцептин (15 мг, 0,1 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 4,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 37°C в течение 2 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела, посредством диализа с использованием кассеты MWCO 50 кДа на буфер повторного окисления, содержащий PBS с рН 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента в течение 16 ч при комнатной температуре. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 25 мол.экв./антитело, 2,5 мкмоль, 0,04 мл 50 мМ раствора) в

ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 2 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~1,5 мг/мл. Из-за неполного окисления добавляли еще 0,04 мл 50 мМ ДНАА и дополнительно встряхивали при комнатной температуре в течение 2 ч. После этого с помощью ВЭЖХ наблюдалось полное повторное окисление тиолов цистеина для повторного формирования межцепочечных дисульфидов цистеина. Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 3 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 0,8 мкмоль в 1,1 мл ДМСО) к 11 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (12 мг, 0,08 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 1 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (3,2 мкмоль, 0,032 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа, в буфер, содержащий PBS с pH 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при 4°C. СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила на восстановленном образце конъюгата-HER-3 при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 3), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 3, что согласуется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,78 молекулы соединения 3 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия, с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца конъюгата-HER-3 при 280 нм, показал чистоту мономера более 94%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 1,14 мг/мл в 8,2 мл, полученная масса ADC составила 9,3 мг (62% выход).

Конъюгат-R347-1.

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 697 мкмоль, 13,87 мл 50 мМ раствора) к 44,36 мл раствора антитела R347 (1300 мг, 8,67 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 5,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 3,5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела с помощью установки тангенциальной проточной фильтрации (TFF), используя mPES, волоконный фильтр MidiKros® 30 кДа с площадью поверхности 235 см² на буфер повторного окисления, содержащий PBS с pH 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Восстановленное антитело центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали с использованием мембранного фильтра 0,22 мкм. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 15 мол.экв./антитело, 130 мкмоль, 2,6 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела 5,0 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межцепочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 1 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 86,7 мкмоль в 23,4 мл ДМСО) к 330 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (1300 мг, 8,67 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 3 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (433 мкмоль, 4,33 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли с помощью установки тангенциальной проточной фильтрации (TFF), используя mPES, волоконный фильтр MidiKros® 30 кДа с площадью поверхности 235 см², в буфер, содержащий PBS с pH 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства ADC составляли в состав с 25 мМ гистидина, 200 мМ сахарозы, pH 6,0. ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при -78°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила на восстановленном образце конъюгата-R347-1 при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 1), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 1, что согласу-

ется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,82 молекулы соединения 1 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца ADC при 280 нм, показал чистоту мономера более 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного конъюгата-R347-1, равную 10,11 мг/мл в 113 мл, полученная масса ADC составила 1141 мг (88% выход).

Конъюгат-R347-2.

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 213 мкмоль, 4,3 мл 50 мМ раствора) к 13,7 мл раствора антитела R347 (400 мг, 2,67 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 5,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 3,5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела с помощью установки тангенциальной проточной фильтрации (TFF), используя mPES, волоконный фильтр MidiKros® 30 кДа с площадью поверхности 115 см² на буфер повторного окисления, содержащий PBS с рН 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Восстановленное антитело центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали с использованием мембранного фильтра 0,22 мкм. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 15 мол.экв./антитело, 40 мкмоль, 0,8 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~3,0 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межпочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 2 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 26,7 мкмоль в 15,5 мл ДМСО) к 330 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (400 мг, 2,67 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 1,5 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (125 мкмоль, 1,25 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли с помощью установки тангенциальной проточной фильтрации (TFF), используя mPES, волоконный фильтр MidiKros® 30 кДа с площадью поверхности 115 см², в буфер, содержащий PBS с рН 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства ADC составляли в состав с 25 мМ гистидина, 200 мМ сахарозы, рН 6,0. ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при -78°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила на восстановленном образце конъюгата-R347-2 при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 2), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 2, что согласуется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,8 молекулы соединения 2 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца конъюгата-R347-2 при 280 нм, показал чистоту мономера более 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 3,06 мг/мл в 93 мл, полученная масса ADC составила 284 мг (71% выход).

Конъюгат-R347-3.

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 240 мкмоль, 4,8 мл 50 мМ раствора) к 15,36 мл раствора антитела R347 (450 мг, 3,0 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 5,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 3,5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела с помощью установки тангенциальной проточной фильтрации (TFF), используя mPES, волоконный фильтр MidiKros® 30 кДа с площадью поверхности 235 см² на буфер повторного окисления, содержащий PBS с рН 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Восстановленное антитело центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали с использованием мембранного фильтра 0,22 мкм. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскор-

биновой кислоты (ДНАА, 15 мол.экв./антитело, 45 мкмоль, 0,9 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~3,5 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межпечочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 3 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 30,0 мкмоль в 13,0 мл ДМСО) к 330 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (450 мг, 3,0 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 3 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (150 мкмоль, 1,5 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли с помощью установки тангенциальной проточной фильтрации (TFF), используя mPES, волоконный фильтр MidiKros® 30 кДа с площадью поверхности 235 см², в буфер, содержащий PBS с pH 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства ADC составляли в состав с 25 мМ гистидина, 200 мМ сахарозы, pH 6,0. ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при -78°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила восстановленного образца конъюгата при 214 и 330 нм (специфического в отношении соединения 3), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 3, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR), составляющим 1,82 молекулы соединения 3 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца конъюгата-R347-3 при 280 нм, показал чистоту мономера более 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 2,35 мг/мл в 174 мл, полученная масса конъюгата-R347-3 составила 409 мг (91% выход).

Конъюгат-HLL2-1.

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 53,3 мкмоль, 1,07 мл 50 мМ раствора) к 11,8 мл раствора антитела HLL2 (100 мг, 0,6 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 5,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 3,5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа на буфер повторного окисления, содержащий PBS с pH 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 15 мол.экв./антитело, 9 мкмоль, 0,18 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~3,0 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межпечочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 1 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 1,2 мкмоль в 0,58 мл ДМСО) к 7 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (18 мг, 0,12 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 3 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (6 мкмоль, 0,06 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа, в буфер, содержащий PBS с pH 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила на восстановленном образце конъюгата-HLL2-1 при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 1), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 1, что согласуется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,74 молекулы соединения 1 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки

Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца конъюгата-HLL2-1 при 280 нм, показал чистоту мономера более 98%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 1,6 мг/мл в 7,5 мл, полученная масса ADC составила 12 мг (67% выход).

Конъюгат-HLL2-2.

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 53,3 мкмоль, 1,07 мл 50 мМ раствора) к 11,8 мл раствора антитела HLL2 (100 мг, 0,6 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 5,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 3,5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела посредством спинного фильтрования с использованием спинового фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа на буфер повторного окисления, содержащий PBS с pH 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 15 мол.экв./антитело, 9 мкмоль, 0,18 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~3,0 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межпечочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 2 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 1,2 мкмоль в 0,58 мл ДМСО) к 7 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (18 мг, 0,12 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 3 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (6 мкмоль, 0,06 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли посредством спинного фильтрования с использованием спинового фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа, в буфер, содержащий PBS с pH 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства, ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила, восстановленного образца конъюгата при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 2), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 2, что согласуется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,78 молекулы соединения 2 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца конъюгата-HLL2-2 при 280 нм, показал чистоту мономера более 98%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 1,56 мг/мл в 8,0 мл, полученная масса конъюгата-HLL2-2 составила 12,5 мг (69% выход).

Конъюгат-HLL2-3.

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 53,3 мкмоль, 1,07 мл 50 мМ раствора) к 11,8 мл раствора антитела HLL2 (100 мг, 0,6 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 5,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 3,5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела посредством спинного фильтрования с использованием спинового фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа на буфер повторного окисления, содержащий PBS с pH 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 15 мол.экв./антитело, 9 мкмоль, 0,18 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~3,0 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межпечочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 3 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 1,2 мкмоль в 0,58 мл ДМСО) к 7 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (18 мг, 0,12 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 3 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью

N-ацетилцистеина (6 мкмоль, 0,06 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа, в буфер, содержащий PBS с pH 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства, ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила, восстановленного образца конъюгата при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 3), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 3, что согласуется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,79 молекулы соединения 3 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца конъюгата-HLL2-3 при 280 нм, показал чистоту мономера более 98%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 1,73 мг/мл в 8,2 мл, полученная масса конъюгата-HLL2-3 составила 14,2 мг (79% выход).

Конъюгат-CD79b-1.

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 53,6 мкмоль, 1,07 мл 50 мМ раствора) к 13,9 мл раствора антитела CD79b (100 мг, 0,67 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 4,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 4 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа на буфер повторного окисления, содержащий PBS с pH 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 15 мол.экв./антитело, 9 мкмоль, 0,18 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~2,0 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межпечочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 1 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 1,2 мкмоль в 1,0 мл ДМСО) к 9,0 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (18 мг, 0,12 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 2 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (4,8 мкмоль, 0,048 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа, в буфер, содержащий PBS с pH 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила, восстановленного образца конъюгата при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 1), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 1, что согласуется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,90 молекулы соединения 1 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца конъюгата-CD79b-1 при 280 нм, показал чистоту мономера более 98%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 2,00 мг/мл в 7,85 мл, полученная масса конъюгата-CD79b-1 составила 15,7 мг (79% выход).

Конъюгат-CD79b-2.

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 53,6 мкмоль, 1,07 мл 50 мМ раствора) к 13,9 мл раствора антитела CD79b (100 мг, 0,67 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 4,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 4 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере

при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа на буфер повторного окисления, содержащий PBS с pH 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 15 мол.экв./антитело, 9 мкмоль, 0,18 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~2,0 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межпечочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 2 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 1,2 мкмоль в 1,0 мл ДМСО) к 9,0 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (18 мг, 0,12 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 2 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (4,8 мкмоль, 0,048 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа, в буфер, содержащий PBS с pH 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства, ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeria 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила, восстановленного образца конъюгата при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 2), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 2, что согласуется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,87 молекулы соединения 2 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца конъюгата-CD79b-2 при 280 нм, показал чистоту мономера более 98%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 2,25 мг/мл в 5,9 мл, полученная масса конъюгата-CD79b-2 составила 13,3 мг (66% выход).

Конъюгат-1C1-1.

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 75 мкмоль, 1,5 мл 50 мМ раствора) к 26,4 мл раствора антитела 1C1 (140 мг, 0,93 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 5,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 25°C в течение 3,5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановленного антитела посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа на буфер повторного окисления, содержащий PBS с pH 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 15 мол.экв./антитело, 14 мкмоль, 0,28 мл 50 мМ раствора) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (60 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела ~3,0 мг/мл (или до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межпечочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин и затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 1 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 1,3 мкмоль в 0,6 мл ДМСО) к 6 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (20 мг, 0,133 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 4 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (6,65 мкмоль, 0,067 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа, в буфер, содержащий PBS с pH 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства ADC составляли в состав с 25 мМ гистидина, 200 мМ сахарозы, pH 6,0. ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при -78°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeria 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила, восстановленного образца конъюгата при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 1), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 1, что согласуется с от-

ношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 1,86 молекулы соединения 1 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца ADC при 280 нм, показал чистоту мономера более 98%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 1,49 мг/мл в 8,0 мл, полученная масса ADC составила 11,9 мг (60% выход).

Конъюгат-HER-1++ (высокое DAR).

50 мМ раствор дитиотреитола (ДТТ) в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 (PBS) добавляли (100 мол.экв./антитело, 6,7 мкмоль, 0,13 мл 50 мМ раствора) к 5 мл раствора антитела (10 мг, 67 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 2,0 мг/мл. Полученную смесь инкубировали при 25°C в течение ночи (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. После охлаждения до комнатной температуры заменяли буфер для восстановления антитела посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа на буфер конъюгирования, содержащий PBS с рН 7,4 и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Соединение 1 добавляли в виде раствора в ДМСО (20 мол.экв./антитело, 1,34 мкмоль в 0,4 мл ДМСО) к 4,0 мл полученного раствора восстановленного антитела (10 мг, 67 нмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 1 ч при 25°C, а затем останавливали конъюгирование с помощью избытка N-ацетилцистеина (6,7 мкмоль, 67 мкл при 100 мМ).

Полученный ADC очищали с помощью препаративной эксклюзионной колонки (GE Sephadex 26/60), установленной на приборе АКТА Start с использованием буфера PBS, с рН 7,4. Фракции собирали и анализировали на мономерное содержание с использованием системы Shimadzu Prominence с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин отфильтрованным через стерилизующий фильтр буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.) при 280 нм. Фракции с содержанием мономера >92% объединяли и затем концентрировали, используя 50 кДа MWCO vivaspin, в буфер, содержащий PBS с рН 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат и после полного удаления свободного лекарственного средства, ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила восстановленного образца конъюгата при 214 и 330 нм (специфического в отношении соединения 1), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 1, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR), составляющим 7,41 молекулы соединения 1 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца ADC при 280 нм, показал чистоту мономера 95%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 1,44 мг/мл в 4,5 мл, полученная масса ADC составила 6,5 мг (65% выход).

Конъюгат-HER-1+ (среднее DAR).

10 мМ раствор трис(2-карбоксиил)фосфина гидрохлорида (ТСЕР) в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 (PBS) добавляли (2 мол.экв./антитело, 0,134 мкмоль, 13,3 мкл при 10 мМ) к 4 мл раствора антитела (10 мг, 67 нмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 2,5 мг/мл. Восстанавливающую смесь нагревали при 37°C в течение 2 ч в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. Соединение 1 добавляли в виде раствора в ДМСО (15 мол.экв./антитело, 1,0 мкмоль, 0,1 мл в 10 мМ в 0,3 мл ДМСО) и полученную смесь встряхивали в течение 1,5 ч при 25°C и затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (5 мкмоль, 50 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарственного средства удаляли посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с MWCO 50 кДа, в буфер, содержащий PBS с рН 7,4. Степень удаления свободного лекарственного средства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарственного средства ADC фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере и затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм XB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила, восстановлен-

ного образца конъюгата при 214 и 330 нм (специфической в отношении соединения 1), показал смесь легких и тяжелых цепей, присоединенных к нескольким молекулам соединения 1, что согласуется с отношением лекарственное средство-на-антитело (DAR), составляющим 4,2 молекулы соединения 1 на одно антитело.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 мкм 4,6×150 мм (с защитной колонкой 4 мкм 3,0×20 мм), элюируя со скоростью 0,3 мл/мин стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), образца ADC при 280 нм, показал чистоту мономера более 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ADC, равную 2,05 мг/мл в 3,6 мл, полученная масса ADC составила 7,36 мг (74% выход).

Пример 7. In vitro анализ.

Способ определения цитотоксичности MTS.

Концентрацию и жизнеспособность клеток из субконфлюентной (конфлюентность 80-90%) клеточной культуры в колбе T75 измеряли посредством окрашивания трипановым синим и подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток LUNA-II™. Клетки разбавляли до 2×10^5 /мл, распределяли (50 мкл/лунку) в 96-луночные плоскодонные планшеты.

Исходный раствор (1 мл) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) для тестирования (20 мкг/мл) получали разбавлением стерилизованного посредством фильтрации ADC в среде для клеточных культур. Серию 8×10-кратных разбавлений исходного ADC проводили в 24-луночном планшете посредством серийного переноса 100 мкл в 900 мкл среды для клеточных культур. Разбавленный ADC распределяли (50 мкл/лунка) в 4 повторностях в лунки 96-луночного планшета, содержащие 50 мкл клеточной суспензии, высеянной ранее. В контрольные лунки помещали 50 мкл среды для клеточных культур. 96-луночный планшет, содержащий клетки и ADC, инкубировали при 37°C в инкубаторе с подводом CO₂ в течение времени воздействия.

По окончании периода инкубации измеряли жизнеспособность клеток с помощью анализа MTS. MTS (Promega) помещали (20 мкл на лунку) в каждую лунку и инкубировали в течение 4 ч при 37°C в инкубаторе с подводом CO₂. Поглощение в лунках измеряли при 490 нм. Процентное выживание клеток рассчитывали по среднему поглощению в 4 лунках, обработанных ADC, по сравнению со средним поглощением в 4 контрольных, необработанных лунках (100%). IC₅₀ определяли по данным зависимости ответа от дозы с помощью GraphPad Prism, используя алгоритм нелинейного сглаживания кривой: сигмоидальная кривая зависимости ответа от дозы с переменным углом наклона.

Время инкубации ADC составляло 4 дня с SK-BR-3, MDA-MB-468, WSU-DLCL2 и SU-DHL-4, 5 дней для Granta519, 6 дней для VJAB и 7 дней для NCI-N87. MDA-MB-468, NCI-N87, WSU-DLCL2 и SU-DHL-4 выращивали в среде RPMI 1640 с GlutaMax + 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки HyClone™, Granta519 в DMEM + GlutaMax с 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки HyClone™, SK-BR-3 в McCoys 5A с 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки HyClone™ и VJAB в RPMI 1640 + GlutaMax с 20% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки HyClone™.

Способ определения цитотоксичности CellTiter-Glo.

Концентрацию и жизнеспособность клеток из субконфлюентной (конфлюентность 80-90%) клеточной культуры в колбе T75 измеряли посредством окрашивания трипановым синим и подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток LUNA-II™. Клетки разбавляли и распределяли по 1500 клеток на лунку (50 мкл суспензии/лунку) в белые 96-луночные плоскодонные планшеты.

Исходный раствор (1 мл) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) для тестирования (20 мкг/мл) получали разбавлением стерилизованного посредством фильтрации ADC в среде для клеточных культур. Серию 8×10-кратных разбавлений исходного ADC проводили в 24-луночном планшете посредством серийного переноса 100 мкл в 900 мкл среды для клеточных культур. Разбавленный ADC распределяли (50 мкл/лунка) в 4 повторностях в лунки 96-луночного планшета, содержащие 50 мкл клеточной суспензии, высеянной ранее. В контрольные лунки помещали 50 мкл среды для клеточных культур. 96-луночный планшет, содержащий клетки и ADC, инкубировали при 37°C в инкубаторе с подводом CO₂ в течение времени воздействия.

По окончании периода инкубации измеряли жизнеспособность клеток с помощью анализа CellTiter-Glo. CellTiter-Glo (Promega) помещали по 100 мкл на лунку и встряхивали в течение 2 мин перед 10-минутной стабилизацией при комнатной температуре. Затем считывали люминисценцию в каждой лунке. Процентное выживание клеток рассчитывали по среднему поглощению в 4 лунках, обработанных ADC, по сравнению со средним поглощением в 4 контрольных, необработанных лунках (100%). IC₅₀ определяли по данным зависимости ответа от дозы с помощью GraphPad Prism, используя алгоритм нелинейного сглаживания кривой: сигмоидальная кривая зависимости ответа от дозы с переменным углом наклона.

Время инкубации ADC для PC-3 составляло 6 дней. PC-3 выращивали в среде RPMI 1640 с GlutaMax + 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки HyClone™.

Результаты.

EC ₅₀ (мкг/мл)	SU-DHL-4	GRANTA-519	BJAB	WSU-DLCL2
Конъюгат-CD79b-1	1,216	49,69	0,2211	> 100
Конъюгат-CD79b-2	0,4781	0,1124	0,005712	0,7559
Конъюгат-R347-2	> 10			

Все клеточные линии SU-DHL-4, GRANTA519, BJAB и WSU-DL-CL2 экспрессируют CD79b.

EC ₅₀ (мкг/мл)	SK-BR-3	NCI-N87	MDA-MB-468
Конъюгат-Her-1	0,06953	0,9677	3,492
Конъюгат-Her-3	0,0175	0,02502	2,322
Конъюгат-Her-2	0,07427	0,08078	0,9533
Конъюгат-HER-1++		0,1108	12,18
Конъюгат-HER-1+		0,3226	> 10

Клеточные линии SK-BR-3 и NCI-N87 экспрессируют Her2. Клеточная линия MDA-MB-468 не экспрессирует HER2.

EC ₅₀ (мкг/мл)	PC-3
Конъюгат-1C1-1	0,5408
Конъюгат-R347-1	> 100

Пример 8. In vitro анализ (i) Daudi.

Проанализированные конъюгаты: конъюгат-HLL2-1; конъюгат-HLL2-2; конъюгат-HLL2-3.

Самкам мышей CB.17 SCID в возрасте десяти недель инъецировали 0,1 мл 1×10^7 клеток Daudi подкожно в правый бок. Когда опухоли достигли среднего размера 100-150 мм³, животным начинали вводить тестируемые соединения. Мышей взвешивали два раза в неделю. Размер опухоли измеряли два раза в неделю. Животные контролировались индивидуально. Конечной точкой эксперимента был размер опухоли объемом 1500 мм³ или 60 дней, в зависимости от того, что наступило раньше.

Группам из 10 ксенотрансплантированных мышей внутривенно вводили 0,2 мл на 20 г массы тела конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) в фосфатно-солевом буфере (носитель) или 0,2 мл на 20 г массы тела только носителя.

Концентрация ADC была скорректирована, так чтобы вводить следующие дозы:

Конъюгат	Дозы (мг ADC/кг тела)
Конъюгат-HLL2-1	0,6 или 1,8
Конъюгат-HLL2-2	0,3 или 1
Конъюгат-HLL2-3	0,1 или 0,3

Все схемы были приемлемо переносимыми с минимальными потерями в массах тела.

Конъюгат-HLL2-1: Медианное время до конечной точки (TTE) для контрольных мышей, которым вводили носитель, составляло 27,8 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 32,2 дня (116%) для 60-дневного исследования. Одна смерть, не связанная с лечением, была зарегистрирована на 28-й день, и это животное было исключено из анализа.

0,6 мг/кг схема привела к TGD 48,1 дня (73%), что является статистически существенным по сравнению с контролями ($p < 0,001$). Кроме того, данная схема имела пять из девяти 59-регрессионных ответов, состоящих из двух частичных и трех полных регрессий. Шесть животных достигли конечной точки 1500 мм³, при этом 3 выжило через 60 дней. Трое выживших имели средний объем опухоли 221 мм³. Одна смерть, не связанная с лечением, была зарегистрирована, и это животное было исключено из анализа.

1,8 мг/кг схема привела к максимально возможной, значительной TGD (по сравнению с контролями, $p < 0,001$), и имела восемь из десяти выживших на 60-й день и привела к преимуществу выживания, которое было статистически значимо отлично от контрольных мышей, которым вводили носитель ($p < 0,001$). Восемь животных показали полные регрессионные ответы. Пять из этих животных были свободны от опухоли через 60 дней.

Обе схемы лечения давали статистически значимые преимущества для выживания по сравнению с контролем ($p < 0,001$ для обоих 0,6 и 1,8 мг/мл).

Конъюгат-HLL2-2: Медианное время до конечной точки (TTE) для контрольных мышей, которым вводили носитель, составляло 27,8 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 32,2 дня (116%) для 60-дневного исследования.

Обе схемы 0,3 и 1 мг/кг привели к максимально достижимым TGD (32,2 дня, 116%). Оба этих результата были статистически значимыми по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$ для каждой схемы).

80% животных, которым вводили 0,3 мг/кг, показали регрессионные ответы, состоящие из двух частичных ответов и шести полных ответов, четыре из которых оставались свободными от опухоли в конце исследования. Четверо животных, которым вводили 0,3 мг/кг, достигли конечной точки объема опухоли, в результате чего в конце исследования шесть выживших животных были свободны от опухоли.

100% животных, которым вводили 1 мг/кг, показали регрессионные реакции, и все животные были свободны от опухолей на 60 день.

Обе схемы лечения привели к значительным различиям общей выживаемости по сравнению с контролем (контроль по сравнению с любой из 0,3 или 1 мг/кг, $p < 0,0001$).

Конъюгат-HLL2-3: Медианное время до конечной точки (TTE) для контрольных мышей, которым вводили носитель, составляло 27,8 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 32,2 дня (116%) для 60-дневного исследования.

Схемы 0,1 и 0,3 мг/кг привели к TGD 12,9 (46%) и 24,6 дней (88%) соответственно. Оба этих результата были статистически значимыми по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$ для каждой схемы).

30% регрессионных ответов наблюдали у животных, получавших схему 0,1 мг/мл с тремя частичными ответами. Все животные в данной группе достигли конечной точки объема опухоли к 60 дню.

70% животных, которым вводили 0,3 мг/кг, показали регрессионные ответы, состоящие из трех частичных ответов и четырех полных ответов, одно животное из которых оставалось свободным от опухоли в конце исследования. Четверо животных, которым вводили 0,3 мг/кг, достигли конечной точки объема опухоли, в результате чего в конце исследования шесть выживших животных были свободны от опухоли. Семь животных в этой группе достигли конечной точки объема опухоли, оставив трех выживших в течение 60 дней с MTV 750 мм³ в конце исследования.

Обе схемы лечения привели к значительным различиям общей выживаемости по сравнению с контролем (контроль по сравнению с любой из 0,1 или 0,13 мг/кг, $p < 0,0001$).

(ii) JMT-1.

Проанализированные конъюгаты: конъюгат-Her-3.

Самкам мышей CB.17 SCID в возрасте 10 недель инъецировали 0,1 мл 1×10^7 клеток JMT-1 в 50% матригеле подкожно в правый бок. Когда опухоли достигли среднего размера 100-150 мм³, животным начинали вводить тестируемые соединения. Мышей взвешивали два раза в неделю. Размер опухоли измеряли два раза в неделю. Животные контролировались индивидуально. Конечной точкой эксперимента был размер опухоли объемом 1000 мм³ или 59 дней, в зависимости от того, что наступило раньше.

Группам из 10 ксенотрансплантированных мышей внутривенно вводили 0,2 мл на 20 г массы тела конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) в фосфатно-солевом буфере (носитель) или 0,2 мл на 20 г массы тела только носителя. Концентрация ADC была скорректирована, так чтобы вводить 1 или 3 мг ADC/кг массы тела в одной дозе.

Все схемы были приемлемо переносимыми с минимальными потерями в массах тела. Медианное время до конечной точки (TTE) для контрольных мышей, которым вводили носитель, составляло 48,4 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 10,6 дня (22%) для 59-дневного исследования.

Дозозависимый эффект наблюдался там, где у животных, получавших дозу 1 мг/кг, средний объем опухоли оставался неизменным до 34 дня, затем прогрессировал, тогда как у животных, получавших 3 мг/кг, наблюдалось небольшое уменьшение размера опухоли до MTV 81 мм³. Обе схемы приводили к максимальной TGD, составляющему 10,6 дней (22%) по сравнению с контрольной группой ($P < 0,001$ для обеих групп получающих лечение).

Режим 1 мг/кг привел к девяти выжившим в исследовании с MTV 650 мм³ и без объективных регрессионных ответов.

Схема 3 мг/кг привела к девяти выжившим с 20% объективными регрессионными ответами, состоящими из двух частичных ответов. MTV выживших в исследовании составил 108 мм³. Схемы лечения не отличались друг от друга значительно ($p > 0,05$).

Обе схемы лечения привели к значительным различиям общей выживаемости по сравнению с контролем (контроль по сравнению с любой из 1 или 3 мг/кг, $p < 0,0001$).

(iii) NCI-N87.

Проанализированные конъюгаты: конъюгат-Her-3.

Самкам мышей CB.17 SCID в возрасте десяти недель инъецировали 0,1 мл 1×10^7 клеток NCI-N87 в 50% матригеле подкожно в правый бок. Когда опухоли достигли среднего размера 100-150 мм³, животным начинали вводить тестируемые соединения. Мышей взвешивали два раза в неделю. Размер опухоли измеряли два раза в неделю. Животные контролировались индивидуально. Конечной точкой эксперимента была опухоль объемом 800 мм³ или 81 день, в зависимости от того, что наступило раньше.

Группам из 10 ксенотрансплантированных мышей внутривенно вводили 0,2 мл на 20 г массы тела конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) в фосфатно-солевом буфере (носитель) или 0,2 мл на 20 г массы тела только носителя. Концентрация ADC была скорректирована, так чтобы вводить 0,3 или

1 мг ADC/кг массы тела в одной дозе.

Все схемы были приемлемо переносимыми с минимальными потерями в массах тела. Шесть из десяти контрольных опухолей достигли 800 мм³ со временем до конечных точек (ТТЕ) в диапазоне от 36,8 до 81,0 дней. Медианное время до конечной точки (ТТЕ) для контрольных мышей, которым вводили носитель, составляло 77 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 4 дня (5%) для 81-дневного исследования. Четверо контрольных животных выжили со средним объемом опухоли (MTV) 696 мм³.

Схемы 0,3 и 1 мг/кг привели к TGD 0,5 (1%) и 4,0 дня (5%) соответственно. Оба эти результата не были статистически значимыми по сравнению с контролем или друг с другом ($p > 0,05$). В обеих группах не было зафиксировано объективных регрессий. Пять животных, которым вводили 0,3 мг/кг и семь животных, которым вводили 1 мг/кг, выжили с MTV 550 мм³ в обеих группах.

Ни одна из схем лечения не привела к статистически значимым преимуществам выживания по сравнению с контролем ($p > 0,05$ для обеих групп лечения), и не было значимого различия между группами лечения ($p > 0,05$).

(iv) NCI-N87.

Проанализированные конъюгаты: конъюгат-Нег-1, конъюгат-Нег-3.

Самкам мышей CB.17 SCID в возрасте восьми недель инъецировали 0,1 мл 1×10^7 клеток NCI-N87 в 50% матригеле подкожно в правый бок. Когда опухоли достигли среднего размера 100-150 мм³, животным начинали вводить тестируемые соединения. Мышей взвешивали два раза в неделю. Размер опухоли измеряли два раза в неделю. Животные контролировались индивидуально. Конечной точкой эксперимента была опухоль объемом 800 мм³ или 78 день, в зависимости от того, что наступило раньше.

Группам из 10 ксенотрансплантированных мышей внутривенно вводили 0,2 мл на 20 г массы тела конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) в фосфатно-солевом буфере (носитель) или 0,2 мл на 20 г массы тела только носителя.

Концентрация ADC была скорректирована, так чтобы вводить следующие дозы:

Конъюгат	Дозы (мг ADC/кг тела)
Конъюгат-Нег-1	1, 3 или 6
Конъюгат-Нег-3	0,3, 1 и 3

Все схемы были приемлемо переносимыми с минимальными потерями в массах тела.

Конъюгат-Нег-1: Медианное время до конечной точки (ТТЕ) для контрольных мышей, которым вводили носитель, составляло 42 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 36 дня (86%) для 60-дневного исследования.

Схемы 0,6 и 1 мг/кг привели к TGD 9,9 (24%) и 11,6 дня (28%) соответственно. Ни один из этих результатов не был статистически значимым по сравнению с контролями ($p > 0,05$). Все животные в обеих группах достигли конечной точки 800 мм³.

6 мг/кг схема привела к максимально возможной, значительной TGD (по сравнению с контролями, $p < 0,001$), и имела восемь из десяти выживших на 60-й день и привела к преимуществу выживания, которое было статистически значимо отлично от контрольных мышей, которым вводили носитель ($p < 0,0001$). Одно животное достигло конечной точки 800 мм³ на 78-й день, оставив девять выживших со средними объемами опухоли 550 мм³.

Не наблюдалось никаких регрессивных реакций со схемами 1, 3 или 6 мг/кг.

Конъюгат-Нег-3: Медианное время до конечной точки (ТТЕ) для контрольных мышей, которым вводили носитель, составляло 42,0 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 36,0 дня (86%) для 78-дневного исследования.

TGD для 0,3, 1 и 3 мг/кг составляли 15,1 (36%), 30,6 (73%) и 36,0 (86%) дней соответственно. Существовали значительные различия для 1 и 3 мг/кг по сравнению с контролями ($p < 0,001$ для обеих групп лечения, но не для 0,3 мг/кг ($p > 0,05$)). Не наблюдалось никаких регрессивных реакций у животных, получавших 0,3 и 1 мг/кг ADC. Девяносто процентов регрессионных ответов наблюдали у животных, получавших 3 мг/кг. Что состояло из восьми частичных ответов и одного полного ответа, который оставался свободным от опухоли в конце исследования. Все животные, получавшие 0,3 мг/кг, достигли конечной точки 800 мм³. Пять животных, которым вводили 1 мг/кг, достигли конечной точки, оставив пять выживших после 78 дней. MTV у них был 486 мм³. Все десять животных, которым вводили 3 мг/кг, выжили в исследовании с MTV 63 мм³.

Схемы 1 и 3 мг/кг привели к значительным различиям в выживаемости по сравнению с контролями ($p < 0,001$ для обеих групп лечения). Группа лечения 0,3 мг/кг не была статистически значимой по сравнению с контролем ($p > 0,05$). Обе группы 1 и 3 мг/кг существенно отличались друг от друга от 0,3 мг/кг группы ($p < 0,001$ и $p < 0,0001$ соответственно).

(v) NCI-N87.

Проанализированные конъюгаты: конъюгат-Her-2.

Самкам мышей CB.17 SCID в возрасте восьми недель инъецировали 0,1 мл 1×10^7 клеток NCI-N87 в 50% матригеле подкожно в правый бок. Когда опухоли достигли среднего размера 100-150 мм³, животным начинали вводить тестируемые соединения. Мышей взвешивали два раза в неделю. Размер опухоли измеряли два раза в неделю. Животные контролировались индивидуально. Конечной точкой эксперимента была опухоль объемом 800 мм³ или 79 день, в зависимости от того, что наступило раньше.

Группам из 10 ксенотрансплантированных мышей внутривенно вводили 0,2 мл на 20 г массы тела конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) в фосфатно-солевом буфере (носитель) или 0,2 мл на 20 г массы тела только носителя. Концентрация ADC была скорректирована, так чтобы вводить 1 или 2 мг ADC/кг массы тела в одной дозе.

Все схемы были приемлемо переносимыми с минимальными потерями в массах тела. Медианное время до конечной точки (TTE) для контрольных мышей, которым водили носитель, составляло 49,6 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 29,4 дня (59%) для 79-дневного исследования.

Схемы 1 и 2 мг/кг привели к TGD 7,6 (15%) и 23,6 дня (48%) соответственно. Оба этих результата были статистически значимыми по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$ и $p < 0,001$ соответственно).

Восемь животных, которым вводили 1 мг/кг, достигли конечной точки 800 мм³, оставив двух выживших в течение 79 дней с MTV 694 мм³. Семь животных в группе, в которой вводили 2 мг/мл, достигли конечной точки объема опухоли ко 79 дню, оставив трех выживших в конце исследования с MTV 600 мм³.

Обе схемы лечения привели к значительным различиям общей выживаемости по сравнению с контролем (контроль по сравнению с 1 мг/кг, $p < 0,05$; контроль по сравнению с 2 мг/кг, $p < 0,001$).

Регрессионные ответы не были зарегистрированы ни с одной схемой.

(vi) NCI-N87.

Проанализированные конъюгаты: конъюгат-Her-1, конъюгат-1++.

Самкам мышей CB.17 SCID в возрасте восьми недель инъецировали 0,1 мл 1×10^7 клеток NCI-N87 в 50% матригеле подкожно в правый бок. Когда опухоли достигли среднего размера 100-150 мм³, животным начинали вводить тестируемые соединения. Мышей взвешивали два раза в неделю. Размер опухоли измеряли два раза в неделю. Животные контролировались индивидуально. Конечной точкой эксперимента была опухоль объемом 800 мм³ или 81 день, в зависимости от того, что наступило раньше.

Группам из 10 ксенотрансплантированных мышей внутривенно вводили 0,2 мл на 20 г массы тела конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) в фосфатно-солевом буфере (носитель) или 0,2 мл на 20 г массы тела только носителя.

Концентрация ADC была скорректирована, так чтобы вводить следующие дозы:

Конъюгат	Дозы (мг ADC/кг тела)
Конъюгат- Her-1	6, 18, 6 (раз в нед. x 3), 8 (раз в нед. x 3)
Конъюгат- HER-1++	6

Все схемы были приемлемо переносимыми с минимальными потерями в массах тела.

Медианное время до конечной точки (TTE) для контрольных мышей, которым водили носитель, составляло 40,2 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 40 дня (86%) для 80-дневного исследования.

Конъюгат-Her-1: схемы однократного приема 6 и 18 мг/кг привели к максимально возможным задержкам роста опухоли. В схеме однократного приема 6 мг/кг средний объем опухоли для 5 мышей составлял 600 мм³, без видимых регрессионных реакций. В схеме однократного приема 18 мг/кг было десять выживших со средним объемом опухоли 36 мм³. Было 4 частичных регрессии и 6 полных регрессий.

Схемы три недельных дозирования 6 и 8 мг/кг привели к максимально возможным задержкам роста опухоли. В схеме три недельных дозирования 6 мг/кг средний объем опухоли для 9 мышей в конце исследования составил 245 мм³ с двумя частичными регрессиями. В схеме три недельных дозирования 8 мг/кг было десять выживших со средним объемом опухоли 92 мм³. Было 7 частичных регрессий, 3 полные регрессии и 2 выживших без опухолей.

Конъюгат-HER-1++: схема однократного приема 6 мг/кг привела к максимально возможным задержкам роста опухоли. Было десять выживших со средним объемом опухоли 161 мм³. Было 5 частичных регрессий, 5 полных регрессий и 2 выживших без опухолей.

(vii) NCI-N87.

Проанализированные конъюгаты: конъюгат-Her-1, конъюгат-Her-1+, конъюгат-Her-1++ Самкам мышей CB.17 SCID в возрасте восьми недель инъецировали 0,1 мл 1×10^7 клеток NCI-N87 в 50% матригеле подкожно в правый бок. Когда опухоли достигли среднего размера 100-150 мм³, животным начинали

вводить тестируемые соединения. Мышей взвешивали два раза в неделю. Размер опухоли измеряли два раза в неделю. Животные контролировались индивидуально. Конечной точкой эксперимента была опухоль объемом 800 мм³ или 83 день, в зависимости от того, что наступило раньше.

Группам из 10 ксенотрансплантированных мышей внутривенно вводили 0,2 мл на 20 г массы тела конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) в фосфатно-солевом буфере (носитель) или 0,2 мл на 20 г массы тела только носителя.

Концентрация ADC была скорректирована, так чтобы вводить следующие дозы:

Конъюгат	Дозы (мг ADC/кг тела)
Конъюгат- Her-1	6, 18
Конъюгат- HER-1+	3, 6
Конъюгат- HER-1++	1,5, 3

Все схемы были приемлемо переносимыми с минимальными потерями в массах тела.

Медианное время до конечной точки (TTE) для контрольных мышей, которым водили носитель, составляло 36,8 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 46,2 дня (126%) для 80-дневного исследования.

Конъюгат-Her-1: схемы 6 и 18 мг/кг привели к задержке роста опухоли на 45,9 дня (125%) и 46,2 дня (126%). В схеме 6 мг/кг средний объем опухоли для 4 мышей составлял 564 мм³, без видимых регрессионных реакций. В схеме 18 мг/кг было девять выживших со средним объемом опухоли 108 мм³. Было 9 частичных регрессий и 1 полная регрессия.

Конъюгат-HER-1++: схема 1,5 и 3 мг/кг привела к задержке роста опухоли на 45,9 дня (125%) и 46,2 дня (126%). В схеме 1,5 мг/кг было два выживших со средним объемом опухоли 634 мм³. В схеме 3 мг/кг было десять выживших со средним объемом опухоли 451 мм³.

Конъюгат-HER-1+: схемы 3 и 6 мг/кг привели к задержке роста опухоли на 46,2 дня (126%). В схеме 3 мг/кг было семь выживших со средним объемом опухоли 600 мм³. В схеме 6 мг/кг было десять выживших со средним объемом опухоли 256 мм³. Были две частичные регрессии.

(vii) JMT1.

Проанализированные конъюгаты: конъюгат-Her-1, конъюгат-1++.

Самкам мышей CB.17 SCID в возрасте восьми недель инъецировали 0,1 мл 1×10^7 клеток JMT1 в 50% матригеле подкожно в правый бок. Когда опухоли достигли среднего размера 100-150 мм³, животным начинали вводить тестируемые соединения. Мышей взвешивали два раза в неделю. Размер опухоли измеряли два раза в неделю. Животные контролировались индивидуально. Конечной точкой эксперимента был размер опухоли объемом 1000 мм³ или 60 дней, в зависимости от того, что наступило раньше.

Группам из 10 ксенотрансплантированных мышей внутривенно вводили 0,2 мл на 20 г массы тела конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) в фосфатно-солевом буфере (носитель) или 0,2 мл на 20 г массы тела только носителя.

Концентрация ADC была скорректирована, так чтобы вводить следующие дозы:

Конъюгат	Дозы (мг ADC/кг тела)
Конъюгат- Her-1	18, 24
Конъюгат- HER-1++	4, 6, 8

Все схемы были приемлемо переносимыми с минимальными потерями в массах тела.

Медианное время до конечной точки (TTE) для контрольных мышей, которым водили носитель, составляло 37,5 дня, что соответствует максимально возможной отсрочке в росте опухоли (TGD) 22,5 дня (60%) для 60-дневного исследования.

Конъюгат-Her-1: схемы 18 и 24 мг/кг привели к задержке роста опухоли на 5,3 дня (14%) и 3,2 дня (9%). В схеме 18 мг/кг все животные достигли конечной точки 1000 мм³. В схеме 24 мг/кг было одно выжившее животное с объемом опухоли 968 мм³. Обе схемы привели к значительному общему различию выживаемости по сравнению с контролем ($P < 0,01$).

Конъюгат-HER-1++: схема 4, 6 и 8 мг/кг привели к задержке роста опухоли на 4,4 дня (12%), 6,9 дня (18%) и 17,7 дня (47%). В схеме 4 мг/кг все животные достигли конечной точки 1000 мм³. В схеме 6 мг/кг было одно выжившее животное с объемом опухоли 650 мм³. В схеме 8 мг/кг было одно выжившее животное с объемом опухоли 847 мм³. Все схемы привели к значительной общей разнице в выживаемости по сравнению с контролем ($P < 0,01$).

Пример 9. Токсикологический анализ.

Использовали исследование токсичности однократной дозы для определения максимально переносимой дозы (MTD) и профиля безопасности ADC, которыми были конъюгат-R347-1; конъюгат-R347-2; конъюгат-R347-3.

Самцам крыс Спрага-Доули (Envigo, Inc) через хвостовую вену вводили однократную медленную внутривенную болюсную инъекцию ADC. Используемым носителем для разбавления был носитель, содержащий 25 мМ гистидин-HCl, 7% сахарозы, 0,02% полисорбата 80 и имеющий pH 6,0. Во время исследования оценивали различные параметры, включая смертность, физические нагрузки, наблюдения поведения в клетке, массу тела, изменение массы тела, клиническую патологию (клинические химические анализы, гематологию и коагуляцию) и показатели макропатологии. Всех животных усыпляли на 29 день исследования (SD).

Конъюгат-R347-1.

Группа	(мг/кг)	N
2	5	5
4	7	5
6	10	5
8	16	5
10	20	5
12	25	5

Переносимость определяли на основании конечных критериев токсичности, включая незначительные снижения в гематологических параметрах, микроскопические оценки и угнетение костного мозга. На основании микроскопических изменений животных получавших более высокие дозы, максимально переносимую дозу (MTD) у крыс после однократной дозы считали равной 25 мг/кг.

Конъюгат-R347-2.

Группа	Доза (мг/кг)	N
2	2	5
3	5	5
4	8	5

Переносимость определяли на основании конечных критериев токсичности. ADC переносился до 8 мг/кг у крыс после однократного дозирования. Полученные данные включали дозозависимое снижение массы тела и угнетение костного мозга.

Конъюгат-R347-3.

Группа	(мг/кг)	N
5	1	5
9	2,5	5
11	4	5

Переносимость определяли на основании конечных критериев токсичности. ADC переносился до 4 мг/кг у крыс после однократного приема. Результаты включали дозозависимую потерю массы тела и угнетение костного мозга.

Терапевтический индекс.

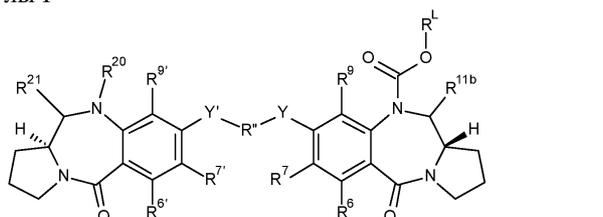
Терапевтический индекс каждого ADC/лекарственное средство линкера рассчитывали с использованием следующего уравнения:

$$TI = MTD \text{ у крыс (мг/кг) / MED в мышинной модели эффективности (мг/кг)}.$$

Линкер лекарственного средства	MTD (мг/кг)	NCI-N87 MED (мг/кг)	TI
1	25	6	4,2
2	8	2	4
3	4	1	4

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемая соль,

где R^6 и R^9 представляют собой H;

R^7 представляет собой C_{1-4} алкоксигруппу;

R'' представляет собой C_{3-12} алкиленовую группу, цепь которой может прерываться бензолом;

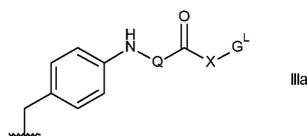
Y и Y' представляют собой O;

R^6 , R^7 , R^9 выбраны из тех же групп, что и R^6 , R^7 и R^9 соответственно;

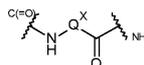
R^{11b} представляет собой OH;

R^L представляет собой линкер для связи с клеточно-связывающим агентом, который выбран из:

(IIIa):

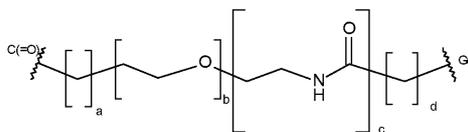


где Q представляет собой



Q^X является таким, что Q представляет собой остаток аминокислоты, дипептидный остаток или трипептидный остаток;

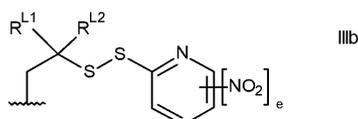
X представляет собой



где $a=0-5$, $b=0-16$, $c=0$ или 1, $d=0-5$;

G^L представляет собой линкер для связи с антителом или его активным фрагментом; и

(IIIb):



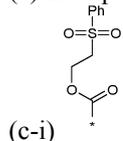
где R^{L1} и R^{L2} независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу;

e равно 0 или 1; и

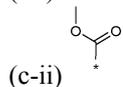
(a) R^{20} представляет собой H и R^{21} представляет собой OH или OR^A , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил; или

(b) R^{20} и R^{21} образуют двойную связь азот-углерод между атомами азота и углерода, с которыми они связаны; или

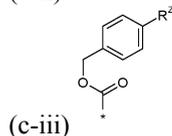
(c) R^{21} представляет собой OH или OR^A , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил и R^{20} выбран из:



(c-i)

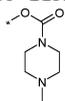


(c-ii)



(c-iii)

где R^Z выбран из:



(z-i)

(z-ii) $OC(=O)CH_3$;

(z-iii) NO_2 ;

(z-iv) OMe ;

(z-v) глюкоронида;

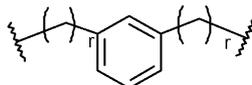
(z-vi) $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-R^{ZC}$, где $-C(=O)-X_1-NH-$ и $-C(=O)-X_2-NH-$ представляют собой природные аминокислотные остатки и R^{ZC} выбран из Me , OMe , OCH_2CH_2OMe .

2. Соединение по п.1, в котором

R'' представляет собой:

(i) C_{3-7} алкиленовую группу, цепь которой может прерываться бензолом; или

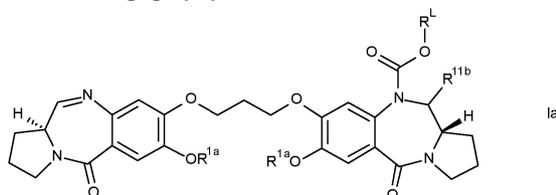
(ii) группу формулы



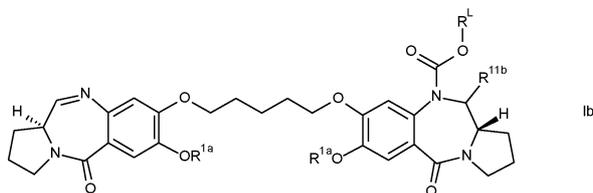
где $г$ равно 1 или 2.

3. Соединение по любому из пп.1, 2, в котором R^{20} и R^{21} образуют двойную связь азот-углерод между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.

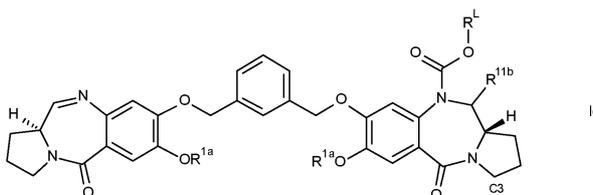
4. Соединение по п.1, имеющее формулу Ia, Ib или Ic:



Ia



Ib



Ic

где R^{1a} представляет собой метил;

R^L и R^{11b} являются такими, как определено в п.1.

5. Соединение по любому из пп.1-4, в котором R^L имеет формулу Ша и Q представляет собой дипептидный остаток, выбранный из:

$CO-Phe-Lys-NH$,
 $CO-Val-Ala-NH$,
 $CO-Val-Lys-NH$,
 $CO-Ala-Lys-NH$,
 $CO-Val-Cit-NH$,
 $CO-Phe-Cit-NH$,
 $CO-Leu-Cit-NH$,
 $CO-Ile-Cit-NH$,
 $CO-Phe-Arg-NH$ и
 $CO-Trp-Cit-NH$.

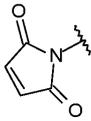
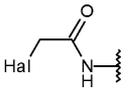
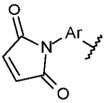
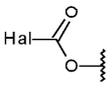
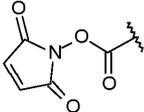
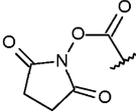
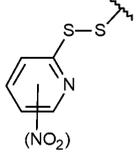
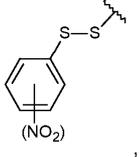
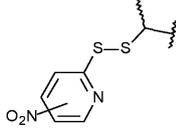
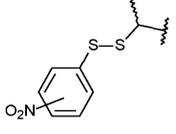
6. Соединение по любому из пп.1-5, в котором:

a) R^L имеет формулу Ша и a равно 0; и/или

b) R^L имеет формулу Ша и b равно от 0 до 8; и/или

c) R^L имеет формулу Ша и d равно 2.

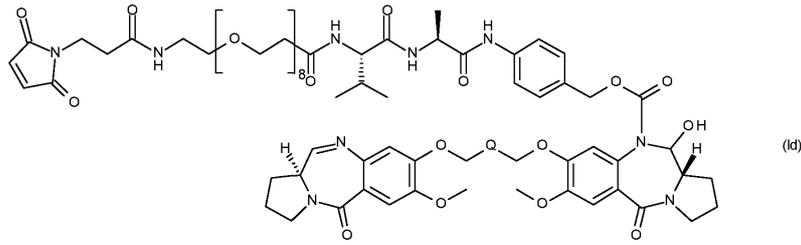
7. Соединение по любому из пп.1-6, в котором R^L имеет формулу Ша и G^L выбран из:

(G ^{L1-1})		(G ^{L4})	 где Hal = I, Br, Cl
(G ^{L1-2})		(G ^{L5})	
(G ^{L2})		(G ^{L6})	
(G ^{L3-1})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L7})	
(G ^{L3-2})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L8})	
(G ^{L3-3})	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L9})	
(G ^{L3-4})	 где группа NO ₂ является необязательной		

где Ar представляет собой C₅₋₆ариленовую группу.

8. Соединение по п.7, в котором G^L представляет собой G^{L1-1} .

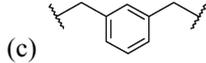
9. Соединение по п.1, в котором соединение имеет формулу Id



где Q выбран из:

(a) $-\text{CH}_2-$;

(b) $-\text{C}_3\text{H}_6-$ и

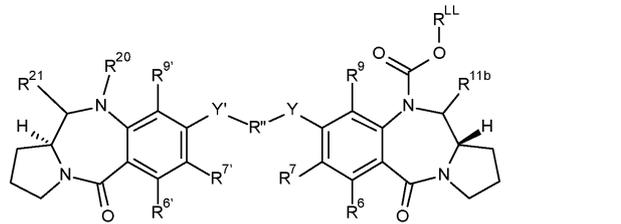


10. Конъюгат формулы (II)



где L представляет собой антитело или его активный фрагмент;

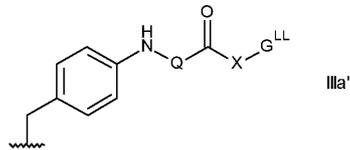
D^L представляет собой фрагмент линкера лекарственного соединения формулы I'



где R^6 , R^7 , R^9 , R^{11b} , Y, R'' , Y' , R^6 , R^7 , R^9 , R^{20} и R^{21} являются такими, как определено в любом из пп.1-4;

R^{LL} представляет собой линкер для соединения с клеточно-связывающим агентом, который выбран из:

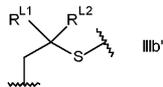
(IIIa):



где Q и X являются такими, как определено в любом из пп.1 и 6; и

G^{LL} представляет собой линкер, связанный с антителом или его активным фрагментом; и

(IIIb):



где R^{L1} и R^{L2} являются такими, как определено в п.1;

p равно целому числу от 1 до 20.

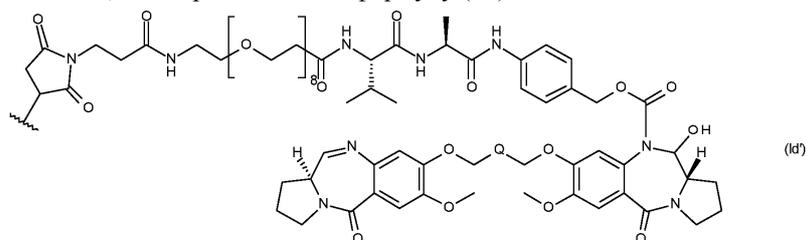
11. Конъюгат по п.10, в котором G^{LL} выбран из:

(G ^{LL1-1})		(G ^{LL6})	
(G ^{LL1-2})		(G ^{LL7})	
(G ^{LL2})		(G ^{LL8-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL4})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL5})			

где Ar представляет собой C₅₋₆ариленовую группу.

12. Конъюгат по п.11, в котором G^{LL} представляет собой G^{LL1-1}.

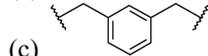
13. Конъюгат по п.10, в котором D^L имеет формулу (Id')



где Q выбран из:

(a) -CH₂-;

(b) -C₃H₆- и



14. Конъюгат по любому из пп.10-13, в котором фрагмент лиганда представляет собой антитело или его активный фрагмент, которые связываются с одним или более опухолеассоциированными антигенами или рецепторами клеточной поверхности, выбранными из (1)-(88):

- (1) Bmpr1b;
- (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) CRIPTO;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;
- (16) FcRH2;
- (17) HER2;
- (18) NCA; (19) MDP;
- (20) IL20R-alpha;
- (21) Бревикан;
- (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) антигены, специфические для 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 Mindin - Mindin/RG-1;
- (70) B7-H4-VTCN1;
- (71) PTK7;
- (72) CD37;
- (73) CD138-SDC1;
- (74) CD74;
- (75) Клаудины - CL;
- (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) Аннексин А1 - ANXA1;
- (88) V-CAM (CD106)-VCAM1.

15. Конъюгат по любому из пп.10-14, в котором p равно целому числу от 1 до 8.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп.10-15 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

17. Применение конъюгата по любому из пп.10-15 или фармацевтической композиции по п.16 для лечения рака у субъекта.

