

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 038662

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.30

(21) Номер заявки
201990615

(22) Дата подачи заявки
2017.10.13

(51) Int. Cl. A61K 47/68 (2017.01)
C07H 7/06 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ПИРРОЛОБЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ

(31) 1617466.6

(32) 2016.10.14

(33) GB

(43) 2019.08.30

(86) PCT/EP2017/076162

(87) WO 2018/069490 2018.04.19

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

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

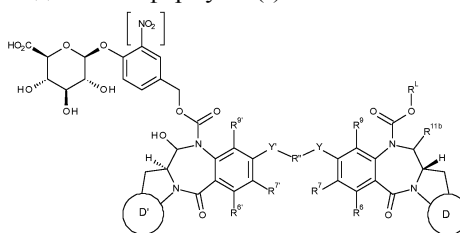
(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2015052322
WO-A1-2013055987
WO-A1-2016037644

KAMAL A. ET AL.: "Pyrrolo[2,1-e]
[1,4]benzodiazepine-beta-glucuronide prodrugs with
a potential for selective therapy of solid
tumors by PMT and ADEPT strategies",
BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY
LETTERS, PERGAMON, AMSTERDAM, NL,
vol. 18, no. 13, 1 July 2008 (2008-07-01),
pages 3769-3773, XP022716296, ISSN: 0960-894X,
DOI: 10.1016/J.BMCL.2008.05.038 [retrieved on
2008-06-12], abstract, figure 2; compound 15a,
Scheme 3

WO-A1-2013055990

(57) Изобретение относится к соединению формулы (I)



и его конъюгатам.

B1

038662

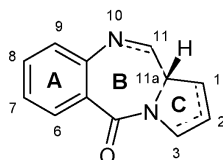
038662

B1

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

Уровень техники

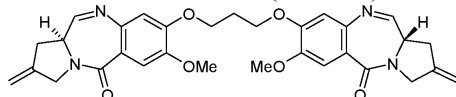
Некоторые пирролобензодиазепины (PBD) обладают способностью распознавать и связываться с определенными последовательностями ДНК; предпочтительной последовательностью является PuGpu. Первый PBD противоопухолевый антибиотик, антрамицин, открыт в 1965 году (Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (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 58-180487; 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)), протракарин (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 правостороннее 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, Нью-Йорк, р. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Их способность образовывать аддукт в малой бороздке обеспечивает возможность влиять на процессинг ДНК, вследствие чего их используют в качестве противоопухолевых агентов.

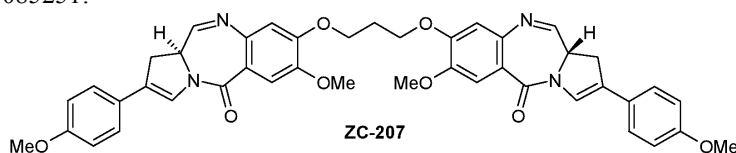
Ранее было описано, что биологическая активность указанных молекул может быть усилена посредством соединения двух звеньев PBD друг с другом через их C8/C'-гидроксильные функциональные группы посредством гибкого алкиленового линкера (Bose, D.S., et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 4939-4941 (1992); Thurston, D.E., et al., J. Org. Chem., 61, 8141-8147 (1996)). Димеры PBD предположительно образуют последовательность-селективные повреждения ДНК, такие как палиндромная 5'-Pu-GATC-Py-3' межнитевая 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.

Одним из примеров димера PBD является SG2000 (SJG-136):

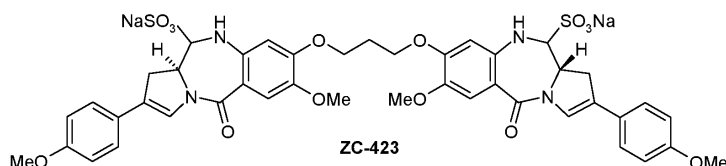


(Gregson, S., et al., J. Med. Chem., 44, 737-748 (2001); Alley, M.C., et al., Cancer Research, 64, 6700-6706 (2004); Hartley, J.A., et al., Cancer Research, 64, 6693-6699 (2004)), который исследовали в клинических испытаниях в качестве отдельного агента, например NCT02034227, изучая его применение при 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):



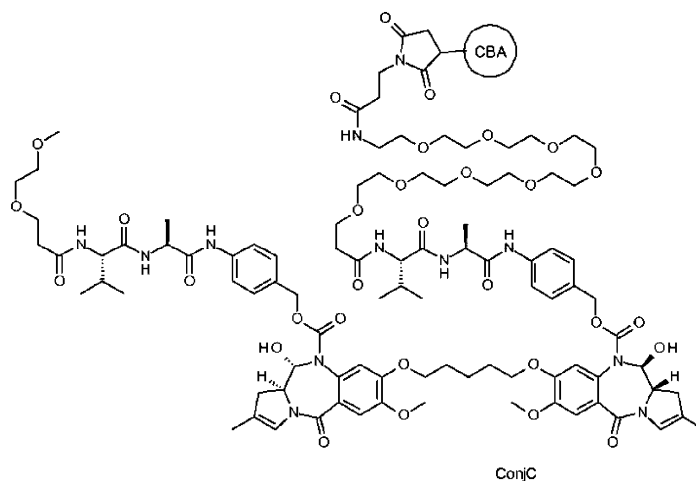
Было показано, что данные соединения являются весьма подходящими цитотоксическими агентами (Howard, P.W., et al., *Bioorg. Med. Chem.* (2009), doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.012).

В WO 2007/085930 описано получение димерных соединений PBD, содержащих линкерные группы для связи с клеточно-связывающим агентом (СВА), таким как антитело. Указанный линкер находится в мостиковой связи мономерных звеньев 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. Если несвязанное положение N10 защищено кэп-группой, то иллюстративные кэп-группы имеют такой же триггер расщепления, как линкер, связанный с антителом.

В WO 2014/057074 описаны два специфических димерных конъюгата PBD, связанных через положение N10 в одном мономере, причем другой мономер PBD находится в иминной форме.

В WO 2015/052322 описан специфический димерный конъюгат PBD, связанный через положение N10 в одном мономере, причем другой мономер PBD находится в иминной форме. Описан также специфический димерный конъюгат PBD, связанный через положение N10 в одном мономере, причем другой мономер PBD содержит кэп-группу с таким же триггером расщепления, как линкер, связанный с антителом:



Сущность изобретения

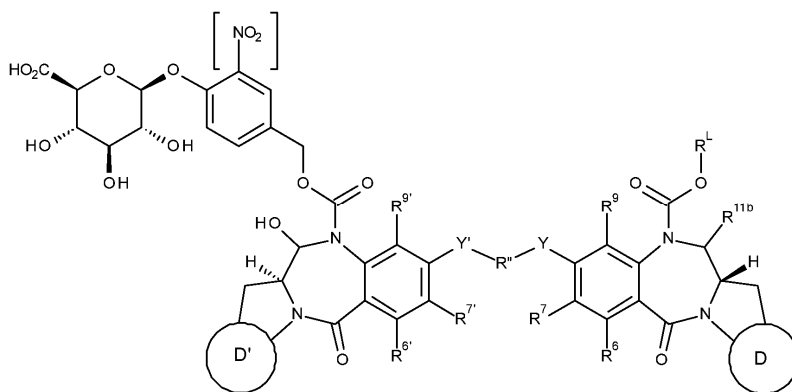
В данном изобретении предложены PBD и родственные димерные конъюгаты, в которых группа N10-C11, не связанная со звеном лиганда, представляет собой β -глюкуронидную кэп-группу. Триггер расщепления связи указанного звена линкера со звеном лиганда отщепляется не по глюкурониду.

Использование глюкуронидного кэп-звена в указанных конъюгатах предположительно имеет преимущество, поскольку при отщеплении конъюгата от антитела за пределами клетки-мишени высвобожденное защищенное соединение остается неактивным, поскольку оно не может проникать через клеточные мембраны вследствие своей гидрофильности.

В данном изобретении также предложены PBD и родственные димерные линкеры лекарственного соединения, пригодные для конъюгации со звеном лиганда, где группа N10-C11, не предназначенная для связывания со звеном лиганда, представляет собой глюкуронидную кэп-группу. Триггер расщепления связи указанного звена линкера не является глюкуронидным кэп-звеном.

Использование глюкуронидного кэп-звена в указанных линкерах лекарственных соединений предположительно имеет преимущество, поскольку оно увеличивает гидрофильность в целом гидрофобного линкера лекарственного соединения, упрощая конъюгацию линкеров лекарственных соединений со звеном лиганда.

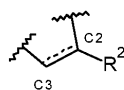
Первый аспект данного изобретения включает соединение формулы I



и его соль,

где квадратные скобки означают, что группа NO₂ является необязательной;

D означает группу D1:



D1

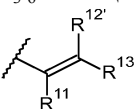
пунктирная линия означает необязательное наличие двойной связи между C2 и C3;

при наличии двойной связи между C2 и C3 R² выбран из группы, состоящей из:

(ia) C₅₋₁₀арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген; нитро; циано; OR, где R представляет собой C₁₋₇алкил; карбокси; C(O)OR, где R представляет собой C₁₋₇алкил, C₃₋₂₀гетероцикл или C₅₋₂₀арил; C₁₋₇алкил, C₃₋₇гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃алкилен;

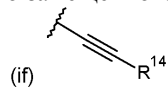
(ib) C₁₋₅насыщенного алифатического алкила;

(ic) C₃₋₆насыщенного циклоалкила;

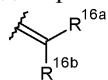


(id) , где каждый из R¹¹, R¹² и R¹³ независимо выбран из H, C₁₋₃насыщенного алкила, C₂₋₃алкенила, C₂₋₃алкинила и циклопропила, и общее количество атомов углерода в группе R² составляет не более 5;

(ie) , где один из R^{15a} и R^{15b} представляет собой H, а другой выбран из фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

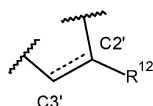


(if) , где R¹⁴ выбран из H; C₁₋₃насыщенного алкила; C₂₋₃алкенила; C₂₋₃алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; при наличии одинарной связи между C2 и C3,



R² выбран из H, OH, F, diF и , где R^{16a} и R^{16b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄насыщенного алкила, C₂₋₃алкенила, причем указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C₁₋₄алкиламида и сложного C₁₋₄алкилового эфира; или если один из R^{16a} и R^{16b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C₁₋₄алкилового эфира;

D' представляет собой группу D'1:



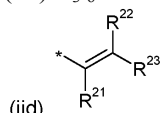
D'1

где пунктирная линия означает необязательное наличие двойной связи между C2' и C3'; при наличии двойной связи между C2' и C3' R¹² выбран из группы, состоящей из:

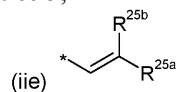
(iia) C₆₋₁₀арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей галоген; нитро; циано; OR, где R представляет собой C₁₋₇алкил; карбокси; C(O)OR, где R представляет собой C₁₋₇алкил, C₃₋₂₀гетероцикл или C₅₋₂₀арил; C₁₋₇алкил, C₃₋₇гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃алкилен;

(iib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;

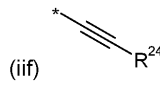
(iic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;



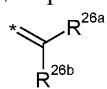
(iia) C^* , где каждый из R²¹, R²² и R²³ независимо выбран из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила, и общее количество атомов углерода в группе R¹² составляет не более 5;



(iie) C^* , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила; и



(iif) C^* , где R²⁴ выбран из H; C₁₋₃ насыщенного алкила; C₂₋₃ алкенила; C₂₋₃ алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила; при наличии одинарной связи между C2' и C3';



R¹² выбран из H, OH, F, diF и C^* где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, причем указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C₁₋₄ алкиламида и сложного C₁₋₄ алкилового эфира; или если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C₁₋₄ алкилового эфира;

R⁶ и R⁹ представляют собой H;

где R и R' независимо выбраны из C₁₋₄ алкильной группы, C₅₋₆ арильной группы и азотсодержащих C₆-гетероциклов;

R⁷ представляет собой OR;

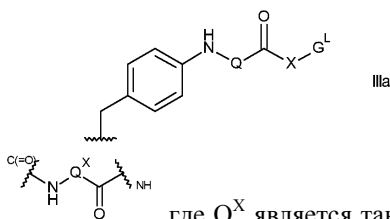
R'' представляет собой C₃₋₁₂ алкиленовую группу, цепь которой может прерываться одним или более гетероатомами, выбранными из O, и/или бензольное кольцо;

Y и Y' выбраны из O, S или NH;

R⁶, R⁷, R⁹ выбраны из таких же групп, как R⁶, R⁷ и R⁹ соответственно;

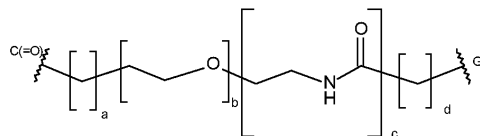
R^{11b} выбран из OH, OR^A, где R^A представляет собой C₁₋₄ алкил; и

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



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

X представляет собой



где a = от 0 до 5, b = от 0 до 16, c = 0 или 1, d = от 0 до 5;

G^L выбран из:

(G ^{L1-1})		(G ^{L1-2})	
(G ^{L2})		(G ^{L6})	

где Ar представляет собой C₅₋₆ риленовую группу, при этом C₃₋₂₀ гетероциклическое кольцо содержит от 3 до 20 кольцевых атомов, из которых от 1 до 10 представляют собой гетероатомы, выбранные из O, S или N;

при этом C_{3-7} -гетероцикл содержит от 3 до 7 кольцевых атомов, из которых от 1 до 2 представляют собой гетероатомы, выбранные из O, S или N;

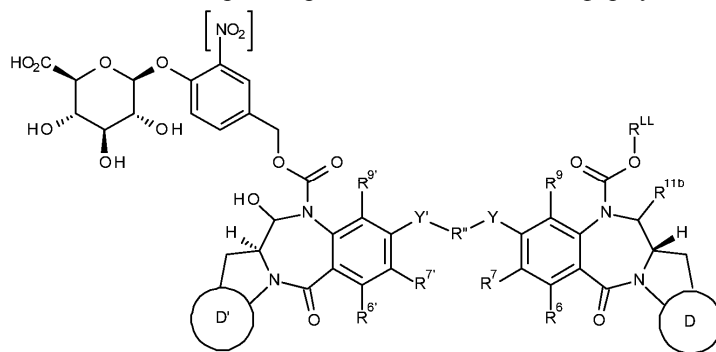
при этом азотсодержащий C_6 -гетероцикл содержит 6 кольцевых атомов, из которых от 1 до 2 представляют собой N.

Во втором аспекте данного изобретения предложены конъюгаты формулы I



где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

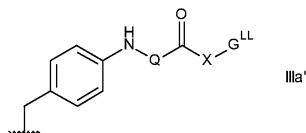
D^L представляет собой звено линкера лекарственного соединения формулы I'



где D, R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , R^{11b} , Y, R'' , Y' , D' , R^6' , R^7' , R^9' и R^{12} (включая наличие или отсутствие двойных связей между C2 и C3, и C2' и C3' соответственно) являются такими, как определено в первом аспекте данного изобретения;

где p представляет собой целое число от 1 до 20;

R^{LL} представляет собой линкер для связи с указанным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который представляет собой



где Q и X являются такими, как определено в первом аспекте; и

G^{LL} выбран из:

(G^{LL1-1})		(G^{LL1-2})	
(G^{LL2})			

где Ag представляет собой C_5 -ариленовую группу.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, более подробно описанные ниже, представляют собой нацеливающий агент, который связывается с фрагментом-мишенью. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может специфически связываться с клеточным компонентом (клеточно-связывающий агент) или с другими молекулами-мишенями, представляющими интерес.

В третьем аспекте данного изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая смесь конъюгатов по второму аспекту данного изобретения, в которой среднее значение p в указанной смеси соединений-конъюгатов составляет от 1 до 8. В четвертом аспекте данного изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по второму аспекту данного изобретения и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество. В пятом аспекте данного изобретения предложено применение конъюгата по второму аспекту данного изобретения или фармацевтической композиции по четвертому аспекту данного изобретения для лечения рака у субъекта.

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

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано изменение жизнеспособности клеток SKOV3 после инкубации с конъюгатом по данному изобретению.

На фиг. 2 показано изменение жизнеспособности клеток SKOV3 после инкубации с другим

конъюгатом по данному изобретению;

На фиг. 3 показано изменение объема ксенотрансплантата опухоли NCI-N87 после лечения другим конъюгатом по данному изобретению.

На фиг. 4 показано изменение объема ксенотрансплантата опухоли JMT-1 после обработки тем же конъюгатом по данному изобретению, как на фиг. 3.

Определения

Заместители.

Выражение "необязательно замещенная" 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 так же хорошо известны способы их получения и внедрения в различные исходные группы.

Примеры заместителей более подробно описаны ниже.

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 эпициклическим, 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 эпициклическим и которое может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Таким образом, термин "алкил" включает подклассы алкинила, алкинила, циклоалкила и т.д., рассмотренные ниже.

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

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

Примеры ненасыщенных разветвленных алкильных групп включают изопропил-(C₃), изобутил-(C₄), втор-бутил-(C₄), трет-бутил-(C₄), изопентил-(C₅) и неопентил-(C₆).

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

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

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

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

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 (карбоциклического) 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:

циклопропана (C₃), циклобутана (C₄), циклопентана (C₅), циклогексана (C₆), циклогептана (C₇), метилциклопропана (C₄), диметилциклопропана (C₅), метилциклобутана (C₅), диметилциклобутана (C₆), метилциклопентана (C₆), диметилциклопентана (C₇) и метилциклогексана (C₇);

ненасыщенных моноциклических углеводородных соединений: циклопропена (C₃), циклобутена (C₄), циклопентена (C₅), циклогексена (C₆), метилциклопропена (C₄), диметилциклопропена (C₅), метилциклобутена (C₅), диметилциклобутена (C₆), метилциклопентена (C₆), диметилциклопентена (C₇) и метилциклогексена (C₇); и

насыщенных полициклических углеводородных соединений: норкарана (C₇), норпинана (C₇), норборнана (C₇).

Термин "C₃₋₂₀гетероцикл" 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 "C_{5,6}гетероцикл" 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: азиридина (C₃), азетидина (C₄), пирролидина (тетрагидропиррола) (C₅), пирролина (например, 3-пирролина, 2,5-дигидропиррола) (C₅), 2Н-пиррола или 3Н-пиррола (изопиррола, изоазола) (C₅), пиперидина (C₆), дигидропиперидина (C₆), тетрагидропиперидина (C₆), азепина (C₇);

O₁: оксирана (C₃), оксетана (C₄), оксолана (тетрагидрофурана) (C₅), оксола (дигидрофурана) (C₅), океана (тетрагидропирана) (C₆), дигидропирана (C₆), пирана (C₆), оксепина (C₇);

S₁: тирана (C₃), тиетана (C₄), тиолана (тетрагидротииофена) (C₅), тиана (тетрагидротииопирана) (C₆), тиепана (C₇);

O₂: диоксолана (C₅), диоксана (C₆) и диоксепана (C₇);

O₃: триоксана (C₆);

N₂: имидазолидина (C₅), пиразолидина (диазолидина) (C₅), имидазолина (C₅), пиразолина (дигидропиразола) (C₅), пиперазина (C₆);

N₁O₁ тетрагидрооксазола (C₅), дигидрооксазола (C₅), тетрагидроизоксазола (C₅), дигидроизоксазола (C₅), морфолина (C₆), тетрагидрооксазина (C₆), дигидрооксазина (C₆), оксазина (C₆);

N₁S₁: тиазолина (C₅), тиазолидина (C₅), тиомофролина (C₆);

N₂O₁: оксадиазина (C₆);

O₁S₁: оксатиола (C₅) и оксатиана (тиоксана) (C₆);

N₁O₁S₁: оксатиазина (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.

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 "C₅₋₆ арил" 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 аценантрена (C₁₆).

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: пиррола (азола) (C₅), пиридина (азина) (C₆);

O₁: фурана (оксола) (C₅);

S₁: тииофена (тиола) (C₅);

N₁O₁: оксазола (C₅), изоксазола (C₅), изоксазина (C₆);

N₂O₁: оксадиазола (фуразана) (C₅);

N₃O₁: оксатриазола (C₅);

N₁S₁: тиазола (C₅), изотиазола (C₅);

N₂: имидазола (1,3-диазола) (C₅), пиразола (1,2-диазола) (C₅), пиридазина (1,2-диазина)

(C₆), пиримидина (1,3-диазина) (C₆) (например, цитозина, тимина, урацила), пиразина (1,4-диазина) (C₆);

N₃: триазола (C₅), триазина (C₆);

N₄: тетразола (C₅).

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

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

C₁₀ (с 2 конденсированными кольцами), полученные из хромена (O₁), изохромена (O₁), хромана (O₁), изохромана (O₁), бензодиксоана (O₂), хинолин а (N₁), изохинолина (N₁), хинолизина (N₁), бензоксазина (N₁O₁), бензодиазина (N₂), пиридопиридина (N₂), хиноксалина (N₂), хиназолина (N₂), циннолина (N₂), фалазина (N₂), нафтиридина (N₂), птеридина (N₄);

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

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

C₁₄ (с 3 конденсированными кольцами), полученные 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.

Гидроксильная: -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 C₃₋₂₀гетероциклическоксигруппа) 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(iBu) (изобутокси) и -O(tBu) (трет-бутокси).

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

Сложный эфир (карбоксилат, сложный эфир карбоновой кислоты, оксикарбонил): -C(=O)OR, где R представляет собой заместитель сложного эфира, например C₁₋₇алкильную группу, C₃₋₂₀гетероциклическую группу или C₅₋₂₀арильную группу, предпочтительно C₁₋₇алкильную группу. Примеры сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются этим, -C(=O)OCH₃, -C(=O)OCH₂CH₃, -C(=O)OC(CH₃)₃ и -C(=O)OPh.

Нитро: -NO₂.

Циано (нитрил, карбонитрил): -CN.

Алкилен.

C₃₋₁₂алкилен: Термин "C₃₋₁₂алкилен" 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 эпициклическим, 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 C₃₋₁₂алкиленовых групп включают, но не ограничиваются этим, -(CH₂)_n-, где n представляет собой целое число от 3 до 12, например, -CH₂CH₂CH₂- (пропилен), -CH₂CH₂CH₂CH₂- (бутилен), -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- (пентилен) и -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- (гептилен).

Примеры разветвленных насыщенных C₃₋₁₂алкиленовых групп включают, но не ограничиваются этим, -CH(CH₃)CH₂-, -CH(CH₃)CH₂CH₂-, -CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH(CH₃)CH₂-, -CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂-, -CH(CH₂CH₃)-, -CH(CH₂CH₃)CH₂- и -CH₂CH(CH₂CH₃)CH₂-.

Примеры линейных частично ненасыщенных C₃₋₁₂алкиленовых групп (C₃₋₁₂алкениленовых и алкиниленовых) групп включают, но не ограничиваются этим, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH=CH-, -CH=CH-CH=CH-CH₂-, -CH=CH-CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH=CH-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH=CH- и -CH₂-C≡C-CH₂-.

Примеры разветвленных частично ненасыщенных C₃₋₁₂алкиленовых групп (C₃₋₁₂алкениленовых и алкиниленовых групп) включают, но не ограничиваются этим, -C(CH₃)=CH-, -C(CH₃)=CH-CH₂-, -CH=CH-CH(CH₃)- и -C≡C-CH(CH₃)-.

Примеры эпициклических насыщенных C₃₋₁₂алкиленовых групп (C₃₋₁₂циклоалкиленов) включают,

но не ограничиваются этим, циклопентилен (например, циклопент-1,3-илен) и циклогексилен (например, циклогекс-1,4-илен).

Примеры эпициклических 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).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Антитело или фрагмент антитела может содержать 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 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 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 антител или их антигенсвязывающих фрагментов включают агенты, описанные для применения в WO 2007/085930, включенном в данный документ.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой клеточно-связывающий агент, который связывается с внеклеточной мишенью на клетке. Так, в одном варианте реализации данного изобретения предложен конъюгат антитело-лекарственное соединение (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, транспортирующие питательные вещества, или любую другую клеточно-связывающую молекулу или вещество..

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 переменную 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 эпитоп-связывающие 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 другому 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 варибельного домена, полученные из примата, не являющегося человеком (например, мартышковы или человекообразных обезьян), и последовательности константной области человека.

"Интактное антитело" в данном контексте представляет собой антитело, содержащее домены V_L и V_H , 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 , δ , 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".

"Гуманизованное антитело" относится к пептиду, содержащему по меньшей мере часть модифицированной варибельной области человеческого антитела, в которой часть указанной варибельной области, предпочтительно часть, которая значительно меньше интактного человеческого варибельного домена, замещена соответствующей последовательностью из нечеловеческих видов, и при этом указанная модифицированная варибельная область связана по меньшей мере с другой частью другого белка, предпочтительно с константной областью человеческого антитела. Выражение "гуманизованные антитела" 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 "прививание CDR", "направленный выбор", "деиммунизацию", "изменение поверхности" (также известное как "рекомбинация поверхностных остатков"), "композиционные антитела", "оптимизацию состава человеческой цепочки" и перестановку в каркасе.

Прививание CDR.

В данной технологии гуманизированные 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 антигена).

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 выбор.

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 выбирают по отношению к рассматриваемому антигену. Такой выбранный 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 (п.У.), 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 2008/0206239 A1.

Деиммунизация.

Указанный способ включает удаление эпитопов Т-клетки человека (или других вторичных видов) из V областей терапевтического антитела (или другой молекулы). Последовательность V -областей 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. (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 процессирующих 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 варибельной области нечеловеческого антитела;

(b) создание выравнивания последовательностей с применением распределений относительной доступности на основании рентгеновских кристаллографических структур достаточного количества тяжелых и легких цепей варибельной 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, определенной на стадии (c), причем тяжелая и легкая цепи из человеческого антитела являются или не являются естественным образом спаренными;

(e) замещение в аминокислотной последовательности нечеловеческого антитела, подлежащего гуманизации, поверхности набора тяжелой и легкой цепей, подверженной действию аминокислотных остатков, определенной на стадии (c), 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 (e);

(g) идентификацию, посредством сравнения трехмерных моделей, построенных на стадиях (a) и (f), любых аминокислотных остатков из наборов, идентифицированных на стадиях (c) или (d), которые находятся в пределах 5 ангстрем от любого атома любого остатка 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 (a) 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 2005/079479 A2.

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 гибридуруют внутри рамки с пулами кДНК, включающими все известные каркасы тяжелой и легкой цепи 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) VMPIB (рецептор костного морфогенетического белка типа IV).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа NM_001203.

Genbank, версия номер NM_001203.2 GI:169790809.

Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:06 после полудня (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:

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

(2) E16 (LAT1, SLC7A5).

Нуклеотид:

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. (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; страница 127-129); WO 2002/86443 (п.27; страницы 222, 393); WO 2003/003906 (п.10; страница 293); WO 2002/64798 (п.33; страница 93-95); WO 2000/14228 (п.5; страница 133-136); US 2003/224454 (фиг. 3); WO 2003/025138 (п.12; страница 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. U.S.A.* 96(25):4523-14528); 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; страница 618-619); WO 2003/022995 (Пример 9; фиг. 13A, Пример 53; страница 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., 07:56 до полудня (дп).

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAK74120.

Genbank, версия номер AAK74120.3 GI:34501467.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 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; страница 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. U.S.A.* 96 (20):11531-11536 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1):136-140 (1996), *J. Biol. Chem.* 270 (37):21984-21990 (1995); WO 2003/101283 (п.14); (WO 2002/102235 (п.13; страница 287-288); WO 2002/101075 (п.4; страница 308-309); WO 2002/71928 (страница 320-321); WO 94/10312 (страница 52-57); IM:601051.

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPPIb, 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; страница 326); EP 0875569 (п.1; страница 17-19); WO 2001/57188 (п.20; страница 329); WO 2004/032842 (Пример IV); WO 2001/75177 (п.24; страница 139-140); MIM:604217.

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Nlog семафорина 5b, домен sema, 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; страница 50); WO 2001/88133 (п.1; страница 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); EP1347046 (п.1); WO 2003/025148 (п.20); GI:37182378.

(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., 02:26 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAR32295.

Genbank, версия номер AAR32295.1 GI:30526095.

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

Перекрестные ссылки:

Nakamura 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; страница 144); WO 2001/98351 (п.1; страница 124-125); EP 0522868 (п.8; фиг. 2); WO 2001/77172 (п.1; страница 297-299); US 2003/109676; US 6518404 (фиг. 3); US5773223 (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; страница 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., 01:54 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAN04080.

Genbank, версия номер AAN04080.1 GI:22655488.

Genbank, дата обновления записи: 11 марта, 2010 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; страница 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 транзитного 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; страница 100-103); WO 2002/10382 (п.1; фиг. 9A); WO 2003/042661 (п.12); WO 2002/30268 (п.27; страница 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., 02:57 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_003203.

Genbank, версия номер NP_003203.1 GI:4507425.

Genbank, дата обновления записи: 23 сентября, 2012 г., 02:57 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; страница 52-53); WO 2003/024392 (п.2; фиг. 58); WO 2002/16413 (п.1; страница 94-95, 105); WO 2002/22808 (п.2; фиг. 1); US 5854399 (Пример 2; кол. 17-18); US 5792616 (фиг. 2); MIM: 187395.

(14) CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2) или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барра) или Hs. 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); образец: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

(15) CD79b (CD79B, CD79/3, 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 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_000617.

Genbank, версия номер NP_000617.1 GI:11038674.

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

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, страница 102); WO 2003/062401 (п.9); WO 2002/78524 (Пример 2); US 2002/150573 (п.5, страница 15); US5644033; WO 2003/048202 (п.1, страницы 306 и 309); WO 99/58658, US 6534482 (п.13, фиг. 17A/B); WO 2000/55351 (п.11, страницы 1145-1146); MIM: 147245.

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (домен SH2, содержащий якорный белок фосфатазы 51a), 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; страница 95-107); WO 2002/12341 (п.68; фиг. 7); WO 2002/13847 (страница 71-74); WO 2002/14503 (страница 114-117); WO 2001/53463 (п.2; страница 41-46); WO 2001/41787 (страница 15); WO 2000/44899 (п.52; фиг. 7); WO 2000/20579 (п.3; фиг. 2); US5869445 (п.3; кол. 31-38); WO 9630514 (п.2; страница 56-61); EP1439393 (п.7); WO 2004/043361 (п.7); WO 2004/022709; WO 2001/00244 (Пример 3; фиг. 4); образец: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.

Антитела

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.

Biogen: US 20100119511.

Например, номера доступа ATCC: PTA-10355, PTA-10356, PTA-10357, PTA-10358.

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 В1В65B03 (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).

Пертузумаб (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 цепей 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 дезамидированный 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: антитело TrasGEX <http://www.glycoptope.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. U.S.A. 99:16899-16903, 2002; WO 2004/063709; EP1439393 (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; страница 427); WO 2002/60317 (п.2); образец: 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; страница 85- 87); JP05003790 (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; EP1394274 (Пример 11); US 2004/005320 (Пример 5); WO 2003/029262 (страница 74-75); WO 2003/002717 (п.2; страница 63); WO 2002/22153 (страница 45-47); US 2002/042366 (страница 20-21); WO 2001/46261 (страница 57-59); WO 2001/46232 (страница 63-65); WO 98/37193 (п.1; страница 55-59); образец: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.
- (21) Brevican (BCAN, 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, Tуго5).

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 2003042661 (п.12); WO 200053216 (п.1; страница 41); WO 2004065576 (п.1); WO 2004020583 (п.9); WO 2003004529 (страница 128-132); WO 200053216 (п.1; страница 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 г., 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; страница 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; страница 45-46); WO 2002/06317 (Пример 2; страница 320-321, п.34; страница 321-322); WO 2002/71928 (страница 468-469); WO 2002/02587 (Пример 1; фиг. 1); WO 2001/40269 (Пример 3; страницы 190-192); WO 2000/36107 (Пример 2; страница 205-207); WO 2004/053079 (п.12); WO 2003/004989 (п.1); WO 2002/71928 (страница 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 CAB97347.1 GI:9367212.

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; EP1394274 (Пример 11); US 2004/018553 (п.17); WO 2003/008537 (п.1); WO 2002/81646 (п.1; страница 164); WO 2003/003906 (п.10; страница 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; страница 97); WO 98/51824 (п.10; страница 94); WO 98/40403 (п.2; фиг. 1B); образец: 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 AAP14954.

Genbank, версия номер AAP14954.1 GI:30102449.

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

Перекрестные ссылки:

AP14954 lipoma HMGIC fusion-partnerlike protein /pid=AAP14954.1 - 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 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO 2004/058309; WO 2004/011611; WO 2003/045422 (Пример; страница 32-33); WO 2003/014294 (п.35; фиг. 6B); WO 2003/035846 (п.70; страница 615-616); WO 2002/94852 (кол. 136-137); WO 2002/38766 (п.3; страница 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 BAV15489.

Genbank, версия номер BAV15489.1 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.

Антигела

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

Эпратузумаб - 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, передает сигнал, участвующий в дифференцировке В-клеток), pI: 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, страницы 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 развития СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза); 372 аа, рI: 8,54 ММ: 41959 ТМ: 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); US 6555339 (Пример 2); WO 2002/61087 (фиг. 1); WO 2001/57188 (п.20, страница 269); WO 2001/72830 (страницы 12-13); WO 2000/22129 (Пример 1, страницы 152-153, пример 2, страницы 254-256); WO 99/28468 (п.1, страница 38); US5440021 (Пример 2, кол. 49-52); WO 94/28931 (страницы 56-58); WO 92/17497 (п.7, фиг. 5); Dobner et al. (1992), Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al. (1995), Biochem. J. 309:773-779.

(30) HLA-DOB (бета-субъединица молекулы II класса МНС (антиген Ia), которая связывает пептиды и предоставляет их в лимфоциты CD4+ T; 273 аа, рI: 6,56, ММ: 30820.ТМ: 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 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_002111.

Genbank, версия номер NP_002111.1 GI:4504403.

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

Перекрестные ссылки:

Tonnelle et al. (1985), EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al. (1989), Immunogenetics, 29(6):411-413; Beck et al. (1992), J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci USA, 99:16899-16903; 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 99/5865 (п.13, фиг. 15); US 6153408 (кол. 35-38); US 5976551 (кол. 168-170); US 6011146 (кол. 145-146); Kasahara et al. (1989), Immunogenetics, 30(1):66-68; Larhammar et al. (1985), J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119.

(31) P2X5 (лиганд-управляемый ионный канал 5 пуринервического рецептора P2X, ионный канал, управляемый внеклеточной АТФ, может участвовать в синаптической трансмиссии и нейрогенезе, дефицит может способствовать патофизиологии идиопатической нестабильности детрузора; 422 аа, рI: 7.63, ММ: 47206 ТМ: 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 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_002552.

Genbank, версия номер NP_002552.2 GI:28416933.

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

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 (страница 82).

(32) CD72 (антиген дифференцировки В-клеток CD72, Lyb-2; 359 аа, рI: 8,66, ММ: 40225, ТМ: 15 [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 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_001773.

Genbank, версия номер NP_001773.1 GI:4502683.

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

Перекрестные ссылки:

WO 2004042346 (п.65); WO 2003/026493 (страницы 51-52, 57-58); WO 2000/75655 (страницы 105-

106); Von Hoegen et al. (1990), *J. Immunol.* 144(12):4870-4877; Strausberg et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:16899-16903.

(33) LY64 (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, pI: 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 GI:167555127.

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

Перекрестные ссылки:

US 2002/193567; WO 97/07198 (п.11, страницы 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, страницы 57-61); WO 2000/12130 (страницы 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 дифференцировке В-лимфоцитов; 429 aa, pI: 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); EP1347046 (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, pI: 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, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Mouse: 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/геререгулина 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;

JP2004113151; WO 2003/042661; WO 2003/009814; EP1295944 (страницы 69-70); WO 2002/30268 (страница 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, GCP1, NAALAD1, NAALADase, PSM, PSMA, mGCP.

Другие обозначения: N-ацетилованная альфа-связанная кислотная дипептидаза 1; N-ацетилованная-альфа-связанная кислотная дипептидаза I; NAALADase I; белок гена 27, ингибирующего рост клетки; фолиполи-гамма-глутамат-карбоксихептидаза; глутаматкарбоксилаза II; глутамат-карбоксихептидаза 2; глутамат-карбоксихептидаза II; мембранная глутамат-карбоксихептидаза; вариант F простата-специфического мембранного антигена; птероилполи-гамма-глутамат-карбоксихептидаза.

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.

Proscan: 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).

Cytogen: 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 открыто внесены в депозитарий 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 60/654,125, озаглавленной "Human Monoclonal Antibodies to Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA)", поданной 18 февраля 2005 г. Аминокислотные последовательности 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

PSMA Development Company/Progenies/цитоген - Seattle Genetics: 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 года (US 7850971).

University Hospital Freiburg, Германия - 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 г., 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 г., 12:45 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа BAA04107.

Genbank, версия номер BAA04107.1 GI:487684.

Genbank, дата обновления записи: 1 августа, 2006 г., 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.

AvB 6- 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.

Антигела

Биоген: US 7943742 - гибридомные 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 цепи, 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 M.C., 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 GM78677.

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, CEA.

Другие обозначения: антиген мекония 100.

Антигела

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:

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 варибельной области тяжелой цепи указанного анти-СЕА,
 антитела, которые содержат:
 CDR1 содержит TYWMS (SEQ ID NO: 23);
 CDR2 содержит EHPDSSTINYAPSLKD (SEQ ID NO: 24) и
 CDR3 содержит LYFGFPWFAY (SEQ ID NO: 25).
 US 20100221175; US 20090092598; US 20070202044; 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, c-Met.

Другие обозначения: рецептор HGF; рецептор HGF/SF; рецептор SF; рецептор фактора роста гепатоцитов; прото-онкогенная тирозинкиназа met; прото-онкогенная c-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 (АТСС) РТА-5026; антитело, вырабатываемое гибридомой 9.1.2, имеющей номер доступа АТСС РТА-5027; антитело, вырабатываемое гибридомой 8.70.2, имеющей номер доступа АТСС РТА-5028; или антитело, вырабатываемое гибридомой 6.90.3, имеющей номер доступа АТСС РТА-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 серии, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4, где X8 представляет собой аланин, без сигнальных последовательностей; антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8, без сигнальных последовательностей; антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, без сигнальных последовательностей; или антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16, без сигнальных последовательностей.

Agouron Pharmaceuticals (в настоящее время Pfizer): 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, АТСС НВ-11894 и АТСС НВ-11895.

US 20100016241 - например, АТСС НВ-11894 (гибридома 1А3.3.13) или НВ-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 гибридомной

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.

(43) 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 эпителиальный 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*, том 16, номер 2, с. 96-107, 2006;

HMFG2 - Burchell J., et al. *Cancer Res.*, 47, 5476-5482 (1987); см. 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, номер доступа ATCC 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 7183388; 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: (H6B6, 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; карбонатгидраза 9; карбоангидраза; мембранный антиген MN; рMW1; антиген G250, ассоциированный с почечноклеточной карциномой

Антитела

Abgenix/Amgen: US com 20040018198.

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

Bayer: US 7462696.

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

Harvard Medical School: Антитела G10, G36, G37, G39, G45, G57, G106, G119, G6, G27, G40 and 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:

Batra 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, выбранные 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 амино-

кислотной 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.

US 20090155282, US 20050059087 и US 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 V_H CDR3, и F92W в V_L 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; 23(2):61-9 (Uppsala University).

Han DC, 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, связывающий сиаловую кислоту.

Антитела

H195 (линтузумаб) - Raza A., et al. Leuk Lymphoma. 2009 Aug; 50(8):1336-44; US 6759,045 (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).

mAbE6: 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 вариабельную область тяжелой цепи, которая

содержит три CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-3, и варибельную 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 TF., 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 - AI-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 Кнаппик, А. et al. J Mol Biol 2000 Feb; 296(1):57-86.

AstraZeneca/Medimmune: MEDI-551 - Herbst R., et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010 Oct; 335(1):213-22.

Glenmark Pharmaceuticals: GBR-401 - Hou S., et al. Mol. Cancer Ther. November 2011 (Meeting Abstract Supplement) C164.

US 7109304 (Immunomedics).

Например, антитело, содержащее последовательность hA19V_k (SEQ ID NO: 7) и последовательность hA19V_H (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 (KASQSVDYDGDGDSYLN); CDR2 SEQ ID NO: 17 (DASNLVS); и CDR3 SEQ ID NO: 18 (QQSTEDPWT), и последовательности CDR тяжелой цепи CDR1 SEQ ID NO: 19 (SYWMN); CDR2 SEQ ID NO: 20 (QIWPQDGDGTNYNGKFKG) и CDR3 SEQ ID NO: 21 (RETTTVGGRYYYAMDY), 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 варибельной 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 варибельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и варибельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

4G7 chim - Lang P., et al. Blood. 2004 May 15; 103(10):3982-5 (University of Tübingen).

Например, фиг. 6 и SEQ ID NO: 80 в 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; IL2-RA; антиген TAC; альфа-субъединица рецептора интерлейкина-2; p55.

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

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

Например, антитело, имеющее антигенсвязывающий 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).

BergenBio: 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.

(51) 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: 2 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: антиген созревания В-клетки; фактор созревания В-клеток; белок созревания В-клеток; 17 член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли.

(52) ST Ags -CTA (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

(54) 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: 1 апреля, 2012 г., 03:34 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа NP_778230.

Genbank, версия номер NP_778230.1 GI:28269707.

Genbank, дата обновления записи: 1 апреля, 2012 г., 03:34 пп.

Прочая информация:

Официальный символ: CLEC14A.

Другие названия: UNQ236/PRO269, C14orf27, CEG1, EGFR-5.

Другие обозначения: член А семейства 14 лектинового 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 (Ofazoglu, 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.

(57) 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 г., 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, 03:38 пп.

Проминин/CD133.

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.. AACR2010 Annual Meeting (реферат № 4393).

Антитела

Анти-AGS-5 антитело: M6.131 (Smith, L.M., et al. AACR 2010 Annual Meeting (реферат № 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, PDNPP3.

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 DP., 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, 04:35 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA96258.

Genbank, версия номер AAA96258.2 GI:12711793.

Genbank, дата обновления записи: 30 ноября, 2009, 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 39; транспортер цинка ZIP6; zrt- и lrt-подобный белок 6.

(63) ST4, 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 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа CAA09930.

Genbank, версия номер CAA09930.1 GI:3805947.

Genbank, дата обновления записи: 1 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.

Другие обозначения: антиген, распознаваемый моноклональным антителом 5.1 H11; молекула адгезии нервных клеток, NCAM.

Антигела

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

Например, см. гуманизованное из мышинового 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.

Антигела

huC242 (Tolcher AW 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: AAA35823

Genbank, номер доступа AAA35823.

Genbank, версия номер.1 GM82418.

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.

Антигела

M9346A - Whiteman KR., 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: 2 февраля, 2011 г., 10:10 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа CAA54044.

Genbank, версия номер CAA54044.1 GI:666043.

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

Перекрестные ссылки:

Weteman 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 - HAVCR1 (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: HAVCR1.

Другие названия: HAVCR, HAVCR-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 B7х Т-клеток; костимулирующая молекула B7х Т-клеток; ингибитор 1 активации Т-клеток, содержащий V-образный домен; иммунный костимулирующий белок B7-H4.

(71) PTK7 (протеинтирозинкиназа 7 PTK7).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа AF447176.

Genbank, версия номер AF447176.1 GI:17432420.

Genbank, дата обновления записи: 28 ноября, 2008, 01:51 пп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAL39062.

Genbank, версия номер AAL39062.1 GM7432421.

Genbank, дата обновления записи: 28 ноября, 2008, 01:51 пп.

Перекрестные ссылки:

Park S.K., et al. *J. Biochem.* 119 (2), 235-239 (1996)

Прочая информация:

Официальный символ: PTK7.

Другие названия: ССК-4, ССК4.

Другие обозначения: киназа 4 карциномы толстой кишки; неактивная тирозин-протеинкиназа 7; псевдорепертор 7 тирозинкиназы; белок 7, подобный тирозин-протеинкиназе.

(72) 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.* 14(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; 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: 1 февраля, 2011 г., 12:09 пп.

Перекрестные ссылки:

O'Connell FP., 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.

(74) 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: DHLAГ, HLADG, II, Ia-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 (милатузумаб) - 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 61, 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. US6235883, 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. US 5891996, 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-мет-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) EPHA2 (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: 6 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: EPHA2.

Другие названия: ARCC2, СТРА, СТРР1, ЕСК.

Другие обозначения: рецептор 2 эфринового типа А; рецепторная протеин-тирозинкиназа эпителиальных клеток; растворимый вариант 1 EPHA2; рецептор ЕСК тирозин-протеинкиназы.

Антигела

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-домены, подсемейство А, член 1).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа M27394.

Genbank, версия номер M27394.1 GI: 179307.

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

Полипептид:

Genbank, номер доступа AAA35581.

Genbank, версия номер AAA35581.1 GI: 179308.

Genbank, дата обновления записи: 30 ноября, 2009, 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.

Антигела

Genentech/Roche: ритуксимаб - Abdulla N.E., et al. *BioDrugs.* 2012 Apr 1; 26(2):71-82.

Например, см. US5736137, 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.

Антигена

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.

Антигена

Novartis: BHQ880 (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.

Антигела

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

Например, см. Drugbank, номер доступа 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.

Антигела

BMS: элотузумаб/HuLuc63 (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.

(86) 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, ННТ1, ORW, ORW1.

Другие обозначения: антиген CD105.

(87) Аннексин A1 - ANXA1 (аннексии A1).

Нуклеотид:

Genbank, номер доступа X05908.

Genbank, версия номер X05908.1 GI:34387.

Genbank, дата обновления записи: 2 февраля, 2011 г., 10:02 дп.

Полипептид:

Genbank, номер доступа CCA29338.

Genbank, версия номер CCA29338.1 GI:34388.

Genbank, дата обновления записи: 2 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 типа).

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 $\alpha\beta 6$

RHAB6.2

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGFAFTDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDETEYA
PKFQGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVAGPYFPD
YWGQGLTVTVSS

RHCB6.2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGDETEYA
PKFQGRVTITDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVAGPYFP
DYWGQGLTVTVSS

RHF

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGDETEYA
PKFQGRVTFTDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGLTVTVSS

RHFB6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGDETEYA
PKFQGRVTFTDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVAGPYFP
DYWGQGLTVTVSS

RHAY100bP

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGFAFTDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDETEYA
PKFQGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTGPYPFDYWGQGLTVTVSS

RKF

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSG
SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

RKFL36L50

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWLQKPGQAPRLLIYLTSNLASGIPDRFSGS
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

RKC

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRFSGS
GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

Анти-CD33

CD33 Hum 195V_H

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYN
QKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGRPAMDYWGQGLTVTVSS

CD33 Hum 195VK

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESDNYGISFMNWFQKPGKAPKLLIYAASNQSGVGP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDFATYYCQQSKEVPWTFGGGKVEIK

Анти-CD19

V_H B4 CD19 с измененной поверхностью

QVQLVQPGAQEWKPGASVKLSCKTSGYTFTSNWMHWVKQRPGQGLEWIGEIDPSDYSYNYN
QNFKGGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNPYYAMDYWGQGTSVTVSS

VK B4 CD19 с измененной поверхностью

EIVLTQSPAIMSASPGERVMTMCSASSGVNYMHWYQKPGTSPRRWIYDTSKLAGVPARFS
GSGSGTSYSLTISSMEPEDAATYYCHQRGSYTFGGGKLEIK

Анти-Her2

V_H цепь герцептина

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADS
VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS

V_L цепь герцептина

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS
GSRSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYYTPPTFGGKVEIK

Анти-CD25

VK симулекта (также известного как базиликсимаб)

QIVSTQSPAIMSASPGKVTMTCASSSRSYMQWYQKPGTSPKRWIYDTSKLAGVPARFS
GSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYTFGGGKLEIK

V_H симулекта
 QLQSGTFLARPGASVKMCKASGYSFTRYWMHWIKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQK
 FEGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSAIVYCSRDIYGYFDFWGGTTLTVSS
 Анти-PSMA Деиммунизированный V_H '1
 EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHVVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQK
 FEDKATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTLLTVSS
 Деиммунизированный VK'1
 DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQKPGPSPKLLIYWASTRHTGIPSRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYYCQYNSYPLTFGPGTKVDIK
 Деиммунизированный V_H 1'5
 EVKLVEGGLVQPGGSMKLSVAVSGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNLRRAEDTGVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Деиммунизированный V_H 2'5
 EVKLVEGGLVQPGGSLKLSVAVSGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNLRRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Деиммунизированный V_H 3'5
 EVKLVEGGLVQPGGSLKLSVAVSGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNLRRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Деиммунизированный V_H 4'5
 EVKLVEGGLVQPGGSLKLSVAVSGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNLRRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Деиммунизированный VK1'5
 NIVMTQFPSSMSASVGDRTITCKASENVGTYSVSWYQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFT
 GSGSATDFTLTISSLQTEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEMK
 Деиммунизированный VK2'5
 NIVMTQFPSSMSASVGDRTITCKASENVGTYSVSWYQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQAEADLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK
 Деиммунизированный VK3'5
 NIQMTQFPSSMSASVGDRTITCKASENVGTYSVSWYQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVPDRF
 SGSGSGTDFTLTISSLQAEADLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK
 Деиммунизированный VK4'5
 NIQMTQFPSSMSASVGDRTITCKASENVGTYSVSWYQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVPDRF
 SGSGSGTDFTLTISSLQAEADLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK
 Деиммунизированный VKDI '5
 NIVMTQFPSSMSASVGDRTITCKASENVGTYSVSWYQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVPDRF
 SGSGSGTDFTLTISSLQAEADLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEMK
 Деиммунизированный V_H DI '5
 EVKLEESGGLVQPGGSMKISCVAVSGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVIISRDDSKSIVYLQMNLRRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированная RHA '5
 EVKLVEGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVGEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVTISRDDSKNTAYLQMNLSLKTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированная RHB '5
 EVKLVEGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNLSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированная RHC '5
 EVKLVEGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNLSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированная RHD '5
 EVKLVEGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVGEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNLSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированная RHE '5
 EVKLVEGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVTISRDDSKNTVYLQMNLSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированная RHF '5
 EVKLVEGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNLSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированная RHG '5
 EVKLVEGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFATH
 YAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNLSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS
 Гуманизированная RKA '5
 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYSVSWYQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPDRFS

GSGSATDFTLTINNLPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированная RKB '5

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPSRFS

GSGSATDFTLTINNLPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированная RKC '5

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPSRFS

GSGSATDFTLTINNLPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированная RKD '5

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPSRFS

GSGSATDFTLTINNLPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированная RKE '5

NIVMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPRFT

GSGSATDFILTINNLPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированная RKF '5

NIVMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPSRFS

GSGSATDFILTINNLPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Гуманизированная RKG '5

NIVMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPRFT

GSGSATDFTLTINNLPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

Исходное антитело также может быть гибридным белком, содержащим последовательность альбумин-связывающего пептида (ABP) (Dennis et al. (2002), "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Антитела по данному изобретению включают гибридные белки с последовательностями ABP, описанными в публикациях: (i) Dennis et al. (2002), J. Biol. Chem. 277:35035-35043 в таблицах III и IV, страница 35038; (ii) US 2004/0001827 в параграфе [0076] и (iii) WO 01/45746 на страницах 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 до внедрения в конъюгат или в составе конъюгата. Метка может быть биотиновой меткой. В другом варианте реализации клеточно-связывающий агент может иметь радиоизотопную метку.

Связывание звена линкера с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают со звеном линкера через дисульфидную связь.

В одном варианте реализации связь между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и линкером лекарственного соединения образуется между тиольной группой цистеинового остатка в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте и малеимидной группой в звене лекарственного линкера.

Цистеиновые остатки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут быть доступны для реакции с функциональной группой звена линкера с образованием связи. В других вариантах реализации тиольные группы антитела могут участвовать в межпочечных дисульфидных связях. Указанные межпочечные связи можно превращать в свободные тиольные группы, например, посредством обработки антитела агентом DTT перед осуществлением реакции с функциональной группой звена линкера.

В некоторых вариантах реализации цистеиновый остаток внедряют в тяжелую или легкую цепь антитела. Положения для вставки цистеина посредством замещения тяжелых или легких цепей антитела включают положения, описанные в опубликованной заявке США № 2007-0092940 и в публикации международного патента WO 2008/070593, которые включены в данный документ.

Лечение.

Соединения по данному изобретению можно использовать в терапии. Также предложено применение конъюгата формулы I или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для лечения. 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 ма-

териала 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 адьювант. 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 апиогенным и имеет подходящий рН, 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, в частности рака. Термин "пролиферативное заболевание" относится к нежелательной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или патологических клеток, которые являются нежелательными, 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 молочного 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 из клеток маргинальной зоны, из клеток мантийной зоны и фолликулярная лимфома, лимфома Ходжкина, AML и другие раковые заболевания из В-или Т-клеток.

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.

Содержание лекарственного вещества.

Содержание лекарственного вещества (p) представляет собой среднее количество PBD лекарств на один клеточно-связывающий агент, в частности антитело. Если соединения по данному изобретению связаны с цистеинами, то содержание лекарственного вещества может составлять от 1 до 8 единиц лекарства (D) на один клеточно-связывающий агент, т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 фрагментов лекарства ковалентно связаны с клеточно-связывающим агентом. Композиции конъюгатов включают совокупности клеточно-связывающих агентов, в частности антител, конъюгированных с лекарственным соединением в количестве от 1 до 8. Если соединения по данному изобретению связаны с лизинами, то содержание лекарственного вещества может составлять от 1 до 80 единиц лекарства (D) на один клеточно-связывающий агент, хотя предпочтительным может быть верхний предел 40, 20, 10 или 8. Композиции конъюгатов включают совокупности клеточно-связывающих агентов, в частности антител, конъюгированных с лекарственным соединением 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 лекарств на одно антитело в препаратах ADC, полученных в результате реакций конъюгации, можно определить стандартными способами, такими как УФ, обратно-фазовая ВЭЖХ, ГИХ, масс-спектрометрия, твердофазный иммуноферментный анализ и электрофорез. Также можно определить количественное распределение ADC с точки зрения p. С помощью твердофазного иммуноферментного анализа можно определить среднее значение p 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 p (лекарства) нельзя определить по связыванию антитело-антиген и по пределу обнаружения твердофазного иммуноферментного анализа. Кроме того, твердофазный иммуноферментный

анализ для обнаружения конъюгатов антитело-лекарственное соединение не обеспечивает определение положений, в которых фрагменты лекарства присоединены к антителу, такому как фрагменты тяжелой цепи или легкой цепи, конкретных аминокислотных остатков. В некоторых случаях разделение, очистку и определение характеристик гомогенного ADC, в котором p представляет собой определенное значение, полученное на основании ADC с другим содержанием лекарства, можно осуществлять с помощью, например, обратно-фазовой ВЭЖХ или электрофореза. Такие технологии также применимы к другим типам конъюгатов.

Для некоторых конъюгатов антитело-лекарственное соединение p может быть ограничен количеством центров присоединения в антителе. Например, антитело может иметь только одну или несколько тиольных групп цистеина или может иметь только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, к которым может быть присоединен линкер. Более высокое содержание лекарства, например $p > 5$, может приводить к агрегации, нестабильности, токсичности или снижению клеточной проницаемости некоторых конъюгатов антитело-лекарственное соединение.

Как правило, в реакции конъюгации 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 соединения. Только самые реакционноспособные лизиновые группы могут взаимодействовать с амин-реакционным 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 лекарственным фрагментом. Большинство цистеиновых тиольных остатков в антителах указанных соединений существуют в виде дисульфидных мостиков, и их необходимо восстанавливать восстановительным агентом, таким как дитиотреитол (DTT) или TCEP, в условиях частичного или полного восстановления. Содержание лекарственного соединения (отношение лекарственное соединение/антитело) в ADC можно регулировать несколькими различными способами, включая (i) ограничение молярного избытка линкера лекарственного соединения относительно антитела, (ii) ограничение времени или температуры реакции конъюгации 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 конъюгации с линкерными реагентами посредством их обработки восстановительным агентом, таким как DTT (дитиотреитол). Каждый цистеиновый мостик теоретически будет образовывать два реакционноспособных тиольных нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы можно внедрять в антитело посредством реакции лизинов с 2-иминотиолоаном (реагент Трота), в результате чего амин превращается в тиол. Реакционноспособные тиольные группы можно внедрять 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 внедрения 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 линкера лекарственного соединения по данному изобретению, которые содержат тиол-реакционные электрофильные группы, такие как малеимид или альфа-галоамиды, с образованием ADC с антителами, сконструированными на основе цистеина, и PBD лекарственными фрагментами. Таким образом, положение лекарственного фрагмента можно проектировать, контролировать и знать. Можно контролировать содержание лекарства, поскольку тиольные группы сконструированного цистеина обычно взаимодействуют с тиол-реакционными линкерными реагентами или реагентами линкера лекарственного соединения 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. Содержание лекарства около 2 может быть обеспечено с почти полной гомогенностью продукта конъюгации ADC.

Если более одной нуклеофильной или электрофильной группы антитела взаимодействует с линкером промежуточного лекарственного соединения или с линкерным реагентом, а затем с фрагментом лекарства, то полученный продукт представляет собой смесь ADC соединений с распределением лекарственных фрагментов, 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 содержания лекарства. Можно выделять препараты ADC с одним значением содержания лекарства (p), однако такое единственное значение содержания ADC все еще может означать гетерогенную смесь, поскольку лекарственные фрагменты могут быть присоединены через линкер в разных сайтах антитела.

Таким образом, композиции конъюгатов антитело-лекарственное соединение по данному изобретению включают смеси соединений-конъюгатов антитело-лекарственное соединение, в которых антитело имеет один или более фрагментов PBD лекарства и в которых лекарственные фрагменты могут быть присоединены к антителу у различных аминокислотных остатков.

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.

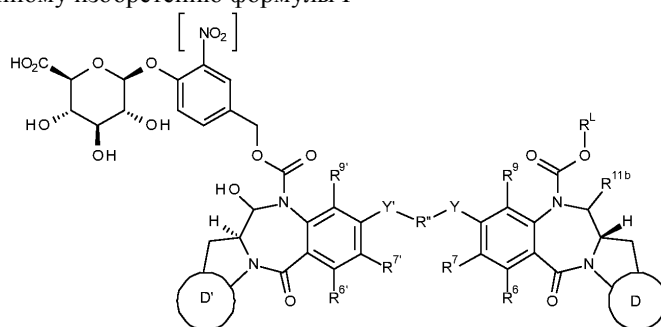
Общие способы синтеза.

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

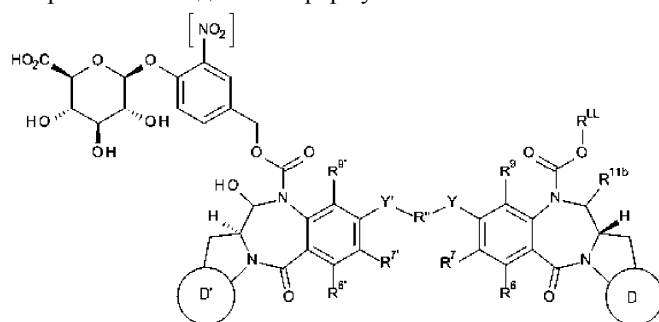
- WO 00/12508 (страницы 14-30);
- WO 2005/023814 (страницы 3-10);
- WO 2004/043963 (страницы 28-29);
- WO 2005/085251 (страницы 30-39).

Способ синтеза.

Соединения по данному изобретению формулы I

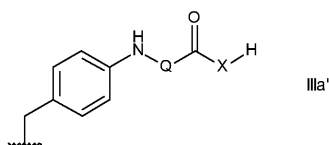


можно синтезировать из соединения формулы 2



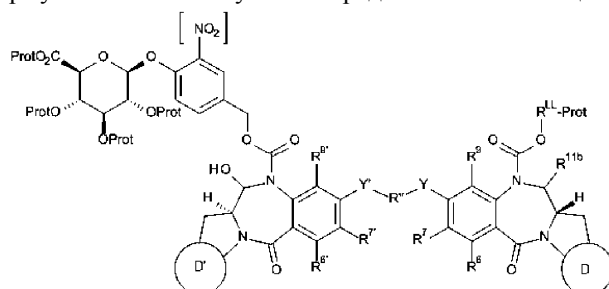
Формула 2

где R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , R^6' , R^7' , R^9' , R^{11b} , R^{12} , Y , Y' и R'' являются такими, как определено для соединений формулы I, и R^{LL} является предшественником 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'



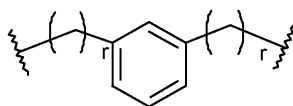
В таком случае реакция включает присоединение группы G^L .

Соединения формулы 2 можно получать посредством снятия защиты с соединений формулы 3



Формула 3

где R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , R^6' , R^7' , R^9' , R^{11b} , R^{12} , Y , Y' и R'' являются такими, как определено для соединений



где r равен 1 или 2.

R^6 - R^9

R^9 представляет собой H,

R^6 представляет собой H,

R^7 представляет собой OR, где R выбран из C_{1-4} алкильных, C_6 -гетероциклических и $C_{5,6}$ арильных групп. Более предпочтительно R может представлять собой C_{1-4} алкильную группу. Пригодный заместитель представляет собой $C_{5,6}$ арильную группу (например, фенил). Особенно предпочтительные заместители в положениях 7 представляют собой OMe. Другие особенно пригодные заместители представляют собой азотсодержащие C_6 -гетероциклилы, включая N-метилпиперазинил.

Указанные варианты реализации и предпочтения относятся к R^9 , R^6 и R^7 соответственно.

D и D'

В некоторых вариантах реализации D и D' представляют собой D1 и D'1 соответственно.

В некоторых вариантах реализации D и D' представляют собой D2 и D'2 соответственно.

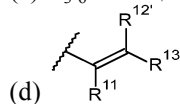
R^2

При наличии двойной связи между C2 и C3 R^2 выбран из:

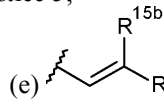
(a) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген; нитро; циано; OR, где R представляет собой C_{1-7} алкил; C_{3-7} гетероциклил и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

(b) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

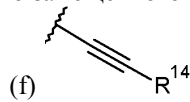
(c) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;



, где каждый из R^{11} , R^{12} и R^{13} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила и общее количество атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5;



, где один из R^{15a} и R^{15b} представляет собой H, а другой выбран из фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила и тиофенила; и



, где R^{14} выбран из H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_2 -алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила и тиофенила.

Если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может представлять собой $C_{5,7}$ арильную группу. $C_{5,7}$ арильная группа может представлять собой фенильную группу. В некоторых вариантах реализации R^2 предпочтительно представляет собой фенил.

Если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может иметь любое количество групп заместителей. Предпочтительно он содержит от 1 до 3 групп заместителей, более предпочтительно 1 и 2 группы заместителей, и наиболее предпочтительными являются однократно замещенные группы. Заместители могут быть в любом положении.

Если R^2 представляет собой $C_{5,7}$ арильную группу, то единственный заместитель предпочтительно находится у кольцевого атома, который не является смежным со связью с остальной частью соединения, т.е. он предпочтительно находится в положении β или γ относительно связи с остальной частью соединения. Таким образом, если $C_{5,7}$ арильная группа представляет собой фенил, то заместитель предпочтительно находится в мета-или пара-положениях, и более предпочтительно находится в пара-положении.

Заместители R^2 , если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой галоген, то он предпочтительно представляет собой F или Cl, более предпочтительно Cl.

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой OR, то в некоторых вариантах реализации он может представлять собой алкоксигруппу, например, C_{1-7} алкоксигруппу (например, метокси, этокси).

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{1-7} алкил, то он может предпочтительно представлять собой C_{1-4} алкильную группу (например, метил, этил, пропил, бутил).

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{3-7} гетероциклил, то в некоторых вариантах реализации он может представлять собой

C_6 -азотсодержащую гетероциклическую группу, например пиперазинил. Указанные группы могут быть связаны с остальной частью фрагмента PBD через атом азота. Указанные группы могут быть дополнительно замещены, например, C_{1-4} алкильными группами. Если C_6 -азотсодержащая гетероциклическая группа представляет собой пиперазинил, то указанный дополнительный заместитель может быть расположен у второго кольцевого атома азота.

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой бис-окси- C_{1-3} алкилен, то он предпочтительно представляет собой бис-окси-метилен или бис-окси-этилен.

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C(O)OR, то он предпочтительно представляет собой метиловый эфир или этиловый эфир.

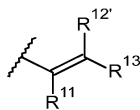
Особенно предпочтительные заместители, если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, включают метокси, этокси, фтор, хлор, циано, бис-окси-метилен, метилпиперазинил. Другие особенно предпочтительные заместители для R^2 представляют собой карбокси.

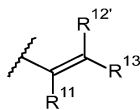
Особенно предпочтительные замещенные группы R^2 , если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, включают, но не ограничиваются этим, 4-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-этоксифенил, 3-этоксифенил, 4-фторфенил, 4-хлорфенил, 3,4-бис-оксиметилен-фенил, 4-цианофенил.

Другая возможная замещенная группа R^{12} представляет собой 4-нитрофенил. Группы R^{12} , представляющие особый интерес, включают 4-(4-метилпиперазин-1-ил)фенил и 3,4-бис-оксиметилен-фенил.

Если R^2 представляет собой C_{1-5} насыщенный алифатический алкил, он может представлять собой метил, этил, пропил, бутил или пентил. В некоторых вариантах реализации он может представлять собой метил, этил или пропил-(n -пентил или изопропил). В некоторых из таких вариантов реализации он может представлять собой метил. В других вариантах реализации он может представлять собой бутил или пентил, который может быть линейным или разветвленным.

Если R^2 представляет собой C_{3-6} насыщенный циклоалкил, он может представлять собой циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил. В некоторых вариантах реализации он может представлять собой циклопропил.



Если R^2 представляет собой , то каждый из R^{11} , R^{12} и R^{13} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5. В некоторых вариантах реализации общее количество атомов углерода в группе R^2 составляет не более 4 или не более 3.

В некоторых вариантах реализации один из R^{11} , R^{12} и R^{13} представляет собой H, а другие две группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

В других вариантах реализации два из R^{11} , R^{12} и R^{13} представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

В некоторых вариантах реализации группы, которые не представляют собой H, выбраны из метила и этила. В некоторых из таких вариантов реализации группы, которые не представляют собой H, представляют собой метил.

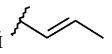
В некоторых вариантах реализации R^{11} представляет собой H.

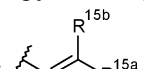
В некоторых вариантах реализации R^{12} представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации R^{13} представляет собой H. В некоторых вариантах реализации R^{11} и R^{12} представляют собой H.

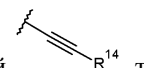
В некоторых вариантах реализации R^{11} и R^{13} представляют собой H.

В некоторых вариантах реализации R^{12} и R^{13} представляют собой H.


Особенно предпочтительная группа R^2 представляет собой .

Если R^2 представляет собой , то один из R^{15a} и R^{15b} представляет собой H, а другой выбран из фенила, необязательно замещенной группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила.


В некоторых вариантах реализации группа, которая не представляет собой H, представляет собой необязательно замещенный фенил. Если необязательный заместитель фенила представляет собой галоген, то он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа является незамещенной.

Если R^2 представляет собой , то R^{14} выбран из H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенной группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила. Если необязательный заместитель фенила представляет собой галоген, то он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа является незамещенной.

В некоторых вариантах реализации R^{14} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила. В некоторых из таких вариантов реализации R^{14} выбран из H и метила.

При наличии одинарной связи между C2 и C3 R^2 представляет собой H или , где R^{16a} и R^{16b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и сложного C_{1-4} алкилового эфира; или если один из R^{16a} и R^{16b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C_{1-4} алкилового эфира.

В некоторых вариантах реализации R^2 представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации R^2 представляет собой  /

В некоторых вариантах реализации предпочтительно, что оба R^{16a} и R^{16b} представляют собой H.

В других вариантах реализации предпочтительно, что оба R^{16a} и R^{16b} представляют собой метил.

В дополнительных вариантах реализации предпочтительно, что один из R^{16a} и R^{16b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы являются необязательно замещенными. В указанном дополнительном варианте реализации может быть дополнительно предпочтительно, что группа, которая не представляет собой H, выбрана из метила и этила.

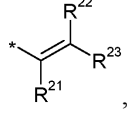
R^{12}

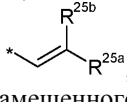
При наличии двойной связи между C2' и C3' R^{12} выбран из:

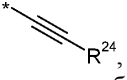
(a) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген; нитро; циано; OR, где R представляет собой C_{1-7} алкил; C_{1-7} алкил; C_{3-7} гетероцикл и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

(b) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(c) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(d) , где каждый из R^{21} , R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила и общее количество атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;

(e) , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила и тиофенила; и

(f) , где R^{24} выбран из H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила.

Если R^{12} представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может представлять собой C_{5-7} арильную группу, C_{5-7} арильная группа может представлять собой фенильную группу. В некоторых вариантах реализации R^{12} предпочтительно представляет собой фенил.

Если R^{12} представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может иметь любое количество групп заместителей. Предпочтительно он содержит от 1 до 3 групп заместителей, более предпочтительно 1 и 2 группы заместителей, и наиболее предпочтительными являются однократно замещенные группы. Заместители могут быть в любом положении.

Если R^{12} представляет собой C_{5-7} арильную группу, то единственный заместитель предпочтительно находится у кольцевого атома, который не является смежным со связью с остальной частью соединения, т.е. он предпочтительно находится в положении β или γ относительно связи с остальной частью соединения. Таким образом, если C_{5-7} арильная группа представляет собой фенил, то заместитель предпочтительно находится в мета- или пара-положениях и более предпочтительно находится в пара-положении.

Заместители R^{12} , если R^{12} представляет собой C_{5-10} арильную группу. Если заместитель в R^{12} , когда R^{12} представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой галоген, то он предпочтительно представляет собой F или Cl, более предпочтительно Cl.

Если заместитель в R^{12} , когда R^{12} представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой OR, то в некоторых вариантах реализации он может представлять собой алкоксигруппу, например C_{1-7} алкоксигруппу (например, метокси, этокси).

Если заместитель в R^{12} , когда R^{12} представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{1-7} алкил, то он может предпочтительно представлять собой C_{1-4} алкильную группу (например, метил, этил, пропил, бутил).

Если заместитель в R^{12} , когда R^{12} представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой

C₃₋₇гетероцикл, то в некоторых вариантах реализации он может представлять собой C₆-азотсодержащую гетероциклическую группу, например пиперазинил. Указанные группы могут быть связаны с остальной частью фрагмента РВД через атом азота. Указанные группы могут быть дополнительно замещены, например, C₁₋₄алкильными группами. Если C₆-азотсодержащая гетероциклическая группа представляет собой пиперазинил, то указанный дополнительный заместитель может быть расположен у второго кольцевого атома азота.

Если заместитель в R¹², когда R¹² представляет собой C₅₋₁₀арильную группу, представляет собой бис-окси-C₁₋₃алкилен, то он предпочтительно представляет собой бис-окси-метилен или бис-окси-этилен.

Если заместитель в R¹², когда R¹² представляет собой C₅₋₁₀арильную группу, представляет собой C(O)OR, то он предпочтительно представляет собой метиловый эфир или этиловый эфир.


Особенно предпочтительные заместители, если R¹² представляет собой C₅₋₁₀арильную группу, включают метокси, этокси, фтор, хлор, циано, бис-окси-метилен, метилпиперазинил. Другой особенно предпочтительный заместитель для R¹² представляет собой карбокси.

Особенно предпочтительные замещенные группы R¹², если R¹² представляет собой C₅₋₁₀арильную группу, включают, но не ограничиваются этим, 4-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-этоксифенил, 3-этоксифенил, 4-фторфенил, 4-хлорфенил, 3,4-бис-оксиметилен-фенил, 4-цианофенил. Другая возможная замещенная группа R¹² представляет собой 4-нитрофенил. Группы R¹², представляющие особый интерес, включают 4-(4-метилпиперазин-1-ил)фенил и 3,4-бис-оксиметилен-фенил.

Если R¹² представляет собой C₁насыщенный алифатический алкил, он может представлять собой метил, этил, пропил, бутил или пентил. В некоторых вариантах реализации он может представлять собой метил, этил или пропил-(н-пентил или изопропил). В некоторых из таких вариантов реализации он может представлять собой метил. В других вариантах реализации он может представлять собой бутил или пентил, который может быть линейным или разветвленным.

Если R¹² представляет собой C₃₋₆насыщенный циклоалкил, он может представлять собой циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил. В некоторых вариантах реализации он может представлять собой циклопропил.



Если R¹² представляет собой , то каждый из R²¹, R²² и R²³ независимо выбран из H, C₁₋₃насыщенного алкила, C₂₋₃алкенила, C₂₋₃алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в группе R¹² составляет не более 5. В некоторых вариантах реализации общее количество атомов углерода в группе R¹² составляет не более 4 или не более 3.

В некоторых вариантах реализации один из R²¹, R²² и R²³ представляет собой H, а другие две группы выбраны из H, C₁₋₃насыщенного алкила, C₂₋₃алкенила, C₂₋₃алкинила и циклопропила.

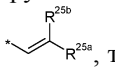
В других вариантах реализации два из R²¹, R²² и R²³ представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C₁₋₃насыщенного алкила, C₂₋₃алкенила, C₂₋₃алкинила и циклопропила.

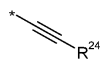
В некоторых вариантах реализации группы, которые не представляют собой H, выбраны из метила и этила. В некоторых из таких вариантов реализации группы, которые не представляют собой H, представляют собой метил.

В некоторых вариантах реализации R²¹ представляет собой H. В некоторых вариантах реализации R²² представляет собой H. В некоторых вариантах реализации R²³ представляет собой H.


В некоторых вариантах реализации R²¹ и R²² представляют собой H. В некоторых вариантах реализации R²¹ и R²³ представляют собой H. В некоторых вариантах реализации R²² и R²³ представляют собой H.

Особенно предпочтительная группа R¹² представляет собой .

Если R¹² представляет собой , то один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из фенила, необязательно замещенной группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила. В некоторых вариантах реализации группа, которая не представляет собой H, представляет собой необязательно замещенный фенил. Если необязательный заместитель фенила представляет собой галоген, то он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа является незамещенной.

Если R¹² представляет собой , то R²⁴ выбран из H; C₁₋₃насыщенного алкила; C₂₋₃алкенила; C₂₋₃алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенной группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила. Если необязательный заместитель фенила представляет собой галоген, то он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа является незамещенной.

В некоторых вариантах реализации R²⁴ выбран из H, метила, этила, этенила и этинила. В некоторых из таких вариантов реализации R²⁴ выбран из H и метила.

При наличии одинарной связи между C2' и C3' R¹² представляет собой H или , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄насыщенного алкила, C₂₋₃алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C₁₋₄алкиламида и сложного C₁₋₄алкилового эфира; или если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C₁₋₄алкилового эфира.

В некоторых вариантах реализации R¹² представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации R¹² представляет собой .

В некоторых вариантах реализации предпочтительно, что оба R^{26a} и R^{26b} представляют собой H.

В других вариантах реализации предпочтительно, что оба R^{26a} и R^{26b} представляют собой метил.

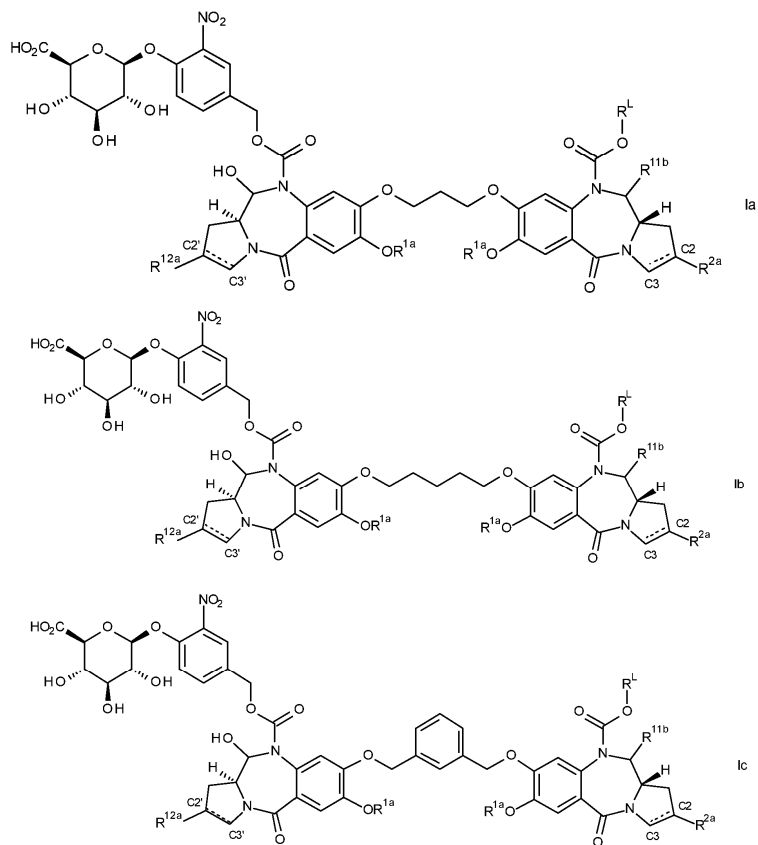
В дополнительных вариантах реализации предпочтительно, что один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, а другой выбран из C₁₋₄насыщенного алкила, C₂₋₃алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы являются необязательно замещенными. В указанном дополнительном варианте реализации может быть дополнительно предпочтительно, что группа, которая не представляет собой H, выбрана из метила и этила.

R^{11b}

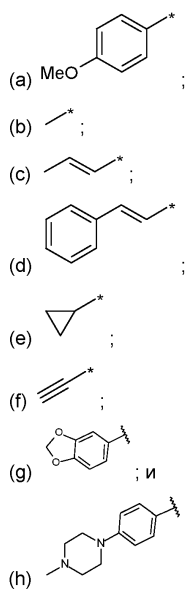
В некоторых вариантах реализации R^{11b} представляет собой OH.

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 формул Ia-1, Ia-2 или Ia-3:



где R^{2a} и R^{12a} являются одинаковыми и выбраны из:



R^{1a} выбран из метила и бензила;

R^L и R^{11b} являются такими, как определено выше.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения и R^2 , и R^{12} содержат не более 3 атомов углерода.

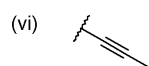
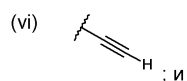
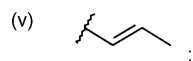
В тех вариантах реализации, в которых между C2 и C3 присутствует двойная связь, R^2 может быть выбран из:

(i) метила;

(ii) этила;

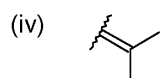
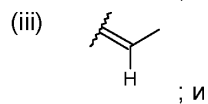
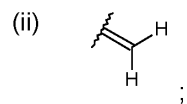
(iii) пропила;

(iv) циклопропила;

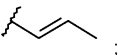
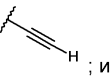



В тех вариантах реализации, в которых между C2 и C3 нет двойной связи, R^2 может быть выбран из:


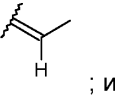

(i) H;



В тех вариантах реализации, в которых между C2' и C3' присутствует двойная связь, R^{12} может быть выбран из:


- (i) метила;
- (ii) этила;
- (iii) пропила;
- (iv) циклопропила;
- (v)  ;
- (vi)  ; и
- (vi)  ;

В тех вариантах реализации, в которых между C2' и C3' нет двойной связи, R¹² может быть выбран из:

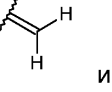

- (i) H;
- (ii)  ;
- (iii)  ; и
- (iv)  ;

В некоторых из таких вариантов реализации и R², и R¹² содержат не более 2 атомов углерода.


В тех вариантах реализации, в которых между C2 и C3 присутствует двойная связь, R² может быть выбран из:

- (i) метила;
- (ii) этила и
- (vi)  ;



В тех вариантах реализации, в которых между C2 и C3 нет двойной связи, R² может быть выбран из:

- (i) H;
- (ii)  и
- (iii)  ;

В тех вариантах реализации, в которых между C2' и C3' присутствует двойная связь, R¹² может быть выбран из:

- (i) метила;
- (ii) этила и
- (vi)  ;

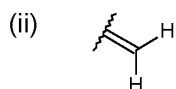
В тех вариантах реализации, в которых между C2' и C3' нет двойной связи, R¹² может быть выбран из:

- (i) H;
- (ii)  и
- (iii)  ;

В следующих из таких вариантов реализации и R^2 , и R^{12} содержат не более 1 атома углерода.

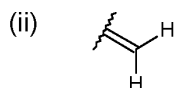
В тех вариантах реализации, в которых между C2 и C3 присутствует двойная связь, R^2 может представлять собой метил. В тех вариантах реализации, в которых между C2 и C3 нет двойной связи, R^2 может быть выбран из:

(i) H и



В тех вариантах реализации, в которых между C2' и C3' присутствует двойная связь, R^{12} может представлять собой метил. В тех вариантах реализации, в которых между C2' и C3' нет двойной связи, R^{12} может быть выбран из:

(i) H и



Не ограничиваясь теорией, если заместитель в положении C2 димеров PBD является небольшим, то использование глюкуронового кэп-звена в таких линкерах лекарственных соединений предпочтительно является особенно преимущественным, поскольку оно может увеличивать гидрофильность линкера лекарственного соединения, упрощая конъюгацию линкеров лекарственных соединений со звеном лиганда.

Указанные варианты реализации и предпочтения также относятся ко второму аспекту данного изобретения.

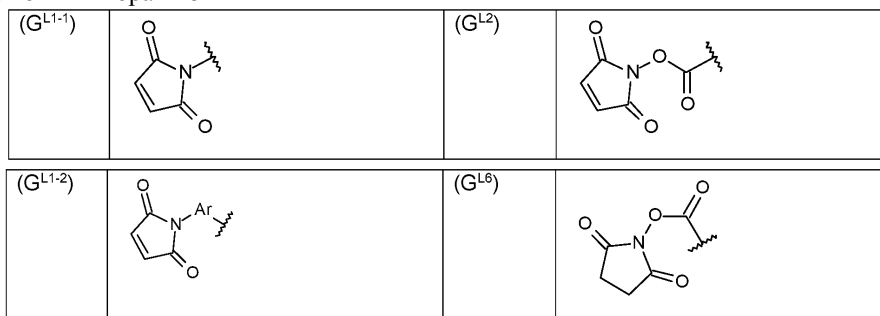
Линкер (R^L).

В некоторых вариантах реализации R^L имеет формулу Ша.

В некоторых вариантах реализации R^{LL} имеет формулу Ша'.

G^L

G^L может быть выбран из

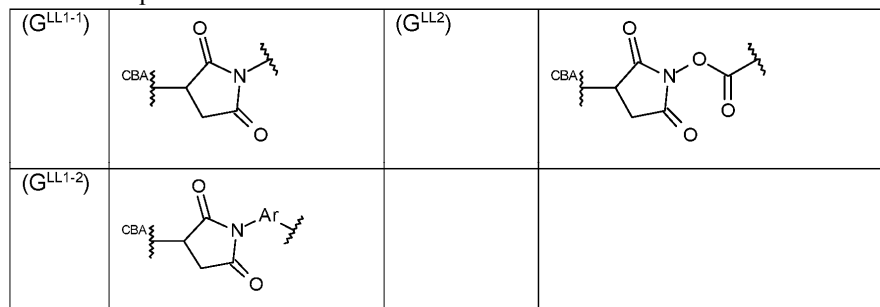


где Ar представляет собой C_{5-6} ариленовую группу, например, фенилен.

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:

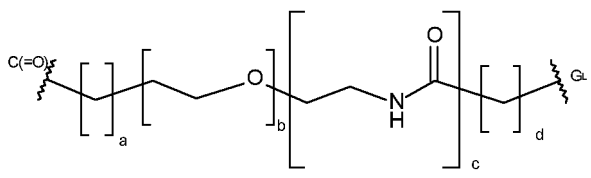


где Ar представляет собой C_{5-6} ариленовую группу, например фенилен.

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 $a =$ от 0 до 5, $b =$ от 0 до 16, $c = 0$ или 1, $d =$ от 0 до 5;

a может быть равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах реализации a равен от 0 до 3. В некоторых из таких вариантов реализации a равен 0 или 1. В дополнительных вариантах реализации a равен 0;

b может быть равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах реализации b равен от 0 до 12. В некоторых из таких вариантов реализации b равен от 0 до 8 и может быть равен 0, 2, 4 или 8;

c может быть равен 0 или 1;

d может быть равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах реализации d равен от 0 до 3. В некоторых из таких вариантов реализации d равен 1 или 2. В дополнительных вариантах реализации d равен 2.

В некоторых вариантах реализации группы X a равен 0, c равен 1, и d равен 2, и b может быть равен от 0 до 8. В некоторых из таких вариантов реализации b равен 0, 4 или 8.

Q^X

В одном варианте реализации Q^X представляет собой остаток аминокислоты.

Аминокислота может быть природной аминокислотой или неприродной аминокислотой.

В одном варианте реализации Q^X выбран из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp, где Cit представляет собой цитруллин.

В одном варианте реализации Q^X 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-подвижный линкер, то дипептид представляет собой место действия катепсин-опосредованного расщепления. В таком случае дипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина.

В одном варианте реализации Q^X выбран 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;

где Cit представляет собой цитруллин.

Предпочтительно Q^X 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^X 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.

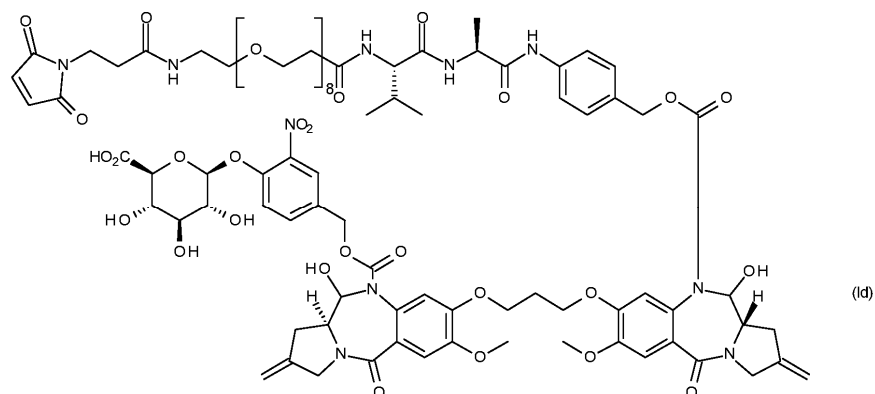
В некоторых вариантах реализации Q^X представляет собой трипептидный остаток. Аминокислоты в трипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных ами-

нокислот. В некоторых вариантах реализации трипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой катепсин-подвижный линкер, то трипептид представляет собой место действия катепсин-опосредованного расщепления. В таком случае трипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина.

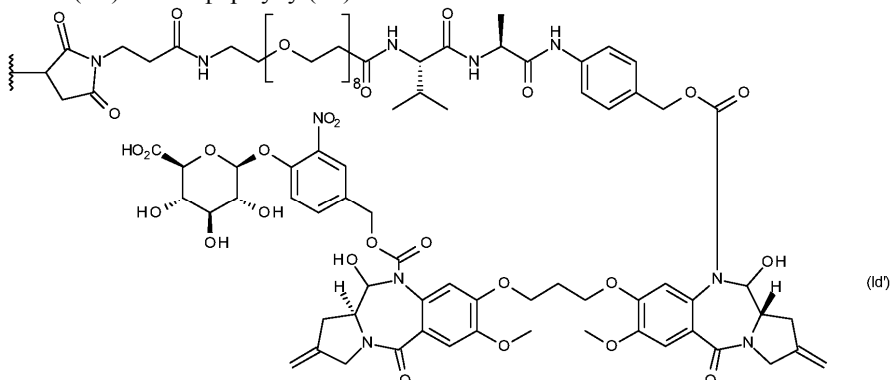
В одном варианте реализации боковая цепь аминокислоты является химически защищенной, если это необходимо. Защитная группа боковой цепи может представлять собой группу, описанную ниже. Защищенные аминокислотные последовательности могут расщепляться ферментами. Например, дипептидная последовательность, 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 одном конкретном варианте реализации первый аспект данного изобретения включает соединенные формулы (Id)



В одном конкретном варианте реализации второго аспекта данного изобретения линкер лекарственного соединения (D^L) имеет формулу (Id')



Дополнительная вводная информация.

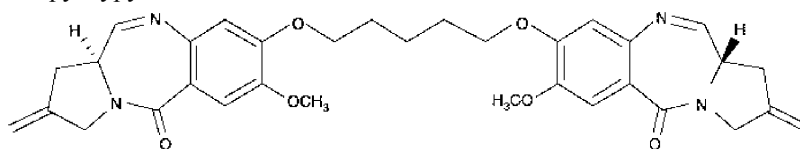
В исследовании воздействия, представленном на рассмотрение в рамках Программы оценки научных достижений 2014 года (2014 Research Excellence Framework (REF)) в Великобритании Университетским колледжем Лондона (University College London) (доступно по ссылке <http://impact.ref.ac.uk/casestudies2/refservice.svc/GetCaseStudyPDF/35393>), указано, что

"Разработано следующее поколение димеров PBD, включая SG2057 и SG2202, которые являются более эффективными, чем SG2000. Они демонстрируют пикомолярную/суб-пикомолярную активность против ряда человеческих опухолевых клеточных линий и демонстрируют терапевтическую активность в моделях ксенотрансплантата человеческих опухолей", ссылка на Hartley J.A, et al., DNA interstrand cross-linking and in vivo antitumor activity of the extendedpyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine dimer SG2057. Invest New Drugs. 2012 Jun; 30(3):950-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-011-9647-z> (здесь и далее "Hartley et al. (2012)"); и

"Возможность получать такие цитотоксические молекулы, которые демонстрируют превосходную эффективность, позволяет предположить возможную роль в стратегиях, рассчитанных на направленное воздействие и высвобождение сильных цитотоксических агентов непосредственно в очаге опухоли. Такой пример действует как "активная группа" конъюгата антитела-лекарства (ADC). Полностью синтетические димеры PBD идеально подходят на роль активной группы в подходе с ADC".

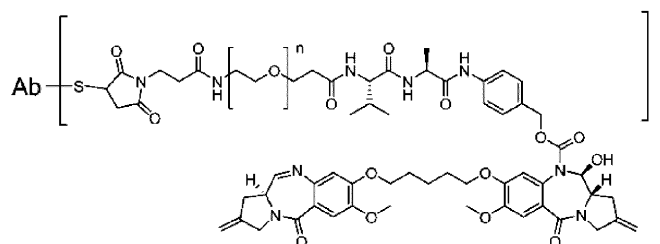
В резюме документа Hartley et al. (2012) указано, что "SG2057, таким образом, является весьма активным противоопухолевым агентом с более высокой in vitro активностью и превосходной in vivo активностью по сравнению с SG2000, что обосновывает дальнейшие разработки".

SG2057 имеет структуру:



SG2057

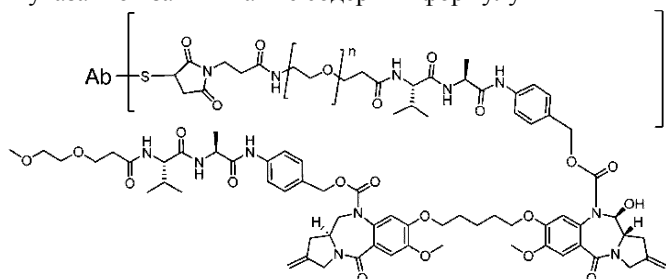
Конъюгаты антитело-лекарственное соединение с применением SG2057 в качестве активной группы были впервые описаны в WO 2011/130598. Например, пункт 54 формулы указанной заявки содержит формулу



где n равен от 1 до 24, более предпочтительно от 4 до 8.

Приведены примеры следующих линкеров лекарственных соединений: n=4, 15c; n=8, 15d; n=24, 15e.

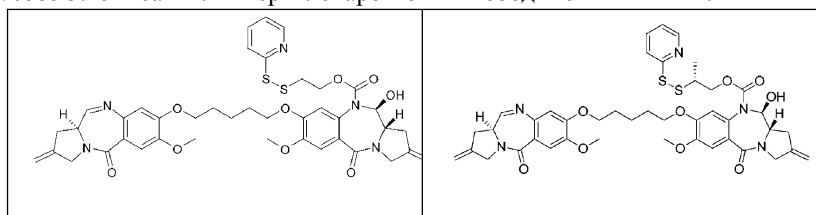
Пункт 54 формулы указанной заявки также содержит формулу



где n равен от 1 до 24, более предпочтительно от 4 до 8. Приведены примеры следующих линкеров лекарственных соединений: n=8, 58; n=24, 61.

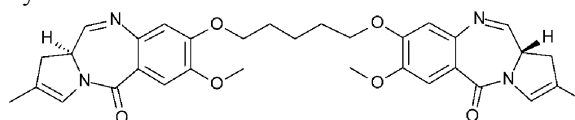
В WO 2011/130598 также описаны конъюгаты антитело-лекарственное соединение, содержащие указанные линкеры лекарственных соединений, например, пример 110 (antiSteap1-15d), пример 114 (тастузумаб-15d) и пример 115 (тастузумаб-58).

В WO 2013/055987 описаны линкеры лекарственных соединений 14 и 22:



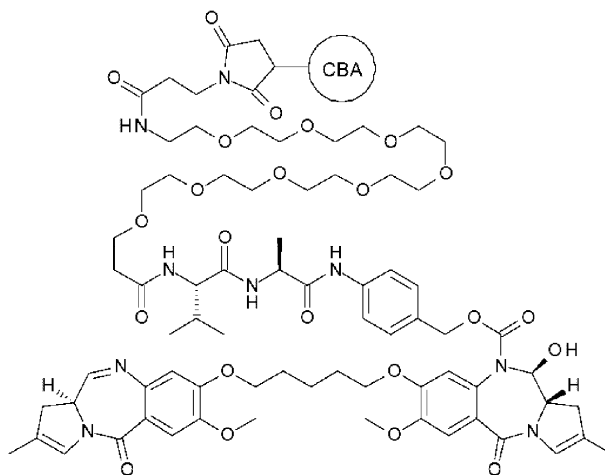
и их применение в конъюгатах антитело-лекарственное соединение.

Позже активную группу



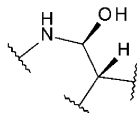
использовали в линкерах лекарственных соединений и конъюгатах антитело-лекарственное соединение.

В WO 2014/057074 описаны

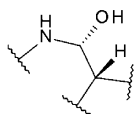


Авторами данного изобретения неожиданно обнаружено, что несмотря на то, что SG2000 по меньшей мере в 10 раз менее цитотоксичен, чем SG2057 (см. Hartley et al. 2012), определенные конъюгаты антитело-лекарственное соединение, т.е. конъюгаты формулы Id, демонстрируют по меньшей мере сравнимую активность. Было показано, что указанные конъюгаты неожиданно хорошо переносятся в исследованиях токсичности у различных видов животных. Это обеспечивает высокий терапевтический индекс таких конъюгатов и, следовательно, делает их перспективными клиническими кандидатами.

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:



Соединения, представляющие собой особый интерес, включают соединения, описанные в примерах.

Примеры

Флэш-хроматографию проводили на приборе Biotage Isolera 1™, используя градиентное элюирование, начиная с 88% смеси гексана в EtOAc или 99,9% смеси ДХМ в MeOH, до полного элюирования из колонки всех УФ-активных компонентов (обнаружение при 214 и 254 нм). Когда наблюдали значительное элюирование УФ-активного материала, градиент выдерживали 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 связывания записывали в герцах (Гц). Химические сдвиги записывали в миллионных долях (м.д.) в сторону слабого поля относительно сигнала тетраметилсилана. Спиновые мультиплетности записывали как с (синглет), шс (широкий 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 подвижных фаз использовали растворитель А (H₂O с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (CH₃CN с 0,1% муравьиной кислоты). Градиент для обычной записи хроматограммы за 3 мин: первоначальное содержание 5% В выдерживали в течение 25 с, затем повышали от 5% В до 100% В за 1 мин 35 с. Такое содержание выдерживали в течение 50 с при 100% В, затем возвращали к 5% В за 5 с и выдерживали в течение 5 с. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 3,0 мин. Градиент для записи хроматограммы за 15 мин: первоначальное содержание 5% В выдерживали в течение 1 мин, затем повышали от 5% В до 100% В за

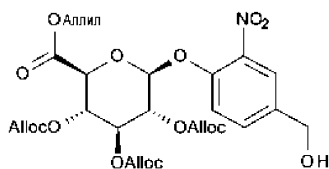
9 мин. Такое содержание выдерживали в течение 2 мин при 100% В, затем возвращали к 5% В за 10 с и выдерживали в течение 2 мин 50 с. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 15,0 мин. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин (для 3-минутного цикла) и 0,6 мл/мин (для 15-минутного цикла). Обнаружение 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, 130А, 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, 130А, 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), размеры: 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: первоначальное содержание 13% В увеличивали до 60% В за 15 мин, затем увеличивали до 100% В за 2 мин. Такое содержание 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.

Синтез основных промежуточных соединений

(а) Соединение 5а.

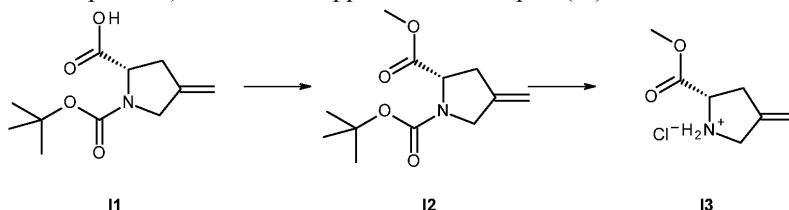
Следующее соединение 5а:



5а

синтезировали так, как описано (для соединения 10) в публикации Grinda, M., et al., ChemMedChem 2011 (5), 2137-2141 (DOI: 10.1002/cmde.201100355).

(а) (S)-2-(Метоксикарбонил)-4-метиленипирролидиния хлорид (I3)



I1

I2

I3

Имеющееся в продаже производное пролина (I1) приобретали у компании Omegachem.

(i) (S)-1-трет-Бутил-2-метил-4-метиленипирролидин-1,2-дикарбоксилат (I2).

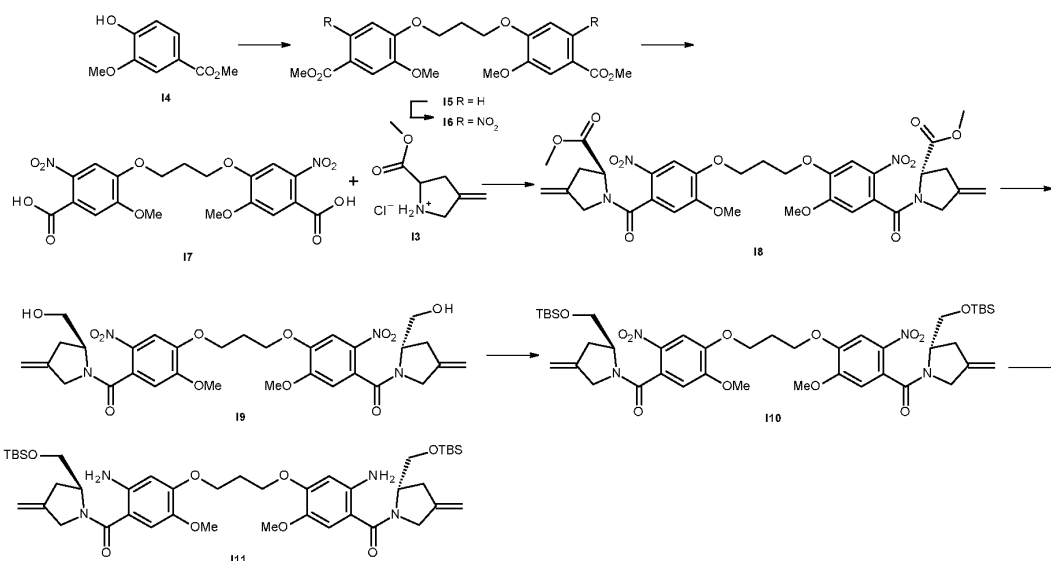
Карбонат калия (19,92 г, 14 ммоль, 3,0 экв.) добавляли к перемешанному раствору карбоновой кислоты I1 (10,92 г, 48 ммоль, 1,0 экв.) в ДМФА (270 мл). Полученную белую суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего добавляли йодметан (21,48 г, 9,5 мл, 151 ммоль, 3,15 экв.). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре на 3 дня. ДМФА удаляли ротационным испарением при пониженном давлении с получением желтого остатка, который разделяли между этилацетатом и водой. Органический слой отделяли, а водную фазу экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали водой, насыщали солью и сушили над сульфатом магния. Этилацетат удаляли ротационным испарением при пониженном давлении с получением неочищенного продукта в виде желтого маслянистого вещества. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией [85% н-гексан/15% этилацетат] с получением продукта в виде бесцветного маслянистого вещества (10,74 г, 93%).

(ii) (S)-2-(Метоксикарбонил)-4-метиленипирролидиния хлорид (I3).

Раствор 4 М хлористоводородной кислоты в диоксане (63 мл, 254,4 ммоль, 4,5 экв.) добавляли к фрагменту Вос-защитенного кольца C I2 (13,67 г, 56,6 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре. Наблюдалось выделение газа, что свидетельствует о высвобождении CO₂ и удалении группы Вос. Продукт выпадал в осадок в виде белого твердого вещества и добавляли дополнительное количество диоксана для облегчения перемешивания реакционной смеси, которую оставляли перемешиваться в течение одного ч, а затем разбавляли диэтиловым эфиром. Выпавший в осадок продукт собирали вакуумным фильтрованием и промывали дополнительным количеством диэтилового эфира. После сушки на воздухе получали требуемый продукт в виде белого порошка (9,42 г, 94%).

(b) ((Пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(((трет-

бутилдиметилсилил(окси)метил)-4-метиленипирролидин-1-ил)метанон) (II1)



(i) 1',3'-бис-[2-Метокси-4-(метоксикарбонил)фенокси]пропан (I5).

Диизопропилазодикарбоксилат (71,3 мл, 73,2 г, 362 ммоль) по каплям добавляли в течение 60 мин к перемешиваемому с помощью верхней мешалки раствору метилваниллата I4 (60 г, 329 ммоль) и Ph_3P (129,4 г, 494 ммоль) в безводном ТГФ (800 мл) при 0-5°C (лед/ацетон) в атмосфере азота. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 0-5°C еще 1 ч, после чего по каплям добавляли раствор 1,3-пропандиола (11,4 мл, 12,0 г, 158 ммоль) в ТГФ (12 мл) в течение 20 мин. Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали 5 дней. Полученный белый осадок I3 собирали вакуумным фильтрованием, промывали ТГФ и сушили в вакуумном эксикаторе до постоянной массы. Выход = 54,68 г (84% относительно 1,3-пропандиола).

Аналитические данные: Удовлетворительная чистота по ЖХ/МС, 3,20 мин (ЭР+) m/z (относительная интенсивность) 427 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 10);

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,64 (дд, 2H, $J=1,8, 8,3$ Гц), 7,54 (д, 2H, $J=1,8$ Гц), 6,93 (д, 2H, $J=8,5$ Гц), 4,30 (т, 4H, $J=6,1$ Гц), 3,90 (с, 6H), 3,89 (с, 6H), 2,40 (п, 2H, $J=6,0$ Гц).

(ii) 1',3'-бис-[2-Метокси-4-(метоксикарбонил)-5-нитрофенокси]пропан (I6).

Твердый $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (81,54 г, 337,5 ммоль) медленно добавляли к перемешиваемой с помощью верхней мешалки суспензии сложного бис-эфира I5 (54,68 г, 135 ммоль) в уксусном ангидриде (650 мл) при 0-5°C (лед/ацетон). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 1 ч при 0-5°C, а затем оставляли нагреваться до комнатной температуры. На этой стадии наблюдали умеренную экзотерму (около 40-50°C), сопровождающуюся загущением смеси и выделением NO_2 . Добавляли дополнительное количество уксусного ангидрида (300 мл) и оставляли реакционную смесь перемешиваться в течение 16 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь выливали на лед (~1,5 л), перемешивали и оставляли нагреваться до комнатной температуры. Образовавшийся желтый осадок собирали вакуумным фильтрованием и сушили в эксикаторе с получением требуемого бис-нитросоединения I6 в виде желтого твердого вещества. Выход = 66,7 г (100%).

Аналитические данные: Удовлетворительная чистота по ЖХ/МС 3,25 мин. (ЭР+) m/z (относительная интенсивность) 517 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 40);

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,49 (с, 2H), 7,06 (с, 2H), 4,32 (т, 4H, $J=6,0$ Гц), 3,95 (с, 6H), 3,90 (с, 6H), 2,45-2,40 (м, 2H). См. ссылку Thurston 1996.

(iii) 1',3'-бис-(4-Карбокси-2-метокси-5-нитрофенокси)пропан (I7).

Суспензию метилового сложного эфира I6 (66,7 г, 135 ммоль) в ТГФ (700 мл) обрабатывали 1н. раствором NaOH (700 мл) и энергично перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре. Через 4 дня перемешивания суспензия превращалась в раствор темного цвета, который подвергали ротационному испарению при пониженном давлении для удаления ТГФ. Полученный водный остаток подкисляли до pH 1 с помощью концентрированной HCl , собирали бесцветный осадок I7 и тщательно сушили в вакуумной печи (50°C). Выход = 54,5 г (87%).

Аналитические данные: Удовлетворительная чистота по ЖХ/МС 2,65 мин. (ЭР+) m/z (относительная интенсивность) 489 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 30);

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,62 (с, 2H), 7,30 (с, 2H), 4,29 (т, 4H, $J=6,0$ Гц), 3,85 (с, 6H), 2,30-2,26 (м, 2H).

(iv) Диметил-1,1'-(4,4'-(пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитробензоил))(2S,2'S)-бис-(4-метиленипирролидин-2-карбоксилат) (I8).

Каталитическое количество безводного ДМФА (2,4 мл) добавляли к перемешанной суспензии оксалилхлорида (14,7 г, 9,8 ммоль, 115,8 ммоль, 3 экв.) и димерного ядра I7 (18 г, 38,6 ммоль, 1 экв.) в безводном ДХМ (500 мл) при комнатной температуре. После добавления ДМФА наблюдали энергичное выделение газа и перемешивали реакционную смесь в течение 18 ч в круглодонной колбе, оснащенной сушильной трубкой с хлоридом кальция. Полученный прозрачный раствор выпаривали при пониженном давлении и растирали твердое вещество с эфиром. Твердый продукт собирали вакуумным фильтрованием, промывали дополнительным количеством эфира и сушили *in vacuo* при 40°C в течение 1,5 ч. Затем полученное твердое вещество по частям добавляли к суспензии кольца С 3 (15,1 г, 84,9 ммоль, 2,2 экв.) и ТЕА (19,5 г, 27 мл, 119,6 ммоль, 5 экв.) в сухом ДХМ (375 мл), поддерживая температуру от -40 до -50°C с помощью бани из сухого льда/ацетонитрила. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при -40°C в течение 1 ч, а затем оставляли нагреваться до комнатной температуры, после чего ЖХМС показала полное расхождение исходного вещества. Реакционную смесь разбавляли дополнительным количеством ДХМ и последовательно промывали водным раствором хлористоводородной кислоты (1 М, 2×200 мл), насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (2×250 мл), водой (250 мл), насыщенным соевым раствором (250 мл), сушили (MgSO₄). ДХМ удаляли ротационным испарением при пониженном давлении с получением продукта в виде желтого пенистого вещества (25,72 г, 94%).

Аналитические данные: RT 1,59 мин; MS (ЭР⁺) m/z (относительная интенсивность) 713 ([M+H]⁺, 100).

(v) ((Пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(гидроксиметил)-4-метиленипирролидин-1-ил)метанон) (I9).

Твердый боргидрид лития (3,18 г, 146 ммоль, 3 экв.) одной порцией добавляли к раствору сложного эфира I8 (34,72 г, 48,7 ммоль, 1 экв.) в сухом ТГФ (350 мл) в атмосфере азота при 0°C (ледяная баня). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 0°C в течение 30 мин, а затем оставляли нагреваться до комнатной температуры, после чего наблюдали выпадение в осадок оранжевого смолистого вещества. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре еще на 2 ч, а затем охлаждали на ледяной бани и обрабатывали водой с получением желтой суспензии. Осторожно добавляли хлористоводородную кислоту (1 М) до прекращения выделения газа. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (×4) и промывали объединенные органические слои водой (×1), насыщенным соевым раствором (×1) и сушили (MgSO₄). Этилацетат удаляли ротационным испарением при пониженном давлении с получением желтого пенистого вещества. В результате очистки колоночной флэш-хроматографией [градиентное элюирование смесью ДХМ/MeOH от 0 до 5% с приращениями 1%] получали продукт в виде бледно-желтого пенистого вещества (23,1 г, 72%).

Аналитические данные: RT 1,23 мин; MS (ЭР⁺) m/z (относительная интенсивность) 657 ([M+H]⁺, 100).

(vi) ((Пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленипирролидин-1-ил)метанон) (I10).

Раствор бис-спирта I9 (10 г, 15,2 ммоль, 1 экв.), трет-бутилдиметилсилилхлорида (5,97 г, 39,6 ммоль, 2,6 экв.) и имидазола (5,38 г, 79 ммоль, 5,2 экв.) в сухом ДМФА (80 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакционную смесь выливали в воду (500 мл) с получением желтого осадка. Смесь экстрагировали ДХМ (4×100 мл), а объединенные экстракты промывали водой и насыщенным соевым раствором, сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении с получением вязкой желтой маслянистой жидкости. После очистки колоночной хроматографией [Biotage Isolera, градиентное элюирование, начиная со смеси гексана 60%/EtOAc 40% до 100% EtOAc, 8 объемов колонки, 100 г картридж Snap Ultra®] получали продукт в виде желтого пенистого вещества (11,8 г, 88%).

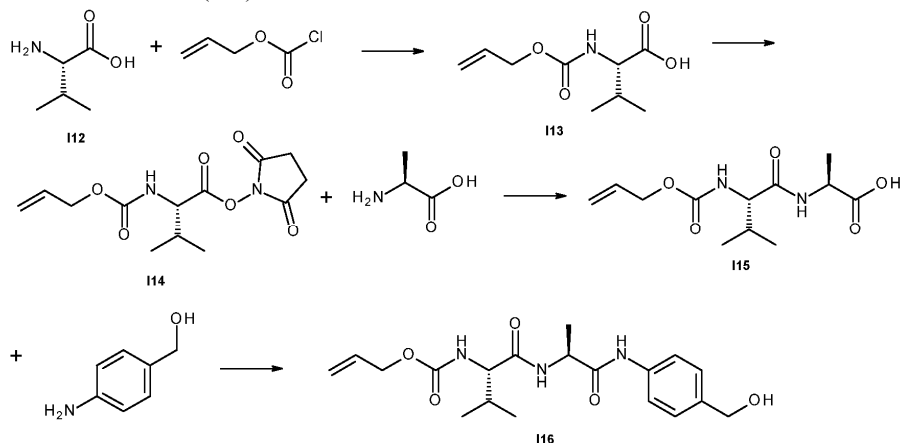
Аналитические данные: RT 2,20 мин; MS (ЭР⁺) m/z (относительная интенсивность) 885 ([M+H]⁺, 100), 907 ([M+Na]⁺, 50).

(vii) ((Пропан-1,3-диил-бис-(окси))-бис-(2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленипирролидин-1-ил)метанон) (I11).

Цинковый порошок (31,9 г, 488 ммоль, 40 экв.) активировали посредством перемешивания/обработки ультразвуком с 1 М HCl в течение 10 мин. Цинк отфильтровывали, промывая 1 М HCl, водой (×3) и MeOH (×2). Активированный цинк добавляли к раствору нитро-TBS соединения I10 (10,8 г, 12,2 ммоль, 1 экв.) в MeOH (88 мл) и 5% раствора муравьиной кислоты/MeOH (440 мл). Температура повышалась до 37°C, а реакционная смесь изменялась с желтого на бесцветный раствор. После убывания экзотермы (20 мин.) реакция была завершена, по данным ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровывали через целит, промывая EtOAc. EtOAc часть промывали насыщенным раствором бикарбоната (×4) [осторожно, выделяется газ!], водой (×1), насыщенным соевым раствором (×1), сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении с получением желтого твердого вещества. После очистки колоночной флэш-хроматографией [н-гексан/EtOAc 50/50 об./об. до 100% EtOAc с приращениями 10%] получали продукт в виде желтого пенистого вещества (9,5 г, 86%).

Аналитические данные: RT 2,12 мин; MS (ЭР⁺) m/z (относительная интенсивность) 825 ([M+H]⁺, 60), 847 ([M+Na]⁺, 30).

(c) Alloc-Val-Ala-PAВОН (I16)



(i) Alloc-Val-OH (I13).

Аллилхлорформат (41 г, 36,2 мл, 0,34 моль, 1,2 экв.) по каплям добавляли к перемешанному раствору L-валина I12 (33,25 г, 0,28 моль, 1 экв.) и карбоната калия (58,9 г, 0,426 моль, 1,5 экв.) в воде (650 мл) и ТГФ (650 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. ТГФ выпаривали при пониженном давлении, а оставшийся раствор экстрагировали диэтиловым эфиром (или МТБЭ) (×2). Водную часть подкисляли до pH 2 концентрированной HCl и экстрагировали ДХМ (×3). Объединенные органические экстракты промывали насыщенным солевым раствором (×1), сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении с получением бесцветного маслянистого вещества (57,1 г). Его использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

(ii) Alloc-Val-OSu (I14).

К перемешанному раствору соединения I13 (57,1 г, 0,28 моль, 1 экв.) и N-гидроксисукцинимид (32,68 г, 0,28 моль, 1 экв.) в сухом ТГФ (800 мл) добавляли дициклогексилкарбодиимид (58,6 г, 0,28 моль, 1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакционную смесь отфильтровывали. Твердое вещество промывали ТГФ и концентрировали объединенный фильтрат при пониженном давлении. Маслянистый/твердый остаток повторно растворяли в ДХМ и оставляли стоять при 0°C в течение 30 мин. Суспензию фильтровали, промывая холодным ДХМ. После выпаривания фильтрата при пониженном давлении получали сукцинимидный сложный эфир в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

iii) Alloc-Val-Ala-OH (I15).

Раствор Alloc-Val-OSu I14 (11,67 г, 39,0 ммоль, 1 экв.) в ТГФ (50 мл) добавляли к раствору H-Ala-OH (3,66 г, 41,08 ммоль, 1,05 экв.) и NaHCO₃ (3,61 г, 43,03 ммоль, 1,1 экв.) в ТГФ (100 мл) и H₂O (100 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 72 ч и выпаривали ТГФ при пониженном давлении. pH довели до 3-4 с помощью лимонной кислоты, в результате чего в осадок выпало белое смолистое вещество. Его экстрагировали этилацетатом (6×150 мл) и промывали объединенные экстракты H₂O (200 мл), насыщенным солевым раствором (200 мл), сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении с получением белого твердого вещества. После растирания с диэтиловым эфиром (избыток) получали чистый продукт в виде белого порошка (7,93 г, 74%).

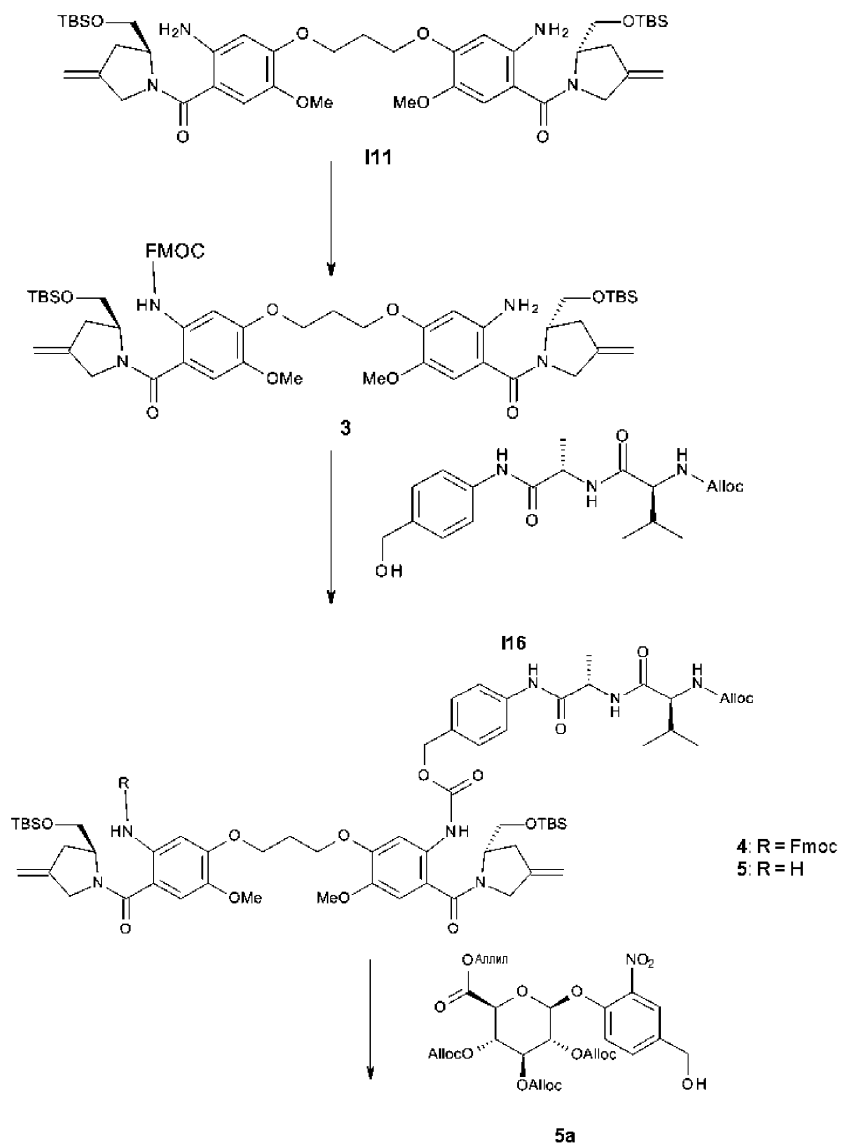
Аналитические данные: RT 2,17 мин; MC (ЭР⁺) m/z (относительная интенсивность) 295 ([M+Na]⁺, 63), 273 ([M+1]⁺, 60).

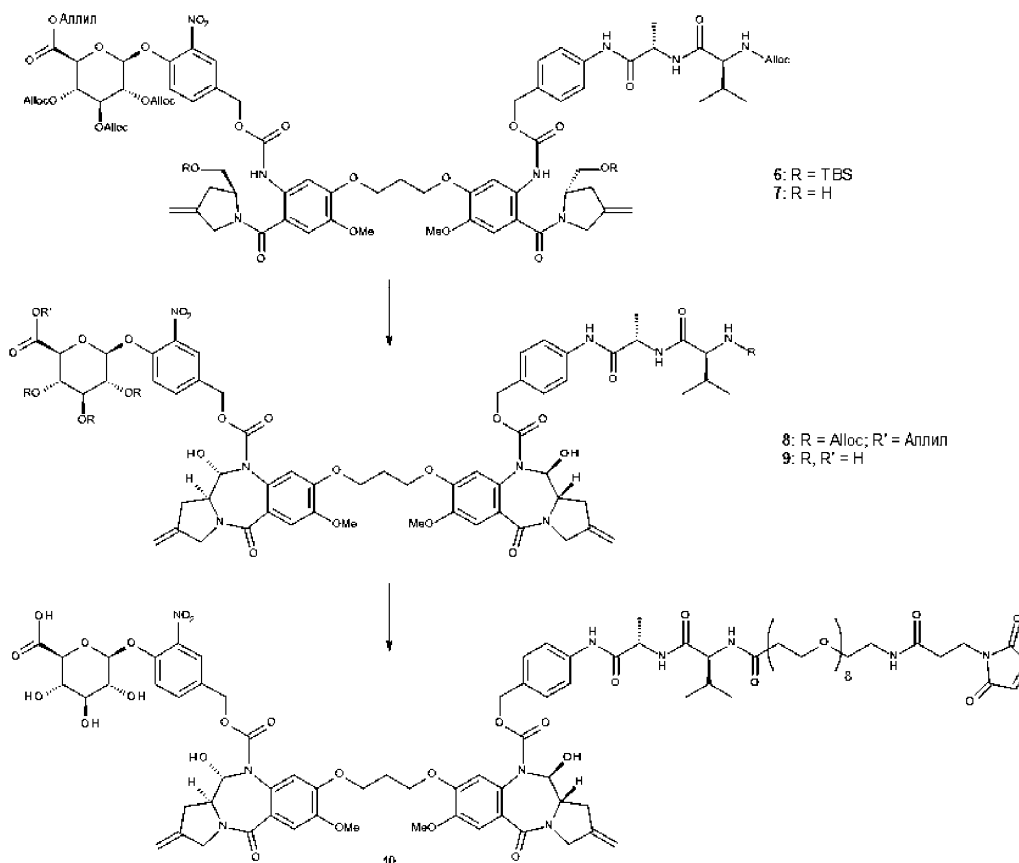
(iv) Alloc-Val-Ala-PAВОН (I16).

EEDQ (4,79 г, 19,3 ммоль, 1,05 экв.) добавляли к раствору p-аминобензилового спирта (2,38 г, 19,3 ммоль, 1,05 экв.) и Alloc-Val-Ala-OH (I15) (5,02 г, 18,4 ммоль, 1,0 экв.) в сухом ТГФ (100 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 72 ч. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением бледно-коричневого твердого вещества. Твердое вещество растирали с диэтиловым эфиром и фильтровали, промывая избытком диэтилового эфира. В результате получали продукт в виде белого твердого вещества (6,2 г, 89%).

Аналитические данные: RT 2,50 мин; MC (ЭР⁺) m/z (относительная интенсивность) 400,6 ([M+Na]⁺, 50), 378,6 ([M+1]⁺, 60).

Пример 1





(а) (9Н-Флуорен-9-ил)метил-(5-(3-(5-амино-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленипирролидин-1-карбонил)-2-метоксифеноксипропокси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленипирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (3).

FmocCl (1,97 г, 7,63 ммоль) добавляли к перемешанному раствору бис-анилина II1 (6,99 г, 8,48 ммоль) и Na₂CO₃ (2,25 г, 21,2 ммоль) в ТГФ (65 мл) и H₂O (65 мл). Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре на 16 ч, анализ ЖХ/МС показал наличие требуемого моно-Fmoc продукта 3 при времени удерживания 2,34 мин, 1% = 40, ИЭР+ m/z 1069 [M+Na]⁺, 1047 [M+H]⁺, вместе с непрореагировавшим исходным материалом при времени удерживания 2,15 мин, 1% = 12, а также бис-Fmoc продукта при времени удерживания 2,50 мин, 1% = 45, ИЭР+ m/z 1291 [M+Na]⁺, 1269 [M+H]⁺. Слои разделяли и экстрагировали водную фазу ДХМ (2×20 мл), объединенные органические слои промывали H₂O (30 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали in vacuo с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 50 г, 100 мл/мин) получали чистый моно-Fmoc продукт 3 в виде пенистого вещества (2,67 г, выход 39% относительно FmocCl, элюировали с 50% смесью гексан/EtOAc), непрореагировавший бис-анилин 2 (1,78 г, элюировали с 100% EtOAc) и бис-Fmoc (3, оранжевого 28 г, элюировали с 70% смесью гексан/EtOAc).

(б) (9Н-Флуорен-9-ил)метил-(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)-4-метиленипирролидин-1-карбонил)-2-метоксифеноксипропокси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленипирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (4).

Трифосген (26 мг, 86 мкмоль) добавляли к перемешанному раствору моно-Fmoc продукта 3 (250 мг, 0,24 ммоль) и ТЕА (73 мкл, 53 мг, 0,53 ммоль) в сухом ДХМ (10 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (брали образец в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,39 мин, ИЭР+ m/z 1127 [M+Na]⁺, 1105 [M+H]⁺). Смесь обрабатывали дополнительным количеством ТЕА (50 мкл, 36 мг, 0,36 ммоль), затем добавляли линкер 116 (90 мг, 0,24 ммоль). Через 4 ч перемешивания в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал удовлетворительное превращение в карбамат 4 с временем удерживания 2,34 мин, ИЭР+ m/z 1472 [M+Na]⁺, 1451 [M+H]⁺. Смесь разбавляли ДХМ (60 мл) и промывали насыщенным водным раствором NH₄Cl (2×20 мл), H₂O (20 мл), насыщенным соевым раствором (30 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали in vacuo с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 25 г, 75 мл/мин) получали чистый карбамат 4 (элюировали с 28% смесью гексан/EtOAc) в виде желтого пенистого вещества (257 мг, выход 74%).

(с) 4-((S)-2-((S)-2-(((Аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-(5-(3-(5-амино-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленипирролидин-1-карбонил)-2-метокси-

феноксипропоксид)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленипирролидин-1-карбонил)-4-метоксибензил)карбамат (5).

Диметиламин (16,5 мл 2,0 М раствора в ТГФ, 33,0 ммоль) добавляли к перемешанному раствору Fmoc-защищенного соединения 4 (2,39 г, 1,65 ммоль) в ТГФ (46 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 1 ч при комнатной температуре анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта с временем удерживания 2,17 мин, ИЭР+ m/z 1250 $[M+Na]^+$, 1228 $[M+H]^+$, вместе с побочным продуктом расщепления Fmoc с временем удерживания 1,92 мин и его DMA-аддуктом с временем удерживания 1,10 мин. Смесь выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта, который затем очищали на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) с получением чистого анилина 5 (элюировали при 100% EtOAc) в виде оранжевого пенного вещества (1,87 г, выход 92%).

(d) Аллил-(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленипирролидин-1-карбонил)-2-метоксибензил)пропоксид)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленипирролидин-1-карбонил)-4-метоксибензил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофеноксид)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-карбоксилат (6).

Трифосген (161 мг, 0,54 ммоль) добавляли к перемешанному раствору анилина 5 (1,85 г, 1,51 ммоль) и пиридина (269 мкл, 263 мг, 3,32 ммоль) в сухом ДХМ (20 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (брали образец в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,21 мин, ИЭР+ m/z 1308 $[M+Na]^+$, 1286 $[M+H]^+$). Смесь обрабатывали дополнительным количеством пиридина (183 мкл, 179 мг, 2,27 ммоль) и дилауратом дибутилолова (179 мкл, 191 мг, 0,30 ммоль), затем добавляли линкер 5a (960 мг, 1,51 ммоль). Через 20 ч перемешивания в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал удовлетворительное превращение в карбамат 6 (время удерживания 2,25 мин, ИЭР+ m/z 1915 $[M+Na]^+$, 1892 $[M+H]^+$). Смесь разбавляли ДХМ (60 мл) и промывали насыщенным раствором NH_4Cl (2×20 мл), H_2O (20 мл), насыщенным соевым раствором (30 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый карбамат 6 (элюировали с 42% смесью гексана/EtOAc) в виде желтого пенного вещества (2,01 г, выход 70%).

(e) Аллил-(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(гидроксиметил)-4-метиленипирролидин-1-карбонил)-2-метоксибензил)пропоксид)-2-((S)-2-(гидроксиметил)-4-метиленипирролидин-1-карбонил)-4-метоксибензил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофеноксид)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-карбоксилат (7).

Ледяную уксусную кислоту (18 мл) добавляли к перемешанному раствору TBS-защищенного соединения 6 (2,12 г, 1,12 ммоль) в ТГФ (6 мл) и H_2O (6 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 18 ч при комнатной температуре, после чего анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта, наблюдаемого при времени удерживания 1,79 мин, ИЭР+ m/z 1663 $[M+H]^+$, 1686 $[M+Na]^+$.

Реакционную смесь по каплям добавляли к охлажденному (0-5°C) насыщенному раствору $NaHCO_3$ (300 мл). Нейтральный раствор оставляли нагреваться до комнатной температуры и экстрагировали EtOAc (3×100 мл), объединенные органические слои промывали H_2O (50 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали бис-спирт 7 (элюировали с 93% смесью ДХМ/MeOH) в виде желтоватого пенного вещества (1,43 г, выход 77%).

(f) 4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-((Аллилокси)карбонил)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)-тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-3-нитробензил-(11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилени-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пропоксид)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилени-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат (8).

45% IBX (264 мг, 0,43 ммоль) добавляли к перемешанному раствору бис-ОН 7 (300 мг, 0,18 ммоль) в сухом ДМСО (5 мл). Смесь нагревали до 30°C в атмосфере аргона и контролировали ход реакции по ЖХ/МС. Через 24 ч перемешивания добавляли дополнительное количество IBX (22 мг, 36 мкмоль) и перемешивали смесь еще 24 ч. После этого анализ ЖХ/МС показал преимущественно один пик, соответствующий требуемому продукту, с временем удерживания 1,78 мин, ИЭР+ m/z 1682 $[M+Na]^+$. Реакционную смесь выливали в воду (40 мл), фильтровали и собирали осадок, промывали H_2O (50 мл) и убирали фильтрат в сторону. Остаток (осадок) промывали ДХМ (120 мл), а оставшийся нерастворенный осадок промывали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (60 мл). Объединенные фильтраты переносили в делительную воронку и разделяли слои. Водную фазу экстрагировали ДХМ (2×20 мл) и объединенные

органические слои промывали NaHCO_3 (2×50 мл), насыщенным соевым раствором (60 мл), сушили (MgSO_4), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 25 г, 75 мл/мин) получали циклизированный продукт 8 (элюировали с 94,5% смесью ДХМ/MeOH) в виде белого пенистого вещества (261 мг, выход 87%).

(g) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-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-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (9).

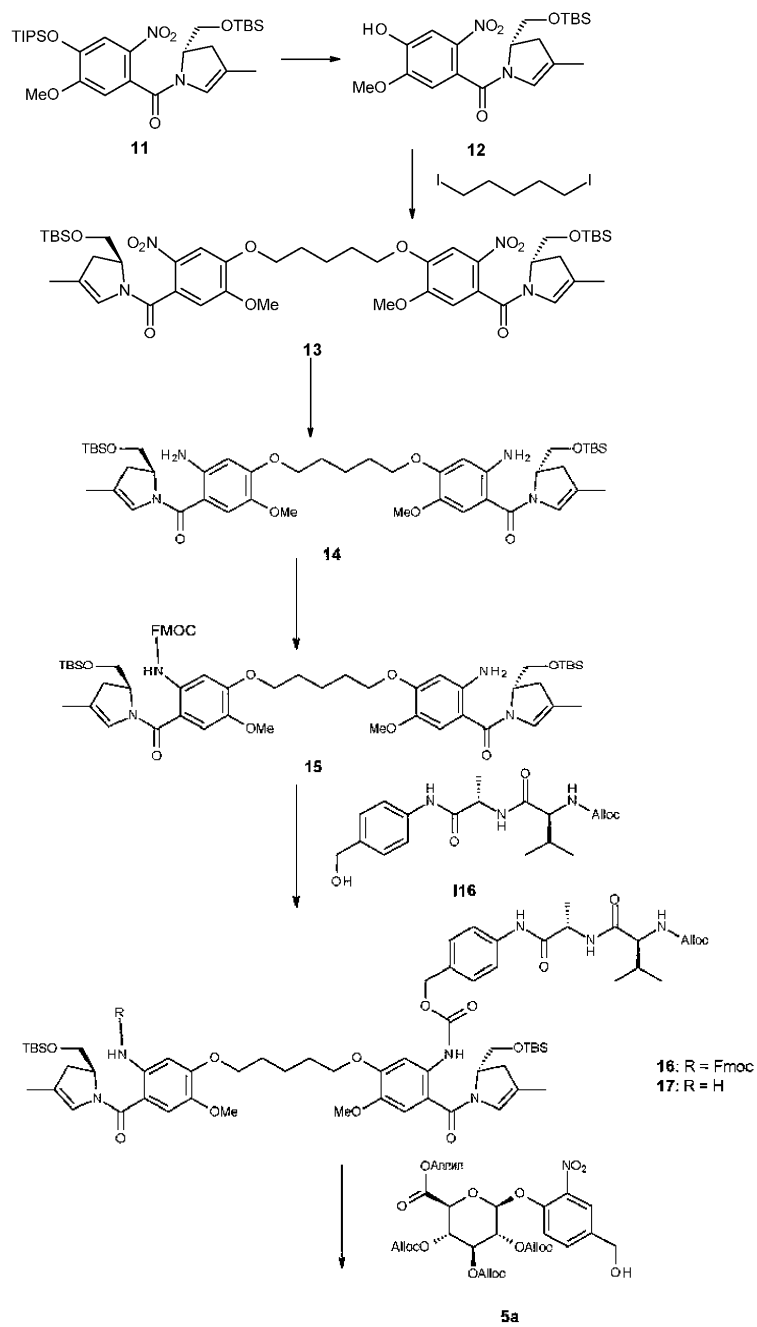
$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (18,2 мг, 15,7 мкмоль) добавляли к перемешанному раствору пирролидина (72 мкл, 62 мг, 0,87 ммоль) и Алос/аллил-соединения 8 (261 мг, 0,16 ммоль) в сухом ДХМ (3 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона, в результате чего начал образовываться осадок. После перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с образованием требуемого продукта, наблюдаемого при времени удерживания 1,13 мин, ИЭР+ m/z 1284 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Растворитель удаляли выпариванием *in vacuo* и растирали полученный остаток с диэтиловым эфиром, с последующим дополнительным выпариванием *in vacuo* с получением неочищенного амина 9 в виде твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки или анализа.

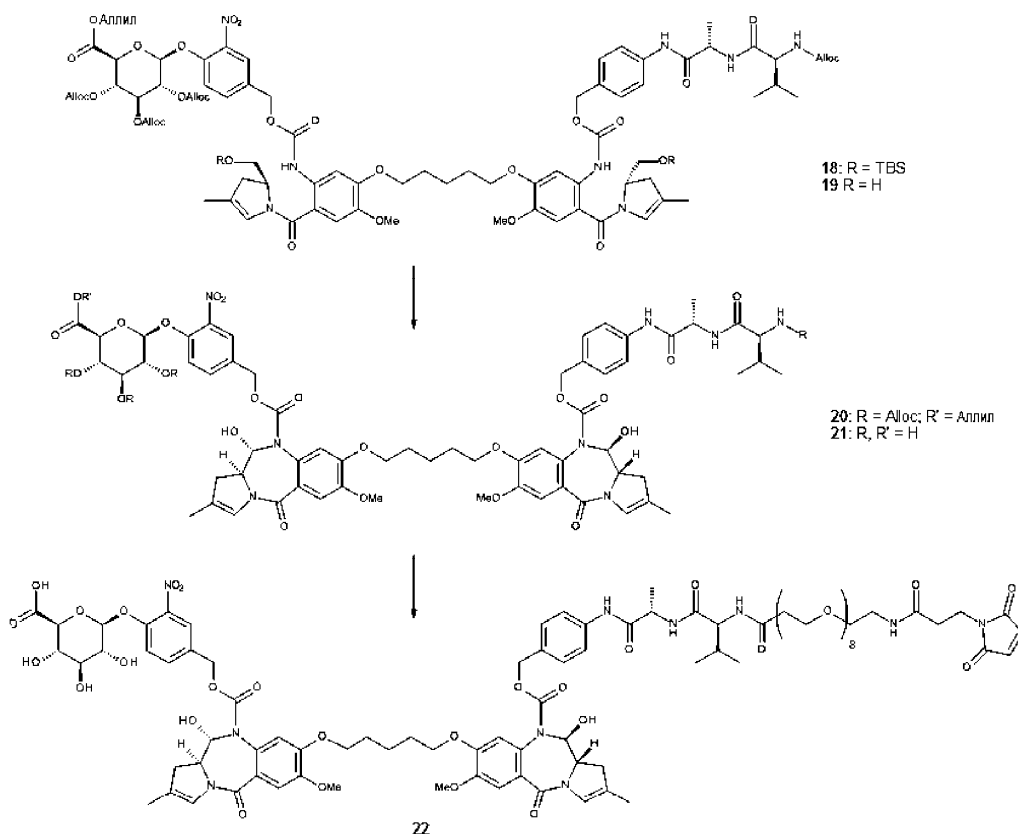
(h) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((2S,5S)-37-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаокса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пропокси)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (10).

Раствор сложного эфира MAL-dPEG®8-TFP (132 мг, 0,18 ммоль) в сухом ДХМ (7 мл) добавляли к перемешанному образцу амина 9 (202 мг, 0,16 ммоль), пиридина (24 мкл, 23 мг, 0,3 ммоль) и ДМФА (0,25 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона в течение 20 ч, и смесь со временем начинала темнеть. Анализ ЖХ/МС показал образование требуемого продукта с временем удерживания 1,38 мин, ИЭР+ m/z 1857 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1880 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, вместе с непрореагировавшим амином с временем удерживания 1,13 мин. Добавляли дополнительное количество сложного эфира MAL-dPEG®8-TFP (66 мг, 0,09 ммоль), пиридина (12 мкл, 11 мг, 0,15 ммоль) и ДХМ (3 мл) и оставляли смесь перемешиваться еще на три дня. После этого образовалось удовлетворительное количество требуемого продукта, по данным анализа ЖХ/МС, и растворитель удаляли выпариванием *in vacuo*. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением малеимида 10 в виде белого твердого вещества (55 мг, 19%).

ЖХ/МС (15-минутный цикл), время удерживания 5,93 мин, ИЭР+ m/z 1857 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1880 $[\text{M}+\text{Na}]^+$;
 ^1H ЯМР (400 МГц, d_6 -ДМСО) @ 10,0 (шс, 2H), 8,25-8,12 (м, 1H), 7,99 (т, 1H, $J=5,7$ Гц), 7,87 (д, 1H, $J=8,9$ Гц), 7,73 (шс, 1H), 7,62-7,48 (м, 3H), 7,40 (д, 1H, $J=8,7$ Гц), 7,22-7,11 (м, 2H), 7,06 (с, 2H), 7,00 (с, 2H), 6,87 (с, 2H), 6,84-6,76 (м, 1H), 6,68-6,52 (м, 2H), 5,45-5,30 (м, 3H), 5,25-5,01 (м, 9H), 4,97-4,82 (м, 2H), 4,42-4,34 (м, 1H), 4,24-4,17 (м, 1H), 4,16-3,92 (м, 8H), 3,87-3,72 (м, 6H), 3,60 (т, 4H, $J=7,2$ Гц), 3,54-3,42 (м, 30H), 3,39-3,20 (м, 5H), 3,18-3,12 (м, 2H), 2,95-2,82 (м, 2H), 2,57-2,35 (м, 4H), 2,33 (т, 2H, $J=7,4$ Гц), 2,24-2,13 (м, 2H), 2,03-1,90 (м, 1H), 1,30 (д, 1H, $J=7,0$ Гц), 0,87 (д, 3H, $J=6,7$ Гц), 0,83 (д, 3H, $J=6,7$ Гц).

Пример 2





(a) (S)-2-(((трет-Бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-ил(4-гидрокси-5-метокси-2-нитрофенил)метанон (12).

LiOAc (2,11 г, 20,7 ммоль) добавляли к перемешанному раствору TIPS соединения 11 (12 г, 20,7 ммоль) в ДМФА (67 мл) и H₂O (3 мл) при комнатной температуре. Наблюдали изменение цвета с желтого на красный. Через 2 ч перемешивания при комнатной температуре анализ ЖХ/МС показал полное превращение в требуемый продукт с временем удерживания 1,83 мин, ИЭР+ m/z 445 [M+Na]⁺, 423 [M+H]⁺. Смесь разбавляли H₂O (300 мл) и экстрагировали EtOAc (3×150 мл). Объединенные органические слои промывали 10% мас./об. раствором лимонной кислоты (2×200 мл), H₂O (200 мл), насыщенным соевым раствором (200 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали in vacuo с получением неочищенного продукта 12 в виде желтого твердого вещества (8,74 г, выход 100%). Чистота была удовлетворительной, поэтому продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

(b) ((Пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-ил)метанон (13).

1,5-Дийодпентан (1,54 мл, 3,35 г, 10,4 ммоль) добавляли к перемешанному раствору фенола 12 (8,74 г, 20,7 ммоль), TBAI (750 мг, 2,05 ммоль) и K₂CO₃ (3,15 г, 22,8 ммоль) в сухом ДМФА (60 мл). Реакционную смесь нагревали до 70°C и перемешивали в атмосфере аргона в течение 16 ч, после чего анализ ЖХ/МС показал образование существенного количества продукта с временем удерживания 2,21 мин, ИЭР+ m/z 935 [M+Na]⁺, 913 [M+H]⁺. Реакционную смесь оставляли остывать до комнатной температуры и удаляли ДМФА выпариванием in vacuo. Полученный остаток повторно растворяли в EtOAc (200 мл) и промывали водную фазу водой (3×40 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали in vacuo с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали простой бис-эфир 13 (элюировали с 60% смесью гексан/EtOAc) в виде желтого пенистого вещества (6,75 г, выход 71%).

(c) ((Пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-ил)метанон (14).

Цинковую пыль (2,79 г, 42,8 ммоль) обрабатывали 1н. HCl (50 мл) и перемешивали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем смесь обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин и собирали активированный цинк вакуумным фильтрованием через спеченный фильтр, затем промывали 1н. HCl (25 мл), H₂O (20 мл), MeOH (20 мл) и сушили in vacuo на спеченной фильтрующей прокладке. Активированный цинк добавляли к энергично перемешиваемому раствору бис-нитросоединения 13 (974 мг, 1,07 ммоль) в MeOH (15 мл) при комнатной температуре. В реакционную смесь по каплям добавляли 5% об./об. раствор HCO₂H в MeOH (20 мл). Наблюдали изменение цвета с зеленого на металлический серый и экзотерму до 37°C. Реакционную смесь оставляли остывать до комнатной температуры, после чего анализ ЖХ/МС показал полное превращение в требуемый продукт с временем удерживания

2,19 мин, ИЭР+ m/z 875 $[M+Na]^+$, 853 $[M+H]^+$. Смесь фильтровали через Celite® и промывали фильтровальный слой EtOAc (75 мл). Фильтрат промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃ (3×20 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали in vacuo с получением неочищенного бис-анилина 14 в виде темно-оранжевого пенного вещества (840 мг, выход 92%). Чистота была удовлетворительной, поэтому продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

(d) (9Н-Флуорен-9-ил)метил(5-((5-(5-амино-4-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентил)окси)-2-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенилкарбамат (15).

FmocCl (1,50 г, 5,93 ммоль) добавляли к перемешанной суспензии бис-анилина 14 (6,74 г, 7,91 ммоль) и Na₂CO₃ (2,10 г, 19,8 ммоль) в ТГФ (40 мл) и H₂O (40 мл). Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 16 ч, после чего анализ ЖХ/МС показал наличие требуемого моно-Fmoc продукта 15 с временем удерживания 2,41 мин, 1% = 32, ИЭР+ m/z 1098 $[M+Na]^+$, 1076 $[M+H]^+$, вместе с непрореагировавшим исходным материалом с временем удерживания 2,22 мин, 1% = 30, и бис-Fmoc продуктом с временем удерживания 2,60 мин, 1% = 36, ИЭР+ m/z 1321 $[M+Na]^+$, 1298 $[M+H]^+$. Смесь разделяли между H₂O (50 мл) и EtOAc (50 мл), слои разделяли и промывали органический слой H₂O (30 мл), насыщенным соевым раствором (40 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали in vacuo с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый моно-Fmoc продукт 15 в виде оранжевого пенного вещества (2,43 г, выход 38% относительно FmocCl, элюировали с 58% смесью гексан/EtOAc), непрореагировавший бис-анилин 14 (3,06 г, элюировали с 40% смесью гексан/EtOAc) и бис-Fmoc (2,32 г, элюировали с 74% смесью гексан/EtOAc).

(e) (9Н-Флуорен-9-ил)метил(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)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентил)окси)-2-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенилкарбамат (16).

Трифосген (242 мг, 0,81 ммоль) добавляли к перемешанному раствору моно-Fmoc продукта 15 (2,43 г, 2,26 ммоль) и ТЕА (692 мкл, 502 мг, 4,97 ммоль) в сухом ДХМ (30 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (брали образец в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,38 мин, ИЭР+ m/z 1156 $[M+Na]^+$, 1133 $[M+H]^+$). Смесь обрабатывали дополнительным количеством ТЕА (472 мкл, 342 мг, 3,39 ммоль), затем добавляли линкер 116 (852 мг, 2,26 ммоль). Через 3,5 ч перемешивания в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал удовлетворительное превращение в карбамат 16 с временем удерживания 2,33 мин, ИЭР+ m/z 1501 $[M+Na]^+$, 1479 $[M+H]^+$. Смесь разбавляли ДХМ (50 мл) и промывали насыщенным водным раствором NH₄Cl (2×20 мл), насыщенным соевым раствором (30 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали in vacuo с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый карбамат 16 (элюировали с 46% смесью гексан/EtOAc) в виде желтого пенного вещества (2,26 г, выход 68%).

(f) 4-((S)-2-((S)-2-((Аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-(5-((5-(5-амино-4-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентил)окси)-2-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенилкарбамат (17).

Диметиламин (15,0 мл 2,0 М раствора в ТГФ, 30,6 ммоль) добавляли к перемешанному раствору Fmoc-защищенного соединения 16 (2,26 г, 1,65 ммоль) в ТГФ (20 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 1 ч при комнатной температуре анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта с временем удерживания 2,17 мин, ИЭР+ m/z 1279 $[M+Na]^+$, 1257 $[M+H]^+$, вместе с побочным продуктом расщепления Fmoc с временем удерживания 1,79 мин и его DMA-аддуктом с временем удерживания 0,97 мин. Смесь выпаривали in vacuo с получением неочищенного продукта, который затем очищали на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) с получением чистого анилина 17 (элюировали с 18% смесью гексан/EtOAc) в виде оранжевого пенного вещества (1,94 г, выход 100%).

(g) Аллил(2S,3SAS,5R,6S)-6-(4-(((5-((5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентил)окси)-2-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенил)-карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-карбоксилат (18).

Трифосген (165 мг, 0,55 ммоль) добавляли к перемешанному раствору анилина 17 (1,94 г, 1,54 ммоль) и пиридина (274 мкл, 268 мг, 3,39 ммоль) в сухом ДХМ (20 мл) при комнатной температуре.

После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (брали образец в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,21 мин, ИЭР+ m/z 1337 $[M+Na]^+$, 1315 $[M+H]^+$). Смесь обрабатывали дополнительным количеством пиридина (187 мкл, 183 мг, 2,31 ммоль) и дилауратом дибутилолова (179 мкл, 191 мг, 0,30 ммоль), затем добавляли линкер 5a (984 мг, 1,54 ммоль). Через 18 ч перемешивания в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал удовлетворительное превращение в карбамат 18 с временем удерживания 2,23 мин, ИЭР+ m/z 1942 $[M+Na]^+$, 1920 $[M+H]^+$. Смесь разбавляли ДХМ (30 мл) и промывали насыщенным раствором NH_4Cl (2×20 мл), H_2O (20 мл), насыщенным соевым раствором (40 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый карбамат 18 (элюировали с 43% смесью гексан/EtOAc) в виде желтого пеннистого вещества (2,17 г, выход 74%).

(h) Аллил(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(гидроксиметил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентил)окси)-2-((S)-2-(гидроксиметил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-карбоксилат (19).

Ледяную уксусную кислоту (18 мл) добавляли к перемешанному раствору TBS-защищенного соединения 18 (2,17 г, 1,13 ммоль) в ТГФ (6 мл) и H_2O (6 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 18 ч при комнатной температуре, после чего анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта с временем удерживания 1,82 мин, ИЭР+ m/z 1691 $[M+H]^+$, 1714 $[M+Na]^+$. Реакционную смесь по каплям добавляли к охлажденному (0-5°C) насыщенному раствору $NaHCO_3$ (300 мл). Нейтральный раствор оставляли нагреваться до комнатной температуры и экстрагировали EtOAc (3×100 мл), объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали бис-спирт 19 (элюировали с 96,5% смесью ДХМ/MeOH) в виде белого пеннистого вещества (1,31 г, выход 69%).

(i) 4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-((Аллилокси)карбонил)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-3-нитробензил(11S,11aS)-8-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат (20).

45% IBX (269 мг, 0,43 ммоль) добавляли к перемешанному раствору бис-ОН 19 (300 мг, 0,18 ммоль) в сухом DMSO (5 мл). Смесь нагревали до 30°C в атмосфере аргона и контролировали ход реакции по ЖХ/МС. Через 24 ч перемешивания добавляли дополнительное количество IBX (22 мг, 36 мкмоль) и перемешивали смесь еще 24 ч. После этого анализ ЖХ/МС показал образование продукта с временем удерживания 1,79 мин, ИЭР+ m/z 1710 $[M+Na]^+$. Реакционную смесь по каплям добавляли к насыщенному водному раствору $NaHCO_3$ (100 мл) и экстрагировали ДХМ (2×75 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (2×20 мл), H_2O (30 мл), насыщенным соевым раствором (40 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 25 г, 75 мл/мин) получали циклизированный продукт 11 (элюировали с 97,4% смесью ДХМ/MeOH) в виде белого пеннистого вещества (136 мг, выход 46%).

(j) Альтернативный синтез 4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-((аллилокси)карбонил)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-3-нитробензил(11S,11aS)-8-(((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилата (20).

ТЕМРО (6,6 мг, 42 мкмоль) и DAIB (125 мг, 0,39 ммоль) добавляли к перемешанному раствору бис-ОН 19 (300 мг, 0,18 ммоль) в сухом ДХМ (15 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали в атмосфере аргона и контролировали ход реакции по ЖХ/МС. Через 24 ч перемешивания добавляли дополнительное количество ТЕМРО (6,6 мг, 42 мкмоль) и DAIB (25 мг, 78 мкмоль) и перемешивали смесь еще 24 ч. После этого анализ ЖХ/МС показал образование продукта, наблюдаемым при времени удерживания 1,79 мин, ИЭР+ m/z 1710 $[M+Na]^+$. Смесь разбавляли ДХМ (50 мл) и промывали насыщенным водным раствором тиосульфата натрия (40 мл), насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (30 мл), насыщенным соевым раствором (40 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 25 г, 75 мл/мин) получали циклизированный продукт 21 (элюировали с 96,5% смесью ДХМ/MeOH) в виде белого пеннистого вещества (231 мг, выход 78%).

(k) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-(((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-

метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,10,11,11а-тетрагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,10,11,11а-тетрагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (21).

Pd(PPh₃)₄ (15,8 мг, 13,7 мкмоль) добавляли к перемешанному раствору пирролидина (63 мкл, 54 мг, 0,75 ммоль) и Алос/аллил-соединения 20 (231 мг, 0,14 ммоль) в сухом ДХМ (4 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона, в результате чего начал образовываться осадок. После перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с образованием требуемого продукта, наблюдаемым при времени удерживания 1,18 мин, ИЭР+ m/z 1312 [M+H]⁺. Растворитель удаляли выпариванием in vacuo и растирали полученный остаток с диэтиловым эфиром, затем проводили дополнительное выпаривание in vacuo с получением неочищенного амина 12 в виде твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки или анализа.

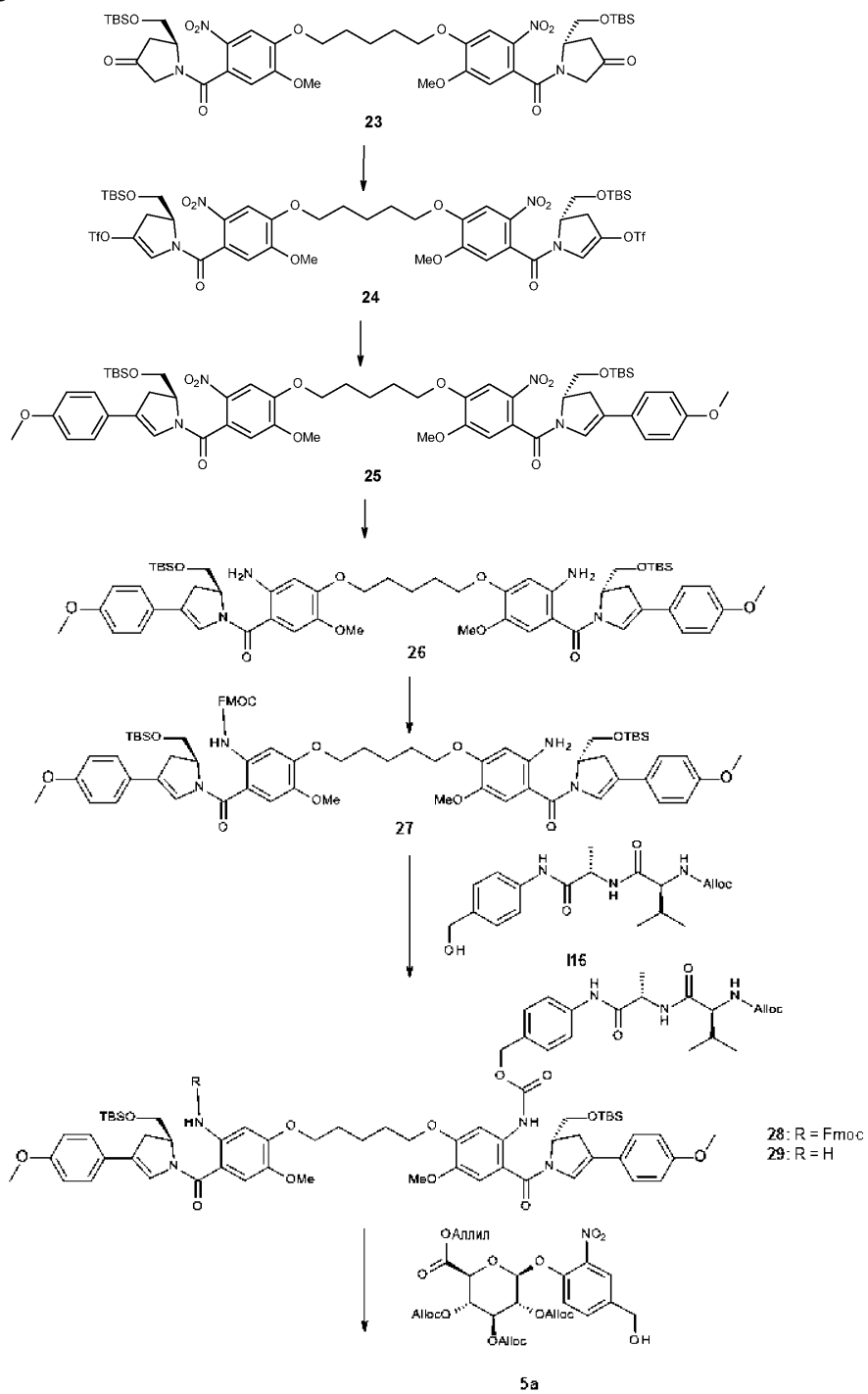
(1) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((2S,5S)-37-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октакса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,10,11,11а-тетрагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,10,11,11а-тетрагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (22).

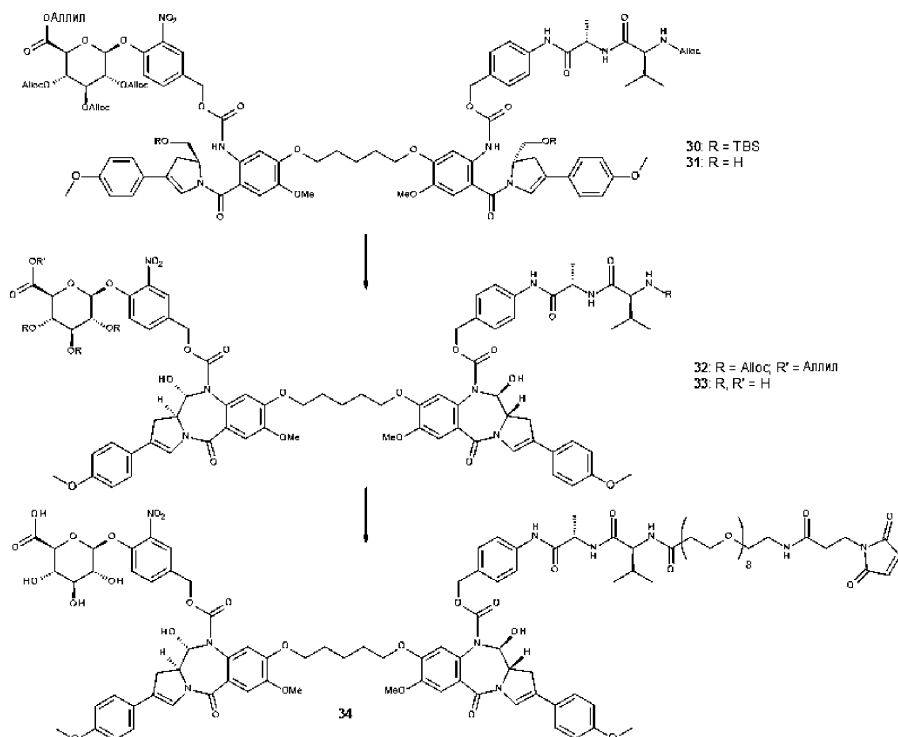
Раствор сложного эфира MAL-dPEG®8-TFP (122 мг, 0,16 ммоль) в сухом ДХМ (5 мл) добавляли к перемешанному образцу амина 21 (180 мг, 0,16 ммоль), пиридина (28 мкл, 27 мг, 0,34 ммоль) и ДМФА (0,25 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона в течение 20 ч, и со временем смесь начинала темнеть. Анализ ЖХ/МС показал образование требуемого продукта с временем удерживания 1,43 мин, ИЭР- m/z 1884 [M-H]⁺, вместе с непрореагировавшим амином с временем удерживания 1,18 мин. Добавляли дополнительное количество сложного эфира MAL-dPEG®8-TFP (66 мг, 0,09 ммоль), пиридина (12 мкл, 11 мг, 0,15 ммоль) и ДХМ (3 мл) и оставляли смесь перемешиваться еще на три дня. После этого, по данным анализа ЖХ/МС, образовалось удовлетворительное количество требуемого продукта, и растворитель удаляли выпариванием in vacuo. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением малеимида 22 в виде белого твердого вещества (55 мг, 19%).

ЖХ/МС (15-минутный цикл), время удерживания 5,82 мин, ИЭР+ m/z 1886 [M+H]⁺, 1908 [M+Na]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, d₆-DMCO) δ 9,98 (шс, 2H), 8,25-8,15 (м, 1H), 7,99 (т, 1H, J=5,7 Гц), 7,87 (д, 1H, J=8,7 Гц), 7,69 (шс, 1H), 7,62-7,48 (м, 3H), 7,37 (д, 1H, J=8,9 Гц), 7,21-7,09 (м, 2H), 7,04 (с, 1H), 7,03 (с, 1H), 6,98 (с, 2H), 6,79 (с, 1H), 6,74 (с, 1H), 6,72-6,65 (м, 2H), 6,62-6,58 (м, 2H), 5,63-5,50 (м, 2H), 5,41-5,32 (м, 2H), 5,25-5,05 (м, 4H), 4,93-4,80 (м, 2H), 4,41-4,32 (м, 1H), 4,23-4,16 (м, 1H), 4,00-3,90 (м, 4H), 3,87-3,72 (м, 6H), 3,70-3,60 (м, 2H), 3,58 (т, 4H, J=7,2 Гц), 3,52-3,43 (м, 28H), 3,39-3,20 (м, 5H), 3,18-3,10 (м, 2H), 2,95-2,82 (м, 2H), 2,53-2,34 (м, 4H), 2,31 (т, 2H, J=7,3 Гц), 1,99-1,90 (м, 1H), 1,82-1,68 (м, 4H), 1,73 (с, 6H), 1,60-1,47 (м, 2H), 1,28 (д, 1H, J=7,0 Гц), 0,85 (д, 3H, J=6,8 Гц), 0,81 (д, 3H, J=6,8 Гц).

Пример 3





Соединение 23 представляет собой соединение 46 в документе WO 2014/057074.

(а) ((5*S*,5'*S*)-(4,4'-(Пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитробензоил))-бис-(5-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-1,3-диил)-бис-(трифторметансульфонат) (24).

Безводный 2,6-лутидин (8,90 мл, 8,22 г, 76,7 ммоль) через шприц добавляли к перемешанному раствору бис-кетона 23 (5,41 г, 5,90 ммоль) в сухом ДХМ (200 мл) при -45°C (сухой лед/ацетонитрил) в атмосфере аргона. Затем через шприц добавляли безводный трифторметансульфоновый ангидрид (5,96 мл, 10,0 г, 35,5 ммоль), который брали из только что открытой ампулы, поддерживая температуру -40°C или ниже. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при -45°C в течение 1 ч, после чего анализ ЖХ/МС показал превращение в продукт с временем удерживания 2,23 мин, ИЭР+ m/z 1203 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1181 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Холодную реакционную смесь сразу разбавляли ДХМ (200 мл) и промывали водой (1 \times 200 мл), 5% раствором лимонной кислоты (2 \times 200 мл), насыщенным водным раствором NaHCO_3 (200 мл), насыщенным соевым раствором (300 мл), сушили (MgSO_4), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе IsoleraTM (гексан/ EtOAc , SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали трифлат бис-енола 3 (элюировали с 78% смесью гексан/ EtOAc) в виде желтого пенистого вещества (5,02 г, выход 72%).

(б) ((Пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((*S*)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)метанон) (25).

$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (196 мг, 0,17 ммоль) добавляли к перемешанной смеси трифлата бис-енола 24 (5,02 г, 4,25 ммоль), 4-метоксифенилбороновой кислоты (1,68 г, 11,1 ммоль), Na_2CO_3 (1,44 г, 13,6 ммоль), EtOH (20 мл), толуола (40 мл) и воды (20 мл). Реакционную смесь нагревали при 30°C и перемешивали в атмосфере аргона в течение 3 ч, после чего наблюдали полное превращение в требуемый продукт, по данным ЖХ/МС, с временем удерживания 2,23 мин, ИЭР+ m/z 1120 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1098 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Реакционную смесь разделяли между EtOAc (200 мл) и H_2O (100 мл) и экстрагировали водный слой EtOAc (3 \times 30 мл). Объединенные органические слои промывали H_2O (2 \times 50 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили (MgSO_4), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе IsoleraTM (гексан/ EtOAc , SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали бис-С2-арильное соединение 25 (элюировали с 63% смесью гексан/ EtOAc) в виде желтоватой пены (3,11 г, выход 67%).

(с) ((Пентан-1,5-диил-бис-(окси))-бис-(2-амино-5-метокси-4,1-фенипен))-бис-(((*S*)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)метанон) (26).

Неактивированный цинк (4,13 г, 63,1 ммоль) добавляли к энергично перемешиваемому раствору бис-нитросоединения 25 (1,73 г, 1,58 ммоль) в EtOH (15 мл) и EtOAc (15 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь обрабатывали водой (1 мл), затем по каплям добавляли 5% об./об. раствор HCO_2H в MeOH (19 мл). Наблюдали изменение цвета с зеленого на металлический серый и экзотерму до 40°C . Реакционную смесь оставляли остывать до комнатной температуры, после чего анализ ЖХ/МС показал полное превращение в требуемый продукт с временем удерживания 2,19 мин, ИЭР+ m/z 1060 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1038 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Смесь фильтровали через Celite[®] и промывали фильтровальный слой EtOAc (100 мл).

Фильтрат промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 (3×50 мл) [осторожно: бурное выделение газа!], насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили (MgSO_4), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного бис-анилина 26 в виде темно-оранжевого пенистого вещества (1,56 г, выход 95%). Чистота была удовлетворительной, поэтому продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

(d) (9Н-Флуорен-9-ил)метил(5-((5-(5-амино-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентил)окси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (27).

FmocCl (1,22 г, 4,70 ммоль) добавляли к перемешанной суспензии бис-анилина 26 (6,50 г, 6,27 ммоль) и Na_2CO_3 (1,66 г, 15,7 ммоль) в ТГФ (32 мл) и H_2O (32 мл). Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 3 ч, после чего анализ ЖХ/МС показал наличие требуемого моно-Fmoc продукта 27 с временем удерживания 2,33 мин, 1% = 51, ИЭР+ m/z 1282 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1260 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Вместе с непрореагировавшим исходным материалом с временем удерживания 2,19 мин, 1% = 24, и бис-Fmoc продукта с временем удерживания 2,47 мин, 1% = 24, ИЭР+ m/z 1504 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1482 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Смесь разделяли между H_2O (50 мл) и EtOAc (75 мл), слои разделяли и экстрагировали водную фазу EtOAc (2×25 мл). Объединенные органические слои промывали H_2O (30 мл), насыщенным соевым раствором (40 мл), сушили (MgSO_4), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый моно-Fmoc продукт 27 в виде оранжевого пенистого вещества (3,31 г, выход 56% относительно FmocCl, элюировали с 53% смесью гексан/EtOAc), непрореагировавшего бис-анилина 26 (2,09 г, элюировали с 40% смесью гексан/EtOAc) и бис-Fmoc (1,39 г, элюировали с 68% смесью гексан/EtOAc).

(e) (9Н-Флуорен-9-ил)метил(5-((5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентил)окси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (28).

Трифосген (281 мг, 0,81 ммоль) добавляли к перемешанному раствору моно-Fmoc продукта 27 (3,31 г, 2,63 ммоль) и ТЕА (805 мкл, 584 мг, 5,79 ммоль) в сухом ДХМ (35 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (брали образец в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,35 мин, ИЭР+ m/z 1340 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1318 $[\text{M}+\text{H}]^+$). Смесь обрабатывали дополнительным количеством ТЕА (549 мкл, 398 мг, 3,95 ммоль), затем добавляли линкер П16 (992 мг, 2,63 ммоль). Через 20 ч перемешивания в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал превращение в требуемый карбамат 28 с временем удерживания 2,33 мин, 1% = 40, ИЭР+ m/z 1685 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, вместе с продуктом расщепления Fmoc 29 с временем удерживания 2,19 мин, 1% = 28.

ИЭР+ m/z 1463 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1441 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Смесь разбавляли ДХМ (40 мл) и промывали насыщенным водным раствором NH_4Cl (2×30 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили (MgSO_4), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый карбамат 28 в виде желтого пенистого вещества (1,64 г, выход 38%, элюировали с 40% смесью гексан/EtOAc) вместе с продуктом расщепления Fmoc 29 (1,31 г, элюировали с 20% смесью гексан/EtOAc).

(f) 4-((S)-2-((S)-2-(((Аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-(5-((5-(5-амино-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентил)окси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (29).

Диметиламин (9,9 мл 2,0 М раствора в ТГФ, 19,7 ммоль) добавляли к перемешанному раствору Fmoc-защищенного соединения 28 (1,64 г, 0,99 ммоль) в ТГФ (15 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 1,5 ч при комнатной температуре анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта с временем удерживания 2,19 мин, ИЭР+ m/z 1463 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1441 $[\text{M}+\text{H}]^+$, вместе с побочным продуктом расщепления Fmoc, DMA-аддуктом, с временем расщепления 0,97 мин. Смесь выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта, который затем очищали на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) с получением чистого анилина 29 (элюировали с 20% смесью гексан/EtOAc) в виде оранжевого пенистого вещества (1,36 г, выход 96%).

(g) Аллил(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-((5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)пентил)окси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1Н-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-карбоксилат (30).

Трифосген (198 мг, 0,67 ммоль) добавляли к перемешанному раствору анилина 29 (2,67 г, 1,85 ммоль) и пиридина (329 мкл, 322 мг, 4,07 ммоль) в сухом ДХМ (25 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (брали образец в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,22 мин, ИЭР+ m/z 1521 [M+Na]⁺, 1499 [M+H]⁺). Смесь обрабатывали дополнительным количеством пиридина (224 мкл, 220 мг, 2,78 ммоль) и дилауратом дибутилолова (219 мкл, 234 мг, 0,37 ммоль), затем добавляли линкер 5a (1,18 г, 1,85 ммоль). Через 16 ч перемешивания в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал израсходование изоцианата и уменьшение интенсивности сигнала линкера 5a, но отсутствие M²⁺ для требуемого продукта с временем удерживания 2,23 мин. Смесь разбавляли ДХМ (30 мл) и промывали насыщенным раствором NH₄Cl (2×30 мл), насыщенным солевым раствором (40 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали in vacuo с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гексан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый карбамат 30 (элюировали с 39% смесью гексан/EtOAc) в виде желтого пенистого вещества (2,40 г, выход 62%).

(h) Аллил(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(гидроксиметил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-2-метоксифенокси)карбонил)окси)-2-((S)-2-(гидроксиметил)-4-(4-метоксифенил)-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-карбоксилат (31).

Ледяную уксусную кислоту (21 мл) добавляли к перемешанному раствору TBS-защищенного соединения 30 (2,40 г, 1,14 ммоль) в ТГФ (7 мл) и H₂O (7 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре, после чего анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта, наблюдаемого при времени удерживания 1,88 мин, ИЭР+ m/z 1876 [M+H]⁺, 1898 [M+Na]⁺. Реакционную смесь по каплям добавляли к охлажденному (0-5°C) насыщенному раствору NaHCO₃ (350 мл). Нейтральный раствор оставляли нагреваться до комнатной температуры и разделяли с помощью EtOAc (200 мл). Водную фазу экстрагировали EtOAc (2×50 мл), объединенные органические слои промывали NaHCO₃ (2×60 мл), насыщенным солевым раствором (70 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали in vacuo с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали бис-спирт 31 (элюировали с 95,6% смесью ДХМ/MeOH) в виде желтоватого пенистого вещества (2,07 г, выход 97%).

(i) 4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-((Аллилокси)карбонил)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-3-нитробензил(11S,11aS)-8-(((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-(4-метоксифенил)-5-оксо-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-2-(4-метоксифенил)-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат (32).

Cu(NCCH₃)₄·CF₃SO₃ (2 мг, 5,3 мкмоль) добавляли к перемешанному раствору бис-ОН 31 (100 мг, 53 мкмоль) и раствору TEMPO для аэробного окисления по Столу (Stahl aerobic oxidation) (27 мкл 0,2 М раствора в CH₃CN, 5,3 мкмоль) в CH₃CN (1 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере воздуха (из баллона) в течение 3 ч, после чего анализ ЖХ/МС показал отсутствие видимого изменения времени удерживания или ИЭР+. Добавляли дополнительное количество Cu(NCCH₃)₄·CF₃SO₃ (2 мг, 5,3 мкмоль) и раствора TEMPO для аэробного окисления по Столу (27 мкл 0,2 М раствора в CH₃CN, 5,3 мкмоль) и перемешивали реакционную смесь еще 16 ч. Анализ ЖХ/МС снова показал отсутствие изменения времени удерживания, однако анализ ИЭР⁺ показал отсутствие m/z исходного вещества и заметное наличие m/z требуемого продукта, 1894 [M+Na]⁺. Растворитель удаляли выпариванием in vacuo и очищали полученный остаток на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 10 г, 36 мл/мин) с получением циклизированного продукта 32 (элюировали с 96,2% смесью ДХМ/MeOH) в виде белого пенистого вещества (91 мг, выход 92%).

(j) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-(((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-(4-метоксифенил)-5-оксо-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-2-(4-метоксифенил)-5-оксо-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (33).

Pd(PPh₃)₄ (15,0 мг, 12,8 мкмоль) добавляли к перемешанному раствору пирролидина (59 мкл, 50 мг, 0,70 ммоль) и Аллос/аллил-соединения 32 (240 мг, 0,13 ммоль) в сухом ДХМ (5 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона, и после перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта, наблюдаемого при времени удерживания 1,31 мин, ИЭР+ m/z 1496 [M+H]⁺. Растворитель удаляли выпариванием in vacuo и растирали полученный остаток с диэтиловым эфиром, обрабатывали ультразвуком, затем проводили дополнительное выпаривание in vacuo с получением неочищенного амина 33 в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки или

анализа.

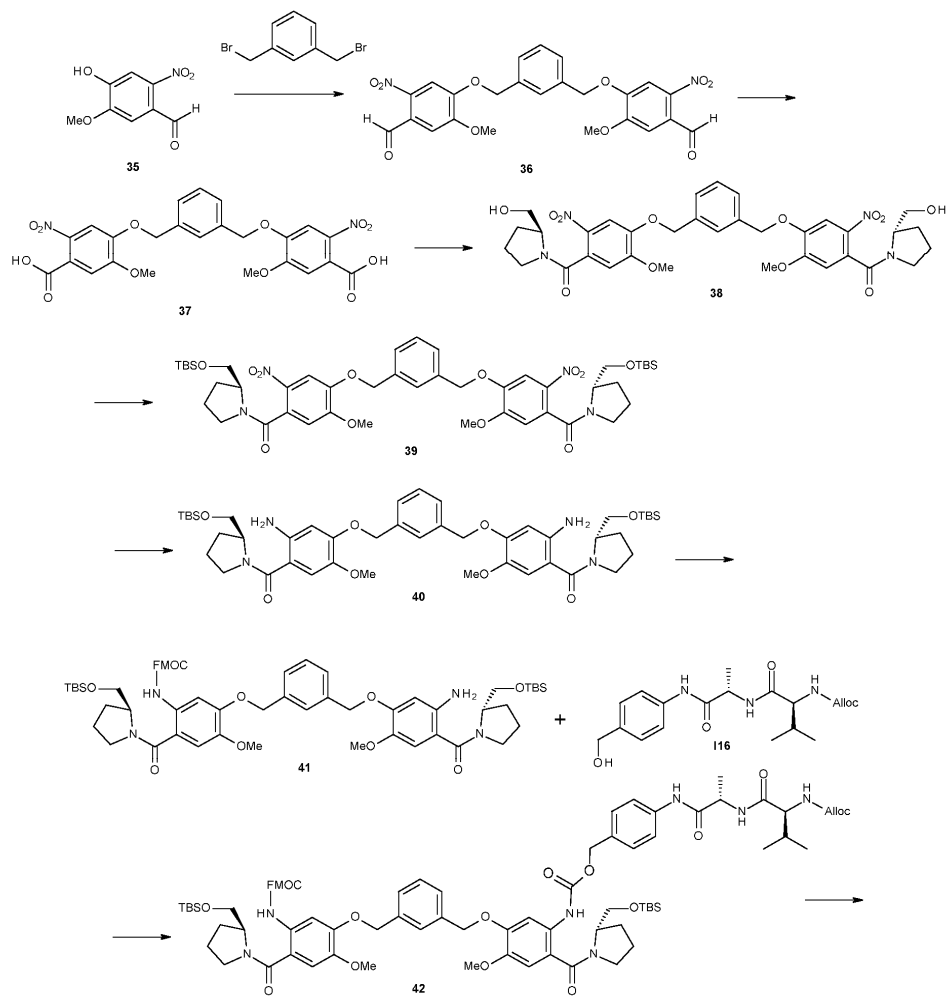
(к) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((((11S,11aS)-8-((5-((((11S,11aS)-10-(((4-((2S,5S)-37-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октакса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-(4-метоксифенил)-5-оксо-5,10,11,11а-тетрагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-2-(4-метоксифенил)-5-оксо-5,10,11,11а-тетрагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (34).

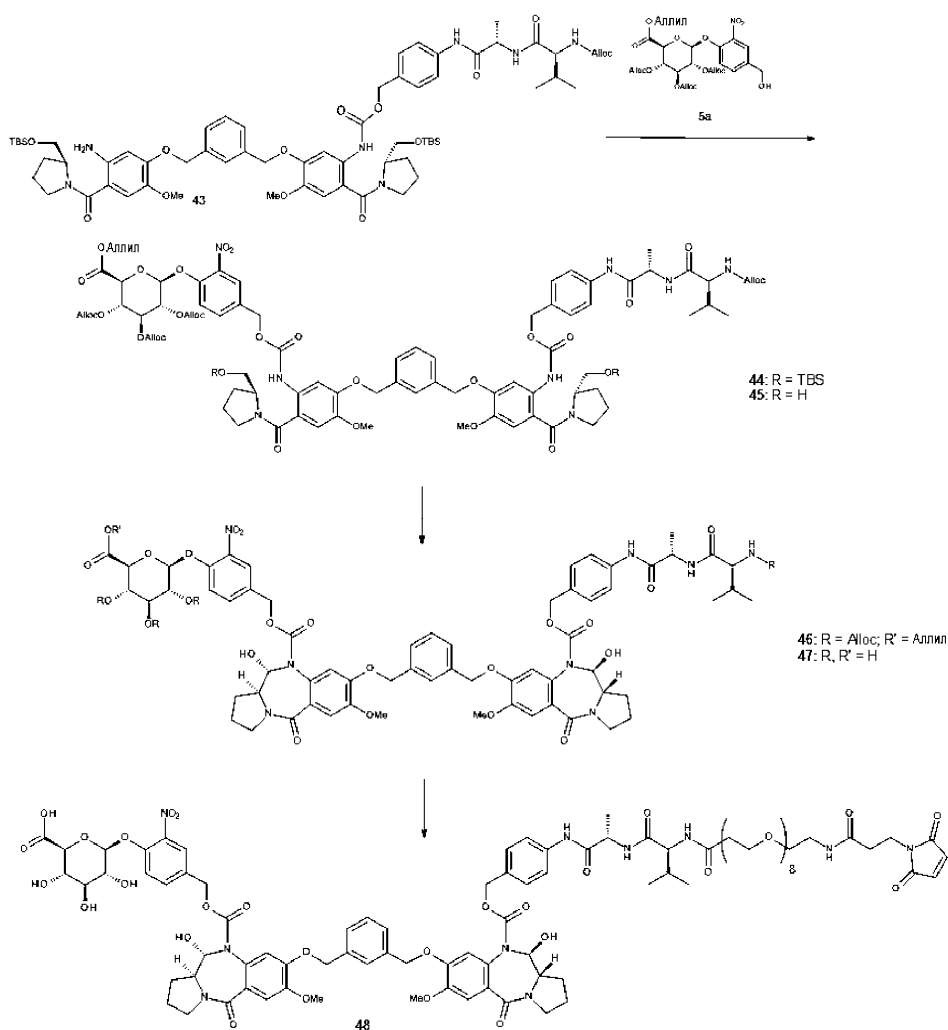
Раствор сложного эфира MAL-dPEG®8-TFP (114 мг, 0,15 ммоль) в сухом ДХМ (5 мл) добавляли к перемешанному образцу амина 33 (191 мг, 0,13 ммоль) и пиридина (26 мкл, 25 мг, 0,32 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона в течение 20 ч, и со временем смесь начинала темнеть. Анализ ЖХ/МС показал образование требуемого продукта с временем удерживания 1,59 мин (требуемое значение m/z для M^{2+} в процессе наблюдения хода реакции не обнаруживали) вместе с непрореагировавшим амином с временем удерживания 1,31 мин. Добавляли дополнительное количество сложного эфира MAL-dPEG®8-TFP (114 мг, 0,15 ммоль), пиридина (26 мкл, 25 мг, 0,32 ммоль) и ДХМ (3 мл) и оставляли смесь перемешиваться еще на шесть дней. После этого, по данным анализа ЖХ/МС, наблюдали удовлетворительное количество требуемого продукта и удаляли растворитель выпариванием *in vacuo*. Неочищенный продукт очищали на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 10 г, 36 мл/мин, элюировали с 82% смесью ДХМ/MeOH), затем препаративной ВЭЖХ с получением малеимида 34 в виде светло-желтого твердого вещества (46 мг, 13%).

ЖХ/МС (15-минутный цикл), время удерживания 6,71 мин, ИЭР+ m/z 1036 [$M^{2+}+H$], 1058 [$M^{2+}+Na$], 1046 [$M+Na$]²⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, d₆-DMCO) δ 10,02 (шс, 2H), 8,27-8,16 (м, 1H), 8,01 (т, 1H, J=5,6 Гц), 7,90 (д, 1H, J=8,6 Гц), 7,72 (шс, 1H), 7,60-7,51 (м, 3H), 7,46-7,38 (м, 5H), 7,23-7,15 (м, 2H), 7,11 (с, 1H), 7,09 (с, 1H), 6,99 (с, 2H), 6,92 (д, 2H, J=8,9 Гц), 6,91 (д, 2H, J=8,9 Гц), 6,88-6,77 (м, 6H), 5,70-5,60 (м, 2H), 5,39-5,33 (м, 2H), 5,24-5,09 (м, 4H), 4,96-4,81 (м, 2H), 4,42[^],34 (м, 1H), 4,24-4,17 (м, 1H), 4,04-3,93 (м, 4H), 3,87-3,79 (м, 8H), 3,77 (с, 6H), 3,59 (т, 4H, J=7,3 Гц), 3,52-3,46 (м, 28H), 3,40-3,26 (м, 7H, перекрыт сигналом H₂O), 3,19-3,11 (м, 2H), 2,95-2,82 (м, 2H), 2,53-2,31 (м, 4H), 2,02-1,92 (м, 1H), 1,86-1,73 (м, 4H), 1,62-1,52 (м, 2H), 1,30 (д, 1H, J=7,0 Гц), 0,87 (д, 3H, J=6,7 Гц), 0,83 (д, 3H, J=6,8 Гц).

Пример 4





(а) 4,4'-((1,3-Фенилен-бис-(метилден))-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитробензальдегид) (36).

1,3-бис-(Бромметил)бензол (5,0 г, 19,1 ммоль) добавляли к перемешанному раствору фенола 35 (7,5 г, 38,2 ммоль), ТВАІ (705 мг, 1,91 ммоль) и K_2CO_3 (5,81 г, 42,0 ммоль) в сухом ДМФА (60 мл). Реакционную смесь нагревали до $70^\circ C$ и перемешивали в атмосфере аргона в течение 2 ч, после чего анализ ЖХ/МС показал существенное образование продукта с временем удерживания 1,67 мин, ИЭР+ m/z 519 $[M+Na]^+$, 497 $[M+H]^+$. Реакционную смесь оставляли остывать до комнатной температуры и удаляли ДМФА выпариванием *in vacuo*. Полученный остаток разбавляли водой (300 мл) и собирали оранжевый осадок 36 вакуумным фильтрованием, затем промывали H_2O , диэтиловым эфиром и сушили в вакуумной печи до постоянной массы (9,18 г, выход 97%).

(б) 4,4'-((1,3-Фенилен-бис-(метилден))-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитробензойная кислота) (37).

Раствор хлорита натрия (8,44 г, 92,7 ммоль, техническая марка 80%) и одноосновного дигидрофосфата натрия (6,2 г, 51,8 ммоль) в воде (140 мл) добавляли к раствору альдегида 36 (9,18 г, 18,5 ммоль) в тетрагидрофуране (100 мл) при комнатной температуре. К энергично перемешиваемой двухфазной смеси сразу по каплям добавляли пероксид водорода (30% мас./мас, 53 мл, 518 ммоль). Наблюдали бурное выделение газа и экзотерму до $30^\circ C$ вместе с изменением цвета с оранжевого на бледно-желтый и растворением суспензии. Реакционную смесь охлаждали на ледяной бане и подкисляли до pH 2 концентрированной хлористоводородной кислотой. Затем реакционную смесь экстрагировали $EtOAc$ (4×150 мл) и промывали объединенную органическую фазу насыщенным солевым раствором (2×100 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенной кислоты 37. Твердое вещество растирали с диэтиловым эфиром и сушили в вакуумной печи до постоянной массы (9,90 г, выход $>100\%$). По данным ЖХ/МС, чистота была удовлетворительной (время удерживания 1,56 мин, ИЭР- m/z 527 $[M+H]^+$).

ДМФА (12 капель) добавляли к перемешанной суспензии бис-нитробензойной кислоты 37 (9,90 г, 18,7 ммоль) и оксалилхлорида (4,9 мл, 7,1 г, 56,3 ммоль) в безводном ДХМ (130 мл). После первоначального бурного выделения газа реакционная суспензия превращалась в раствор и смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 16 ч. Основную часть растворителя удаляли выпариванием *in vacuo* и растирали концентрированный раствор с диэтиловым эфиром. Полученный желтый оса-

док (образец для ЖХ/МС брали в MeOH с получением метилового эфира с временем удерживания 1,69 мин, ИЭР+ m/z 579 $[M+Na]^+$) собирали вакуумным фильтрованием, промывали холодным диэтиловым эфиром и сушили в течение 1 ч в вакуумной печи при 40°C. Твердый хлорангидрид кислоты по частям добавляли к перемешанной суспензии (S)-(+)-2-пирролидинметанола (4,35 г, 4,25 мл, 43,0 ммоль) и ТЕА (13,0 мл, 9,46 г, 93,5 ммоль) в ДХМ (100 мл) при -40°C (сухой лед/ CH_3CN). Через 1 ч перемешивания реакция была завершена, по данным ЖХ/МС, с образованием только требуемого продукта с временем удерживания 1,44 мин, ИЭР+ m/z 717 $[M+Na]^+$, 695 $[M+H]^+$. Смесь разбавляли ДХМ (100 мл) и промывали 1н. HCl (3×50 мл), насыщенным раствором $NaHCO_3$ (3×40 мл), насыщенным соевым раствором (70 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали растворитель *in vacuo* с получением чистого продукта 38 в виде желтого твердого вещества (12,7 г, выход 100%).

(d) (((1,3-Фенилен-бис-(метилен))-бис-(окси))-бис-(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-ил)метанон (39).

TBSCI (8,27 г, 54,9 ммоль) добавляли к перемешанному раствору бис-спирта 38 (12,7 г, 18,3 ммоль) и имидазола (7,47 г, 110 ммоль) в сухом ДХМ (100 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 1,5 ч анализ ЖХ/МС показал полное превращение в требуемый продукт с временем удерживания 2,11 мин, ИЭР+ m/z 946 $[M+Na]^+$, 924 $[M+H]^+$. Смесь разбавляли ДХМ (100 мл) и промывали водой (2×75 мл), насыщенным соевым раствором (80 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали растворитель *in vacuo* с получением неочищенного продукта 39 в виде желтого пенистого вещества (16,7 г, выход 99%). Вещество было достаточно чистым для использования на следующей стадии без дополнительной очистки.

(e) (((1,3-Фенилен-бис-(метилен))-бис-(окси))-бис-(2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))-бис-(((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-ил)метанон (40).

Неактивированный цинк (18,5 г, 282 ммоль) добавляли к энергично перемешиваемому раствору бис-нитросоединения 39 (6,50 г, 7,10 ммоль) в EtOH (65 мл) и EtOAc (65 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь обрабатывали водой (6,5 мл), затем по каплям добавляли 5% об./об. раствор HCO_2H в EtOH (130 мл). Наблюдали изменение цвета с зеленого на металлический серый и экзотерму до 37°C. Реакционную смесь оставляли остывать до комнатной температуры, после чего анализ ЖХ/МС показал полное превращение в требуемый продукт с временем удерживания 2,04 мин, ИЭР+ m/z 885 $[M+Na]^+$, 863 $[M+H]^+$. Смесь фильтровали через Celite® и промывали фильтровальный слой EtOAc (200 мл). Фильтрат промывали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (3×100 мл) [осторожно: бурное выделение газа!], насыщенным соевым раствором (150 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного бис-анилина 40 в виде темно-оранжевого пенистого вещества (5,41 г, выход 89%). Чистота была удовлетворительной, поэтому продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

(f) (9H-Флуорен-9-ил)метил-(5-((3-((5-амино-4-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифеноксид)метил)бензил)окси)-2-((8)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (41).

FmocCl (1,43 г, 5,50 ммоль) добавляли к перемешанной суспензии бис-анилина 40 (6,34 г, 7,35 ммоль) и Na_2CO_3 (1,95 г, 18,4 ммоль) в ТГФ (32 мл) и H_2O (32 мл). Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2 ч, после чего анализ ЖХ/МС показал наличие требуемого моно-Fmoc продукта 41 с временем удерживания 2,24 мин, 1% = 41, ИЭР+ m/z 1108 $[M+Na]^+$, 1086 $[M+H]^+$. Вместе с непрореагировавшим исходным веществом с временем удерживания 2,03 мин, 1% = 19, и бис-Fmoc вещества с временем удерживания 2,39 мин, 1% = 40, ИЭР+ m/z 1330 $[M+Na]^+$, 1308 $[M+H]^+$. Смесь разделяли между H_2O (50 мл) и EtOAc (50 мл), разделяли слои и промывали органический слой H_2O (30 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гептан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый моно-Fmoc продукт 41 в виде оранжевого пенистого вещества (2,40 г, выход 40% относительно FmocCl, элюировали с 30% смесью гептан/EtOAc), непрореагировавший бис-анилин 40 (1,72 г, элюировали с 100% EtOAc) и бис-Fmoc (1,95 г, элюировали с 69% смесью гептан/EtOAc).

(g) (9H-Флуорен-9-ил)метил-(5-((3-((5-(((4-((S)-2-((S)-2-((аллил)окси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)амино)-4-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифеноксид)метил)бензил)окси)-2-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (42).

Трифосген (236 мг, 0,80 ммоль) добавляли к перемешанному раствору моно-Fmoc продукта 41 (2,40 г, 2,21 ммоль) и ТЕА (676 мкл, 491 мг, 4,86 ммоль) в сухом ДХМ (30 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (брали образец в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,27 мин, ИЭР+ m/z 1166 $[M+Na]^+$, 1144 $[M+H]^+$). Смесь обрабатывали дополнительным количеством ТЕА (461 мкл, 335 мг, 3,32 ммоль), затем добавляли линкер 116 (835 мг, 2,21 ммоль). Через 2,5 ч перемешивания в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал удовлетворительное превращение в карбамат 9 с време-

нем удерживания 2,24 мин, ИЭР+ m/z 1511 $[M+Na]^+$, 1489 $[M+H]^+$. Смесь разбавляли ДХМ (50 мл) и промывали насыщенным водным раствором NH_4Cl (2×40 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гептан/ $EtOAc$, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый карбамат 42 (элюировали с 38% смесью гептан/ $EtOAc$) в виде желтого пенистого вещества (2,40 г, выход 73%).

(h) 4-((S)-2-((S)-2-(((Аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-(5-((3-((5-амино-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифенокси)-метил)бензил)окси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (43).

Диметиламин (16,1 мл 2,0 М раствора в ТГФ, 32,2 ммоль) добавляли к перемешанному раствору Fmoc-защищенного соединения 42 (2,40 г, 1,61 ммоль) в ТГФ (20 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 1 ч при комнатной температуре анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта с временем удерживания 2,07 мин, ИЭР+ m/z 1289 $[M+Na]^+$, 1267 $[M+H]^+$, вместе с побочным продуктом расщепления Fmoc с временем удерживания 1,74 мин и его DMA-аддуктом с временем удерживания 0,95 мин. Смесь выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта, который затем очищали на системе Isolera™ (гептан/ $EtOAc$, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) с получением чистого анилина 43 (элюировали при 100% $EtOAc$) в виде белого пенистого вещества (1,77 г, выход 87%).

(i) Аллил(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((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)метил)бензил)окси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-карбоксилат (44).

Трифосген (150 мг, 0,50 ммоль) добавляли к перемешанному раствору анилина 43 (1,77 г, 1,40 ммоль) и пиридина (249 мкл, 243 мг, 3,08 ммоль) в сухом ДХМ (20 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (брали образец в $MeOH$ с получением метилкарбамата, время удерживания 2,11 мин, ИЭР+ m/z 1347 $[M+Na]^+$, 1325 $[M+H]^+$). Смесь обрабатывали дополнительным количеством пиридина (170 мкл, 166 мг, 2,10 ммоль) и дилауратом дибутилолова (165 мкл, 177 мг, 0,28 ммоль), затем добавляли линкер 5a (891 мг, 1,40 ммоль). Через 24 ч перемешивания в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал удовлетворительное превращение в карбамат 44 с временем удерживания 2,16 мин, ИЭР+ m/z 1952 $[M+Na]^+$, 1930 $[M+H]^+$. Смесь разбавляли ДХМ (40 мл) и промывали насыщенным раствором NH_4Cl (2×35 мл), насыщенным соевым раствором (30 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гептан/ $EtOAc$, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый карбамат 44 (элюировали с 32% смесью гептан/ $EtOAc$) в виде белого твердого вещества (2,16 г, выход 80%).

(o) Аллил(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((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)метил)бензил)окси)-2-((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-карбоксилат (45).

Ледяную уксусную кислоту (18 мл) добавляли к перемешанному раствору TBS-защищенного соединения 44 (2,16 г, 1,12 ммоль) в ТГФ (6 мл) и H_2O (6 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 5 ч при комнатной температуре, после чего анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта, наблюдаемого при времени удерживания 1,77 мин, ИЭР+ m/z 1702 $[M+H]^+$, 1724 $[M+Na]^+$. Реакционную смесь по каплям добавляли к охлажденному (0-5°C) насыщенному раствору $NaHCO_3$ (300 мл). Нейтральный раствор оставляли нагреваться до комнатной температуры и экстрагировали $EtOAc$ (3×50 мл), объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (60 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (ДХМ/ $MeOH$, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали бис-спирт 45 (элюировали с 94,8% смесью ДХМ/ $MeOH$) в виде белого пенистого вещества (1,86 г, выход 98%).

(k) 4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-((Аллилокси)карбонил)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-3-нитробензил(11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)метил)-бензил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат (46).

45% IBX (263 мг, 0,42 ммоль) добавляли к перемешанному раствору бис-ОН 45 (300 мг, 0,18 ммоль) в сухом ДМСО (4 мл). Смесь нагревали до 30°C в атмосфере аргона и контролировали ход реакции по ЖХ/МС. Через 24 ч перемешивания добавляли дополнительное количество IBX (2×22 мг, 2×36 ммоль) и

перемешивали смесь еще 28 ч. После этого анализ ЖХ/МС показал образование требуемого продукта с временем удерживания 1,72 мин, ИЭР+ m/z 1698 $[M+H]^+$, 1720 $[M+Na]^+$. Реакционную смесь по каплям добавляли к насыщенному водному раствору $NaHCO_3$ (100 мл) и экстрагировали ДХМ (2×40 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (40 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 25 г, 75 мл/мин) получали циклизированный продукт 46 (элюировали с 96,5% смесью ДХМ/MeOH) в виде белого пенистого вещества (219 мг, выход 73%).

(l) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)метил)бензил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (47).

$Pd(PPh_3)_4$ (13,0 мг, 11,1 мкмоль) добавляли к перемешанному раствору пирролидина (51 мкл, 43 мг, 0,61 ммоль) и АНос/аллил-соединения 46 (189 мг, 0,11 ммоль) в сухом ДХМ (2 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта, наблюдаемого при времени удерживания 1,13 мин, ИЭР+ m/z 1322 $[M+H]^+$. Растворитель удаляли выпариванием *in vacuo* и растирали полученный остаток с диэтиловым эфиром, затем проводили дополнительное выпаривание *in vacuo* с получением неочищенного амина 47 в виде твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки или анализа.

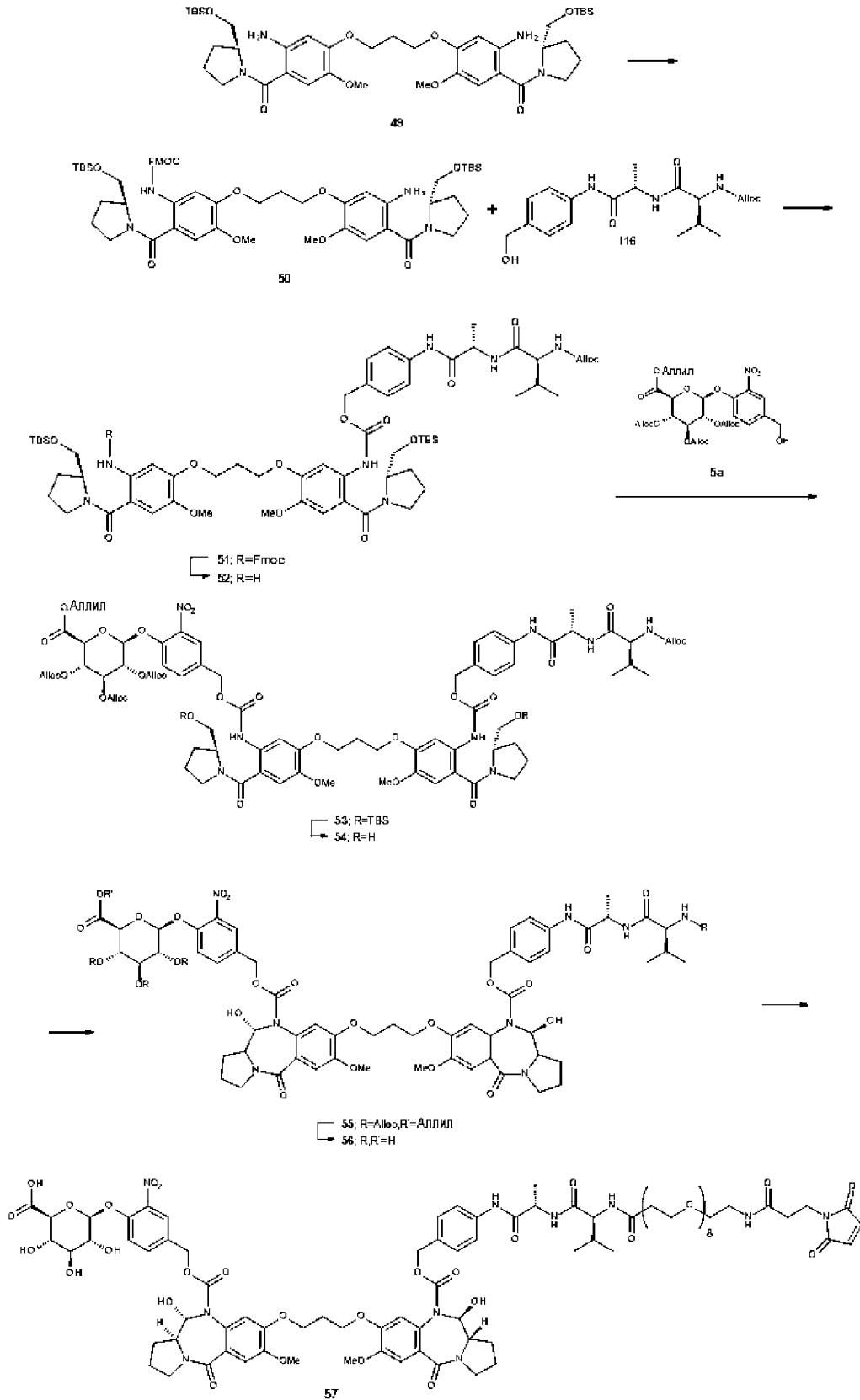
(m) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(((4-((2S,5S)-37-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаокса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)метил)бензил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (48).

Раствор сложного эфира MAL-dPEG®8-TFP (123 мг, 0,16 ммоль) в сухом ДХМ (2 мл) добавляли к перемешанному образцу амина 47 (147 мг, 0,11 ммоль) и пиридина (22 мкл, 22 мг, 0,28 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона в течение 20 ч, и со временем смесь начинала темнеть. Анализ ЖХ/МС показал образование требуемого продукта с временем удерживания 1,37 мин, ИЭР+ m/z 1896 $[M+H]^+$, 1918 $[M+Na]^+$ вместе со следовым количеством непрореагировавшего амина с временем удерживания 1,13 мин. Значительное количество продуктов разложения и растворителя удаляли выпариванием *in vacuo*. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением малеимида 48 в виде белого твердого вещества (75 мг, 36%).

ЖХ/МС (15-минутный цикл), время удерживания 5,48 мин, ИЭР+ m/z 1896 $[M+H]^+$, 1918 $[M+Na]^+$;

1H ЯМР (400 МГц, d_6 -DMCO) δ 9,92 (шс, 2H), 8,20-8,14 (м, 1H), 8,01 (т, 1H, $J=5,6$ Гц), 7,87 (д, 1H, $J=8,7$ Гц), 7,73 (шс, 1H), 7,62-7,36 (м, 8H), 7,23-7,15 (м, 2H), 7,11 (с, 1H), 7,09 (с, 1H), 7,00 (с, 2H), 6,99 (с, 1H), 6,94 (с, 1H), 6,62-6,51 (м, 2H), 5,53-5,41 (м, 3H), 5,35-5,85 (м, 9H), 4,41-4,32 (м, 1H), 4,23-4,16 (м, 1H), 4,00-3,90 (м, 2H), 3,81 (с, 3H), 3,80 (с, 3H), 3,61-3,58 (м, 4H), 3,52-3,45 (м, 28H), 3,42-3,23 (м, 9H), 3,18-3,12 (м, 2H), 2,50-2,35 (м, 2H), 2,34-2,31 (м, 2H), 2,10-1,8 (м, 9H), 1,28 (д, 1H, $J=7,1$ Гц), 0,87 (д, 3H, $J=6,7$ Гц), 0,83 (д, 3H, $J=6,8$ Гц).

Пример 5



(а) (9Н-Флуорен-9-ил)метил(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 (50).

FmocCl (1,58 г, 6,09 ммоль) добавляли к перемешанной смеси бис-анилина 49 (6,50 г, 8,12 ммоль) и Na_2CO_3 (2,15 г, 20,3 ммоль) в ТГФ (35 мл) и H_2O (35 мл). Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 2,5 ч, после чего анализ ЖХ/МС показал наличие требуемого моно-Fmoc про-

дукта 50 с временем удерживания 2,19 мин, 1% = 49, ИЭР+ m/z 1046 $[M+Na]^+$, 1024 $[M+H]^+$ Вместе с непрореагировавшим исходным веществом с временем удерживания 1,96 мин, 1% = 19, и бис-Гмос продуктом с временем удерживания 2,34 мин, 1% = 32, ИЭР+ m/z 1270 $[M+Na]^+$, 1246 $[M+H]^+$. Смесь разделяли между H_2O (50 мл) и EtOAc (50 мл), слои разделяли и экстрагировали водный слой EtOAc (2×25 мл). Объединенные органические слои промывали H_2O (30 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гептан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый моно-Гмос продукт 50 в виде оранжевого пенистого вещества (3,61 г, выход 58% относительно ГмосCl, элюировали с 61% смесью гептан/EtOAc), непрореагировавший бис-анилин 2 (2,04 г, элюировали при 100% EtOAc) и бис-Гмос (1,71 г, элюировали с 30% смесью гептан/EtOAc).

(b) 4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-(5-(3-(5-(((9Н-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифеноксипропокси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамат (51).

Трифосген (377 мг, 1,27 ммоль) добавляли к перемешанному раствору моно-Гмос продукта 50 (3,61 г, 3,53 ммоль) и ТЕА (1,08 мл, 784 мг, 7,70 ммоль) в сухом ДХМ (40 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (брали образец MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,23 мин, ИЭР+ m/z 1104 $[M+Na]^+$, 1082 $[M+H]^+$). Смесь обрабатывали дополнительным количеством ТЕА (737 мкл, 535 мг, 5,30 ммоль), затем добавляли линкер П16 (1,33 г, 3,53 ммоль). Через 2,5 ч перемешивания в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал удовлетворительное превращение в карбамат 51 с временем удерживания 2,21 мин, ИЭ+ m/z 1449 $[M+Na]^+$, 1427 $[M+H]^+$. Смесь разбавляли ДХМ (50 мл) и промывали насыщенным водным раствором NH_4Cl (2×30 мл), H_2O (30 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гептан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый карбамат 51 (элюировали с 40% смесью гексан/EtOAc) в виде желтого пенистого вещества (3,34 г, выход 66%).

(c) 4-((S)-2-((S)-2-(((Аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-(5-(3-(5-амино-4-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-2-метоксифеноксипропокси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)-карбамат (52).

Диметиламин (23,4 мл 2,0 М раствор в ТГФ, 46,8 ммоль) добавляли к перемешанному раствору Гмос-защищенного соединения 51 (3,34 г, 2,34 ммоль) в ТГФ (15 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в атмосфере аргона в течение 1 ч при комнатной температуре анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта с временем удерживания 2,02 мин, ИЭР+ m/z 1227 $[M+Na]^+$, 1205 $[M+H]^+$, вместе с побочным продуктом расщепления Гмос с временем удерживания 1,72 мин и его DMA-аддуктом с временем удерживания 0,93 мин. Смесь выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта, который затем очищали на системе Isolera™ (гептан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) с получением чистого анилина 52 (элюировали при 100% EtOAc) в виде оранжевого пенистого вещества (2,51 г, выход 89%).

(d) Аллил(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((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-метоксифеноксипропокси)-2-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метоксифенил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофеноксипропокси)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-карбоксилат (53).

Трифосген (222 мг, 0,75 ммоль) добавляли к перемешанному раствору анилина 52 (2,51 г, 2,08 ммоль) и пиридина (370 мкл, 362 мг, 4,58 ммоль) в сухом ДХМ (30 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 10 мин в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал полное превращение в изоцианат (брали образец в MeOH с получением метилкарбамата, время удерживания 2,06 мин, ИЭР+ m/z 1285 $[M+Na]^+$, 1263 $[M+H]^+$). Смесь обрабатывали дополнительным количеством пиридина (252 мкл, 247 мг, 3,12 ммоль) и дилауратом дибутилолова (247 мкл, 263 мг, 0,42 ммоль), затем добавляли линкер 5а (1,33 г, 2,08 ммоль). Через 28 ч перемешивания в атмосфере аргона анализ ЖХ/МС показал удовлетворительное превращение в карбамат 53 (время удерживания 2,12 мин, ИЭР+ m/z 1890 $[M+Na]^+$, 1868 $[M+H]^+$). Смесь разбавляли ДХМ (40 мл) и промывали насыщенным раствором NH_4Cl (3×30 мл), насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (гептан/EtOAc, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали чистый карбамат 53 (элюировали с 37% смесью гептан/EtOAc) в виде желтого пенистого вещества (3,12 г, выход 80%).

(e) Аллил(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((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-метоксифеноксипропокси)-2-((S)-2-((гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-4-метокси-

фенил)карбамоил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)тетрагидро-2Н-пиран-2-карбоксилат (54).

Ледяную уксусную кислоту (24 мл) добавляли к перемешанному раствору TBS-защищенного соединения 53 (3,12 г, 1,67 ммоль) в ТГФ (8 мл) и H₂O (8 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 18 ч при комнатной температуре, после чего анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта, наблюдаемого при времени удерживания 1,72 мин, ИЭР+ m/z 1640 [M+H]⁺, 1662 [M+Na]⁺. Реакционную смесь по каплям добавляли к охлажденному (0-5°C) насыщенному раствору NaHCO₃ (450 мл). Нейтральный раствор оставляли нагреваться до комнатной температуры и экстрагировали EtOAc (3×80 мл), объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (80 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 100 г, 100 мл/мин) получали бис-спирт 54 (элюировали с 96,6% смесью ДХМ/MeOH) в виде белого пенистого вещества (2,05 г, выход 75%).

(f) 4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-((Аллилокси)карбонил)-3,4,5-трис-(((аллилокси)карбонил)окси)-тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)-3-нитробензил(11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пропокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10(5Н)-карбоксилат (55).

45% IBX (273 мг, 0,44 ммоль) добавляли к перемешанному раствору бис-ОН 54 (300 мг, 0,18 ммоль) в сухом ДМСО (4 мл). Смесь нагревали до 30°C в атмосфере аргона и контролировали ход реакции по ЖХ/МС. Через 24 ч перемешивания добавляли дополнительное количество IBX (26 мг, 42 мкмоль) и перемешивали смесь еще 24 ч. После этого анализ ЖХ/МС показал преимущественно единственный пик, соответствующий требуемому продукту, с временем удерживания 1,68 мин, ИЭР+ m/z 1658 [M+Na]⁺. Реакционную смесь по каплям добавляли к охлажденному насыщенному водному раствору NaHCO₃ (100 мл) и экстрагировали ДХМ (2×40 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (40 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением неочищенного продукта. После очистки на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 25 г, 75 мл/мин) получали циклизированный продукт 55 (элюировали с 97% смесью ДХМ/MeOH) в виде белого пенистого вещества (256 мг, выход 87%).

(g) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пропокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (56).

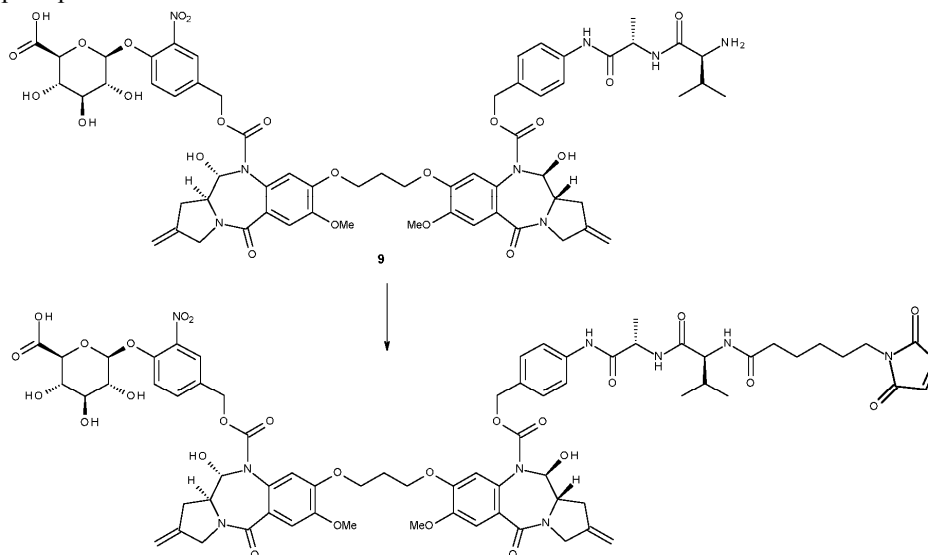
Pd(PPh₃)₄ (18,1 мг, 15,7 мкмоль) добавляли к перемешанному раствору пирролидина (72 мкл, 62 мг, 0,86 ммоль) и Алос/аллил-соединения 55 (256 мг, 0,16 ммоль) в сухом ДХМ (2 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона, в результате чего начал образовываться осадок. После перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре анализ ЖХ/МС показал завершение реакции с получением требуемого продукта, наблюдаемого при времени удерживания 1,07 мин, ИЭР+ m/z 1260 [M+H]⁺. Растворитель удаляли выпариванием *in vacuo* и растирали полученный остаток с диэтиловым эфиром, затем проводили дополнительное выпаривание *in vacuo* с получением неочищенного амина 56 в виде твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки или анализа.

(h) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((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-октакса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пропокси)-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1Н-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновая кислота (57).

Раствор сложного эфира MAL-dPEG®8-TFP (140 мг, 0,19 ммоль) в сухом ДХМ (2 мл) добавляли к перемешанному образцу амина 56 (198 мг, 0,16 ммоль), пиридина (32 мкл, 31 мг, 0,39 ммоль) и ДМФА (0,25 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона в течение 20 ч, и со временем смесь начинала темнеть. Анализ ЖХ/МС показал образование требуемого продукта с временем удерживания 1,31 мин, ИЭР+ m/z 1834 [M+H]⁺, 1857 [M+Na]⁺, вместе с непрореагировавшим амином с временем удерживания 1,07 мин. Добавляли дополнительное количество сложного эфира MAL-dPEG®8-TFP (70 мг, 0,09 ммоль), пиридина (16 мкл, 16 мг, 0,2 ммоль) и ДХМ (2 мл) и оставляли смесь перемешиваться еще на 24 ч. Затем уменьшали объем растворителя на 50% выпариванием *in vacuo*, после чего, по данным анализа ЖХ/МС, образовалось удовлетворительное количество требуемого продукта, и растворитель полностью удаляли выпариванием *in vacuo*. Неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением малеимида 56 в виде белого твердого вещества (48 мг, 17%).

ЖХ/МС (15-минутный цикл), время удерживания 5,22 мин, ИЭР+ m/z 1834 $[M+H]^+$, 1856 $[M+Na]^+$;
 1H ЯМР (400 МГц, d_6 -ДМСО) δ 9,99 (шс, 2H), 8,24-8,17 (м, 1H), 8,01 (т, 1H, $J=5,6$ Гц), 7,88 (д, 1H, $J=8,7$ Гц), 7,74 (шс, 1H), 7,64-7,50 (м, 3H), 7,44-7,34 (м, 1H), 7,23-7,13 (м, 2H), 7,06 (с, 2H), 7,00 (с, 2H), 6,86 (с, 1H), 6,79 (с, 1H), 6,59-6,47 (м, 2H), 5,52-5,37 (м, 3H), 5,32-5,02 (м, 4H), 4,98-4,84 (м, 2H), 4,44-4,34 (м, 1H), 4,24-4,19 (м, 1H), 4,17-3,96 (м, 5H), 3,92-3,84 (м, 1H), 3,77 (с, 6H), 3,60 (т, 4H, $J=7,3$ Гц), 3,54-3,45 (м, 2H), 3,40-3,24 (м, 8H), 3,19-3,12 (м, 2H), 2,57-2,35 (м, 2H), 2,34-2,30 (м, 2H), 2,25-2,12 (м, 2H), 2,10-1,78 (м, 9H), 1,30 (д, 1H, $J=6,9$ Гц), 0,87 (д, 3H, $J=6,7$ Гц), 0,83 (д, 3H, $J=6,7$ Гц).

Пример 6

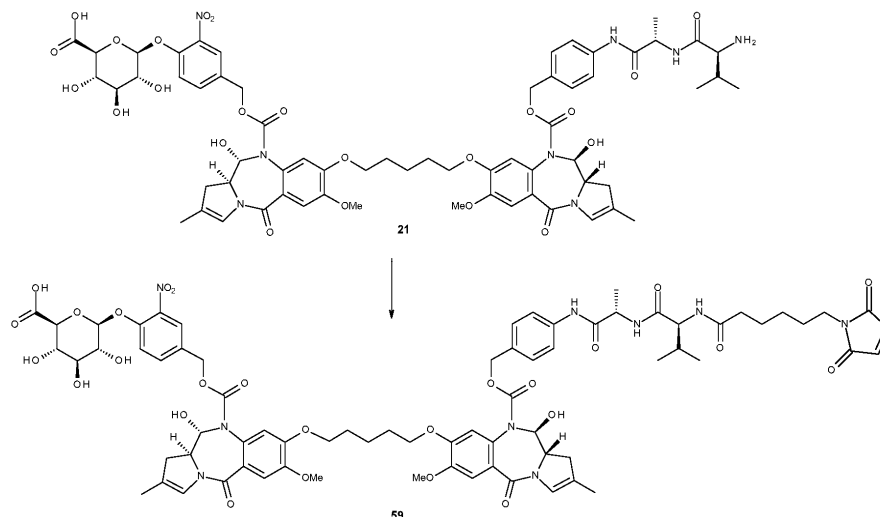


(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пропокси)-11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,5,10,11,11a-гексагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокси-тетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (58).

Раствор N-гидроксисукцинимиды 6-малеимидогексановой кислоты (51 мг, 0,17 ммоль) в сухом ДХМ (2 мл) добавляли к перемешанному образцу амина 9 (141 мг, 0,11 ммоль), пиридина (22 мкл, 21 мг, 0,33 ммоль) и ДМФА (0,25 мл). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона в течение 20 ч, и со временем смесь начинала темнеть. Анализ ЖХ-МС показал образование требуемого продукта с временем удерживания 1,42 мин, ИЭР- m/z 1474 $[M-H]^-$, вместе со следовым количеством непрореагировавшего амина с временем удерживания 1,12 мин. Растворитель удаляли выпариванием *in vacuo* и очищали полученный остаток на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 10 г, 36 мл/мин, элюировали с 80% смесью ДХМ/MeOH) с получением 90 мг обогащенного 58. После дополнительной очистки препаративной ВЭЖХ получали малеимид 58 в виде белого твердого вещества (26 мг, 16%): ЖХ-МС (15-минутный цикл), время удерживания 5,85 мин, ИЭР+ m/z 1477 $[M+H]^+$, 1499 $[M+Na]^+$;

1H ЯМР (400 МГц, d_6 -ДМСО) δ 10,0 (шс, 2H), 8,16 (д, 1H, $J=7,0$ Гц), 7,80 (д, 1H, $J=8,6$ Гц), 7,74 (шс, 1H), 7,62-7,50 (м, 3H), 7,39 (д, 1H, $J=8,7$ Гц), 7,22-7,11 (м, 2H), 7,06 (с, 2H), 7,00 (с, 2H), 6,89 (с, 2H), 6,84-6,78 (м, 1H), 6,68-6,56 (м, 2H), 5,45-5,30 (м, 3H), 5,29-5,01 (м, 9H), 4,98-4,85 (м, 2H), 4,42-4,33 (м, 1H), 4,24-3,92 (м, 9H), 3,77 (с, 6H), 3,44 (т, 2H, $J=9,5$ Гц), 3,39-3,30 (м, 2H), 2,93-2,80 (м, 2H), 2,57-2,35 (м, 2H), 2,23-2,06 (м, 4H), 2,03-1,90 (м, 1H), 1,48 (п, 4H, $J=7,3$ Гц), 1,30 (д, 3H, $J=7,0$ Гц), 1,18 (п, 2H, $J=7,6$ Гц), 0,86 (д, 3H, $J=6,7$ Гц), 0,83 (д, 3H, $J=6,7$ Гц).

Пример 7



(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)окси)карбонил)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-8-ил)окси)пентил)окси)-11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-5,10,11,11a-тетрагидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10-карбонил)окси)метил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (59).

Раствор N-гидроксисукцинимиды 6-малеимидогексановой кислоты (42 мг, 0,14 ммоль) в сухом ДХМ (2 мл) добавляли к перемешанному образцу амина 21 (118 мг, 0,09 ммоль) и пиридина (18 мкл, 18 мг, 0,23 ммоль). Реакционную смесь оставляли перемешиваться в атмосфере аргона в течение 24 ч, и со временем смесь начинала темнеть. Анализ ЖХ-МС показал образование требуемого продукта с временем удерживания 1,45 мин, ИЭР- m/z 1502 [M-H]⁻, вместе со следовым количеством непрореагировавшего амина с временем удерживания 1,15 мин. Растворитель удаляли выпариванием *in vacuo* и очищали полученный остаток на системе Isolera™ (ДХМ/MeOH, SNAP Ultra 10 г, 36 мл/мин, элюировали с 66% смесью ДХМ/MeOH) с получением 76 мг обогащенного 59. После дополнительной очистки препаративной ВЭЖХ получали maleимид 59 в виде белого твердого вещества (27 мг, 20%).

ЖХ-МС (15-минутный цикл), время удерживания 6,13 мин, ИЭР+ m/z 1505 [M+H]⁺, 1527 [M+Na]⁺;

¹H ЯМР (400 МГц, d₆-DMCO) δ 9,95 (шс, 2H), 8,15 (д, 1H, J=6,9 Гц), 7,80 (д, 1H, J=8,7 Гц), 7,87 (д, 1H, J=8,7 Гц), 7,71 (шс, 1H), 7,62-7,48 (м, 3H), 7,39 (д, 1H, J=8,6 Гц), 7,21-7,12 (м, 2H), 7,06 (с, 1H), 7,05 (с, 1H), 6,99 (с, 2H), 6,82 (с, 1H), 6,76 (с, 1H), 6,72-6,65 (м, 2H), 6,62 (с, 2H), 5,63-5,50 (м, 2H), 5,48-5,40 (м, 2H), 5,31-5,08 (м, 6H), 4,98-4,82 (м, 3H), 4,43-4,34 (м, 1H), 4,21-4,14 (м, 1H), 4,03-3,86 (м, 4H), 3,79 (с×2, 6H), 3,72-3,61 (м, 2H), 3,38-3,35 (м, 2H), 2,98-2,85 (м, 2H), 2,59-2,42 (м, 2H), 2,23-2,06 (м, 2H), 2,00-1,88 (м, 1H), 1,82-1,68 (м, 4H), 1,74 (с, 6H), 1,61-1,41 (м, 8H), 1,22-1,14 (м, 2H), 1,28 (д, 1H, J=7,0 Гц), 0,86 (д, 3H, J=6,7 Гц), 0,82 (д, 3H, J=6,8 Гц).

Пример 8. Conjugation.

Конъюгат трастузумаб-10 (ConjA).

50 мМ раствор DL-дителиотреитола (ДТТ) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 16 мкмоль, 320 мкл) к 12,0 мл раствора антитела, трастузумаба (30 мг, 200 нмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 2,5 мг/мл. Восстанавливающую смесь оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в течение 4-5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (50 об/мин) встряхивании. В восстановленном антителе, посредством центрифугирования на спиновом фильтре, заменяли буфер на буфер повторного окисления, содержащий PBS и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 20 мол.экв./антитело, 4 мкмоль, 80 мкл) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (50 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела 1,5 мг/мл (или добавляли больше ДНАА и оставляли смесь взаимодействовать в течение более продолжительного времени до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межцепочечных цистеиновых дисульфидов, поданным СВЭЖХ). Затем смесь повторного окисления фильтровали через стерилизующий фильтр и разбавляли буфером для конъюгирования, содержащим PBS и 1 мМ ЭДТК, до конечной концентрации антитела 1,0 мг/мл. Соединение 10 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 1 мкмоль в 1,5 мл ДМСО) к 13,5 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (15 мг, 100 нмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор перемешивали в течение 1,5 ч при

комнатной температуре, затем прекращали конъюгирование посредством добавления N-ацетилцистеина (15 мкмоль, 150 мкл 100 мМ раствора), затем очищали спиновым фильтрованием с использованием 15 мл спинового фильтра Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, фильтровали через стерилизующий фильтр и анализировали.

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 ConjA при 280 и 330 нм (специфического в отношении соединения 10), показал неконъюгированные легкие цепи и смесь неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к одной молекуле соединения 10, что согласуется с отношением лекарственного соединения к анти телу (DAR), составляющим 1,89 молекулы соединения 10 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, отфильтрованного через стерилизующий фильтр буфера SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), на образце ConjA при 280 нм, показал чистоту мономера 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ConjA 1,45 мг/мл в 8,5 мл, полученная масса ConjA составила 12,3 мг (выход 82%).

Конъюгат трастузумаб-22 (ConjB).

50 мМ раствор DL-дителиотреитола (ДТТ) в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 42,7 мкмоль, 853 мкл) к 20,0 мл раствора антитела, трастузумаба (80 мг, 533 нмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 4,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в течение 4-5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. В восстановленном антителе, посредством центрифугирования на спиновом фильтре, заменяли буфер на буфер повторного окисления, содержащий PBS и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 20 мол.экв./антитело, 10,7 мкмоль, 213 мкл) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (50 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела 1,5 мг/мл (или добавляли больше ДНАА и оставляли смесь взаимодействовать в течение более продолжительного времени до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межцепочечных цистеиновых дисульфидов, поданным СВЭЖХ). Затем смесь повторного окисления фильтровали через стерилизующий фильтр и разбавляли буфером для конъюгирования, содержащим PBS и 1 мМ ЭДТК, до конечной концентрации антитела 1,0 мг/мл. Соединение 22 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 молярных эквивалентов/антитело, 1,33 мкмоль в 2,0 мл ДМСО) к 18,0 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (20 мг, 133 нмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре, затем прекращали конъюгирование посредством добавления N-ацетилцистеина (20 мкмоль, 200 мкл 100 мМ раствора), затем очищали спиновым фильтрованием с использованием 15 мл спинового фильтра Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, фильтровали через стерилизующий фильтр и анализировали.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкмXB-C18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила на восстановленном образце ConjB при 280 и 330 нм (специфического в отношении Соединения 22), показал неконъюгированные легкие цепи и смесь неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к одной молекуле Соединения 22, что согласуется с отношением лекарственного соединения к анти телу (DAR), составляющим 1,71 молекулы Соединения 22 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, отфильтрованного через стерилизующий фильтр буфера SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), на образце ConjB при 280 нм, показал чистоту мономера 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ConjB 1,39 мг/мл в 10,3 мл, полученная масса ConjB составила 14,3 мг (выход 72%).

Конъюгат трастузумаб-34 (ConjC).

50 мМ раствор DL-дителиотреитола (ДТТ) в фосфатно-солевом буферном растворе с рН 7,4 (PBS) добавляли (80 молярных эквивалентов/антитело, 42,7 мкмоль, 853 мкл) к 20,0 мл раствора антитела, трастузумаба (80 мг, 533 нмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 4,0 мг/мл. Восстанавливающую смесь оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в течение 4-5 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (60 об/мин) встряхивании. В восстановленном антителе, посредством центрифугирования на спиновом фильтре, заменяли буфер на буфер повторного окисления, содержащий PBS и 1 мМ ЭДТК, для удаления избытка восстанавливающего агента. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (ДНАА, 20 мол.экв./антитело, 10,7 мкмоль, 213

мкл) в ДМСО и оставляли смесь для повторного окисления взаимодействовать в течение 16 ч при комнатной температуре при умеренном (50 об/мин) встряхивании с концентрацией антитела 1,5 мг/мл (или добавляли больше ДНАА и оставляли смесь взаимодействовать в течение более продолжительного времени до полного повторного окисления цистеиновых тиолов с образованием межцепочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Затем смесь повторного окисления фильтровали через стерилизующий фильтр и разбавляли буфером для конъюгирования, содержащим PBS и 1 мМ ЭДТК, до конечной концентрации антитела 1,0 мг/мл. Соединение 34 добавляли в виде раствора в ДМСО (10 мол.экв./антитело, 1,33 мкмоль в 2,0 мл ДМСО) к 18,0 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (20 мг, 133 нмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре, затем прекращали конъюгирование посредством добавления N-ацетилцистеина (20 мкмоль, 200 мкл 100 мМ раствора), затем очищали спиновым фильтрованием с использованием 15 мл спинного фильтра Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, и дополнительно очищали на системе АКТА™ Start FPLC, используя колонку GE Healthcare HiLoad™ 26/600, упакованную Superdex 200 PG, элюируя со скоростью 2,5 мл/мин. PBS. Фракции, соответствующие пику мономера ConjC, объединяли, концентрировали с помощью 15 мл спинного фильтра Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, фильтровали через стерилизующий фильтр и анализировали.

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 ConjC при 280 и 330 нм (специфического в отношении Соединения 34), показал неконъюгированные легкие цепи и смесь неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к одной молекуле Соединения 34, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR), составляющим 1,66 молекулы Соединения 34 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, отфильтрованного через стерилизующий фильтр буфера SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), на образце ConjC при 280 нм, показал чистоту мономера 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ConjC 1,36 мг/мл в 10,4 мл, полученная масса ConjC составила 14,1 мг (выход 71%).

Конъюгат трастузумаб-10 (ConjD)

50 мМ раствор DL-дителиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (150 мол.экв./антитело, 40 мкмоль, 800 мкл) к 16,0 мл раствора антитела, трастузумаба (40 мг, 267 нмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 2,5 мг/мл. Восстанавливающую смесь оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в течение 4 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (50 об/мин) встряхивании. В растворе восстановленного антитела, посредством центрифугирования на спиновом фильтре, заменяли буфер (для удаления избытка восстанавливающего агента) на буфер для конъюгирования, содержащий PBS и 1 мМ ЭДТК, до конечной концентрации антитела 2,5 мг/мл. Соединение 10 добавляли в виде раствора в ДМСО (25 молярных эквивалентов/антитело, 1,67 мкмоль в 0,4 мл ДМСО) к 3,6 мл полученного раствора восстановленного антитела (10 мг, 67 нмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре, затем прекращали конъюгирование посредством добавления N-ацетилцистеина (8,33 мкмоль, 83,3 мкл 100 мМ раствора), затем очищали на системе АКТА™ Start FPLC, используя колонку GE Healthcare HiLoad™ 26/600, упакованную Superdex 200 PG, элюируя со скоростью 2,5 мл/мин. PBS. Фракции, соответствующие пику мономера ConjD, объединяли, концентрировали с помощью 15 мл спинного фильтра Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, фильтровали через стерилизующий фильтр и анализировали.

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 ConjD при 280 и 330 нм (специфического в отношении соединения 10), показал смесь неконъюгированных легких цепей, легких цепей, присоединенных к одной молекуле Соединения 10, неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к до трем молекулам Соединения 10, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR), составляющим 7,47 молекулы Соединения 10 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, отфильтрованного через стерилизующий фильтр буфера SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), на образце ConjD при 280 нм, показал чистоту мономера 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ConjD 1,90 мг/мл в 4,4 мл, полученная масса ConjA составила 8,4 мг (выход 84%).

Конъюгат трастузумаб-22 (ConjE).

50 мМ раствор DL-дителиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) до-

бавляли (150 молярных эквивалентов/антитело, 40 мкмоль, 800 мкл) к 16,0 мл раствора антитела, трастузумаба (40 мг, 267 нмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 2,5 мг/мл. Восстанавливающую смесь оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в течение 4 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (50 об/мин) встряхивании. В растворе восстановленного антитела, посредством центрифугирования на спиновом фильтре, заменяли буфер (для удаления избытка восстанавливающего агента) на буфер для конъюгирования, содержащий PBS и 1 мМ ЭДТК, до конечной концентрации антитела 2,5 мг/мл. Соединение 22 добавляли в виде раствора в ДМСО (25 молярных эквивалентов/антитело, 1,67 мкмоль в 0,4 мл ДМСО) к 3,6 мл полученного раствора восстановленного антитела (10 мг, 67 нмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре, затем прекращали конъюгирование посредством добавления N-ацетилцистеина (8,33 мкмоль, 83,3 мкл 100 мМ раствора), затем очищали на системе АКТА™ Start FPLC, используя колонку GE Healthcare HiLoad™ 26/600, упакованную Superdex 200 PG, элюируя со скоростью 2,5 мл/мин. PBS. Фракции, соответствующие пику мономера ConjE, объединяли, концентрировали с помощью 15 мл спинового фильтра Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, фильтровали через стерилизующий фильтр и анализировали.

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 ConjE при 280 и 330 нм (специфического в отношении соединения 22), показал смесь неконъюгированных легких цепей, легких цепей, присоединенных к одной молекуле Соединения 22, неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к до трем молекулам Соединения 22, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR), составляющим 7,39 молекулы Соединения 22 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, отфильтрованного через стерилизующий фильтр буфера SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), на образце ConjE при 280 нм, показал чистоту мономера 96%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ConjE 1,93 мг/мл в 4,6 мл, полученная масса ConjE составила 8,9 мг (выход 89%).

Конъюгат трастузумаб-34 (ConjF).

50 мМ раствор DL-дифтотиотреитола (ДТТ) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (150 молярных эквивалентов/антитело, 10 мкмоль, 200 мкл) к 4,0 мл раствора антитела (10 мг, 66,7 нмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 2,5 мг/мл. Восстанавливающую смесь оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в течение 4 ч (или до полного восстановления, по данным СВЭЖХ) в орбитальном шейкере при умеренном (50 об/мин) встряхивании. В растворе восстановленного антитела, посредством центрифугирования на спиновом фильтре, заменяли буфер (для удаления избытка восстанавливающего агента) на буфер для конъюгирования, содержащий PBS и 1 мМ ЭДТК, до конечной концентрации антитела 2,5 мг/мл. Соединение 34 добавляли в виде раствора в ДМСО (25 мол.экв./антитело, 1,67 мкмоль в 0,4 мл ДМСО) к 3,6 мл полученного раствора восстановленного антитела (10 мг, 67 нмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор перемешивали в течение 0,75 ч при комнатной температуре, затем прекращали конъюгирование посредством добавления N-ацетилцистеина (8,33 мкмоль, 83,3 мкл 100 мМ раствора), затем очищали на системе АКТА™ Start FPLC, используя колонку GE Healthcare HiLoad™ 26/600, упакованную Superdex 200 PG, элюируя со скоростью 2,5 мл/мин. PBS. Фракции, соответствующие пику ConjF, объединяли, концентрировали с помощью 15 мл спинового фильтра Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, повторно очищали на системе АКТА™ Start FPLC, используя колонку GE Healthcare HiLoad™ 26/600, упакованную Superdex 200 PG, элюируя со скоростью 2,5 мл/мин. PBS. Фракции, соответствующие пику ConjF, объединяли, концентрировали с помощью 15 мл спинового фильтра Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, фильтровали через стерилизующий фильтр и анализировали.

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 ConjF при 280 и 330 нм (специфического в отношении соединения 34), показал смесь неконъюгированных легких цепей, легких цепей, присоединенных к одной молекуле Соединения 34, неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к до трем молекулам Соединения 34, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR), составляющим 7,41 молекулы Соединения 34 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, отфильтрованного через стерилизующий фильтр буфера SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), на образ-

це ConjF при 280 нм, показал чистоту мономера 0% (100% димер-тример). SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ConjF 1,09 мг/мл в 4,4 мл, полученная масса ConjF составила 4,8 мг (выход 48%).

Конъюгат трастузумаб-58 (ConjG).

50 мМ раствор дитиотреитола (ДТТ) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (120 мол.экв./антитело, 32 мкмоль, 0,64 мл 50 мМ раствора) к 3,7 мл раствора антитела (40 мг, 0,267 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 2,0 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 в восстановленном антителе заменяли буфер, посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с НОММ 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, 20 молярных эквивалентов/антитело, 5,3 мкмоль, 0,1 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 межцепочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин, а затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 58 добавляли в виде раствора в ДМСО (11 молярных эквивалентов/антитело, 1,46 мкмоль в 0,9 мл ДМСО) к 9,1 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (20 мг, 0,13 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 3 ч при +25°C, а затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (7,3 мкмоль, 0,07 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарства удаляли спинным фильтрованием с использованием спинного фильтра Vivaspin с НОММ 50 кДа, в буфере, содержащем PBS в pH 7,4. Степень удаления свободного лекарства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарства, ConjG фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере, а 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 при 214 и 330 нм (специфического в отношении Соединения 58), показал неконъюгированные легкие цепи и смесь неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к одной молекуле Соединения 58, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR), составляющим 1,83 молекулы Соединения 58 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, отфильтрованного через стерилизующий фильтр буфера SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), на образце ConjG при 280 нм, показал чистоту мономера более 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ConjG 1,34 мг/мл в 8,9 мл, полученная масса ConjG составила 11,9 мг (выход 60%).

Конъюгат трастузумаб-59 (ConjH).

Антитело (30 мг) загружали на твердую подложку и восстанавливали, повторно окисляли, конъюгировали с Соединением 59, очищали высвобождали из смолы и составляли в композицию с 25 мМ гистидина, 200 мМ сахарозы, 0,02% Tween-20 с pH 6,0 в соответствии со способом, описанным в US 2014-0037961A1, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

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 при 214 и 330 нм (специфического в отношении Соединения 59), показал неконъюгированные легкие цепи и смесь неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к одной молекуле Соединения 59, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR), составляющим 1,9 молекулы Соединения 59 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, отфильтрованного через стерилизующий фильтр буфера SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), на образце ConjH при 280 нм, показал чистоту мономера более 97%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ConjH 1,49 мг/мл в 7,5 мл, полученная масса ConjH составила 11,2 мг (выход 37%).

Конъюгат трастузумаб-48 (ConjI).

50 мМ раствор дитиотреитола (ДТТ) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 21,4 мкмоль, 0,43 мл 50 мМ раствора) к 3,7 мл раствора антитела (40 мг, 0,267 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной ки-

слоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 2,0 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 в восстановленном антителе заменяли буфер, посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с НОММ 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, 20 мол.экв./антитело, 5,3 мкмоль, 0,1 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 межцепочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин, а затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 48 добавляли в виде раствора в ДМСО (11 мол.экв./антитело, 1,46 мкмоль в 1,7 мл ДМСО) к 16,8 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (20 мг, 0,13 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 3 ч при 25°C, а затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (7,3 мкмоль, 0,07 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарства удаляли спинным фильтрованием с использованием спинного фильтра Vivaspin с НОММ 50 кДа, в буфере, содержащем PBS в pH 7,4. Степень удаления свободного лекарства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарства, АДС фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере, а затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм ХВ-С18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила на восстановленном образце конъюгата при 214 и 330 нм (специфического в отношении Соединения 48), показал неконъюгированные легкие цепи и смесь неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к одной молекуле Соединения 48, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR), составляющим 1,86 молекулы Соединения 48 на одно антитело.

УВЭЖХ 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 отфильтрованного буфера SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), на образце ConJ1 при 280 нм, показал чистоту мономера более 99%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ConJ1 1,7 мг/мл в 7,3 мл, полученная масса ConJ1 составила 12,4 мг (выход 62%).

Конъюгат трастузумаб-57 (ConJ1).

50 мМ раствор дитиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (80 мол.экв./антитело, 21,4 мкмоль, 0,43 мл 50 мМ раствора) к 3,7 мл раствора антитела (40 мг, 0,267 мкмоль) в восстанавливающем буфере, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК) с конечной концентрацией антитела 2,0 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 в восстановленном антителе заменяли буфер, посредством спинного фильтрования с использованием спинного фильтра Vivaspin с НОММ 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, 20 мол.экв./антитело, 5,3 мкмоль, 0,1 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 межцепочечных цистеиновых дисульфидов, по данным СВЭЖХ). Смесь для повторного окисления центрифугировали в течение 3 мин при 4000 об/мин, а затем фильтровали через стерилизующий фильтр с мембраной 0,22 мкм. Соединение 57 добавляли в виде раствора в ДМСО (11 мол.экв./антитело, 1,46 мкмоль в 1,7 мл ДМСО) к 16,8 мл полученного раствора повторно окисленного антитела (20 мг, 0,13 мкмоль) до конечной концентрации в ДМСО 10% (об./об.). Раствор встряхивали в течение 3 ч при 25°C, а затем останавливали конъюгирование с помощью N-ацетилцистеина (7,3 мкмоль, 0,07 мл при 100 мМ).

Избыток свободного лекарства удаляли спинным фильтрованием с использованием спинного фильтра Vivaspin с НОММ 50 кДа, в буфере, содержащем PBS в pH 7,4. Степень удаления свободного лекарства контролировали с помощью ОФ-СВЭЖХ, используя неразбавленный конъюгат. После полного удаления свободного лекарства, АДС фильтровали через фильтр Mustang 0,22 мкм в стерильной атмосфере, а затем хранили при 4°C.

СВЭЖХ анализ на системе Shimadzu Prominence, который проводили с использованием колонки Phenomenex Aeris 3,6 мкм ХВ-С18 150×2,1 мм, элюируя градиентом воды и ацетонитрила на восстановленном образце конъюгата при 214 и 330 нм (специфического в отношении Соединения 57), показал не-

конъюгированные легкие цепи и смесь неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к одной молекуле Соединения 57, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR), составляющим 1,87 молекулы Соединения 57 на одно антитело.

УВЭЖХ 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 отфильтрованного буфера SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), на образце ConjJ при 280 нм, показал чистоту мономера более 100%. SEC анализ СВЭЖХ показал концентрацию конечного ConjJ 0,86 мг/мл в 10,3 мл, полученная масса ConjJ составила 8,9 мг (выход 45%).

Пример 9.

In vitro испытание Соединения 10.

Клетки DU145 (2000 клеток/лунку, 72-часовой анализ) и MDA-MB-361 (5000 на лунку, 144-часовой анализ) помещали в культуральную среду на 96-луночных планшетах, обработанных тканевой культурой, в объеме 80 мкл на лунку и оставляли прикрепляться на ночь. Для разбавления активной группы получали первоначальную 60× концентрацию каждой дозы, подлежащей испытанию, разбавляя экспериментальные препараты в ДМСО. Затем 60× разбавления активной группы дополнительно разбавляли до 5× концентрации либо в чистой среде для выращивания клеток, либо в среде для выращивания клеток, содержащей 5× фермента β-глюкуронидазы (Sigma, кат. № G0799-25KU). 20 мкл среды для выращивания клеток, содержащей экспериментальный препарат ± фермент, добавляли к клеткам в трех экземплярах лунок, и кривая конечных доз содержала значения от 6,4 нМ до 61 нМ с поэтапными серийными разбавлениями 1:4. В качестве контрольного образца использовали чистый ДМСО, разбавленный до культуральной среды. Обработанные клетки выращивали при 37°C/5% CO₂ в течение 72-144 ч (в зависимости от установленной кинетики роста для каждой конкретной клеточной линии). По окончании анализа использовали люминесцентный анализ жизнеспособности CellTiter-Glo® (CTG) (Promega) для определения относительной цитотоксичности. В каждую лунку добавляли 100 мкл CTG реагента и инкубировали планшеты в течение 10 мин при комнатной температуре при умеренном встряхивании, поглощение в каждом образце считывали при 560 нМ на люминесцентном счетчике EnVision (Perkin Elmer). Процент жизнеспособности клеток рассчитывали по следующей формуле:

$$\left(\frac{\text{средняя люминесценция обработанных образцов}}{\text{средняя люминесценция контрольных образцов}} \right) \times 100.$$

Значения IC₅₀ определяли логистическим анализом нелинейной регрессии в программном обеспечении GraphPad Prism.

Соединение 10	Без глюкуронидазы	С глюкуронидазой
DU145 - IC ₅₀	6,84 мкМ	201 нМ
MDA-MB-361 - IC ₅₀	778 нМ	32 нМ

In vitro испытание.

Конъюгат jA.

Использовали такой же способ, как описан выше, с клетками MDA-MB-361 (с высоким содержанием HER2, 5000 клеток/лунку, 144-часовой анализ) и MCF-7 (с низким содержанием HER2, 1500 клеток/лунку, 144-часовой анализ). Плотность посева клеток на планшет и продолжительность анализа определяли на основании установленной кинетики роста каждой конкретной клеточной линии. Получали 5× концентрацию каждой дозы ADC, подлежащей испытанию, разбавляя экспериментальные препараты в культуральной среде. 20 мкл ADC добавляли к клеткам в трех экземплярах лунок с получением кривой конечных доз, содержащей значения от 3 мкг/мл до 11 пг/мл с серийными разбавлениями 1:4. Обработанные клетки выращивали при 37°C/5% CO₂ в течение 144 ч и использовали люминесцентный анализ жизнеспособности CellTiter-Glo® (CTG) (Promega) для определения относительной цитотоксичности, как описано выше.

IC ₅₀	MDA-MB-361	MCF-7
Конъюгат A	14,5 нг/мл	~ 3 мкг/мл

Испытание ConjB и ConjC в клетках с миРНК-опосредованным нокдауном β-глюкуронидазы.

Клетки SKOV3, сверхэкспрессирующие HER2, подвергали обратной трансфекции для нокдауна уровня экспрессии GUSB. Сначала получали 4× исходный раствор RNAiMAX (конечная концентрация 0,125 мкл/лунку, Life Technologies) и 4× исходный раствор олигомеров миРНК (неприцельная/негативная миРНК, миРНК ГАФДГ и миРНК GUSB в конечной концентрации 100 нМ/лунку, Life Technologies) в среде OptiMEM. В качестве липидного контроля включали чистую смесь RNAiMAX/OptiMEM. 4× раствор RNAiMAX и 4× растворы миРНК доводили до 2× посредством смешивания в соотношении один к одному и оставляли смесь RNAiMAX/миРНК инкубироваться при комнатной температуре в течение 20 мин. После инкубации добавляли 40 мкл смеси RNAiMAX/миРНК и липидного контрольного образца

на одну лунку 96-луночных планшетов, обработанных тканевой культурой, и добавляли 40 мкл раствора клеток к смеси липида/миРНК с конечной плотностью высевания на планшет 2000 клеток/лунку. Планшеты культивировали при 37°C / 5% CO₂ в течение 72 ч, после чего к клеткам добавляли 20 мкл 5× концентрации каждой дозы ConjB/ConjC в двух экземплярах лунок с получением кривой конечных доз, содержащей значения от 10 мкг/мл до 0,15 нг/мл с серийными разбавлениями 1:4. Клетки, обработанные ADC, выращивали при 37°C/5% CO₂ в течение еще 72 ч и использовали люминесцентный анализ жизнеспособности CellTiter-Glo® (CTG) (Promega) для определения относительной цитотоксичности, как описано выше. Эффективность миРНК-опосредованного нокдауна определяли по уровням экспрессии РНК и по измерению активности фермента β-глюкуронидазы.

Результаты представлены на фиг. 1 (ConjB) и фиг. 2 (ConjC), где использованы следующие обозначения:

▼	Не трансфицированные
●	Только липид
◇	Не миРНК oligo2
△	GUSB oligo3
▽	GAPDH oligo2
×	Neg2 миРНК tox
*	GUSB миРНК tox
★	ГАФДГ миРНК tox

IC ₅₀ (нг/мл)	Не трансфицированные	Neg миРНК oligo2	Только липид	GUSB oligo3	ГАФДГ oligo2
ConjB	12,66	18,19	13,1	26,05	27,84
ConjC	4,871	13,07	5,818	31,59	23,00

Также заметен гораздо более высокий максимум уничтожения для ConjC.

Пример 10. In vitro испытание.

Среду из субконфлюэнтной (конфлюэнтность 80-90%) клеточной культуры в колбе T75 аспирировали и промывали колбу PBS (около 20 мл) и опустошали. Добавляли трипсин-ЭДТК (5 мл), колбу возвращали в насыщенный газом инкубатор при 37°C примерно на 5 мин, затем резко постукивали для отделения осадка и открепления клеток от пластика. Клеточную суспензию переносили в стерильную центрифужную пробирку объемом 50 мл с винтовой крышкой, разбавляли средой для выращивания до конечного объема 15 мл, затем центрифугировали (400g в течение 5 мин). Надосадочный раствор аспирировали и повторно суспендировали осадок в 10 мл культуральной среды. Может потребоваться повторный отбор пипеткой для получения монодисперсной клеточной суспензии. Концентрацию и жизнеспособность клеток измеряли по клеткам, окрашенным трипановым синим, и подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток LUNA-II™. Клетки разбавляли до 2×10⁵/мл, распределяли (50 мкл/лунка) в 96-луночные плоскодонные планшеты и инкубировали в течение ночи перед использованием.

Исходный раствор (1 мл) конъюгата антитело-лекарственное соединение (ADC) (20 мкг/мл) получали разбавлением стерилизованного через фильтр ADC в среде для клеточных культур. Серию 8×10-кратных разбавлений исходного ADC проводили в 24-луночном планшете посредством серийного перебора 100 мкл в 900 мкл среды для клеточных культур.

Разбавленный ADC распределяли (50 мкл/лунка) в 4 экземплярах в лунки 96-луночного планшета, содержащие 50 мкл клеточной суспензии, высеванной в предыдущий день. В контрольные лунки помещали 50 мкл среды для клеточных культур. 96-луночный планшет, содержащий клетки и ADC, инкубировали при 37°C в насыщенном CO₂ инкубаторе 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 насыщенном CO₂ инкубаторе. Поглощение в лунках измеряли при 490 нм. Процентное выживание клеток рассчитывали по среднему поглощению в 4 лунках, обработанных ADC, в сравнении 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: сигмоидальный, 4PLX представляет собой log (концентрации).

Клеточная линия	Описание	Воздействие ADC	Среда для выращивания клеток
MDA MB 468	HER2-негативная карцинома молочной железы	4 дня	RPMI 1640 с Glutamax, 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки HyClone™
NCIN87	Карцинома желудка	7 дней	RPMI 1640 с Glutamax, 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки HyClone™

ADC	IC ₅₀ (нМ) в:	
	MDA MB 468	NCI-N87
ConjA	>100	0,263
ConjB	>100	0,0222
ConjC	68	0,0013
ConjD	>100	0,185
ConjE	>100	0,0023
ConjF	81	0,0003

ADC	EC ₅₀ (мкг/мл)
ConjA	0,0133
ConjB	0,00141
ConjC	0,00000187
ConjD	0,00271
ConjE	0,00000203
ConjF	3 x 10 ⁻¹⁶
ConjG	0,00369
ConjH	0,000496
ConjI	0,00844
ConjJ	0,0829

Пример 11. Испытание ксенотрансплантата.

Мыши с ксенотрансплантатом NCI-N87.

Возраст самок мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (Fox Chase SCID®, CB17/lcr-Prkdcscid, Charles River) составлял десять недель, диапазон массы тела (BW) от 16,5 до 21,1 г на 1 день исследования. Животных обеспечивали водой ad libitum (обратный осмос, 1 м.д. CI) и модифицированным кормом NIH 31, а также облученным кормом Lab Diet®, состоящим из 18,0% неочищенного белка, 5,0% неочищенного жира и 5,0% неочищенного волокна. Мышей содержали на подстилке для лабораторных животных Enricho'cobs™ в статических микроизоляторах с 12-часовым циклом освещения при 20-22°C (68-72°F) и влажности 40-60%. Компания CR Discovery Services, в частности, действует в соответствии с рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных в отношении обездвиживания, содержания, хирургических операций и регуляции обеспечения корма и жидкости, а также ветеринарного ухода. Программа по содержанию и использованию животных в компании CR Discovery Services аккредитована Международной ассоциацией по аттестации и аккредитации содержания лабораторных животных (AAALAC), что гарантирует соблюдение принятых стандартов по содержанию и использованию лабораторных животных.

Культура опухолевых клеток.

Клетки карциномы-лимфомы желудка человека NCI-N87 выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2 mM глутамина, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина и 25 мкг/мл гентамицина. Клетки выращивали в колбах для тканевых культур в увлажненном инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха.

In vivo имплантация и рост опухоли.

Клетки NCI-N87, использованные для имплантации, собирали на логарифмической фазе роста и повторно суспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), содержащем 50% Matrigel™ (BD Biosciences). В день имплантации опухоли каждой экспериментальной мыши в правый бок вводили под-

кожную инъекцию 1×10^7 клеток (0,1 мл клеточной суспензии) и контролировали рост опухоли по среднему размеру, приближающемуся в требуемому диапазону от 100 до 150 мм³. Через 14 дней, в день, обозначенный как 1 день исследования, мышей разделяли на группы в соответствии с рассчитанным размером опухоли, и каждая группа состояла из десяти животных с размером опухоли у каждой из них от 108 до 144 мм³, и средний объем опухоли в группе составлял 115 мм³.

Опухоли измеряли в двух направлениях с помощью штангенциркуля и рассчитывали объем по формуле

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

где w = ширина и l = длина опухоли в мм.

Массу опухоли можно оценить, если принять, что 1 мг эквивалентен объему опухоли 1 мм³.

Лечение.

Лечение начинали на 1 день в группах по 10 мышей (n=10) с развившимися подкожными опухолями NCI-N87 (108-144 мм³). Трастузумаб-10 (ConjA) вводили внутривенно однократно на 1 день (qd×1). Группу, которую лечили носителем, использовали в качестве контрольной группы для анализа эффективности. Опухоли измеряли два раза в неделю до окончания исследования на 79 день. Каждую мышшь усыпляли по достижении конечного объема опухоли 800 мм³ или до последнего дня, в зависимости от того, что наступит раньше. Для каждой мыши рассчитывали время до конечной точки (ТТЕ).

Результат лечения определяли по процентной отсрочке роста опухоли (%TGD), которую рассчитывали как процентное увеличение медианного ТТЕ у мышшей, проходивших лечения, по сравнению с контрольными мышшами, и разность между группами считали статистически значимой при $P \leq 0,05$ с использованием логрангового анализа выживания. Мышей контролировали по ответу полной регрессии (CR) и частичной регрессии (PR).

Переносимость лечения оценивали посредством измерения массы тела и частоты наблюдения признаков побочных эффектов, связанных с лечением. Переносимость лечения оценивали посредством измерения массы тела и частоты наблюдения признаков побочных эффектов, связанных с лечением. Все схемы были хорошо переносимыми.

Медианное ТТЕ для контрольных мышшей, которых лечили носителем, составляло 50,7 дня, что соответствует максимально возможной TGD 28,3 дня (56%) для 79-дневного исследования.

Минимально эффективную дозу определяли как минимальную дозу, необходимую для инициации стаза опухоли в течение 28 дней после введения экспериментального препарата. На основании визуального осмотра, графиков среднего и медианного объема опухоли и процентного изменения объема опухоли относительно 1 дня доза конъюгата трастузумаб-10 (ConjA) 1,0 мг/кг является дозой, обеспечивающей достижение ответа, соответствующего минимальной эффективной дозе.

Два животных из группы с 0,3 мг/кг закончили исследование живыми с MTV 708 мм³. Восемь животных из группы с 1,0 мг/кг закончили исследование живыми с MTV 650 мм³. Результаты представлены на фиг. 3.

Мыши с ксенотрансплантатом JMT-1.

Мыши.

Возраст самок мышшей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (Fox Chase SCID®, CB17/lcr-Prkdcscid/lcrIcoCrI, Charles River) составлял десять недель, диапазон массы тела (BW) от 15,1 до 22,2 г на 1 день исследования.

Культура опухолевых клеток.

Клетки карциномы молочной железы человека JMT-1 выращивали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 единиц/мл натриевой соли пенициллина G, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина, 25 мкг/мл гентамицина и 2 мМ глутамина. Клеточные культуры выдерживали в колбах для тканевых культур в увлажненном инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха.

In vivo имплантация и рост опухоли.

Клетки JMT-1, использованные для имплантации, собирали на стадии экспоненциального роста и повторно суспендировали в смеси 50% Matrigel (BD Biosciences): 50% фосфатно-солевого буферного раствора в концентрации 5×10^7 клеток/мл. В день имплантации опухоли каждой экспериментальной мыши в правый бок вводили подкожную инъекцию 1×10^7 клеток (0,2 мл клеточной суспензии) и контролировали рост опухоли по среднему размеру, приближающемуся к требуемому диапазону от 100 до 150 мм³. Опухоли измеряли в двух направлениях с помощью штангенциркуля и рассчитывали объем по формуле

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

где w = ширина и l = длина опухоли в мм.

Массу опухоли можно оценить при допущении, что 1 мг эквивалентен 1 мм³ объема опухоли.

Лечение.

Лечение начинали на 1 день в группах по 10 мышей (n=10) с развившимися подкожными опухоля-

ми ЛМТ-1 с объемом в диапазоне 88-196 мм³, и средний объем опухоли в группе составлял 120-122 мм³. Трастузумаб-10 (ConjA) вводили внутривенно однократно на 1 день (qd×1). Группу, которую лечили носителем, использовали в качестве контрольной группы для анализа эффективности. Опухоли измеряли два раза в неделю до окончания исследования на 59 день. Каждую мышшь усыпляли по достижении конечного объема опухоли 1000 мм³ или до последнего дня, в зависимости от того, что наступит раньше. Для каждой мыши рассчитывали время до конечной точки (ТТЕ).

Результат лечения определяли по процентной отсрочке роста опухоли (%TGD), которую рассчитывали как процентное увеличение медианного ТТЕ у мышшей, проходивших лечения, по сравнению с контрольными мышшами и разность между группами считали статистически значимой при $P \leq 0,05$ с использованием логрангового анализа выживания. Мышей контролировали по ответу полной регрессии (CR) и частичной регрессии (PR).

Переносимость лечения оценивали посредством измерения массы тела и частоты наблюдения признаков побочных эффектов, связанных с лечением. Все схемы были хорошо переносимыми. Медианное ТТЕ для контрольных мышшей, которых лечили носителем, составляло 48,4 дня, что соответствует максимально возможной TGD 10,6 дня (22%) для 59-дневного исследования. Все испытанные схемы введения ADC обеспечивали существенное преимущество для выживания по сравнению с контрольными группами, которые лечили носителем ($P < 0,01$).

Минимально эффективную дозу определяли как минимальную дозу, необходимую для инициации стаза опухоли в течение 28 дней после введения экспериментального препарата. На основании визуального осмотра, графиков среднего и медианного объема опухоли и процентного изменения объема опухоли относительно 1 дня доза конъюгата трастузумаб-10 (ConjA) 1,0 мг/кг является дозой, обеспечивающей достижение ответа, соответствующего минимальной эффективной дозе.

Наблюдали дозозависимый эффект, когда медианный объем опухоли в группе с 0,3 мг/кг постепенно увеличивался до 34 дня, затем прогрессировал далее, а в группе с 1,0 мг/кг наблюдали неизменный объем опухоли до 38 дня, который затем прогрессировал далее. Медианное ТТЕ для группы с 0,3 мг/кг составляло 56,9 дня, что соответствует существенному TGD, составляющему 8,5 дня (18%) по сравнению с контрольным значением ($P < 0,05$). Группа с 0,3 мг/кг не демонстрировала объективной ответной регрессии. Пять животных из группы с 0,3 мг/кг закончили исследование живыми с MTV 486 мм³.

Медианное ТТЕ для группы с 1,0 мг/кг составляло максимальные 59,0 дня, что соответствует существенному TGD, составляющему 10,6 дня (22%) по сравнению с контрольным значением ($P < 0,001$). Группа с 1,0 мг/кг не демонстрировала объективной ответной регрессии. Девять животных из группы с 1,0 мг/кг закончили исследование живыми с MTV 446 мм³. Группы с 0,3 и 1,0 мг/кг существенно отличались друг от друга ($P < 0,05$).

Результаты представлены на фиг. 4.

Пример 12. Испытания токсичности/терапевтический индекс.

Исследование на крысах.

Использовали исследование токсичности однократной дозы для определения максимально переносимой дозы (MTD) и профиля безопасности конъюгата трастузумаб-10 (ConjA). Самцам крыс Спрага-Доули (ENVIGO) через хвостовую вену вводили однократную медленную внутривенную болюсную инъекцию контрольного носителя (25 мМ гистидина, 200 мМ сахарозы, pH 6,0) или экспериментального препарата (ConjA). В процессе 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. Все животные в группах 1-6 прекращали исследование на 29 день исследования (Study Day, SD), за исключением одного животного в группе 6, которое прекратило исследование на 25 день исследования (SD).

Группа	Лечение	Способ введения	Доза (мг/кг)	Частота	Самцы крыс	
					Основное исследование	
					N	
1	Контроль	IV	0	Однократно	5	
2	ConjA	IV	4	Однократно	5	
3	ConjA	IV	6	Однократно	5	
4	ConjA	IV	8	Однократно	5	
5	ConjA	IV	12	Однократно	5	
6	ConjA	IV	14	Однократно	5	

Контроль = 25 мМ гистидина-HCl, 200 мМ сахарозы, pH 6,0.

Переносимость определяли на основании конечных критериев токсичности, включая снижение аб-

солотного содержания ретикулоцитов, белых кровяных клеток и клеточных компонентов, а также макроскопических и микроскопических повреждений в легких. Основным наблюдением в дозах ≥ 4 мг/кг были гистологические данные легочных повреждений. В дозе 4 мг/кг наблюдения результаты были умеренными и считались обратимыми. При увеличении дозы легочные повреждения характеризовались повышением тяжести и не считались обратимыми. На основании полученных данных, максимально переносимую дозу (MTD) у крыс после однократной дозы ConjA считали равной 6 мг/кг.

Терапевтический индекс.

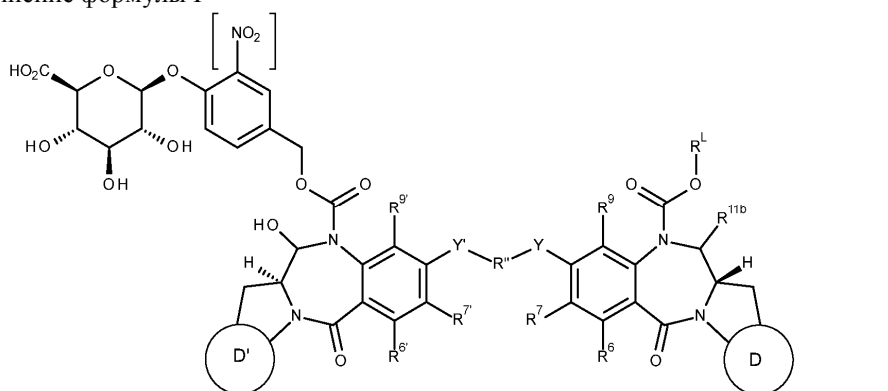
Терапевтический индекс можно рассчитать делением максимально переносимой однократной дозы (MTD) неприцельного ADC у крыс на минимально эффективную однократную дозу (MED) прицельного ADC. MED представляет собой однократную дозу, необходимую для достижения стаза опухоли в модели *in vivo* через 28 дней (для ксенотрансплантата NCI-N87).

Таким образом, для конъюгатов соединения 10 терапевтический индекс представляет собой MTD, равную 6 мг/кг, деленную на MED, составляющую 1,0 мг/кг (см. выше), и равен терапевтическому индексу 6.

Все документы и другие ссылки, упомянутые выше, включены в данный документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

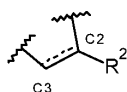
1. Соединение формулы I



или его соль, где

квадратные скобки означают, что группа NO_2 является необязательной;

D означает группу D1:



D1

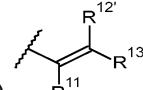
пунктирная линия означает необязательное наличие двойной связи между C2 и C3;

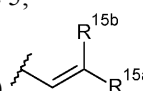
при наличии двойной связи между C2 и C3 R^2 выбран из группы, состоящей из:

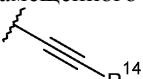
(ia) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей галоген; нитро; циано; OR, где R представляет собой C_{1-7} алкил; карбокси; $\text{C}(\text{O})\text{OR}$, где R представляет собой C_{1-7} алкил, C_{3-20} гетероцикл или C_{5-20} арил, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероцикл и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

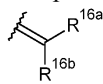
(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(id) , где каждый из R^{11} , $\text{R}^{12'}$ и R^{13} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила и общее количество атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5;

(ie) , где один из R^{15a} и R^{15b} представляет собой H, а другой выбран из фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

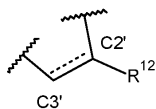
(f) , где R^{14} выбран из H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пири-

дила; и тиофенила; при наличии одинарной связи между C2 и C3;



R^2 выбран из H, OH, F, diF и $\text{C}(\text{R}^{16a})=\text{C}(\text{R}^{16b})$, где R^{16a} и R^{16b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и сложного C_{1-4} алкилового эфира; или если один из R^{16a} и R^{16b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C_{1-4} алкилового эфира;

D' представляет собой группу $D'1$:



$D'1$

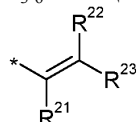
где пунктирная линия означает необязательное наличие двойной связи между $C2'$ и $C3'$;

при наличии двойной связи между $C2'$ и $C3'$ R^{12} выбран из группы, состоящей из:

(ia) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген; нитро; циано; OR, где R представляет собой C_{1-7} алкил; карбокси; $C(O)OR$, где R представляет собой C_{1-7} алкил, C_{3-20} гетероцикл или C_{5-20} арил; C_{1-7} алкил; C_{3-7} гетероцикл и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

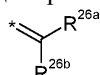
(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;



(iid) $\text{C}(\text{R}^{21})=\text{C}(\text{R}^{22})-\text{R}^{23}$, где каждый из R^{21} , R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила и общее количество атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;

(ie) $\text{C}(\text{R}^{25a})=\text{C}(\text{R}^{25b})$, где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила; и

(if) $\text{C}(\text{R}^{24})\equiv\text{C}$, где R^{24} выбран из H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила; при наличии одинарной связи между $C2'$ и $C3'$;



R^{12} выбран из H, OH, F, diF и $\text{C}(\text{R}^{26a})=\text{C}(\text{R}^{26b})$, где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и сложного C_{1-4} алкилового эфира; или если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C_{1-4} алкилового эфира;

R^6 и R^9 представляют собой H;

где R и R' независимо выбраны из C_{1-4} алкильной группы, C_{5-6} арильной группы и азотсодержащих C_6 -гетероциклов;

R^7 представляет собой OR;

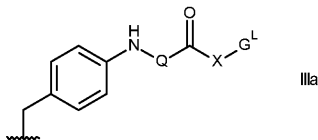
R'' представляет собой C_{3-12} алкиленовую группу, цепь которой может прерываться одним или более гетероатомами, выбранными из O, и/или бензольное кольцо;

Y и Y' выбраны из O, S или NH;

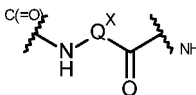
R^6 , R^7 , R^9 выбраны из таких же групп, как R^6 , R^7 и R^9 соответственно;

R^{11b} выбран из OH, OR^A , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил; и

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

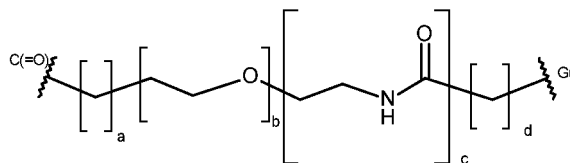


где Q представляет собой



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

X представляет собой



где a = от 0 до 5, b = от 0 до 16, c = 0 или 1, d = от 0 до 5;

G^L выбран из:

(G^{L1-1})		(G^{L1-2})	
(G^{L2})		(G^{L6})	

где Ar представляет собой C_{5-6} ариленовую группу,

при этом C_{3-20} гетероцикл содержит от 3 до 20 кольцевых атомов, из которых от 1 до 10 представляют собой гетероатомы, выбранные из O, S или N;

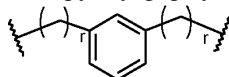
при этом C_{3-7} гетероцикл содержит от 3 до 7 кольцевых атомов, из которых от 1 до 2 представляют собой гетероатомы, выбранные из O, S или N;

при этом азотсодержащий C_6 -гетероцикл содержит 6 кольцевых атомов, из которых от 1 до 2 представляют собой N.

2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что:

a) оба Y и Y' представляют собой O; и/или

b) R'' представляет собой C_{3-7} алкилен или группу формулы



где r равен 1 или 2.

3. Соединение по п.1 или 2, отличающееся тем, что:

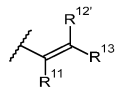
a) D представляет собой D1, между C2 и C3 присутствует двойная связь и R^2 представляет собой C_{5-7} арильную группу, где R^2 необязательно содержит от одного до трех заместителей, выбранных из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила; или

b) D представляет собой D1, между C2 и C3 присутствует двойная связь и R^2 представляет собой C_{8-10} арильную группу, где R^2 необязательно содержит от одного до трех заместителей, выбранных из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила; или

c) D представляет собой D1, между C2 и C3 присутствует двойная связь и R^2 представляет собой метил, этил или пропил; или

d) между C2 и C3 присутствует двойная связь и R^2 представляет собой циклопропил; или

e) D представляет собой D1, между C2 и C3 присутствует двойная связь и R^2 представляет собой



группу формулы , при этом:

i) общее количество атомов углерода в группе R^2 составляет не более 4; и/или

ii) один из R^{11} , R^{12} и R^{13} представляет собой H, а другие две группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила; или

iii) два из R^{11} , R^{12} и R^{13} представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила; или

f) D представляет собой D1, между C2 и C3 присутствует двойная связь и R^2 представляет собой


группу ; или


g) D представляет собой D1, между C2 и C3 присутствует двойная связь и R^2 представляет собой


группу формулы R^{14} , где R^{14} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила.

4. Соединение по п.1 или 2, отличающееся тем, что:

а) D представляет собой D1, между C2 и C3 присутствует одинарная связь и R² представляет собой H; или

б) D представляет собой D1, между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R² представляет собой  , оба R^{16a} и R^{16b} представляют собой H; или

с) D представляет собой D1, между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R² представляет собой  , оба R^{16a} и R^{16b} представляют собой метил; или

д) D представляет собой D1, между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R² представляет собой  , один из R^{16a} и R^{16b} представляет собой H, а другой выбран из C₁₋₄насыщенного алкила, C₂₋₃алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы являются необязательно замещенными группой, выбранной из C₁₋₄алкиламида и сложного C₁₋₄алкилового эфира.

5. Соединение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что:

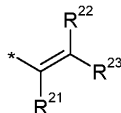
а) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует двойная связь и R¹² представляет собой C₅₋₇арильную группу, где R¹² необязательно содержит от одного до трех заместителей, выбранных из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила; или

б) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует двойная связь и R¹² представляет собой C₈₋₁₀арильную группу, где R¹² необязательно содержит от одного до трех заместителей, выбранных из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила; или

с) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует двойная связь и R¹² представляет собой метил, этил или пропил; или

д) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует двойная связь и R¹² представляет собой циклопропил; или

е) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует двойная связь и R¹² представляет собой группу формулы

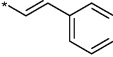


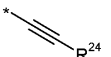
при этом:

i) общее количество атомов углерода в группе R¹² составляет не более 3;

ii) один из R²¹, R²² и R²³ представляет собой H, а другие две группы выбраны из H, C₁₋₃насыщенного алкила, C₂₋₃алкенила, C₂₋₃алкинила и циклопропила; или

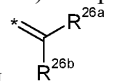
iii) два из R²¹, R²² и R²³ представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C₁₋₃насыщенного алкила, C₂₋₃алкенила, C₂₋₃алкинила и циклопропила; или

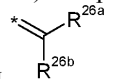
f) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует двойная связь и R¹² представляет собой группу  ; или

г) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует двойная связь и R¹² представляет собой группу формулы  , где R²⁴ выбран из H, метила, этила, этенила и этинила.

6. Соединение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что:

а) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует одинарная связь и R¹² представляет собой H; или

б) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует одинарная связь и R¹² представляет собой  , оба R^{26a} и R^{26b} представляют собой H; или

с) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует одинарная связь и R¹² представляет собой  , оба R^{26a} и R^{26b} представляют собой метил; или

д) D' представляет собой D'1, между C2' и C3' присутствует одинарная связь и R¹² представляет со-

бой $\begin{matrix} * \\ \diagup \\ R^{26a} \\ \diagdown \\ R^{26b} \end{matrix}$, один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы являются необязательно замещенными группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и сложного C_{1-4} алкилового эфира.

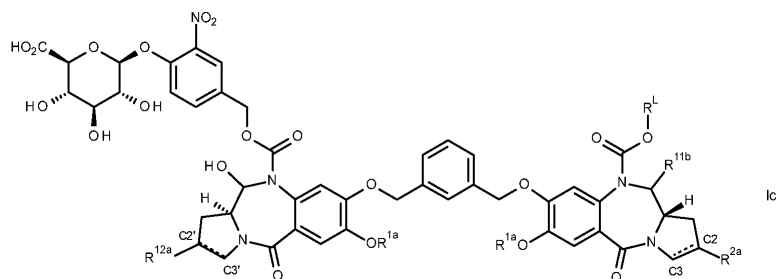
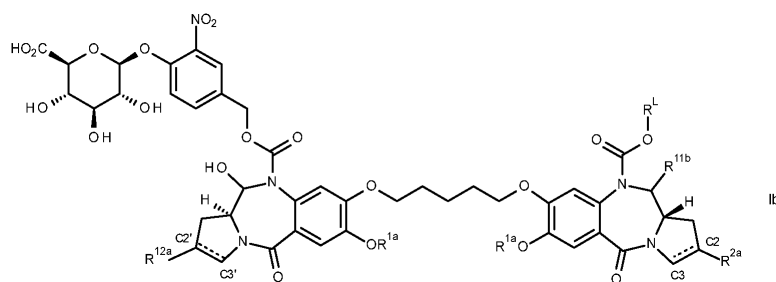
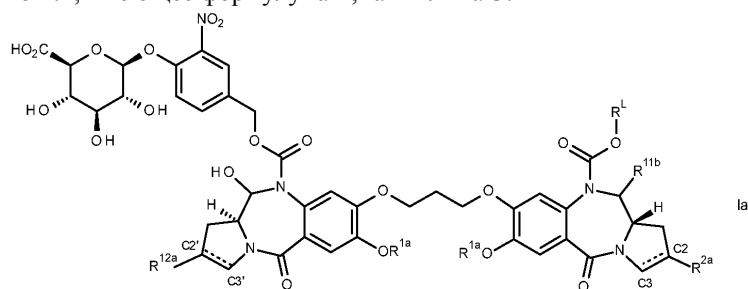
7. Соединение по любому из пп. 1-6, отличающееся тем, что:

a) $R^{6'}$ выбран из таких же групп, как R^6 , $R^{7'}$ выбран из таких же групп, как R^7 , $R^{9'}$ выбран из таких же групп, как R^9 , и Y' выбран из таких же групп, как Y ; и/или

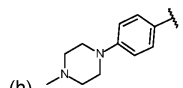
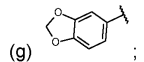
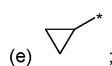
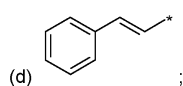
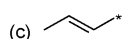
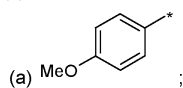
b) R^6 представляет собой такие же группы, как R^6 , $R^{7'}$ представляет собой такие же группы, как R^7 , $R^{9'}$ представляет собой такие же группы, как R^9 , и Y' представляет собой такие же группы, как Y ; и/или

c) R^{12} представляет собой такую же группу, как R^2 .

8. Соединение по п. 1, имеющее формулу Ia-1, Ia-2 или Ia-3:



где R^{2a} и R^{12a} являются одинаковыми и выбраны из:



R^{1a} выбран из метила и бензила;

R^L и R^{11b} являются такими, как определено в п.1.

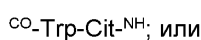
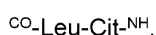
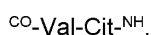
9. Соединение по п.1 или 2, отличающееся тем, что оба R^2 и R^{12} содержат не более трех атомов углерода.

10. Соединение по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что R^{11b} представляет собой OH или OR^A , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил, при этом необязательно R^A представляет собой метил.

11. Соединение по любому из пп.1-10, отличающееся тем, что Q^x представляет собой:

а) остаток аминокислоты, выбранный из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp; или

б) дипептидный остаток, выбранный из:



в) трипептидный остаток.

12. Соединение по любому из пп.1-11, отличающееся тем, что:

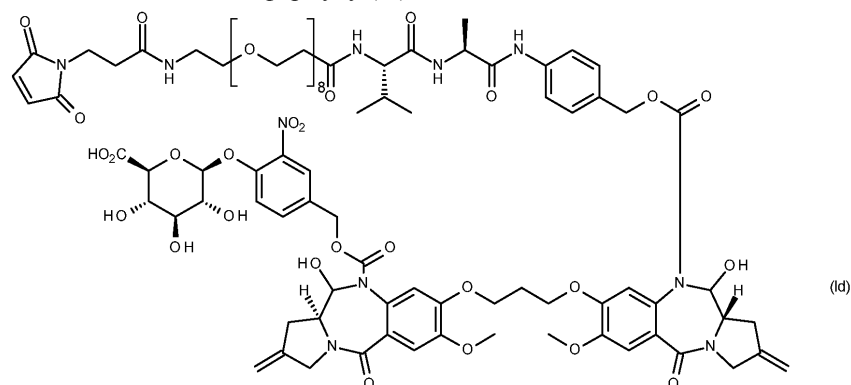
а) a равен от 0 до 3; и/или

б) b равен от 0 до 12; и/или

в) c равен от 0 до 3.

13. Соединение по любому из пп.1-11, отличающееся тем, что a равен 0, c равен 1, d равен 2 и b равен от 0 до 8.

14. Соединение по п.1, имеющее формулу (Id)



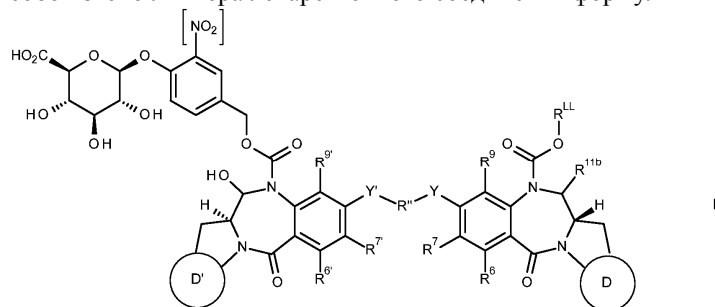
15. Конъюгат формулы (I)

L - $(D^L)_p$

(I)

где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

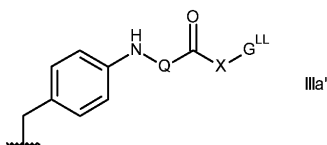
D^L представляет собой звено линкера лекарственного соединения формулы I'



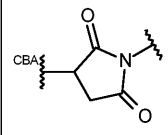
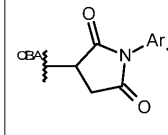
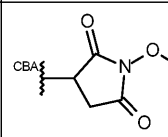
где D, R^2 , R^6 , R^7 , R^9 , R^{11b} , Y, R^{11} , Y' , D' , $R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$ и R^{12} , включая наличие или отсутствие двойных связей между C2 и C3, и C2' и C3' соответственно, являются такими, как определено в любом из пп.1-10;

при этом p представляет собой целое число от 1 до 20;

R^{11L} представляет собой линкер для связи с указанным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который представляет собой



где Q и X являются такими, как определено в любом из пп.1 и 11-13; и G^{LL} выбран из:

(G^{LL1-1})		(G^{LL1-2})	
(G^{LL2})			

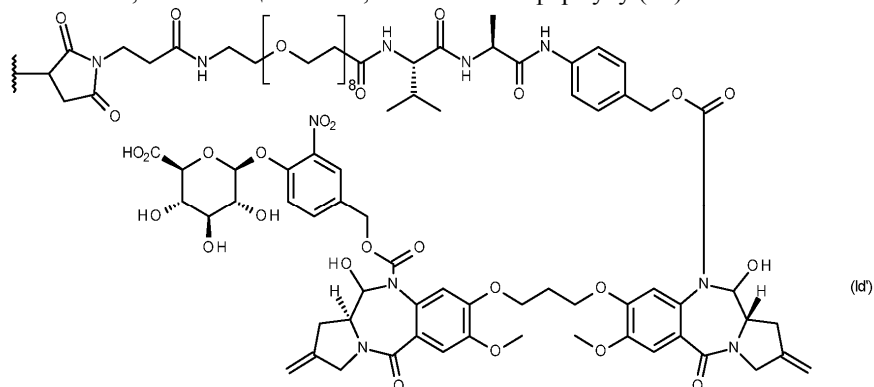
где Ar представляет собой C_{5-6} ариленовую группу.

16. Соединение по любому из пп.1-14 или конъюгат по п.15, отличающиеся тем, что:

а) Ar представляет собой фениленовую группу и/или

б) G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2} .

17. Конъюгат по п.15, отличающийся тем, что D^L имеет формулу (Id')



18. Конъюгат по любому из пп.15-17, отличающийся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело или фрагмент антитела к опухолеассоциированному антигену, при этом необязательно антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело, которое связывается с одним или более опухолеассоциированными антигенами или рецепторами клеточной поверхности, выбранными из (1)-(88):

- (1) BМРR1В;
- (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-альфа;
- (21) Brevican;
- (22) EphB2R;

- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R;
- (27) CD22;
- (28) CD79a;
- (29) CXCR5;
- (30) HLA-DOB;
- (31) P2X5;
- (32) CD72;
- (33) LY64;
- (34) FcRH1;
- (35) IRTA2;
- (36) TENB2;
- (37) PSMA-FOLH1;
- (38) SST;
- (38.1) SSTR2;
- (38.2) SSTR5;
- (38.3) SSTR1;
- (38.4) SSTR3;
- (38.5) SSTR4;
- (39) ITGAV;
- (40) ITGB6;
- (41) CEACAM5;
- (42) MET;
- (43) MUC1;
- (44) CA9;
- (45) EGFRvIII;
- (46) CD33;
- (47) CD19;
- (48) IL2RA;
- (49) AXL;
- (50) CD30 - TNFRSF8;
- (51) BCMA-TNFRSF17;
- (52) CT Ags - CTA;
- (53) CD174 (Льюис Y) - FUT3;
- (54) CLEC14A;
- (55) GRP78 - HSPA5;
- (56) CD70;
- (57) Специфические антигены стволовых клеток;
- (58) ASG-5;
- (59) ENPP3;
- (60) PRR4;
- (61) GCC-GUCY2C;
- (62) Liv-1 - SLC39A6;
- (63) 5T4;
- (64) CD56 - NCMA1;
- (65) CanAg;
- (66) FOLR1;
- (67) GPNMB;
- (68) TIM-1 -HAVCR1;
- (69) RG-1/Мишень опухоли предстательной железы 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) Аннексии А1 - ANXA1;
- (88) V-CAM (CD106) - VCAM1.

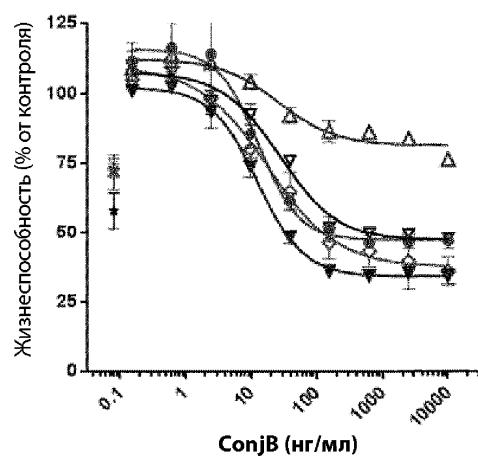
19. Конъюгат по п.18, отличающийся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело, сконструированное на основе цистеина.

20. Конъюгат по любому из пп.15-19, отличающийся тем, что r представляет собой целое число от 1 до 8.

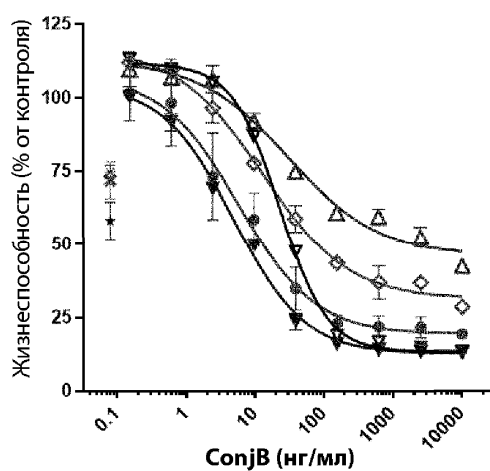
21. Фармацевтическая композиция, содержащая смесь конъюгатов по любому из пп.15-20, в которой среднее значение r в указанной смеси соединений-конъюгатов составляет от 1 до 8.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп.15-20 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

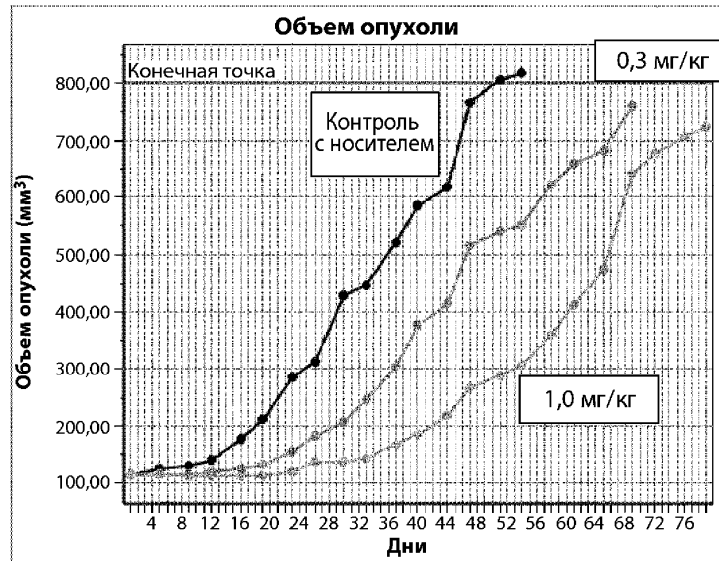
23. Применение конъюгата по любому из пп.15-20 или фармацевтической композиции по п.22 для лечения рака у субъекта.



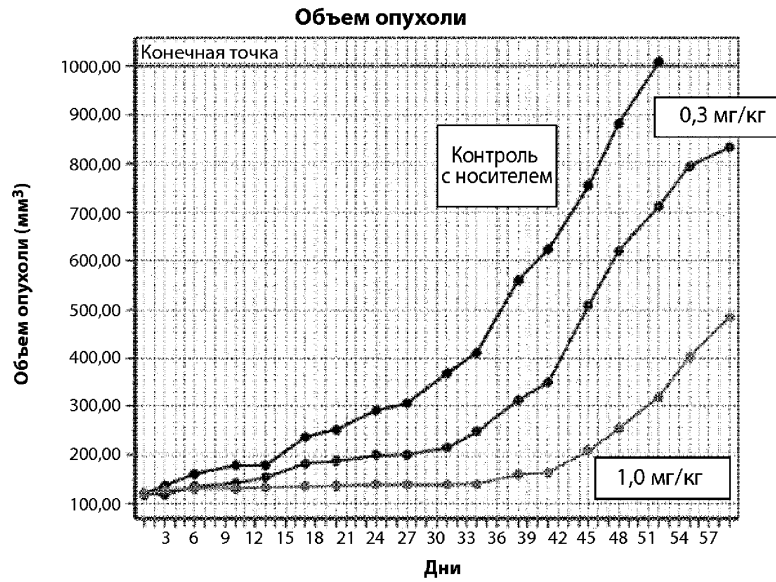
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4