(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202092682 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.19

(22) Дата подачи заявки
2019.05.08

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(54) АНТИТЕЛА К MSR1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

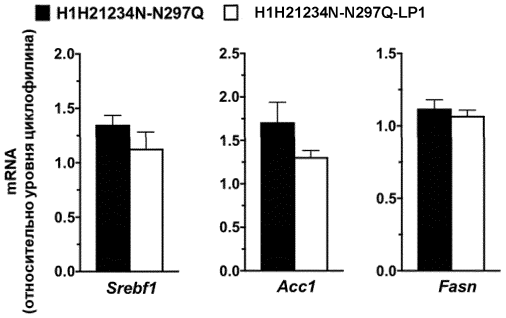
(31) **62/669,276; 62/678,200; 62/769,946; 62/789,987; 62/821,362**
(32) **2018.05.09; 2018.05.30; 2018.11.20; 2019.01.08; 2019.03.20**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/031383**
(87) **WO 2019/217591 2019.11.14**

(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Громада Джеспер, Гусарова Виктория, Хан Эми, Хаксхинасто Сокол, Мерфи Эндрю Джей., Олсон Уильям, Слиман Мэтью, Кирацус Кристос, Ниттоли Томас, Зумстег Анна (US)

(74) Представитель:
Безрукова О.М. (RU)

(57) В изобретении представлены антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с MSR1, и способы их использования. Согласно определенным вариантам осуществления, такие антитела связываются с MSR1 человека с высокой аффинностью. В определенных вариантах осуществления такие антитела связываются с MSR1 без блокирования или с блокированием менее чем 90% связывания модифицированных ЛПНП с MSR1. В некоторых вариантах осуществления такие антитела связываются с экспрессируемым клеточной поверхностью MSR1 и интернализуются. Антитела по настоящему изобретению могут быть полностью человеческими антителами. Настоящее изобретение включает антитела к MSR1 или их антиген-связывающие фрагменты, конъюгированные с лекарственными средствами или терапевтическими соединениями.



202092682 A1

202092682 A1

АНТИТЕЛА К MSR1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

[001] Для настоящей заявки испрашивается приоритет относительно Предварительной патентной заявки США № 62/669,276, поданной 9 мая 2018 года, Предварительной патентной заявки США № 62/678,200, поданной 30 мая 2018 года, Предварительной патентной заявки США № 62/769,946, поданной 20 ноября 2018 года, Предварительной патентной заявки США № 62/789,987, поданной 8 января 2019 года, и Предварительной патентной заявки США № 62/821,362, поданной 20 марта 2019 года, которые включаются в настоящий документ полностью посредством ссылки для любых целей.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[002] Настоящее изобретение относится к антителам и их антиген-связывающим фрагментам, а также конъюгатам антитело-лекарственное средство таких антител, которые специфически связываются с тримерным мембранным гликопротеиновым рецептором (MSR1) и модулируют трансдукцию сигнала MSR1, а также к способам их использования.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[003] Официальная копия перечня последовательностей предоставляется одновременно со спецификацией посредством EFS-Web в виде бумажной копии перечня последовательности формата ASCII с названием файла 114581.00244_ST25.TXT, с датой создания 30 мая 2018 года, размером около 165 килобайт. Перечень последовательностей, содержащийся в настоящей бумажной копии документа формата ASCII, является частью спецификации и включается в настоящий документ полностью посредством ссылки.

ИЗВЕСТНЫЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[004] Скавенджер-рецептор макрофагов 1 (MSR1) - паттерн-распознающий рецептор, представляющий собой однопроходный тримерный трансмембранный гликопротеин типа II, который опосредует захват серии отрицательно заряженных/полианионных лигандов, включая модифицированные липопротеины низкой плотности (ЛПНП) (Krieger, M. 1994. *Annu. Rev. Biochem.* 63:601-637; Platt, N. and S. Gordon. 2001. *J Clin Invest.* 108(5):649-654) и конечные продукты гликирования бычьего сывороточного альбумина (AGE-BSA) (Smedsrød *et al.* 1997. *Biochem J.* 322(Pt 2):567-573.) Предполагается, что рецепторы MSR1 играют роль во многих связанных с макрофагами физиологических и патологических процессах, включая атеросклероз, болезнь Альцгеймера и иммунную защиту.

[005] Изначально считалось, что MSR1 экспрессируется только на макрофагах. Однако недавно он также был обнаружен на различных классах дендритных клеток (Herber et al. 2010. *Nat. Med.* 16(8): 880–886). Кроме того, MSR1, по-видимому, экспрессируется в эндотелиальных клетках и клетках гладкой мускулатуры. Он интернализуется с помощью окаймленных ямок на поверхности клеток и высвобождает свой лиганд при кислотном pH, а затем возвращается на клеточную поверхность из транс-аппарата Гольджи (Doi *et al.* 1994. *Journal of Biological Chemistry;* Mori, T. 1994. *Lab Invest.*). Он промотирует преобразование макрофагов моноцитарного происхождения в пенистые клетки, что является важнейшим этапом для прогрессирования атеросклероза.

[006] Изоформы MSR1 типа 1 и типа 2 являются функциональными рецепторами и способны опосредовать эндоцитоз модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Изоформа MSR1 типа 3 может связываться с модифицированными ЛПНП (ацетил-ЛПНП), но, по-видимому, не способна к интернализации связанного комплекса. Тем не менее, MSR1 также связывается с большим разнообразием лигандов, кроме модифицированных ЛПНП. Эти лиганды включают бета-амилоидный белок, молекулярные шапероны, белки внеклеточного матрикса, конечные продукты гликирования, апоптотические клетки и активированные B-клетки.

[007] X рецептор печени (LXR) включает LXRα и LXRβ, которые представляют собой лиганд-зависимые транскрипционные факторы, контролирующие экспрессию генов, участвующих в гомеостазе холестерина, липидов и глюкозы, воспалении и врожденном иммунитете. LXRα высоко экспрессируется в печени, кишечнике, подкожно-жировой клетчатке и дифференцированных макрофагах; а LXRβ экспрессируется повсеместно. LXR имеют различные биологические функции, включая (i) стимулирование экспрессии транспортеров холестерина, например, ABCA1 и ABCG1, оба из которых опосредуют эффлюкс холестерина из клеток; и (ii) негативное регулирование экспрессии воспалительного гена макрофагов посредством репрессии активации NF-kB. Также определено, что LXR играют роль в развитии атеросклероза, пролиферативных нарушений, нейродегенеративных нарушений и воспаления. Пролиферативные нарушения включают меланомы, рак легких, плоскоклеточную карциному полости рта и рак простаты. (Pencheva *et al.* 2004; Wu *et al.* 2015; Kaneko *et al.* 2015; Chuu *et al.* 2006) Нейродегенеративные нарушения включают болезнь Альцгеймера, экспрессию генов миелина. (Terwel *et al.* 2011; Sandoval-Hernandez *et al.* 2016; Meffre *et al.* 2014) Воспаление включает воспалительное заболевание кишечника, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона и артрит. (Anderson *et al.* 2011; Huang *et al.* 2015; Cui *et al.* 2012). Известно, что LXR макрофагов также имеют противоатерогенное действие. Полагают, что агонисты LXR способны (i) ингибировать начало и откладывать прогрессирование атеросклероза;

(ii) уменьшать выраженность атеросклероза и стабилизировать имеющиеся атеросклеротические повреждения; и (iii) уменьшать содержание макрофагов в повреждении посредством апоптоза.

[008] Терапевтический потенциал низкомолекулярных модуляторов LXR ограничивается, например, нежелательной модуляцией LXR на клетках, не являющихся мишенями, и/или низкой биологической доступностью. Модуляция LXR на клетках, не являющихся мишенями, может привести к нежелательным побочным действиям, а низкая биологическая доступность может иметь место по большому ряду причин, включая, помимо прочего, низкую растворимость, которая в еще большей степени ухудшает плохие терапевтические окна для лечения. Разработка конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), содержащих модуляторы LXR, сделала бы возможной мишень-специфическую модуляцию LXR, что позволило бы избежать побочных действий, вызываемых нецелевой модуляцией LXR. Более того, такие ADC обеспечили бы улучшенную модуляцию биологических мишеней, улучшенную биодоступность и улучшенное терапевтическое окно. В связи с этим остается потребность в эффективном лечении, например, нарушений метаболизма с использованием конъюгатов антитело-лекарственное средство модуляторов LXR.

[009] Глюкокортикоиды (ГК) - это низкомолекулярные стероиды, которые связываются с глюкокортикоидными рецепторами (ГР) и широко применяются в противовоспалительной и иммуносуппрессивной терапиях. Тем не менее, ввиду повсеместной экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в клетках многих типов недостатком лечения глюкокортикоидами является токсичность для большинства систем органов. Таким образом, существует необходимость как в новых глюкокортикоидах, так и в новых терапиях, которые минимизируют побочные действия, связанные с введением глюкокортикоидов, особенно побочные действия, которые связаны с активацией глюкокортикоидных рецепторов в клетках, не являющихся мишенями.

[010] Рифамицины образуют подкласс семейства антибиотиков ансамицинов со спектром действия против грам-положительных и грам-отрицательных бактерий и являются часто назначаемыми противомикобактериальными препаратами для лечения туберкулеза, болезни Хансена и/или комплекса Mycobacterium avium (MAC). Рифамициновая группа антибиотиков включает “классические” рифамициновые препараты, а также производные рифамицина, такие как рифампицин (или рифампин), рифабутин, рифапентин, рифалазил и рифаксимин. Растущая частота распространения штаммов бактерий, резистентных к антибиотикам (например, метициллин-резистентных *S. aureus* (MRSA), ванкомицин-резистентных *S. aureus* (VRSA)), мультирезистентных *M. tuberculosis*), особенно в нозокомиальных условиях, является актуальной проблемой. Существует

потребность в более эффективных аналогах рифамицинов. Рифамицины являются умеренно-эффективными или мощными индукторами ферментной системы цитохрома P450 (а именно, CYP3A4), что может обусловить пониженную биодоступность и усиленный клиренс некоторых применяемых совместно препаратов, подвергающихся метаболизму посредством ферментной системы цитохрома P450 (а именно, CYP3A4). Такие взаимодействия могут начинаться позднее, однако они сохраняются после одновременного введения рифамицина. Рифампин также может индуцировать эффлюксные белки-транспортеры множественной лекарственной устойчивости P-гликопротеина (P-gp). Существует потребность в новых терапиях, которые уменьшают побочные действия, связанные с применением рифамицинов, особенно побочные действия, которые связаны с активацией ферментной системы цитохрома P450.

[011] Как раскрывается в настоящей заявке, антитела к MSR могут быть средством специфического целенаправленного воздействия терапевтических молекул, таких как агонисты LXR, стероиды и рифамицины, для уменьшения нежелательных побочных действий, связанных с системным введением таких соединений.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[012] Здесь представлены антитела, антиген-связывающие фрагменты антител и их конъюгаты антитело-лекарственное средство, которые связываются с мембранным гликопротеиновым рецептором, известным как MSR1. Эти антитела полезны, *inter alia*, для целенаправленного воздействия на клетки, экспрессирующие MSR1, такие как макрофагальные клетки. Антитела к MSR1 и их антиген-связывающие фрагменты могут применяться либо отдельно в немодифицированной форме, либо в качестве составной части конъюгата антитело-лекарственное средство.

[013] Описанные здесь антитела могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антиген-связывающий фрагмент (например, фрагмент Fab, $F(ab')_2$ или scFv) или могут модифицироваться для изменения функциональности, например, для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

[014] Варианты осуществления описанных здесь антител к MSR1 указаны в Таблицах 4 и 5. В Таблице 4 указаны идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR), вариабельных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных антител к MSR1. В Таблице 5 указаны идентификаторы

нуклеотидных последовательностей HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных антител к MSR1.

[015] Здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, которая выбирается из любых аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в Таблице 4, или по существу аналогичную им последовательность с идентичностью последовательности минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[016] Также здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, которая выбирается из любых аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в Таблице 4, или по существу аналогичную им последовательность с идентичностью последовательности минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[017] Также здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в Таблице 4, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в Таблице 4. Определенные варианты осуществления относятся к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуются в любом из иллюстративных антител к MSR1, указанных в Таблице 4. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбирается из группы, состоящей из: 2/10, 23/42, 50/58; 90/98 и 282/290.

[018] Здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, которая выбирается из любых аминокислотных последовательностей HCDR1, указанных в Таблице 4, или по существу аналогичную им последовательность с идентичностью последовательности минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[019] Также здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, которая выбирается из любых аминокислотных последовательностей HCDR2, указанных в Таблице 4, или по существу

аналогичную им последовательность с идентичностью последовательности минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[020] Здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, которая выбирается из любых аминокислотных последовательностей HCDR3, указанных в Таблице 4, или по существу аналогичную им последовательность с идентичностью последовательности минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[021] Здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, которая выбирается из любых аминокислотных последовательностей LCDR1, указанных в Таблице 4, или по существу аналогичную им последовательность с идентичностью последовательности минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[022] Также здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, которая выбирается из любых аминокислотных последовательностей LCDR2, указанных в Таблице 4, или по существу аналогичную им последовательность с идентичностью последовательности минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[023] Здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, которая выбирается из любых аминокислотных последовательностей LCDR3, указанных в Таблице 4, или по существу аналогичную им последовательность с идентичностью последовательности минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[024] Также здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, указанных в Таблице 4, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, указанных в Таблице 4. Определенные варианты осуществления относятся к антителам или их антиген-связывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуются в любом из иллюстративных антител к MSR1, указанных в Таблице 4. В

некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбирается из группы, состоящей из: 8/16, 40/48, 56/64; 96/104 и 288/296.

[025] Здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие набор из шести CDR (*m.e.*, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных антител к MSR1, указанных в Таблице 4. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбирается из группы, состоящей из: 4-6-8-12-14-16; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 92-94-96-100-102-104 и 284-286-288-292-294-296.

[026] В сходном варианте осуществления здесь представлены антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие набор из шести CDR (*m.e.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR согласно определению для любого из иллюстративных антител к MSR1, указанных в Таблице 4. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с MSR1, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая выбирается из группы, состоящей из: 2/10, 23/42, 50/58, 90/98 и 282/290. Методы и способы выявления CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут применяться для определения CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, которые здесь описаны. Иллюстративные правила, которые можно применять для определения границ CDR, включают, *например*, определение по Кэбату (Kabat), определение по Чотиа (Chothia) и определение AbM. В общем, определение по Кэбату основывается на вариабельности последовательностей, определение по Чотиа основывается на местоположении структурных петлевых областей, а определение AbM представляет собой компромиссное решение между подходами по Кэбату и Чотиа. *См.*, *например*, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol. 273*:927-948 (1997); и Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86*:9268-9272 (1989). Также для определения последовательностей CDR в антителе есть общедоступные базы данных.

[027] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела к MSR1 или их части. Например, здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из аминокислотных последовательностей HCVR, указаных в Таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит

полинуклеотидную последовательность, которая выбирается из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, указанных в Таблице 5, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую идентичность последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[028] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из аминокислотных последовательностей LCVR, указаных в Таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбирается из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, указанных в Таблице 5, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую идентичность последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[029] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из аминокислотных последовательностей HCDR1, указаных в Таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбирается из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR1, указанных в Таблице 5, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую идентичность последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[030] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из аминокислотных последовательностей HCDR2, указаных в Таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбирается из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR2, указанных в Таблице 5, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую идентичность последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[031] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из аминокислотных последовательностей HCDR3, указаных в Таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбирается из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCDR3, указанных в Таблице 5, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую идентичность последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[032] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из аминокислотных последовательностей LCDR1, указаных в Таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную

последовательность, которая выбирается из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR1, указанных в Таблице 5, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую идентичность последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[033] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из аминокислотных последовательностей LCDR2, указаных в Таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбирается из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR2, указанных в Таблице 5, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую идентичность последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[034] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из аминокислотных последовательностей LCDR3, указаных в Таблице 4; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбирается из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCDR3, указанных в Таблице 5, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую идентичность последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[035] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие HCVR, при этом HCVR содержит набор из трех CDR (*m.e.* HCDR1-HCDR2-HCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 соответствует определению для любых из иллюстративных антител к MSR1, указанных в Таблице 4.

[036] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие LCVR, при этом LCVR содержит набор из трех CDR (*m.e.* LCDR1-LCDR2-LCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 соответствует определению любых из иллюстративных антител к MSR1, указанных в Таблице 4.

[037] Также здесь представлены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие и HCVR, и LCVR, при этом HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в Таблице 4 и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в Таблице 4. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, которая выбирается из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, указанных в Таблице 5, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую идентичность последовательностей минимум 90%,

минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%, и полинуклеотидную последовательность, которая выбирается из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, указанных в Таблице 5, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую идентичность последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%. В определенных вариантах осуществления согласно данному аспекту изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом HCVR и LCVR получают от одного и того же антитела к MSR1, указанного в Таблице 4.

[038] Также здесь представлены рекомбинантные векторы экспрессии, способные к экспрессии полипептида, содержащего вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела к MSR1. Например, варианты осуществления включают рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любые из указанных выше молекул нуклеиновых кислот, *m.e.* молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, указанных в Таблице 4. Также в границы объема настоящего изобретения входят клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также методы производства антител или их частей посредством культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих производство антител или фрагментов антител и выделение произведенных таким образом антител или фрагментов антител.

[039] Здесь представлены антитела к MSR1, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления для улучшения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) может быть полезной, например, модификация для удаления нежелательных участков гликозилирования (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В некоторых вариантах осуществления для улучшения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) может быть полезной, например, модификация для получения антитела с отсутствующим компонентом фукозы, присутствующим в олигосахаридной цепи. В других областях применения для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC) может выполняться модификация галактозилирования.

[040] В другом аспекте здесь представлена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с MSR1, и фармацевтически приемлемый носитель. В соответствующем аспекте варианты осуществления относятся к композиции, которая представляет собой комбинацию антитела к MSR1 и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления таким вторым терапевтическим средством является любое средство, которое эффективно комбинируется с антителом к MSR1. Также здесь представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело к MSR1,

конъюгированное с лекарственным препаратом или терапевтическим средством. Иллюстративные комбинированные терапии, комбинированные препараты и ADC, включающие антитела к MSR1, описаны здесь далее.

[041] Также здесь представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, конъюгированные с лекарственным препаратом или терапевтическим средством. Также здесь представлены реактивные линкер-нагрузки, полезные для создания ADC. Также здесь представлены модифицированные антитела к MSR1 и антиген-связывающие фрагменты модифицированных антител к MSR1, полезные для создания ADC.

[042] Также здесь представлены способы лечения, включающие введение антитела к MSR1, антиген-связывающего фрагмента антитела к MSR1 или конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, нуждающемуся в этом субъекту. Данные способы лечения включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело к MSR1, антиген-связывающий фрагмент антитела к MSR1 или конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, к субъекту. Заболеванием, которое лечится таким образом, является любое заболевание или состояние, которое улучшается, нормализуется, ингибируется или предотвращается посредством целенаправленного воздействия на MSR1. В некоторых вариантах осуществления таким заболеванием или состоянием является пролиферативное заболевание, метаболическое нарушение, воспаление, нейродегенеративное заболевание или заболевание, нарушение или состояние, связанное с сигнализацией глюкокортикоидного рецептора. В некоторых вариантах осуществления таким заболеванием или состоянием является атеросклероз. В некоторых вариантах осуществления таким заболеванием, нарушением или состоянием, связанным с сигнализацией глюкокортикоидного рецептора, является воспалительное заболевание, нарушение или состояние. В некоторых из таких вариантов осуществления побочные действия, связанные с введением неконъюгированной стероидной нагрузки указанного соединения, уменьшаются. Также здесь представлены способы лечения, включающие введение антитела к MSR1, антиген-связывающего фрагмента антитела к MSR1 или конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, для лечения и/или профилактики бактериальной инфекции у субъекта.

[043] Здесь представлено использование антитела к MSR1, антиген-связывающего фрагмента антитела к MSR1 или конъюгата антитело-лекарственное средство,

содержащего антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, которые здесь описаны, для лечения любого описанного здесь заболевания, нарушения или состояния.

[044] Также здесь представлены способы лечения, нормализации или улучшения состояния при атеросклерозе, включающие введение антитела к MSR1, антиген-связывающего фрагмента антитела к MSR1 или конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, нуждающемуся в этом субъекту. Данные способы лечения включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело к MSR1, антиген-связывающий фрагмент антитела к MSR1 или конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, к субъекту.

[045] Другие варианты осуществления становятся очевидными после изучения приведенного далее подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАЦИЙ

[046] На **ФИГ. 1** приведена схема для синтеза **P1 и P2B**.

[047] На **ФИГ. 2** приведена схема для синтеза **LP1**.

[048] На **ФИГ. 3** приведена схема для синтеза **LP2**.

[049] На **ФИГ. 4** приведена схема для синтеза **LP5**.

[050] На **ФИГ. 5** приведена схема для синтеза **LP6**.

[051] На **ФИГ. 6** приведена схема для синтеза **LP18**.

[052] На **ФИГ. 7** приведена схема для синтеза **LP4**.

[053] На **ФИГ. 8** приведена схема для синтеза **LP11**.

[054] На **ФИГ. 9** приведена схема для синтеза **LP9**.

[055] На **ФИГ. 10** приведена схема для синтеза **LP12**.

[056] На **ФИГ. 11** приведена схема для синтеза **P3** и **P4**.

[057] На **ФИГ. 12** приведена схема для синтеза **LP3**.

[058] На **ФИГ. 13** приведена схема для синтеза **LP13**.

[059] На **ФИГ. 14** приведена схема для синтеза **LP14**.

[060] На **ФИГ. 15** приведена схема для синтеза **LP15**.

[061] На **ФИГ. 16** приведена схема для синтеза конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC).

[062] **ФИГ. 17** представляет собой линейный график, иллюстрирующий процентную долю дозозависимого эффлюкса холестерина в макрофагах THP-1 для иллюстративного конъюгата антитело к MSR1-LXR, его неконъюгированного аналога, конъюгата изотипический контроль-стероид и соответствующей свободной нагрузки.

[063] На **ФИГ. 18** представлен ряд столбчатых графиков, иллюстрирующих действие иллюстративного конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR и его неконъюгированного аналога на уровни липидов сыворотки крови в модели атеросклероза у мышей.

[064] На **ФИГ. 19** представлен ряд столбчатых графиков, иллюстрирующих действие иллюстративного конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR и его неконъюгированного аналога на липидную площадь поражения и содержание макрофагов (CD68) в модели атеросклероза у мышей.

[065] На **ФИГ. 20** представлен ряд столбчатых графиков, иллюстрирующих действие иллюстративного конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR и его неконъюгированного аналога на уровни триглицеридов и холестерина в печени в модели атеросклероза у мышей.

[066] На **ФИГ. 21** представлен ряд столбчатых графиков, иллюстрирующих действие иллюстративного конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR и его неконъюгированного аналога на *de novo* липогенез в модели атеросклероза у мышей.

[067] На **ФИГ. 22** представлена схема для синтеза будесонид-спейсеров, содержащих реактивные группы, янтарную кислоту (соединение 1c), карбаматные аналоги (1d, 1e), THP-аналоги (1g и 1h), глюкозные аналоги (1i и 1j), фосфатные аналоги (1k и 1l) и коммерческий фосфатный аналог (1m).

[068] На **ФИГ. 23** представлена схема для синтеза нагрузок, соединений и бис-октагидрофенантрен-карбоксамидов **P3B – P9B**.

[069] На **ФИГ. 24** представлена схема для синтеза нагрузок, соединений и бис-октагидрофенантрен-карбоксамидов **P10B – P11B**.

[070] На **ФИГ. 25** представлена схема для синтеза линкеров и линкер-нагрузок **LP1B – LP5B**.

[071] На **ФИГ. 26** представлена схема для синтеза линкеров и линкер-нагрузки **LP6B**.

[072] На **ФИГ. 27** представлена схема для синтеза линкеров и линкер-нагрузки **LP7B**.

[073] На **ФИГ. 28** представлена схема для синтеза линкеров и линкер-нагрузки **LP8B**.

[074] На **ФИГ. 29** представлена схема для синтеза линкеров и линкер-нагрузки **LP9B**.

[075] На **ФИГ. 30** представлена схема для синтеза линкеров и линкер-нагрузок **LP10B** и **LP11B**.

[076] На **ФИГ. 31** представлена схема для синтеза нагрузок **12B**, линкеров и линкер-нагрузки **LP12B**.

[077] На **ФИГ. 32** представлена схема для синтеза циклодекстрин-азида **105a**.

[078] На **ФИГ. 33** представлена схема для синтеза азидо-ПЭГ$_4$-таурина **105b**.

[079] На **ФИГ. 34** представлена схема для синтеза мальтоза-азида **105c**.

[080] На **ФИГ. 35** представлен график результатов анализа подавления роста *S. aureus*, проведенного с аналогами рифамицина.

[081] На **ФИГ. 36** представлен столбчатый график результатов анализа внутриклеточного киллинга *S. aureus*, проведенного с аналогами рифамицина.

[082] На **ФИГ. 37** представлен график результатов анализа внутриклеточного киллинга *S. aureus*, проведенного с аналогами рифамицина.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[083] Перед началом описания настоящего изобретения следует отметить, что данное изобретение не ограничивается описанными конкретными методами и экспериментальными условиями, поскольку такие методы и условия могут различаться. Также следует понимать, что используемая здесь терминология применяется только с целью описания конкретных вариантов осуществления и не имеет ограничивающий характер, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только приложенной формулой изобретения.

[084] Если не приведено иное определение, все используемые здесь технические и научные термины имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. В контексте настоящего документа термин "около" при применении в отношении конкретного указанного численного значения означает, что это значение может отличаться от указанного значения не более, чем на 1%. Например, в контексте настоящего документа выражение "около 100" включает 99 и 101 и все значения между этими числами (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

[085] Хотя на практике или при апробации настоящего изобретения могут применяться любые методы и материалы, похожие на описанные здесь или эквивалентные им, далее описаны предпочтительные методы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в данной спецификации, включаются в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Определения

[086] Выражения "MSR1," "hMSR1" и подобные им в контексте настоящего документа означают паттерн-распознающий рецептор, представляющий собой человеческий однопроходный тримерный трансмембранный гликопротеин типа II, содержащий (i) аминокислотную последовательность, приведенную в NCBI с учетным № NP_002436.1, (ii) аминокислотную последовательность, приведенную в NCBI с учетным № NP_619729.1, и/или (iii) аминокислотную последовательность, приведенную в NCBI с учетным № NP_619730.1, которые представляют различные типы и изоформы скавенджер-рецепторов макрофагов класса A. Выражение "MSR1" включает как мономерные, так и мультимерные молекулы MSR1. В контексте настоящего документа выражение "мономерный человеческий MSR1" означает белок MSR1 или его часть, которые не содержат или не имеют никакие мультимеризирующие домены и которые существуют в нормальных условиях как одиночная молекула MSR1 без прямого физического соединения с другой молекулой MSR1. Иллюстративной мономерной молекулой MSR1 является молекула, которая упоминается здесь как "His-hMSR1", включающая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 393 (см., например, Пример 3 в настоящем документе).

[087] Все упоминания белков, полипептидов и фрагментов белков в настоящем документе предполагают человеческую версию соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если нет прямого указания на то, что они относятся к виду, не являющемуся человеком. Таким образом, выражение "MSR1" означает человеческий MSR1, если нет указания на то, что он не относится к другому виду, например, "MSR1 мыши," "MSR1 обезьяны" и т.д.

[088] В контексте настоящего документа выражение "экспрессируемый клеточной поверхностью MSR1" означает один или более белков MSR1 или его внеклеточный домен, который экспрессируется/которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo* таким образом, что, как минимум, часть белка MSR1 выступает на внеклеточную сторону клеточной мембраны и является доступной для антиген-связывающей части антитела. "Экспрессируемый клеточной поверхностью MSR1" может содержать белок MSR1 или состоять из белка MSR1, экспрессируемого на поверхности

клетки, которая обычно экспрессирует белок MSR1. В качестве варианта "экспрессируемый клеточной поверхностью MSR1" может содержать белок MSR1 или состоять из белка MSR1, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует человеческий MSR1 на своей поверхности, но была искусственным образом модифицирована для экспрессии MSR1 на своей поверхности.

[089] В контексте настоящего документа выражение "антитело к MSR1" включает моновалентные антитела с одинарной специфичностью, а также биспецифические антитела, содержащие первое плечо, которое связывается с MSR1, и второе плечо, которое связывается со вторым антигеном (мишенью), при этом плечо антитела к MSR1 включает любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, которые изложены в Таблице 4 в настоящем документе. Выражение "антитело к MSR1" также включает конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, конъюгированные с лекарственным средством или терапевтическим средством. Выражение "антитело к MSR1" также включает конъюгаты антитело-радионуклид (ARC), содержащие антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, конъюгированные с радионуклидом.

[090] Термин "антитело" в контексте настоящего документа означает любую антиген-связывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащие минимум одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, MSR1). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (которая сокращается здесь как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена, C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (которая сокращается здесь как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Области V_H и V_L можно далее разделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые перемежаются с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, организованных от амино-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR антитела к MSR1 (или его антиген-связывающего фрагмента) могут быть идентичными человеческим последовательностям зародышевого типа или могут быть естественным или искусственным образом модифицированными.

Аминокислотная консенсусная последовательность может определяться на основании параллельного анализа двух или более CDR.

[091] Термин "антитело" в контексте настоящего документа также включает антиген-связывающие фрагменты молекул полноразмерных антител. Термины "антиген-связывающая часть" антитела, "антиген-связывающий фрагмент" антитела и подобные им в контексте настоящего документа включают любой природный, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Антиген-связывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, от молекул полноразмерных антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генной инженерии, включающие манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и изменена химическим образом или с помощью методов молекулярной биологии, например, для организации одного или более вариабельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, изменения, добавления или удаления аминокислот и т.д..

[092] Неограничивающие примеры антиген-связывающих фрагментов включают: (i) Fab фрагменты; (ii) F(ab')2 фрагменты; (iii) Fd фрагменты; (iv) Fv фрагменты; (v) одноцепочечные Fv (scFv) молекулы; (vi) dAb фрагменты; и (vii) минимальные рекогниционные компоненты, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, изолированную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие модифицированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитой CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также охватываются выражением "антиген-связывающий фрагмент" в контексте настоящего документа.

[093] Антиген-связывающий фрагмент антитела обычно содержит минимум один вариабельный домен. Этот вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и обычно содержит минимум одну CDR, которая находится рядом или в каркасе с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антиген-

связывающих фрагментах, имеющих V_H домен, связанный с V_L доменом, V_H и V_L домены могут быть расположены относительно друг друга любым подходящим образом. Например, эта вариабельная область может быть димерной и может содержать V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L димеры. В качестве варианта антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H или V_L домен.

[094] В определенных вариантах осуществления антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать минимум один вариабельный домен, ковалентно связанный минимум с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут находиться в антиген-связывающем фрагменте антитела настоящего изобретения, включают: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любую из указанных выше иллюстративных конфигураций, вариабельные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом или могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может содержать минимум 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислоты, что обуславливает гибкую или полугибкую связь между соседними вариабельными и/или константными доменами в одиночной полипептидной молекуле. Более того, антиген-связывающий фрагмент антитела настоящего изобретения может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любых указанных выше конфигураций вариабельных и константных доменов в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными V_H или V_L доменами (например, дисульфидной связью (дисульфидными связями)).

[095] Как и с молекулами полноразмерных антител, антиген-связывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антиген-связывающий фрагмент антител, как правило, содержит минимум два различных вариабельных домена, при этом каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, включая раскрытые здесь иллюстративные форматы биспецифического антитела, может быть изменен для применения в контексте антиген-связывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием стандартных методов, применяемых в данной области.

[096] Антитела по настоящему изобретению могут функционировать через комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) или антитело-зависимую клеточно-опосредованную

цитотоксичность (ADCC). "Комплемент-зависимая цитотоксичность" (CDC) означает лизис антиген-экспрессирующих клеток антителом по изобретению в присутствии комплемента. "Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" (ADCC) означает клеточно-опосредованную реакцию, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcRs) (например, естественные киллеры (NK-клетки), нейтрофилы и макрофаги), опознают связанное антитело на клетке-мишени, что приводит к лизису клетки-мишени. CDC и ADCC можно измерить посредством методов анализа, которые хорошо известны и доступны в данной области. (См., например, Патенты США № 5,500,362 и 5,821,337 и Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) *95*:652-656). Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, желательно ли для антитела опосредование цитотоксичности.

[097] В определенных вариантах осуществления описанные здесь антитела к MSR1 являются человеческими антителами. Предполагается, что термин "человеческое антитело" в контексте настоящего документа включает антитела, имеющие вариабельные и константные области, полученные от последовательностей зародышевого типа человеческого иммуноглобулина. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодированные последовательностями зародышевого типа человеческого иммуноглобулина (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* либо соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Тем не менее, предполагается, что термин "человеческое антитело" в контексте настоящего документа не включает антитела, в которых CDR последовательности, полученные от зародышевой линии другого вида млекопитающих, например, мыши, были привиты к человеческим каркасным последовательностям.

[098] Описанные здесь антитела в некоторых вариантах осуществления могут быть рекомбинантными человеческими антителами. Предполагается, что термин "рекомбинантное человеческое антитело" в контексте настоящего документа включает все человеческие антитела, которые приготавливаются, экспрессируются, создаются или выделяются рекомбинантными способами, например, антитела, экспрессированные при помощи рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (что описывается далее), антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител (что описывается далее), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, приготовленые, экспрессированные, созданные или выделенные любыми

другими средствами, что включает сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют вариабельные и константные области, полученные от последовательностей зародышевого типа человеческого иммуноглобулина. Тем не менее, в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, если используется животное, трансгенное для последовательностей человеческого Ig, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H и V_L областей рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, при том, что они получены от V_H и V_L последовательностей зародышевого типа человека, не могут естественным образом существовать в зародышевом наборе человеческого антитела *in vivo*.

[099] Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые ассоциируются с гетерогенностью шарнирной области. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильный четырехцепьевой конструкт приблизительно 150-160 кДа, в котором димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью тяжелой цепи. Во второй форме димеры не соединяются посредством межцепочечных дисульфидных связей, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно соединенных легкой и тяжелой цепи (полуантитело). Эти формы было чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

[0100] Частота существования второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, помимо прочего, структурными различиями, связанными с изотипом антитела шарнирной области. Единичная аминокислотная замена в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительным образом снизить частоту существования второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнирного участка человеческого IgG1. Описанные здесь варианты осуществления охватывают антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирном участке, C_H2 или C_H3 области, которые могут быть желательными, например, в производстве для улучшения выхода желаемой формы антитела.

[0101] Описанными здесь антителами могут быть выделенные антитела. "Выделенное антитело" в контексте настоящего документа означает антитело, которое было определено и отделено и/или восстановлено минимум из одного компонента своей естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено минимум из одного компонента организма или из ткани или клетки, в котором антитело естественным образом существует или естественным образом производится, является "выделенным антителом" для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела -

антитела, которые были подвергнуты минимум одному этапу очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления, в выделенном антителе могут, главным образом, отсутствовать другой клеточный материал и/или химические вещества.

[0102] Описываемые здесь антитела к MSR1 могут включать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной и/или CDR областях вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевого типа, от которых эти антитела были получены. Такие мутации могут быть легко установлены посредством сравнения описываемых здесь аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевого типа, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Варианты осуществления включают антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые получают от любой из описанных здесь аминокислотных последовательностей, при этом одна или более аминокислот в одной или нескольких каркасной и/или CDR областях мутируют в соответствующий остаток (остатки) последовательности зародышевого типа, от которой было получено антитело, или в соответствующий остаток (остатки) другой человеческой последовательности зародышевого типа, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательностей называются здесь в совокупности "герминативные мутации"). Специалист в данной области, начиная с описанных здесь последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепи, может легко получать множество антител и антиген-связывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько индивидуальных герминативных мутаций или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все из каркасных и/или CDR остатков в V_H и/или V_L доменах мутируют обратно в остатки, обнаруживаемые в первоначальной последовательности зародышевого типа, от которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно в первоначальную последовательность зародышевого типа, например, только мутированные остатки, обнаруживаемые в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруживаемые в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков мутируют в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевого типа (т.е. последовательности зародышевого типа, которая отличается от последовательности зародышевого типа, от которой антитело было получено изначально). Более того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более герминативных мутаций в каркасной и/или CDR областях, например, при этом определенные индивидуальные остатки мутируют в

соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевого типа, при этом определенные другие остатки, которые отличаются от первоначальной последовательности зародышевого типа, сохраняются или мутируют в соответствующий остаток другой последовательности зародышевого типа. После получения антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые содержат одну или более герминативных мутаций, можно легко проверить на наличие одного или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антиген-связывающие фрагменты, полученные таким общим образом, входят в описываемые здесь варианты осуществления.

[0103] Варианты осуществления также включают антитела к MSR1, содержащие варианты любой из HCVR, LCVR и/или CDR аминокислотных последовательностей, описанных здесь, имеющих одну или более консервативных замен. Например, варианты осуществления включают антитела к MSR1, имеющие HCVR, LCVR и/или CDR аминокислотные последовательности с, например , 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из HCVR, LCVR и/или CDR аминокислотных последовательностей, указанных в Таблице 4 настоящего документа.

[0104] Термин "эпитоп" означает антигенную детерминанту, которая взаимодействует со специфическим антиген-связывающим участком в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с разными областями на антигене и могут иметь разные биологические действия. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп производится пространственно рядом расположенными аминокислотами из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп производится рядом расположенными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[0105] Термин "существенная идентичность" или "существенно идентичный" в отношении нуклеиновой кислоты или ее фрагмента означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью) имеется идентичность нуклеотидных последовательностей минимум в около 95% и предпочтительнее минимум в около 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, по результатам измерений с

использованием любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, например, FASTA, BLAST или GAP, что описывается далее. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность эталонной молекуле нуклеиновой кислоты, может, в определенных случаях, кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность, как полипептид, кодированный эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

[0106] При применении к полипептидам термин "существенная аналогичность" или "по существу аналогичный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафа за делецию по умолчанию, имеют идентичность последовательностей минимум в 95%, предпочтительнее идентичность последовательностей минимум в 98% или 99%. Предпочтительно позиции остатков, которые не являются идентичными, различаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" - замена, при которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с похожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена значительным образом не изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, идентичность последовательностей в процентах или степень схожести можно откорректировать в сторону увеличения для компенсации консервативного характера замены. Средства для такой коррекции хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с похожими химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве варианта консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-1445. "Умеренно консервативная" замена - любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0107] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, обычно измеряется при помощи программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет схожие последовательности при помощи мер сходства, приписываемых различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологичности последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG Версия 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать при помощи FASTA с использованием параметров по умолчанию или рекомендуемых параметров, программы в GCG, Версия 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и идентичность последовательностей в процентах областей с наилучшим перекрытием между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000) выше). Другой предпочтительный алгоритм при сравнении последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей от различных организмов - компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, использующая параметры по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 и Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

[0108] При использовании в отношении описанных здесь соединений следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Если не приведено иное определение, все используемые здесь технические и научные термины имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области. Если имеется множество определений для приведенного здесь термина, данные определения должны иметь преимущественное значение, если не указано иное.

[0109] Единственное число в контексте настоящего документа также может предполагать множественное число, если контекст явно не указывает на иное.

[0110] В контексте настоящего документа "алкил" означает моновалентный и насыщенный углеводородный радикал. Алкил является необязательно замещенным и может быть линейным, разветвленным или циклическим, т.е. циклоалкилом. Алкил включает, помимо прочего, радикалы, имеющие 1-20 атомов углерода, т.е. C_{1-20} алкил; 1-12 атомов углерода, т.е. C_{1-12} алкил; 1-8 атомов углерода, т.е. C_{1-8} алкил; 1-6 атомов углерода, т.е. C_{1-6} алкил, и 1-3 атомов углерода, т.е. C_{1-3} алкил. Примеры алкилов включают, помимо прочего, метил, этил, n-пропил, i-пропил, n-бутил, s-бутил, t-бутил, i-

бутил, пентил, гексил, циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил. Пентил включает, помимо прочего, n-пентил и i-пентил. Гексил включает, помимо прочего, n-гексил.

[0111] В контексте настоящего документа "алкилен" означает двухвалентную алкильную группу. Если не указано иное, алкилен включает, помимо прочего, 1-20 атомов углерода. Алкиленовая группа является необязательно замещенной, согласно приведенному здесь описанию для алкила. В некоторых вариантах осуществления алкилен является незамещенным. В некоторых вариантах осуществления алкилен является двухвалентной разветвленной алкильной группой.

[0112] Термин “амино” означает $–NH_2$.

[0113] Термин “алкиламино,” в контексте настоящего документа и если не указано иное, означает группу –NHR′, где R′ является C_{1-10}алкилом, согласно приведенному здесь определению. В некоторых или любых вариантах осуществления алкиламино представляет собой C_{1-6}алкиламино.

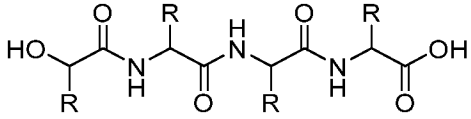
[0114] Термин “диалкиламино,” в контексте настоящего документа и если не указано иное, означает группу –NR′R′, где в каждом случае R′ независимо является C_{1-10}алкилом, согласно приведенному здесь определению. В некоторых или любых вариантах осуществления диалкиламино - ди-C_{1-6}алкиламино.

[0115] Термин “аминоалкил,”в контексте настоящего документа и если не указано иное, означает алкильную группу, согласно приведенному здесь определению, которая замещена одной или более амино группами. В некоторых или любых вариантах осуществления аминоалкилом является алкильная группа, замещенная одной группой $–NH_2$ (например, $–R′(NH_2)$, где R′ - это -C_{1-10}алкил, согласно приведенному здесь определению). В некоторых или любых вариантах осуществления аминоалкилом является алкильная группа, замещенная двумя группами $–NH_2$. В некоторых вариантах осуществления “аминоалкил” - это аминоC_{1-6}алкил.

[0116] “Алкиламиноалкил,” согласно приведенному здесь определению и если не указано иное, означает алкильную группу, согласно приведенному здесь определению, которая замещена одной или несколькими алкиламино группами, согласно приведенному здесь определению. В некоторых вариантах осуществления “алкиламиноалкил” - это C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый алкил в алкиламиноалкиле выбирается независимо.

[0117] “Диалкиламиноалкил”, в контексте настоящего документа или если не указано иное, означает алкильную группу, согласно приведенному здесь определению, которая

замещена одной или несколькими диалкиламино группами, согласно приведенному здесь определению. В некоторых вариантах осуществления “диалкиламиноалкил” - это ди-C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил. В некоторых вариантах осуществления каждый алкил в диалкиламиноалкиле выбирается независимо.

[0118] В контексте настоящего документа термин “O-аминокислота” или “HO-аминокислота” обозначает аминокислоту, в которой нативная амино группа на N-конце аминокислоты или аминокислотная последовательность была замещена кислородной или гидроксильной группой, соответственно. Например, предполагается, что “O-AAAA” или “HO-AAAA” обозначает аминокислотную последовательность (AAAA), в которой нативная амино группа на N-конце была замещена кислородной или гидроксильной группой, соответственно (например,  , где в каждом случае R - боковая цепь аминокислоты). Аналогичным образом, термины “O-аминокислотный остаток” или “HO-аминокислотный остаток” означают химическое вещество в соединении, которое остается после химической реакции. Например, “O-аминокислотный остаток” или “HO-аминокислотный остаток” означает продукт связывания амида или связывания пептида O-аминокислоты или HO-аминокислоты с подходящим партнером по связыванию; при этом, например, молекула воды удаляется после связывания амида или пептида O-аминокислоты или HO-аминокислоты, в результате чего образуется продукт, имеющий O-аминокислотный остаток или HO-аминокислотный остаток, включенный в него.

[0119] Предполагается, что обозначение аминокислоты или аминокислотного остатка без указания их стереохимии охватывает L-форму аминокислоты, D-форму аминокислоты или их рацемическую смесь.

[0120] В контексте настоящего документа "галоалкил" означает алкил, согласно приведенному здесь определению, при этом алкил включает минимум одного заместителя, который выбирается из галогена, например, фтора (F), хлора (Cl), брома (Br) или йода (I). Примеры галоалкила включают, помимо прочего, $-CF_3$, $-CH_2CF_3$, $–CCl_2F$ и $–CCl_3$.

[0121] В контексте настоящего документа "алкенил" означает моновалентный углеводородный радикальный компонент, содержащий минимум два атома углерода и одну или более неароматических углерод-углеродных двойных связей. Алкенил является необязательно замещенным и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкенил включает, помимо прочего, радикалы, имеющие 2-20 атомов углерода, т.е. , C_{2-20} алкенил; 2-12 атомов углерода, т.е. C_{2-12} алкенил; 2-8 атомов углерода, т.е. C_{2-8} алкенил;

2-6 атомов углерода, т.е. C_{2-6} алкенил; и 2-4 атома углерода, т.е. C_{2-4} алкенил. Примеры алкенилов включают, помимо прочего, винил, пропенил, бутенил и циклогексенил.

[0122] В контексте настоящего документа "алкинил" означает моновалентный углеводородный радикал, содержащий минимум два атома углерода и одну или более углерод-углеродных тройных связей. Алкинил является необязательно замещенным и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкинил включает, помимо прочего, радикалы, имеющие 2-20 атомов углерода, т.е. C_{2-20} алкинил; 2-12 атомов углерода, т.е. C2-12 алкинил; 2-8 атомов углерода, т.е. C_{2-8} алкинил; 2-6 атомов углерода, т.е. C_{2-6} алкинил; и 2-4 атома углерода, т.е. C_{2-4} алкинил. Примеры алкинила включают, помимо прочего, этинил, пропинил и бутинил.

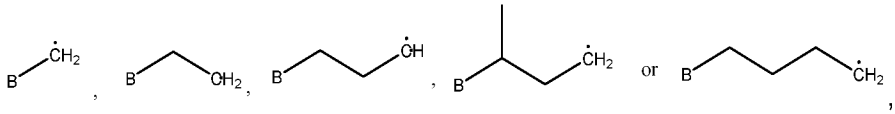
[0123] В контексте настоящего документа "алкокси" означает моновалентный и насыщенный углеводородный радикал, при этом углеводород включает одинарную связь с атомом кислорода и при этом радикал локализуется на атоме кислорода, например, CH_3CH_2-O· для этокси. Алкокси заместители связываются с соединением, которое они замещают, через данный атом кислорода алкокси заместителя. Алкокси является необязательно замещенным и может быть линейным, разветвленным или циклическим, т.е. циклоалкокси. Алкокси включает, помимо прочего, алкокси, имеющие 1-20 атомов углерода, т.е. C_{1-20} алкокси; 1-12 атомов углерода, т.е. C_{1-12} алкокси; 1-8 атомов углерода, т.е. C_{1-8} алкокси; 1-6 атомов углерода, т.е. C_{1-6} алкокси, и 1-3 атомов углерода, т.е. C_{1-3} алкокси. Примеры алкокси включают, помимо прочего, метокси, этокси, n-пропокси, i-пропокси, n-бутокси, s-бутокси, t--бутокси, i-бутокси, пентокси, гексокси, циклопропокси, циклобутокси, циклопентокси и циклогексокси.

[0124] В контексте настоящего документа "галоалкокси" означает алкокси, согласно приведенному определению, при этом алкокси включает минимум один заместитель, который выбирается из галогена, например, F, Cl, Br или I.

[0125] В контексте настоящего документа "арил" означает моновалентный радикал ароматического соединения, в котором кольцевыми атомами являются атомы углерода. Арил является необязательно замещенным и может быть моноциклическим или полициклическим, например, бициклическим или трициклическим. Примеры арильных компонентов включают, помимо прочего, компоненты, имеющие от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-20} арил; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-15} арил, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-10} арил. Примеры арилов включают, помимо прочего, фенил, нафтил, флуоренил, азуленил, антрил, фенантрил и пиренил.

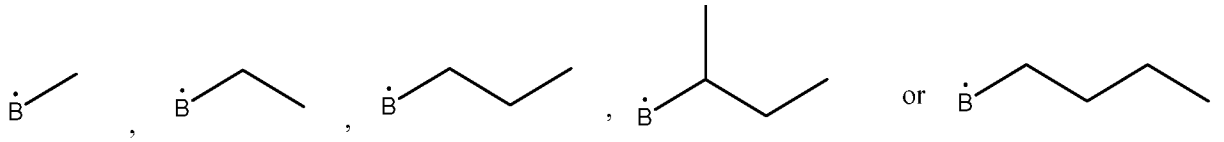
[0126] В контексте настоящего документа "арилалкил" означает одновалентный радикал алкильного соединения, при этом алкильное соединение замещено ароматическим

заместителем, т.е. ароматическое соединение включает одинарную связь с алкильной группой и при этом радикал локализуется на алкильной группе. Арилалкильная группа связывается с иллюстрируемой химической структурой посредством алкильной группы. Арилалкил может быть представлен этой структурой, например,

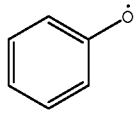


, при этом B - ароматический фрагмент, например, фенил. Арилалкил является необязательно замещенным, т.е. арильная группа и/или алкильная группа может быть замещена так, как описано здесь. Примеры арилалкила включают, помимо прочего, бензил.

[0127] В контексте настоящего документа "алкиларил" означает одновалентный компонент, являющийся радикалом арильного соединения, при этом арильное соединение замещено алкильным заместителем, т.е. арильное соединение включает одинарную связь с алкильной группой и при этом радикал локализуется на арильной группе. Алкиларильная группа связывается с иллюстрируемой химической структурой посредством арильной группы. Алкиларил может быть представлен этой структурой, например,

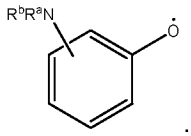


при этом B - ароматический фрагмент, например, фенил. Алкиларил является необязательно замещенным, т.е. арильная группа и/или алкильная группа может быть замещена так, как описано здесь. Примеры алкиларила включают, помимо прочего, толуил.

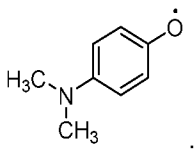
[0128] В контексте настоящего документа "арилокси" означает одновалентный компонент, являющийся радикалом ароматического соединения, при этом кольцевыми атомами являются атомы углерода и при этом кольцо замещено кислородсодержащим радикалом, т.е. ароматическое соединение включает одинарную связь с атомом кислорода и при этом радикал локализуется на атоме кислорода, например, 

для феноксi. Арилокси заместители связываются с соединением, которое они замещают, через данный атом кислорода. Арилокси является необязательно замещенным. Арилокси включает, помимо прочего, радикалы, имеющие от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-20} арилокси; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-15} арилокси, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-10} арилокси. Примеры арилокси включают, помимо прочего, феноксi, нафтокси и антрокси.

[0129] В контексте настоящего документа "R^aR^bN-арилокси" означает одновалентный компонент, являющийся радикалом ароматического соединения, при этом кольцевыми атомами являются атомы углерода и при этом кольцо замещено минимум одним R^aR^bN – заместителем и минимум одним кислородсодержащим радикалом, т.е. ароматическое соединение включает одинарную связь с R^aR^bN-заместителем и одинарную связь с атомом кислорода и при этом радикал локализуется на атоме кислорода, например,



. R^aR^bN -арилокси заместители связываются с соединением, которое они замещают, через данный атом кислорода. R^aR^bN -арилокси является необязательно замещенным. R^aR^bN -арилокси включает, помимо прочего, компоненты, имеющие от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, например, C_{6-20} (R^aR^bN)n-арилокси, от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, например, C_{6-15} (R^aR^bN)n-арилокси, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, например, C_{6-10} (R^aR^bN)n-арилокси, при этом n представляет число R^aR^bN – заместителей. Пример R^aR^bN -арилокси включает, помимо прочего, 4-(диметиламино)-фенокси,



.

[0130] В контексте настоящего документа "арилен" означает двухвалентный компонент ароматического соединения, в котором кольцевыми атомами являются только атомы углерода. Арилен является необязательно замещенным и может быть моноциклическим или полициклическим, например, бициклическим или трициклическим. Примеры арилена включают, помимо прочего, компоненты, имеющие от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-20} арилен; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-15} арилен, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-10} арилен.

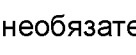
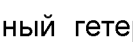
[0131] В контексте настоящего документа "гетероалкил" означает алкил, в котором один или более атомов углерода замещаются гетероатомами. В контексте настоящего документа "гетероалкенил" означает алкенил, в котором один или более атомов углерода замещаются гетероатомами. В контексте настоящего документа "гетероалкинил" означает алкинил, в котором один или более атомов углерода замещаются гетероатомами. Подходящие гетероатомы включают, помимо прочего, атомы азота, кислорода и серы. Гетероалкил является необязательно замещенным. Примеры гетероалкила включают, помимо прочего, аминоалкил, сульфонилалкил и сульфинилалкил. Примеры гетероалкила также включают, помимо прочего, метиламино, метилсульфонил и метилсульфинил.

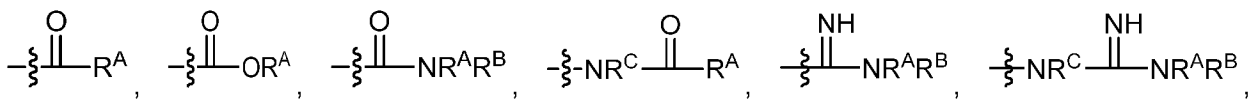
[0132] В контексте настоящего документа "гетероарил" означает одновалентный компонент, являющийся радикалом ароматического соединения, при этом кольцевые атомы содержат атомы углерода и минимум один атом кислорода, серы, азота или фосфора. Примеры гетероарильных компонентов включают, помимо прочего, компоненты, имеющие от 5 до 20 кольцевых атомов; от 5 до 15 кольцевых атомов; и от 5 до 10 кольцевых атомов. Гетероарил является необязательно замещенным.

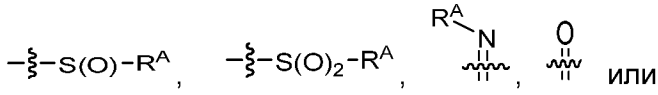
[0133] В контексте настоящего документа "гетероарилен" означает арилен, в котором один или более кольцевых атомов ароматического кольца замещаются атомом кислорода, серы, азота или фосфора. Гетероарилен является необязательно замещенным.

[0134] В контексте настоящего документа "гетероциклоалкил" означает циклоалкил, в котором один или более атомов углерода замещаются гетероатомами. Подходящие гетероатомы включают, помимо прочего, атомы азота, кислорода и серы. Гетероциклоалкил является необязательно замещенным. Примеры гетероциклоалкила включают, помимо прочего, морфолинил, пиперидинил, тетрагидропиранил, пирролидинил, имидазолидинил, оксазолидинил, тиазолидинил, диоксоланил, дитиоланил, оксанил или тианил.

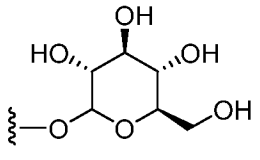
[0135] В контексте настоящего документа "N-содержащий гетероциклоалкил" означает циклоалкил, в котором один или более атомов углерода замещаются гетероатомами и при этом минимум один гетероатом является атомом азота. Подходящие гетероатомы, кроме азота, включают, помимо прочего, атомы кислорода и серы. N-содержащий гетероциклоалкил является необязательно замещенным. Примеры N-содержащего гетероциклоалкила включают, помимо прочего, морфолинил, пиперидинил, пирролидинил, имидазолидинил, оксазолидинил или тиазолидинил.

[0136] В конце настоящего документа термин "необязательно замещенный" при использовании для описания радикала, например, необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного гетероарила, необязательно замещенного арилена и необязательно замещенного гетероарилена, означает, что такой компонент необязательно связан с одним или более заместителями. Примеры таких заместителей включают, помимо прочего, гало, циано, нитро, необязательно замещенный галоалкил, азидо, эпокси, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклоалкил,  ,  ,  ,



 , при этом R^A, R^B и R^C являются независимо в каждом случае атомом водорода, алкилом, алкенилом, алкинилом, арилом, алкиларилом, арилалкилом, гетероалкилом, гетероарилом или гетероциклоалкилом, или R^A и R^B вместе с атомами, с которыми они связываются, образуют насыщенное или ненасыщенное карбоциклическое кольцо, при этом данное кольцо является необязательно замещенным и при этом один или более кольцевых атомов необязательно замещаются гетероатомом. В определенных вариантах осуществления, когда радикал необязательно замещен необязательно замещенным гетероарилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом или необязательно замещенным насыщенным или ненасыщенным карбоциклическим кольцом, заместители на необязательно замещенном гетероариле, необязательно замещенном гетероциклоалкиле или необязательно замещенном насыщенном или ненасыщенном карбоциклическом кольце, если они замещаются, не замещаются заместителями, которые далее необязательно замещаются дополнительными заместителями. В некоторых вариантах осуществления, когда описанная здесь группа необязательно замещена, заместитель, связанный с группой, является незамещенным, если не указано иное.

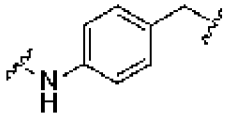
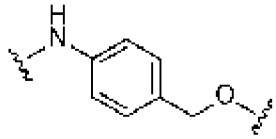
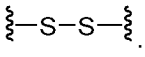
[0137] В контексте настоящего документа “O-глюкоза” означает одновалентный компонент, присоединенный через экзоциклический атом кислорода глюкозы.

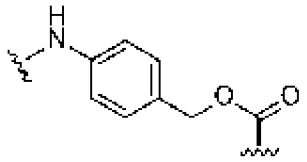
Подходящие компоненты O-глюкозы включают, помимо прочего,  , и подобные .

[0138] В контексте настоящего документа “O-ПЭГ$_n$” означает одновалентный компонент, где **n** это число от 1 до 100. Например, когда **n** равен 1, тогда O-ПЭГ**n** это –O–CH_2CH_2OH; когда **n** равен 2, тогда O-ПЭГ**n** это –O–CH_2CH_2O–CH_2CH_2OH; и когда **n** равно 3, тогда O-ПЭГ**n** это –O–CH_2CH_2O–CH_2CH_2O–CH_2CH_2OH.

[0139] В контексте настоящего документа "связующий агент" означает любую молекулу, например, белок или антитело, способные связываться со специфичностью с определенным партнером по связыванию, например, антигеном.

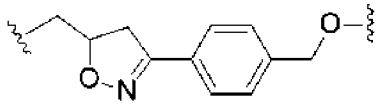
[0140] В контексте настоящего документа "линкер" означает двухвалентный, трехвалентный или мультивалентный компонент, который ковалентно соединяет связующего агента с одним или более соединениями, описанными здесь, например, соединениями-нагрузками и/или гидрофильной группой, согласно приведенному здесь описанию.

[0141] В контексте настоящего документа “коннекторная группа” или “остаток коннекторной группы” означает любую группу, которая может способствовать высвобождению нагрузки. Подходящие коннекторные группы способствуют высвобождению двухвалентных или мультивалентных присоединенных нагрузок обратно к первоначальным неконъюгированным формам с небольшой дериватизацией или без нее. Примеры коннекторных групп включают, помимо прочего  ,  или их производные. В другом примере коннекторной группой является  .

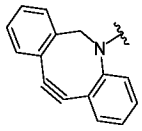
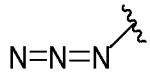
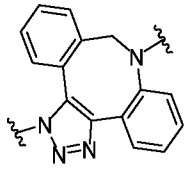
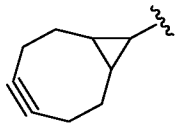
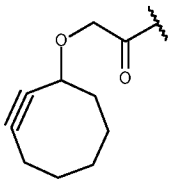
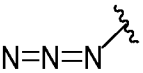
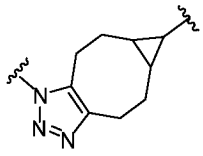
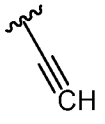
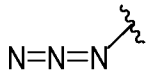
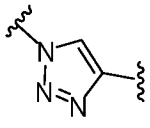
[0142] В других примерах коннекторной группой является саморасщепляющаяся группа. “Саморасщепляющаяся группа” означает любую такую группу, известную специалисту в данной области. В конкретных вариантах осуществления саморасщепляющейся группой является *p*-аминобензилоксикарбонил (PAB/PABC), т.е.  . Специалистам в данной области известно, что саморасщепляющаяся группа способна вступать в химическую реакцию, при которой высвобождаются оставшиеся атомы линкера из нагрузки.

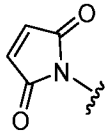
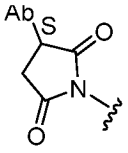
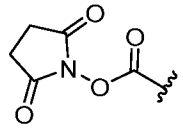
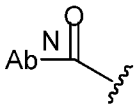
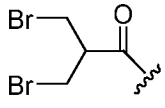
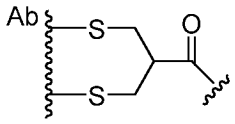
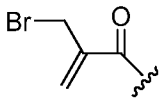
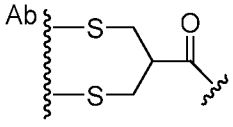
[0143] В контексте настоящего документа “соединительный линкер” (**L^2**) или “соединительные линкеры” означают двухвалентные группы, которые являются расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры - линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, расщепления посредством реакции гидролиза, восстановления или ферментативной реакции. Нерасщепляемые линкеры - линкеры, которые высвобождают присоединенную нагрузку посредством лизосомной деградации антитела после интернализации. Подходящие соединительные линкеры включают, помимо прочего, кислотолабильные линкеры, гидролизлабильные линкеры, расщепляемые под воздействием ферментов линкеры, редукционно-лабильные линкеры и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры также включают, помимо прочего, линкеры, которые представляют собой или содержат глюкурониды, сукцинимид-тиоэфиры, полиэтиленгликольные (ПЭГ) единицы, гидразоны, мал-капроильные единицы,

дисульфидные единицы (например, –S–S–, –S–C($R^{1b}R^{2b}$)–, при этом R^{1b} и R^{2b} независимо являются водородом или гидрокарбилом), карбаматные единицы, пара-амино-бензильные единицы (PAB), фосфатные единицы, например, моно-, бис- или трис-фосфатные единицы и пептидные единицы, например, пептидные единицы, содержащие два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более аминокислотных остатков, включая, помимо прочего, единицы валин–цитруллинового остатка. В контексте настоящего документа “капроил” означает -$(CH_2)_5$-C(O)- группу.

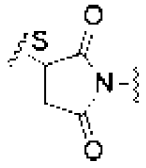
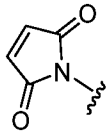
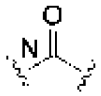
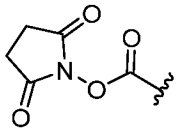
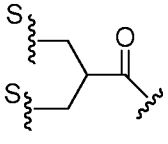
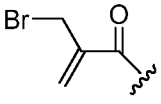
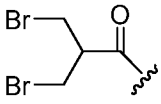
[0144] В контексте настоящего документа “реактивная группа” (“**RG**”) означает функциональную группу или компонент, который вступает в реакцию с реактивной частью антитела, модифицированного антитела или его антиген-связывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления “реактивная группа” - это функциональная группа или компонент (например, малеимид или NHS-эфир), которые вступают в реакцию с цистеиновым или лизиновым остатком антитела или его антиген-связывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления “реактивная группа” - это функциональная группа или компонент, который способен вступать в реакцию клик-химии. В некоторых вариантах осуществления указанной реакции клик-химии реактивная группа содержит алкин, который способен вступать в реакцию 1,3 циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реактивные группы включают, помимо прочего, напряженные алкины, например, подходящие для промотируемых напряжением алкин-азидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкины, например, циклооктины, бензаннелированные алкины и алкины, способные вступать в реакции 1,3 циклоприсоединения с азидами в отсутствие катализаторов на основе меди. Подходящие алкины также включают, помимо прочего, DIBAC (где -C(O)CH_2CH_2C(O)- часть компонента DIBAC может быть представлена **L** и/или $\mathbf{L^2}$), DIBO (где -O- часть компонента DIBO может быть представлена **L** и/или $\mathbf{L^2}$), BARAC (где  часть компонента BARAC может быть представлена **L** и/или $\mathbf{L^2}$), DIFO (где -O- часть может быть представлена **L** и/или $\mathbf{L^2}$), замещенные алкины, например, фторированные алкины, аза–циклоалкины, BCN и их производные. Линкер-нагрузки, содержащие такие реактивные группы, полезны для конъюгирования антител, которые были функционализованы с азидо группами. Такие функционализованные антитела включают антитела, функционализованные с азидо–полиэтиленгликольными группами. В определенных вариантах осуществления такое функционализованное антитело получают посредством реакции антитела, содержащего минимум один глутаминовый остаток, например, тяжелую цепь Q295 (нумерация EU), с соединением согласно формуле H_2N–LL–N_3, где LL

это двухвалентная полиэтиленгликольная группа, в присутствии фермента трансглутаминазы.

[0145] В некоторых вариантах осуществления такой реактивной группой (**RG**) является алкин, например,  , который может вступать в реакцию посредством клик-химии с азидом, например,  , в результате чего образуется продукт клик-химии, например,  , его региоизомер или их смесь. В некоторых вариантах осуществления такой реактивной группой является алкин, например,  или  (где **L** и/или **L**^{2} охватывает -OCH2C(O)-), который может вступать в реакцию посредством клик-химии с азидом, например ,  в результате чего образуется продукт клик-химии, например,  . В некоторых вариантах осуществления такой реактивной группой является алкин, например ,  , который может вступать в реакцию посредством клик-химии с азидом, например ,  , в результате чего образуется продукт клик-химии, например,  , его региоизомер или их смесь. В некоторых вариантах осуществления такой реактивной группой является функциональная группа, например,


, которая вступает в реакцию с цистеиновым остатком на антителе или его антиген-связывающем фрагменте, в результате чего образуется соответствующая связь, например,  , при этом Ab означает антитело или его антиген-связывающий фрагмент, а S означает S-атом на цистеиновом остатке, через который данная функциональная группа связывается с Ab. В некоторых вариантах осуществления такой реактивной группой является функциональная группа, например,  , которая вступает в реакцию с лизиновым остатком на антителе или его антиген-связывающем фрагменте, в результате чего образуется соответствующая связь, например,  , при этом Ab означает антитело или его антиген-связывающий фрагмент, а N означает N-атом, например, на лизиновом или остатке N-конца, через который данная функциональная группа связывается с Ab. В некоторых случаях реактивной группой является та  , которая вступает в реакцию с двумя тиолами (например, тиолами на двух разных цепях) антитела или его антиген-связывающего фрагмента, в результате чего образуется соответствующая связь, например,  . В некоторых случаях реактивной группой является та  , которая вступает в реакцию с двумя тиолами (например, тиолами на двух разных цепях) антитела или его антиген-связывающего фрагмента, в результате чего образуется соответствующая связь, например,  .

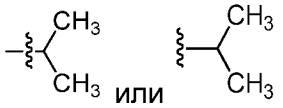
[0146] В контексте настоящего документа фраза “остаток реактивной группы” означает продукт реакции функциональной группы в линкере с реактивной частью связующего агента (**BA**), включая продукт клик-химии. Остаток реактивной группы образуется

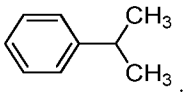
посредством реакции реактивной группы на аминокислоте связующего агента и присоединяется к связующему агенту (например, антителу) и к линкеру. В некоторых вариантах осуществления остатком реактивной группы является группа, которая содержит 1,2,3-тетразол, т.е. образуется посредством реакции алкина с азидом. В некоторых вариантах осуществления остатком реактивной группы является  (a), в котором S означает S-атом на цистеиновом остатке, через который (a) связывается с Ab, и который образуется посредством реакции  с цистеиновым остатком на антителе или его антиген-связывающем фрагменте. В некоторых вариантах осуществления остатком реактивной группы является  , в котором N означает N-атом на лизиновом остатке и который образуется посредством реакции функциональной группы, например,  , с лизиновым остатком на антителе или на его антиген-связывающем фрагменте. Специалистам в данной области известно, что части остатка реактивной группы могут быть получены от реактивной группы, от антитела, или от них обоих. В некоторых случаях остатком реактивной группы является  , в котором S означает S-атом на цистеиновом остатке и который образуется посредством реакции функциональной группы  или  с цистеиновым остатком на антителе или на его антиген-связывающем фрагменте.

[0147] В контексте настоящего документа “фармацевтически приемлемая соль” означает любую соль, подходящую для введения пациенту. Подходящие соли включают, помимо прочего, соли, описанные в работе Berge *et al*., "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci*., 1977, 66:1, которая включается в настоящий документ посредством ссылки. Примеры солей включают, помимо прочего, соли, полученные от кислот, полученные от оснований, органические, неорганические, аминные соли и соли щелочных или щелочно-земельных

металлов, включая, помимо прочего, кальциевые соли, магниевые соли, калиевые соли, натриевые соли, соли соляной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, азотной кислоты, фосфорной кислоты, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, гликолиевой кислоты, пировиноградной кислоты, щавелевой кислоты, малеиновой кислоты, малоновой кислоты, янтарной кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, лимонной кислоты, бензойной кислоты, фенилакриловой кислоты, миндальной кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, р–толуолсульфоновой кислоты, салициловой кислоты и подобные. В некоторых примерах описанная здесь нагрузка (например, описанный здесь аналог рифамицина) содержит третичный амин, при этом атом азота в третичном амине является атомом, через который нагрузка связывается с линкером или линкер-спейсером. В таких случаях связь с третичным амином нагрузки дает четвертичный амин в молекуле линкер-нагрузки. Положительный заряд на четвертичном амине может быть сбалансирован противоионом (например, хлоро, бромо, йодо или любым другим компонентом с подходящим зарядом, например, описанным выше).

[0148] Определенные группы, компоненты, заместители и атомы изображаются с волнистой линией. Волнистая линия может пересекать или покрывать связь или связи. Волнистая линия обозначает атом, через который связываются группы, компоненты, заместители или атомы. Например, фенильная группа, которая замещена пропильной группой, изображается следующим образом:



имеет следующую структуру: 

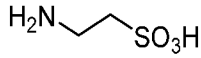
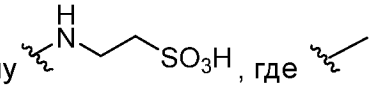
.

[0149] В контексте настоящего документа "условия синтеза амида" означает реакционные условия, подходящие для осуществления образования амида, например, посредством реакции карбоновой кислоты, активированной карбоновой кислоты или ацилгалогенида с амином. В некоторых примерах условия синтеза амида означают реакционные условия, подходящие для образования амидной связи между карбоновой кислотой и амином. В некоторых из этих примеров карбоновая кислота сначала преобразуется в активированную карбоновую кислоту, а затем активированная карбоновая кислота вступает в реакцию с амином, в результате чего образуется амид. Подходящие условия для образования амида включают, помимо прочего, использование реагентов для осуществления реакции между карбоновой кислотой и амином, включая,

помимо прочего, дициклогексилкарбодиимид (DCC), диизопропилкарбодиимид (DIC), (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония гексафторофосфат (BOP), (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторофосфат (PyBOP), (7-азабензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторофосфат (PyAOP), бромотрипирролидинофосфония гексафторофосфат (PyBrOP), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N′,N′-тетраметилурония гексафторофосфат (HBTU), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N′,N′-тетраметилурония тетрафтороборат (TBTU), 1–[бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния 3-оксида гексафторофосфат (HATU), N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин (EEDQ), N-этил-N′-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), 2-хлоро-1,3-диметилимидазолидиния гексафторофосфат (CIP), 2-хлоро-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (CDMT) и карбонилдиимидазол (CDI). В некоторых из этих примеров карбоновая кислота сначала преобразуется в активированный эфир карбоновой кислоты, а затем на активированный эфир карбоновой кислоты воздействуют амином, в результате чего образуется амидная связь. В определенных вариантах осуществления на карбоновую кислоту воздействуют тем или иным реагентом. Этот реагент активирует карбоновую кислоту посредством депротонизации карбоновой кислоты и последующего образования комплекса продукта с депротонированной карбоновой кислотой в результате нуклеофильной атаки депротонированной карбоновой кислоты на протонированный реагент. Активированные эфиры карбоновой кислоты для определенных карбоновых кислот, в последующем, становятся более восприимчивыми к нуклеофильной атаке амином, чем карбоновая кислота до активации. Это приводит к образованию амидной связи. В результате карбоновая кислота описывается как активированная. Иллюстративные реагенты включают DCC и DIC.

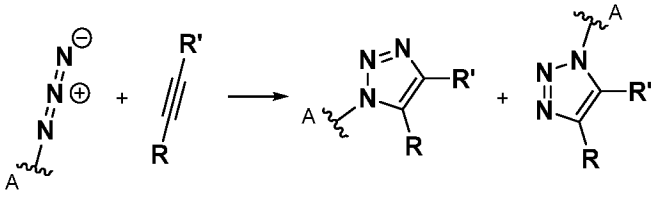
[0150] “Аминокислота” или “аминокислотный остаток” означают в некоторых вариантах осуществления природные аминокислоты. В других вариантах осуществления аминокислота или остаток аминокислоты могут быть природной аминокислотой и/или неприродной аминокислотой (например, β-аминокислоты (β^3 и β^2), гомоаминокислотами, производными пролина и пировиноградной кислоты, 3-замещенными производными аланина, производными глицина, замещенными в кольце производными фенилаланина и тирозина, линейными основными аминокислотами и/или *N*-метил аминокислотами или любой другой коммерчески доступной неприродной аминокислотой (например, неприродными аминокислотами, доступными из Sigma-Aldrich)). В других вариантах осуществления аминокислотным остатком может быть остаток, имеющий боковую цепь, участвующую в реакции, опосредованной трансглутаминазой, например, опосредованной трансглутаминазой реакции боковой цепи аминокислоты с первичным амином. Например, для приготовления определенных описываемых здесь конъюгатов антитело-

лекарственное средство применяется реакция боковой цепи аспарагина и/или глутамина с первичным амином. В определенных вариантах осуществления такое функционализованное антитело получают посредством реакции антитела, содержащего минимум один глутаминовый остаток, например, тяжелую цепь Q295 (нумерация EU), с соединением согласно формуле $H_2N–LL–N_3$, где LL - двухвалентная полиэтиленгликольная группа, в присутствии фермента трансглутаминазы.

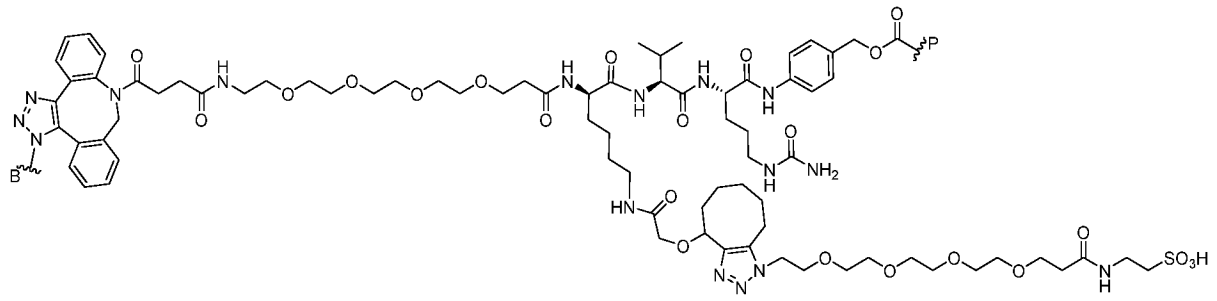
[0151] В контексте настоящего документа "таурин" означает реагент  , или группу  , где означает атом, через который таурин связывается с рядом расположенными группами в формуле.

[0152] В контексте настоящего документа "стереоизомерная форма" или “стереоизомер” означает относительную пространственную ориентацию различных групп в соединении. Стереоизомерные формы включают энантиомеры, диастереомеры и/или их смеси.

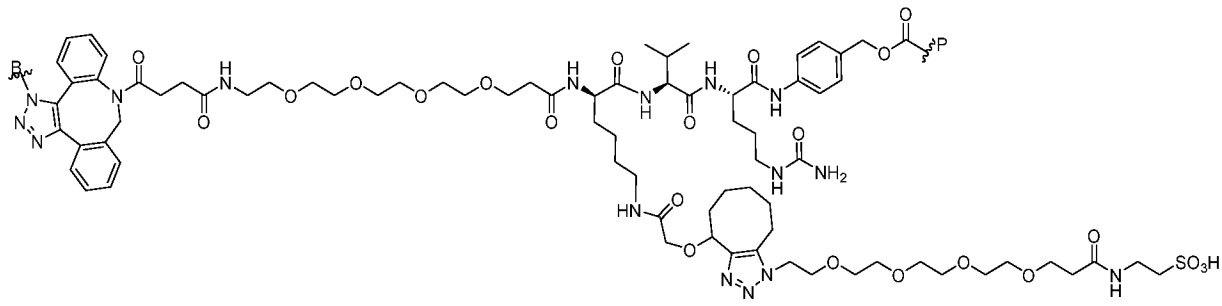
[0153] В контексте настоящего документа "региоизомер," "региоизомеры" или "смесь региоизомеров" означает продукт(ы) 1,3-циклоприсоединений или промотированных напряжением алкин-азидных циклоприсоединений (SPAAC) – известных иначе как клик-реакции – которые получают от подходящих азидов (например, $–N_3$ или ПЭГ-N_3 производные антитела), на которых воздействуют подходящими алкинами. В определенных вариантах осуществления, например, региоизомеры и смеси региоизомеров характеризуются продуктами клик-реакций, показанными далее:



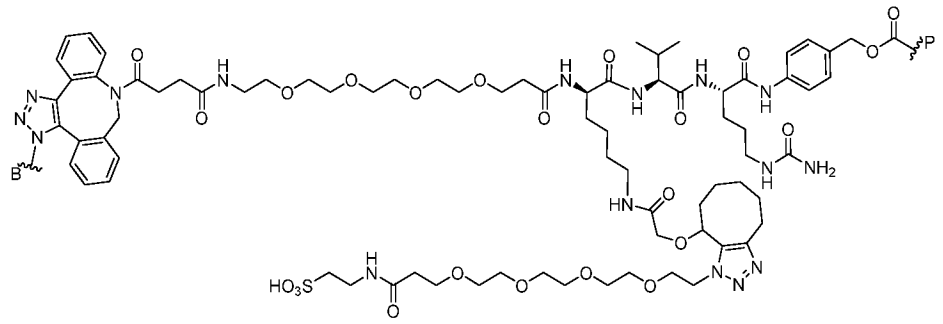
[0154] Только в качестве примера региоизомеры соединения A1′, т.е. соединения A2′, A3′, A4′, показаны далее, при этом в каждом случае  - связь со связующим агентом; и в каждом случае  - связь с нагрузкой:



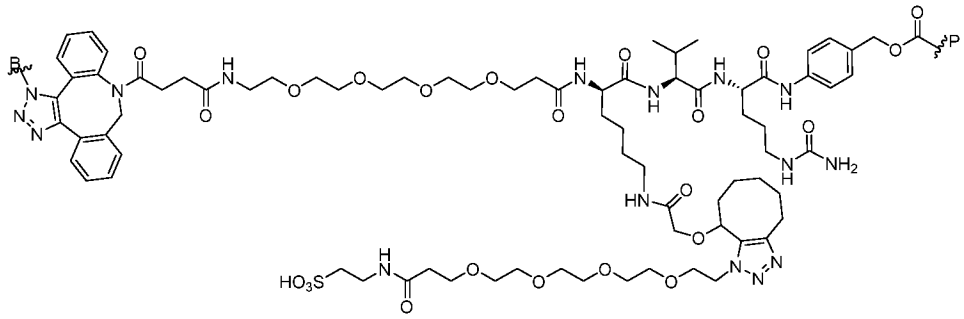
соединение A1′



соединение A2′;



соединение A3′;



соединение A4′.

Антитела к MSR1, содержащие варианты Fc

[0155] Согласно определенным вариантам осуществления, представлены антитела к MSR1, содержащие Fc домен, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или снижают связывание антитела с FcRn рецептором, например, при кислотном pH по

сравнению с нейтральным pH. Например, здесь представлены антитела к MSR1, содержащие мутацию в C_H2 или C_H3 области Fc домена, при этом такая мутация (мутации) повышает аффинность Fc домена к FcRn в кислотной среде (например, в эндосоме, где pH варьируется от около 5.5 до около 6.0). Такие мутации могут привести к повышению времени полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких Fc модификаций включают, например, модификацию в позиции 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T), и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в позиции 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в позиции 250 и/или 428; или модификацию в позиции 307 или 308 (например, 308F, V308F), и 434. В одном варианте осуществления такая модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

[0156] Например, варианты осуществления включают антитела к MSR1, содержащие Fc домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, которые выбираются из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные комбинации указанных ранее мутаций Fc домена и других мутаций в вариабельных доменах антител, описанных в настоящем документе, рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител

[0157] Варианты осуществления включают антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с MSR1 человека с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение включает антитела к MSR1, которые связываются с внеклеточным доменом MSR1 человека, экспрессированным с нонагистидиновой меткой на N-конце (например, His9-hMSR1) с K_D менее, чем около 10 нМ, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25ºC или 37ºC, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления, представлены антитела к MSR1, которые связываются с MSR1 человека при 37ºC с K_D менее, чем около 10 нМ, менее, чем около 9 нМ, менее, чем около 8 нМ, менее, чем около 7 нМ, менее, чем около 6 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1 нМ, менее, чем

около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 700 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 500 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 300 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 90 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 70 пМ, менее, чем около 60 пМ, менее, чем около 50 пМ, менее, чем около 40 пМ, менее, чем около 30 пМ, менее, чем около 20 пМ или менее, чем около 10 пМ, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь антитела к MSR1 связываются с MSR1 человека при 25ºC с K_D менее, чем около 6 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1 нМ, менее, чем около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 700 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 500 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 300 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 90 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 70 пМ, менее, чем около 60 пМ, менее, чем около 50 пМ, менее, чем около 40 пМ, менее, чем около 30 пМ или менее, чем около 20 пМ, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0158] Варианты осуществления также включают антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с MSR1 обезьяны с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение включает антитела к MSR1, которые связываются с внеклеточным доменом MSR1 обезьяны, экспрессированным с myc-myc гексагистидиновой меткой на N-конце (например, HMM-mfMSR1) с K_D менее, чем около 20 нМ, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25ºC или 37ºC, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления, представлены антитела к MSR1, которые связываются с MSR1 обезьяны при 37ºC с K_D менее, чем около 20 нМ, менее, чем около 18 пМ, менее, чем около 15 нМ, менее, чем около 12 нМ, менее, чем около 10 нМ, менее, чем около 9 нМ, менее, чем около 8 нМ, менее, чем около 7 нМ, менее, чем около 6 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1 нМ, менее, чем около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 700 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 500 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 300 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 90 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 70 пМ, менее, чем около 60

пМ, менее, чем около 50 пМ, менее, чем около 40 пМ, менее, чем около 30 пМ, менее, чем около 20 пМ или менее, чем около 10 пМ, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления, представлены антитела к MSR1, которые связываются с MSR1 обезьяны при 25ºC с K_D менее, чем около 12 нМ, менее, чем около 10 нМ, менее, чем около 9 нМ, менее, чем около 8 нМ, менее, чем около 7 нМ, менее, чем около 6 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1 нМ, менее, чем около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 700 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 500 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 300 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 90 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 70 пМ, менее, чем около 60 пМ, менее, чем около 50 пМ, менее, чем около 40 пМ, менее, чем около 30 пМ, или менее, чем около 20 пМ, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0159] Настоящее изобретение также включает антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с внеклеточным доменом MSR1 человека, экспрессированным с нонагистидиновой меткой на N-конце (например, His9-hMSR1) с диссоциативным периодом полужизни (t½) более, чем около 5 минут, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25ºC или 37ºC, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления, представлены антитела к MSR1, которые связываются с MSR1 человека при 37ºC с t½ более, чем около 4 минут, более, чем около 5 минут, более, чем около 6 минут, более, чем около 8 минут, более, чем около 10 минут, более, чем около 12 минут, более, чем около 14 минут, более, чем около 16 минут, более, чем около 18 минут, более, чем около 20 минут, более, чем около 30 минут, более, чем около 40 минут, более, чем около 50 минут, более, чем около 60 минут, более, чем около 70 минут, более, чем около 80 минут, более, чем около 90 минут, более, чем около 120 минут, более, чем около 150 минут, более, чем около 180 минут, более, чем около 210 минут, более, чем около 240 минут или дольше, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0160] Варианты осуществления также включают антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые могут связываться с внеклеточным доменом MSR1 обезьяны, экспрессированным с myc-myc-гексагистидиновой меткой на N-конце (например, HMM-mfMSR1) с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение включает антитела к MSR1, которые связываются с HMM-mfMSR1 с K_D менее, чем около 20 нМ, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25ºC или 37ºC, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления, представлены антитела к MSR1, которые связываются с HMM-mfMSR1 при 37ºC с K_D менее, чем около 20 нМ, менее, чем около 15 нМ, менее, чем около 10 нМ, менее, чем около 9 нМ, менее, чем около 8 нМ, менее, чем около 7 нМ, менее, чем около 6 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1 нМ, менее, чем около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 700 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 500 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 300 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 90 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 70 пМ, менее, чем около 60 пМ, или менее, чем около 50 пМ, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь антитела к MSR1 связываются с HMM-mfMSR1 при 25ºC с K_D менее, чем около 12 нМ, менее, чем около 10 нМ, менее, чем около 9 нМ, менее, чем около 8 нМ, менее, чем около 7 нМ, менее, чем около 6 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1 нМ, менее, чем около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 700 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 500 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 300 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 90 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 70 пМ, менее, чем около 60 пМ, или менее, чем около 50 пМ, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0161] Варианты осуществления также включают антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с внеклеточным доменом MSR1 обезьяны, экспрессированным с myc-myc-гексагистидиновой меткой на N-конце (например, HMM-mfMSR1) с диссоциативным периодом полужизни (t½) более, чем около 55 минут, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25ºC или

37ºC, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа или по существу аналогичного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления, представлены антитела к MSR1, которые связываются с димерным MSR1 человека при 37ºC с t½ более, чем около 1 минуты, более, чем около 2 минут, более, чем около 3 минут, более, чем около 4 минут, более, чем около 5 минут, более, чем около 6 минут, более, чем около 8 минут, более, чем около 10 минут, более, чем около 12 минут, более, чем около 14 минут, более, чем около 16 минут, более, чем около 18 минут, более, чем около 20 минут, более, чем около 30 минут, более, чем около 40 минут, более, чем около 50 минут, более, чем около 60 минут, более, чем около 70 минут, более, чем около 80 минут, более, чем около 90 минут, более, чем около 120 минут, более, чем около 150 минут, более, чем около 180 минут, более, чем около 210 минут, более, чем около 240 минут или дольше, по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса, например, при использовании формата анализа, определенного в Примере 3 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0162] Варианты осуществления также включают антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с модифицированным экспрессируемым клеточной поверхностью hMSR1 с коэффициентом связывания модифицированных hMSR1-экспрессирующих клеток к неэкспрессирующим клеткам, как минимум, приблизительно 2-кратным, приблизительно 3-кратным, приблизительно 4-кратным, приблизительно 5-кратным, приблизительно 6-кратным, приблизительно 7-кратным, приблизительно 8--кратным, приблизительно 9-кратным, приблизительно 10-кратным, приблизительно 12-кратным, приблизительно 15-кратным, приблизительно 20-кратным, приблизительно 25-кратным, приблизительно 30-кратным, приблизительно 35-кратным, приблизительно 40-кратным, приблизительно 45-кратным, приблизительно 50--кратным или более, по результатам измерения посредством анализа связывания антитела, например, при помощи формата анализа, определенного в Примере 5 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления здесь представлены антитела, которые связываются с клетками с эндогенно-экспрессируемым hMSR1 с коэффициентами связывания клеток, экспрессирующих эндогенный hMSR1, к неэкспрессирующим клеткам, как минимум, приблизительно 2-кратным, приблизительно 3-кратным, приблизительно 4-кратным, приблизительно 5-кратным, приблизительно 6-кратным, приблизительно 7-кратным, приблизительно 8--кратным, приблизительно 9-кратным, приблизительно 10-кратным, приблизительно 12-кратным, приблизительно 15-кратным, приблизительно 20-кратным, приблизительно 25-кратным, приблизительно 30-кратным, приблизительно 35-кратным, приблизительно 40-кратным, приблизительно 45-

кратным, приблизительно 50-кратным или более по результатам измерения посредством анализа связывания антитела, например, при помощи формата анализа, определенного в Примере 5 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа. В некоторых вариантах осуществления описанное здесь антитело MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент связываются с модифицированным экспрессируемым клеточной поверхностью MSR1 мыши с коэффициентом связывания экспрессирующих модифицированный MSR1 мыши клеток к неэкспрессирующим клеткам, как минимум, приблизительно 2-кратным, приблизительно 3-кратным, приблизительно 4-кратным, приблизительно 5-кратным, приблизительно 6-кратным, приблизительно 7-кратным, приблизительно 8--кратным, приблизительно 9-кратным, приблизительно 10-кратным, приблизительно 12-кратным, приблизительно 15-кратным, приблизительно 20-кратным, приблизительно 25-кратным, приблизительно 30-кратным, приблизительно 35-кратным, приблизительно 40-кратным, приблизительно 45-кратным, приблизительно 50-кратным или более, по результатам измерения посредством анализа связывания антитела, например, при помощи формата анализа, определенного в Примере 5 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа.

[0163] Варианты осуществления также включают антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с MSR1 и демонстрируют максимальное ингибирование захвата модифицированного липопротеина низкой плотности (ЛПНП) в клетках, экспрессирующих MSR1 человека менее, чем около 95%. Например, варианты осуществления включают антитела к MSR1, которые демонстрируют максимальное ингибирование захвата модифицированного ЛПНП (например, окисленного или ацетилированного) в клетках, которые экспрессируют MSR1 человека менее, чем около 95%, с IC_{50} менее, чем около 6.1 нМ, по результатам измерения с использованием анализа захвата лигандов, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 8 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления, представлены антитела к MSR1, которые демонстрируют максимальное ингибирование захвата модифицированного ЛПНП в клетках, экспрессирующих MSR1 человека менее, чем около 95%, с IC_{50} менее, чем около 6.1 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1.5 нМ, менее, чем около 1.4 нМ, менее, чем около 1.3 нМ, менее, чем около 1.2 нМ, менее, чем около 1.0 нМ, менее, чем около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 60 пМ, менее, чем около 40 пМ, менее, чем около 20 пМ, по результатам измерения с использованием анализа захвата лигандов, например, с

использованием формата анализа, определенного в Примере 8 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0164] В некоторых вариантах осуществления антитела к MSR1 демонстрируют максимальное ингибирование захвата модифицированного ЛПНП в клетках, экспрессирующих MSR1 человека менее, чем около 95%, с IC_{50} менее, чем около 6.1 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1.5 нМ, менее, чем около 1.4 нМ, менее, чем около 1.3 нМ, менее, чем около 1.2 нМ, менее, чем около 1.0 нМ, менее, чем около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 60 пМ, менее, чем около 40 пМ, менее, чем около 20 пМ, по результатам измерения с использованием анализа захвата лигандов, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 8 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0165] В некоторых вариантах осуществления антитела к MSR1 демонстрируют максимальное ингибирование захвата модифицированного ЛПНП в клетках, экспрессирующих MSR1 человека менее, чем около 75%, с IC_{50} менее, чем около 6.1 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1.5 нМ, менее, чем около 1.4 нМ, менее, чем около 1.3 нМ, менее, чем около 1.2 нМ, менее, чем около 1.0 нМ, менее, чем около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 60 пМ, менее, чем около 40 пМ, менее, чем около 20 пМ, по результатам измерения с использованием анализа захвата лигандов, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 8 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0166] В некоторых вариантах осуществления антитела к MSR1 демонстрируют максимальное ингибирование захвата модифицированного ЛПНП в клетках, экспрессирующих MSR1 человека менее, чем около 60%, с IC_{50} менее, чем около 6.1 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1.5 нМ, менее, чем около 1.4 нМ, менее, чем около 1.3 нМ, менее, чем около 1.2 нМ, менее, чем около 1.0 нМ, менее, чем около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 60 пМ, менее, чем около 40 пМ, менее, чем около 20 пМ, по результатам измерения с использованием анализа захвата лигандов, например, с использованием формата анализа,

определенного в Примере 8 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0167] В некоторых вариантах осуществления антитела к MSR1 демонстрируют максимальное ингибирование захвата модифицированного ЛПНП в клетках, экспрессирующих MSR1 человека менее, чем около 50%, с IC_{50} менее, чем около 6.1 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 4 нМ, менее, чем около 3 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1.5 нМ, менее, чем около 1.4 нМ, менее, чем около 1.3 нМ, менее, чем около 1.2 нМ, менее, чем около 1.0 нМ, менее, чем около 900 пМ, менее, чем около 800 пМ, менее, чем около 600 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 60 пМ, менее, чем около 40 пМ, менее, чем около 20 пМ, по результатам измерения с использованием анализа захвата лигандов, например, с использованием формата анализа, определенного в Примере 8 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0168] Варианты осуществления также включают антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с экспрессируемым клеточной поверхностью MSR1 и интернализуются клетками. Например, здесь представлены антитела, которые связываются с экспрессируемым клеточной поверхностью MSR1 на клетках THP-1 и становятся интернализованными клетками. Например, в данном изобретении раскрываются антитела к MSR1, которые связываются с экспрессируемым клеточной поверхностью MSR1 на клетках THP-1 и становятся интернализованными клетками с относительным процентным соотношением минимум около 10%, по результатам измерений посредством хемилюминесцентного анализа, например, при помощи формата анализа, определенного в Примере 9 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления представлены антитела к MSR1, которые связываются с экспрессируемым клеточной поверхностью MSR1 на клетках THP-1 и становятся интернализованными клетками с относительным процентным соотношением минимум около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50%, по результатам измерений посредством хемилюминесцентного анализа, например, при помощи формата анализа, определенного в Примере 9 настоящего документа, или по существу аналогичного анализа.

[0169] Представленные здесь антитела могут обладать одной или несколькими указанными ранее биологическими характеристиками или любой их комбинацией. Предполагается, что представленный здесь ранее список биологических характеристик антител не является исчерпывающим. Другие биологические характеристики представленных здесь антител являются очевидными для специалистов в данной

области на основании анализа настоящего описания изобретения, включая приведенные здесь рабочие Примеры.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

[0170] Здесь представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело -к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, конъюгированные с лекарственным препаратом или терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления таким терапевтическим средством является агонист X рецептора печени (LXR) или стероид. Также здесь представлены реактивные линкер-нагрузки, полезные для создания ADC. Также здесь представлены модифицированные антитела к MSR1 и антиген-связывающие фрагменты модифицированных антител к MSR1, полезные для создания ADC.

[0171] ADC обычно имеют Формулу (I): **BA** – $[(\mathbf{L})_{0\text{-}1}$ – **PA**$]_n$. В данной формуле **BA** - связующий агент, например, антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент. **L** - линкер, подробно описанный далее. **PA** - нагрузка. Подходящие нагрузки включают любую малую молекулу, которая может оказать терапевтическое действие посредством доставки к MSR1. В определенных вариантах осуществления нагрузкой может быть, например, стероид, модулятор LXR или аналог рифамицина. Полезные нагрузки подробно описываются далее. В формуле **n** - целое число от 1 до 30, например, от 1 до 4, например, 2 или 4. В каждом случае **L** – **PA** ковалентно связана с функциональной группой **PA**. В некоторых конкретных вариантах осуществления в каждом случае **L** – **PA** ковалентно связана с боковой цепью лизина, боковой цепью цистеина, боковой цепью глутамина или амино-концом **BA**.

[0172] В данной отрасли известны методы и линкеры для конъюгирования с остатками антитела или антиген-связывающего фрагмента. Иллюстративные аминокислотные присоединения, которые могут применяться в контексте данного аспекта, например, лизин (см., например, US 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5,714,586; US 2013/0101546; и US 2012/0585592), цистеин (см., например, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; и US 7,750,116), селеноцистеин (см., например, WO 2008/122039; и Hofer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2008, 105*:12451-12456), формилглицин (см., например, Carrico *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2013, 110*:46-51, и Rabuka *et al.*, *Nat. Protocols*, 2012, *10*:1052-1067), неприродные аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559), и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры также могут быть конъюгированы с антиген-связывающим белком через

присоединение к углеводам (см., например, US 2008/0305497, WO 2014/065661 и Ryan *et al.*, *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, *13*:127-130) и дисульфидным линкерам (см., например, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611 и Shaunak *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, *2*:312-313). Также можно применять методы сайт-специфического конъюгирования для прямой конъюгации с конкретными остатками антитела или антиген-связывающего белка (см., например, Schumacher *et al. J Clin Immunol* (2016) 36(Suppl 1): 100). Методы сайт-специфической конъюгации включают, помимо прочего, конъюгацию глутамина через трансглутаминазу (см., например, Schibli, Angew Chemie Inter Ed. 2010, 49 ,9995).

[0173] Линкеры могут быть конъюгированы с одним или более глутаминовыми остатками через основанную на трансглутаминазе хемоферментативную конъюгацию (см., например, Dennler *et al., Bioconjugate Chem.* 2014, 25, 569-578, и WO 2017/147542). Например, в присутствии трансглутаминазы один или более глутаминовых остатков антитела могут соединяться с первичным аминным соединением. Если описать вкратце, в некоторых вариантах осуществления на антитело, имеющее глутаминовый остаток (например, , остаток Gln295) воздействуют первичным аминным соединением, которое подробнее описывается далее, в присутствии фермента трансглутаминазы. Первичные аминные соединения включают нагрузки или линкер-нагрузки, которые напрямую дают конъюгаты антитело-лекарственное средство через опосредованную трансглутаминазой связь. Первичные аминные соединения также включают линкеры и спейсеры, которые функционализуются с реактивными группами, которые в последующем могут вступать в реакции с другими соединениями в направлении синтеза конъюгатов антитело-лекарственное средство. Антитела, содержащие глутаминовые остатки, могут быть выделены из природных источников или модифицированы, чтобы содержать один или более глутаминовых остатков. Специалистам в данной области известны методы для введения глутаминовых остатков в полипептидную цепь антитела (глутаминил-модифицированные антитела или антиген-связывающие молекулы). В определенных вариантах осуществления антитело является агликозилированным.

[0174] В определенных вариантах осуществления антитело, или глутаминил-модифицированное антитело, или антиген-связывающая молекула содержит минимум один глутаминовый остаток минимум в одной последовательности полипептидной цепи. В определенных вариантах осуществления антитело, или глутаминил-модифицированное антитело, или антиген-связывающая молекула содержит два полипептида тяжелой цепи, каждый с одним остатком Gln295. В других вариантах осуществления антитело, или глутаминил-модифицированное антитело, или антиген-связывающая молекула содержит один или более глутаминовых остатков в участке, кроме 295 тяжелой цепи. В некоторых

вариантах осуществления антитело можно получить посредством сайт-направленного мутагенеза с целью вставить глутаминовый остаток в какой-либо участок, чтобы при этом функция или связывание антитела не были нарушены. Например, сюда включены антитела, имеющие мутацию (мутации) Asn297Gln (N297Q) согласно приведенному здесь описанию. В некоторых вариантах осуществления антитело, имеющее остаток Gln295 и/или мутацию N297Q, содержит один или более дополнительных природных глутаминовых остатков в их вариабельных областях, к которым может быть доступ для трансглутаминазы и которые, в результате, способны к конъюгации с линкером или линкер-нагрузкой. Иллюстративный природный глутаминовый остаток можно найти, например, в Q55 легкой цепи. В таких случаях антитело, конъюгированное через трансглутаминазу, может иметь значение DAR выше ожидаемого (например, значение DAR выше 4). Любые такие антитела можно выделить из природных или искусственных источников.

[0175] Первичным аминным соединением, полезным для опосредованного трансглутаминазой соединения антитела (или антиген-связывающего соединения), содержащим глутамин, может быть любое первичное аминное соединение, которое специалист считает полезным. В общем, первичное аминное соединение имеет формулу H_2N-R, где R может быть любой группой, совместимой с антителом и условиями реакции. В определенных вариантах осуществления R - алкил, замещенный алкил, гетероалкил или замещенный гетероалкил.

[0176] В некоторых вариантах осуществления первичное аминное соединение содержит реактивную группу или защищенную реактивную группу. Полезные реактивные группы включают азиды, алкины, циклоалкины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, кислоты, эфиры, гидрозиды, аналины и амины. В определенных вариантах осуществления реактивная группа выбирается из группы, состоящей из азида, алкина, сульфгидрила, циклоалкина, альдегида и карбоксила.

[0177] В определенных вариантах осуществления первичное аминное соединение соответствует формуле H_2N-**LL**-**X**, где **LL** это двухвалентный спейсер и **X** это реактивная группа или защищенная реактивная группа. В конкретных вариантах осуществления **LL** это двухвалентная полиэтиленгликольная (ПЭГ) группа. В определенных вариантах осуществления **X** выбирается из группы, состоящей из –SH, $–N_3$, алкина, альдегида и тетразола. В конкретных вариантах осуществления **X** представляет собой $–N_3$.

[0178] В определенных вариантах осуществления первичное аминное соединение соответствует одной из следующих формул:

H_2N-$(CH_2)_n$-X;

H_2N-$(CH_2CH_2O)_n$-$(CH_2)_p$-X;

H_2N-$(CH_2)_n$-N(H)C(O)-$(CH_2)_m$-X;

H_2N-$(CH_2CH_2O)_n$-N(H)C(O)-$(CH_2CH_2O)_m$-$(CH_2)_p$-X;

H_2N-$(CH_2)_n$-C(O)N(H)-$(CH_2)_m$-X;

H_2N-$(CH_2CH_2O)_n$-C(O)N(H)-$(CH_2CH_2O)_m$-$(CH_2)_p$-X;

H_2N-$(CH_2)_n$-N(H)C(O)-$(CH_2CH_2O)_m$-$(CH_2)_p$-X;

H_2N-$(CH_2CH_2O)_n$-N(H)C(O)-$(CH_2)_m$-X;

H_2N-$(CH_2)_n$-C(O)N(H)-$(CH_2CH_2O)_m$-$(CH_2)_p$-X; и

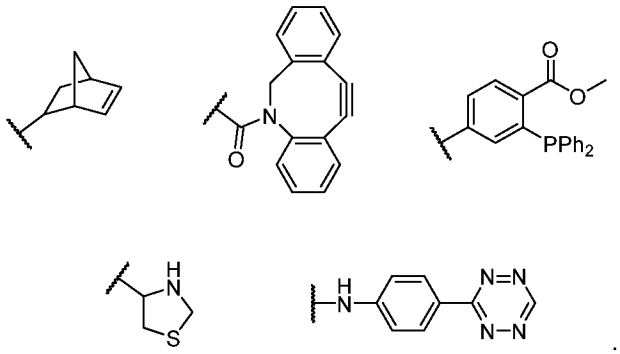
H_2N-$(CH_2CH_2O)_n$-C(O)N(H)-$(CH_2)_m$-X;

где **n** представляет собой целое число, которое выбирается от 1 до 12;

m представляет собой целое число, которое выбирается от 0 до 12;

p представляет собой целое число, которое выбирается от 0 до 2;

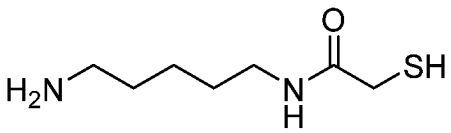
и X выбирается из группы, состоящей из –SH, $–N_3$, –C≡CH, –C(O)H, тетразола, и любого из

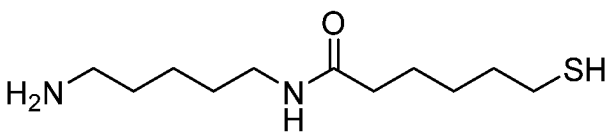


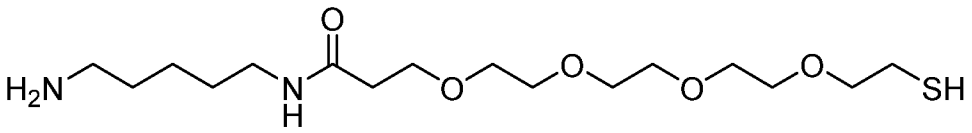
.

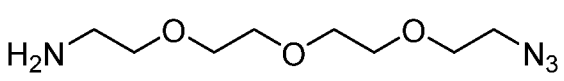
[0179] В вышеприведенных примерах любая из алкильных или алкиленовых (т.е. $-CH_2-$) групп может быть необязательно замещенной, например, C_{1-8}алкилом, метилформилом или $–SO_3H$. В определенных вариантах осуществления алкильные группы являются незамещенными.

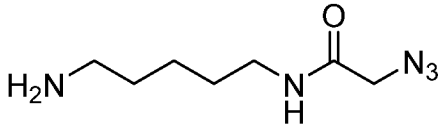
[0180] В определенных вариантах осуществления первичное аминное соединение выбирается из группы, состоящей из:



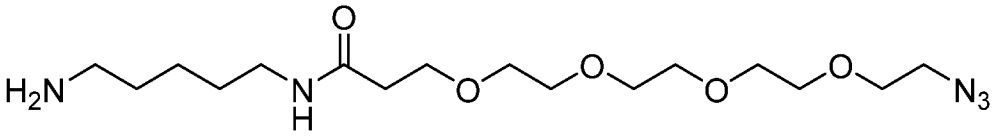




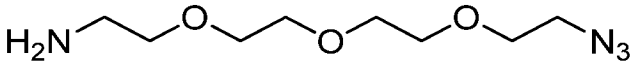




и

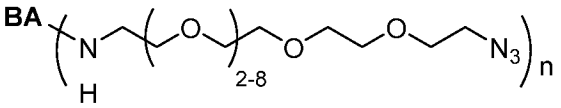


[0181] В конкретных вариантах осуществления первичное аминное соединение представляет собой



[0182] Иллюстративные условия для вышеприведенных реакций представлены в Примерах далее:

[0183] Соответственно, здесь представлены модифицированные антитела к MSR1 и их антиген-связывающие фрагменты, соединенные с одним или более первичными аминными соединениями. В конкретных вариантах осуществления здесь представлены модифицированные антитела к MSR1 и их антиген-связывающие фрагменты, согласно формуле:



[0184] В формуле **BA** представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент. Переменная **n** представляет собой целое число от 1 до 30. В определенных вариантах осуществления **n** представляет собой число от 1 до числа глутаминовых остатков в **BA**. В определенных вариантах осуществления **n** представляет собой число от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления **n** равно 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления n равно 2. В некоторых вариантах осуществления n равно 4. Модифицированные антитела к MSR1 и их антиген-связывающие фрагменты

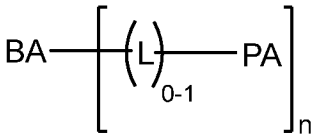
полезны, например, для соединения с одной или более молекулами **L – PA**, в результате чего образуется конъюгат (ADC).

[0185] В определенных вариантах осуществления **BA** содержит два или четыре глутаминовых остатка. В определенных вариантах осуществления **BA** содержит остаток Q295. В определенных вариантах осуществления **BA** содержит мутацию N297Q. В определенных вариантах осуществления **BA** содержит Q295 и N297Q. В таких вариантах осуществления, поскольку **BA** может быть димерным, **BA** имеет четыре глутаминовых остатка для конъюгации с компонентами **L – PA**.

Соединения

[0186] В одном аспекте здесь представлено соединение и/или конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или его антиген-связывающий фрагмент, описанные здесь, конъюгированные с остатком нагрузки необязательно через линкер или через линкер-спейсер,

[0187] В группе вариантов осуществления это соединение и/или конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру Формулы (**I**):



Формула (**I**)

где:

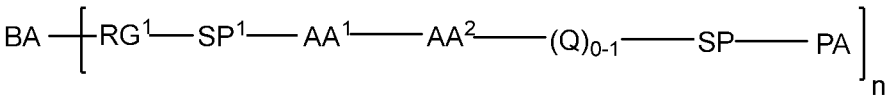
BA представляет собой связующий агент;

L представляет собой линкер;

PA представляет собой нагрузку, которая выбирается из группы, состоящей из стероидного остатка, остатка модулятора LXR или остатка аналога рифамицина; и

нижний индекс **n** представляет собой целое число от 1 до 30.

[0188] В группе вариантов осуществления описанные здесь и в настоящем документе соединение и/или конъюгат антитело-лекарственное средство имеют структуру Формулы (**IA**):



Формула (**IA**)

где

SP^1 отсутствует или является спейсером;

RG[1] представляет собой остаток реактивной группы;

AA[1] отсутствует или является двухвалентным или трехвалентным линкером, содержащим аминокислотный остаток, который может быть связан напрямую или косвенно с группой **HG**;

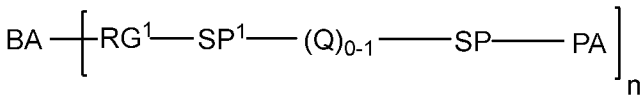
AA[2] отсутствует или является дипептидным, трипептидным или тетрапептидным остатком;

Q, если имеется, является остатком коннекторной группы;

SP отсутствует или является спейсером; и

HG, если имеется, является гидрофильной группой.

[0189] В группе вариантов осуществления описанные здесь и в настоящем документе соединение и/или конъюгат антитело-лекарственное средство имеют структуру Формулы (**IB-1**):



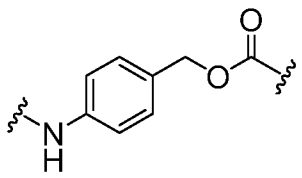
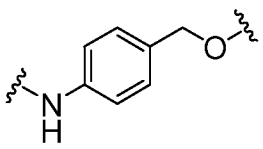
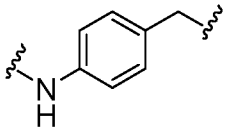
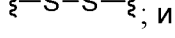
Формула (**IB-1**)

где

SP[1] отсутствует или является спейсером;

RG[1] представляет собой остаток реактивной группы;

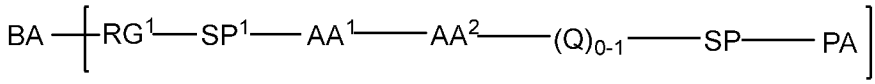
Q, если имеется, является


, 
, или 
; или 
; и

SP отсутствует или является спейсером;

где  обозначает атомы, через которые указанная группа связана с соседними группами в формуле.

[0190] В группе вариантов осуществления описанные здесь и в настоящем документе соединение и/или конъюгат антитело-лекарственное средство имеют структуру Формулы (**IB-2**):



Формула (**IB-2**)

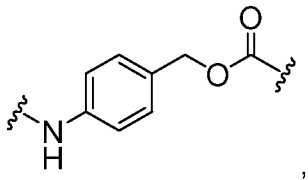
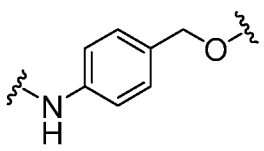
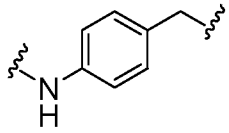
где

SP[1] отсутствует или является спейсером;

RG[1] представляет собой остаток реактивной группы;

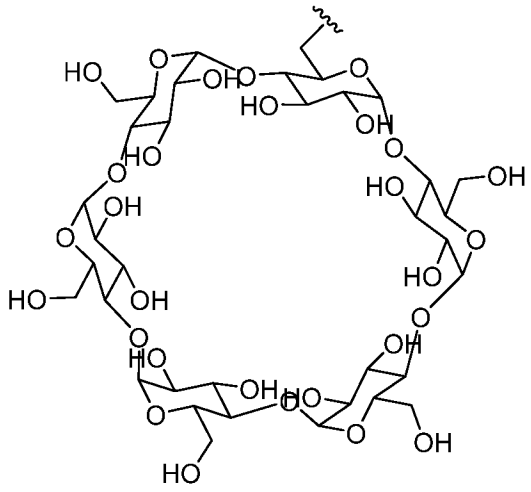
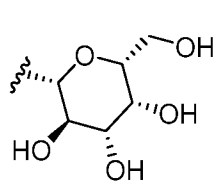
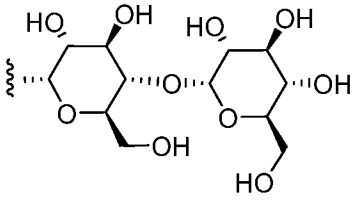
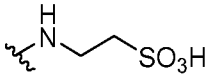
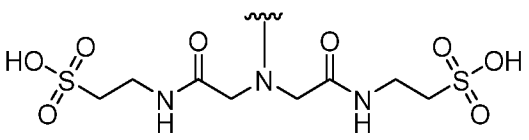
AA[1] отсутствует или является двухвалентным или трехвалентным линкером, содержащим аминокислотный остаток, который может быть связан напрямую или косвенно с группой **HG**;

AA[2] отсутствует или является дипептидным, трипептидным или тетрапептидным остатком;

Q, если имеется, является  ,  или  ;

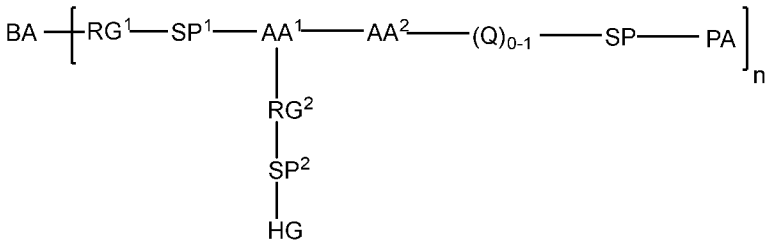
SP отсутствует или является спейсером; и

HG, если имеется, является

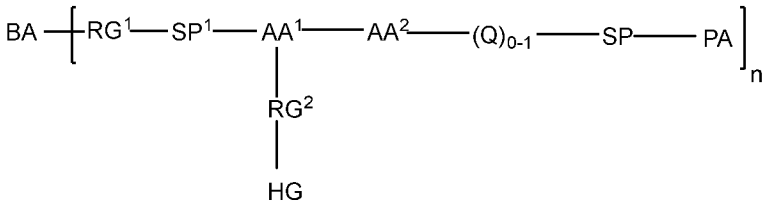
 ,  ,  ,  , или  ,

где  обозначает атомы, через которые указанная группа связана с соседними группами в формуле.

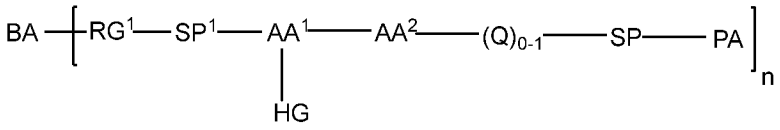
[0191] В группе вариантов осуществления описанные здесь и в настоящем документе соединение и/или конъюгат антитело-лекарственное средство имеют структуру Формулы (**IC**), Формулы (**ID**) или Формулы (**IE**):



Формула (**IC**)



Формула (**ID**)



Формула (**IE**)

где

SP^1 отсутствует или является спейсером;

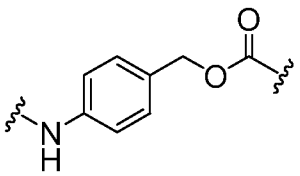
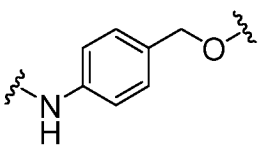
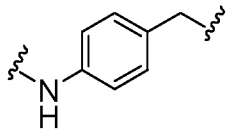
RG^1 представляет собой остаток реактивной группы;

SP^2 отсутствует или является спейсером;

RG^2 представляет собой остаток реактивной группы;

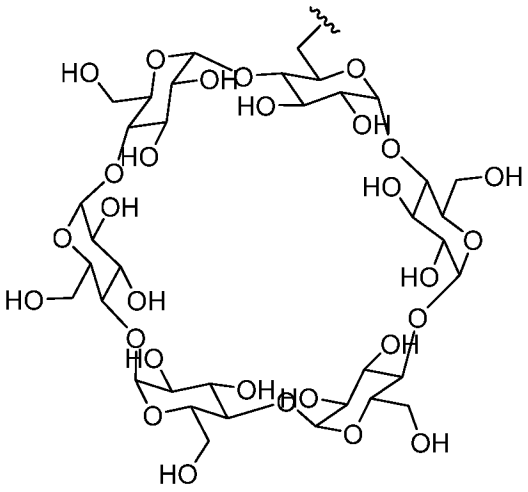
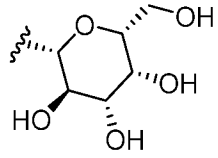
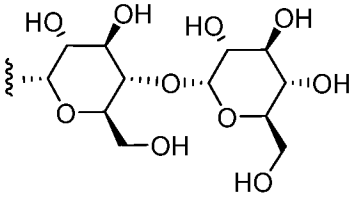
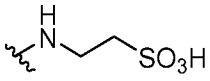
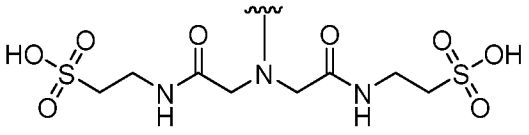
AA^1 представляет собой двухвалентный или трехвалентный линкер, содержащий аминокислотный остаток;

AA^2 является дипептидным, трипептидным или тетрапептидным остатком;

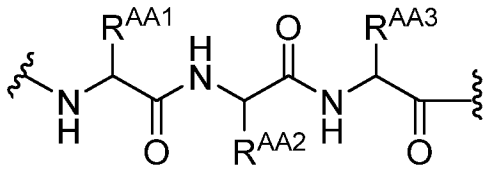
Q, если имеется, является  ,  или  ;

SP отсутствует или является спейсером; и

HG является

 ,  ,  ,  , или  ,

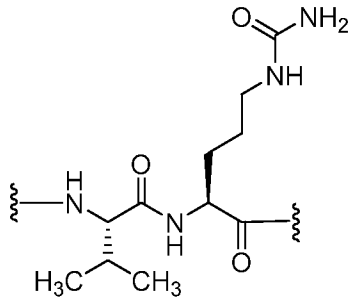
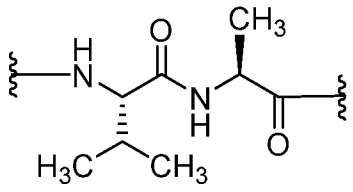
[0192] где  обозначает атомы, через которые указанная группа связана с соседними группами в формуле. В некоторых или любых случаях для любого соединения и/или конъюгата антитело-лекарственное средство, описанных здесь и в настоящем документе, **AA^1-AA^2** соответствует Формуле (**LL1**):


(**LL1**)

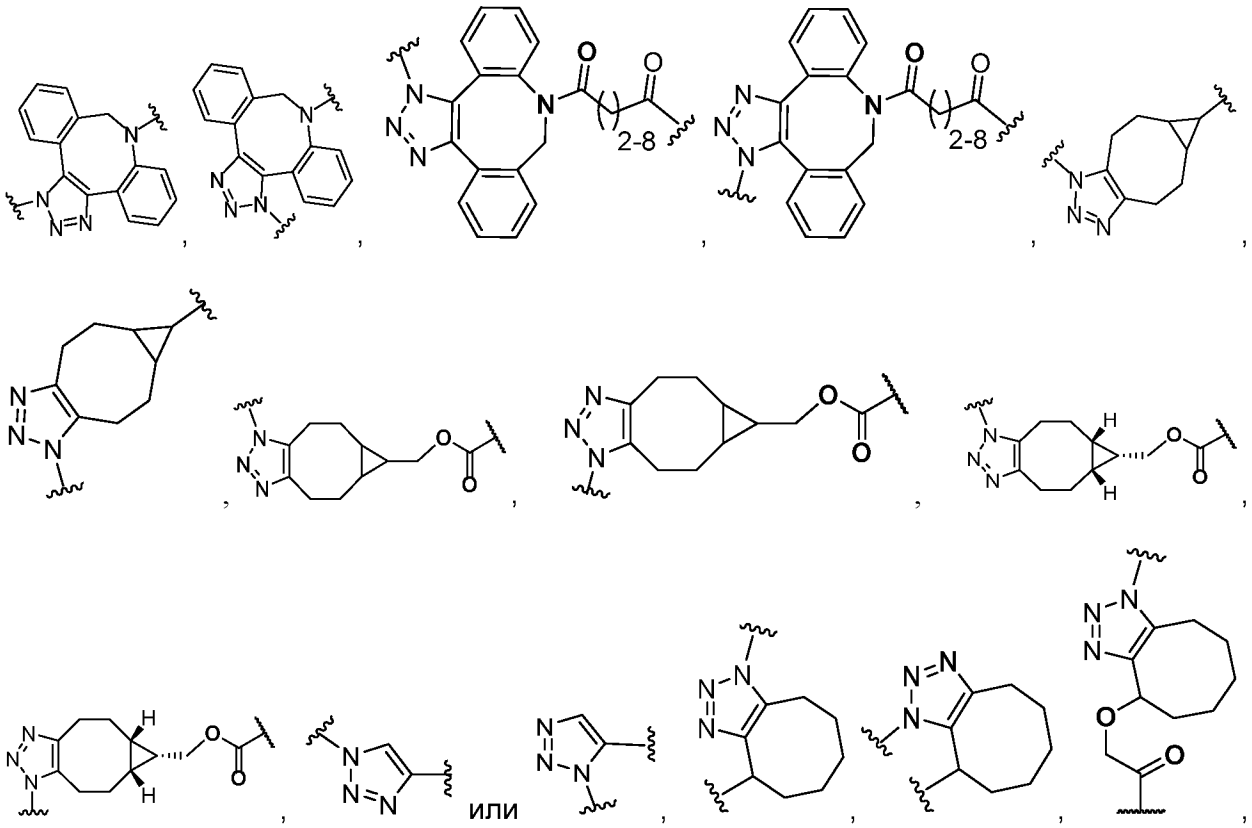
где все **R^{AA1}**, **R^{AA2}** и **R^{AA3}** независимо являются аминокислотными боковыми цепями,

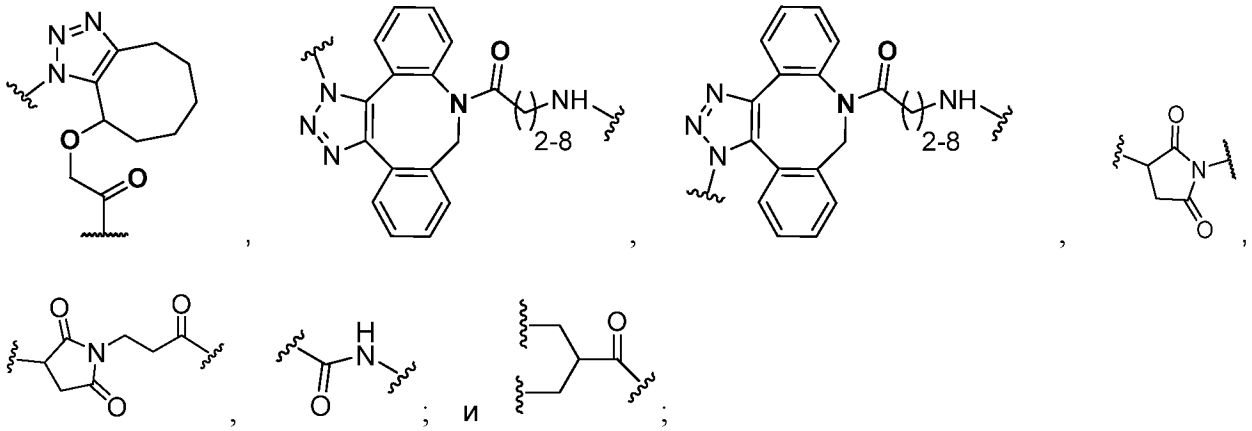
минимум одна из которых связана с –(**RG^2**)-**SP^2**-**HG**, –(**RG^2**)-**HG** или **HG;** где  указывает на атомы, через которые **AA^1-AA^2** связана с соседними группами в формуле. В

некоторых из таких вариантов осуществления R^{AA1} это боковая цепь лизина, глутамина, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, связанная напрямую или косвенно с **HG**, а R^{AA2} и R^{AA3} - боковые цепи либо валина и аланина, либо валина и цитруллина, соответственно.

[0193] В некоторых или любых случаях для любого соединения и/или конъюгата антитело-лекарственное средство, описанных выше и в настоящем документе, AA^1-AA^2 это  или  , при этом  означает атомы, через которые AA^1-AA^2 связана с соседними группами в формуле.

[0194] В некоторых или любых случаях для любого соединения и/или конъюгата антитело-лекарственное средство, описанных выше и в настоящем документе, остатки RG^1 и RG^2 независимо в каждом случае выбираются из группы, состоящей из:



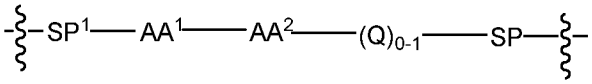


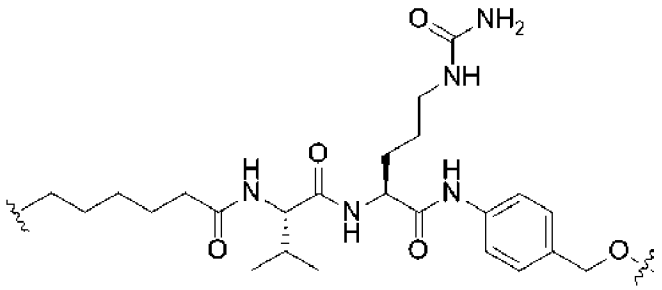
где  указывает на атомы, через которые остаток **RG**^{1} или **RG**^{2} связан с соседними группами в формуле.

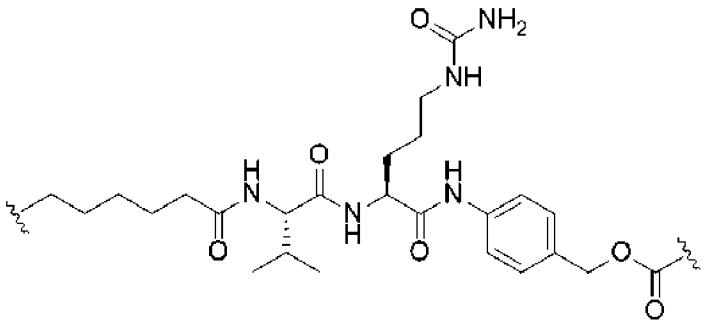
[0195] В некоторых или любых случаях для любого соединения и/или конъюгата антитело-лекарственное средство, описанных выше и в настоящем документе, **SP**, **SP**^{1} и **SP**^{2} независимо в каждом случае отсутствуют или выбираются из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, -NH-, -S-, -O-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(-O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$, $(\text{глицина})_4$-серина и их комбинаций, при этом нижний индекс **e** представляет собой целое число от 0 до 4, нижний индекс **u** представляет собой целое число от 1 до 8, и нижний индекс **v** представляет собой целое число от 1 до 8.

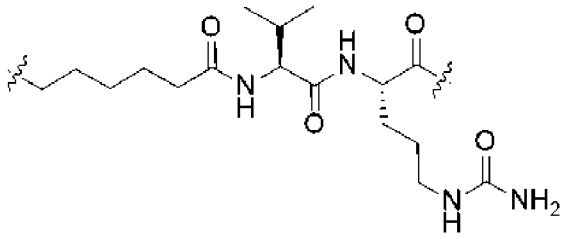
[0196] В некоторых или любых случаях для любого соединения и/или конъюгата антитело-лекарственное средство, описанных выше и в настоящем документе, n представляет собой целое число от 1 до 10, от 1 до 8, от 1 до 6, от 1 до 4, или n равно 1, 2, 3 или 4.

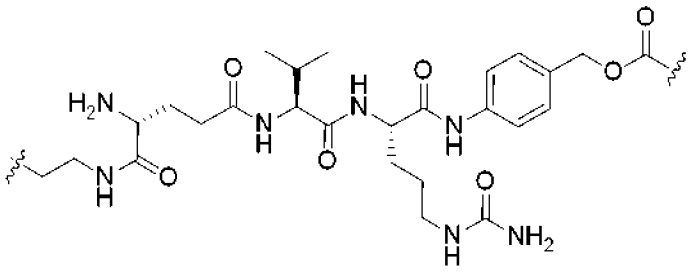
[0197] В некоторых или любых случаях для любого соединения, линкер-нагрузки и/или конъюгата антитело-лекарственное средство, описанных выше и в настоящем документе,

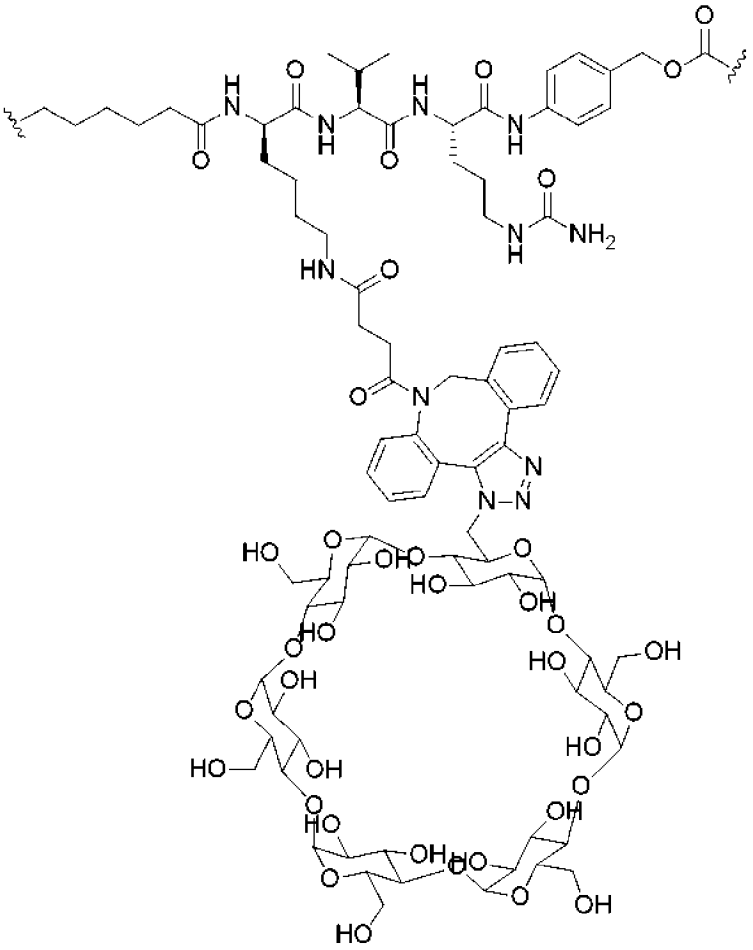
 представляет собой

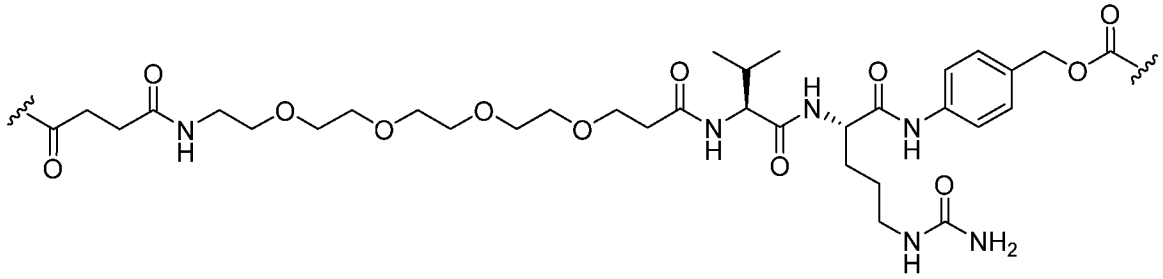


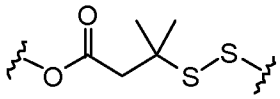


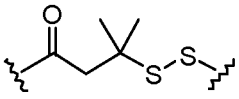


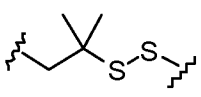


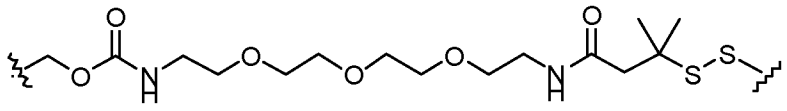


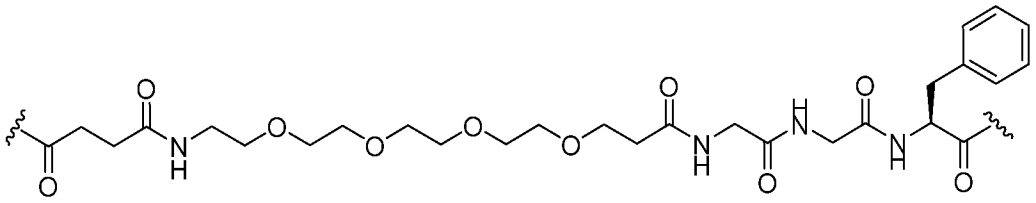


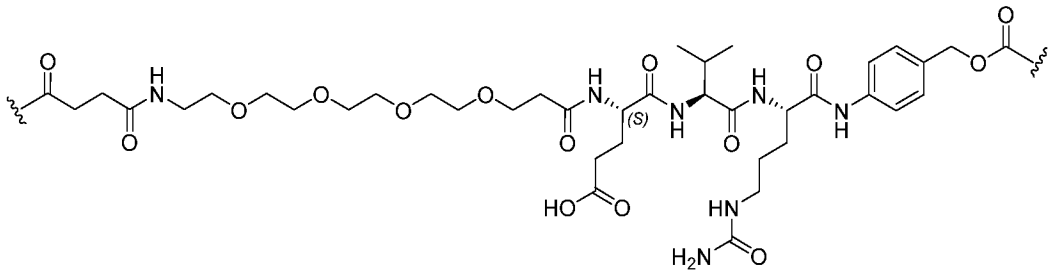


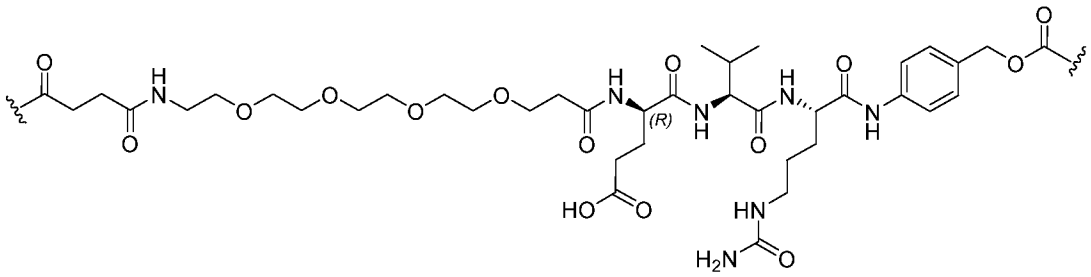


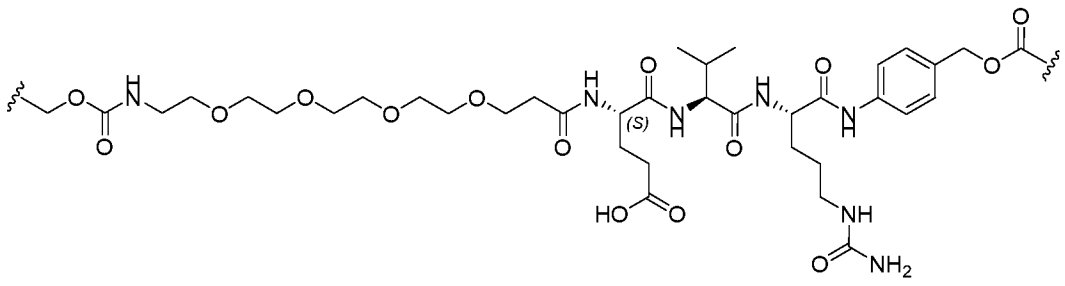


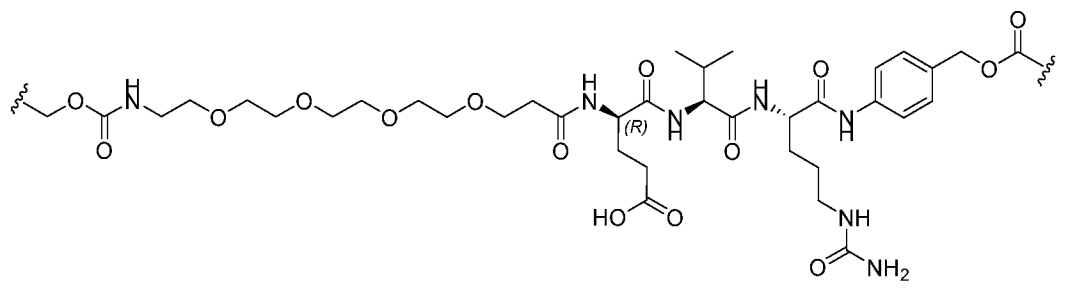


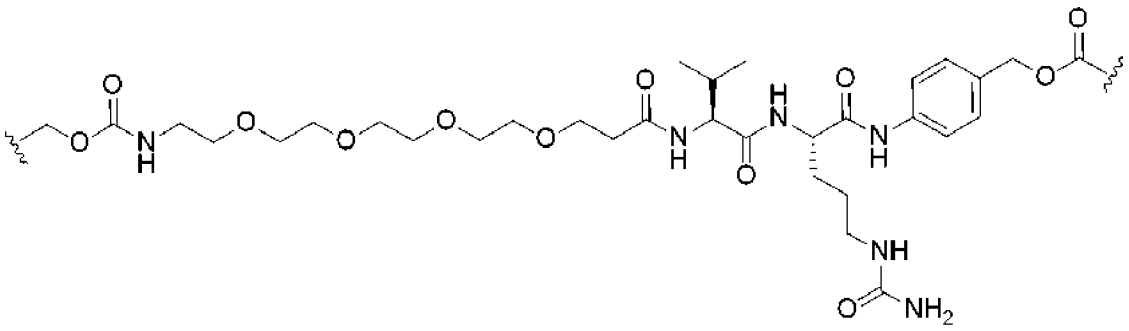


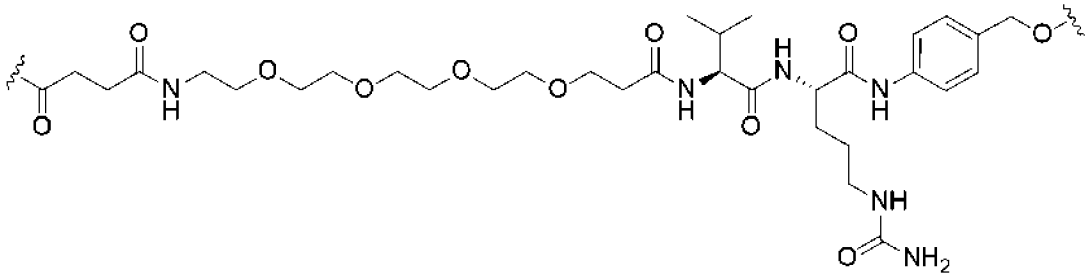


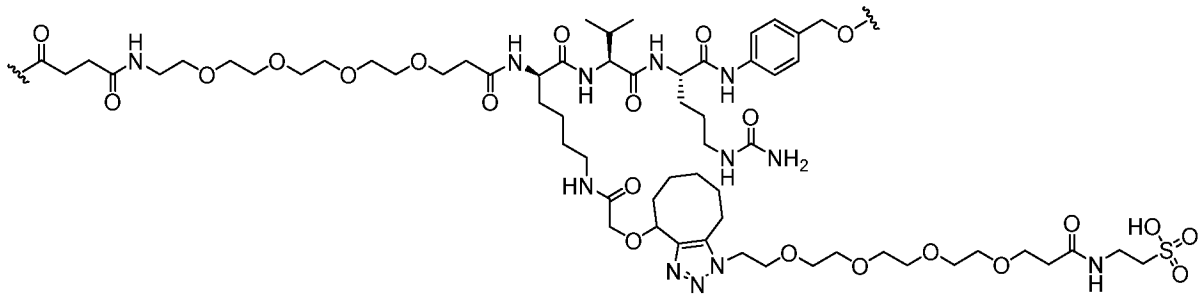


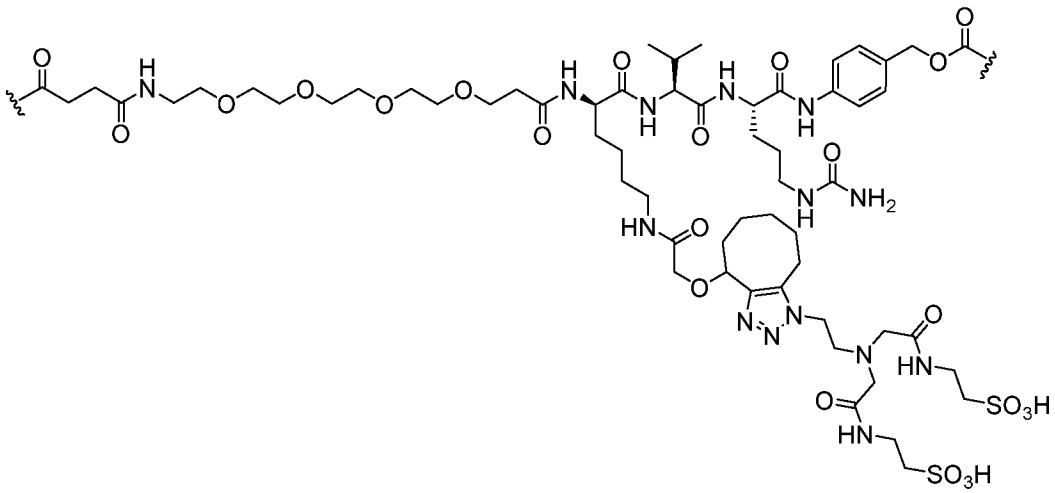


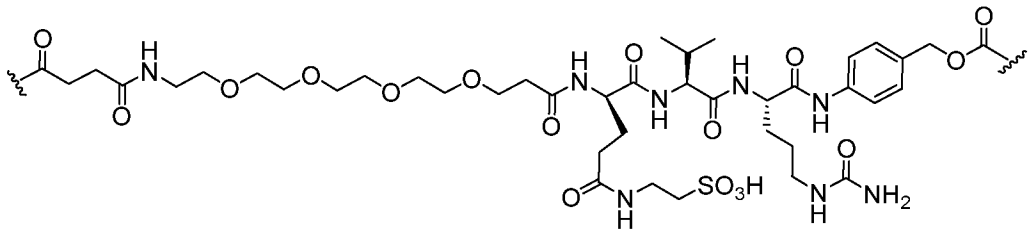


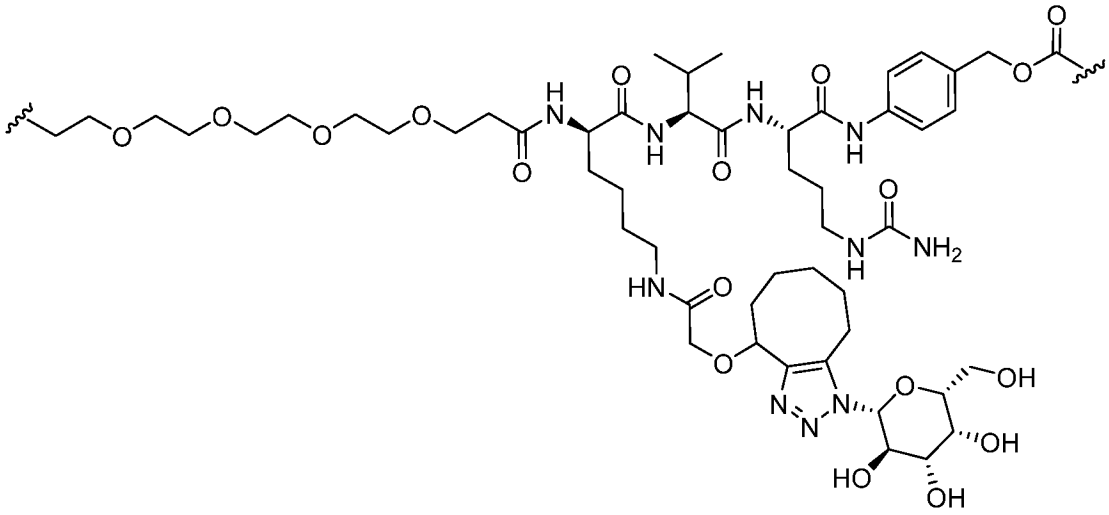


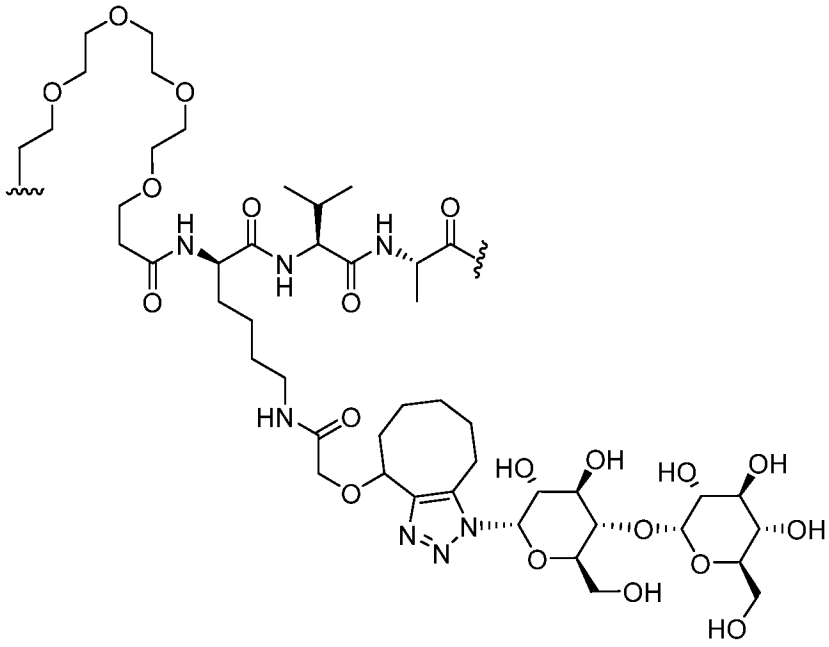


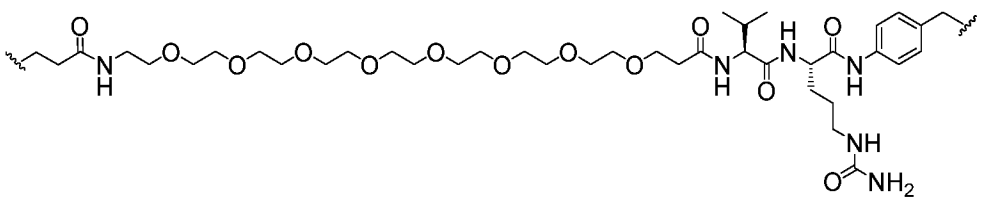




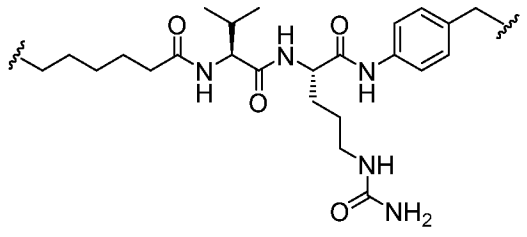








или



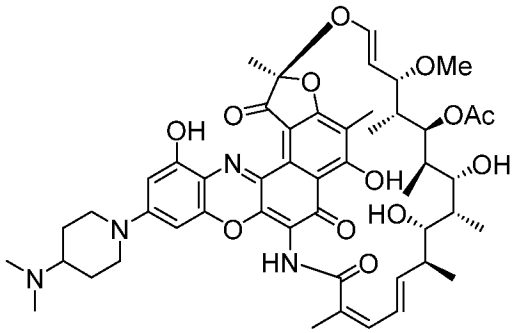
[0198] В некоторых или любых вариантах осуществления для любого соединения и/или конъюгата антитело-лекарственное средство, описанных выше и в настоящем документе, антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгированы со стероидной нагрузкой через линкер или линкер-спейсер.

[0199] В некоторых или любых вариантах осуществления для любого соединения и/или конъюгата антитело-лекарственное средство, описанных выше и в настоящем документе, антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгированы с нагрузкой модулятора LXR через линкер.

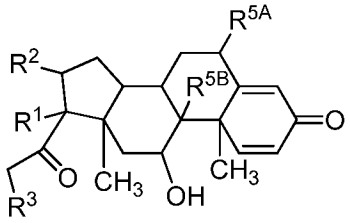
[0200] В некоторых или любых вариантах осуществления для любого соединения и/или конъюгата антитело-лекарственное средство, описанных выше и в настоящем документе, антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгированы с нагрузкой аналога рифамицина через линкер.

Нагрузки

[0201] В Формуле (I) **BA** – [**L** – **PA**]$_n$ **PA** может быть любой нагрузкой, которая считается полезной. Такие нагрузки включают малые молекулы, которые оказывают терапевтическое действие посредством их доставки через MSR1. В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой остаток молекулы, который выбирается из группы, состоящей из стероида, модулятора LXR или аналога рифамицина. В некоторых случаях **PA** представляет собой стероид. В некоторых случаях **PA** представляет собой модулятор LXR. В некоторых случаях **PA** представляет собой агонист LXR. В некоторых вариантах осуществления **PA** представляет собой антагонист LXR. Иллюстративные нагрузки модулятора LXR описаны, например, в Заявке США №62/508,327, поданной 18 мая 2017 года, под названием “БИС-ОКТАГИДРОФЕНАНТРЕНА КАРБОКСАМИДЫ И ИХ БЕЛКОВЫЕ КОНЪЮГАТЫ,” опубликованной как US 2018/0334426, которая включается в настоящий документ полностью посредством ссылки. В некоторых случаях **PA** представляет собой аналог рифамицина, включая любой описанный здесь аналог рифамицина. В некоторых случаях **PA** представляет собой аналог рифамицина, имеющий следующую структуру:



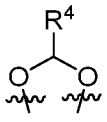
[0202] В определенных вариантах осуществления нагрузками в соединениях Формулы (**I**) являются глюкокортикоиды согласно Формуле (**A**):



Формула (**A**)

или их фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где

R^1 и R^2 - независимо –H, алкил, алкил-C(O)-O–, –OH или гало; или R^1 и R^2 вместе образуют  ,

где R^4 представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил,

где алкил, арил, арилалкил и N-содержащий гетероциклоалкил независимо в каждом случае могут быть замещены $-NR^{Aa}R^{Ab}$;

R^3 представляет собой –OH, R^Z-C(O)-**X**–, гетероалкил, пиперидинил, $–NR^{Aa}R^{Ab}$, -оксиарил–$NR^{Aa}R^{Ab}$ или $-Z-A'(R^P)_t$;

R^Z представляет собой алкил;

X представляет собой O или NR^{Aa};

Z представляет собой S, S(O), $S(O)_2$, SO_2NR^{Aa}, O, $C(O)NR^{Aa}$, C(O) или NR^{Aa};

A′ представляет собой арил, арилалкил или гетероарил;

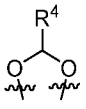
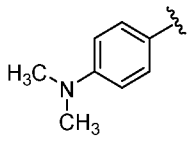
R^P представляет собой независимо в каждом случае гало, необязательно замещенный алкил, –OH или $-NR^{Aa}R^{Ab}$;

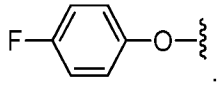
R^{Aa} и R^{Ab} представляет собой независимо в каждом случае –H, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный арил;

нижний индекс **a** - целое число от 0 до 19; и

t представляет собой целое число от 1 до 3;

при условии, что:

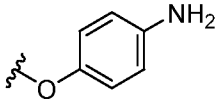
(1) R^3 не является –OH (a), когда R^1 представляет собой –OH или (b), когда R^1 и R^2 вместе образуют  , где R^4 - C_{1-9} алкил или  и

(2) R^3 не является  .

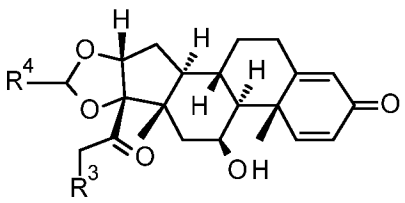
и

R^{5A} и R^{5B} представляет собой в каждом случае независимо гало или атом водорода;

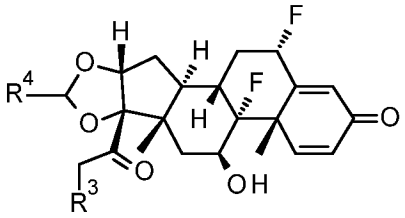
где группа R^3 или R^4 связана с линкером.

[0203] В некоторых из таких вариантов осуществления R^3 - NH_2. В некоторых других из таких вариантов осуществления R^3 представляет собой  , где  обозначает атом, через который R^3 присоединяется к соседним группам в Формуле (I).

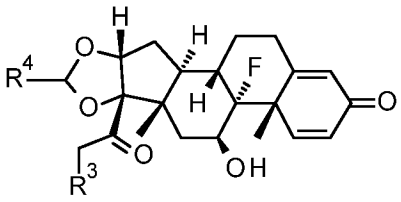
[0204] В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой стероид. Иллюстративные стероидные нагрузки описаны, например, в Заявке США № 62/614,905, поданной 8 января 2018 года, под названием “СТЕРОИДЫ И ИХ КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛ”, и Заявке США № 15/806,197, поданной 7 ноября 2017 года, под названием “СТЕРОИДЫ И ИХ БЕЛКОВЫЕ КОНЪЮГАТЫ,” опубликованной как US 2018/0155389, каждая из которых включается в настоящий документ полностью посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления PA выбирается из



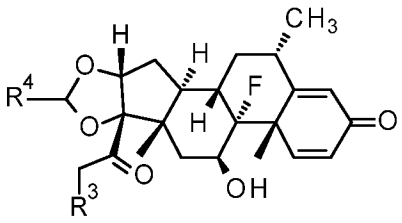
1110



1120

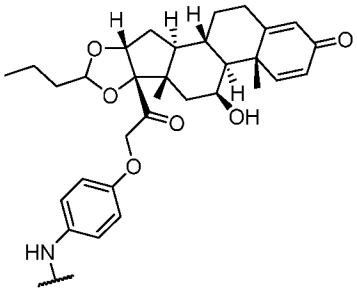


1130

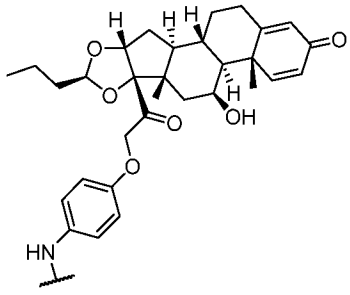


1140

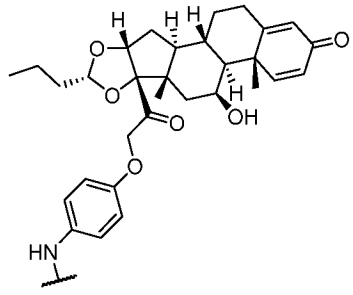
или их фармацевтически приемлемой соли, сольвата или стереоизомерной формы. В определенных вариантах осуществления согласно любой из Формул 1110-1140 R^3 представляет собой -O-арил, -$NR^{Aa}R^{Ab}$, -алкилен-$NR^{Aa}R^{Ab}$, -X-арилен-Y-$NR^{Aa}R^{Ab}$, -X-гетероарилен-Y-$NR^{Aa}R^{Ab}$ или N-содержащий гетероциклоалкил; где X отсутствует, -N-, -CH_2- или -O-; где Y отсутствует или -CH_2-; и R^4 представляет собой алкил, арил, алкиларил или арилалкил. В определенных вариантах осуществления R^3 представляет собой -O-арилен-$NR^{Aa}R^{Ab}$, -O-гетероарилен-$NR^{Aa}R^{Ab}$; где арил или гетероарил необязательно замещен галогеном, дейтерием, гидроксилом или метоксилом. В определенных вариантах осуществления R^3 представляет собой -O-фенил-$NR^{Aa}R^{Ab}$, -O-гетероарилен-$NR^{Aa}R^{Ab}$; где фенил или гетероарил необязательно замещен галогеном или дейтерием. В определенных вариантах осуществления R^4 представляет собой n-пропил. В определенных вариантах осуществления каждый из R^{Aa} и R^{Ab} представляет собой независимо водород или алкил. В конкретных вариантах осуществления один из R^{Aa} и R^{Ab} замещен связью с линкером (например, **L** или **LL**). В определенных вариантах осуществления **PA** -



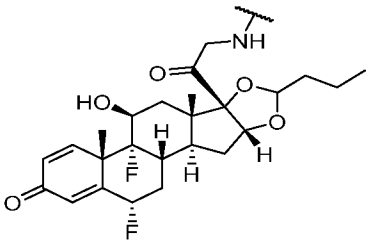
,



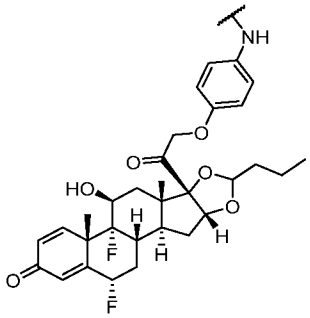
,



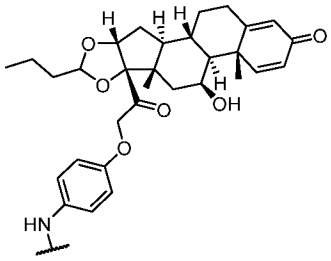
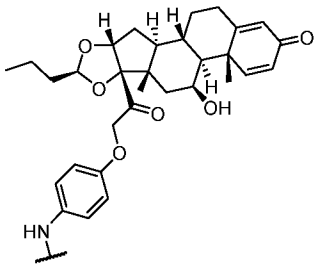
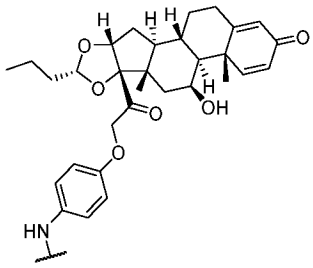
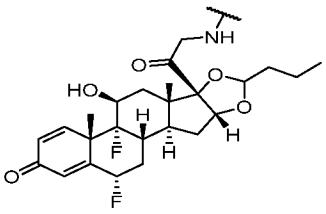
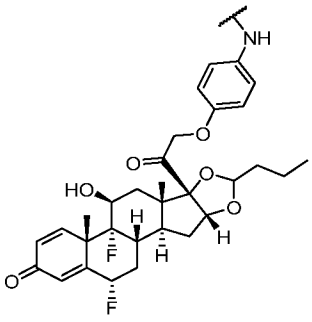
,



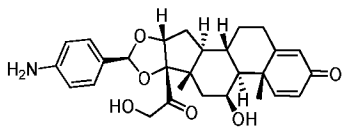
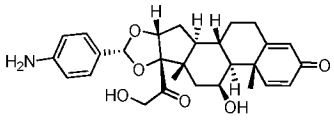
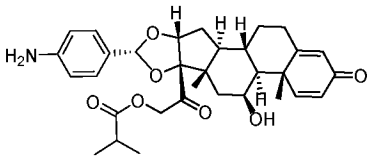
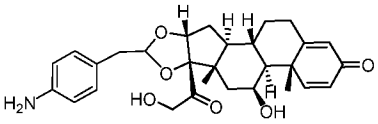
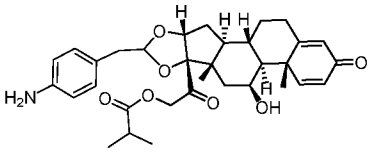
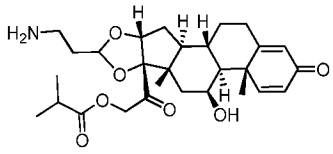
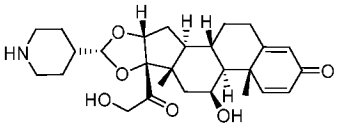
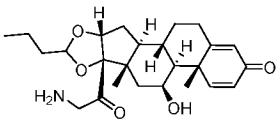
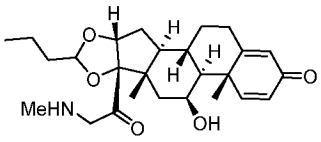
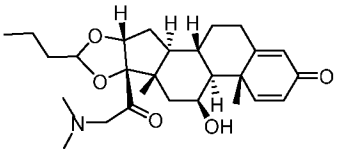
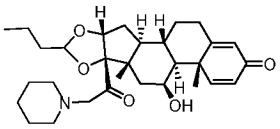
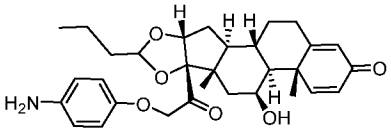
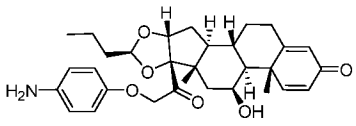
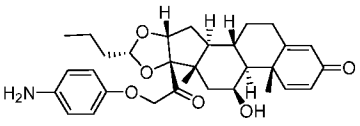
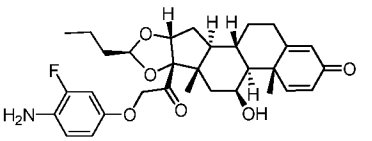
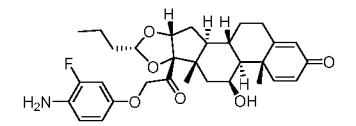
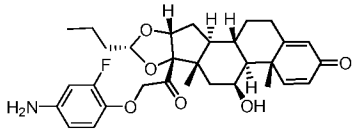
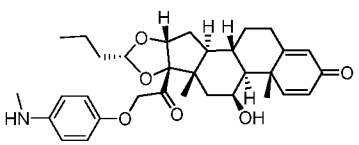
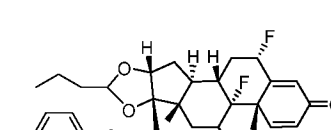
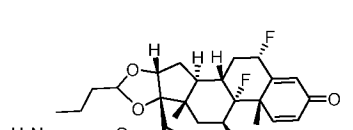
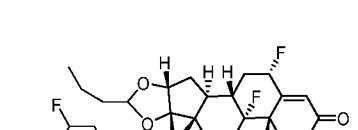
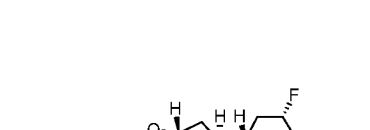
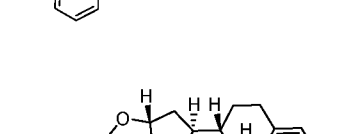
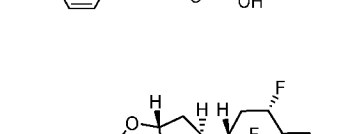
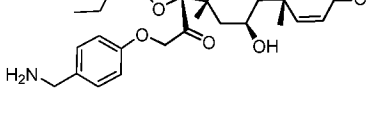
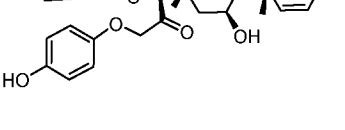
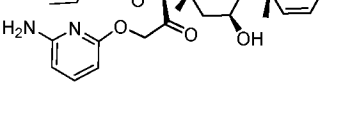
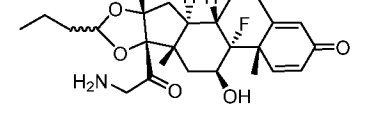
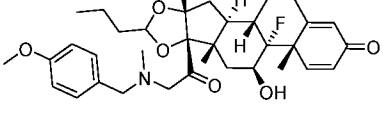
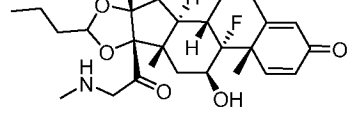
или

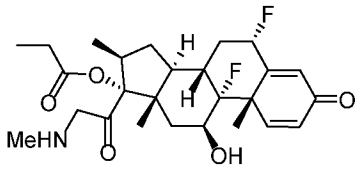
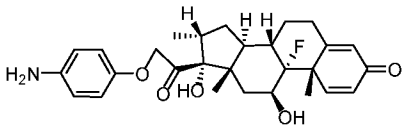
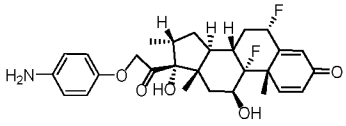
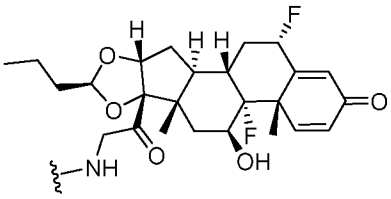
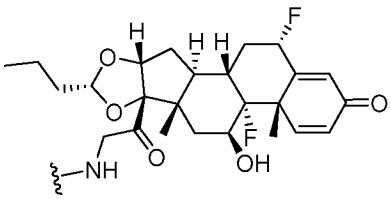
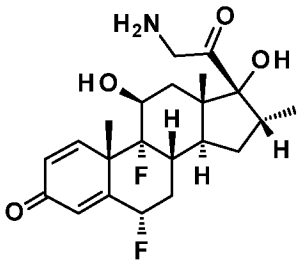
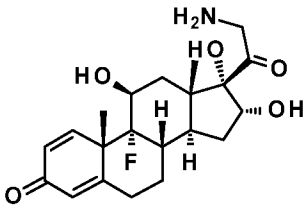
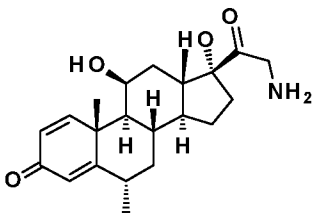
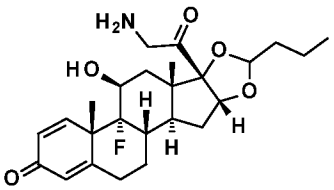
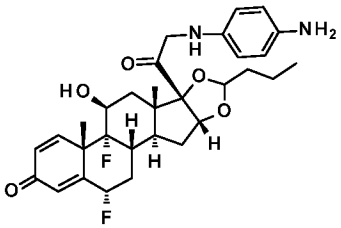
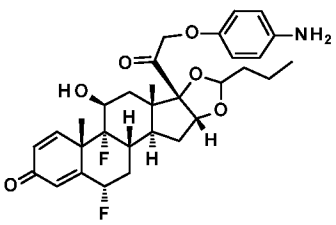
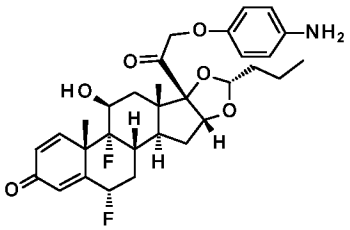
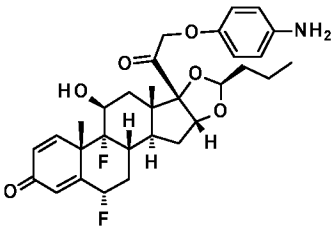
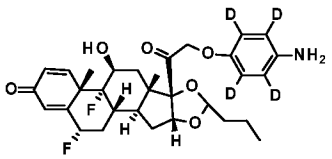
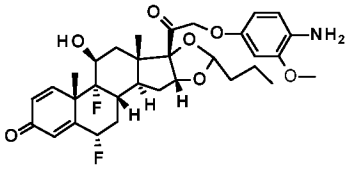
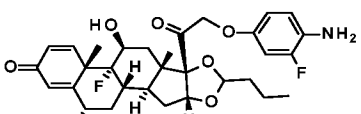
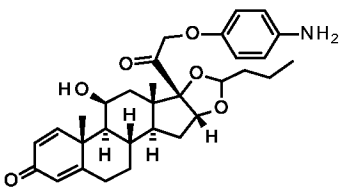
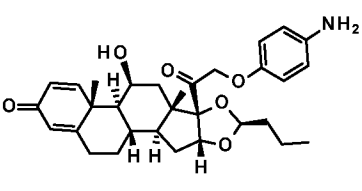
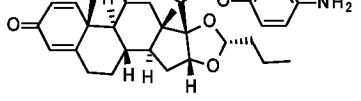
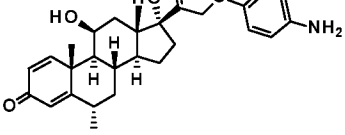
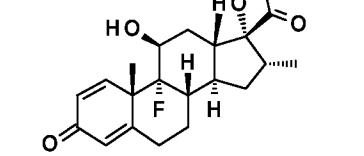


,

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** это  или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** это  или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** это  или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** это  или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** это  или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер. В таких вариантах осуществления волнистая линия обозначает связь с линкером (например, **L** или **LL**).

[0205] В определенных вариантах осуществления **PA** выбирается из следующих остатков:

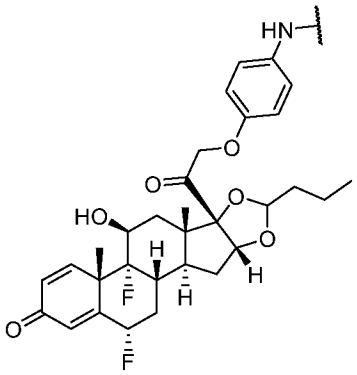




































,

















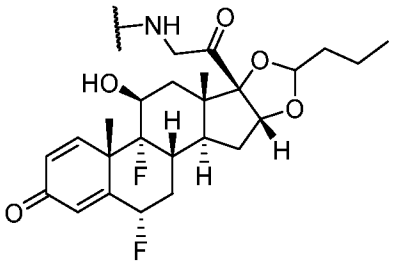


или фармацевтически приемлемой соли или стереоизомера. В конкретных вариантах осуществления первичный или вторичный амин связан с линкером **L**, в результате чего образуется линкер-нагрузка, которая связывается с **BA**, в результате чего образуется конъюгат. Специалистам известно, что вышеуказанные соединения могут соединяться с L связью с первичной или вторичной аминной группой, замещая H.

[0206] В некоторых вариантах осуществления антитела к MSR1, описанные здесь, конъюгированы с:

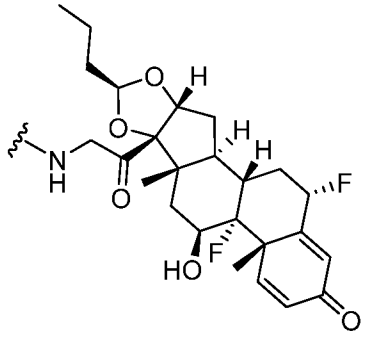


или

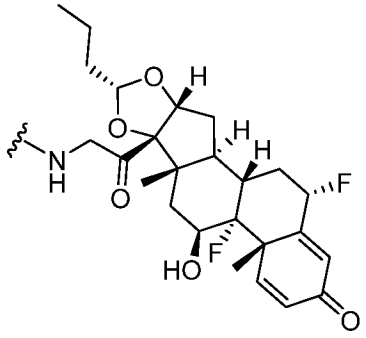


.

[0207] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь конъюгаты антитело-лекарственное средство содержат стероидную нагрузку, при этом стероидная нагрузка выбирается из группы, состоящей из:

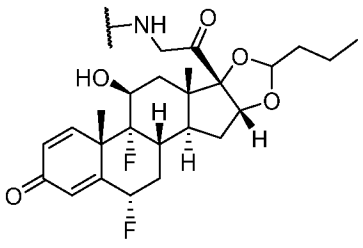


и

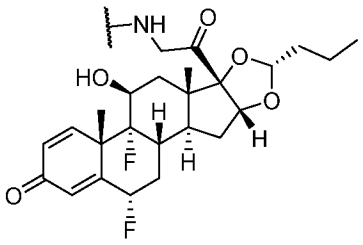


или их смесей.

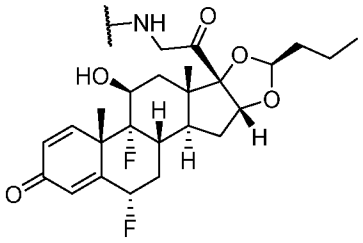
[0208] В определенных вариантах осуществления **PA**:



или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA**:

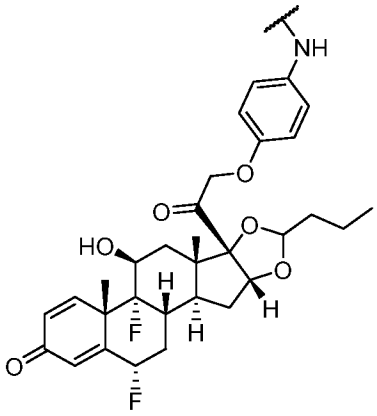


или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA**:

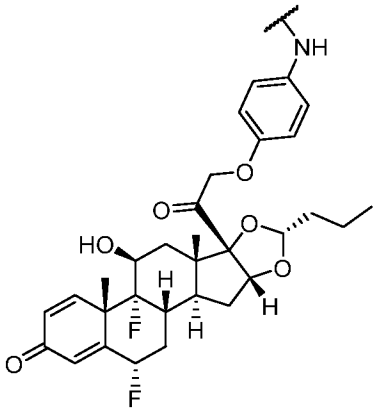


или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер.

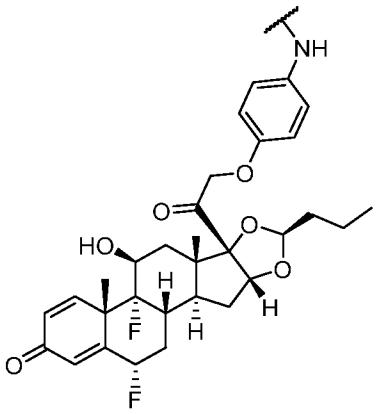
[0209] В определенных вариантах осуществления **PA**:



или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA**:

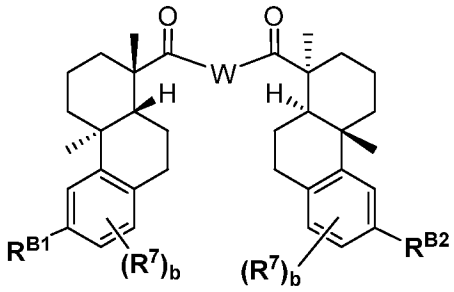


или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой



или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер.

[0210] В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой модулятор X рецептора печени (LXR). В определенных вариантах осуществления **PA** соответствует Формуле (**B**):



Формула (**B**)

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где

W представляет собой $–CH_2–$, –N(H)– или –O–;

$\mathbf{R^{B1}}$ представляет собой –H, –OH, $–NH_2$, алкил или $–OP(O)(O\mathbf{R^6})_2$;

$\mathbf{R^{B2}}$ представляет собой –H, –OH, $–CH_2NH_2$, $\mathbf{R^{B3}}$, $\mathbf{R^{B4}}$, $\mathbf{R^{B5}}$ или $–O–\mathbf{R^{B5}}$, где $\mathbf{R^{B1}}$ и $\mathbf{R^{B2}}$ - одновременно не является –H;

$\mathbf{R^{B3}}$ представляет собой $–N(\mathbf{R^6})_2$;

$\mathbf{R^{B4}}$ представляет собой **–X–Y–Z**;

X выбирается из группы, состоящей из –O– и –N(H)–;

Y выбирается из группы, состоящей из алкилена, замещенного алкилена (включая, помимо прочего, оксо замещение, т.е. =O)), гетероалкилена и замещенного гетероалкилена (включая, помимо прочего, оксо замещение, т.е. =O));

Z выбирается из группы, состоящей из –OH и $–NH_2$;

$\mathbf{R^{B5}}$ представляет собой алкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил включает один, два или три гетероатома, выбираемых из азота и кислорода, и включает

минимум один –OH и $–CH_2OH$ заместитель или минимум один первичный или вторичный азот, например, O-глюкозу;

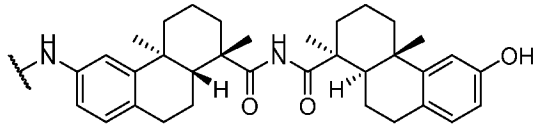
каждый $\mathbf{R^6}$ - в каждом случае –H, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептид или алкил; и

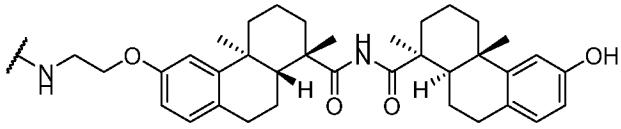
каждый $\mathbf{R^7}$ - независимо гало, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси, –CN, O-глюкоза, O-аминокислотный остаток и O-$ПЭГ_b$, где каждый нижний индекс **b** - целое число от 0 до 3;

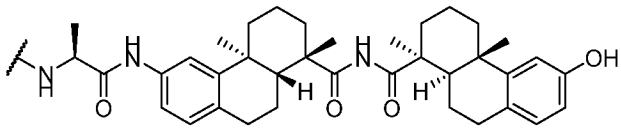
где группа $\mathbf{R^{B1}}$, $\mathbf{R^{B2}}$ или $\mathbf{R^7}$ связана с линкером.

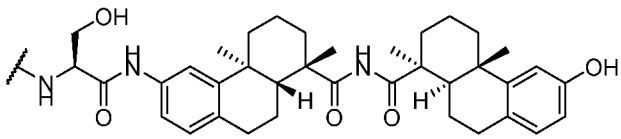
[0211] В конкретных вариантах осуществления $\mathbf{R^{B1}}$ или $\mathbf{R^{B2}}$ замещен связью с линкером (например, **L** или **LL**).

[0212] В определенных вариантах осуществления **PA** выбирается из:



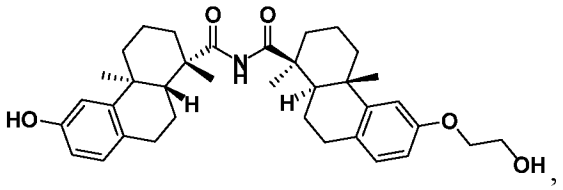


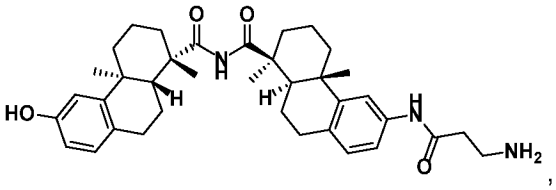


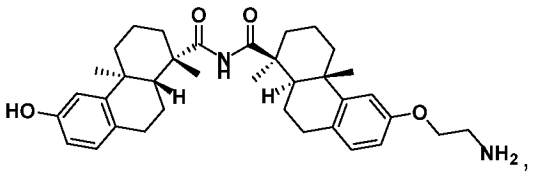


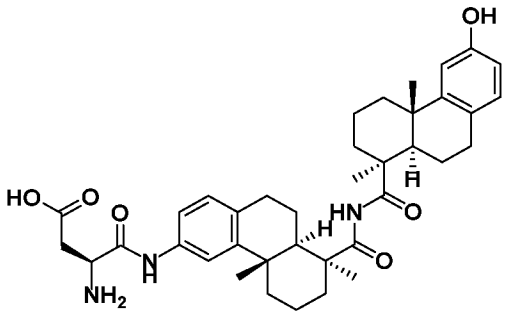
[0213] В конкретных вариантах осуществления волнистая линия в  означает связь с линкером (например, **L** или **LL**).

[0214] В определенных вариантах осуществления нагрузка Формулы (B) выбирается из группы, состоящей из:

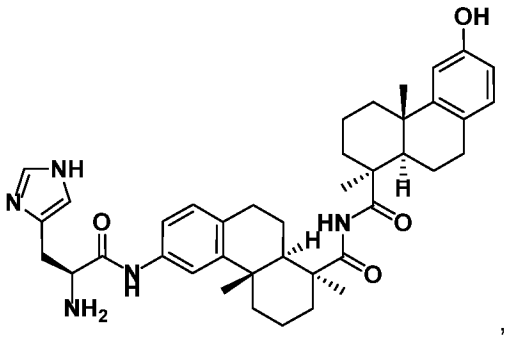








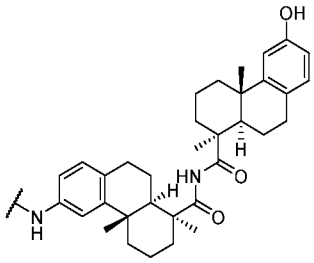
и



,

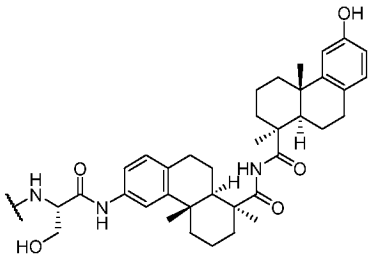
или их фармацевтически приемлемой соли, сольвата или стереоизомерной формы.

[0215] В определенных вариантах осуществления **PA**:



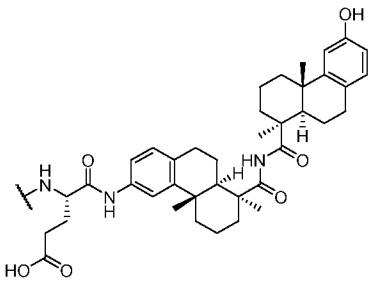
или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер.

[0216] В определенных вариантах осуществления **PA**:



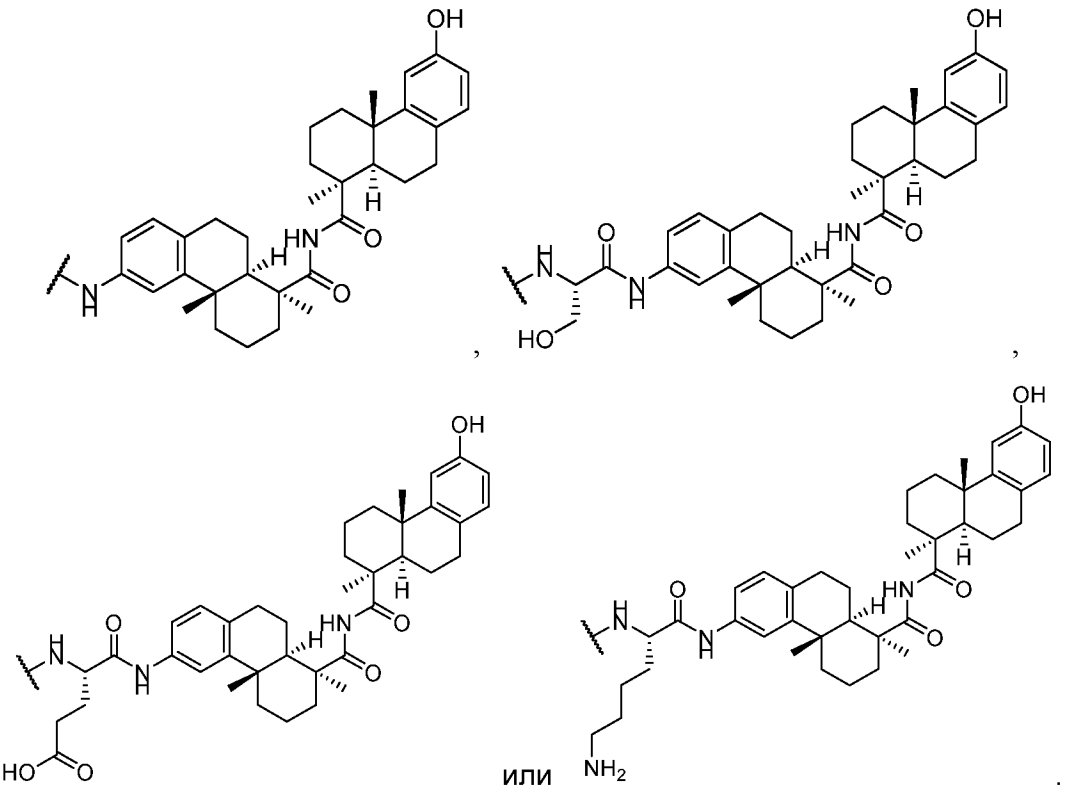
или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер.

[0217] В определенных вариантах осуществления **PA**:

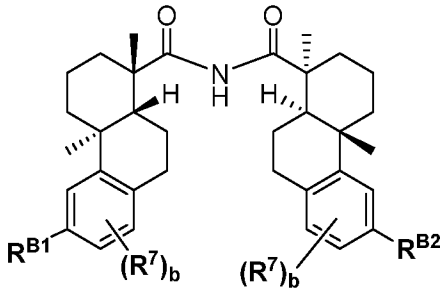


или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер.

[0218] В некоторых вариантах осуществления антитела к MSR1, описанные здесь, конъюгированы с:



[0219] В некоторых вариантах осуществления **PA** представляет собой модулятор X рецептора печени (LXR) согласно Формуле (**B-1**):



Формула **(B-1)**

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма,

где

$\mathbf{R^{B1}}$ представляет собой –N(H)$\mathbf{R^8}$ или –N($\mathbf{R^9}$)$_2$;

$\mathbf{R^{B2}}$ представляет собой –N(H)$\mathbf{R^8}$;

каждый $\mathbf{R^8}$ представляет собой независимо в каждом случае водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый компонент или алкил;

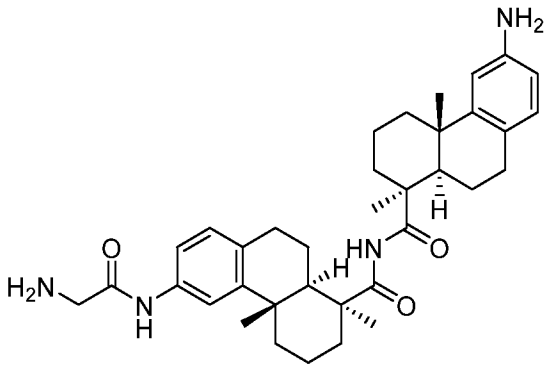
$\mathbf{R^9}$ представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбираемые из азота

и кислорода, и, когда он является замещенным, включает минимум один –OH и -CH_2OH или минимум один первичный или вторичный азот;

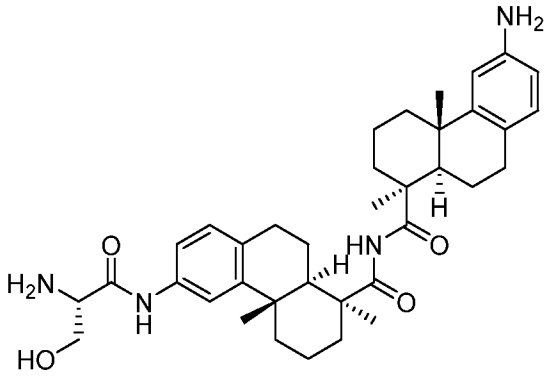
каждый R^7 представляет собой независимо гало, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси, –CN, O-глюкоза, O-аминокислотный остаток или O-ПЭГ$_b$, где каждый нижний индекс **b** - целое число от 0 до 3;

где группа R^{B1}, R^{B2} или R^7 связана с линкером.

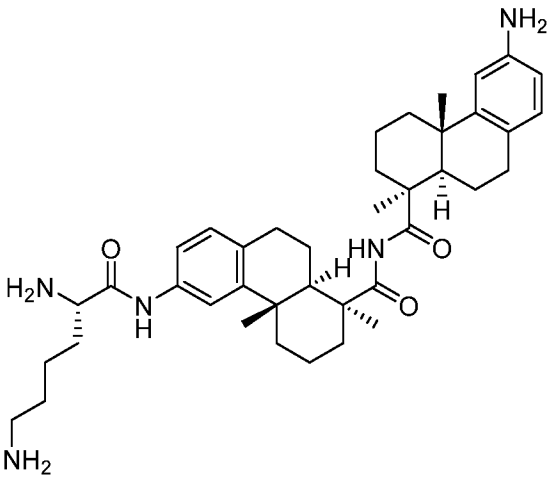
[0220] В некоторых случаях соединение Формулы (**B-1**) выбирается из группы, состоящей из:



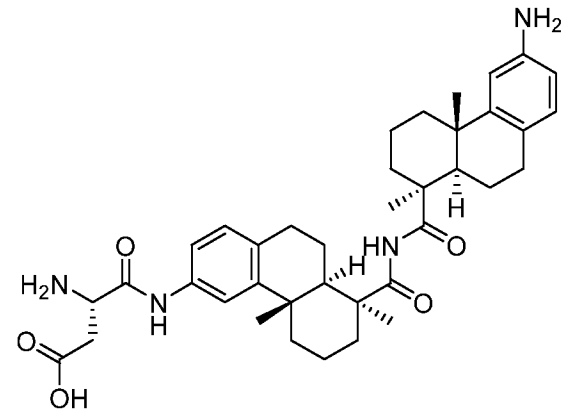
P4B;



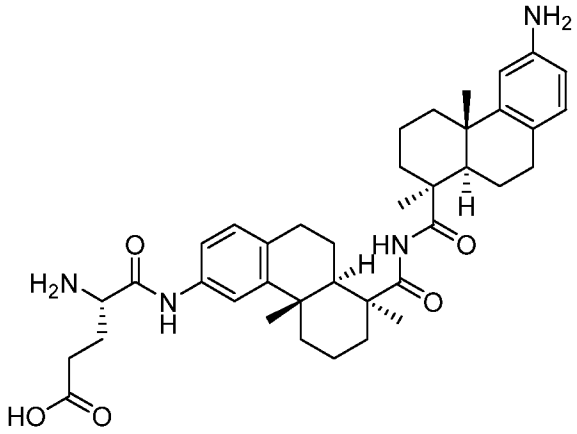
P5B;



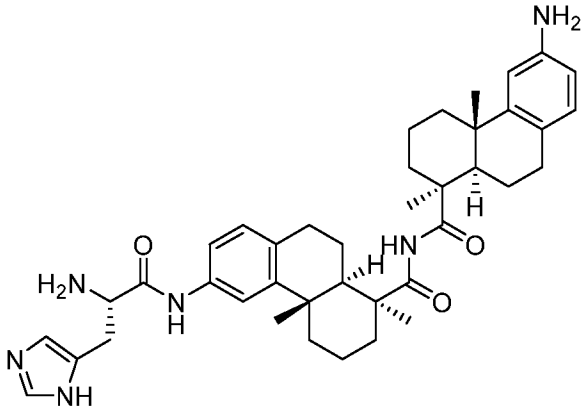
P6B;



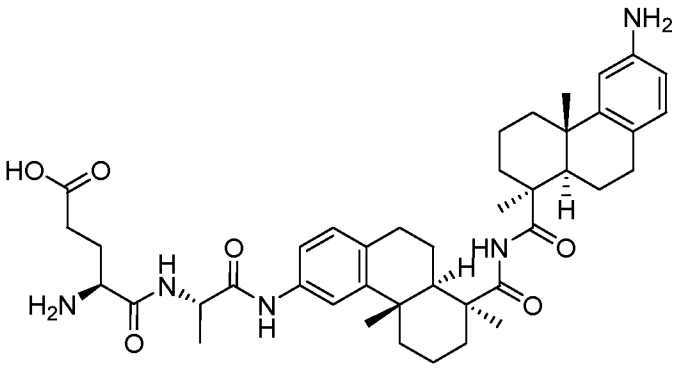
P7B;



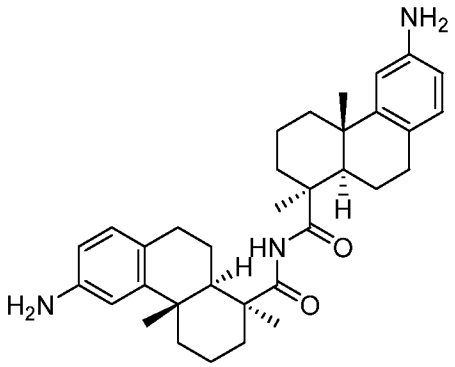
P8B;



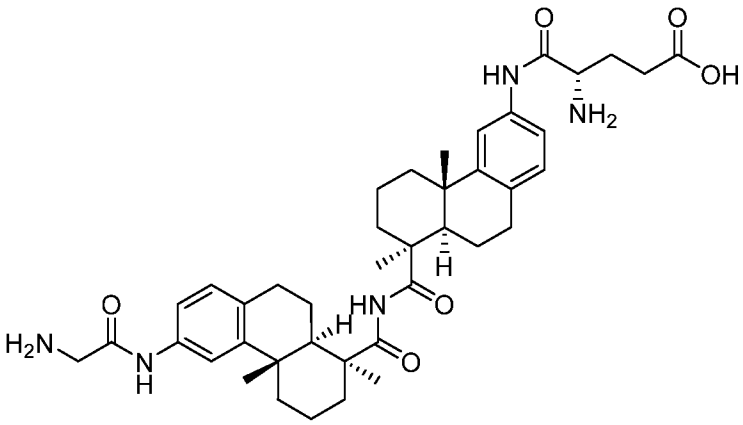
P9B;



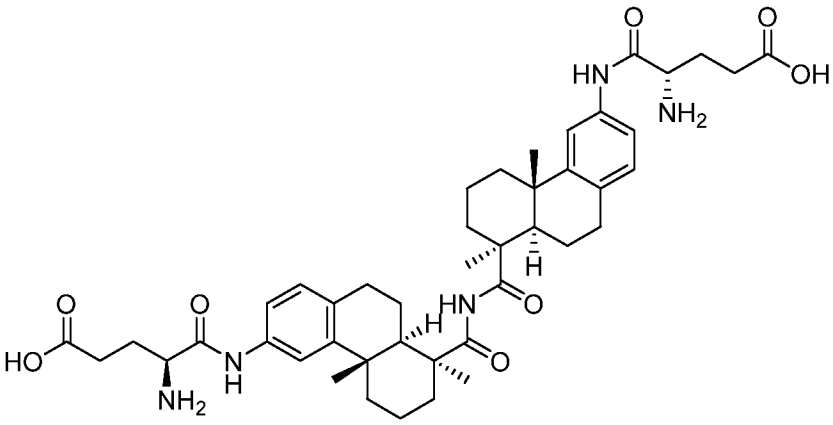
P12B;



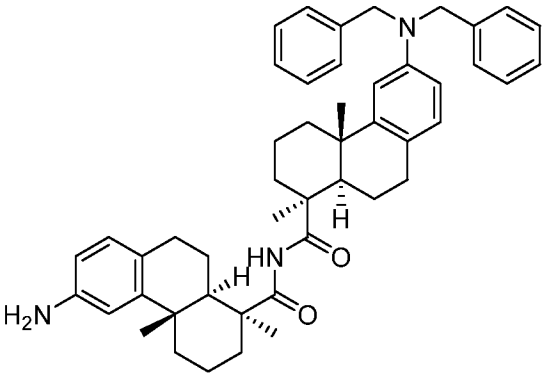
P2B;



P10B;



P11B; и

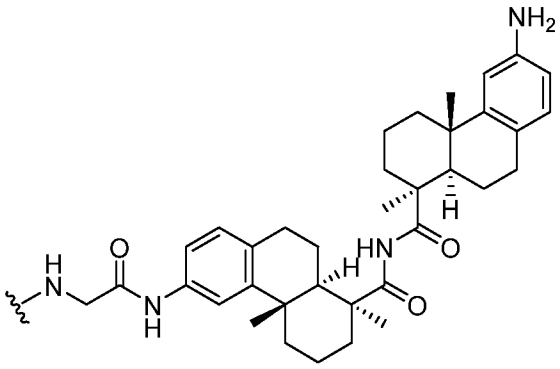


P3B;

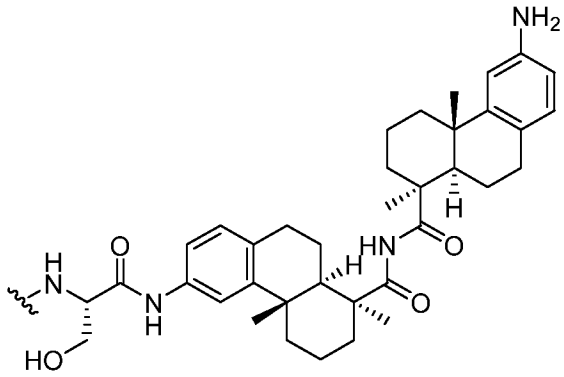
или их фармацевтически приемлемой соли или сольвата.

[0221] В конкретных вариантах осуществления R^{B1} или R^{B2} замещен связью с линкером (например, **L** или **LL**).

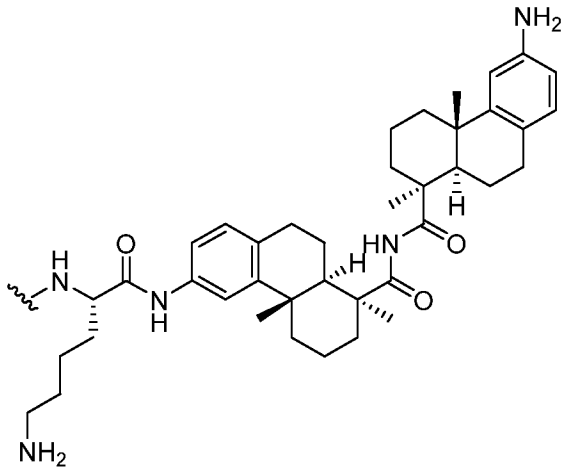
[0222] В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой



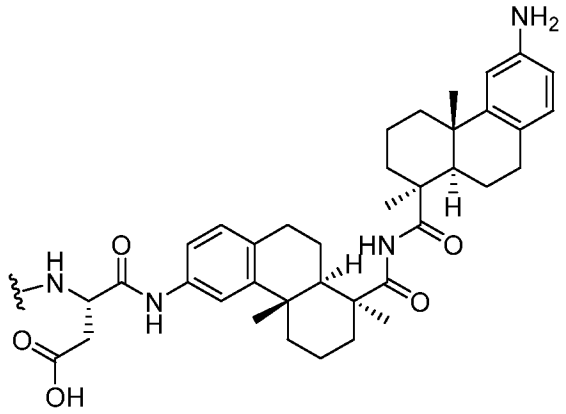
P4B, или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой



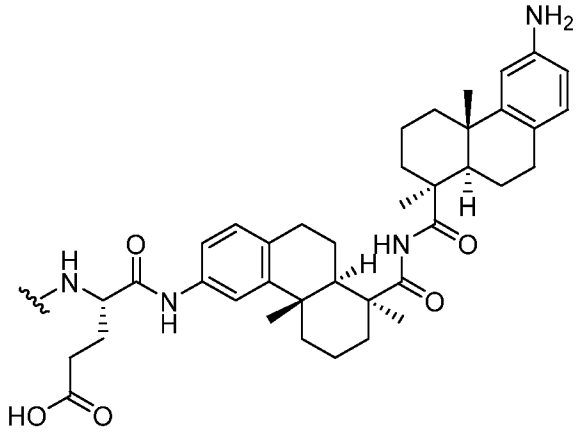
P5B, или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой



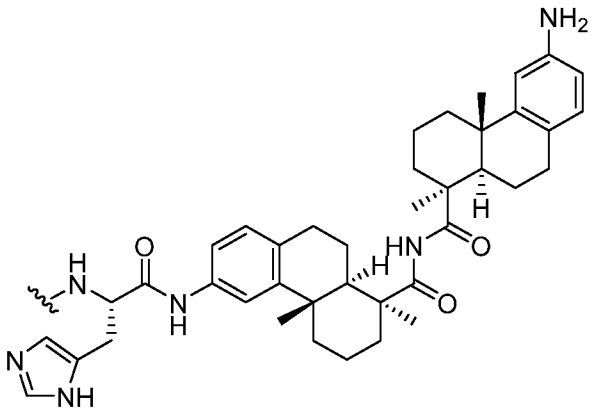
P6B, или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой



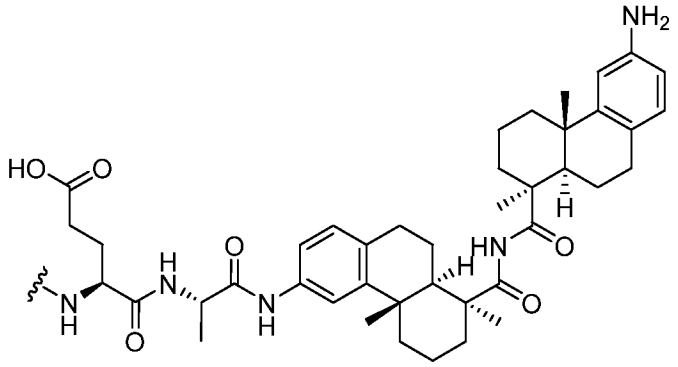
P7B, или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой



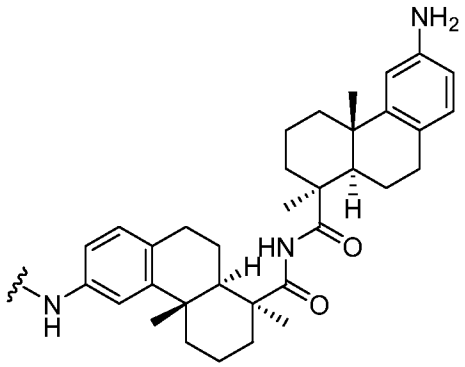
P8B, или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой



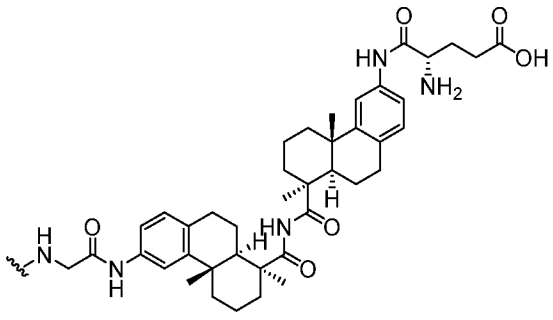
P9B, или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления



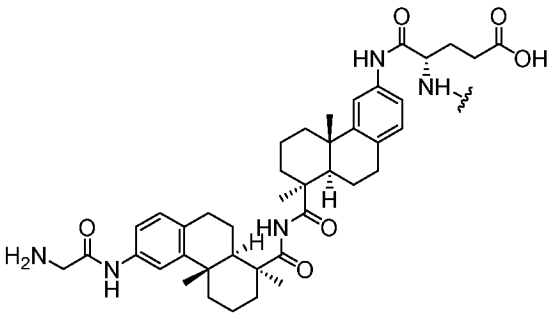
PA представляет собой **P12B,** или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой



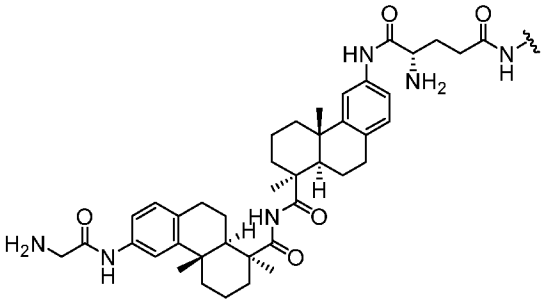
P2B, или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер. В определенных вариантах осуществления **PA** представляет



собой или

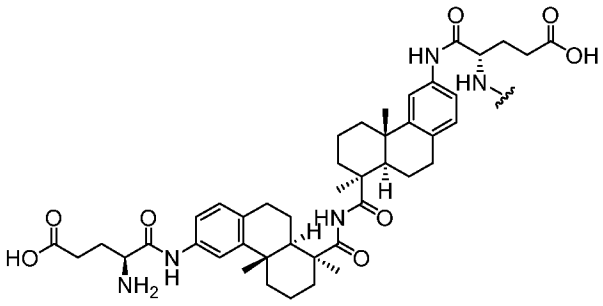


или

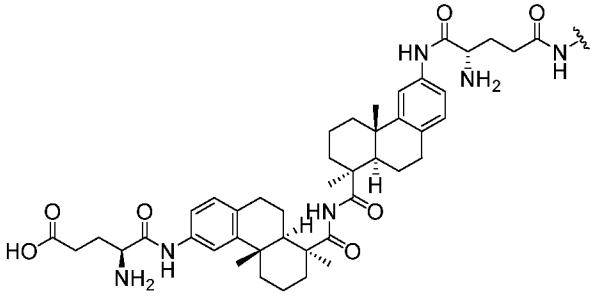


P10B,

или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер. В некоторых из таких вариантов осуществления группа карбоновой кислоты **P10B** связана с линкером через амидную связь, показанную выше. В определенных вариантах осуществления **PA** представляет собой

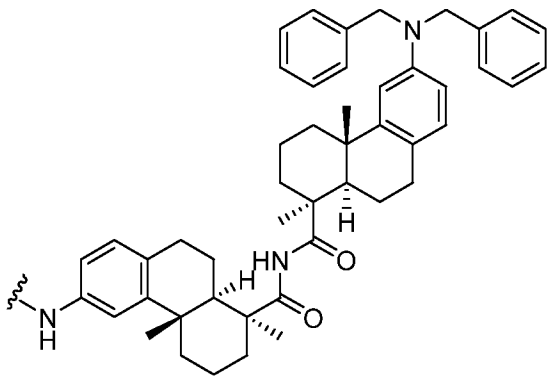


или



P11B,

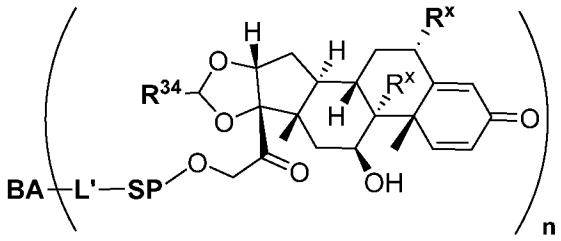
или фармацевтически приемлемую соль или стереоизомер. В некоторых из таких вариантов осуществления группа карбоновой кислоты **P11B** связана с линкером через амидную связь, показанную выше. В определенных вариантах осуществления **PA** это



P3B, или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер.

Для любых вариантов осуществления, описанных в данном пункте, волнистая линия в  обозначает связь с линкером (например, **L** или **LL**) согласно приведенному здесь описанию.

[0223] В группе вариантов осуществления здесь представлены соединения Формулы (**III**):

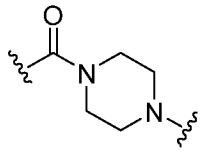
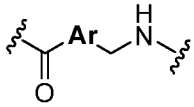


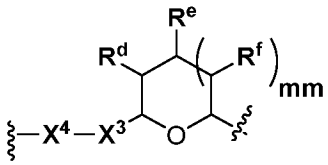
Формула (**III**);

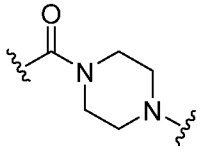
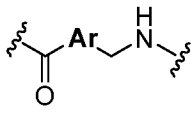
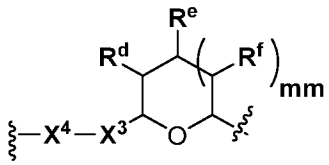
или их фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер,

где:

R^{34} представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил;

оба R^x представляет собой водород; и **SP** представляет собой -C(O)-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-X^1- , где X^1 присоединен к **L′** в Формуле (**III**), -C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}-алкилен)-S- , где S присоединен к **L′** в Формуле (**III**), -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-(C_1-C_{10}-алкилен)-S- , где S присоединен к **L′** в Формуле (**III**),  где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N)- к **L′** в Формуле (**III**), -CH_2-NH- , где N присоединен к **L′** в Формуле (III),  , где N присоединен к **L′** в Формуле (**III**) и где **Ar** представляет собой необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен, -(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50a}- , где NR^{50a}

присоединен к **L′** в Формуле (**III**), -C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}- , где N**R**^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (**III**) и где каждый C_1-C_{10}-алкилен независимо необязательно замещен одной или более гидрокси, -C(O)-N(**R**^{35})-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)NH-**X**^{2}- , где **X**^{2} присоединен к **L′** в Формуле (**III**), или  где **X**^{4} присоединен к **L′** в Формуле (**III**); или

оба **R**^{x} - фтор; и **SP** - -C(O)-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-**X**^{1b}- , где **X**^{1b} присоединен к**L** в Формуле (**III**), -C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}-алкилен)-**X**^{1b}- , где **X**^{1b} присоединен к **L′** в Формуле (**III**),  , где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) - к **L′** в Формуле (**III**), -CH_2-NH- , где N присоединен к **L′** в Формуле (III),  где N присоединен к **L′** в Формуле (**III**) и где **Ar** - необязательно замещенный арилен или необязательно замещенный гетероарилен, -(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}- , где N**R**^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (**III**), -C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}- , где N**R**^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (**III**) и где каждый C_1-C_{10}-алкилен независимо необязательно замещен одной или более гидрокси, -C(O)-N(**R**^{35})-(C_1-C_{10}-алкилен)-C(O)NH-**X**^{2}- , где **X**^{2} присоединен к**L′** в Формуле (**III**), или  где **X**^{4} присоединен к **L′** в Формуле (**III**); и

X^{1} представляет собой -N(C_{1-6}алкил)-;

X^{1b} представляет собой -S-, -NH- или -N(C_{1-6}алкил)-;

X^{2} представляет собой -NH-;

X^{3} представляет собой-CH_2-, **X**^{3} - -CH_2-O-(C_1-C_{10}-алкилен)-C(O)- , где C(O) присоединен к **X**^{4}, или **X**^{3} представляет собой -C(O)-;

X^{4} представляет собой -O-;

R^{35} представляет собой H, -OH, -OCH_3 или C_{1-6}алкил;

R^{50} и **R**^{50a} представляет собой независимо водород или C_1-C_6-алкил;**R**^{d}, **R**^{e} и **R**^{f} представляет собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил, алкоксикарбонил, -C(O)OH или -CH_2O**R**^{g}, где каждый **R**^{g} - независимо -CH_2C(O)OH или -CH_2C(O)O(алкил); и

mm представляет собой 0 или 1;

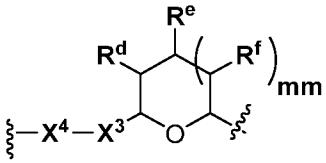
n представляет собой целое число, выбираемое в диапазоне 1-30, включительно;

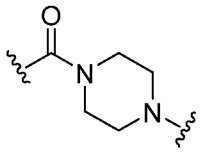
L′ представляет собой линкер; и

BA представляет собой связующий агент.

[0224] В некоторых вариантах осуществления в соединении Формулы (**III**) оба R^x представляет собой водород, и **SP**, **BA**, **L′**, R^{34} и **n** соответствуют описаниям, приведенным здесь в некоторых или любых вариантах осуществления. В некоторых вариантах осуществления в соединении Формулы (**III**) оба R^x представляет собой фтор, и **SP**, **BA**, **L′**, R^{34} и **n** соответствуют описаниям, приведенным здесь в некоторых или любых вариантах осуществления. В некоторых вариантах осуществления R^{34} представляет собой в R-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления R^{34} представляет собой в S-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления R^{34} представляет собой смесь R- и S-конфигураций. В некоторых вариантах осуществления R^{34} представляет собой смесь R- и S-конфигураций, где отношение R:S - около 1:1, около 2:1, около 3;1, около 4:1, около 5:1, около 6;1, около 7:1, около 8:1, около 9:1 или около 10:1.

[0225] В некоторых вариантах осуществления представлены соединения Формулы (**III**) , где

оба R^x представляют собой водород; и **SP** представляет собой -C(O)-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-X^1-, где X^1 присоединен к **L′** в Формуле (**III**), -C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}-алкилен)-S- , где S присоединен к **L′** в Формуле (**III**), -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-(C_1-C_{10}-алкилен)-S- , где S присоединен к **L′** в Формуле (**III**), -(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50a}- , где NR^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (**III**), -C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50a}- , где NR^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (**III**) и где каждый C_1-C_{10}-алкилен независимо необязательно замещен одной или более гидрокси, -C(O)-N(R^5)-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)NH-X^2- , где X^2 присоединен к **L′** в Формуле (**III**), или  , где X^4 присоединен к **L′** в Формуле (**III**); или

оба R^x представляют собой фтор; и **SP** - -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-X^{1b}- , где X^{1b} присоединен к **L′** в Формуле (**III**), -C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}-алкилен)-X^{1b}- , где X^{1b} присоединен к **L′** в Формуле (**III**),  , где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) - к **L′** в Формуле (**III**), -(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-

NR^{50a}- , где NR^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (**III**), -C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50a}- , где NR^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (**III**) и где каждый C_1-C_{10}-алкилен независимо необязательно замещен одной или более гидрокси, или -C(O)-N(R^5)-(C_1-C_{10}-алкилен)-C(O)NH-X^2- , где X^2 присоединен к **L′** в Формуле (**III**).

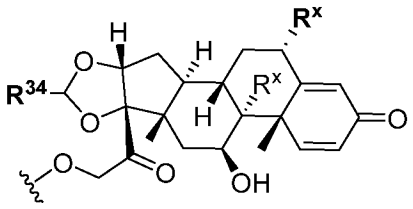
[0226] В некоторых вариантах осуществления соединение Формулы (**I**) является соединением Формулы (**3000**):

BA-(**L′-SP-D**)$_n$ Формула (**3000**)

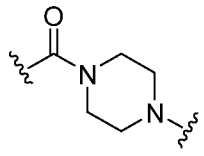
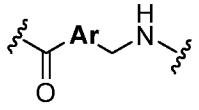
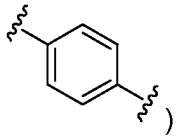
или его фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомером,

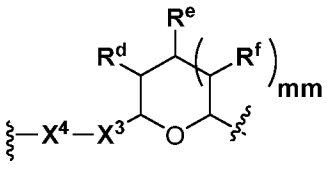
где

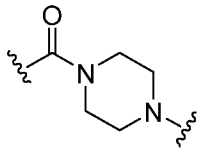
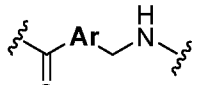
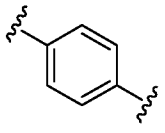
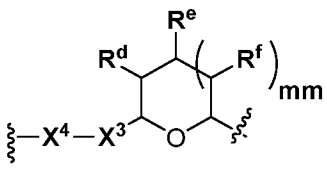
D выбирается из



а) Формула (а),

где оба R^x в Формуле (а) представляют собой водород; R^{34} представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил; и **SP** - -C(O)-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-X^1- , где X^1 присоединен к **L′** в Формуле (3000), -C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}-алкилен)-S- , где S присоединен к **L′** в Формуле (3000), -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-(C_1-C_{10}-алкилен)-S- , где S присоединен к **L′** в Формуле (3000),  , где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) - к **L′** в Формуле (3000), -CH_2-NH- , где N присоединен к **L′** в Формуле (3000),  , где N присоединен к **L′** в Формуле (3000) и где **Ar** - необязательно замещенный арилен (в некоторых вариантах осуществления ) или необязательно замещенный гетероарилен, -(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50a}- , где NR^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (3000), -C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-NR^{50a}- , где NR^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (3000) и где каждый C_1-C_{10}-алкилен независимо необязательно замещен одной или более гидрокси, -C(O)-N(R^{35})-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)NH-X^2- , где X^2 присоединен к **L′** в

Формуле (3000), или  , где **X⁴** присоединен к **L′** в Формуле (3000); или

где оба **R^x** в Формуле (a) представляют собой фтор; **R³⁴** представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил; и **SP** представляет собой -C(O)-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-**X^{1b}**- , где **X^{1b}** присоединен к **L′** в Формуле (3000), -C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}-алкилен)-**X^{1b}**- , где **X^{1b}** присоединен к **L′** в Формуле (3000),  , где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) - к **L′** в Формуле (3000), -CH_2-NH- , где N присоединен к **L′** в Формуле (3000),  , где N присоединен к **L** в Формуле (3000) и где **Ar** представляет собой необязательно замещенный арилен (в некоторых вариантах осуществления ) или необязательно замещенный гетероарилен, -(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R⁵⁰**C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R^{50a}**- , где N**R^{50a}** присоединен к **L′** в Формуле (3000), -C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R⁵⁰**C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R^{50a}**- , где N**R^{50a}** присоединен к **L′** в Формуле (3000) и где каждый C_1-C_{10}-алкилен независимо необязательно замещен одной или более гидрокси, -C(O)-N(**R³⁵**)-(C_1-C_{10}-алкилен)-C(O)NH-**X²**- , где **X²** присоединен к **L′** в Формуле (3000), или  , где **X⁴** присоединен к **L′** в Формуле (3000); и/или

b) соединения в нижеприведенной Таблице A, где соединения в Таблице A связаны с **BA** Соединения Формулы (**III**) через гидрокси группы -C(O)CH_2OH, т.е. посредством -C(O)CH_2-O-**SP**-**L′**-, или через гидрокси Мапракората, т.е. посредством -O-**SP**-**L′**-;

X¹ представляет собой -N(C_{1-6}алкил)-;

X^{1b} представляет собой -S-, -NH- или -N(C_{1-6}алкил)-;

X² представляет собой -NH-;

X³ представляет собой -CH_2-, **X³** - -CH_2-O-(C_1-C_{10}-алкилен)-C(O)- , где C(O) присоединен к **X⁴**, или **X³** представляет собой -C(O)-;

X^4 представляет собой -O-;

R^{35} представляет собой H, -OH, $-OCH_3$ или C_{1-6}алкил;

R^{50} и R^{50a} представляет собой независимо водород или C_1-C_6-алкил;

R^d, R^e и R^f представляют собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил, алкоксикарбонил, -C(O)OH или $-CH_2OR^g$, где каждый R^g - независимо $-CH_2C(O)OH$ или $-CH_2C(O)O$(алкил); и

mm представляет собой 0 или 1;

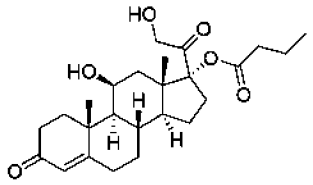
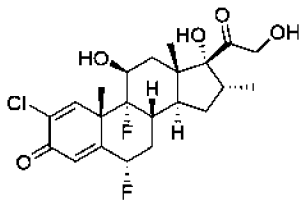
n представляет собой целое число, выбираемое в диапазоне 1-30, включительно;

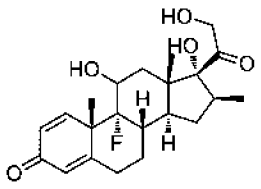
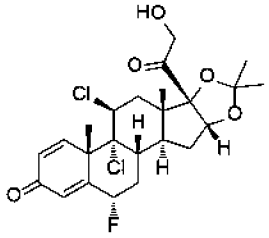
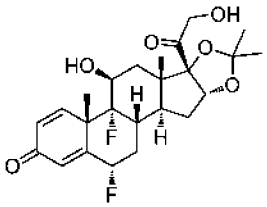
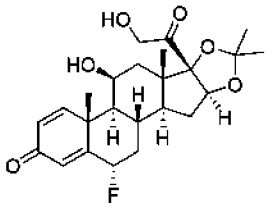
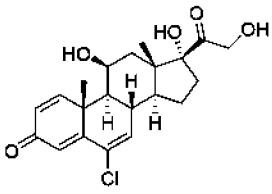
L′ представляет собой линкер; и

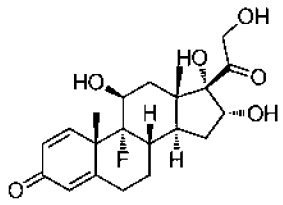
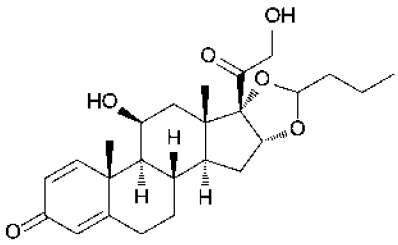
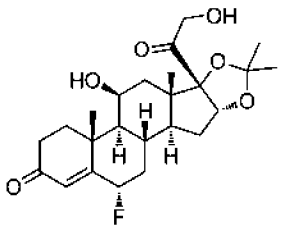
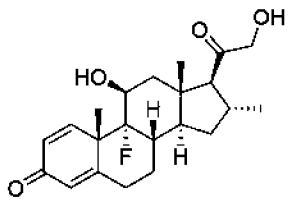
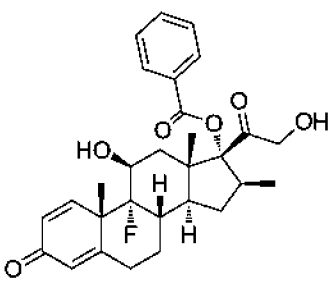
BA представляет собой связующий агент.

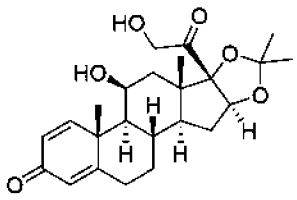
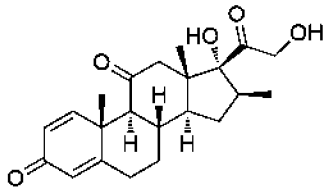
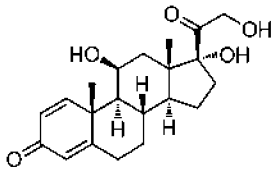
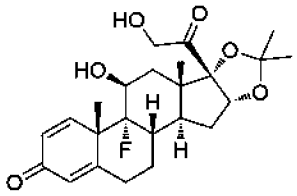
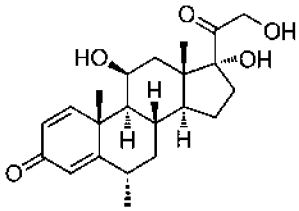
[0227] В некоторых примерах Формулы (3000) **D** представляет собой будесонид или любой другой стероид, показанный в Таблице A. В некоторых примерах Формулы (3000) **D** представляет собой любой описанный здесь аналог будесонида. Соединения в Таблице A связаны с **BA** Соединения Формулы (**III**) через гидрокси группы $-C(O)CH_2OH$, т.е. посредством $-C(O)CH_2-O$-**SP-L′**-, или через гидрокси Мапракората, т.е. посредством -O-**SP-L′**-. В некоторых примерах Формулы (3000) компонент **SP-D** (или **H-SP-D**) называется здесь “будесонид-спейсер” и включает, например, будесонид-спейсеры, показанные в Таблице B, в разделе примеров и в Схеме 1 на **ФИГ. 22**.

Таблица A.

Торговое название	Структура
Гидрокортизона бутират Locoid®	
Галометазон Sicorten®/ (C-48401-Ba)	

Торговое название	Структура
Бетаметазон Celestone®/Rinderon®/Diprosone® (NSC-39470; Sch-4831)	
Флуклорона ацетонид Cutanit®/Topicon® (RS-2252)	
Флуоцинолона ацетонид Flucort®/Fluonid®/Iluvien®/Retisert®/Synalar®/Synalar-HP®/Synemol® (NSC-92339; DF-277)	
Флунизолид (RS-3999; RS-1320)	
Клопреднол (RS-4691)	

Торговое название	Структура
Триамцинолон Aristocort®/Kenacort®	
Будесонид	
Флурандренолид Cordran®	
Дезоксиметазон Topicort® (DSXS)	
Бетаметазона бензоат Uticort® (W-5975)	

Торговое название	Структура
Дезонид Desonate® (D-2083)	
Мепреднизон (NSC-527579; Sch-4358)	
Преднизолон Delta-Cortef® (NCS-9120)	
Триамцинолона ацетонид	
Метилпреднизолон Depo-Medrol; Medrol; Urbason® (NSC-19987)	

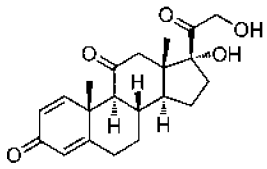
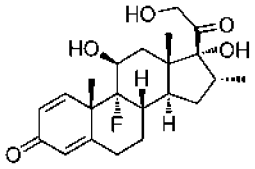
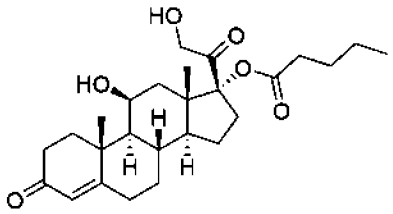
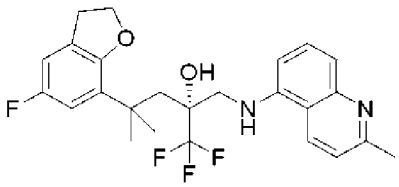
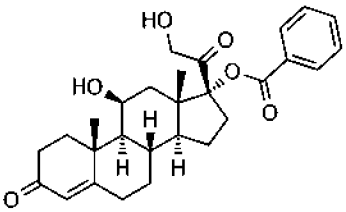
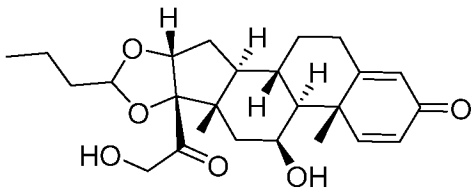
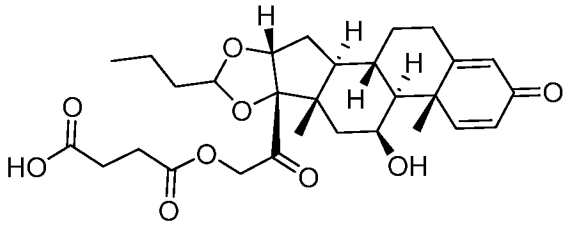
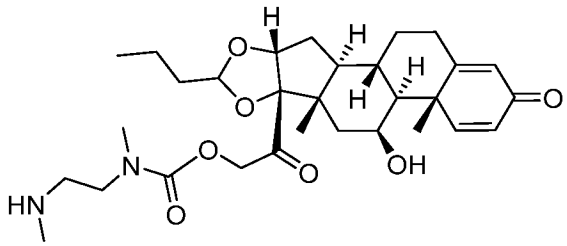
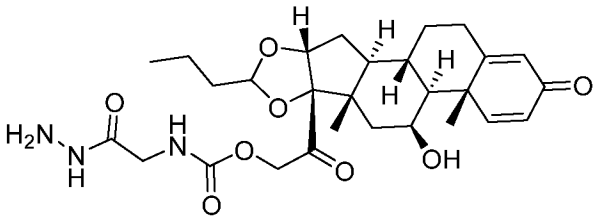
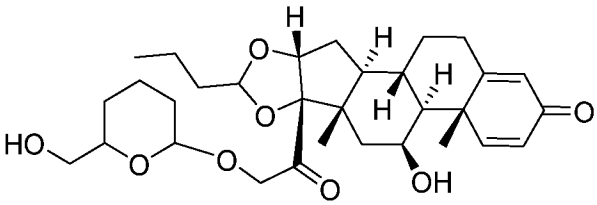
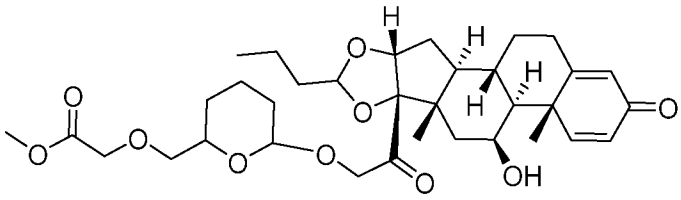
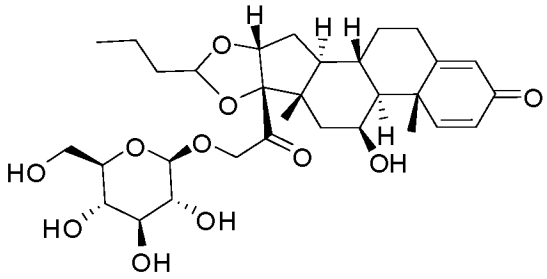
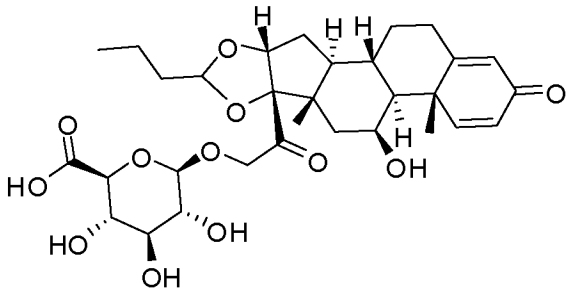
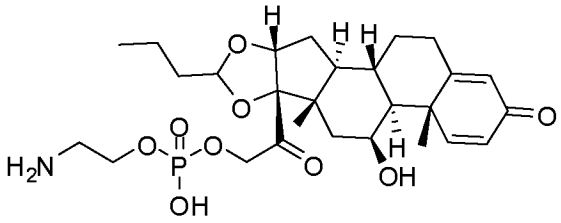
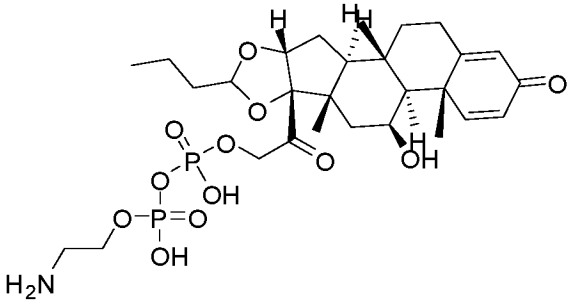
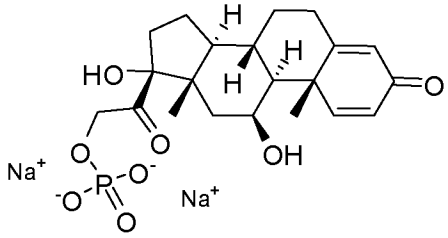
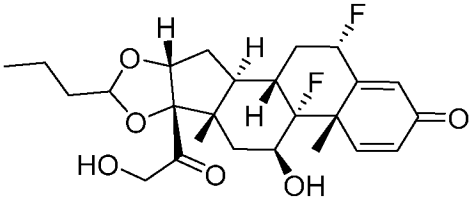
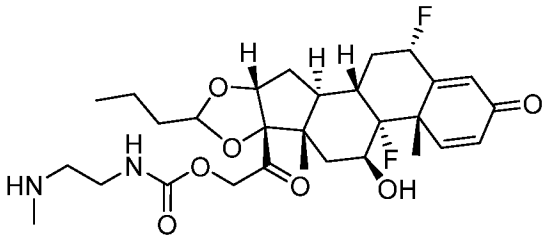
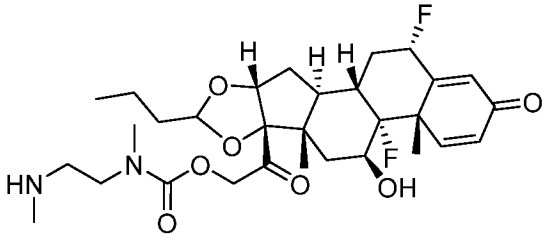
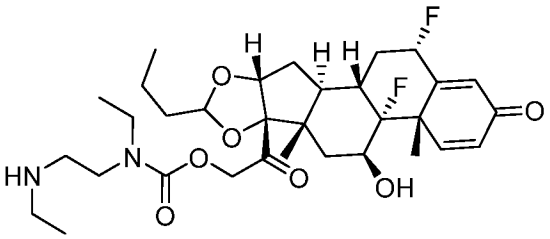
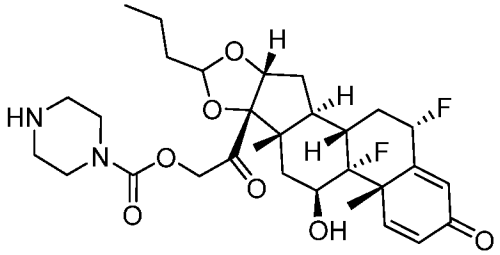
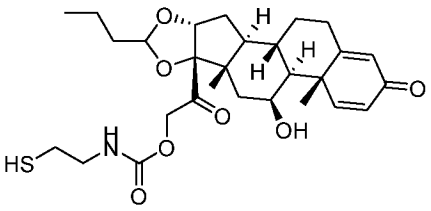
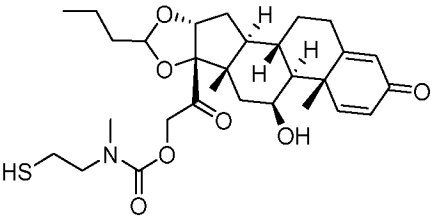
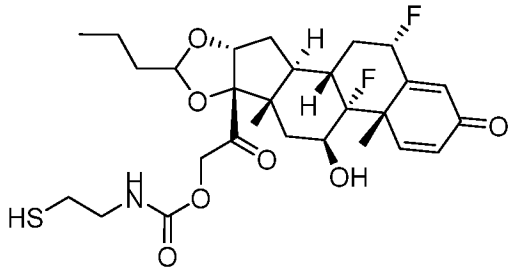
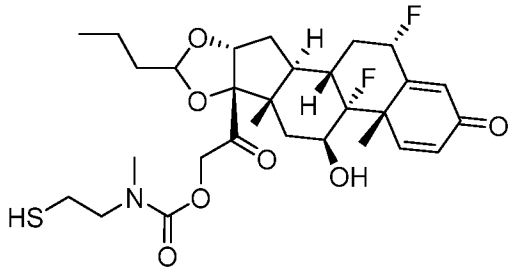
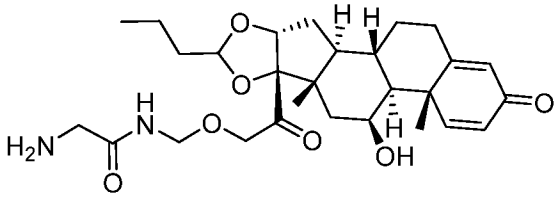
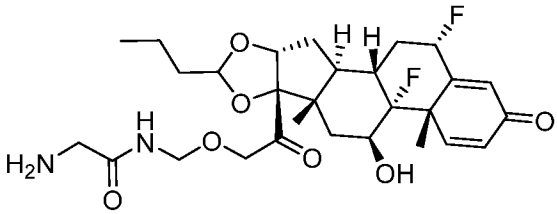
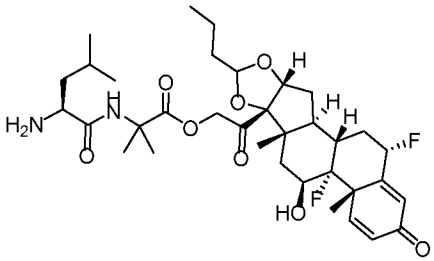
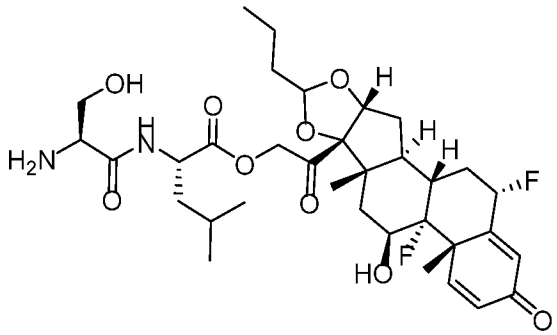
Торговое название	Структура
Преднизон Decortin®/Deltasone®/Lodotra®/Meticorten®/Rayos® (NSC-10023)	
Дексаметазон Decadron® (FT-4145; ENV-1105; IBI-10090; ISV-305; OTO-104)	
Гидрокортизона валерат Westcort®	
Мапракорат (BOL-242X; BOL-303242-X; ZK-245186; BAY-865319; BOL-303242-X)	
Бензодрокортизон	

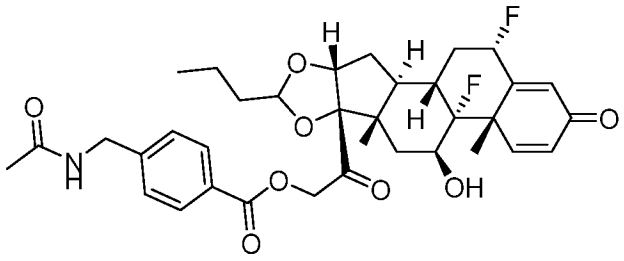
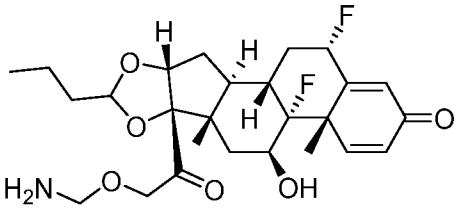
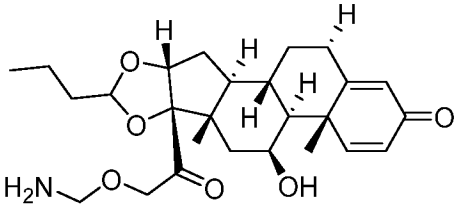
Таблица B. Будесонид-спейсер (Будесонид-SP)

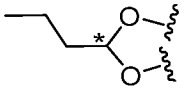
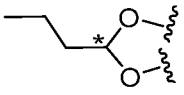
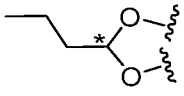
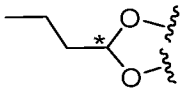
№ соединения	Структура
1a (**Будесонид**)	
1c	
1d	
1e	
1g	
1h	

№ соединения	Структура
1i	
1j	
1k	
1l	
1m	
100	

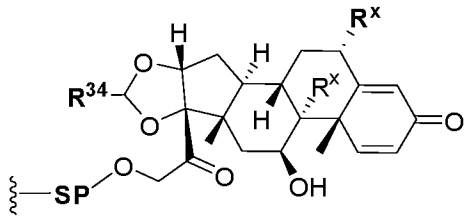
№ соединения	Структура
101a	
101b	
101c	
101d	
102c	
102d	

№ соединения	Структура
102e	
102f	
103a	
103b	
104a	
104b	

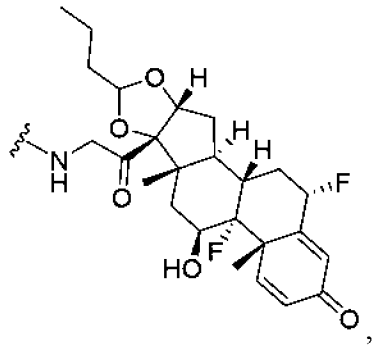
№ соединения	Структура
105aa	
106a	
107a	

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер. В некоторых случаях n-пропил  в каждой из указанных выше структур - в R-конфигурации, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых случаях n-пропил  в каждой из указанных выше структур - в S-конфигурации, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых случаях n-пропил  в каждой из указанных выше структур представляет собой смесь R- и S-конфигураций, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых случаях n-пропил  в каждой из указанных выше структур представляет собой смесь R- и S-конфигураций, т.е. на углероде, показанном звездочкой, где отношение R:S - около 1:1, около 2:1, около 3;1, около 4:1, около 5:1, около 6;1, около 7:1, около 8:1, около 9:1 или около 10:1.

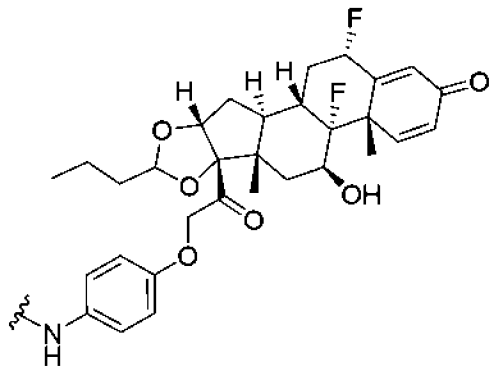
[0228] В различных вариантах осуществления **-SP-D Ab-L′-SP-D** или



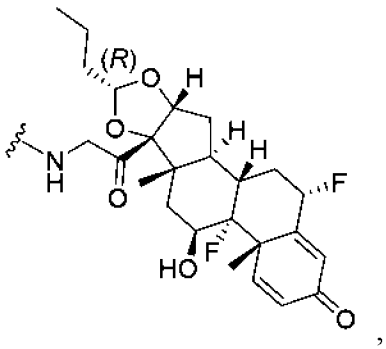
Формулы (**3000)** выбирается из



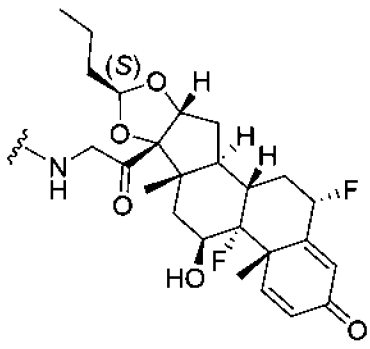
,



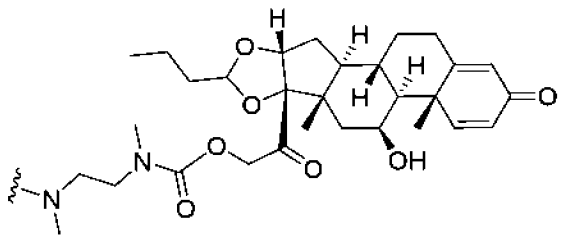
,



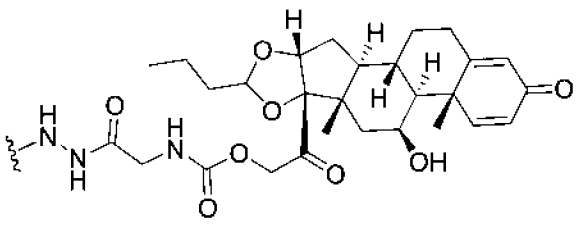
,



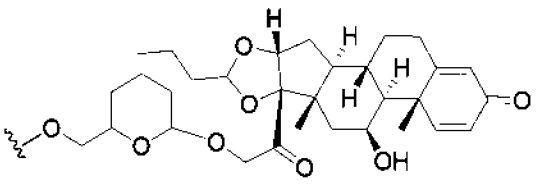
,



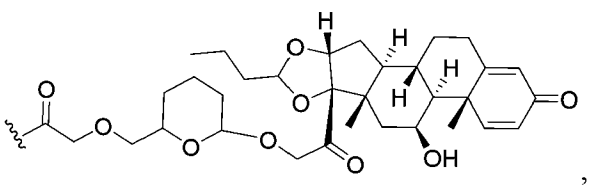
,



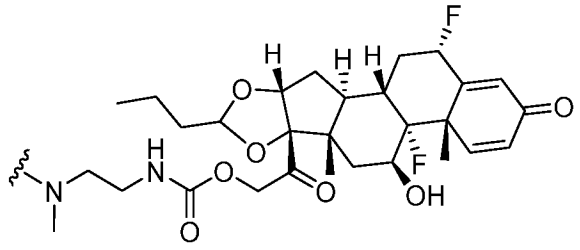
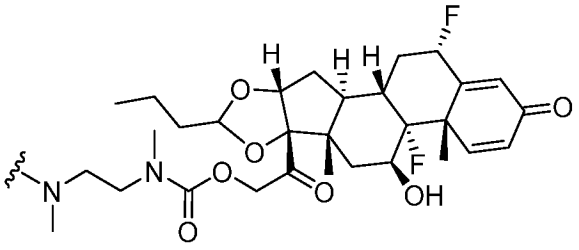
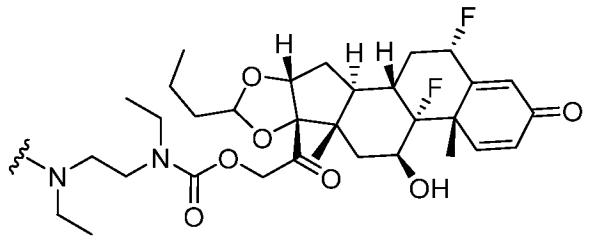
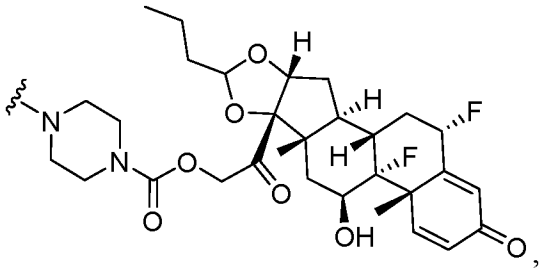
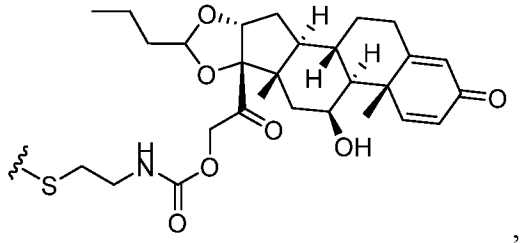
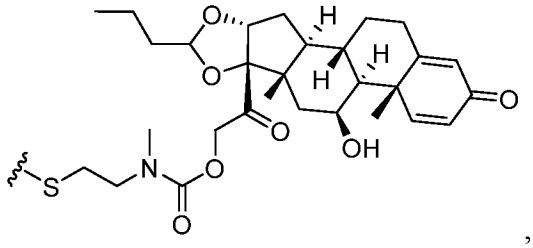
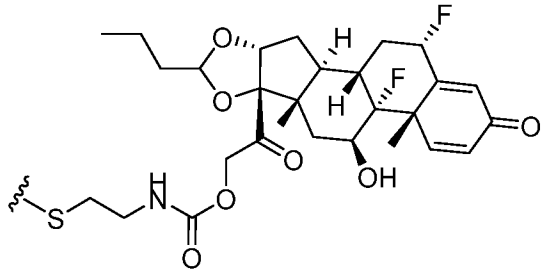
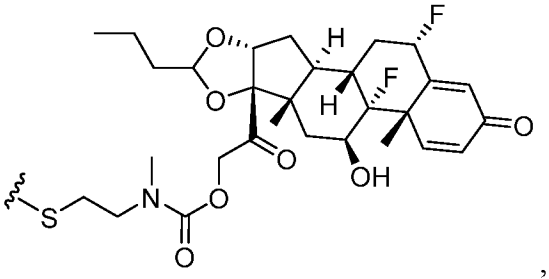
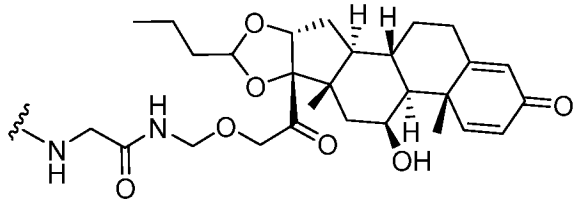
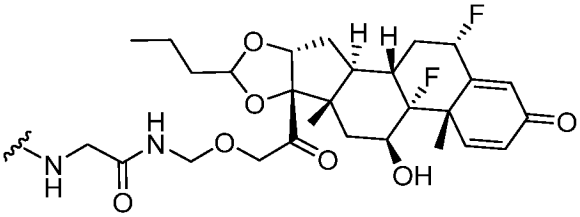
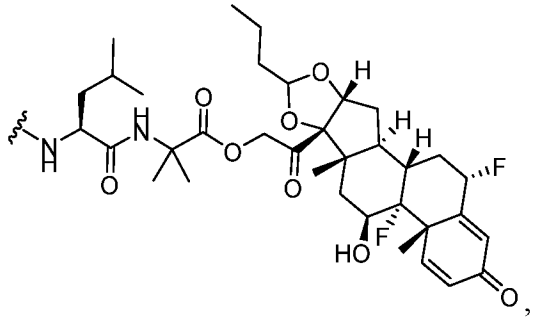
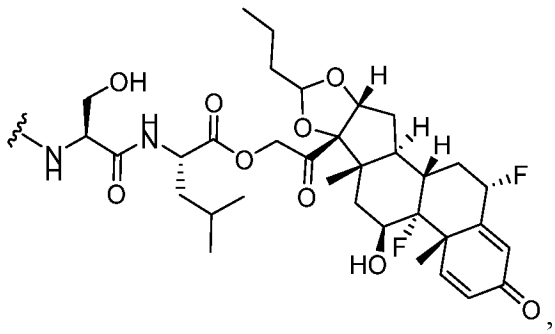
,

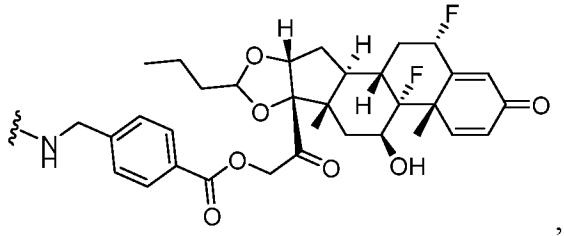
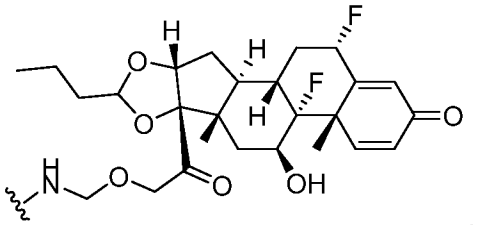
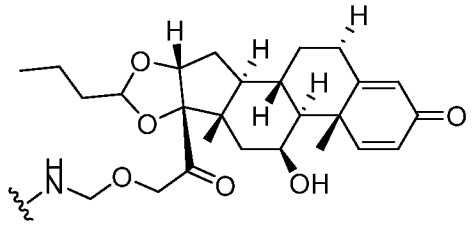
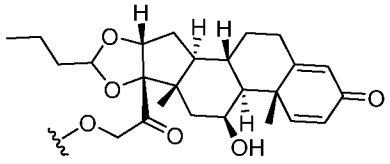
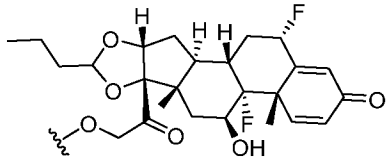


,

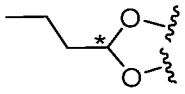
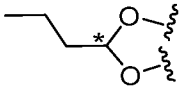
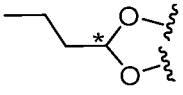
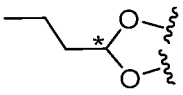


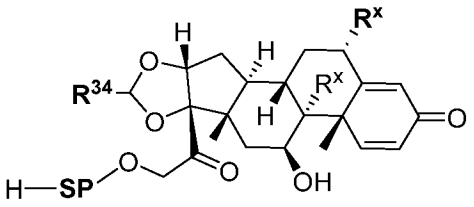
,

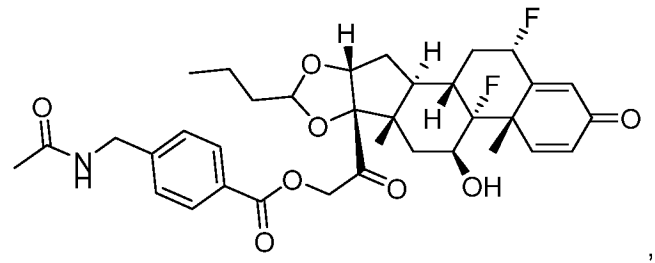

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

, и


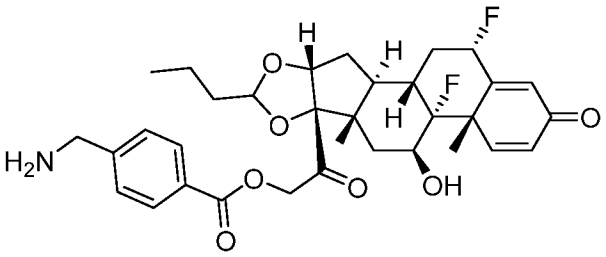
где  представляет собой связь с линкером.

[0229] В некоторых случаях n-пропил  в каждой из указанных выше структур представлен в R-конфигурации, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых случаях n-пропил  в каждой из указанных выше структур представлен в S-конфигурации, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых случаях n-пропил  в каждой из указанных выше структур представляет собой смесь R- и S-конфигураций, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых случаях n-пропил  в каждой из указанных выше структур представляет собой смесь R- и S-конфигураций, т.е. на углероде, показанном звездочкой, где отношение R:S представляет около 1:1, около 2:1, около 3;1, около 4:1, около 5:1, около 6;1, около 7:1, около 8:1, около 9:1 или около 10:1.

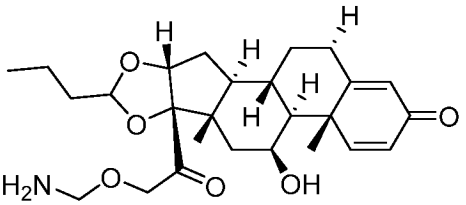
[0230] В различных вариантах осуществления  выбирается из Таблицы B или выбирается из



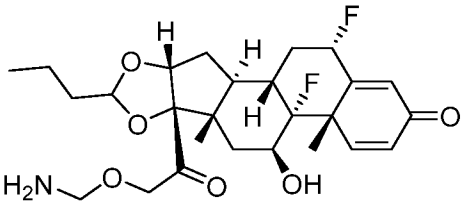
,



,

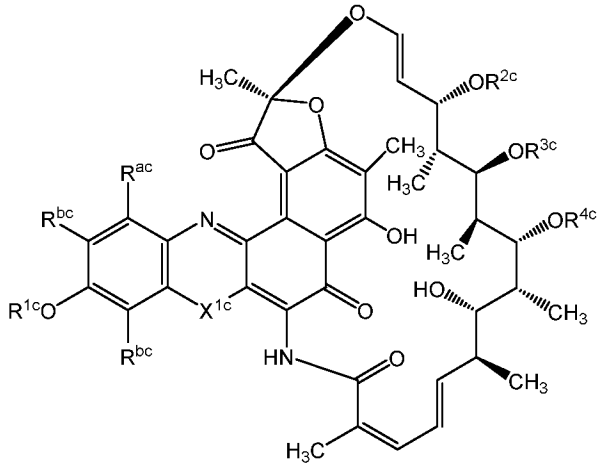


или



.

[0231] В некоторых вариантах осуществления нагрузка представляет собой аналог рифамицина, имеющий структуру Формулы (**C**):



Формула (**C**)

или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомерную форму; где:

$\mathbf{X^{1c}}$ выбирается из –O–, –S— и $-NR^{5c}$;

$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой водород; амино-C_{1-6}алкил; C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; ди-C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; гидрокси-C_{1-6}алкил; HS-C_{1-6}алкил; $(\mathbf{R^{5c}})_2$N-C_{1-6}алкилен-N($\mathbf{R^{5c}}$)-C_{1-6}алкил; $(\mathbf{R^{5c}})_2$N-C_{1-6}алкилен-O-C_{1-6}алкил; $(\mathbf{R^{5c}})_2$N-C_{1-6}алкилен-S-C_{1-6}алкил; гетероциклоалкил или гетероциклоалкил-C_{1-6}алкил; где гетероциклоалкил включает один, два или три гетероатома, выбираемых из O, N и S; и где гетероциклоалкил необязательно замещен гало, C_{1-6}алкилом, -OH, =O или –N($\mathbf{R^{5c}}$)$_2$;

$\mathbf{R^{2c}}$, $\mathbf{R^{3c}}$ и $\mathbf{R^{4c}}$ независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и -(C=O)-$\mathbf{R^{5c}}$;

$\mathbf{R^{ac}}$ выбирается из -F; -Cl; -Br; -I; -OH; -NH_2; и C_{1-6}алкокси;

$\mathbf{R^{bc}}$ представляет собой водород в каждом случае; и

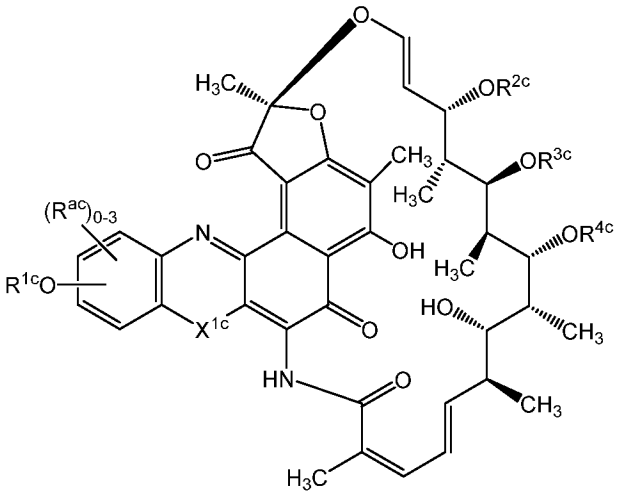
$\mathbf{R^{5c}}$ независимо в каждом случае выбирается из водорода; и C_{1-6}алкила;

при условии, что $\mathbf{R^{1c}}$ не является n-бутильной группой; и

при дополнительном условии, что когда $\mathbf{X^{1c}}$ представляет собой -O-, $\mathbf{R^{1c}}$ не является водородом;

где группа $\mathbf{R^{1c}}$ связана с линкером.

[0232] В некоторых вариантах осуществления нагрузка представляет собой аналог рифамицина, имеющий структуру Формулы (**C-1**):



Формула (**C-1**)

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где:

$\mathbf{X^{1c}}$ выбирается из –S-; -O- и –N$\mathbf{R^{5c}}$;

$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой амино-C_{1-6}алкил; C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; ди-C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; гидрокси-C_{1-6}алкил; HS-C_{1-6}алкил; $(\mathbf{R^{5c}})_2$N-C_{1-6}алкилен-N($\mathbf{R^{5c}}$)-C_{1-6}алкил; $(\mathbf{R^{5c}})_2$N-C_{1-6}алкилен-O-C_{1-6}алкил; $(\mathbf{R^{5c}})_2$N-C_{1-6}алкилен-S-C_{1-6}алкил; гетероциклоалкил или гетероциклоалкил-C_{1-6}алкил; где гетероциклоалкил включает один, два или три гетероатома, выбираемых из O, N и S; и где

гетероциклоалкил необязательно замещен гало, C_{1-6}алкилом, -OH, =O или $–N(\mathbf{R^{5c}})_2$;

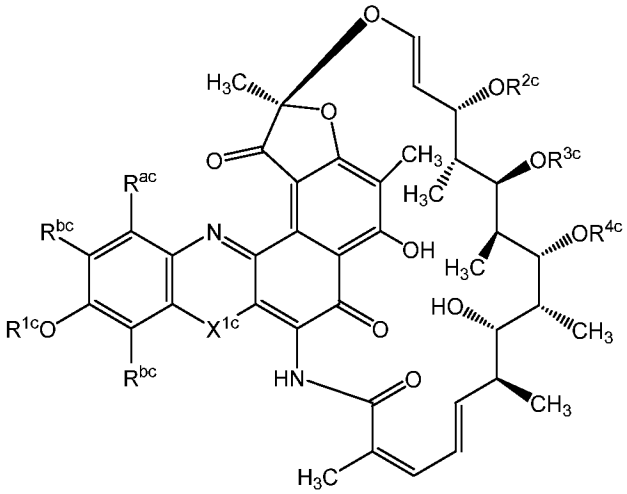
$\mathbf{R^{2c}}$, $\mathbf{R^{3c}}$ и $\mathbf{R^{4c}}$ независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и $-(C=O)-\mathbf{R^{5c}}$;

каждый $\mathbf{R^{ac}}$, если имеется, независимо выбирается из -F; -Cl; -Br; -I; -OH; $-NH_2$; и C_{1-6}алкокси; и

$\mathbf{R^{5c}}$ независимо в каждом случае выбирается из водорода; и C_{1-6}алкила;

где группа $\mathbf{R^{1c}}$ связана с линкером.

[0233] В некоторых вариантах осуществления нагрузка представляет собой аналог рифамицина, имеющий структуру Формулы (**C-2**):



Формула (**C-2**)

или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомерную форму;

где:

$\mathbf{X^{1c}}$ выбирается из –S–; –O– и $–N\mathbf{R^{5c}}$;

$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой амино-C_{1-6}алкил; C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; ди-C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; гидрокси-C_{1-6}алкил; HS-C_{1-6}алкил; $(\mathbf{R^{5c}})_2$N-C_{1-6}алкилен-N($\mathbf{R^{5c}}$)-C_{1-6}алкил; $(\mathbf{R^{5c}})_2$N-C_{1-6}алкилен-O-C_{1-6}алкил; $(\mathbf{R^{5c}})_2$N-C_{1-6}алкилен-S-C_{1-6}алкил; гетероциклоалкил или гетероциклоалкил-C_{1-6}алкил; где гетероциклоалкил включает один, два или три гетероатома, выбираемых из O, N и S; и где гетероциклоалкил необязательно замещен гало, C_{1-6}алкилом, -OH, =O или $–N(\mathbf{R^{5c}})_2$;

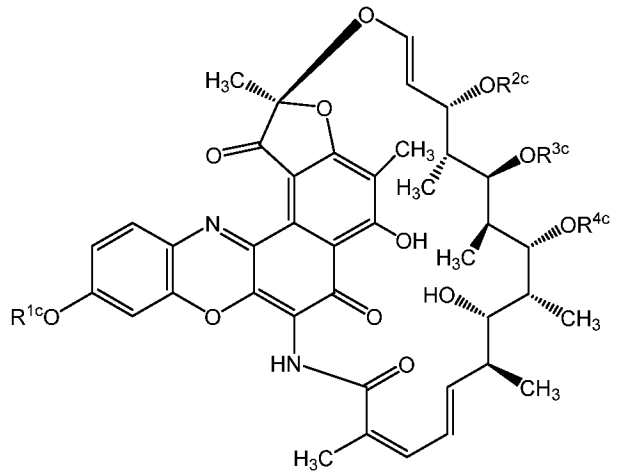
$\mathbf{R^{2c}}$, $\mathbf{R^{3c}}$ и $\mathbf{R^{4c}}$ независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и $-(C=O)-\mathbf{R^{5c}}$;

$\mathbf{R^{ac}}$и $\mathbf{R^{bc}}$ независимо выбираются из -F; -Cl; -Br; -I; -OH; $-NH_2$; и C_{1-6}алкокси; и

$\mathbf{R^{5c}}$ независимо в каждом случае выбирается из водорода; и C_{1-6}алкила;

где группа $\mathbf{R^{1c}}$ связана с линкером.

[0234] В некоторых вариантах осуществления нагрузка представляет собой аналог рифамицина, имеющий структуру Формулы (**C-3**):



Формула (**C-3**)

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где:

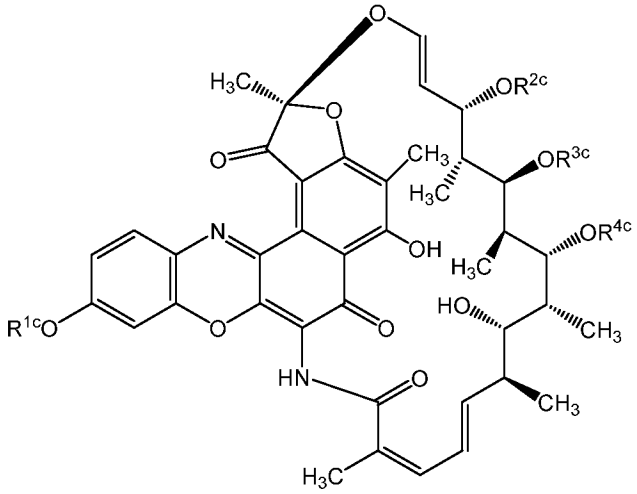
R^{1c} представляет собой ди-C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; $(R^{5c})_2N$-C_{1-6}алкилен-N(R^{5c})-C_{1-6}алкил; гетероциклоалкил или гетероциклоалкил-C_{1-6}алкил; где гетероциклоалкил включает один, два или три гетероатома, выбираемых из O, N и S; и где гетероциклоалкил необязательно замещен гало, C_{1-6}алкилом, -OH, =O или $–N(R^{5c})_2$; и

R^{2c}, **R^{3c}** и **R^{4c}** независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и -(C=O)-**R^{5c}**; и

R^{5c} выбирается из водорода и C_{1-6}алкила;

где группа **R^{1c}** связана с линкером.

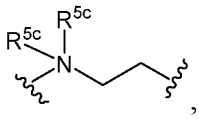
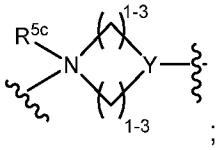
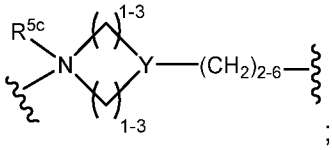
[0235] В некоторых вариантах осуществления нагрузка представляет собой аналог рифамицина, имеющий структуру Формулы (**C-4**):



Формула (**C-4**)

или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомерную форму;

где:

$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой  ,  ; или  ;

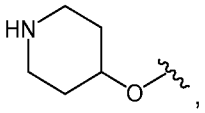
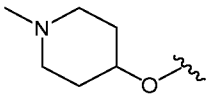
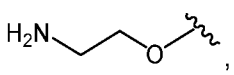
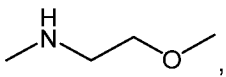
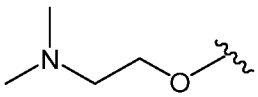
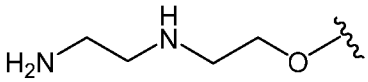
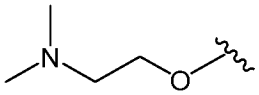
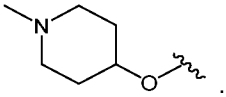
где **Y** представляет собой C или N;

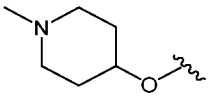
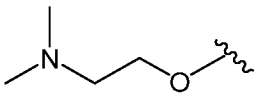
$\mathbf{R^{2c}}$, $\mathbf{R^{3c}}$ и $\mathbf{R^{4c}}$ независимо выбираются из водорода, $C_{1\text{-}6}$алкила и -(C=O)-$\mathbf{R^{5c}}$; и

$\mathbf{R^{5c}}$ выбирается из водорода и $C_{1\text{-}6}$алкила;

где группа $\mathbf{R^{1c}}$ связана с линкером через атом азота, что указывается волнистой линией  .

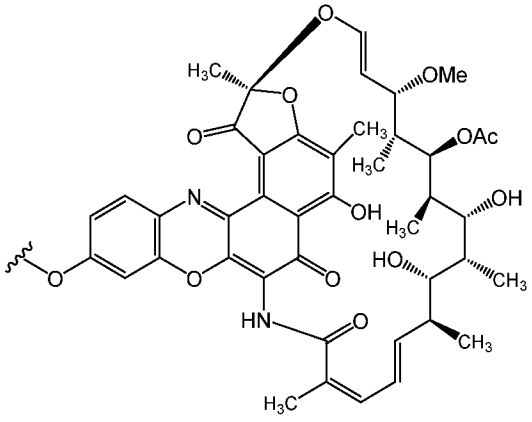
[0236] В некоторых или любых вариантах осуществления Формулы (**C-1**) и/или (**C-2**) и/или (**C-3**) и/или (**C-4**), $\mathbf{R^{bc}}$ представляет собой водород и/или $\mathbf{R^{ac}}$ представляет собой водород. В некоторых или любых вариантах осуществления Формулы (**C-1**) и/или (**C-2**) и/или (**C-3**) и/или (**C-4**), $\mathbf{R^{2c}}$ представляет собой метил, этил, пропил или изопропил, предпочтительно метил. В некоторых или любых вариантах осуществления Формулы (**C-1**) и/или (**C-2**) и/или (**C-3**) и/или (**C-4**), $\mathbf{R^{3c}}$ представляет собой CH_3-(C=O)- (ацетил) группа, CH_3CH_2-(C=O)-. $CH_3CH_2CH_2$-(C=O)- или $(CH_3)_2CH$-(C=O)-; предпочтительно ацетил. В некоторых или любых вариантах осуществления Формулы (**C-1**) и/или (**C-2**) и/или (**C-3**) и/или (**C-4**), $\mathbf{R^{4c}}$ - водород.

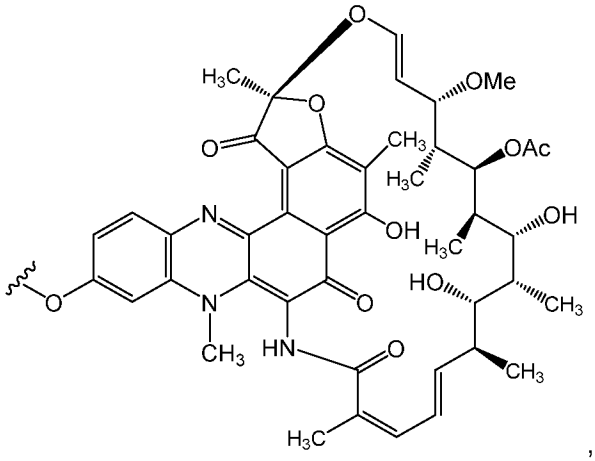
[0237] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**C-1**) и/или (**C-2**) и/или (**C-3**) и/или (**C-4**), -O$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой один или более из  ,  ,  ,  ,  или  . В некоторых вариантах осуществления Формулы (**C-1**) и/или (**C-2**) и/или (**C-3**) и/или (**C-4**), -O$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой  и/или  .

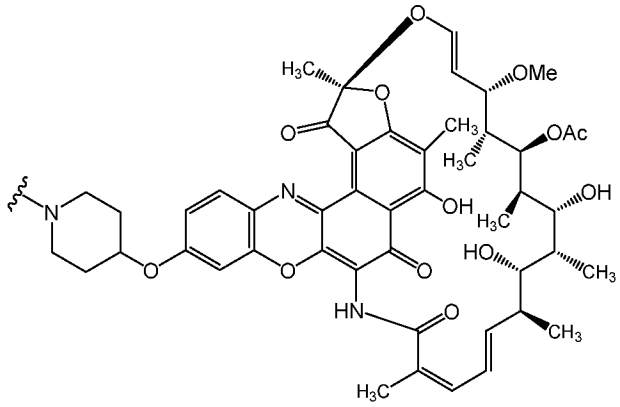
[0238] В некоторых или любых вариантах осуществления Формулы (**C-1**) и/или (**C-2**) и/или (**C-3**) и/или (**C-4**), $\mathbf{X^{1c}}$ представляет собой O, и -O$\mathbf{R^{1c}}$ содержит третичный амин, указанный третичный амин, после связывания с линкером, меняется на четвертичный амин. В некоторых из таких вариантов осуществления -O$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой  или  . В таких вариантах осуществления, где

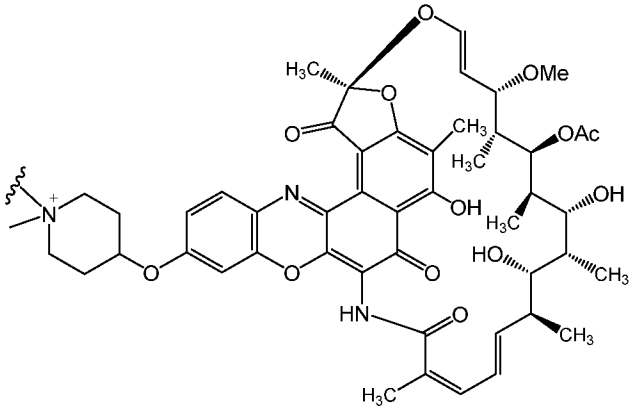
образуется четвертичный амин, присутствует подходящий противоион, т.е. аналог рифамицина присутствует как фармацевтически приемлемая соль, содержащая четвертичный амин, несущий положительный заряд, и, в качестве соли, например, заряд-балансирующий отрицательно заряженный противоион (например, I^-, Br^- , Cl^- или любой другой подходящий противоион).

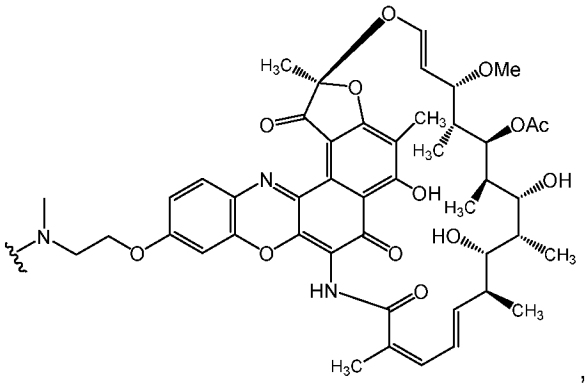
[0239] В некоторых вариантах осуществления соединение Формулы (**C-1**) и/или (**C-2**) и/или (**C-3**) и/или (**C-4**) выбирается из группы, состоящей из:

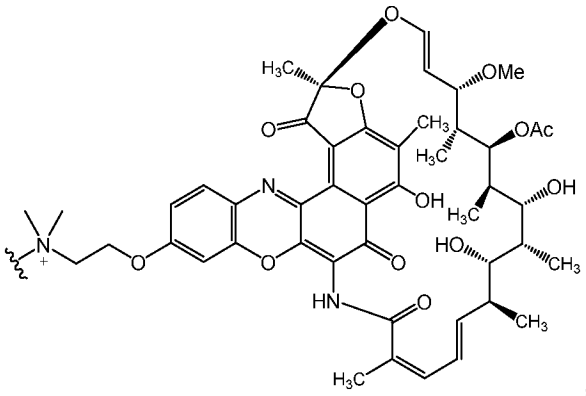
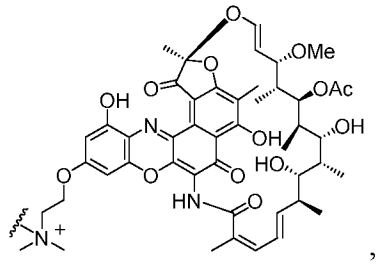
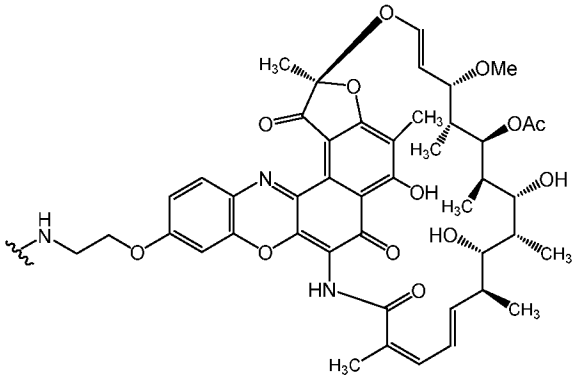
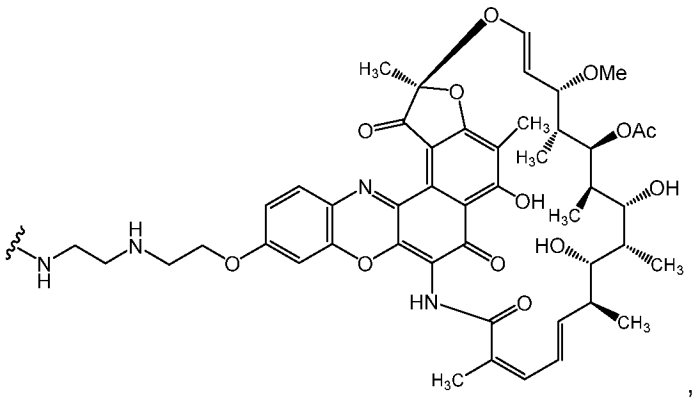

,


,


,


,

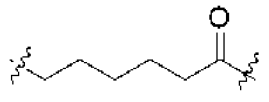
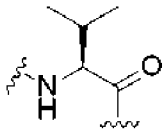
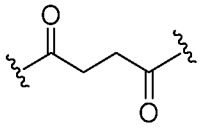
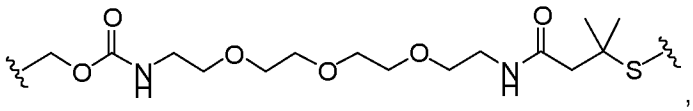
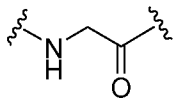
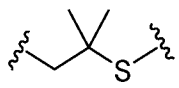

,

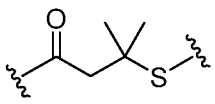
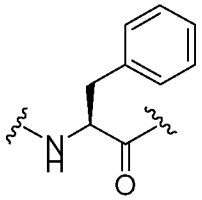
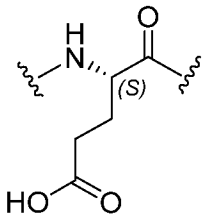
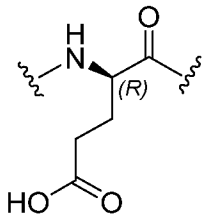
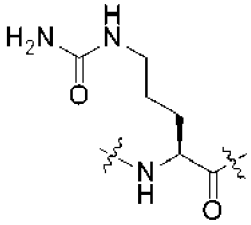
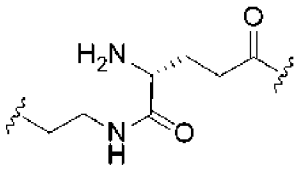
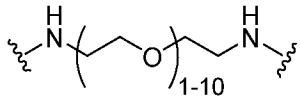
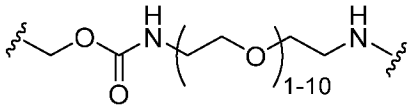
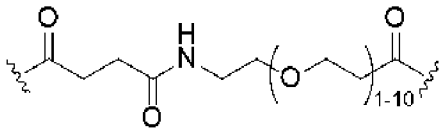
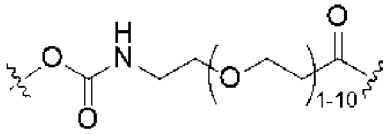
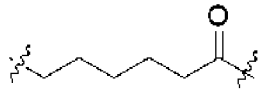
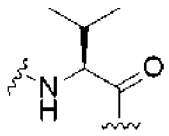
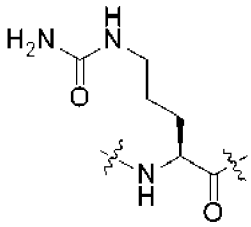
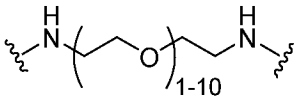
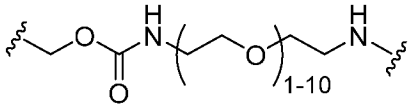
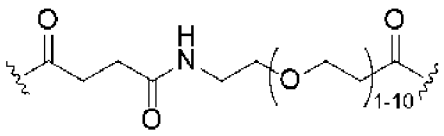

,

,

и

,

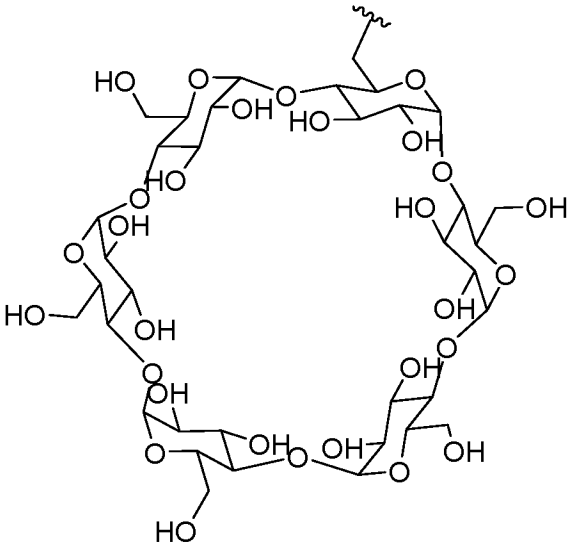
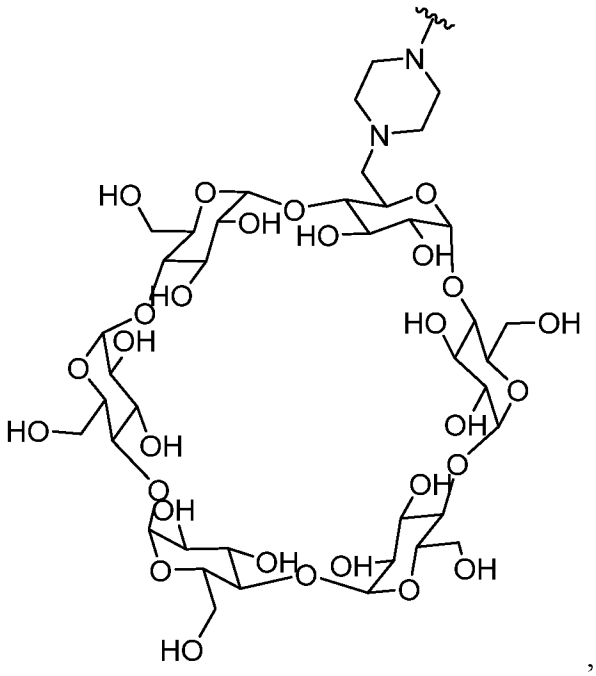
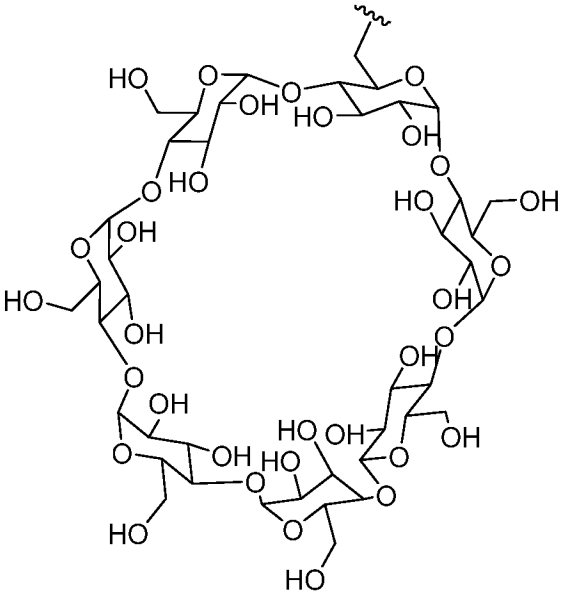
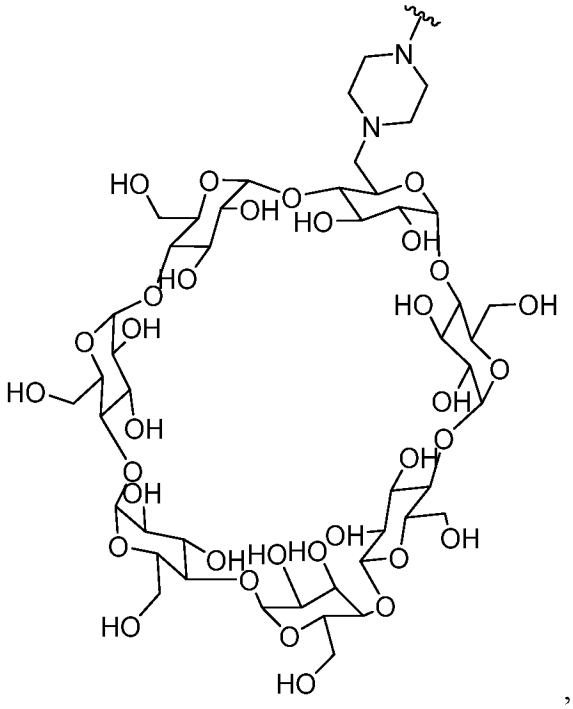
где  представляет собой связь с линкером.

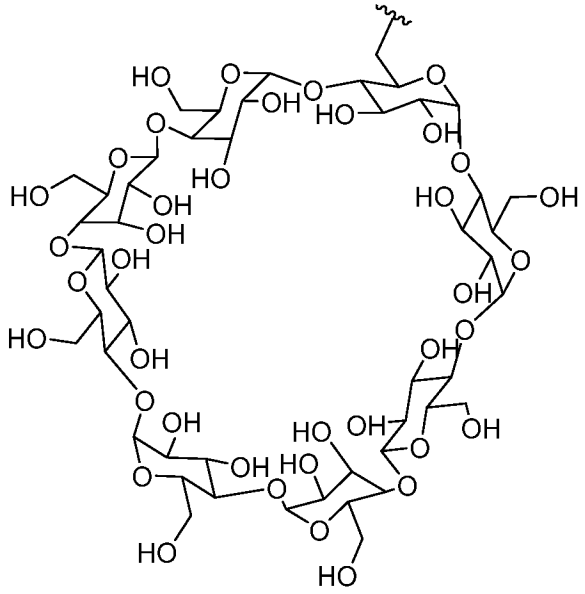
Линкеры

[0240] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**I**), (**III**) или (**3000**) **L** содержит $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$ и L^2 содержит

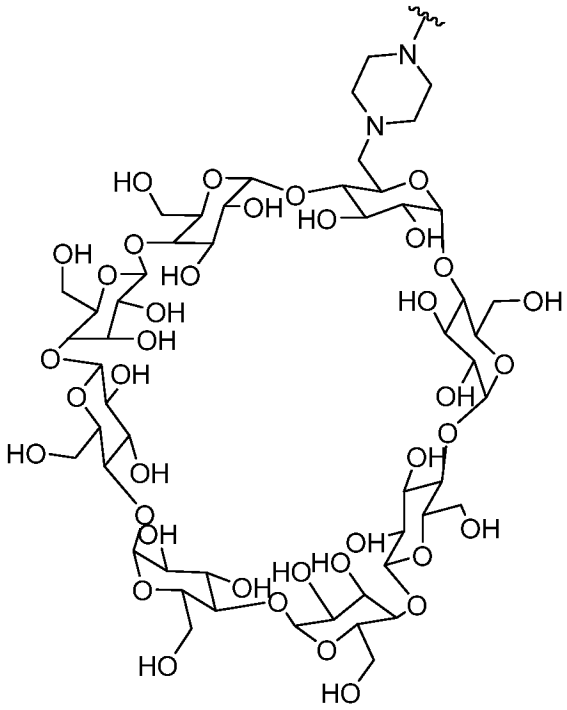

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

, -C(O)CH$_2$CH$_2$C(O)NH-,

,

,

,

, -OCH$_2$C(O)- или остаток циклодекстрина (**CD**); или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления **L** содержит -**L**^{1}-**L**^{2}-(**L**^{3})$_{0-1}$- и **L**^{2} содержит

,

,

,

,

,

или **CD** или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления **L** содержит -**L**^{1}-**L**^{2}-(**L**^{3})$_{0-1}$- и **L**^{2} содержит **CD**. В некоторых вариантах осуществления, где **L** и/или **L**^{2} содержит **CD**, **CD** выбирается из группы, состоящей из


,

,

,

,

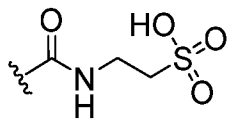


,

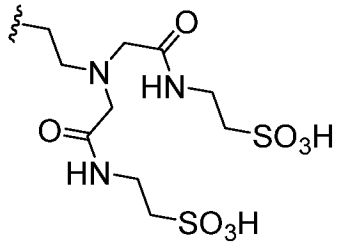


и .

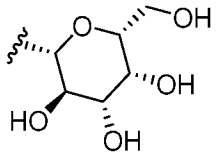
[0241] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**I**), (**III**) или (3000) **L** содержит -L^1-L^2-(L^3)$_{0-1}$- и L^2 содержит **HG** согласно приведенному здесь описанию. В некоторых вариантах осуществления **L** и/или L^2 содержит



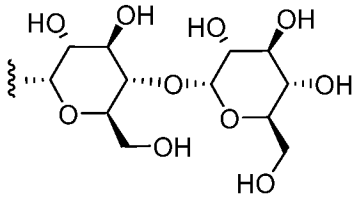
или



. В некоторых вариантах осуществления **L** и/или L^2 содержит

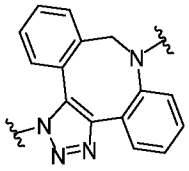


или

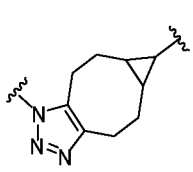
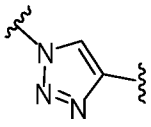
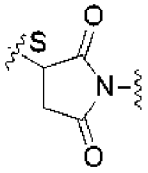
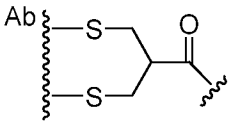
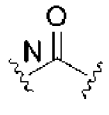


.

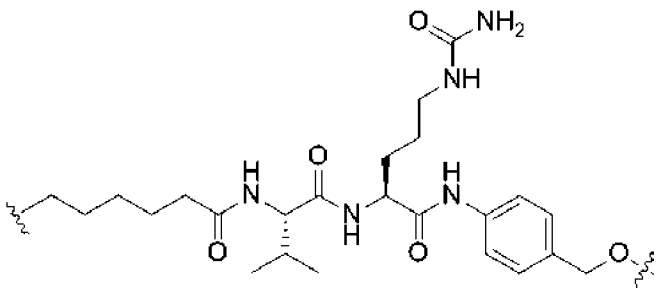
[0242] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**I**), (**III**) или (**3000**), **L** содержит -L^1-L^2-(L^3)$_{0-1}$- и L^1 выбирается из

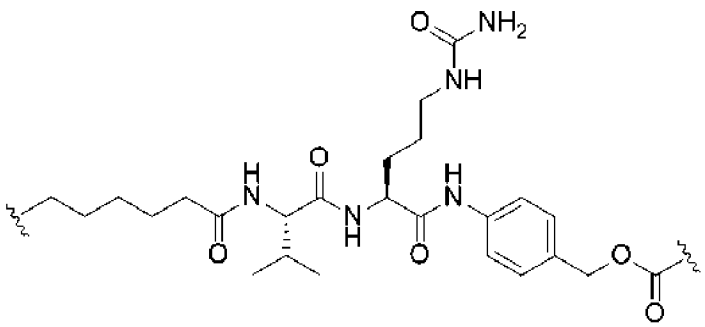


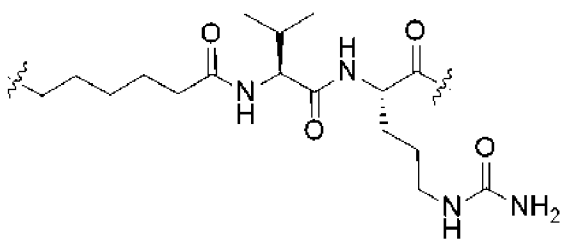
или региоизомера или смеси изомеров;

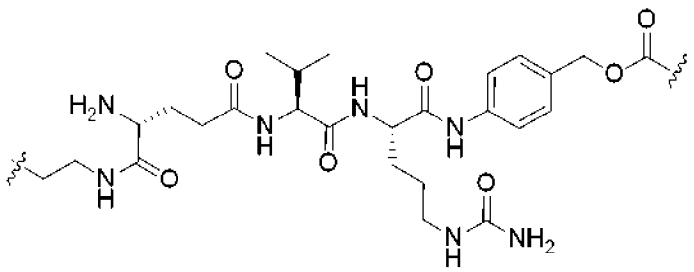

;

;

;

; или стереоизомера или смеси стереоизомеров, где S означает S атом на цистеиновом остатке, через который остаток реактивной группы присоединен к **BA**; и

где N означает N атом на лизиновом остатке, через который остаток реактивной группы присоединен к **BA**.

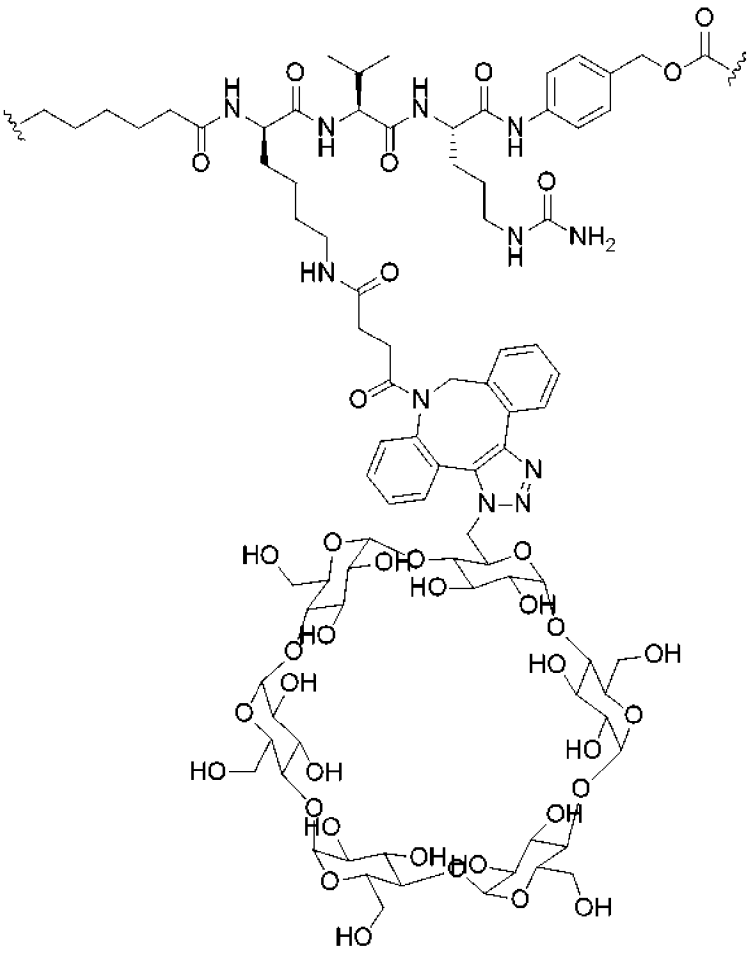
[0243] В некоторых вариантах осуществления **L** содержит -$\mathbf{L^1}$-$\mathbf{L^2}$-($\mathbf{L^3}$)$_{0-1}$- и -$\mathbf{L^2}$-($\mathbf{L^3}$)$_{0-1}$- согласно приведенному здесь описанию. В некоторых вариантах осуществления **L** - **L′-SP** согласно приведенному здесь описанию для Формулы (III) и Формулы (3000). В некоторых вариантах осуществления **L** содержит:

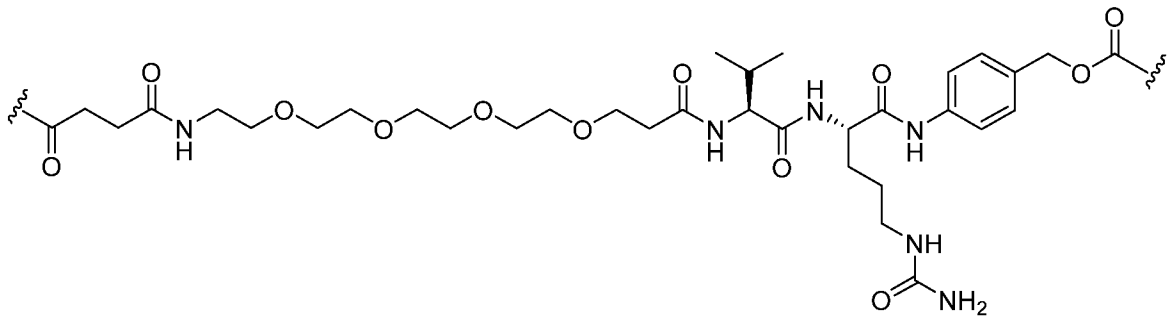


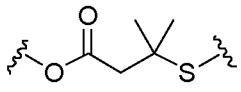


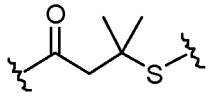


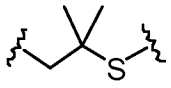


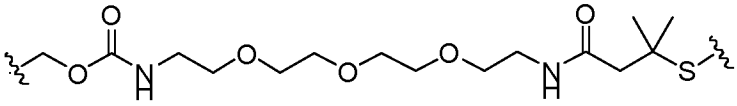


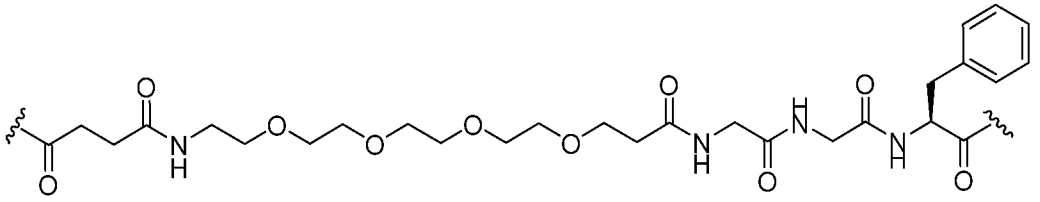


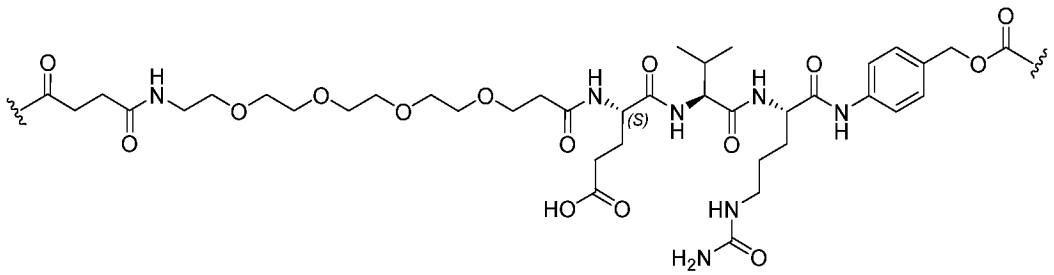


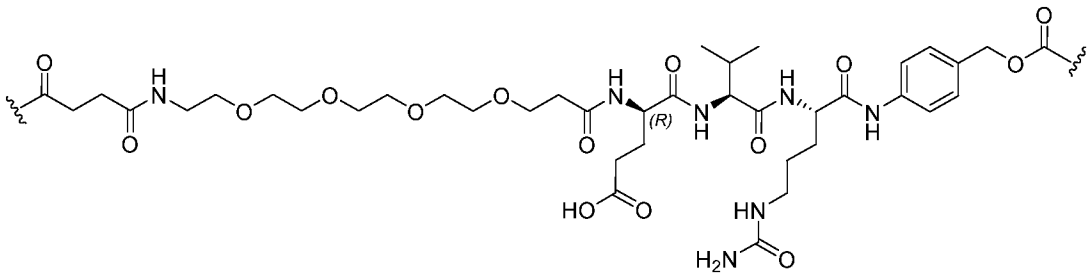


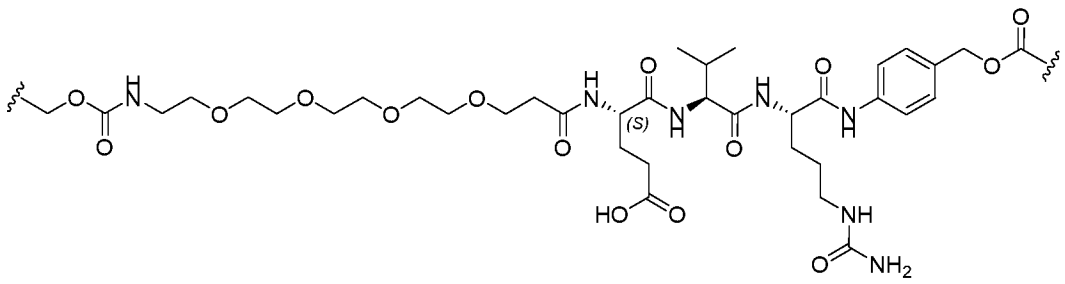


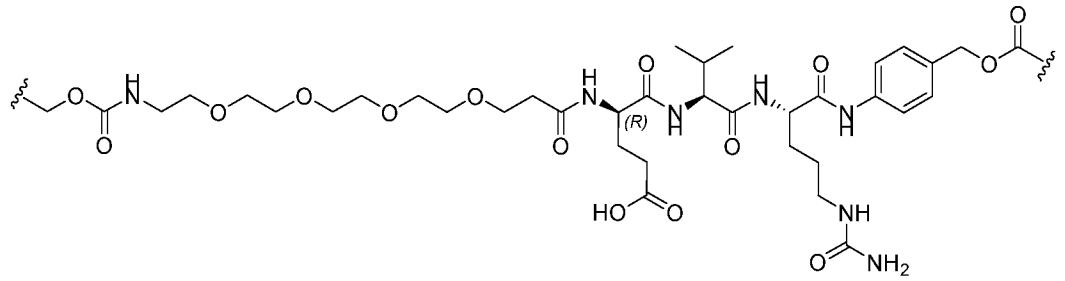


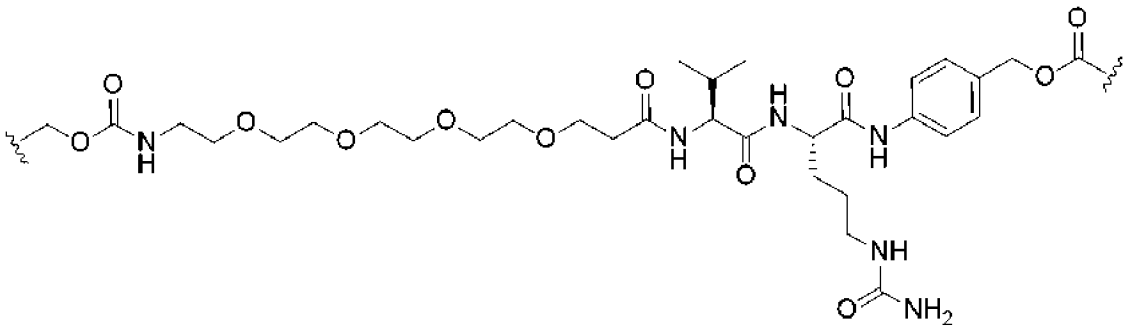


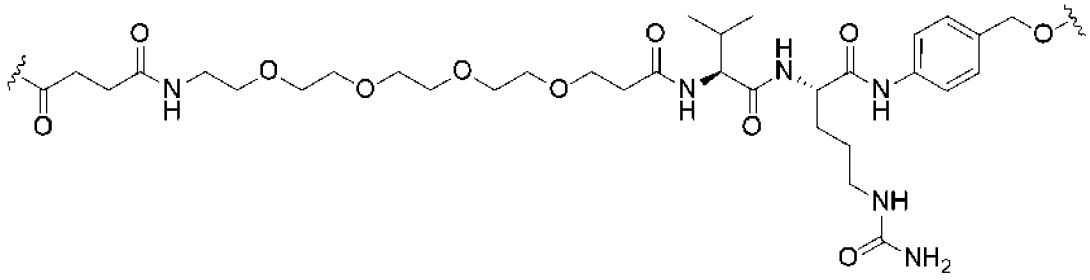


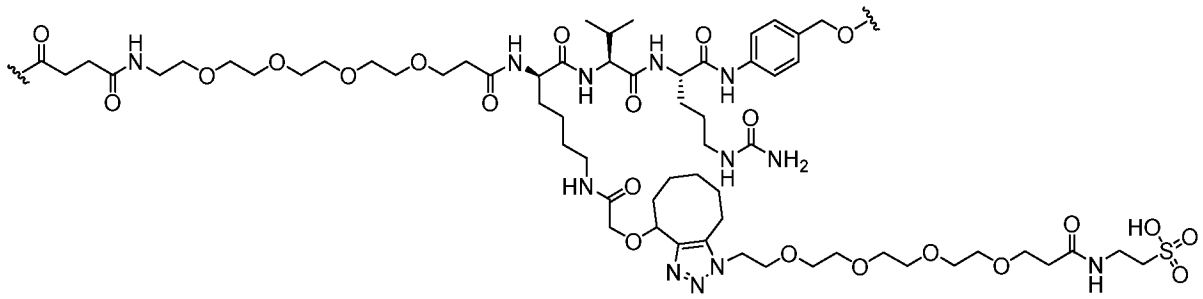


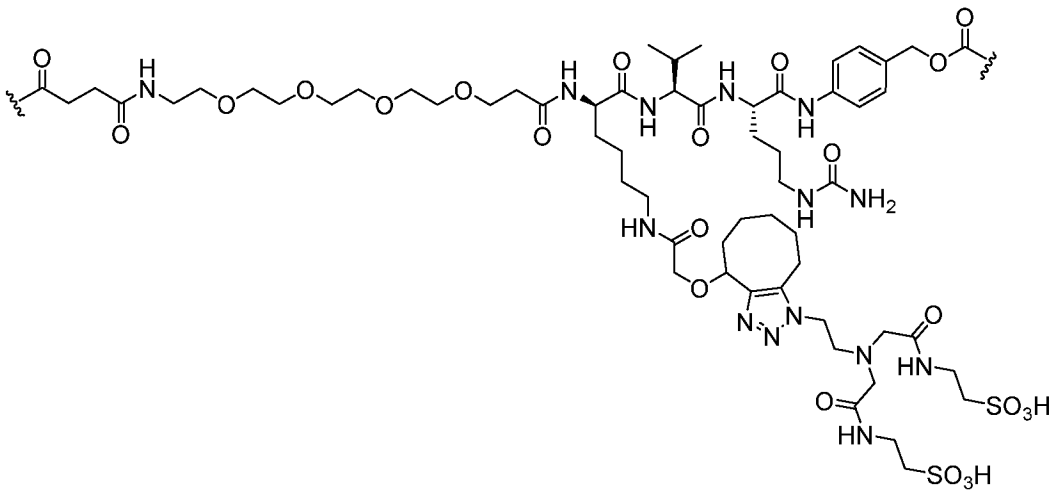


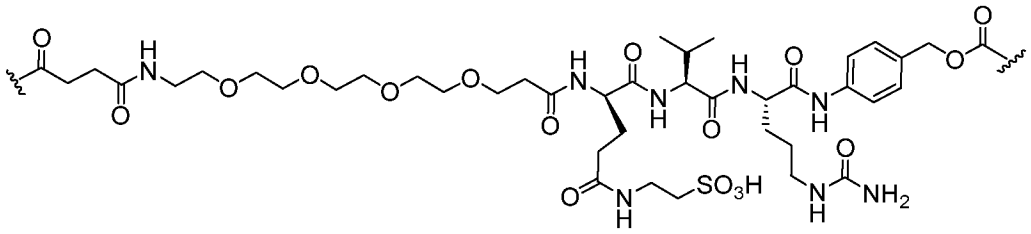


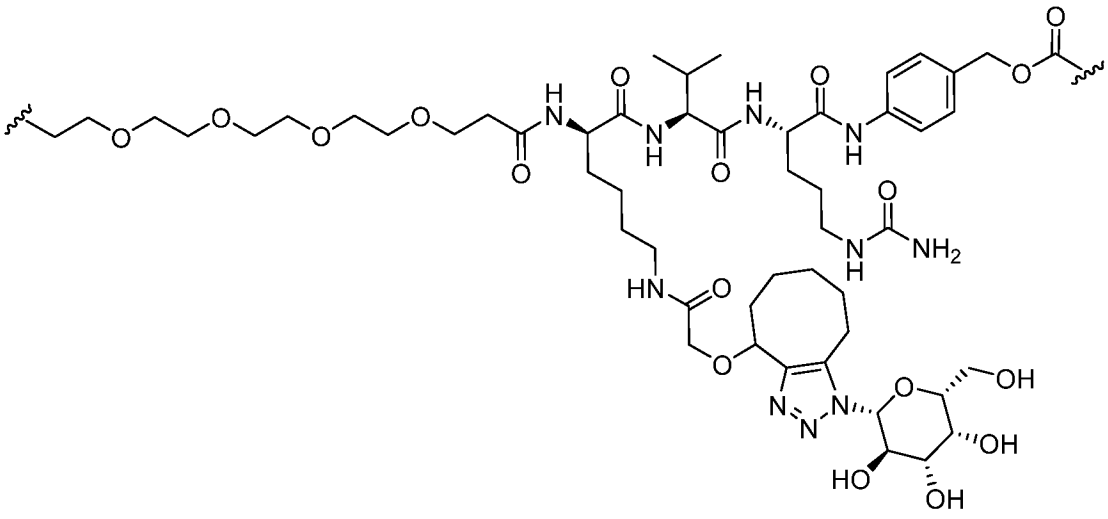


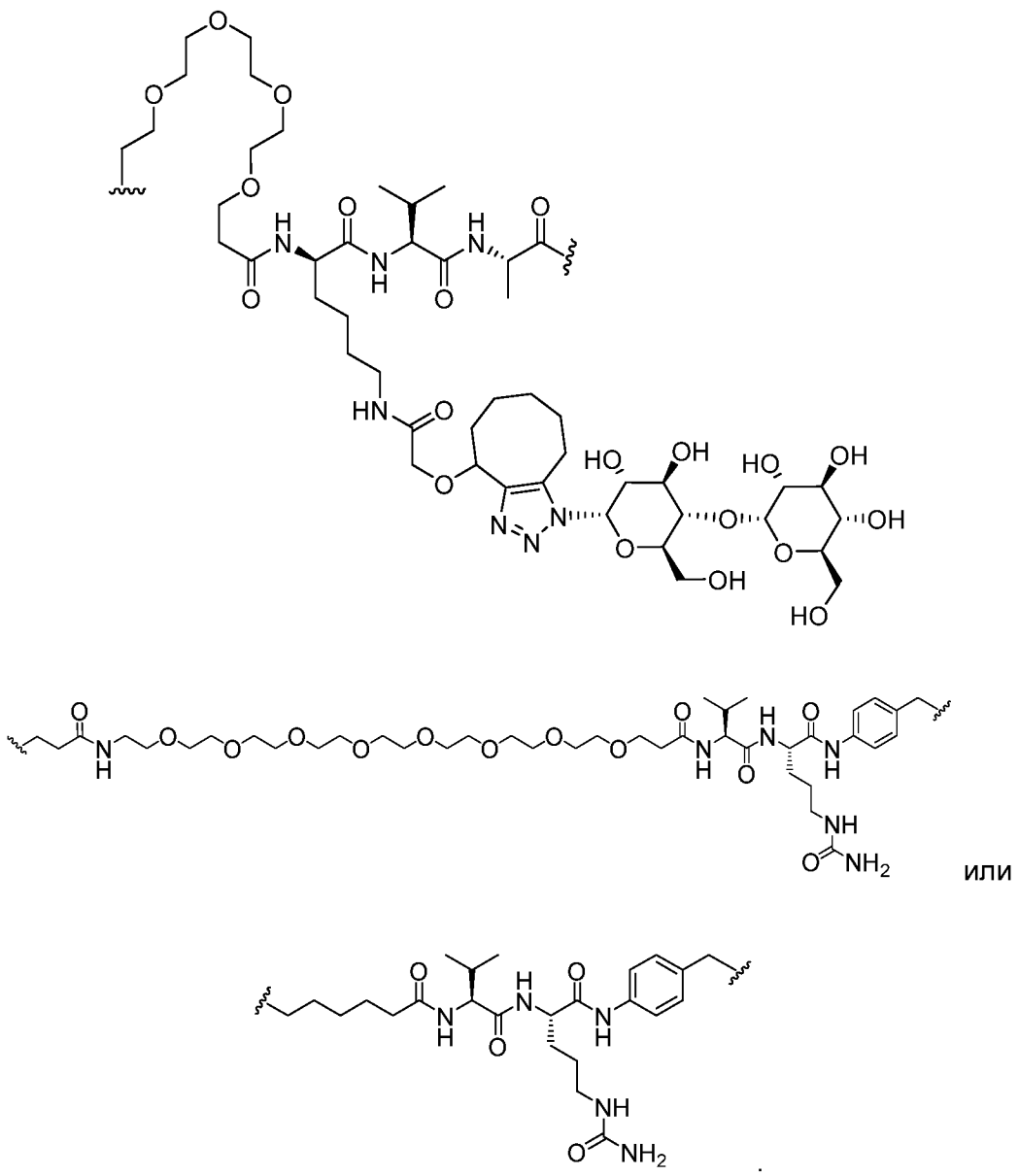








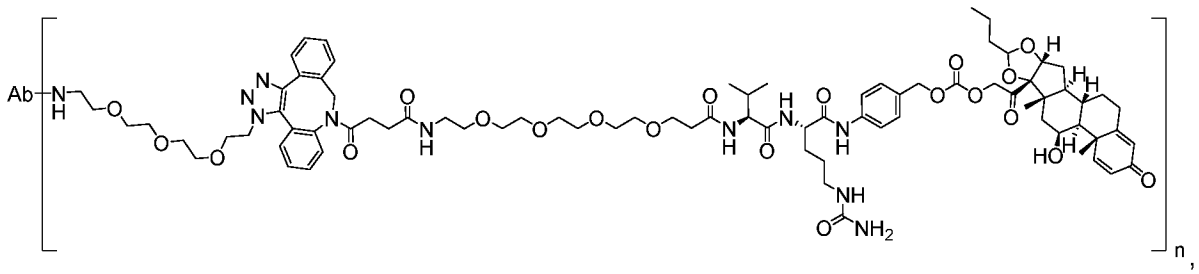




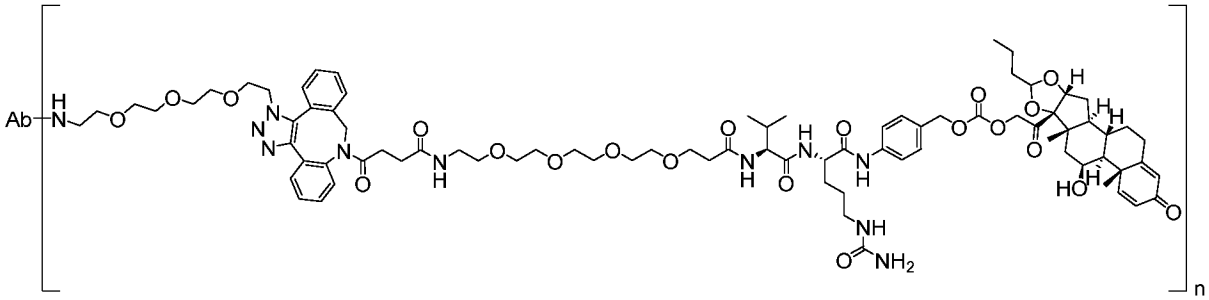
или

.

[0244] В некоторых случаях соединение Формулы (**I**) или (**III**) или (3000) выбирается из



и



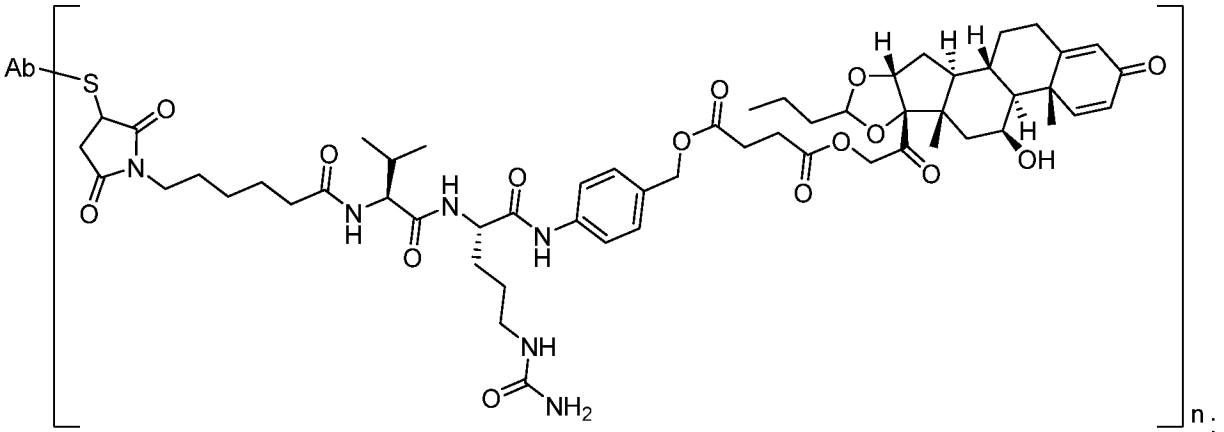
или их смеси;

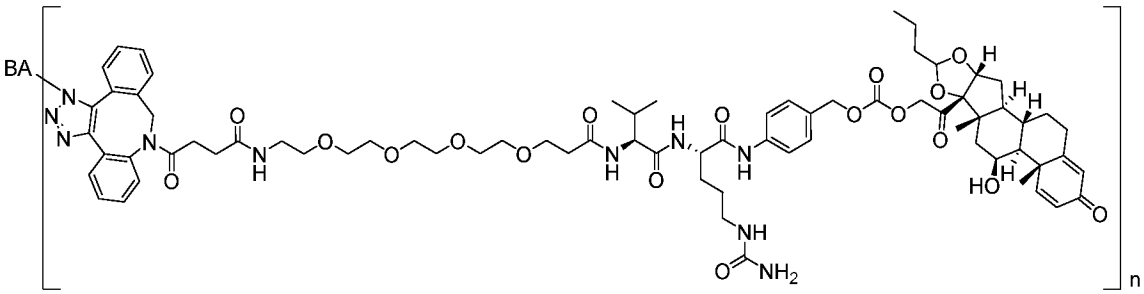
или его стереоизомерной формы, или региоизомера, или смеси региоизомеров, где

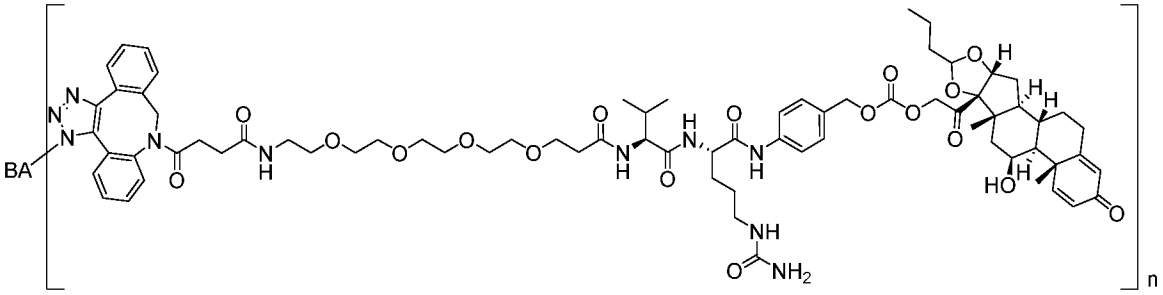
каждое Ab представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент; и

каждое число n представляет собой целое число от 1 до 4.

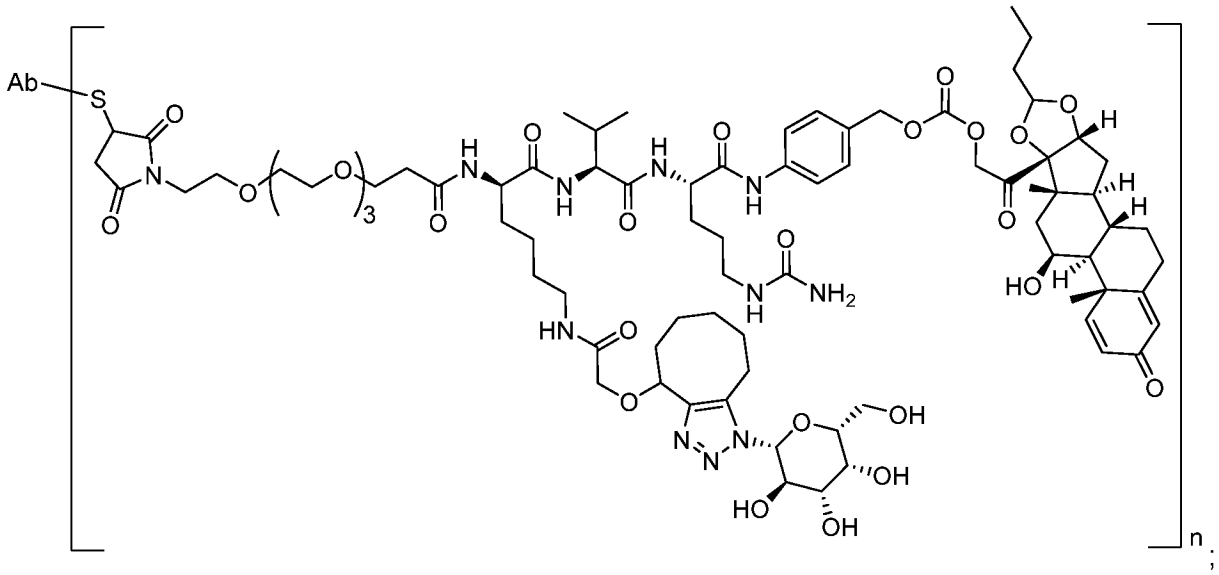
[0245] В некоторых случаях соединение Формулы (**I**) или (**III**) или (3000) выбирается из

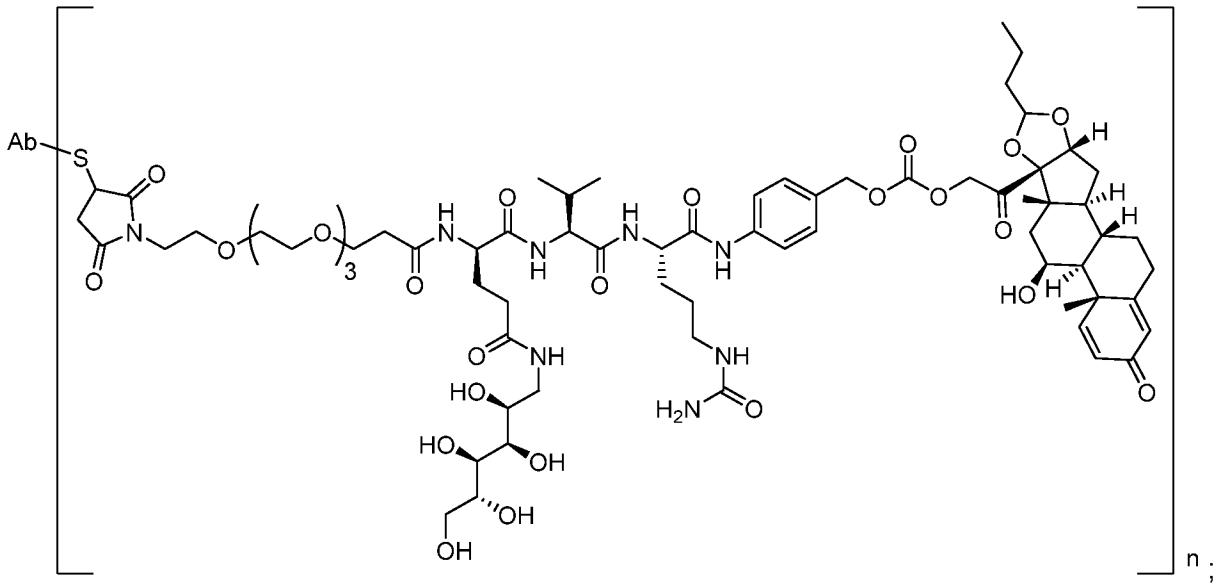


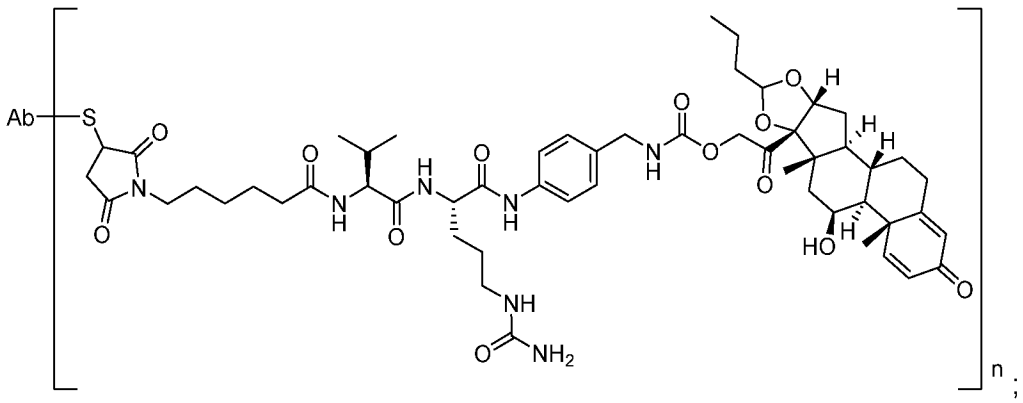


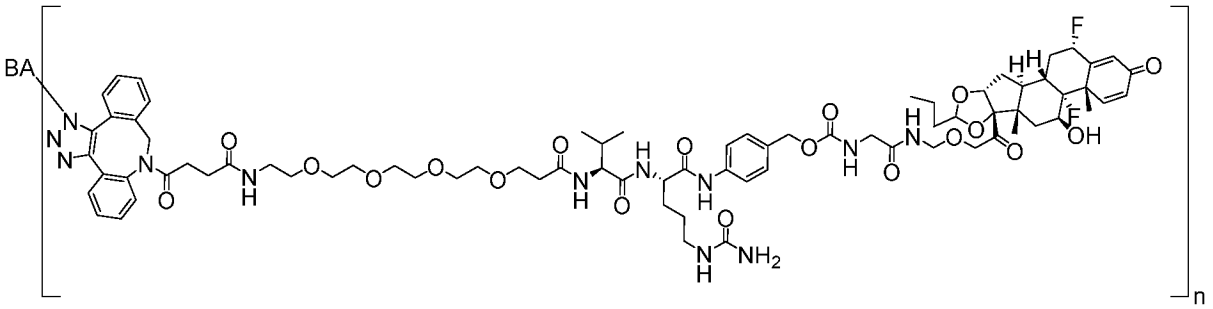


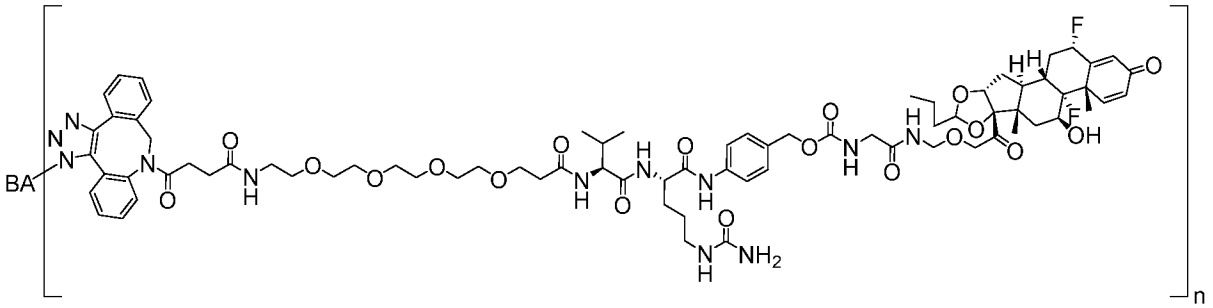
или их смеси;

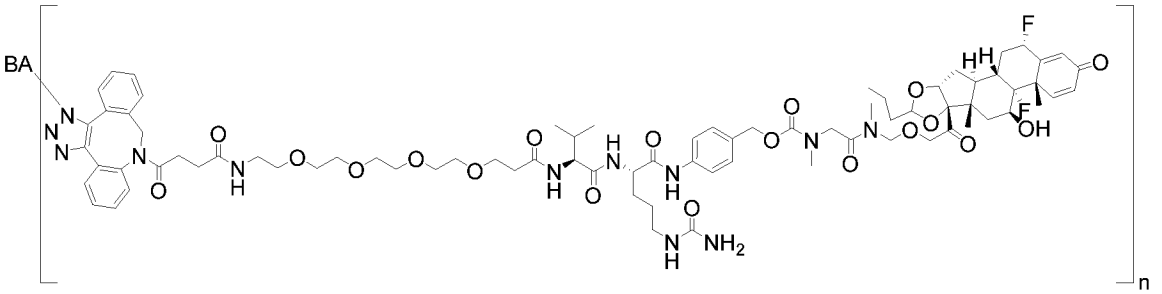


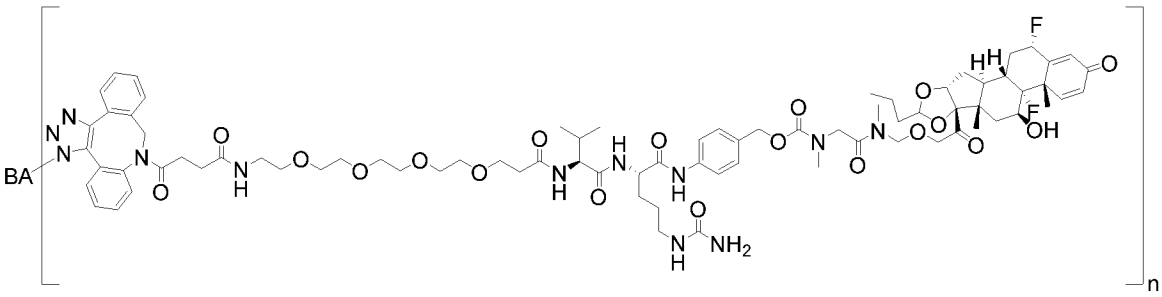




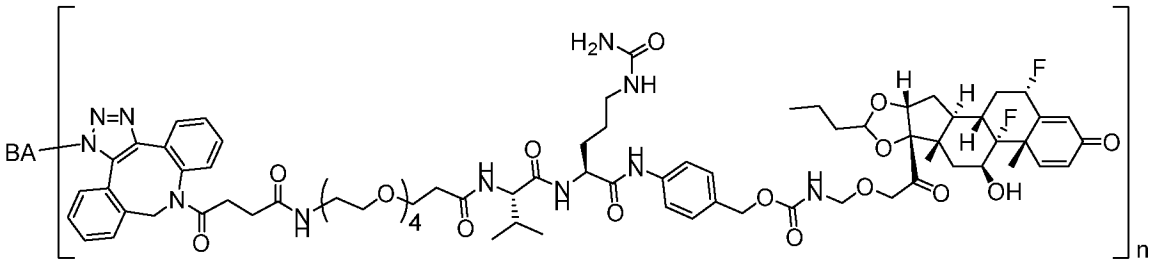


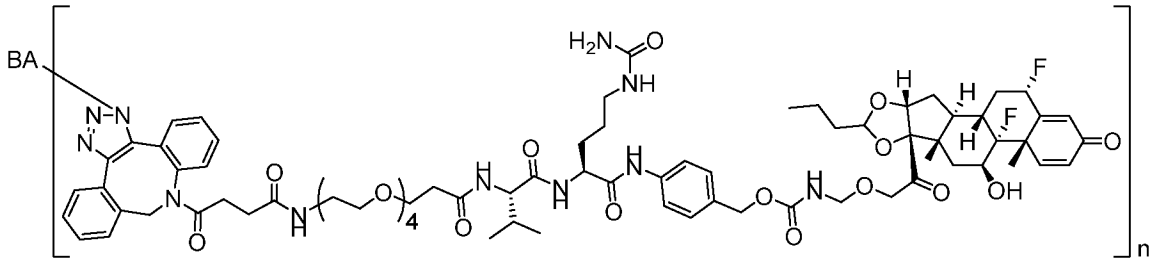




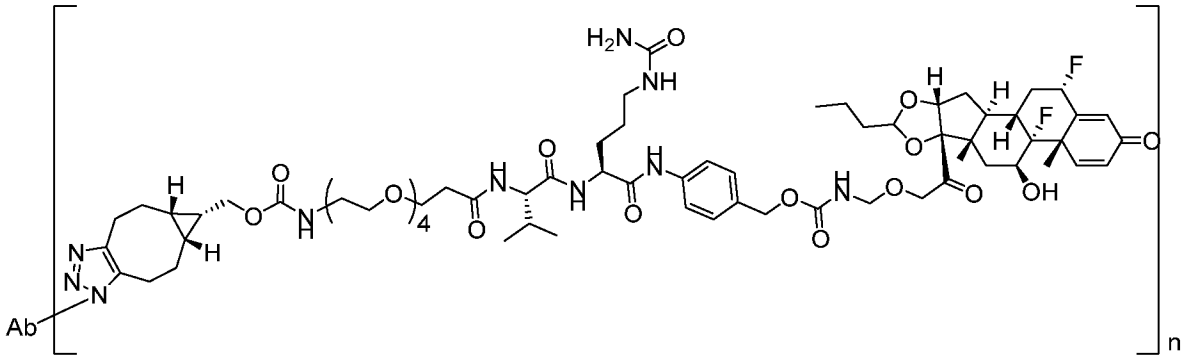


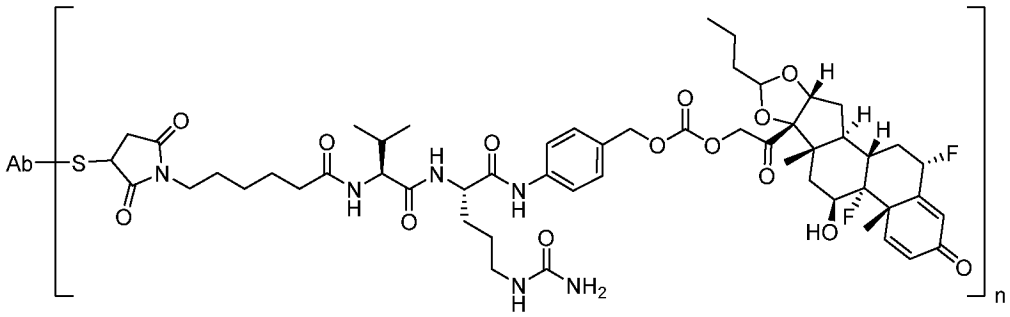
или их смеси,

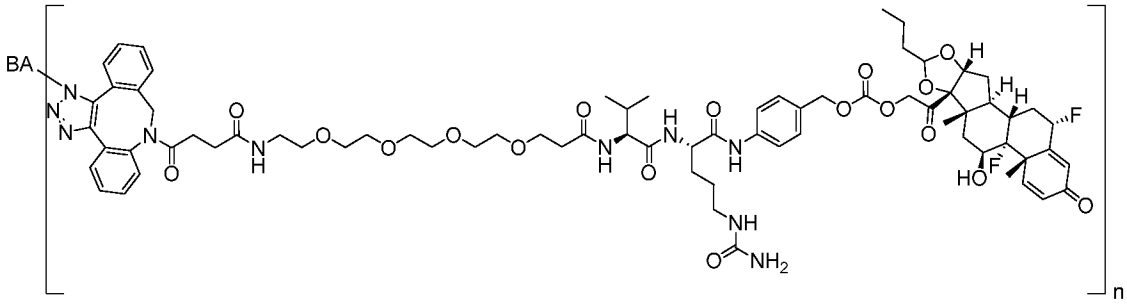


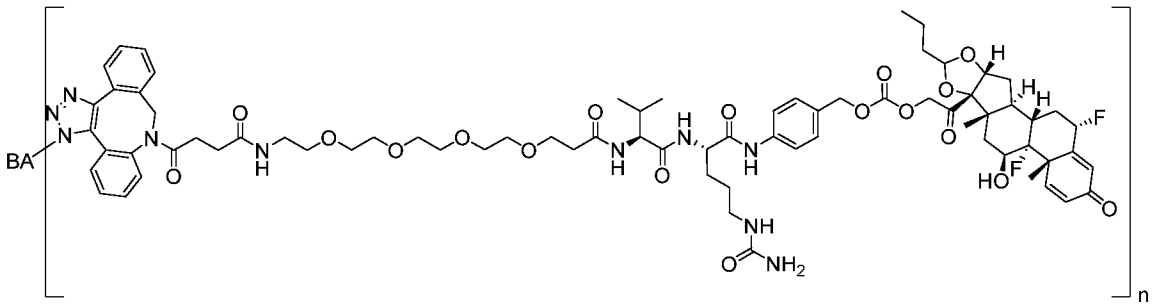


или их смеси

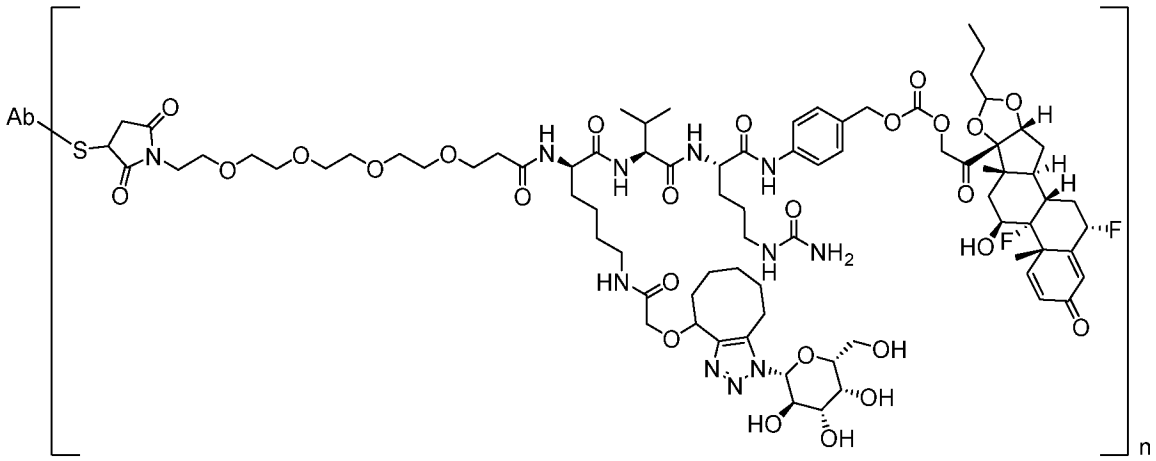


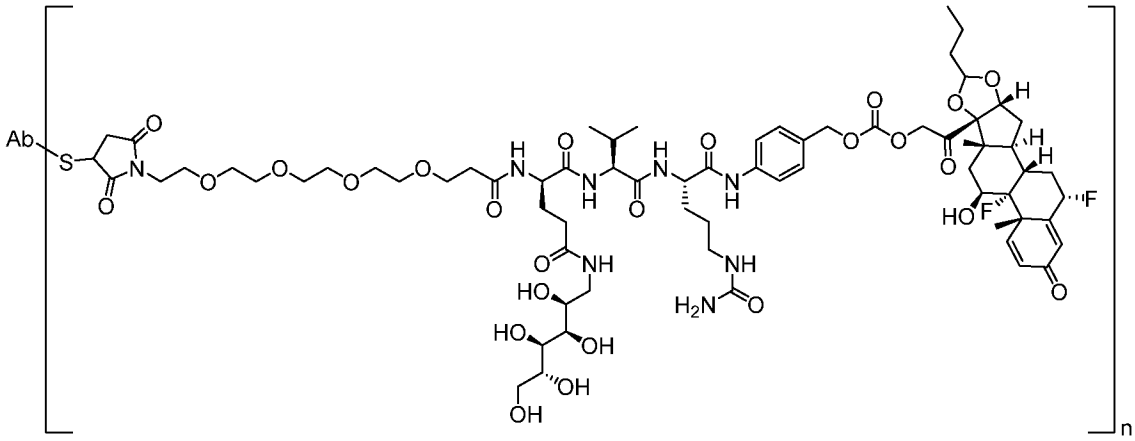


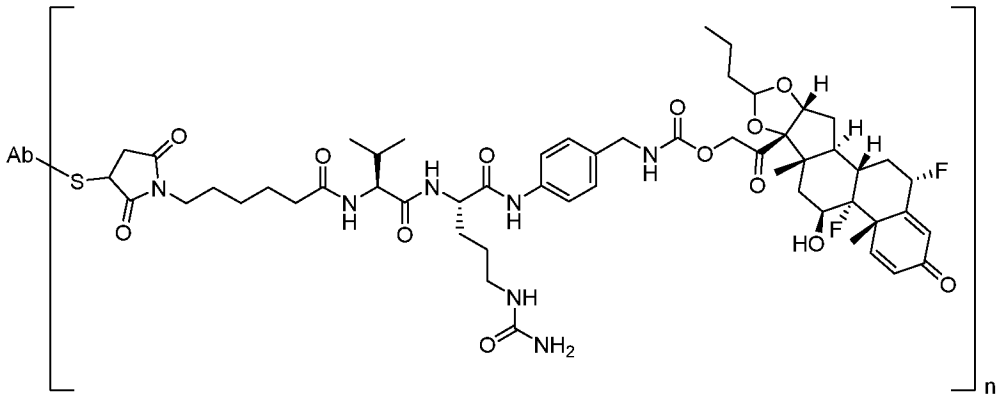


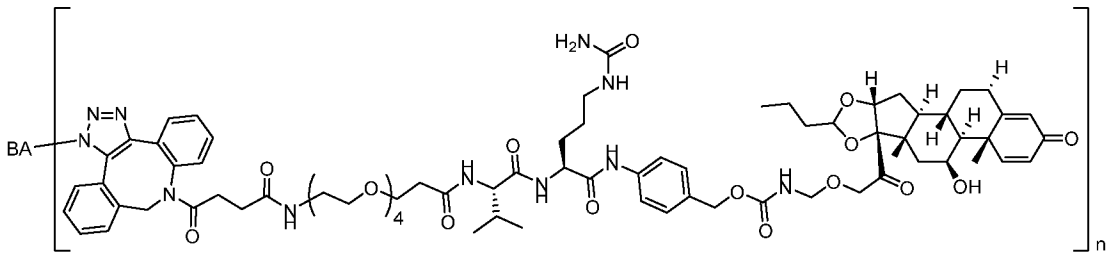


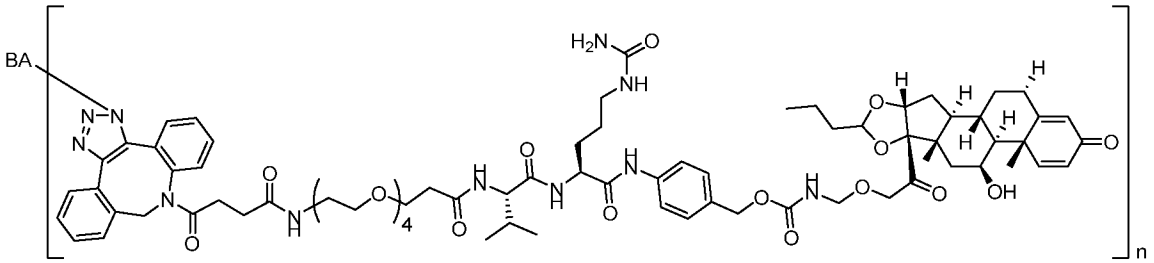
или их смеси



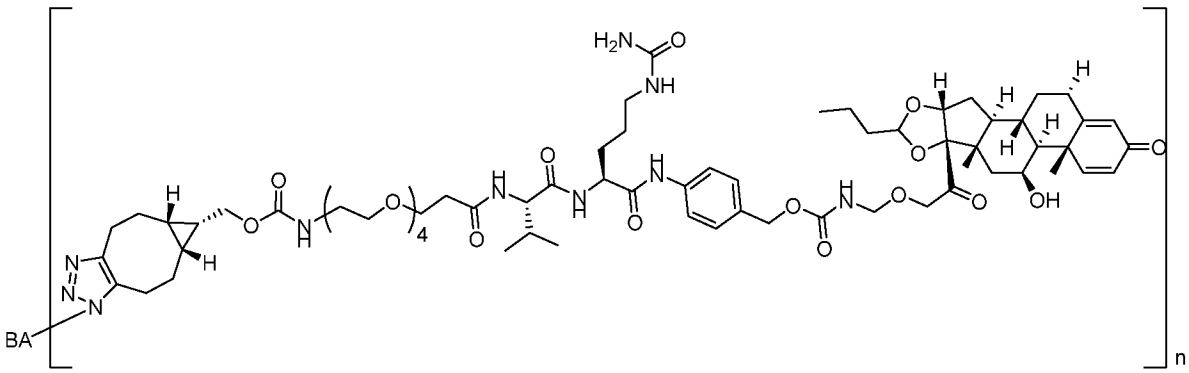






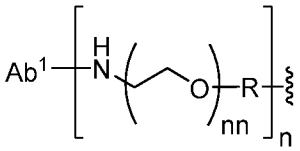


или их смеси



или его стереоизомерной формы, или региоизомера, или смеси региоизомеров, где

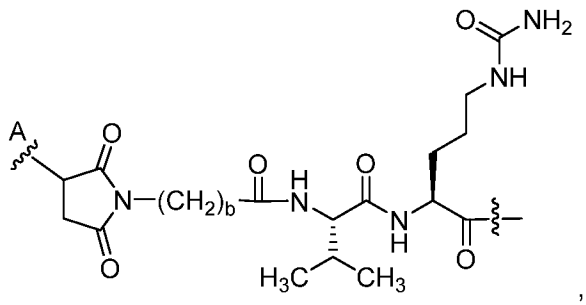
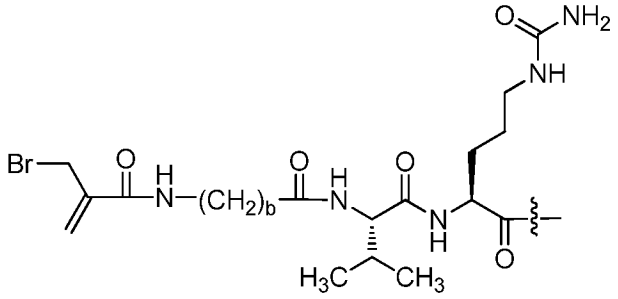
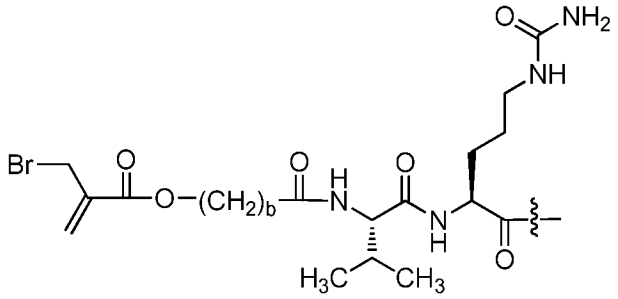
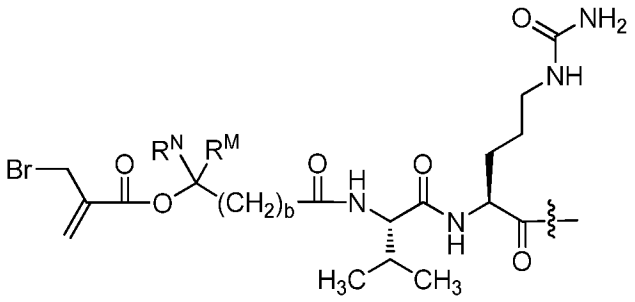
каждое Ab представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент;

каждый BA представляет собой  , где **Ab**[1] представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент; **R** представляет собой C_{2-4}-алкилен; и **nn** представляет собой целое число, которое выбирается от 2 до 4, включительно.

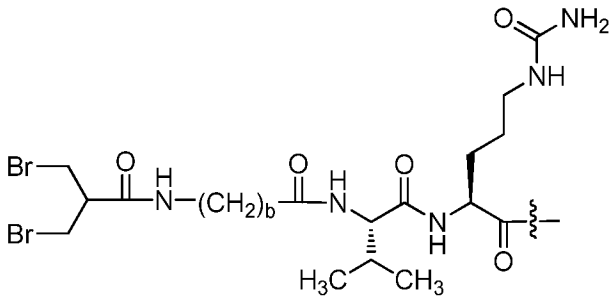
и

каждое число n - целое число от 1 до 4.

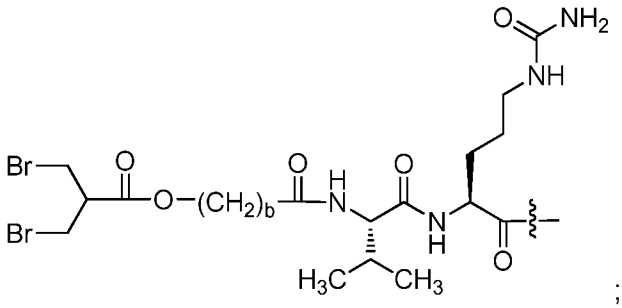
[0246] В некоторых дополнительных вариантах осуществления описанные здесь конъюгаты антитело-лекарственное средство могут содержать линкеры, описанные в документе US 9,951,141 B2, поданном 29 ноября 2016 года и выпущенном 24 апреля 2018 года, при этом эти линкеры включены в настоящий документ посредством ссылки. В

некоторых случаях линкер содержит:  , где b представляет собой целое число от 2 до 8 и  - связь со связующим агентом. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит две реактивные группы и может образовывать связи, например, с тиолами на двух разных цепях антитела или его антиген-связывающего фрагмента:  ; где b представляет собой целое число от 2 до 8. В других вариантах осуществления линкер содержит две реактивные группы и может образовывать связи, например, с тиолами на двух разных цепях антитела или его антиген-связывающего фрагмента:  ; где b представляет собой целое число от 2 до 8. В некоторых других вариантах осуществления линкер содержит две реактивные группы и может образовывать связи, например, с тиолами на двух разных цепях антитела или его антиген-связывающего фрагмента:  ; где b представляет собой целое число от 2 до 8, R^N представляет собой атом водорода или алкил и R^M - алкил. В дополнительных вариантах осуществления линкер содержит две реактивные группы и может образовывать связи, например, с тиолами на двух разных

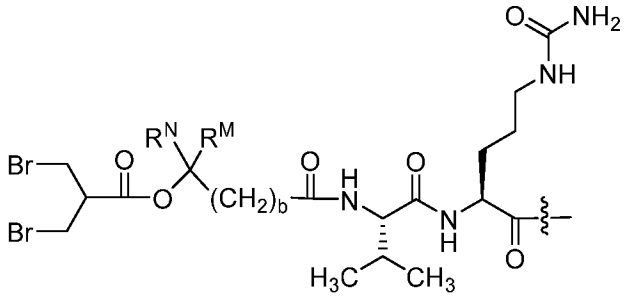
цепях антитела или его антиген-связывающего фрагмента:



; где b представляет собой целое число от 2 до 8. В определенных вариантах осуществления линкер содержит две реактивные группы и может образовывать связи, например, с тиолами на двух разных цепях антитела или его антиген-связывающего фрагмента:



; где b представляет собой целое число от 2 до 8. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит две реактивные группы и может образовывать связи, например, с тиолами на двух разных цепях антитела или его антиген-связывающего фрагмента:



; где b представляет собой целое число от 2 до 8, R^N представляет собой атом водорода или алкил и R^M представляет собой алкил.

[0247] В Формулах (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**III**), (**3000**), (**5001**), (**5002**), (**5003**), (**5004**), (**6001**), (**6002**), (**6003**), (**6004**), (**6005**), (**7001**), (**7002**), (**7003**), (**7004**) и/или (**7005**), описанных здесь, и/или в **BA** – $[(\mathbf{L})_{0\text{-}1}$ – **PA**$]_n$, **PA** может быть связана с BA с помощью любого линкера **L**, который считается подходящим. Линкеры представляет собой любую группу или компонент, которые соединяют или связывают описанные здесь антитело или антиген-связывающие белки с терапевтическим компонентом, например, стероидом или модулятором LXR. Подходящие линкеры можно найти, например, в работах *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins*; Phillips, G. L., Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L., Ed.; Humana Press, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Wang, J., Shen, W.-C., and Zaro, J. L., Eds.; Springer International

Publishing, 2015, содержание каждой из которых включается в настоящий документ полностью посредством ссылки. В общем, подходящие линкеры связывающих агентов для описанных здесь конъюгатов антител - это линкеры, которые достаточно стабильны для использования периода полужизни в кровотоке антитела и в то же время способны высвобождать свою нагрузку после антиген-опосредованной интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры включают линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, расщепления посредством реакции гидролиза, восстановления или ферментативной реакции. Нерасщепляемые линкеры включают линкеры, которые высвобождают присоединенную нагрузку посредством лизосомной деградации антитела после интернализации. Подходящие линкеры включают, помимо прочего, кислотолабильные линкеры, гидролизлабильные линкеры, расщепляемые под воздействием ферментом линкеры, редукционно-лабильные линкеры, -саморасщепляющиеся линкеры/группы и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры включают, помимо прочего, линкеры, которые представляют собой или содержат пептиды, глюкурониды, сукцинимид-тиоэфиры, полиэтиленгликольные (ПЭГ) звенья, гидразоны, мал-капроильные звенья, дипептидные звенья, валин-цитрулиновые звенья и пара-аминобензильные (PAB) звенья.

[0248] Для создания или конструирования конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему описанию изобретения можно использовать любую линкерную молекулу или линкерную технологию, известную в данной отрасли. В определенных вариантах осуществления такой линкер является расщепляемым линкером. Согласно другим вариантам осуществления, такой линкер является нерасщепляемым линкером. Иллюстративные линкеры, которые могут применяться в контексте настоящего описания изобретения, включают линкеры, которые содержат или состоят из, например, , MC (6-малеимидокапроила), MP (малеимидопропаноила), валин-цитруллина, валин-аланина, дипептидного участка в расщепляемом протеазой линкере, аланин-фенилаланина, дипептидного участка в расщепляемом протеазой линкере, PAB (p-аминобензилоксикарбонила), SPP (N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио) пентаноата), SMCC (N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексана-1 карбоксилата), SIAB (N-сукцинимидил (4-иодо-ацетил)аминобензоата) и их вариантов и комбинаций. Дополнительные примеры линкеров, которые могут использоваться в контексте настоящего описания изобретения, представлены, например, в US 7,754,681 и в Ducry, Bioconjugate Chem., 2010, *21*:5-13, и в указанных там источниках, содержание которых включается в настоящий документ полностью посредством ссылки.

[0249] В определенных вариантах осуществления такие линкеры являются стабильными в физиологических условиях. В определенных вариантах осуществления такие линкеры являются расщепляемыми, например, способными высвобождать минимум часть нагрузки в присутствии фермента или при определенном диапазоне или значении pH. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит расщепляемый ферментом компонент. Иллюстративные расщепляемые ферментом компоненты включают, помимо прочего, пептидные связи, эфирые связи, гидразоны и дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления такой линкер включает расщепляемый катепсином линкер.

[0250] В некоторых вариантах осуществления такой линкер включает нерасщепляемый компонент.

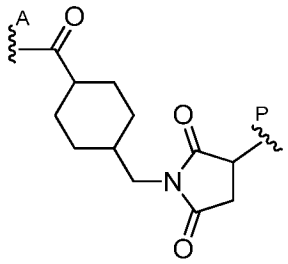
[0251] Подходящие линкеры также включают, помимо прочего, линкеры, которые химически связаны с двумя цистеиновыми остатками одного связующего агента, например, антитела. Такие линкеры могут служить для имитации дисульфидных связей антитела, которые разрушаются в результате процесса конъюгации.

[0252] В некоторых вариантах осуществления такой линкер содержит одну или более аминокислот. Подходящие аминокислоты включают, помимо прочего, природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные и L- или D- α-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер включает аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, их производное или их комбинацию. В определенных вариантах осуществления одна или более боковых цепей аминокислот связаны с группой боковой цепи, описанной далее. В некоторых вариантах осуществления такой линкер включает валин и цитруллин. В некоторых вариантах осуществления такой линкер включает лизин, валин и цитруллин. В некоторых вариантах осуществления такой линкер включает лизин, валин и аланин. В некоторых вариантах осуществления такой линкер включает валин и аланин.

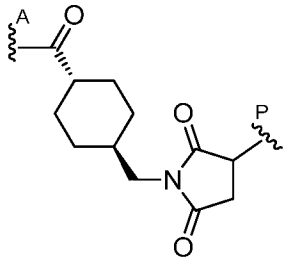
[0253] В некоторых вариантах осуществления такой линкер включает саморасщепляющуюся группу. Такой саморасщепляющейся группой может быть любая такая группа, известная специалистам. В конкретных вариантах осуществления такая саморасщепляющаяся группа - *p*-аминобензил (PAB) или его производное. В некоторых вариантах осуществления такая саморасщепляющаяся группа - *p*-аминобензилокси. В некоторых вариантах осуществления такая саморасщепляющаяся группа включает расщепляемую дисульфидную группу. Полезные производные включают *p*-

аминобензилоксикарбонил (PABC). Специалистам в данной области известно, что саморасщепляющаяся группа способна вступать в химическую реакцию, при которой высвобождаются оставшиеся атомы линкера из нагрузки.

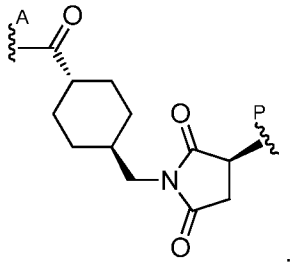
[0254] В некоторых вариантах осуществления такой линкер:



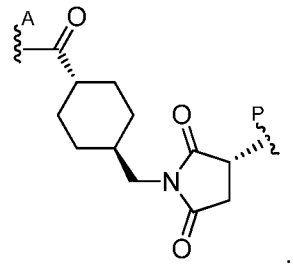
где  представляет собой связь с антителом или антиген-связывающим белком (например, через лизиновый остаток) и  представляет собой связь с нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления такой линкер:



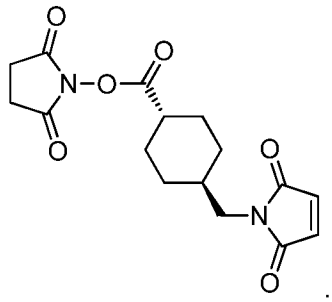
где  представляет собой связь с антителом или антиген-связывающим белком (например, через лизиновый остаток) и  представляет собой связь с нагрузкой. В определенных вариантах осуществления такой линкер:



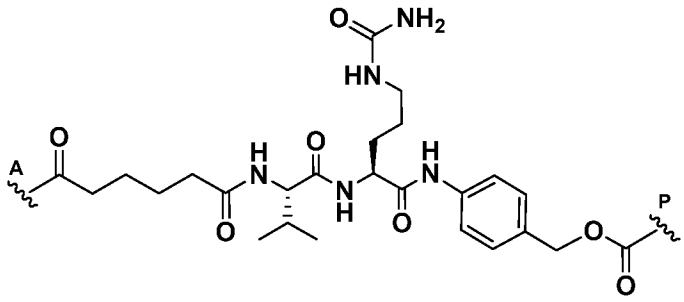
[0255] В определенных вариантах осуществления такой линкер:



[0256] В некоторых вариантах осуществления такой линкер получают от малеимидилметил-4-транс-циклогексанкарбоксисукцината:



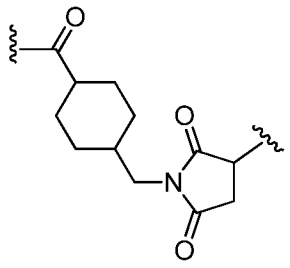
[0257] В некоторых вариантах осуществления такой линкер:



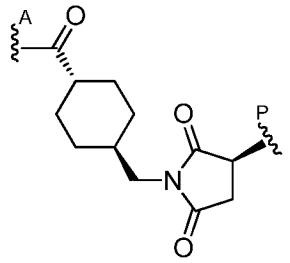
где  представляет собой связь с антителом или антиген-связывающим белком (например, через лизиновый остаток) и  - связь с нагрузкой.

[0258] В некоторых вариантах осуществления **L** представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления **L** представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления **L** содержит дипептид. В некоторых вариантах осуществления **L** содержит **PAB** компонент. В некоторых вариантах осуществления **L** содержит дисульфидный компонент.

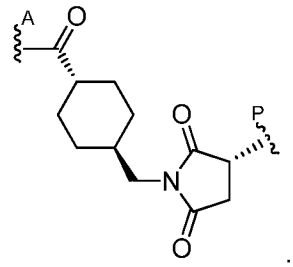
[0259] В некоторых вариантах осуществления **L** содержит компонент, имеющий следующую структуру:



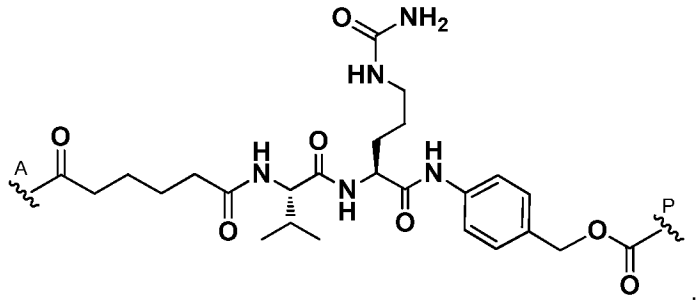
[0260] В некоторых вариантах осуществления L содержит компонент, имеющий следующую структуру:



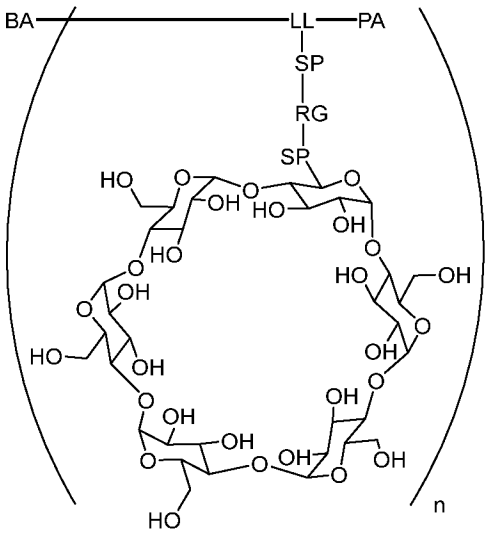
[0261] В некоторых вариантах осуществления L содержит компонент, имеющий следующую структуру:



[0262] В некоторых вариантах осуществления L содержит компонент, имеющий следующую структуру:



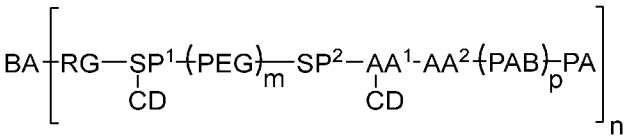
[0263] В определенных вариантах осуществления такой линкер содержит циклодекстриновую группу. В определенных вариантах осуществления такой линкер дает конъюгат антитело-лекарственное средство согласно Формуле (Ia):



(**Ia**)

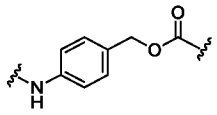
[0264] В Формуле (**Ia**) **BA** представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, **LL** представляет собой трехвалентный линкер, **RG** представляет собой остаток реактивного линкера, **SP** представляет собой независимо в каждом случае отсутствует или является спейсерной группой, нижний индекс **n** равен целое число от 1 до 30; и **PA** представляет собой нагрузку. В определенных вариантах осуществления **n** представляет собой число от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления **n** равен 4. В определенных вариантах осуществления **n** равен 2. В определенных вариантах осуществления **n** равен 1. В определенных вариантах осуществления **n** равен 3.

[0265] В определенных вариантах осуществления такой линкер содержит циклодекстриновую группу. В определенных вариантах осуществления такой линкер дает конъюгат антитело-лекарственное средство согласно Формуле (Id):



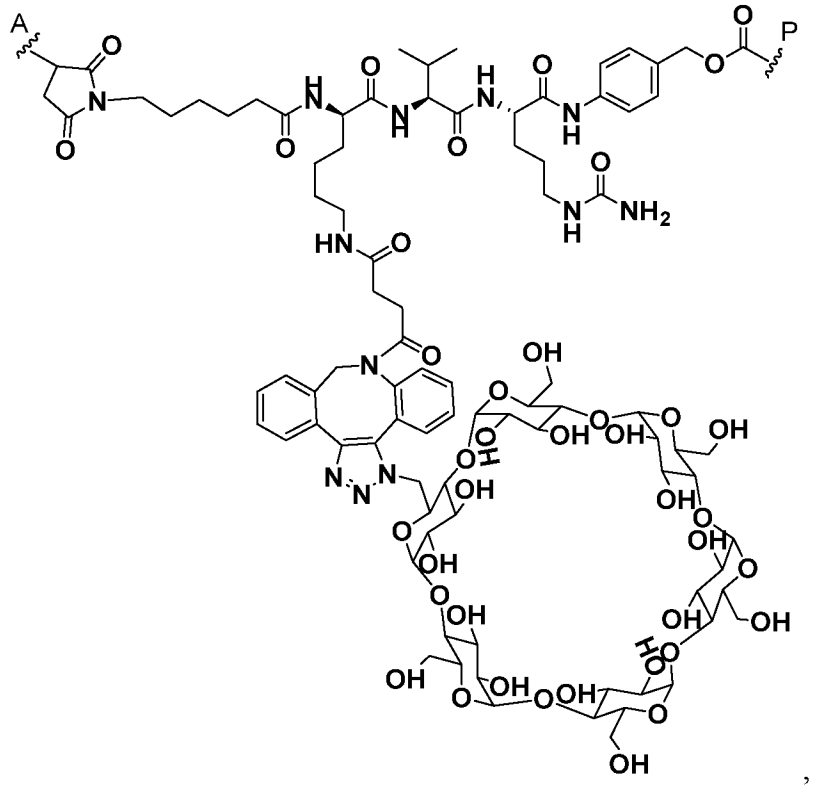
(**Id**)

[0266] В Формуле (**Id**) **BA** - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент; **RG** - остаток реактивной группы; **SP^1** и **SP^2** - каждый независимо в каждом случае отсутствует или является остатком спейсерной группы, и где **SP^1** содержит трехвалентный линкер; **AA^1** представляет собой трехвалентный линкер, содержащий аминокислотный остаток; **AA^2** представляет собой дипептидный остаток; **PEG** представляет собой полиэтиленгликольный остаток; **PAB** представляет собой

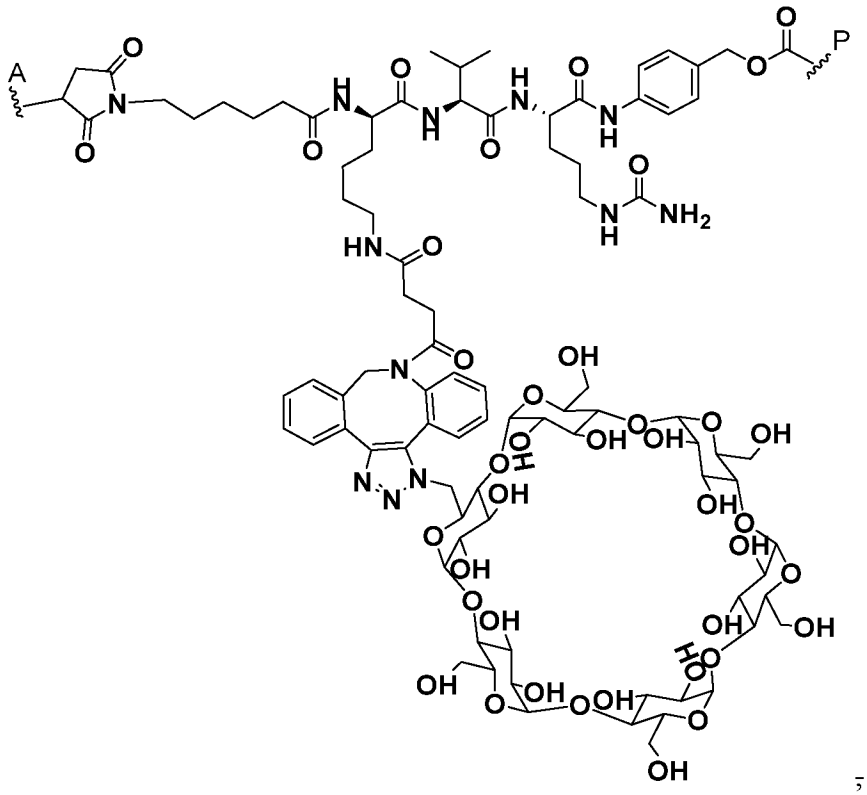

, где  обозначает атом, через который **PAB** связан с соседними группами в формуле, **CD** независимо в каждом случае отсутствует или является циклодекстриновым остатком, где присутствует минимум один **CD**, нижний индекс **n** представляет собой целое число от 1 до 30; нижний индекс **m** представляет собой целое число от 0 до 5; нижний индекс **p** равен 0 или 1; и **PA** представляет собой нагрузку. В этих примерах нижний индекс **m** равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых примерах нижний индекс **m** равен 0. В некоторых примерах нижний индекс **m** равен 1. В некоторых примерах нижний индекс **m** равен 2. В некоторых примерах нижний индекс **m** равен 3. В некоторых примерах нижний индекс **m** равен 4. В некоторых примерах нижний индекс **m** равен 5. В некоторых примерах нижний индекс **p** равен 0. В некоторых примерах нижний индекс **p** равен 1. В некоторых примерах любая из AA^1 или AA^2 включает независимо в каждом случае аминокислоту, которая выбирается из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производного или их комбинации. В определенных вариантах осуществления AA^1 представляет собой аминокислоту, которая выбирается из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производного или их комбинации. В определенных вариантах осуществления AA^1 представляет собой лизин. В определенных вариантах осуществления AA^1 представляет собой лизин или производное лизина. В определенных вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой глицин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA^1-AA^2 глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA^1-AA^2 представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA^1-AA^2 представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA^1-AA^2 представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA^1-AA^2 представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В определенных вариантах осуществления такой лизин представляет собой L-лизин. В определенных вариантах осуществления такой лизин представляет собой D-лизин. В некоторых примерах SP^1 независимо в каждом случае выбирается из группы,

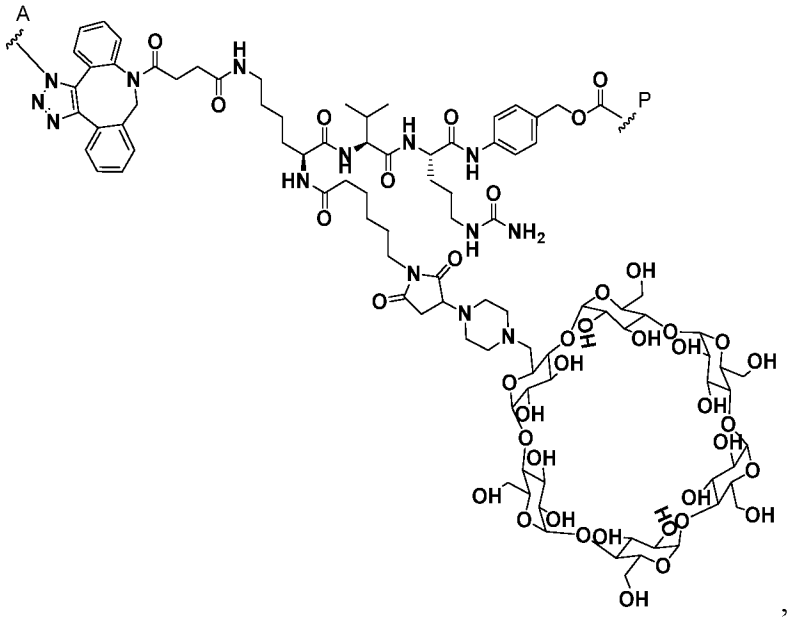
состоящей из C_{1-6} алкилена, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(-O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинаций, где нижний индекс **e** представляет собой целое число от 0 до 4, нижний индекс **u** представляет собой целое число от 1 до 8 и нижний индекс **v** представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых примерах SP^2 независимо в каждом случае выбирается из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(-O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинаций, где нижний индекс **e** представляет собой целое число от 0 до 4, нижний индекс **u** представляет собой целое число от 1 до 8 и нижний индекс **v** представляет собой целое число от 1 до 8.

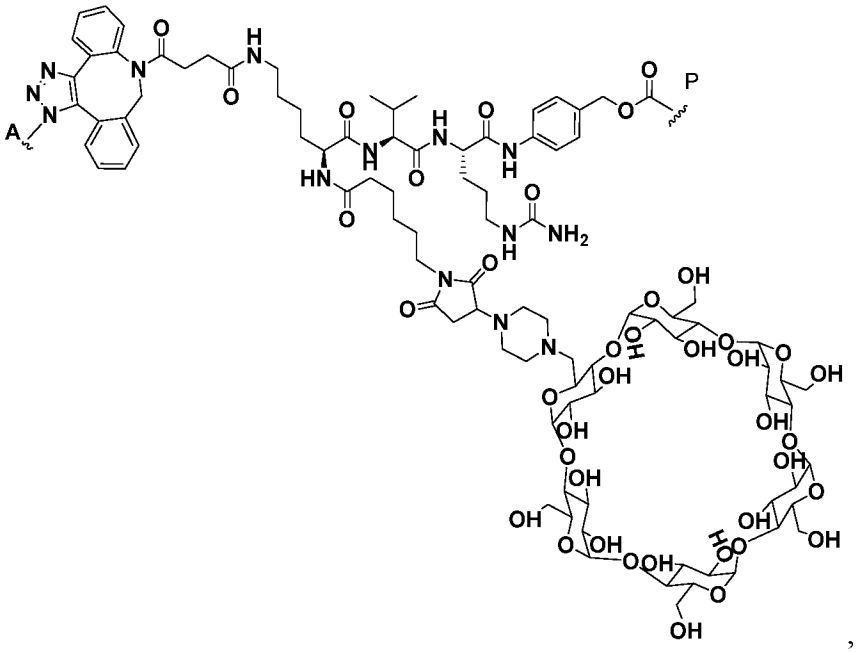
[0267] В определенных вариантах осуществления для Формул (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**III**), (**3000**), (**5001**), (**5002**), (**5003**), (**5004**), (**6001**), (**6002**), (**6003**), (**6004**), (**6005**), (**7001**), (**7002**), (**7003**), (**7004**) и/или (**7005**) такой линкер выбирается из:



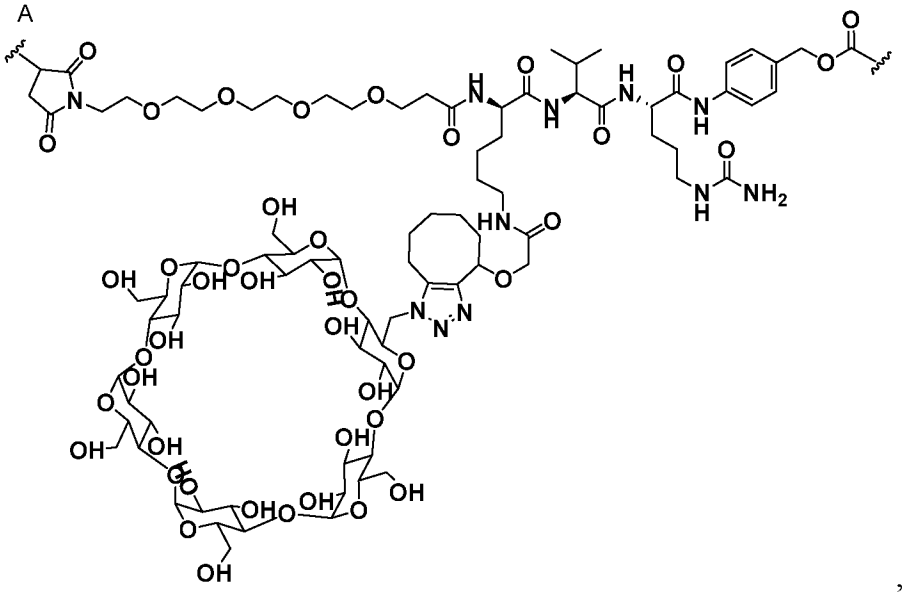
,



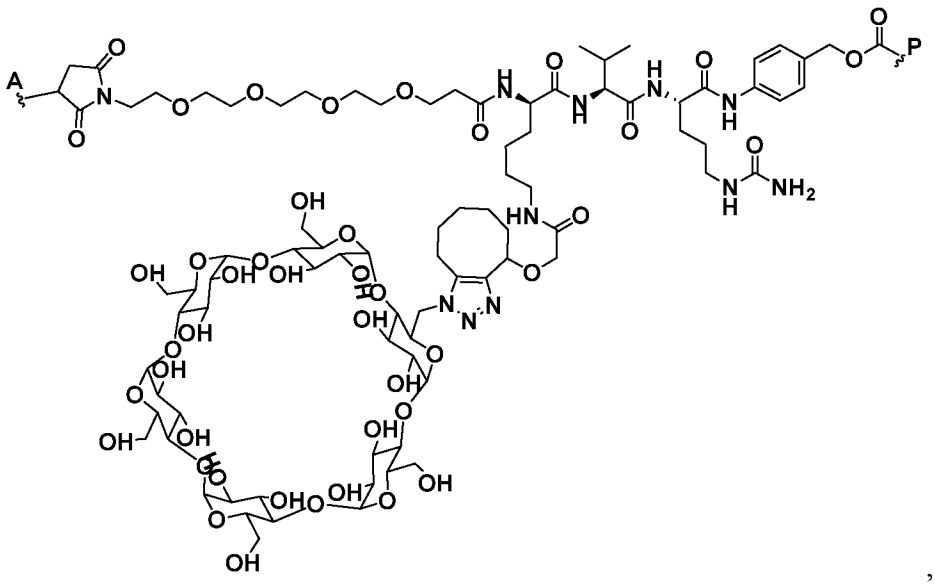




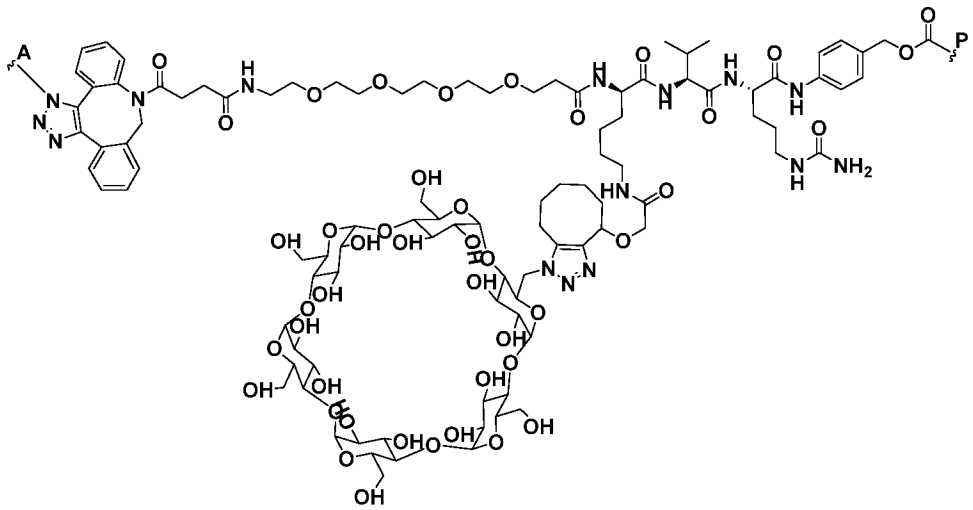
,



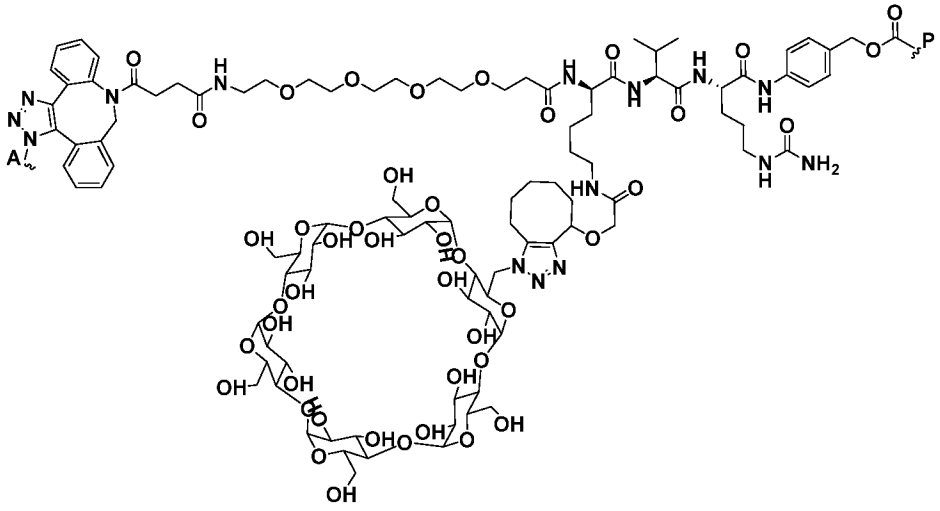
,



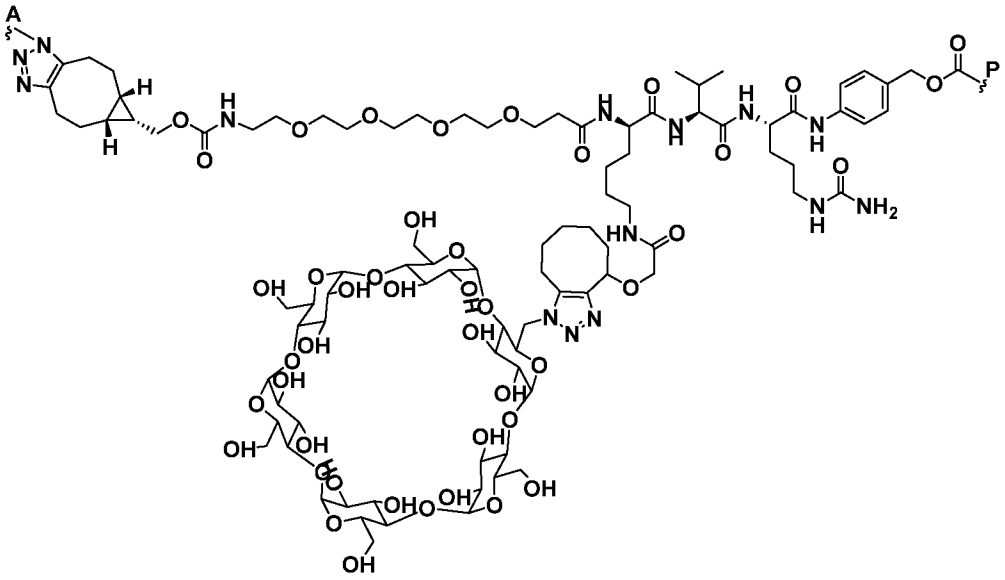
,



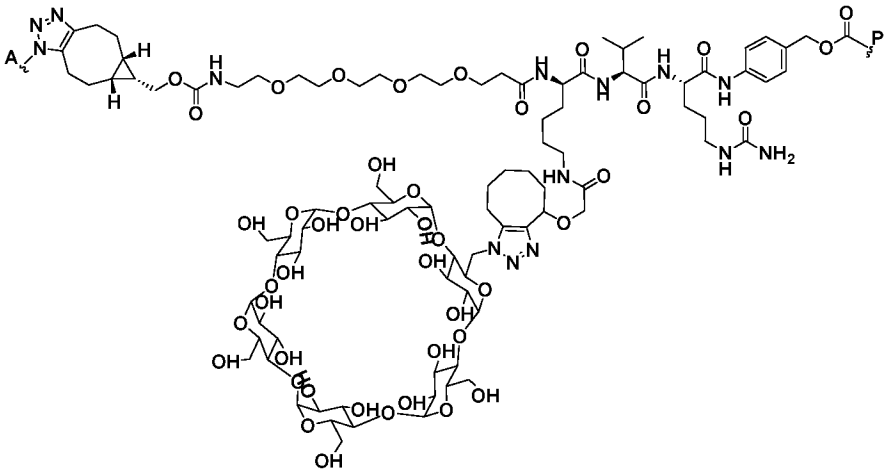
,



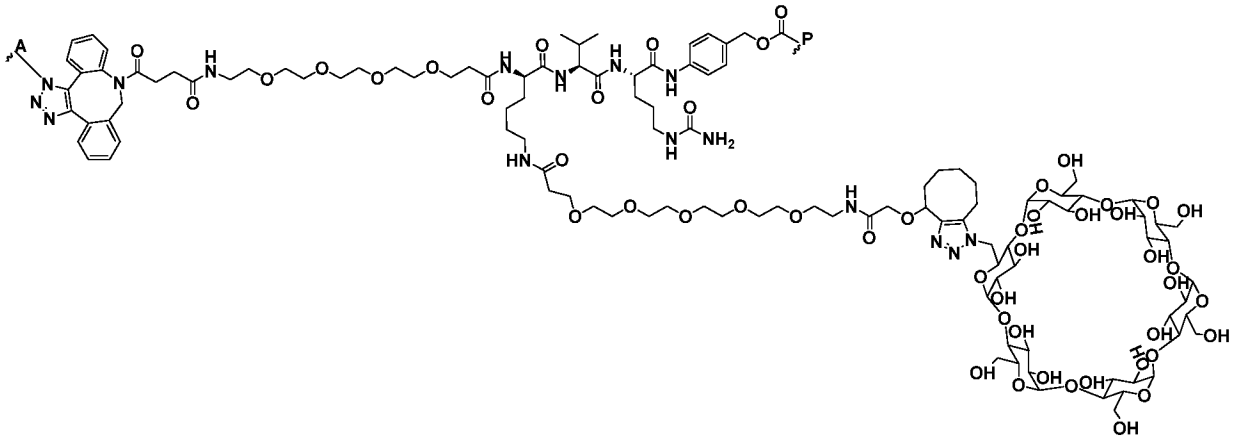
,



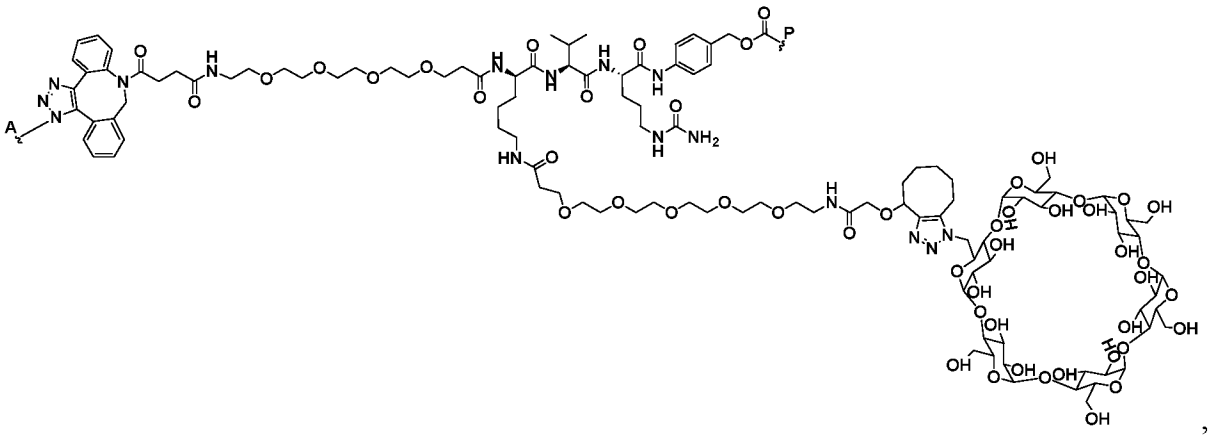
,



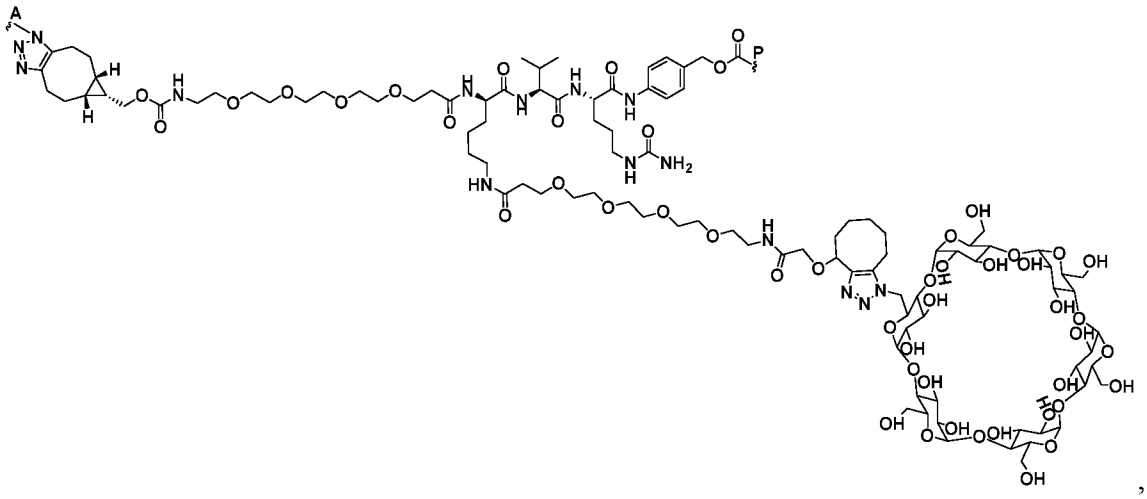
,



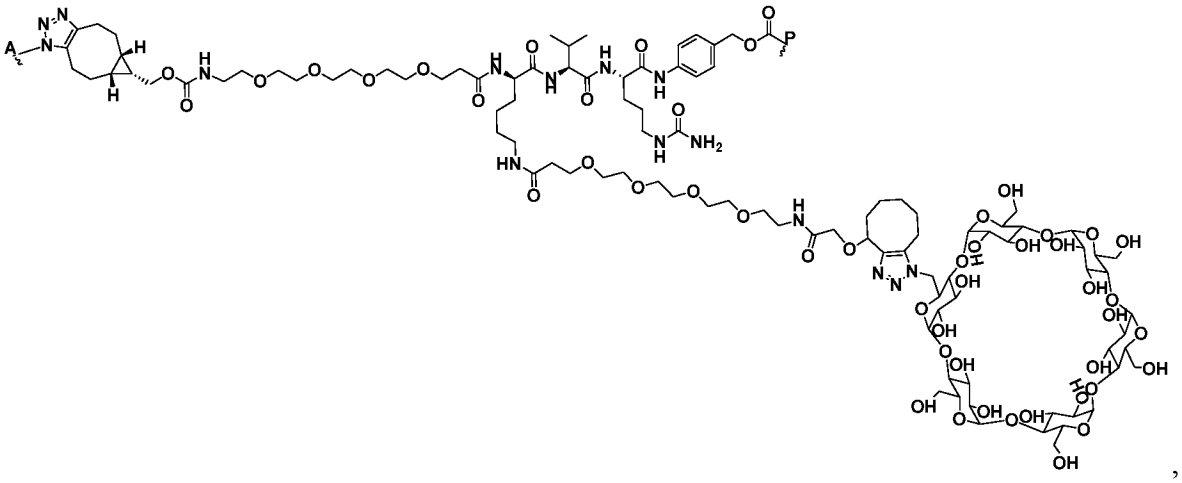
,



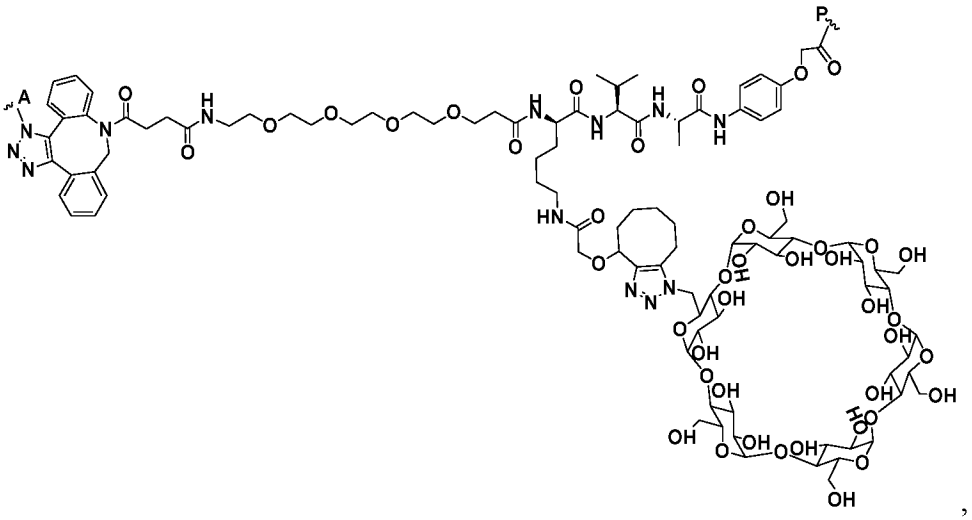
,



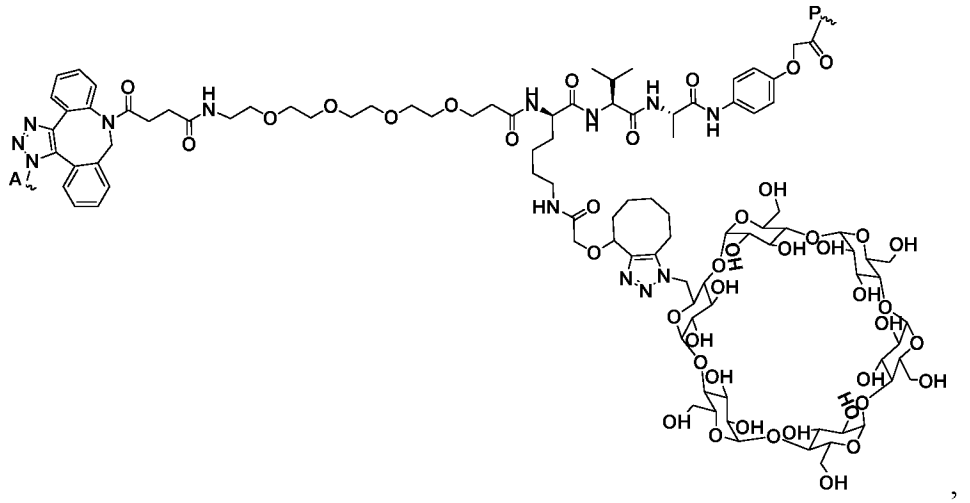
,



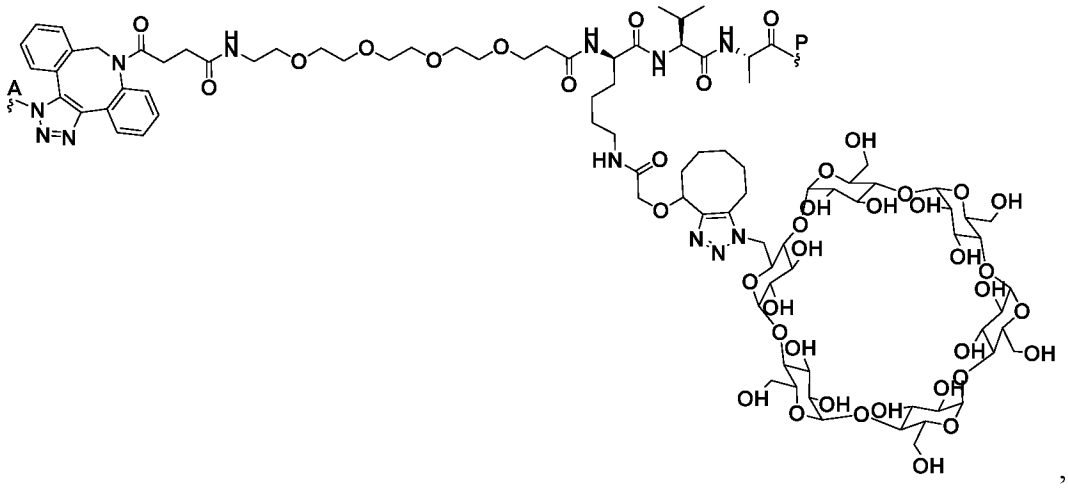
,



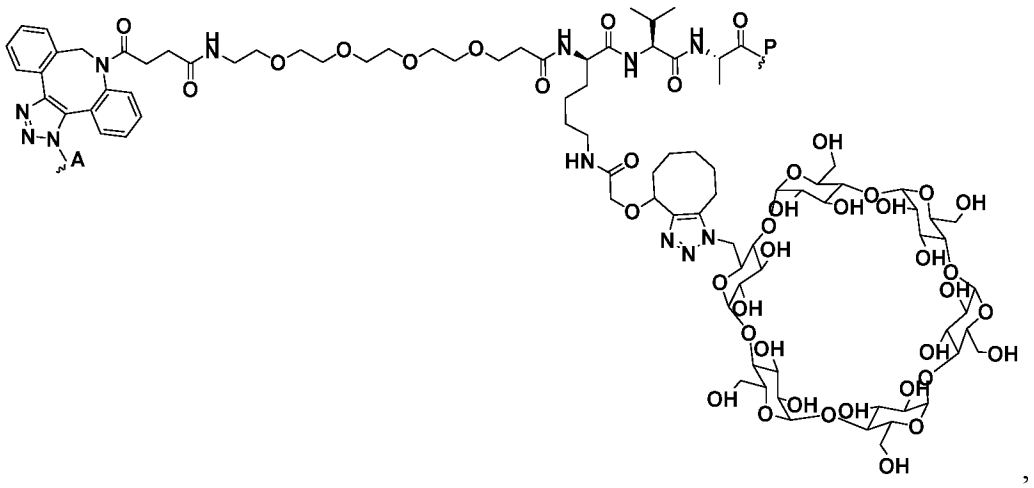
,



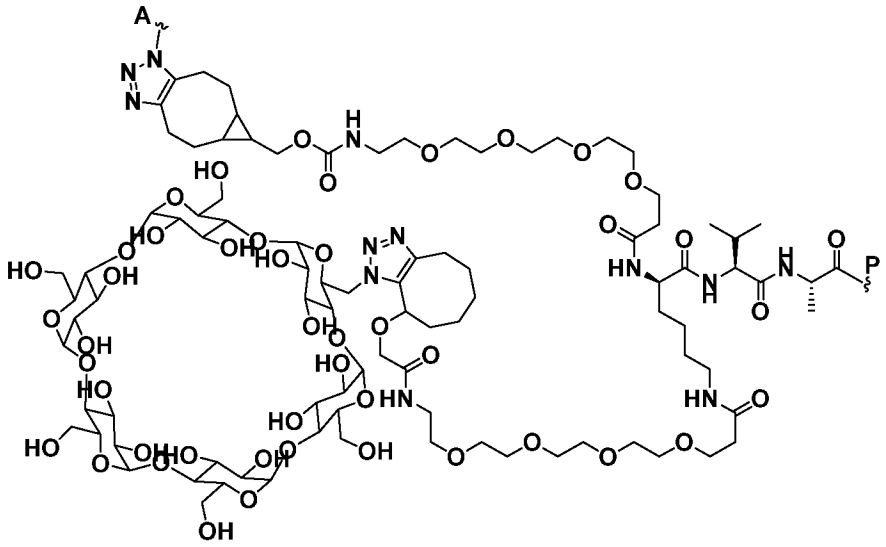
,



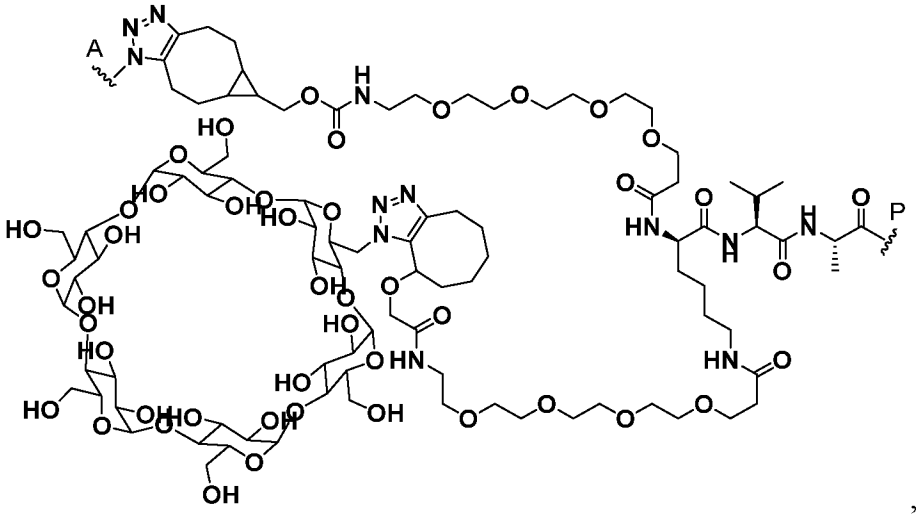
,



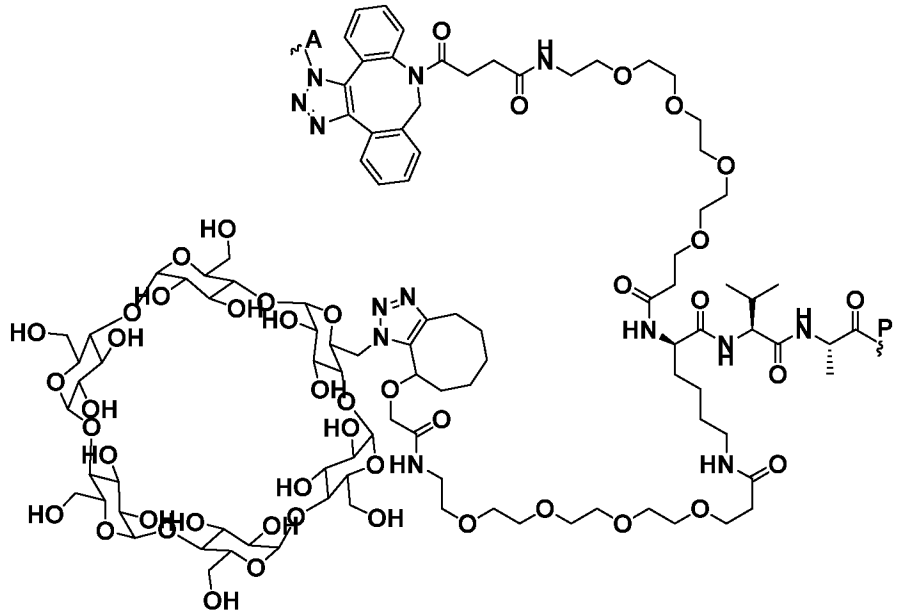
,



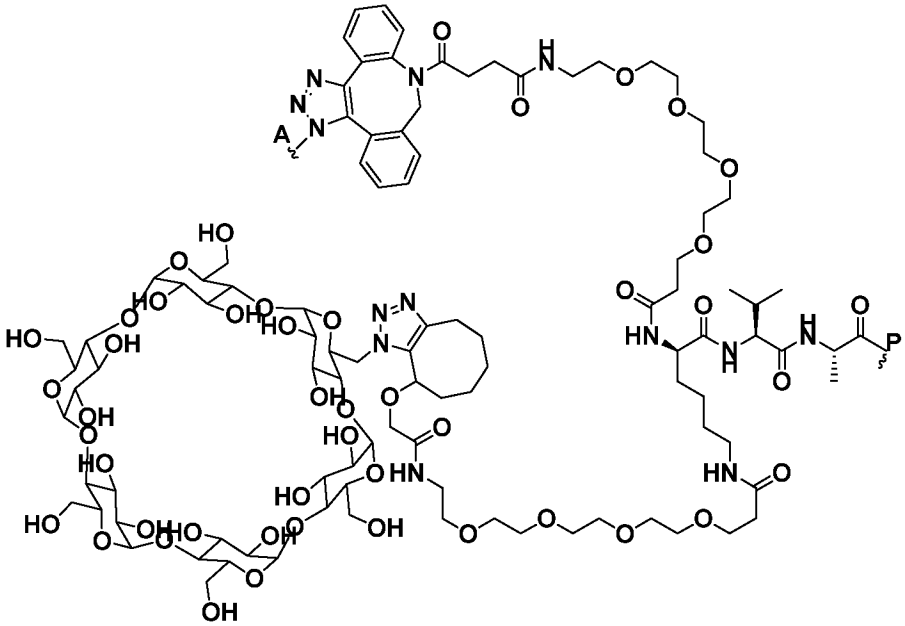
,



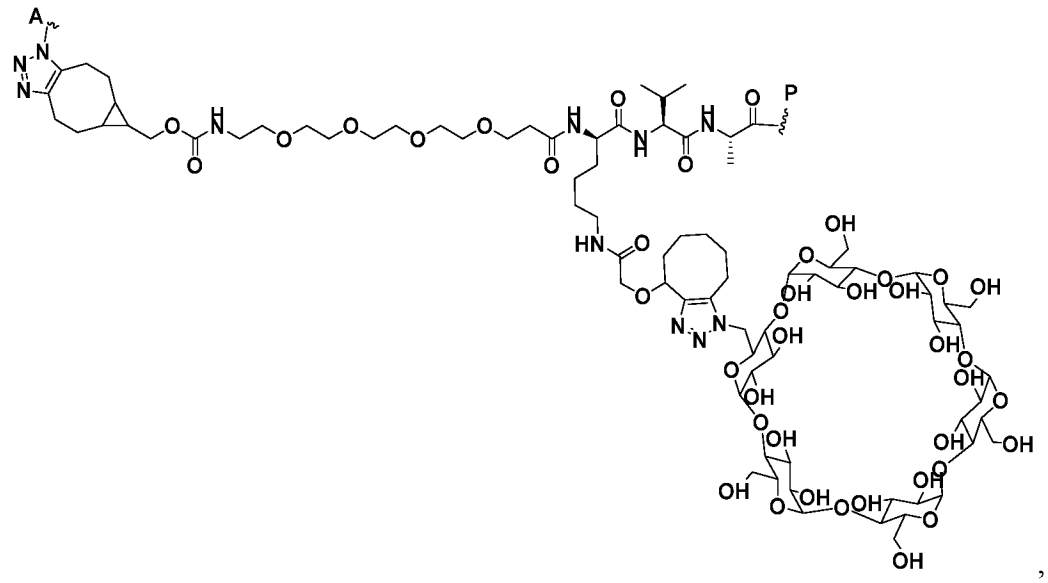
,



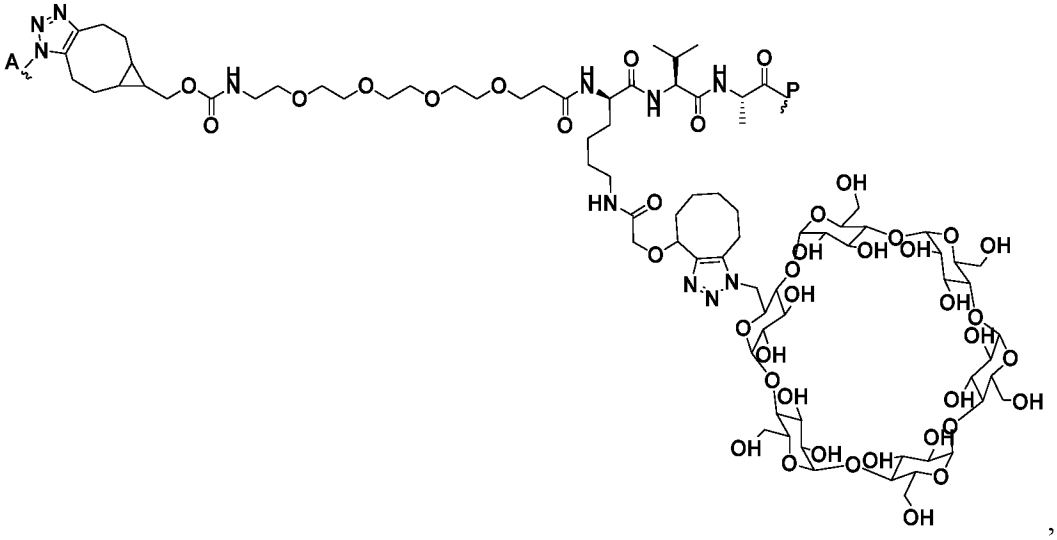
,



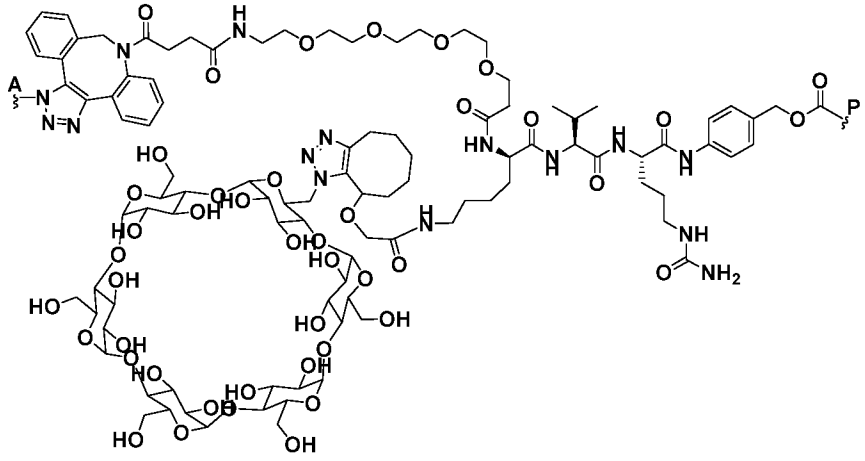
,



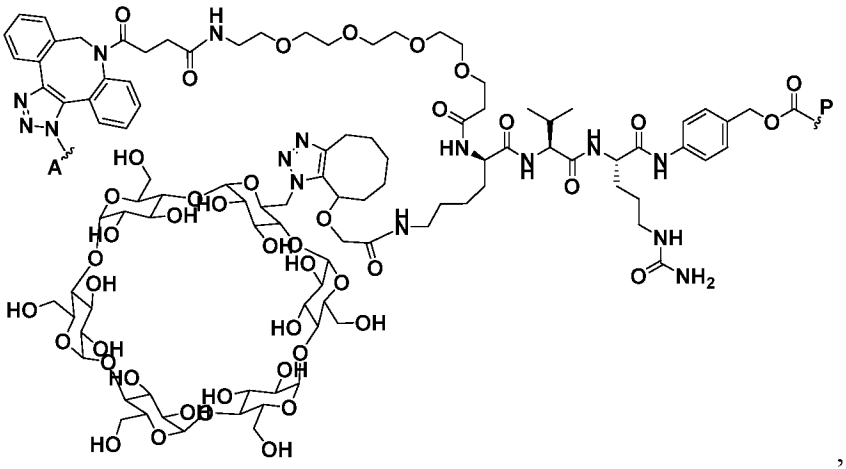
,



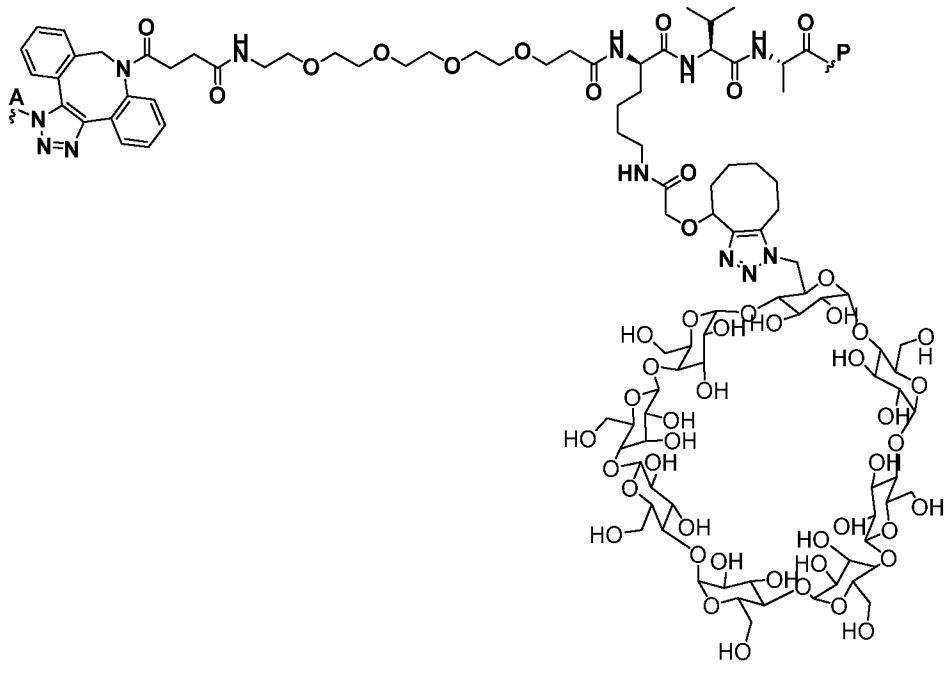
,



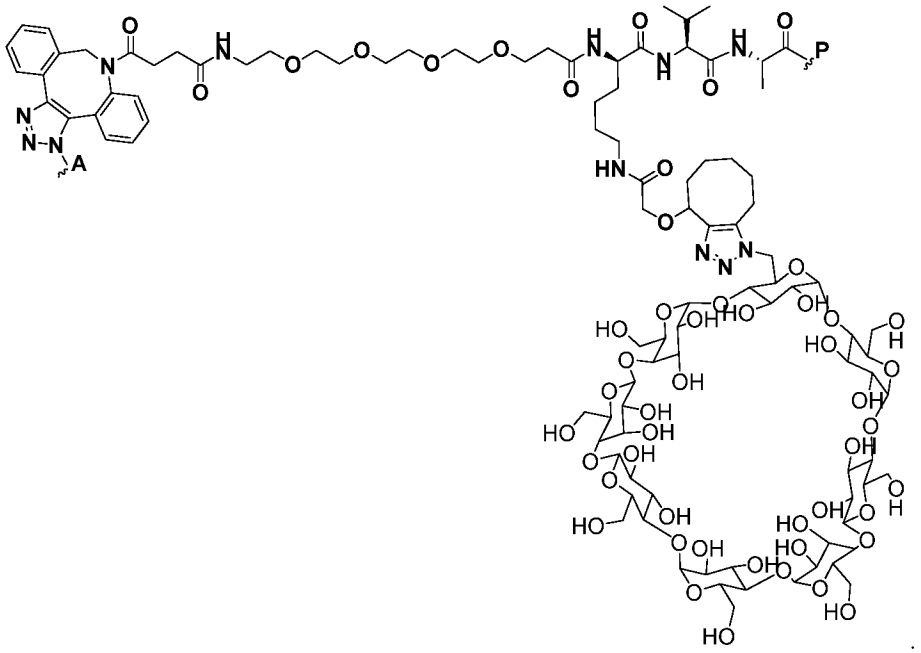
,



,

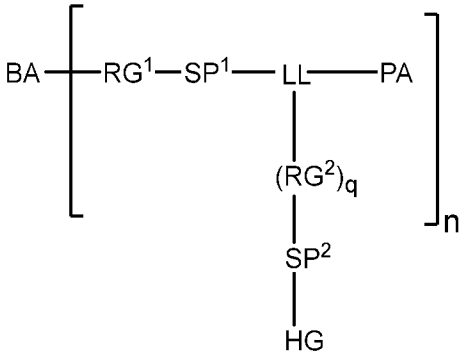


, и



Также в эти примеры включаются его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, региоизомер или смесь региоизомеров, где каждый  - связь со связующим агентом; а каждый  - связь с нагрузкой.

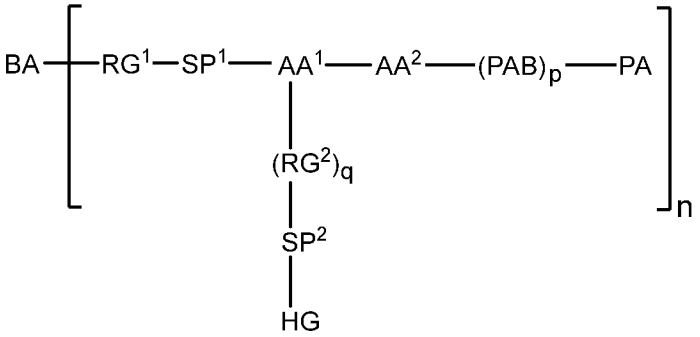
[0268] В определенных вариантах осуществления такой линкер содержит концевую гидрофильную группу (**HG**). В определенных вариантах осуществления такой линкер содержит тауриновую группу. В определенных вариантах осуществления такой линкер содержит концевую группу сульфоновой кислоты. В определенных вариантах осуществления такой линкер дает конъюгат антитело-лекарственное средство согласно Формуле (**II**):



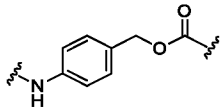
(**II**)

где в Формуле (II) **BA** представляет собой связующий агент; **LL** представляет собой трехвалентный линкер; RG^1 и RG^2 представляет собой остатки реактивной группы; SP^1 и SP^2 независимо в каждом случае отсутствуют или являются остатком спейсерной группы; **HG** представляет собой гидрофильный остаток; **PA** представляет собой остаток нагрузки; нижний индекс **n** представляет собой целое число от 1 до 30; и нижний индекс **q** равен 0 или 1. В некоторых случаях может присутствовать более одного трехвалентного линкера **LL**. В некоторых случаях **n** представляет собой целое число от 1 до 4. В некоторых случаях **n** равен 1. В некоторых случаях **n** равен 2. В некоторых случаях **n** равен 3. В некоторых случаях **n** равен 4. В некоторых случаях **HG** представляет собой концеваую гидрофильную группу. В некоторых случаях **HG** содержит одну концевую группу сульфоновой кислоты или ее соль. В других случаях **HG** содержит более одной концевой группы сульфоновой кислоты или ее солей. В некоторых случаях **HG** содержит одну концевую группу фосфоновой кислоты или ее соль. В других случаях **HG** содержит более одной концевой группы фосфоновой кислоты или ее солей. В некоторых случаях **HG** содержит одну концевую группу третичного амина или ее соль. В других примерах **HG** содержит более одной концевой группы третичного амина или ее солей. В некоторых случаях **HG** содержит один концевой полиол (например, глюкозу, мальтозу) или его производное. В других примерах **HG** содержит более одного концевого полиола (например, глюкозы, мальтозы) или его производного.

[0269] В другом примере соединение Формулы (II) соответствует Формуле (**IV**):



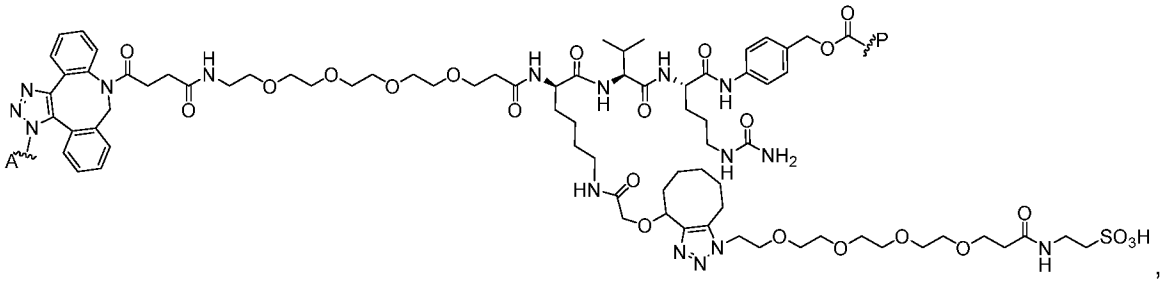
(**IV**).

[0270] В Формуле (**IV**) **BA**, RG^1, SP^1, RG^2, SP^2 и **HG** соответствуют приведенным выше определениям, AA^1 - трехвалентный линкер, содержащий аминокислотный остаток; AA^2 представляет собой дипептидный остаток; и **PAB** представляет собой  , где  обозначает атом, через который **PAB** связан с соседними группами в формуле; нижний индекс **p** равен 0 или 1; и нижний индекс **q** равен 0 или 1. В некоторых случаях

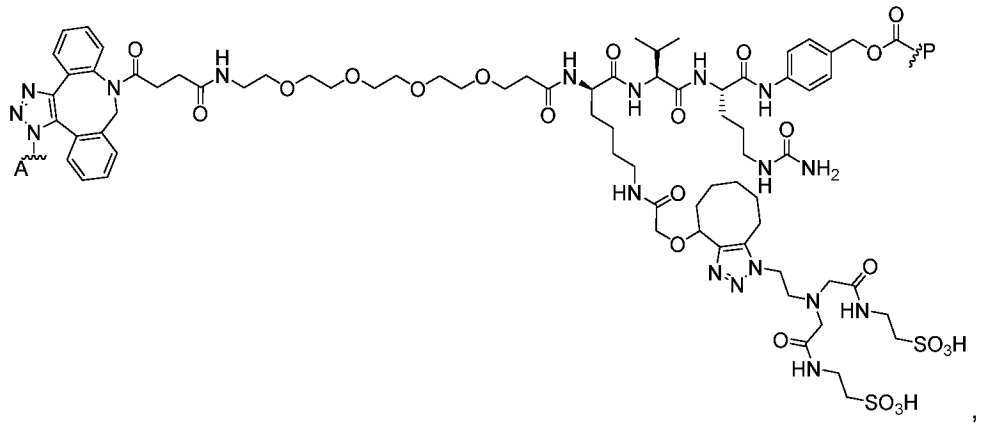
нижний индекс **p** равен 0, а нижний индекс **q** - 0. В некоторых случаях нижний индекс **p** равен 1; а нижний индекс **q** равен 0. В некоторых случаях нижний индекс **p** равен 0; и нижний индекс **q** равен 1. В некоторых случаях нижний индекс **p** равен 1; а нижний индекс **q** равен 1. В некоторых случаях **SP**^{1} содержит 0-5 полиэтиленгликольных (**ПЭГ**) остатков. В некоторых случаях **SP**^{2} содержит 0-5 **ПЭГ** остатков. В некоторых примерах **SP**^{1} независимо в каждом случае выбирается из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(-O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинаций, где нижний индекс **e** представляет собой целое число от 0 до 4, нижний индекс **u** представляет собой целое число от 1 до 8 и нижний индекс **v** - целое число от 1 до 8. В некоторых примерах **SP**^{2} независимо в каждом случае выбирается из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(-O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинаций, где нижний индекс **e** - целое число от 0 до 4, нижний индекс **u** представляет собой целое число от 1 до 8, а нижний индекс **v** представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых примерах любая из **AA**^{1} или **AA**^{2} включает независимо в каждом случае аминокислоту, которая выбирается из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производного или их комбинации. В определенных вариантах осуществления **AA**^{1} представляет собой аминокислоту, которая выбирается из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производного или их комбинации. В определенных вариантах осуществления **AA**^{1} - лизин. В определенных вариантах осуществления **AA**^{1} представляет собой лизин или производное лизина. В определенных вариантах осуществления **AA**^{1} представляет собой глутаминовую кислоту. В определенных вариантах осуществления **AA**^{2} представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления **AA**^{2} представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления **AA**^{2} представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления **AA**^{2} - аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления **AA**^{2} представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления **AA**^{2} представляет собой глицин-валин. В некоторых вариантах осуществления **AA**^{1}-**AA**^{2} представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления **AA**^{1}-**AA**^{2} представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления **AA**^{1}-**AA**^{2} представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления **AA**^{1}-**AA**^{2} представляет собой глутамин-валин-аланин. В определенных

вариантах осуществления такой лизин представляет собой L-лизин. В определенных вариантах осуществления такой лизин представляет собой D-лизин.

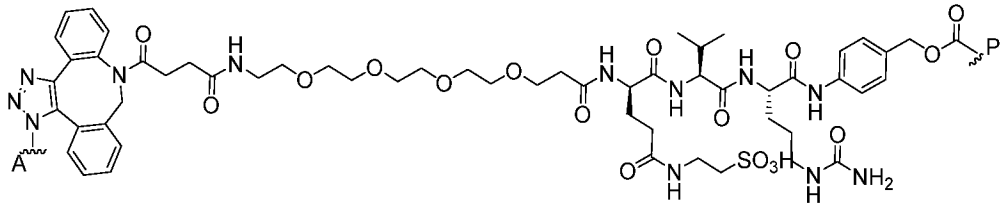
[0271] В определенных вариантах осуществления для Формул (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**III**), (**3000**), (**5001**), (**5002**), (**5003**), (**5004**), (**6001**), (**6002**), (**6003**), (**6004**), (**6005**), (**7001**), (**7002**), (**7003**), (**7004**) и/или (**7005**) такой линкер выбирается из:

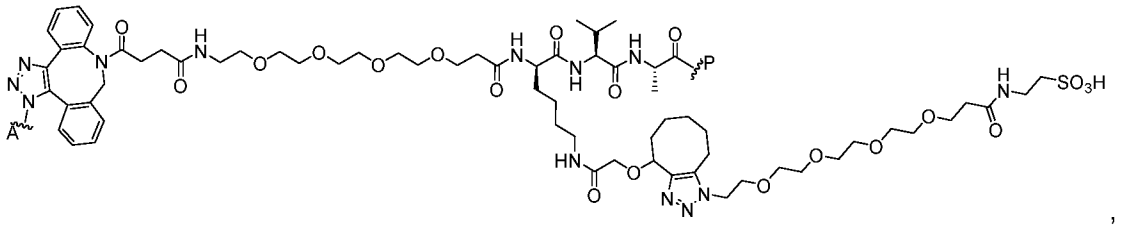


,



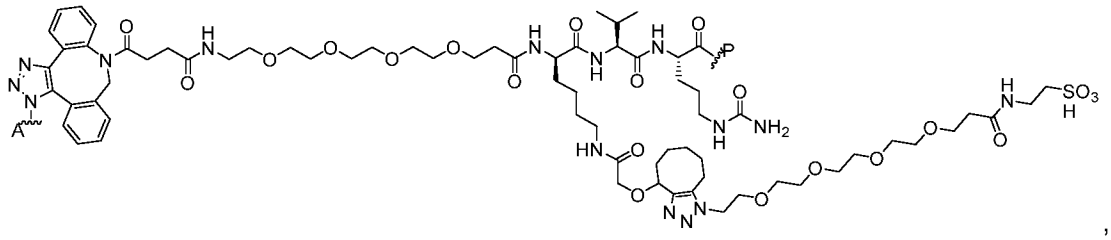
,





,

и



или его стереоизомерной формы, или региоизомера, или смеси региоизомеров, где

каждый  представляет собой связь со связующим агентом; а

каждый  представляет собой связь с остатком нагрузки.

[0272] В некоторых случаях компонент **L-PA** присоединен к реактивной группе (**RG**), в результате чего образуется **RG-L-PA** (например, линкер-нагрузки, показанные в Таблице 3). В некоторых случаях **BA** (или модифицированная форма **BA**, например, ПЭГ представляет собой модифицированное **Ab**, показанное в Таблице 2, или **Ab**^{1}) вступает в реакцию с линкер-нагрузками, в результате чего образуются конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в Таблице 1 и Таблице 2. Также в объем представленных здесь вариантов осуществления входят конъюгаты антитело-лекарственное средство, приготовленные из любых линкер-нагрузок, описанных в Таблице 5A и Таблице 5B.

Линкер-нагрузки

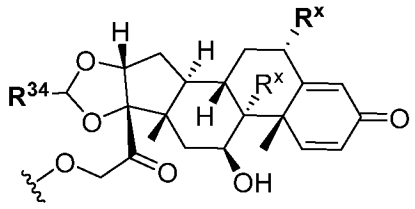
[0273] Здесь представлены линкер-стероиды согласно Формуле (**2000**),

RG-L^{2}-(L^{3})$_{0-1}$-SP-D

или их фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер; которые полезны в приготовлении конъюгатов антитело-лекарственное средство,

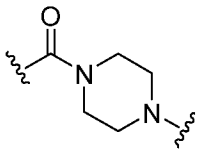
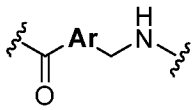
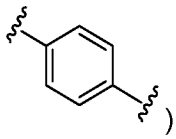
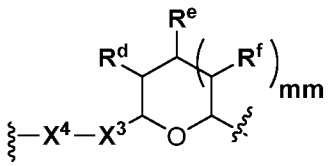
где

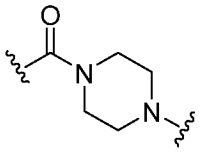
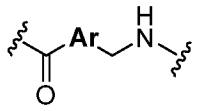
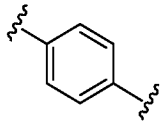
D выбирается из



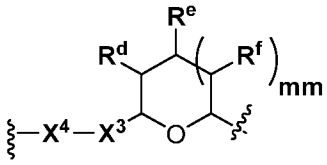
а) Формула (а),

где оба **R^{x}** в формуле (а) представляют собой водород; **R^{34}** представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил; и **SP** представляет собой -C(O)-C$_{1}$-C$_{10}$-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C$_{1-6}$алкил)-C$_{1}$-C$_{10}$-алкилен-**X^{1}**- , где **X^{1}** присоединен к (**L^{3}**)$_{0-1}$ в Формуле (**2000**), -C(O)-N(H)-(C$_{1}$-C$_{10}$-алкилен)-S- , где S

присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**), -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-(C_1-C_{10}-алкилен)-S- , где S присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**),  где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) - к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**), -CH_2-NH- , где N присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (2000),  где N присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**) и где **Ar** - необязательно замещенный арилен (в некоторых вариантах осуществления ) или необязательно замещенный гетероарилен, -(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}- , где N**R**^{50a} присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**), -C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}- , где N**R**^{50a} присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**) и где каждый C_1-C_{10}-алкилен независимо необязательно замещен одной или более гидрокси, -C(O)-N(**R**^{5})-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)NH-**X**^{2}- , где **X**^{2} присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**), или  где **X**^{4} присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**); или

где оба **R**^{x} в формуле (a) представляют собой фтор; **R**^{34} - алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил; и **SP** представляет собой -C(O)-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-**X**^{1b}- , где **X**^{1b} присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**), -C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}-алкилен)-**X**^{1b}- , где **X**^{1b} присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**),  где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) - к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**), -CH_2-NH- , где N присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (2000),  где N присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в Формуле (**2000**) и где **Ar** представляет собой необязательно замещенный арилен (в некоторых вариантах осуществления ) или необязательно замещенный гетероарилен, -(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}- , где N**R**^{50a} присоединен к $(L^3)_{0-1}$ в

Формуле (**2000**), -C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}- , где N**R**^{50a} присоединен к (**L**^{3})$_{0-1}$ в Формуле (**2000**) и где каждый C_1-C_{10}-алкилен независимо необязательно замещен одной или более гидрокси, -C(O)-N(**R**^{5})-(C_1-C_{10}-алкилен)-C(O)NH-**X**^{2}- , где **X**^{2} присоединен к (**L**^{3})$_{0-1}$ в Формуле (**2000**), или



где **X**^{4} присоединен к (**L**^{3})$_{0-1}$ в Формуле (**2000**); и/или

b) соединения в вышеприведенной Таблице A, где соединения в Таблице A связаны с **RG** Соединения Формулы (**2000**) через гидрокси -C(O)CH_2OH группы, т.е. посредством -C(O)CH_2-O-**SP**-(**L**^{3})$_{0-1}$ -, или через гидрокси Мапракората, т.е. посредством -O-**SP**-(**L**^{3})$_{0-1}$ -:

X^1 представляет собой -N(C_{1-6}алкил)-;

X^{1b} представляет собой -S-, -NH- или -N(C_{1-6}алкил)-;

X^2 представляет собой -NH-;

X^3 представляет собой -CH_2-, **X**^{3} - -CH_2-O-(C_1-C_{10}-алкилен)-C(O)- , где C(O) присоединен к **X**^{4}, или **X**^{3} представляет собой -C(O)-;

X^{34} представляет собой -O-;

R^{35} представляет собой H, -OH, -OCH_3 или C_{1-6}алкил;

R^{50} и **R**^{50a} представляют собой независимо водород или C_1-C_6-алкил;

R^d, **R**^{e} и **R**^{f} представляет собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил, алкоксикарбонил, -C(O)OH или -CH_2O**R**^{g}, где каждый **R**^{g} - независимо -CH_2C(O)OH или -CH_2C(O)O(алкил); и

mm представляет собой 0 или 1;

RG представляет собой остаток реактивной группы;

L^2 представляет собой соединительный линкер; и

L^3, если имеется, представляет собой саморасщепляющуюся группу.

[0274] Здесь представлены линкер-LXR-модуляторы согласно Формуле (**4000**),

RG-L-E Формула **(4000)**

или их фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер;

которые полезны в приготовлении конъюгатов антитело-лекарственное средство,

где

E выбирается из

a) соединений Формулы (**B**), описанных выше и в настоящем документе; и/или

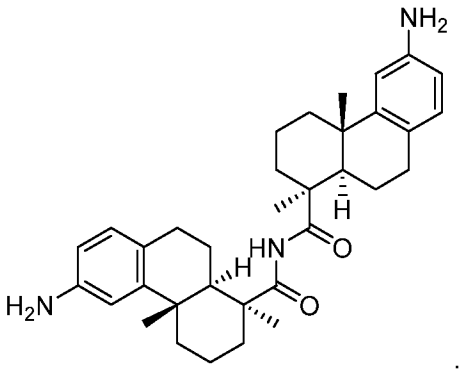
b) соединений Формулы (**B-1**), описанных выше и в настоящем документе; и/или

c) нагрузок, описанных в **Таблице C** в настоящем документе;

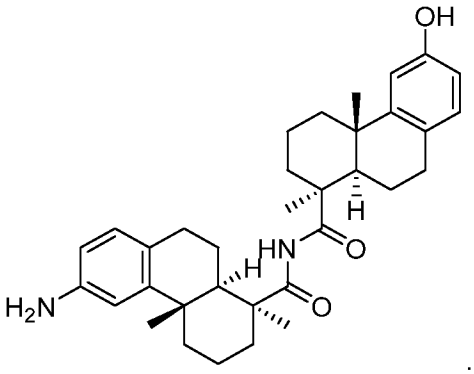
L представляет собой описанный здесь линкер; и

RG представляет собой описанный здесь остаток реактивной группы.

[0275] В некоторых вариантах осуществления LXR нагрузка представляет собой

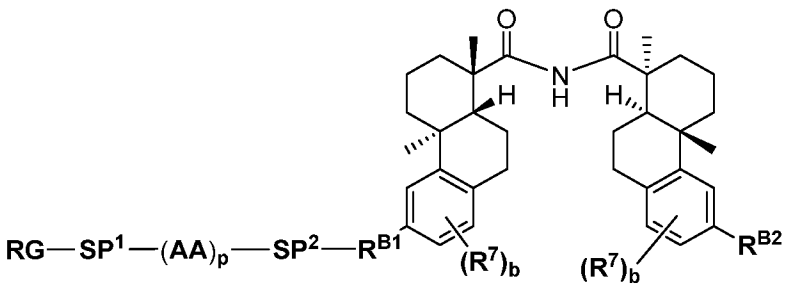


. В некоторых вариантах осуществления LXR нагрузка представляет собой

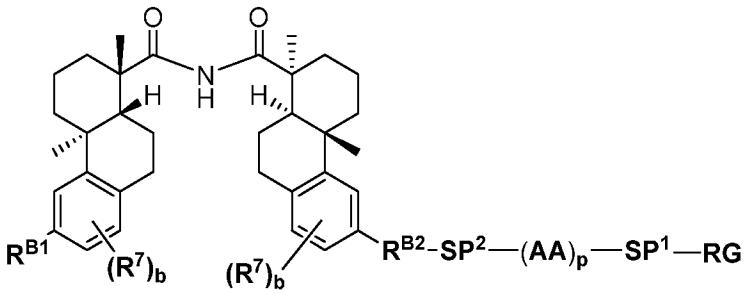


.

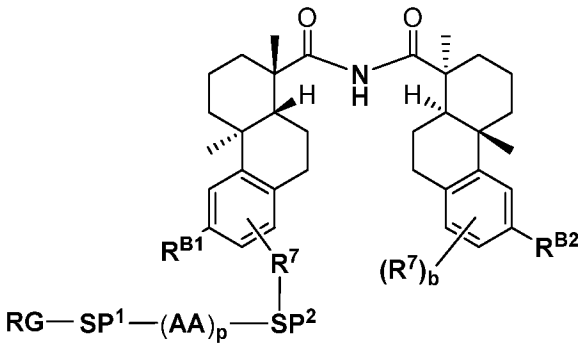
[0276] В некоторых вариантах осуществления линкер-нагрузки Формулы (**4000**) имеют структуры Формулы (**4001**), (**4002**), (**4003**) или (**4004**):



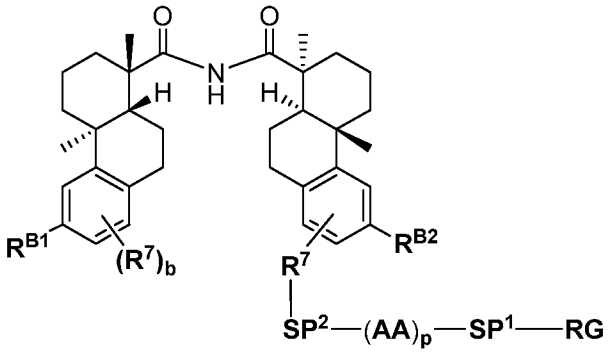
Формула (**4001**)



Формула (**4002**)



Формула (**4003**) или



Формула (**4004**)

или их фармацевтически приемлемой соли, сольвата или стереоизомера;

где SP^1 и SP^2, если имеются, являются спейсерными группами, определенными в настоящем документе в некоторых или любых вариантах осуществления;

каждая **AA** представляет собой остаток аминокислоты;

p представляет собой целое число от 1 до 10;

RG представляет собой остаток реактивной группы; и

R^{B1}, R^{B2}, R^7 и **b** соответствуют приведенным здесь определениям в некоторых или любых вариантах осуществления.

[0277] В некоторых вариантах осуществления линкер-нагрузки Формулы (**4000**), (**4001**), (**4002**), (**4003**) или (**4004**) выбираются из линкер-нагрузок в Таблице 3.

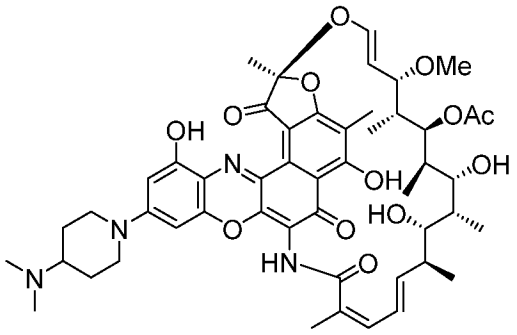
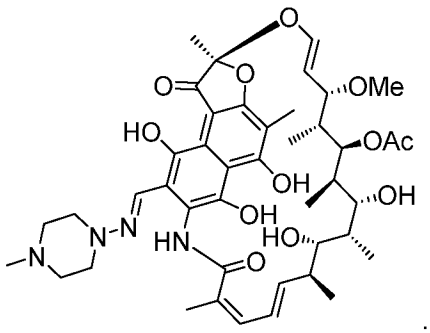
[0278] Здесь представлены линкер-аналоги рифамицина согласно Формуле (**7000**),

RG-L-F Формула **(7000)**

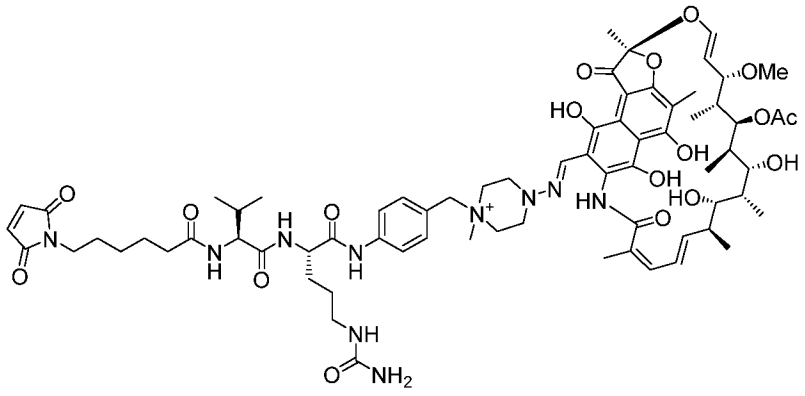
или их фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер;

где **F** представляет собой аналог рифамицина;
L представляет собой описанный здесь линкер; и
RG представляет собой описанный здесь остаток реактивной группы.

[0279] В некоторых вариантах осуществления **F** представляет собой описанный здесь аналог рифамицина. В некоторых вариантах осуществления **F** представляет собой

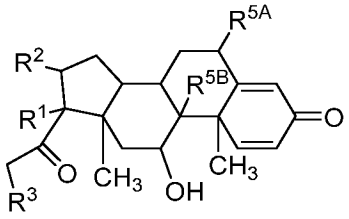
аналог рифамицина:  . В некоторых вариантах осуществления **F** представляет собой рифампицин:  .

[0280] Здесь также представлена линкер-нагрузка согласно Формуле (**D**):



Формула (**D**).

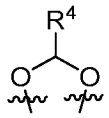
[0281] Здесь представлены линкер-стероиды, где стероид, конъюгированный с антителом или его антиген-связывающим фрагментом, через линкер или линкер-спейсер представляет собой соединение Формулы (**A-1**)



Формула (**A-1**)

или их фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где

R^1 и R^2 - независимо –H, алкил, алкил-C(O)-O–, –OH или гало; или R^1 и R^2 вместе образуют  ,

где R^4 - алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил,

где алкил, арил, арилалкил и N-содержащий гетероциклоалкил независимо в каждом случае могут быть замещены $-NR^{Aa}R^{Ab}$;

R^3 представляет собой –O, R^Z-C(O)-**X**–, –гетероалкил, –пиперидинил, $–NR^{Aa}R^{Ab}$, –оксиарил–$NR^{Aa}R^{Ab}$ или

$–Z\text{-}A'(R^P)_t$;

R^Z представляет собой алкил;

X представляет собой O или NR^{Aa};

Z представляет собой S, S(O), $S(O)_2$, SO_2NR^{Aa}, O, $C(O)NR^{Aa}$, C(O) или NR^{Aa};

A′ представляет собой арил, арилалкил или гетероарил;

R^P представляет собой независимо в каждом случае гало, необязательно замещенный алкил, –OH или $-NR^{Aa}R^{Ab}$;

R^{Aa} и R^{Ab} представляет собой независимо в каждом случае –H, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный арил;

нижний индекс **a** представляет собой целое число от 0 до 19; и

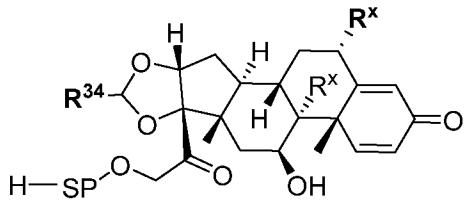
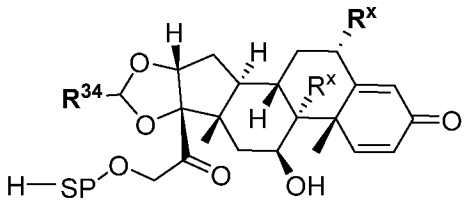
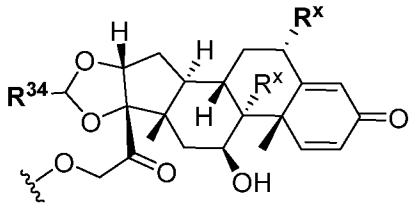
t представляет собой целое число от 1 до 3;

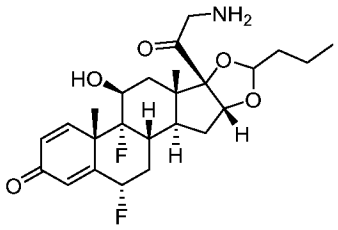
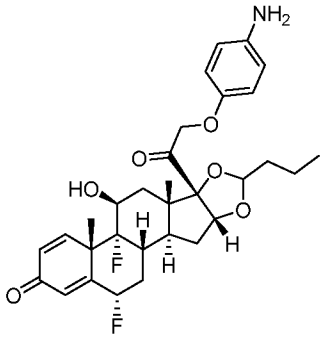
и

R^{5A} и R^{5B} представляет собой в каждом случае независимо гало или атом водорода;

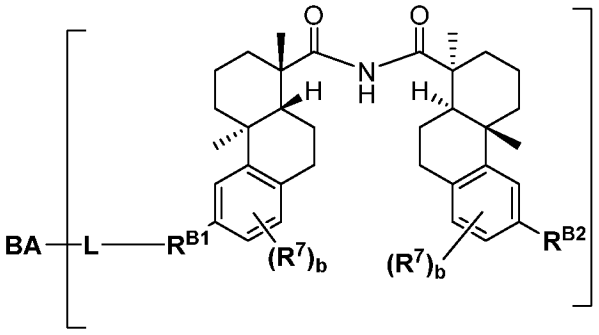
где группа R^3 или R^4 связана с линкером.

[0282] Здесь представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство формулы **Ab-L′-SP-D или BA-L′-SP-D**, где **D** это пролекарственный препарат будесонида или пролекарственный препарат аналога или производного будесонида (включая фторированные аналоги и производные), и где **Ab**, **BA**, **L′** и **SP** соответствуют определениям в любом описанном здесь варианте осуществления. В некоторых вариантах осуществления **SP** представляет собой компонент, способный к

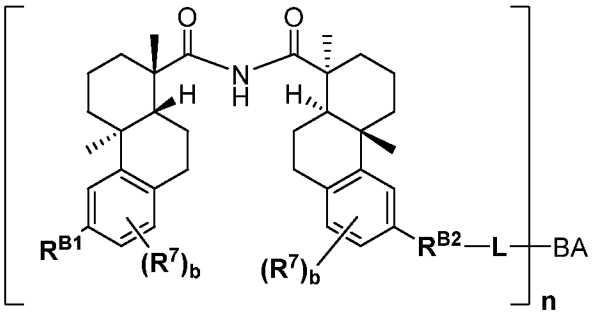
высвобождению **D** или  . В некоторых вариантах осуществления в физиологических условиях связь между **L** и **SP** расщепляется и высвобождается стероидный пролекарственный препарат, т.е. **H-SP-D** или  , и связь между **SP** и **D,** или между **SP** и  в последующем расщепляется и высвобождается биологически активный стероид.

[0283] В некоторых случаях конъюгаты антитело-лекарственное средство Формулы (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**III**) или (**3000**) - конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в Таблице 1 и/или Таблице 2 и в разделе "Примеры". В некоторых вариантах осуществления стероидная нагрузка в любом описанном здесь конъюгате антитело-лекарственное средство представляет собой  , или  , или ее фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер.

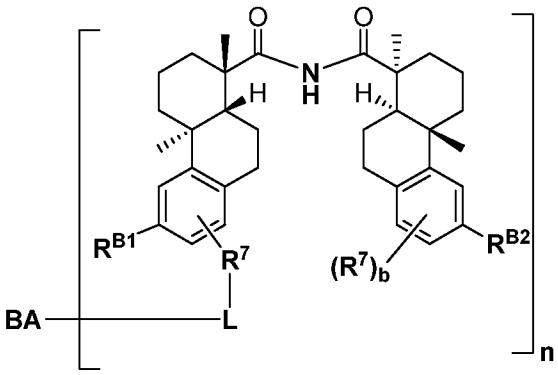
[0284] Здесь представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство любых описанных здесь соединений LXR-модулятора Формулы (**5001**), (**5002**), (**5003**) или (**5004**):



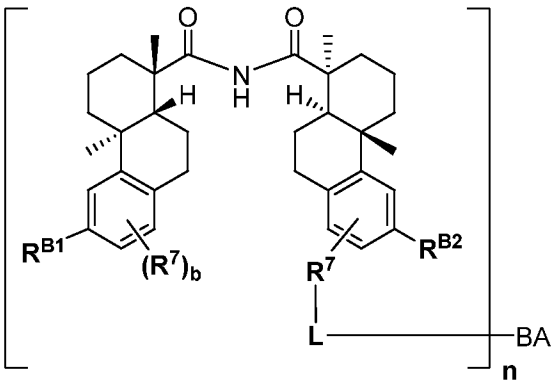
Формула (**5001**)



Формула (**5002**)



Формула (**5003**) или



Формула (**5004**)

или их фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, региоизомер или их смесь;

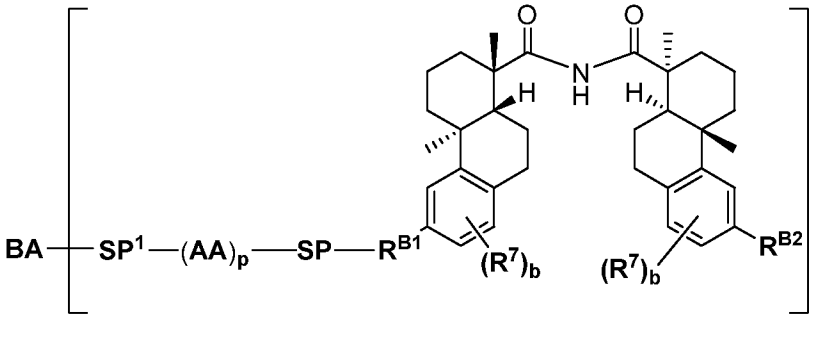
где **L** представляет собой любой описанный здесь линкер в некоторых или любых вариантах осуществления;

n представляет собой целое число от 1 до 30;

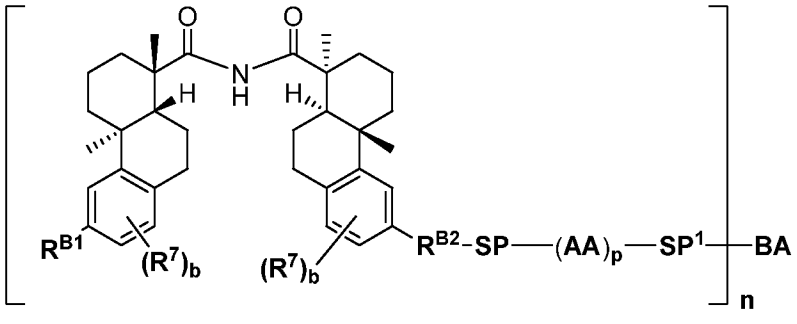
BA представляет собой связующий агент или ПЭГ-модифицированный связующий агент; и

R^{B1}, R^{B2}, R^7 и **b** соответствуют приведенным здесь определениям в некоторых или любых вариантах осуществления.

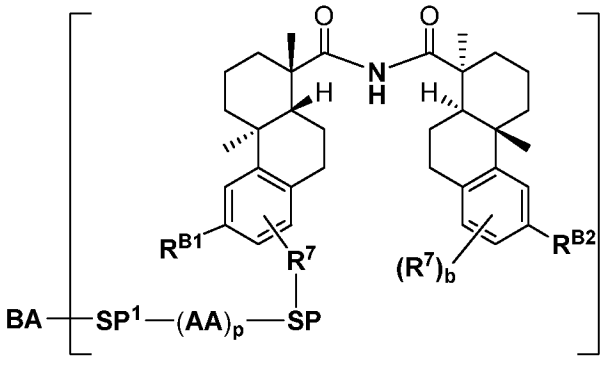
[0285] Здесь представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство любых описанных здесь соединений LXR-модулятора Формулы (**6001**), (**6002**), (**6003**) или (**6004**):



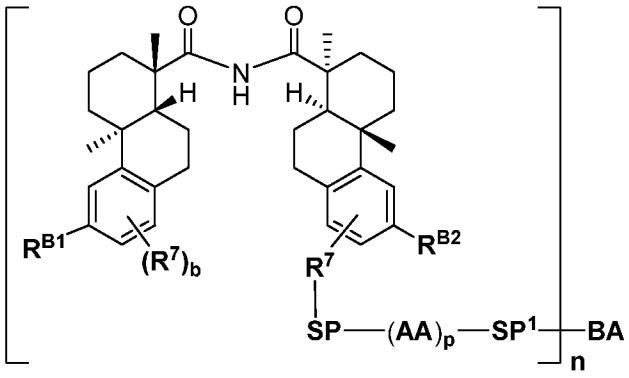
Формула (**6001**)



Формула (**6002**)



Формула (**6003**) или



Формула (**6004**)

или их фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, региоизомер или их смесь;

где **SP**[1] и **SP**, если имеется, являются спейсерными группами, определенными в настоящем документе в некоторых или любых вариантах осуществления;

каждая **AA** представляет собой остаток аминокислоты;

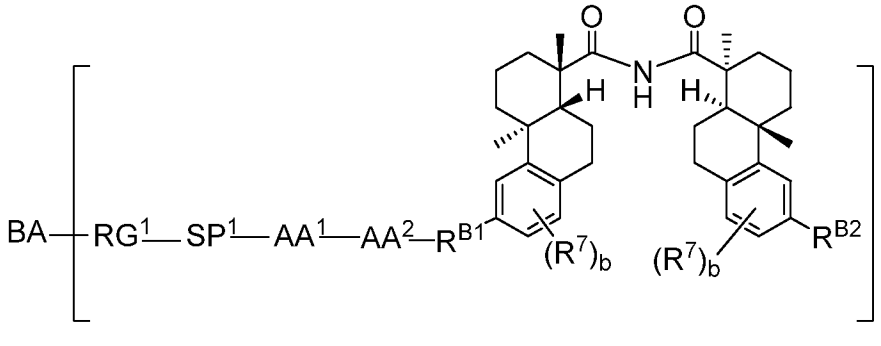
p представляет собой целое число от 1 до 10;

n представляет собой целое число от 1 до 30;

BA представляет собой связующий агент или ПЭГ-модифицированный связующий агент; и

R^{B1}, R^{B2}, R^7 и **b** соответствуют приведенным здесь определениям в некоторых или любых вариантах осуществления.

[0286] Здесь представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство любых описанных здесь соединений LXR-модулятора Формулы (**6005**):

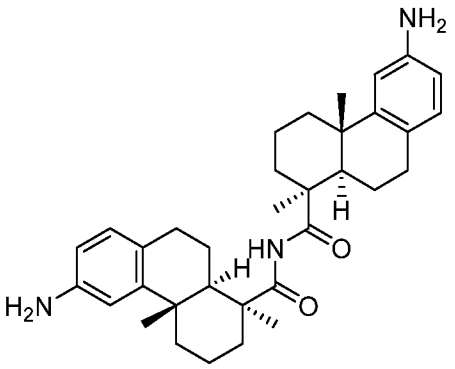


Формула (**6005**)

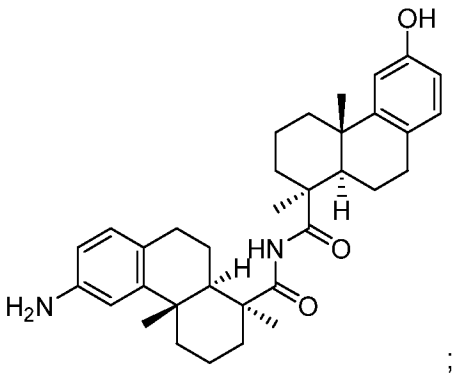
или их фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, региоизомер или их смесь;

где R^{B1}, R^{B2}, R^7, **b**, **BA**, RG^1, SP^1, AA^1 и AA^2 соответствуют приведенным здесь определениям в некоторых или любых вариантах осуществления.

[0287] В некоторых случаях конъюгаты антитело-лекарственное средство Формулы (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**5001**), (**5002**), (**5003**), (**5004**), (**6001**), (**6002**), (**6003**), (**6004**) или (**6005**) - конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в Таблице 1 и/или Таблице 2 и в разделе "Примеры". В некоторых вариантах осуществления нагрузка LXR модулятора в любом описанном здесь конъюгате антитело-лекарственное средство -



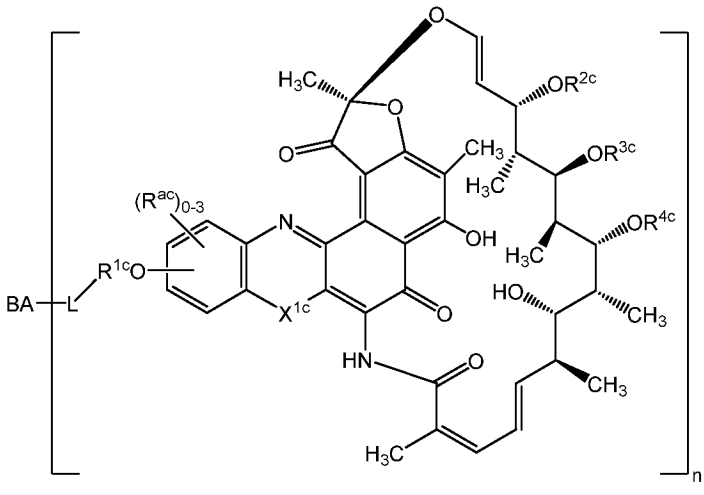
или



;

или ее фармацевтически приемлемая соль или сольват.

[0288] Здесь представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство любых аналогов рифамицина, описанных здесь и имеющих структуру Формулы (**7001**)



Формула (**7001**)

или их фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, региоизомер или их смесь;

где:

X^{1c} выбирается из –S-; -O- и –N**R^{5c}**;

R^{1c} представляет собой амино-C_{1-6}алкил; C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; ди-C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; гидрокси-C_{1-6}алкил; HS-C_{1-6}алкил; (**R^{5c}**)$_2$N-C_{1-6}алкилен-N(**R^{5c}**)-C_{1-6}алкил; (**R^{5c}**)$_2$N-C_{1-6}алкилен-O-C_{1-6}алкил; (**R^{5c}**)$_2$N-C_{1-6}алкилен-S-C_{1-6}алкил; гетероциклоалкил или гетероциклоалкил-C_{1-6}алкил; где гетероциклоалкил

включает один, два или три гетероатома, которые выбираются из O, N и S; и где гетероциклоалкил необязательно замещен гало, C_{1-6}алкилом, -OH или =O;

R^{2c}, R^{3c} и R^{4c} независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и -(C=O)-R^{5c};

каждый R^{ac}, если имеется, независимо выбирается из -F; -Cl; -Br; -I; -OH; $-NH_2$; и C_{1-6}алкокси; и

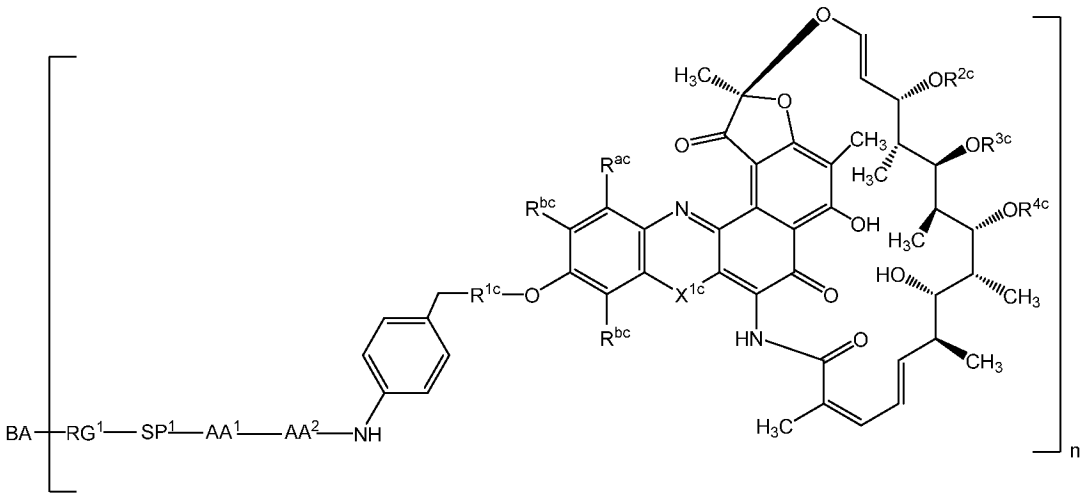
R^{5c} независимо в каждом случае выбирается из водорода; и C_{1-6}алкила;

L представляет собой линкер;

BA представляет собой связующий агент; и

нижний индекс **n** представляет собой целое число от 1 до 30.

[0289] Здесь представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство любых аналогов рифамицина, описанных здесь и имеющих структуру Формулы (**7002**):

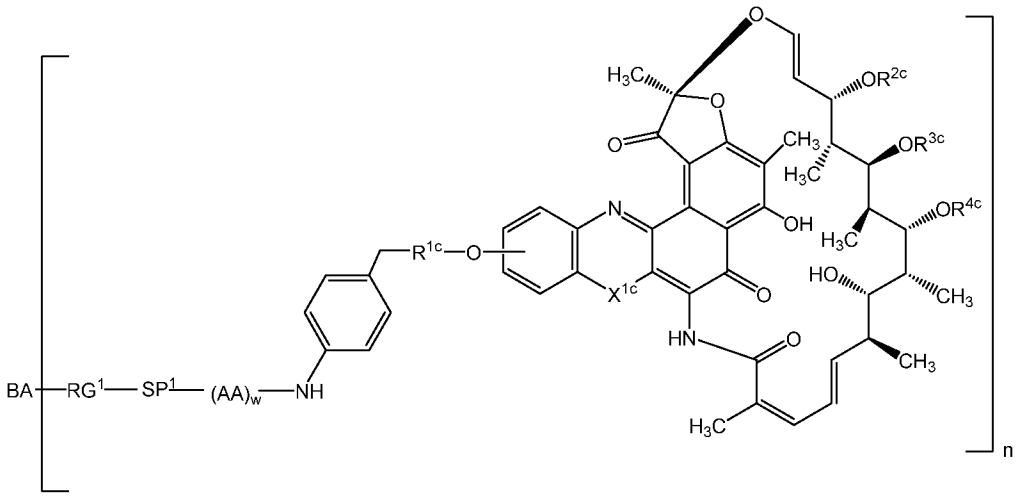


Формула (**7002**);

или их фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, региоизомер или их смесь;

где **BA**, **RG^1**, **SP^1**, **AA^1**, **AA^2**, **R^{1c}**, **R^{bc}**, **R^{ac}**, **X^{1c}**, **R^{2c}**, **R^{3c}**, **R^{4c}** и **n** соответствуют приведенным здесь определениям в некоторых или любых вариантах осуществления.

[0290] Здесь представлены конъюгаты антитело-аналог рифамицина, имеющие структуру Формулы (**7003**):

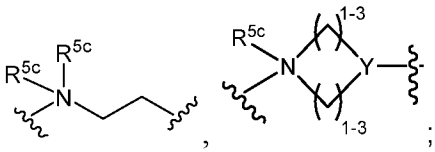
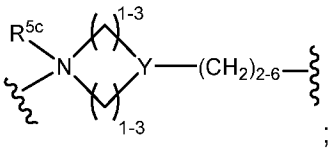


Формула (**7003**)

или их фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, региоизомер или их смесь;

где:

X^{1c} выбирается из –S-; -O- и с;

R^{1c} представляет собой  ; или  ;

где **Y** представляет собой C или N;

R^{2c}, **R^{3c}** и **R^{4c}** независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и -(C=O)-**R^{5c}**;

R^{5c} независимо в каждом случае отсутствует или выбирается из водорода; и C_{1-6}алкила;

каждая **AA** представляет собой независимо выбранная аминокислота;

SP^1 отсутствует или является спейсером;

RG^1 представляет собой остаток реактивной группы;

BA представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент;

нижний индекс **n** представляет собой целое число от 1 до 30;

нижний индекс **w** равен 2, 3 или 4;

где **R^{1c}** связана с линкером через атом азота, что указывается волнистой линией  .

[0291] В различных вариантах осуществления Формулы (**7003**) **SP^1**, **RG^1** и **AA** соответствуют приведенным здесь определениям в некоторых и/или любых конкретных вариантах осуществления.

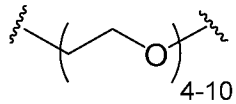
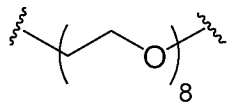
[0292] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) **X^{1c}** представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) **X^{1c}** представляет

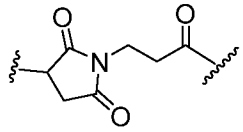
собой S. В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) $\mathbf{X^{1c}}$ представляет собой C. В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) $\mathbf{X^{1c}}$ представляет собой $\mathbf{NR^{5c}}$.

[0293] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) **BA** представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент; содержащие мутацию N297Q.

[0294] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) нижний индекс **w** равен 2.

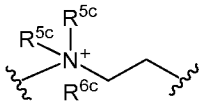
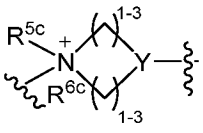
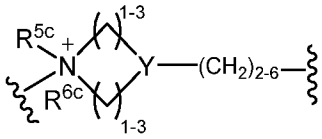
[0295] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**), $(\mathbf{AA})_2$ представляет собой валин-цитруллин.

[0296] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) $\mathbf{SP^1}$ содержит  . В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) $\mathbf{SP^1}$ содержит  .

[0297] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) $\mathbf{RG^1}$ содержит  .

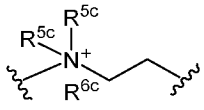
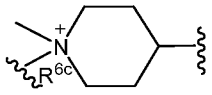
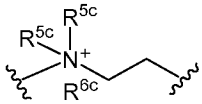
[0298] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**)

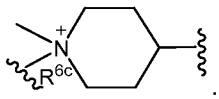
$\mathbf{X^{1c}}$ представляет собой O;

$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой  ,  ; или  ; где **Y** представляет собой C или N; где $\mathbf{R^{1c}}$ связан с линкером через четвертичный атом азота $\mathbf{R^{1c}}$;

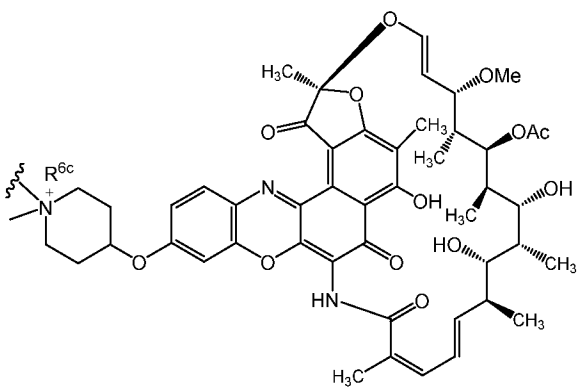
$\mathbf{R^{5c}}$ представляет собой $C_{1\text{-}6}$алкил; и

$\mathbf{R^{6c}}$ представляет собой противоион.

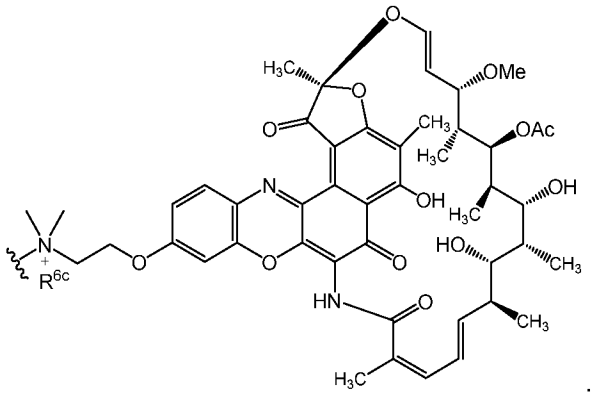
[0299] В некоторых из таких вариантов осуществления $\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой  или  . В некоторых из таких вариантов осуществления $\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой  . В некоторых из таких вариантов осуществления $\mathbf{R^{1c}}$

представляет собой  . В некоторых из таких вариантов осуществления R^{6c} представляет собой I^-, Cl^- или Br^- и в некоторых случаяхR^{6c} представляет собой I^-.

[0300] В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) такой аналог рифамицина:

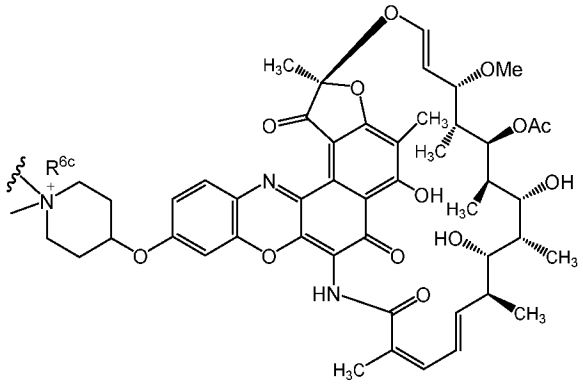


или

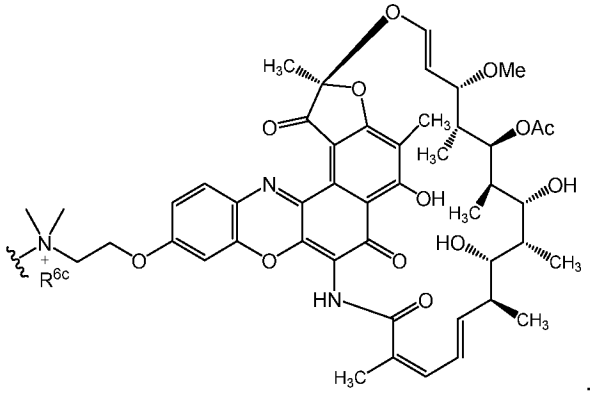


.

В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) такой аналог рифамицина:

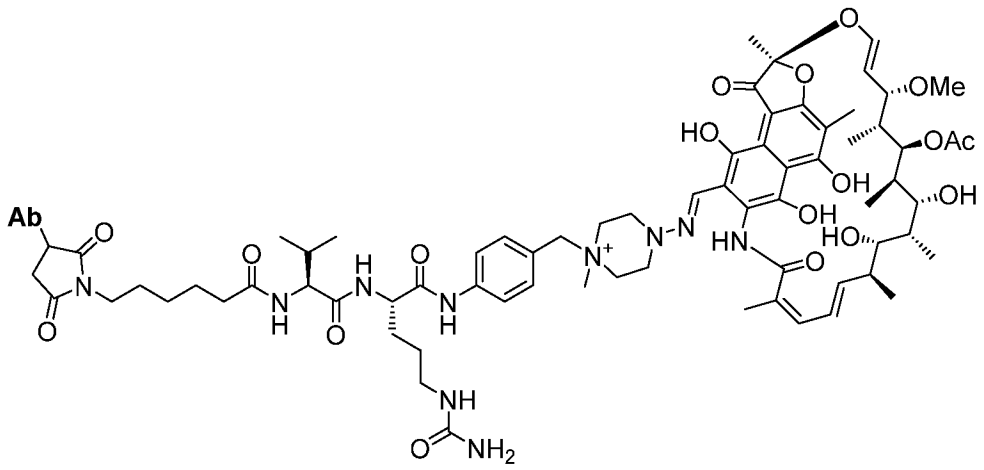


[0301] . В некоторых вариантах осуществления Формулы (**7003**) такой аналог рифамицина:



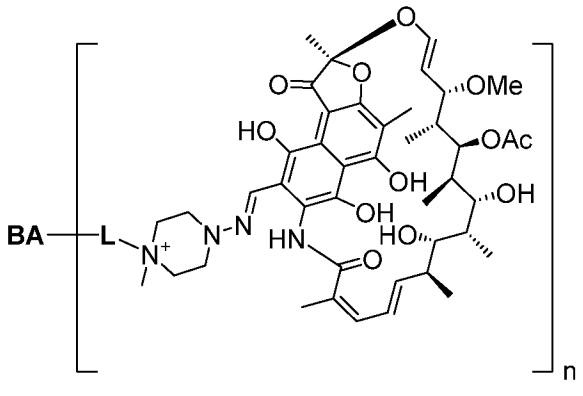
.

[0302] Далее здесь представлен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий соединение рифамицина (например, рифампицин), согласно Формуле (**7004**):



Формула (**7004**).

[0303] Далее здесь представлен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий соединение рифамицина (например, рифампицин), согласно Формуле (**7005**):



Формула (**7005**)

где **L** и **BA** соответствуют приведенным здесь определениям в некоторых или любых вариантах осуществления.

[0304] В некоторых случаях конъюгаты антитело-лекарственное средство Формулы (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**7001**) (**7002**), (**7003**), (**7004**) и/или (**7005**) представляют собой конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в Таблице 2 и/или в разделе "Примеры".

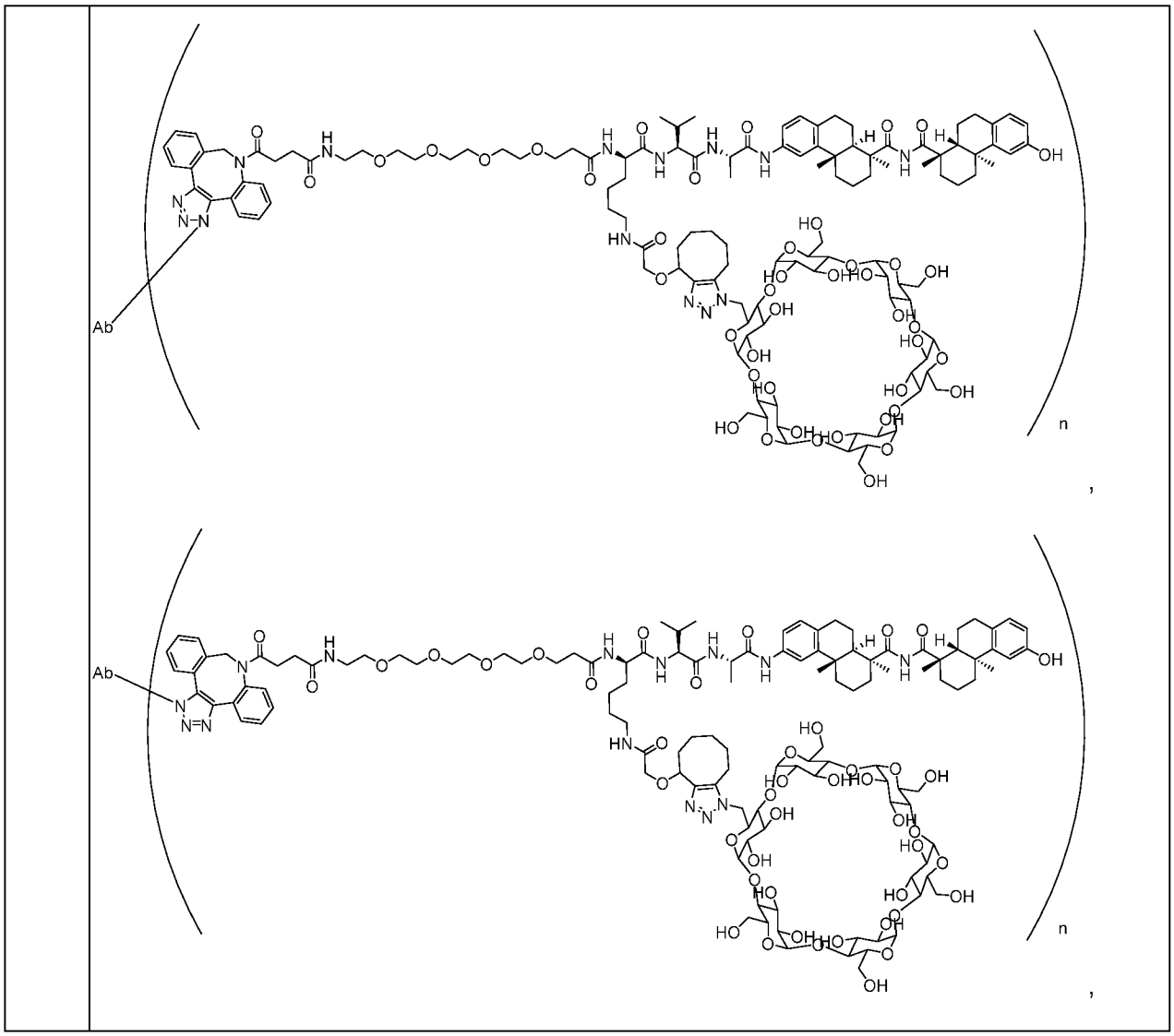
[0305] Также в эти примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство включаются их фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, региоизомер или смесь региоизомеров, где каждый $A\sim$ представляет собой связь со связующим агентом; а каждый $\sim P$ представляет собой связь с нагрузкой.

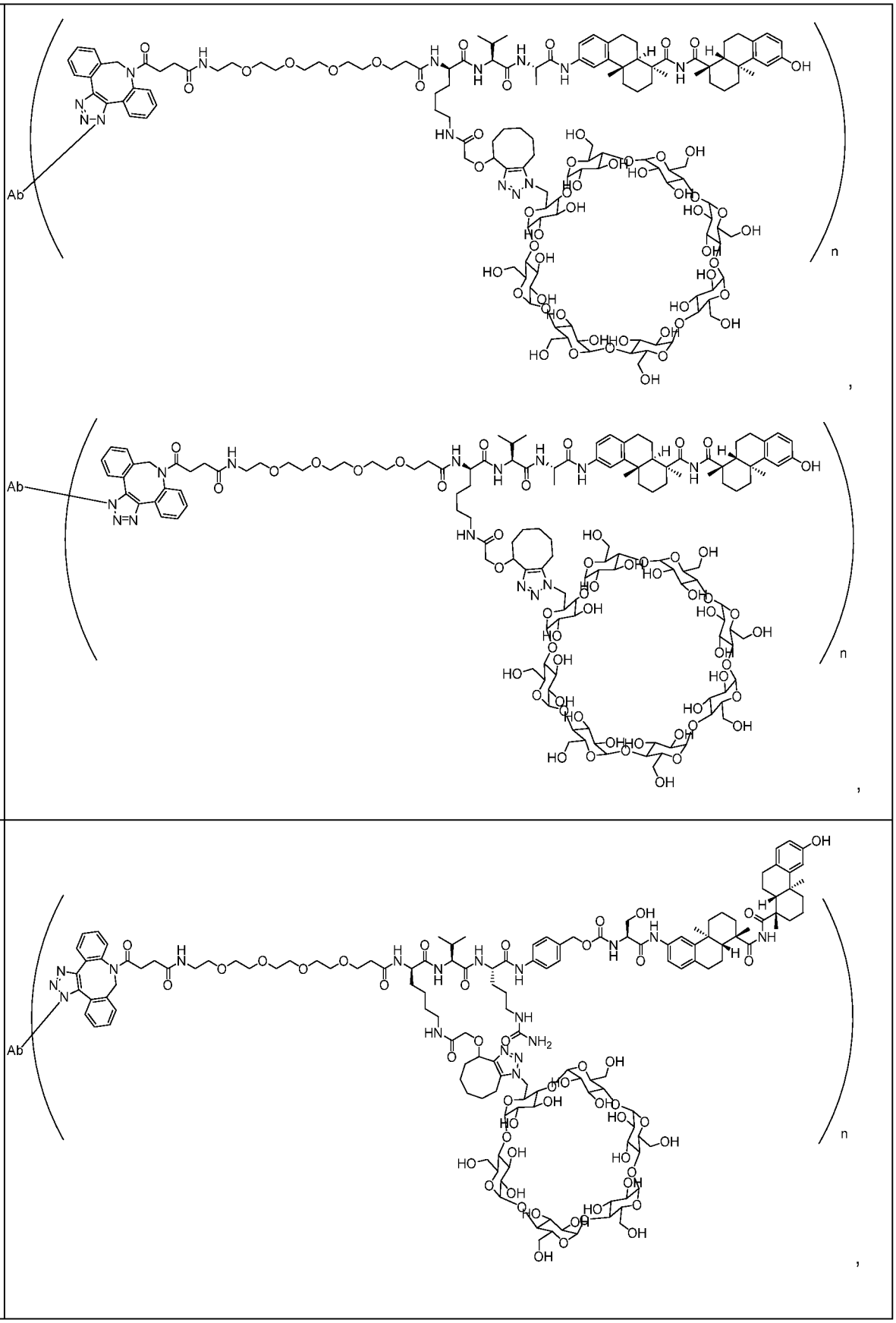
[0306] В определенных вариантах осуществления здесь представлен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело к MSR1 или его антиген-

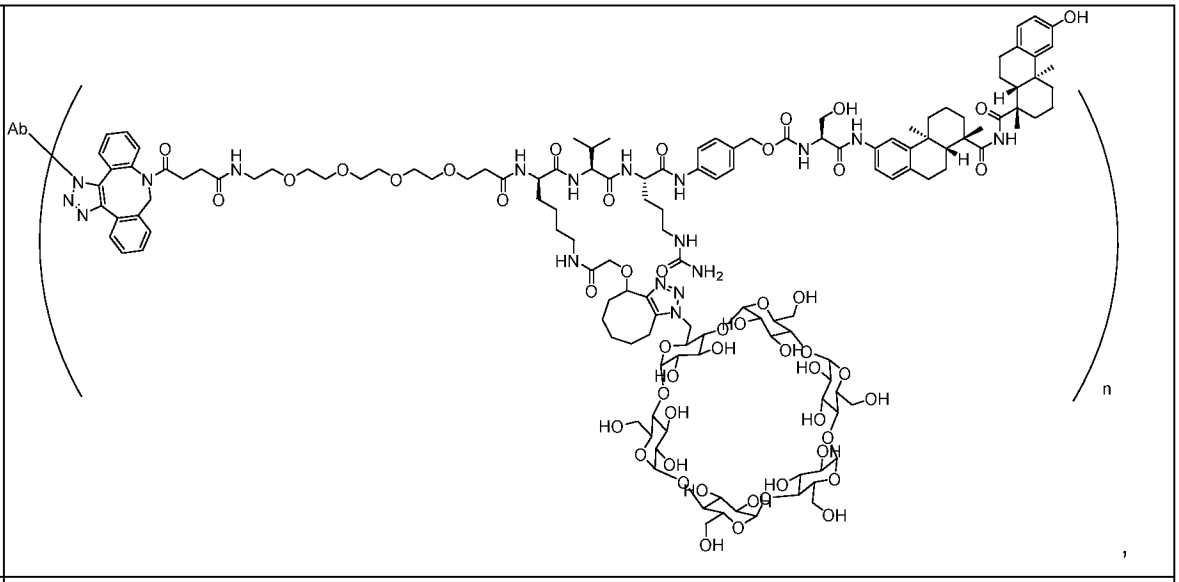
связывающий фрагмент, или ПЭГ-модифицированное антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, описанные здесь, и линкер-нагрузку (**LP**), выбранную из группы, состоящей из линкер-нагрузок в Таблице 3, или их стереоизомерной формы, или региоизомера, или смеси региоизомеров.

[0307] Также здесь представлены конъюгаты антитело-радионуклиды (ARC), содержащие антитела к MSR1, конъюгированные с одним или более радионуклидами. Иллюстративные радионуклиды, которые могут использоваться в контексте данного аспекта описания изобретения, включают, помимо прочего, например, ^{225}Ac, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{131}I, ^{186}Re, ^{227}Th, ^{222}Rn, ^{223}Ra, ^{224}Ra и ^{90}Y.

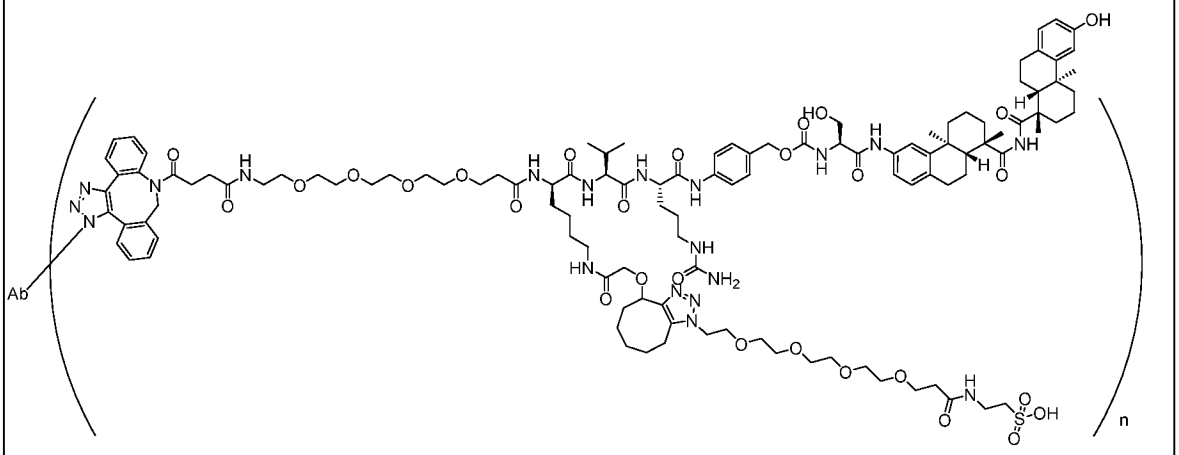
Таблица 1: Список конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) и их структуры



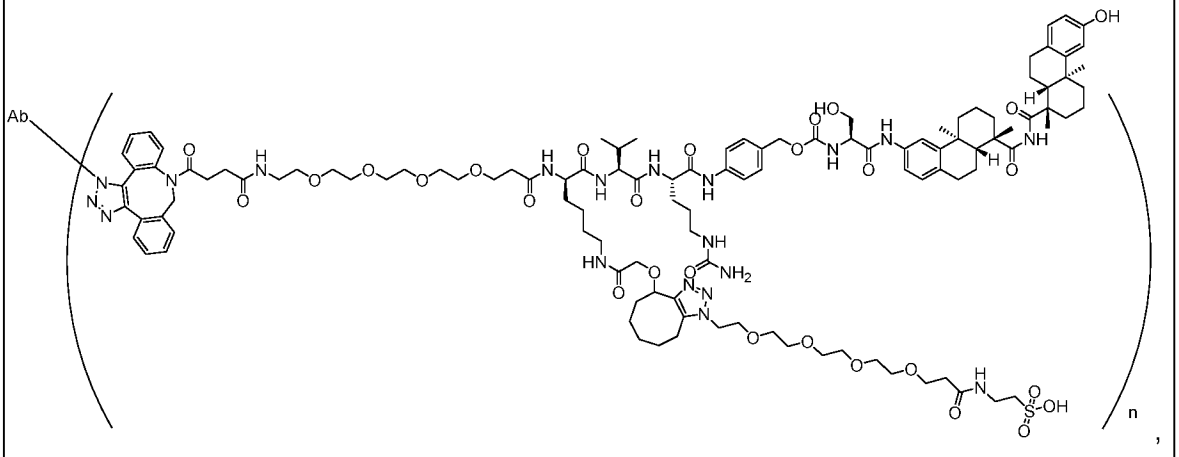




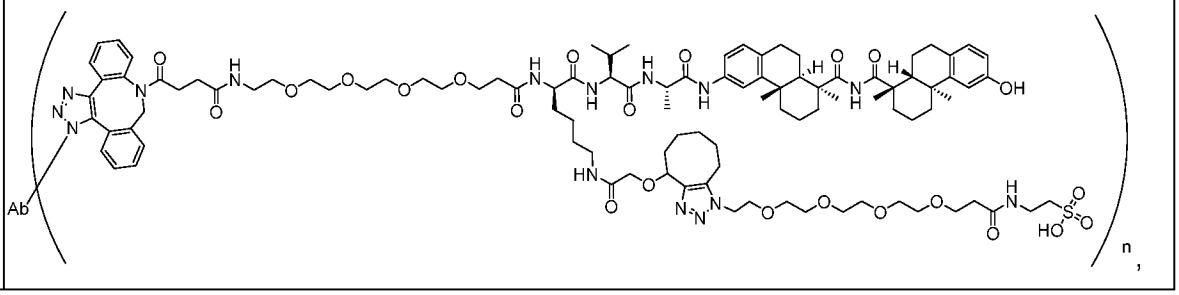
,



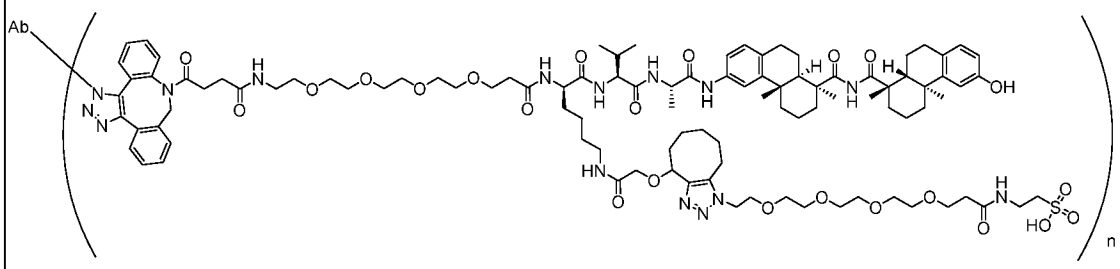
,

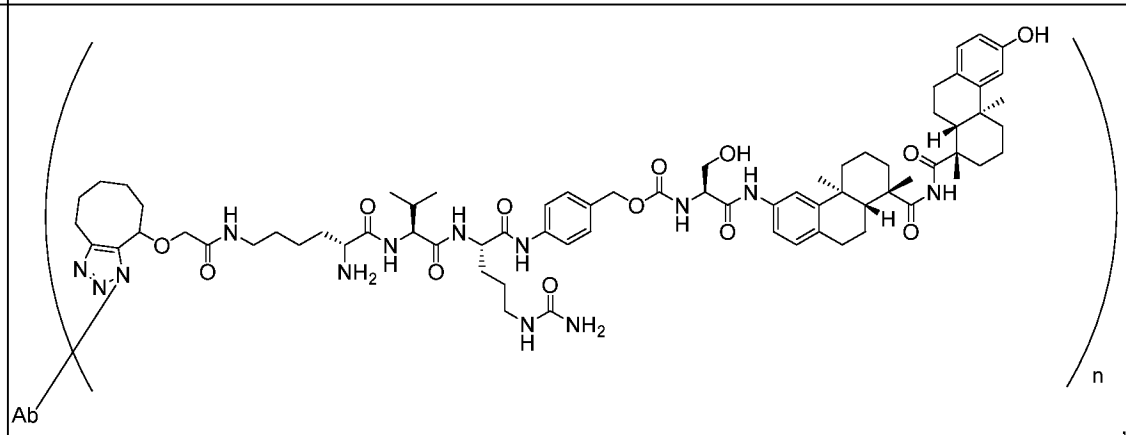


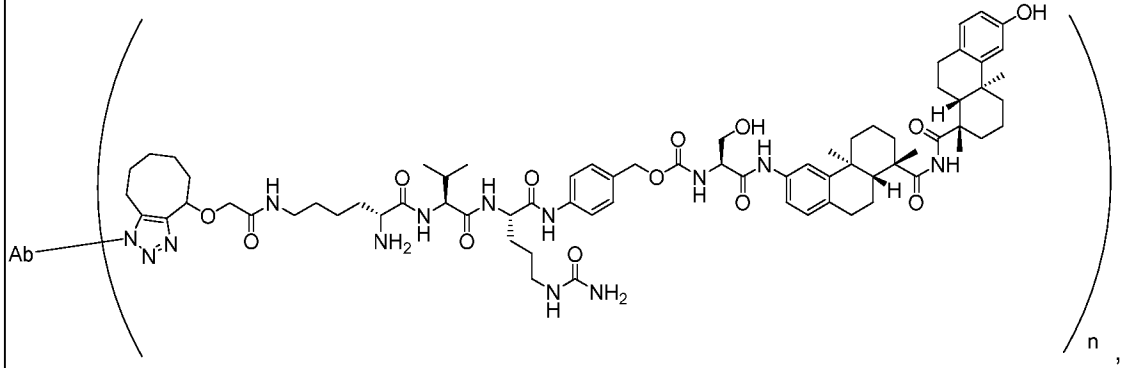
,

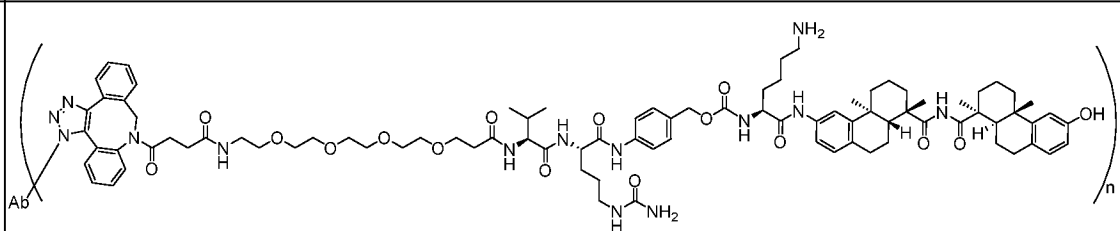


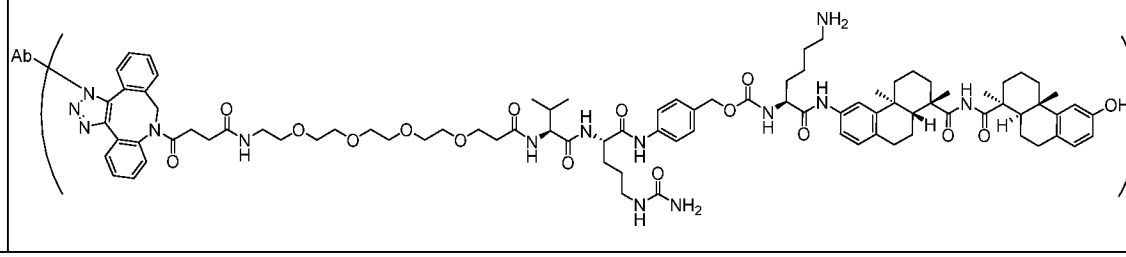
,

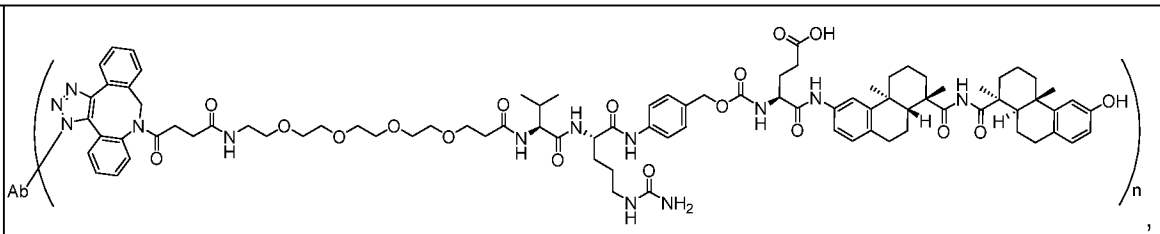


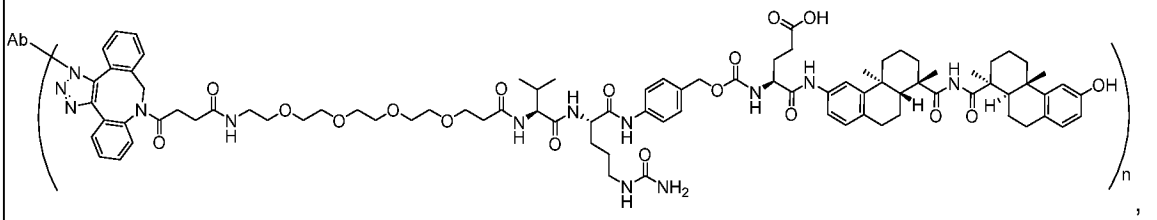


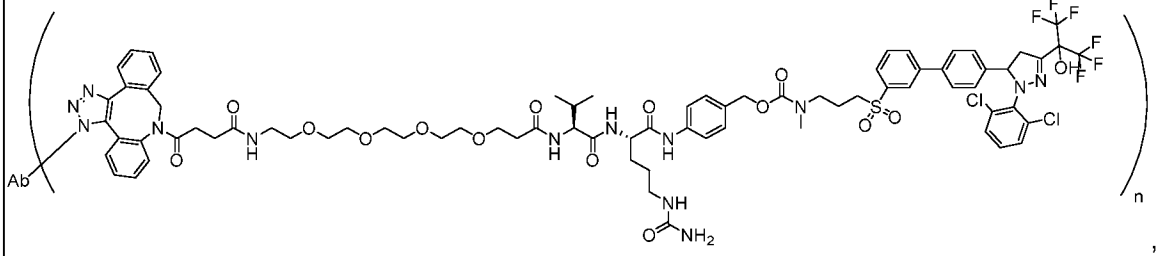


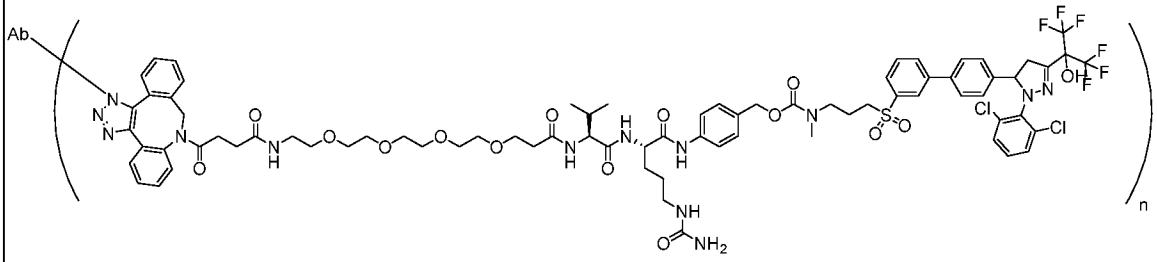


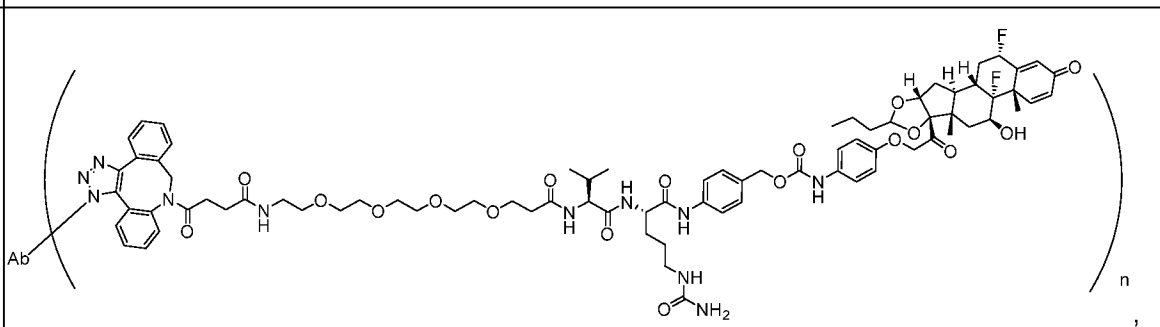


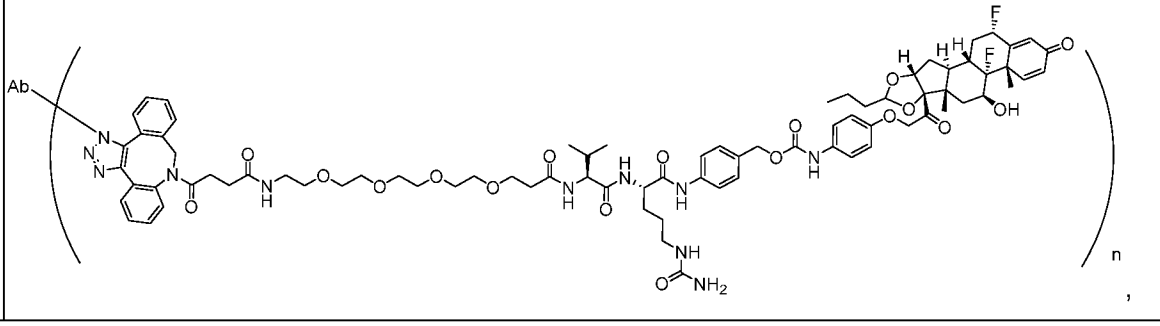


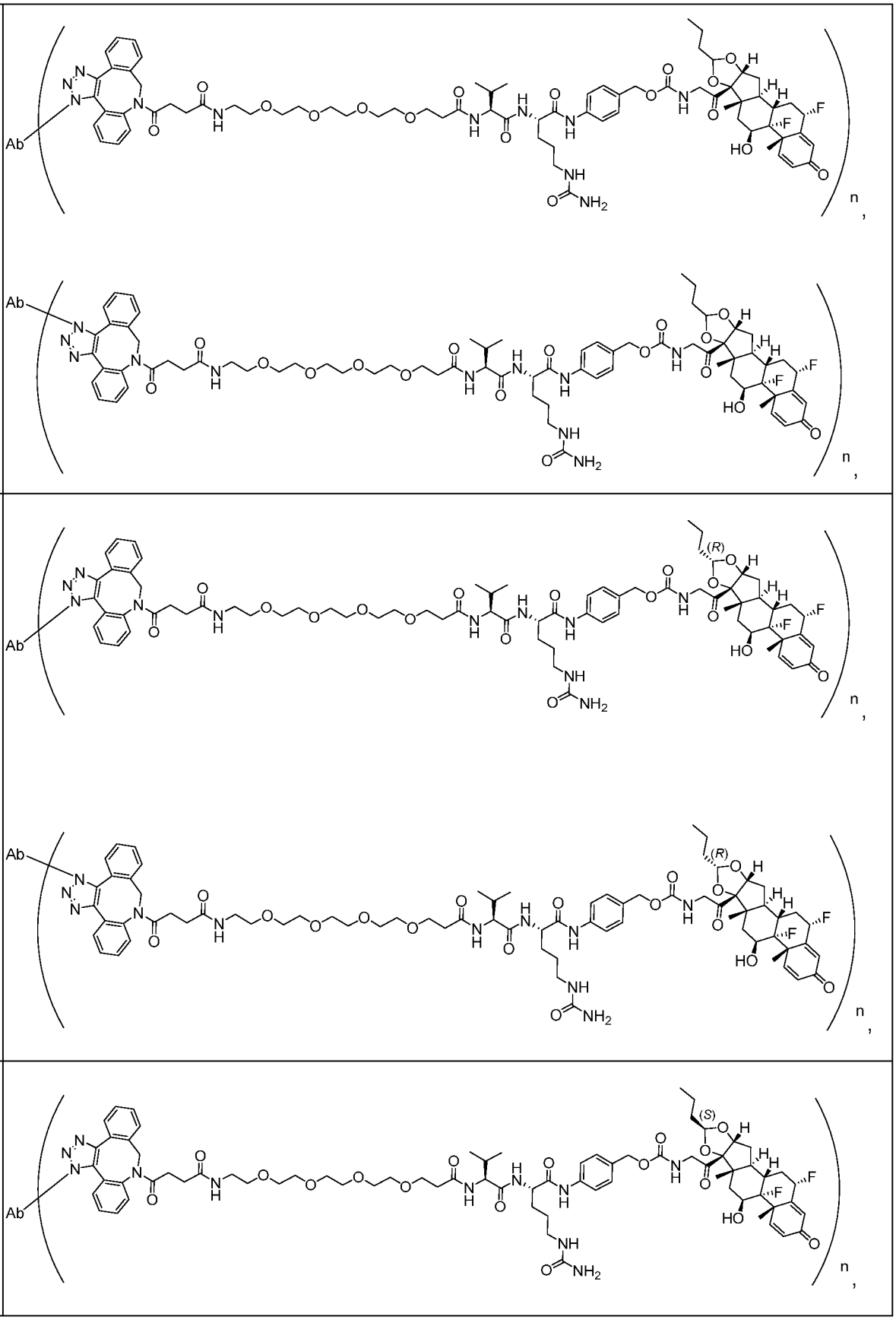


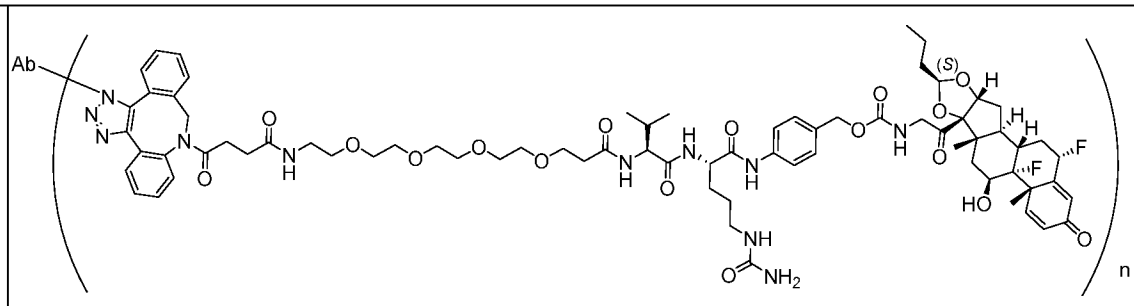




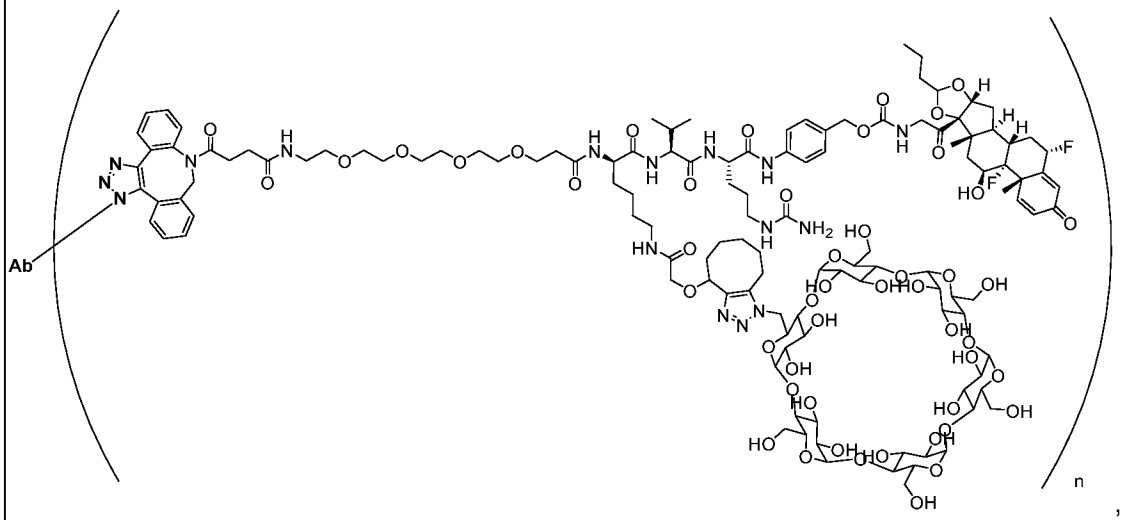




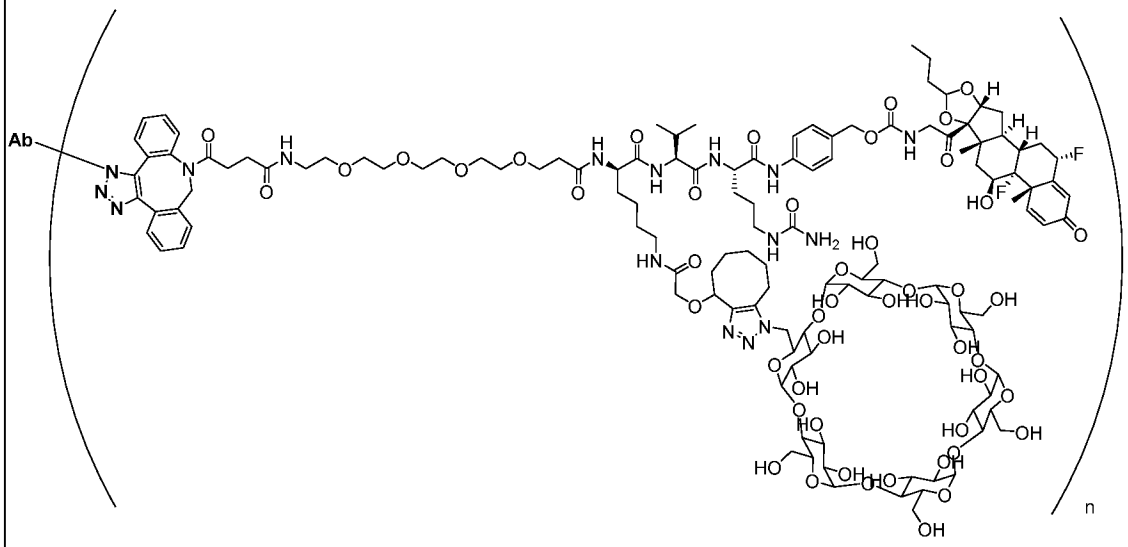




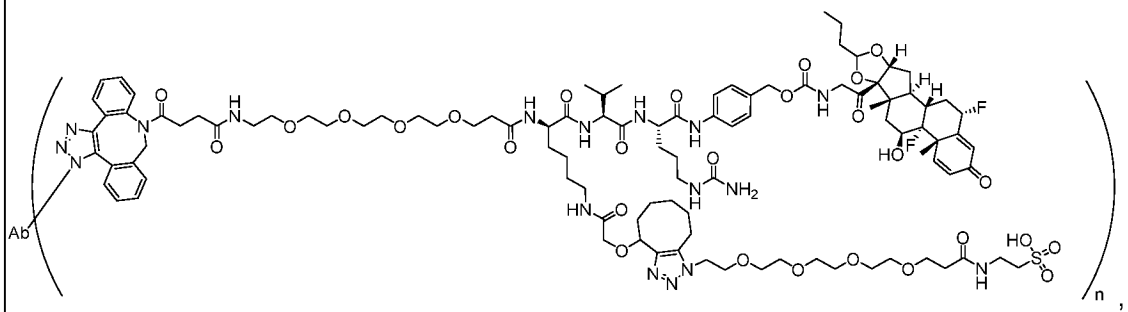
n ,



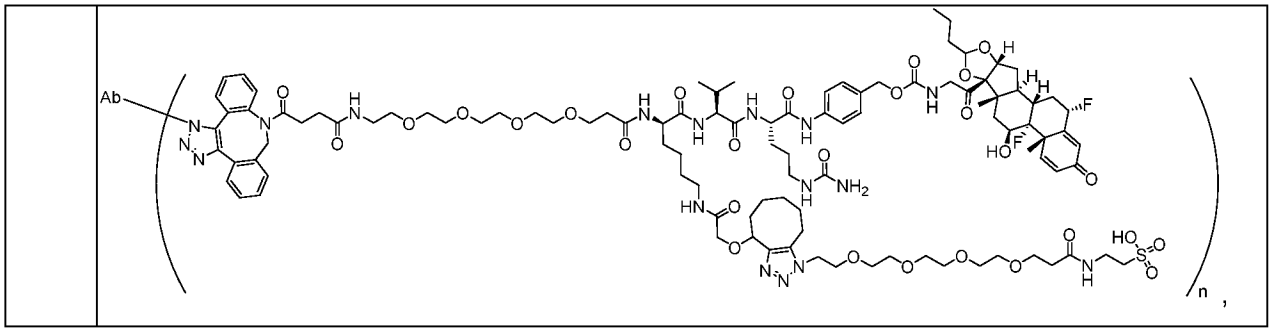
n ,



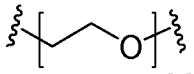
n ,



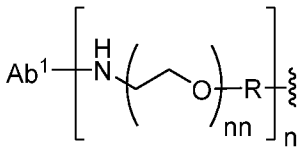
n , И



[0308] В конъюгатах антитело-лекарственное средство (ADC) Таблицы 1 **Ab** представляет собой представленное здесь антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления **Ab** модифицировано



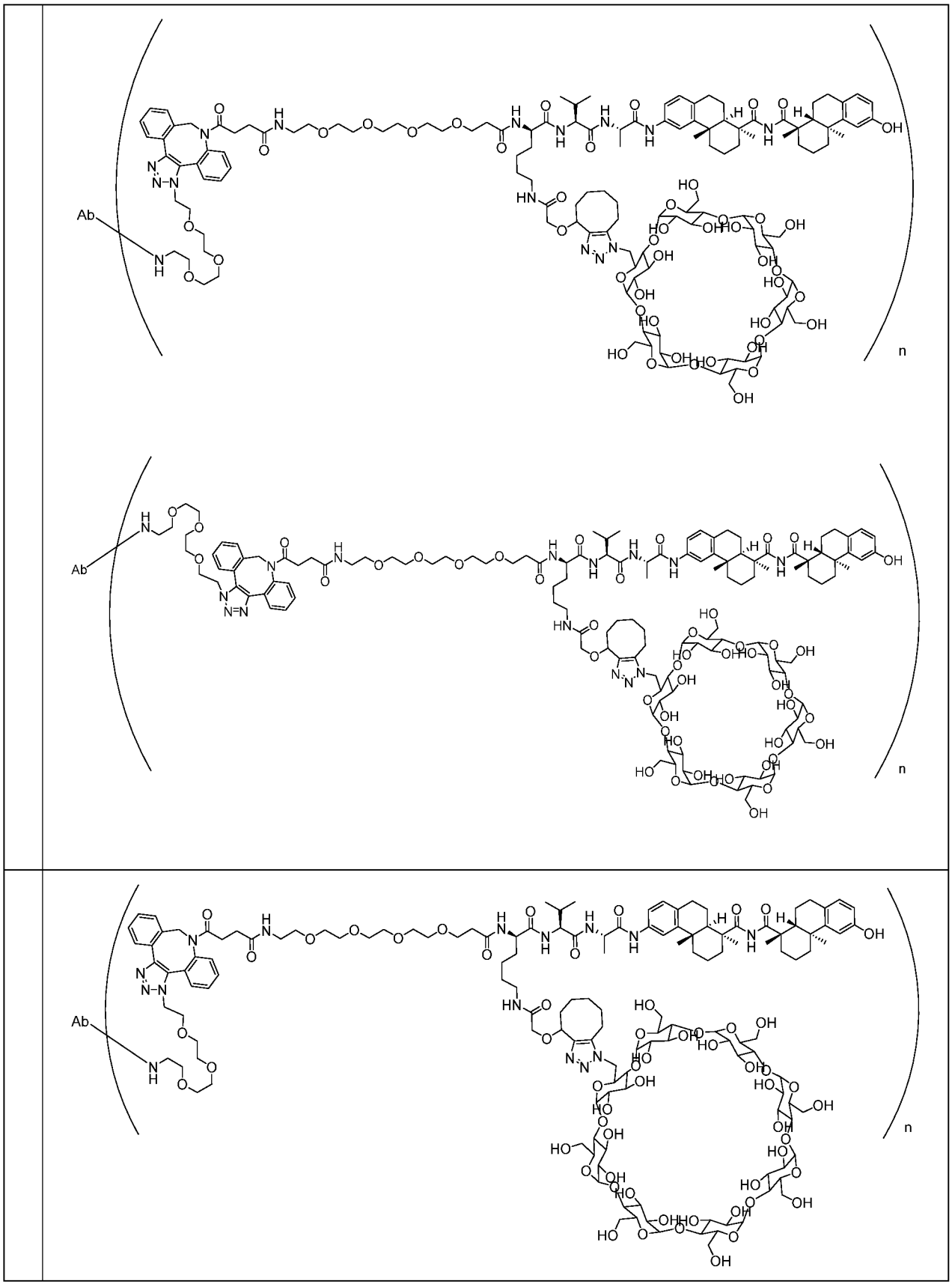
ПЭГ группой на глутаминовой боковой цепи, описанной здесь (называется здесь ПЭГ-модифицированным антителом). В определенных вариантах осуществления такая ПЭГ группа оканчивается на азидо группу, что способствует реакции с описанными здесь линкер-нагрузками (например, линкер-нагрузками, описанными в Таблице 3 и в примерах). В определенных вариантах осуществления такая ПЭГ группа связана с линкер-нагрузкой через описанные здесь триазол или производное триазола. В конъюгатах антитело-лекарственное средство **n** представляет собой целое число от 1 до 10, например, 1, 2, 3 или 4. В ПЭГ группе **nn** представляет собой целое число от 1 до 10, например, 1, 2, 3, 4 или 5. В других вариантах осуществления каждый **BA** в конъюгатах антитело-лекарственное средство в Таблице 1 представляет собой

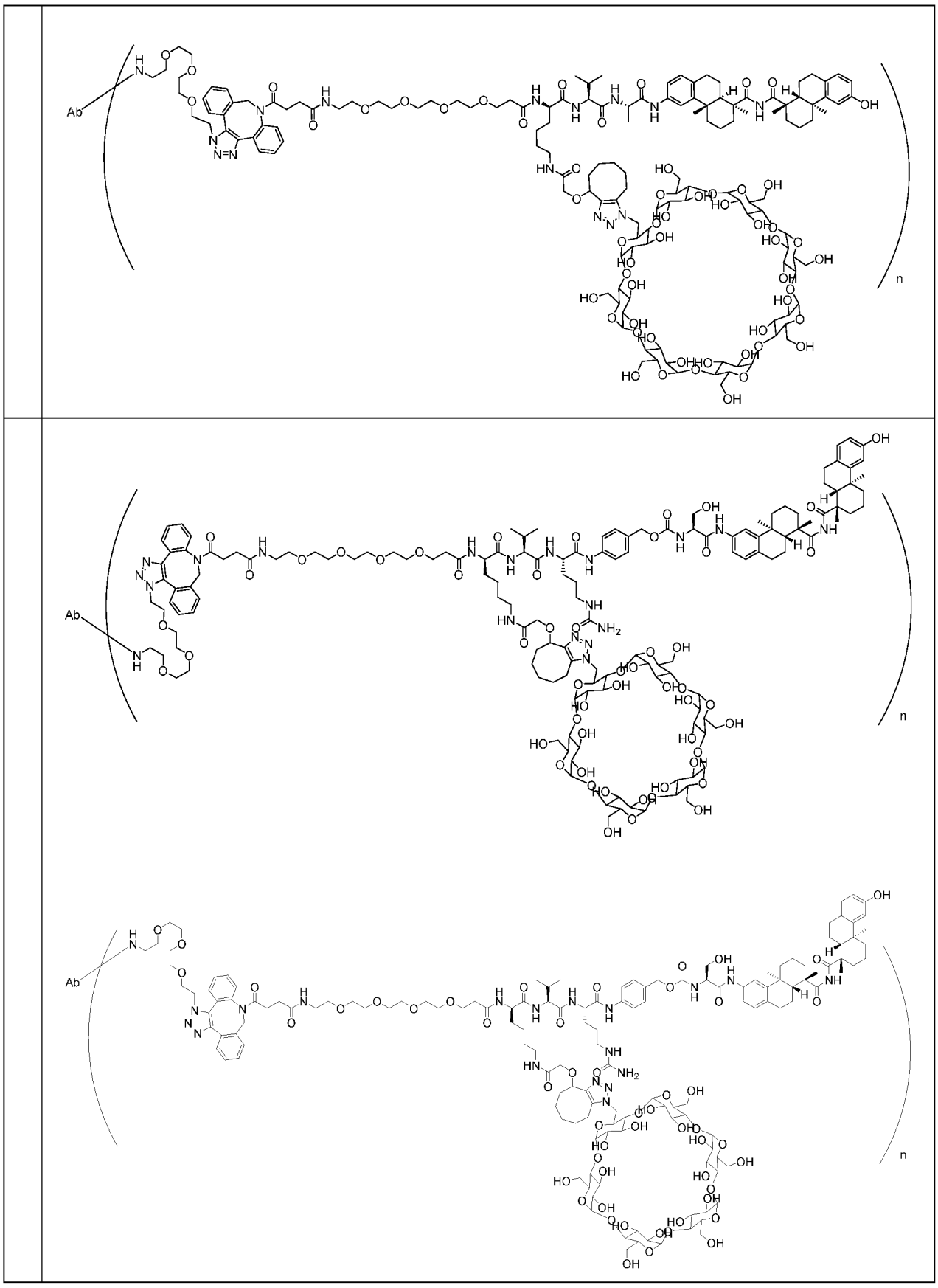


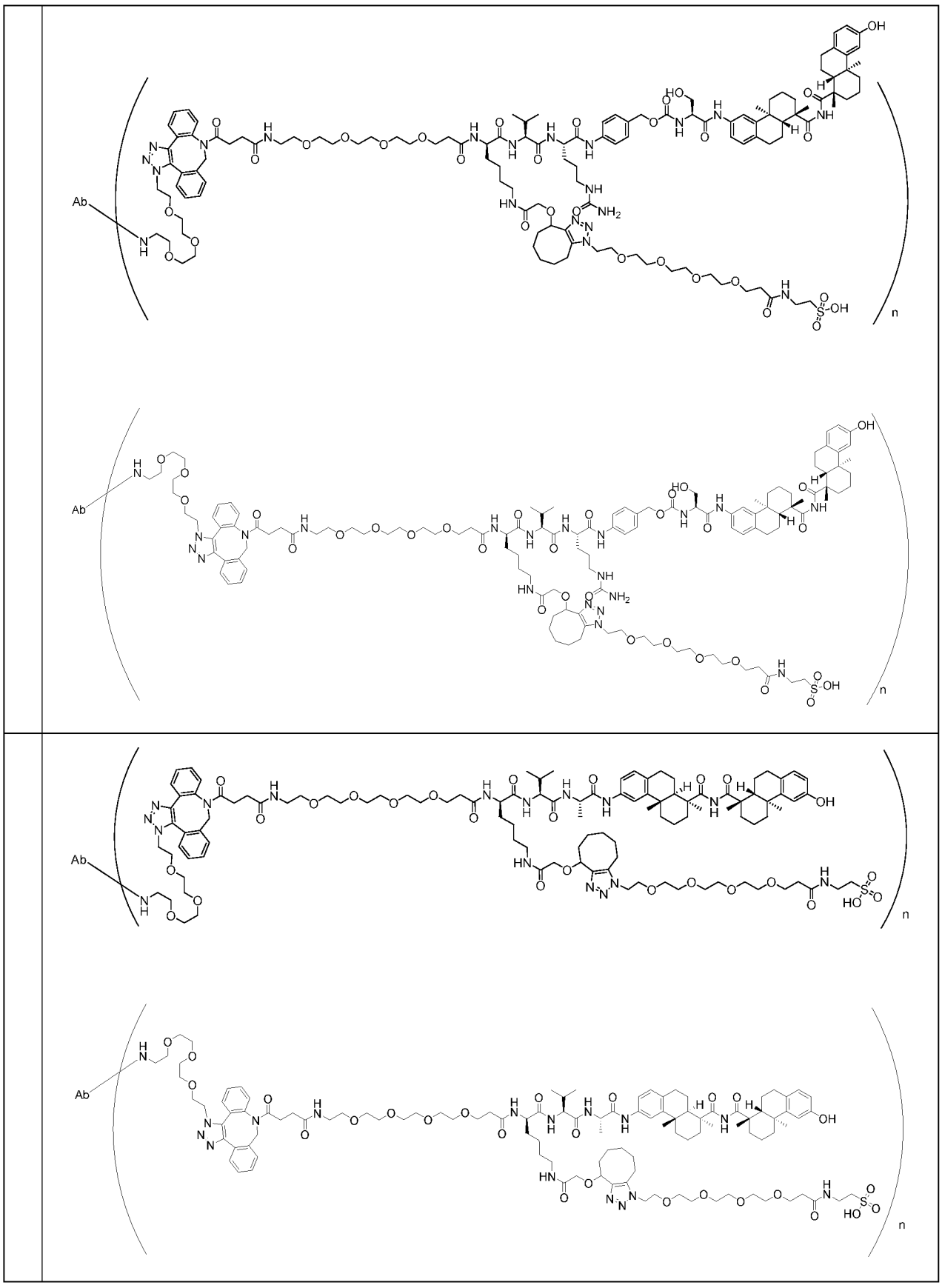
, где **Ab**[1] представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент; **R** представляет собой C_{2-4}-алкилен; а **nn** представляет собой целое число, которое выбирается из диапазона от 2 до 4, включительно, а каждое число **n** представляет собой целое число от 1 до 10, например, 1, 2, 3 или 4.

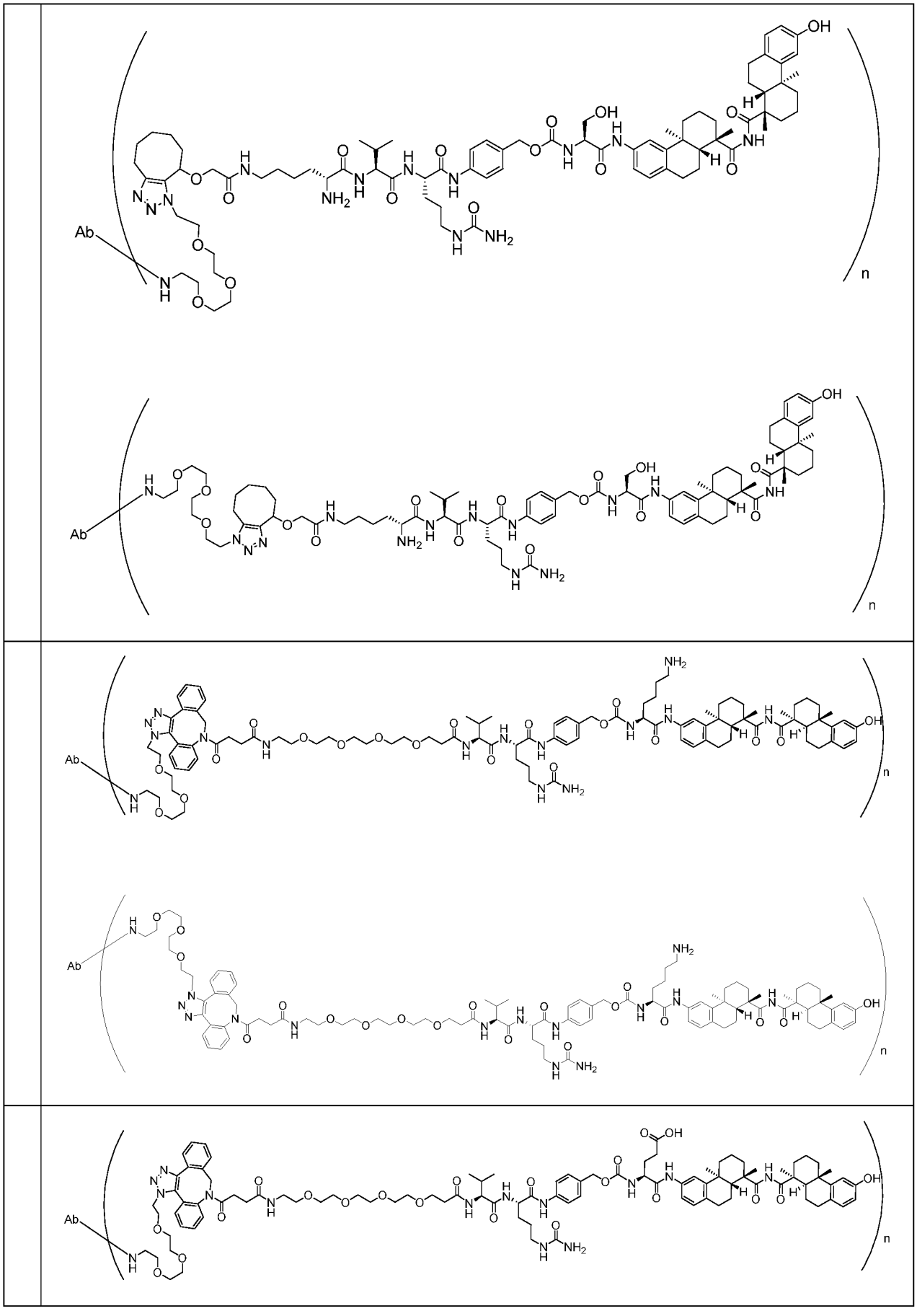
[0309] В определенных вариантах осуществления здесь представлен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий описанное здесь антитело и линкер-нагрузку (**LP**), выбираемую из группы, состоящей из линкер-нагрузок в Таблице 2 или их стереоизомерной формы, или региоизомера, или смеси региоизомеров.

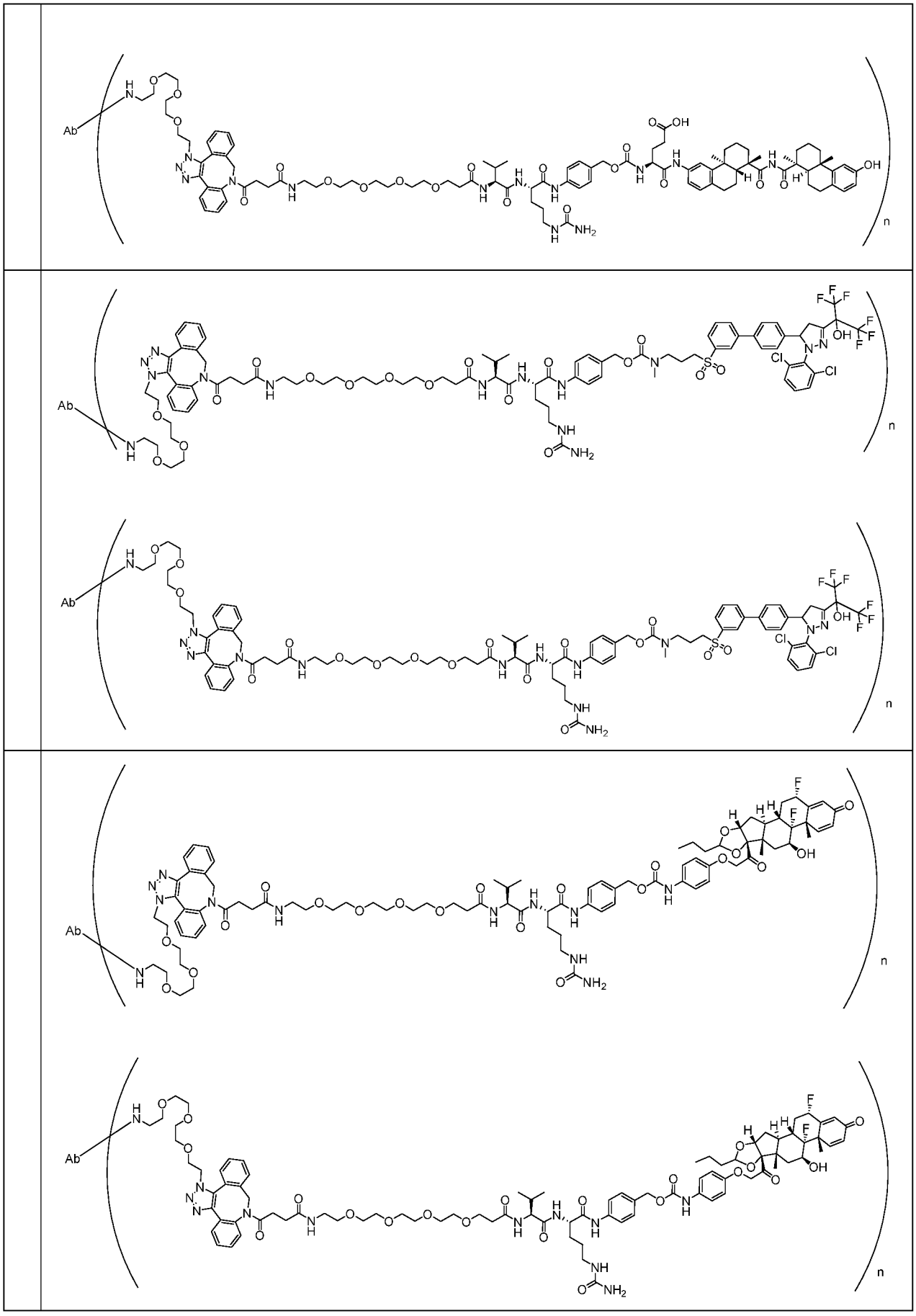
Таблица 2: Список конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) и их структуры

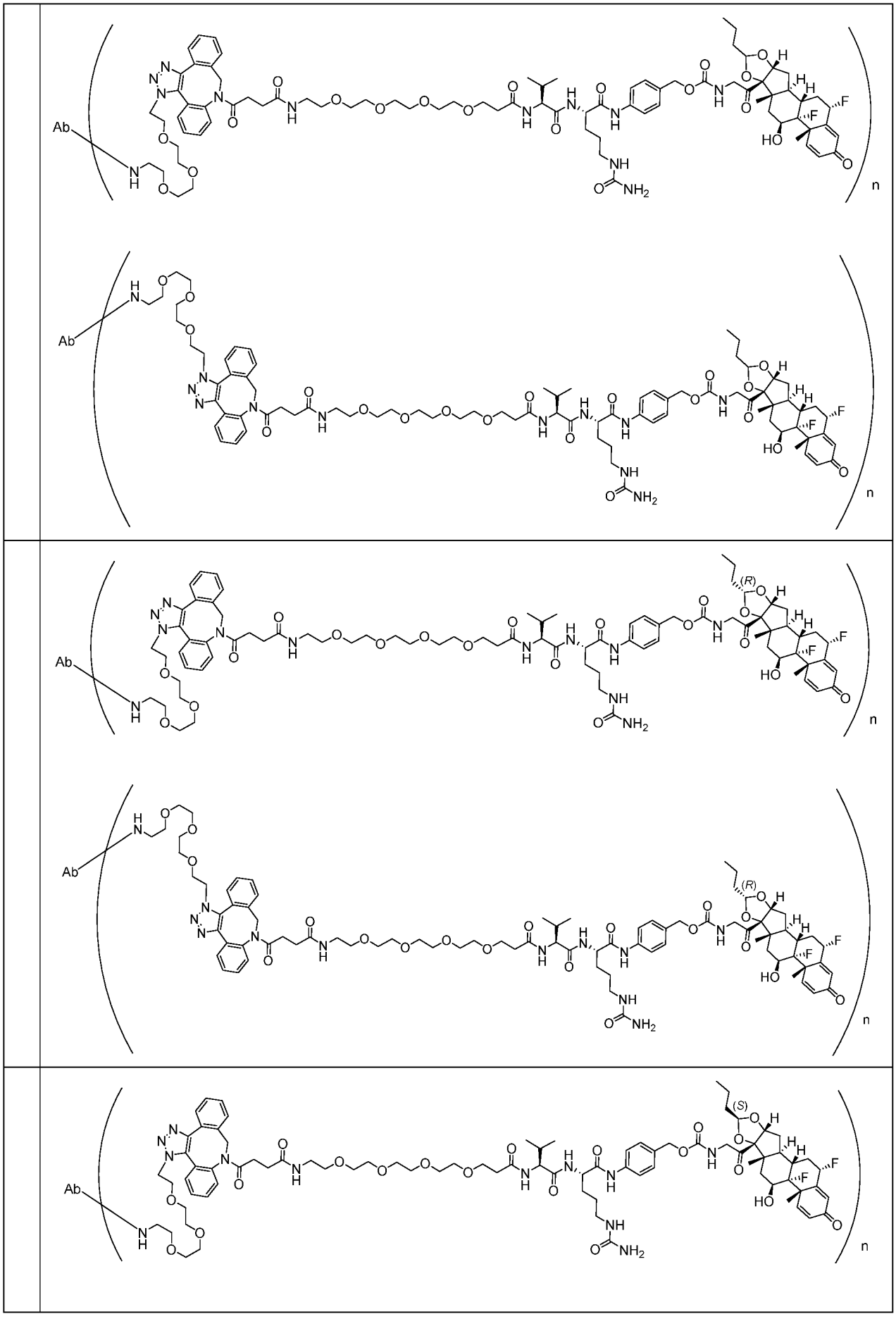


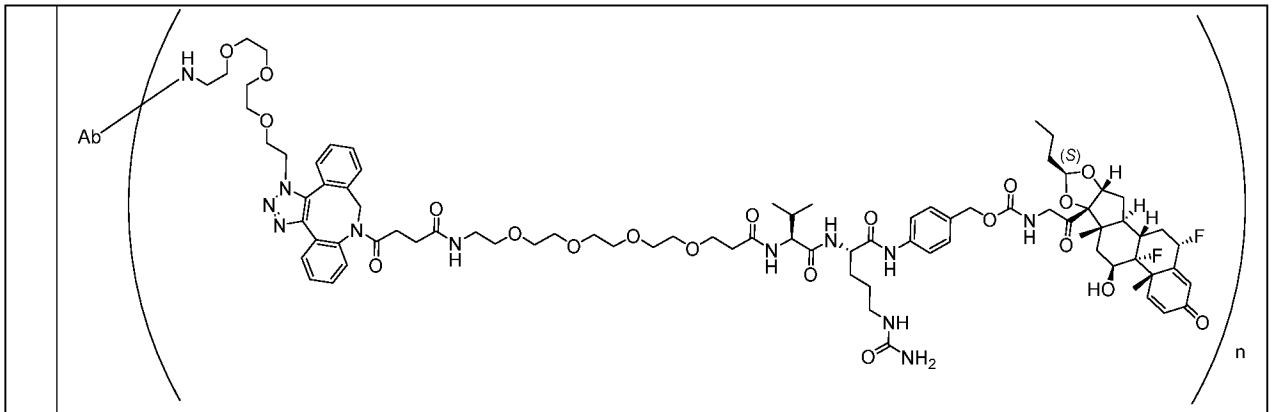


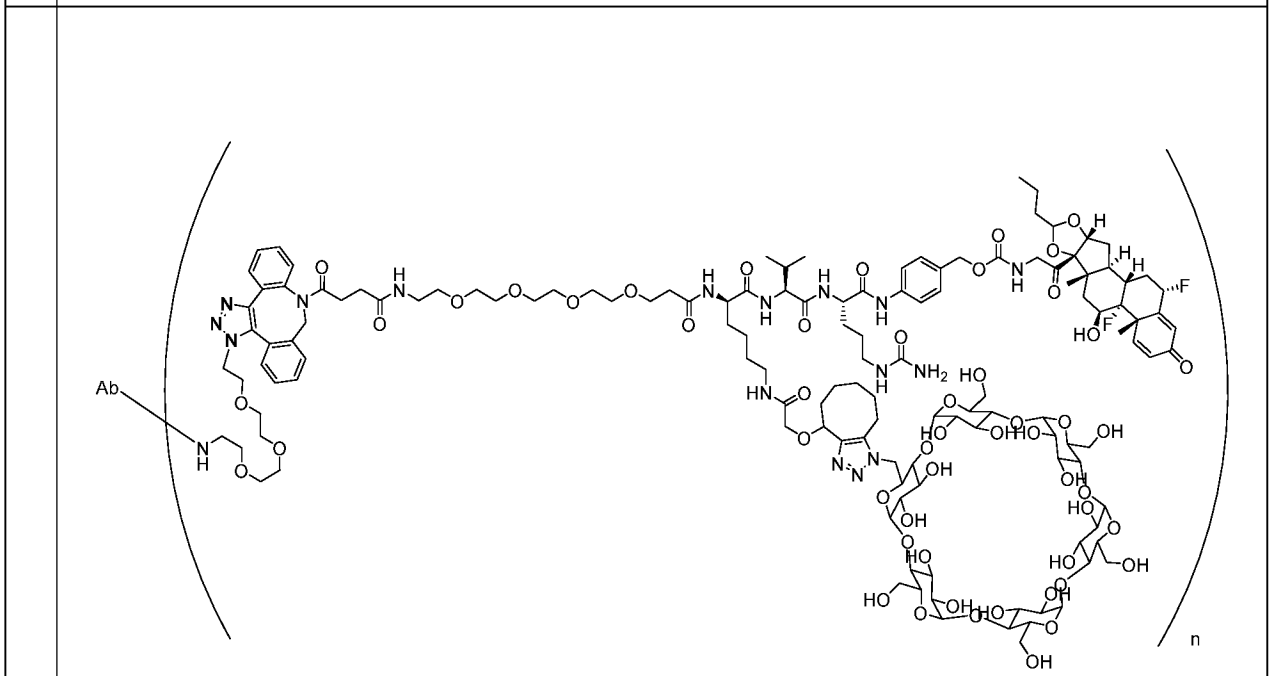


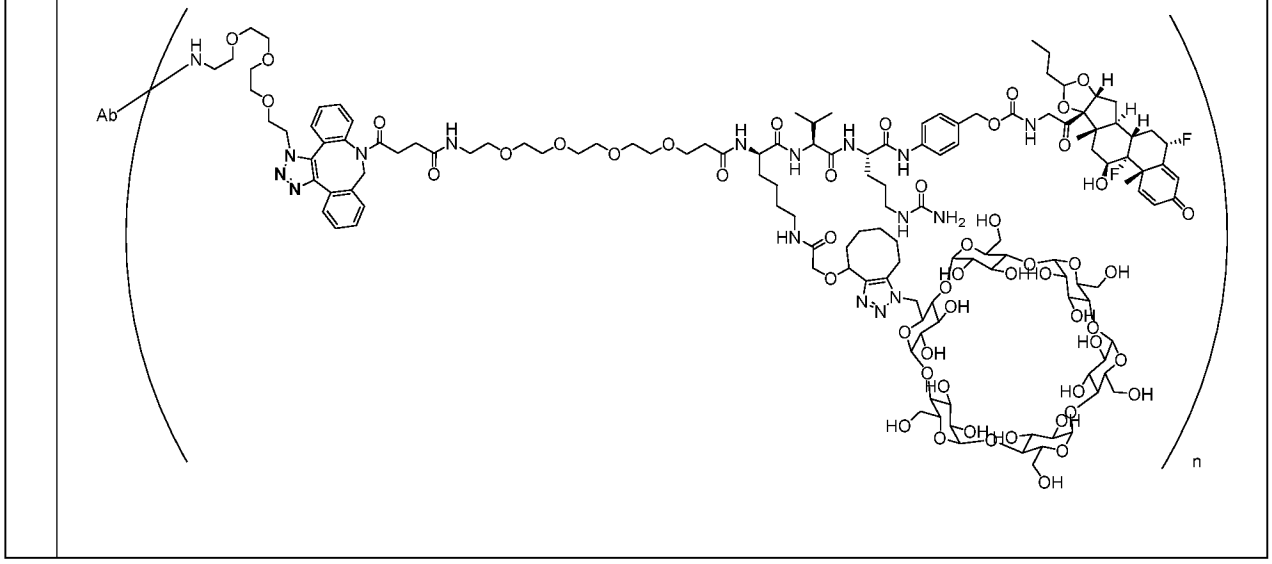


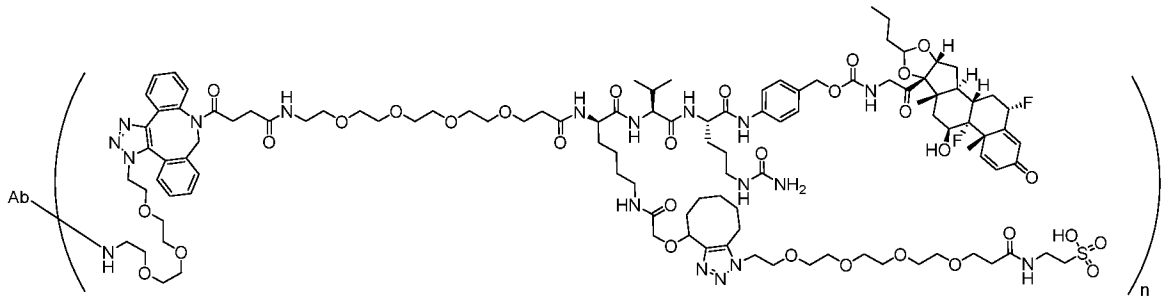




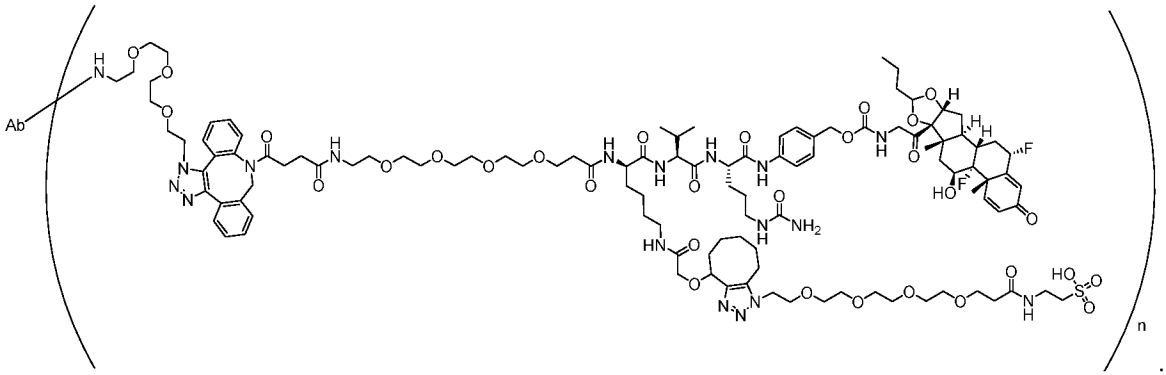


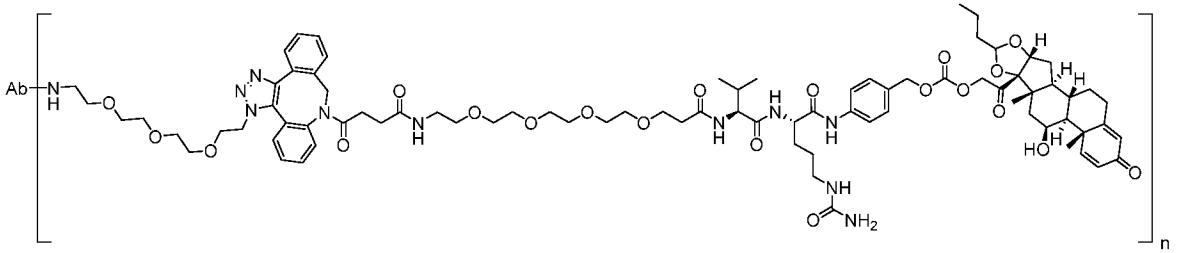


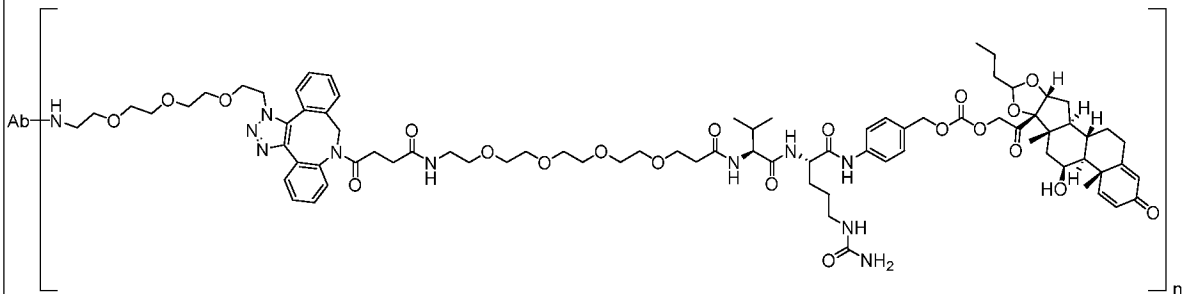




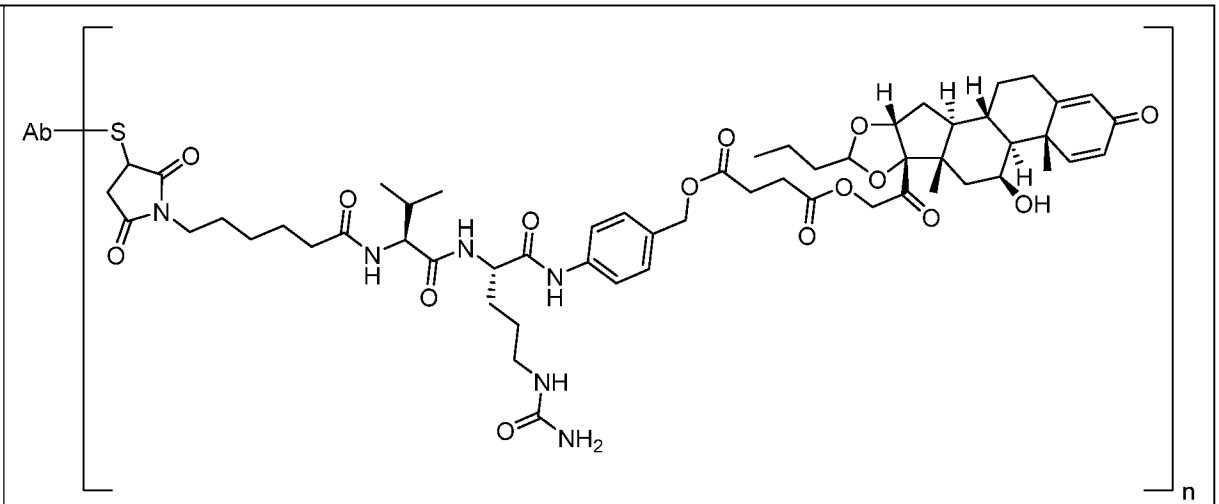
и



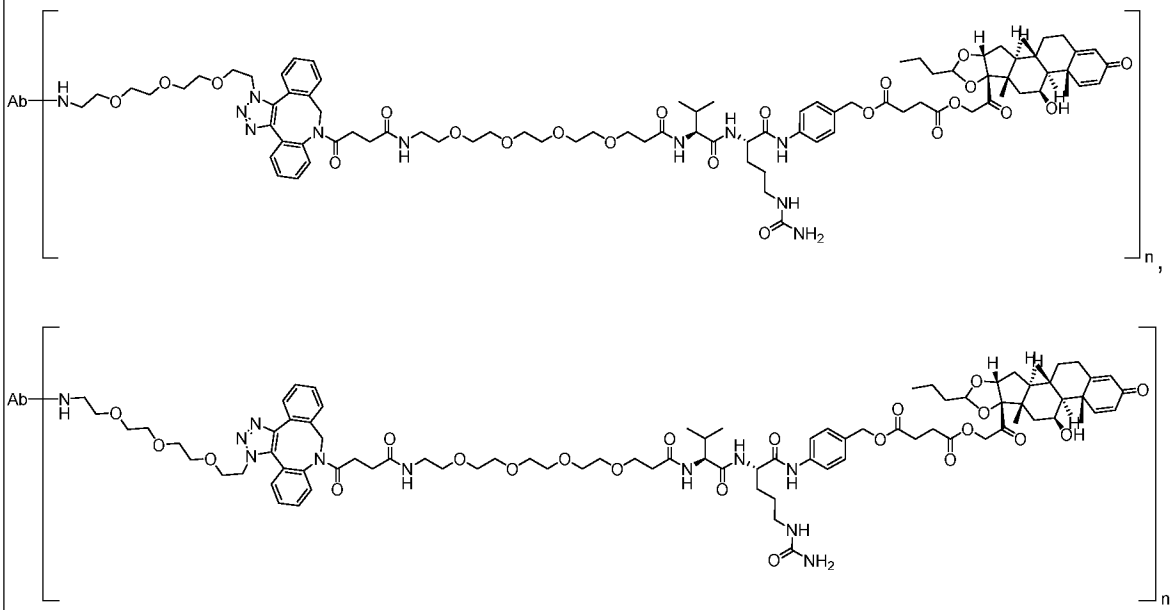




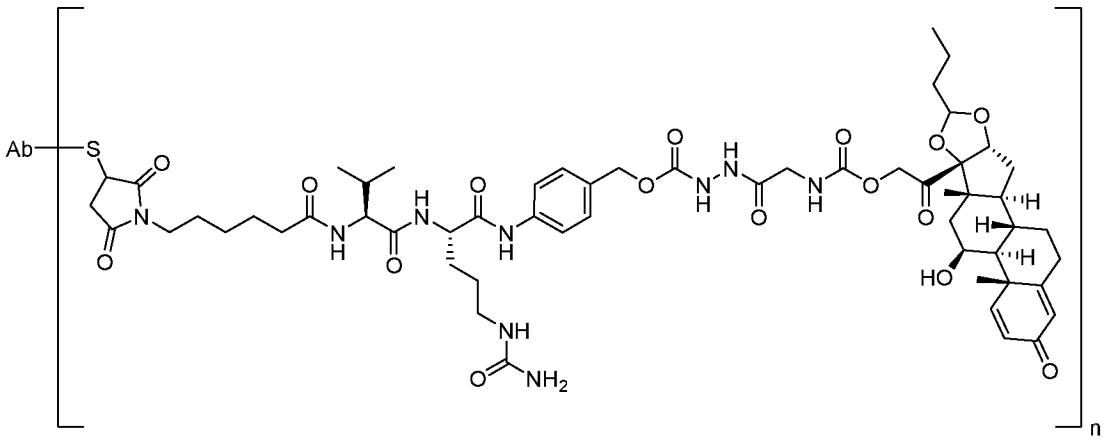
или их смесь;



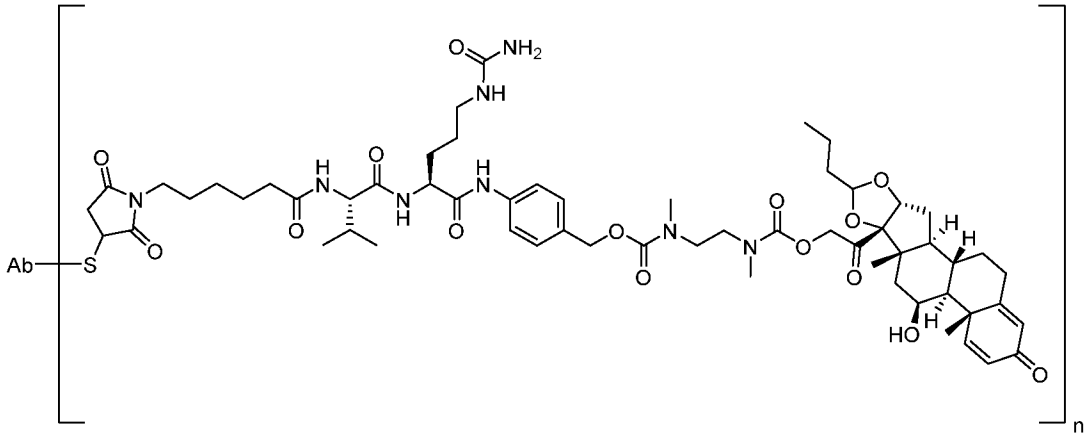
или стереоизомер, или смесь стереоизомеров;



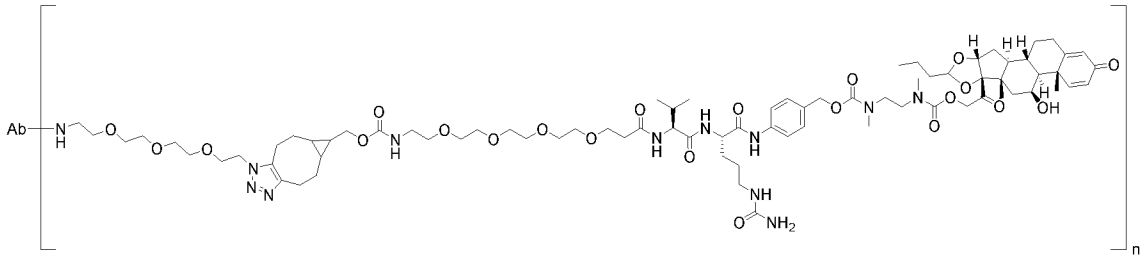
или их смесь;

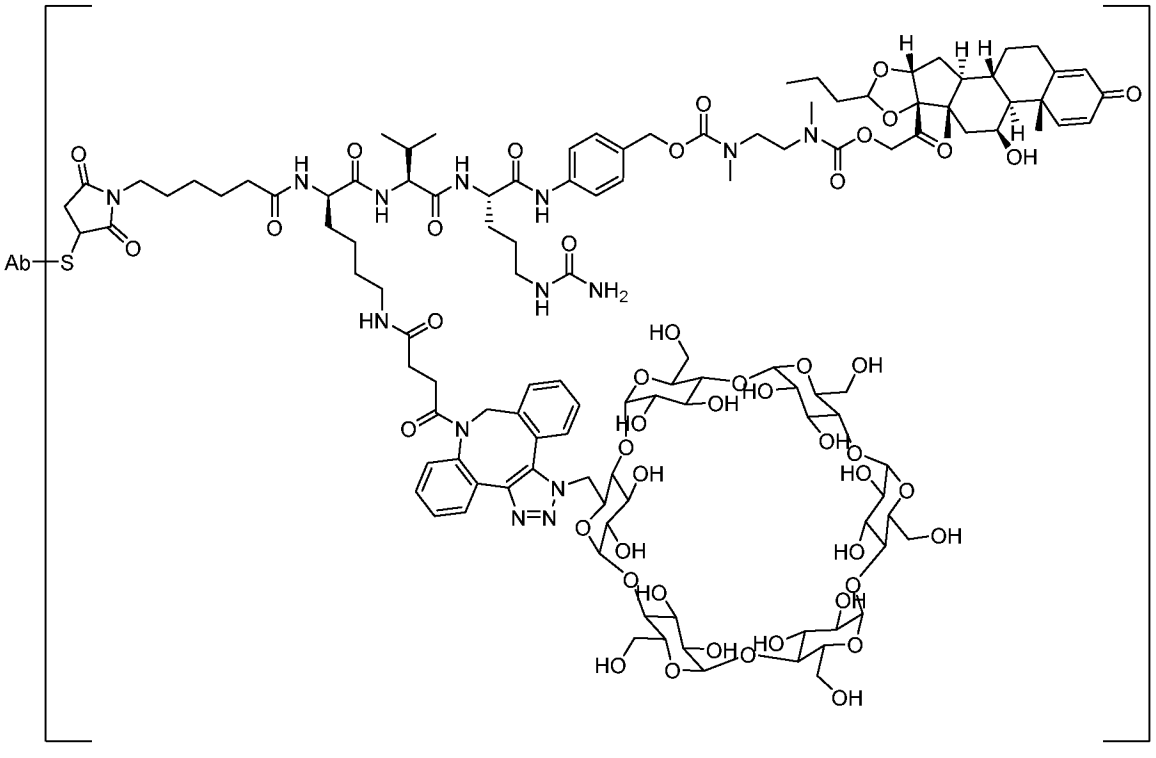


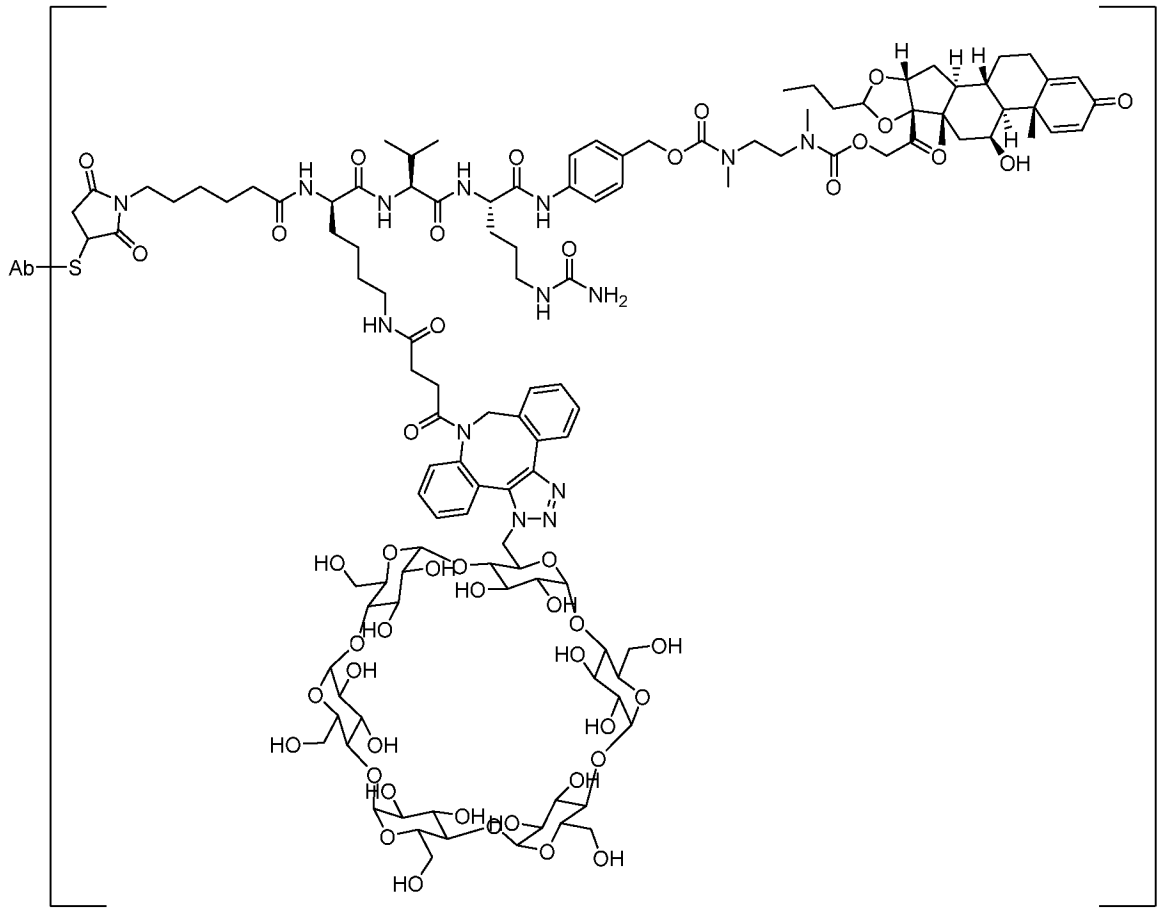
или стереоизомер, или смесь стереоизомеров;



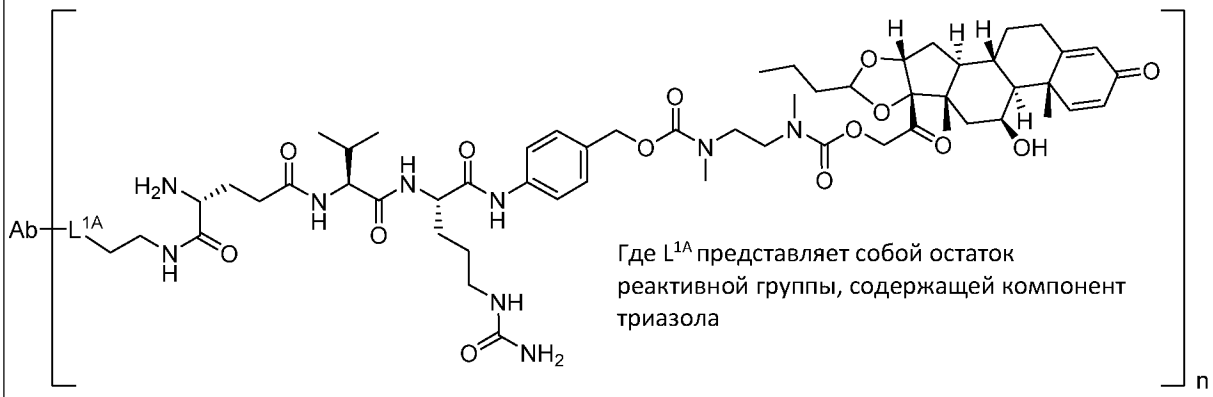
или стереоизомер, или смесь стереоизомеров;





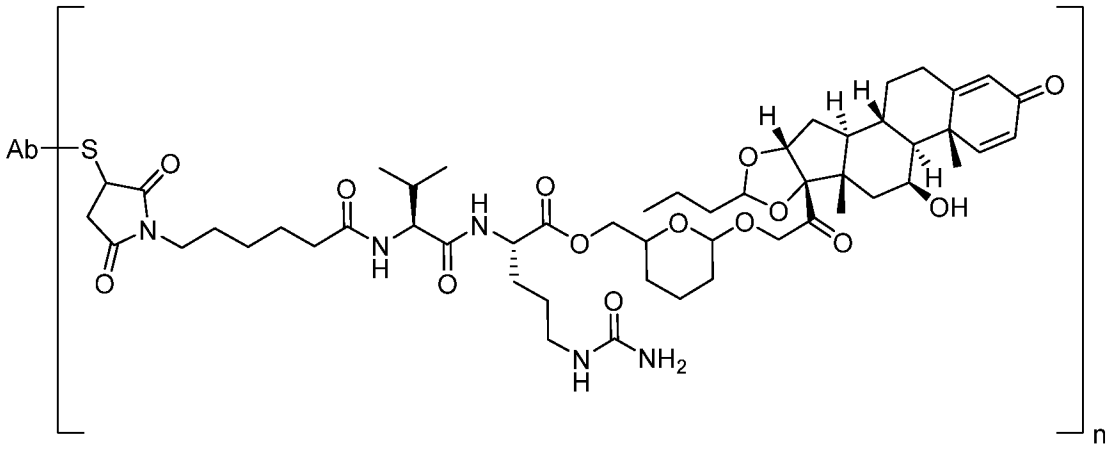


или их смесь

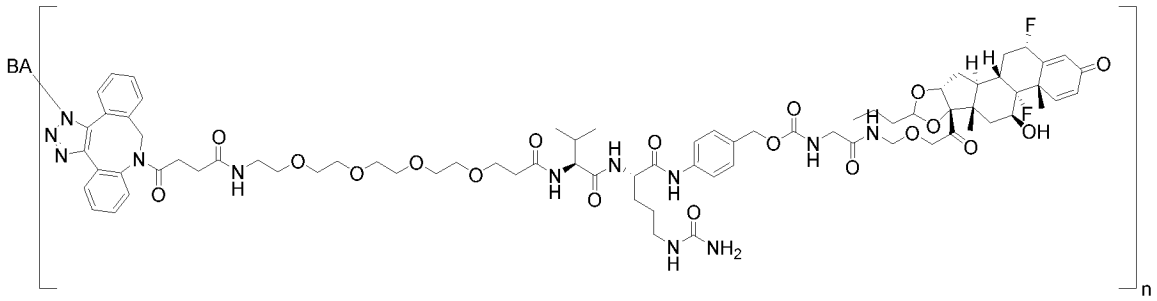


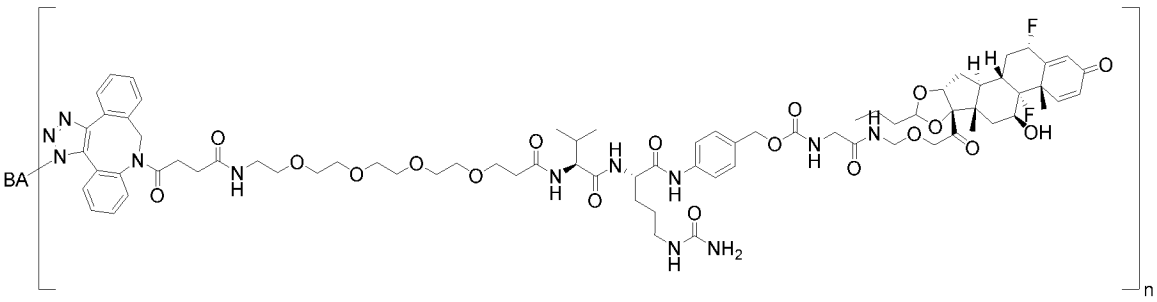
Где L^{1A} представляет собой остаток реактивной группы, содержащей компонент триазола

или их смесь

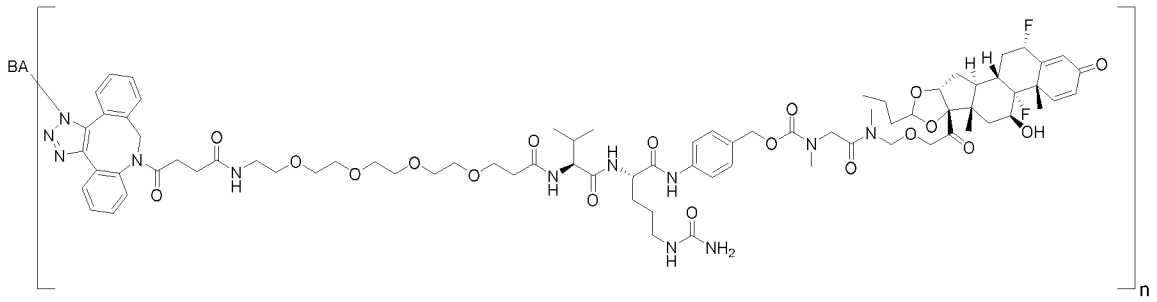


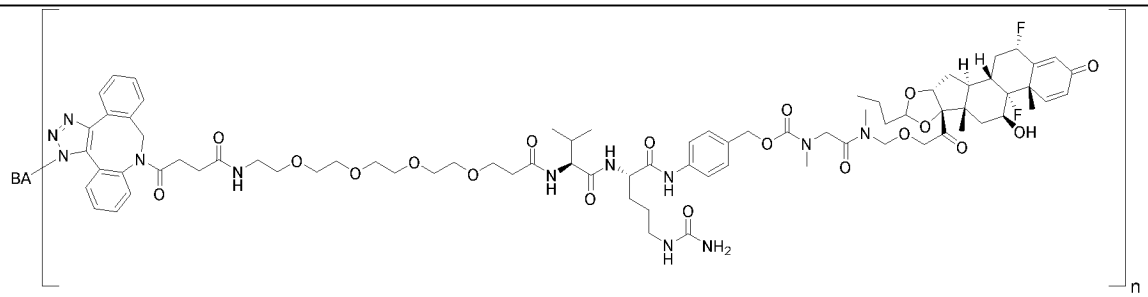
или стереоизомер или смесь стереоизомеров



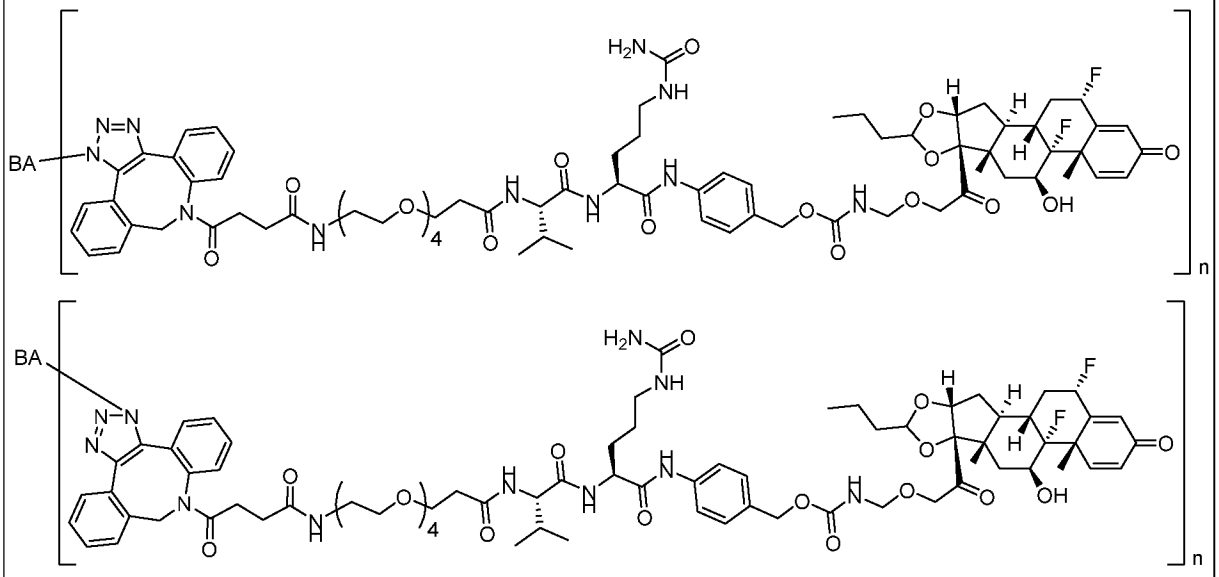


или их смесь

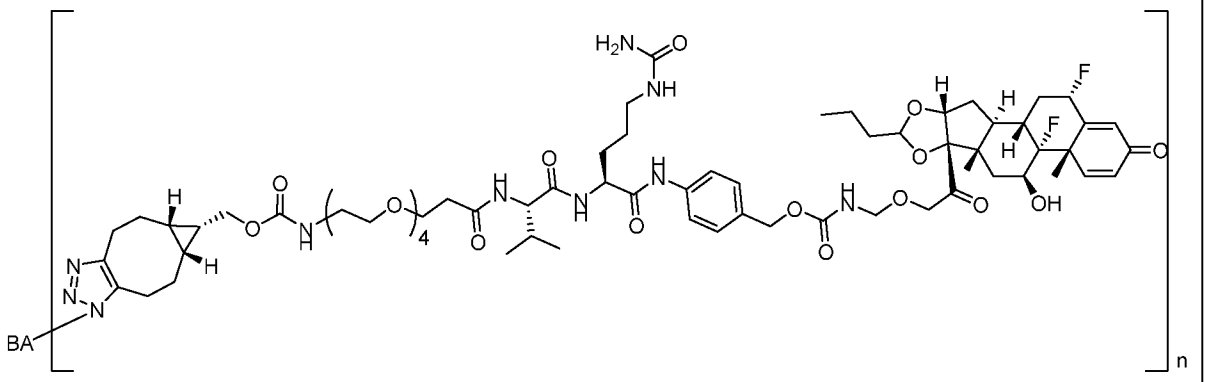


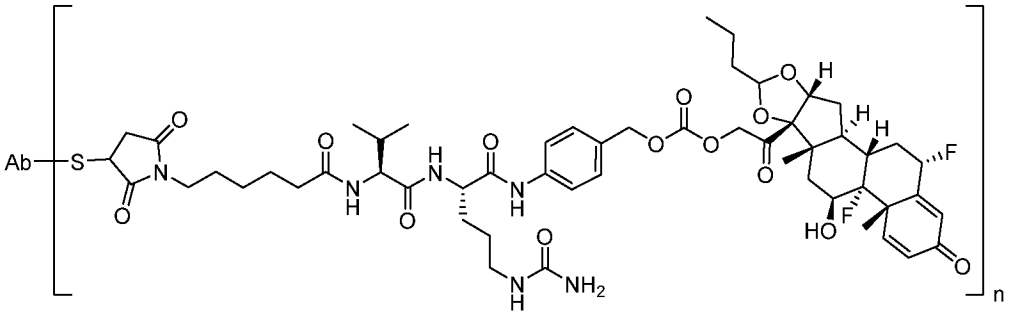


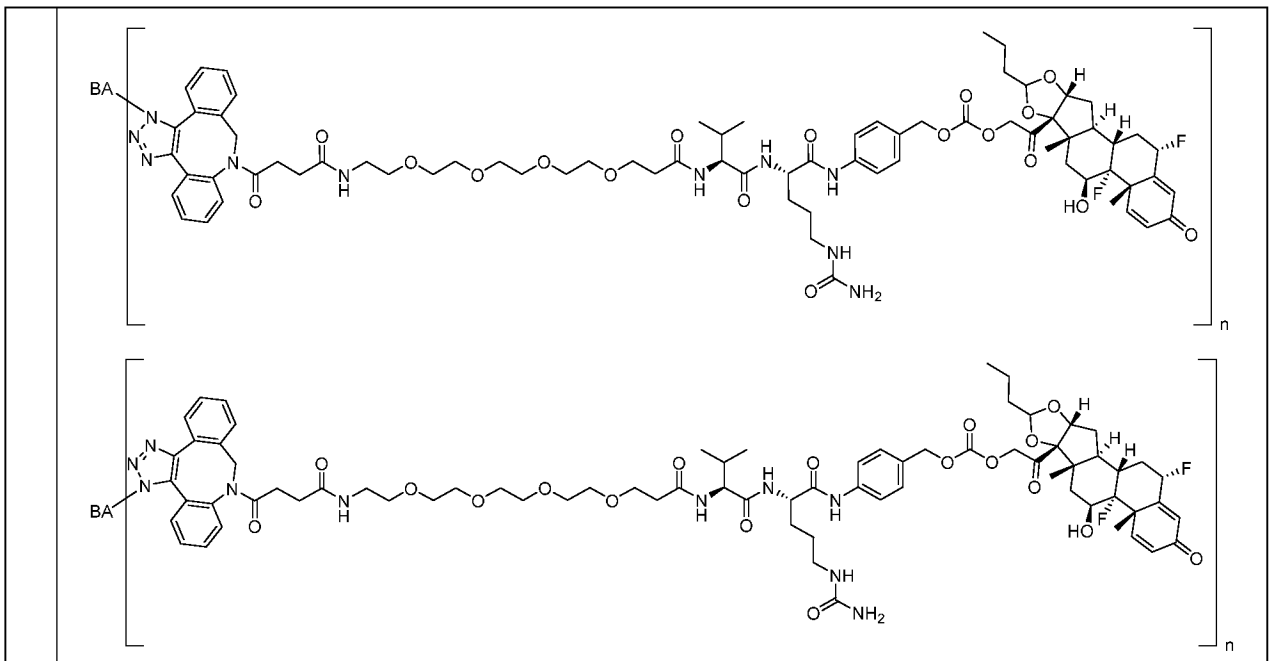
или их смесь



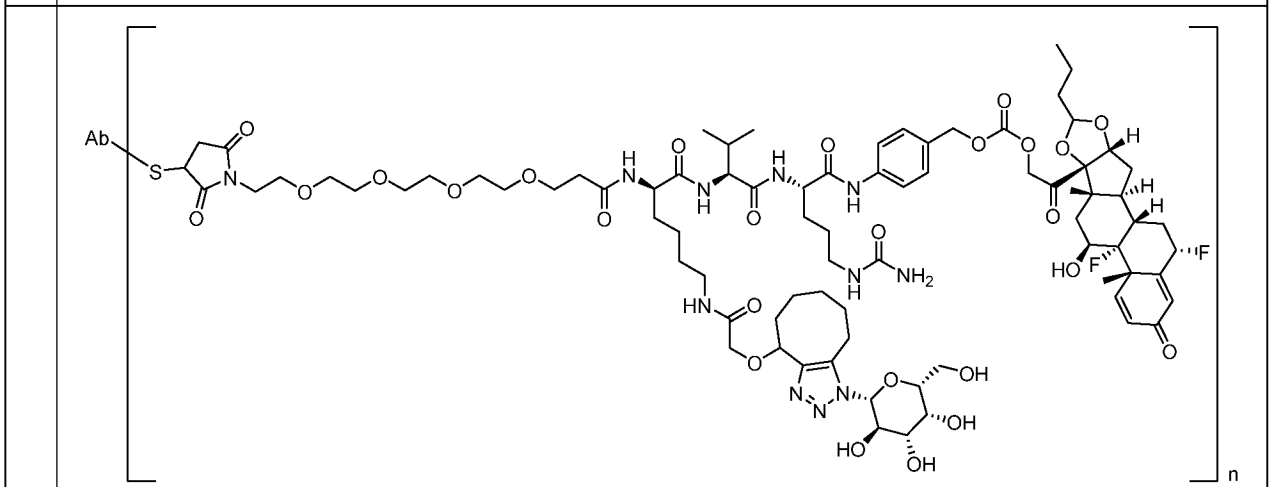
или их смесь

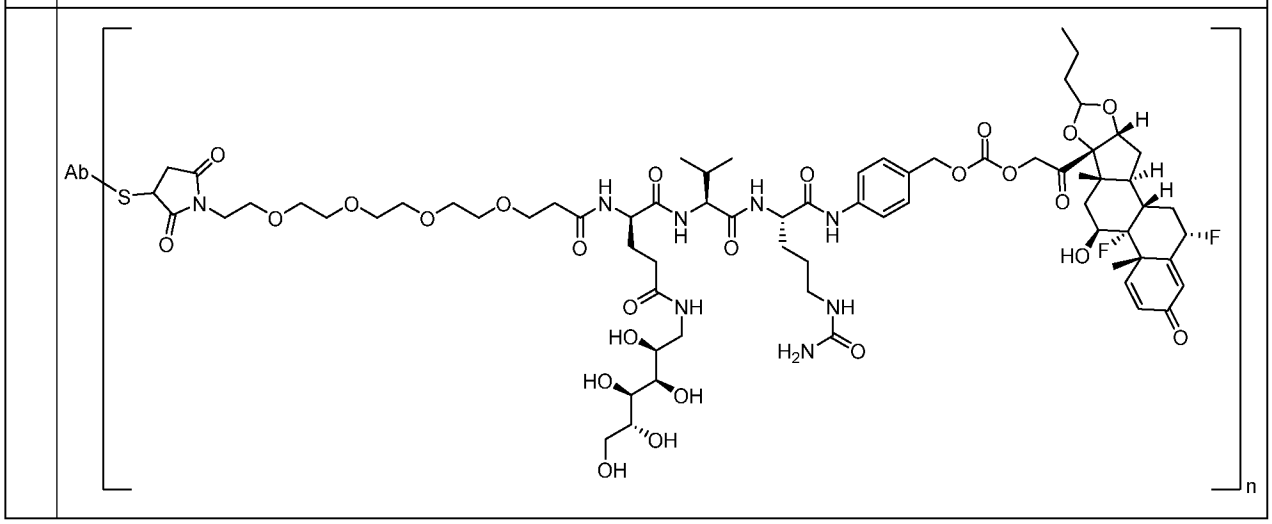


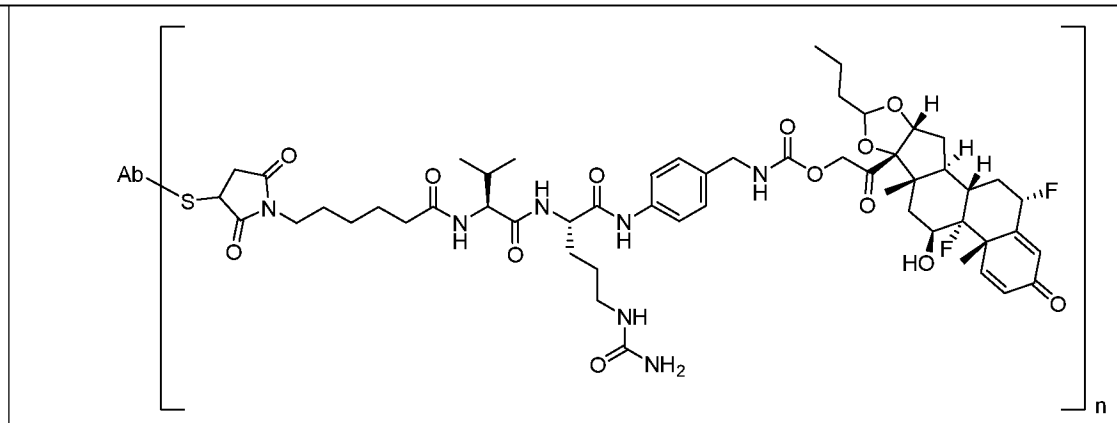


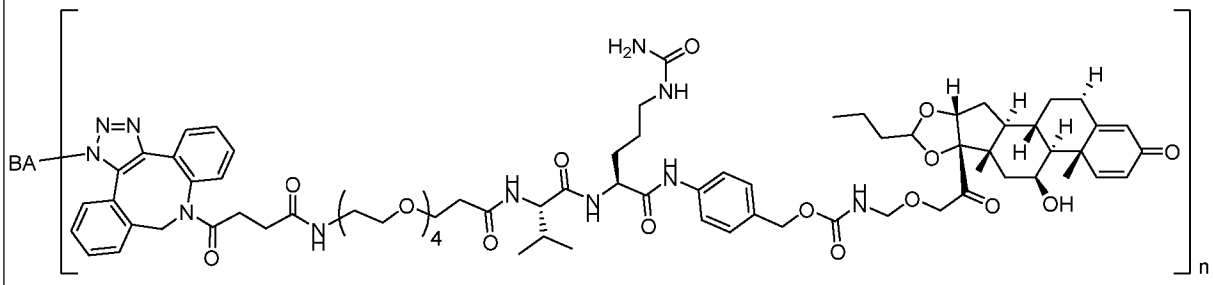


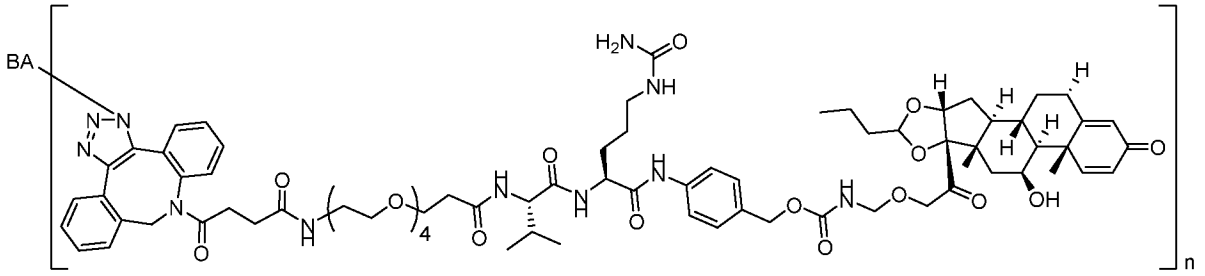
или их смесь



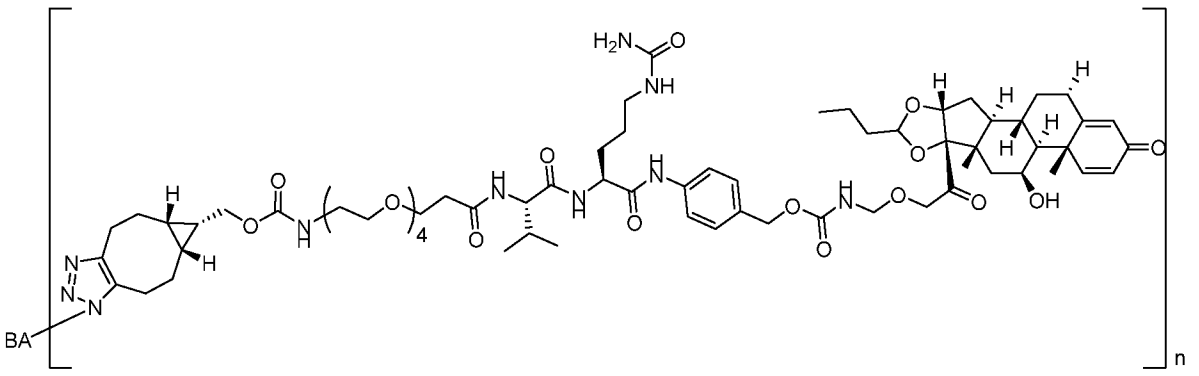


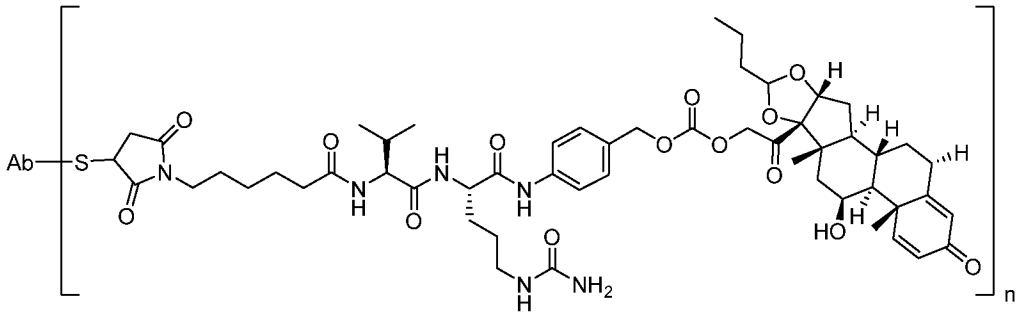


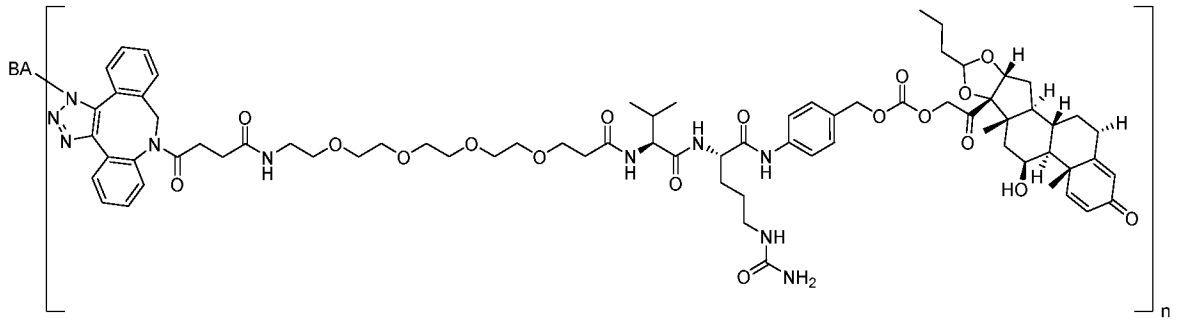


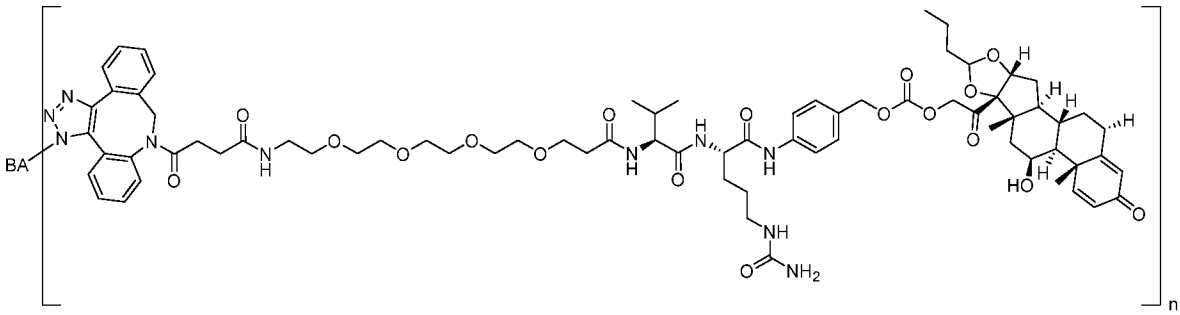


или их смесь

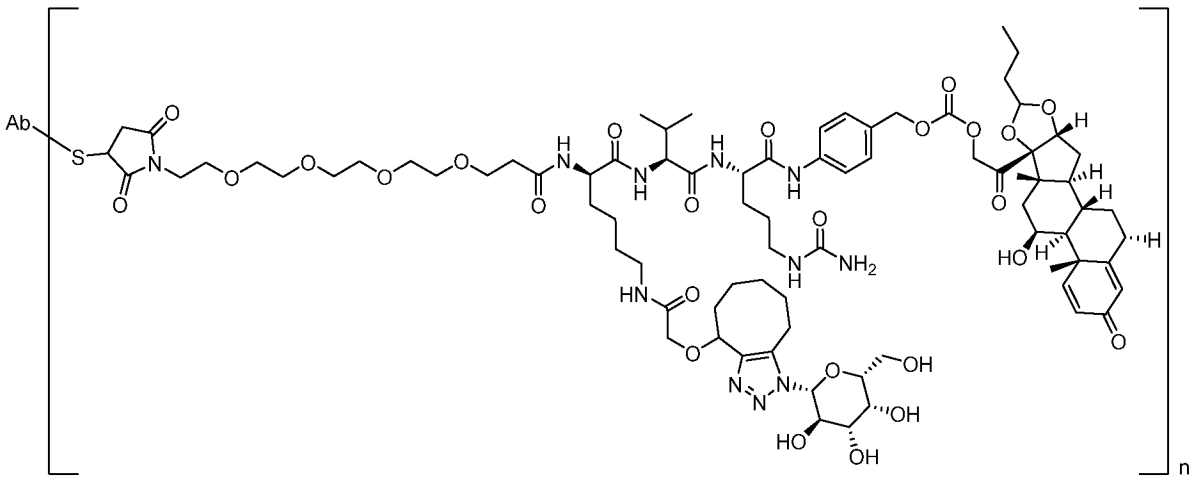


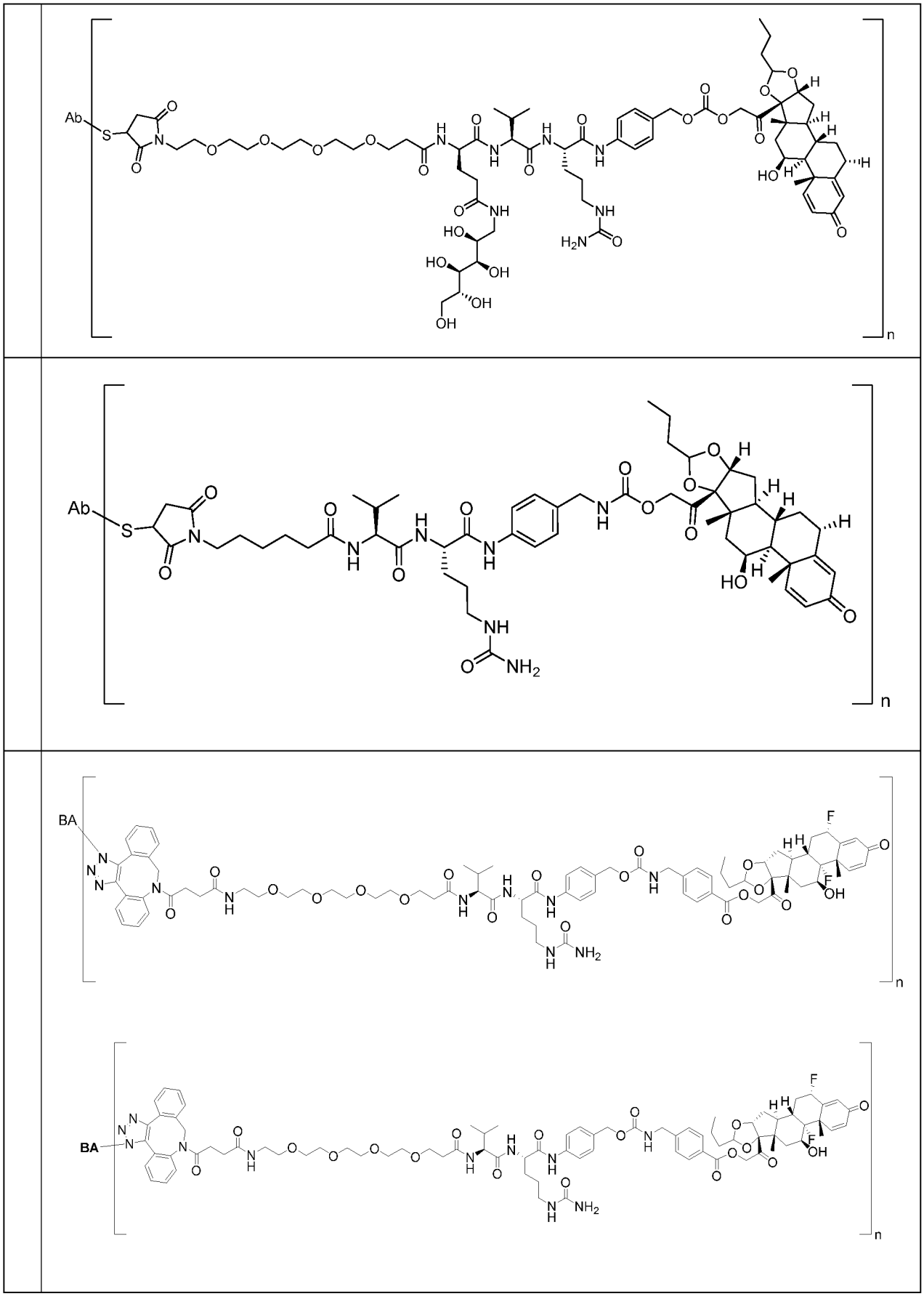




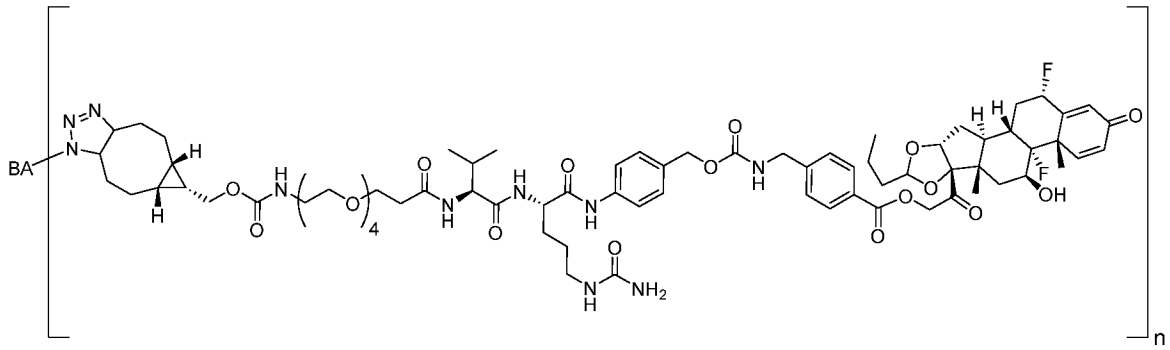


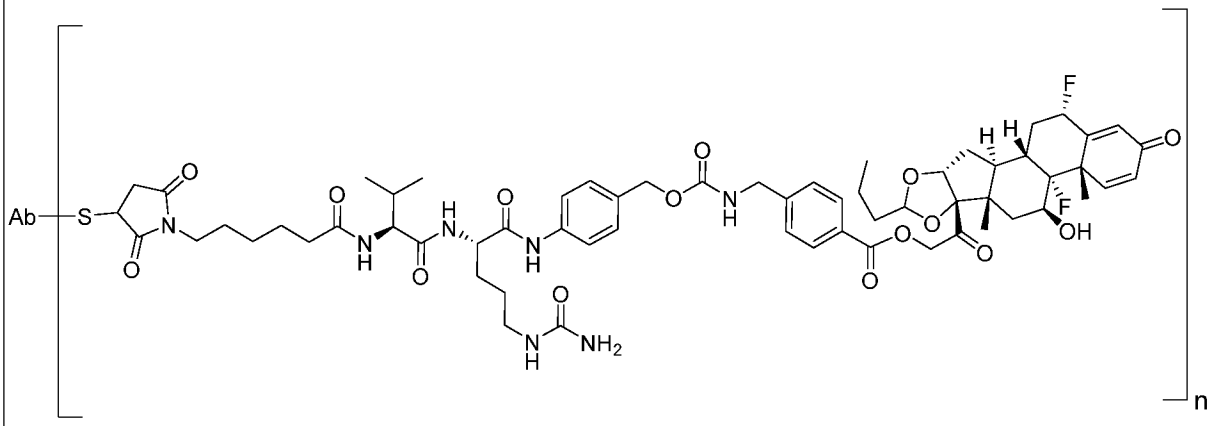
или их смесь

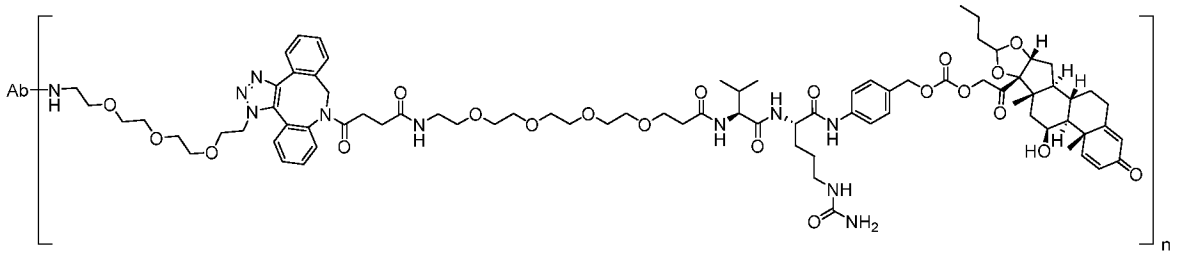


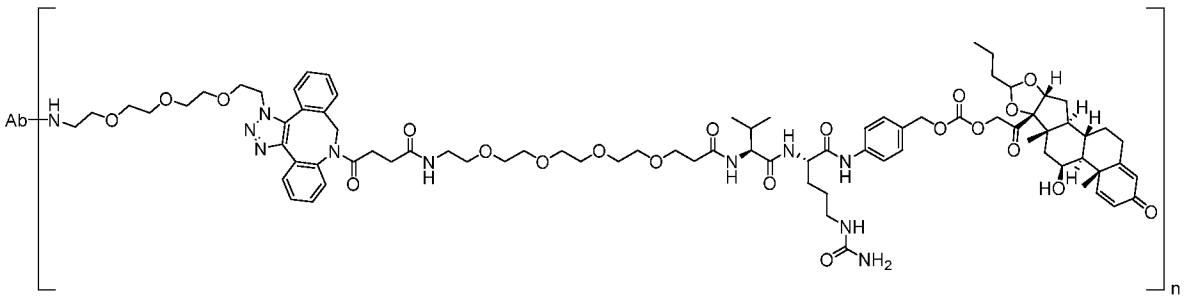


или их смесь

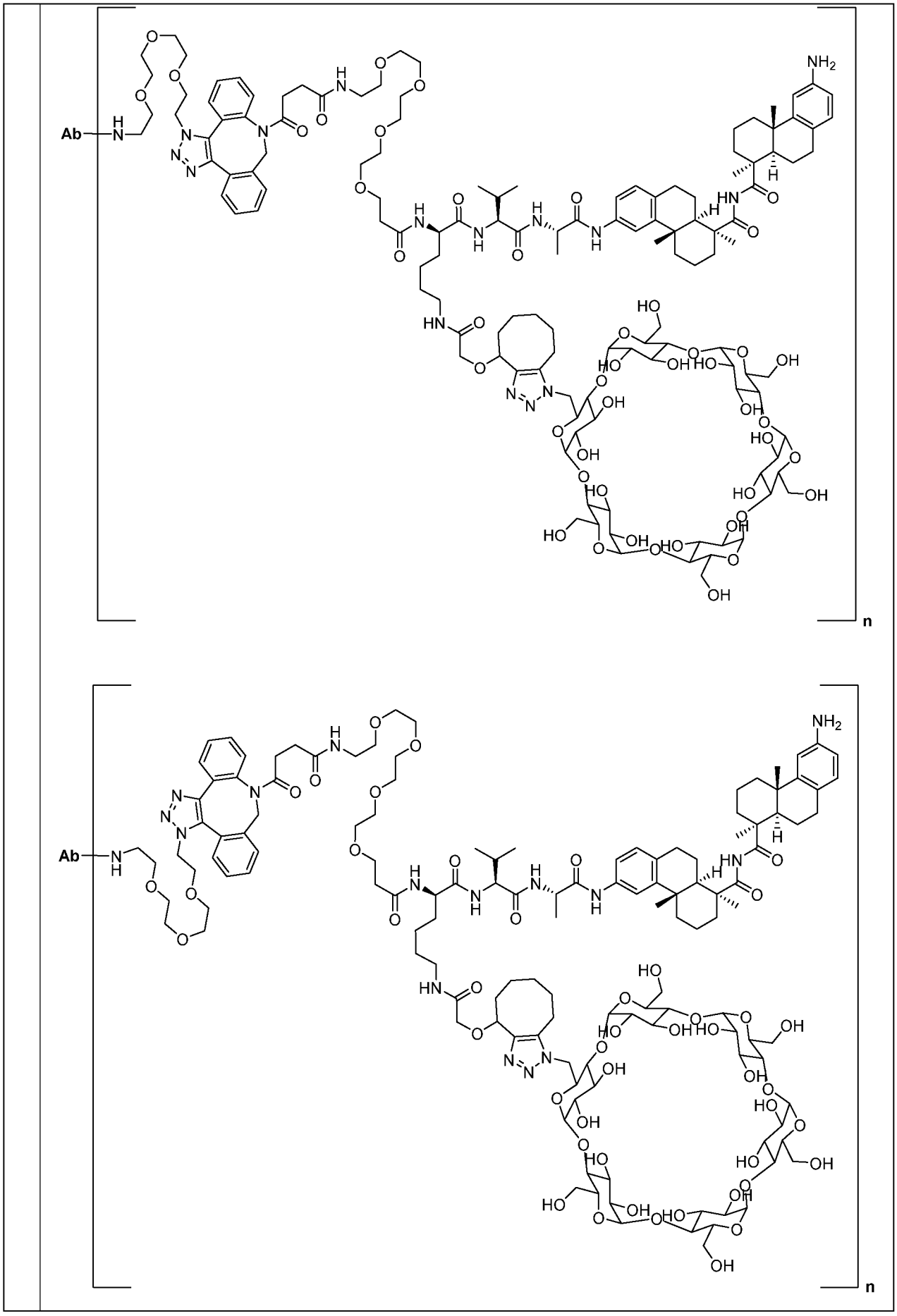


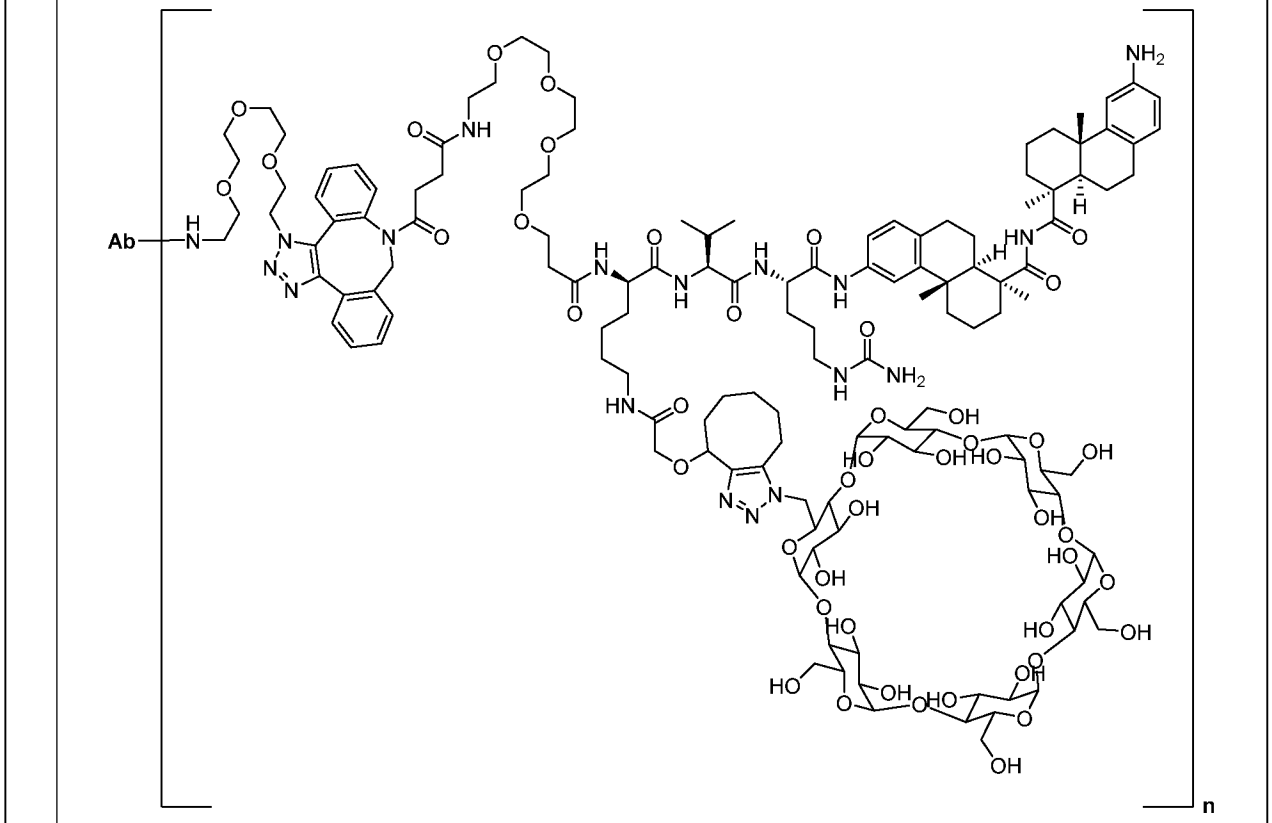


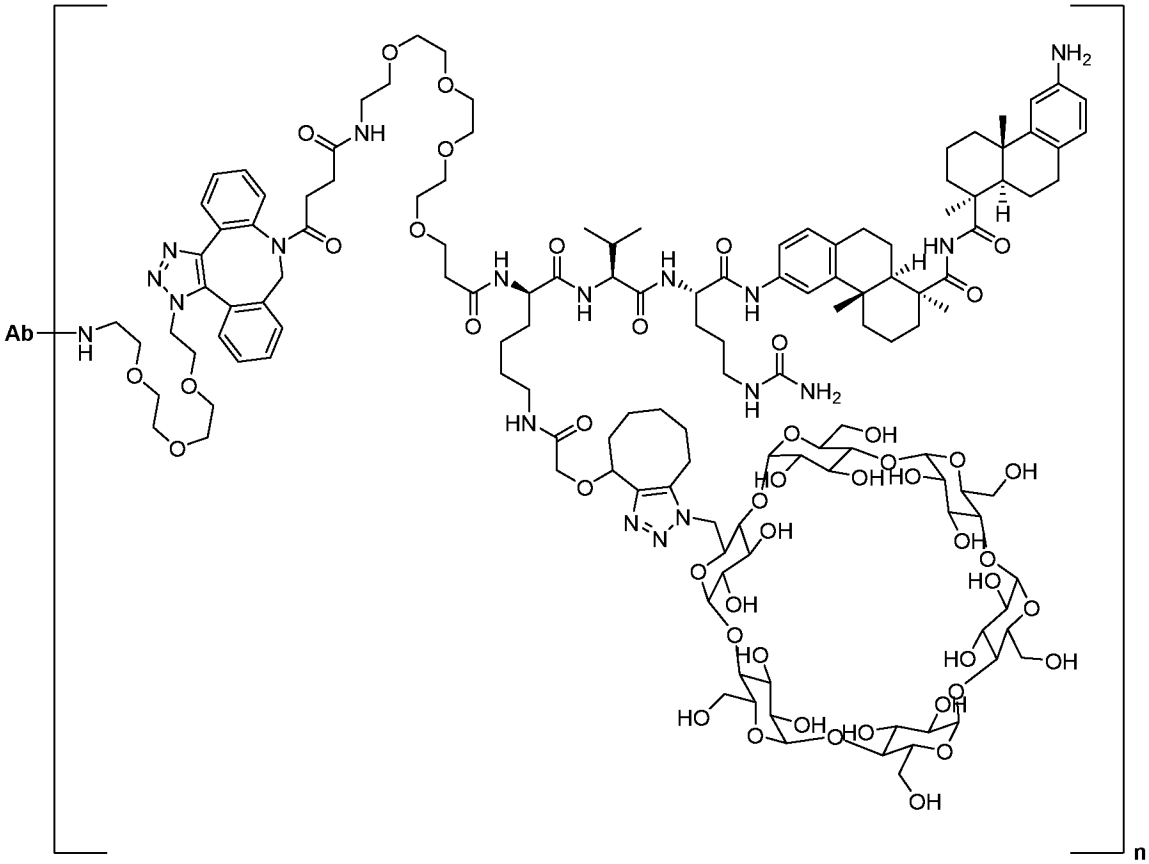


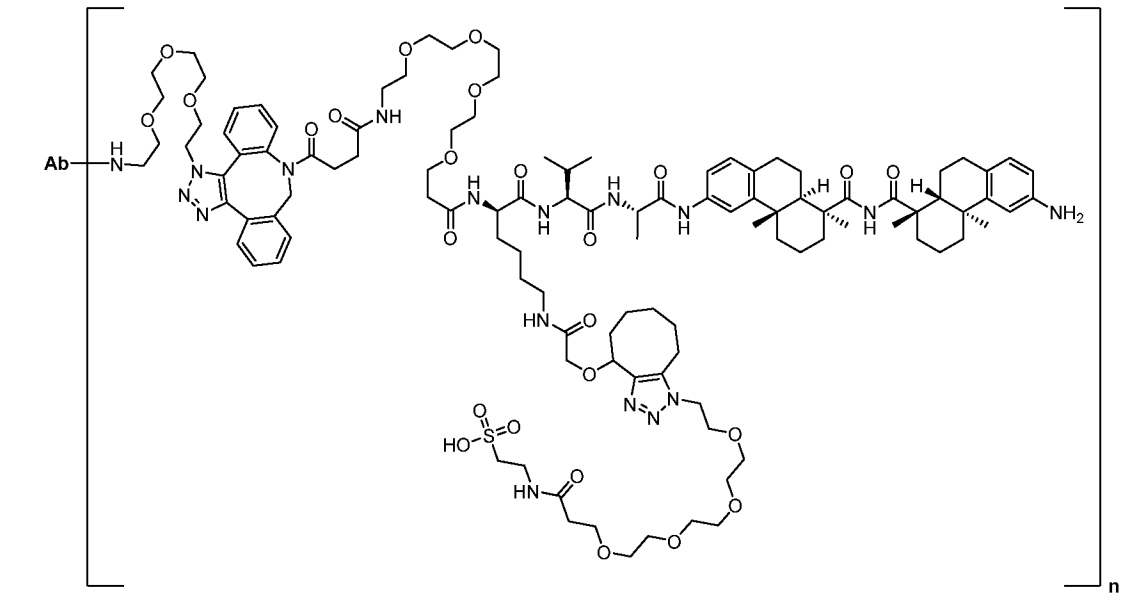


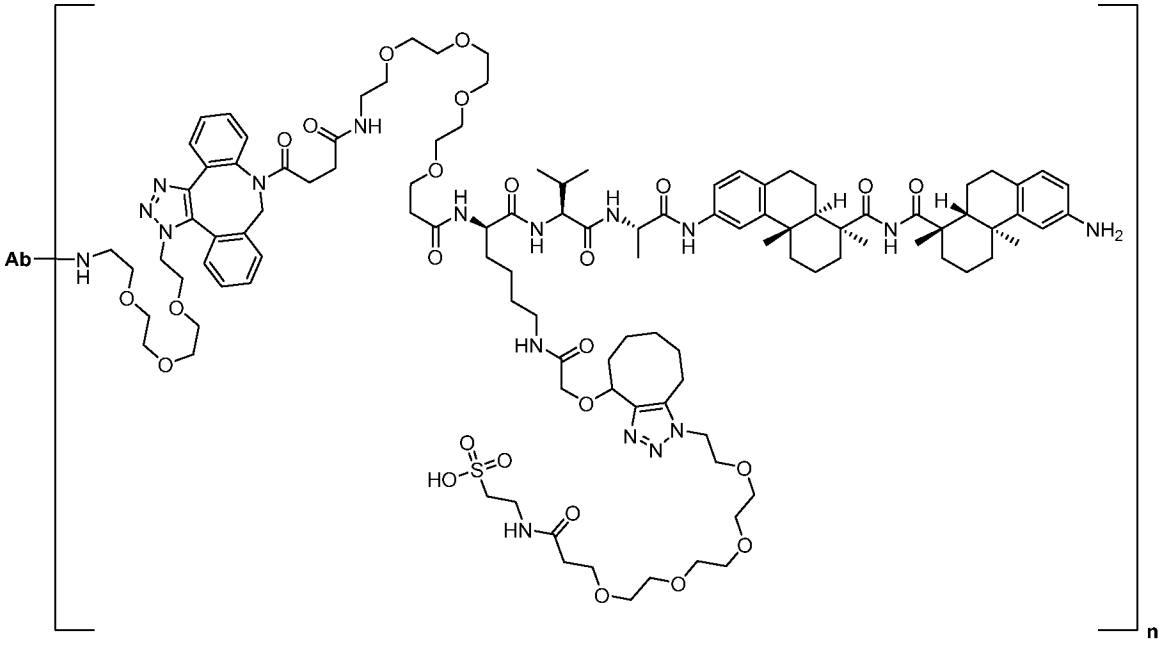
или их смесь;

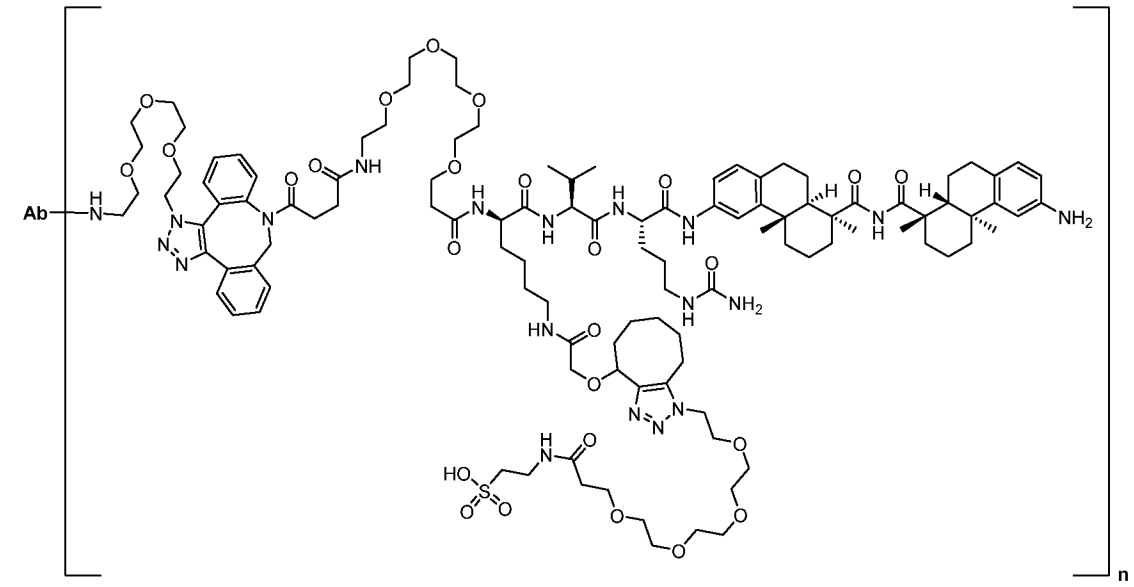


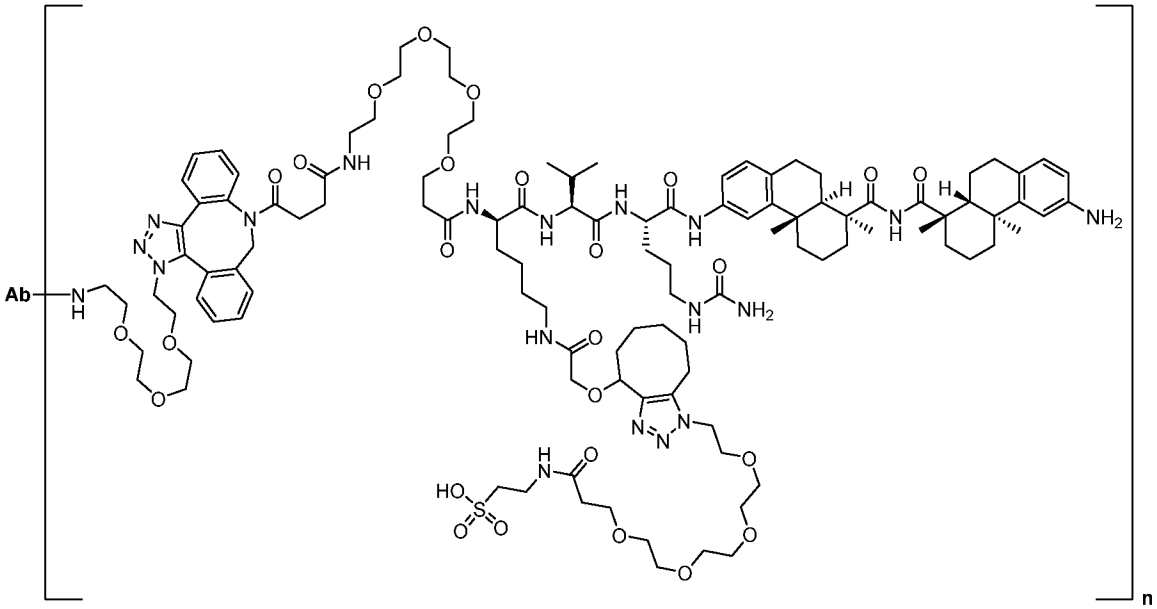

Ab
n

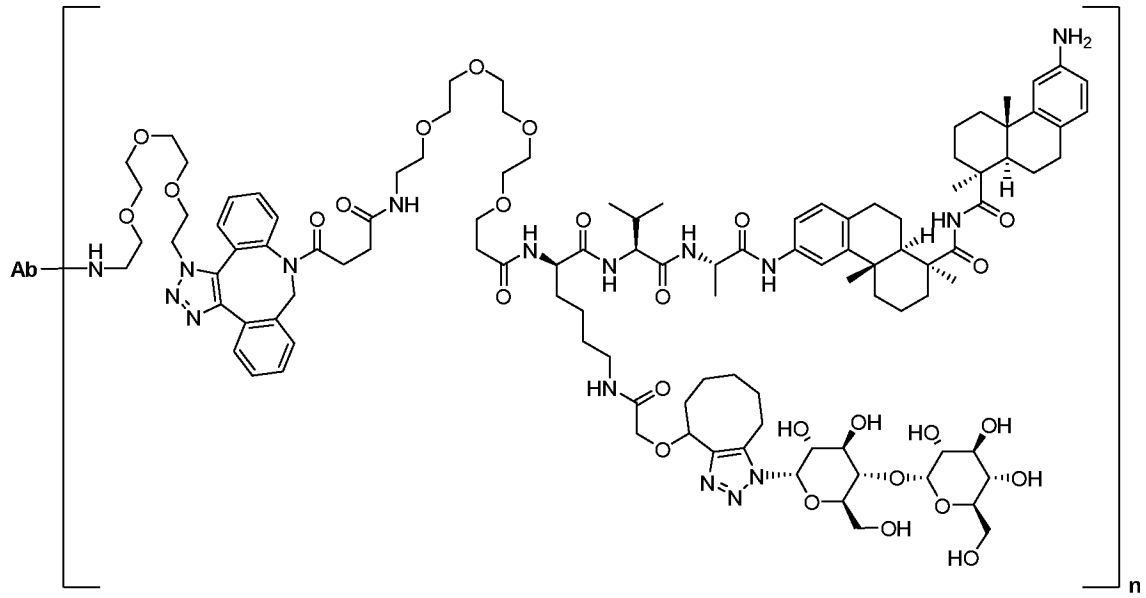

Ab
n

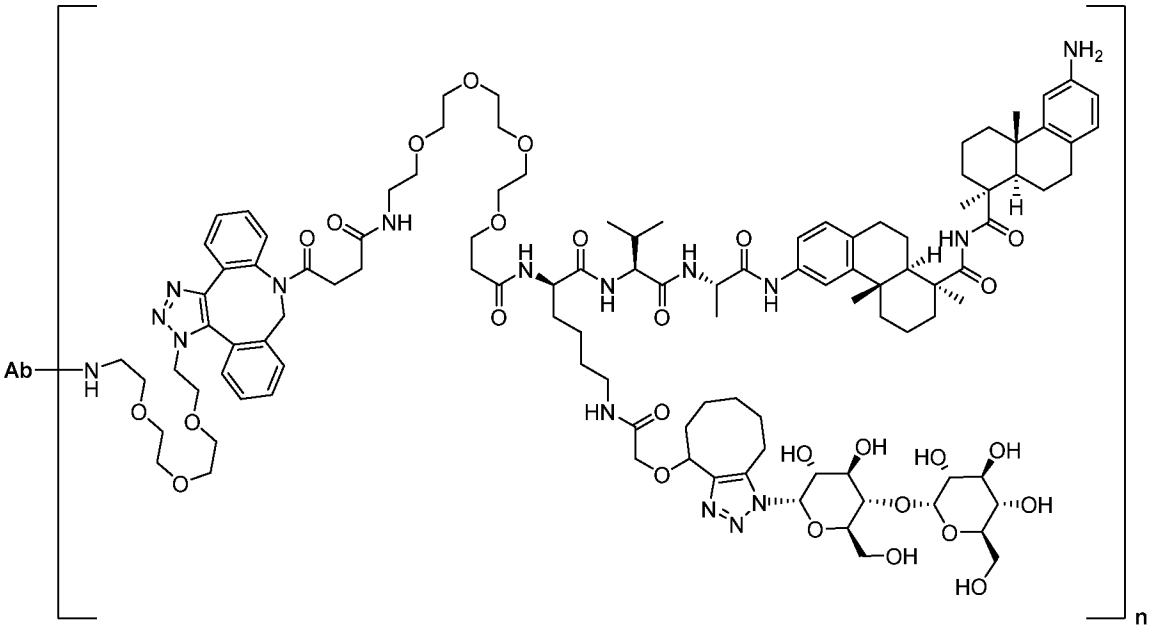


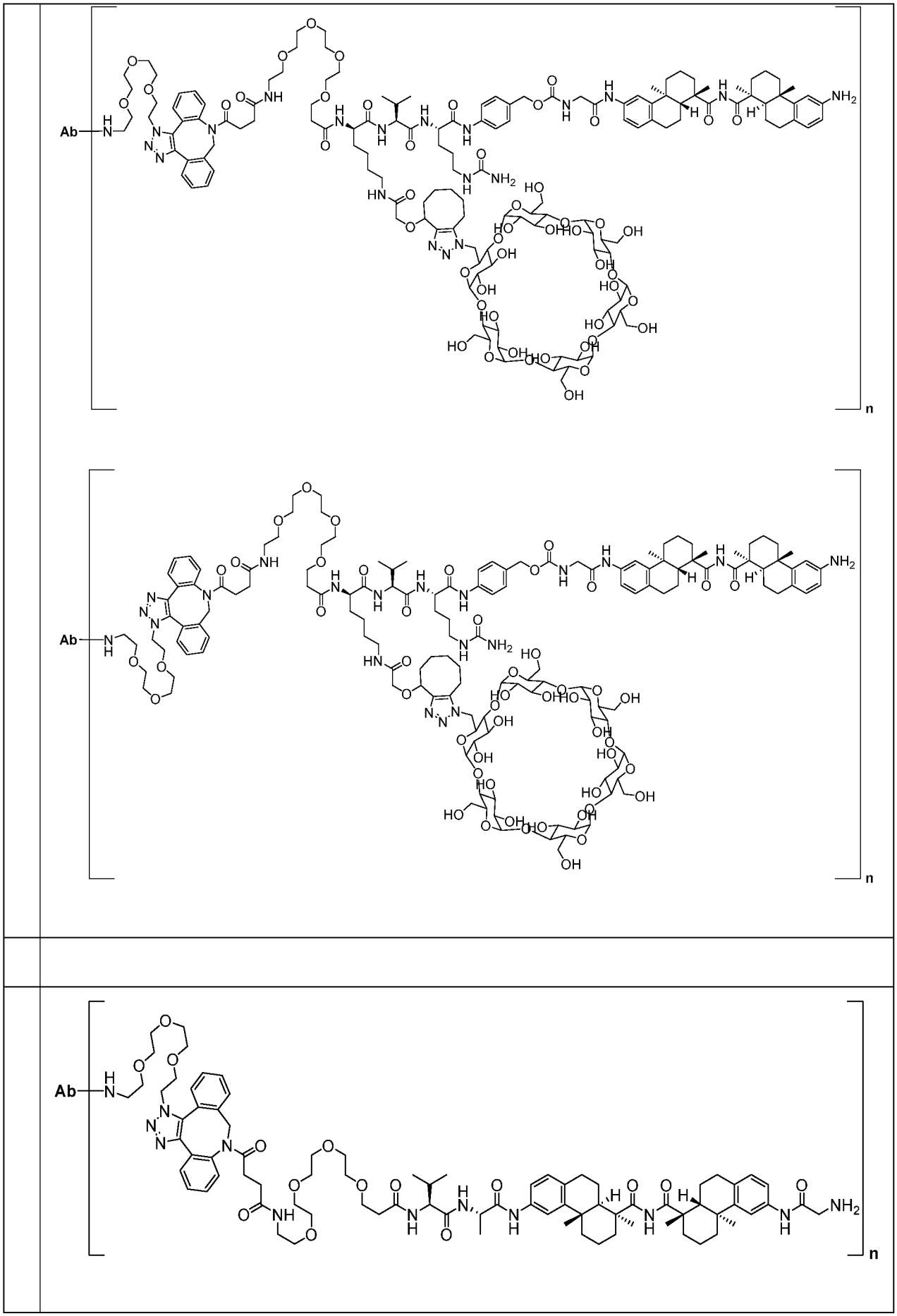


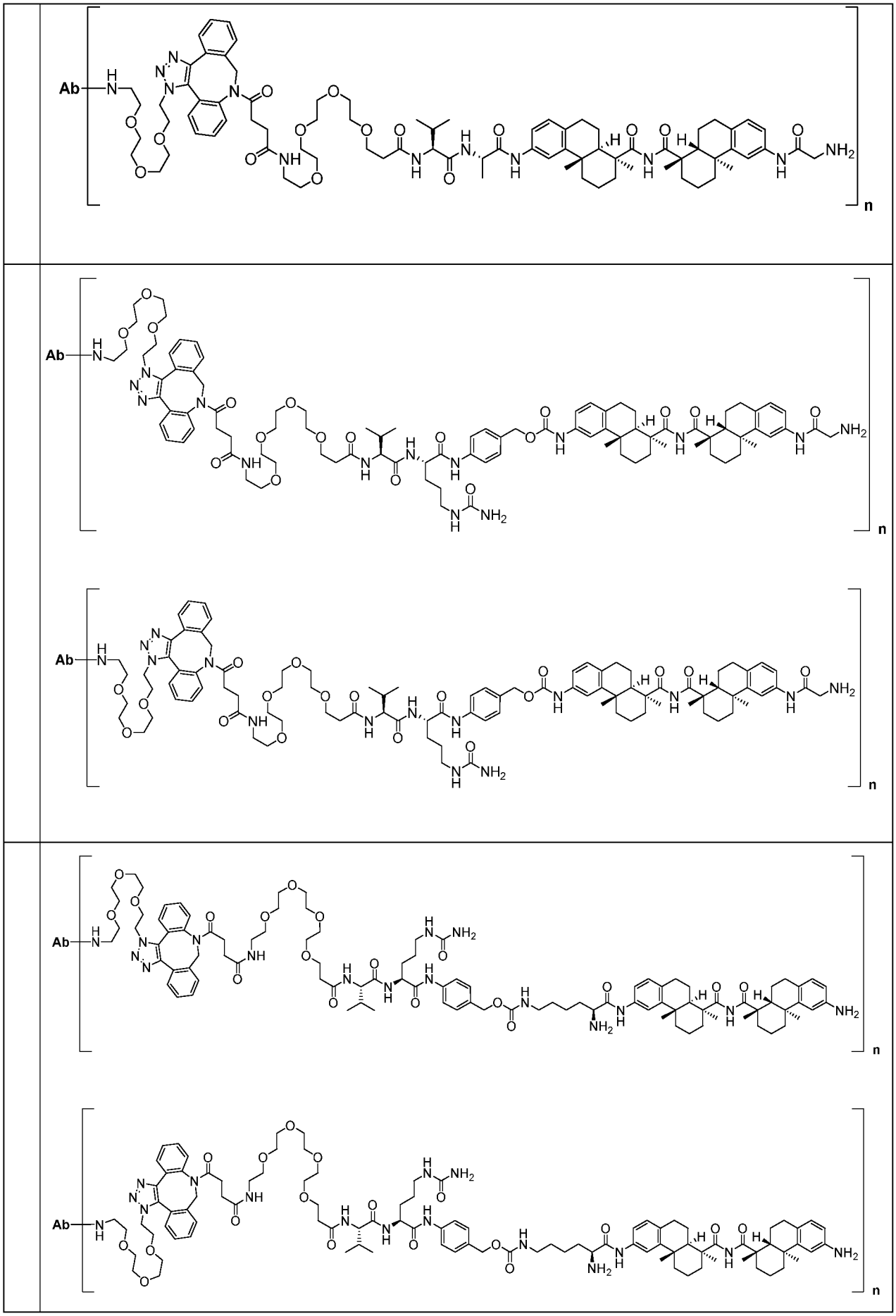


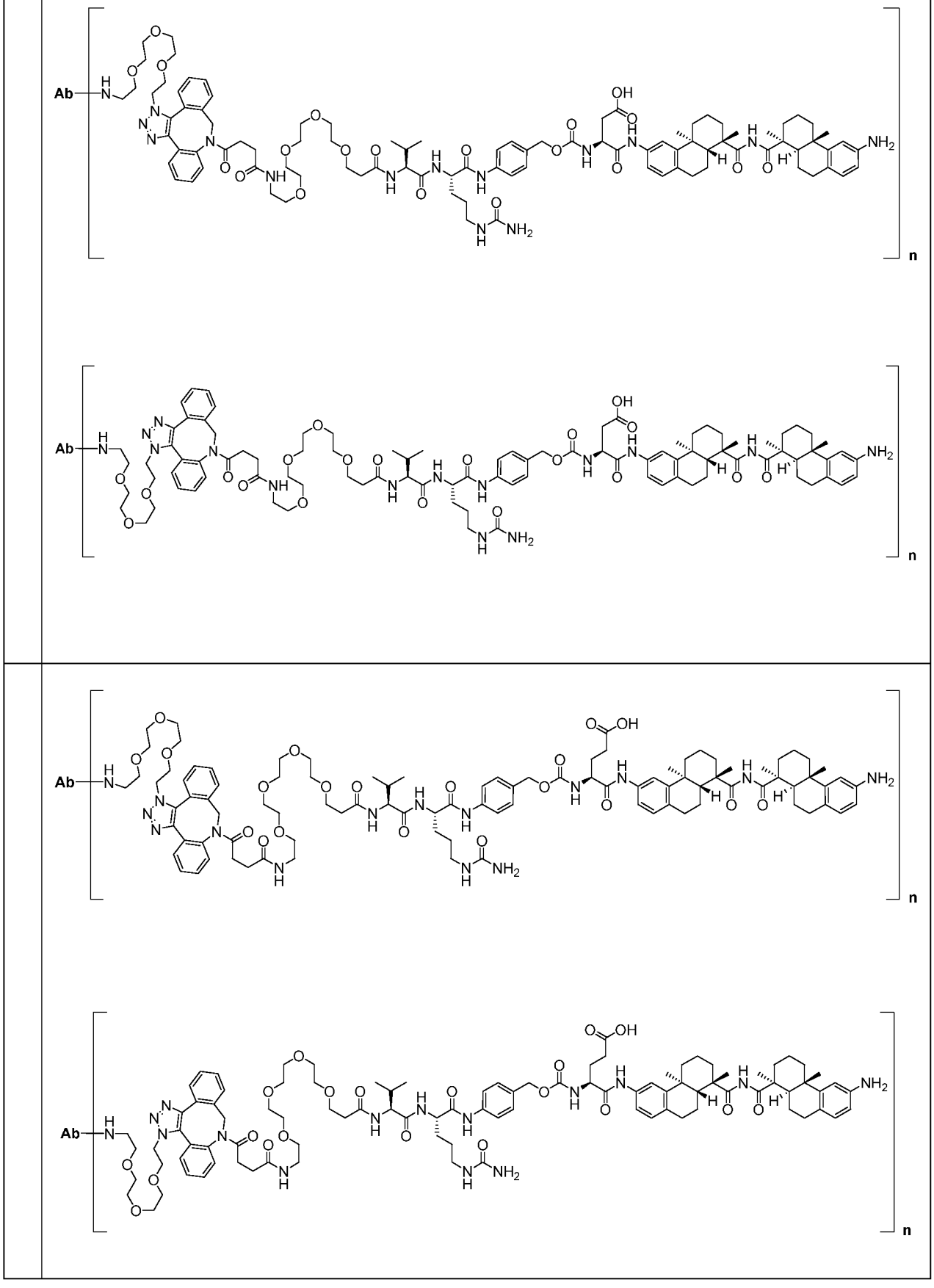


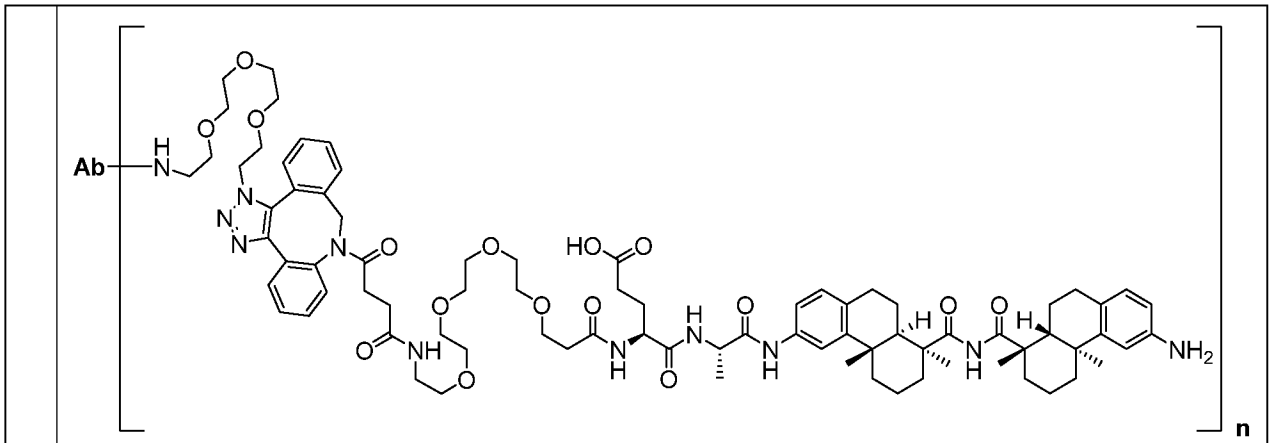


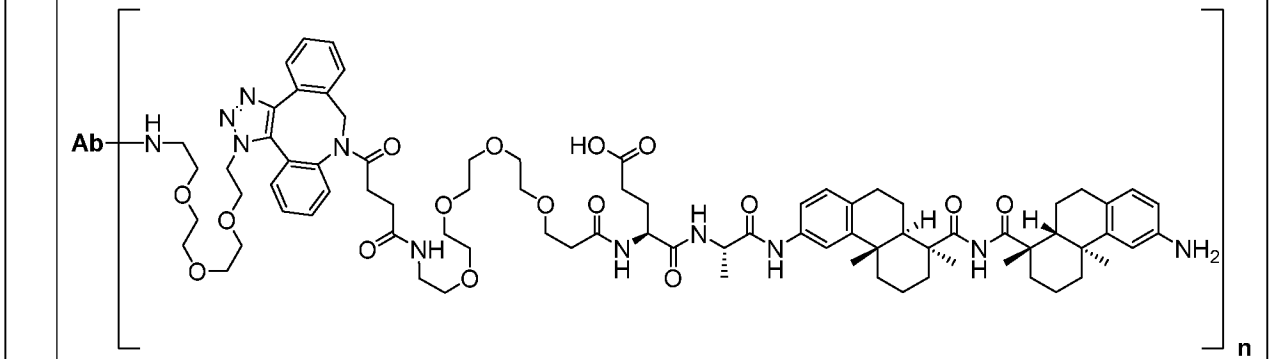


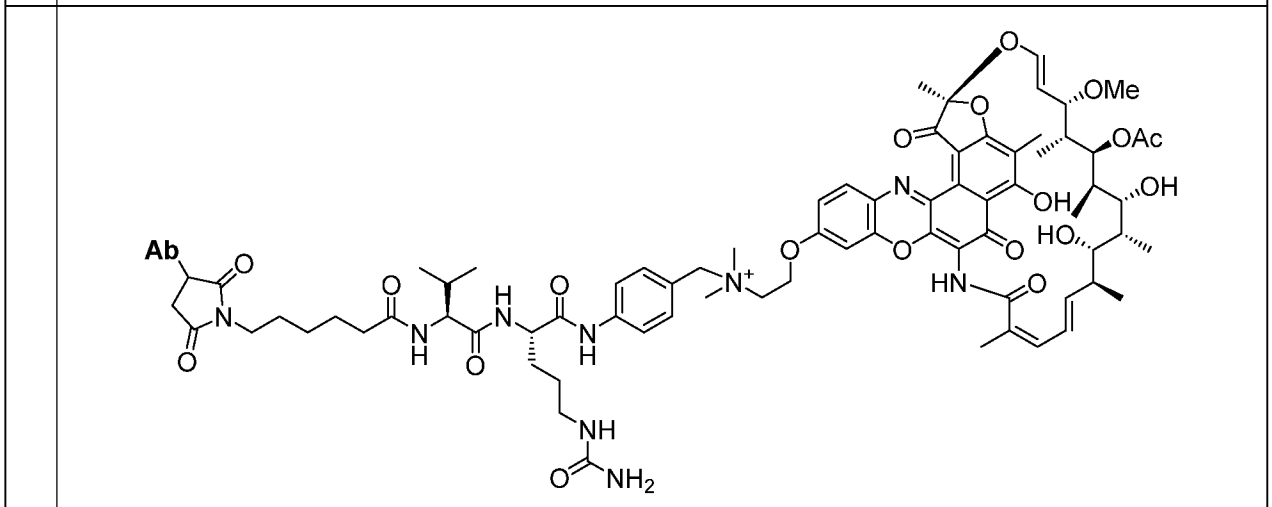


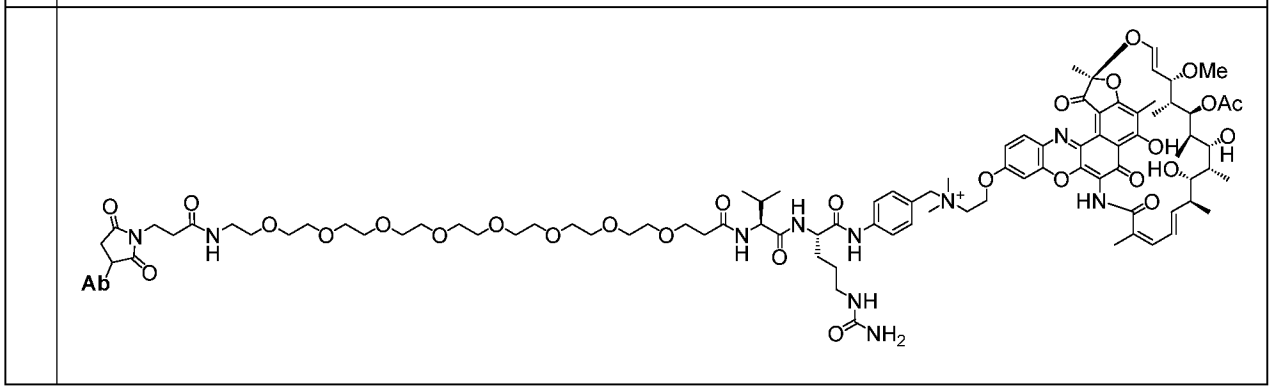




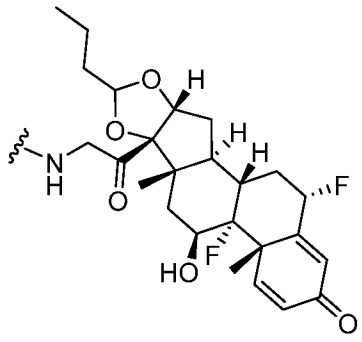

Ab
HO
NH2
n

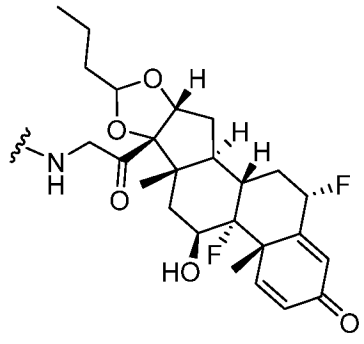

Ab
HO
NH2
n


Ab
OMe
OAc
OH
HO
HN
NH
NH2

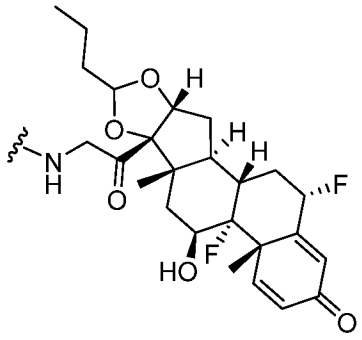

Ab
OMe
OAc
OH
HO
HN
NH
NH2

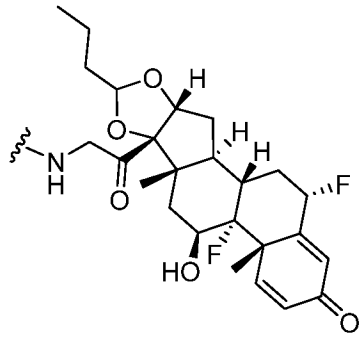
[0310] В конъюгатах антитело-лекарственное средство (ADC) Таблицы 2 Ab представляет собой представленное здесь антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления Ab модифицировано ПЭГ группой на глутаминовой боковой цепи согласно приведенному здесь описанию. В конъюгатах антитело-лекарственное средство n представляет собой целое число от 1 до 10, например, 1, 2, 3 или 4.

[0311] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат мутацию N297Q.

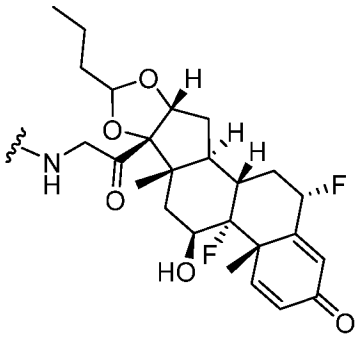
[0312] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0313] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ

ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и мутацию N297Q.

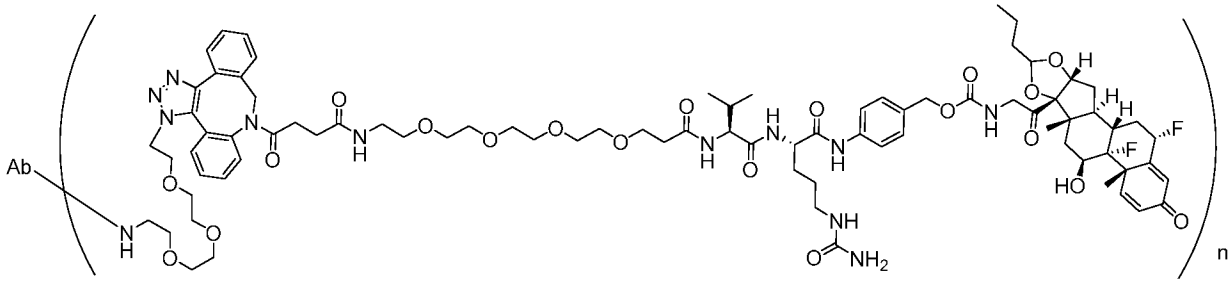
[0314] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0315] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58, и конъюгированные с

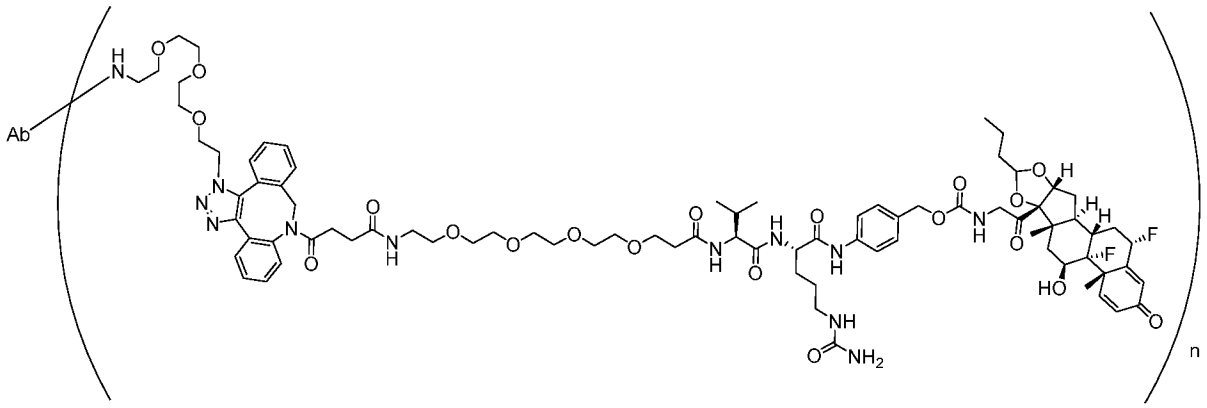


нагрузкой или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58 и мутацию N297Q.

[0316] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

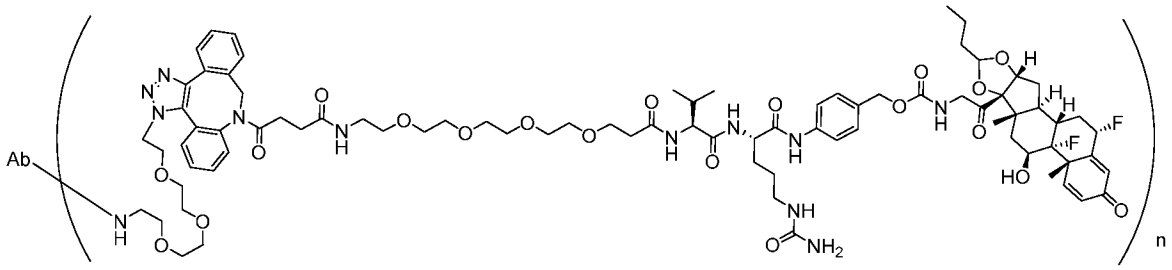


и/или

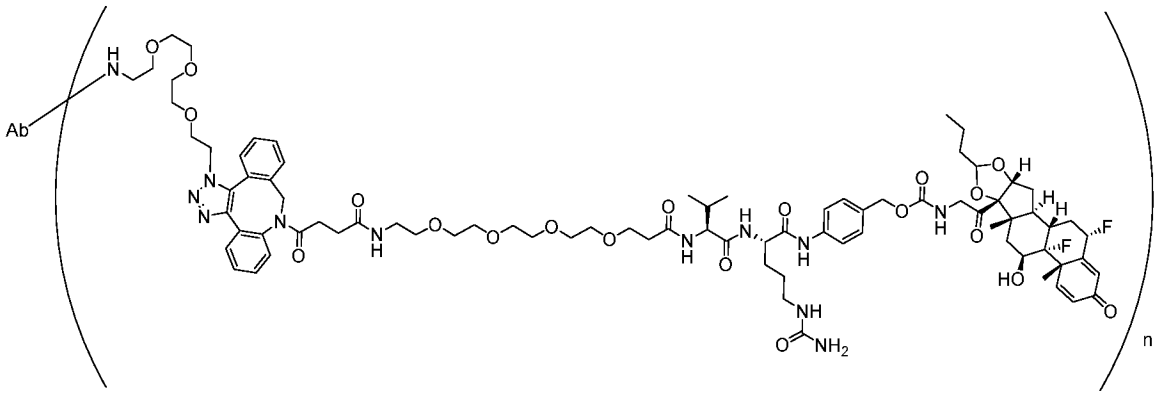


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат мутацию N297Q.

[0317] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

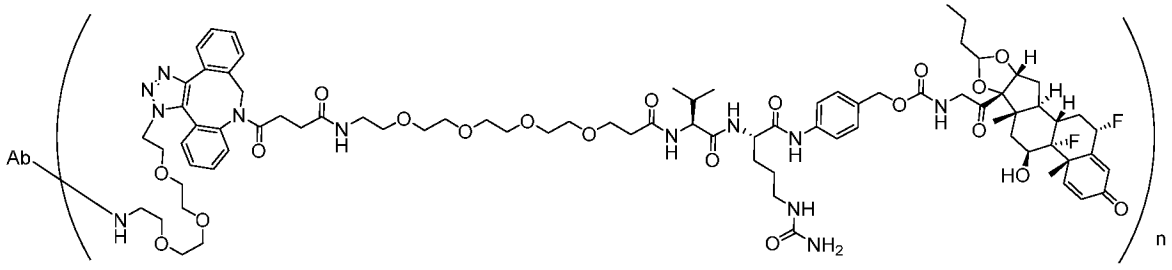


и/или

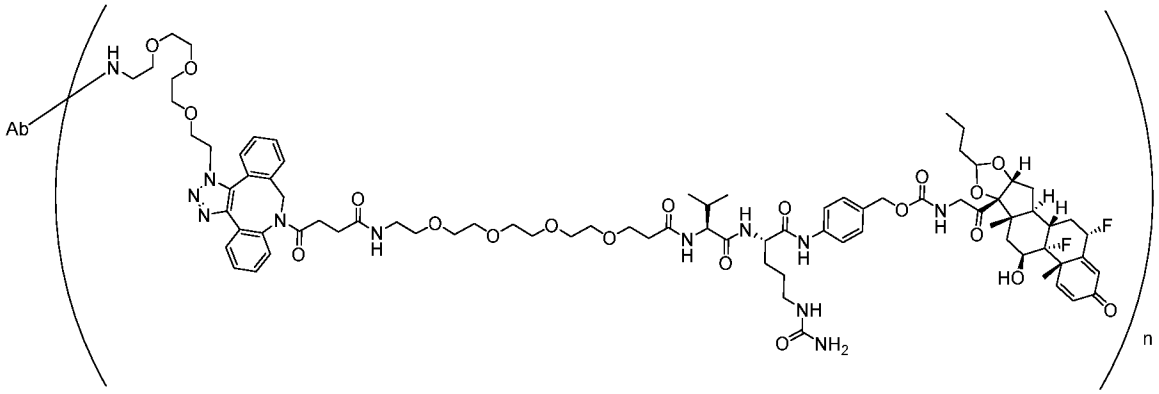


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0318] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

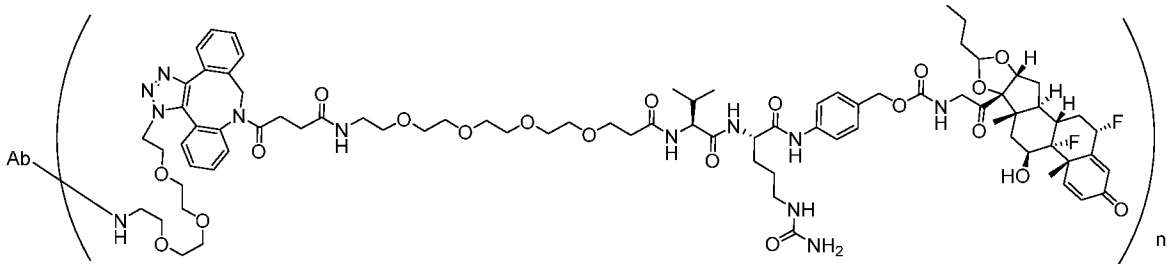


и/или

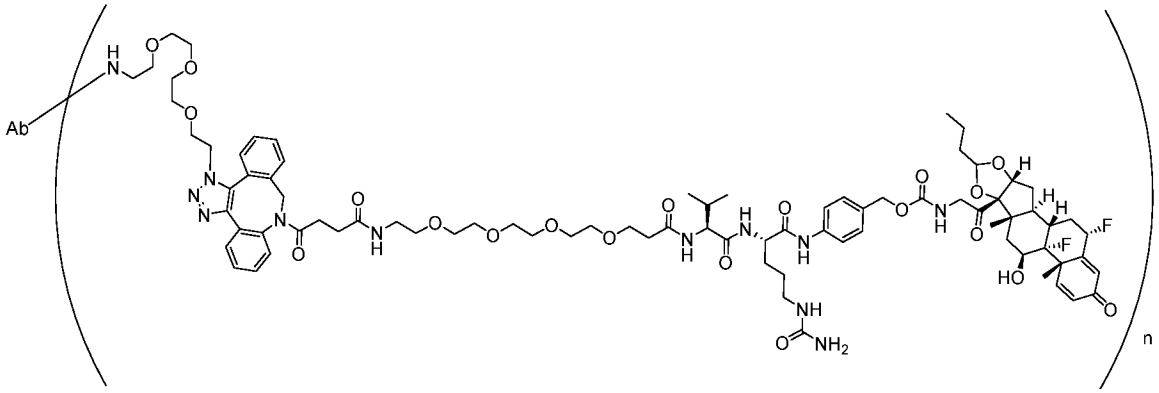


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и мутацию N297Q.

[0319] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

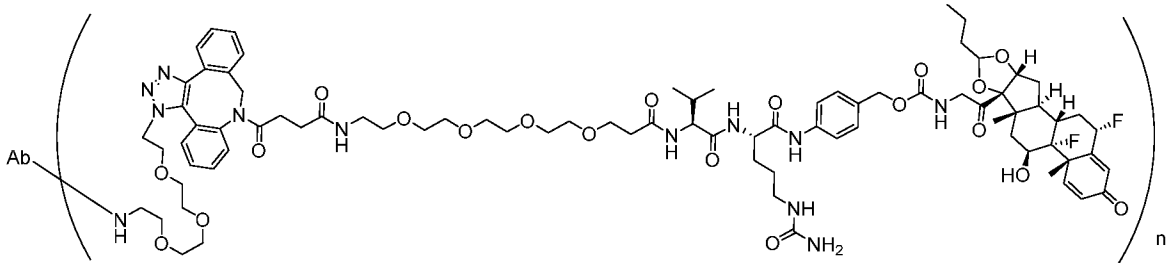


и/или

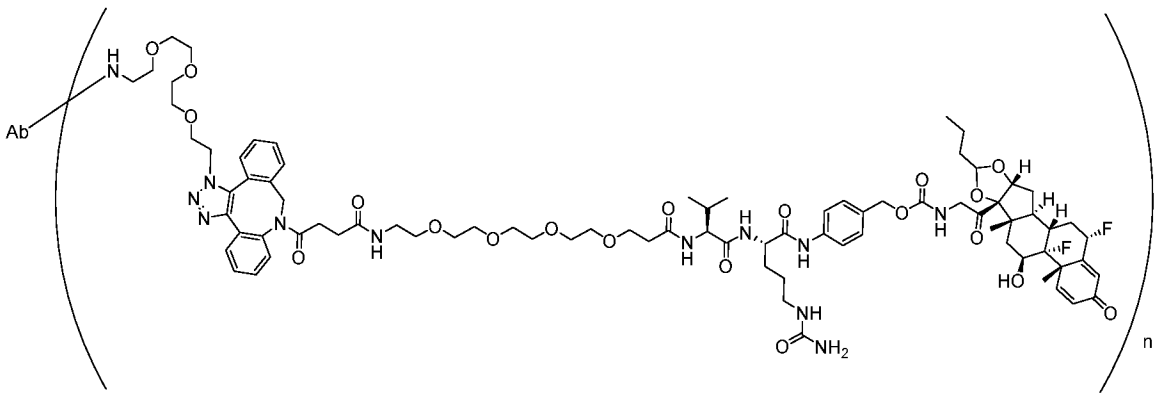


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

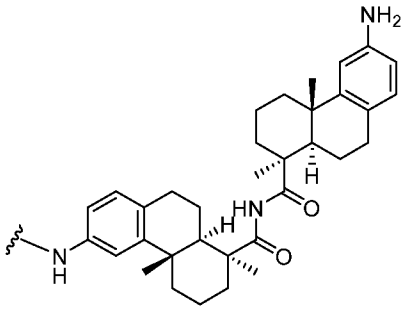
[0320] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

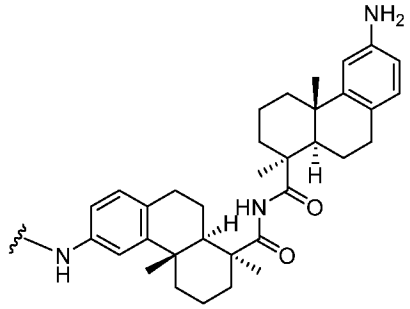


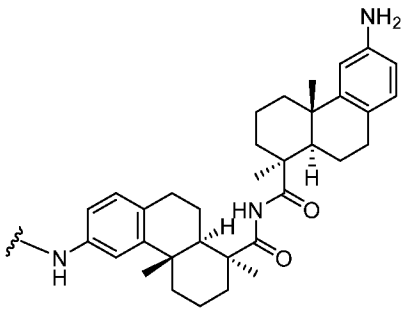
и/или

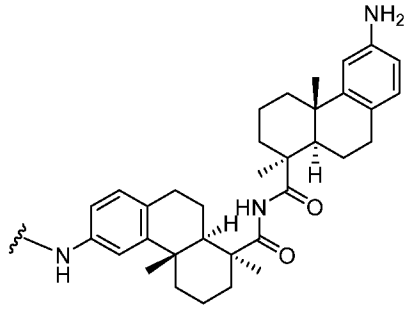


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58 и мутацию N297Q.

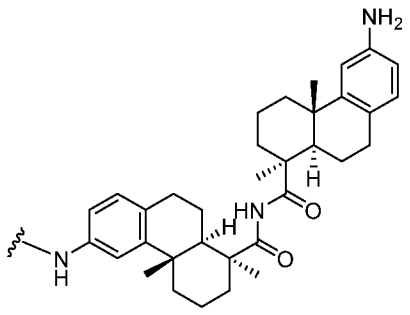
[0321] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат мутацию N297Q.

[0322] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0323] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и мутацию N297Q.

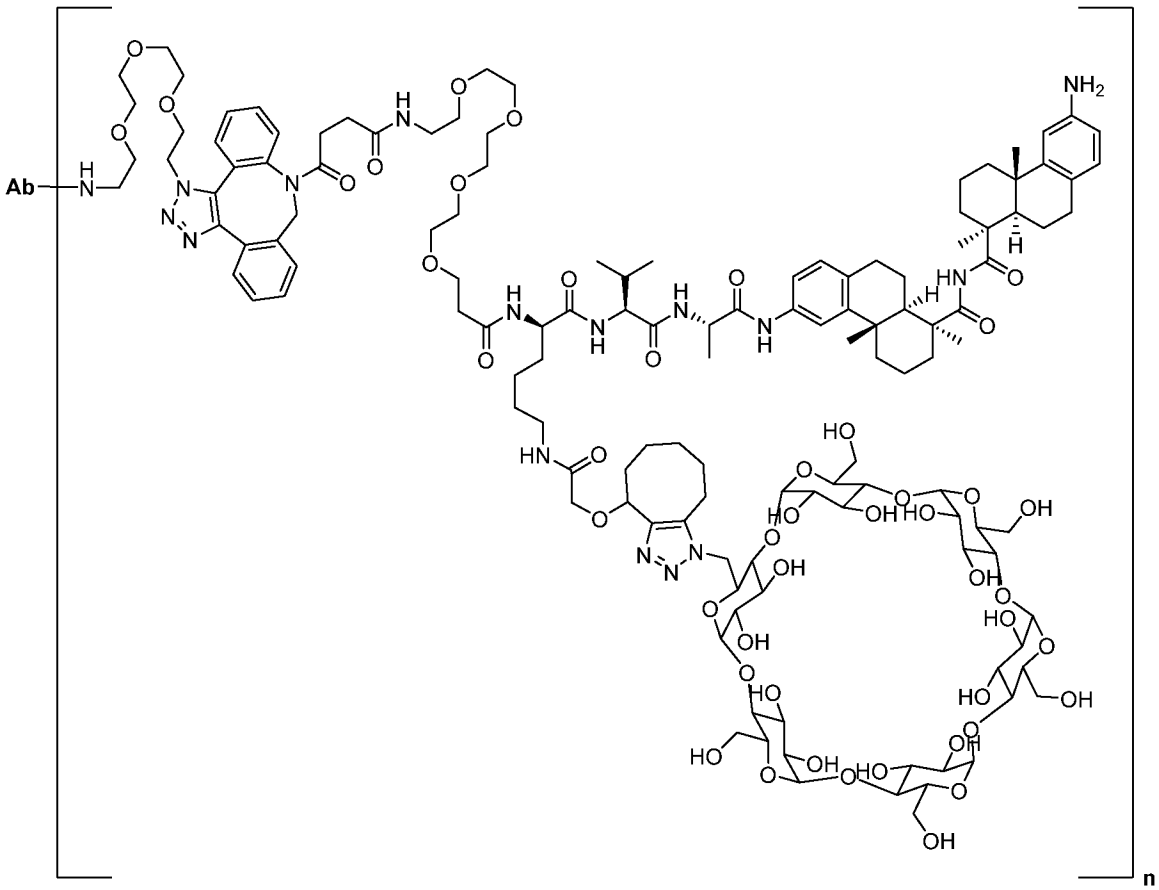
[0324] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0325] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58, и конъюгированные с

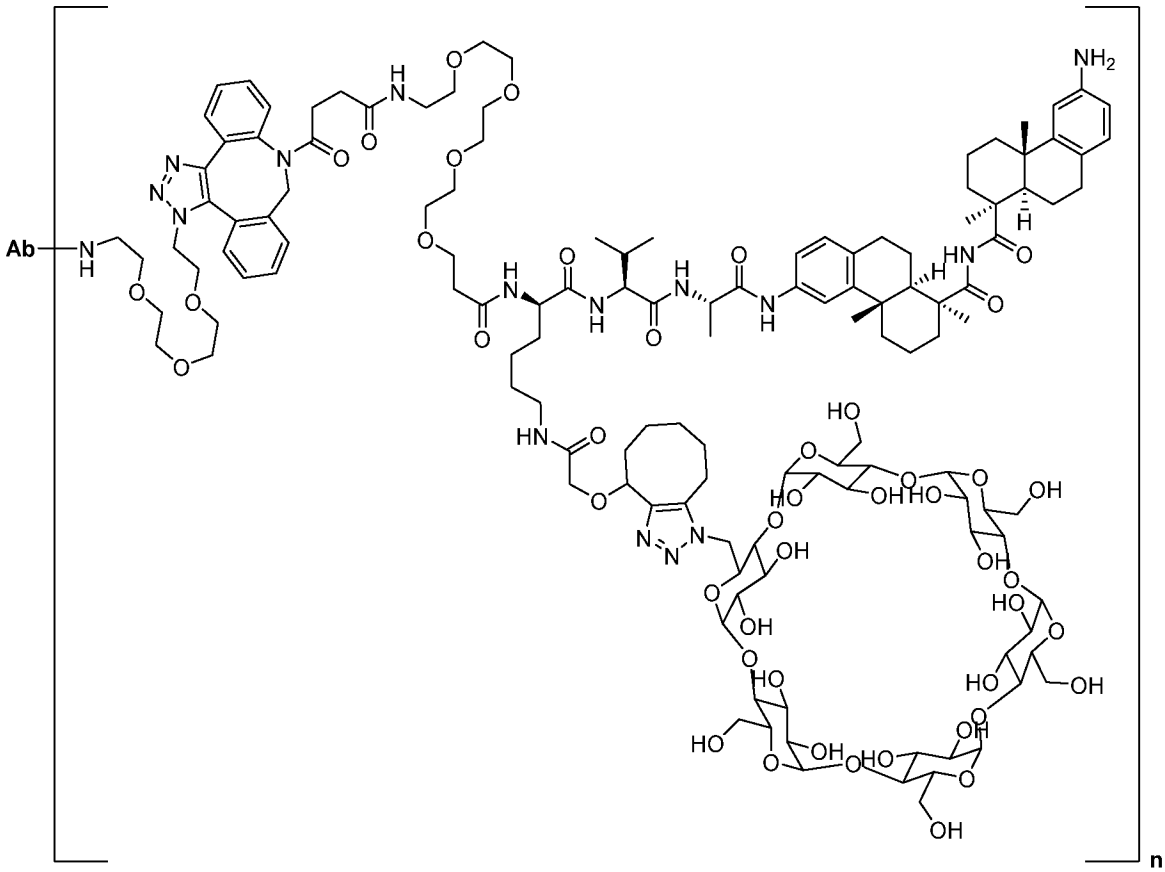


нагрузкой или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58 и мутацию N297Q.

[0326] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

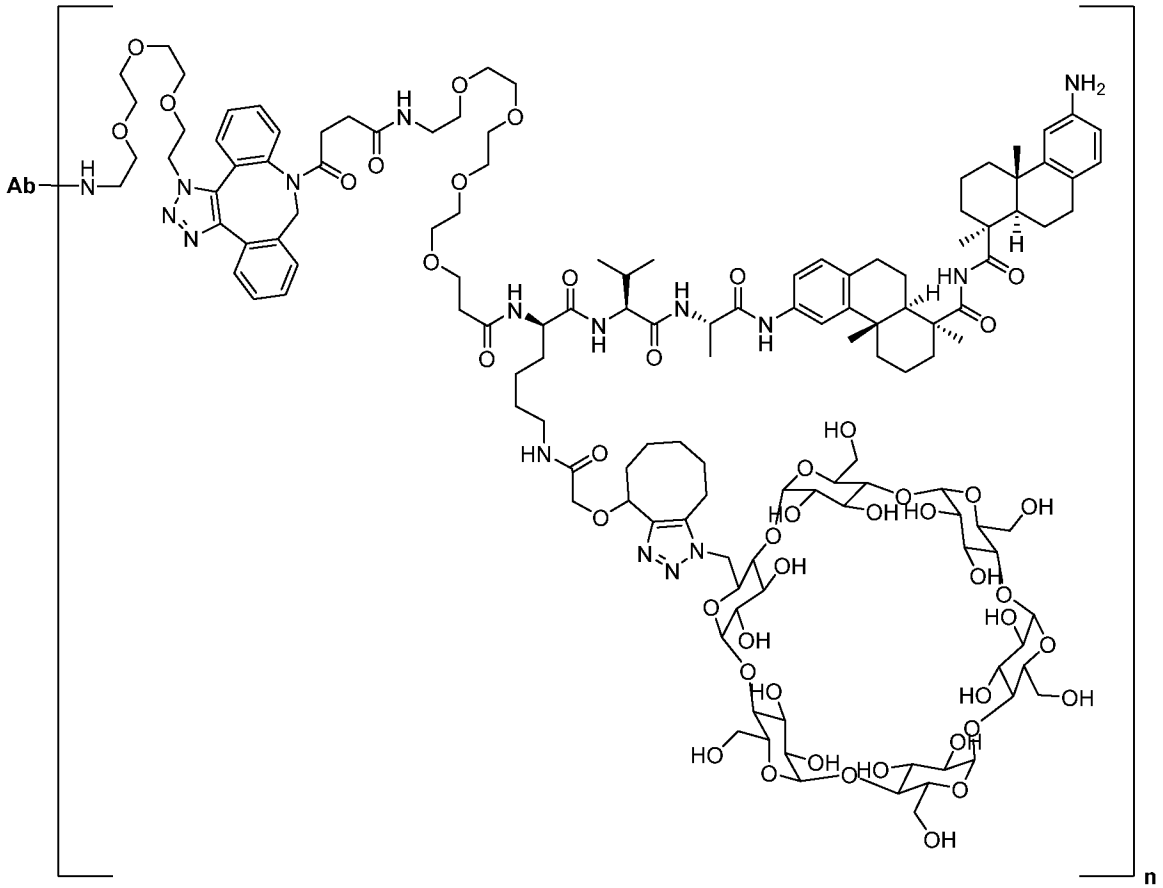


и/или

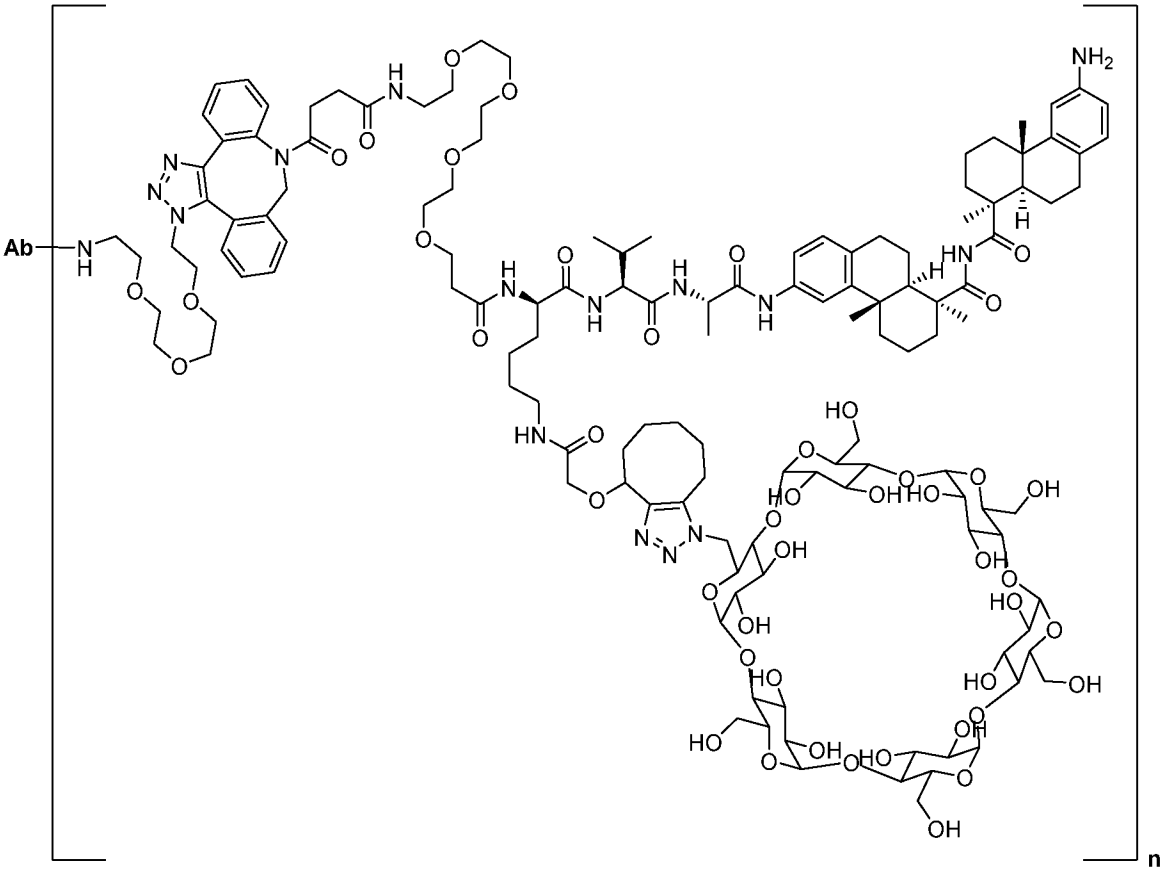


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат мутацию N297Q.

[0327] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

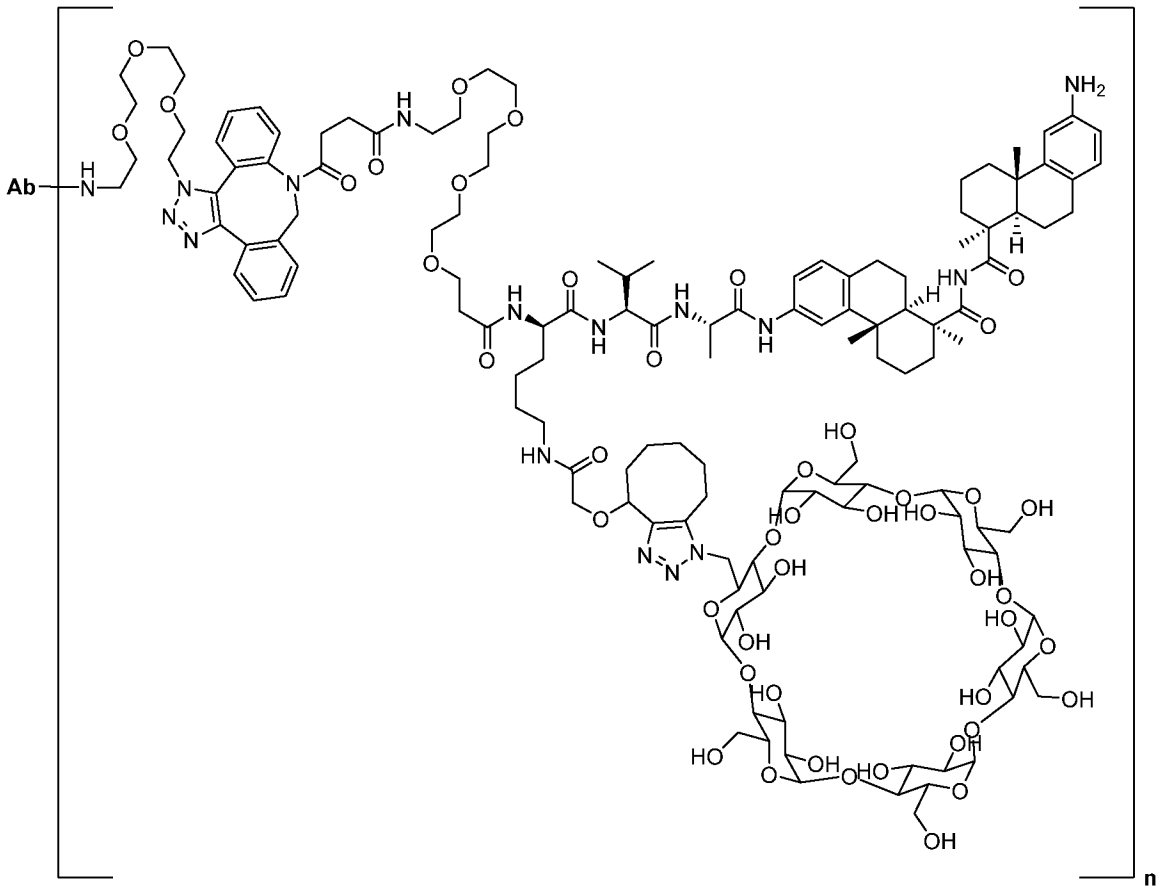


и/или

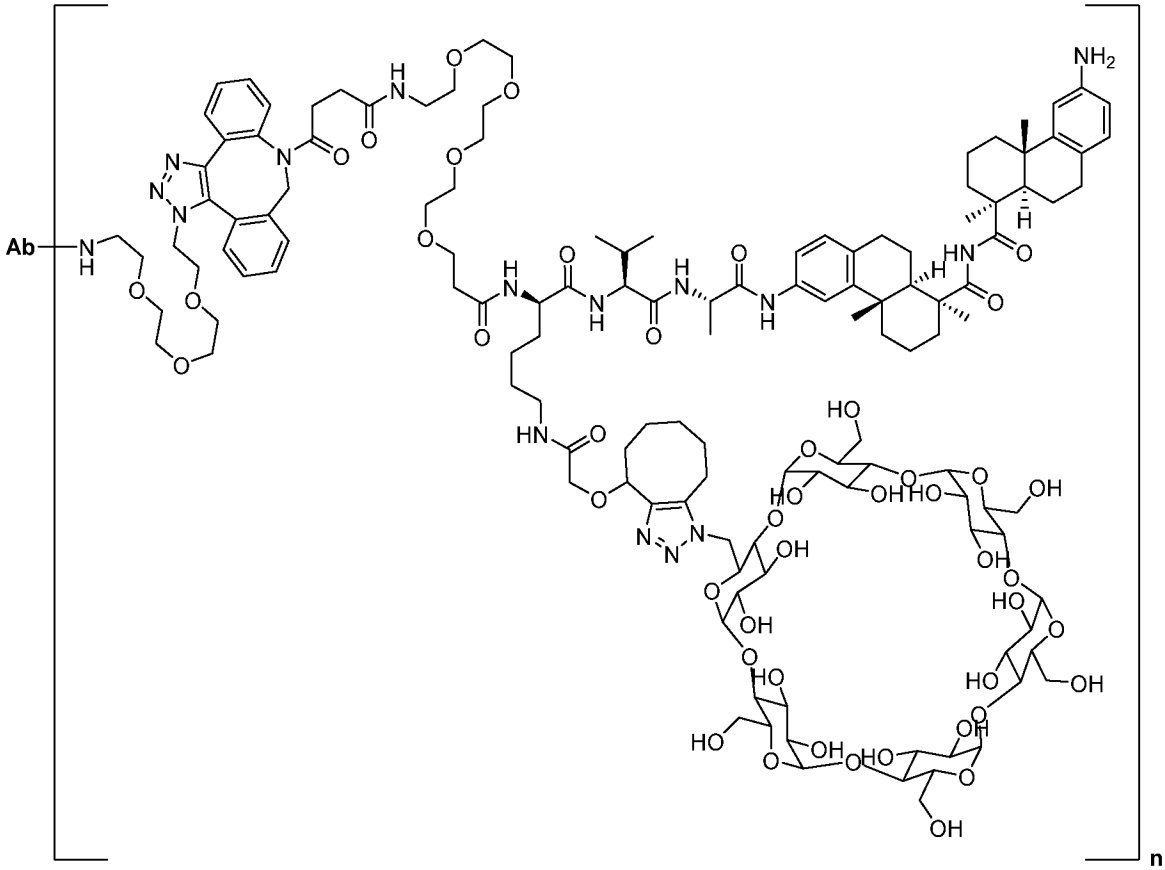


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0328] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

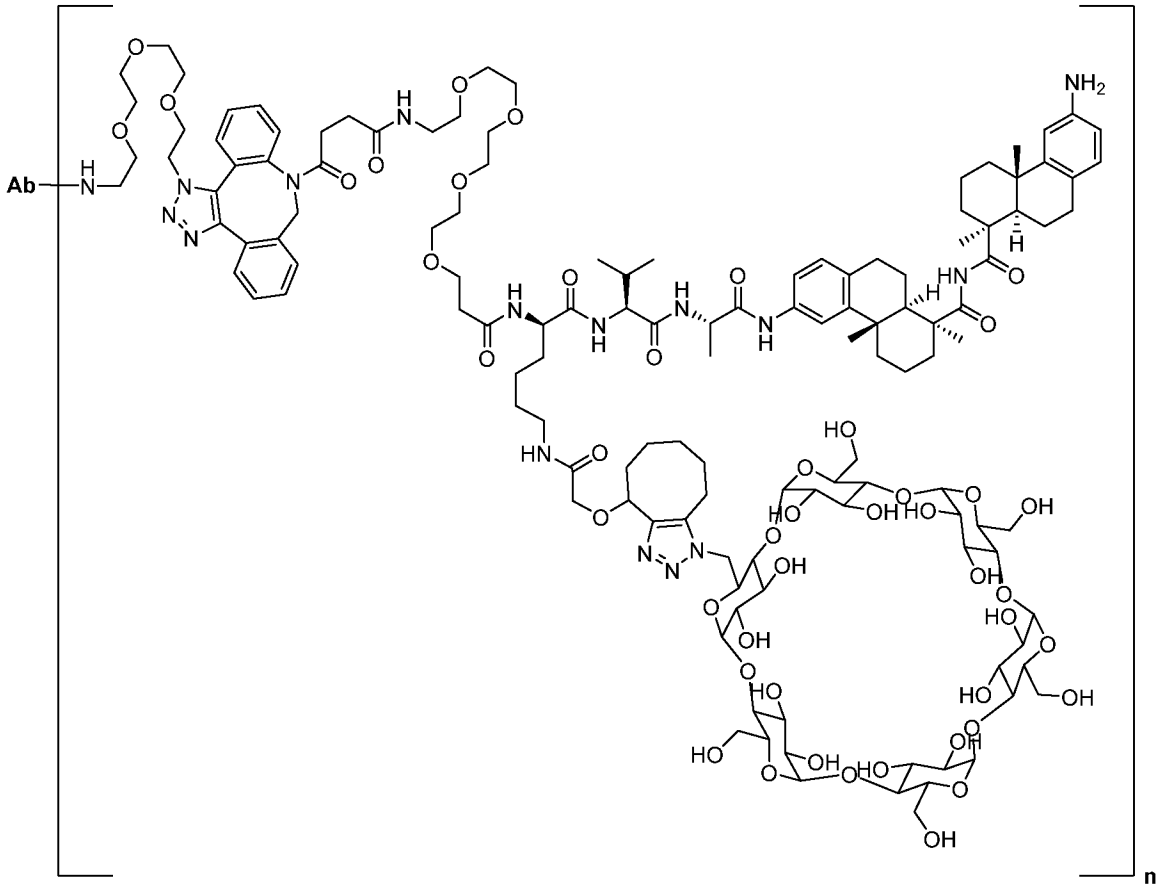


и/или

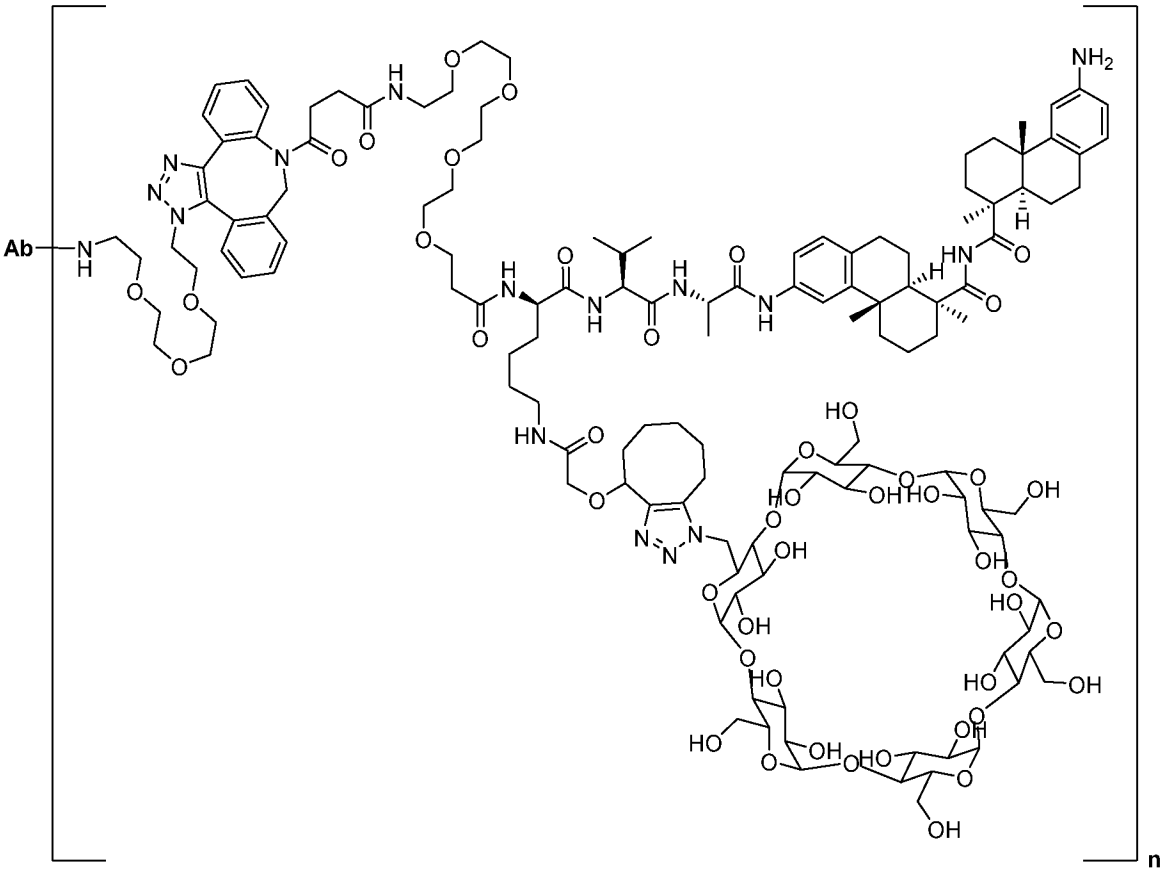


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и мутацию N297Q.

[0329] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

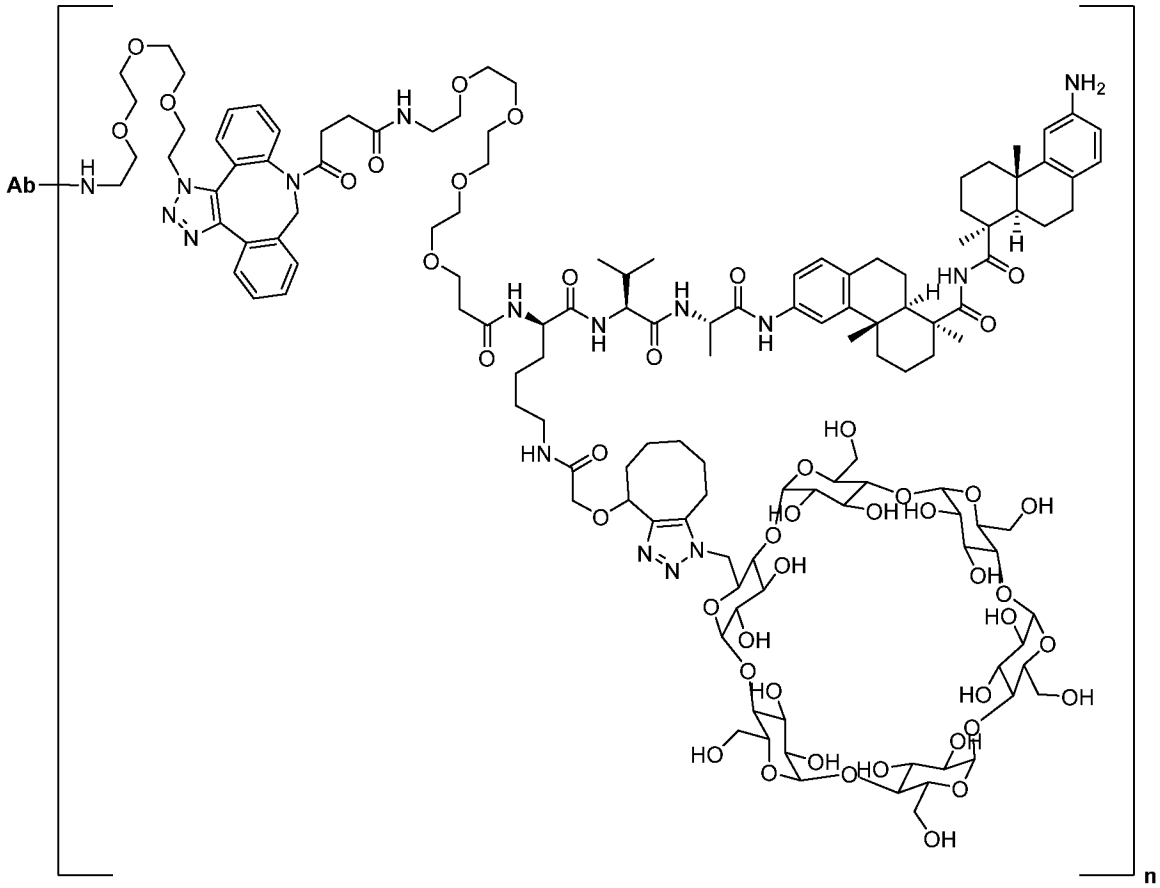


и/или

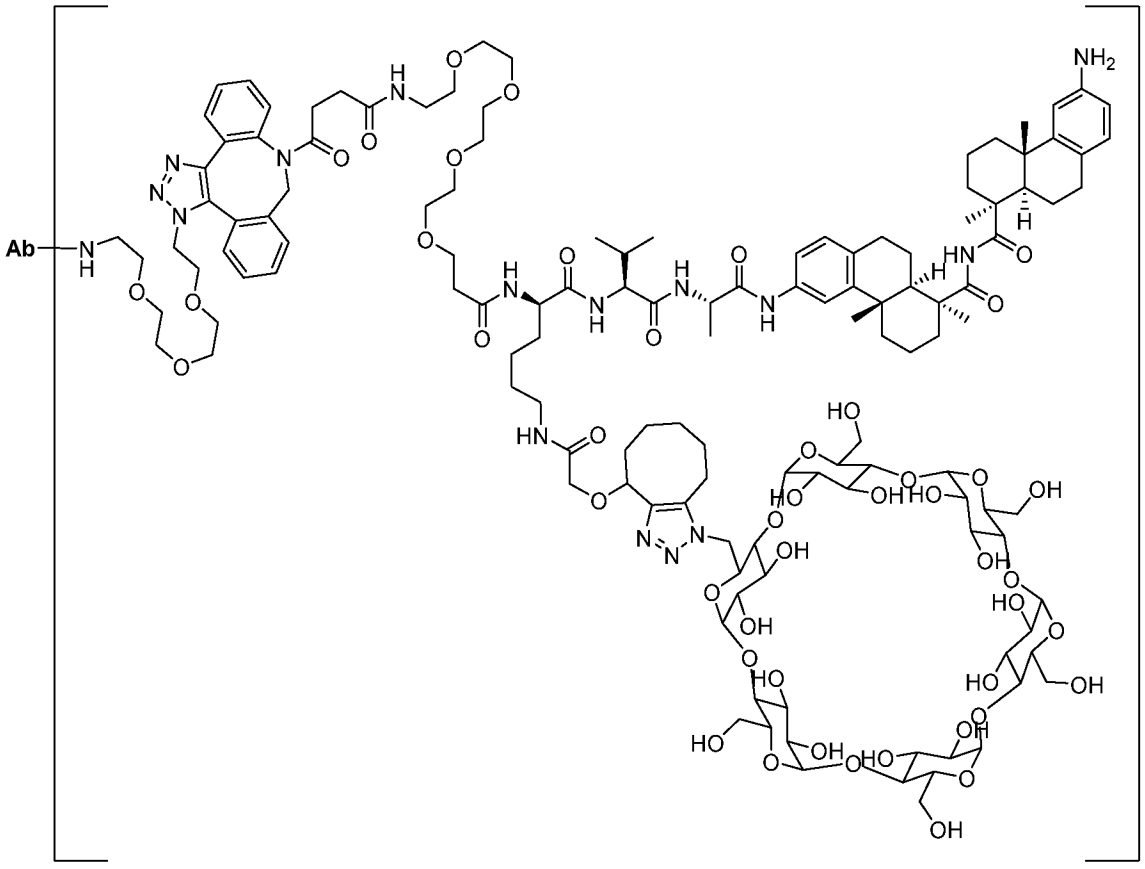


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0330] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

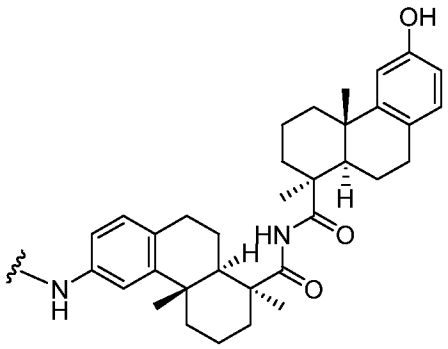


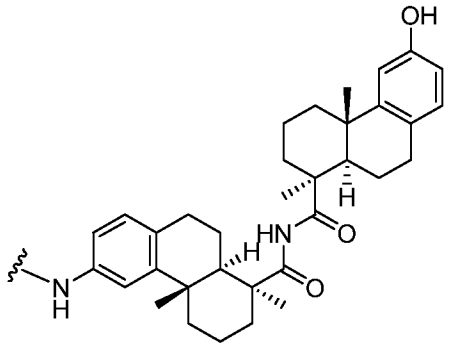
и/или



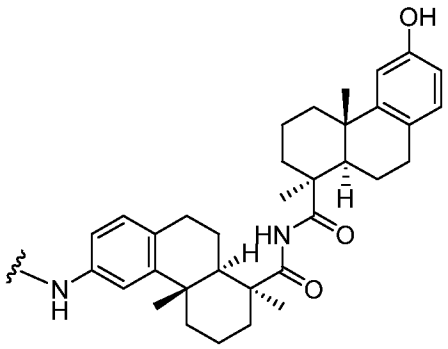
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58 и мутацию N297Q.

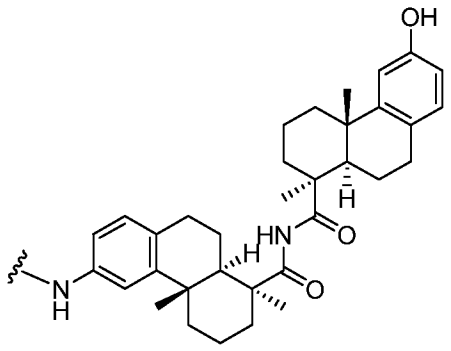
[0331] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент,

конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат мутацию N297Q.

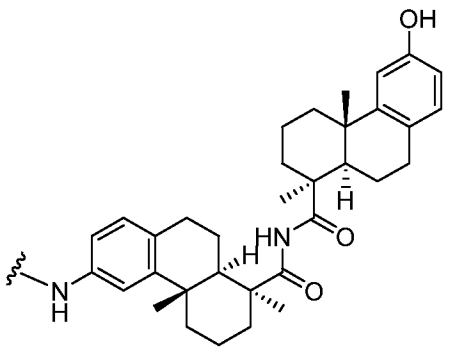
[0332] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0333] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и

конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и мутацию N297Q.

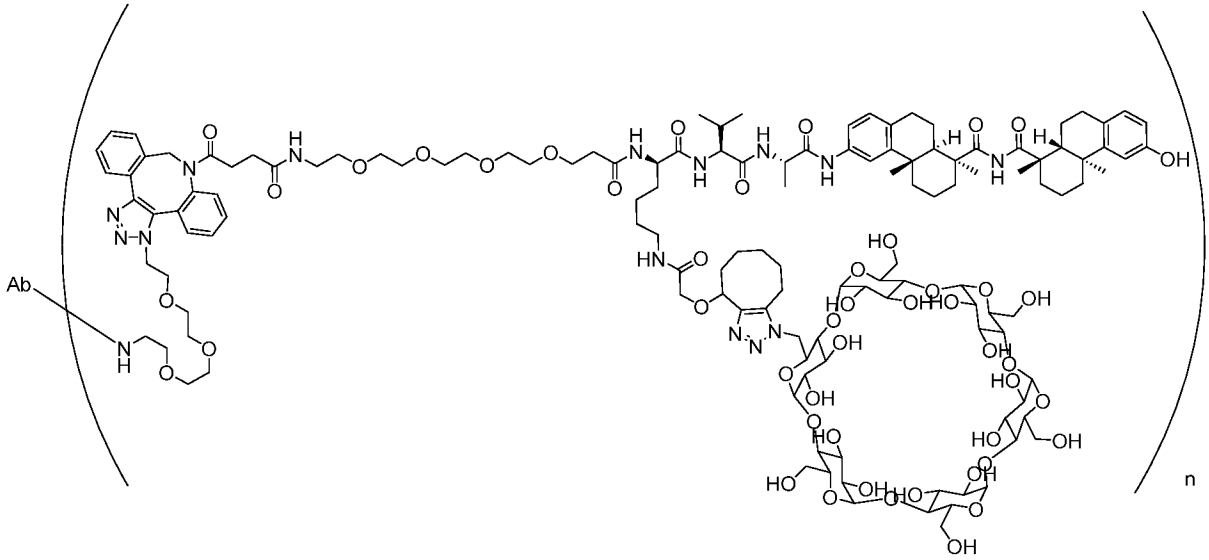
[0334] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0335] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58, и конъюгированные с

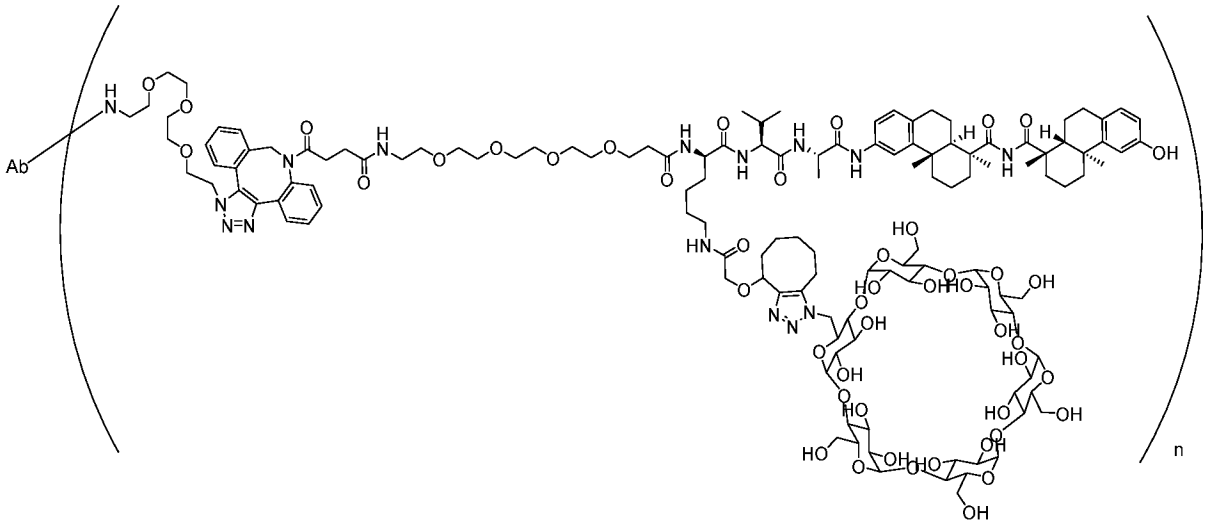


нагрузкой или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58 и мутацию N297Q.

[0336] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

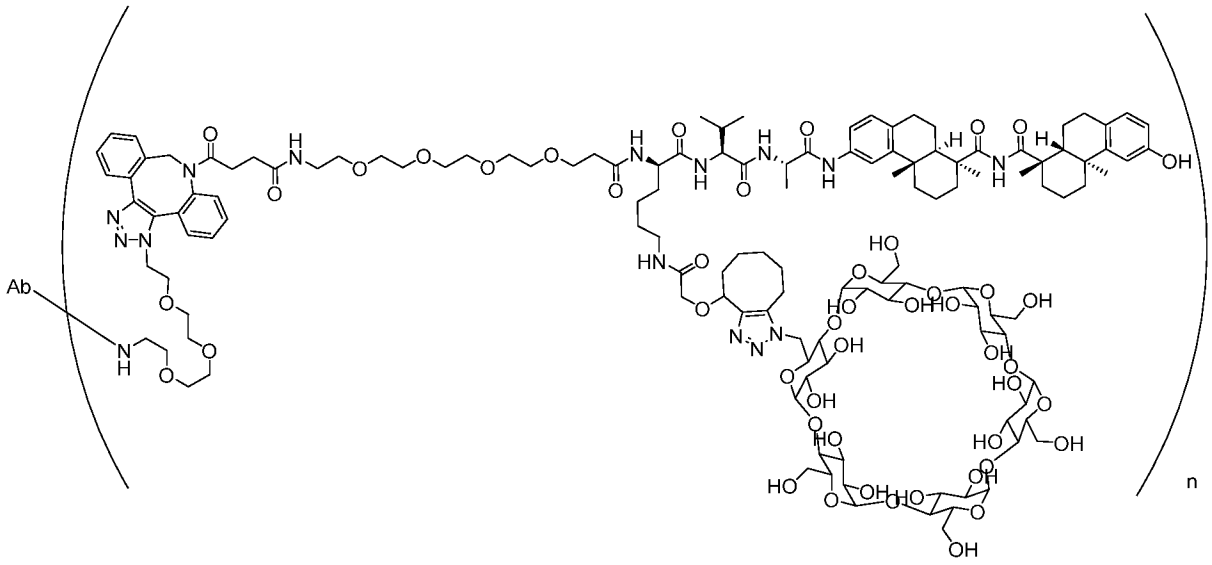


и/или

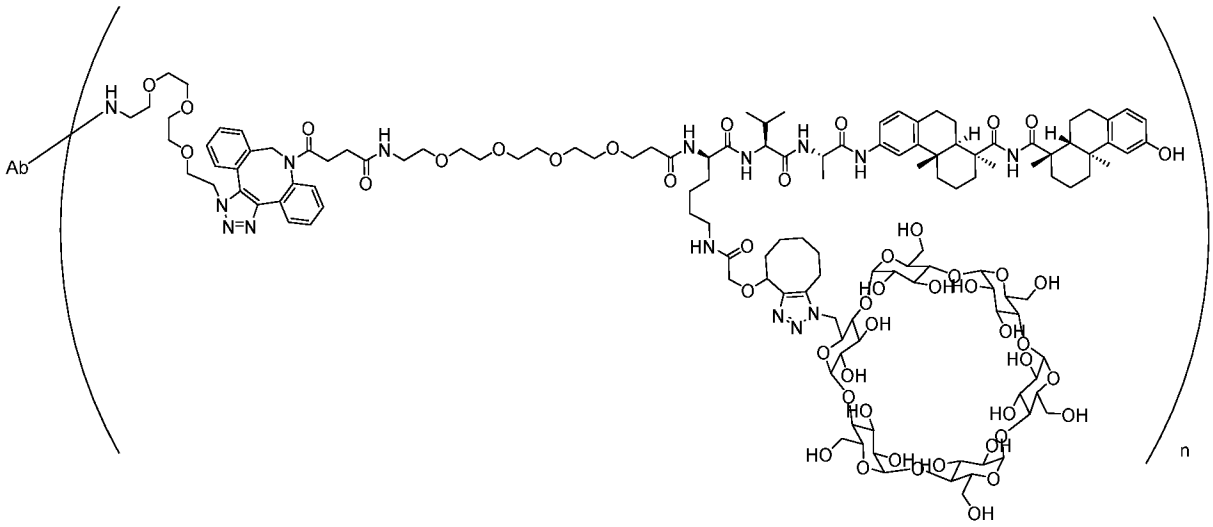


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат мутацию N297Q.

[0337] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:



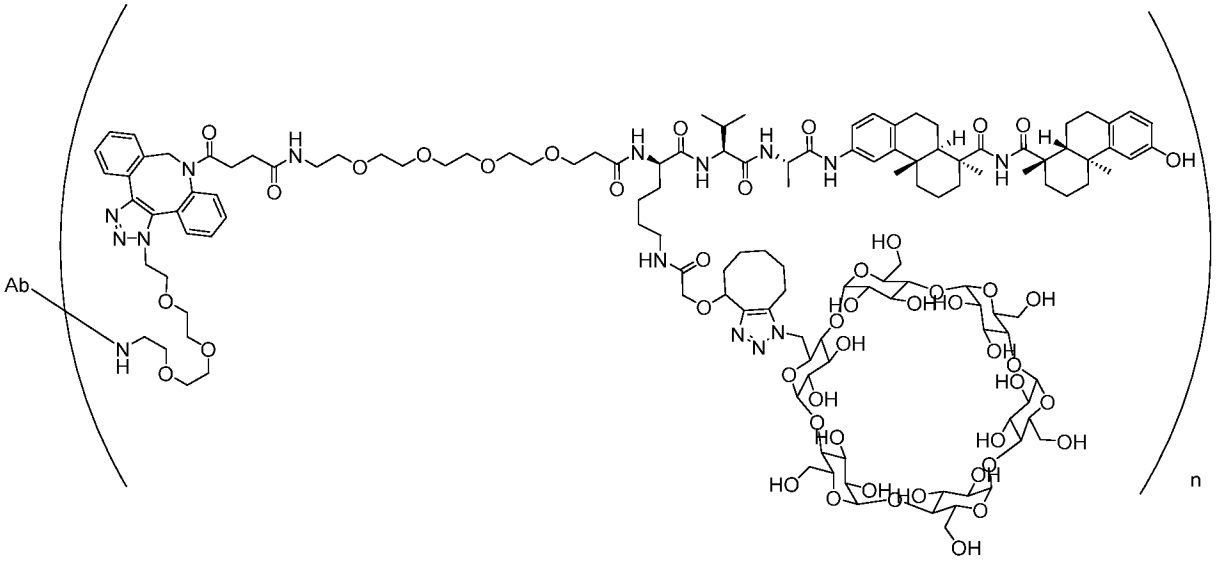
и/или



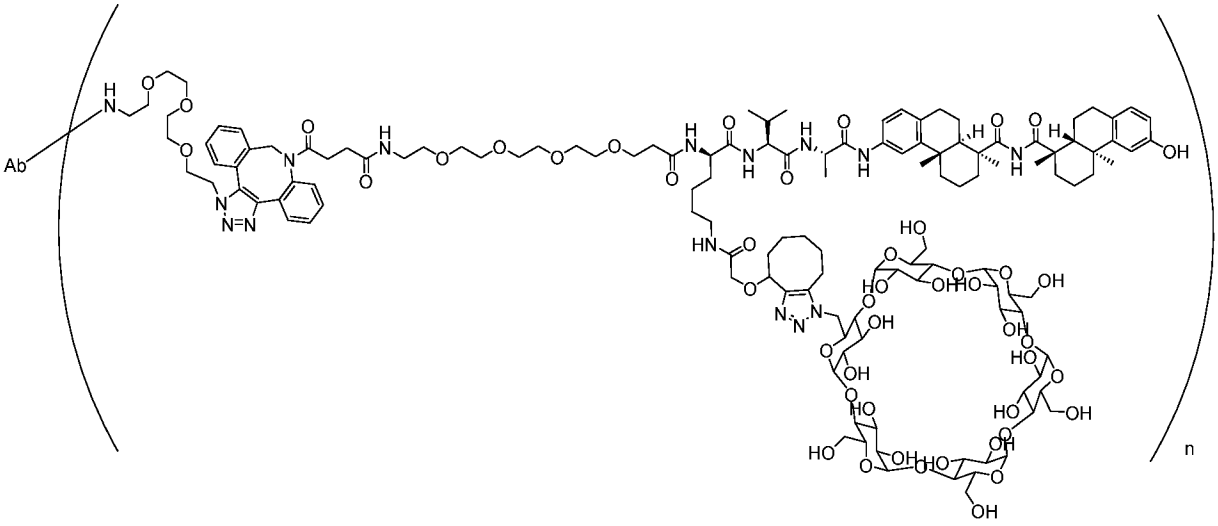
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смеси; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4. В

некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0338] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:



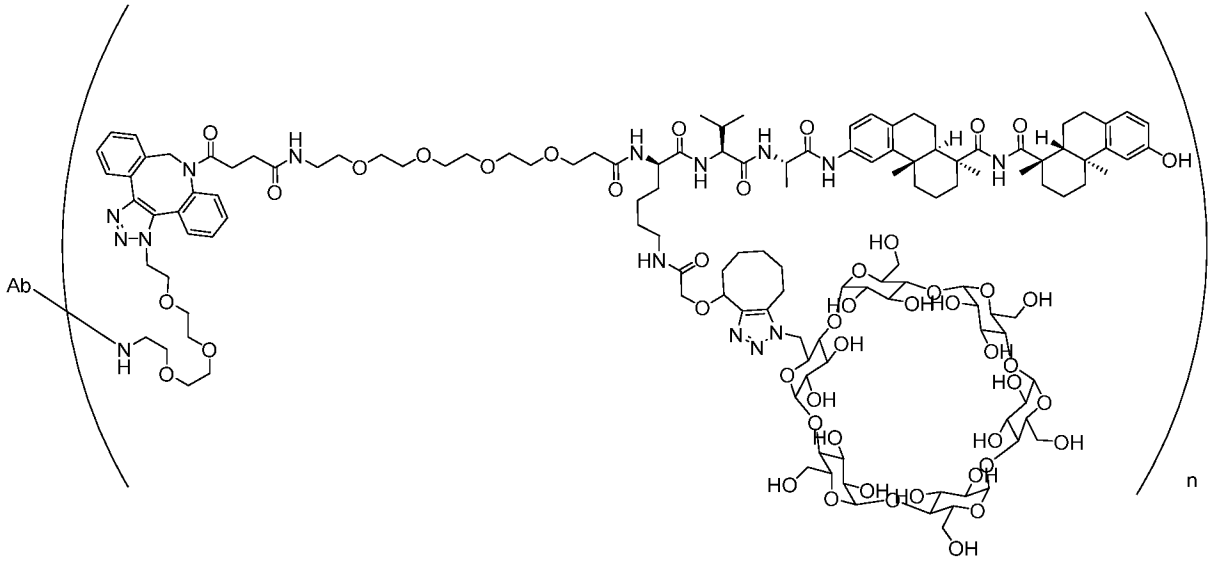
и/или



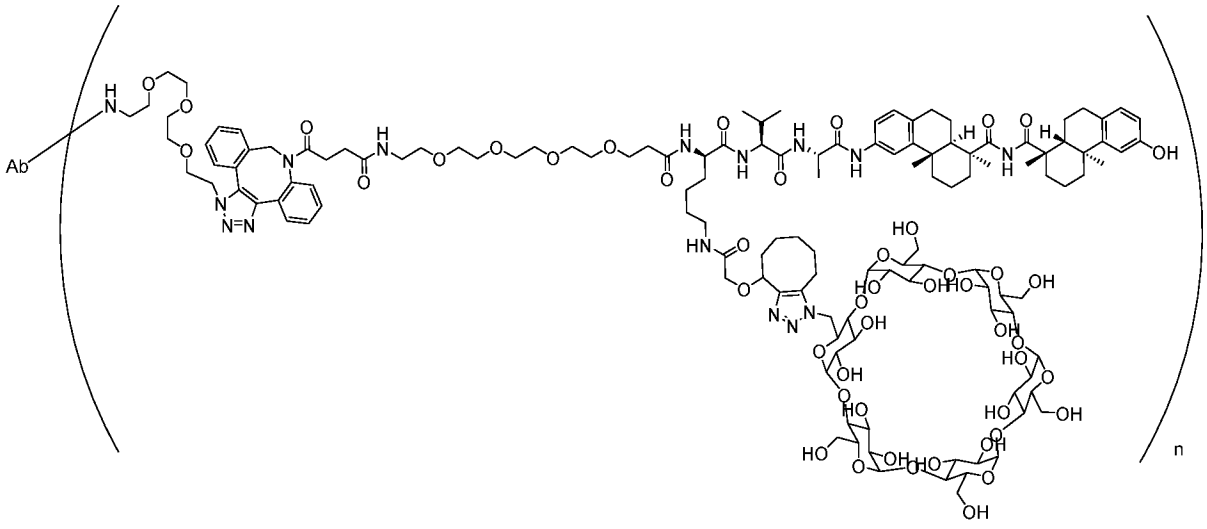
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смеси; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область

легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и мутацию N297Q.

[0339] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

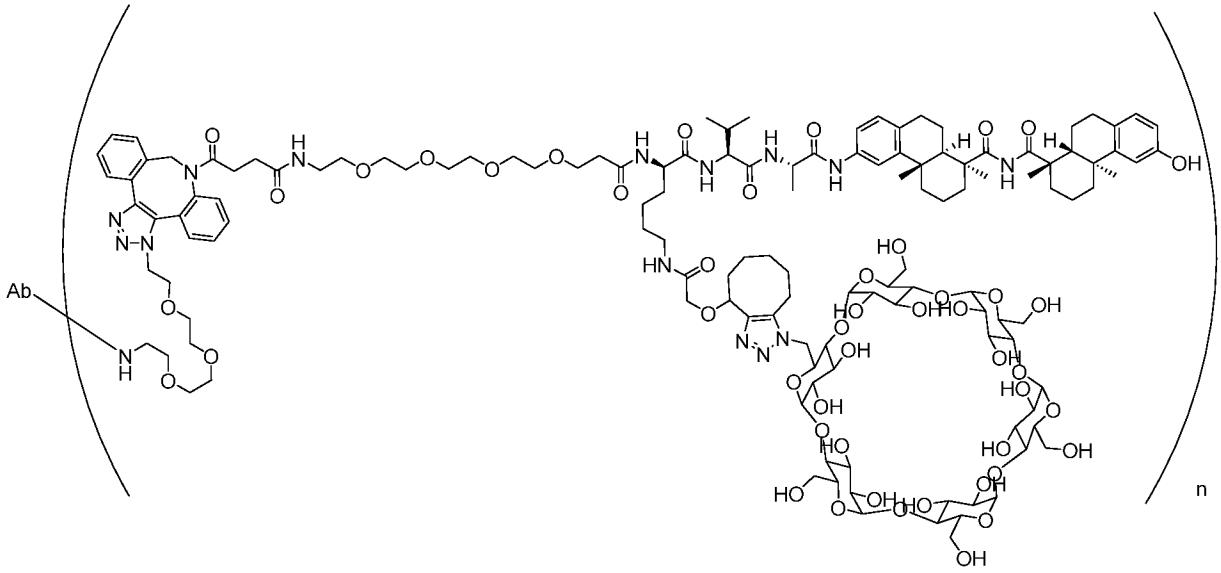


и/или

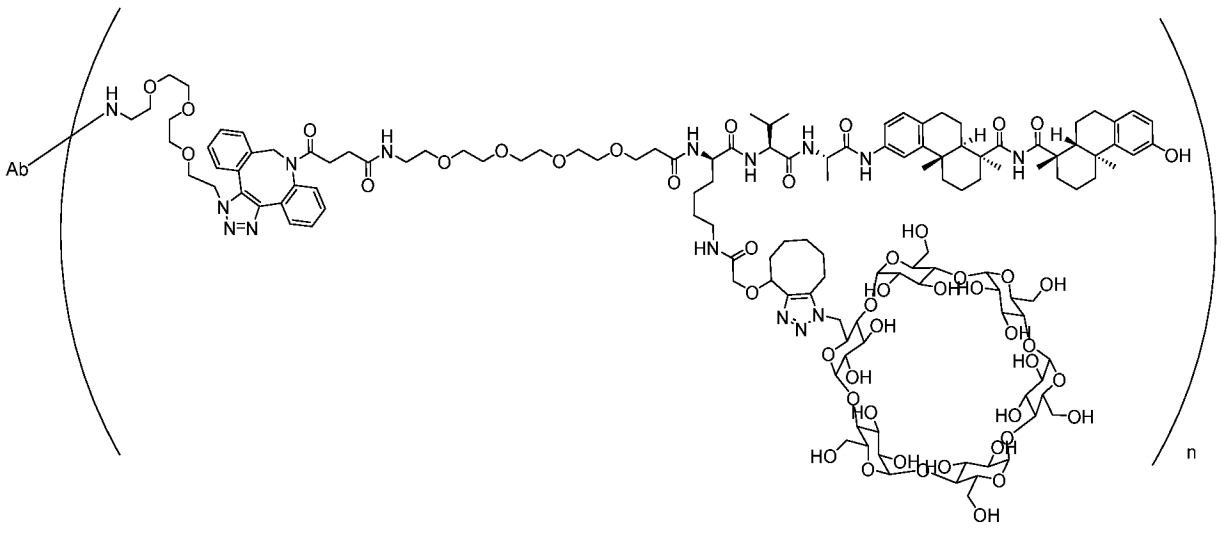


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

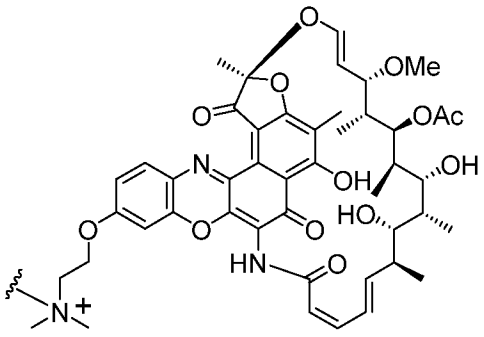
[0340] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формулам:

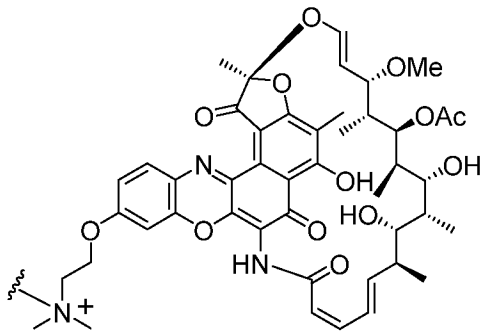


и/или

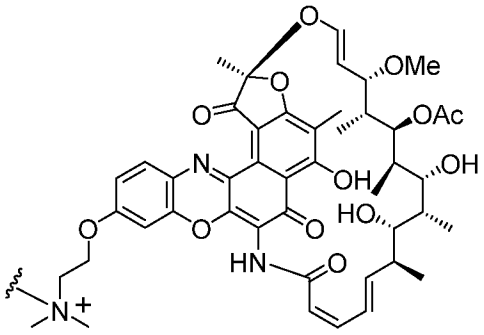


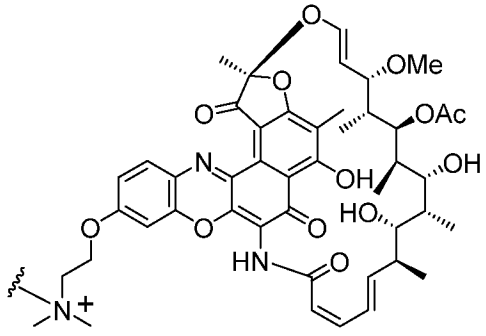
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смесь; где антитело представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58, и мутацию N297Q.

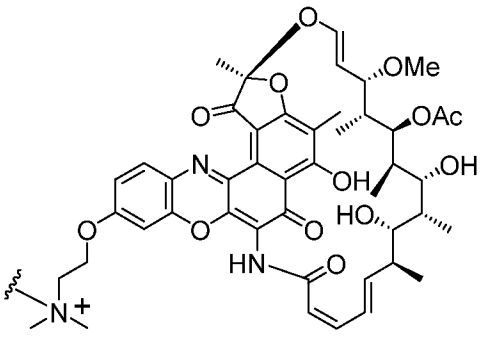
[0341] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат мутацию N297Q.

[0342] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор из шести

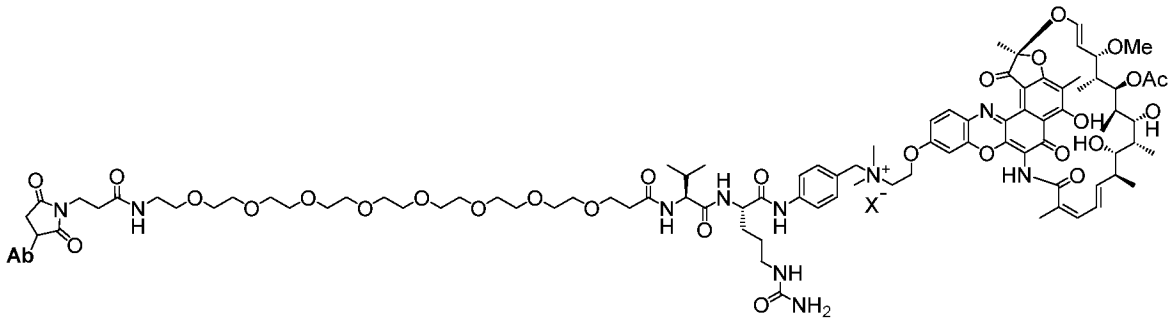
определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0343] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и мутацию N297Q.

[0344] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

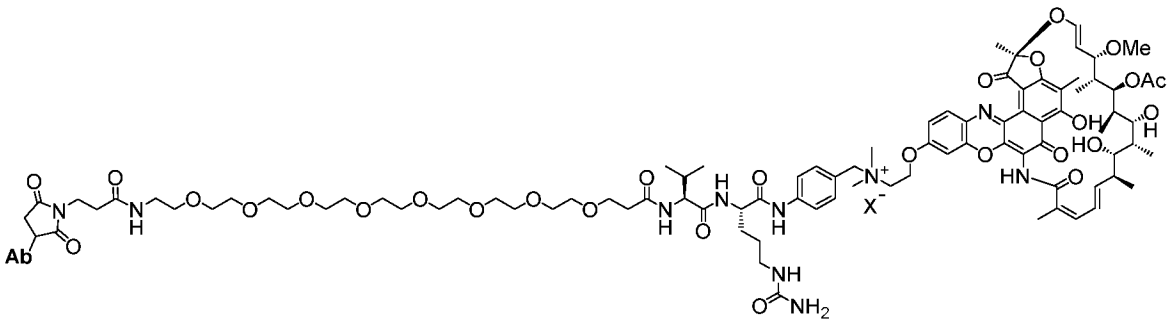
[0345] Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58, и конъюгированные с нагрузкой  или ее фармацевтически приемлемой солью, сольватом или стереоизомерной формой. Здесь представлено антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58 и мутацию N297Q.

[0346] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формуле:



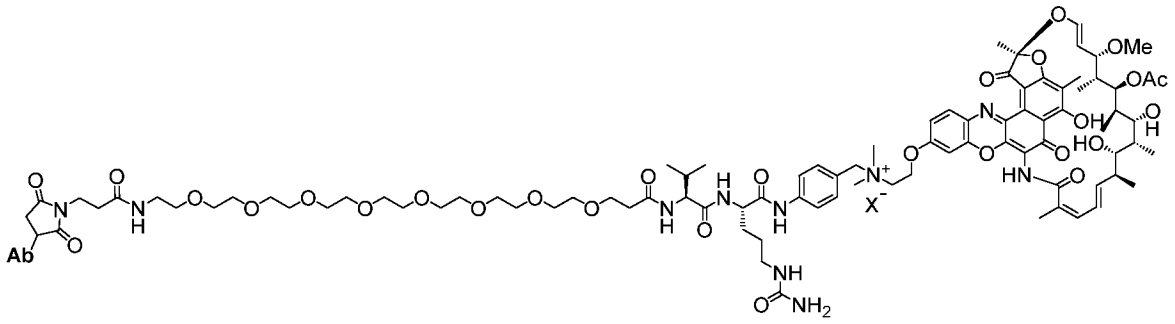
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смеси; где X^- представляет собой фармацевтически приемлемый противоион и где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат мутацию N297Q.

[0347] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формуле:



или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смеси; где X^- представляет собой фармацевтически приемлемый противоион и где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR) (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

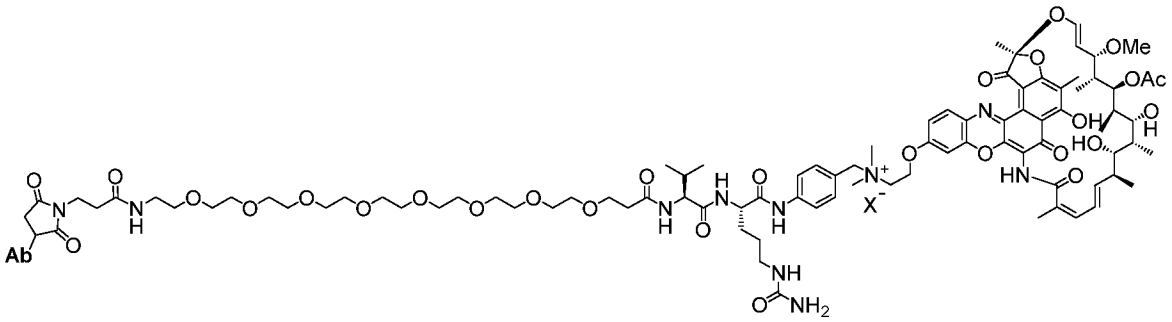
[0348] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формуле:



или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смеси; где X^- представляет собой фармацевтически приемлемый противоион и где антитело представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых

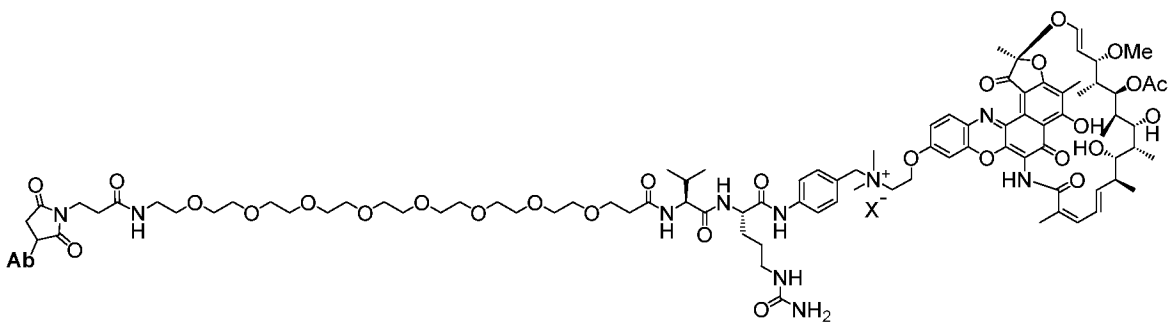
вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64 и мутацию N297Q.

[0349] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формуле:



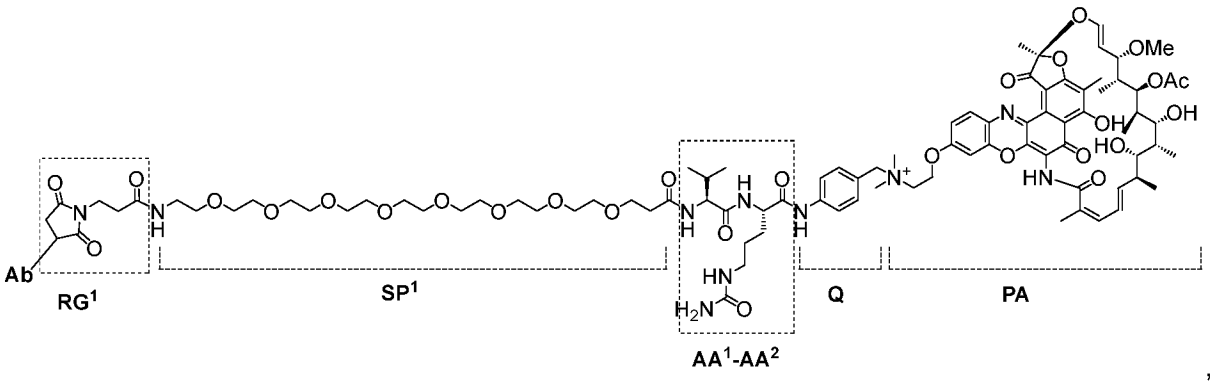
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смеси; где X^- представляет собой фармацевтически приемлемый противоион и где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат набор вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR) и набор вариабельных областей легкой цепи (LCVR) из Таблицы 4 и мутацию N297Q.

[0350] Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) согласно формуле:



или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, или региоизомер, или их смеси; где X^- представляет собой фармацевтически приемлемый противоион и где антитело - антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58. В некоторых из таких вариантов осуществления отношение лекарственное средство-антитело (DAR) составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 1. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 50, и вариабельную область легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 58, и мутацию N297Q.

[0351] В контексте настоящего документа, в определенных вариантах осуществления, где аминокислота связана со спейсером SP^1, например, в компоненте $–SP^1–AA^1–AA^2–$, аминокислота AA^1 связана через ее аминогруппу со спейсером SP^1. Остаток спейсера включает части функциональной группы, которая сформировала связь с аминогруппой в аминокислоте. Исключительно для примера, в следующей структуре:



,

валиновый остаток связан с SP^1 как показано, и остаток SP^1 в данном примере содержит компонент (C=O). Также в этом примере остаток SP^1 содержит функциональную группу, подходящую для формирования связи с реактивной группой, и остатокSP^1 содержит

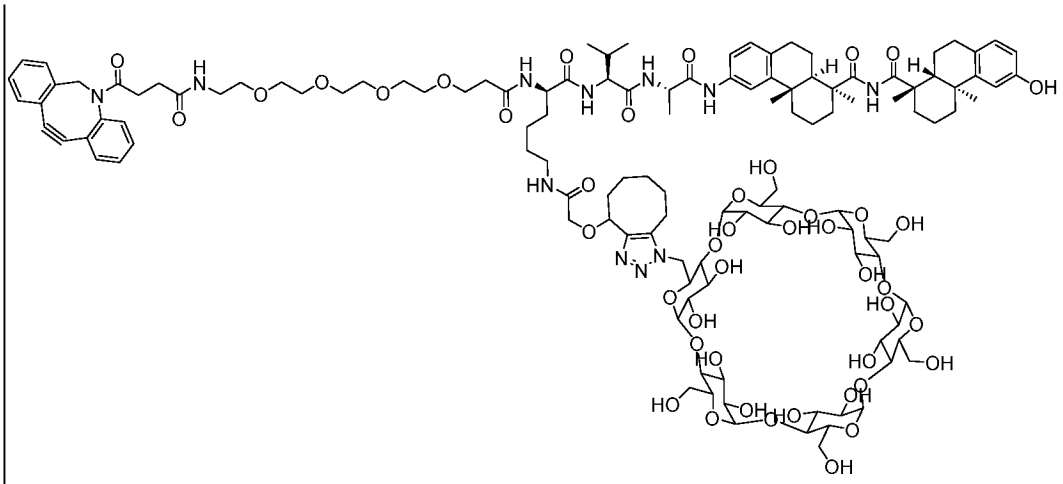
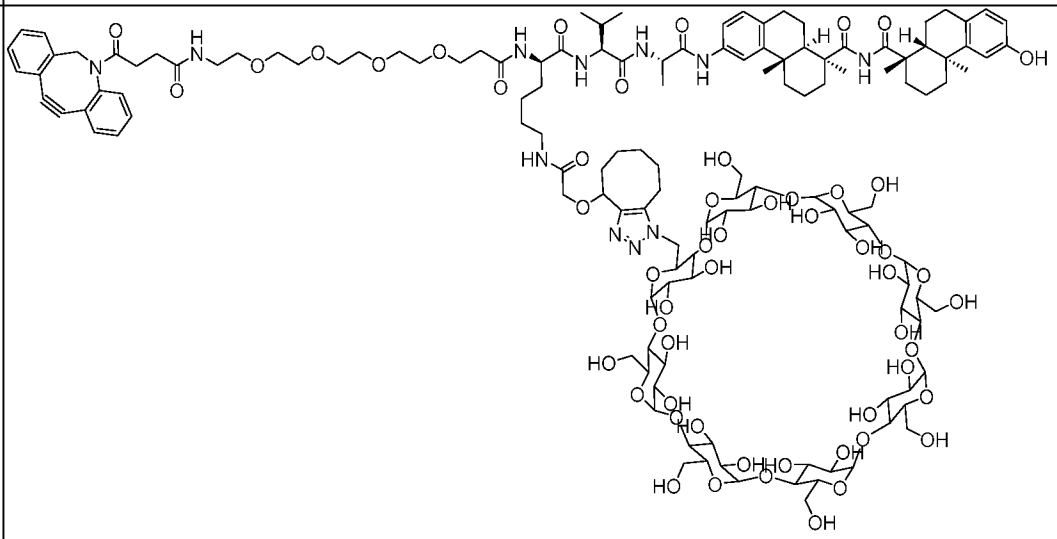
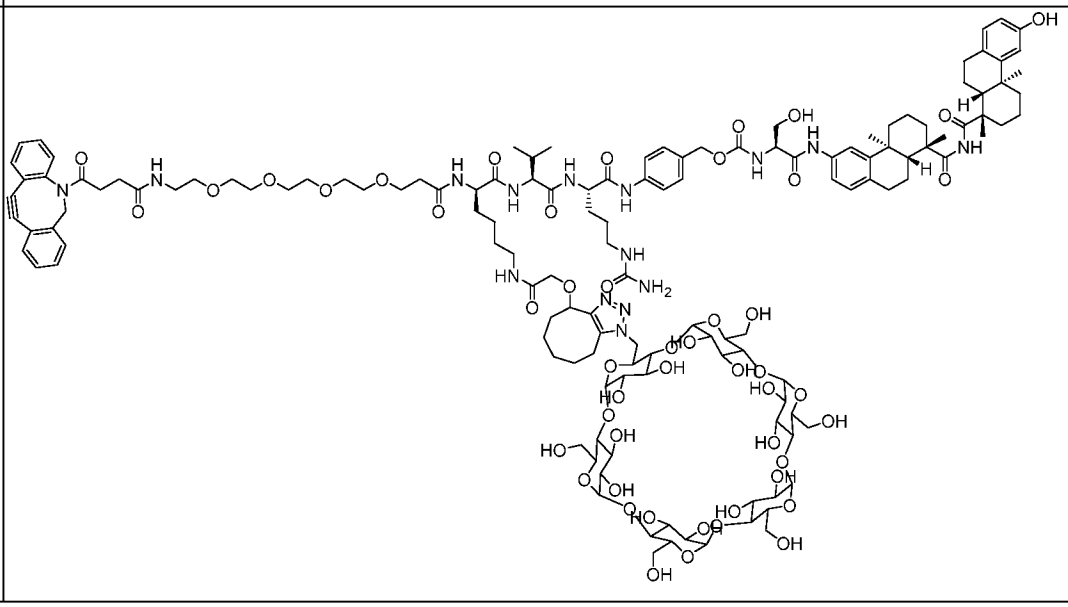
компонент –NH–. Специалистам в данной области известно, что аналогичные группировки могут применяться ко всем другим описанным здесь формулам.

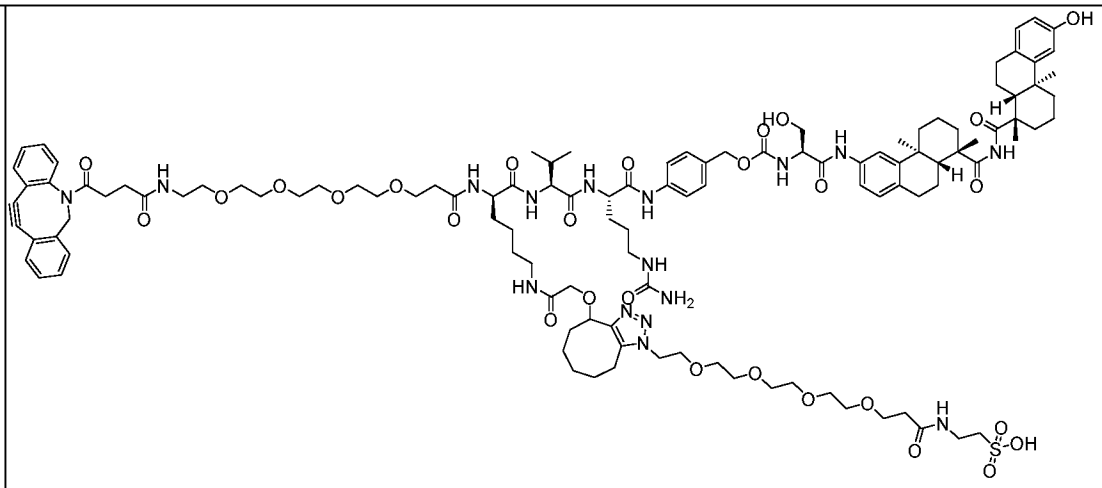
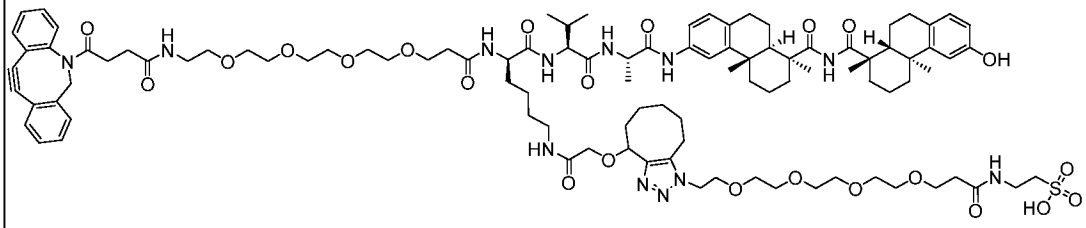
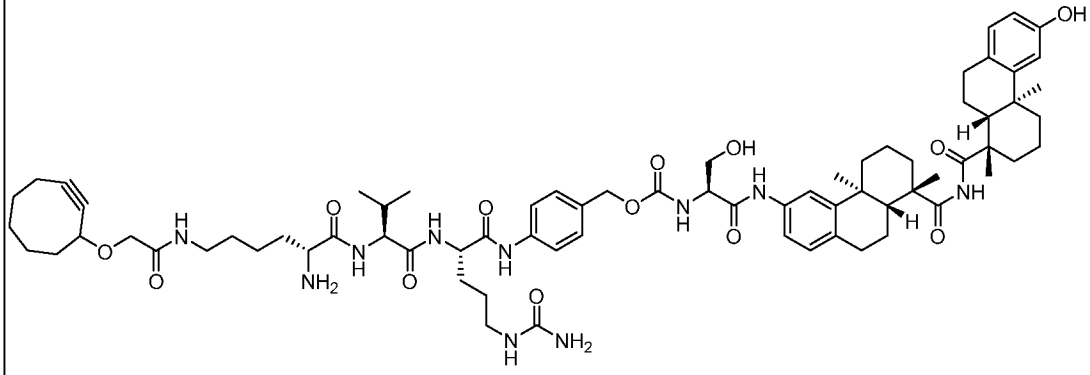
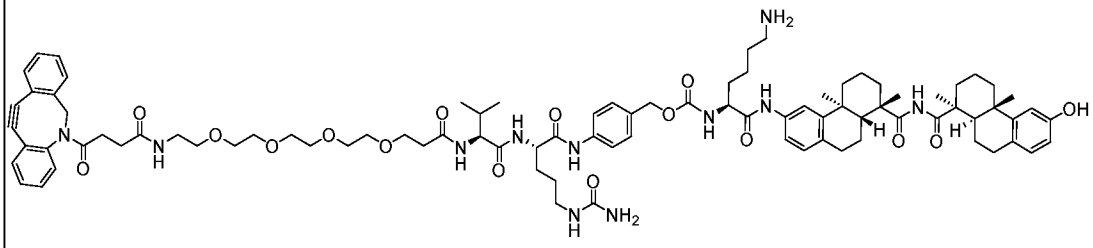
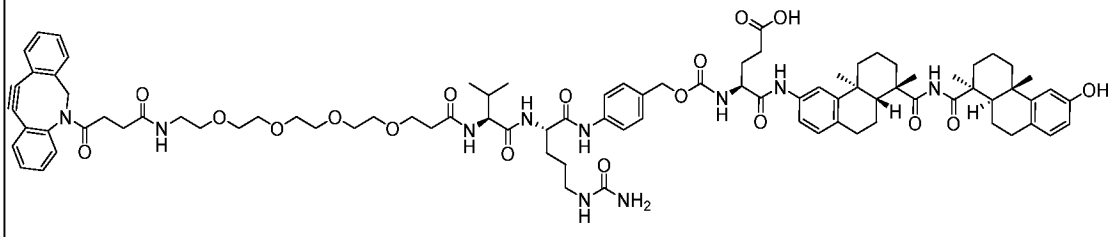
[0352] Описанные здесь конъюгаты антитело-лекарственное средство могут быть приготовлены с применением условий конъюгации, известных специалистам в данной области (см., например, работу Doronina *et al. Nature Biotechnology* 2003, 21, 7, 778, которая включается в настоящий документ полностью посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство приготавливают посредством воздействия на антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент соединением, содержащим необходимый линкер и нагрузку, при этом указанный линкер имеет компонент, который вступает в реакцию с антителом или антиген-связывающим белком, например, на необходимом остатке антитела или антиген-связывающего белка. Иллюстративные условия описаны в нижеприведенных Примерах.

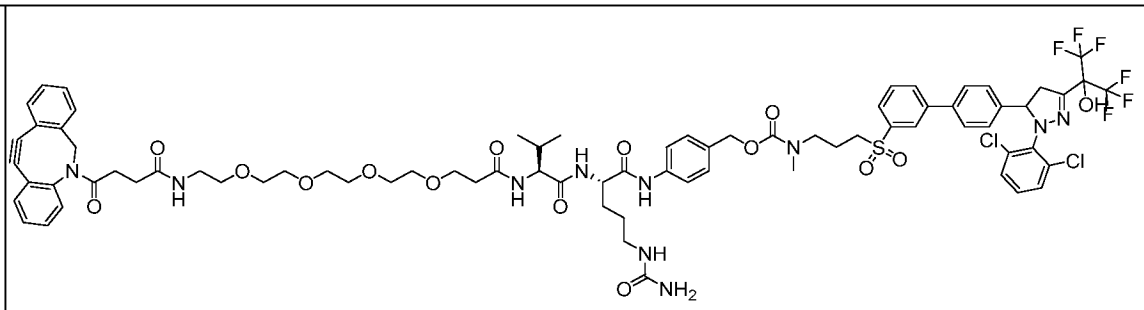
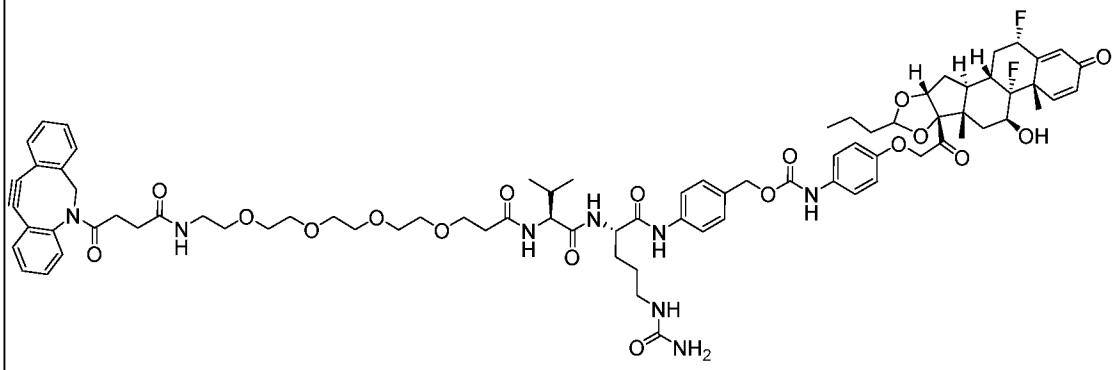
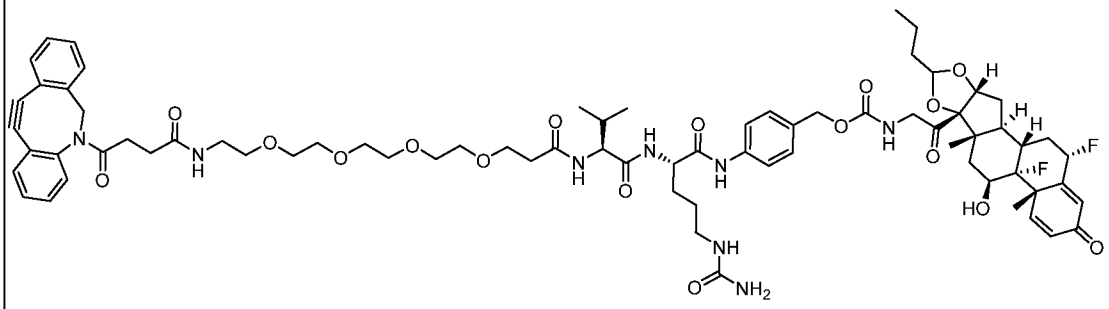
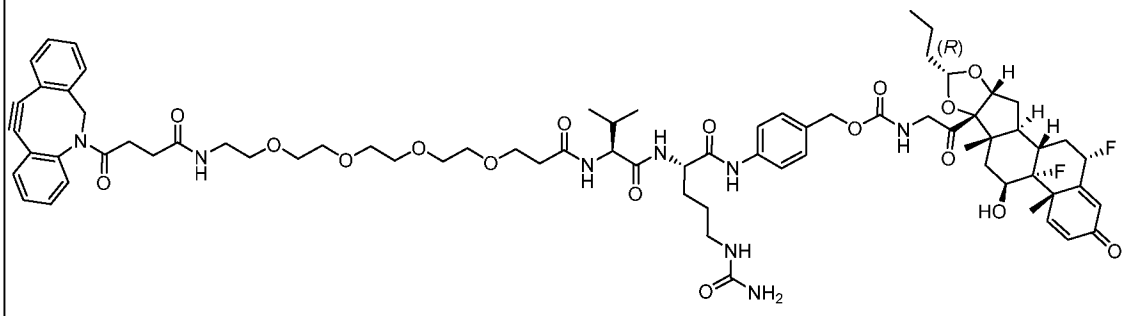
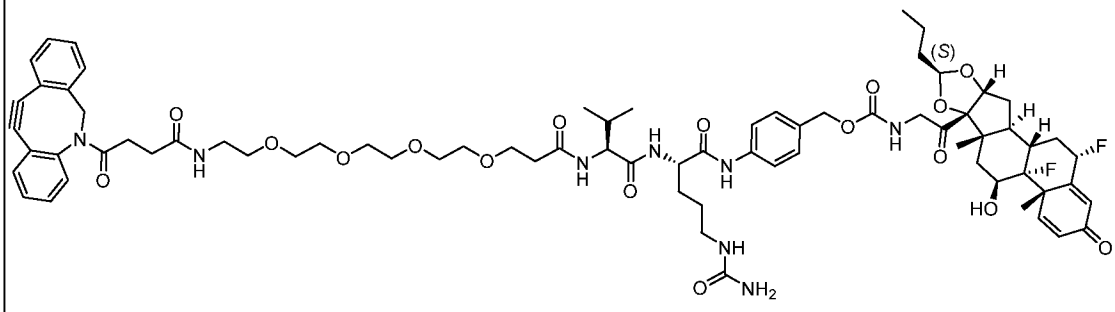
Приготовление конъюгатов антитело-лекарственное средство

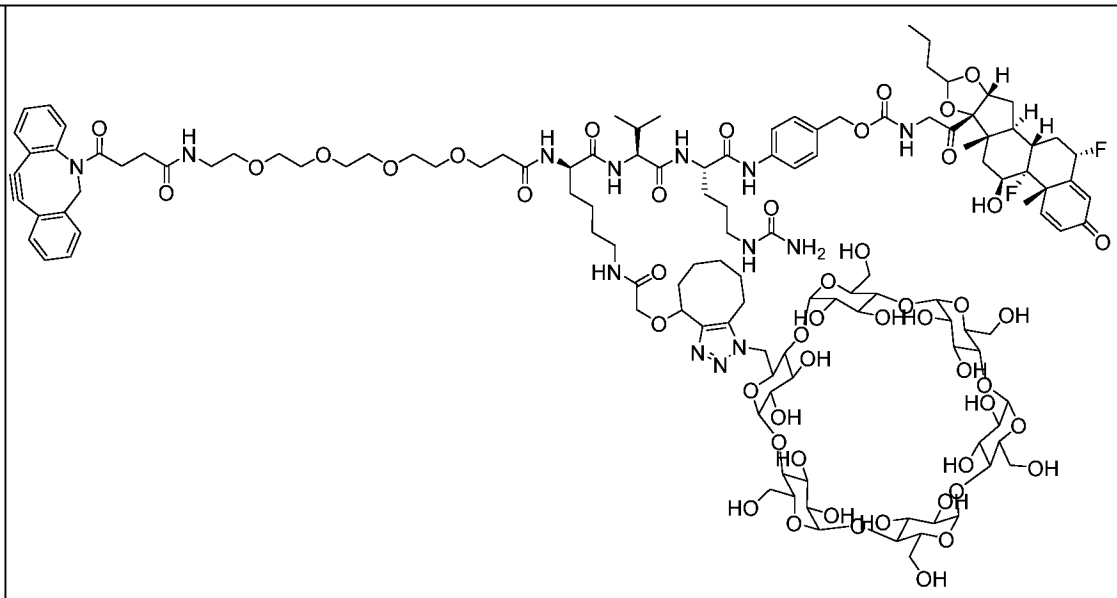
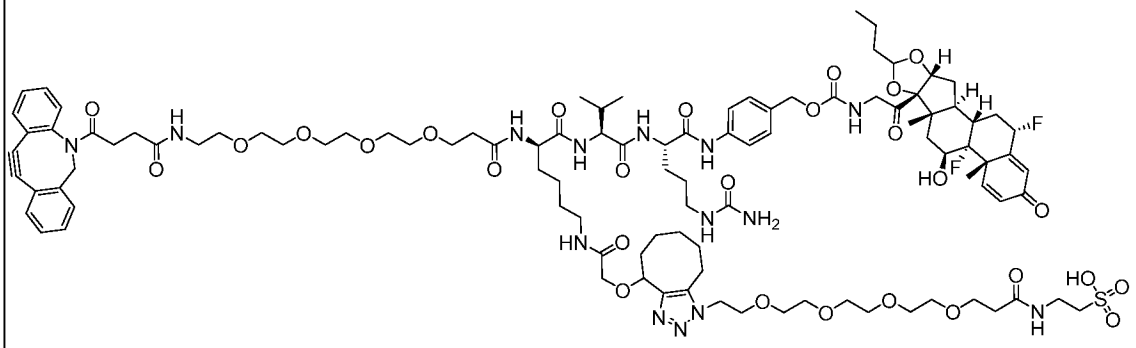
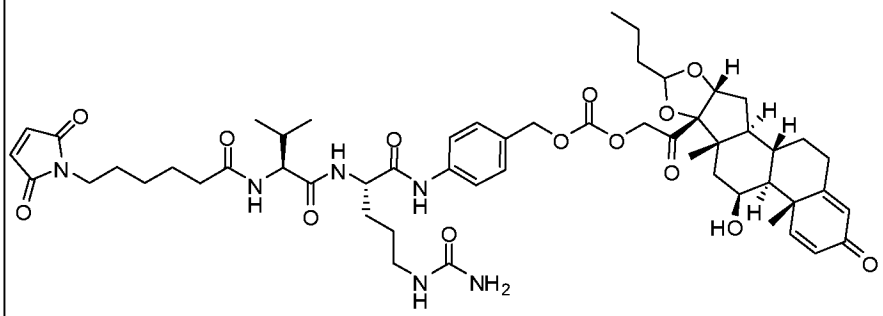
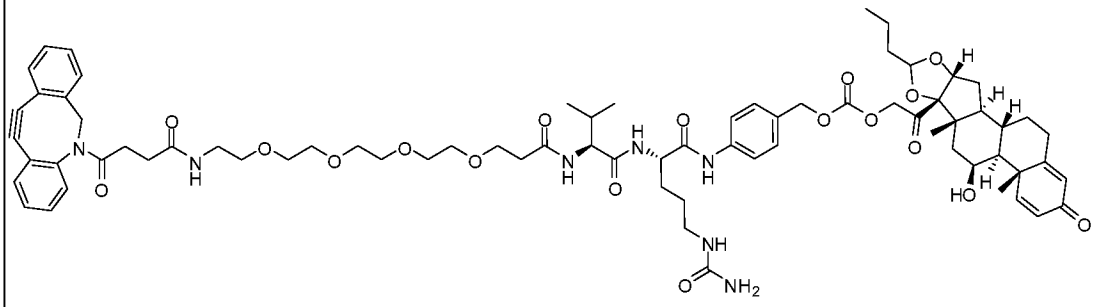
[0353] В некоторых вариантах осуществления здесь представлены процессы для приготовления конъюгата антитело-лекарственное средство, включающие воздействие на антитело к MSR1, или ПЭГ-модифицированное антитело к MSR1, или его антиген-связывающий фрагмент линкер-нагрузкой или линкер-спейсер-нагрузкой, выбранной из Таблицы 3. Также здесь представлен конъюгат антитело-лекарственное средство, приготовленный посредством конъюгации антитела к MSR1, или ПЭГ-модифицированного антитела к MSR1, или его антиген-связывающего фрагмента с линкер-нагрузкой, или с линкер-спейсер-нагрузкой, или их стереоизомерной формой, или региоизомером, или смесью региоизомеров, выбранных из Таблицы 3.

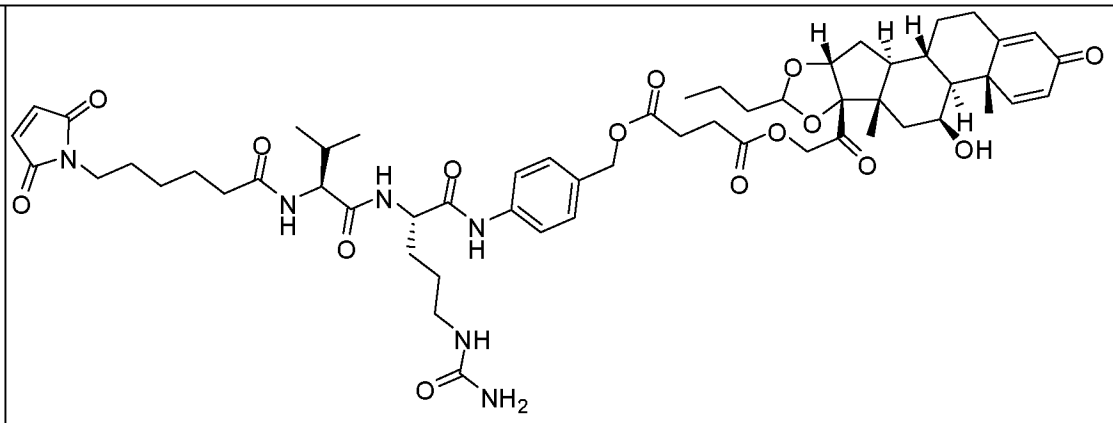
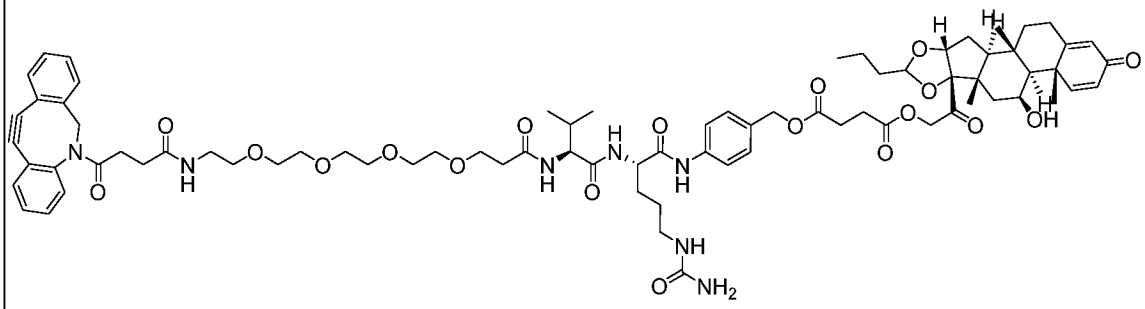
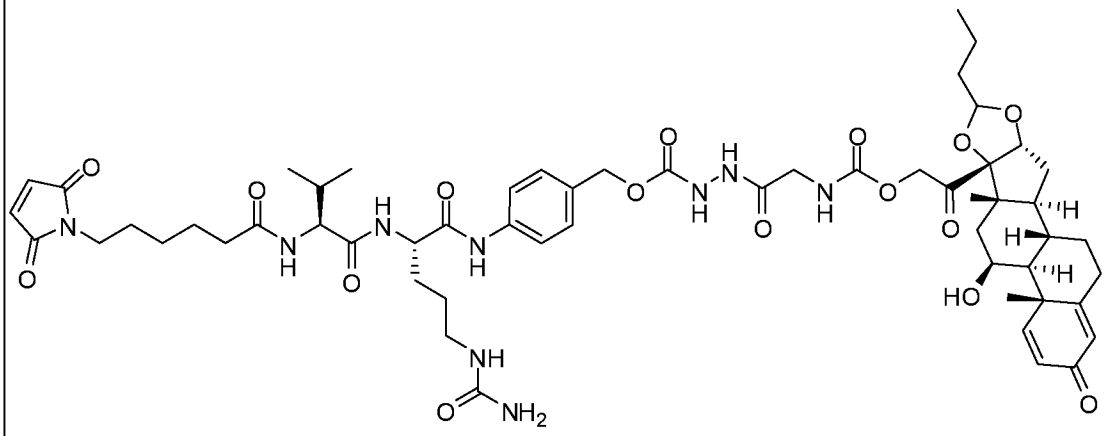
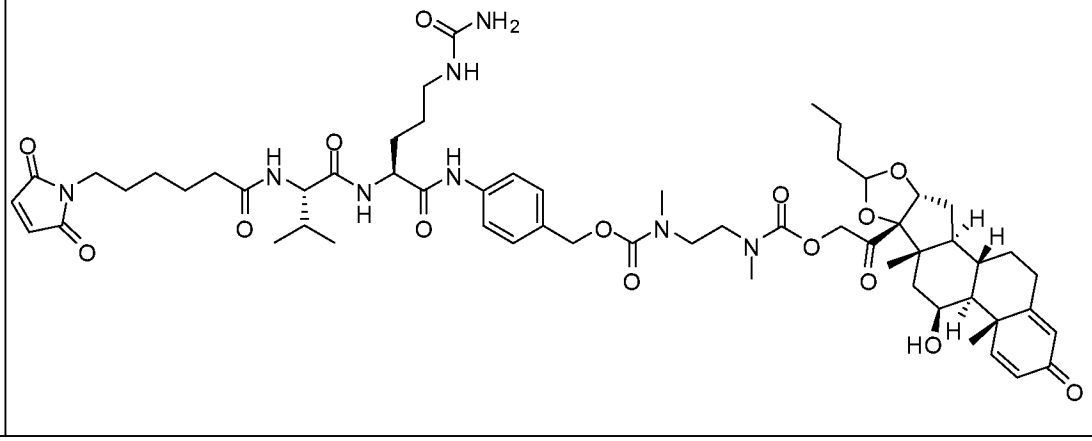
Таблица 3: Список линкер-нагрузок (LP) и их структуры

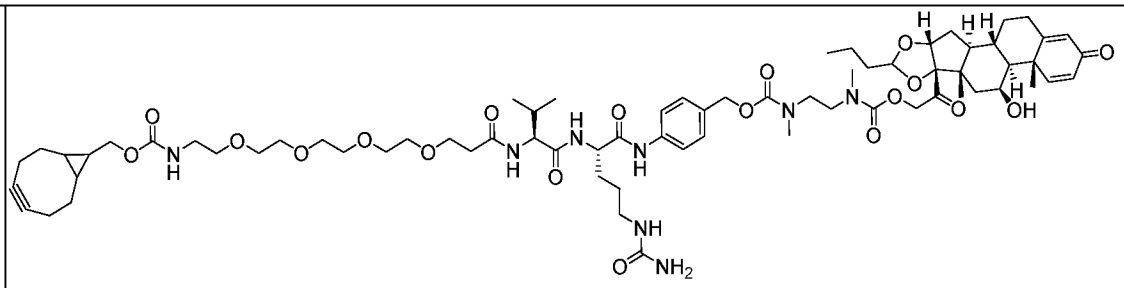
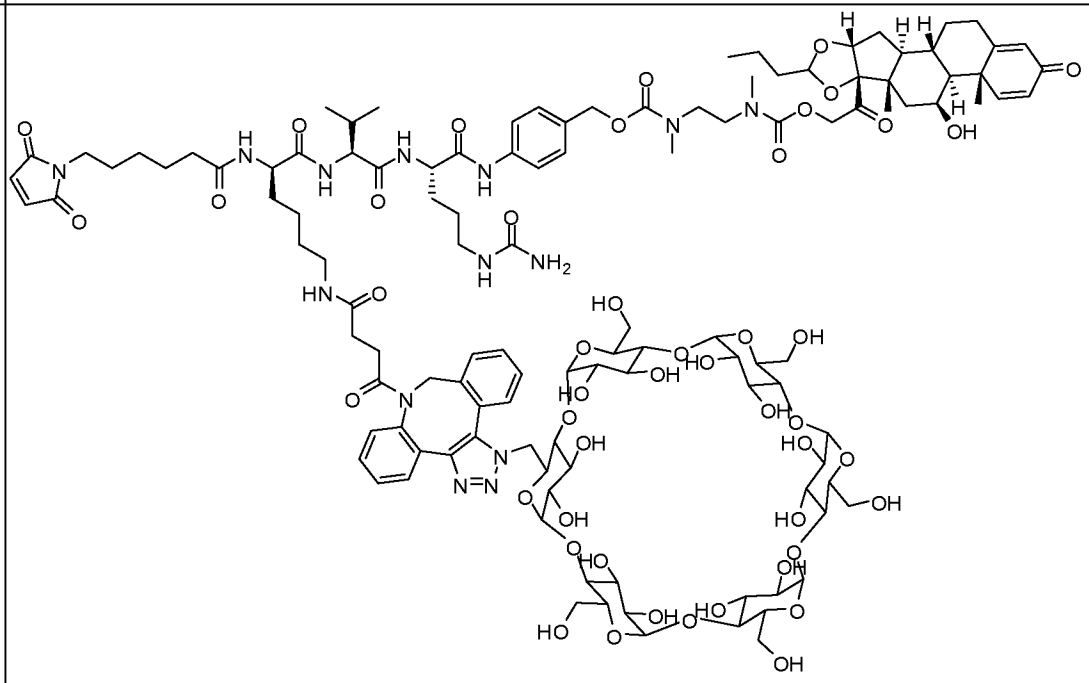
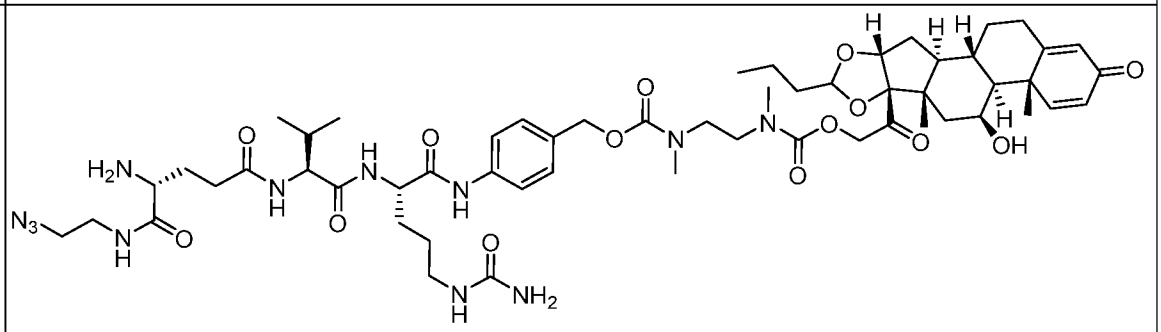
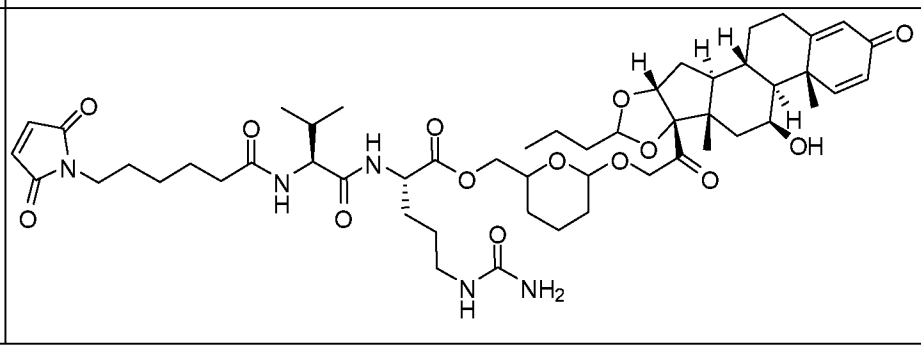
LP1	
LP2	
LP5	

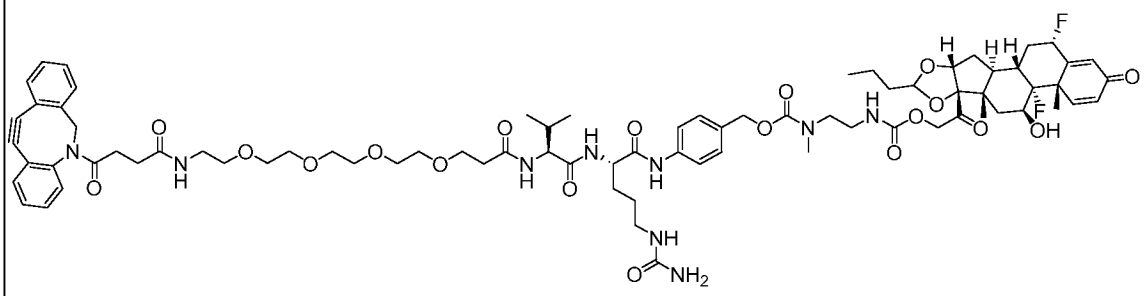
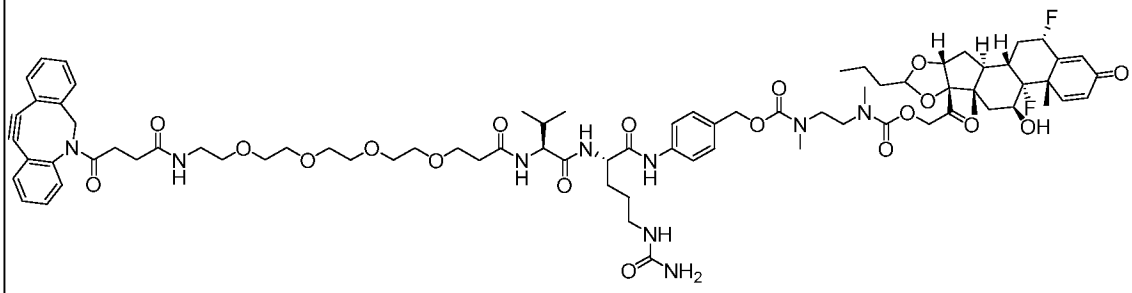
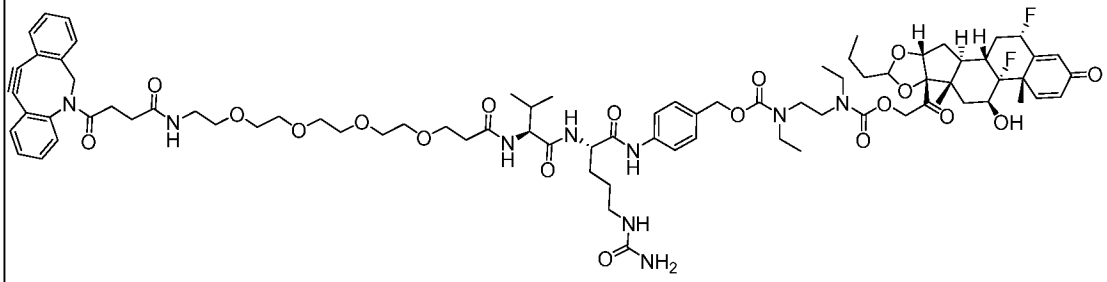
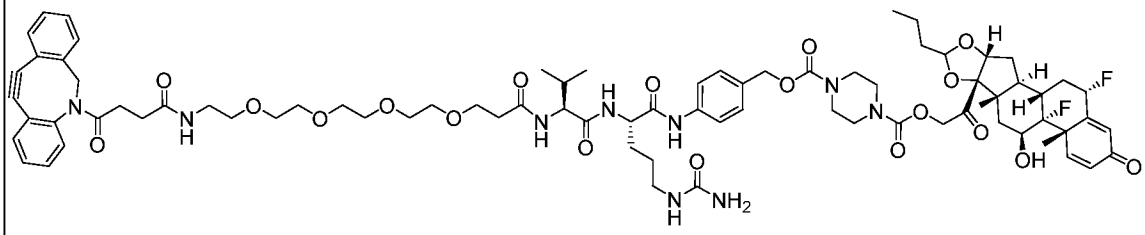
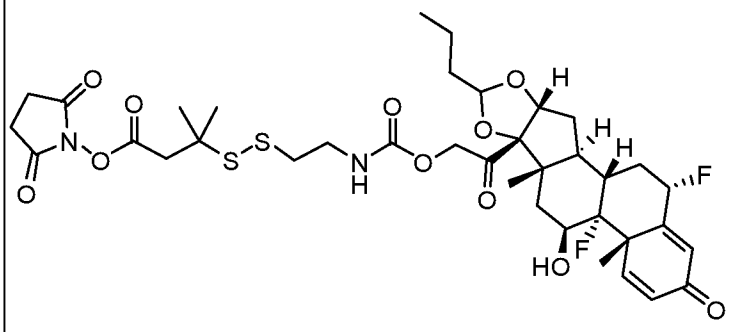
LP6	
LP18	
LP4	
LP11	
LP9	

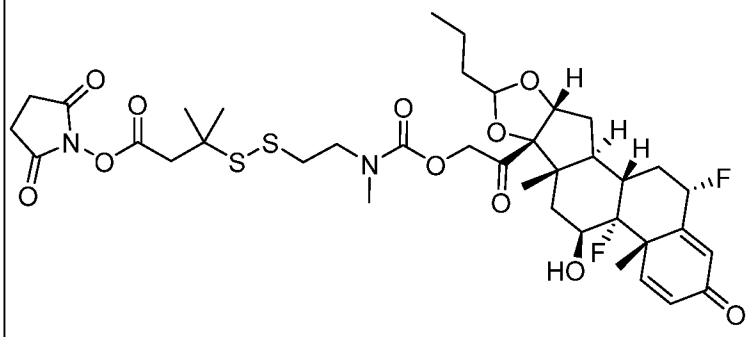
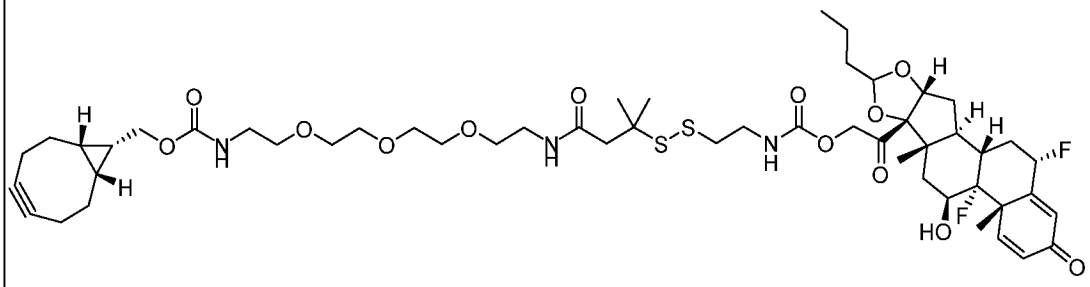
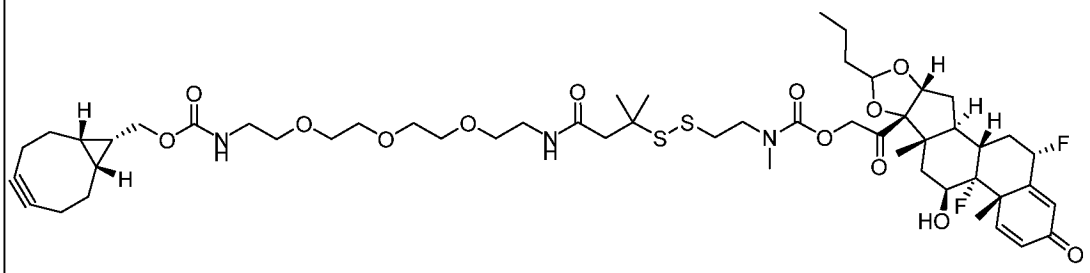
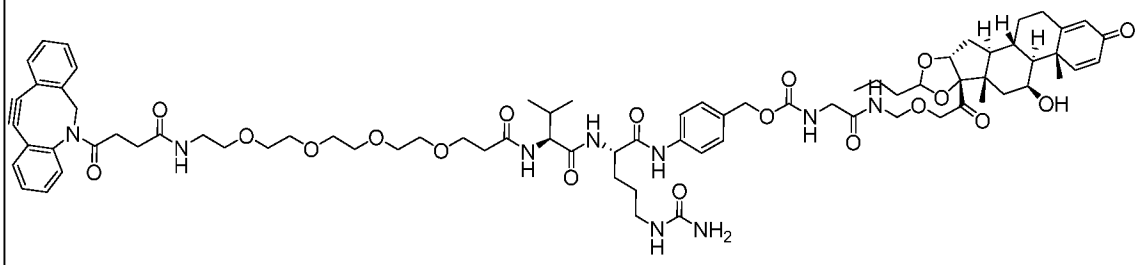
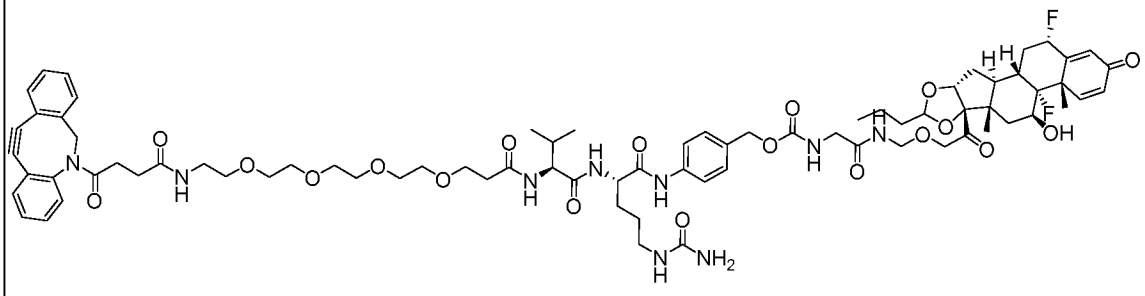
LP12	
LP3	
LP13	
	
	

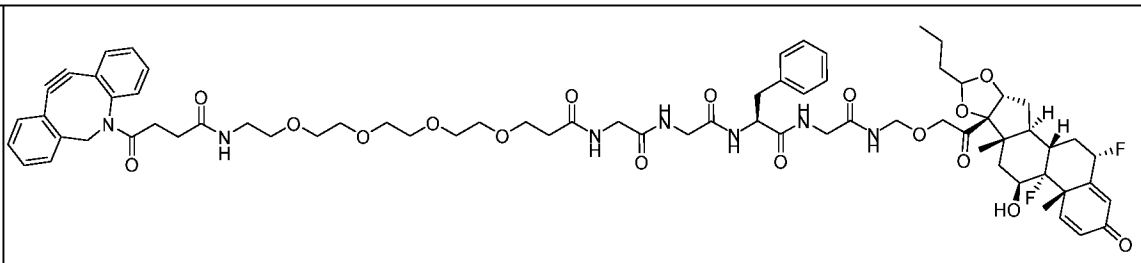
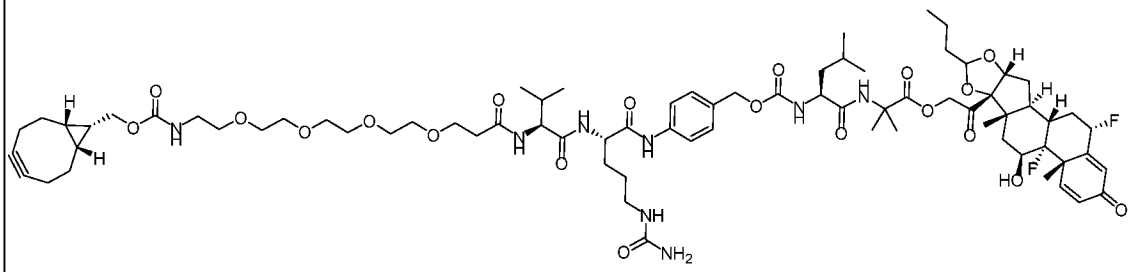
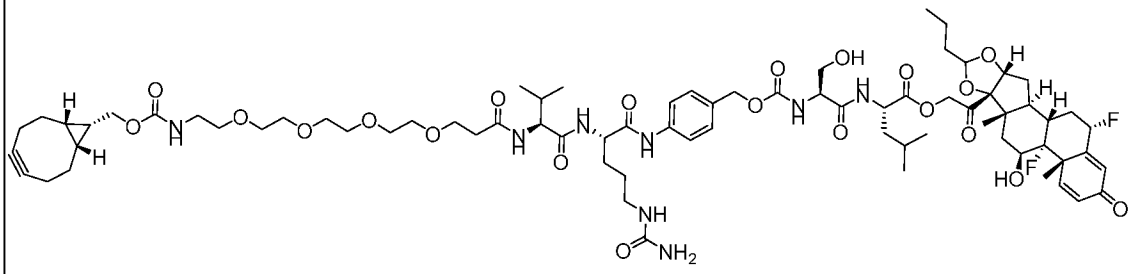
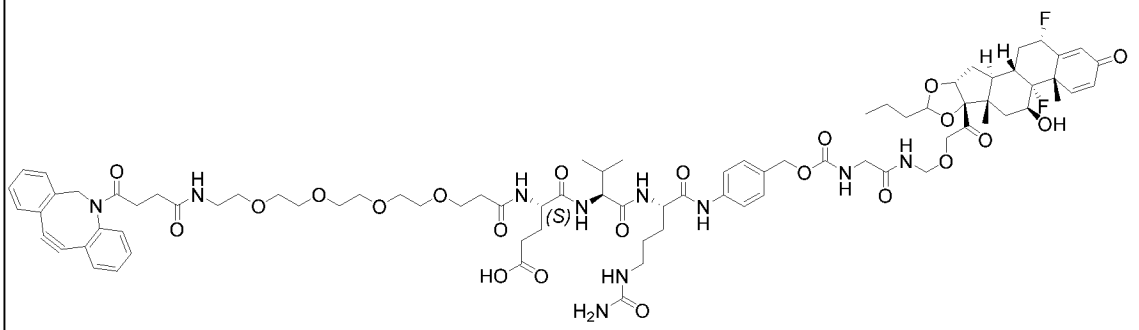
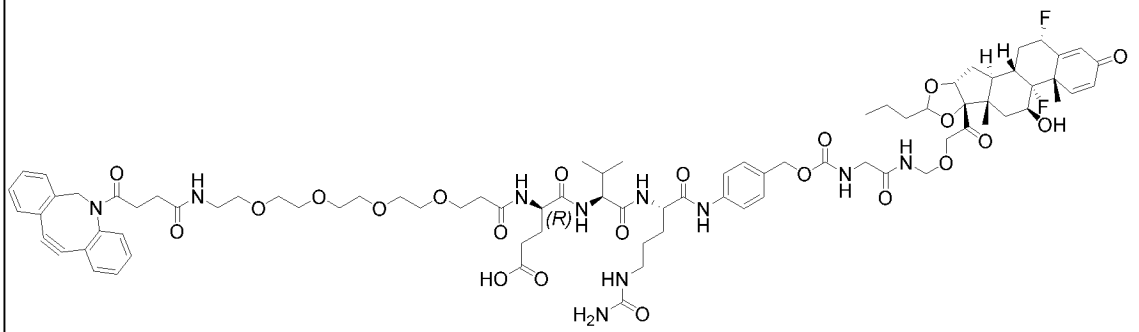
LP14	
LP15	
2a	
2b	

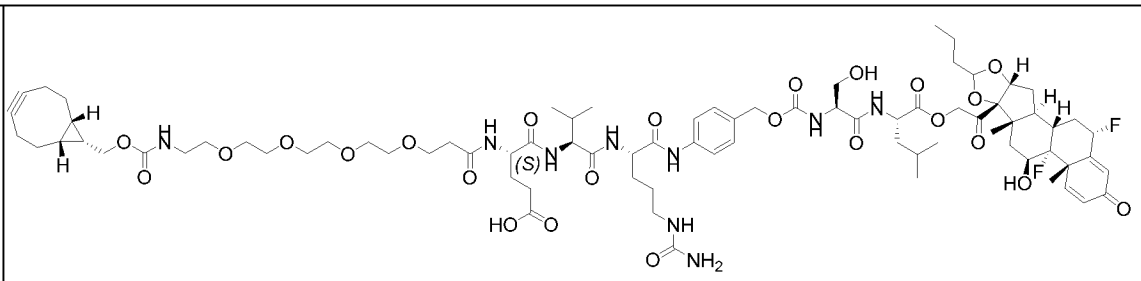
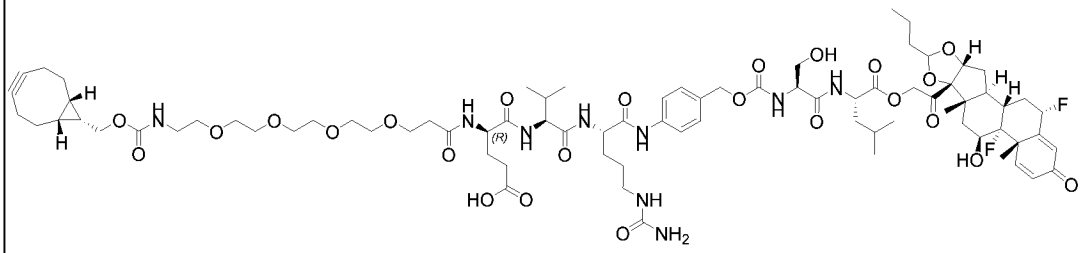
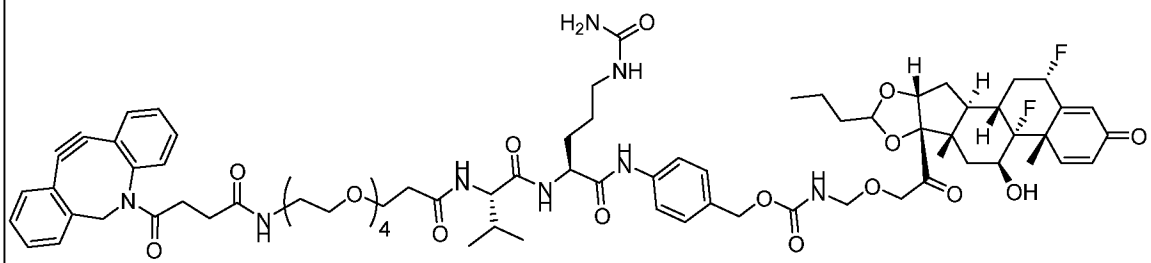
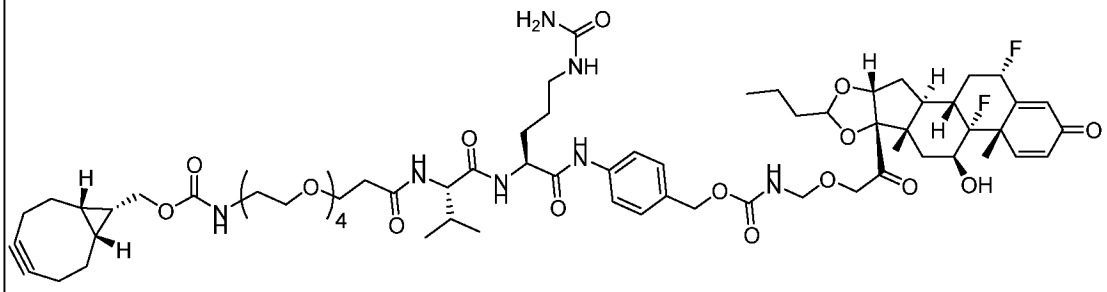
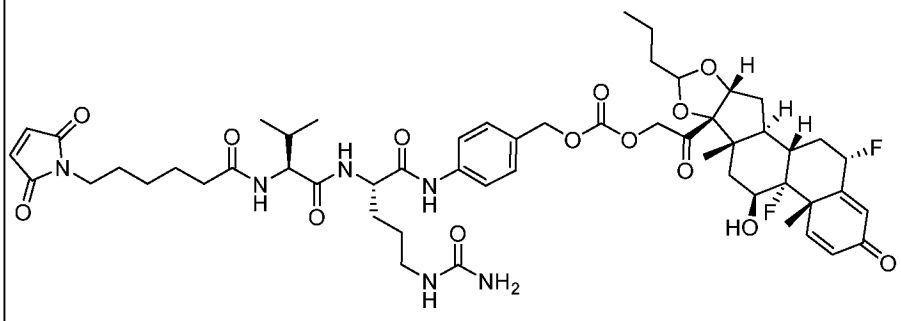
2f	
2g	
2j	
2k	

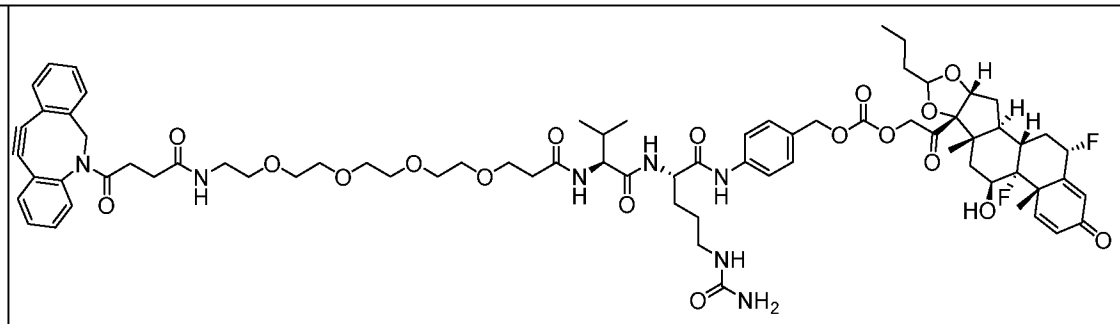
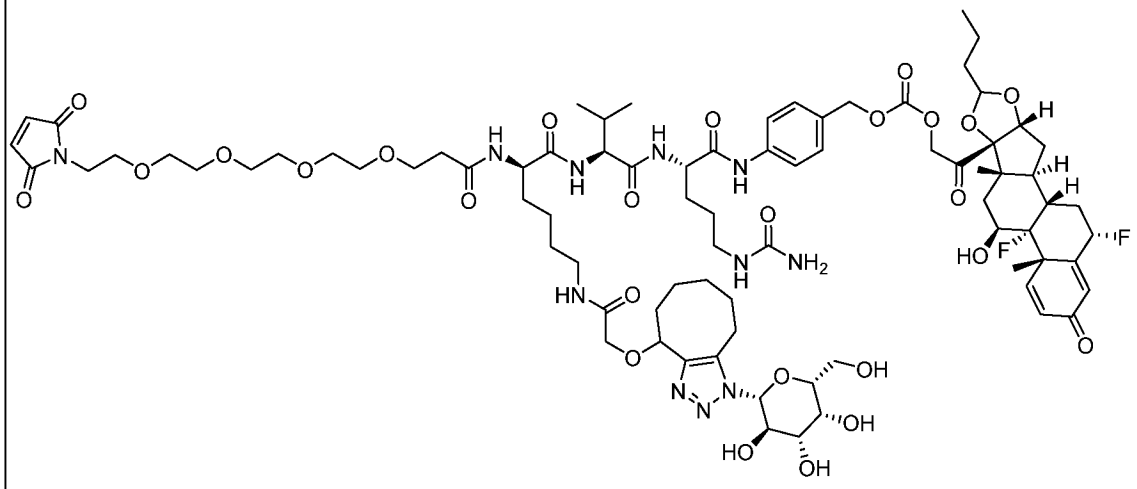
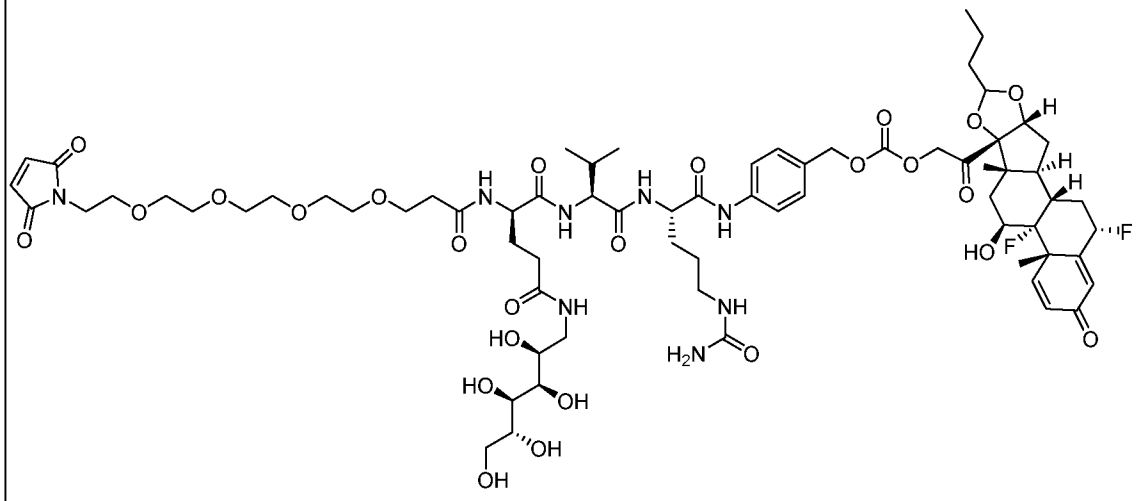
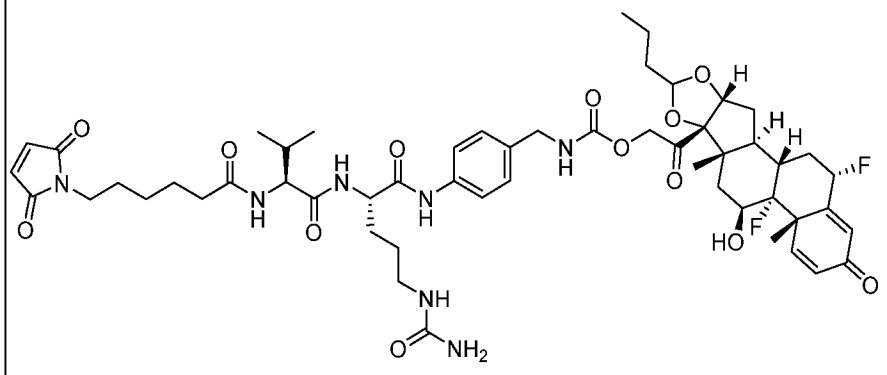
2l	
2m	
2n	 или их смесь
2q	

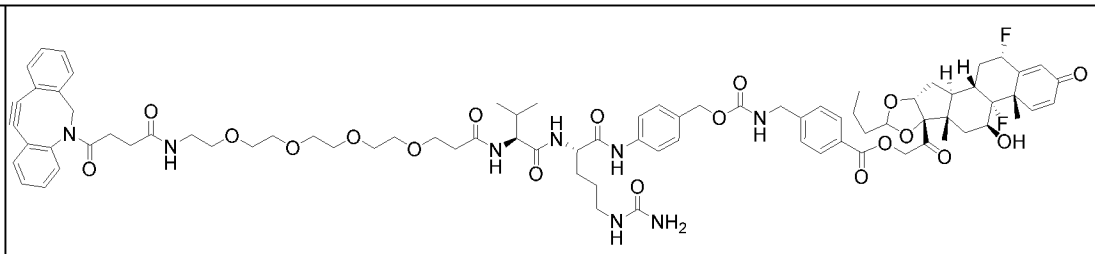
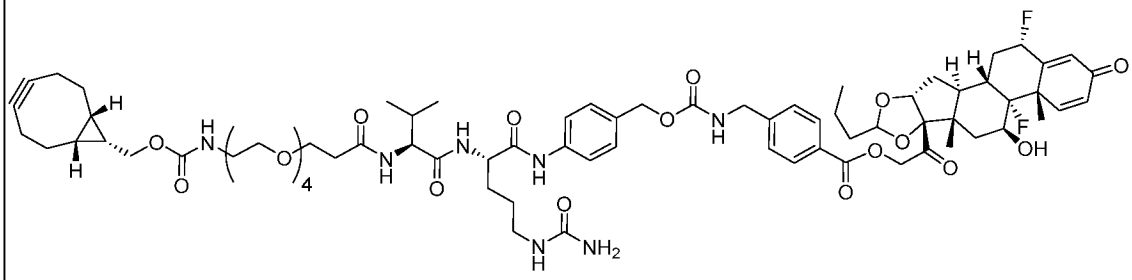
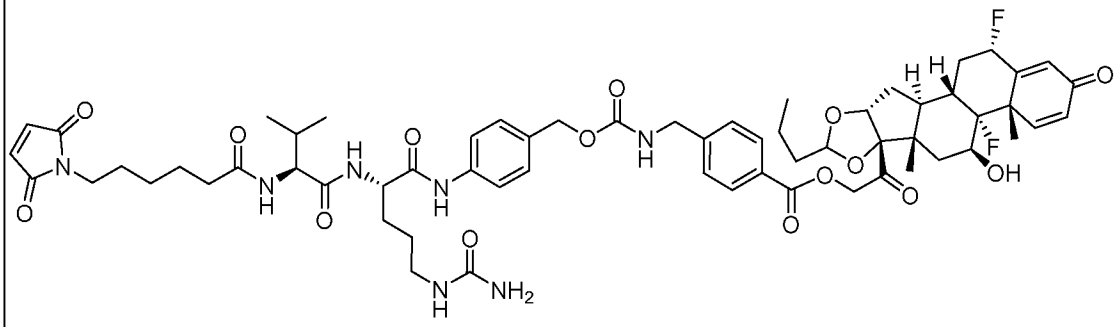
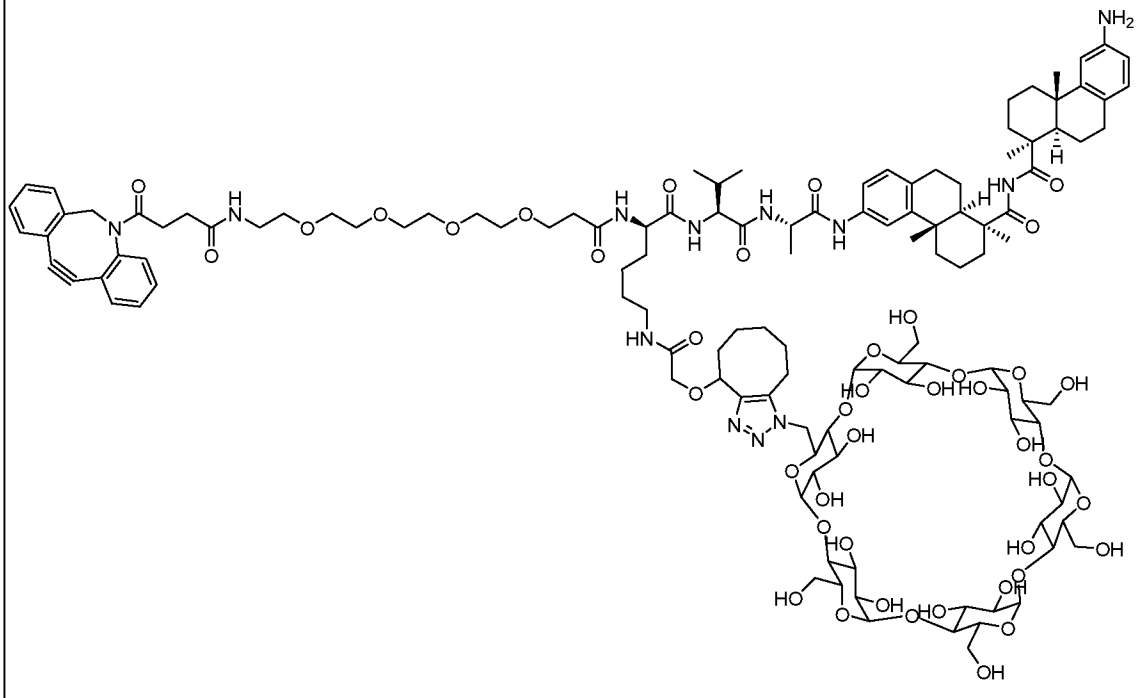
LP1A	
LP2A	
LP3A	
LP4A	
LP5A	

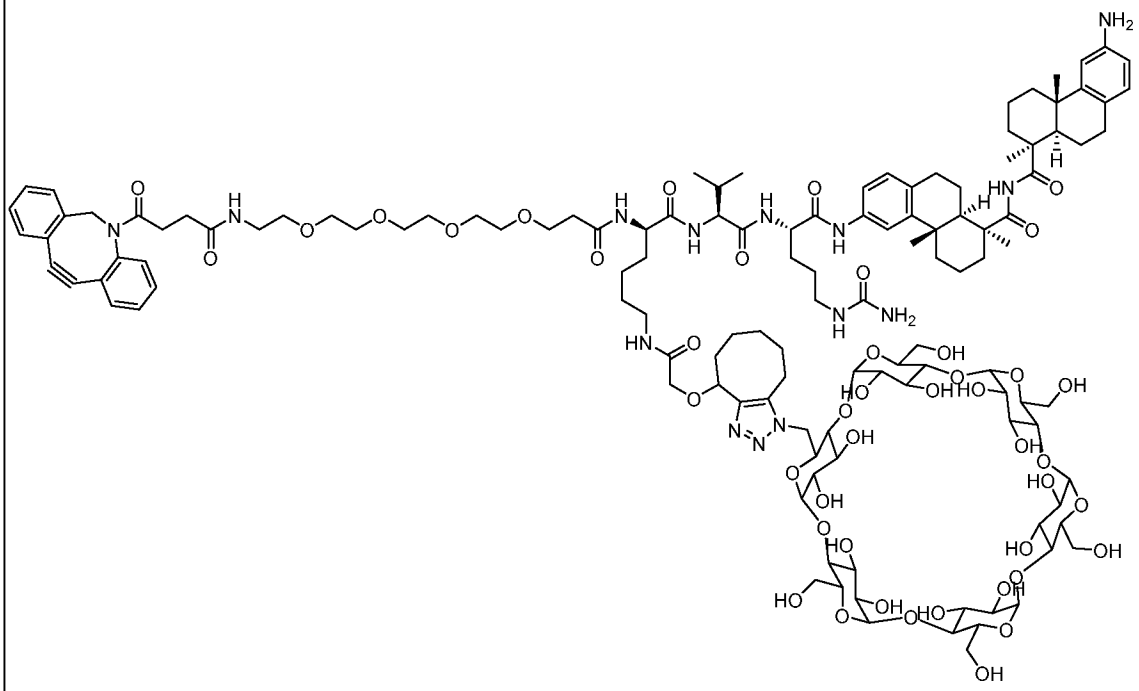
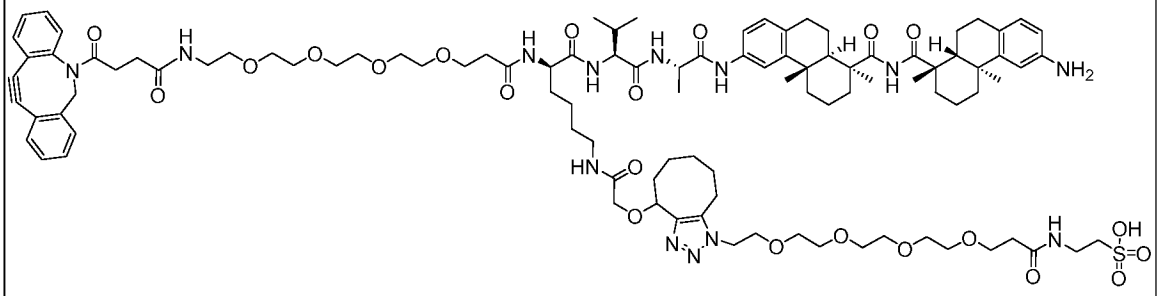
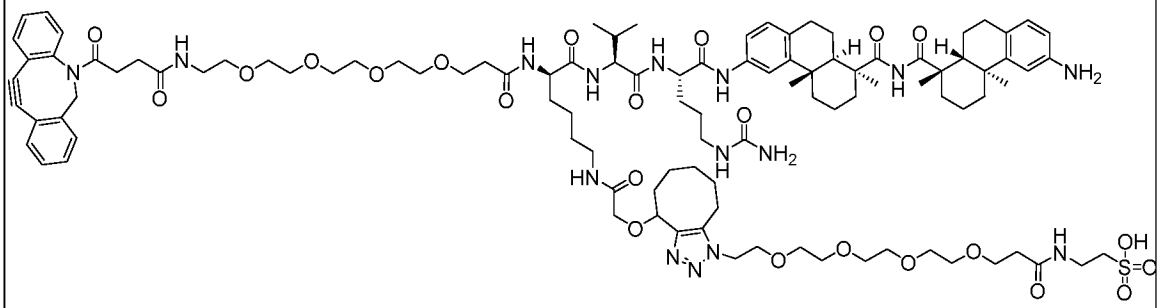
LP6A	
LP7A	
LP8A	
LP9A	
LP10A	

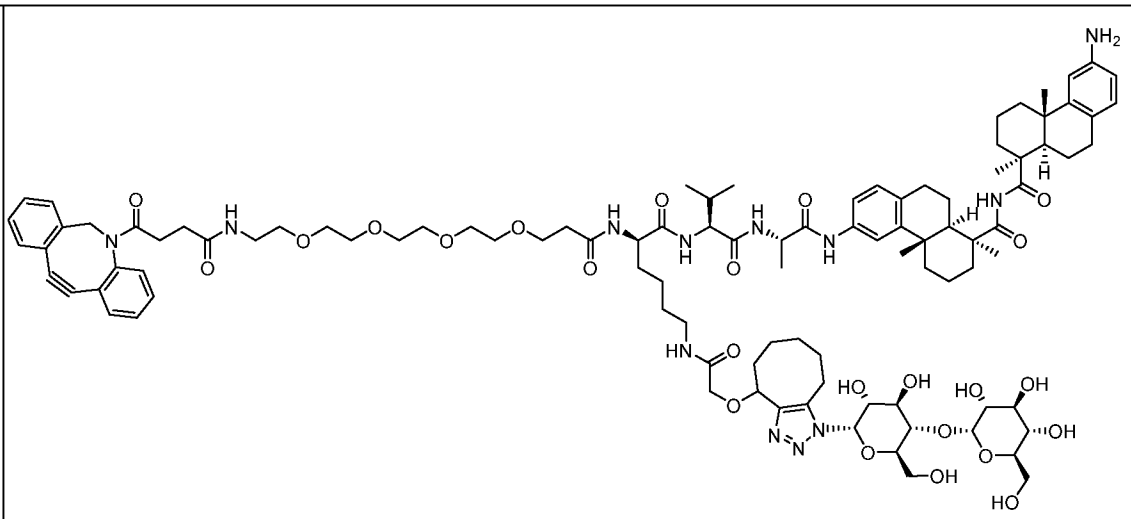
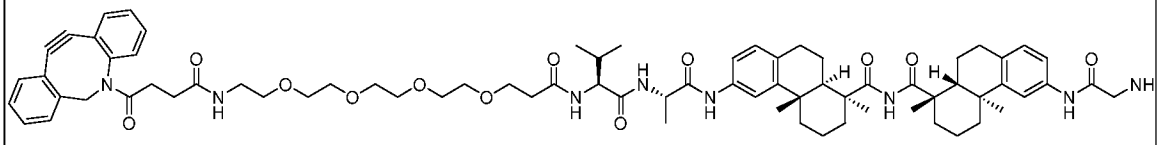
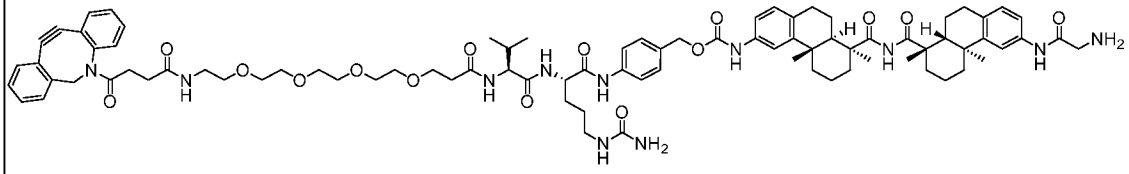
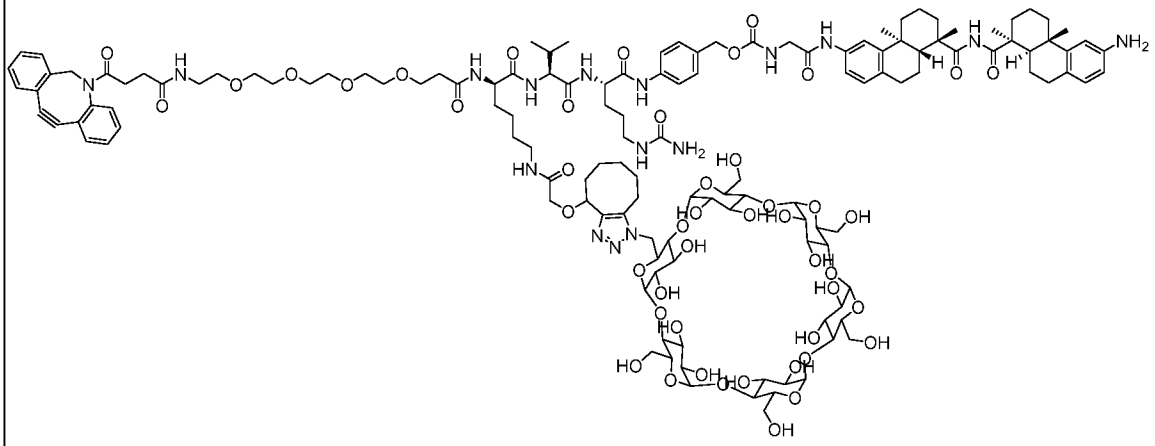
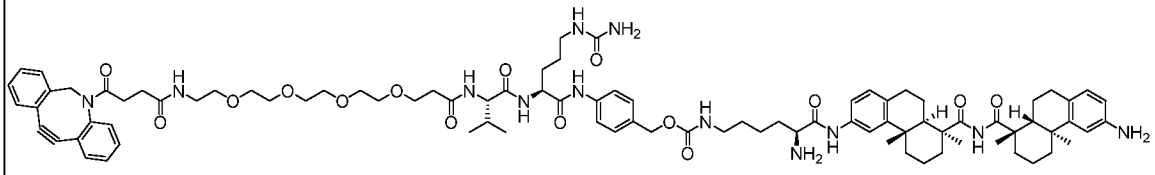
LP11 A	
LP12 A	
LP13 A	
LP18 A	
LP19 A	

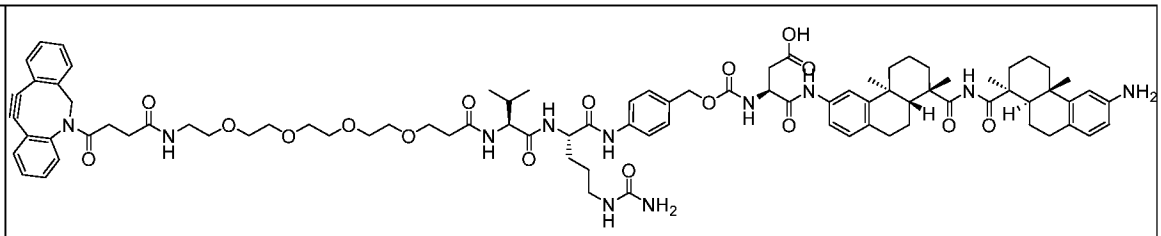
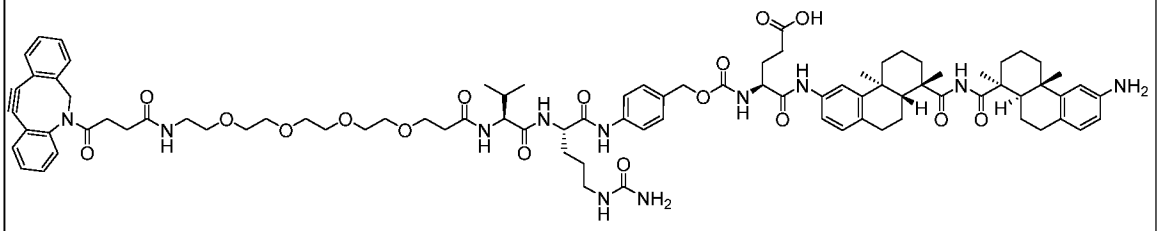
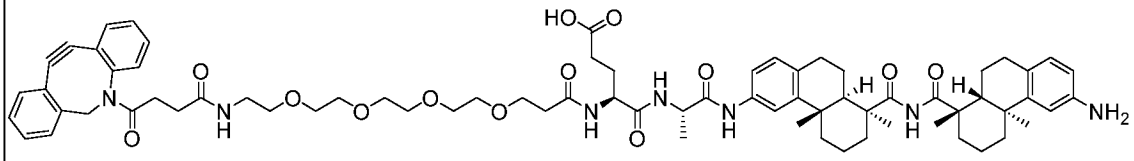
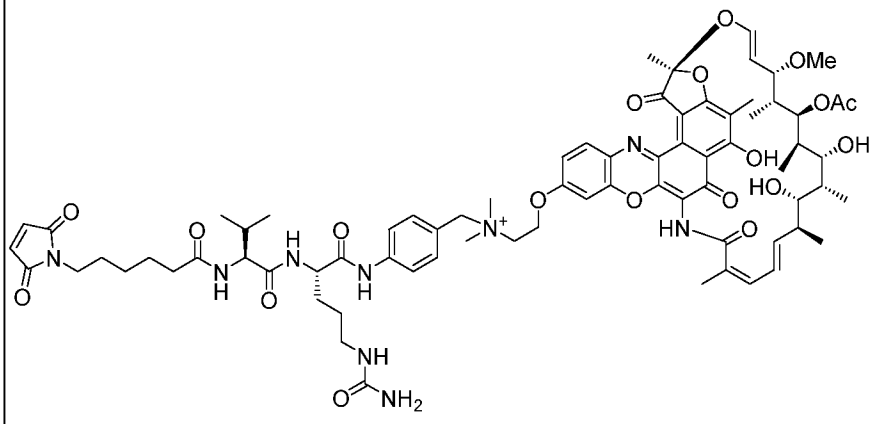
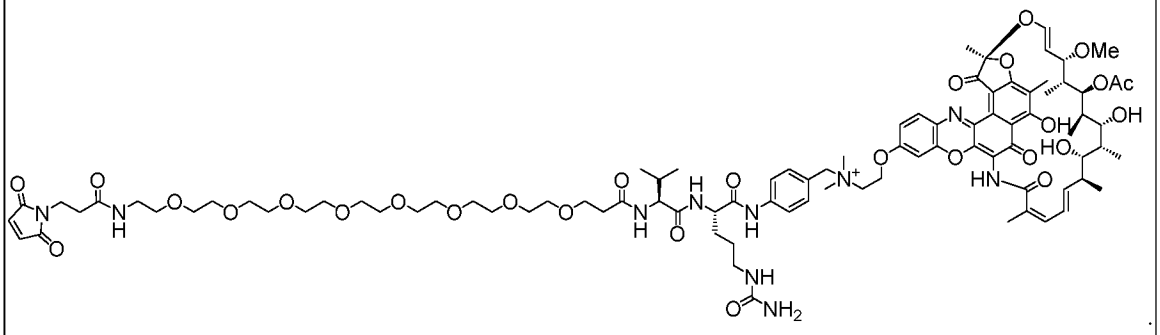
LP20 A	
LP21 A	
LP22 A	
LP23 A	
LP24 A	

LP25 A	
LP26 A	
LP27 A	
LP28 A	

LP29 A	
LP30 A	
LP31 A	
LP1B	

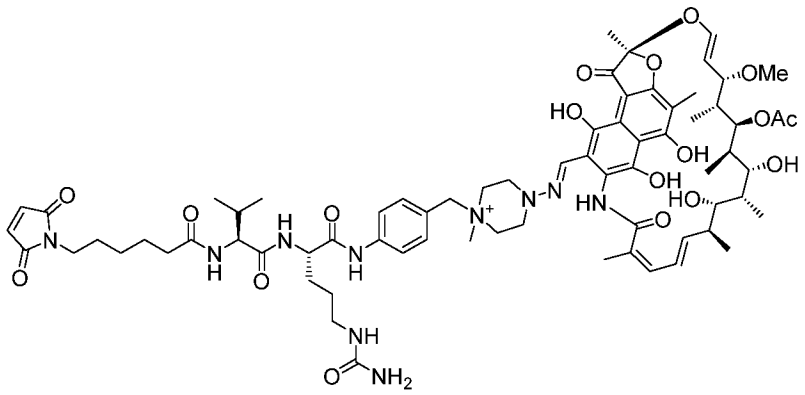
LP2B	
LP3B	
LP4B	

LP5B	
LP6B	
LP7B	
LP8B	
LP9B	

LP10 B	
LP11 B	
LP12 B	
R20	 и
R25	

[0354] Соединения в вышеприведенных таблицах могут быть приготовлены так, как описано в Примерах в настоящем документе.

[0355] Также здесь представлен метод приготовления конъюгата антитело-лекарственное средство аналога рифамицина (например, рифампицина), включающий этап воздействия на антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент линкер-нагрузкой согласно Формуле (**D**):



Формула (**D**).

в условиях, подходящих для образования связи между антителом к MSR1 или его антиген-связывающим фрагментом.

Картирование эпитопов и соответствующие технологии

[0356] Эпитоп, с которым связываются антитела по настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка MSR1. В качестве варианта, такой эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) MSR1. В некоторых вариантах осуществления такой эпитоп расположен на домене связывания модифицированного ЛПНП MSR1 или рядом с ним. В других вариантах осуществления этот эпитоп расположен за пределами домена связывания модифицированного ЛПНП MSR1, например, в месте на поверхности MSR1, в котором антитело, связанное с таким эпитопом, не влияет на связывание модифицированного ЛПНП с MSR1.

[0357] Для определения того, "взаимодействует ли антитело с одной или более аминокислотами" в полипептиде или белке, могут применяться различные методы, известные специалистам в данной области. Иллюстративные методы включают, например, стандартный эпитоп-перекрестный конкурентный анализ, например, описанный в работе Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), мутационный анализ методом сканирования аланином, пептидный блот-анализ (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, могут применяться такие методы, как исключение эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496). Другой метод, который

может применяться для определения аминокислот в полипептиде, с которыми взаимодействует антитело - метод водородно-дейтериевого обмена, определяемого масс-спектрометрией. В общем, метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Далее комплекс белок/антитело переносят в воду для осуществления водородно-дейтериевого обмена на всех остатках за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются меченными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, выявляя таким образом меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem. 73*:256A-265A.

[0358] Варианты осуществления включают антитела к MSR1, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных здесь (например, антитела, содержащие любые из аминокислотных последовательностей, которые изложены в Таблице 4 в настоящем документе). Аналогичным образом, варианты осуществления также включают антитела к MSR1, которые конкурируют за связывание с MSR1 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных здесь (например, антитела, содержащие любые из аминокислотных последовательностей, которые изложены в Таблице 4 в настоящем документе).

[0359] Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом или конкурирует ли оно за связывание с эталонным антителом к MSR1, при помощи стандартных методов, известных в данной области и представленных здесь например, в Примере 7. Например, чтобы определить, связано ли анализируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к MSR1, описанное здесь, эталонному антителу позволяют связаться с белком MSR1. Далее анализируют способность анализируемого антитела связываться с молекулой MSR1. Если анализируемое антитело способно связываться с MSR1 после насыщающего связывания с эталонным антителом к MSR1, можно заключить, что анализируемое антитело связывается с другим эпитопом, а не с тем, с которым связывается эталонное антитело к MSR1. С другой стороны, если анализируемое антитело не способно связываться с молекулой MSR1 после насыщающего связывания с эталонным антителом к MSR1, тогда анализируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, с которым связывается эталонное антитело к MSR1 по изобретению. Затем могут быть проведены дополнительные стандартные эксперименты (например, анализы пептидной мутации и связывания) для проверки того, имеет ли место наблюдаемое отсутствие связывания анализируемого

антитела, фактически, из-за связывания с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и вызвано ли отсутствие наблюдаемого связывания пространственным блокированием (или другим явлением). Эксперименты такого рода могут выполняться при помощи ELISA, RIA, Biacore, поточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, известных в области. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого минимум на 50%, но предпочтительно 75%, 90% или даже 99%, согласно измерениям в конкурентно-связывающем анализе (см., например, Junghans *et al.*, Cancer Res. 1990:50:1495-1502). В качестве варианта, считается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если, главным образом, все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или разрушают связывание одного антитела, уменьшают или разрушают связывание другого. Считается, что два антитела имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только одно подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или разрушают связывание одного антитела, уменьшают или разрушают связывание другого.

[0360] Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание (или кросс-конкурирует за связывание) с эталонным антителом к MSR1, применяется описанная выше методология связывания в двух ориентациях. В первой ориентации эталонному антителу позволяют связаться с белком MSR1 в насыщающих условиях с последующим анализом связывания анализируемого антитела с молекулой MSR1. Во второй ориентации анализируемому антителу позволяют связаться с молекулой MSR1 в насыщающих условиях с последующим анализом связывания эталонного антитела с молекулой MSR1. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой MSR1, тогда делается вывод о том, что анализируемое антитело конкурирует за связывание с MSR1. Как известно специалисту в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, не обязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, одно оно может пространственно блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания с перекрывающимся или соседним эпитопом.

Приготовление человеческих антител

[0361] Описанные здесь антитела к MSR1 могут быть полностью человеческими антителами. В данной области известны способы создания моноклональных антител, включая полностью человеческие моноклональные антитела. Любые такие известные способы могут применяться в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с человеческим MSR1.

[0362] При использовании, например, технологии VELOCIMMUNE™ или любого другого аналогичного способа создания полностью человеческих моноклональных антител первоначально выделяют высокоафинные химерные антитела к MSR1, имеющие вариабельную область человека и константную область мыши. Как в нижеприведенной экспериментальной части, антитела характеризуют и отбирают на основании желаемых характеристик, включая аффинность, лиганд-блокирующее действие, селективность, эпитоп и т.д. При необходимости константные области мыши заменяют желаемой константной областью человека, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированными IgG1 или IgG4, для создания полностью человеческого антитела к MSR1. При том, что выбранная константная область может различаться согласно конкретному применению, характеристики высокоафинного связывания антигена и целевой специфичности относятся к вариабельной области. В определенных случаях полностью человеческие антитела к MSR1 выделяют напрямую из антиген-положительных B-клеток.

Биоэквиваленты

[0363] Описанные здесь антитела к MSR1 и антиген-связывающие фрагменты включают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от аминокислотных последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связываться с человеческим MSR1. Такие вариантные антитела и фрагменты антител содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но демонстрируют биологическое действие, которое по существу эквивалентно биологическому действию описанных антител. Аналогичным образом, последовательности ДНК, кодирующие антитело к MSR1, описанные здесь, включают последовательности, которые содержат одно или более добавлений, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с описанной последовательностью, но которые кодируют антитело к MSR1 или фрагмент антитела, которые по существу биоэквивалентны описанным здесь антителу к MSR1 или фрагменту антитела. Примеры таких вариантных аминокислотных и ДНК последовательностей описаны выше.

[0364] Два антиген-связывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и объем абсорбции которых не демонстрируют значительного различия при введении одной и той же молярной дозы в аналогичных экспериментальных условиях, независимо от того, одна ли это доза или несколько доз. Некоторые антитела считаются эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны в объеме их абсорбции, но не в их скорости их

абсорбции и все еще могут считаться биоэквивалентными, потому что такие различия в скорости абсорбции являются намеренными и отражаются в информации по препарату, не являются значимыми для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении и считаются не значимыми в медицинском отношении для конкретного исследованного лекарственного продукта.

[0365] В одном варианте осуществления два антиген-связывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

[0366] В одном варианте осуществления два антиген-связывающих белка являются биоэквивалентными, если для пациента один или несколько раз можно осуществлять переключение между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого повышения риска неблагоприятных явлений, включая клинически значимое изменение в иммуногенности, или снижения эффективности по сравнению с продолжением лечения без такого переключения.

[0367] В одном варианте осуществления два антиген-связывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют с общим механизмом или механизмами действия для условия или условий применения в соответствии с известными данными о таких механизмах.

[0368] Биоэквивалентность может быть продемонстрирована методами *in vivo* и *in vitro*. Средства измерения биоэквивалентности включают, например, (a) анализ *in vivo* для человека или других млекопитающих, при котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости в зависимости от времени; (b) анализ *in vitro*, который на достаточных основаниях является прогностическим для данных по биодоступности для человека *in vivo* и для которого была выявлена такая связь; (c) анализ *in vivo* для человека или других млекопитающих, при котором соответствующее немедленное фармакологическое действие антитела (или его мишени) измеряется в зависимости от времени; и (d) в контролируемом клиническом исследовании, в котором устанавливаются безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

[0369] Биоэквивалентные варианты антител к MSR1, которые описаны здесь, могут быть сконструированы, например, посредством осуществления различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не требующихся для биологического действия. Например, цистеиновые остатки, не имеющие значения для биологического действия, могут быть

удалены или заменены другими аминокислотами для предотвращения формирования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостов при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител к MSR1, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые нарушают или удаляют гликозилирование.

Селективность видов и кросс-реактивность видов

[0370] Согласно определенным вариантам осуществления, здесь представлены антитела к MSR1, которые связываются с человеческим MSR1, но не с MSR1 от других видов. Варианты осуществления также включают антитела к MSR1, которые связываются с человеческим MSR1 и с MSR1 от одного или более видов, которые не являются человеком. Например, описанные здесь антитела к MSR1 могут связываться с человеческим MSR1 и могут связываться или не могут связываться, в зависимости от обстоятельств, с MSR1 от одного или более видов, среди которых мышь, крыса, морская свинка, хомяк, песчанка, свинья, кошка, собака, кролик, коза, овца, корова, лошадь, верблюд, яванский макак, мартышка, макак-резус или шимпанзе. Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления, представлены антитела к MSR1, которые специфически связываются с MSR1 человека и MSR1 яванского макака (например, *Macaca fascicularis*). Другие описанные здесь антитела к MSR1 связываются с человеческим MSR1, но не связываются или лишь слабо связываются с MSR1 яванского макака.

Мультиспецифические антитела

[0371] Описанные здесь антитела могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифические антитела могут быть специфическими для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антиген-связывающие домены, специфические для более, чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244. Описанные здесь антитела -к MSR1 могут связываться или совместно экспрессироваться с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, посредством химического связывания, сплайсинга, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или более других молекулярных сущностей, таких как другое антитело или фрагмент антитела, в результате чего образуется биспецифическое или мультиспецифическое антитело со второй специфичностью связывания.

[0372] Варианты осуществления включают биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывается с человеческим MSR1, а другое плечо иммуноглобулина является специфическим для второго антигена. Плечо связывания с MSR1 может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, представленных в Таблице 4 настоящего документа. В определенных вариантах осуществления плечо связывания с MSR1 связывается с человеческим MSR1 и блокирует связывание модифицированного ЛПНП с MSR1. В других вариантах осуществления плечо связывания с MSR1 связывается с человеческим MSR1, но не блокирует связывание модифицированного ЛПНП с MSR1. В некоторых вариантах осуществления плечо связывания с MSR1 связывается с человеческим MSR1 и активирует сигнализацию MSR1. В других вариантах осуществления плечо связывания с MSR1 блокирует MSR1-опосредованную стимуляцию рецептора. Варианты осуществления также включают биспецифические антитела, в которых одно плечо антитела связывается с первым эпитопом человеческого MSR1, а другое плечо указанного антитела связывается со вторым различимым эпитопом человеческого MSR1.

[0373] Иллюстративный формат биспецифического антитела, который может применяться в контексте настоящего изобретения, включает применение первого домена C_H3 иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_H3 Ig, при этом первый и второй домены C_H3 Ig отличаются друг от друга минимум одной аминокислотой, и при этом различие минимум в одной аминокислоте уменьшает связывание биспецифического антитела с Белком А по сравнению с биспецифическим антителом без различия в аминокислотах. В одном варианте осуществления первый домен Ig C_H3 связывается с Белком А, а второй домен Ig C_H3 содержит мутацию, которая уменьшает или устраняет связывание Белка А, например, модификацию H95R (по нумерации экзонов ImgT; H435R по нумерации EU). Второй C_H3 может также содержать модификацию Y96F (по IMGT; Y436F по EU). Другие модификации, которые могут быть обнаружены во втором C_H3, включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, и V422I по EU) в случае с антителами IgG1; N44S, K52N, и V82I (IMGT; N384S, K392N, и V422I по EU) в случае с антителами IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, и V422I по EU) в случае с антителами IgG4. Вариации для описанного здесь формата биспецифического антитела рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

[0374] Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые могут применяться в контексте настоящего изобретения, включают, помимо прочего, например, scFv-основанный формат или биспецифический формат диатела, IgG-scFv слияния, (DVD)-Ig с двойным вариабельным доменом, квадрому, выступы-во-впадины, общую легкую цепь

(например, общую легкую цепь с выступами-во-впадины и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, лейциновую "молнию"", дуотело, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и Mab^2 биспецифические форматы (см. анализ вышеуказанных форматов, например, в Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1-11, и указанные там источники). Биспецифические антитела также могут конструировать при помощи конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, когда неприродные аминокислоты с ортогональной химической реактивностью применяют для создания сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самоорганизуются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, , Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [*Epub*: *Dec. 4, 2012*]).

Терапевтический состав и введение

[0375] Варианты осуществления связаны с фармацевтическими композициями, содержащими описанные здесь антитела к MSR1 или их антиген-связывающие фрагменты. Фармацевтические композиции по изобретению составляются с применением подходящих носителей, вспомогательных веществ и других средств, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и подобные им характеристики. Различные подходящие составы можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липид-содержащие (катионные или анионные) везикулы (такие, как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Карлсбад, Калифорния), ДНК конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", карбовакс (полиэтиленгликоли с различным молекулярным весом), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Также см. Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[0376] Доза антитела, вводимая пациенту, может различаться в зависимости от возраста и веса и площади поверхности тела пациента, заболевания, состояний, способа введения и других факторов. Предпочтительная доза обычно рассчитывается в соответствии с весом тела или площадью поверхности тела. Для взрослого пациента может быть предпочтительно вводить антитело по настоящему изобретению обычно одной дозой от около 0.01 до около 20 мг/кг массы тела, предпочтительнее от около 0.02 до около 7, от около 0.03 до около 5 или от около 0.05 до около 3 мг/кг массы тела. Частоту и продолжительность лечения можно регулировать в зависимости от тяжести состояния. Эффективные дозировки и схемы введения антител к MSR1 могут определяться эмпирическим путем; например, можно контролировать состояние пациента посредством регулярного обследования и соответствующим образом

корректировать дозу. Более того, можно выполнять межвидовое приведение дозировок с использованием известных в данной области методов (например, Mordenti *et al.*, 1991, *Pharmaceut. Res. 8*:1351).

[0377] Различные системы доставки известны и могут применяться для введения описанных здесь фармацевтических композиций, например, капсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, , Wu *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, помимо прочего, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный способы. Композиция может вводиться любым удобным способом, например, посредством инфузии или болюсной инъекции, посредством абсорбции через эпителиальный и кожно-слизистый покровы (например, слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и кишечника) и могут вводиться вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным.

[0378] Описанная здесь фармацевтическая композиция может доставляться подкожно или внутривенно при использовании стандартной иглы и шприца. Кроме того, касательно подкожной доставки, при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению может применяться шприц-ручка. Такая шприц-ручка может быть многоразовой или одноразовой. В многоразовой шприц-ручке обычно применяется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как была доставлена вся фармацевтическая композиция в картридже и картридж опустел, пустой картридж можно сразу же утилизировать и заменить на новый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручку можно использовать повторно. В одноразовой шприц-ручке нет сменного картриджа. Одноразовая шприц-ручка поставляется уже заполненной фармацевтической композицией, находящейся в резервуаре в шприц-ручке. После того, как фармацевтическая композиция из резервуара вводится пациенту, все устройство утилизируют.

[0379] Для подкожной доставки описанной здесь фармацевтической композиции могут применяться различные многоразовые шприц-ручки и автоинъекторы. Примеры включают, помимо прочего, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Объединенное Королевство), ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бергдорф, Швейцария), ручку HUMALOG MIX 75/25™, ручку HUMALOG™, ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианополис, Индиана, США), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси, США), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™

и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Франкфурт, Германия) и многие другие. Примеры одноразовых шприц-ручек, применяемых для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Амген, Таузенд-Окс, Калифорния, США), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Абботт-Парк, Иллинойс, США) и многие другие.

[0380] В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может доставляться в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может применяться насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления могут применяться полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Еще в одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может располагаться вблизи от мишени композиции, в связи с чем требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением описаны в исследовании Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

[0381] Инъекционные препараты могут включать дозированные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д . Эти инъекционные препараты могут быть приготовлены при применении общеизвестных методов. Например, инъекционные препараты могут быть приготовлены посредством растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, которые традиционно применяются для инъекций. В качестве водной среды для инъекций применяются, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые могут использоваться в комбинации с соответствующим солюбилизирующим средством, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды применяются, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые могут использоваться в комбинации с солюбилизирующим средством, например, бензилбензоатом, бензиловым спиртом и т.д. Приготовленную таким образом инъекцию предпочтительно помещают в подходящую ампулу.

[0382] Предпочтительно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, подготавливают в дозированных формах с единичной дозой в соответствии с дозой активных ингредиентов. Такие дозированные формы с единичной дозой включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося указанного выше антитела обычно составляет от около 5 до около 500 мг на дозированную форму с единичной дозой; особенно в форме инъекции предпочтительно, чтобы указанное выше антитело содержалось в количестве от около 5 до около 100 мг и в количестве от около 10 до около 250 мг для других дозированных форм.

Терапевтические применения антител

[0383] Варианты осуществления включают способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтической композиции, содержащей антитело к MSR1 или конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий антитело к MSR1 (например, антитело к MSR1 или конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в Таблице 4 в настоящем документе). Терапевтическая композиция может содержать любые из антител к MSR1, их антиген-связывающие фрагменты или конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные здесь (например, конъюгаты антитело-лекарственное средство Формулы (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**III**), (**3000**), (**5001**), (**5002**), (**5003**), (**5004**), (**6001**), (**6002**), (**6003**), (**6004**), (**6005**), (**7001**), (**7002**), (**7003**), (**7004**) и/или (**7005**)) и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

[0384] Описанные здесь антитела и конъюгаты антитело-лекарственное средство полезны, *inter alia*, для лечения, профилактики и/или уменьшения интенсивности симптомов любого заболевания или нарушения, ассоциируемого с экспрессией или активностью MSR1 или опосредованного ими, или поддающихся лечению посредством связывания MSR1 без конкурирования против модифицированного ЛПНП и/или промотирования интернализации рецептора MSR1 и/или снижения числа рецепторов клеточной поверхности. Например, описанные здесь антитела и конъюгаты антитело-лекарственное средство полезны для лечения, ослабления или уменьшения интенсивности симптомов атеросклероза, пролиферативных нарушений, нейродегенеративных заболеваний и воспаления посредством целенаправленного воздействия на клетки, которые экспрессируют MSR1 и/или которые реагируют на опосредованную MSR1 сигнализацию, , макрофаги.

[0385] В контексте описанных здесь способов антитело к MSR1 или его конъюгат антитело-лекарственное средство могут вводиться в качестве монотерапии (т.е. в

качестве единственного терапевтического средства) или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами (примеры которых описаны в настоящем документе).

[0386] Здесь представлен способ лечения пролиферативного заболевания, нарушения метаболизма, воспаления, нейродегенеративного заболевания или заболевания, нарушения или состояния, ассоциированного с сигнализацией глюкокортикоидного рецептора, у субъекта, включающий введение субъекту эффективного терапевтического количества описанного здесь соединения (например, конъюгата антитело к MSR1-лекарственное средство) или фармацевтической композиции, включающей описанное здесь соединение.

[0387] В некоторых вариантах осуществления, когда нагрузкой является стероид, таким заболеванием, нарушением или состоянием является аллергическое состояние, включая, помимо прочего, астму, атопический дерматит, контактный дерматит, аллергический дерматит, реакции гиперчувствительности к лекарственному препарату, анафилактический ринит, круглогодичный или сезонный аллергический ринит и сывороточную болезнь; дерматологические заболевания и состояния, включая, помимо прочего, кожный зуд, себорейный дерматит, нейродерматит, экзему, герпетиформный буллезный дерматит, эксфолиативную эритродермию, фунгоидный микоз, пемфигус и тяжелую мультиформную эритему (синдром Стивенса–Джонсона); нарушения со стороны эндокринной системы, включая, помимо прочего, первичную или вторичную адренокортикальную недостаточность, врожденную гиперплазию надпочечников, гиперкальцемию, ассоциированную с раком, и негнойный тиреоидит; заболевания желудочно-кишечного тракта; гематологические нарушения, включая, помимо прочего, приобретенную аутоиммунную гемолитическую анемию, врожденную (эритроидную) гипопластическую анемию (синдром Даймонда-Блэкфана), идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру у взрослых, истинную эритроцитарную аплазию и вторичную тромбоцитопению; трихинеллез; туберкулезный менингит с субарахноидальным блоком или развивающимся блоком; неопластические заболевания, включая, помимо прочего, лейкемии и лимфомы; заболевания нервной системы, включая, помимо прочего, острые приступы рассеянного склероза, отек мозга, ассоциированный с первичной или метастатической опухолью головного мозга, краниотомию или травму головы; офтальмологические заболевания, включая, помимо прочего, метастатическую офтальмию, височный артериит, увеит, ксерофтальмию и глазные воспалительные состояния, не поддающиеся лечению местными кортикостероидами; заболевания почек, включая, помимо прочего, для индуцирования диуреза или ремиссии протеинурии при идиопатическом нефротическом синдроме или обусловленные эритематозной волчанкой;

респираторные заболевания, включая, помимо прочего, бериллиоз, прогрессирующий или диссеминированный туберкулез легких при одновременном применении с соответствующей противотуберкулезной химиотерапией, идиопатические эозинофильные пневмонии, симптоматический саркоидоз; и ревматические заболевания, включая, помимо прочего, применение в качестве дополнительной терапии для кратковременного введения (для купирования острого приступа или обострения у пациента) при остром подагрическом артрите, остром ревматическом кардите, анкилозирующем спондилите, псориатическом артрите, ревматоидном артрите, включая ювенильный ревматоидный артрит, и для применения при дерматомиозите, полимиозите, стоматите и системной красной волчанке. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики артрита.

[0388] В некоторых вариантах осуществления здесь изложен способ лечения заболевания, нарушения или состояния, которые выбираются из аутоиммунного заболевания, аллергии, артрита, астмы, нарушения дыхания, заболевания крови, рака, коллагеновой болезни, заболеваний соединительной ткани, дерматологического заболевания, глазного заболевания, нарушения работы эндокринной системы, иммунологического заболевания, воспалительного заболевания, кишечных нарушений, заболевания желудочно-кишечного тракта, неврологического нарушения, состояния при трансплантации органов, ревматоидного заболевания, кожного заболевания, состояния отека, состояния заживления раны и их комбинации, включающий введение стероидной нагрузки или ее конъюгата, которые здесь описаны.

[0389] В некоторых вариантах осуществления такое аутоиммунное заболевание выбирается из множественного склероза, аутоимунного гепатита, опоясывающего лишая, системной красной волчанки, миастении гравис, миодистрофии Дюшенна и саркоидоза. В некоторых вариантах осуществления нарушение дыхания выбирается из астмы, хронического респираторного заболевания, хронической обструктивной болезни легких, бронхиального воспаления и острого бронхита. В некоторых вариантах осуществления такой рак выбирается из лейкемии, лимфобластической лейкемии, острой лимфобластической лейкемии, хронической лимфобластической лейкемии, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы и множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления такой коллагеновой болезнью является системная красная волчанка. В некоторых вариантах осуществления таким глазным заболеванием является кератит. В некоторых вариантах осуществления такое нарушение работы эндокринной системы выбирается из болезни Аддисона, недостаточности надпочечников, дисфункции коры надпочечников, адренокортикальной гипеплазии и врожденной гиперплазии надпочечников. В некоторых вариантах осуществления такое воспалительное

заболевание выбирается из воспаления после хирургической операции по удалению катаракты, воспаления суставов, иммунного воспаления, воспаления связок, бурсита, эпикондилита, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, липидного пневмонита, тироидита, крапивницы, перикардита, нефротического синдрома и увеита. В некоторых вариантах осуществления такое кишечное заболевание выбирается из коллагенозного колита, язвенного колита, болезни Крона и воспалительного заболевания кишечника. В некоторых вариантах осуществления такое ревматоидное заболевание выбирается из ревматоидного артрита, ревматической полимиалгии, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и системной красной волчанки. В некоторых вариантах осуществления такое кожное заболевание выбирается из псориаза, экземы и дерматита при контакте с сумахом укореняющимся. В некоторых вариантах осуществления таким неврологическим заболеванием является хроническая воспалительная демиелинизирующая полирадикулонейропатия.

[0390] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь соединения вводятся пациенту для лечения острого воспалительного события, включая, помимо прочего, шок, отек головного мозга и болезнь "трансплантат против хозяина". В некоторых вариантах осуществления описанные здесь соединения вводятся для лечения лимфотических эффектов, включая, помимо прочего, эффекты, ассоциируемые со злокачественными заболеваниями системы крови, например, лейкемиями, лимфомами и миеломами.

[0391] В некоторых вариантах осуществления здесь изложен способ уменьшения воспаления у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества стероида или его конъюгата, которые здесь описаны. В некоторых вариантах осуществления здесь изложен способ для модуляции иммунной системы нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества стероида или его конъюгата, которые здесь описаны. В некоторых вариантах осуществления здесь изложен способ для модуляции уровней кортизола у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества стероида или его конъюгата, которые здесь описаны. В некоторых вариантах осуществления здесь изложен способ уменьшения миграции лимфоцитов у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества стероида или его конъюгата, которые здесь описаны. В некоторых вариантах осуществления здесь изложен способ лечения гиперкальцемии из-за рака, болезни Меньера, мигрени, кластерной головной боли, афтозной язвы тяжелой степени, ларингита, туберкулеза тяжелой степени, реакции Герксхаймера на сифилис, декомпенсированной сердечной недостаточности,

аллергического ринита или носовых полипов, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества стероида или его конъюгата, которые здесь описаны. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь соединения могут применяться для лечения воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона или язвенного колита. В некоторых вариантах осуществления таким заболеванием, нарушением или состоянием является хроническое воспалительное состояние, включая, помимо прочего, астму, кожные инфекции и глазные инфекции. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь соединения применяются для иммуносуппрессии у пациентов, для которых выполняется трансплантация органов.

[0392] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь стероидные нагрузки и их конъюгаты вводятся пациенту для лечения заболевания нервной системы, ассоциируемого с сигнализацией ГР, включая, помимо прочего, психиатрические нарушения, такие как шизофрения, наркомания, посттравматическое стрессовое расстройство и расстройства настроения, злоупотребление наркотическими и психотропными средствами, стресс и тревожность.

[0393] В некоторых вариантах осуществления описанные здесь стероидные нагрузки и их конъюгаты вводятся пациенту для лечения заболевания зрительной системы, включая, помимо прочего, воспаление глаза (например, конъюктивит, кератит, увеит), макулярный отек и макулярную дегенерацию. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь стероидные нагрузки и их конъюгаты вводятся пациенту для лечения заболевания сердечно-сосудистой системы. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь стероидные нагрузки и их конъюгаты вводятся пациенту для лечения нарушения метаболизма глюкозы и/или печеночного метаболизма. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь стероидные нагрузки и их конъюгаты вводятся пациенту для лечения заболевания опорно-двигательной системы. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь стероидные нагрузки и их конъюгаты вводятся пациенту для лечения состояния кожного воспаления, такого как экзема и псориаз.

[0394] Описанные здесь белковые конъюгаты являются средством для направленной доставки стероидной нагрузки к определенным клеткам или системам органов, что снижает или предотвращает побочные действия, возникающие в результате введения свободной неконъюгированной стероидной нагрузки. Примеры таких потенциальных побочных действий, которые требуется уменьшить или предотвратить, включают побочные действия, перечисленные в утвержденной инструкции по применению лекарственного препарата для Decadron® (дексаметазона), которая включается в настоящий документ полностью посредством ссылки. В некоторых вариантах

осуществления побочное действие, которое требуется уменьшить или предотвратить, выбирается из повышения артериального давления; задержки натрия; задержки воды/жидкости (отека, ангиоэдемы, отека легких); повышенной экскреции калия; обратимого подавления гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси; потенциальной кортикостероидной недостаточности после отмены лечения; восприимчивости к инфекциям; обострения системных грибковых инфекций; повышения степени тяжести ветряной оспы у пациентов детского возраста и взрослых пациентов; повышения степени тяжести кори у пациентов детского возраста и взрослых пациентов; задней субкапсулярной катаракты; глаукомы с возможным повреждением зрительных нервов; усиления развития вторичных глазных инфекций из-за бактерий, грибов или вирусов; повышения частоты новых эпизодов неврита зрительного нерва; саркомы Капоши; обусловленной действием лекарственного средства вторичной недостаточности коры надпочечников; повышенного риска перфорации при активной или скрытой язвенной болезни, дивертикулита, недавних энтероэнтеростомий и неспецифического язвенного колита; перитонеального раздражения после перфорации желудочно-кишечного тракта; пониженного остеогенеза; повышенной костной резорбции; ингибирования функции остеобластов; инибирования роста кости у пациентов детского возраста; развития остеопороза в любом возрасте; острой миопатии (возможно, затрагивающей глазные и дыхательные мышцы и потенциально приводящей к квадрипарезу); повышения креатинин-киназы; психических нарушений, от эйфории, бессонницы, перепадов настроения, изменений личности и тяжелой депрессии до развернутого психоза; усугубления имеющейся эмоциональной нестабильности или склонностей к психозу; повышенного внутриглазного давления; брадикардии; остановки сердца; сердечной аритмии; увеличения сердца; сосудистой недостаточности; застойной недостаточности кровообращения; жировой эмболии; гипертензии; гипертрофической кардиомиопатии у недоношенных новорожденных; перфорации миокарда после недавно перенесенного инфаркта миокарда; синкопы; тахикардии; тромбоэмболии; тромбофлебита; васкулита; акне; аллергического дерматита; отрубевидного лишая; экхимоз и петехий; эритемы; нарушения заживления ран; повышенного потоотделения; сыпи; стрий; подавления реакций на кожные тесты; тонкой дряблой кожи; поредения волос на голове; крапивницы; пониженной переносимости углеводов и глюкозы; развития кушингоидного состояния; гипергликемии; гликозурии; гирсутизма; гипертрихоза; повышенной потребности в инсулине или пероральных гипогликемических средствах при диабете (резистентности к инсулину); проявлений скрытого сахарного диабета; нарушений менструального цикла; вторичной адренокортикальной и гипофизарной невосприимчивости (особенно во время стресса; как при травме; хирургической операции или заболевании); подавления роста пациентов детского возраста; застойной сердечной недостаточности у восприимчивых

пациентов; задержки жидкости; гипокалиемического алкалоза; потери калия; задержки натрия; вздутия живота; повышения в уровнях ферментов печени в сыворотке (обычно обратимого при прекращении); гепатомегалии; повышенного аппетита; тошноты; панкреатита; язвенной болезни с возможной перфорацией и геморрагией; перфорации тонкого и толстого кишечника (особенно у пациентов с воспалительным заболеванием кишечника); язвенного эзофагита; отрицательного азотистого баланса из-за катаболизма белка; асептического некроза головок бедренной и плечевой костей; потери мышечной массы; слабости в мышцах; остеопороза; патологического перелома длинных костей; стероидной миопатии; разрыва сухожилия; компрессионных переломов позвоночника; конвульсий; депрессии; эмоциональной нестабильности; эйфории; головной боли; повышенного внутричерепного давления с отеком диска зрительного нерва (идиопатической внутричерепной гипертензии), обычно имеющей место после прекращения лечения; бессонницы; перепадов настроения; неврита; нейропатии; парестезии; изменений личности; психических нарушений; вертиго; экзофтальма; глаукомы; повышенного внутриглазного давления; задних субкапсулярных катаракт; аномальных жировых отложений; пониженной резистентности к инфекциям; икоты; повышенной или пониженной подвижности и числа сперматозоидов; общего недомогания; лунообразного лица; и прибавки в весе; и побочных действий, ассоциируемых с межлекарственным взаимодействием. В некоторых вариантах осуществления побочными действиями, которые требуется уменьшить или предотвратить, являются побочные действия, ассоциируемые с межлекарственными взаимодействиями. В некоторых вариантах осуществления побочное действие, которое требуется уменьшить или предотвратить, ассоциируется с межлекарственными взаимодействиями при применении кортикостероида с аминоглутетимидом, включая снижение подавления функции коры надпочечников при помощи кортикостероидов; инъекции амфотерицина В и калий-несберегающих средств, включая развитие гипокалемии, увеличение сердца и застойную сердечную недостаточность; антибиотиков, включая значительное снижение в клиренсе кортикостероидов; антихолинэстеразных средств, включая сильную слабость у пациентов с миастенией гравис; пероральных антикоагулянтов, включая ингибирование ответа на варфарин; антидиабетических средств, включая повышенные концентрации глюкозы в крови; противотуберкулезных препаратов, включая сниженные концентрации изониазида в сыворотке; холестирамина, включая повышенный клиренс кортикостероидов; циклоспорина, включая повышенную активность и циклоспорина, и кортикостероидов, и частоту возникновения конвульсий; нарушения теста подавления дексаметазона, включая ложно-отрицательные результаты у пациентов, получавших лечение индометацином; дигиталисных гликозидов, включая повышенный риск аритмий из-за гипокалемии; эфедрина, включая повышение

метаболического клиренса кортикостероидов, что приводит к пониженным уровням в крови и сниженной физиологической активности; эстрогенов, включая пероральные контрацептивы, включая сниженный печеночный метаболизм определенных кортикостероидов и соответствующее повышение их воздействия; индукторов, ингибиторов и субстратов печеночных ферментов (лекарственных средств, которые индуцируют активность фермента цитохрома P450 3A4 (CYP 3A4), например, барбитуратов, фенитоина, карбамазепина, рифампина), включая повышение метаболизма кортикостероидов; лекарственных средств, которые ингибируют CYP 3A4 (например, кетоконазола, макролидных антибиотиков, таких как эритромицин), включая возможность повышения концентраций кортикостероидов в плазме; лекарственных средств, которые метаболизируются CYP 3A4 (например, индинавира, эритромицина), включая повышение в их клиренсе, что приводит к снижению концентрации в плазме; кетоконазола, включая пониженный метаболизм определенных кортикостероидов до 60%, что приводит к повышенному риску появления побочных действий кортикостероидов, и ингибирование синтеза адреналовых кортикостероидов, что может вызвать недостаточность коры надпочечников при прекращении приема кортикостероидов; нестероидных противовоспалительных средств, включая повышенный риск развития побочных действия для желудочно-кишечного тракта и повышенный клиренс салицилатов; фенитоина, включая повышения или понижения в уровне фенитоина, изменение контроля припадков; кожных проб, включая подавление реакций на кожные пробы; талидомида, включая токсический эпидермальный некролиз; и вакцин, включая сниженный ответ на токсоиды, и живых или инактивированных вакцин из-за ингибирования ответа антител или потенцирования репликации некоторых организмов, содержащихся в живых аттенуированных вакцинах).

[0395] Таким образом, здесь представлены способы лечения заболевания, нарушения или состояния, ассоциируемых с глюкокортикоидным рецептором, включающие введение конъюгата Формулы (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), Формулы (**III**) или Формулы (**3000**) пациенту с таким заболеванием, нарушением или состоянием, при которых побочные действия, ассоциируемые с введением свободной стероидной нагрузки указанного конъюгата, уменьшаются. Более того, здесь представлены способы доставки соединения Формулы (**III**) или Формулы (3000) в клетку, включающие воздействие на указанную клетку белковым конъюгатом соединения Формулы (3000) или Формулы (**III**), когда белковый конъюгат содержит антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются с поверхностным антигеном указанной клетки.

[0396] В некоторых примерах, когда нагрузкой является модулятор LXR, здесь представлен способ лечения заболевания, нарушения или состояния, включающий

введение пациенту с указанным нарушением терапевтически эффективного количества соединения и/или конъюгата антитело-лекарственное средство (например, ADC Формулы (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**5001**), (**5002**), (**5003**), (**5004**), (**6001**), (**6002**), (**6003**), (**6004**) или (**6005**)) или их фармацевтической композиции.

[0397] В некоторых примерах здесь представлен способ лечения заболевания, нарушения или состояния, включающий введение пациенту с указанным нарушением профилактически эффективного количества соединения и/или конъюгата антитело-лекарственное средство (например, ADC Формулы (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**5001**), (**5002**), (**5003**), (**5004**), (**6001**), (**6002**), (**6003**), (**6004**) или (**6005**) или их фармацевтической композиции.

[0398] В некоторых примерах здесь представлены способы лечения или профилактики заболевания, нарушения или состояния с ответом на модуляцию сигнализации LXR. В некоторых примерах такое заболевание или нарушение ассоциируется с функцией LXR, полиморфизмами LXR, агонистической активностью LXR или антагонистической активностью LXR. В некоторых примерах здесь представлен способ лечения или профилактики заболевания, нарушения или состояния, которые выбираются из группы, состоящей из пролиферативного заболевания, нейродегенеративного заболевания, иммунологического заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, дерматологического заболевания, нарушения обмена веществ, заболевания сердечно-сосудистой системы и заболевания желудочно-кишечного тракта.

[0399] Таким пролиферативным заболеванием может быть любое пролиферативное заболевание, известное специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления пролиферативные заболевания включают, помимо прочего, онкологические заболевания, при этом таким онкологическим заболеванием может быть любое раковое заболевание, известное специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики меланомы. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики метастатической меланомы. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики рака легких. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики рака легких с резистентностью к ингибиторам тирозинкиназы EGFR. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики рака ротовой полости. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики плоскоклеточной карциномы полости рта. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики рака простаты. В определенных вариантах осуществления здесь

представлены способы лечения или профилактики лимфомы Ходжкина. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики рака груди.

[0400] Таким нейродегенеративным заболеванием может быть любое нейродегенеративное заболевание, известное специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики болезни Альцгеймера. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики болезни Паркинсона. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики болезни Хантингтона. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики амиотрофического латерального склероза. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики экспрессии гена миелина. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики состояний, заболеваний или нарушений миелинизации и ремиелинизации.

[0401] Таким иммунологическим заболеванием может быть любое иммунологическое заболевание, известное специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики воспалительного заболевания кишечника. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики язвенного колита. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики болезни Крона.

[0402] Таким воспалительным заболеванием может быть любое воспалительное заболевание, известное специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики артрита. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики ревматоидного артрита.

[0403] Таким нарушением обмена веществ может быть любое нарушение обмена веществ, известное специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления таким нарушением обмена веществ является дислипидемия. Дислипидемией может быть любая дислипидемия, известная специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления дислипидемия выбирается из группы, состоящей из гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, гиперлипопротеинемии, дефицита ЛПВП, дефицита ApoA-I и заболевания сердечно-сосудистой системы, такого как ишемическая болезнь сердца (включая, например,

лечение и профилактику стенокардии, инфаркта миокарда и внезапной сердечной смерти); атеросклероза (включая, например, лечение и профилактику атеросклероза); и рестеноза (включая, например, профилактику или лечение атеросклеротических бляшек, которые появляются вследствие проведения медицинских процедур, таких как баллонная ангиопластика). В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики диабета.

[0404] Таким заболеванием сердечно-сосудистой системы может быть любое заболевание сердечно-сосудистой системы, известное специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики атеросклероза. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики атеросклероза, вызванного аномальным преобразованием в макрофагах. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики атеросклероза, вызванного образованием окисленных липопротеинов низкой плотности (окЛПНП), когда макрофаги не преобразовывают окЛПНП. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики ишемической болезни сердца. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики инсульта. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики гипертензивной болезни сердца. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики аневризмы аорты. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики эндокардита. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики заболевания периферических артерий. В определенных вариантах осуществления здесь представлены способы лечения или профилактики комбинаций любых заболеваний, представленных в данном пункте.

[0405] В некоторых примерах здесь изложен способ модуляции функции ядерного рецептора. В качестве неограничивающего примера, эта функция может быть выбрана из экспрессии/секреции медиаторов воспаления (например, цитокинов, хемокинов), регуляции холестерина, захвата холестерина, эффлюкса холестерина, окисления холестерина, миграции, хемотаксиса, апоптоза и некроза, воспалительной активности, регуляции липидов, апоптоза, миграции, хемотаксиса, генной транскрипции и экспрессии белков.

[0406] В некоторых примерах здесь представлен способ профилактики заболевания, нарушения или состояния, включающий введение пациенту с указанным заболеванием терапевтически эффективного количества соединения и/или конъюгата антитело-

лекарственное средство Формулы (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**7001**), (**7002**), (**7003**), (**7004**) и/или (**7005**) или их фармацевтической композиции.

[0407] *S. aureus* - факультативная внутриклеточная бактерия, которая может выжить в фагоцитозе макрофагами и клетками других типов (Horn, J., et al., *Inside job: Staphylococcus aureus host-pathogen interactions*. Int J Med Microbiol, 2018. 308(6): p. 607-624; Jubrail, J., et al., *Inability to sustain intraphagolysosomal killing of Staphylococcus aureus predisposes to bacterial persistence in macrophages*. Cell Microbiol, 2016. 18(1): p. 80-96). Интравитальная визуализация показала, что макрофаги могут служить резервуаром, где *S. aureus* воспроизводится и затем засевает другие органы во время инфекции (Surewaard, B.G., et al., *Identification and treatment of the Staphylococcus aureus reservoir in vivo*. J Exp Med, 2016. 213(7): p. 1141-51). Большинство антибиотиков не проникают в клетки, включая макрофаги, достаточно хорошо, что указывает на то, что на резервуар внутриклеточной *S. aureus* может не подействовать лечение стандартными антибиотиками (Lehar, S.M., et al., *Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular S. aureus*. Nature, 2015. 527(7578): p. 323-8). Однако липосомальная формула ванкомицина повысила проникновение антибиотика в макрофаги и снизила нагрузку на органы *S. aureus* более эффективно по сравнению со стандартным ванкомицином (Surewaard, B.G., et al., *Identification and treatment of the Staphylococcus aureus reservoir in vivo*. J Exp Med, 2016. 213(7): p. 1141-51). Вместе эти данные указывают на то, что доставка антибиотика в макрофаги может быть эффективным способом уничтожения резервуара внутриклеточной *S. aureus*.

[0408] Резистентная к антибиотикам S. aureus остается проблемой здравоохранения, и приблизительно 40% инфекций кровяного русла в США вызываются резистентной к метициллину S. aureus (MRSA). Для лечения инфекций кровяного русла MRSA существует мало вариантов, одобренных Административным управлением США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA), при этом предпочтительным антибиотиком остается ванкомицин. Несмотря на соответствующее лечение антибиотиками уровень смертности из-за инфекций кровяного русла, вызванных S. aureus, составляет ~18%, что является основанием для проведения исследований комбинаций, которые могут улучшить лечение.

[0409] Антибиотики класса рифамицина ингибируют бактериальную РНК-полимеразу (RNAP) и имеют эффективное действие против S. aureus. Тем не менее, монотерапия с использованием данного класса антибиотиков может привести к селекции резистентной популяции во время лечения. С связи с этим антибиотики класса рифамицина могут применяться в комбинации с антибиотиками первой линии для улучшения результатов лечения, обычно при инфекциях, связанных с протезами или инородными устройствами.

[0410] Описанные здесь конъюгаты антитело-лекарственное средство, включающие аналоги рифамицина, полезны для профилактики или лечения роста бактерии и/или бактериальной инфекции у субъекта. В некоторых случаях такой бактерией является грам-положительная бактерия (причиной такой бактериальной инфекции является грам-положительная бактерия). В некоторых случаях такой бактерией является бактерия, резистентная к пенициллину (причиной такой бактериальной инфекции является бактерия, резистентная к пенициллину). В некоторых случаях такой бактерией является *Staphylococcus aureus*, резистентная к метициллину бактерия *Staphylococcus aureus* (MRSA) (причиной такой бактериальной инфекции является бактерия MRSA). В некоторых случаях такой бактерией является восприимчивая к метициллину бактерия *Staphylococcus aureus* (MSSA) (причиной такой бактериальной инфекции является бактерия MSSA). В некоторых случаях такой бактерией является резистентная к ванкомицину бактерия *Staphylococcus aureus* (VRSA) (причиной такой бактериальной инфекции является бактерия VRSA). В некоторых случаях такой бактерией является мультирезистентная *M. tuberculosis* (причиной такой бактериальной инфекции является мультирезистентная бактерия *M. tuberculosis*). В других случаях такой бактерией является *Chlamydia trachomatis*, резистентная, например, к азитромицину (причиной такой бактериальной инфекции является бактерия*Chlamydia trachomatis*, резистентная, например, к азитромицину). В других случаях такой бактерией является *Clostridium difficile*, резистентная, например, к метронидазолу, ванкомицину и/или фидаксомицину (причиной такой бактериальной инфекции является бактерия*Clostridium difficile*, резистентная, например, к метронидазолу, ванкомицину и/или фидаксомицину).

[0411] Здесь представлен способ профилактики или лечения целлюлита, бактериемии, дермонекроза, инфекции глазного века, глазной инфекции, конъюнктивита новорожденных, остеомиелита, импетиго, фурункулеза, синдрома ошпаренной кожи, пищевого отравления, пневмонии, хирургической инфекции, инфекции мочевыводящей системы, ожоговой инфекции, менингита, эндокардита, септицемии, эндотоксического шока, септического артрита, мастита, инфекции, связанной с эндопротезом сустава, инфекции, связанной с катетером или инфекции, связанной с имплантатом, у субъекта, включающий введение субъекту эффективного терапевтического количества конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего аналог рифамицина (например, ADC Формулы (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**7001**), (**7002**), (**7003**), (**7004**) и/или (**7005**)). Также здесь представлен способ профилактики или лечения внутриклеточной бактериальной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного терапевтического количества конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего

аналог рифамицина (например, ADC Формулы (**I**), (**IA**), (**IB**), (**IB-1**), (**IB-2**), (**IC**), (**ID**), (**IE**), (**7001**), (**7002**), (**7003**), (**7004**) и/или (**7005**)).

[0412] В некоторых способах здесь представлены способы лечения, включающие введение антитела к MSR1, антиген-связывающей части антитела к MSR1 или конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего антитело к MSR1 или антиген-связывающий фрагмент антитела к MSR1 субъекту, нуждающемуся в таком лечении, которые являются полезными для лечения и/или профилактики бактериальной инфекции у субъекта и/или заболевания, или нарушения, или состояния, связанных со стафилококковой инфекцией , например, инфекцией *S. aureus*, и/или для уменьшения интенсивности минимум одного симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием. Таким заболеванием, нарушением или состоянием может быть целлюлит, бактериемия, дермонекроз, инфекция глазного века, глазная инфекция, конъюнктивит новорожденных, остеомиелит, импетиго, фурункулез, синдром ошпаренной кожи, пищевое отравление, пневмония, хирургическая инфекция, инфекция мочевыводящей системы, ожоговая инфекция, менингит, эндокардит, септицемия, эндотоксический шок или септический артрит. В некоторых случаях у субъекта имеется эндопротез сустава, и описанные здесь антитела применяются для лечения и/или профилактики инфекции *S. aureus* ткани, окружающей эндопротез сустава. В некоторых случаях у субъекта имеется катетер, и описанные здесь антитела применяются для лечения и/или профилактики инфекции *S. aureus* катетера и/или ткани, окружающей катетер. В некоторых случаях субъекту имплантировано инородное тело, и описанные здесь антитела применяются для лечения и/или профилактики инфекции *S. aureus* инородного тела и/или ткани, окружающей инородное тело. В некоторых случаях у субъекта имеется мастит, и описанные здесь антитела применяются для лечения мастита.

[0413] В некоторых случаях аналоги рифамицина и/или конъюгаты антитело к MSR1 - лекарственное средство вводятся в комбинации с одним или более антибиотиками (например, антибиотиками, которые могут применяться для лечения инфекций MRSA), такими как ванкомицин, триметоприм-сульфаметоксазол, тетрациклин, доксициклин/миноциклин, клиндамицин, цефалоспорины (например, цефалексин), нафициллин, фидаксомицин, линезолид и подобные, и/или любым другим подходящим антибиотиком (антибиотиками). В некоторых случаях описанные здесь конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие аналоги рифамицина, вводятся в комбинации с ванкомицином и являются полезными для профилактики или лечения бактериальной инфекции у субъекта.

Комбинированные терапии и составы

[0414] Варианты осуществления включают композиции и терапевтические составы, содержащие любые из описанных здесь антител к MSR1 в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций нуждающимся в этом субъектам.

[0415] Описанные здесь антитела к MSR1 могут комбинироваться в одном препарате и/или вводиться с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, которые выбираются из группы, состоящей из: ингибиторов цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов, и антител, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с их соответствующими рецепторами.

[0416] Описанные здесь антитела к MSR1 также могут вводиться и/или комбинироваться в одном препарате с противовоспалительными средствами, иммуномодулирующими средствами, обезболивающимися средствами, кортикостероидами, стероидами, антиоксидантами, ингибиторами ЦОГ-2, кардиозащитными средствами, металлохелатами, ИФН-гамма и/или нестероидными противовоспалительными препаратами. В некоторых вариантах осуществления антитела к MSR1 могут вводиться и/или комбинироваться в одном препарате с антителами к PCSK9, антителами к ANGPTL3, статинами, эзетимибом и другими липидоснижающими терапиями.

[0417] Такие дополнительные терапевтически активные компоненты, например, любые из средств, описанные выше, или их производные, могут вводиться непосредственно до, одновременно и непосредственно после введения описанного здесь антитела к MSR1; (для целей настоящего описания изобретения такие схемы введения считаются введением антитела к MSR1 "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом). Варианты осуществления включают фармацевтические композиции, в которых описанное здесь антитело к MSR1 комбинируется - с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, что описано в настоящем документе.

Схемы введения

[0418] Согласно определенным вариантам осуществления, несколько доз антитела -к MSR1 (или конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела -к MSR1 и любых дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в настоящем документе) могут вводиться субъекту в течение определенного периода времени. Такие способы включают

последовательное введение субъекту нескольких доз описанного здесь антитела к MSR1. В контексте настоящего документа "последовательное введение" означает то, что каждая доза антитела к MSR1 вводится субъекту в разное время, например, в разные дни, разделенные предустановленным временным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Варианты осуществления включают способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной первоначальной дозы антитела к MSR1, с последующей одной или более вторичными дозами антитела к MSR1 и необязательно с одной или более третичными дозами антитела к MSR1.

[0419] Термины "первоначальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" означают временную последовательность введения описанного здесь антитела к MSR1. Таким образом, "первоначальная доза" - доза, которая вводится в начале схемы лечения (она также называется "исходной дозой"); "вторичные дозы" - дозы, которые вводят после первоначальной дозы; а "третичные дозы" - дозы, которые вводят после вторичных доз. Первоначальная, вторичные и третичные дозы все могут содержать одинаковое количество антитела к MSR1, однако обычно они могут отличаться друг от друга в плане частоты введения. Тем не менее, в определенных вариантах осуществления количество антитела к MSR1, содержащееся в первоначальной, вторичных и/или третичных дозах, отличается (например, корректируется в большую или меньшую сторону в зависимости от обстоятельств) во время лечения. В определенных вариантах осуществления две дозы или более (например, 2, 3, 4 или 5) вводят в начале схемы лечения в качестве "ударных доз" с последующими дозами, которые вводят с меньшей частотой (например, "поддерживающие дозы").

[0420] В определенных иллюстративных вариантах осуществления каждая вторичная и/или третичная доза вводится в течение периода от 1 до 26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза" в контексте настоящего документа означает, в последовательности нескольких введений, дозу антитела к MSR1, которая вводится пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[0421] Способы согласно данному аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого числа вторичных и/или третичных доз антитела к MSR1. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводится однократная вторичная доза. В других вариантах осуществления пациенту вводятся две вторичные дозы или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более). Аналогичным образом, в определенных вариантах

осуществления пациенту вводится одна третичная доза. В других вариантах осуществления пациенту вводятся две третичные дозы или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более). Схема введения может соблюдаться неопределенный период времени на протяжении жизни конкретного субъекта или до того момента, как не будет терапевтической необходимости в таком лечении или оно перестанет быть эффективным.

[0422] В вариантах осуществления, включающих несколько вторичных доз, каждая вторичная доза может вводиться с той же частотой, как другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту в течение периода от 1 до 2 недель или от 1 до 2 месяцев после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом, в вариантах осуществления, включающих несколько третичных доз, каждая третичная доза может вводиться с той же частотой, как другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту в течение периода от 2 до 12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может меняться на протяжении схемы лечения. Частота введения также может корректироваться во время лечения врачом в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

[0423] Варианты осуществления включают схемы введения, в которых пациенту вводят от 2 до 6 ударных доз с первой частотой (например, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в месяц, раз в два месяца и т.д.), с последующим введением пациенту двух или более поддерживающих доз с меньшей частотой. Например, согласно данному аспекту изобретения, если ударные дозы вводятся в частотой один раз в месяц, тогда поддерживающие дозы могут вводиться пациенту один раз в шесть недель, один раз в два месяца, один раз в три месяца и т.д..

Диагностические применения антител

[0424] Описанные здесь антитела к MSR1 также могут применяться для обнаружения и/или измерения MSR1 или экспрессирующих MSR1 клеток в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело к MSR1 или его фрагмент могут применяться для диагностики состояния или заболевания, характеризуемого аберрантной экспрессией (например, чрезмерной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) MSR1. Иллюстративные диагностические анализы для MSR1 могут включать, например, воздействие на образец, полученный от пациента, описанным здесь антителом к MSR1, при этом антитело к MSR1 маркируется детектируемой меткой или репортерной молекулой. В качестве варианта, немеченное антитело к MSR1 может применяться в

диагностических целях в комбинации со вторичным антителом, которое само по себе маркируется обнаруживаемым способом. Детектируемая метка или репортерная молекула могут быть радиоизотопом, таким как ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S или ^{125}I; флуоресцентным или хемилюминесцентным компонентом, таким как флуоресцеин или родамин; или ферментом, таким как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или луцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые могут применяться для обнаружения или измерения MSR1 в образце, включают твердофазный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), иммуноПЭТ (например, ^{89}Zr, ^{64}Cu и т.д.) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

[0425] Образцы, которые могут применяться в диагностических анализах для MSR1 согласно настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит обнаруживаемые количества белка MSR1 или его фрагментов, в нормальных или патологических условиях. В общем, уровни MSR1 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, у которого нет заболевания или состояния, связанного с аномальными уровнями или активностью MSR1), измеряются для первоначального установления опорного или стандартного уровня MSR1. Данный опорный уровень MSR1 затем можно сравнить с уровнями MSR1, измеренными в образцах, полученных от отдельных лиц, у которых подозревается наличие связанного с MSR1 заболевания или состояния.

ПРИМЕРЫ

[0426] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам полное описание того, каким образом создавать и использовать представленные здесь способы и композиции, и они не призваны ограничить объем того, что авторы изобретения считают своим изобретением. Были приложены определенные усилия для того, чтобы обеспечить точность в отношении использованных чисел (*например*, количеств, температуры и т.д.), однако следует учитывать вероятность возникновения некоторых экспериментальных ошибок и отклонений. Если не указано иное, доли являются массовыми долями, молекулярный вес является средним молекулярным весом, температура указывается в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному. Данные примеры не следует считать ограничивающими, поскольку эти примеры лишь обеспечивают определенное понимание и описание применения вариантов осуществления и их различных аспектов.

[0427] В контексте настоящего документа символы и условные обозначения, используемые в процессах и Примерах в настоящем документе, соответствуют символам и условным обозначениям, используемым в современной научной литературе, например,

Journal of the American Chemical Society или Journal of Biological Chemistry, если не указано иное. В частности, но без ограничения, следующие сокращения могут применяться в Примерах и в спецификации:

Сокращение	**Термин**
ADC	Конъюгат антитело-лекарственное средство
Агликозилированное антитело	Антитело, у которого нет гликана
aq (вод.)	Водный
BARAC	Биарилазациклооктинон
BCN	(1*R*,8*S*,9*s*)-Бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил
Boc	N-трет-бутоксикарбонил
BupHTM	Продукт Thermo Scientific № 28372, содержащий 100 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлорида натрия, без калия, pH был откорректирован от 7.2 до 7.6-7.8 MQ, если не указано иное.
CD	Циклодекстрин
COT	Циклооктинол
Da (Да)	Дальтон
DAR	Соотношение лекарственное средство-антитело.
DCM	Дихлорметан
DIBAC	Дибенз[b,f]азоцин, 11,12-дидегидро-5,6-дигидро- или Дибензоциклооктин или Дибенз[b,f]азоцин-5(6H)-бутановая кислота, 11,12-дидегидро
DIBAC-Suc	Дибенз[b,f]азоцин-5(6H)-бутановая кислота, 11,12-дидегидро
DIBACT	3H-Бензо[c]-1,2,3-триазоло[4,5-e][1]бензазоцин, 8,9-дигидро-
DIBO	Дибензоциклооктин
DIFO	Двуфтористый циклооктин
DIPEA	Диизопропилэтиламин
DMF	N,N-диметилформамид
DMSO	Диметилсульфоксид
ИЭР	Ионизация электрораспылением
г	грамм
HATU	2-(7-Аза-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторофосфат
HC	Тяжелая цепь иммуноглобулина
HEK	Человеческие эмбриональные клетки почек
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ч	Часов
LC	Легкая цепь иммуноглобулина
ЖХ	Жидкостная хроматография
MC	Малеимидокапроил
мг	Миллиграмов
мин	Минут

Сокращение	Термин
мл	Миллилитров
мМ	Миллимолярный
MMAE	Монометил ауристатин E
МС	Масс-спектрометрия
МСД	Масс-селективный детектор
MTG	Микробная трансглутаминаза
МВ	Молекулярный вес
ncADC	Нецитотоксичная конъюгация антитело-лекарственное средство
NHS	N-гидроксисукцинимид
нМ	Наномолярный
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
NOESY	Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера
PAB	Пара-аминобензилокси(карбонил)
PBS	10 мМ натрий-фосфатного буфера и 150 мМ хлорида натрия
PBSg	10 мМ фосфата, 150 мМ хлорида натрия, 5% глицерина
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
ppm	Частей на миллион (химический сдвиг)
ОФ	Обращенная фаза
КТ	Комнатная температура
SDS-PAGE	Электрофорез в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия
ЭХР	Эксклюзионная хроматография по размеру
Suc	Янтарная кислота
TCEP	Трис(2-карбоксиэтил)фосфингидрохлорид
TEA	Триэтиламин
TFA	Трифторуксусная кислота
TG	Трансглутаминаза
THF	Тетрагидрофуран
ВП	Времяпролетный
УЭЖХ	Ультраэффективная жидкостная хроматография
УФ	Ультрафиолет
VA	Валин-анилин
VC	Валин-цитруллин
мкл	Микролитров
мкМ	Микромолярный

[0428] Реактивы и растворители были получены из коммерческих источников, таких как Sinopharm Chemical Reagent Co. (SCRC), Sigma-Aldrich, Alfa или от других поставщиков, если явным образом не указано иное.

[0429] ^{1}H ЯМР и другие ЯМР спектры были зарегистрированы на Bruker AVIII 400 или Bruker AVIII 500. Данные обрабатывались при помощи программного обеспечения Nuts или программного обеспечения MestReNova, измеряющего протонные сдвиги в частях на миллион (ppm) в сторону слабого поля от внутреннего стандарта тетраметилсилана (TMS).

[0430] Измерения ВЭЖХ-МС проводили на системе Agilent 1200 HPLC/6100 SQ System со следующими условиями:

[0431] Способ A для измерений ВЭЖХ-МС: Подвижная фаза: A: Вода (0.01% трифторуксусная кислота (TFA)), B: ацетонитрил (0.01% TFA); Градиентная фаза: 5% B увеличили до 95% B в течение 15 минут (мин); Расход: 1.0 мл/мин; Колонка: SunFire C18, 4.6x50 мм, 3.5 мкм; Температура колонки: 50 ºC. Детекторы: испарительный детектор по светорассеянию (ELSD) с аналого-цифровым преобразователем (ADC), диодно-матричный детектор (DAD) (214 нм и 254 нм), ионизация электрораспылением-атмосферная ионизация (ИЭР-АИ).

[0432] Способ B для измерений ВЭЖХ-МС: Подвижная фаза: A: Вода (10 мМ NH_4HCO_3, B: ацетонитрил; Градиентная фаза: 5% B увеличили до 95% B в течение 15 минут (мин); Расход: 1.0 мл/мин; Колонка: XBridge C18, 4.6x50 мм, 3.5 мкм; Температура колонки: 50 ºC. Детекторы: ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм), масс-селективный детектор (МСД) (ИЭР-АИ).

[0433] Измерения ЖХ-МС проводили с использованием системы Agilent 1200 HPLC/6100 SQ System со следующими условиями:

[0434] Способ A для измерений ЖХ-МС: Прибор: WATERS 2767; колонка: Shimadzu Shim–Pack, PRC–ODS, 20x250 мм, 15 мкм, две, соединенные последовательно; Подвижная фаза: A: Вода (0.01% TFA), B: ацетонитрил (0.01% TFA); Градиентная фаза: 5% B увеличили до 95% B в течение 3 мин; Расход: 1.8 – 2.3 мл/мин; Колонка: SunFire C18, 4.6x50 мм, 3.5 мкм; Температура колонки: 50 ºC. Детекторы: ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм), ИЭР-АИ.

[0435] Способ B для измерений ЖК-МС: Прибор: Gilson GX–281; колонка: Xbridge Prep C18 10 мкм OBD, 19x250 мм; Подвижная фаза: A: Вода (10 мМ NH_4HCO_3), B: Ацетонитрил; Градиентная фаза: от 5% до 95% B в течение 3 мин; Расход: 1.8 – 2.3 мл/мин; колонка: XBridge C18, 4.6x50 мм, 3.5 мкм; температура колонки: 50 ºC. Детекторы: ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм), МСД (ИЭР-АИ).

[0436] Была выполнена препаративная жидкостная хроматография высокого давления (Преп-ЖХВД) в системе кислого или основного растворителя с использованием прибора

Gilson GX–281. Для системы кислого растворителя применили колонку Waters SunFire 10 мкм C18 (100Å, 250x19 мм), растворителем A для преп-ЖХВД была вода/0.05% TFA, а растворителем B был ацетонитрил. Условия элюирования: повышение линейного градиента растворителя B от 5% до 100% в течение временного периода в 20 мин при расходе в 30 мл/мин. Система основного растворителя включала колонку Waters Xbridge 10 мкм C18 (100 Å, 250x19 мм), растворителем A для преп-ЖХВД была вода/10 мМ аммония бикарбоната (NH_4HCO_3), а растворителем B был ацетонитрил. Условия элюирования: повышение линейного градиента растворителя B от 5% до 100% в течение временного периода в 20 мин при расходе в 30 мл/мин.

[0437] Флэш-хроматографию проводили с использованием прибора Biotage с картриджами Agela Flash Column; обращенно-фазовую флэш-хроматографию проводили с использованием прибора Biotage с картриджами Boston ODS или Agela C18.

[0438] Метод аналитической хиральной ВЭЖХ - условия хроматографии со сверхкритической подвижной фазой (SFC):

a) Прибор: SFC Method Station (Thar, Waters)

b) Колонка: CHIRALPAK AD-H/AS-H/OJ-H/OD-H 4.6×100 мм, 5 мкм (Daicel)

c) Температура колонки: 40 ºC

d) Подвижная фаза: CO_2/ IPA(0.1% DEA)= 55/45

e) Расход: 4.0 мл/мин

f) Обратное давление: 120 бар

g) Объем вводимой пробы: 2 мкл.

[0439] Метод препаративной хиральной ВЭЖХ - условия SFC:

a) Прибор: SFC-80 (Thar, Waters)

b) Колонка: CHIRALPAK AD-H/AS-H/OJ-H/OD-H 20×250 мм, 10 мкм (Daicel)

c) Температура колонки: 35 ºC

d) Подвижная фаза: CO_2/ IPA(0.2% метанола аммония)= 30/70

e) Расход: 80 г/мин

f) Обратное давление: 100 бар

g) Длина волны детектора: 214 нм

h) Время цикла: 6.0 мин

i) Исследуемый раствор: 1500 мг, растворенных в 70 мл метанола

j) Объем вводимой пробы: 2 мл (загрузка: 42.86 мг/впрыск).

[0440] В контексте настоящего документа символы и условные обозначения, используемые в данных процессах, схемах и примерах, независимо от того, дается ли конкретное определение тому или иному сокращению, соответствуют символам и условным обозначениям, используемым в современной научной литературе, например, Journal of the American Chemical Society или Journal of Biological Chemistry.

Пример 1. Создание антител к MSR1

[0441] Антитела к MSR1 получили посредством иммунизации генетически модифицированной мыши с ДНК, кодирующей вариабельные участки тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, С иммуногеном, содержащим внеклеточный домен рекомбинантного человеческого MSR1, слитый с N-концевой нонагистидиновой меткой (R&D Systems, кат. № 2708-MS-050, Миннеаполис, Миннесота). Мышами, использованными для иммунизации, были мыши Velocimmune или мыши, которые экспрессировали "универсальную легкую цепь" (мыши “ULC”). Антитела, производимые мышами ULC, имеют другие вариабельные области тяжелой цепи, но по существу идентичные вариабельные домены легкой цепи.

[0442] Иммунный ответ антител контролировали посредством MSR1-специфического иммунологического анализа. После достижения желаемого иммунного ответа спленоциты выделили и слили с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и создания линий гибридомных клеток. Линии гибридомных клеток подвергли скринингу и селекции для определения линий клеток, которые производят MSR1-специфические антитела. При помощи данного метода получили несколько химерных антител к MSR1 (т.е. антител, имеющих человеческие вариабельные домены и константные домены мыши). Кроме того, несколько полностью человеческих антител к MSR1 выделили непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, что описано в US 2007/0280945A1.

[0443] Определенные биологические свойства иллюстративных антител к MSR1, созданных с применением способов данного Примера, подробно описаны в изложенных далее Примерах.

Пример 2. Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот вариабельных областей тяжелой и легкой цепи

[0444] В Таблице 4 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепи и CDR выбранных антител к MSR1,

описанных в настоящем документе. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот приведены в Таблице 5.

Таблица 4: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	**HCVR**	**HCDR1**	**HCDR2**	**HCDR3**	**LCVR**	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
H1H21227N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H21228N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H21231N	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H21234N	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H21235N	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H25685N	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H25690N	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H25695N	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H25700N	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H27729P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H27731P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1H27732P	178	180	182	184	186	188	190	192
H1H27734P	194	196	198	200	202	204	206	208
H1H27736P	210	212	214	216	218	220	222	224
H1H27739P	226	228	230	232	234	236	238	240
H1H27747P	242	244	246	248	250	252	254	256
H1H27749P	258	260	262	264	266	268	270	272
H1H27751P	274	276	278	280	282	284	286	288
H1H27754P	290	292	294	296	298	300	302	304
H1H27756P	306	308	310	312	314	316	318	320
H1H27760P2	322	324	326	328	90	92	94	96
H1H27761P2	330	332	334	336	90	92	94	96
H1H27762P2	338	340	342	344	90	92	94	96
H1H27766P2	346	348	350	352	90	92	94	96
H1H27771P2	354	356	358	360	362	364	366	368
H1xH27759P2	370	372	374	376	90	92	94	96

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1xH27773P2	378	380	382	384	362	364	366	368
H1xH27778P2	386	388	390	392	362	364	366	368
H1xH29273P2	394	396	397	400	90	92	94	96
H1xH29282P2	402	404	406	408	90	92	94	96
H1xH29283P2	410	412	414	416	90	92	94	96
H2M21229N	420	422	424	426	428	430	432	434
H2M21230N	436	438	440	442	444	446	448	450
H2M21232N	452	454	456	458	460	462	464	466

Таблица 5: Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H21227N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H21228N	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H21231N	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H21234N	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H21235N	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H25685N	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H25690N	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H25695N	113	115	117	119	121	123	125	127
H1H25700N	129	131	133	135	137	139	141	143
H1H27729P	145	147	149	151	153	155	157	159
H1H27731P	161	163	165	167	169	171	173	175
H1H27732P	177	179	181	183	185	187	189	191
H1H27734P	193	195	197	199	201	203	205	207
H1H27736P	209	211	213	215	217	219	221	223
H1H27739P	225	227	229	231	233	235	237	239
H1H27747P	241	243	245	247	249	251	253	255
H1H27749P	257	259	261	263	265	267	269	271
H1H27751P	273	275	277	279	281	283	285	287

	SEQ ID NO:							
Обозначение антитела	**HCVR**	**HCDR1**	**HCDR2**	**HCDR3**	**LCVR**	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
H1H27754P	289	291	293	295	297	299	301	303
H1H27756P	305	307	309	311	313	315	317	319
H1H27760P2	321	323	325	327	89	91	93	95
H1H27761P2	329	331	333	335	89	91	93	95
H1H27762P2	337	339	341	343	89	91	93	95
H1H27766P2	345	347	349	351	89	91	93	95
H1H27771P2	353	355	357	359	361	363	365	367
H1xH27759P2	369	371	373	375	89	91	93	95
H1xH27773P2	377	379	381	383	361	363	365	367
H1xH27778P2	385	387	389	391	361	363	365	367
H1xH29273P2	393	395	397	399	89	91	93	95
H1xH29282P2	401	403	405	407	89	91	93	95
H1xH29283P2	409	411	413	415	89	91	93	95
H2M21229N	419	421	423	425	427	429	431	433
H2M21230N	435	437	439	441	443	445	447	449
H2M21232N	451	453	455	457	459	461	463	465

[0445] Как правило, антитела обозначаются в настоящем документе в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например, "H1H", "H2aM" и т.д.), затем численный идентификатор (например, "21227", "21228", "21231" и т.д.), затем суффикс "P", "N" или "P2", что показано в Таблицах 4 и 5. Таким образом, согласно данной номенклатуре, антитело может обозначаться здесь следующим образом: "H1H21227N", "H2aM21228N", "H1H27729P", "H1H27760P2" и т.д.. Префикс в обозначениях антител, используемых в настоящих документах, обозначает определенный изотип Fc области антитела. В частности, антитело "H1H" имеет Fc IgG1 человека (все вариабельные области являются полностью человеческими, что обозначается первым 'H' в обозначении антитела), а антитело "H2aM" имеет Fc IgG2a мыши. Как известно специалистам в данной области, антитело, имеющее определенный изотип Fc, может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG4 мыши может быть преобразовано в антитело с IgG1 человека и т.д.), однако в любом случае вариабельные домены (включая CDR) – которые обозначаются численными идентификаторами, показанными в Таблицах 4 и 5 – остаются такими же, и предполагается, что свойства

связывания являются идентичными или существенно аналогичными независимо от природы Fc домена.

[0446] *Модификации антител.* Три антитела к MSR1, описанные в Примере 1 (21227N, 21231N, 21234N), получили с оригинальной частью Fcγ человека, а также версию с одной точечной мутацией N297Q для всех трех антител к MSR1. Все другие описанные здесь антитела были созданы с одной точечной мутацией N297Q в Fcγ части человека. Третью версию, мутацию N297D, получили только для антитела 21227N.

Пример 3. Аффинности связывания и кинетические константы человеческих моноклональных антител к MSR1, определенные методом поверхностного плазмонного резонанса

[0447] Аффинности связывания и кинетические константы человеческих антител к MSR1 для различных реактивов MSR1 определили методом поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени (Biacore 4000). Все исследования связывания провели в подвижном буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0.05% об/об ПАВ Tween-20, pH 7.4 (HBS-ET) при 25°C и 37°C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM4 первоначально дериватизировали посредством связывания аминов с поликлональным антителом козы, специфическим к Fcγ человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories, кат. № BR-1008-39) для захвата моноклональных антител к MSR1. Исследования связывания провели на внеклеточном домене MSR1 человека, экспрессированным с нонагистидиновой меткой на N-конце (His9-hMSR1; R&D Systems, кат. номер 2708-MS), и внеклеточном домене MSR1 обезьяны, экспрессированным с гексагистидиновой -myc-myc меткой на N-конце (HMM-mfMSR1; SEQ ID NO: 418). Разные концентрации His9-hMSR1 и HMM-mfMSR1 (100 нМ - 3.7 нМ; 3-кратное последовательное разведение) сначала приготовили в подвижном буфере HBS-ET и вводили на поверхности моноклонального антитела к MSR1 в течение 3 минут с расходом 30 мкл/мин, и диссоциацию реактива MSR1, связанного с моноклональным антителом, контролировали на протяжении 10 минут в подвижном буфере HBS-ET.

[0448] Скорость ассоциации (k_a) и скорость диссоциации (k_d) определили посредством подстановки сенсограмм связывания реального времени в модель связывания 1:1 с ограничением массопереноса с использованием программного обеспечения для подбора аппроксимирующей кривой Scrubber 2.0c. Константу равновесия при диссоциации связывания (K_D) и диссоциативный период полужизни (t½) рассчитали на основании кинетических скоростей следующим образом:

$$K_D\ (M) = \frac{kd}{ka}\text{, и } t½\ (мин) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

[0449] Параметры кинетики связывания для связывания His9-hMSR1 или HMM-mfMSR1 с разными моноклональными антителами к MSR1 при 25°C и 37°C показаны в Таблицах 6 и 7, соответственно.

Таблица 6: Аффинности связывания mAb к MSR1 при 25 °C, Biacore

Связывание при 25 °C / Формат захвата антител					
Антитело	**Аналит**	**ka ($M^{-1}s^{-1}$)**	**kd (s^{-1})**	**K_D (моляр)**	**t½ (мин)**
H1H21227N-N297Q	His9-hMSR1	1.23E+06	4.89E-05	3.97E-11	236
	HMM-mfMSR1	1.36E+06	7.51E-05	5.53E-11	154
H1H21227N-N297D	His9-hMSR1	1.14E+06	3.79E-05	3.33E-11	305
	HMM-mfMSR1	1.35E+06	4.03E-05	2.99E-11	287
H1H21231N-N297Q	His9-hMSR1	3.99E+05	5.88E-05	1.47E-10	196
	HMM-mfMSR1	2.40E+05	9.03E-05	3.76E-10	128
H1H21234N-N297Q	His9-hMSR1	4.97E+05	1.00E-05*	2.01E-11	1155
	HMM-mfMSR1	4.08E+05	1.95E-05	4.66E-11	593
H1H27729P-N297Q	His9-hMSR1	1.97E+05	1.07E-03	5.45E-09	11
	HMM-mfMSR1	2.69E+05	2.12E-03	7.90E-09	5
H1H27731P-N297Q	His9-hMSR1	1.29E+05	2.24E-05	1.74E-10	515
	HMM-mfMSR1	9.82E+04	4.69E-05	4.77E-10	247
H1H27732P-N297Q	His9-hMSR1	1.25E+05	1.00E-05*	8.01E-11	1155
	HMM-mfMSR1	1.28E+05	3.17E-05	2.48E-10	364
H1H27734P-N297Q	His9-hMSR1	4.20E+05	1.11E-03	2.64E-09	10
	HMM-mfMSR1	4.23E+05	2.91E-03	6.88E-09	4
H1H27736P-N297Q	His9-hMSR1	5.15E+05	2.31E-04	4.48E-10	50
	HMM-mfMSR1	4.64E+05	5.87E-04	1.27E-09	20
H1H27739P-N297Q	His9-hMSR1	3.75E+05	1.03E-03	2.74E-09	11
	HMM-mfMSR1	3.52E+05	1.44E-04	4.10E-10	80
H1H27747P-N297Q	His9-hMSR1	2.43E+05	6.52E-04	2.69E-09	18
	HMM-mfMSR1	2.31E+05	8.74E-04	3.78E-09	13
H1H27749P-N297Q	His9-hMSR1	3.18E+05	1.76E-05	5.54E-11	656
	HMM-mfMSR1	2.49E+05	4.27E-05	1.71E-10	271
H1H27751P-N297Q	His9-hMSR1	1.78E+06	3.05E-04	1.72E-10	38
	HMM-mfMSR1	7.44E+05	7.49E-04	1.01E-09	15
H1H27754P-N297Q	His9-hMSR1	2.90E+05	1.00E-05*	3.44E-11	1155
	HMM-mfMSR1	2.35E+05	1.76E-05	7.50E-11	657
H1H27756P-N297Q	His9-hMSR1	3.00E+05	1.22E-04	4.06E-10	94
	HMM-mfMSR1	3.58E+05	2.44E-03	6.81E-09	5
H1H27760P-N297Q	His9-hMSR1	4.54E+05	9.09E-04	2.00E-09	13
	HMM-mfMSR1	3.63E+05	7.01E-04	1.93E-09	16
H1H27759P-N297Q	His9-hMSR1	5.99E+05	1.22E-03	2.03E-09	9
	HMM-mfMSR1	4.17E+05	9.19E-04	2.20E-09	13
H1H27761P-N297Q	His9-hMSR1	3.12E+05	5.10E-04	1.63E-09	23
	HMM-mfMSR1	3.18E+05	5.97E-04	1.88E-09	19
H1H27762P-N297Q	His9-hMSR1	9.89E+05	1.83E-03	1.85E-09	6
	HMM-mfMSR1	1.25E+06	1.99E-03	1.59E-09	6
H1H27766P-N297Q	His9-hMSR1	2.34E+05	1.86E-05	7.96E-11	620
	HMM-mfMSR1	1.57E+05	7.94E-05	5.06E-10	145
H1H27771P-	His9-hMSR1	6.86E+05	9.58E-04	1.40E-09	12
	HMM-mfMSR1	5.19E+05	5.26E-03	1.01E-08	2.2

Связывание при 25 °C / Формат захвата антител					
Антитело	**Аналит**	**ka ($M^{-1}s^{-1}$)**	**kd (s^{-1})**	**K_D (моляр)**	**t½ (мин)**
N297Q					
H1H27773P-N297Q	His9-hMSR1	6.58E+05	2.63E-03	3.99E-09	4
	HMM-mfMSR1	6.43E+05	1.96E-03	3.05E-09	6
H1H27778P-N297Q	His9-hMSR1	5.75E+05	3.94E-04	6.85E-10	29
	HMM-mfMSR1	4.67E+05	1.36E-03	2.91E-09	8
H1H21234N	His9-hMSR1	6.04E+05	1.00E-05*	1.66E-11	1155
	HMM-mfMSR1	3.36E+05	1.00E-05*	2.98E-11	1155
H1H21231N	His9-hMSR1	4.77E+05	1.00E-05*	2.10E-11	1155
	HMM-mfMSR1	2.74E+05	6.39E-05	2.33E-10	181
H1H21227N	His9-hMSR1	1.20E+06	1.44E-05	1.20E-11	800
	HMM-mfMSR1	1.27E+06	4.41E-05	3.48E-11	262
Контроль отсутствия связывания	His9-hMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
	HMM-mfMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]

* означает, что диссоциация His9-hMSR1 или HMM-mfMSR1 не наблюдалась в текущих условиях эксперимента и значение k_d было зафиксировано вручную на 1.00E-05 при подстановке данных

[$] означает, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента (OC, отсутствие связывания).

Таблица 7: Аффинности связывания mAb к MSR1 при 37 °C, Biacore

Связывание при 37 °C / Формат захвата антител					
Антитело	**Аналит**	**ka ($M^{-1}s^{-1}$)**	**kd (s^{-1})**	**K_D (моляр)**	**t½ (мин)**
H1H21227N-N297Q	His9-hMSR1	2.67E+06	1.23E-05	4.60E-12	941
	HMM-mfMSR1	2.74E+06	1.08E-05	3.95E-12	1069
H1H21227N-N297D	His9-hMSR1	2.73E+06	1.00E-05*	3.66E-12	1155
	HMM-mfMSR1	2.68E+06	2.42E-05	9.03E-12	477
H1H21231N-N297Q	His9-hMSR1	5.34E+05	1.15E-04	2.15E-10	101
	HMM-mfMSR1	5.87E+05	1.09E-04	1.86E-10	106
H1H21234N-N297Q	His9-hMSR1	7.87E+05	1.00E-05*	1.27E-11	1155
	HMM-mfMSR1	7.50E+05	1.00E-05*	1.33E-11	1155
H1H27729P-N297Q	His9-hMSR1	2.39E+05	2.04E-03	8.53E-09	6
	HMM-mfMSR1	4.07E+05	3.49E-03	8.58E-09	3.3
H1H27731P-N297Q	His9-hMSR1	2.86E+05	1.32E-04	4.62E-10	88
	HMM-mfMSR1	2.78E+05	1.87E-04	6.74E-10	62
H1H27732P-N297Q	His9-hMSR1	2.81E+05	3.12E-05	1.11E-10	370
	HMM-mfMSR1	3.34E+05	1.06E-04	3.17E-10	109
H1H27734P-N297Q	His9-hMSR1	1.09E+06	1.90E-03	1.74E-09	6
	HMM-mfMSR1	9.49E+05	3.20E-03	3.37E-09	4
H1H27736P-N297Q	His9-hMSR1	1.02E+06	7.33E-04	7.17E-10	16
	HMM-mfMSR1	2.01E+06	1.28E-03	6.37E-10	9
H1H27739P-N297Q	His9-hMSR1	7.76E+05	2.88E-03	3.72E-09	4
	HMM-mfMSR1	2.25E+06	8.42E-04	3.74E-10	14
H1H27747P-N297Q	His9-hMSR1	5.13E+05	2.76E-03	5.37E-09	4
	HMM-mfMSR1	6.57E+05	2.28E-03	3.47E-09	5

Связывание при 37 °C / Формат захвата антител					
Антитело	**Аналит**	**ka ($M^{-1}s^{-1}$)**	**kd (s^{-1})**	**K_D (моляр)**	**t½ (мин)**
H1H27749P-N297Q	His9-hMSR1	4.97E+05	2.42E-04	4.86E-10	48
	HMM-mfMSR1	4.77E+05	1.72E-04	3.61E-10	67
H1H27751P-N297Q	His9-hMSR1	1.45E+06	9.43E-04	6.50E-10	12
	HMM-mfMSR1	1.17E+06	1.80E-03	1.55E-09	6
H1H27754P-N297Q	His9-hMSR1	6.63E+05	2.53E-05	3.81E-11	457
	HMM-mfMSR1	7.01E+05	3.53E-05	5.04E-11	327
H1H27756P-N297Q	His9-hMSR1	6.63E+05	7.71E-04	1.16E-09	15
	HMM-mfMSR1	8.02E+05	3.19E-03	3.97E-09	4
H1H27760P-N297Q	His9-hMSR1	1.08E+06	1.89E-03	1.74E-09	6
	HMM-mfMSR1	1.52E+06	1.59E-03	1.05E-09	7
H1H27759P-N297Q	His9-hMSR1	1.03E+06	2.30E-03	2.24E-09	5
	HMM-mfMSR1	1.46E+06	1.88E-03	1.28E-09	6
H1H27761P-N297Q	His9-hMSR1	6.81E+05	2.22E-03	3.26E-09	5
	HMM-mfMSR1	9.20E+05	2.14E-03	2.32E-09	5
H1H27762P-N297Q	His9-hMSR1	3.06E+06	1.96E-03	6.40E-10	6
	HMM-mfMSR1	2.82E+06	1.97E-03	6.98E-10	6
H1H27766P-N297Q	His9-hMSR1	3.40E+05	7.72E-05	2.27E-10	150
	HMM-mfMSR1	3.43E+05	5.89E-04	1.72E-09	20
H1H27771P-N297Q	His9-hMSR1	1.35E+06	2.04E-03	1.51E-09	6
	HMM-mfMSR1	4.94E+05	9.07E-03	1.84E-08	1.3
H1H27773P-N297Q	His9-hMSR1	9.19E+05	3.07E-03	3.34E-09	4
	HMM-mfMSR1	9.60E+05	5.06E-03	5.27E-09	2.3
H1H27778P-N297Q	His9-hMSR1	1.19E+06	6.55E-04	5.49E-10	18
	HMM-mfMSR1	1.19E+06	1.25E-03	1.05E-09	9
H1H21234N	His9-hMSR1	6.76E+05	1.00E-05*	1.48E-11	1155
	HMM-mfMSR1	7.26E+05	1.00E-05*	1.38E-11	1155
H1H21231N	His9-hMSR1	7.02E+05	9.09E-05	1.30E-10	127
	HMM-mfMSR1	7.12E+05	7.82E-05	1.10E-10	148
H1H21227N	His9-hMSR1	2.56E+06	1.85E-05	7.24E-12	624
	HMM-mfMSR1	2.76E+06	1.00E-05*	3.62E-12	1155
Контроль отсутствия связывания	His9-hMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
	HMM-mfMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]

* означает, что диссоциация His9-hMSR1 или HMM-mfMSR1 не наблюдалась в текущих условиях эксперимента и значение k_d было зафиксировано вручную на 1.00E-05 при подстановке данных

[$] означает, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента (OC, отсутствие связывания).

[0450] При 25°C все моноклональные антитела к MSR1 по настоящему изобретению связывались с His9-hMSR1 со значениями K_D, варьирующимися в диапазоне от 12 пМ до 5.45 нМ, что показано в Таблице 6. При 37°C все моноклональные антитела к MSR1 по настоящему изобретению связывались с His9-hMSR1 со значениями K_D, варьирующимися в диапазоне от 3.66 пМ до 8.53 нМ, что показано в Таблице 7.

[0451] При 25°C все моноклональные антитела к MSR1 по настоящему изобретению связывались с HMM-mfMSR1 со значениями K_D, варьирующимися в диапазоне от 29.9 пМ до 10.1 нМ, что показано в Таблице 6. При 37°C все моноклональные антитела к MSR1 по настоящему изобретению связывались с HMM-mfMSR1 со значениями K_D, варьирующимися в диапазоне от 3.62 пМ до 18.4 нМ, что показано в Таблице 7.

Пример 4. Аффинности связывания и кинетические константы человеческих моноклональных антител к MSR1, определенные с помощью платформы Octet

[0452] Аффинности связывания и кинетические константы человеческих антител к MSR1 для разных реактивов MSR1 определили посредством безмаркерного анализа на основе интерферометрии на биологическом слое в режиме реального времени на биосенсорной платформе HTX OCTET® (Pall FortéBio Corp., Менло-Парк, Калифорния). Эксперимент провели при 25°C в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0.05% об/об ПАВ Tween-20 и 1 мг/мл BSA, pH7.4 (HBS-EBT) с встряхиванием планшетов на скорости 1000 об/мин. Исследования связывания провели на внеклеточном домене MSR1 человека, экспрессированном с нонагистидиновой меткой на N-конце (His9-hMSR1; R&D Systems, каталожный номер 2708-MS), внеклеточном домене MSR1 обезьяны, экспрессированным с myc-myc-гексагистидиновой меткой на N-конце (HMM-mfMSR1; SEQ ID NO: 418), и внеклеточном домене MSR1 мыши, экспрессированным с нонагистидиновой меткой на N-конце (His9-mMSR1; R&D Systems, кат. номер 1797-MS). Моноклональные антитела к MSR1 захватили посредством погружения биосенсоров Octet Anti-human Fc Capture (AHC) или Anti-mouse Fc Capture (AMC) в лунки, содержащие 5 мкг/мл или 10 мкг/мл моноклонального антитела к MSR1 на 45-90 секунд. Захваченные биосенсорами AHC моноклональные антитела к MSR1 затем погрузили в лунки, содержащие 50 нМ His9-mMSR1, а захваченные биосенсорами AMC моноклональные антитела к MSR1 затем погрузили в лунки, содержащие разные концентрации His9-hMSR1 или HMM-mfMSR1 (100 нМ, 25 нМ) или 100 нМ His9-mMSR1. Связывание разных реактивов MSR1 с захваченным моноклональным антителом к MSR1 измеряли на протяжении 4 минут, а диссоциацию реактива MSR1, связанного с моноклональным антителом, контролировали на протяжении 8-10 минут в буфере HBS-EBT.

[0453] Скорость ассоциации (k_a) и скорость диссоциации (k_d) определили посредством подстановки сенсограмм связывания реального времени в модель связывания 1:1 с ограничением массопереноса с использованием программного обеспечения для подбора аппроксимирующей кривой Scrubber 2.0c. Константу равновесия при диссоциации связывания (K_D) и диссоциативный период полужизни (t½) рассчитали на основании кинетических скоростей следующим образом:

$$K_D\ (M) = \frac{kd}{ka}\text{, и } t½\ (мин) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

[0454] Параметры кинетики связывания для связывания His9-hMSR1, HMM-mfMSR1 или His9-mMSR1 с разными моноклональными антителами к MSR1 по настоящему изобретению при 25°C показаны в Таблицах 8 и 9.

Таблица 8: Аффинности связывания mAb к MSR1 при 25 °C, OCTET®

Связывание при 25 °C / Формат захвата антител					
Антитело	**Аналит**	**ka ($M^{-1}s^{-1}$)**	**kd (s^{-1})**	**K_D (моляр)**	**t½ (мин)**
H2aM21228N	His9-hMSR1	1.22E+05	1.16E-04	9.54E-10	100
	HMM-mfMSR1	1.00E+05	1.46E-04	1.45E-09	79
H2aM21229N	His9-hMSR1	3.00E+05	2.10E-04	7.00E-10	55
	HMM-mfMSR1	1.35E+05	2.22E-03	1.64E-08	5
H2aM21230N	His9-hMSR1	6.47E+05	2.87E-04	4.43E-10	40
	HMM-mfMSR1	2.37E+05	3.76E-04	1.59E-09	31
H2aM21232N	His9-hMSR1	1.30E+05	2.86E-04	2.20E-09	40
	HMM-mfMSR1	9.75E+04	3.27E-04	3.35E-09	35
H2aM21235N	His9-hMSR1	1.21E+05	4.58E-05	3.78E-10	252
	HMM-mfMSR1	1.02E+05	6.27E-05	6.12E-10	184
H2aM25700N	His9-hMSR1	5.58E+05	1.14E-04	2.05E-10	101
	HMM-mfMSR1	5.53E+05	1.15E-04	2.08E-10	100
H2aM25690N	His9-hMSR1	2.29E+05	3.11E-04	1.36E-09	37
	HMM-mfMSR1	1.64E+05	5.47E-04	3.35E-09	21
H2aM25695N	His9-hMSR1	3.60E+05	5.27E-04	1.46E-09	22
	HMM-mfMSR1	3.12E+05	5.71E-04	1.83E-09	20
H2aM25685N	His9-hMSR1	2.01E+05	3.97E-04	1.98E-09	29
	HMM-mfMSR1	6.49E+04	1.28E-03	1.97E-08	9
Изотипический контроль mIgG	His9-hMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
	HMM-mfMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]

[$] означает, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента (OC, отсутствие связывания).

Таблица 9: Аффинности связывания mAb к MSR1 при 25 °C, OCTET®

Связывание при 25 °C / Формат захвата антител					
Антитело	**Аналит**	**ka ($M^{-1}s^{-1}$)**	**kd (s^{-1})**	**K_D (моляр)**	**t½ (мин)**
H2aM21228N	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H2aM21229N	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]

Связывание при 25 °C / Формат захвата антител					
Антитело	**Аналит**	**ka ($M^{-1}s^{-1}$)**	**kd (s^{-1})**	**K_D (моляр)**	**t½ (мин)**
H2aM21230N	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H2aM21232N	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H2aM21235N	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H2aM25700N	His9-mMSR1	3.60E+04	1.85E-04	5.20E-09	63
H2aM25690N	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H2aM25695N	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H2aM25685N	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
Изотипический контроль mIgG	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H21227N-N297Q	His9-mMSR1	3.74E+05	7.08E-04	1.89E-09	16
H1H21227N-N297D	His9-mMSR1	4.61E+05	7.86E-04	1.71E-09	15
H1H21231N-N297Q	His9-mMSR1	НД[#]	НД[#]	НД[#]	НД[#]
H1H21234N-N297Q	His9-mMSR1	3.82E+04	5.00E-05*	1.31E-09	231
H1H27729P N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27731P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27732P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27734P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27736P-N297Q	His9-mMSR1	НД[#]	НД[#]	НД[#]	НД[#]
H1H27739P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27747P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27749P-N297Q	His9-mMSR1	НД[#]	НД[#]	НД[#]	НД[#]
H1H27751P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27754P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27756P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27760P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27759P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27761P-N297Q	His9-mMSR1	НД[#]	НД[#]	НД[#]	НД[#]
H1H27762P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27766P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27771P-N297Q	His9-mMSR1	НД[#]	НД[#]	НД[#]	НД[#]
H1H27773P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H27778P-N297Q	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]
H1H21234N	His9-mMSR1	4.60E+04	5.00E-05*	1.09E-09	231
H1H21231N	His9-mMSR1	НД[#]	НД[#]	НД[#]	НД[#]
H1H21227N	His9-mMSR1	4.15E+05	8.16E-04	1.97E-09	14
Контроль отсутствия связывания	His9-mMSR1	OC[$]	OC[$]	OC[$]	OC[$]

* означает, что диссоциация His9-mMSR1 не наблюдалась в текущих условиях эксперимента и значение k_d было зафиксировано вручную на 5.00E-05 при подстановке данных

[$] означает, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента (ОС, отсутствие связывания).

[#] означает, что данные связывания являются недоказательными (НД)

[0455] Моноклональные антитела к MSR1 связывались с His9-hMSR1 со значениями K_D, варьирующимися в диапазоне от 205 пМ до 2.2 нМ, что показано в Таблице 8.

Моноклональные антитела к MSR1 связывались с HMM-mfMSR1 со значениями K_D, варьирующимися в диапазоне от 208 пМ до 19.7 нМ, что показано в Таблице 8.

[0456] Как показано в Таблице 9, 23 из 35 моноклональных антител к MSR1 не связались с His9-mMSR1, при этом данные связывания для 6 моноклональных антител к MSR1 были недоказательными. Шесть (6) из 35 моноклональных антител к MSR1 связывались с His9-mMSR1 со значениями K_D, варьирующимися в диапазоне от 1.09 нМ до 5.2 нМ, что показано в Таблице 9.

Пример 5. Антитела к MSR1 демонстрируют специфическое связывание с экспрессируемым клеточной поверхностью MSR1 человека и обезьяны

[0457] Способность моноклональных антител к MSR1 связываться с клетками, экспрессирующими MSR1 человека или обезьяны, определили посредством детекции на основе электрохемолюминесценции (ЭХЛ).

[0458] *Создание линий клеток, экспрессирующих MSR1.* Было создано две линии клеток, сверхэкспрессирующих MSR1 человека или обезьяны. Для создания линии клеток, сверхэкспрессирующих MSR1 человека, была создана клеточная линия HEK 293 посредством трансдукции резистентным к гигромицину лентивирусным вектором, кодирующим полноразмерный человеческий MSR1 (hMSR1, аминокислоты M1-L451 с учетным номером NP_619729.1), с Myc меткой на С-конце. Полученная клеточная линия обозначается HEK293.Myc.hMSR1. Аналогичным образом, для создания линии клеток, сверхэкспрессирующих MSR1 обезьяны, была создана клеточная линия HEK 293 посредством трансфекции резистентной к генетицину экспрессионной плазмидой, кодирующей полноразмерный MSR1 обезьяны (*Macaca fascicularis*, mfMSR1, аминокислоты M1-L451 с учетным номером XP_005562705.1). Полученная клеточная линия обозначается HEK293.mfMSR1. Для измерения способности антител связываться с эндогенно экспрессируемым MSR1 человека на моноциты человека THP-1 воздействовали 200 нМ форбол 12-миристат 13-ацетата (PMA; Sigma, катал. № P8139) в течение 72 часов для индуцирования высокой экспрессии MSR1 до связывания антитела. Нетрансфицированные клетки HEK293 включили в качестве контролей неспецифического связывания, поскольку у них нет обнаруживаемой экспрессии MSR1 посредством секвенирования следующего поколения экспрессии гена (данные не показаны).

[0459] *Анализ связывания антител.* Для выполнения анализа связывания антител клетки каждой из клеточных линий, описанных выше, однократно промыли в PBS буфере без Ca^{2+}/$мг^{2+}$ и инкубировали в течение 5 минут при 37°C с бесферментным раствором для диссоциации клеток (Enzyme Free Cell Dissociation Solution) (Millipore, катал. № S-004-C, Берлингтон, Массачусетс), чтобы отделить клетки от колбы. Все клетки однократно

промыли 1xPBS с Ca^{2+}/$мг^{2+}$ и подсчитали при помощи счетчика клеток Cellometer™ Auto T4 (Nexcelom Bioscience). Приблизительно $1.0x10^4$ клеток высеяли по-отдельности на 96-луночные планшеты [планшет MULTI- ARRAY high bind plate, Meso Scale Diagnostics] и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Затем участки неспецифического- связывания блокировали при помощи 2% BSA (мас./об.) в PBS с Ca^{2+}/$мг^{2+}$ в течение 1 часа при комнатной температуре. Клетки THP-1 предварительно инкубировали в течение 0.5 часа при комнатной температуре в буфере для разведения образцов с: 1) 1 мг/мл реактивов для блокирования Fc рецептора, чтобы заблокировать Fc гамма-рецепторы на поверхности клеток THP-1 [полномолекулярный человеческий IgG (Jackson Immunoresearch, катал. номер 009-000-003), для лунок, для которых использовали антитела к MSR1-mFc или 2) полномолекулярным mIgG (Jackson Immunoresearch, катал. № 015-000-003) для лунок, для которых использовали антитела к MSR1-hFc. Связывание антител на клетках HEK293.Myc.hMSR1, HEK293.mfMSR1 и HEK293 проанализировали без реактивов для блокировки Fc рецептора. К связанным на планшете клеткам HEK293.Myc.hMSR1, HEK293.mfMSR1 и HEK293 или блоку THP-1+Fc добавили растворы антител к MSR1 или контрольных антител с последовательными разведениями в диапазоне от 1.7 пМ до 100 нМ и растворы без присутствия антител в двух повторностях, и затем планшеты инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промыли для удаления несвязанных антител с использованием машины для мойки планшетов AquaMax2000 с головкой для промывки клеток (MDS Analytical Technologies). Связанные на планшете антитела определяли либо при помощи SULFO-TAG™-конъюгированного поликлонального антитела козы к IgG человека, специфического к Fcγ фрагменту (Jackson Immunoresearch, кат. № 109-005-098), либо SULFO-TAG™-конъюгированного поликлонального антитела мыши к IgG человека, специфического к Fcγ фрагменту (Jackson Immunoresearch, кат. № 115-005-164) в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промыли и обработали буфером Read Buffer (Meso Scale Diagnostics, кат. № R92TD-2) согласно рекомендациям изготовителя, и люминесцентные сигналы зарегистрировали при помощи SECTOR Imager 600 (Meso Scale Diagnostics). Интенсивность люминесценции, измеренную в относительных световых единицах (OCE), записали, чтобы продемонстрировать интенсивность связывания каждого антитела при разных концентрациях. Отношение сигнала, определенного для клеточно-поверхностного связывания каждого антитела к MSR в сравнении с антителом изотипического контроля (при 11 нМ), обозначили в качестве показателя специфичности связывания MSR1. Антитела с коэффициентом связывания на клетках, экспрессирующих MSR-1, который в 2- или более раз превышал коэффициент на родительских клетках HEK293, классифицировали как специфически связывающиеся

антитела. Антитела с коэффициентом связывания, который менее, чем в 2- раза превышал коэффициент на родительских клетках HEK293, классифицировали как несвязывающиеся антитела, что показано в Таблице 10. (См. Таблицу 10).

Таблица 10: Связывание антител к MSR1 с клетками, экспрессирующими MSR1

Антитело	Отношение сигнала связывания антител (OCE) 11 нМ на клетках, экспрессирующих MSR1, и родительских HEK293 к изотипическому контролю			
	HEK293.Myc.hMSR1	THP-1, на которых воздействовали PMA	HEK293.mfMSR1	HEK293
Антитела, специфически связывающиеся с MSR1 человека и обезьяны				
H1H21227N-N297Q	37	5	23	1
H1H21227N-N297D	34	6	25	1
H1H21227N	37	7	26	1
H1H21231N-N297Q	64	45	69	4
H1H21231N	61	42	75	<1
H1H21234N-N297Q	43	25	35	9
H1H21234N	32	18	31	3
H1H27729P-N297Q	17	8	6	3
H1H27731P-N297Q	48	38	43	7
H1H27732P-N297Q	72	56	46	6
H1H27734P-N297Q	40	21	28	14
H1H27736P-N297Q	58	48	45	12
H1H27739P-N297Q	22	9	20	1
H1H27747P-N297Q	26	13	21	5
H1H27749P-N297Q	27	33	24	3
H1H27751P-N297Q	63	54	49	15
H1H27754P-N297Q	55	66	53	18
H1H27756P-N297Q	38	21	20	6
H1H27759P2-N297Q	23	9	25	2
H1H27760P2-N297Q	29	15	25	3
H1H27761P2-N297Q	23	10	15	3
H1H27762P2-N297Q	33	11	25	3
H1H27771P2-N297Q	42	21	7	2
H1H27773P2-N297Q	5	3	10	2
H1H27778P2-N297Q	51	32	29	4
H1xH27759P2	22	6	21	<1

Антитело	Отношение сигнала связывания антител (OCE) 11 нМ на клетках, экспрессирующих MSR1, и родительских HEK293 к изотипическому контролю			
	HEK293.Myc.hMSR1	THP-1, на которых воздействовал	HEK293.mfMSR1	HEK293
H1xH29283P2	26	9	24	1
H2aM25685N	75	11	25	2
H2aM25690N	166	25	77	5
H2aM25695N	35	8	45	5
H2aM25700N	46	3	39	1
H2aM21228N	66	16	60	2
H2aM21230N	78	21	55	5
H2aM21232N	86	21	51	1
H2aM21235N	68	20	40	6
Антитела, специфически связывающиеся только с MSR1 человека				
H2aM21229N	78	56	27	36
H1xH29282P2	9	3	1	<1
H1H27766P2-N297Q	20	9	13	8
Неспецифически связывающееся антитело				
H1xH29273P2	20	24	27	
Изотипические контроли				
Изотипический контроль hIgG1	1	1	1	1
Изотипический контроль mIgG	1	1	1	1

[0460] Как показано в Таблице 10, тридцать восемь из тридцати девяти проанализированных антител к MSR1 специфически связывались с клетками HEK293.Myc.hMSR1 с коэффициентами связывания, превышающими от 5 до 166 раз коэффициент изотипического контроля при концентрации антител к MSR1 в 11 нМ. Тридцать три из данных антител к MSR1 специфически связывались с клетками THP-1, эндогенно экспрессирующими MSR1 человека, после клеточной дифференциации с PMA с коэффициентами клеточного связывания, превышающими от 3 до 66 раз коэффициент изотипического контроля при 11 нМ. Тридцать пять антител к MSR1, которые связались с модифицированными клетками hMSR1, также специфически связывались с модифицированными клетками mfMSR1 с коэффициентами клеточного связывания, превышающими от 6 до 77 раз коэффициент изотипического контроля при 11 нМ. Двенадцать антител к MSR1 (H1H21234N-N297Q, H1H27731P-N297Q, H1H27732P-N297Q,

H1H27734P-N297Q, H1H27736P-N297Q, H1H27751P-N297Q, H1H27754P-N297Q, H1H27756P-N297Q, H2aM25695N, H2aM21235N, H2aM21229N, H1H27766P2-N297Q) связались с родительскими клетками HEK293 с коэффициентами, превышающими в 5 или более раз коэффициент изотипического контроля. Антитела к MSR1, полученные с помощью IgG1 человека, содержащие одну точечную мутацию N297Q или N297D, связывались с клетками таким образом, который был сопоставим с их соответствующими немодифицированными исходными антителами.

[0461] Одно антитело к MSR1, H1xH29273P2, охарактеризовали как антитело, связывающееся неспецифически, поскольку оно связывалось с клетками MSR1 с коэффициентами менее 2 по сравнению с клетками HEK293 при концентрации антител 11 нМ. Изотипические контроли hIgG1 и mIgG1 не были специфическими, как и предполагалось.

Пример 6. Относительное связывание антител к MSR1 с экспрессируемым клеточной поверхностью MSR1 мыши

[0462] Относительное клеточно-поверхностное связывание антител к MSR1 с экспрессирующими MSR1 клетками мыши определили посредством поточной цитометрии с использованием MSR1-положительных клеток RAW264.7 (ATCC, кат. № TIB-71) и MSR1-отрицательных клеток B16F10.9 (Lin *et al.* 1998. *PNAS* 95:8829-8834). В целях анализа клетки высеяли в PBS без кальция и магния (VWR, кат. № 45000-446) и 2% FBS (Saradigm, кат. № 1500-500) (окрашивающий буфер) на 96-луночные планшеты с V-образным дном (Axygen Scientific, кат. № P-96-450-V-C-S). Чтобы заблокировать связывание с Fc-рецепторами, клетки RAW264.7 инкубировали в течение 30 минут при 4°C с 500 мкг/мл IgG мыши (Jackson ImmunoResearch, кат. № 015-000-003), разведенными в окрашивающем буфере, а клетки B16F10.9 оставили в окрашивающем буфере. После блокирования Fc-рецептора к клеткам добавили 10 мкг/мл антител к MSR1 или антитело изотипического контроля и затем инкубировали в течение 30 минут на льду. Для положительного контроля использовали коммерческое антитело к MSR1 мыши (Sino Biological, кат. № 50129-R004), а для отрицательного контроля использовали антитело IgG кролика (Thermo Scientific, кат. № 26102). Затем клетки однократно промыли окрашивающим буфером и инкубировали с APC-конъюгированным вторичным антителом к Fc человека (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-136-170) или конъюгированным вторичным антителом к Fc кролика, меченным Alexa-Flour 647 [Jackson ImmunoResearch, кат. № 111-606-046] при 10 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки промыли и зафиксировали при помощи 50% раствора Cytofix (BD Biosciences, кат. № 554655), разведенного в PBS. Затем образцы исследовали на Beckman Coulter Cytoflex и результаты проанализировали в программном обеспечении Flowjo 10.2 (BD) для расчета

средней интенсивности флуоресцентности (СИФ; Таблица 11). Отношение сигнал-шум (С/Ш) определили посредством вычисления отношения СИФ антител к MSR1 или контрольных антител к СИФ неокрашенного образца (Таблица 11).

Таблица 11: Связывание антител к MSR1 с клетками RAW264.7 (поточная цитометрия)

Антитело	СИФ RAW264.7	СИФ B16F10.9	С/Ш RAW264.7	С/Ш B16F10.9
Неокрашенное	2524	3657	1	1
Только вторичное антитело к IgG человека	3095	3174	1	1
Контроль отсутствия связывания	3402	3829	1	1
H1H21227N-N297Q	12810	3287	5	1
H1H21231N-N297Q	3582	3374	1	1
H1H21234N-N297Q	7052	3499	3	1
Антитело к MSR мыши	245149	6161	97	2
Только вторичное антитело к IgG кролика	8720	5389	3	1
H1H27729P-N297Q	3484	3459	1	1
H1H27731P-N297Q	3510	3688	1	1
H1H27732P-N297Q	3425	3730	1	1
H1H27734P-N297Q	4783	4505	1	1
H1H27736P-N297Q	3554	3759	1	1
H1H27739P-N297Q	3271	3580	1	1
H1H27747P-N297Q	3630	3875	1	1
H1H27749P-N297Q	3789	3693	1	1
H1H27751P-N297Q	3823	4992	1	1
H1H27754P-N297Q	5406	4091	1	1
H1H27756P-N297Q	4573	3782	1	1
H1H27759P-N297Q	3288	3425	1	1
H1H27760P-N297Q	3429	3521	1	1
H1H27761P-N297Q	3837	3734	1	1
H1H27762P-N297Q	3519	3608	1	1
H1H27766P-N297Q	3812	3793	1	1
H1H27771P-N297Q	4055	3865	1	1
H1H27773P-N297Q	3367	3735	1	1
H1H27778P-N297Q	3648	4138	1	1

[0463] Как показано в Таблице 11, два антитела к MSR1 (H1H21227N-N297Q и H1H21234N-N297Q) слабо связались с клетками RAW264.7 со значениями С/Ш 5 и 3, соответственно. Антитело контроля отсутствия связывания не связалось с клетками RAW264.7. Ни одно из 22 антител к MSR1 не связалось с клетками B16F10.9. Эталонный

положительный контроль (антитело MSR1/CD204 мыши, Sino Biological, кат. № 50129-R004) связался с клетками Raw 264.7 с С/Ш 97.

Пример 7. Антитела к MSR1 связываются с отдельными эпитопами на MSR1 рецепторе / кросс-конкуренция между антителами к MSR1

[0464] Конкуренцию за связывание между разными антителами к MSR1 проанализировали посредством безмаркерного анализа на основе интерферометрии на биологическом слое в режиме реального времени на платформе HTX биосенсорной платформы OCTET® (Pall FortéBio Corp., Менло-Парк, Калифорния). Эксперимент провели при 25°C в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0.05% об/об ПАВ Tween-20 и 1 мг/мл BSA, pH7.4 (HBS-EBT) с встряхиванием планшетов со скоростью 1000 об/мин.

[0465] Чтобы определить, способны ли разные антитела конкурировать друг с другом за связывание с их соответствующими эпитопами на внеклеточном домене рекомбинантного человеческого MSR1, экспрессированном с нонагистидиновой меткой на N-конце (His9-hMSR1; R&D Systems, кат. № 2708-MS), около 0.59-0.79 нМ His9-hMSR1 сначала захватили на кончики биосенсоров, покрытых антителами к Пента-His OCTET® (Pall FortéBio Corp., # 18-5122) посредством погружения кончиков биосенсоров на 45 секунд в лунки, содержащие раствор His9-hMSR1 20 мкг/мл. Кончики биосенсоров с захваченным антигеном затем сатурировали первым моноклональным антителом к MSR1 (далее называемым "mAb-1") посредством погружения в лунки, содержащие раствор mAb-1 50 мкг/мл, на 4 минуты. Затем кончики биосенсоров погрузили в лунки, содержащие раствор второго моноклонального антитела к MSR1 50 мкг/мл (далее называемым "mAb-2"), на 4 минуты. Все кончики биосенсоров промывали в буфере HBS-EBT между всеми этапами эксперимента. Ответ связывания в реальном времени контролировали в ходе эксперимента и ответ связывания в конце каждого этапа регистрировали. Ответ связывания mAb-2 с His9-hMSR1 с предварительным включением в качестве компонента mAb-1 сравнили, и конкурентное/неконкурентное поведение разных моноклональных антител к MSR1 определили при помощи 50% порога ингибирования. В Таблице 12 явным образом определены отношения антител, конкурирующих в обоих направлениях, независимо от порядка связывания.

Таблица 12: Кросс-конкуренция антител к MSR1 за связывание с His9-hMSR1

Первое mAb (mAb-1), захваченное при помощи биосенсоров Octet на основе антител к пента-His	Антитела mAb-2, которые конкурируют с mAb-1	Первое mAb (mAb-1), захваченное при помощи биосенсоров Octet на основе антител к пента-His	Антитела mAb-2, которые конкурируют с mAb-1
H1H27756P-N297Q	H1H21231N	H1H27751P-N297Q	H1H21234N-N297Q
	H1H27760P-N297Q		H1H27734P-N297Q
	H1H27762P-N297Q		H1H27732P-N297Q
	H1H21231N-N297Q		H1H27731P-N297Q
	H1H27747P-N297Q		H1H27754P-N297Q
	H1H27749P-N297Q		H1H27766P-N297Q
H1H21231N	H1H27756P-N297Q		H1H21227N-N297D
	H1H27760P-N297Q	H1H27732P-N297Q	H1H27734P-N297Q
	H1H27762P-N297Q		H1H27751P-N297Q
	H1H21231N-N297Q		H1H27731P-N297Q
	H1H27747P-N297Q		H1H27754P-N297Q
	H1H27749P-N297Q	H1H27731P-N297Q	H1H27734P-N297Q
H1H27760P-N297Q	H1H27756P-N297Q		H1H27751P-N297Q
	H1H21231N		H1H27732P-N297Q
	H1H27762P-N297Q		H1H27754P-N297Q
	H1H21231N-N297Q	H1H27754P-N297Q	H1H27734P-N297Q
	H1H27747P-N297Q		H1H27751P-N297Q
	H1H27749P-N297Q		H1H27732P-N297Q
H1H27762P-N297Q	H1H27756P-N297Q		H1H27731P-N297Q
	H1H21231N	H1H27761P-N297Q	H1H27736P-N297Q
	H1H27760P-N297Q		H1H27771P-N297Q
	H1H21231N-N297Q		H1H27778P-N297Q
	H1H27747P-N297Q		H1H27773P-N297Q
	H1H27749P-N297Q		H1H27739P-N297Q
	H1H27766P-N297Q	H1H27736P-N297Q	H1H27761P-N297Q
H1H21231N-N297Q	H1H27756P-N297Q		H1H27771P-N297Q

Первое mAb (mAb-1), захваченное при помощи биосенсоров Octet на основе антител к пента-His	Антитела mAb-2, которые конкурируют с mAb-1	Первое mAb (mAb-1), захваченное при помощи биосенсоров Octet на основе антител к пента-His	Антитела mAb-2, которые конкурируют с mAb-1
	H1H21231N		H1H27778P-N297Q
	H1H27760P-N297Q		H1H27759P-N297Q
	H1H27762P-N297Q		H1H27773P-N297Q
	H1H27747P-N297Q		H1H27773P-N297Q
	H1H27749P-N297Q	H1H27771P-N297Q	H1H27761P-N297Q
H1H27747P-N297Q	H1H27760P-N297Q		H1H27736P-N297Q
	H1H27762P-N297Q		H1H27778P-N297Q
	H1H21231N-N297Q		H1H27759P-N297Q
H1H27749P-N297Q	H1H27760P-N297Q		H1H27773P-N297Q
	H1H27762P-N297Q		H1H27739P-N297Q
	H1H21231N-N297Q	H1H27778P-N297Q	H1H27761P-N297Q
H1H21234N-N297Q	H1H21234N		H1H27736P-N297Q
H1H21234N	H1H21234N-N297Q		H1H27771P-N297Q
H1H27734P-N297Q	H1H21234N-N297Q		H1H27759P-N297Q
	H1H27751P-N297Q		H1H27773P-N297Q
	H1H27732P-N297Q		H1H27739P-N297Q
	H1H27731P-N297Q	H1H27759P-N297Q	H1H27736P-N297Q
	H1H27754P-N297Q		H1H27771P-N297Q
	H1H27766P-N297Q		H1H27778P-N297Q
	H1H21227N-N297D		H1H27773P-N297Q
H1H27766P-N297Q	Нет mAb*		H1H27739P-N297Q
H1H21227N-N297D	H1H21234N-N297Q	H1H27773P-N297Q	H1H27749P-N297Q
	H1H21234N		H1H27766P-N297Q
	H1H27766P-N297Q		H1H21227N-N297D
H1H27739P-N297Q	H1H27759P-N297Q	H1H27729P-N297Q	Недоказательные данные**
H1H21227N	Недоказательные данные**	H1H21227N-N297Q	Недоказательные данные**

*Не кросс-конкурирует ни с одним mAb за связывание с MSR1 при захвате как ‘mAb-1’

**mAb не сатурировало поверхность MSR1 или не связалось с поверхностью MSR1

Пример 8. Захват лигандов антител к MSR1

[0466] MSR1 может связываться с химически модифицированными или измененными полианионными молекулами, включая модифицированные липопротеины низкой плотности (ЛПНП), и интернализовать их (Platt, N. and S. Gordon. 2001. *J Clin Invest.* 108(5):649-654). Был разработан биоанализ для оценки способности иллюстративных антител к MSR1 регулировать захват определенных лигандов MSR1.

[0467] *Создание MSR1-экспрессирующих клеточных линий для анализа.* Человеческие эмбриональные клетки почек (HEK293) трансдуцировали для стабильной экспрессии человеческого MSR1 (аминокислоты 1-451 UniProtKB с учетным номером NP_619729.1) с Myc меткой на С-конце. Полученную клеточную линию, называемую здесь "HEK293.Myc.hMSR1", подвергли селекции и содержали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, NEAA, пенициллин/стрептомицин, L-глутамин и гигромицин 100 μм/мл.

[0468] *Анализ захвата лигандов.* Для целей биоанализа клетки HEK293.Myc.hMSR1 высеяли на 96-луночные поли-D-лизин-покрытые аналитические планшеты (Greiner Bio One, кат. № 655946) с концентрацией 20000 клеток на лунку в среде Opti-MEM, содержащей 0.1% FBS, пенициллин/стрептомицин и L-глутамин (среды для анализа) и инкубировали при 37°C в 5% CO_2 на протяжении ночи. На следующий день антитела последовательно развели от 300 нМ до 5.08 пМ (последовательное разведение 1:3) и предварительно инкубировали с клетками, вместе с отрицательным контролем, состоящем только из среды для анализа, на протяжении 30 минут при 37°C в 5% CO_2. Через 30 минут либо окисленный, либо ацетилированный липопротеин низкой плотности (ЛПНП), меченный 1,1'диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметил индокарбоцианин перхлоратом (называемый "DiI-OxLDL" или "DiI-AcLDL," соответственно) добавили к клеткам при постоянной концентрации в 10 μг/мл. Чтобы определить зависимость доза-ответ захвата лигандов, DiI-OxLDL или DiI-AcLDL последовательно развели от 25 μг/мл до 24.4 пг/мл (плюс только среда для анализа без ЛПНП) и добавили к клеткам. После инкубирования на протяжении ночи при 37°C в 5% CO_2 клетки фиксировали при помощи BD CytoFix™ (BD Biosciences, кат. № 554655) в течение 2 часов при 4°C, и захват лигандов проанализировали при помощи планшет-ридера Flexstation3 (Molecular Devices) с возбуждением на 514 нм и испусканием на 565 нм. Результаты проанализировали при помощи нелинейной регрессии (4-параметрической логистики) с применением программы Prism 7 для получения значений EC_{50} и IC_{50}. Процентную долю ингибирования рассчитали с использованием относительных единиц флуоресценции (RFU) при помощи следующего уравнения:

$$Max\ \%\ Inhibition = 100 \times \frac{RLU_{Baseline} - RLU_{Inhibition}}{RLU_{Baseline} - RLU_{Background}}$$

[0469] В уравнении "$RFU_{Baseline}$" - значение флуоресценции от клеток, на которых воздействовали лигандом 10 μг/мл без антител, "$RFU_{Inhibition}$" - минимальное значение флуоресценции для определенного антитела с лигандом 10 μг/мл, и "$RFU_{Background}$" - значение флуоресценции от клеток без лиганда или антител. Результаты и рассчитанные значения анализа захвата лигандов представлены в Таблице 13.

Таблица 13: Ингибирование антителами захвата DiI-OxLDL и DiI-AcLDL в клетках HEK293.Myc.hMSR1

		DiI-OxLDL		DiI-AcLDL	
Ряд	**Антитела**	**% ингибирования**	**IC_{50} (M)**	**% ингибирования**	**IC_{50} (M)**
1	H2aM21227N	90	3.1E-09	62	3.7E-09
2	H2aM21228N	79	3.1E-09	10	>1.0E-07
3	H2aM21229N	26	>1.0E-07	нет ингибирования	нет ингибирования
4	H2aM21230N	70	2.3E-09	47	>1.0E-08
5	H1M21231N	79	3.7E-09	50	>2.0E-08
6	H2aM21232N	79	4.8E-09	54	>1.0E-08
7	H2bM21234N	61	4.5E-09	19	1.8E-09
8	H2aM21235N	64	3.2E-09	24	>1.0E-07
9	mAb 1 изотипического контроля IgG2a мыши	нет ингибирования	нет ингибирования	нет ингибирования	нет ингибирования
10	mAb изотипического контроля IgG1 мыши	нет ингибирования	нет ингибирования	нет ингибирования	нет ингибирования
11	H2aM25685N	43	>1.0E-07	22	>1.0E-07
12	H2aM25690N	83	1.7E-09	53	2.1E-09
13	H2aM25695N	69	>1.6E-08	40	>1.7E-07
14	H2aM25700N	91	2.2E-09	79	2.4E-09
15	mAb 2 изотипического контроля IgG2a мыши	нет ингибирования	нет ингибирования	нет ингибирования	нет ингибирования
16	H1H21227N-N297Q	94	1.8E-09	65	2.4E-09
17	H1H21231N-N297Q	88	3.7E-09	62	3.7E-09
18	H1H21234N-N297Q	52	6.1E-09	34	1.3E-09
19	H1H21227N	89	2.0E-09	65	2.1E-09
20	H1H21231N	78	3.6E-09	63	3.5E-09

		DiI-OxLDL		DiI-AcLDL	
Ряд	**Антитела**	**% ингибирования**	**IC_{50} (M)**	**% ингибирования**	**IC_{50} (M)**
21	H1H21234N	64	4.3E-09	36	7.1E-10
22	H1H27729P-N297Q	нет ингибирования	нет ингибирования	28	1.2E-09
23	H1H27731P-N297Q	62	>1.0E-08	37	1.8E-09
24	H1H27732P-N297Q	86	1.7E-09	62	2.2E-09
25	H1H27734P-N297Q	22	5.5E-09	нет ингибирования	нет ингибирования
26	H1H27736P-N297Q	83	3.2E-09	49	3.4E-09
27	H1H27739P-N297Q	55	>1.0E-07	нет ингибирования	нет ингибирования
28	H1H27747P-N297Q	42	>1.0E-07	26	>1.0E-07
29	H1H27749P-N297Q	42	1.7E-09	35	4.2E-10
30	H1H27751P-N297Q	85	2.9E-09	59	1.6E-09
31	H1H27754P-N297Q	73	4.6E-09	38	1.8E-09
32	H1H27756P-N297Q	76	3.4E-09	42	>1.0E-07
33	H1H27759P-N297Q	74	>1.0E-08	48	>1.0E-07
34	H1H27760P-N297Q	70	4.9E-09	46	2.6E-09
35	H1H27761P-N297Q	43	9.5E-09	29	>1.0E-07
36	H1H27762P-N297Q	78	4.0E-09	38	2.9E-09
37	H1H27766P-N297Q	72	3.7E-09	38	3.5E-09
38	H1H27771P-N297Q	73	3.0E-09	49	1.9E-09
39	H1H27773P-N297Q	41	>1.0E-07	31	>1.0E-07
40	H1H27778P-N297Q	88	2.2E-09	54	1.5E-09
41	mAb изотипического контроля, IgG1-N297Q человека	нет ингибирования	нет ингибирования	нет ингибирования	нет ингибирования
42	mAb изотипического контроля IgG1 человека	нет ингибирования	нет ингибирования	нет ингибирования	нет ингибирования

[0470] Подходящие кандидаты антител иллюстрируют относительно эффективное ингибирование (например, значение IC_{50} менее, чем около 10 нМ). В некоторых вариантах осуществления подходящие кандидаты антител также иллюстрируют максимальное ингибирование захвата лигандов менее, чем около 65%.

[0471] Как показано в Таблице 13 (ряды 1-10), восемь антител продемонстрировали ингибирование захвата DiI-OxLDL на клетках HEK293.Myc.hMSR1 с максимальным ингибированием в диапазоне от 26% до 90% и значениями IC_{50} в диапазоне от 2.3 нМ до

>100 нМ. Семь из 8 антител продемонстрировали ингибирование захвата DiI-AcLDL с максимальным ингибированием в диапазоне от 10% до 62% и значениями IC_{50} в диапазоне от 1.8 нМ до >100 нМ. Антитело H2aM21229N не продемонстрировало ингибирования захвата DiI-AcLDL.

[0472] Как показано в Таблице 13 (ряды 11-15), четыре антитела продемонстрировали ингибирование MSR1-опосредованного захвата DiI-OxLDL с максимальным ингибированием в диапазоне от 43% до 91% и значениями IC_{50} в диапазоне от 1.7 нМ до >100 нМ. Четыре антитела по изобретению продемонстрировали ингибирование MSR1-опосредованного захвата DiI-AcLDL с максимальным ингибированием в диапазоне от 22% до 79% и значениями IC_{50} в диапазоне от 2.1 нМ до >100 нМ.

[0473] Как показано в Таблице 13 (ряды 16-42), двадцать четыре из 25 антител продемонстрировали ингибирование MSR1-опосредованного захвата DiI-OxLDL с максимальным ингибированием в диапазоне от 22% до 94% и значениями IC_{50} в диапазоне от 1.7 нМ до >100 нМ. Двадцать три из 25 антител продемонстрировали ингибирование захвата DiI-AcLDL с максимальным ингибированием в диапазоне от 26% до 65% и значениями IC_{50} в диапазоне от 0.42 нМ до >100 нМ. Антитело H1H27729P-N297Q не продемонстрировало ингибирования захвата DiI-OxLDL, а антитела H1H27739P-N297Q и H1H27734P-N297Q не продемонстрировали ингибирования захвата DiI-AcLDL на клетках HEK293.Myc.hMSR1.

[0474] Антитела изотипического контроля человека и мыши не продемонстрировали ингибирования захвата DiI-OxLDL и DiI-AcLDL клетками HEK293.Myc.hMSR1 ни в одном из анализов.

Пример 9. Связывание и интернализация экспрессируемого клеточной поверхностью MSR1 антителами к MSR1

[0475] Иллюстративные антитела к MSR1 проанализировали на их способность связываться с MSR1 или интернализовать MSR1 на MSR1-экспрессирующих клетках.

[0476] Для целей анализа клетки THP-1 [ATCC, кат. № TIB-202] высеяли в 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизином (PDL) (Perkin Elmer, кат. № 6055500) в среде RPMI (Irvine Scientific, кат. № 9160), содержащей 10% FBS (ATCC, кат. № 30-2020), пенициллин/стрептомицин/L-глутамин (Gibco, кат. № 10378-016), 50 мкм бета-меркаптоэтанола (Sigma, кат. № M7522) (среды для выращивания) плюс 200 нМ форбол миристат ацетата (PMA; Sigma, кат. № P1585). Клеткам THP-1 позволили дифференциироваться на протяжении 4 дней при 37°C в 5% CO_2. Для окрашивания планшеты с клетками в четырех параллельных анализах инкубировали с 10 мкг/мл антител к MSR1, разведенных в 2% FBS в PBS, без кальция и магния (Irving, кат. № 9240)

(окрашивающий буфер) на протяжении 30 минут при 4°C. Клетки промыли дважды окрашивающим буфером, инкубировали с Alexa-Flour 488 конъюгированным вторичным Ab (Jackson Immunoresearch, кат. № 115-547-003 или Jackson Immunoresearch, кат. № 109-547-003) при 10 мкг/мл в течение 30 минут при 4°C и затем опять дважды промыли окрашивающим буфером. Два планшета немедленно зафиксировали и окрасили 4% параформальдегидом (PFA; ThermoFisher, кат. № 28908) + 5 мкм DRAQ5 (ThermoFisher, кат. № 62251) в PBS в течение 20 минут (планшеты без интернализации). Оставшиеся два планшета инкубировали при 37°C в течение 1 часа с последующей фиксацией и окрашиванием в течение 20 минут с использованием раствора 4% PFA + 5 мкм DRAQ5, разведенного в PBS (планшеты с интернализацией). После фиксации все планшеты однократно промыли с использованием PBS. Один планшет без интернализации и один планшет с интернализацией инкубировали с антителом анти-Alexa Fluor 488 (Regeneron) при 50 мкг/мл в PBS на протяжении ночи при 4°C, чтобы погасить поверхностную флуоресценцию Alexa Fluor 488. Оставшиеся планшеты инкубировали только с PBS. Конфокальные изображения получили на Opera Phenix (Perkin Elmer) с 40X увеличением. Для выявления DRAQ5-меченных клеток применили программное обеспечение для анализа гармонии (Perkin Elmer) и определили общий показатель относительных единиц флуоресценции (RFU) на клетку Alexa-Fluor 488. Общее связывание при 4°C (значения RFU 4°C негашеных лунок), общее связывание при 37°C (значения RFU 37°C негашеных лунок), общее число интернализованных RFU и % интернализации определили для каждого антитела, что показано в Таблице 14.

[0477] Для всех расчетов фоновую флуоресценцию от неокрашенных лунок вычли из показателя каждой лунки. Общий показатель интернализованных RFU рассчитывали следующим образом: Общий показатель RFU для негашеных образцов при 37°C - Поверхностный показатель RFU при 37°C. Поверхностный показатель RFU определяется как негашеные RFU при 37°C - гашеные RFU при 37°C)/QE. QE (эффективность гашения) определяется как: 1-(Общие RFU 4°C гашеного образца/Общие RFU 4°C негашеного образца). % интернализации определяли на основании следующей формулы: (Общие интернализованные RFU at 37°C/Общие RFU при 37°C)*100.

Таблица 14: Интернализация и поверхностное связывание антител к MSR1 в дифференцированных клетках THP-1

Антитело	Общее связывание при 4°C	Общее связывание при 37°C	Общие интернализованные RFU	% интернализации
H1H27729P-N297Q	1930685	6607625	3763127	57.0
H1H27731P-N297Q	1215319	1802404	977543	54.2
H1H27732P-N297Q	2513511	4924734	2414132	49.0

Антитело	Общее связывание при 4°C	Общее связывание при 37°C	Общие интернализованные RFU	% интернализации
H1H27734P-N297Q	482859	1151348	737425	НО*
H1H27736P-N297Q	9514681	12267400	14468087	117.9**
H1H27739P-N297Q	3702857	5608380	4016378	71.6
H1H27747P-N297Q	2518361	5917858	3444330	58.2
H1H27749P-N297Q	4478384	12799899	5704834	44.6
H1H27751P-N297Q	5831744	7998767	6787876	84.9
H1H27754P-N297Q	3077308	7161570	6446236	90.0
H1H27756P-N297Q	6691792	11904608	9039171	75.9
H1H27759P-N297Q	4028970	2480463	1861578	75.0
H1H27760P-N297Q	1297337	6011876	3707164	61.7
H1H27761P-N297Q	1940392	2764577	1625899	58.8
H1H27762P-N297Q	2529645	3856573	3767717	97.7
H1H27766P-N297Q	1877240	3224247	2062539	64.0
H1H27771P-N297Q	6272656	7535203	6991358	92.8
H1H27773P-N297Q	490905	962752	-67811	НО*
H1H27778P-N297Q	9910952	16552831	12518725	75.6
H1H21227N-N297Q	1800012	4110990	3226161	78.5
H1H21234N-N297Q	1953248	5451125	722651	13.3
Изотипический	185971	1087469	1704047	НО*

НО*: % интернализации нельзя было определить из-за слабого связывания и/или отсутствия возможности определить эффективность гашения

**: То, что % интернализованное значение >100%, обусловлено тем, что общие интернализованные значения были несколько выше общих значений при 37°C. Интернализацию в 100% подтверждали визуально по внешнему виду всей Alex488 флуоресценции в везикулярных структурах при 37°C.

[0478] Как показано в Таблице 14, 19 из 21 проанализированного антитела к MSR1 продемонстрировали интернализацию в дифференцированные клетки THP-1 в диапазоне от 13.3% до 117.9% интернализации. Для двух из 21 антитела к MSR1 интернализацию невозможно было определить из-за слабого связывания и/или отсутствия возможности определить эффективность гашения. Изотипический контроль не продемонстрировал никакой поддающейся измерению интернализации.

Пример 10. Анализ блокирующей способности антител к MSR1 для MSR1 человека

[0479] Способность описанных здесь антител к MSR1 блокировать связывание различных лигандов с MSR1 человека измерили посредством трех конкурентных сэндвич-анализов ELISA. В этих анализах применили следующие лиганды: (1) ацетилированные ЛПНП (Ac-LDL), (2) окисленные ЛПНП (Ox-LDL), и (3) конечные продукты гликирования бычьего сывороточного альбумина (AGE-BSA).

[0480] Для анализа рекомбинантный мономерный человеческий белок MSR1, состоящий из части внеклеточного домена MSR1 человека, экспрессированного с 9-гистидиновой меткой на N-конце (His9-hMSR1; R&D Systems, кат. № 2708-MS), нанесли с концентрацией 2 мкг/мл в PBS на 96-луночный микротитрационный планшет на ночь при 4°C для использования в конкурентных анализах ELISA с Ac-LDL, Ox-LDL или биотинилированным-AGE-BSA ("biot-AGE-BSA"). Сайты неспецифического связывания последовательно блокировали с использованием 0.5% (мас./об.) раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатно-солевом буфере (PBS). Антитела к MSR1 или антитела изотипического контроля последовательно разводили соответствующим образом для каждого анализируемого лиганда и добавляли в двух повторностях для каждого комплекса последовательного разведения к микротитрационным планшетам, покрытым His9-hMSR1. На каждый слой также добавили только буфер. Спустя 1 час инкубирования при комнатной температуре без промывки к планшетам с His9-hMSR1 добавили итоговую постоянную концентрацию 50 пМ Ac-LDL (Life Technologies / ThermoFisher Scientific, кат. № L-35354), 5 нМ или 10 нМ Ox-LDL (Alfa Aesar, кат. № J65591) или 400 пМ biot-AGE-BSA (R&D Systems, кат. № BT4127) и планшеты инкубировали еще на протяжении 1 часа при комнатной температуре. (Концентрации Ac-LDL, Ox-LDL и biot-AGE-BSA для анализов ингибирования антител выбрали от приблизительной срединной точки в линейной части индивидуальных кривых связывания Ac-LDL, Ox-LDL или biot-AGE-BSA до His9-hMSR1 на планшете.) Лунки промыли и связанные на планшете Ac-LDL или Ox-LDL определяли при помощи антитела кролика к ЛПНП (Alfa Aesar, кат. № J64398) в сочетании с поликлональными антителами осла, специфическими к IgG (H+L) кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (JacksonImmunoResearch, кат. № 711-035-152), а biot-AGE-BSA определяли при помощи стрептавидин-HRP (ThermoFisher Scientific, кат. № N200). Планшеты обработали раствором ТМБ субстрата (BD Biosciences, кат. № 51-2606KC и кат. № 51-2607KC) в соответствии с рекомендациями изготовителя и абсорбцию на 450 нм измерили на многоканальном планшет-ридере Victor™ (PerkinElmer™). Данный анализ проводили в четырех разных параллелях.

[0481] Данные анализировали при помощи сигмоидальной модели зависимости доза-ответ в программном обеспечении Prism™ (GraphPad). Блокирование в процентах при максимальной концентрации анализируемого антитела в каждом анализе рассчитывали как показатель способности антител блокировать связывание Ac-LDL, Ox-LDL или biot-AGE-BSA с His9-hMSR1 на планшете относительно опорных показателей анализа. В расчетах сигнал связывания одинаковых концентраций Ac-LDL, Ox-LDL или biot-AGE-BSA, использованных для анализа, в отсутствие антитела принимался как 100% связывание

или 0% блокирования, а опорные показатели анализа, определяемые как сигнал связывания образца буфера без лигандов MSR1 или антитела, принимался как 0% связывания или 100% блокирования. Макисмальный процент блокирования при самой высокой концентрации анализируемого антитела в каждом анализе сообщается для всех антител. Отрицательные числа блокирования в процентах отражали более высокое связывание лигандов MSR1 с His9-hMSR1 на планшете в присутствии антител. Результаты блокирования приведены в Таблице 15.

Таблица 15: Способность блокирования антител к MSR1 в конкурентных анализах ELISA

Антитело	**Блокирование антителом к MSR1 связывания Ox-LDL с His9-hMSR1**			**Блокирование антителом к MSR1 (100 нМ) связывания Ac-LDL с His9-hMSR1**	**Блокирование антителом к MSR1 (300 нМ) связывания biot-AGE-BSA с His9-hMSR1**
	концентрация антител к MSR1	**концентрация Ox-LDL**	**% блокирования**	**% блокирования**	**% блокирования**
Заблокировано >50% во всех форматах анализа					
H2aM25700N	500 нМ	10 нМ	98	104	101
H1H21227N-N297Q	500 нМ	10 нМ	97	105	96
H1H21227N-N297D	500 нМ	10 нМ	99	101	97
H1H21227N	500 нМ	10 нМ	100	105	99
Заблокировано >50% в некоторых форматах анализа					
H2aM25695N	500 нМ	10 нМ	96	65	16
H1H27766P2-N297Q	1 мкМ	10 нМ	54	52	27
H1H21234N-N297Q	500 нМ	10 нМ	49	75	-27
H1H21234N	500 нМ	10 нМ	98	70	21
Заблокировано <50% во всех форматах анализа					
H2aM21228N	500 нМ	5 нМ	41	-32	-1
H2aM21229N	500 нМ	5 нМ	38	-11	3
H2aM21230N	500 нМ	5 нМ	45	-14	9
H2aM21232N	500 нМ	5 нМ	16	25	-50
H2aM21235N	500 нМ	5 нМ	-4	24	-24
H2aM25685N	500 нМ	10 нМ	28	-33	-86
H2aM25690N	500 нМ	10 нМ	8	-76	-96
H1H21231N-	500 нМ	10 нМ	26	-60	-50

Антитело	Блокирование антителом к MSR1 связывания Ox-LDL с His9-hMSR1			Блокирование антителом к MSR1 (100 нМ) связывания Ac-LDL с His9-hMSR1	Блокирование антителом к MSR1 (300 нМ) связывания biot-AGE-BSA с His9-hMSR1
	концентрация антител к MSR1	концентрация Ox-LDL	% блокирования	% блокирования	% блокирования
N297Q					
H1H21231N	500 нМ	10 нМ	22	-62	-44
H1H27729P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	36	8	15
H1H27731P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-1	-41	4
H1H27732P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-60	-61	-9
H1H27734P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-15	-38	-4
H1H27736P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	3	-31	-3
H1H27739P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-41	-47	-9
H1H27747P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-31	-44	-2
H1H27749P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-21	-51	-1
H1H27751P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-31	-51	-11
H1H27754P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-44	-42	-9
H1H27756P-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-45	-54	-8
H1H27759P2-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-62	-45	-19
H1H27760P2-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-47	-43	-4
H1H27761P2-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-21	-36	-4
H1H27762P2-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-65	-58	-16
H1H27771P2-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-23	-21	-1
H1H27773P2-N297Q	1 мкМ	10 нМ	2	-11	1
H1H27778P2-N297Q	1 мкМ	10 нМ	-59	-40	-8
Антитела изотипического контроля					
Изотипический	1 мкМ	10 нМ	3	-8	4

Антитело	Блокирование антителом к MSR1 связывания Ox-LDL с His9-hMSR1			Блокирование антителом к MSR1 (100 нМ) связывания Ac-LDL с His9-hMSR1	Блокирование антителом к MSR1 (300 нМ) связывания biot-AGE-BSA с His9-hMSR1
	концентрация антител к MSR1	концентрация Ox-LDL	% блокирования	% блокирования	% блокирования
контроль hIgG1					
Изотипический контроль mIgG1	1 мкМ	10 нМ	16	-4	7

[0482] Было определено, что четыре из 35 проанализированных антител к MSR1 блокировали >50% связывания Ac-LDL, Ox-LDL и biot-AGE-BSA с hMSR1. Эти четыре антитела к MSR1 блокировали более 95% связывания 50 пМ Ac-LDL, 10 нМ Ox-LDL и 400 пМ biot-AGE-BSA с His9-hMSR1.

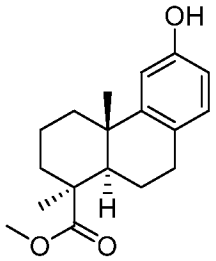
[0483] При максимальной концентрации анализированного антитела четыре из 35 антител к MSR1 блокировали >50% связывания Ac-LDL и/или Ox-LDL с hMSR1, но не блокировали связывание biot-AGE-BSA с hMSR1. Три из этих антител блокировали связывание 50 пМ Ac-LDL и 10 нМ Ox-LDL с hMSR1 с блокированием от 52% до 98%. Одно антитело (H1H21234N-N297Q) блокировало связывание только 50 пМ Ac-LDL с hMSR1 с блокированием в 75%.

[0484] Двадцать семь (27) из 35 антител к MSR1 и нерелевантные антитела изотипического контроля блокировали связывание <50% Ac-LDL, Ox-LDL и biot-AGE-BSA с hMSR1.

[0485] Три антитела к MSR1 (21227N, 21231N, 21234N) были созданы с оригинальной Fcγ-частью человека и версией с одной точечной мутацией N297Q. Антитело 21227N также было создано как третья версия с мутацией N297D. Модифицированные версии 21227N (H1H21227N-N297Q и H1H21227N-N297D) и 21231N (H1H21231N-N297Q) антител к -MSR1 сохранили исходные характеристики. Антитела H1H21227N-N297Q и H1H21227N-N297D блокировали >50% связывания Ac-LDL, Ox-LDL и biot-AGE-BSA с hMSR1, а антитело H1H21231N-N297Q блокировало <50% связывания Ac-LDL, Ox-LDL и biot-AGE-BSA с hMSR1. Модифицированное антитело к MSR1 H1H21234N-N297Q блокировало только связывание 50 pM Ac-LDL с hMSR1 в сравнении с немодифицированным антителом H1H21234N, которое блокировало >50% связывания Ac-LDL и Ox-LDL с hMSR1.

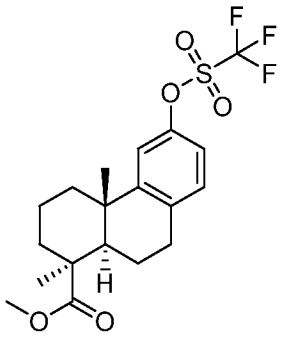
Пример 11. Синтез нагрузки P1 и P2B (ФИГ. 1)

Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (P1-2)



[0486] К раствору подокарповой кислоты (**P1-1**, 90 г, 0.33 моль) в метаноле (200 мл) и толуоле (600 мл) добавили (триметилсилил)диазометан (2 М в гексане, 200 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. После этого подокарповая кислота была полностью израсходована согласно ЖХМС. Летучие компоненты удалили *in vacuo*, а остаток очистили растворением в петролейном эфире (2 л) и получили соединение **P1-2** (91 г, выход 96%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 289 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 8.95 (s, 1H), 6.79 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.4 Гц, 1H), 6.48 (dd, J = 8.2, 2.4 Гц, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.80-2.55 (m, 2H), 2.20-2.02 (m, 3H), 1.96-1.71 (m, 2H), 1.56-1.45 (m, 2H), 1.27 (t, J = 13.5 Гц, 1H), 1.21 (s, 3H), 1.09 (td, J = 13.5, 4.1 Гц, 1H), 0.91 (s, 3H) ppm.

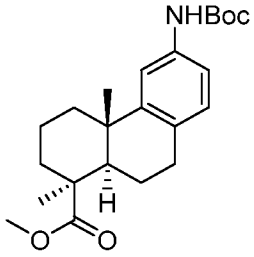
Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-1,4a-диметил-6-трифторметансульфонилокси)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (P1-3)



[0487] К раствору соединения **P1-2** (10 г, 35 ммоль) в метиленхлориде (200 мл) добавили пиридин (3.3 г, 42 ммоль) и DMAP (0.84 г, 6.9 ммоль) в атмосфере азота. Смесь охладили до -78°C и добавили трифлатный ангидрид (12 г, 42 ммоль), полученной смеси дали согреться до 25°C и перемешивали ее при 25°C еще на протяжении 4 часов. Реакционную смесь развели DCM (500 мл), промыли водой (100 мл), вод. гидрохлоридом (1 Н, 150 мл) и рассолом (100 мл), высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили сырое соединение **P1-3** (14 г, выход в сыром виде

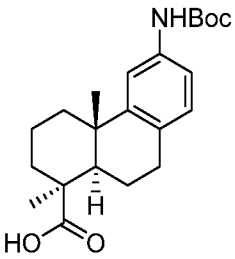
97%) в виде вязкого масла, которое было достаточно чистым для использования на следующем этапе. Сырое соединение **P1-3** можно было очистить посредством флэш-хроматографии (0-10% этилацетат в петролейном эфире) для получения чистого продукта в виде вязкого масла. ИЭР м/з: 421.2 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.12 (d, J = 2.5 Гц, 1H), 7.10 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.97 (dd, J = 8.5, 2.5 Гц, 1H), 3.67 (s, J = 3.4 Гц, 3H), 2.93 (dd, J = 17.2, 4.4 Гц, 1H), 2.85-2.71 (m, 1H), 2.29 (d, J = 13.5 Гц, 1H), 2.25-2.14 (m, 2H), 2.03-1.89 (m, 2H), 1.71-1.61 (m, 1H), 1.56-1.48 (m, 1H), 1.40 (td, J = 13.4, 4.2 Гц, 1H), 1.30-1.22 (m, 3H), 1.09 (td, J = 13.6, 4.2 Гц, 1H), 1.02 (s, 3H) ppm.

Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (P1-4)



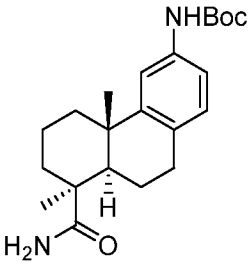
[0488] К раствору соединения **P1-3** (14 г, 34 ммоль) и *трет*-бутил карбамата ($BocNH_2$, 7.9 г, 68 ммоль) в *трет*-бутаноле (100 мл) добавили последовательно карбонат цезия (22 г, 68 ммоль), трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0) ($Pd_2(dba)_3$, 1.8 г, 2.0 ммоль) и X-Phos (1.8 г, 4.0 ммоль) при комнатной температуре. Смесь дегазировали и продули аргоном трижды и затем перемешивали при 80 °C под аргоном (баллон) на протяжении ночи до тех пор, пока соединение **P1-3** не было полностью израсходовано, что контролировали посредством ТСХ. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавили этилацетатом и отфильтровали через целит. Твердое вещество промыли этилацетатом 3 раза. Объединенный фильтрат сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (0-6.25% этилацетат в петролейном эфире), в результате чего получили соединение **P1-4** (11 г, выход 82%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 410 $(M + 23)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.07 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.13 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.87 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 3.59 (s, 3H), 2.76 (dd, J = 16.4, 4.5 Гц, 1H), 2.70-2.61 (m, 1H), 2.16-2.05 (m, 3H), 2.00-1.75 (m, 2H), 1.65-1.50 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.31-1.25 (m, 1H), 1.21 (s, 3H), 1.10 (td, J = 13.5, 4.1 Гц, 1H), 0.92 (s, 3H) ppm.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[(*трет*-бутокси)карбонил]амино}-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоновая кислота (P1-5)



[0489] К раствору соединения **P1-4** (4.9 г, 13 ммоль) в DMSO добавили калия *трет*-бутоксид (15 г, 0.13 моль) одной частью при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 60 °C в течение 3 часов под аргоном до завершения реакции согласно ЖХМС. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь налили в лед и медленно окислили вод. гидрохлоридом (0.5 М) до pH 5, при этом температура не превышала 25 °C. Осадок собрали посредством фильтрации и промыли водой несколько раз. Далее сырой продукт очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (0-20% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P1-5** (4.5 г, выход 93%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 318 (M - 55)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 12.08 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.87 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 2.79-2.68 (m, 1H), 2.65 (d, J = 12.6 Гц, 1H), 2.17-2.03 (m, 4H), 1.94-1.76 (m, 2H), 1.53 (d, J = 13.7 Гц, 1H), 1.46 (d, J = 7.4 Гц, 9H), 1.29-1.14 (m, 5H), 1.04 (s, 3H) ppm.

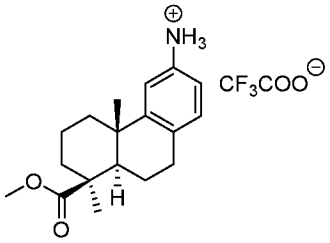
***трет*-Бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-карбамоил-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (P1-6)**



[0490] К раствору **P1-5** (4.5 г, 12 ммоль) и HATU (4.9 г, 13 ммоль) в DMF (50 мл) добавили диизопропилэтиламин (20 мл, 0.12 моль) и смесь перемешивали при 25 °C на протяжении часа. Затем к смеси добавили хлорид аммония (16 г, 0.30 моль) и затем смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Полученную смесь развели этилацетатом, промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством флэш-хроматографии (0-20% этилацетат в петролейном эфире), в результате чего получили соединение **P1-6** (4.2 г, выход 94%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 373.3 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 7.20 (s, 1H), 6.97 (d, J = 7.7 Гц, 1H), 6.80 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 2.77-2.68 (m, 2H), 2.66-2.55 (m, 1H), 2.20 (d, J = 12.9 Гц, 1H), 2.13 (dd, J = 13.2, 5.3 Гц,

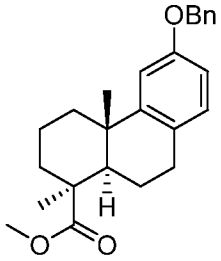
1H), 2.08 (d, *J* = 14.0 Гц, 1H), 2.03-1.86 (m, 2H), 1.54 (d, *J* = 11.1 Гц, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.26 (t, *J* = 26.7Гц, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.14-1.03 (m, 4H) ppm.

Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат трифторуксусной кислоты соль (P1-7)



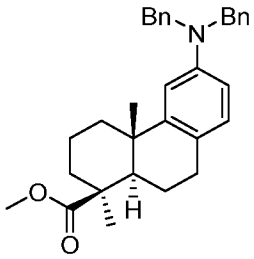
[0491] К раствору соединения **P1-4** (6.0 г, 15 ммоль) в DCM (60 мл) добавили TFA (12 мл) при КТ. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч до полного удаления Boc, что контролировали посредством ТСХ. Реакционную смесь сконцентрировали *in vacuo* и получили сырое соединение **P1-7** в виде соли трифторуксусной кислоты, которую использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 288 $(M+1)^+$.

Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(бензилокси)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (P1-8a)



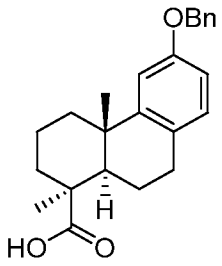
[0492] Смесь соединения **P1-2** (12 г, 40 ммоль) и карбоната цезия (14 г, 44 ммоль) в DMF (100 мл) перемешивали при 20-25 °C в течение 15 минут. К смеси добавили бензилбромид (7.1 мл, 60 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания при комнатной температуре в течение 4 часов полученную смесь налили в холодную воду и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали in vacuo. Сырой продукт очистили посредством флэш-хроматографии (0-10% этилацетат в петролейном эфире), в результате чего получили указанное в заголовке соединение **P1-8a** (13 г, выход 89%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 379 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 7.60-7.20 (m, 5H), 7.00-6.82 (m, 2H), 6.73 (d, *J* = 7.1 Гц, 1H), 5.03 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.95-2.58 (m, 2H), 2.36-2.10 (m, 3H), 2.10-1.85 (m, 2H), 1.70-1.48 (m, 2H), 1.44-1.21 (m, 4H), 1.15 (t, *J* = 17.2 Гц, 1H), 1.01 (s, 3H) ppm.

Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(дибензиламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (8b)



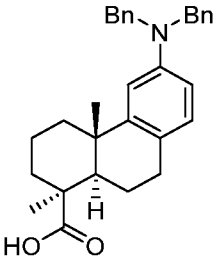
[0493] К раствору сырого соединения **P1-7**, полученного выше (рассчит. 15 ммоль) в DMF (60 мл) добавили карбонат калия (6.4 г, 46 ммоль) и бензилбромид (5.8 г, 34 ммоль) при КТ. Реакционную смесь перемешивали при 80 °C на протяжении ночи до завершения реакции, что контролировали посредством ТСХ. После охлаждения до КТ смесь налили в холодную воду (300 мл) и экстрагировали этилацетатом (х 3). Объединенный органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo* и получили сырой продукт **8b**, который использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 468 $(M + 1)^+$.

1S,4aS,10aR)-6-(бензилокси)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоновая кислота (P1-9a)



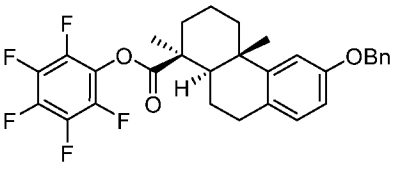
[0494] Смесь соединения **P1-8a** (11 г, 29 ммоль) и трет-бутоксида калия (33 г, 0.29 моль) в DMSO (0.19 л) перемешивали при 100 °C на протяжении часа до полного удаления метильной группы, что контролировали посредством ЖХМС и ТСХ. После охлаждения до 25 °C смесь охладили водным гидрохлоридом (1 Н) и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор промыли рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали in vacuo. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (0-24% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P1-9a** (7.5 г, выход 71%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 365 $(M + H)^+$. 1Н ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 7.42 (d, J = 7.4 Гц, 2Н), 7.36 (t, J = 7.5 Гц, 2Н), 7.30 (t, J = 7.3 Гц, 1Н), 6.92 (d, J = 8.4 Гц, 1Н), 6.87 (d, J = 2.5 Гц, 1Н), 6.72 (dd, J = 8.4, 2.5 Гц, 1Н), 5.02 (s, 2Н), 2.82 (dd, J = 16.3, 4.4 Гц, 1Н), 2.77-2.65 (m, 1Н), 2.24 (d, J = 13.2 Гц, 2Н), 2.19 (dd, J = 13.8, 6.0 Гц, 1Н), 2.11-1.96 (m, 2Н), 1.64-1.56 (m, 1Н), 1.53 (d, J = 11.0 Гц, 1Н), 1.35 (td, J = 13.3, 3.7 Гц, 1Н), 1.30 (s, 3Н), 1.13 (s, 3Н), 1.11-1.05 (m, 1Н) ppm.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(Дибензиламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоновая кислота (9b)



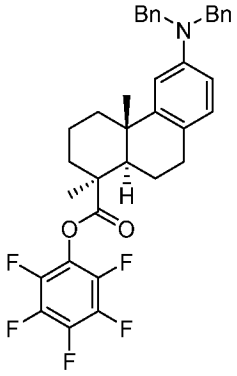
[0495] К раствору сырого соединения **8b**, полученного выше (рассчит. 15 ммоль), в DMSO (100 мл) добавили *трет*-бутоксид калия (17 г, 0.15 моль) одной частью при КТ. Реакционную смесь перемешивали при 100 °C в течение 2 ч под аргоном до завершения реакции согласно ЖХМС. После охлаждения до КТ реакционную смесь налили в лед и медленно окислили вод. гидрохлоридом (4 М) до pH 5, при этом температуре не позволяли подниматься выше 25 °C. Смесь экстрагировали этилацетатом и объединенный органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Сырой продукт очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (0-20% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **9b** (6.8 г, выход 99% за 3 этапа из соединения **P1-4**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 454 $(M + 1)^+$.

Пентафторфенил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(бензилокси)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (P1-10a)



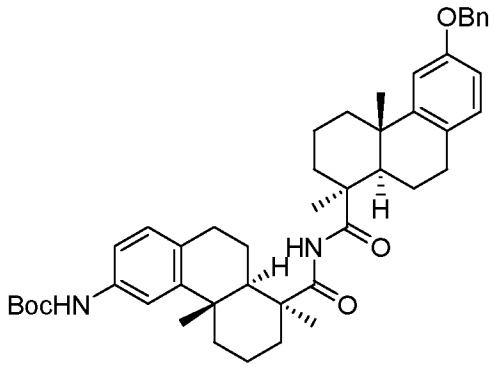
[0496] К раствору **P1-9a** (9.6 г, 26 ммоль) в DMF (100 мл) добавили DIPEA (14 мл, 79 ммоль) и перфторфенил 2,2,2-трифторацетат (15 г, 53 ммоль). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Затем реакционную смесь развели эфиром (200 мл) и промыли водой (300 мл) и рассолом (200 мл). Органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством флэш-хроматографии (0-10% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P1-10a** (12 г, выход 88%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 531 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 7.43 (d, J = 7.1 Гц, 2H), 7.38 (t, J = 7.4 Гц, 2H), 7.31 (t, J = 7.2 Гц, 1H), 6.93 (dd, J = 10.2, 5.5 Гц, 2H), 6.76 (dd, J = 8.4, 2.5 Гц, 1H), 5.05 (s, 2H), 2.81 (dd, J = 16.3, 4.5 Гц, 1H), 2.77-2.68 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 2H), 2.18 (dd, J = 13.4, 5.6 Гц, 1H), 2.00-1.83 (m, 2H), 1.74 (d, J = 11.8 Гц, 1H), 1.65 (d, J = 14.1 Гц, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.38-1.27 (m, 2H), 1.08 (s, 3H) ppm.

Пентафторфенил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(дибензиламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (10b)



[0497] К раствору **9b** (6.8 г, 15 ммоль) в DMF (100 мл) добавили DIPEA (10 мл, 0.61 моль) и перфторфенил 2,2,2-трифторацетат (10 мл, 58 ммоль). Данную смесь перемешивали при 25 °C на протяжении ночи под азотом и затем развели эфиром. Данный органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (0-10% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **10b** (7.5 г, выход 81%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 620 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.36-7.25 (m, 10H), 6.92 (d, J =8.4 Гц, 1H), 6.67 (d, J =2.8 Гц, 1H), 6.63 (dd, J = 8.4, 2.6 Гц, 1H), 4.63 (m, 4H), 2.85-2.73 (m, 2H), 2.41-2.37(m, 1H), 2.22-2.20 (m, 1H), 2.15-1.91 (m, 3H), 1.71-1.65 (m, 2H), 1.51 (s, 3H), 1.37-1.19 (m, 2H), 1.10 (s, 3H) ppm.

***трет*-Бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(бензилокси)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (P1-11a)**

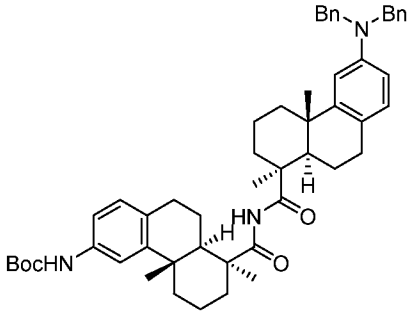


[0498] К раствору соединения **P1-6** (2.3 г, 6.2 ммоль) в THF (20 мл) добавили по каплям*н*-бутиллитий (2.5 M в гексане, 5.5 мл, 14 ммоль) при -78 °C. Реакционную смесь перемешивали при данной температуре в течение 1 часа. К смеси добавили раствор **P1-10a** (3.0 г, 5.6 ммоль) в THF (20 мл) и полученную смесь затем перемешивали при 10-20

°C на протяжении ночи до разрушения соединения **P1-10a** под контролем ЖХМС. Реакцию остановили при помощи нас. вод.хлорида аммония и выполнили экстракцию этилацетатом. Объединенный органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством флэш-хроматографии (0-30% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P1-11a** (1.59 г, выход 51%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 719 (M + 1)$^+$.

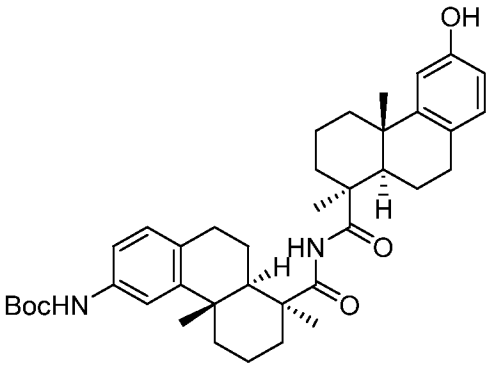
[0499] (По сравнению с описанной далее процедурой **11b**, вместо LiHMDS применили n-бутиллитий. Хотя соединение **P1-6** не было полностью израсходовано, данная процедура позволяла уменьшить количество побочного продукта, и выход **P1-11a** увеличился приблизит. от 40% до 51%. Данное непрореагировавшее соединение **P1-6** восстановили (восстановленный выход: 10-20%).

***трет*-Бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(дибензиламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (11b)**



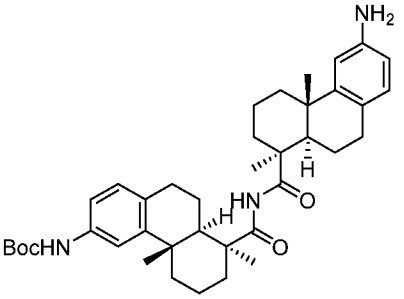
[0500] К раствору соединения **P1-6** (1 г, 2.7 ммоль) в THF (15 мл) добавили по каплям лития бис(триметилсилил)амид (1 М в гексане, 8.0 мл) при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при 0 °C на протяжении часа. К смеси добавили раствор соединения **10b** (2.5 г, 4.0 ммоль) в THF (10 мл) и затем полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Затем реакционную смесь гасили нас.вод. хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством флэш-хроматографии (0-35% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **11b** (0.95 г, выход 44%) в виде белого твердого вещества; и восстановленное соединение **P1-6** (восстановленный выход 37%). ИЭР м/з: 808 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8.16 (s, 1H), 7.35-7.24 (m, 10H), 7.12 (d, J = 8 Гц, 1H), 7.00 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.91 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.62-6.59 (m, 2H), 6.42 (s, 1H), 4.62 (s, 3H), 2.98-2.75 (m, 4H), 2.31-2.22 (m, 5H), 2.10-1.97 (m, 5H), 1.69-1.63 (m, 4H), 1.56 (s, 9H), 1.32-1.27 (m, 9H), 1.43-1.27 (m, 5H), 1.05 (s, 3H) ppm.

***трет*-Бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (P1-12a)**



[0501] К раствору **P1-11a** (2.0 г, 2.78 ммоль) в этилацетате (40 мл) добавили влажный палладий на углероде (10% Pd, 0.9 г) под защитой азота. Смесь дегазировали и продули водородом и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода из баллона на протяжении ночи до полного израсходования **P1-11a** под контролем ЖХМС. Смесь профильтровали через целит и фильтрат сконцентрировали in vacuo. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (0-55% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P1-12a** (1.06 г, выход 61%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 629 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.10 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.15 (d, J = 7.5 Гц, 1H), 6.90 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.81 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.3 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.2, 2.4 Гц, 1H), 2.84 (td, J = 16.3, 3.8 Гц, 2H), 2.77-2.64 (m, 2H), 2.30-2.22 (m, 2H), 2.14 (t, J = 10.9 Гц, 4H), 2.00-1.80 (m, 4H), 1.65-1.54 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.34-1.28 (m, 2H), 1.27 (d, J = 2.5 Гц, 6H), 1.15-1.08 (m, 2H), 0.99 (s, 6H) ppm.

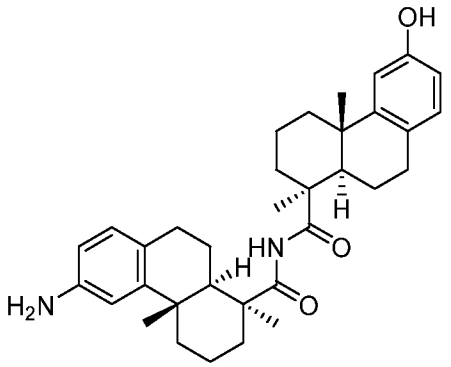
***трет*-Бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (12b)**



[0502] К раствору **11b** (0.45 г, 0.56 ммоль) в этилацетате (5 мл) добавили влажный палладий на углероде (10% Pd, 50 мг) под азотом. Смесь дегазировали, продули водородом 3 раза и перемешивали при КТ в атмосфере водорода из баллона на

протяжении ночи. Смесь отфильтровали через целит и фильтрат сконцентрировали *in vacuo* и получили соединение **12b** (0.33 г, выход 94%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 628 $(M + 1)^+$.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P1)



[0503] К раствору соединения **P1-12a** (0.17 г, 0.27 ммоль) в DCM (10 мл) добавили по каплям TFA (3 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении часа до удаления Boc согласно ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили **P1** (0.10 г, выход 70%) в виде белого твердого вещества.

[0504] ИЭР м/з: 529.3 $(M + 1)^+$.

[0505] ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8.14 (s, 1H), 6.92 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.86 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 6.73 (d, J = 2.5 Гц, 1H), 6.65-6.57 (m, 2H), 6.50 (dd, J = 8.1, 2.3 Гц, 1H), 4.75 (s, 1H), 3.49 (s, 1H), 2.99-2.85 (m, 2H), 2.79 (tt, J = 11.6, 5.8 Гц, 2H), 2.34-2.14 (m, 6H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.74-1.51 (m, 5H), 1.46-1.34 (m, 2H), 1.30 (s, 6H), 1.21-1.06 (m, 8H) ppm.

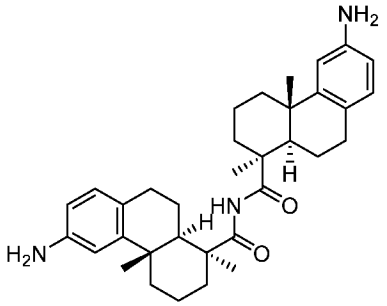
[0506] ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.99 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 6.81 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.5 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.0, 2.5 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 2.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 8.0, 2.5 Гц, 1H), 4.69 (s, 2H), 2.86-2.60 (m, 4H), 2.28-2.10 (m, 6H), 1.94-1.75 (m, 4H), 1.65-1.53 (m, 4H), 1.35-1.20 (m, 8H), 1.20-1.06 (m, 2H), 0.98 (s, 6H) ppm.

[0507] ^{13}C ЯМР (100 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 174.03, 173.92, 155.34, 148.39, 147.63, 146.43, 129.56, 129.09, 124.60, 121.65, 113.23, 112.58, 111.81, 110.77, 52.32, 52.09, 45.56, 45.52, 39.20, 39.36, 38.23, 38.17, 37.18, 37.12, 31.08, 31.00, 27.65, 27.64, 23.08, 23.03, 21.43, 21.27, 19.64, 19.61 ppm.

[0508] ВЭЖХ (способ B): Время удерживания: 8.92 мин, чистота: 99.4%. хиральная ВЭЖХ: >99.9% (в колонке AD, AS, OD и OJ).

[0509] Оптическое вращение (α): +2.53° (1.7 г/100 мл THF, 25 °C).

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P2B)

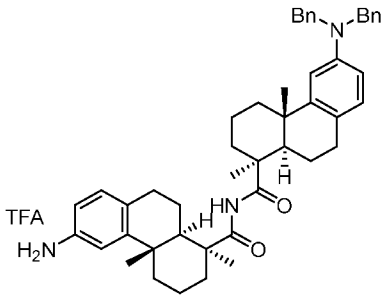


[0510] К раствору соединения **12b** (0.63 г, 1.0 ммоль) в DCM (10 мл) добавили по каплям TFA (3 мл) при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 4 ч до удаления Boc согласно ЖХМС. Смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили **P2B** (0.42 г, выход 79%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 528.2 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.28 (s, 1H), 6.67 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 6.47 (d, J = 2.0 Гц, 2H), 6.33 (dd, J = 8.0, 2.0 Гц, 2H), 4.69 (s, 4H), 2.80-2.75 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.26-2.20 (m, 2H), 2.19-2.05 (m, 4H), 1.95-1.75 (m, 4H), 1.62-1.50 (m ,4H), 1.33-1.20 (m, 8H), 1.12 (t, J = 8.8 Гц, 2H), 0.98 (s, 6H) ppm.

Пример 11-2. Синтез P3B

[0511] Данный пример демонстрирует общие способы синтеза производного подокарповой кислоты **P3B** в Таблице C далее. Данный пример относится к соединениям, пронумерованным от **11b** и **P3B** на ФИГ. 23.

(3*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*)-17-имино-10,13-диметил-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-тетрадекагидро-1*H*-циклопента[a]фенантрен-3-ол, трифторуксусной кислоты соль (P3B)



[0512] К раствору соединения **11b** (10 мг, 12 мкмоль) в DCM (2 мл) добавили TFA (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 2 ч до удаления Boc согласно ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток растворили в 5% ацетонитрила в

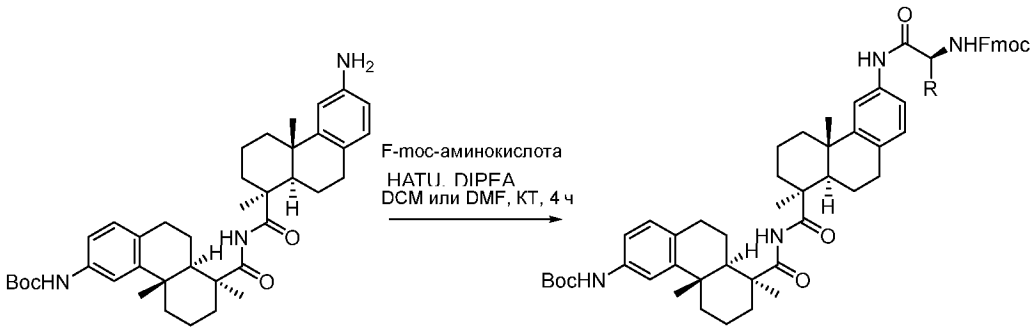
воде. Раствор лиофилизировали и получили соединение **P3B** (7 мг, выход 80%) в виде светло-желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 354.8 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.38 (br s, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.35-7.06 (m, 12H), 6.97 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 6.73 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.46 (d, J = 6.4 Гц, 1H), 4.68-4.55 (m, 4H), 3.00-2.50 (m, 4H), 2.40-2.00 (m, 6H), 1.94-1.73 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 3H), 1.50-1.00 (m, 11H), 0.98 (s, 3H), 0.83 (s, 3H) ppm. ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO$_{d6}$) δ -74.08 ppm.

ПРИМЕР 11-3

[0513] Данный пример демонстрирует общие способы синтеза производных подокарповой кислоты **P4B-P8B** в Таблице C далее. Данный пример относится к соединениям, пронумерованным от **12b** и **P4B-P8B** на ФИГ. 23.

Пример 11-3a

Промежуточные соединения 13a-e



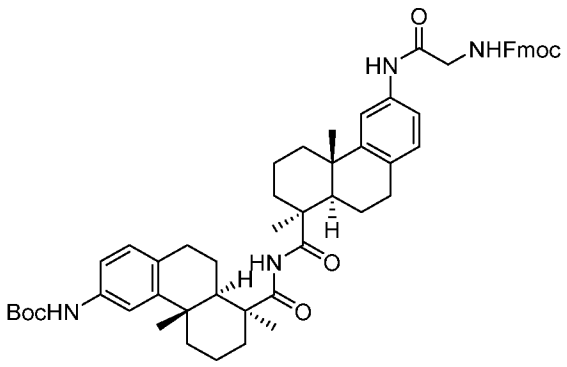
12b

13a, R = H
13b, R = CH_2OH
13c, R = $(CH_2)_4NHFmoc$
13d, R = $CH_2COOtBu$
13e, R = $CH_2CH_2COOtBu$

[0514] К раствору соединения **12b** (1.0 эквив.) в DMF или DCM добавили Fmoc-аминокислоту (1.1-1.2 эквив.), HATU (1.2-1.5 эквив.) и DIPEA (2.0-3.0 эквив.), последовательно. Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 2 ч под контролем ЖХМС. Смесь сконцентрировали *in vacuo* (когда DCM был растворителем) и остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (0-90% этилацетат в петролейном эфире); или реакционную смесь (когда DMF был растворителем) очистили напрямую посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (50-90% ацетонитрил в вод. бикарбоната аммония (10 мМ)) и получили соединение **13** в виде белого твердого вещества.

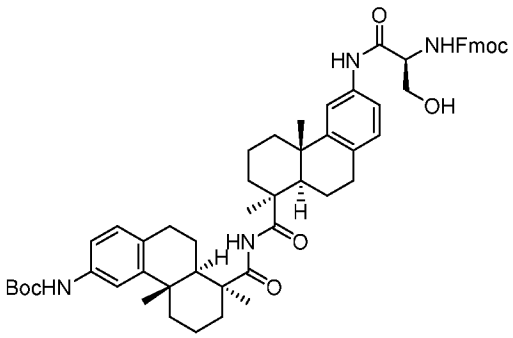
12b г (ммоль)	Fmoc-аминокислота		HATU г (ммоль)	DIPEA г (ммоль)	Растворитель (мл)	Время (ч)	очистка	Продукт		
	R	г (ммоль)						№	г	Выход (%)
0.13 (0.20)	H	0.071 (0.24)	0.11 (0.29)	0.077 (0.60)	DMF (10)	4	RP-B	**13a**	0.14	78
0.31 (0.50)	CH_2OH	0.18 (0.55)	0.23 (0.60)	0.19 (1.50)	DCM (20)	4	SGC	**13b**	0.39	83
0.20 (0.32)	$(CH_2)_4NHFmoc$	0.21 (0.35)	0.15 (0.38)	0.083 (0.64)	DMF (20)	4	RP-B	**13c**	0.30	78
0.31 (0.50)	$CH_2COOtBu$	0.22 (0.55)	0.23 (0.60)	0.19 (1.50)	DCM (20)	4	SGC	**13d**	0.43	85
0.31 (0.50)	$(CH_2)_2COOtBu$	0.23 (0.55)	0.23 (0.60)	0.19 (1.50)	DCM (20)	4	SGC	**13e**	0.42	82

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[(*трет*-бутокси)карбонил]амино}-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил)карбамат (13a)



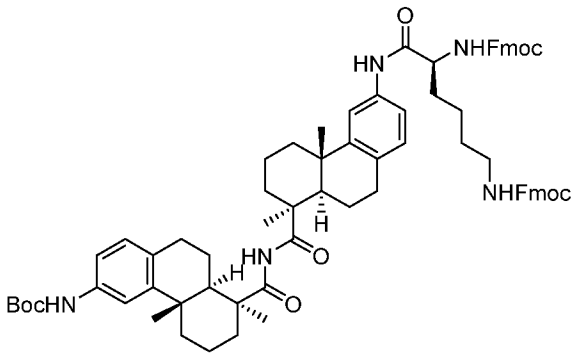
[0515] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений **13a-e** получили соединение **13a** (0.14 г, выход 78%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 907 $(M + H)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[(*трет*-бутокси)карбонил]амино}-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамат (13b)



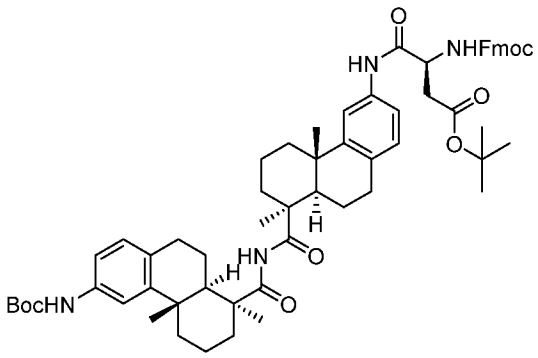
[0516] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений **13a-e** получили соединение **13b** (0.39 г, выход 83%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 938 $(M + H)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(5*S*)-5-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[(*трет*-бутокси)карбонил]амино}-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-5-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}пентил]карбамат (13c)



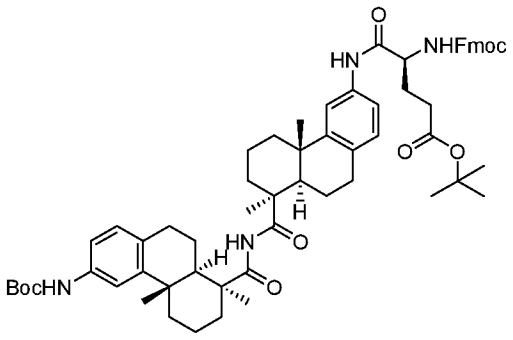
[0517] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений **13a-e** получили соединение **13c** (0.30 г, выход 78%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1201 $(M + H)^+$.

(*S*)-*трет*-Бутил 3-(((9*H*-флуорен-9-ил)метокси)карбониламино)-4-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(*трет*-бутоксикарбониламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-4-оксобутаноат (13d)



[0518] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений **13a-e** получили соединение **13d** (0.43 г, выход 85%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1021 $(M + H)^+$.

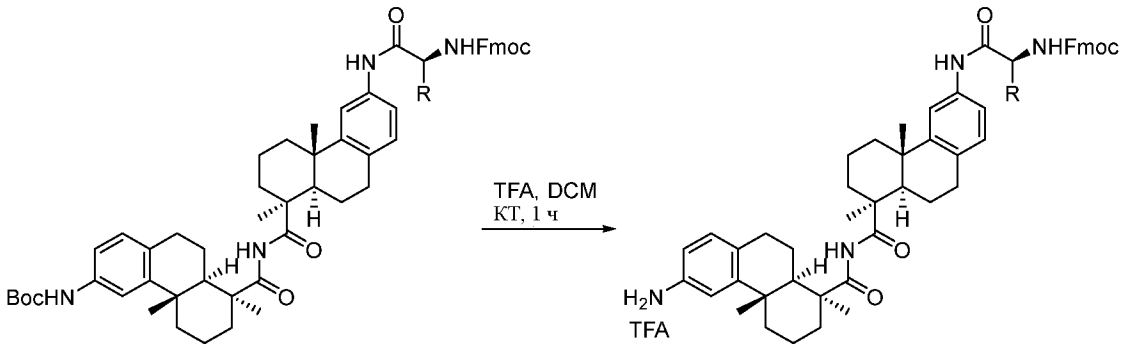
(*S*)-*трет*-Бутил 4-(((9*H*-флуорен-9-ил)метокси)карбониламино)-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(*трет*-бутоксикарбониламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-5-оксопентаноат (13e)



[0519] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений **13a-e** получили соединение **13e** (0.42 г, выход 82%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1036 $(M + H)^+$.

Пример 11-3b

Промежуточные соединения 14a-e



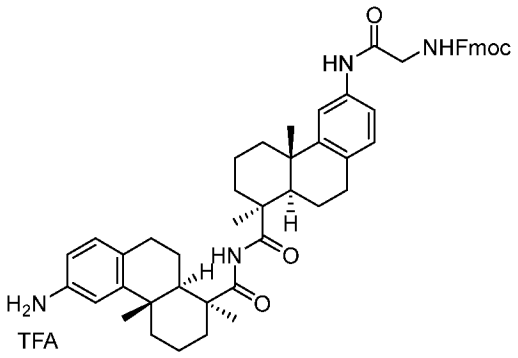
13a, R = H
13b, R = CH_2OH
13c, R = $(CH_2)_4NHFmoc$
13d, R = $CH_2COOtBu$
13e, R = $CH_2CH_2COOtBu$

14a, R = H
14b, R = CH_2OH
14c, R = $(CH_2)_4NHFmoc$
14d, R = CH_2COOH
14e, R = CH_2CH_2COOH

[0520] К раствору соединения **13** (1.0 эквив.) в DCM добавили TFA при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении часа и сконцентрировали *in vacuo* и получили сырой продукт **14** в виде бесцветного масла, который использовали для следующего этапа без дальнейшей очистки.

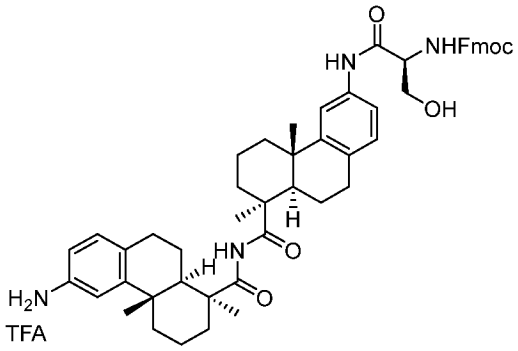
13			TFA (мл)	DCM (мл)	Сырой продукт **14**		
№	R	г (ммоль)			№	R	г
13a	H	0.14 (0.16)	3	10	**14a**	H	0.13
13b	CH_2OH	0.10 (0.11)	3	10	**14b**	CH_2OH	0.09
13c	$(CH_2)_4NHFmoc$	0.24 (0.20)	3	10	**14c**	$(CH_2)_4NHFmoc$	0.22
13d	$CH_2COOtBu$	0.12 (0.12)	3	10	**14d**	CH_2COOH	0.10
13e	$(CH_2)_2COOtBu$	0.10 (0.10)	3	20	**14e**	$(CH_2)_2COOH$	0.08

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил)карбамат, трифторуксусной кислоты соль (14a)



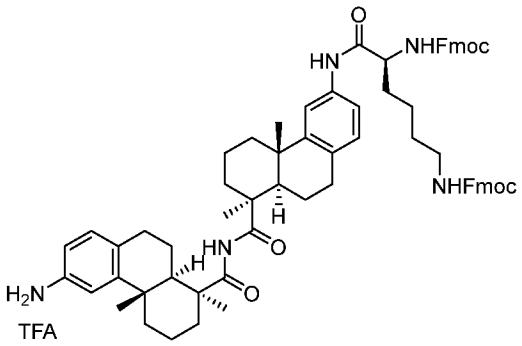
[0521] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений **14a-e** получили сырое соединение **14a** (0.14 г, выход 99%, соль TFA) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 807 $(M + 1)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил (*S*)-1-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-3-гидрокси-1-оксопропан-2-илкарбамат, трифторуксусной кислоты соль (14b)



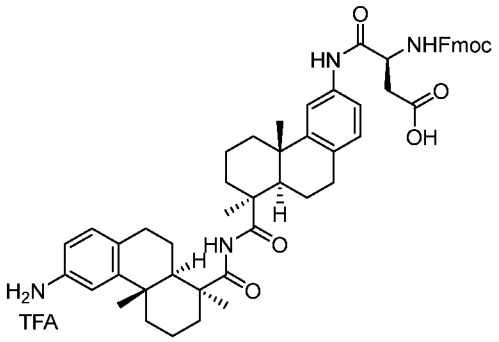
[0522] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений **14a-e** получили сырое соединение **14b** (0.14 г, выход 99%, соль TFA) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 837 $(M + 1)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(5*S*)-5-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-5-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}пентил]карбамат, трифторуксусной кислоты соль (14c)



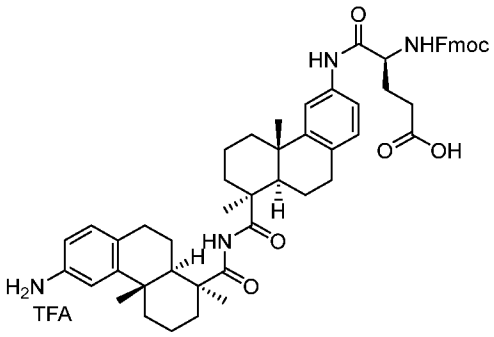
[0523] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений **14a-e** получили сырое соединение **14c** (0.22 г, выход 92%, соль TFA) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 1101 $(M + 1)^+$.

(*S*)-3-(((9*H*-Флуорен-9-ил)метокси)карбониламино)-4-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-4-оксобутановая кислота, трифторуксусной кислоты соль (14d)



[0524] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений **14a-e** получили сырое соединение **14d** (0.10 г, выход 87%, соль TFA) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 866 $(M + 1)^+$.

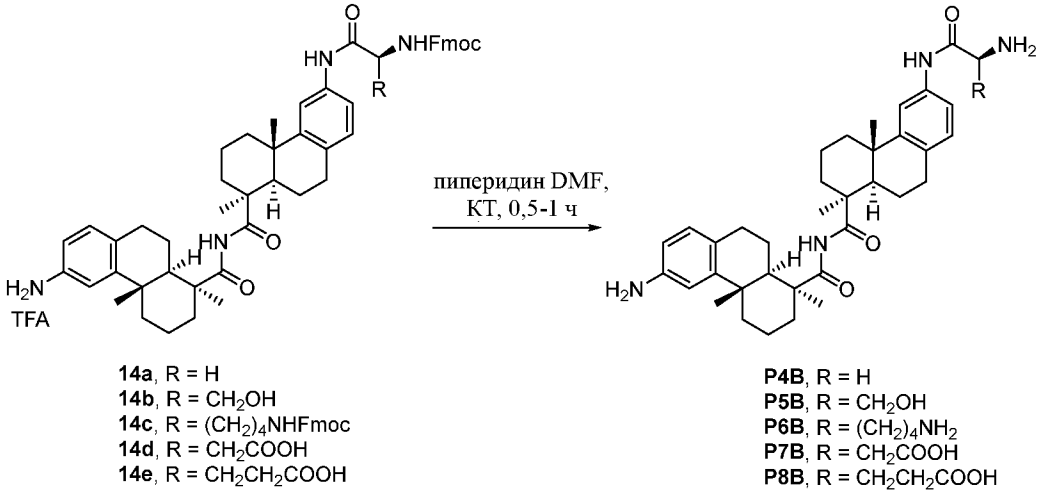
(*S*)-4-(((9*H*-Флуорен-9-ил)метокси)карбониламино)-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-5-оксопентановая кислота, трифторуксусной кислоты соль (14e)



[0525] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений **14a-e** получили сырое соединение **14e** (84 мг, выход 86%, соль TFA) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 880 $(M + 1)^+$.

Пример 11-3c

Нагрузки P4B-P8B



14a, R = H
14b, R = CH_2OH
14c, R = $(CH_2)_4NHFmoc$
14d, R = CH_2COOH
14e, R = CH_2CH_2COOH

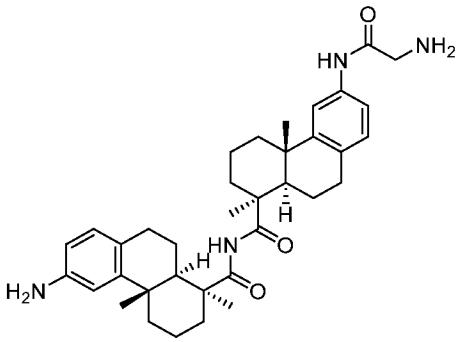
P4B, R = H
P5B, R = CH_2OH
P6B, R = $(CH_2)_4NH_2$
P7B, R = CH_2COOH
P8B, R = CH_2CH_2COOH

[0526] К раствору полученного выше сырого соединения **14** в DMF добавили пиперидин. Смесь перемешивали при КТ на протяжении часа под контролем ЖХМС. Смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили нагрузки **P4-8** в виде белого твердого вещества.

Сырое соединение **14**			пиперидин (мл)	DMF (мл)	Время (час)	очистка			
№	R	г (ммоль)					№	R	мг (Выход)
14a	H	0.066 (0.073)	0.5	3	0.5	Преп-B	**P4B**	H	12 (28%)
14b	CH_2OH	0.10 (0.11)	0.5	3	0.5	Преп-B	**P5B**	CH_2OH	41 (67%)

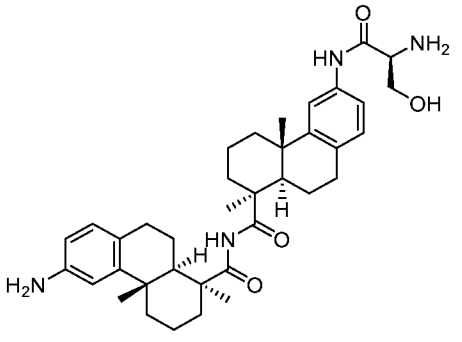
14c	$(CH_2)_4NHFmoc$	0.050 (0.045)	0.5	5	1	Преп-B	**P6B**	$(CH_2)_4NH_2$	5 (17%)
14d	CH_2COOH	0.10 (0.12)	0.5	3	0.5	Преп-B	**P7B**	CH_2COOH	39 (51%)
14e	$(CH_2)_2COOH$	0.10 (0.12)	0.5	3	0.5	Преп-B	**P8B**	$(CH_2)_2COOH$	44 (58%)

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(2-Аминоацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P4B)



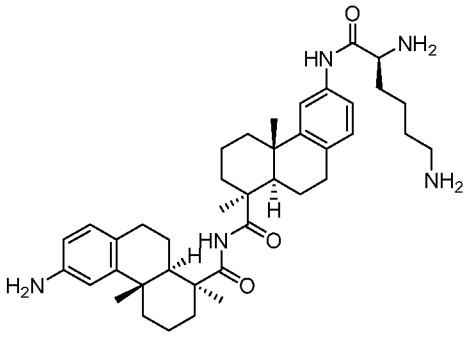
[0527] В соответствии с общей процедурой для Нагрузок **P4B-8B** получили соединение **P4B** (12 мг, выход 28%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 585 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.79 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.41 (dd, J = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4. 70 (m, 2H), 3.20 (s, 3H), 2.95-2.83 (m, 1H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.20-2.10 (m, 4H), 2.05-1.70 (m, 4H), 1.70-1.50 (m, 4H), 1.31-1.25 (m, 8H), 1.20-1.10 (m, 2H), 1.05 (d, J = 7.5 Гц ,6H) ppm.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-Амино-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((*S*)-2-амино-3-гидроксипропанамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P5B)



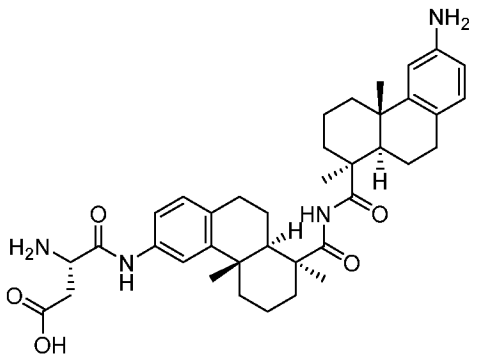
[0528] В соответствии с общей процедурой для Нагрузок **P4B-8B** получили соединение **P5B** (41 мг, выход 67%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 615 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.09(s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.41 (dd, J = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96(d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.68(d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.48(d, J = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4.84-4.76 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 3.60-3.45 (m, 2H), 2.95-2.83 (m, 1H), 2.80-2.60 (m, 4H), 2.30-2.20 (m, 3H), 2.20-2.10 (m, 4H), 1.95-1.75 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 4H), 1.40-1.30 (m, 2H), 1.28 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.20-1.10 (m, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ppm.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-Амино-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((*S*)-2,6-диаминогексанамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P6B)



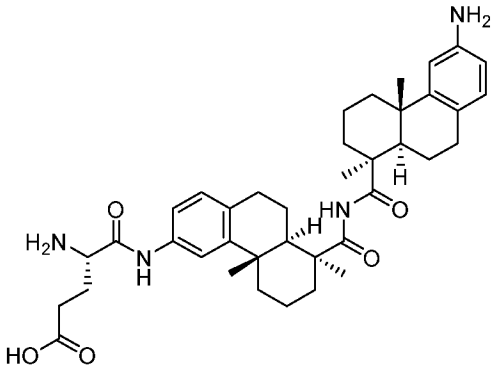
[0529] В соответствии с общей процедурой для Нагрузок **P4B-8B** получили соединение **P6B** (5 мг, выход 17%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 656 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.09 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.41 (dd, J = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4. 70 (m, 2H), 3.20 (s, 2H), 2.95-2.83 (m, 2H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.37-2.35 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 3H), 2.20-2.10 (m, 5H), 2.05-1.95 (m, 2H), 1.95-1.75 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 6H), 1.31-1.25 (m, 8H), 1.20-1.10 (m, 3H), 1.05 (d, J = 7.5 Гц, 6H), 0.85 (t, J = 6.0 Гц, 1H) ppm.

(*S*)-3-Амино-4-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-4-оксобутановая кислота (P7B)



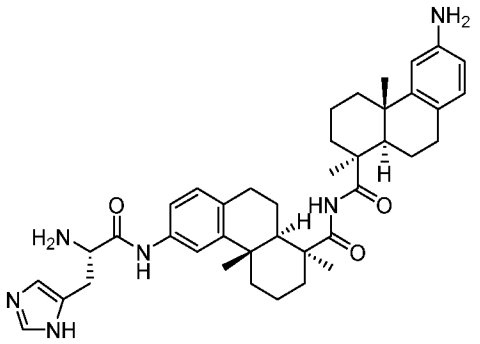
[0530] В соответствии с общей процедурой для Нагрузок **P4B-8B** получили соединение **P7B** (39 мг, выход 51%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 643 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 10.5-10.0 (br, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.41 (dd, *J* = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.5 Гц, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.5 Гц, 1H), 6.48 (d, *J* = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, *J* = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4.84-4.50 (m, 2H), 3.75-3.68 (m, 2H), 2.95-2.83 (m, 1H), 2.80-2.60 (m, 4H), 2.40-2.20 (m, 4H), 2.20-2.10 (m, 5H), 1.95-1.70 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 5H), 1.27 (d, *J* = 7.5 Гц, 6H), 1.20-1.10 (m, 2H), 1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ppm.

(*S*)-4-Амино-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-Амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-5-оксопентановая кислота (P8B)



[0531] В соответствии с общей процедурой для Нагрузок **P4B-8B** получили соединение **P8B** (44 мг, выход 58%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 657 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 8.09 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.41 (dd, *J* = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.5 Гц,1H), 6.68 (d, *J* = 8.5 Гц, 1H), 6.48 (d, *J* = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, *J* = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4.70 (m, 2H), 2.95-2.83 (m, 1H), 2.80-2.60 (m, 5H), 2.30-2.20 (m, 4H), 2.20-2.10 (m, 5H), 1.95-1.75 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 5H), 1.50-1.40 (m, 4H), 1.27 (d, *J* =7.5 Гц, 6H), 1.20-1.10 (m, 2H), 1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ppm.

(1S,4aS,10aR)-6-амино-N-((1S,4aS,10aR)-6-((S)-2-амино-3-(1H-имидазол-4-ил)пропанамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P9B)



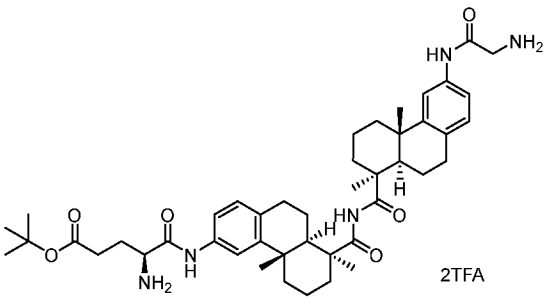
[0532] К раствору Fmoc-His-OH (0.38 г, 1.0 ммоль) в DCM (5 мл) добавили Fmoc-OSu (0.37 г, 1.1 ммоль) и DIPEA (0.26 г, 2.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством флэш-хроматографии (5-10% метанол в DCM) и получили Fmoc-His(Fmoc)-OH (0.50 г, выход 84%, ИЭР м/з: 600 $(M + 1)^+$) в виде белого твердого вещества.

[0533] К раствору соединения **12b** (0.31 г, 0.50 ммоль) в DCM (20 мл) добавили Fmoc-His(Fmoc)-OH (0.33 г, 0.55 ммоль), полученный выше, HATU (0.23 г, 0.60 ммоль) и DIPEA (0.19 г, 1.5 ммоль), последовательно. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч под контролем ЖХМС. К реакционной смеси добавили пиперидин (0.5 мл) и смесь перемешивали при КТ на протяжении часа до полного удаления Fmoc под контролем ЖХМС. Смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (50-80% ацетонитрил в воде) и получили **Boc-P9B** (0.15 г) в виде белого твердого вещества, половину из которого растворили в DCM (20 мл). К раствору добавили TFA (3 мл). Смесь перемешивали при КТ на протяжении часа до удаления Boc согласно ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **P9B** (17 мг, выход 12%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 665 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 11.82 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.52-7.50 (m, 2H), 7.41 (dd, J = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.90-6.80 (m, 1H), 6.68 (d, J = 8.5 Гц,1H), 6.48 (d, J = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4.84-4.50 (m, 2H), 3.60-3.45 (m, 2H), 2.95-2.83 (m, 2H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.40-2.10 (m, 8H), 1.95-1.70 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 4H), 1.27 (d, J = 7.5 Гц, 6H), 1.20-1.10 (m, 2H), 1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ppm.

ПРИМЕР 11-4

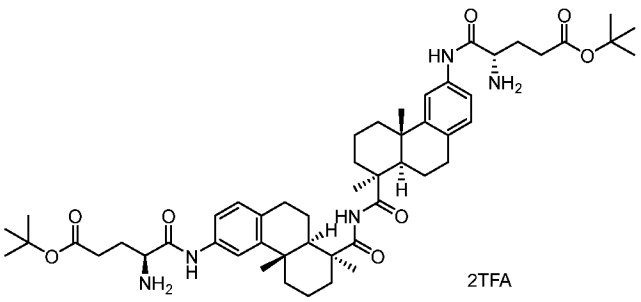
[0534] Данный пример демонстрирует общие способы синтеза производных подокарповой кислоты **P10B** и **P11B** в Таблице C далее. Данный пример относится к соединениям, пронумерованным от **14a**, **15a-b** и **P10B** и **P11B** на ФИГ. 24.

(*S*)-*трет*-Бутил 4-амино-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(2-аминоацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-5-оксопентаноат, ди-трифторуксусной кислоты соль (15a)



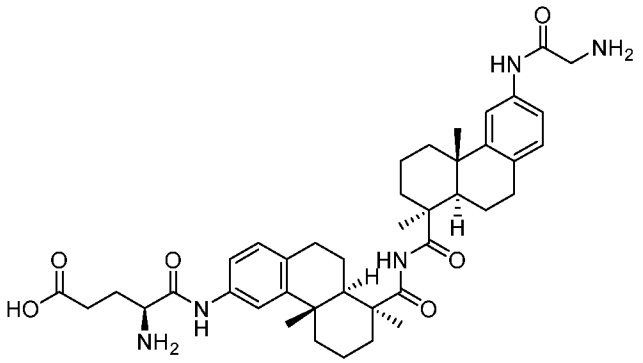
[0535] К раствору Fmoc-Glu(OtBu)-OH (74 мг, 0.17 ммоль) и DIPEA (55 мкл, 0.32 ммоль) в DMF (5.0 мл) добавили HATU (91 мг, 0.24 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 15 мин и затем добавили соединение **14a** (0.14г, 0.16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (1 мл) по каплям. Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении часа до удаления Fmoc согласно ЖХМС. Полученную смесь напрямую отделили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0.01%)) и получили соединение **15a** (0.13 г, выход 80%) в виде желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 770.5 $(M + 1)^+$.

(4*S*,4'*S*)-*трет*-Бутил 5,5'-(4b*S*,4b'*S*,8*S*,8a*R*,8'*S*,8a'*R*)-8,8'-(азанедиилбис(оксометилен))бис(4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-8,3-диил)бис(азанедиил)бис(4-амино-5-оксопентаноат) ди-трифторуксусной кислоты соль (15b)



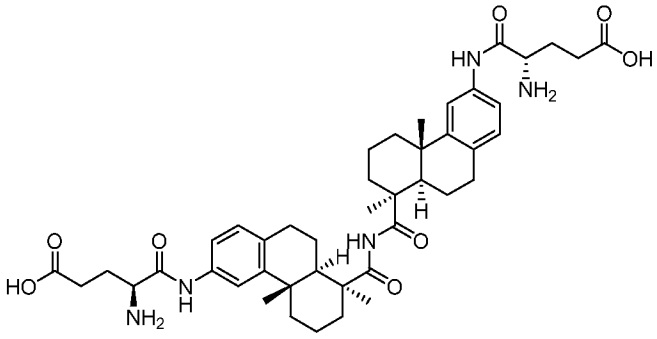
[0536] К раствору Fmoc-Glu(OtBu)-OH (0.15 г, 0.35 ммоль) и DIPEA (83 мкл, 0.48 ммоль) в DMF (5.0 мл) добавили HATU (0.15 г, 0.40 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 30 мин и затем добавили соединение **P2B** (0.10 г, 0.16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (1 мл) по каплям. Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 3 ч до полного удаления Fmoc под контролем ЖХМС. Полученную смесь напрямую отделили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0.01%)) и получили соединение **15b** (0.14 г, выход 78%) в виде желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 899 $(M + 1)^+$.

(*S*)-4-Амино-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(2-аминоацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-5-оксопентановая кислота (P10B)



[0537] Смесь соединения **15a** (0.13 г, 0.13 ммоль) в чистой TFA (2.0 мл) перемешивали при КТ в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь развели DCM (20 мл) и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате натрия (10 мМ)) и получили **P10B** (20 мг, выход 22%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 358 (M/2 + 1)$^+$; 714.5 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.85 (br s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.51 (s, 2H), 7.42-7.36 (m, 2H), 6.96 (dd, J = 8.0 Гц и 3.0 Гц, 2H), 3.67 (br s, 8H), 3.36-3.33 (m, 1H), 3.22 (s, 2H), 2.91-2.87 (m, 2H), 2.80-2.71 (m, 2H), 2.31-2.28 (m, 4H), 2.17-2.14 (m, 4H), 1.91-1.82 (m, 5H), 1.69-1.58 (m, 5H), 1.34-1.23 (m, 6H), 1.19-1.12 (m, 2H), 1.01 (s, 6H) ppm.

(4*S*,4'*S*)-5,5'-(4b*S*,4b'*S*,8*S*,8a*R*,8'*S*,8a'*R*)-8,8'-(Азанедиилбис(оксометилен))бис(4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-8,3-диил)бис(азадениил)бис(4-амино-5-оксопентановая кислота) (P11B)



[0538] Смесь соединения **15b** (0.14 г, 0.14 ммоль) в чистой TFA (3.0 мл) перемешивали при КТ в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь развели DCM (30 мл) и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате натрия (10 мМ)) и получили **P11B** (20 мг, выход 18%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 394 (M/2 + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.85 (br s, 2H), 8.12 (s, 1H), 7.51 (s, 2H), 7.9 (dd, J = 8.4 Гц и 1.6

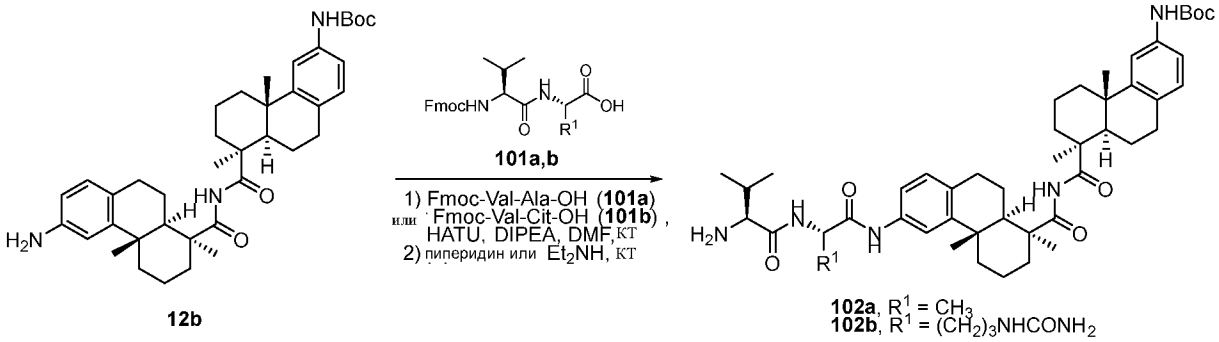
Гц, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.0 Гц, 2H), 3.5 (br s, 6H), 3.40-3.37 (m, 2H), 3.16 (s, 1H), 2.91-2.88 (m, 2H), 2.79-2.66 (m, 2H), 2.33-2.29 (m, 7H), 2.18-2.15 (m, 4H), 1.91-1.84 (m, 6H), 1.71-1.59 (m, 6H), 1.35-1.23 (m, 6H), 1.18-1.12 (m, 2H), 1.01 (s, 6H) ppm.

ПРИМЕР 11-5

[0539] Данный пример демонстрирует способы синтеза линкер-нагрузок **LP1B-LP5B** в вышеприведенной Таблице 3. Данный пример относится к соединения, пронумерованным **12b** и от **102a-b** до **106a-e** и линкер-нагрузкам **LP1B-LP5B** на ФИГ. 25.

Пример 5a

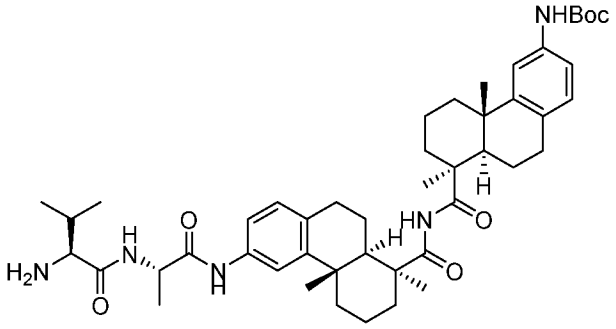
Промежуточные соединения 102a-b



[0540] К раствору кислоты (Fmoc-Val-Ala-OH (**101a**, 1.2 эквив.) или Fmoc-Val-Cit-OH (**101b**, 1.2 эквив.) в DMF добавили HATU (1.2 эквив.) и DIPEA (2.0-3.0 эквив.) при КТ. После перемешивания смеси при КТ в течение 5 мин добавили соединение **12b** (1.0 эквив.). Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 4-20 ч до израсходования амина согласно ЖХМС. Затем к смеси добавили пиперидин (избыт.) и смесь перемешивали при КТ в течение 1-6 ч до полного удаления Fmoc под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через мембрану и фильтрат напрямую очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) или обращенно-фазовой хроматографии и получили соединение **102** (выход 38-72%) в виде белого твердого вещества.

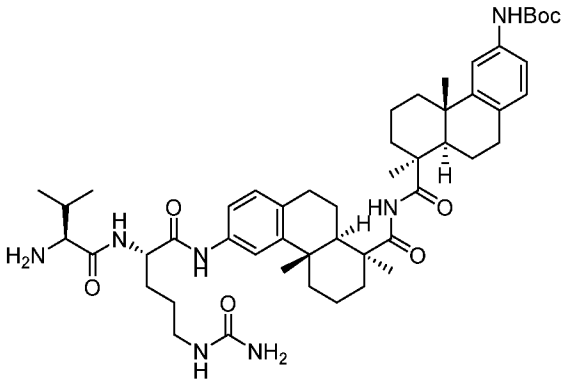
Амин г (ммоль)		Кислота г (ммоль)		Этап 1				Этап 2		Очистка	Продукт	
				HATU г (ммоль)	DIPEA г (ммоль)	DMF (мл)	Время (ч)	Пиперидин (мл)	Время (ч)		№	г (выход)
12b	0.31 (0.50)	**101a**	0.25 (0.60)	0.23 (0.60)	0.19 (1.5)	20	4	0.5	1	ОФ	102a	0.29 (72%)
12b	0.50 (0.80)	**101b**	0.48 (0.96)	0.36 (0.96)	0.28 мл (1.6)	6	20	0.5	6	Преп-В	102b	0.27 (38%)

***трет*-Бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]пропанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]карбонил}карбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (102a)**



[0541] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений 102a,b получили соединение **102a** (0.29 г, выход 72%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 799 $(M + 1)^+$.

***трет*-Бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]карбонил}карбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (102b)**



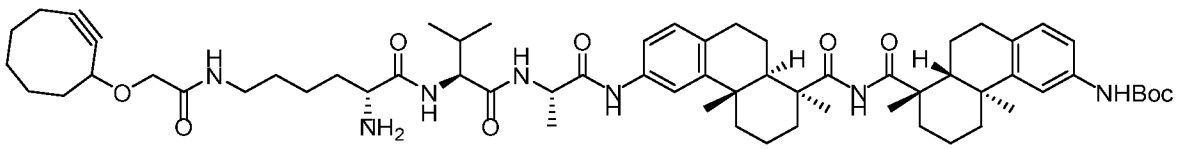
[0542] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений 102a,b получили соединение **102b** (0.27 г, выход 38%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 885 $(M + 1)^+$.

Пример 5b

Промежуточные соединения 104a-b

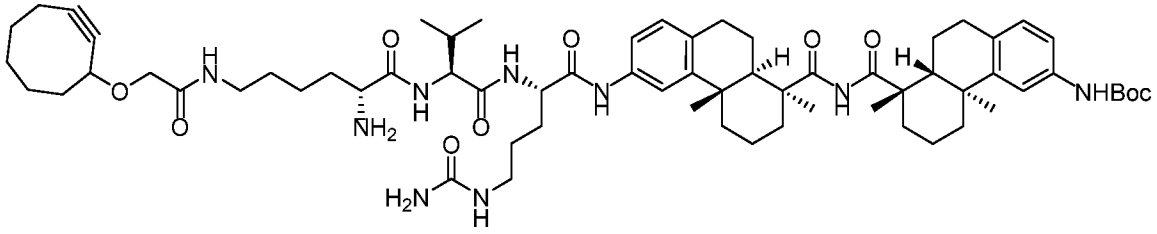
***трет*-Бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-{2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамиодо]гексанамидо}-3-метилбутанамидо]пропанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-**

октагидрофенантрен-1-ил]карбонил}карбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (104a)



[0543] К раствору соединения **103** (70 мг, 0.13 ммоль) в DMF (2 мл) добавили HATU (68 мг, 0.18 ммоль) и DIPEA (44 мкл, 0.24 ммоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ в течение 5 мин и затем добавили соединение **102a** (95 мг, 0.12 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3 ч до полного израсходования соединения **102a** под контролем ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (0.5 мл, избыт.). Смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч. Затем смесь отфильтровали и фильтрат сконцентрировали. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате натрия (10 мМ)) и получили соединение **104a** (0.13 г, выход 96%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 518.0 $((M-55)/2)^+$.

***трет*-Бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-{2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]гексанамидо}-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]карбонил}карбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (104b)**



[0544] К раствору соединения **103** (0.27 г, 0.31 ммоль) и DIPEA (0.11 мл, 0.61 ммоль) в DMF (6 мл) добавили соединение **102b** (0.18 г, 0.34 ммоль), а затем добавили HATU (0.14 г, 0.37 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3 ч под контролем ЖХМС. Полученный раствор очистили напрямую посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии и получили соединение **Fmoc-104b** (0.30 г, ИЭР м/з: 711 $((M + Na)/2 +1)^+$) в виде светло-желтого твердого вещества, которое растворили в DCM (6.0 мл). К раствору добавили пиперидин (0.5 мл) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток очистили растворением в петролейном эфире и получили соединение

104b (0.26 г, выход 65%) в виде светло-желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 1177.6 ((M + H)$^+$.

Пример 5c

Промежуточные соединения 105a-c

[0545] Промежуточный компонент азидо α-CD-N_3 (**105a**) синтезировали в соответствии с *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134(46), 19108-19117 (ФИГ. 32).

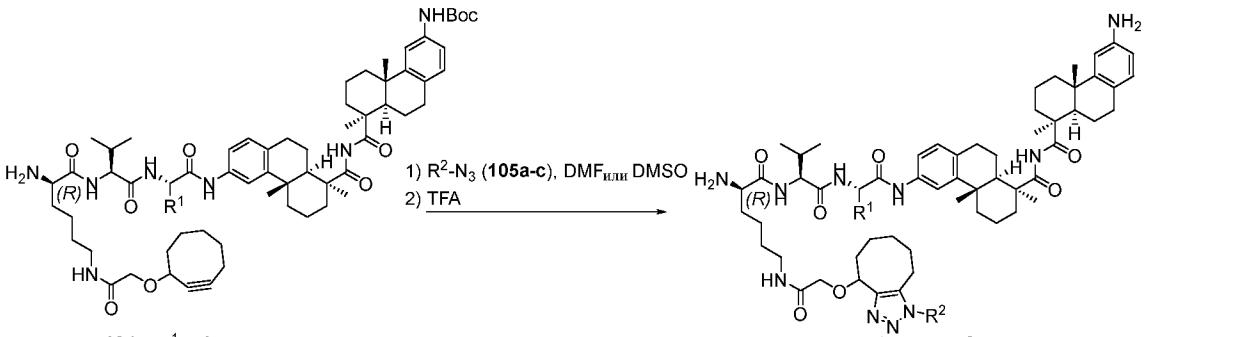
Азидо-15-оксо-3,6,9,12-тетраокса-16-азаоктадекан-18-сульфоновая кислота (105b), ФИГ. 33

[0546] К раствору 2,5-диоксопирролидина-1-ил 1-азидо-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-оата (N_3-ПЭГ$_4$-OSu, 0.10 г, 0.26 ммоль) и таурина (39 мг, 0.31 ммоль) в безводного DMF (4 мл) добавили DIPEA (15 мг, 0.52 ммоль). Смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Реакционную смесь отфильтровали и раствор очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили промежуточное соединение **105b** (0.80 г, выход 78%) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 399.1 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, D_2O) δ 3.69 (t, J = 6.0 Гц, 2H), 3.64-3.59 (m, 14H), 3.49 (t, J = 6.5 Гц, 2H), 3.41 (t, J = 4.5 Гц, 2H), 3.00 (t, J = 7.0 Гц, 2H), 2.45 (t, J = 6.0 Гц, 2H) ppm.

[0547] Промежуточный компонент азидо мальтоза-N_3 (**105c**) синтезировали в соответствии с *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42 (7), 1325-1328 (ФИГ. 34).

Пример 5d

Промежуточные соединения 106a-e



104a, R^1 = CH_3
104b, R^1 = $(CH_2)_3NHCONH_2$

106a, R^1 = CH_3, R^2 = aCD
106b, R^1 = $(CH_2)_3NHCONH_2$, R^2 = aCD
106c, R^1 = CH_3, R^2 = PEG$_4$-таурин
106d, R^1 = $(CH_2)_3NHCONH_2$, R^2 = PEG$_4$-таурин
106e, R^1 = CH_3, R^2 = мальтоза

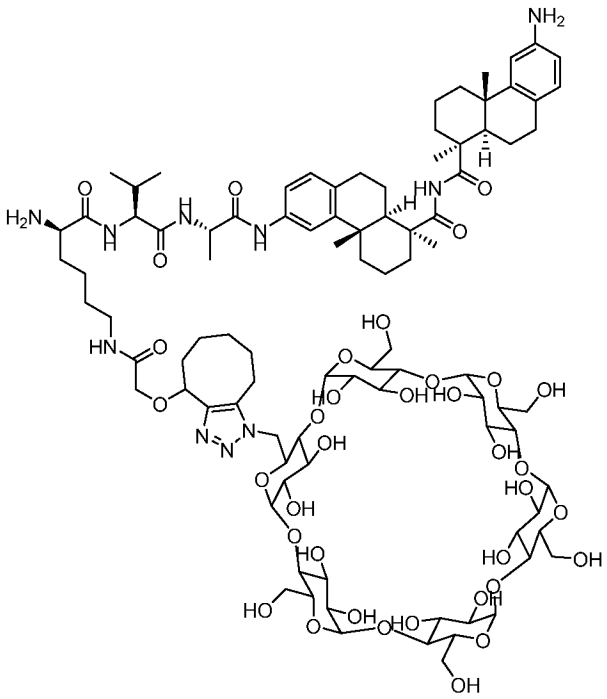
[0548] К раствору соединения **104** в DMF добавили промежуточное соединение азидо **105** при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3-48 ч до завершения реакции согласно ЖХМС. Реакционную смесь напрямую очистили посредством преп-ВЭЖХ и получили соединение **Boc-106** в виде белого твердого вещества, которое

растворили в растворе TFA (или чистой TFA). Раствор перемешивали при КТ в течение 0.5-20 ч до удаления Boc согласно ВЭЖХ. Раствор сконцентрировали и получили **106** (в виде соли TFA).

Алкин г (ммоль)		Азид г (ммоль)		Этап 1				Этап 2			Продукт	
				DMF (мл)	T (°C)	Время (ч)	Очистка	TFA (мл)	растворитель (мл)	Время (ч)	№	г (выход)
104a	0.050 (0.045)	**105a**	0.11 (0.12)	4	КТ	48	RP-A	1	DCM (3 мл)	1	**106a**	0.019* (69%)
104b	0.050 (0.042)	**105a**	0.085 (0.085)	4	КТ	20	ОФ	2	/	0.5	**106b**	0.076 (87%)
104a	0.17 (0.16)	**105b**	0.12 (0.31)	6	КТ	20	RP-A	2	/	1	**106c**	0.090 (39%)
104b	0.050 (0.042)	**105b**	0.034 (0.084)	2	КТ	3	ОФ	1	MeOH (2 мл)	20	**106d**	0.022 (36%)
104a	0.035 (0.032)	**105c**	0.024 (0.064)	DMSO 5 мл	КТ	4	ОФ	3	/	2	**106e**	0.034 (77%)

*не все **Boc-106a** применили для удаления Boc.

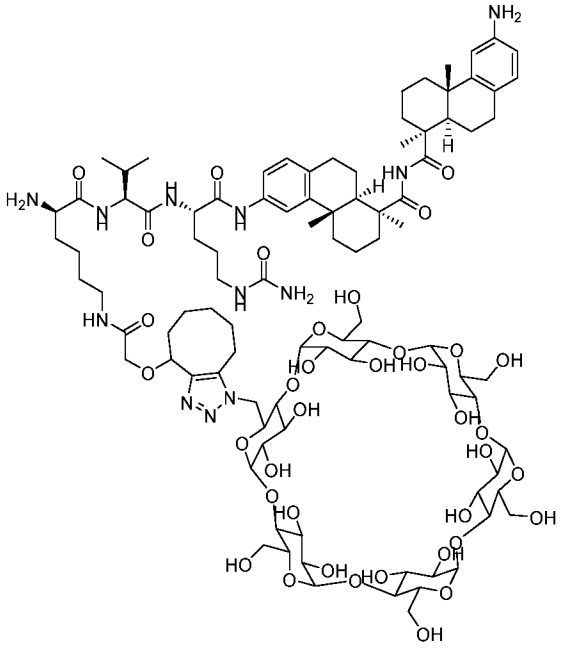
(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-2,3,4,9,10,10a-гексагидрофенантрен-1-карбонил]-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3},^{6}.2^{8},^{11}.2^{13},^{16}.2^{18},^{21}.2^{23},^{26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пропанамидо]-1,4a-диметил-2,3,4,9,10,10a-гексагидрофенантрен-1-карбоксамид трифторуксусной кислоты соль (106a)



[0549] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений 106a-e получили соединение **Boc-106a** (72 мг, выход 76% в виде смеси региоизомеров триазола) в виде белого твердого вещества (ИЭР м/з: 1045 (M/2 + 1)$^+$). Небольшое количество чистого основного изомера (7 мг) можно было получить после дальнейшей очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-60% ацетонитрил в вод. TFA (0.01%)), что определили посредством ^{1}H ЯМР (500МГц, $DMSO_{d6}$) ((с региоизомерами) δ 9.92 (s, 0.5H), 9.82 (s, 0.5H), 9.10 (s, 1H), 8.58-8.53 (m, 1H), 8.50-8.35 (m, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.04 (s, 3H), 7.88-7.82 (m, 1H), 7.55 (s, 0.5H), 7.46 (s, 0.5H), 7.41 (s, 1H), 7.40-7.26 (m, 1H), 7.14 (d, J = 7.0 Гц, 1H), 6.97 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.90 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 5.51 (br, 12H), 4.83-4.70 (m, 8H), 4.57-4.51 (m, 3H), 4.44-4.36 (m, 4H), 4.00-3.98 (m, 1H), 3.88-3.55 (m, 27H), 3.26-3.09 (m, 6H), 2.91-2.85 (m, 4H), 2.76-2.63 (m, 3H), 2.29-2.25 (m, 2H), 2.17-1.99 (m, 4H), 1.96-1.93 (m, 6H), 1.88-1.63 (m, 9H), 1.56-1.54 (m, 15H), 1.33-1.28 (m, 15H), 1.18-1.13 (m, 3H), 1.01-0.99 (m, 6H), 0.89-0.83 (m, 7H) ppm.). К смеси **Boc-106a** (как смеси региоизомеров) (20 мг, 9.6 мкмоль) в DCM (3 мл) добавили TFA (1 мл). Полученную смесь перемешивали при КТ в течение часа до удаления Boc под контролем ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo* и получили соединение **106a** (19 мг, выход 69% из **104a**) в виде светло-желтого твердого вещества, которое применили для следующего этапа без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 995 (M/2 + 1)$^+$.

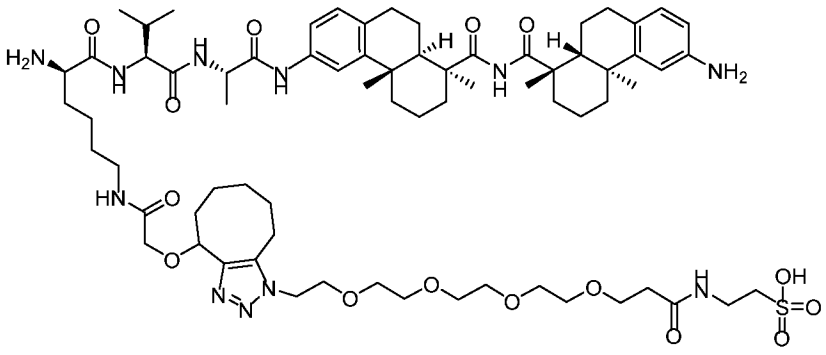
(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-

1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]карбонил}-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид трифторуксусной кислоты соль (106b)



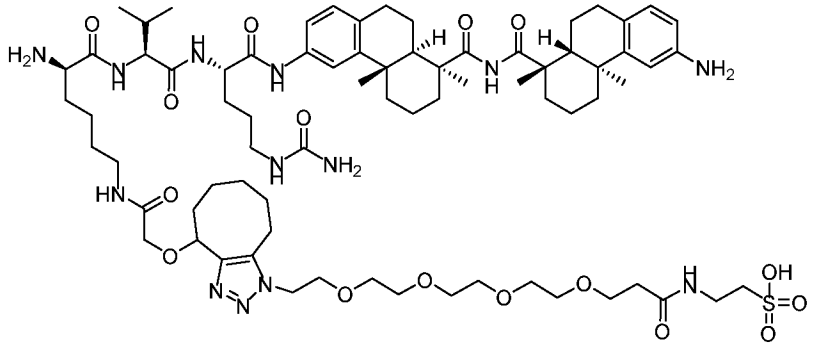
[0550] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений 106a-e получили соединение **106b** (76 мг, выход 87% из **104b**) в виде желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 692 $(M/3 + 1)^+$.

1-(4-(2-(((*R*)-5-амино-6-(((*S*)-1-(((*S*)-1-(((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-(((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)карбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-6-оксогексил)амино)-2-оксоэтокси)-4,5,6,7,8,9-гексагидро-1*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил)-15-оксо-3,6,9,12-тетраокса-16-азаоктадекан-18-сульфоновая кислота (106c)



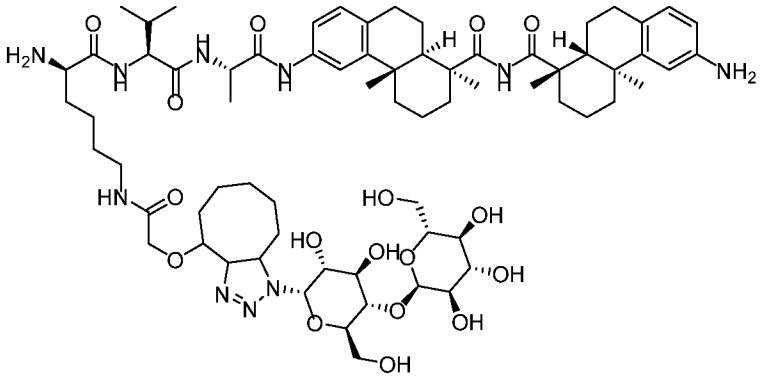
[0551] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений 106a-e получили соединение **106c** (90 мг, выход 39% из **104c**) в виде желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 463.8 $(M/3 + 1)^+$.

1-(4-(((6*S*,9*S*,12*R*)-1,12-Диамино-6-(((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-(((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)карбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил)карбамоил)-9-изопропил-1,8,11,18-тетраоксо-2,7,10,17-тетраазанонадекан-19-ил)окси)-4,5,6,7,8,9-гексагидро-1*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил)-15-оксо-3,6,9,12-тетраокса-16-азаоктадекан-18-сульфоновая кислота (106d)



[0552] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений 106a-e получили соединение **106d** в виде соли TFA (22 мг, выход 36%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-80% ацетонитрил в воде в течение 25 минут). ИЭР м/з: 788 $(M/2 + H)^+$.

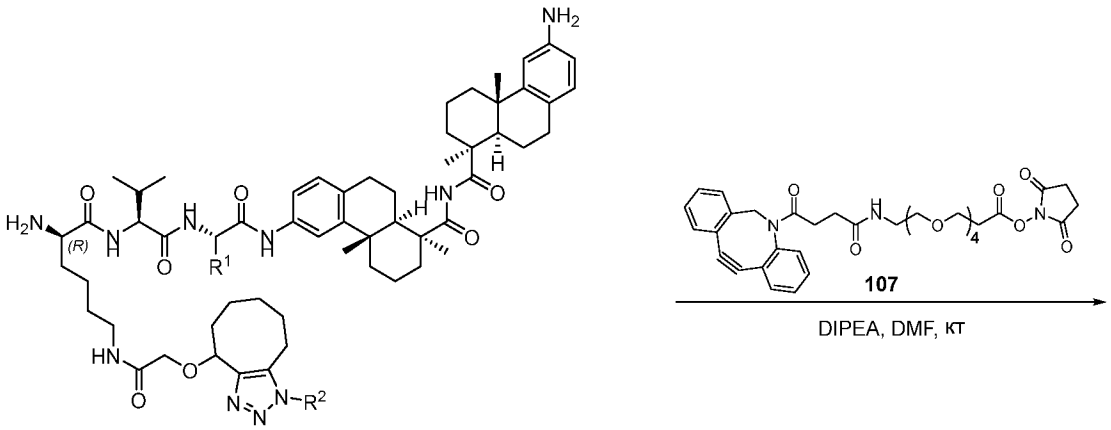
(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((2*S*)-2-((2*S*)-2-((2*R*)-2-амино-6-(2-((1-((2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)окси)тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)-3a,4,5,6,7,8,9,9a-октагидро-1*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси)ацетамидо)гексанамидо)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (106e)



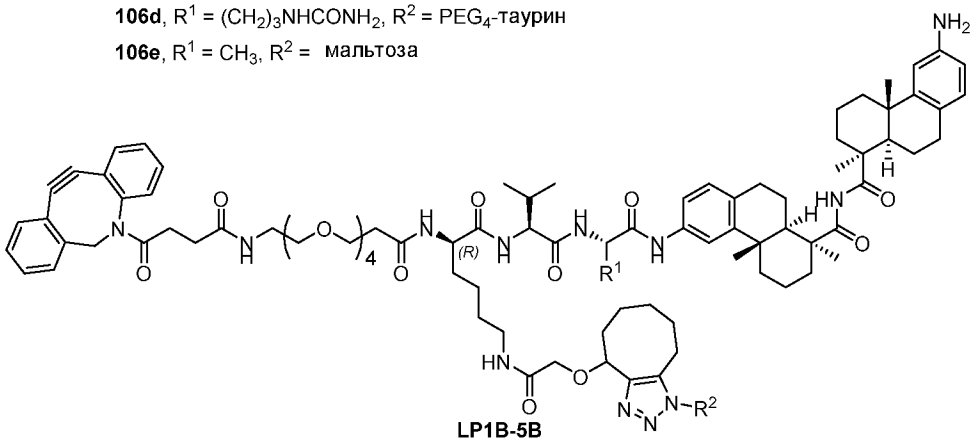
[0553] В соответствии с общей процедурой для Промежуточных соединений 106a-e получили соединение **106e** в виде соли TFA (34 мг, выход 77%) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 1358 $(M + H)^+$.

Пример 5e

Линкер-нагрузки LP1B-LP5B



106a, $R^1 = CH_3$, R^2 = aCD
106b, $R^1 = (CH_2)_3NHCONH_2$, R^2 = aCD
106c, $R^1 = CH_3$, $R^2 = PEG_4$-таурин
106d, $R^1 = (CH_2)_3NHCONH_2$, $R^2 = PEG_4$-таурин
106e, $R^1 = CH_3$, R^2 = мальтоза



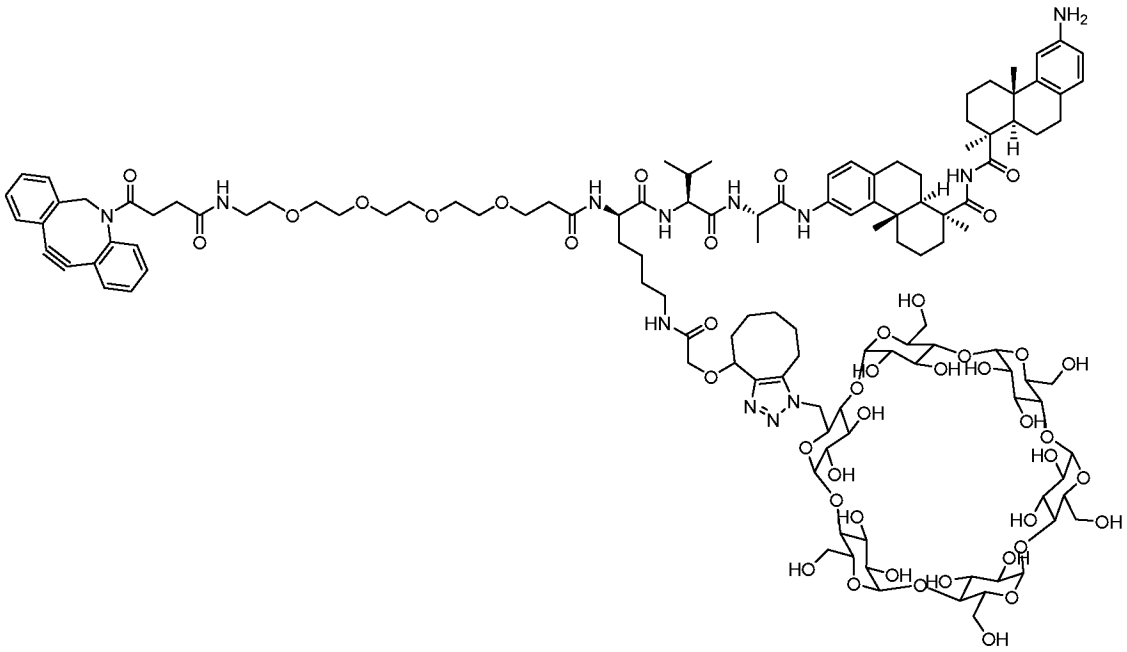
LP1B-5B

[0554] К раствору соединения **106** в DMF добавили соединение DIBAC-PEG$_4$-NHS **107** и DIPEA при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3 ч. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (способ B) или обращенно-фазовой флэш-хроматографии (способ B) и получили соединение **LP1B-5B**.

Амин **106**		NHS-эфир **107** мг (мкмоль)	DIPEA (ммоль)	DMF (мл)	Время (ч)	Очистка	Продукт **LP**		
№	мг (мкмоль)							№	мг (выход)
106a	19 (8.7)	7.0 (11)	4.0 мг (0.031)	1.5	1.5	RP-B (дважды)		**LP1B**	8 (36%)*
106b	76 (37)	24 (37)	12 мкл (0.073)	5	1.5	Преп-B (дважды)		**LP2B**	20 (21%)
106c	90 (65)	39 (60)	0.02 мл (0.12)	5	1.5	Преп-B		**LP3B**	60 (52%)
106d	22 (15)	9.7 (15)	5 мкл (0.030)	2	1.5	Преп-B		**LP4B**	6 (20%)
106e	40 (29)	23 (35)	7.6 мг (59)	5	4	Преп-B		**LP5B**	15 (27%)

*7 мг соединения **106a** в виде свободного основания переработали.

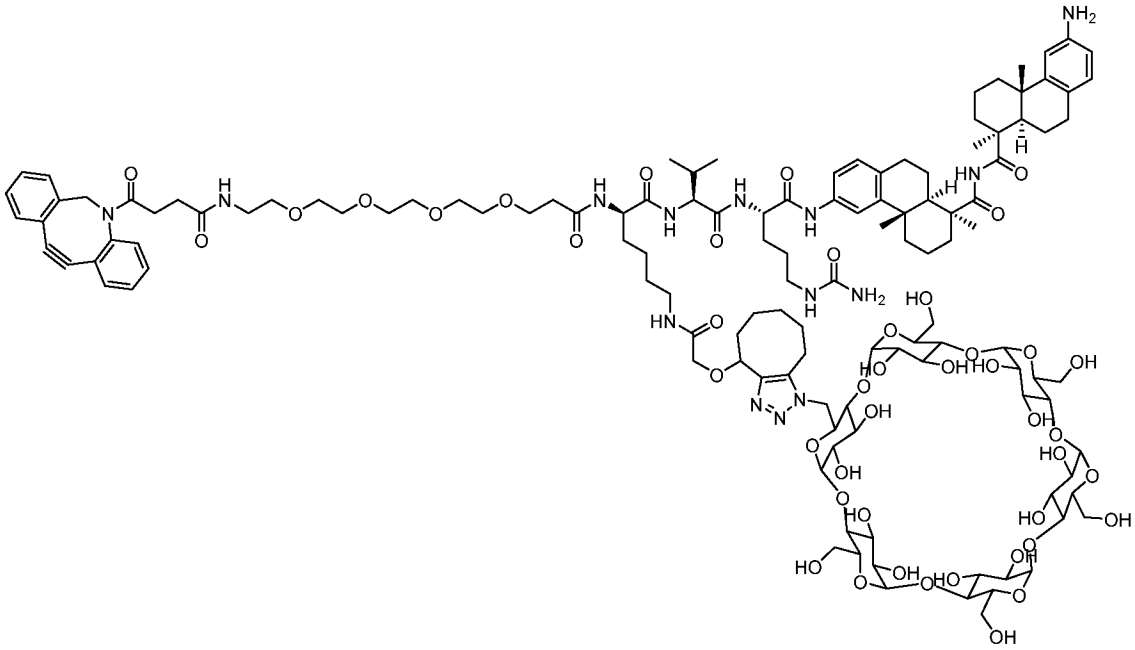
1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-[(1*R*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-2,3,4,9,10,10a-гексагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-5,6,7,8a,9,10-гексагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}этил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP1B)



[0555] В соответствии с общей процедурой для Линкер-нагрузок LP1-5 получили линкер-нагрузку **LP1B** (8 мг, выход 36%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 842 (M/3 + 1)$^+$; 1262 (M/2 + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.69 (s, 0.5H), 9.28 (s, 0.5H), 8.20-8.00 (m, 5H), 7.81-7.75 (m, 2H), 7.66 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.60 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.53-7.27 (m, 9H), 6.96-6.92 (m, 1H), 6.67 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.32 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 5.57-5.47 (m, 14H), 5.13-4.99 (m, 2H), 4.81-4.68 (m, 11H), 4.59-4.52 (m, 5H), 4.36-4.29 (m, 3H), 4.16-4.08 (m, 1H), 3.99-3.98 (m, 1H), 3.84-3.53 (m, 30H), 3.45-3.38 (m, 12H), 3.13-3.03 (m, 4H), 2.90-2.66 (m, 5H), 2.36-2.32 (m, 1H), 2.26-2.20 (m, 3H), 2.15-2.12 (m, 4H), 2.00-1.99 (m, 2H), 1.88-1.72 (m, 6H), 1.64-1.40 (m, 14H), 1.33-1.24 (m, 17H), 1.14-1.09 (m, 3H), 1.00-0.97 (m, 7H), 0.89-0.81 (m, 8H) ppm.

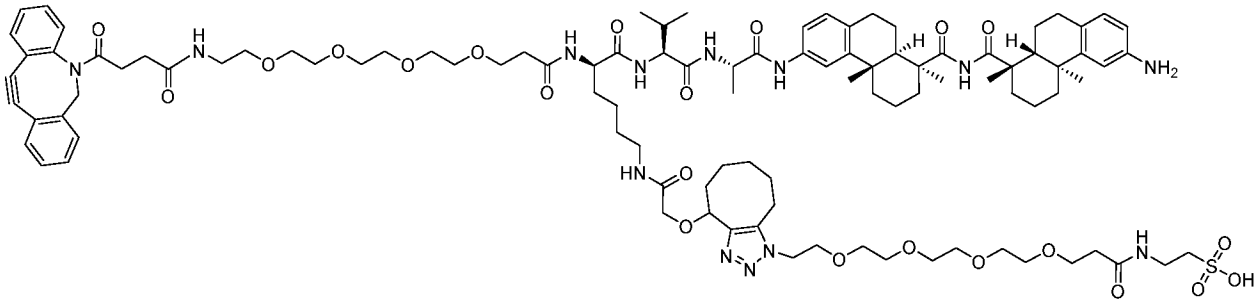
[0556] Анал. *ВЭЖХ*: 95%, Время удерживания: 7.93 мин (способ B).

1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^4,^{9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-[(1*R*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-4-(карбамоиламино)бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^3,^{6}.2^8,^{11}.2^{13},^{16}.2^{18},^{21}.2^{23},^{26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP2B)



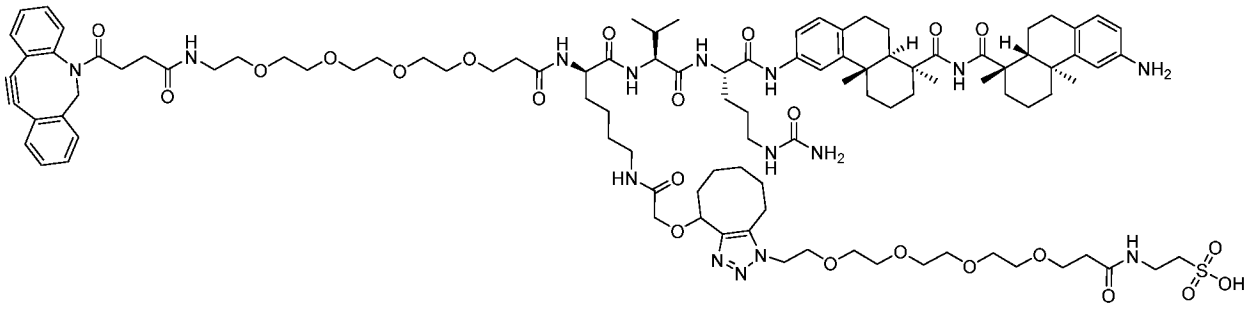
[0557] В соответствии с общей процедурой для Линкер-нагрузок LP1-5 получили линкер-нагрузку **LP2B** (20 мг, выход 21%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 870 (M/3 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.76 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 8.26-8.16 (m, 1H), 8.11-8.07 (m, 1H), 8.03-7.98 (m, 1H), 7.78-7.75 (m, 1H), 7.68-7.66 (m, 1H), 7.62-7.60 (d, *J* = 7.2 Гц, 1H), 7.55-7.52 (m, 1H), 7.48-7.44 (m, 4H), 7.39-7.30 (m, 4H), 6.96-6.93 (m, 1H), 6.68-6.77 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 6.47 (m, 1H), 6.34-6.32 (dd, *J* = 8.0 Гц, 1.6 Гц, 1H), 5.96 (br s, 1H), 5.59-5.56 (m, 5H), 5.52-5.45 (m, 7H), 5.38 (s, 2H), 5.13 (br s, 1H), 5.04-5.00 (d, *J* = 14.0 Гц, 1H), 4.81-4.69 (m, 10H), 4.60-4.51 (m, 5H), 4.36-4.11 (m, 5H), 3.98 (br s, 2H), 3.85-3.77 (m, 11H), 3.70-3.58 (m, 10H), 3.45-3.40 (m, 20H), 3.30-3.27 (m, 4H), 3.12-3.04 (m, 5H), 2.98-2.86 (m, 4H), 2.77-2.67 (m, 4H), 2.27-2.19 (m, 4H), 2.16-2.10 (m, 4H), 2.02-1.96 (m, 2H), 1.89-1.73 (m, 8H), 1.64-1.57 (m, 11H), 1.50-1.43 (m, 7H), 1.26-1.20 (m, 12H), 1.15-1.10 (m, 4H), 1.01-0.97 (m, 6H), 0.89-0.82 (m, 6H) ppm. *Анал. ВЭЖХ*: 100%, Время удерживания: 7.35 мин (способ B). Растворимость: < 0.1 мг/мл воды.

2-{1-[4-({[(5*R*)-5-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-5-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]карбонил}карбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}этил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}пентил]карбамоил}метокси)-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}этан-1-сульфоновая кислота (LP3B)



[0558] В соответствии с общей процедурой для Линкер-нагрузок LP1-5 получили линкер-нагрузку **LP3B** (60 мг, выход 52%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 642 (M/3 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 9.68 (s, 0.6H), 9.25 (s, 0.4H), 8.22-8.07 (m, 3H), 8.02-7.86 (m, 2H), 7.77-7.72 (m, 2H), 7.68-7.60 (m, 2H), 7.54-7.52 (m, 1H), 7.50-7.42 (m, 4H), 7.39-7.27 (m, 4H), 7.22 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.97-6.94 (m, 2H), 6.74 (d, J = 10.5 Гц, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.43 (dd, J = 10.0 Гц, 2.0 Гц, 1H), 5.62 (br s, 1H), 5.04-5.00 (m, 1H), 4.93-4.90 (m, 0.4H), 4.76-4.72 (m, 0.6H), 4.52-4.26 (m, 4H), 4.16-4.08 (m, 1H), 3.81-3.75 (m, 4H), 3.61-3.55 (m, 4H), 3.46-3.44 (m, 24H), 3.30-3.27 (m, 5H), 3.08-3.06 (m, 5H), 2.97-2.89 (m, 2H), 2.80-2.74 (m, 4H), 2.54-2.52 (m, 2H), 2.40-2.31 (m, 2H), 2.27-2.22 (m, 4H), 2.16-2.13 (m, 4H), 2.02-1.71 (m, 8H), 1.69-1.45 (m, 10H), 1.40-1.21 (m, 14H), 1.17-1.08 (m, 4H), 1.01-0.98 (m, 6H), 0.89-0.82 (m, 6H) ppm.

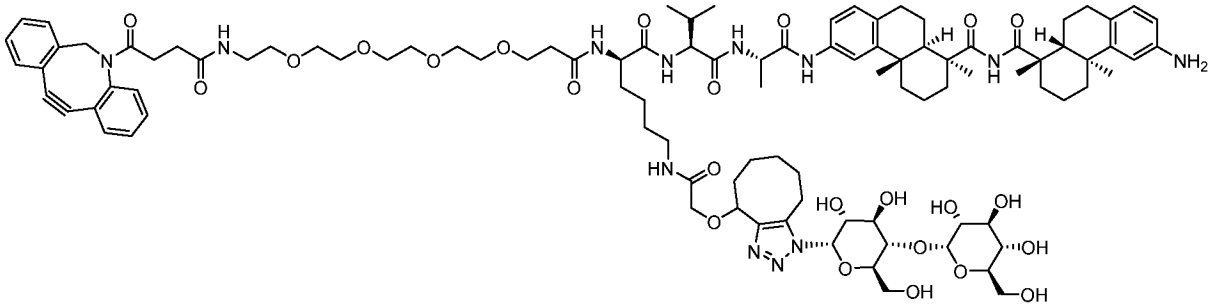
2-{1-[4-({[(5*R*)-5-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-5-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]карбонил}карбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-4-(карбамоиламино)бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}пентил]карбамоил}метокси)-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}этан-1-сульфоновая кислота (LP4B)



[0559] В соответствии с общей процедурой для Линкер-нагрузок LP1-5 получили соединение **LP4B** (6.0 мг, выход 20%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 671 (M/3 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 9.37 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.24-8.22 (m, 1H), 8.18-8.17

(m, 2H), 8.09 (s, 2H), 8.01-7.99 (m, 1H), 7.97-7.94 (m, 2H), 7.89-7.84 (m, 1H), 7.76 (m, 5H), 7.68 (d, *J* = 7.5 Гц, 2H), 7.62 (d, *J* = 7.5 Гц, 2H), 7.55 (m, 2H), 7.51-7.43 (m, 7H), 7.39-7.28 (m, 7H), 7.08 (m, 4H), 6.96-6.93 (t, *J* = 7.0 Гц, 2H), 6.68 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 6.48 (s, 2H), 6.35-6.33 (m, 2H), 5.97-5.95 (m, 2H), 5.37 (s, 4H), 5.04-5.01 (m, 2H), 4.74-4.69 (m, 5H), 4.52 (m, 1H), 4.42 (t, *J* = 5.5 Гц, 2H), 4.34-4.27 (m, 4H), 4.18 (m, 1H), 4.13-4.11 (m, 1H), 3.82-3.77 (m, 5H), 3.58-3.55 (m, 6H), 3.49-3.44 (m, 14H), 3.10-3.05 (m, 4H), 2.98-2.93 (m, 4H), 2.77-2.75 (m, 4H), 2.28-2.25 (m, 4H), 2.03-1.99 (m, 2H), 1.64-1.51 (m, 6H), 1.27-1.24 (m, 11H), 1.01-0.98 (m, 11H), 0.89-0.82 (m, 8H) ppm.

1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-[(1*R*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}этил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-5-[2-({1-[(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-{[(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]окси}оксан-2-ил]-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил}окси)ацетамидо]пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP5B)



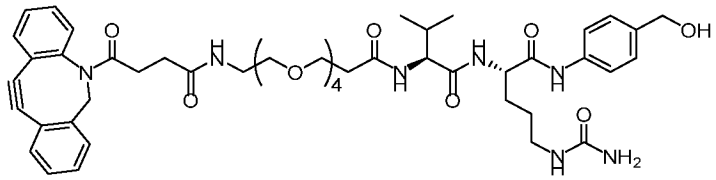
[0560] В соответствии с общей процедурой для Линкер-нагрузок LP1-5 получили соединение **LP5B** (15 мг, выход 27%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 947 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.69 (s, 0.55H), 9.27 (s, 0.45H), 8.25-8.15 (m, 2H), 8.15-8.05 (m, 2H), 8.05-7.90 (m, 1H), 7.90-7.80 (m, 1H), 7.76 (t, *J* = 6.4 Гц, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.0 Гц, 1H), 7.60 (d, *J* = 6.8 Гц, 1H), 7.55-7.40 (m, 4H), 7.40-7.25 (m, 3H), 7.00-6.90 (m, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.32 (d, *J* = 8.0 Гц, 1H), 5.75-5.70 (m, 1H), 5.56 (d, *J* = 6.0 Гц, 1H), 5.50-5.40 (m, 2H), 5.20-4.92 (m, 4H), 4.80-4.70 (m, 1H), 4.70-4.65 (m, 2H), 4.65-4.55 (m, 2H), 4.40-4.25 (m, 2H), 4.20-3.95 (m, 2H), 3.80-3.75 (m, 2H), 3.75-3.45 (m, 23H), 3.30-3.20 (m, 3H), 3.20-2.90 (m, 5H), 2.90-2.65 (m, 3H), 2.60-2.55 (m, 1H), 2.40-1.95 (m, 12H), 1.90-1.70 (m, 5H), 1.70-1.35 (m, 14H), 1.35-1.20 (m, 15H), 1.15-1.05 (m, 3H), 1.00-0.90 (m, 7H), 0.90-0.80 (m, 7H) ppm.

ПРИМЕР 11-6

Линкер-нагрузка LP6B

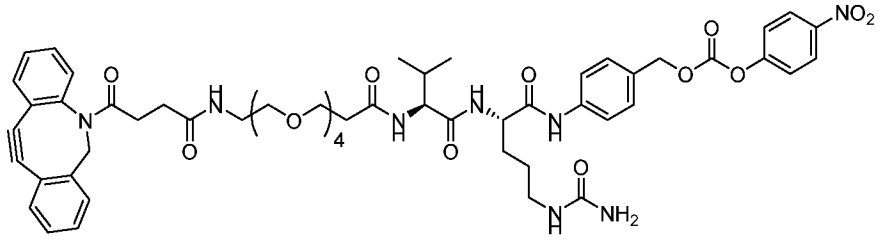
[0561] Данный пример демонстрирует способы синтеза линкер-нагрузок **LP6B** в вышеприведенной Таблице 3. Данный пример относится к соединениям, пронумерованным от **109** до **113** и линкер-нагрузке **LP6B** на ФИГ. 26.

1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутл]карбамоил}-2-метилпропил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (110)



[0562] К раствору соединения **108** (0.30 г, 0.54 ммоль) в DMF (10 мл) добавили HATU (0.31 г, 0.81 ммоль) и DIPEA (0.14 г, 1.1 ммоль) последовательно при КТ. Смесь перемешивали при КТ в течение 15 мин. Затем к реакционной смеси добавили VC-PAB-OH **109** (CAS: 159857-79-1, 0.21 г, 0.54 ммоль) при КТ и полученную смесь перемешивали при КТ в течение 3 ч до израсходования **108** или **109** под контролем ЖХМС. Затем реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат сконцентрировали и напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбоната аммония)) и получили соединение **110** (0.30 г, выход 60%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 617 $(M + H)^+$.

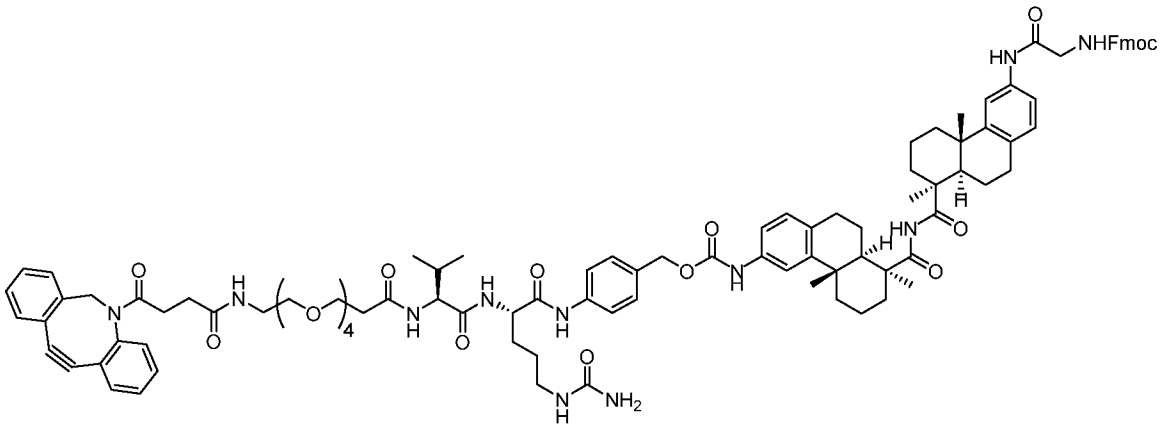
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил 4-нитрофенил карбонат (112)



[0563] К раствору соединения **110** (0.15 г, 0.16 ммоль) в DMF (10 мл) добавили бис(4-нитрофенил) карбонат **111** (0.15 г, 0.49 ммоль) и DIPEA (63 мг, 0.49 ммоль) последовательно при 0 °C. Затем смесь перемешивали при КТ в течение 3 ч до израсходования **110** под контролем ЖХМС. Затем реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат сконцентрировали и напрямую очистили

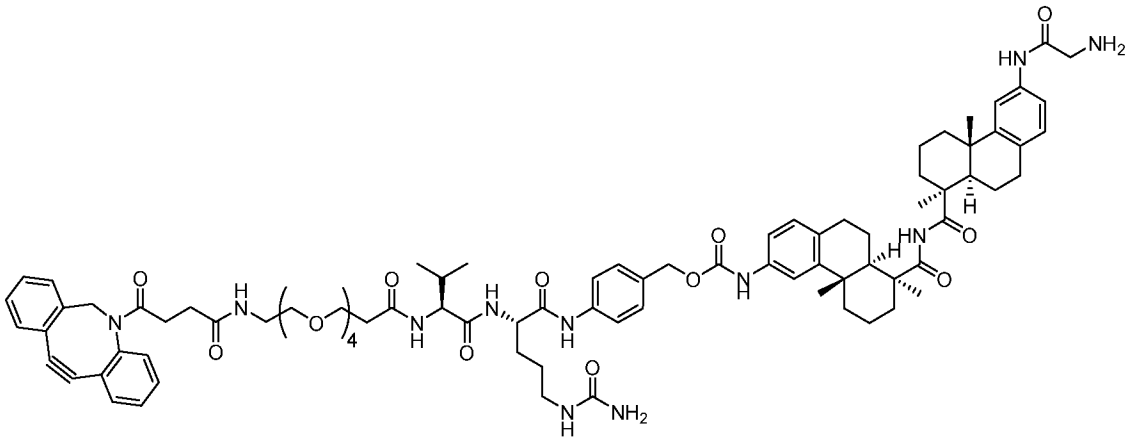
посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбоната аммония)) и получили соединение **112** (50 мг, выход 28%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1079 $(M + H)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил)карбамат (113)



[0564] К смеси соединения **14a** (0.10 г, 0.12 ммоль) и соединения **112** (0.15 г, 0.14 ммоль) в DMF (5 мл) добавили HOBt (20 мг, 0.15 ммоль) и DIPEA (48 мг, 0.37 ммоль) и смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч под контролем ЖХМС. Реакционную смесь очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **113** (0.16 г, выход 72%) в виде светло-желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 874 $(M/2 + 1)^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(2-аминоацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (LP6B)



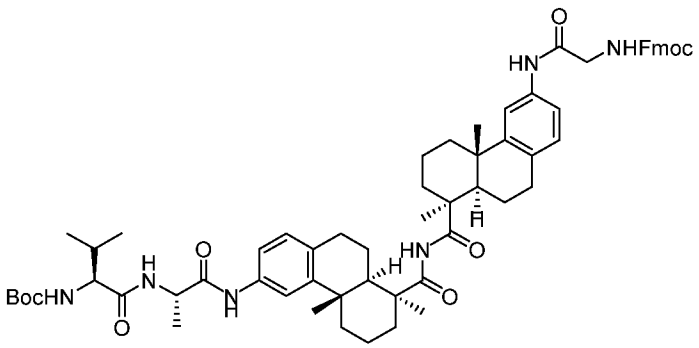
[0565] К раствору соединения **113** (0.10 г, 0.057 ммоль) в DMF (5 мл) добавили пиперидин (1 мл) и смесь перемешивали при КТ в течение получаса до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP6B** (35 мг, выход 23%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 763 (M/2 + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.0 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 8.15-8.08 (m, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.5 Гц, 1H), 7.76 (t, *J* = 5.0 Гц, 1H), 7.70-7.65 (m, 1H), 7.61 (t, *J* = 8.5 Гц, 3H), 7.51-7.42 (m, 4H), 7.41-7.30 (m, 8H), 7.20-7.10 (m, 1H), 7.00-6.90 (m, 2H), 6.00-5.95 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.35-5.30 (m, 1H), 5.10-5.00 (m, 3H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 14H), 3.25 (s, 3H), 3.10-3.00 (m, 4H), 3.00-2.85 (m, 4H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.63-2.61 (m, 1H), 2.60-2.55 (m, 1H),2.45-2.35 (m, 3H), 2.31-2.20 (m, 3H), 2.20-2.10 (m,4H), 2.10-1.92 (m, 5H), 1.90-1.82 (m, 4H), 1.68-1.53 (m, 6H), 1.50-1.40 (m, 2H), 1.20-1.10 (m, 2H), 1.02-0.96 (m, 6H), 0.90-0.80 (m, 8H) ppm.

ПРИМЕР 11-7

Линкер-нагрузка LP7B

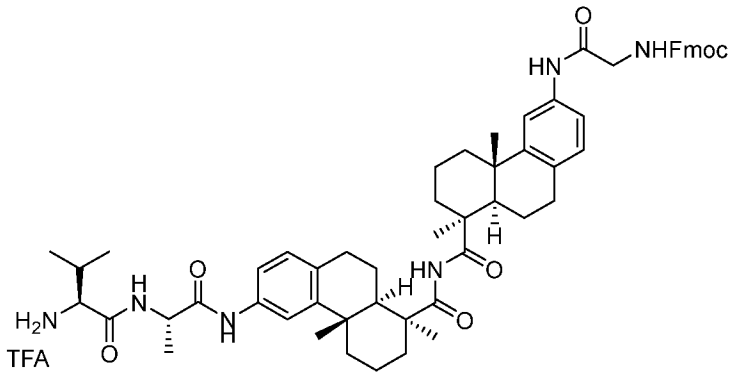
[0566] Данный пример демонстрирует способы синтеза линкер-нагрузки **LP7B** в вышеприведенной Таблице 2. Данный пример относится к соединениям, пронумерованным **14a**, **107**, **114** и **115** и линкер-нагрузке **LP7B** на ФИГ. 27.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-{[(*трет*-бутокси)карбонил]амино}-3-метилбутанамидо]пропанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил)карбамат (114)



[0567] К раствору соединения **14a** (66 мг, 0.082 ммоль) в DMF (10 мл) добавили Boc-Val-Ala-OH **101c** (28мг, 0.098 ммоль), DIPEA (32 мг, 0.25 ммоль) и HATU (47 мг, 0.12 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч под контролем ЖХМС. Смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (50-90% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили соединение **114** (74 мг, выход 84%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 978 (M – Boc + 1)$^+$.

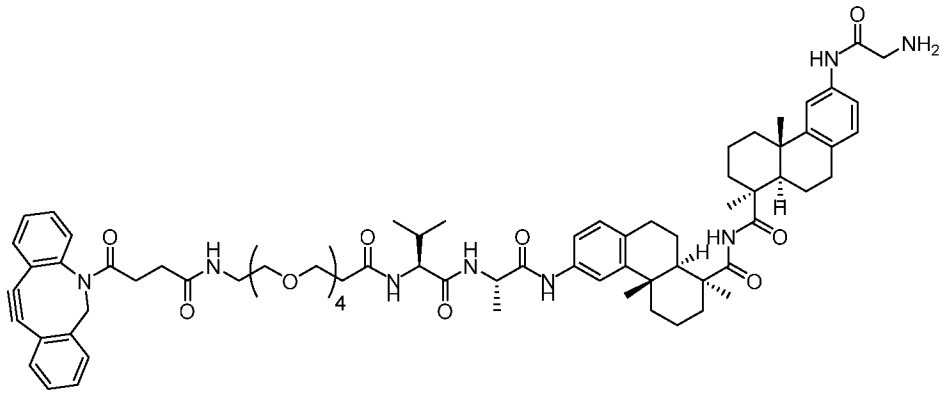
9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]пропанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил)карбамат трифторуксусной кислоты соль (115)



[0568] К раствору соединения **114** (74 мг, 0.069 ммоль) в DCM (3 мл) добавили TFA (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении часа до полного удаления Boc согласно ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo* и получили сырой продукт **115** (66 мг, выход 97% в виде соли TFA) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 978 (M + 1)$^+$.

1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(2-аминоацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-

ил]карбамоил}этил]карбамоил}-2-метилпропил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP7B)



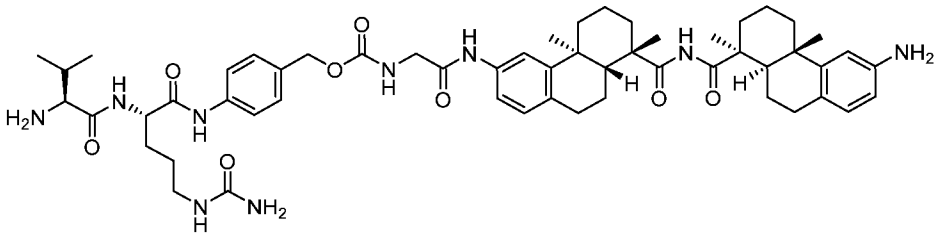
[0569] К раствору соединения **115** (60 мг, 61 мкмоль) в DMF (5 мл) добавили DIBAC-suc-PEG4-OSu **107** (48 мг, 74 мкмоль) и DIPEA (24 мг, 0.18 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч под контролем ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (0.2 мл, избыт.). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 30 мин до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили **LP7B** (22 мг, выход 28%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1292 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500МГц, $DMSO_{d6}$) (с региоизомерами) δ 9.66 (s, 0.5H), 9.51(s, 0.5H), 8.43 (d, J = 7.5 Гц, 0.5H), 8.15-8.10 (m, 1.5H), 8.05 (d, J = 7.5 Гц, 0.5H), 7.90 (d, J = 7.5 Гц, 0.5H), 7.77 (t, J = 5.5 Гц, 1H), 7.70-7.65 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.55-7.25 (m, 11H), 6.97 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 5.02 (d, J = 14.5 Гц, 1H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.18 (t, J = 7.5 Гц, 0.5H), 4.04 (t, J = 7.5 Гц, 0.5H), 3.65-3.50 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 14H), 3.23 (s, 3H), 3.15-3.05 (m, 3H), 2.95-2.85 (m, 3H), 2.80-2.70 (m, 3H), 2.60-2.55 (m, 1H), 2.40-2.10 (m, 12H), 2.00-1.80 (m, 5H), 1.80-1.70 (m, 1H), 1.70-1.55 (m, 5H), 1.24 (s, 1H), 1.20-1.10 (m, 3H), 1.10-0.90 (m, 8H), 0.90-0.80 (m, 8H) ppm.

ПРИМЕР 11-8

Линкер-нагрузка LP8B

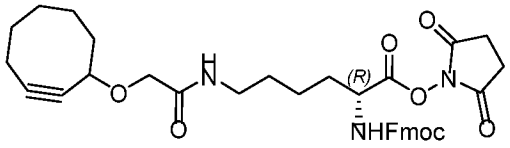
[0570] Данный пример демонстрирует способы синтеза линкер-нагрузки **LP8B** в вышеприведенной Таблице 3. Данный пример относится к соединениям, пронумерованным **P4B**, **117-120** и линкер-нагрузке **LP8B** на ФИГ. 28.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил)карбамат (117)



[0571] К раствору Fmoc-vc-PAB-PNP **116** (0.14 г, 0.18 ммоль) и нагрузки **P4B** (0.11 г, 0.18 ммоль) в DMF (2 мл) добавили HOBt (24 мг, 0.18 ммоль) и DIPEA (70 мг, 0.54 ммоль) при КТ при помощи шприца. Смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч до израсходования соединения **P4B** согласно ЖХМС. К полученной смеси добавили пиперидин (42 мг, 0.50 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч до полного удаления Fmoc под контролем ЖХМС. После фильтрации через мембрану фильтрат сконцентрировали и напрямую очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **117** (45 мг, выход 27%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 991 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.11 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 8.20-8.04 (m, 2H), 7.60 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.52-7.44 (m, 2H), 7.36-7.20 (m, 3H), 6.96 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 1.7 Гц, 1H), 6.36-6.29 (m, 1H), 5.98 (t, J = 5.6 Гц, 1H), 5.41 (s, 2H), 4.97 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.52-4.42 (m, 1H), 3.75 (d, J = 6.0 Гц, 2H), 3.07-2.85 (m, 4H), 2.82-2.61 (m, 3H), 2.31-2.06 (m, 6H), 2.00-1.78 (m, 6H), 1.72-1.52 (m, 6H), 1.44-1.09 (m, 13H), 0.99 (d, J = 8.5 Гц, 6H), 0.87 (d, J = 8.1 Гц, 3H), 0.78 (d, J = 6.8 Гц, 3H) ppm.

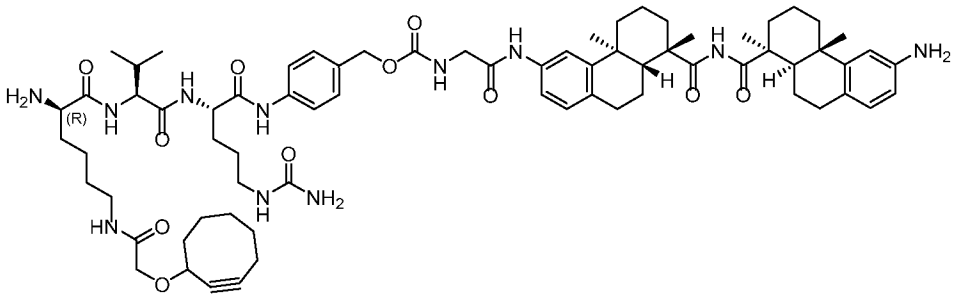
2,5-Диоксопирролидин-1-ил (2*R*)-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-2-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}гексаноат (118)



[0572] Смесь соединения **103** (0.10 г, 0.19 ммоль), EDCI (72 мг, 0.38 ммоль) и HOSu (43 мг, 0.38 ммоль) в DCM (3 мл) перемешивали при КТ в течение 3 ч. Реакционную смесь сконцентрировали и остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (70% этилацетат в петролейном эфире) и получили промежуточное соединение **118** (55 мг, выход 47%) в виде белого твердого вещества, которое применили на следующем этапе без очистки. ИЭР м/з: 630 (M + 1)$^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-

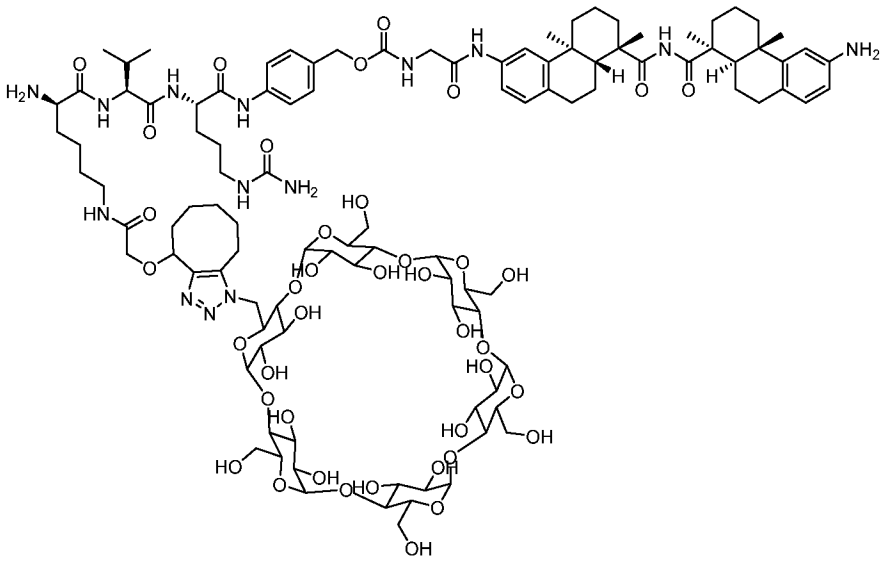
({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил)карбамат (119)



[0573] К раствору соединения **117** (55 мг, 56 мкмоль) и DIPEA (24 мг, 0.19 ммоль) в DMF (1.5 мл) добавили сырое промежуточное вещество **118** (40 мг, 63 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч до израсходования **118** согласно ЖХМС. Реакционную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде) и получили **Fmoc-119** (60 мг, ИЭР м/з: 753 $(M/2 + 1)^+$) в виде белого твердого вещества, которое растворили в DMF (1.5 мл). К раствору добавили диэтиламин (24 мг, 0.33 ммоль) и раствор перемешивали при КТ в течение 2 ч до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Реакционную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония) и получили соединение **119** (35 мг, выход 50% из соединения **117**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1282 $(M + H)^+$.

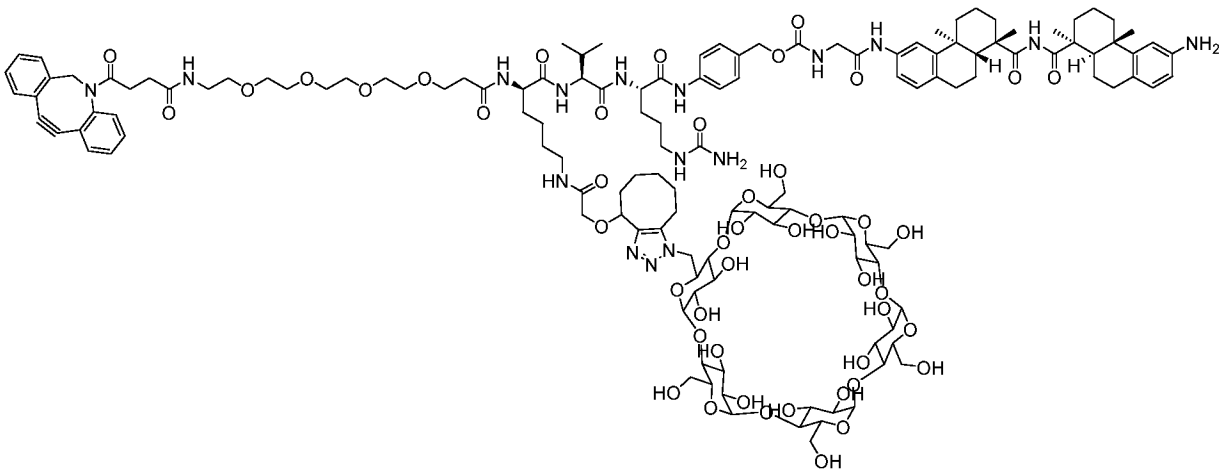
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3},^{6}.2^{8},^{11}.2^{13},^{16}.2^{18},^{21}.2^{23},^{26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-

октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил)карбамат (120)



[0574] К раствору соединения **119** (70 мг, 54 мкмоль) в DMF (3 мл) добавили α-CD-N_3 **105a** (0.16 г, 0.16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 50 °C в течение 3 дней под контролем ЖХМС. Затем полученную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ) и получили соединение **120** (20 мг, выход 16%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1141 $(M/2 + 1)^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил)карбамат (LP8B)



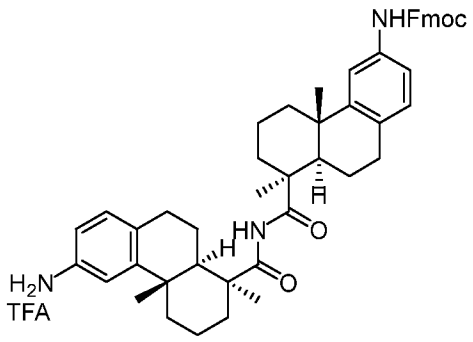
[0575] К раствору соединения **120** (10 мг, 4.4 мкмоль) и промежуточного соединения **107** (5 мг, 7.7 мкмоль) в DMF (2 мл) добавили DIPEA (16 мг, 0.12 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили **LP8B** (1.5 мг, выход 12%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 939 (M/3 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.87-9.66 (m, 1H), 8.22-8.08 (m, 4H), 7.91-7.76 (m, 2H), 7.71-7.61 (m, 4H), 7.56-7.45 (m, 4H), 7.40-7.28 (m, 5H), 6.96 (d, *J* = 8.5 Гц, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.1 Гц, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.34 (d, *J* = 8.2 Гц, 1H), 6.03-5.96 (m, 1H), 5.67-5.31 (m, 12H), 5.06-4.95 (m, 3H), 4.87-4.66 (m, 7H), 4.63-4.50 (m, 3H), 4.38-4.29 (m, 3H), 4.22-4.13 (m, 1H), 4.06-3.93 (m, 1H), 3.86-3.40 (m, 54H), 3.30-3.19 (m, 4H), 3.17-2.85 (m, 4H), 2.81-2.62 (m, 2H), 2.60-2.54 (m, 3H), 2.41-1.95 (m, 11H), 1.92-1.71 (m, 5H), 1.68-1.40 (m, 13H), 1.33-1.09 (m, 22H), 1.02-0.93 (m, 10H), 0.89-0.78 (m, 9H) ppm. *Анал. ВЭЖХ* (в виде смеси региоизомеров триазола): 63%, Время удерживания: 6.03 мин; 36%, Время удерживания: 6.13 мин (способ B).

ПРИМЕР 11-9

Линкер-нагрузка LP9B

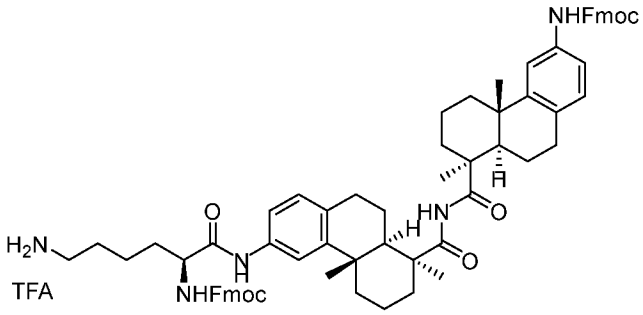
[0576] Данный пример демонстрирует способы синтеза линкер-нагрузки **LP9B** в вышеприведенной Таблице 3. Данный пример относится к соединениям, пронумерованным **12b**, **15**, **112**, **121** и **122** и линкер-нагрузке **LP9B** на ФИГ. 29.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат, трифторуксусной кислоты соль (15)



[0577] К раствору соединения **12b** (0.63 г, 1.0 ммоль) в DCM (50 мл) добавили Fmoc-OSu (0.40 г, 1.2 ммоль) и DIPEA (0.26 г, 2.0 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 16 ч под контролем ЖХМС. Смесь сконцентрировали *in vacuo* остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (50-80% этилацетат в петролейном эфире) и получили **Boc-15** (0.71 г) в виде белого твердого вещества, которое растворили в DCM (10 мл). К раствору добавили TFA (3 мл) при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч до полного удаления Boc согласно ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo* и получили соединение **15** в виде соли TFA (0.62 г, выход 74%) и бесцветного масла. ИЭР м/з: 751 $(M + H)^+$.

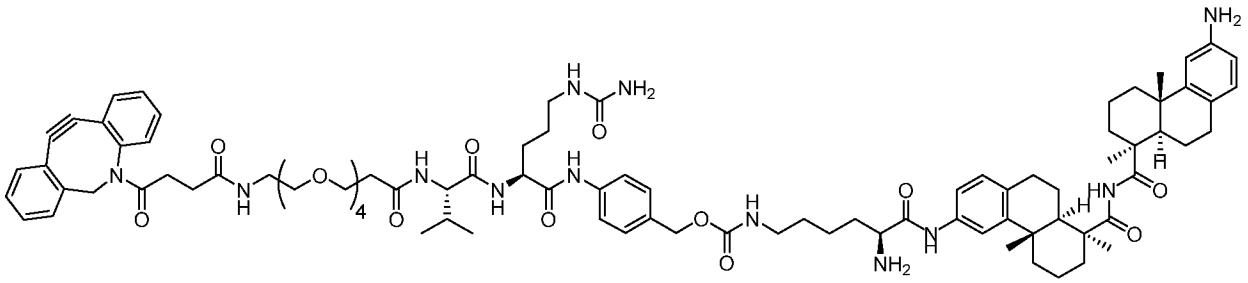
9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-6-амино-2-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}гексанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат, трифторуксусной кислоты соль (122)



[0578] К раствору соединения **15** (0.30 г, 0.40 ммоль) в DMF (20 мл) добавили Fmoc-Lys(Boc)-OH **121** (0.23 г, 0.48 ммоль), HATU (228 мг, 0.60 ммоль) и DIPEA (0.16 г, 1.2 ммоль) последовательно при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч под контролем ЖХМС. Полученную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (50-90% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили **Boc-122** (0.41 г) в виде белого твердого вещества, 0.24 г которого растворили в DCM (20 мл). К раствору добавили TFA (3 мл) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение часа до полного удаления Boc согласно ЖХМС. Летучие

вещества удалили *in vacuo* и получили соединение **122** в виде соли TFA (0.22 г, выход 79%) и бесцветного масла. ИЭР м/з: 1101 (M + H)$^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-[(5*S*)-5-амино-5-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}пентил]карбамат (LP9B)



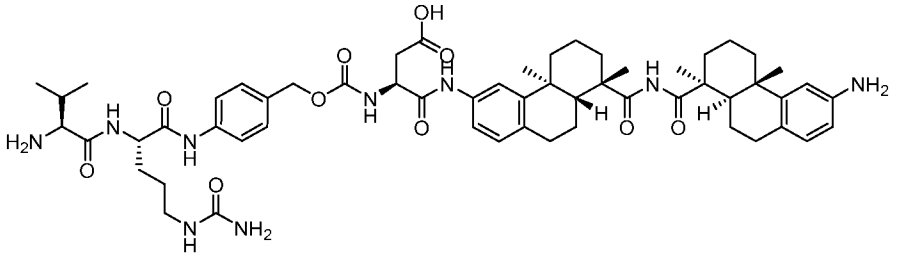
[0579] К смеси соединения **122** (14 мг, 12 мкмоль) и соединения **112** (15 мг, 14 мкмоль) в DMF (5 мл) добавили HOBt (2 мг, 15 мкмоль) и DIPEA (5 мг, 37 мкмоль) и смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч под контролем ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (0.5 мл) и смесь перемешивали при КТ в течение 0.5 ч до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Затем реакционную смесь отфильтровали через мембрану и фильтрат сконцентрировали и напрямую очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили **LP9B** (6 мг, выход 31%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 798 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.0 (s, 1H), 8.15-8.08 (m, 2H), 7.87 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 7.76 (t, J = 5.0 Гц, 1H), 7.67 (d, J = 7.0 Гц, 1H), 7.61 (d, J = 7.0 Гц, 1H), 7.60-7.56 (m, 2H), 7.51-7.42 (m, 4H), 7.41-7.24 (m, 6H), 7.20-7.16 (m, 1H), 6.95 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.50-6.46 (m, 1H), 6.36-6.32 (m, 1H), 6.00-5.96 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.02 (d, J = 9.0 Гц, 1H), 4.91 (s, 2H), 4.69 (s, 2H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 14H), 3.24-3.20 (m, 2H), 3.10-3.05 (m, 2H), 3.00-2.92 (m, 3H), 2.92-2.85 (m, 1H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.65-2.55 (m, 2H), 2.45-2.35 (m, 2H), 2.31-2.20 (m, 4H), 2.20-2.10 (m,4H), 2.10-1.92 (m, 3H), 1.90-1.70 (m, 6H), 1.68-1.53 (m, 6H), 1.50-1.30 (m, 8H), 1.25-1.20 (m, 7H), 1.20-1.10 (m, 3H), 1.02-0.96 (m, 6H), 0.90-0.80 (m, 6H) ppm.

ПРИМЕР 11-10

Линкер-нагрузки LP10B и LP11B

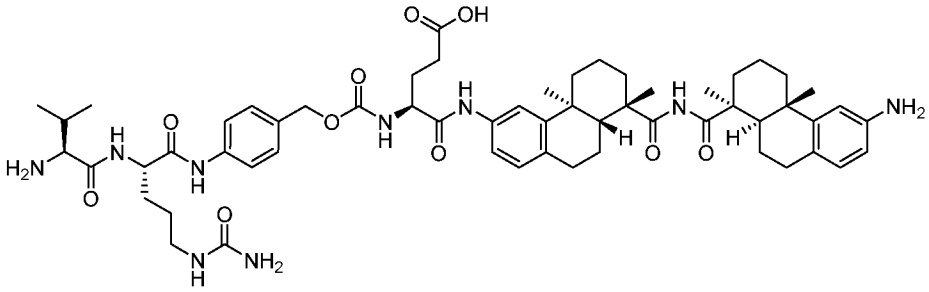
[0580] Данный пример демонстрирует способы синтеза линкер-нагрузок **LP10B-LP11B** в вышеприведенной Таблице 3. Данный пример относится к соединениям, пронумерованным **P7B**, **P8B**, **116**, **123a-b**, линкер-нагрузкам **LP10B** и **LP11B** на ФИГ. 30.

(*S*)-4-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-3-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензилокси)карбониламино)-4-оксобутановая кислота (123a)



[0581] К раствору нагрузки **P7** (64 мг, 0.10 ммоль) в DMF (5 мл) добавили промежуточное соединение **116** (92 мг, 0.12 ммоль) и DIPEA (26 мг, 0.20 ммоль) последовательно при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч под контролем ЖХМС. Затем к смеси добавили пиперидин (0.5 мл) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 10 мин до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (40-70% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили соединение **123a** (41 мг, выход 39%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1049 $(M + H)^+$.

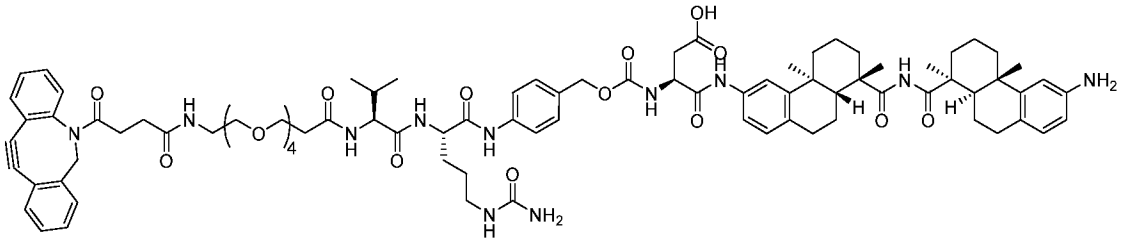
(*S*)-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-4-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензилокси)карбониламино)-5-оксопентановая кислота (123b)



[0582] После аналогичной процедуры для **123a**, за исключением замены **P7** на **P8** (0.53 г, 0.81 ммоль), получили соединение **123b** (0.61 г, выход 71%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1063 $(M + H)^+$.

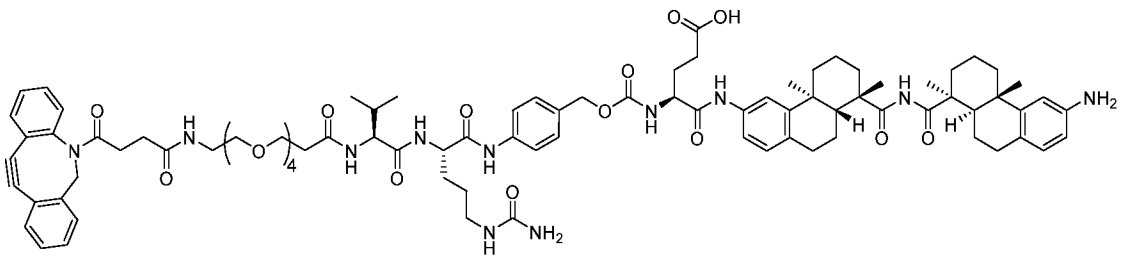
(3*S*)-3-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0⁴,⁹]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-3-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-

{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}пропановая кислота (LP10B)



[0583] К раствору соединения **123** (21 мг, 20 мкмоль) в DMF (2 мл) добавили промежуточное соединение **107** (16 мг, 24 мкмоль) и DIPEA (5 мг, 40 мкмоль) последовательно при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP10B** (12 мг, выход 38%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 792 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.0 (s,1H), 8.14 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.90 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.85-7.75 (m, 1H), 7.68 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 7.65-7.55 (m, 3H), 7.55-7.40 (m, 4H), 7.40-7.25 (m, 5H), 6.95 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 6.67 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.32 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.05-5.95 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.05-4.90 (m, 3H), 4.80-4.60 (m, 1H), 4.40-4.35 (m, 2H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 25H), 3.20-2.85 (m, 4H), 2.80-2.55 (m, 3H), 2.40-2.30 (m, 3H), 2.30-2.20 (m, 3H), 2.20-2.05 (m, 4H), 2.0-1.50 (m, 12H), 1.50-1.30 (m, 3H), 1.30-1.20 (m, 6H), 1.20-1.05 (m, 2H), 1.05-0.90 (m, 5H), 0.90-0.80 (m, 6H) ppm.

(4*S*)-4-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}бутановая кислота (LP11B)



[0584] В соответствии с аналогичной процедурой для **LP10B**, за исключением замены **123a** на **123b** (0.10 г, 94 мкмоль), получили соединение **LP11B** (50 мг, выход 33%) в виде

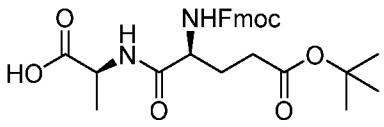
белого твердого вещества. ИЭР м/з: 799 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.0 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.14 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.90 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.85-7.75 (m, 1H), 7.68 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 7.65-7.55 (m, 3H), 7.55-7.40 (m, 4H), 7.40-7.25 (m, 6H), 6.95 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 6.67 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.32 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.05-5.95 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.05-4.90 (m, 3H), 4.40-4.35 (m, 2H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 4H), 3.50-3.40 (m, 25H), 3.20-2.85 (m, 4H), 2.80-2.55 (m, 3H), 2.40-2.30 (m, 3H), 2.30-2.20 (m, 3H), 2.20-2.05 (m, 4H), 2.00-1.50 (m, 12H), 1.50-1.30 (m, 3H), 1.30-1.20 (m, 6H), 1.20-1.05 (m, 2H), 1.05-0.90 (m, 5H), 0.90-0.80 (m, 6H) ppm.

ПРИМЕР 11-11

Нагрузка P12B и линкер-нагрузка LP12B

[0585] Данный пример демонстрирует способы синтеза нагрузки **P12B** в Таблице C далее и линкер-нагрузки **LP12B** в Таблице C выше. Данный пример относится к соединениям, пронумерованным **12b**, **107**, **124**, **125** и **126** и нагрузке **P12B** линкер-нагрузке **LP12B** на ФИГ. 31.

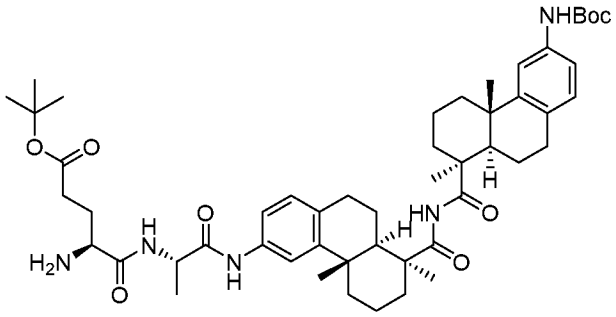
((*S*)-2-((((9*H*-Флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-5-(*трет*-бутокси)-5-оксопентаноил)-*L*-аланин (125)



[0586] К раствору Fmoc-Glu(OtBu)-OH (6.0 г, 14 ммоль) в DCM (300 мл) добавили HOSu (3.2 г, 28 ммоль) и EDCI (5.4 г, 28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Полученную смесь разбавили DCM (200 мл) и промыли водой (100 мл x 2) и рассолом (100 мл). Органический раствор высушили над безводным сульфатом натрия, отфильтровали и сконцентрировали *in vacuo* и получили сырое соединение **124** (8.5 г, ИЭР м/з: 545 (M + 23)$^+$), которое растворили в DMF (10 мл). К раствору добавили аланин (4.2 г, 48 ммоль) и DIPEA (6.2 г, 48 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Полученную смесь вылили в воду (100 мл) и окислили уксусной кислотой до pH 5-6. Смесь экстрагировали этилацетатом и объединенный органический раствор сконцентрировали *in vacuo*. Сырой продукт очистили посредством обратно-фазовой флэш-хроматографии (0-60% ацетонитрил в вод. TFA (0.01%)) и получили соединение **125** (1 г, выход 15%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 497 (M + H)$^+$.

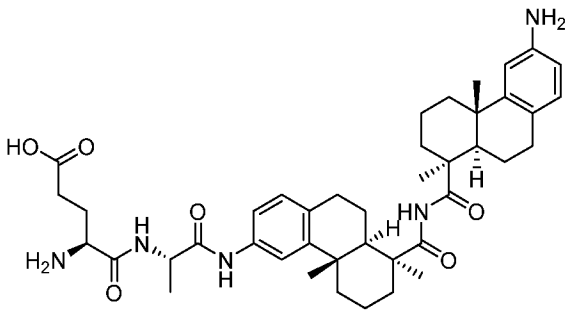
(*S*)-*трет*-Бутил 4-амино-5-((*S*)-1-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(*трет*-бутоксикарбониламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-

карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-1-оксопропан-2-иламино)-5-оксопентаноат (126)



[0587] К раствору соединения **125** (42 мг, 84 мкмоль) и DIPEA (28 мкл, 0.16 ммоль) в DMF (3.0 мл) добавили HATU (36 мг, 95 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 10 мин и затем добавили соединение **12b** (50 мг, 80 мкмоль), смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (1.0 мл) и смесь перемешивали при КТ в течение 3 ч до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Полученную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0.01%)) и получили соединение **126** (20 мг, выход 28%) в виде желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 885 $(M + H)^+$.

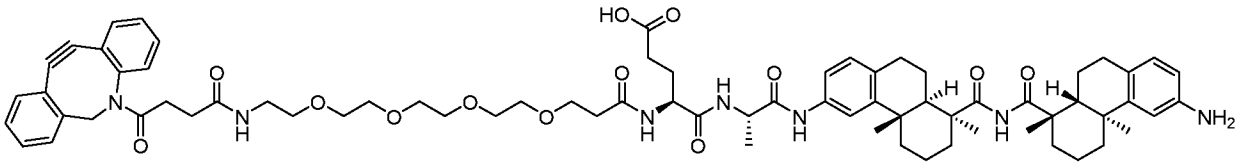
(*S*)-4-амино-5-((*S*)-1-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-1-оксопропан-2-иламино)-5-оксопентановая кислота (P12B)



[0588] Смесь соединения **126** (57 мг, 64 мкмоль) в чистой TFA (2.0 мл) перемешивали при КТ на протяжении часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь развели DCM (20 мл) и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате натрия (10 мМ)) и получили **P12B** (20 мг, выход 43%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 365 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.90 (s, 1H), 8.30 (br s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.33 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.67 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.46(s, 1H), 6.33 (dd, J =

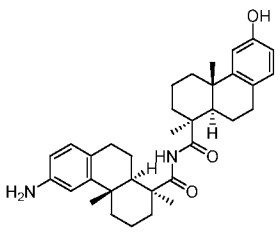
7.6 Гц и 2.0 Гц, 1H), 4.70 (br s, 1H), 4.41-4.36 (m, 1H), 3.42-3.30 (m, 6H), 2.91-2.85 (m, 1H), 2.78-2.75 (m, 2H), 2.67-2.61 (m, 1H), 2.32-2.27 (m, 4H), 2.16-2.13 (m, 4H), 1.88-1.77 (m, 4H), 1.65-1.58 (m, 4H), 1.29-1.23 (m, 12H), 1.14-1.11 (m, 2H), 1.01 (d, *J* = 7.6 Гц, 6H) ppm.

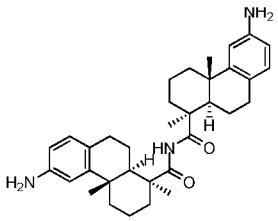
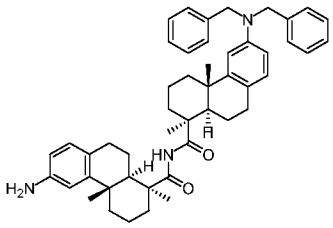
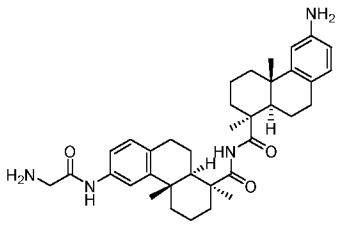
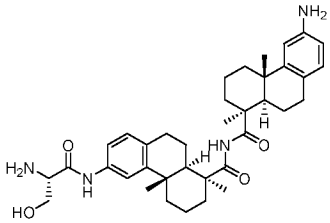
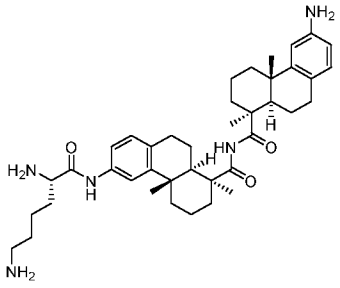
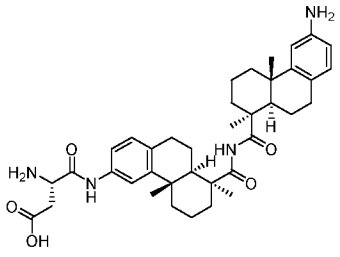
(4*S*)-4-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}этил]карбамоил}бутановая кислота (LP12B)

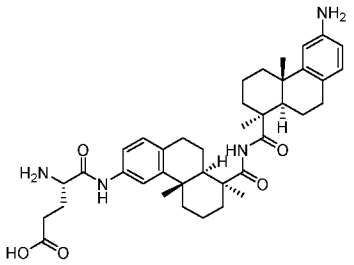
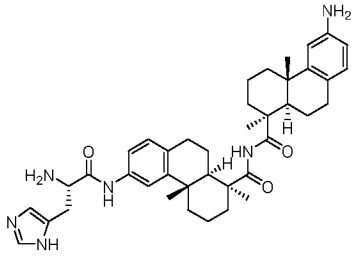
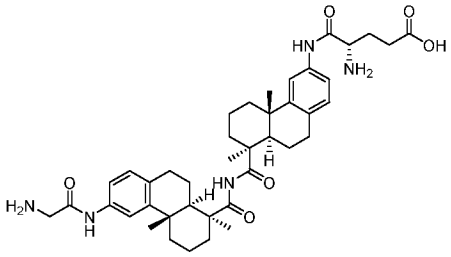
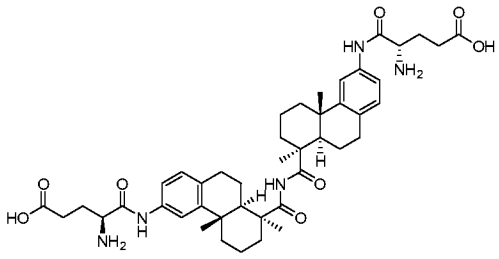
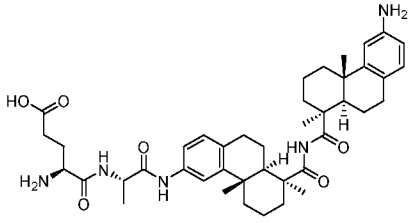


[0589] К раствору соединения **P12B** (10 мг, 14 мкмоль) в DMF (2.0 мл) добавили DIPEA (6 мкл, 21 мкмоль) и соединение **107** (11 мг, 16 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3 ч под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP12B** (3.5 мг, выход 20%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 632 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.64 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.41-8.39 (m, 1H), 8.12-8.09 (m, 1H), 7.79 (br s, 1H), 7.67 (d, *J* = 7.2 Гц, 1H), 7.61 (d, *J* = 7.2 Гц, 1H), 7.60 (br s, 1H), 7.52-7.27 (m, 8H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.33 (dd, *J* = 8.4 Гц и 1.6 Гц, 1H), 5.02 (d, *J* = 14.0 Гц, 1H), 4.70-4.67 (br s, 1H), 4.36-4.30 (m, 1H), 4.21-4.14 (m, 1H), 3.61-3.58 (m, 3H), 3.46-3.45 (m, 15H), 3.08-3.06 (m, 2H), 2.90-2.55 (m, 5H), 2.42-2.09 (m, 12H), 1.98-1.73 (m, 7H), 1.65-1.54 (m, 3H), 1.29-1.25 (m, 12H), 1.17-1.11 (m, 2H), 0.99-0.97 (m, 6H) ppm.

Таблица C. Нагрузки модулятора LXR

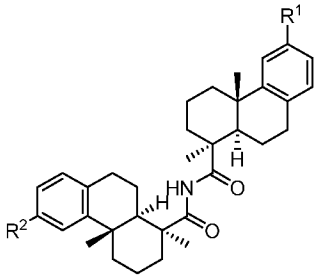
Обозн. соед.	Структуры	МФ	МВ	Точная масса
P1		$C_{34}H_{44}N_2O_3$	528.72	528.72

Обозн. соед.	Структуры	МФ	МВ	Точная масса
P2B		$C_{34}H_{45}N_3O_2$	527.74	527.74
P3B		$C_{48}H_{57}N_3O_2$	707.99	707.45
P4B		$C_{36}H_{48}N_4O_3$	584.79	584.37
P5B		$C_{37}H_{50}N_4O_4$	614.82	614.38
P6B		$C_{40}H_{57}N_5O_3$	655.91	655.45
P7B		$C_{38}H_{50}N_4O_5$	642.83	642.38

Обозн. соед.	Структуры	МФ	МВ	Точная масса
P8B		$C_{39}H_{52}N_4O_5$	656.85	656.39
P9B		$C_{40}H_{52}N_6O_3$	664.88	664.41
P10B		$C_{41}H_{55}N_5O_6$	713.91	713.42
P11B		$C_{44}H_{59}N_5O_8$	785.97	785.44
P12B		$C_{42}H_{57}N_5O_6$	727.93	727.43

[0590] Структуры, рассчитанные значения LogP, результаты МС и ВЭЖХ для вышеуказанных нагрузок приведены в Таблице D.

Таблица D Химико-физические свойства нагрузок



Соед.	R1	R2	cLogP	МС (M+H)	ВЭЖХ	
					Чистота (%)	КТ (мин)
P1	OH	NH_2	+++	529.3	95	8.66
P2B	NH_2	NH_2	+++	528.2	95	9.11
P3B	NH_2	NBn_2	+++	354.8 (M/2+H)	95	8.87
P4B	NH_2	$NHC(O)CH_2NH_2$ (Gly)	++	585.4	98	8.20
P5B	NH_2	NHC(O)(S)-$CH(CH_2OH)NH_2$ (Ser)	++	615.4	100	7.86
P6B	NH_2	$NHC(O)CH((CH_2)_4NH_2)NH_2$ (Lys)	+++	656.5	100	8.89
P7B	NH_2	$NHC(O)CH(CH_2CO_2H)NH_2$ (Asp)	+	643.4	100	6.64
P8B	NH_2	$NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (Glu)	+	657.4	97	6.69
P9B	NH_2	$NHC(O)CH(CH_2$-имидазол$)NH_2$ (His)	++	665.3	97	5.94
P10B	$NHC(O)CH_2NH_2$ (Gly)	$NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (Glu)	+	714.5	100	6.12
P11B	$NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (Glu)	$NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (Glu)	+	393.8 (M/2+H)	100	5.45
P12B	NH_2	$NHC(O)CH(CH_3)NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (AlaGlu)	+	728.5	100	6.61, 6.67

6 < +++ < 12; 4 < ++ < 6; 0 < + < 4

[0591] Молекулярные формулы, молекулярный вес, рассчитанные значения LogP, результаты МС и ВЭЖХ для вышеуказанных линкер-нагрузок приведены в Таблице E.

Таблица E Химико-физические свойства нагрузок

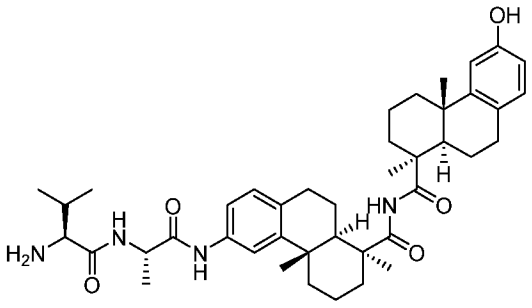
Соед.	МФ	МВ	cLogP	Чистота (%)	МС м/з (100%)	наиболее выс. МС м/з	ВЭЖХ ВУ (мин)
LP1	$C_{124}H_{176}N_{12}O_{43}$	2522.81	+	95	841.7 [M/3+H]	1262.0 [M/2+H]	7.93 (B)

Соед.	МФ	МВ	cLogP	Чистота (%)	МС м/з (100%)	наиболее выс. МС м/з	ВЭЖХ ВУ (мин)
LP2B	$C_{127}H_{182}N_{14}O_{44}$	2608.87	+	100	870.3 [M/3+H]	870.3 [M/3+H]	7.35 (B)
LP3B	$C_{101}H_{143}N_{13}O_{22}S$	1923.36	+++	100	641.8 [M/3+H]	962.5 [M/2+H]	6.20 (B)
LP4B	$C_{104}H_{149}N_{15}O_{23}S$	2009.45	++	99	670.5 [M/3+H]	1004.9 [M/2+H]	5.94 (B)
LP5B	$C_{100}H_{138}N_{12}O_{24}$	1892.23	++	95	631.5 [M/3+H]	946.6 [M/2+H]	6.94 (B)
LP6B	$C_{85}H_{109}N_{11}O_{15}$	1524.84	+++	96	763.0 [M/2+H]	763.0 [M/2+H]	8.63 (B)
LP7B	$C_{74}H_{96}N_8O_{12}$	1289.60	+++	97	645.4 [M/2+H]	1290.7 [M+H] (23%)	8.67 (B)
LP8B	$C_{137}H_{192}N_{16}O_{47}$	2815.07	+	99	939.2 [M/2+H]	939.2 [M/2+H]	7.60 (B)
LP9B	$C_{89}H_{118}N_{12}O_{15}$	1595.96	+++	100	798.3 [M/2+H]	798.3 [M/2+H]	8.58 (B)
LP10B	$C_{87}H_{111}N_{11}O_{17}$	1582.88	+++	97	528.4 [M/3+H]	792.0 [M/2+H]	7.11 (B)
LP11B	$C_{88}H_{113}N_{11}O_{17}$	1596.90	+++	96	799.2 [M/2+H]	799.2 [M/2+H]	7.10 (B)
LP12B	$C_{72}H_{91}N_7O_{13}$	1262.53	+++	100	631.8 [M/2+H]	631.8 [M/2+H]	7.51 (B)

6 < +++ < 12; 4 < ++ < 6; -2 < + < 4

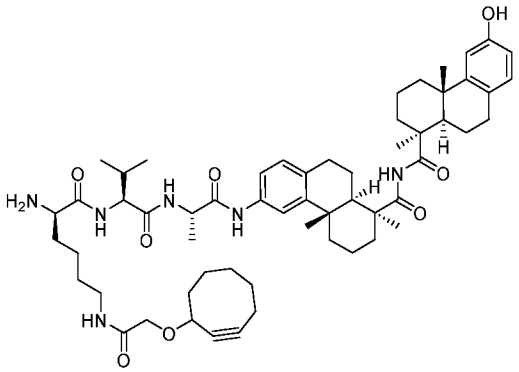
Пример 12. Синтез LP1 (ФИГ. 2)

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((*S*)-2-((*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (LP1-2)



[0592] К раствору **P1** (53 мг, 0.10 ммоль) в DMF (1 мл) добавили Fmoc-Val-Ala-OH (41 мг, 0.10 ммоль), HATU (38 мг, 0.1 ммоль) и диизопропилэтиламин (26 мг, 0.20 ммоль) последовательно. После перемешивания при 25 °C в течение 24 часов до разрушения **P1** согласно ЖХМС к смеси добавили пиперидин (0.1 мл) и полученный раствор перемешивали при 25 °C еще на протяжении 3 часов. После фильтрации фильтрат напрямую очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **LP1-2** (45 мг, выход 64%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 699 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 8.40 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.32 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 7.03 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.88 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.72 (d, J = 2.4 Гц, 1H), 6.56 (dd, J = 8.3, 2.4 Гц, 1H), 4.60-4.48 (m, 1H), 3.22-3.11 (m, 1H), 3.02-2.93 (m, 1H), 2.92-2.76 (m, 3H), 2.74-2.70 (m, 1H), 2.43-2.31 (m, 3H), 2.28 (d, J = 14.1 Гц, 3H), 2.16-1.96 (m, 3H), 1.81 (s, 1H), 1.78-1.65 (m, 4H), 1.53-1.42 (m, 4H), 1.38 (d, J = 5.3 Гц, 6H), 1.33-1.22 (m, 2H), 1.14 (d, J = 6.6 Гц, 6H), 1.09 (d, J = 18.6 Гц, 6H) ppm.

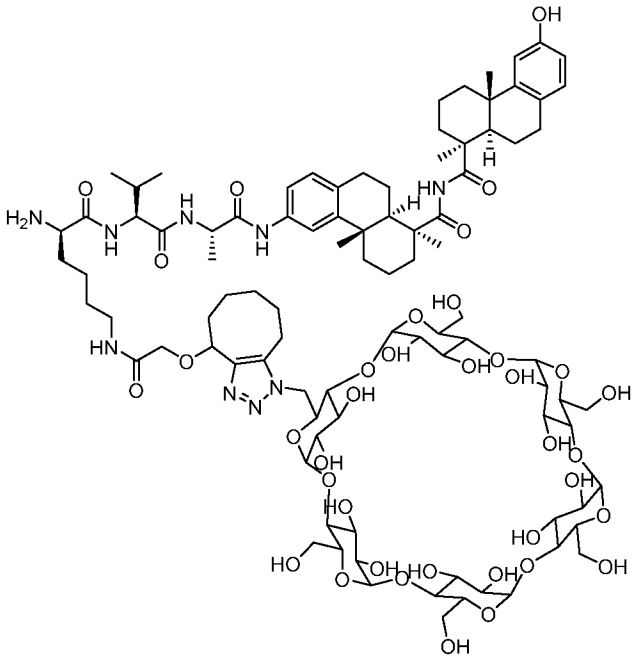
(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((2*S*)-2-((2*S*)-2-((2*R*)-2-амино-6-(2-(циклоокт-2-инилокси)ацетамидо)гексанамидо)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (LP1-4)



[0593] К раствору соединения **LP1-3** (35 мг, 0.064 ммоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (24 мг, 0.064 ммоль) и соединение **LP1-2** (45 мг, 0.064 ммоль) последовательно при комнатной температуре. Смесь перемешивали в течение нескольких минут при комнатной температуре до тех пор, пока смесь не стала гомогенной. К этой смеси добавили диизопропилэтиламин (41 мг, 0.32 ммоль) при комнатной температуре при помощи шприца. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи (16 часов) до почти полного израсходования **LP1-2** согласно ЖХМС. Затем к данной реакционной смеси добавили пиперидин (0.1 мл, избыт.) по каплям при комнатной температуре и смесь перемешивали еще в течение 3 часов до удаления Fmoc под контролем ЖХМС. Реакционную смесь напрямую очистили посредством обращенно-

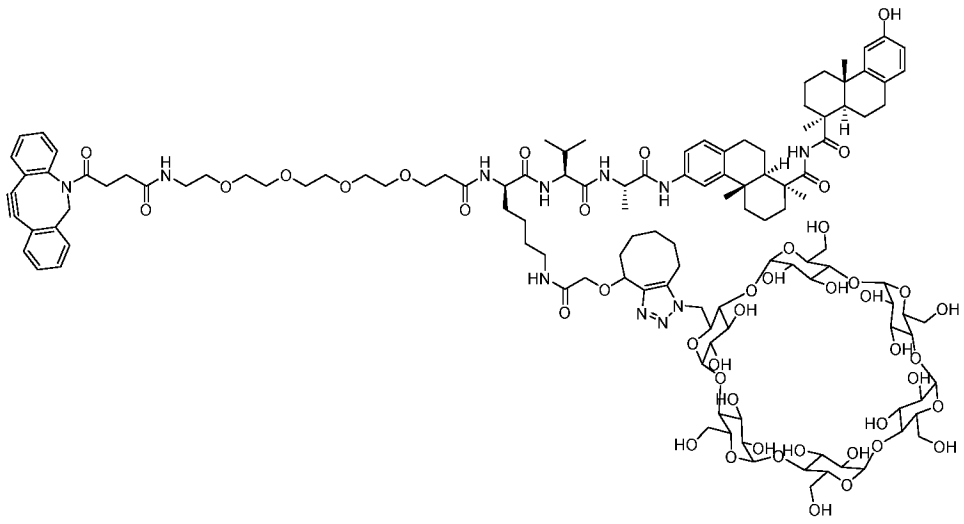
фазовой флэш-хроматографии или преп-ВЭЖХ (способ B, основное условие) и получили соединение **LP1-4** (30 мг, выход 47%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 991 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 7.51 (d, J = 1.5 Гц, 1H), 7.37 (dd, J = 8.3, 2.0 Гц, 1H), 7.02 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.89 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.72 (d, J = 2.4 Гц, 1H), 6.56 (dd, J = 8.3, 2.5 Гц, 1H), 4.64-4.57 (m, 1H), 4.48 (q, J = 7.1 Гц, 1H), 4.33-4.27 (m, 1H), 4.20 (d, J = 6.7 Гц, 1H), 3.93 (m, 2H), 3.43 (t, J = 6.6 Гц, 1H), 3.24 (t, J = 6.9 Гц, 2H), 3.02-2.93 (m, 2H), 2.92-2.76 (m, 3H), 2.40-2.32 (m, 2H), 2.33-2.23 (m, 4H), 2.22-2.12 (m, 3H), 2.12-2.00 (m, 5H), 1.99-1.91 (m, 1H), 1.91-1.81 (m, 2H), 1.78-1.66 (m, 6H), 1.66-1.58 (m, 1H), 1.58-1.49 (m, 2H), 1.45 (d, J = 7.1 Гц, 6H), 1.38 (d, J = 4.0 Гц, 6H), 1.34-1.22 (m, 4H), 1.14 (d, J = 7.0 Гц, 6H), 1.06-0.98 (m, 6H) ppm.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пропанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]карбонил}-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (LP1-5)



[0594] К раствору соединения **LP1-4** (30 мг, 30 мкмоль) в DMF (0.5 мл) добавили раствор CD-N_3 (60 мг, 60 мкмоль) в DMF (0.5 мл) при комнатной температуре при помощи шприца. Смесь перемешивали при 20-25 °C в течение 3 дней. Соединение **LP1-4** было по большей части израсходовано согласно ЖХМС. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP1-5** (14 мг, выход 23%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 995 (M/2 + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 8.40 (s, 1H), 7.56-7.52 (m, 1H), 7.32 (t, J = 7.7 Гц, 1H), 7.03 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.88 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.72 (d, J = 2.4 Гц, 1H), 6.56 (dd, J = 8.2, 2.3 Гц, 1H), 5.24-5.16 (m, 1H), 5.01-4.95 (m, 6H), 4.65-4.59 (m, 1H), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.31-4.22 (m, 2H), 4.13-3.73 (m, 22H), 3.63-3.43 (m, 14H), 3.14-2.72 (m, 7H), 2.45-2.32 (m, 3H), 2.28 (d, J = 13.8 Гц, 3H), 2.22-1.85 (m, 11H), 1.82-1.59 (m, 9H), 1.55-1.41 (m, 8H), 1.38 (d, J = 5.3 Гц, 6H), 1.31-1.26 (m, 3H), 1.14 (d, J = 7.2 Гц, 6H), 1.06-0.93 (m, 6H) ppm.

1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-[(1*R*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}этил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP1)

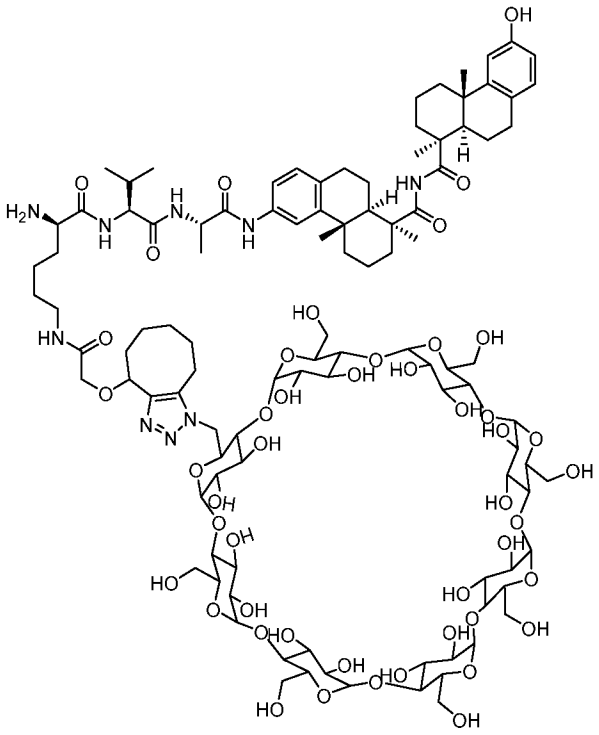


[0595] К раствору соединения **LP1-5** (14 мг, 7.4 мкмоль) и DIBAC-Suc-PEG$_4$-OSu (6.5 мг, 10 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили триэтиламин (2.0 мг, 20 мкмоль) и смесь перемешивали при 20-25 °C в течение 16 часов. Большую часть летучих веществ удалили

in vacuo и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **LP1** (5.0 мг, выход 27%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1261 (M/2 + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 7.69-7.44 (m, 6H), 7.41-7.30 (m, 3H), 7.26 (d, *J* = 6.8 Гц, 1H), 7.04-6.96 (m, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 6.72 (d, *J* = 1.9 Гц, 1H), 6.56 (dd, *J* = 8.3, 2.4 Гц, 1H), 5.25-5.18 (m, 1H), 5.17-5.08 (m, 1H), 5.01-4.94 (m, 4H), 4.61 (s, 16H), 4.53-4.13 (m, 5H), 4.03-3.80 (m, 18H), 3.74-3.64 (m, 3H), 3.63-3.41 (m, 23H), 3.28-2.76 (m, 12H), 2.76-2.65 (m, 1H), 2.56-2.44 (m, 2H), 2.42-2.31 (m, 4H), 2.30-2.23 (m,4H), 2.18-1.92 (m, 9H), 1.79-1.55 (m, 9H), 1.49-1.34 (m, 9H), 1.33-1.22 (m, 3H), 1.18-1.10 (m, 6H), 1.06-0.94 (m, 6H) ppm.

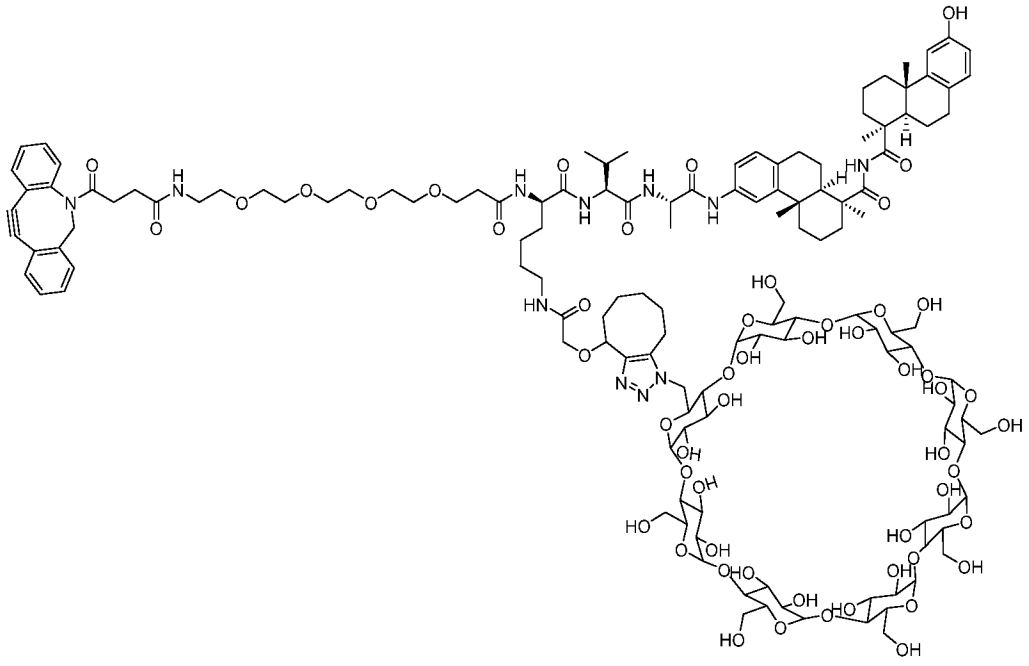
Пример 13. Синтез LP2 (ФИГ. 3)

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-{2-[(1-{[41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56-гексадекагидрокси-10,15,20,25,30,35,40-гептакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29,32,34,37,39-гексадекаоксанонацикло[36.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}.2^{28,31}.2^{33,36}]гексапентаконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пропанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]карбонил}-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (LP2-5)



[0596] К раствору соединения **LP1-4** (30 мг, 0.030 ммоль) в DMF (2 мл) добавили γCD-N_3 (0.12 мг, 0.091 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов под контролем ЖХМС. Смесь отфильтровали через мембрану и затем фильтрат очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ А) и получили соединение **LP2-5** (40 мг, выход 57%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1157.6 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.82 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.55 (d, J = 9.0 Гц, 1H), 8.39 (d, J = 6.5 Гц, 1H), 8.11-8.04 (m, 4H), 7.93-7.88 (m, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.35 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.97 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.81 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.50 (d, J = 11 Гц, 1H), 5.89-5.68 (m, 16H), 5.16-4.32 (m, 19H), 3.94-3.80 (m, 4H), 3.69-3.51 (m, 50H), 3.18-2.64 (m, 8H), 2.33-1.85 (m, 12H), 1.65-1.11 (m, 25H), 0.99 (d, J = 9.5 Гц, 6H), 0.89-0.83 (m, 6H) ppm.

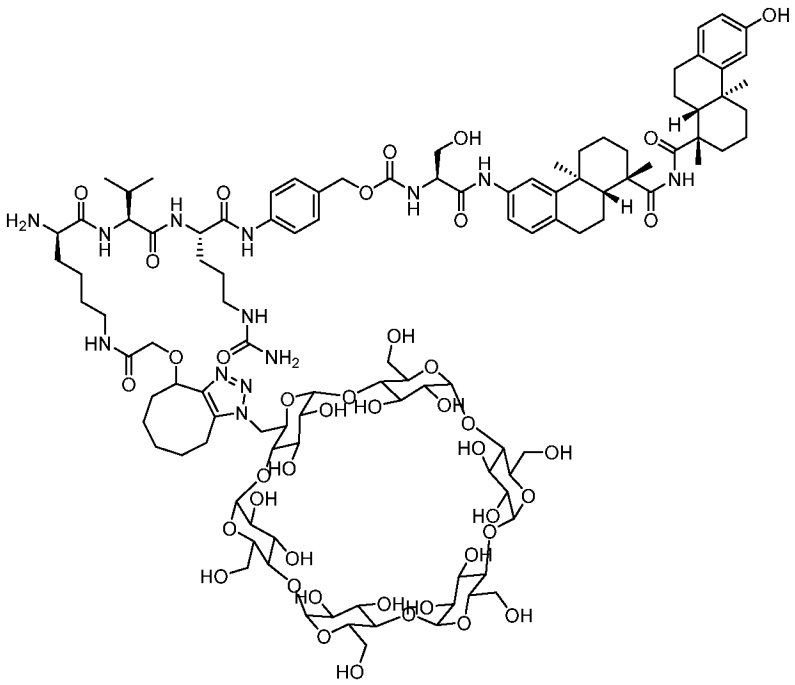
1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-[(1*R*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}этил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-5-{2-[(1-{[41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56-гексадекагидрокси-10,15,20,25,30,35,40-гептакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29,32,34,37,39-гексадекаоксанонацикло[36.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}.2^{28,31}.2^{33,36}]гексапентаконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP2)



[0597] К раствору соединения **LP2-6** (4.3 мг, 7.8 мкмоль) в безводном DMF (1 мл) добавили HATU (3.0 мг, 7.8 мкмоль). Смесь перемешивали при 10 °C в течение 10 минут, а затем добавили соединение **LP2-5** (15 мг, 6.5 мкмоль) и DIPEA (1.7 мг, 13 мкмоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов до полного израсходования **LP2-5** под контролем ЖХМС. Смесь отфильтровали через мембрану и затем фильтрат очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **LP3** (6.0 мг, выход 32%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1424.2 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.26 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.24-7.98 (m, 4H), 7.81 (d, J = 5.6 Гц, 1H), 7.72 (t, J = 5.5 Гц, 1H), 7.67 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 7.61 (d, J = 7.4 Гц, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.53-7.25 (m, 7H), 6.95 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.81 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.1 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.2, 2.1 Гц, 1H), 5.94-5.58 (m, 15H), 5.39-4.43 (m, 17H), 4.37-4.24 (m, 3H), 4.13-4.08 (m, 1H), 3.98-3.33 (m, 52H), 3.26-2.52 (m, 18H), 2.40-1.18 (m, 48H), 1.18-0.63 (m, 19H) ppm. Растворимость: 0.075 мг/мл H_2O.

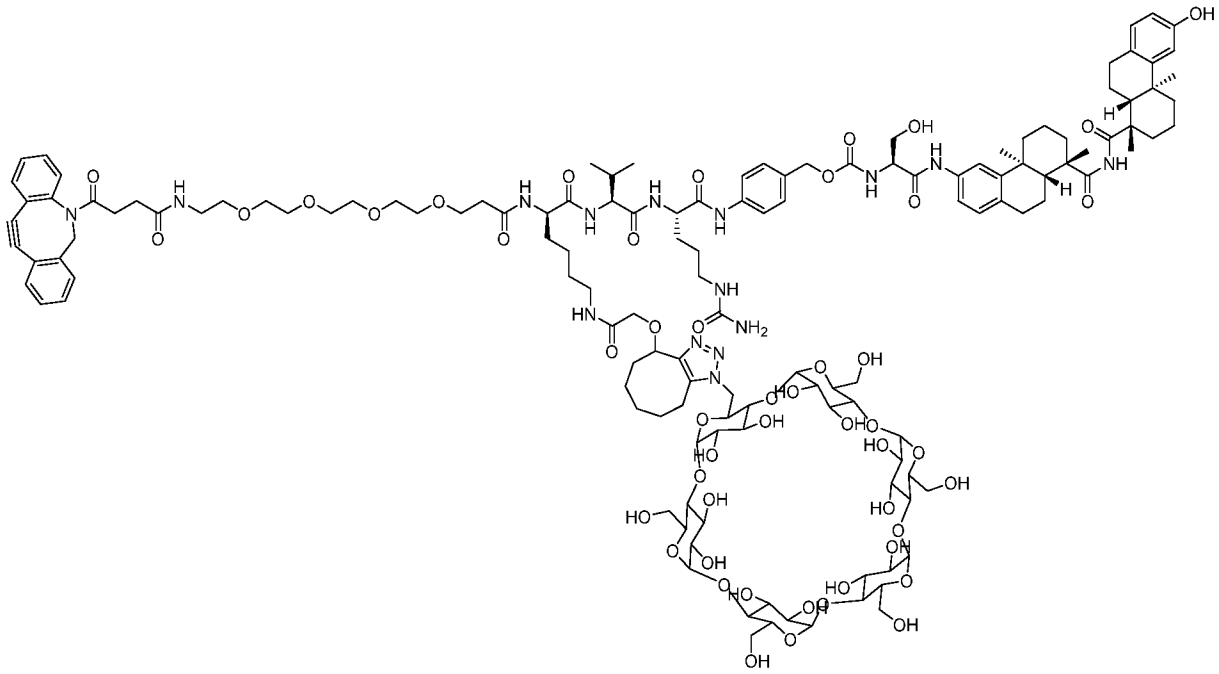
Пример 14. Синтез LP5 (ФИГ. 4)

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.$2^{3,6}$.$2^{8,11}$.$2^{13,16}$.$2^{18,21}$.$2^{23,26}$]дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамат (LP5-1)



[0598] К раствору соединения **LP4** (20 мг, 15 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили раствор CD-N_3 (46 мг, 45 мкмоль) в ацетонитриле (2 мл) и воду (2 мл) при КТ. Смесь перемешивали при 30 °C в течение 16 часов. Соединение **LP4** было практически израсходовано согласно ЖХМС. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP5-1** (20 мг, выход 57%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1156.0 $(M/2 + 1)^+$.

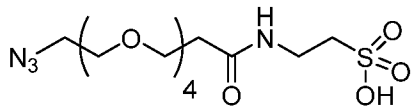
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамат (LP5)



[0599] К раствору DIBAC-ПЭГ$_4$-кислоты **LP5-2** (4.3 мг, 7.8 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (3.0 мг, 3.6 мкмоль) и DIPEA (1.7 мг, 13 мкмоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 10 минут. Затем к смеси добавили **LP5-1** (15 мг, 6.5 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 30 °C в течение 2 часов до завершения реакции под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали и очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили **LP5** (10 мг, выход 42%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1424.3 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.81-9.67 (m, 2H), 8.99 (s, 1H), 8.20-8.06 (m, 5H), 7.85-7.22 (m, 18H), 6.97-6.49 (m, 2H), 5.98 (s, 1H), 5.65-5.33 (m, 15H), 5.14-4.92 (m, 5H), 4.82-4.72 (m, 6H), 4.60-4.54 (m, 4H), 4.36-4.28 (m, 3H), 4.18-3.96 (m, 3H), 3.85-3.55 (m, 27H), 3.49-3.39 (m, 23H), 3.28-3.08 (m, 8H), 2.94-2.57 (m, 4H), 2.42-2.07 (m, 8H), 1.99-1.45 (m, 22H), 1.28-1.11 (m, 23H), 1.05-0.95 (m, 6H), 0.89-0.79 (m, 7H) ppm.

Пример 15. Синтез LP6 (ФИГ. 5)

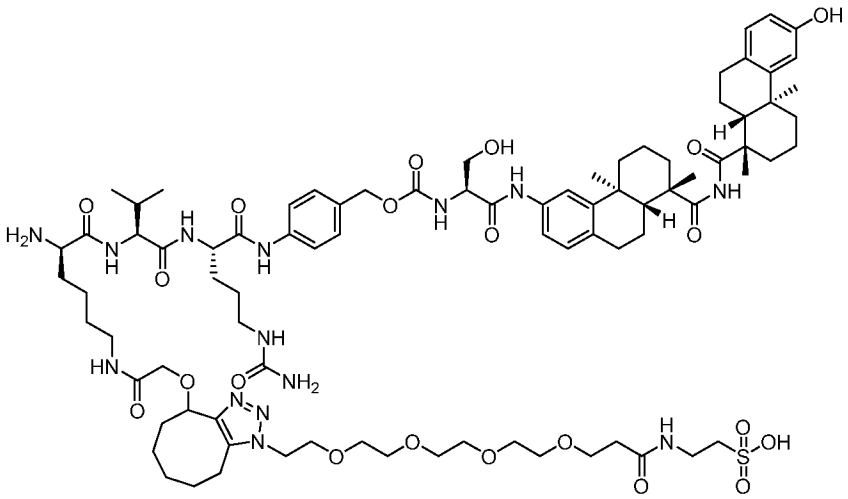
1-Азидо-15-оксо-3,6,9,12-тетраокса-16-азаоктадекан-18-сульфоновая кислота (L6-2)



[0600] К раствору азидо-ПЭГ$_4$-NHS (**L6-1**, 0.10 г, 0.26 ммоль) в безводном DMF (4 мл) добавили таурин (39 мг, 0.31 ммоль) и DIPEA (15 мг, 0.52 ммоль). Смесь перемешивали при 25 °C на протяжении ночи. Смесь отфильтровали и фильтрат очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **LP6-2** (80 мг, выход 78%) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 399.1 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, D_2O) δ 3.69 (t, J = 6.0 Гц,

2H), 3.64-3.59 (m, 14H), 3.49 (t, *J* = 6.5 Гц, 2H), 3.41 (t, *J* = 4.5 Гц, 2H), 3.00 (t, *J* = 7.0 Гц, 2H), 2.45 (t, *J* = 6.0 Гц, 2H) ppm.

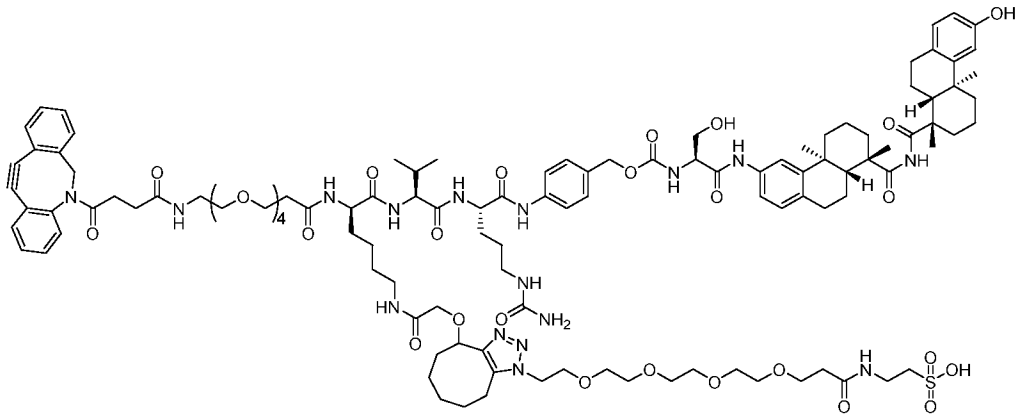
2-{1-[4-({[(5*R*)-5-амино-5-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-({4-[({[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамоил}окси)метил]фенил}карбамоил)-4-(карбамоиламино)бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}пентил]карбамоил}метокси)-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}этан-1-сульфоновая кислота (LP6-3)



[0601] К раствору соединения **LP6-2** (20 мг, 50 мкмоль) в воде (1 мл) добавили по каплям нас. вод. раствор бикарбоната натрия при 0 °C до достижения pH ~ 7. К перемешанному раствору затем добавили раствор соединения **LP4** (28 мг, 21 мкмоль) в ацетонитриле (1 мл) при помощи шприца. Смесь перемешивали при 25 °C на протяжении ночи. Реакцию контролировали посредством ЖХМС до полного израсходования **LP4**. Реакционную смесь отфильтровали и очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **LP6-3** (15 мг, выход 41%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 856.5 $(M/2 + 1)^+$.

2-{1-[4-({[(5*R*)-5-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-5-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-({4-[({[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамоил}окси)метил]фенил}карбамоил)-4-(карбамоиламино)бутил]карбамоил}-2-

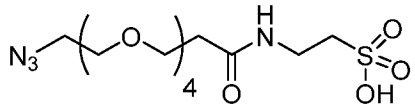
метилпропил]карбамоил}пентил]карбамоил}метокси)-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}этан-1-сульфоновая кислота (LP6)



[0602] К раствору соединения **LP6-3** (15 мг, 8.8 мкмоль) и коммерчески доступной DIBAC-Suc-PEG$_4$-OSu **LP6-4** (5.7 мг, 8.8 мкмоль, CAS 1427004-19-0) в DMF (1 мл) добавили DIPEA (2.3 мг, 18 мкмоль) и смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Большую часть летучих веществ удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили **LP6** (6.0 мг, выход 30%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1123.8 (M/2 + H)$^+$, 749.5 (M/3 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 7.76-7.16 (m, 14H), 7.06-7.00 (m, 1H), 6.88 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.72-6.71 (m, 1H), 6.56-6.55 (m, 1H), 5.39-5.33 (m, 1H), 5.14-5.09 (m, 5H), 4.61 (s, 18H), 4.50-4.43 (m, 2H), 4.33-4.30 (m, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.89-3.85 (m, 3H), 3.73-3.42 (m, 28H), 3.25-2.72 (m, 8H), 2.45 (t, J = 7.5 Гц, 2H), 2.36-1.96 (m, 18H), 1.81-1.51 (m, 12H), 1.45-1.32 (m, 15H), 1.12-0.89 (m, 12H) ppm.

Пример 16. Синтез LP18 (ФИГ. 6)

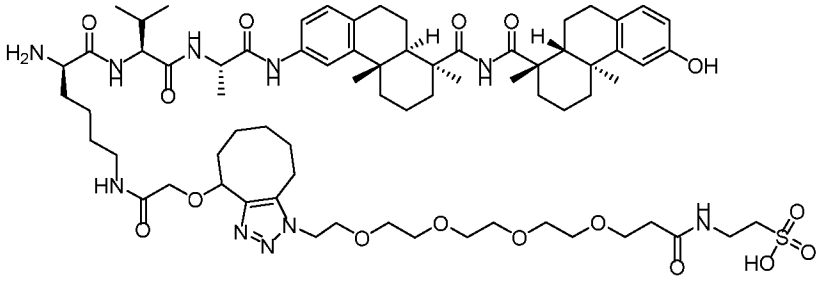
1-Азидо-15-оксо-3,6,9,12-тетраокса-16-азаоктадекан-18-сульфоновая кислота (L18-2)



[0603] К раствору азидо-ПЭГ$_4$-NHS (**L18-1**, 0.10 г, 0.26 ммоль) в безводном DMF (4 мл) добавили таурин (39 мг, 0.31 ммоль) и DIPEA (15 мг, 0.52 ммоль). Смесь перемешивали при 25 °C на протяжении ночи. Смесь отфильтровали и фильтрат очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **LP18-2** (80 мг, выход 78%) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 399.1 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, D_2O) δ 3.69 (t, J = 6.0 Гц, 2H), 3.64-3.59 (m, 14H), 3.49 (t, J = 6.5 Гц, 2H), 3.41 (t, J = 4.5 Гц, 2H), 3.00 (t, J = 7.0 Гц, 2H), 2.45 (t, J = 6.0 Гц, 2H) ppm.

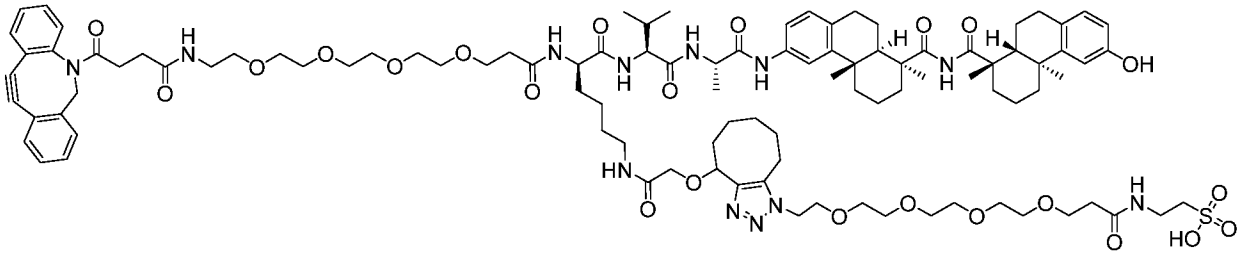
1-(4-(2-((*R*)-5-амино-6-((*S*)-1-((*S*)-1-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-

диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-1-оксопропан-2-иламино)-3-метил-1-оксобутан-2-иламино)-6-оксогексиламино)-2-оксоэтокси)-4,5,6,7,8,9-гексагидро-1*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил)-15-оксо-3,6,9,12-тетраокса-16-азаоктадекан-18-сульфоновая кислота (LP18-3)



[0604] К раствору соединения **LP1-4** (40 мг, 40 ммоль) в DMF (1 мл) добавили азид **LP18-2** (40 мг, 0.10 ммоль) при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов до завершения реакции согласно ЖХМС. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС и получили соединение **LP18-3** (43 мг, выход 77%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 695.4 $(M/2 + H)^+$.

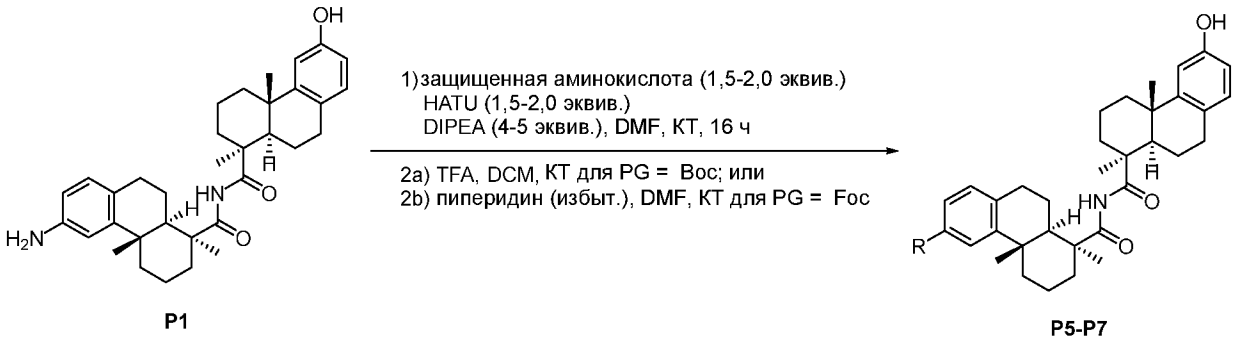
2-{1-[4-({[(5*R*)-5-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-5-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}этил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}пентил]карбамоил}метокси)-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}этан-1-сульфоновая кислота (LP18)



[0605] К раствору соединения **LP18-3** (30 мг, 22 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили раствор DIBAC-suc-PEG_4-OSu (**LP18-4**, 14 мг, 22 мкмоль) в DMF (1 мл) и DIPEA (4 мг, 32 мкмоль) последовательно при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили

соединение **LP18** (15 мг, выход 37%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 642 (M/3 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.68-9.27 (m, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.23-7.85 (m, 4H), 7.79-7.71 (m, 2H), 7.76-7.42 (m ,6H), 7.39-7.28 (m, 3H), 7.21 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.96-6.93 (m, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 6.63 (d, *J* = 2.4 Гц, 1H), 6.50 (dd, *J* = 8.4 Гц, 2.4 Гц, 1H), 5.02 (d, *J* = 14.0 Гц, 1H), 4.93-4.72 (m, 1H), 4.53-4.09 (m, 5H), 3.82-3.75 (m, 4H), 3.62-3.53 (m, 3H), 3.51-3.38 (m, 23H), 3.30-3.27 (m, 6H), 3.12-2.67 (m, 10H), 2.61-2.54 (m, 4H), 2.39-1.52 (m, 31H), 1.45-1.08 (m, 18H), 1.01-0.98 (m, 6H), 0.90-0.82 (m, 6H) ppm.

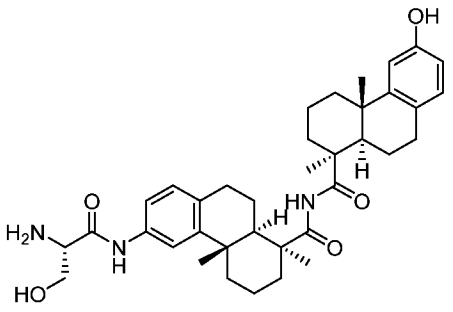
Пример 17. Синтез нагрузки P5, нагрузки P6 и нагрузки P7



Соед.	R	PG	Выход
P5	NHC(O)(*S*)-CH(CH_2OH)NH_2 (Ser)	Fmoc	51%
P6	NHC(O)(*S*)-CH(CH_2CH_2COOH)NH_2 (Glu)	tBu, Boc	46%
P7	NHC(O)(*S*)-CH($(CH_2)_4NH_2$)NH_2 (Lys)	Boc, Boc	49%

Нагрузка P5

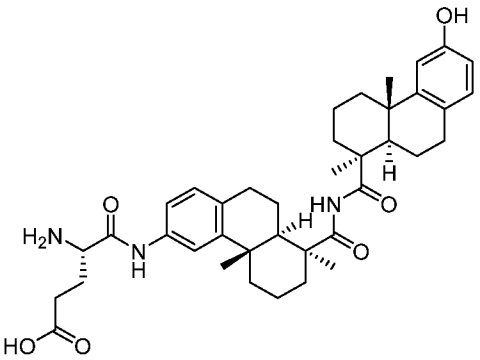
(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((*S*)-2-амино-3-гидроксипропанамидо)-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P5)



[0606] К раствору Fmoc-Ser-OH (33 мг, 0.1 ммоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (38 мг, 0.1 ммоль) и DIPEA (39 мг, 0.3 ммоль) при 25 °C. Полученную смесь перемешивали при данной температуре в течение 1 часа. Затем к смеси добавили **P1** (30 мг, 0.06 ммоль). После того, как реакционную смесь перемешивали при 25 °C в течение 16 часов и соединение **P1** было полностью израсходовано (под контролем ЖХМС), к смеси добавили пиперидин (0.2 мл) и перемешивали ее еще на протяжении 30 минут при комнатной температуре. Остаток очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили **P5** (18 мг, выход 51%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 616 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.74 (br s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.11 (s, 1H,), 7.58 (s, 1H), 7.41 (dd, J = 8.2, 2.0 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.82 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.3 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.2, 2.4 Гц, 1H), 4.82 (t, J = 5.5 Гц, 1H), 3.62-3.45 (m, 2H), 2.97-2.67 (m, 4H), 2.67-2.61 (m, 2H), 2.33-2.21 (m, 2H), 2.21-2.03 (m, 4H), 1.96-1.77 (m, 4H), 1.70-1.50 (m, 4H), 1.43-1.37 (m, 1H), 1.36-1.20 (m, 8H), 1.23-1.06 (m, 2H), 1.06-0.93 (m, 6H) ppm.

Нагрузка P6

(4*S*)-4-амино-4-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}бутановая кислота; трифторуксусной кислоты соль (P6)

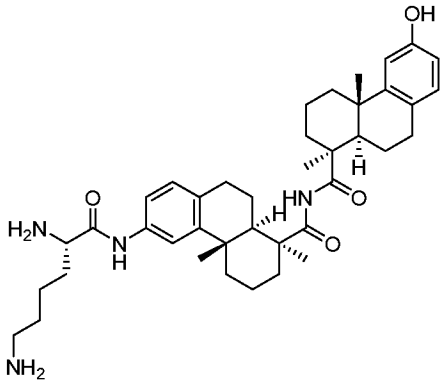


[0607] К раствору OtBu-*N*-Boc-Glu-OH (15 мг, 0.05 ммоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (19 мг, 0.05 ммоль) и DIPEA (13 мг, 0.1 ммоль) при 25 °C. Полученную смесь перемешивали при данной температуре в течение 1 часа. Затем к смеси добавили **P1** (14 мг, 0.026 ммоль). После перемешивания при 25 °C в течение 16 часов, когда соединение **P1** было полностью израсходовано (под контролем ЖХМС), реакционную смесь развели этилацетатом и промыли водой и рассолом. Органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток растворили в DCM (1 мл) и к раствору медленно добавили TFA (0.1 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили **P6** (8 мг,

выход 46%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 658.3 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 10.32 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.35 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 7.02 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.82 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.1 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.2, 2.3 Гц, 1H), 3.87 (t, J = 6.5 Гц, 1H), 2.97-2.67 (m, 4H), 2.41-2.22 (m, 4H), 2.22-2.08 (m, 4H), 2.05-1.97 (m, 2H), 1.94-1.80 (m, 4H), 1.69-1.52 (m, 4H), 1.42-1.22 (m, 8H), 1.22-1.06 (m, 2H), 1.02 (s, 3H), 0.99 (s, 3H) ppm. ^{19}F NMR (376 МГц, DMSO$_{d6}$) δ -73.50 ppm.

Нагрузка P7

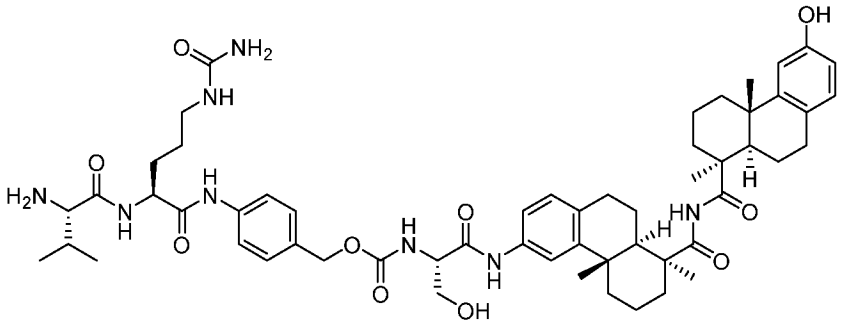
(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]-6-[(2*S*)-2,6-диаминогексанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид; трифторуксусной кислоты соль (P7)



[0608] К раствору Boc-Lys-OH (15 мг, 0.05 ммоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (19 мг, 0.05 ммоль) и DIPEA (13 мг, 0.1 ммоль) при 25 °C. Полученную смесь перемешивали при данной температуре в течение 1 часа. Затем к смеси добавили **P1** (15 мг, 0.028 ммоль). После перемешивания при 25 °C в течение 16 часов, когда соединение **P1** было полностью израсходовано (под контролем ЖХМС), реакционную смесь развели этилацетатом и промыли водой и рассолом. Органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток (**Boc-P7**) растворили в DCM (1 мл) и к раствору медленно добавили TFA (0.1 мл) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили **P7** (9 мг, выход 49%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 657.5 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 10.33 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.78 (br s, 6H), 7.51 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 7.02 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.82 (d, J = 8.6 Гц, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.51 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 3.82 (s, 1H), 2.89 (s, 1H), 2.82-2.67 (m, 5H), 2.29 (s, 2H), 2.15 (s, 4H), 1.85 (s, 6H), 1.64-1.51 (m, 6H), 1.28 (d, J = 6.8 Гц, 10H), 1.13 (s, 2H), 1.01 (s, 3H), 0.99 (s, 3H) ppm. ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO $_{d6}$) δ -73.53 ppm.

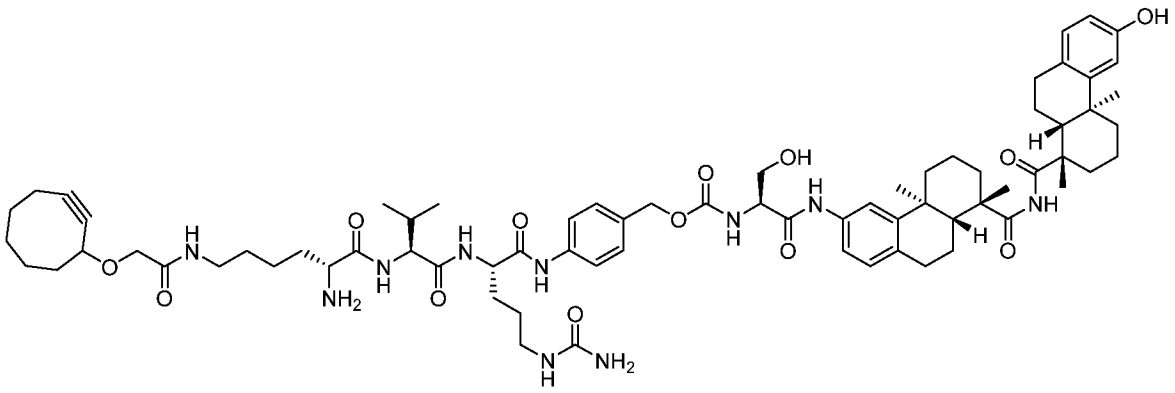
Пример 18. Синтез LP4 (ФИГ. 7)

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамат (LP4-2)



[0609] К раствору Fmoc-vc-PAB-PNP (**LP4-1**, 58 мг, 76 мкмоль) и **P5** (36 мг, 58 мкмоль) в DMF (3 мл) добавили HOBt (7.9 мг, 58 мкмоль) и DIPEA (15 мг, 0.12 ммоль) и смесь перемешивали при 30 °C в течение 16 часов. Соединение **P5** было полностью израсходовано согласно ЖХМС. К полученной смеси добавили диэтиламин (0.1 мл) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение часа до удаления Fmoc под контролем ЖХМС. После фильтрации реакционной смеси фильтрат очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **LP4-2** (36 мг, выход 48%) в виде светло-желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 1021 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.02 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.69-8.65 (m, 1H), 8.11-8.00 (m, 4H), 7.65-7.53 (m, 3H), 7.40-7.30 (m, 3H), 7.30-7.20 (m, 1H), 6.96 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.81 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.65-6.61 (m, 1H), 6.50 (dd, J = 8.0 Гц, 2.0 Гц, 1H), 6.00-5.95 (m, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.00-4.95 (m, 3H), 4.60-4.40 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 4H), 3.15-2.55 (m, 10H), 2.40-2.20 (m, 3H), 2.20-2.00 (m, 5H), 2.00-1.80 (m, 4H), 1.86-1.55 (m, 6H), 1.27 (d, J = 4.8 Гц, 9H), 1.20-1.10 (m, 2H), 0.97-0.90 (m, 6H) ppm.

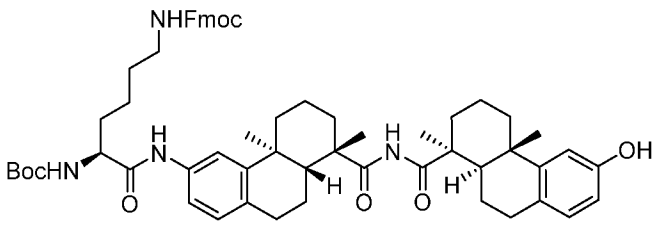
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамат (LP4)



[0610] К раствору соединения **LP4-3** (24 мг, 44 мкмоль) в DMF (2 мл) добавили HATU (17 мг, 44 мкмоль) и соединение **LP4-2** (35 мг, 34 мкмоль) последовательно при КТ. Смесь перемешивали в течение нескольких минут при комнатной температуре до тех пор, пока смесь не стала гомогенной. К данной смеси добавили DIPEA (8.8 мг, 68 мкмоль) при КТ при помощи шприца. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов до израсходования большей части **LP4-2** согласно ЖХМС. К данной реакционной смеси затем добавили диэтиламин или пиперидин (0.1 мл, избыт.) по каплям при КТ и смесь перемешивали в течение часа до удаления группы Fmoc под контролем ЖХМС. (Примечание: И диэтиламин, и пиперидин были одинаково эффективными.) Затем реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **LP4** (15 мг, выход 33%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1313.6 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 7.59 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.36-7.26 (m, 3H), 7.01 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.88 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.72-6.71 (m, 1H), 6.57-6.54 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.64-4.52 (m, 1H), 4.35-4.28 (m, 2H), 4.21 (d, J = 7.0 Гц, 1H), 4.01-3.98 (m, 1H), 3.88-3.84 (m, 3H), 3.43 (t, J = 6.5 Гц, 1H), 3.26-3.10 (m, 4H), 3.00-2.76 (m, 3H), 2.38-2.24 (m, 7H), 2.19-2.02 (m, 9H), 1.98-1.78 (m, 4H), 1.74-1.54 (m, 12H), 1.45-1.26 (m, 14H), 1.13 (s, 6H), 1.00 (t, J = 7.5 Гц, 6H) ppm.

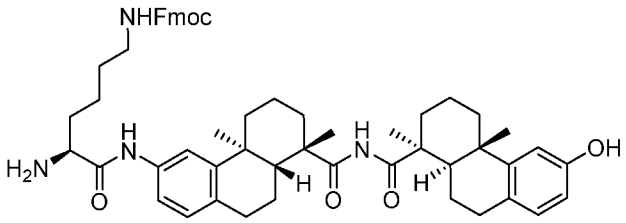
Пример 19. Синтез LP11 (ФИГ. 8)

***трет*-Бутил *N*-[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10, 10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-5-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}пентил] карбамат (LP11-1)**



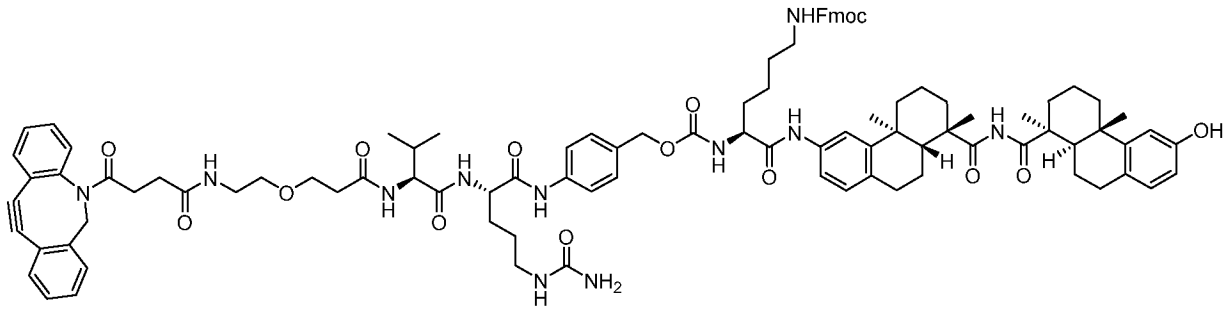
[0611] К раствору *N*-Boc-*N'*-Fmoc-*L*-Лизина (0.21 г, 0.45 ммоль) в DMF (2 мл) добавили HATU (0.24 г, 0.64 ммоль) и DIPEA (0.15 г, 1.1 ммоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 3 минут. Затем к смеси добавили нагрузку **P1** (0.20 г, 0.38 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 15 минут до завершения реакции под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали и очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **LP11-1** (0.10 г, выход 27%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 979 $(M + 1)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(5*S*)-5-амино-5-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}пентил]карбамат (LP11-2)



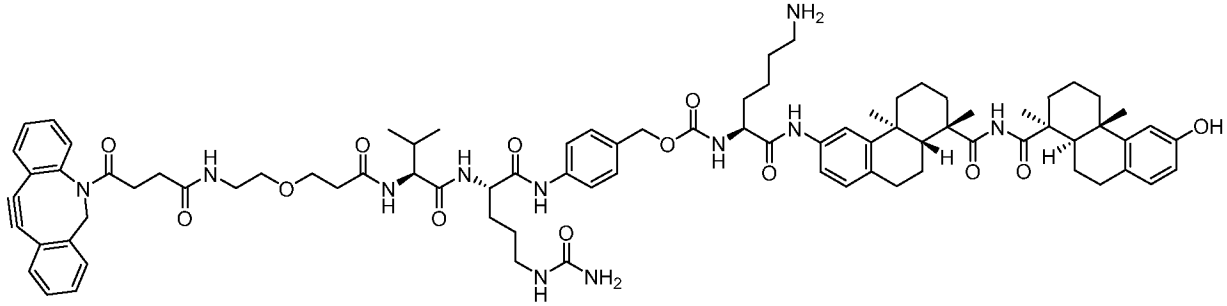
[0612] К раствору соединения **LP11-1** (0.10 г, 0.10 ммоль) в DCM добавили TFA (2 мл) при КТ. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение часа до полного удаления Boc согласно ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo*. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате натрия (10 мМ)) и получили соединение **LP11-2** (77 мг, выход 86%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 879 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.87-9.52 (m, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.92-7.81 (m, 2H), 7.71-7.48 (m, 3H), 7.44-7.22 (m, 6H), 7.00-6.90 (m, 1H), 6.82 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.66-6.60 (m, 1H), 6.54-6.47 (m, 1H), 4.38-4.14 (m, 3H), 3.27-3.17 (m, 1H), 3.01-2.93 (m, 2H), 2.90-2.66 (m, 4H), 2.33-2.06 (m, 7H), 1.94-1.78 (m, 4H), 1.67-1.51 (m, 5H), 1.48-1.07 (m, 16H), 1.03-0.92 (m, 6H) ppm.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-5-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}пентил]карбамат (LP11-3)



[0613] К смеси соединения **LP11-2** (57 мг, 65 мкмоль) и соединения **LP9-5** (0.10 г, 96 мкмоль) в DMF (3 мл) добавили HOBt (30 мг, 0.22 ммоль) и DIPEA (0.11 г, 0.81 ммоль) и смесь перемешивали при КТ в течение часа под контролем ЖХМС. Реакционную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили соединение **LP11-3** (97 мг, выход 81%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 909 $(M/2 + 1)^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-[(1*S*)-5-амино-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}пентил]карбамат (LP11)

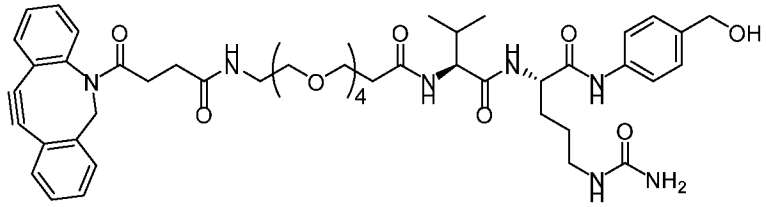


[0614] К раствору соединения **LP11-3** (97 мг, 53 мкмоль) в DMF (3 мл) добавили диэтиламин (45 мг, 0.62 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP11** (40 мг, выход 47%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 798 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.99 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.21-8.10 (m, 2H), 7.88 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 7.82-7.59 (m, 6H), 7.55-7.43 (m, 5H), 7.41-7.29 (m, 5H), 6.98 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.84 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.53 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 6.06-5.96 (m, 1H), 5.50-5.38 (m, 2H), 5.09-4.92 (m, 3H), 4.45-4.35 (m, 1H), 4.28-4.21 (m, 1H), 4.14-4.04 (m, 1H), 3.67-3.58 (m, 4H), 3.52-3.45 (m, 13H), 3.14-2.69

(m, 9H), 2.63-2.56 (m, 1H), 2.50-2.44 (m, 1H), 2.43-2.37 (m, 1H), 2.33-2.13 (m, 7H), 2.06-1.85 (m, 6H), 1.82-1.56 (m, 9H), 1.51-1.23 (m, 17H), 1.21-1.13 (m, 2H), 1.10-0.80 (m, 12H) ppm.

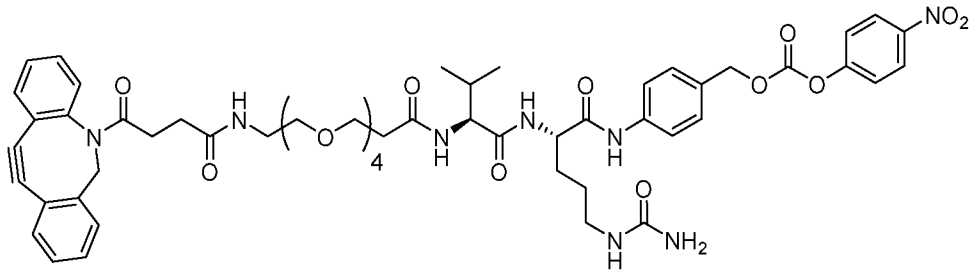
Пример 20. Синтез LP9 (ФИГ. 9)

1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP9-3)



[0615] К раствору соединения **LP9-2** (0.30 г, 0.54 ммоль) в DMF (10 мл) добавили HATU (0.31 г, 0.81 ммоль) и DIPEA (0.14 г, 1.1 ммоль) последовательно при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. К реакционной смеси добавили VC-PAB-OH (**LP9-1**, CAS: 159857-79-1, 0.21 г, 0.54 ммоль) при КТ и полученную смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до израсходования **LP9-2** под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбоната аммония)) и получили соединение **LP9-2** (0.30 г, выход 60%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 617 $(M + H)^+$.

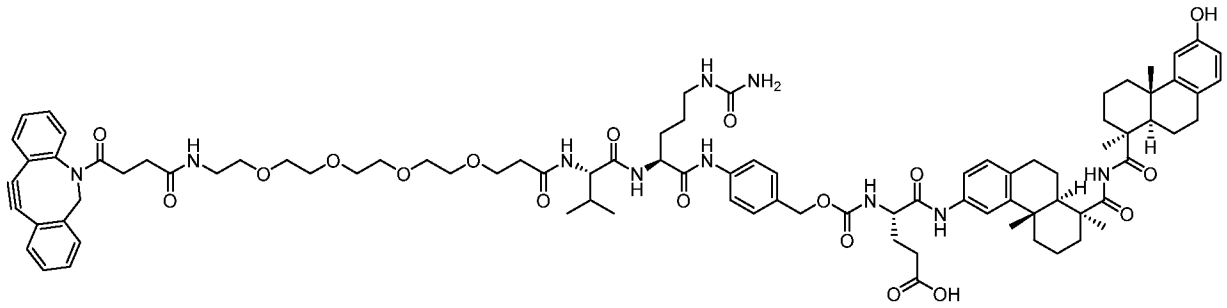
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил 4-нитрофенил карбонат (LP9-5)



[0616] К раствору соединения **LP9-3** (0.15 г, 0.16 ммоль) в DMF (10 мл) добавили бис(4-нитрофенил) карбонат (**LP9-4**, 0.15 г, 0.49 ммоль) и DIPEA (63 мг, 0.49 ммоль) последовательно при 0 °C. Затем смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до почти

полного израсходования **LP9-3** под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбоната аммония)) и получили соединение **LP9-5** (50 мг, выход 28%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1079 $(M + H)^+$.

(4*S*)-4-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}бутановая кислота (LP9)



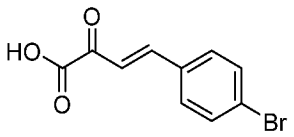
[0617] К смеси соединения **P6** (50 мг, 76 мкмоль) и соединения **LP9-5** (0.10 г, 96 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили HOBt (16 мг, 0.12 ммоль) и DIPEA (39 мг, 0.31 ммоль) и смесь перемешивали при КТ в течение часа под контролем ЖХМС. Реакционную смесь очистили посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP9** (40 мг, выход 33%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 799 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.02 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.20-8.07 (m, 2H), 7.94-7.87 (m, 1H), 7.82-7.76 (m, 1H), 7.70-7.57 (m, 4H), 7.54-7.42 (m, 4H), 7.40-7.26 (m, 6H), 6.99-6.91 (m, 1H), 6.85-6.79 (m, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.53-6.47 (m, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.07-4.88 (m, 3H), 4.42-4.32 (m, 1H), 4.27-4.20 (m, 1H), 4.11-4.02 (m, 1H), 3.63-3.55 (m, 3H), 3.51-3.41 (m, 13H), 3.11-2.58 (m, 10H), 2.40-2.10 (m, 11H), 2.00-1.55 (m, 15H), 1.46-1.09 (m, 14H), 1.05-0.94 (m, 6H), 0.99-0.77 (m, 7H) ppm.

Пример 21. Синтез нагрузки P9 и линкер-нагрузки LP12 (ФИГ. 10)

Нагрузка P9

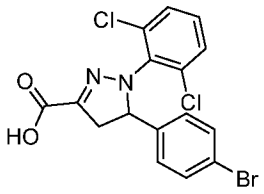
[0618] Синтез нагрузки P9 основан, как минимум, частично, на документе US 2015/0291563A1, который включается сюда полностью посредством ссылки.

4-(4-Бромофенил)-2-оксобут-3-еноевая кислота (P9-3)



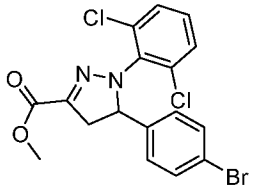
[0619] К раствору 4-бромобензальдегида **P9-2** (5.5 г, 30 ммоль) и пировиноградной кислоты **P9-1** (2.8 г, 32 ммоль) в метаноле (100 мл) добавили раствор гидроксида калия (2.5 г, 45 ммоль) в метаноле (100 мл) при 0 °C. Осадок выпал при добавлении основания, и смеси дали достичь КТ в течение часа. Смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов и затем сконцентрировали *in vacuo* для удаления летучих веществ. Остаток разбавили водой (200 мл) и окислили вод. HCl (1 M) до pH 3. Смесь экстрагировали этилацетатом (100 мл x 3). Объединенный органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo* и получили соединение **P9-3** (7.1 г, выход 93%) в виде вязкого масла. ИЭР м/з: 255 $(M + 1)^+$.

5-(4-Бромофенил)-1-(2,6-дихлорофенил)-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-3-карбоновая кислота (P9-5)



[0620] Смесь соединения **P9-3** (5.1 г, 20 ммоль) и (2,6-дихлорофенил)гидразин гидрохлорида **P9-4** (4.1 г, 20 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (100 мл) дефлегмировали в атмосфере азота в течение 4 часов. После охлаждения до 25 °C реакционную смесь налили в ледяную воду, при этом получили вязкую массу, которую экстрагировали DCM. Объединенные органические растворы промыли водой, высушили сульфатом натрия и сконцентрировали. Остаток высушили в воздухе и получили соединение **P9-5** (5.4 г, выход 65%) в виде светло-желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 413 $(M + 1)^+$.

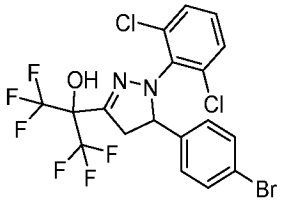
Метил 5-(4-бромофенил)-1-(2,6-дихлорофенил)-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-3-карбоксилат (P9-6)



[0621] К раствору соединения **P9-5** (8.2 г, 20 ммоль) в метаноле (200 мл) добавили серную кислоту (0.5 мл) по каплям. Смесь дефлегмировали в течение 4 часов под

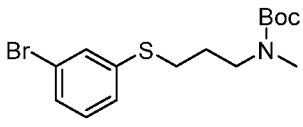
контролем ЖХМС. Реакционную смесь охладили до КТ и летучие вещества удалили *in vacuo*. Остаток экстрагировали этилацетатом (300 мл) и затем промыли нас. вод. хлоридом аммония и водой. Органический слой высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (этилацетат/n-гексан = 1/4) и получили соединение **P9-6** (2.1 г, выход 25%) в виде желтого масла. ИЭР м/з 429 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 7.50-7.45 (m, 4H), 7.35-7.25 (m, 3H), 5.70-5.52 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 1.75-1.65 (m, 1H), 3.32-3.24 (m, 1H) ppm.

2-(5-(4-Бромофенил)-1-(2,6-дихлорфенил)-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-3-ил)-1,1,1,3,3,3-гексафторпропан-2-ол (P9-7)



[0622] К смеси соединения P9-6 (0.49 г, 1.2 ммоль) в толуоле (20 мл) медленно добавили (трифторметил)триметилсилан (0.68 мл, 4.6 ммоль), 4 Å молекулярные сита (100 мг) и TBAF (1 M в THF, 4.6 мл) в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали при 46°C в течение 16 часов. Полученную смесь отфильтровали через целитовую прокладку и фильтрат развели DCM. Раствор промыли дистиллированной водой и рассолом, высушили над безводным сульфатом магния и сконцентрировали *in vacuo*. Желтый остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (этилацетат/n-гексан = 1/8) и получили соединение P9-7 (0.15 г, выход 25%) в виде коричневого масла. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.43-7.38 (m, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.22-7.17 (m, 2H), 7.12-7.06 (m, 1H), 5.75-5.95 (m, 1H), 4.88 (s, 1H), 3.65-3.55 (m, 1H), 3.26-3.16 (m, 1H) ppm.

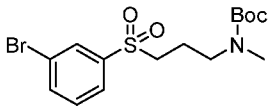
***трет*-Бутил 3-(3-бромофенилтио)пропил(метил)карбамат (P9-11)**



[0623] К раствору трет-бутил 3-гидроксипропил(метил)карбамата **P9-8** (1.9 г, 10 ммоль) в пиридине (5 мл) добавили тозилхлорид (2.1 г, 11 ммоль) по каплям при 0 °C. Смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Смесь сконцентрировали *in vacuo* , чтобы удалить пиридин, и получили сырой продукт **P9-9** (ИЭР м/з: 244 (M – Boc + 1)$^+$), который растворили в ацетонитриле (100 мл). К раствору добавили 3-бромбензолтиол **P9-10** (1.9 г, 10 ммоль) и карбонат цезия (6.5 г, 20 ммоль). Смесь дефлегмировали в течение 4 часов под контролем ЖХМС. После охлаждения до КТ

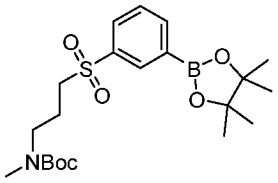
реакционную смесь отфильтровали и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (8-10% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P9-11** (2.2 г, выход 61%) в виде светло-желтого масла. ИЭР м/з: 260 (M – Boc + 1)$^+$.

***трет*-Бутил 3-(3-бромфенилсульфонил)пропил(метил)карбамат (P9-12)**



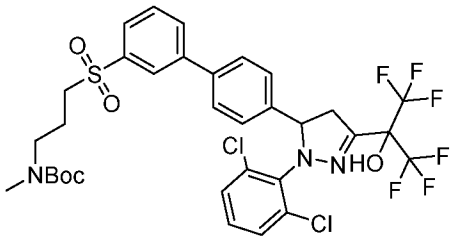
[0624] К раствору соединения **P9-11** (0.36 г, 1.0 ммоль) в DCM (20 мл) добавили mCPBA (1.0 г, 0.4 ммоль) медленно при 0 °C. Смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Реакционную смесь промыли нас. вод. карбонатом натрия (20 мл x 3) и рассолом. Органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Сырой продукт очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (8-10% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P9-12** (0.22 г, выход 56%) в виде светло-желтого масла. ИЭР м/з: 294 (M – Boc + 1)$^+$.

***трет*-Бутил метил(3-(3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенилсульфонил)пропил)карбамат (P9-13)**



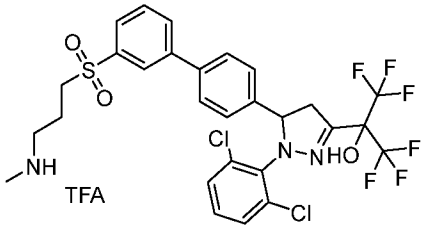
[0625] К раствору соединения P9-12 (0.20 г, 0.51 ммоль) в 1,4-диоксане (20 мл) добавили бис(пинаколато)диборон (0.26 г, 1.0 ммоль), $Pd(dppf)Cl_2$ (37 мг, 0.051 ммоль) и ацетат калия (0.20 г, 2.0 ммоль) в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при 80 °C в течение 16 часов в атмосфере азота. После охлаждения до КТ смесь отфильтровали через целитную прокладку. К фильтрату добавили дистиллированную воду и смесь экстрагировали диэтилэфиром трижды. Объединенные экстракты промыли дистиллированной водой и рассолом, высушили над безводным сульфатом магния и сконцентрировали *in vacuo* и получили желтый жидкий остаток. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (8-10% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P9-13** (0.20 г, выход 87%) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 340 (M – Boc + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.10 (s, 1H), 8.05-8.0 (m, 2H), 7.70 (t, J =7.5 Гц, 1H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.20-3.14 (m, 2H), 2.70 (s, 3H), 1.75-1.67 (m, 2H), 1.32 (s, 9H), 1.16 (s, 12H) ppm.

***трет*-Бутил 3-(4'-(1-(2,6-дихлорфенил)-3-(1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-гидроксипропан-2-ил)-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-5-ил)бифенил-3-илсульфонил)пропил(метил)карбамат (P9-14)**



[0626] К смеси соединения **P9-13** (0.20 г, 0.51 ммоль) и соединения **P9-7** (0.27 г, 0.51 ммоль) в 1,4-диоксане (20 мл) и воде (3 мл) добавили $Pd(dppf)Cl_2$ (37 мг, 0.051 ммоль) и карбонат калия (0.28 г, 2.0 ммоль) под защитой азота. Для реакционной смеси выполнили газообмен азотом 3 раза и перемешивали ее при 80°C в атмосфере азота в течение 16 часов. После охлаждения до КТ реакционную смесь отфильтровали через целитную прокладку. Фильтрат развели дистиллированной водой и экстрагировали диэтилэфиром трижды. Объединенные экстракты промыли дистиллированной водой и рассолом, высушили над безводным сульфатом магния и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (8-10% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P9-14** (0.33 г, выход 84%) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 667 $(M - Boc + 1)^+$.

2-(1-(2,6-Дихлорфенил)-5-(3'-(3-(метиламино)пропилсульфонил)бифенил-4-ил)-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-3-ил)-1,1,1,3,3,3-гексафторпропан-2-ол, трифторуксусной кислоты соль (P9)

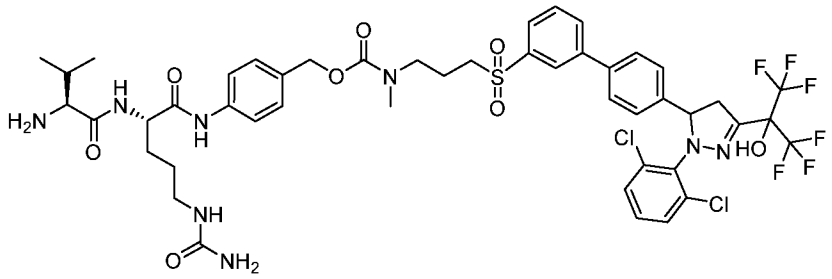


[0627] К раствору соединения **P9-14** (0.20 г, 0.26 ммоль) в DCM (10 мл) добавили TFA (3 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении часа под контролем ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo*. Полученный желтый остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **P9** (55 мг, выход 32% в виде соли TFA) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 667 $(M + 1)^+$. ^1H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.77 (s, 1H), 8.34 (s, 2H), 8.10-8.00 (m, 2H), 7.90-7.83 (m, 1H), 7.80-7.77 (m, 3H), 7.50-7.40 (m, 4H), 7.30-7.20 (m, 1H), 5.58 (t, J = 10.4 Гц, 1H), 3.80-3.66 (m, 1H), 3.52 (t, J =

8.0 Гц, 2H), 3.26-3.18 (m, 1H), 3.00-2.90 (m, 2H), 2.56-2.52(m, 3H), 1.92-1.82 (m, 2H) ppm. (H от TFA не обнаружили).

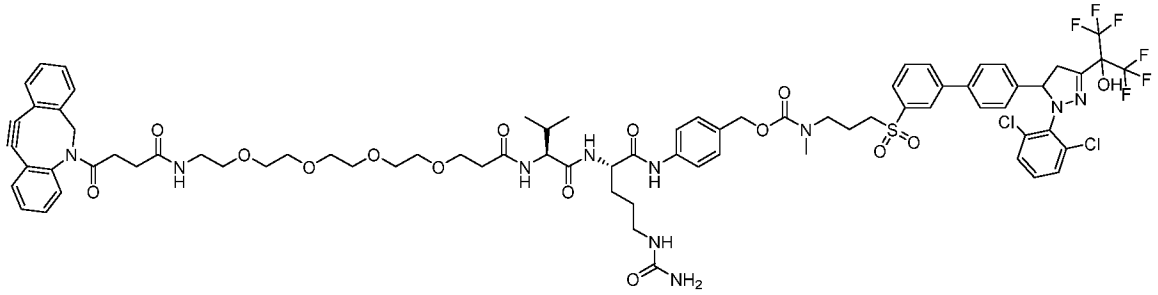
Линкер-нагрузка LP12

4-((*S*)-2-((*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил 3-(4'-(1-(2,6-дихлорфенил)-3-(1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-гидроксипропан-2-ил)-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-5-ил)бифенил-3-илсульфонил)пропил(метил)карбамат (LP12-2)



[0628] К раствору соединения **P9** (50 мг, 0.075 ммоль) в DMF (5 мл) добавили Fmoc-VC-PAB-PNP **P12-1** (63 мг, 0.083 ммоль), DIPEA (19 мг, 0.15 ммоль) и HOBt (15 мг, 0.11 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (1 мл, избыт.). Смесь перемешивали при КТ в течение часа до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Смесь очистили напрямую посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-50% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили соединение **LP12-2** (48 мг, выход 60%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1073 $(M + 1)^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-[3-(3-{4-[1-(2,6-дихлорфенил)-3-(1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-гидроксипропан-2-ил)-4,5-дигидро-1*H*-пиразол-5-ил]фенил}бензолсульфонил)пропил]-*N*-метилкарбамат (LP12)



[0629] К раствору DIBAC-PEG4-кислоты **LP12-3** (18 мг, 32 мкмоль) в DMF (5 мл) добавили HATU (15 мг, 39 мкмоль) и DIPEA (14 мг, 0.11 ммоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 30 минут. Затем к смеси добавили **LP12-2** (29 мг, 27

мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение часа до завершения реакции под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали и очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили **LP12** (25 мг, выход 58%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 805 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.99 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.13 (d, J = 7.5 Гц, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.03 (d, J = 7.0 Гц, 1H), 7.90-7.80 (m, 2H), 7.80-7.65 (m, 5H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.60-7.52 (m, 2H), 7.52-7.43 (m, 5H), 7.43-7.39 (m, 2H), 7.39-7.31 (m, 2H), 7.31-7.20 (m, 4H), 5.98 (t, J = 5.5 Гц, 1H), 5.57 (t, J = 10.5 Гц, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.03 (d, J = 14.0Гц, 1H), 5.0-4.90 (m, 2H), 4.43-4.34 (m, 1H), 4.23 (t, J = 7.0 Гц, 1H), 3.75-3.65 (m, 1H), 3.65-3.53 (m, 3H), 3.53-3.40 (m, 12H), 3.32-3.20 (m, 6H), 3.10-3.05 (m, 2H), 3.05-3.00 (m, 1H), 3.00-2.90 (m, 1H), 2.80-2.70 (m, 3H), 2.60-2.53 (m, 1H), 2.49-2.42 (m, 1H), 2.40-2.30 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 1H), 2.04-1.90 (m, 2H), 1.80-1.65 (m, 4H), 1.65-1.50 (m, 1H), 1.50-1.30 (m, 2H), 1.23 (s, 1H), 0.90-0.80 (m, 6H) ppm.

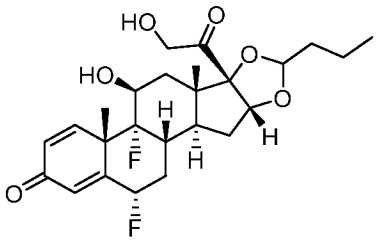
Пример 22. Синтез нагрузки P3 и нагрузки P4 (ФИГ. 11)

[0630] Данный пример относится к ФИГ. 11. Приготовили определенные стероидные нагрузки, начиная с коммерческого флуоцинолон ацетонида **P3-1** (CAS: 67-73-2). Соединение **P3-2**, полученное от **P3-1** посредством кеталь-обмена с бутиральдегидом в присутствии перхлорной кислоты, преобразовали в мезилат **P3-3** с последующей заменой мезилатной группы азидным компонентом, в результате чего образовалось соединение **P4-4**, которое восстановили до амина **P4**. В другом случае мезилатный компонент в **P3-3** также заменили 4-амино-фенолом и получили анилин **P3**.

[0631]

Нагрузка P3

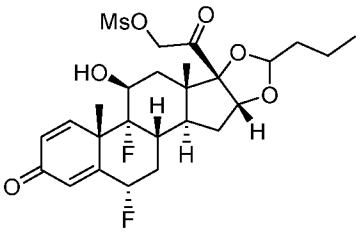
(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-8-(2-гидроксиацетил)-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он (P3-2)



[0632] К смеси флуоцинолон ацетонида (**P3-1**, 0.90 г, 2.0 ммоль) и силикагеля (18 г) в гептанах (90 мл) добавили бутиральдегид (0.27 мл, 3.0 ммоль) при 10°C и суспензию перемешивали при 10-20°C в течение 10 минут. К смеси добавили перхлорную кислоту (70%, 0.68 мл, 8.3 ммоль) по каплям при 0°C. Затем реакционную смесь перемешивали

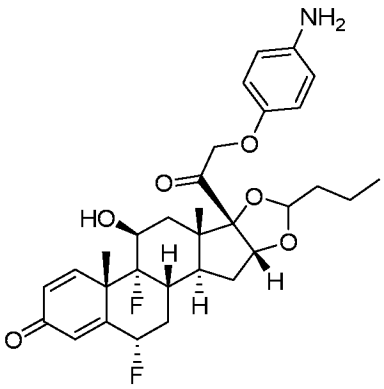
при 10-20 °C на протяжении ночи. Большая часть флуоцинолон ацетонида **P3-1** была израсходована согласно ТСХ и ЖХМС. Реакционную смесь развели петролейным эфиром и погасили нас. вод. Na_2CO_3. Суспензию отфильтровали и твердое вещество промыли DCM/метанолом (об./об. = 1). Объединенный фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством флэш-хроматографии с силикагелем (0-100% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P3-2** (0.15 г, выход 16%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 467.1 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил метансульфонат (P3-3)



[0633] К раствору соединения **P3-2** (0.28 г, 0.65 ммоль)) и триэтиламина (0.13 г, 1.3 ммоль) в DCM (3 мл) добавили метансульфонилхлорид (89 мг, 0.78 ммоль) при 0 °C. После перемешивания при 0 °C в течение 0.5 ч реакционную смесь развели DCM (20 мл). Смесь промыли H_2O (20 мл×2), высушили над безводным Na_2SO_4, отфильтровали и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (0-50% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **P3-3** (0.26 г, выход >99%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 545 $(M + H)^+$.

(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-[2-(4-аминофенокси)ацетил]-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он (P3)

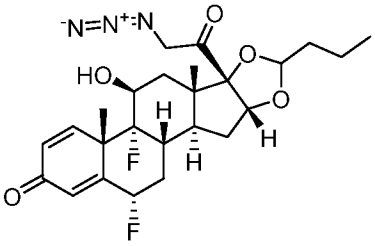


[0634] Смесь соединения **P3-3** (93 мг, 0.17 ммоль), 4-аминофенола (37 мг, 0.34 ммоль) и карбоната цезия (0.11 г, 0.34 ммоль) в ацетоне (0.5 мл) дефлегмировали в течение 2

часов. Смесь охладили до КТ и развели H_2O (10 мл). Смесь экстрагировали этилацетатом (10 мл×3). Объединенный органический слой промыли водой (20 мл) и рассолом (20 мл), высушили над Na_2SO_4, отфильтровали и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ и получили нагрузку **P3** (6.0 мг, выход 6.3%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 298 (M/2 + H)$^+$, 558 (M + H)$^+$ (10%). ^{1}H ЯМР (500 МГц, $MeOD_{d4}$) δ 7.34 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 6.78-6.71 (m, 4H), 6.37-6.33 (m, 2H), 5.63-5.49 (m, 1H), 5.10-4.99 (m, 1H), 4.77-4.63 (m, 2H), 4.33 (d, J = 9.1 Гц, 1H), 2.74-2.57 (m, 1H), 2.39-2.13 (m, 3H), 1.98-1.31 (m, 12H), 1.03-0.93 (m, 6H) ppm. *Анал.* ВЭЖХ: чистота 97.4%, Время удерживания: 7.55 мин (способ B).

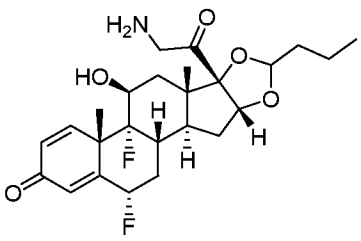
Нагрузка P4

(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-(2-Азидоацетил)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он (P4-4)



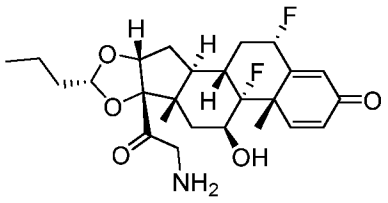
[0635] Суспензию соединения **P3-3** (1.0 г, 1.8 ммоль) и азида натрия (1.2 г, 18 ммоль) в ацетоне (15 мл) перемешивали при 50 °C на протяжении ночи. Смесь охладили до КТ и налили в воду (80 мл). Водную смесь экстрагировали этилацетатом (50 мл x 3). Объединенный органический слой промыли рассолом (30 мл), высушили над безводным Na_2SO_4, отфильтровали и сконцентрировали *in vacuo* и получили сырое предшествующее соединение азидо **P4-4** (0.90 г, выход > 99%) в виде желтого твердого вещества, которое использовали для следующего этапа без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 492 (M + H)$^+$.

(1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-(2-аминоацетил)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он; трифторуксусной кислоты соль (P4)

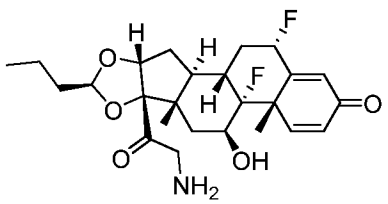


[0636] К раствору соединения **P4-4** (0.85 г, 1.7 ммоль) в THF (20 мл) добавили вод. гидрохлорид (1 H, 10 мл). Смесь перемешивали при 28-32 °C до тех пор, пока она не стала прозрачной, затем к смеси добавили трифенилфосфин (0.68 г, 2.6 ммоль). Полученный желтый прозрачный раствор перемешивали при КТ в течение 18 ч. Смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-50% ацетонитрил в вод. TFA (0.05%)) и получили соединение **P4 (*R/S*)** (0.56 г, выход 57%, соль TFA) в виде грязно-белого твердого вещества. ИЭР м/з: 466 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $MeOD_{d4}$) δ 7.33 (d, J = 9.9 Гц, 1H), 6.40-6.29 (m, 2H), 5.69-5.45 (m, 1H), 4.93-4.92 (m, 1H), 4.71 (t, J = 4.3 Гц, 1H), 4.35-4.27 (m, 2H), 3.90-3.84 (m, 1H), 2.81-2.54 (m, 1H), 2.42-2.06 (m, 3H), 1.82-1.32 (m, 11H), 1.09-0.87 (m, 6H) ppm. ^{19}F NMR (376 МГц, CD_3OD) δ -77.01, -166.24, -166.92, -188.81, -188.83 ppm. *Анал.* ВЭЖХ: 100%, Время удерживания: 6.86 мин (способ A).

[0637] Нагрузку **P4** необязательно подвергают хиральному разделению посредством ВЭЖХ и/или сверхкритической жидкостной хроматографии (СЖХ). Стереохимически чистые эпимеры **P4,** т.е. **P4-1 (*R*)** и **P4-2 (*S*)**, или их обогащенные смеси, **P4-3**, получили посредством хирального разделения из смеси их соответствующих ***R/S*** изомеров. Абсолютную стереохимию для каждого соединения определили посредством 2D–*NOESY*. Приводится ссылка на публикацию заявки США под номером US 2018/0155389, которая показывает, что в 2D–NOESY спектрах для соединений **11-*5R/S*** в этой заявке, H^{22} и H^{18} были коррелированы для соединения **11-*5R*** и что в **11-*5S*** между H^{22} и H^{18} корреляции не было. Посредством аналогичного анализа, описанного в US 2018/0155389 для соединений **11-*5R/S***, хиральные центры в C^{22}–положении определяются для соединений **P4-1 и P4-2** в настоящем документе посредством 2D–NOESY.



P4-1 (R-изомер)



P4-2 (S-изомер)

P4-3: R:S 3:1 to 4:1

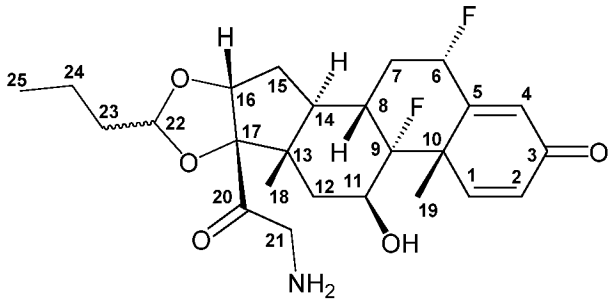
Вариант синтеза (1*S*,2*S*,4*R*,6*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-8-(2-аминоацетил)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он; трифторуксусной кислоты соль P4-1 (*R*)

[0638] **Этап 1**: При помощи той же процедуры, которая описана выше, предшествующее соединение азидо P4-4 (***R***) (0.12 г, выход 87%) получили от соединения (**P3-3*R***) в виде белого твердого вещества после очистки посредством флэш-хроматографии (0-50% этилацетат в петролейном эфире). ИЭР м/з: 492 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7.10 (dd, J = 10.2, 1.3 Гц, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.38 (dd, J = 10.2, 1.8 Гц, 1H), 5.48-5.31 (m, 1H), 4.92 (d, J = 5.4 Гц, 1H), 4.62 (t, J = 4.4 Гц, 1H), 4.43 (dd, J = 5.6, 2.7 Гц, 1H), 4.22 (d, J = 18.7 Гц, 1H), 3.94 (d, J = 18.7 Гц, 1H), 2.56-2.39 (m, 2H), 2.32-2.18 (m, 2H), 1.85-1.71 (m, 3H), 1.67-1.54 (m, 7H), 1.46-1.37 (m, 2H), 0.97-0.90 (m, 6H) ppm.

[0639] **Этап 2:** При помощи той же процедуры, которая описана выше, соединение **P4-1** (***R***) (30 мг, выход 66%) получили в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (способ A). ИЭР м/з: 466 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $MeOD_{d4}$) δ 7.34 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 6.40-6.30 (m, 2H), 5.65-5.46 (m, 1H), 4.94-4.91 (m, 1H), 4.72 (t, J = 4.3 Гц, 1H), 4.34-4.28 (m, 2H), 3.88 (d, J = 18.8 Гц, 1H), 2.78-2.60 (m, 1H), 2.39-2.34 (m, 1H), 2.33-2.18 (m, 2H), 1.77-1.54 (m, 9H), 1.53-1.40 (m, 2H), 0.99-0.95 (m, 6H) ppm. *Анал.* ВЭЖХ: 100%, Время удерживания: 6.85 мин (способ A).

[0640] **P4-2** (***S***) получают посредством похожей процедуры.

[0641] В нижеприведенной Таблице сравниваются химические сдвиги ^{1}H ЯМР (ppm в *d6*-DMSO) ***R*-P4** (**P4-1** в настоящем документе) и ***S*-P4** (**P4-2** в настоящем документе), выделенные посредством СЖХ **P4** (***R*/*S***).



Протон №	**P4 (rac-) в DMSO-d6**	**P4-1 *(R)* в DMSO-d6**	**P4-2 *(S)*-в DMSO-d6**
	8.14 (s, 3H)	8.14 (s, 3H)	8.12 (brs, 3H),
C^1-H	7.31 (d, J = 10.2 Гц, 1H)	7.30 (d, J = 10.0 Гц, 1H)	7.30 (d, J = 10.0 Гц, 1H),
C^2-H	6.31 (dd, J = 10.1 Гц, 1.6 Гц, 1H)	6.31 (dd, J = 10.0 Гц, 1.6 Гц, 1H)	6.30 (dd, J = 1.6 Гц, 10.0 Гц, 1H),
C^4-H	6.11 (s, 1H)	6.11 (s, 1H)	6.11 (s, 1H),
C^6-H	5.71-5.54 (m, 1H)	5.71-5.55 (m, 1H)	5.71-5.54 (m, 1H),
C^7-H_2	2.28-2.26 (m, 1H),	2.28-2.26 (m, 1H),	2.25-2.22 (m, 1H),

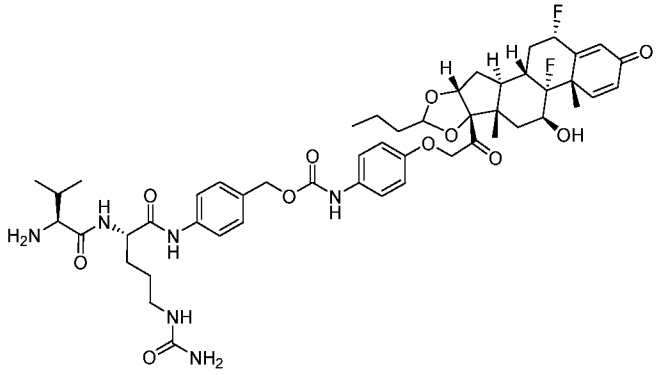
Протон №	**P4 (rac-) в DMSO-d6**	**P4-1 *(R)* в DMSO-d6**	**P4-2 *(S)*-в DMSO-d6**
	1.68-1.56 (m, 1H)	1.68-1.56 (m, 1H)	1.72-1.52 (m, 1H)
C^{8}-H	1.87-1.79 (m, 1H)	1.44-1.31 (m, 1H)	1.87-1.79 (m, 1H)
C^{11}-H	4.18 (m, 1H)	4.22 (m, 1H)	4.18 (m, 1H)
C^{12}-H_2	2.09-2.01 (m, 1H), 1.68-1.56 (m, 1H)	2.09-2.01 (m, 1H), 1.68-1.56 (m, 1H)	2.03-1.97 (m, 1H), 1.72-1.52 (m, 1H)
C^{14}-H	2.09-2.01 (m, 1H)	2.09-2.01 (m, 1H)	2.03-1.97 (m, 1H)
C^{15}-H_2	2.67-2.50 (m, 1H), 1.68-1.56 (m, 1H)	2.67-2.50 (m, 1H), 1.68-1.56 (m, 1H)	2.58-2.53 (m, 1H), 1.72-1.52 (m, 1H)
C^{16}-H	4.78 (m, 0.6H) 5.15 (d, J=7.6 Гц, 0.4 H),	4.78 (m, 1H)	5.15 (d, J=7.6 Гц, 1 H)
C^{18}-H_3	0.85 (s, 3H)	0.85 (s, 3H)	0.91 (s, 3H)
C^{19}-H_3	1.48 (s, 3H)	1.48 (s, 3H)	1.48 (s, 3H)
C^{21}-H_2	4.20 (m, 1H), 3.77 (m, 1H)	4.20 (d, J=19 Гц, 1H), 3.77 (d, J=19 Гц, 1H)	4.15 (d, J=19 Гц, 1H), 3.74 (d, J=19 Гц, 1H)
C^{22}-H	4.67 (t, *J* = 4.4 Гц, 0.6H) 5.22 (t, J=4.8 Гц, , 0.4H),	4.67 (t, *J* = 4.4 Гц, 1H)	5.22 (t, J=4.8 Гц, , 1H)
C^{23}-H_2	1.68-1.56 (m, 2H)	1.68-1.56 (m, 2H)	1.48 (m, 2H)
C^{24}-H_2	1.44-1.31 (m, 2H)	1.44-1.31 (m, 2H)	1.34-1.28 (m, 1H)
C^{25}-H_3	0.87 (t, J=7.2 Гц, 3H)	0.87 (t, J=7.2 Гц, 3H)	0.88 (t, J=7.6 Гц, 3 H)

***S*-изомер:** ИЭР м/з: 522 $(M+H)^+$; хиральная СЖХ (CC4): 99.5 d.e.%; ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) *δ* 7.21 (d, *J* = 10.1 Гц, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.8 Гц, 2H), 6.63 (d, *J* = 8.8 Гц, 2H), 6.24 (dd, *J* = 10.1, 1.6 Гц, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.20 (d, *J* = 6.8 Гц, 1H), 5.18 (t, *J* = 4.8 Гц, 1H), 4.99 (d, *J* = -17.9 Гц, 1H), 4.61 (d, *J* = -17.9 Гц, 1H), 4.43 (s, 1H), 3.46 (s, 2H), 2.57 (td, *J* = 13.2, 4.4 Гц, 1H), 2.34 (dd, *J* = 13.4, 3.2 Гц, 1H), 2.16-2.01 (m, 4H), 1.85-1.68 (m, 3H), 1.59-1.49 (m, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.44-1.26 (m, 2H), 1.18-1.09 (m, 2H), 1.00 (s, 3H), 0.91 (t, *J* = 7.3 Гц, 3H) ppm.

***R*-изомер:** ИЭР м/з: 522 $(M+H)^+$; хиральная СЖХ (CC4): 98.1 d.e.%; ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) *δ* 7.23 (d, *J* = 10.1 Гц, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.8 Гц, 2H), 6.65 (d, *J* = 8.8 Гц, 2H), 6.27 (dd, *J* = 10.1, 1.7 Гц, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.94 (d, *J* = 4.4 Гц, 1H), 4.89 (d, *J* = 18.0 Гц, 1H), 4.65 (d, *J* = 18.0 Гц, 1H), 4.61 (t, *J* = 4.4 Гц, 1H), 4.48 (d, *J* = 2.1 Гц, 1H), 3.51 (s, 2H), 2.58 (td, *J* = 13.3 Гц, 4.9 Гц, 1H), 2.35 (dd, *J* = 13.4 Гц, 2.8 Гц, 1H), 2.23-1.99 (m, 4H), 1.79-1.61 (m, 6H), 1.46-1.38 (m, 2H), 1.44 (s, 3H), 1.23-1.09 (m, 2H), 0.95 (s, 3H), 0.93 (t, *J* = 7.3 Гц, 3H) ppm.

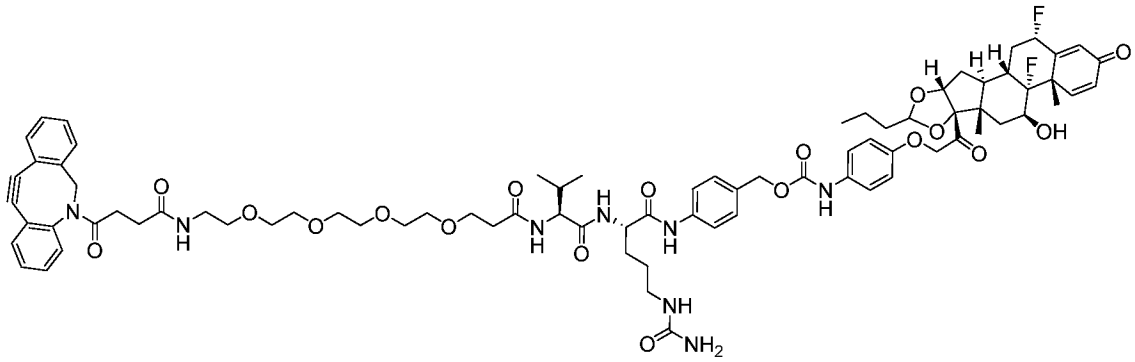
Пример 23. Синтез линкер-нагрузки LP3 (ФИГ. 12)

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамат (LP3-2)



[0642] К раствору Fmoc-vc-PAB-PNP (**LP3-1**, 100 мг, 0.13 ммоль) и соединения **P3** (87 мг, 0.15 ммоль) в DMF (5 мл) добавили DIPEA (67 мг, 0.52 ммоль) при КТ при помощи шприца. Смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов, и большая часть **LP3-1** была израсходована согласно ЖХМС. К полученной смеси добавили пиперидин (1 мл, избыт.) и перемешивали ее при 25 °C в течение 2 часов до полного удаления Fmoc под контролем ЖХМС. После фильтрации через мембрану фильтрат напрямую очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **LP3-2** (80 мг, выход 64%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 963 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 10.22 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 8.69 (d, J = 7.5 Гц, 1H), 8.08 (s, 3H), 7.61 (d, J = 6.8 Гц, 2H), 7.36 (d, J = 6.8 Гц, 3H), 7.27 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 7.22-7.00 (m, 1H), 6.84 (d, J = 7.2 Гц, 2H), 6.30 (dd, J = 8.0 Гц, 1.6Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.00 (m, 1H), 5.72-5.55 (m, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.16-5.05 (m, 3H), 4.88-4.80 (m, 1H), 4.80-4.76 (m, 1H), 4.75-4.70 (m, 1H), 4.55-4.48 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.70-3.60 (m, 1H), 3.12-2.90 (m, 2H), 2.70-2.55 (m, 1H), 2.40-2.20 (m, 1H), 2.15-2.00 (m, 3H), 1.86-1.75 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 1H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 4H), 0.97-0.91 (m,5H), 0.90-0.85 (m, 4H), 0.85-0.80 (m, 3H) ppm.

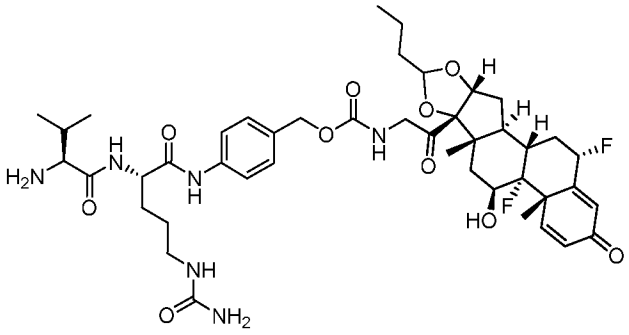
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-(4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамат (LP3)



[0643] К раствору кислоты **LP3-3** (37 мг, 67 мкмоль) в DMF (5 мл) добавили DIPEA (15 мг, 0.12 ммоль) и HATU (34 мг, 90 мкмоль) при КТ последовательно. Полученную смесь перемешивали при этой температуре в течение 0.5 часа, а затем добавили амин **LP3-2** (58 мг, 60 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до полного израсходования амина под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через мембрану и затем фильтрат отделили посредством преп-ВЭЖХ и получили соединение **LP3** (20 мг, выход 22%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1499 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.02 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 8.14 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.88 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 3H), 7.53-7.45 (m, 3H), 7.40-7.28 (m, 7H), 6.84 (d, J = 9.2 Гц, 2H), 6.30 (dd, J = 10.4 Гц, 1.6 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.00 (m, 1H), 5.72-5.55 (m,1H), 5.52 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.16-5.05 (m, 4H), 4.88-4.70 (m, 3H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 2H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.12-2.90 (m, 4H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.48-2.43 (m, 1H), 2.40-2.35 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.86-1.75 (m, 2H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 4H), 1.23 (s, 2H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm. *Анал. ВЭЖХ*: 100%, Время удерживания: 7.99 мин (способ B). Растворимость: <0.01 мг/мл воды.

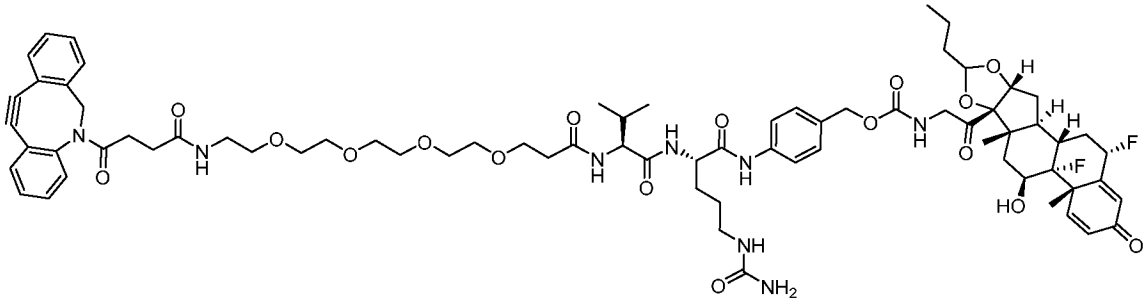
Пример 24. Синтез линкер-нагрузки LP13 (ФИГ. 13)

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}карбамат (LP13-1)



[0644] К раствору Fmoc-VC-PAB-PNP (**LP3-1**, 0.17 г, 0.22 ммоль) и соединения **P4** (93 мг, 0.20 ммоль) в DMF (3 мл) добавили DIPEA (51 мг, 0.40 ммоль) при КТ при помощи шприца. Смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов, и большая часть материалов была израсходована согласно ЖХМС. К полученной смеси добавили пиперидин (0.3 мл, избыт.) и перемешивали ее при КТ в течение часа до полного удаления Fmoc под контролем ЖХМС. После фильтрации через мембрану фильтрат напрямую очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **LP13-1** (0.13 г, выход 73%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 871 $(M + 1)^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}карбамат (LP13)

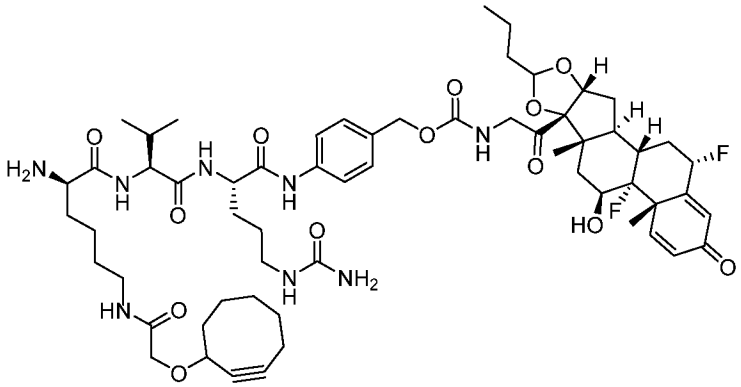


[0645] К раствору кислоты **LP3-3** (30 мг, 54 ммоль) в DMF (5 мл) добавили DIPEA (13 мг, 0.10 ммоль) и HATU (31 мг, 81 ммоль) при КТ последовательно. Полученную смесь перемешивали при этой температуре в течение 0.5 часа и затем добавили амин **LP13-1** (43 мг, 50 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до полного израсходования амина под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через мембрану и затем фильтрат отделили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **LP13** (16 мг, выход 23%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1406 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.99 (s, 1H), 8.11 (d, J = 7.5

Гц, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.5 Гц, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 3H), 7.53-7.33 (m, 6H), 7.33-7.28 (m, 3H), 6.30 (dd, *J* = 10.0 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H),6.10-6.00 (m, 1H), 5.72-5.55 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.05-5.01 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.80-4.72 (m, 1H), 4.60-4.58 (m, 1H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.25-4.10 (m,3H), 3.88-3.80 (m,1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.12-2.90 (m, 4H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.48-2.35 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H),2.15-1.95 (m, 4H), 1.86-1.65 (m, 3H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 5H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm. *Анал. ВЭЖХ*: 100%, Время удерживания: 7.40 мин (способ B). Растворимость: 0.02 мг/мл воды.

Пример 25. Синтез линкер-нагрузки LP14 (ФИГ. 14)

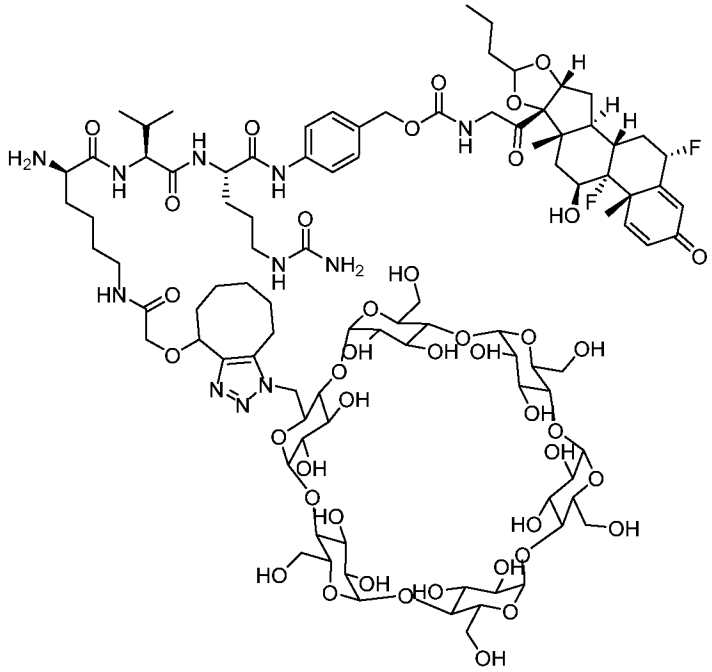
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}карбамат (LP14-1)



[0646] К раствору кислоты **LP1-3** (0.12 г, 0.22 ммоль) в DMF (5 мл) добавили HATU (0.11 г, 0.30 ммоль) и DIPEA (77 мг, 0.60 ммоль) при КТ. После того, как смесь перемешивали при КТ в течение 30 минут, добавили раствор амина **LP13-1** (0.17 г, 0.20 ммоль) в DMF (5 мл) при помощи шприца. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до тех пор, пока большая часть амина не была израсходована согласно ЖХМС. Затем к смеси добавили пиперидин (1 мл, избыт.) и смесь перемешивали при КТ в течение получаса до полного удаления Fmoc, под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через мембрану и фильтрат напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили соединение **LP14-1** (0.12 г, выход 52%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1163 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, MeOD$_{d4}$) δ 7.65-7.55 (m, 2H), 7.40-7.26 (m, 3H), 6.39-6.27 (m, 2H), 5.65-5.45 (m, 1H), 5.13-5.01 (m, 2H), 4.71-4.50 (m, 2H), 4.40-4.14 (m, 4H), 4.11-3.82 (m, 3H), 3.46-3.39 (m, 1H), 3.29-3.09 (m, 4H), 2.76-2.54 (m, 1H),

2.41-2.10 (m, 7H), 2.09-1.99 (m, 1H), 1.96-1.80 (m, 5H), 1.78-1.21 (m, 23H), 1.06-0.82 (m, 12H) ppm.

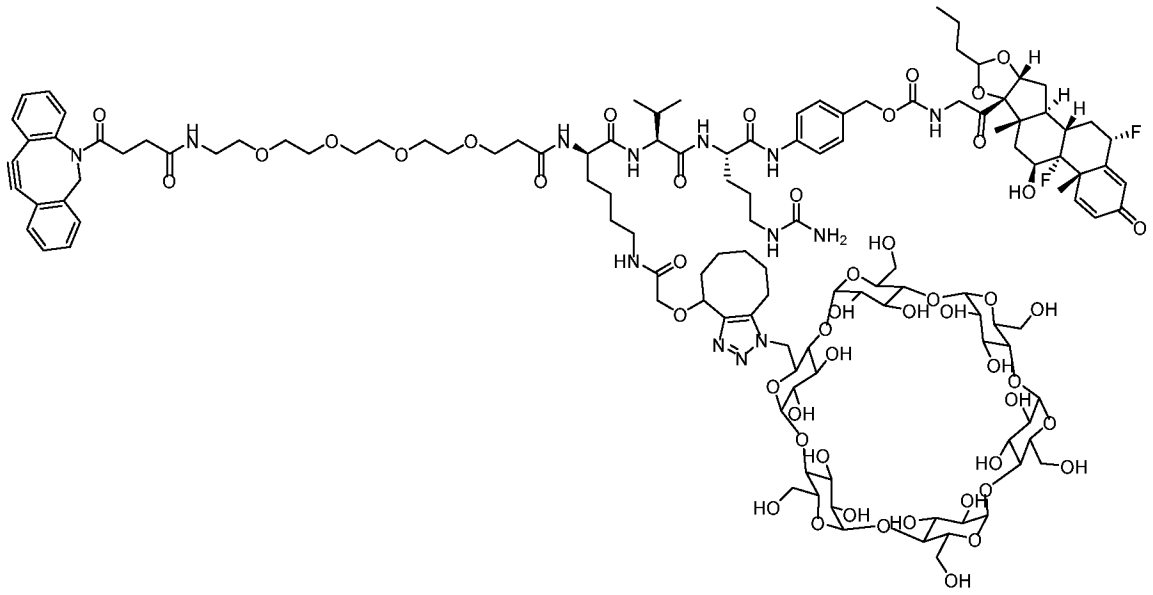
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}карбамат (LP14-2)



[0647] К раствору алкина **LP14-1** (0.12 г, 0.10 ммоль) в DMF (5 мл) добавили α-циклодекстрин-азид (0.30 г, 0.30 ммоль). Затем полученную смесь перемешивали при 50 ^{o}C в течение 3 часов до почти полного израсходования соединения **LP14-1** и обнаружения желаемой массы, под контролем ЖХМС. После фильтрации полученную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили соединение **LP14-2** (0.11 г, выход 51%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1081 (M/2 + 1)$^{+}$. ^{1}H ЯМР (500МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.05 (s, 1H), 8.30-7.80 (m, 3H), 7.80-7.55 (m, 2H), 7.50-7.40 (m, 1H), 7.40-7.25 (m, 3H), 6.30 (d, J = 12.5 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.80-5.35 (m, 16H), 5.25-5.05 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.90-4.50 (m, 13H), 4.50-4.00 (m, 5H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.30-3.20 (m, 8H), 3.20-3.00

(m, 4H), 3.00-2.85 (m, 5H), 2.25-2.20 (m, 2H), 2.10-1.95 (m, 4H), 1.80-1.00 (m, 30H), 1.00-0.90 (m, 4H),0.90-0.80 (m, 14H) ppm.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}карбамат (LP14)

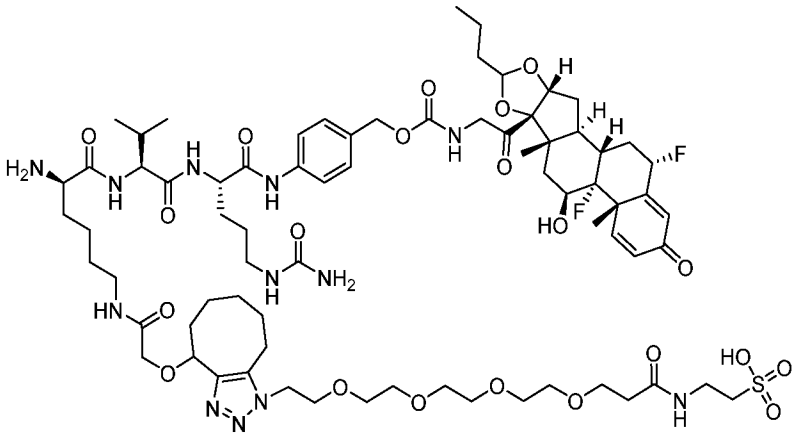


[0648] К раствору кислоты **LP14-3** (30 мг, 54 ммоль) в DMF (5 мл) добавили DIPEA (18 мг, 0.14 ммоль) и HATU (26 мг, 69 ммоль) при КТ последовательно. Полученную смесь перемешивали при данной температуре в течение 0.5 часа, после чего добавили **LP14-2** (0.10 г, 46 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов до полного израсходования амина под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через мембрану и затем фильтрат отделили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **LP14** (26 мг, выход 22%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1349 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.71 (s, 1H), 8.30-8.00 (m, 3H), 8.00-7.74 (m, 2H), 7.70-7.58 (m, 5H), 7.52-7.20 (m, 12H), 6.35-6.20 (m, 2H), 6.15-5.85 (m, 3H), 5.80-5.35 (m, 18H), 5.25-4.90 (m, 6H), 4.90-4.50 (m, 14H), 4.40-4.25 (m, 4H), 4.25-4.10 (m, 3H), 4.10-3.95 (m, 2H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.55-3.40 (m, 22H), 3.20-3.00 (m, 6H), 3.00-2.85 (m, 3H), 2.65-2.55 (m, 1H), 2.25-2.20 (m, 4H), 2.10-1.95 (m, 6H), 1.80-1.70 (m, 5H), 1.70-

1.50 (m, 10H), 1.50-1.45 (m, 9H), 0.90-0.80 (m, 14H) ppm. *Анал. ВЭЖХ*: 100%, Время удерживания: 6.23 мин (способ B). Растворимость: 0.026 мг/мл воды.

Пример 26. Синтез линкер-нагрузки LP15 (ФИГ. 15)

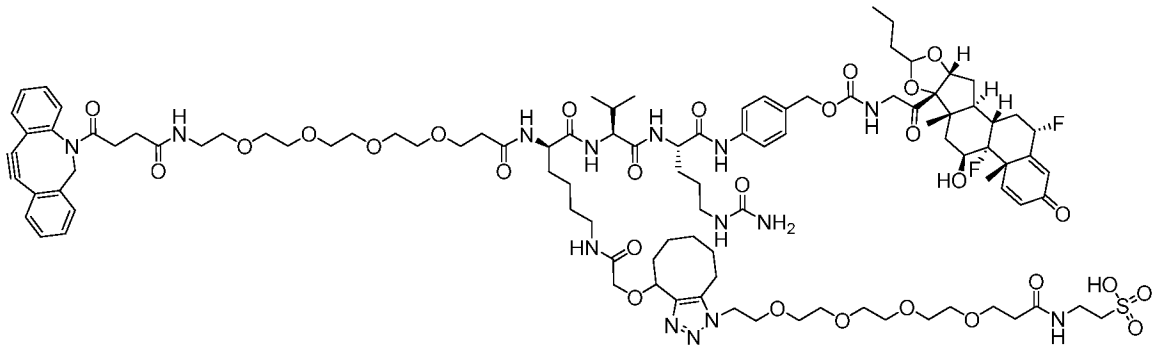
2-{1-[4-({[(5*R*)-5-амино-5-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}карбамоил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}пентил]карбамоил}метокси)-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}этан-1-сульфоновая кислота (LP15-2)



[0649] К раствору соединения **LP14-1** (60 мг, 52 ммоль) в DMF (2 мл) добавили азидо соединение **LP15-1** (62 мг, 0.16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 30 °C на протяжении ночи. ЖХМС показала завершение реакции. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP15-2** (60 мг, выход 74%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 781 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, MeOD$_{d4}$) δ 7.61 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 7.39-7.28 (m, 3H), 6.39-6.30 (m, 2H), 5.66-5.46 (m, 1H), 5.29-5.13 (m, 1H), 5.12-5.04 (m, 3H), 4.72-4.60 (m, 2H), 4.56-4.49 (m, 2H), 4.36-3.84 (m, 8H), 3.76-3.70 (m, 2H), 3.66-3.54 (m, 14H), 3.30-3.23 (m, 2H), 3.21-3.04 (m, 3H), 3.03-2.97 (m, 2H), 2.96-2.84 (m, 1H), 2.75-2.52 (m, 1H), 2.50-2.42 (m, 2H), 2.39-2.01 (m, 6H), 1.99-1.78 (m, 6H), 1.74-1.22(m, 22H), 1.03-0.87 (m, 12H) ppm.

2-{1-[4-({[(5*R*)-5-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-5-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}карбамоил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-

метилпропил]карбамоил}пентил]карбамоил}метокси)-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}этан-1-сульфоновая кислота (LP15)



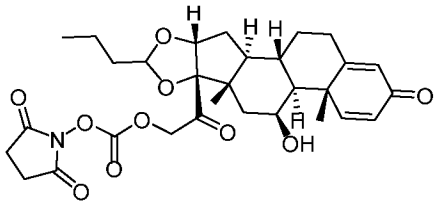
[0650] К раствору соединения **LP15-2** (47 мг, 30 ммоль) в DMF (1 мл) добавили соединение **LP15-3** (21 мг, 33 ммоль) и DIPEA (19 мг, 0.15 ммоль) при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP15** (28 мг, выход 45%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1049 $(M/2 + H)^+$. 1H ЯМР (500 МГц, MeODd4) δ 7.75-7.57 (m, 4H), 7.48-7.43 (m, 3H), 7.38-7.23 (m, 6H), 6.37-6.28 (m, 2H), 5.65-5.43 (m, 1H), 5.17-5.03 (m, 3H), 4.69-4.59 (m, 2H), 4.52-4.47 (m, 1H), 4.45-4.41 (m, 1H), 4.34-4.25(m, 2H), 4.23-4.13 (m, 2H), 4.07-3.86 (m, 5H), 3.77-3.68 (m, 4H), 3.64-3.54 (m, 22H), 3.52-3.47 (s, 3H), 3.46-3.40 (m, 4H), 3.29-3.21 (m, 4H), 3.20-3.14 (m, 2H), 3.10-3.01 (m, 1H), 3.00-2.95 (m, 2H), 2.92-2.84 (m, 1H), 2.76-2.60 (m, 2H), 2.47-2.42 (m, 2H), 2.40-2.25 (m, 5H), 2.23-2.13 (m, 3H), 2.07-1.97 (m, 3H), 1.90-1.79 (m, 4H), 1.71-1.55 (m, 14H), 1.52-1.42 (m, 3H), 1.40-1.29 (m, 8H), 1.07-0.85 (m, 12H) ppm. *Анал. ВЭЖХ*: 98%, Время удерживания: 5.88 мин (способ B).

Пример 26A: Синтез Будесонид-спейсеров (См. ФИГ. 22)

[0651] На ФИГ. 22 показана Схема 1 для синтеза Будесонид-спейсеров, содержащих реактивные группы, янтарную кислоту (соединение **1c**), карбаматные аналоги (**1d**, **1e**), THP-аналоги (**1g** и **1h**), глюкозные аналоги (**1i** и **1j**), фосфатные аналоги (**1k** и **1l**) и коммерческий фосфатный аналог (**1m**).

Промежуточное соединение 3a

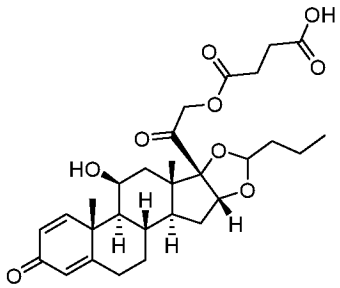
1-[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси]пирролидин-2,5-дион (**3a**)



[0652] К раствору будесонида **1a** (0.10 г, 0.26 ммоль) в DCM (1 мл) добавили бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) карбонат (71 мг, 0.30 ммоль), триэтиламин (47 мг, 0.52 ммоль) и DMAP (3.0 мг, кат.). Реакционную смесь перемешивали при 15-25 °C в течение 12 часов до разрушения будесонида, под контролем ЖХМС. Затем реакционную смесь развели DCM и промыли водой. Органический раствор высушили над сульфатом натрия. После фильтрации раствор сконцентрировали in vacuo и остаток (сырой **3a**) использовали для следующего этапа сразу же без дополнительной очистки. (93 мг, выход 71%). ИЭР **м/з**: 572.2 $(M + H)^+$.

Пример 1c

4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}-4-оксобутановая кислота (**1c**)



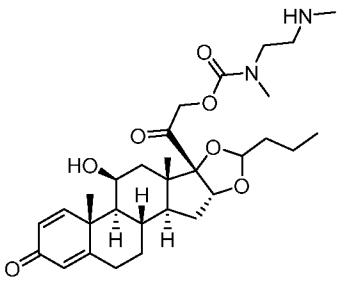
[0653] См. WO2015005459; WO2013074988; *Research in Pharmaceutical Science*, **2011**, 6(2), 107-116; и *International Journal of Pharmaceutics*, **2009**, 365(1-2), 69-76.

[0654] К раствору будесонида (**1a**, 0.10 г, 0.26 ммоль) в DCM (1 мл) добавили янтарный ангидрид (30 мг, 0.30 ммоль), триэтиламин (47 мг, 0.52 ммоль) и DMAP (3 мг, катализатор,

0.02 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 12 часов до израсходования будесонида под контролем ТСХ и ЖХМС. Затем реакционную смесь развели DCM и промыли водой. Органический раствор высушили над сульфатом натрия. После фильтрации раствор сконцентрировали in vacuo и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ и получили указанное в заголовке соединение **1c** (22 мг, выход 18%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 531.3 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7.48 (d, J = 10 Гц, 1H), 6.28-6.26 (m, 1H), 6.04-6.02 (m, 1H), 5.23-5.11 (m, 1H), 5.06-4.99 (m, 1H), 4.83-4.68 (m, 1H), 4.45-4.43 (m, 1H), 2.76-2.63 (m, 5H), 2.41-2.39 (m, 1H), 2.26-2.12 (m, 2H), 1.99-1.66 (m, 6H), 1.57-1.38 (m, 6H), 1.32 (s, 1H), 1.16-0.94 (m, 8H) ppm.

Пример 1d

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-метил-*N*-[2-(метиламино)этил]карбамат (1d)

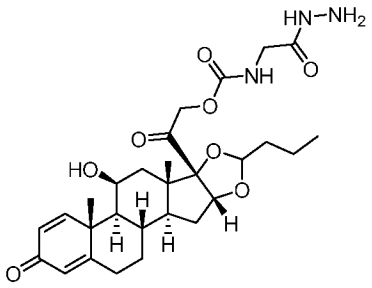


[0655] К раствору сырого промежуточного соединения **3a** (63 мг, 0.11 ммоль) в DCM (5 мл) добавили *N,N'*-диметилэтан-1,2-диамин (28 мг, 0.32 ммоль) и триэтиламин (38 мг, 0.38 ммоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов до израсходования большей части **3a** под контролем ЖХМС. Летучие вещества удалили in vacuo и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили **1d** (4 мг, выход 4.5%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 545.3 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 7.32-7.30 (m, 1H), 6.28-6.25 (m,1H), 6.02-6.01 (m, 1H), 4.42 (br s, 1H), 3.50-3.23 (m, 3H), 3.10-3.02 (m, 3H), 2.82-2.71 (m, 3H), 2.57-2.55 (m, 1H), 2.35-2.33 (m, 1H), 2.15-2.06 (m, 2H),

1.96-1.79 (m, 12H), 1.60-1.56 (m, 3H), 1.46 (m, 3H), 1.37-1.33 (m, 2H), 1.23-1.04 (m, 4H), 0.92-0.86 (m, 3H) ppm.

Пример 1e

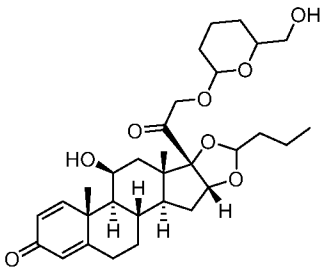
2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапента цикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-[(гидразинкарбонил)метил]карбамат (1e)



[0656] К смеси сырого **3a** (0.16 г, 0.28 ммоль) в DMF (3 мл) добавили Boc-2-(2-аминоацетил)гидразин (80 мг, 0.42 ммоль) и триэтиламин (85 мг, 0.84 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов до израсходования промежуточного соединения **3a** под контролем ЖХМС. Затем реакционную смесь погасили водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор высушили над безводным сульфатом натрия. После фильтрации раствор сконцентрировали in vacuo. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (30-50% этилацетат в петролейном эфире) и получили **Boc-1e** (70 мг) в виде белого твердого вещества (ИЭР **м/з**: 646 (M + H)$^+$), которое растворили в DCM (2 мл). К раствору добавили по каплям TFA (1 мл) при 0 °C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов до израсходования **Boc-1e** под контролем ЖХМС. Летучие вещества удалили in vacuo и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ и получили указанное в заголовке соединение **1e** (7 мг, выход 12%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 546 (M + H)$^+$.

Пример 1g

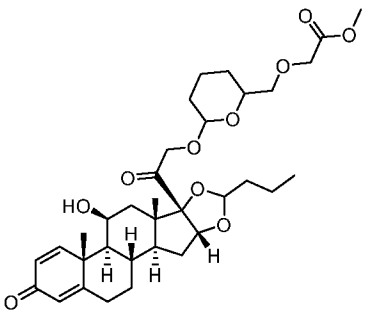
(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-8-(2-{[6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]окси}ацетил)-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он (1g)



[0657] К раствору будесонида (**1a**, 50 мг, 0.12 ммоль) в безводном DCM (4 мл) добавили (3,4-дигидро-2H-пиран-2-ил)метанол (0.11 г, 0.93 ммоль) и *p*-толуолсульфоновую кислоту (31 мг, 0.18 ммоль) при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 дней под контролем ЖХМС. Летучие вещества удалили in vacuo и остаток растворили в DMF и отделили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили указанное в заголовке соединение **1g** (13 мг, выход 20%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 545 $(M + H)^+$.

Пример 1h

Метил 2-[(6-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}оксан-2-ил)метокси]ацетат (**1h**)



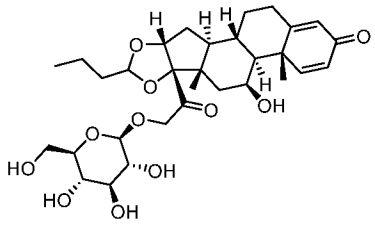
[0658] К раствору (3,4-дигидро-2*H*-пиран-2-ил)метанола (2.0 г, 18 ммоль) в THF (30 мл) добавили гидрид натрия (60% в минеральном масле, 0.88 г, 22 ммоль) частями при 0 °C под защитой азота. Суспензию перемешивали при 0 °C до завершения выделения водорода. К полученной смеси затем добавили раствор этил 2-бромацетата (4.0 г, 26 ммоль) в THF (18 мл). Смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи до почти полного израсходования исходного материала согласно ЖХМС. После охлаждения до 0 °C реакционную смесь погасили водой под защитой азота и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством флэш-

хроматографии (0-8% этилацетат в петролейном эфире) и получили этил 2-((3,4-дигидро-2*H*-пиран-2-ил)метокси)ацетат (0.70 г, выход 21%) в виде бесцветного масла. (^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 6.36 (d, J = 6.0 Гц, 1H), 4.67 (m, 1H), 4.16 (s, 2H), 3.92 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.57 (d, J = 5.5 Гц, 2H), 2.50-1.99 (m, 1H), 1.93-1.82 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.60 (m, 1H) ppm.)

[0659] К раствору будесонида (**1a**, 0.11 г, 0.25 ммоль) в безводном DCM (8 мл) добавили этил 2-((3,4-дигидро-2*H*-пиран-2-ил)метокси)ацетат (0.35 г, 1.9 ммоль, полученный выше, и *p*-толуолсульфоновую кислоту (66 мг, 0.35 ммоль) при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Летучие вещества удалили in vacuo и остаток растворили в DMF и отделили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили указанное в заголовке соединение **1h** (46 мг, выход 29%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 617 $(M + H)^+$.

Пример 1i

(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-6-пропил-8-(2-{[(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]окси}ацетил)-5,7-диоксапентацикло[10.8.0$0^{2,9}$.$0^{4,8}$.$0^{13,18}$]икоса-14,17-диен-16-он (1i, с эпимерами)

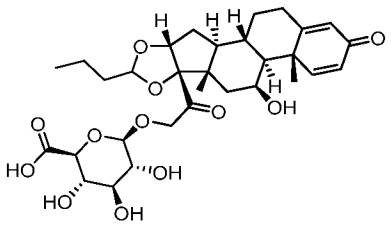


[0660] К смеси будесонида (**1a**, 0.22 г, 0.50 ммоль) и ацетобромо-α-D-глюкозы (0.33 г, 0.80 ммоль) в DCM (15 мл) добавили 4 Å молекулярные сита (1.0 г) и смесь перемешивали при КТ в течение получаса и затем добавили трифторметансульфонат серебра (0.19 г, 0.75 ммоль) при 0 °C. Суспензию перемешивали в темноте при КТ на протяжении выходных (72 часов) под защитой азота. Смесь профильтровали через целит и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили **Ac-1i** (25 мг, выход 9.2%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 761 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР ($DMSO_{d6}$, 400 МГц) (с эпимерами) δ 7.34-7.30 (m, 1H), 6.19-6.14 (m, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.29 (t, J = 9.2 Гц, 1H), 5.17-5.15 (m, 0.5H), 5.03-5.01 (m, 0.5H), 4.96-4.90 (m, 1H), 4.85-4.74 (m, 3H), 4.70-4.67 (m, 1H), 4.64-4.63 (m, 0.5H), 4.59-4.56 (m, 0.5H), 4.39-4.28 (m, 2H), 4.20-4.16 (m, 1H), 4.05-3.99 (m, 2H), 2.56-2.40 (m, 1H), 2.32-2.26 (m, 1H), 2.13-1.89 (m, 14H), 1.83-1.63 (m, 3H), 1.59-1.48 (m, 3H), 1.44-1.21 (m, 6H), 1.15-0.91 (m, 2H), 0.86-0.81 (m, 6H) ppm.

[0661] К раствору соединения **Ac-1i** (30 мг, 39 ммоль), полученного выше, в воде (1 мл) и метанола (3 мл) добавили моногидрат гидроокиси лития (17 мг, 0.40 ммоль) при 0 °C. После перемешивания при 0 °C на протяжении часа смесь напрямую очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили **1i** (24 мг, выход 98%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 593 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (MeOD$_{d4}$, 400 МГц) (с эпимерами) δ 7.46 (t, J = 10.4 Гц, 1H), 6.26 (dt, J = 10.0 и 2.0 Гц, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.21 и 4.64 (t, J = 4.8 Гц, 1H), 5.16 (t, J = 7.2 Гц, 0.5H), 4.94-4.80 (m, 2.5H), 4.57-4.47 (m, 1H), 4.44-4.41 (m, 1H), 4.34-4.31 (m, 1H), 3.90-3.87 (m, 1H), 3.70-3.64 (m, 1H), 3.39-3.24 (m, 4H), 2.70-2.62 (m, 1H), 2.41-2.36 (m, 1H), 2.27-2.08 (m, 2H), 2.00-1.93 (m, 1H), 1.88-1.81 (m, 1H), 1.74-1.32 (m, 9H), 1.22-0.90 (m, 8H) ppm.

Пример 1j

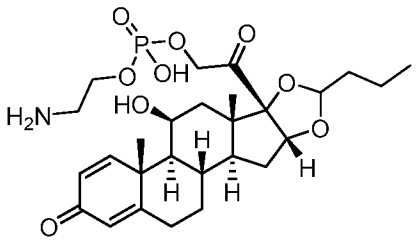
(2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-Тригидрокси-6-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.00^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}оксан-2-карбоновая кислота (1j, с эпимерами)



[0662] В соответствии с аналогичной процедурой, как для **1i**, за исключением замены ацетобромо-α-D-глюкозы на ацетобромо-*α*-*D*-глюкуроновой кислоты метиловый эфир, получили соединение **1j** (24 мг, выход 9.2% за 2 шага) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 607 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (MeOD$_{d4}$, 400 МГц) δ 7.48 (t, J = 10.0 Гц, 1H), 6.28-6.24 (m, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.22-5.15 (m, 1H), 4.98-4.81 (m, 2.5H), 4.65-4.56 (m, 1.5H), 4.45-4.39 (m, 2H), 3.62-3.59 (m, 1H), 3.52-3.46 (m, 1H), 3.41 (t, J = 8.8 Гц, 1H), 3.30-3.28 (m, 1H), 2.70-2.62 (m, 1H), 2.40-2.36 (m, 1H), 2.27-2.10 (m, 2H), 1.95-1.92 (m, 2H), 1.75-1.54 (m, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.51-1.32 (m, 3H), 1.12-0.90 (m, 8H) ppm.

Пример 1k

(2, 2113этокси)({2 1H)*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)13окси)({2 1H), 3.30-3.28 (m, 1H), 2.70-2.62 (m, 1H), 2.40-2.36 (m, 1H)^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса)({2 1H), 3.30-3.28 оксоэтокси})фосфиновая кислота (1k)



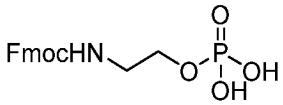
[0663] К раствору триэтиламина (0.67 г, 6.6 ммоль) в хлороформе (4 мл) добавили оксихлорид фосфора (0.51 мг, 3.3 ммоль) при 0 °C, а затем добавили раствор будесонида (**1a**, 1.3 г, 3.0 ммоль) в хлороформе (4 мл). После перемешивания при 20 °C в течение 2 часов смесь охладили до 0 °C и добавили раствор Boc-этаноламина (0.41 мг, 2.6 ммоль) в хлороформе (4 мл) и пиридина (3 мл). После перемешивания при 20 °C в течение часа до завершения реакции согласно ЖХМС реакционную смесь погасили добавлением воды (2 мл) при 0 °C. Смесь перемешивали при 20 °C на протяжении ночи. Летучие вещества удалили in vacuo и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили сырое соединение **Boc-1k** (330 мг, 17%) в виде желтой пленки. ИЭР **м/з**: 676 $(M + Na)^+$.

[0664] К раствору **Boc-1k** (0.18 г, 0.28 ммоль) в DCM (5 мл) добавили трифторуксусную кислоту (0.5 мл) при 0 °C. Полученную смесь перемешивали при 23 °C в течение 2 часов до полного удаления Boc согласно ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo*. Остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили **1k** в виде белого твердого вещества (90 мг, выход 59%). ИЭР **м/з**: 554 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $MeOD_{d4}$) δ 7.49 (d, J = 10.1 Гц, 1H), 6.28 (d, J = 10.1 Гц, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.24-5.15 (m, 1H), 4.87-4.62 (m, 3H), 4.45 (d, J = 6.1 Гц, 1H), 4.18-4.15 (m, 2H), 3.22-3.20 (m, 2H), 2.71-2.64 (m, 1H), 2.40 (d, J = 13.4 Гц, 1H), 2.29-1.71 (m, 6H), 1.65-1.32 (m, 9H), 1.22-0.91 (m, 7H) ppm. Анал. ВЭЖХ: > 99.9%, Время удерживания: 3.90 мин (способ B).

Пример 1l

(2-{[(9*H*-Флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}этокси)фосфоновая кислота

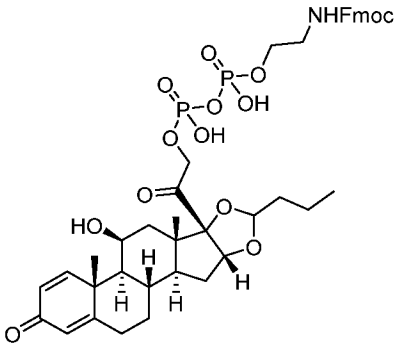
[0665] См. J. Am. Chem. Soc., **2016**, 138(4), 1430-1445; WO2015153401; м Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements, **2000**, 165, 83-90.



[0666] К смеси Fmoc-этаноламина (1.1 г, 3.9 ммоль) в THF (16 мл) добавили дифосфорилхлорид (2.2 г, 8.8 ммоль) при помощи шприца при -40 °C. После перемешивания при -40 °C в течение часа до полного израсходования исходного

материала под контролем ЖХМС, реакционную смесь погасили водой (1 мл) при -40 °C, на смесь воздействовали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (200 мл) и оставили при 10-20 °C на протяжении ночи. Полученную смесь окислили *конц.* HCl до pH 2 и затем экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали, в результате чего получили сырое соединение, указанное в заголовке (1.6 г, сырое) в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующем этапе без очистки. ИЭР **м/з**: 364 $(M + H)^+$.

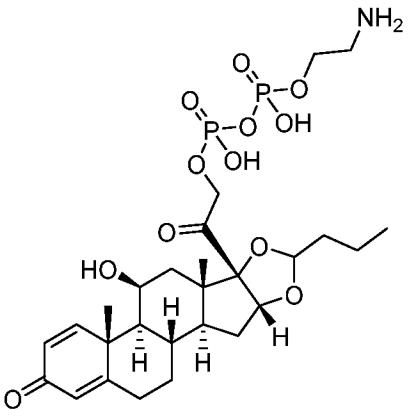
(2-{[(9*H*-Флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}этокси)({[гидрокси({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси})фосфорил]окси})фосфиновая кислота (Fmoc-1l)



[0667] В соответствии с вышеуказанной процедурой, за исключением замены Fmoc-этаноламина на будесонид (**1a**, 0.86 г, 20 ммоль), получили промежуточное соединение фосфонового будесонида **1a-PO_3H_2** (1.1 г, сырое соединение) в виде белого твердого вещества (ИЭР **м/з**: 551 $(M + H)^+$).

[0668] К раствору (2-{[(9*H*-Флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}этокси)фосфоновой кислоты (0.29 г, 0.80 ммоль) в DMF (5 мл) добавили триэтиламин (81 мг, 0.80 ммоль) и 1,1'-карбонилдиимидазол (CDI, 0.32 г, 2.0 ммоль) при 10 °C. Смесь перемешивали при 10-20 °C в течение 30 минут и затем к реакционной смеси добавили полученное выше промежуточное соединение фосфонового будесонида **1a-PO_3H_2** (0.41 г, 0.80 ммоль) и хлорид цинка (0.87 г, 6.4 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 10-20 °C на протяжении ночи, и исходный материал был полностью израсходован согласно ЖХМС. Затем реакционную смесь погасили разведенным вод. HCl (1 H, 50 мл) и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор сконцентрировали и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили **Fmoc-1l** (0.32 г, выход 47%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 856 $(M + H)^+$.

(2-аминоэтокси)({[гидрокси({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси})фосфорил]окси})фосфиновая кислота (1l)

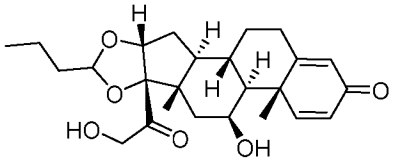


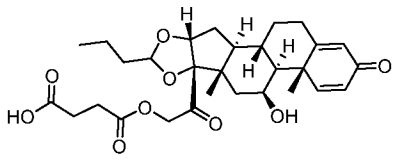
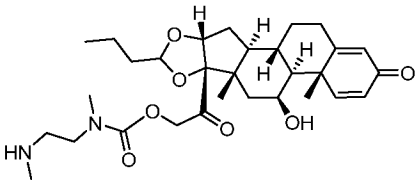
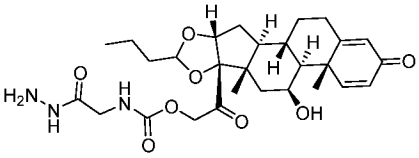
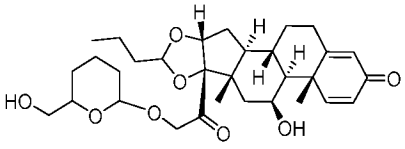
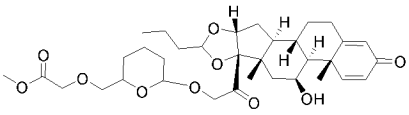
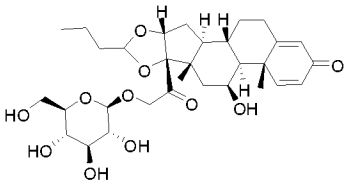
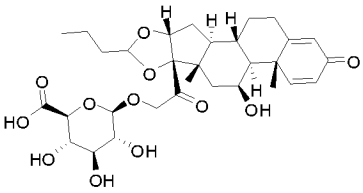
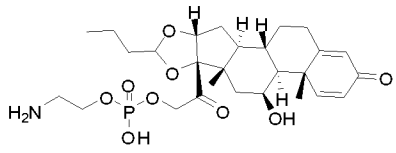
[0669] См. WO2015153401.

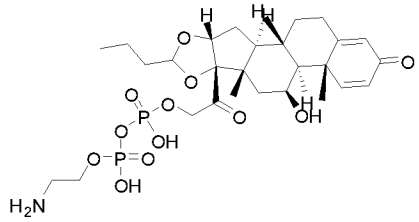
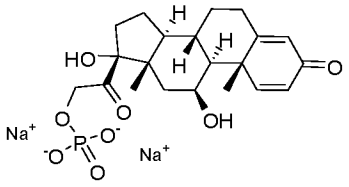
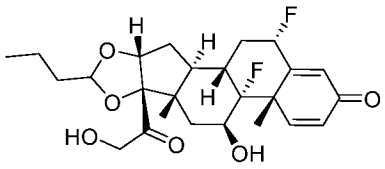
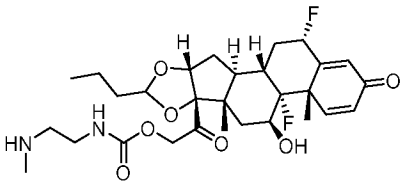
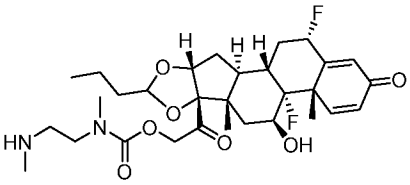
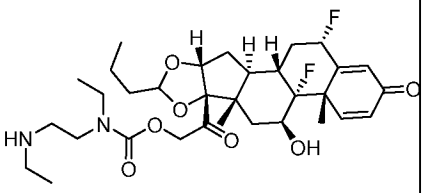
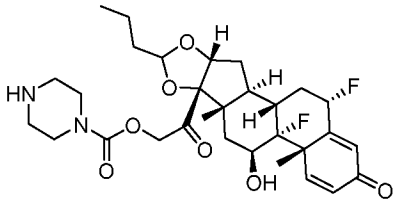
[0670] К раствору **Fmoc-1l** (0.10 г, 0.12 ммоль) в DCM (2 мл) добавили пиперидин (67 мг, 0.79 ммоль) при 10 °C. Реакционную смесь перемешивали при 10-20 °C в течение 16 часов. Соединение **Fmoc-1l** было полностью израсходовано согласно ЖХМС. Летучие вещества удалили in vacuo и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили **1l** (50 мг, выход 68%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 634 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $MeOD_{d4}$) δ 7.50 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 6.28 (d, J = 9.9 Гц, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.23-5.16 (m, 1H), 5.02-4.97 (m, 1H), 4.88-4.67 (m, 1H), 4.45 (d, J = 3.4 Гц, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.24 (s, 2H), 2.67 (dd, J = 13.5, 8.3 Гц, 1H), 2.40 (d, J = 11.3 Гц, 1H), 2.28-1.32 (m, 15H), 1.23-0.92 (m, 8H) ppm. Анал. ВЭЖХ: > 99.9%, Время удерживания: 2.74 мин (способ B).

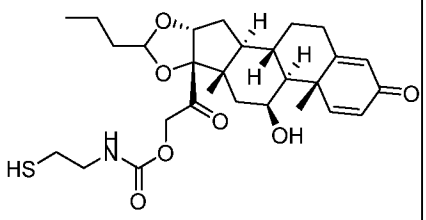
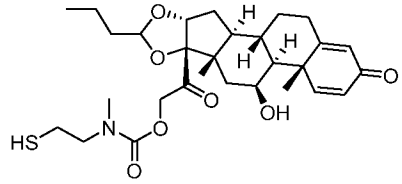
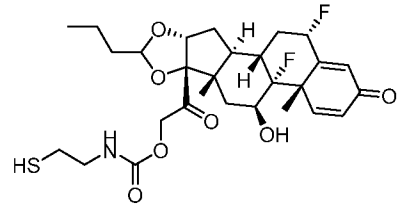
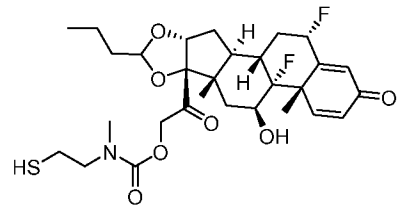
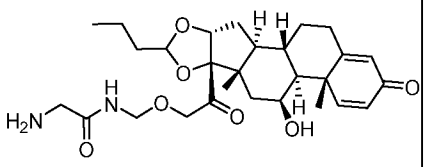
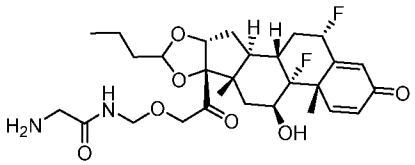
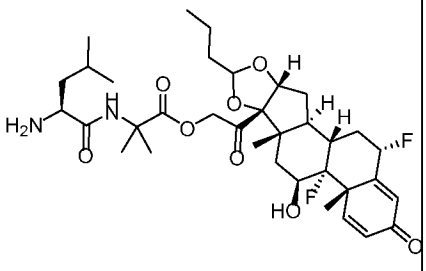
[0671] В нижеприведенной Таблице 1a представлены стероиды, приготовленные способами, описанными в настоящем документе.

Таблица 1a – Структура и химико-физические свойства соединений

№	Структура	Чистота ВЭЖХ	cLogP	МФ	МВ (рас.)	МС (M+H)
1a		95	2.73	$C_{25}H_{34}O_6$	430.55	431.3

№	Структура	Чистота ВЭЖХ	cLogP	МФ	МВ (рас.)	МС (М+Н)
1c		98	3.00	$C_{29}H_{38}O_9$	530.25	531.2
1d		93	2.92	$C_{30}H_{44}N_2O_7$	544.69	545.3
1e		100	1.44	$C_{28}H_{39}N_3O_8$	545.62	546.2
1g		92	3.65	$C_{31}H_{44}O_8$	544.68	545.3
1h		98	3.19	$C_{34}H_{48}O_{10}$	616.32	616.32
1i		100	0.96	$C_{31}H_{44}O_{11}$	592.67	593.4
1j		98	1.28	$C_{31}H_{42}O_{12}$	606.66	607.3
1k		100	1.18	$C_{27}H_{40}NO_9P$	553.58	554.1

№	Структура	Чистота ВЭЖХ	cLogP	МФ	МВ (рас.)	МС (М+Н)
1l		100	0.55	$C_{27}H_{41}NO_{12}P_2$	633.56	634.0
1m		100	1.15	$C_{21}H_{27}Na_2O_8P$	484.39	590.3
100		100	2.44	$C_{25}H_{32}F_2O_6$	466.51	467
101a		>95	2.40	$C_{29}H_{40}F_2N_2O_7$. $C_2HF_3O_2$	663.66	567
101b		>95	2.63	$C_{30}H_{42}F_2N_2O_7$. $C_2HF_3O_2$	678.69	581
101c		100	3.34	$C_{32}H_{46}F_2N_2O_7$. $C_2HF_3O_2$	722.74	609
101d		100	2.46	$C_{30}H_{40}F_2N_2O_7$	578.64	579

№	Структура	Чистота ВЭЖХ	cLogP	МФ	МВ (рас.)	МС (М+Н)
102c		>95	3.47	$C_{28}H_{39}NO_7S$	533.68	531
102 d		>95	3.69	$C_{29}H_{41}NO_7S$	547.71	548
102e		>95	3.17	$C_{28}H_{37}F_2NO_7S$	569.66	570
102f		>95	3.40	$C_{29}H_{39}F_2NO_7S$	583.69	584
103a		98	1.58	$C_{28}H_{40}N_2O_7$	516.64	517
103 b		98	1.29	$C_{28}H_{38}F_2N_2O_7$	552.62	553
104a		>90	3.67	$C_{35}H_{50}F_2N_2O_8$	664.79	665

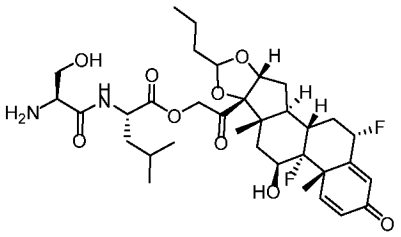
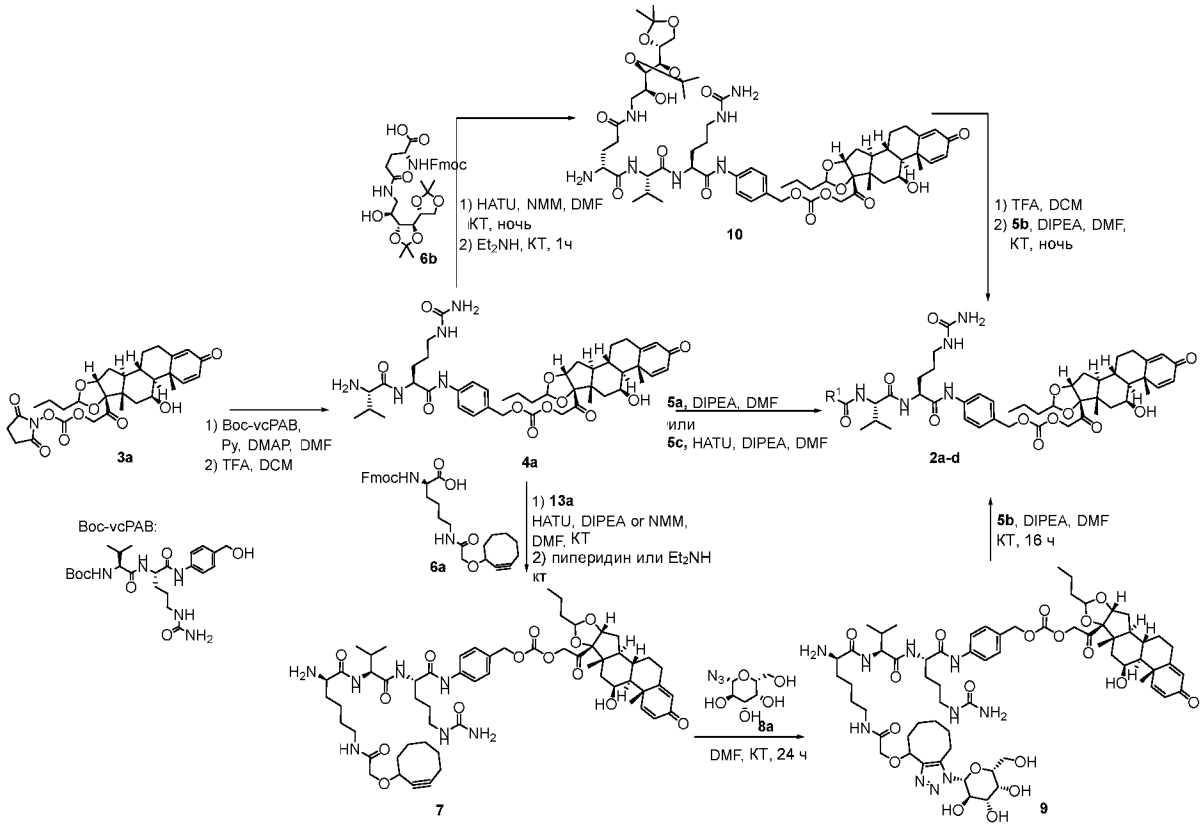
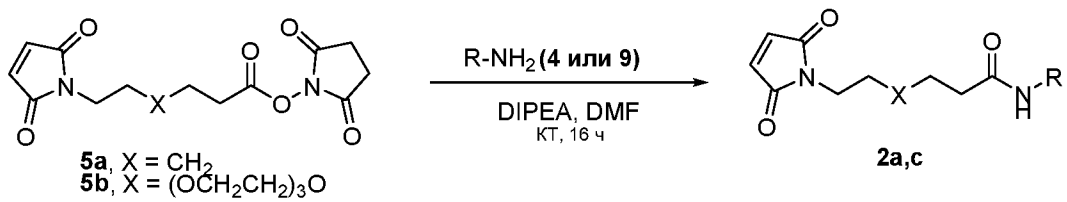
№	Структура	Чистота ВЭЖХ	cLogP	МФ	МВ (рас.)	МС (М+Н)
104 b		>95	2.19	$C_{34}H_{48}F_2N_2O_9$	666.76	667

Схема 2. Синтез VC-PAB спейсер-будесонида



Общая процедура А для синтеза МС- спейсер-будесонида (2a и 2c)



5a, X = CH_2
5b, X = $(OCH_2CH_2)_3O$

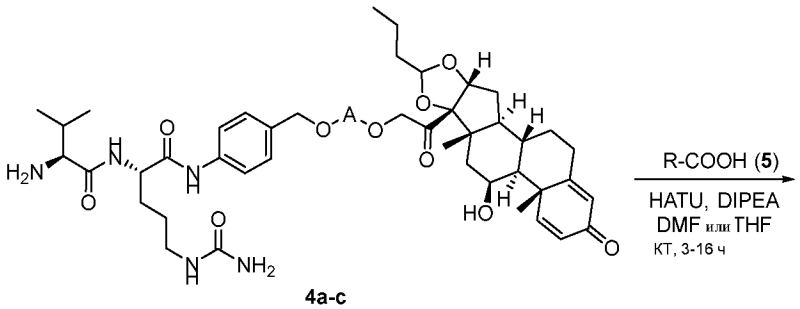
[0672] К раствору vcPAB-будесонида (**4a** A = CO, 1.0 эквив.) или амина **9** (1.0 эквив.) на Схеме 2 в DMF (приблизит. 1 мл на 10 мг амина) добавили активированный NHS-эфир **5** (1.5-3.0 эквив.) в нижеприведенной таблице и DIPEA (2.0 эквив.) при КТ. Реакционную

смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи, когда NHS-эфир и большая часть амина были израсходованы согласно спектрам ЖХМС. После фильтрации реакционный раствор очистили напрямую посредством преп-ЖХМС или обращенно-фазовой флэш-хроматографии и получили необходимый амид **2** (*ca.* выход 17%) в виде белого твердого вещества.

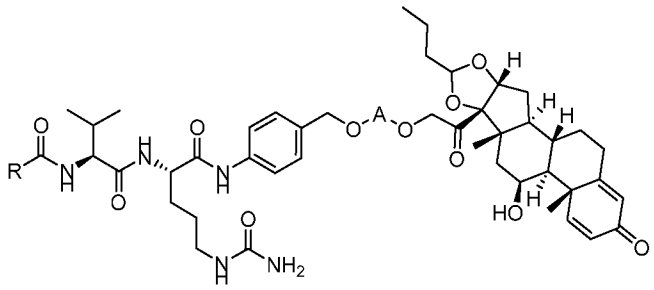
Амины		**Активированный эфир 5**		**Основание/ реактивы**	**Растворитель**	**Время (ч)**	**Очистка**	**Продукт 2**
4a[c]	50 мг, 56 ммоль	**5a**	28 мг, 91 ммоль	DIPEA (23 мг, 0.18 ммоль)	DMF (3 мл)	16	Преп-ВЭЖХ (способ A)	**2a** (10 мг, 17%)
rxn раствор **9**		**5b**	8.8 мг, 20 ммоль	DIPEA (4.0 мг, 31 ммоль)	DMF (1 мл)	16	Преп-ВЭЖХ (способ A)	**2d** (3.5 мг, 4%)

c.Соль TFA

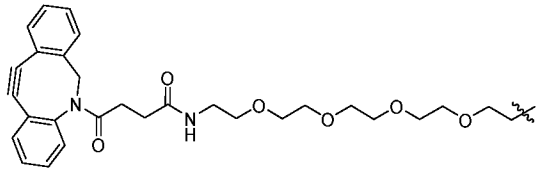
Общая процедура B для синтеза амидов 2b, 2l, 2m-предшественника от кислоты

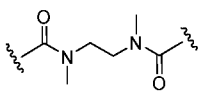
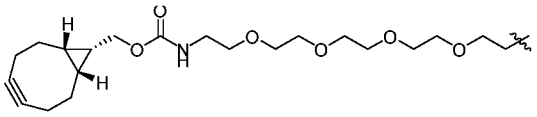
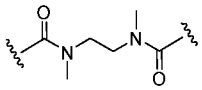
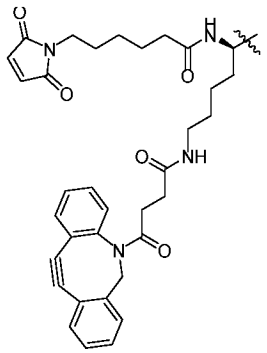


4a-c



2b, 2l, 2m-предшественник

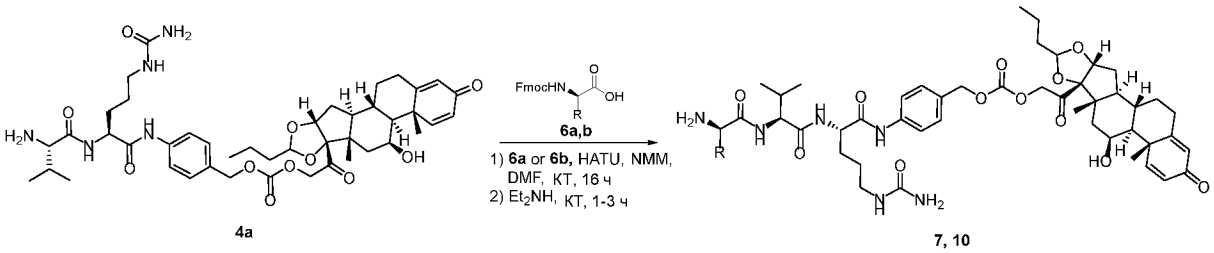
Продукты	**Амины**	**Кислоты**	**A**	**R**
2b	**4a**	**5c**		

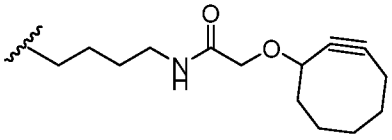
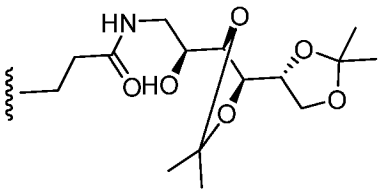
Продукты	Амины	Кислоты	A	R
2l	**4c**	**5d**		
2m – пред-шествен-ник	**4c**	**5e**		

[0673] К раствору кислоты **5** (1.0-1.5 эквив.) в DMF или DCM или THF (1 мл на 5 мг **5**) добавили DIPEA (2.0-5.0 эквив.) и HATU (1.4-2.2 эквив.) при КТ. Полученную смесь перемешивали при данной температуре в течение 0.5-1 часа затем добавили vcPAB-Будесонид (**4**, 1.0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3-16 часов до полного израсходования амина под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через мембрану и фильтрат отделили напрямую посредством преп-ВЭЖХ или обращенно-фазовой хроматографии и получили **2** (выход 21-54%) в виде белого твердого вещества. В нижеприведенной таблице указана дополнительная информация.

Амины		кислота		Основание/ реактивы	Растворитель	Время (ч)	Очистка	Продукт 2
4b	10 мг, 11 ммоль	**5c**	10 мг, 18 ммоль	DIPEA (6.2 мг, 48 ммоль) HATU (9.0 мг, 24 ммоль)	DMF (1 мл)	16	Преп-ВЭЖХ (способ B)	**2b** (3.0 мг, 21%)
4c	58 мг, 61 ммоль	**5c**	37 мг, 67 ммоль	DIPEA (15 мг, 0.12 ммоль) HATU (34 мг, 89 ммоль)	DMF (5 мл)	3	Преп-ВЭЖХ (способ B)	**2i** (21 мг, 24%)
4c	8.9 мг, 9.4 ммоль	**5d**	6.3 мг, 14 ммоль	DIPEA (3.6 мг, 27 ммоль) HATU (8.0 мг, 20 ммоль)	DMF (1 мл)	16	Преп-ВЭЖХ (способ B)	**2l** (7 мг, 54%)
4c	20 мг, 21 ммоль	**5e**	13 мг, 21 ммоль	DIPEA (8.0 мг, 62 ммоль) HATU (12 мг, 31 ммоль)	THF (5 мл)	16	Преп-ВЭЖХ (способ A)	**2m - предшественник** (5 мг)

Общая процедура C для синтеза промежуточного соединения 7 и 10

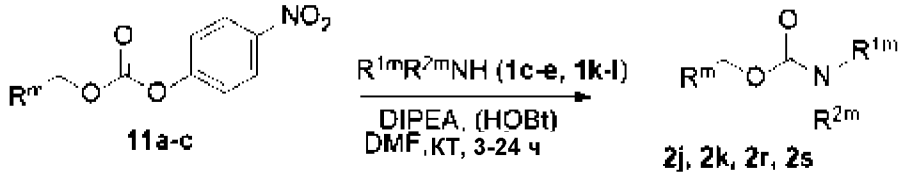


Fmoc-аминокислота **6**	Продукт	R
6a	**7**	
6b	**10**	

[0674] К раствору промежуточного соединения **6** (1.2-1.4 эквив.) в DMF добавили HATU (1.5-1.7 эквив.) при КТ. Полученный раствор перемешивали при КТ в течение часа. К данной суспензии добавили раствор vcPAB-будесонида (**4a**, 1.0 эквив.) в DMF (0.10 мл на мг **4a**) и последовательно NMM (2.3-3.0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов, и она стала прозрачной. Реакцию контролировали посредством ЖХМС до полного израсходования **4a**. Затем к реакционной смеси добавили диэтиламин (избыт.) и затем полученную смесь перемешивали при КТ в течение 1-3 часов до удаления Fmoc согласно ЖХМС. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **7** (выход 18% из соединения **4a**) или очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **10** (выход 5-%) в виде белого твердого вещества. В нижеприведенной таблице указана дополнительная информация.

Амины		Промежуточное соединение 6		Основание/реактивы	Растворитель	Время	Очистка	Продукт
4a	60 мг, 64 ммоль	**6a**	46 мг, 86 ммоль	NMM (15 мг, 0.15 ммоль) HATU (41 мг, 0.11 ммоль) затем Et_2NH (0.5 мл)	DMF (3 мл)	16 ч затем 3 ч	Преп-ВЭЖХ (способ A)	**7** (13 мг, 18%)
4a	0.19 г, 0.20 ммоль	**6b**	0.15 г, 0.24 ммоль	NMM (61 мг, 0.60 ммоль) HATU (0.11 г, 0.29 ммоль) затем Et_2NH (1 мл)	DMF (5 мл)	16 ч затем 1 ч	Преп-ВЭЖХ (способ B)	**10** (13 мг, 5%)

Общая процедура D для синтеза карбаматов 2j, 2k, 2r, и 2s



[0675] Смесь перемешивали при КТ в течение 3-24 часов до полного израсходования **PNP активированного эфира** под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через мембрану и фильтрат отделили посредством преп-ВЭЖХ и получили соединение **2** (с диастереоизомерами или без них, выход 11-63%) в виде белого твердого вещества (веществ). В нижеприведенной таблице указана дополнительная информация.

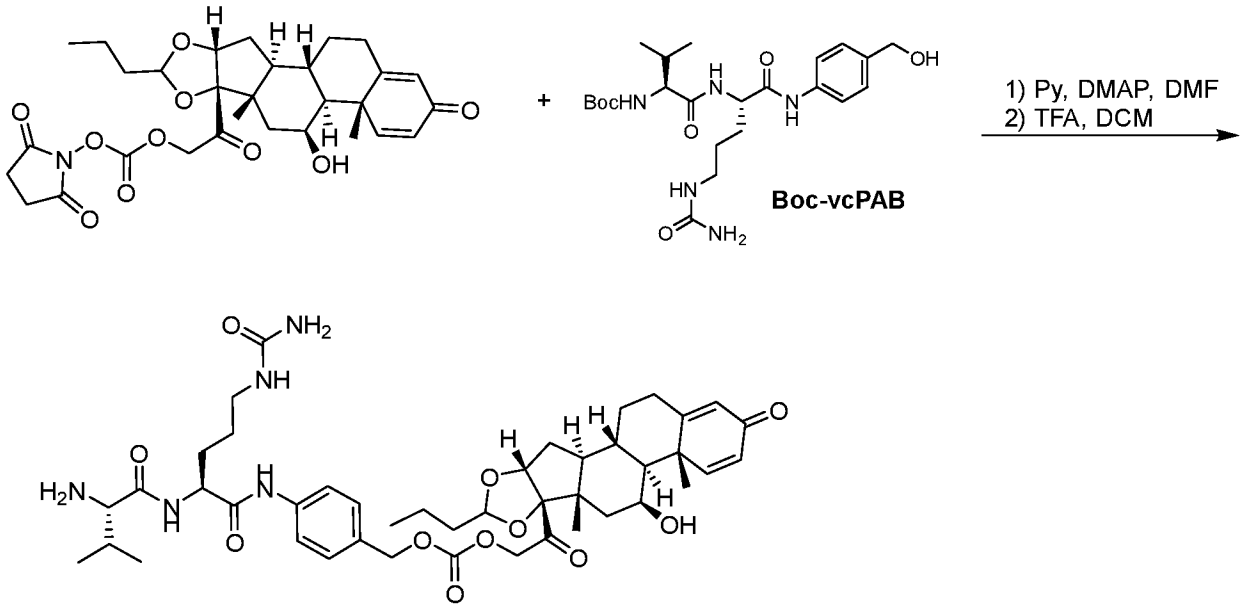
Спейсер-будесонид 21		Активирован-ный эфир 23		Основание/ реактивы	Растворитель	Вре-мя (ч)	Очист-ка	Про-дукт 2
1e	15 мг, 28 ммоль	**11a**	15 мг, 20 ммоль	DIPEA (12 мг, 93 ммоль) HOBt (4.0 мг, 30 ммоль)	DMF (1 мл)	12	Преп-ВЭЖХ (способ A)	**2j** (3.0 мг, 13%)
1d	20 мг, 37 ммоль	**11a**	22 мг, 30 ммоль	DIPEA (12 мг, 93 ммоль) HOBt (6.0 мг, 44 ммоль)	DMF (1 мл)	12	Преп-ВЭЖХ (способ A)	**2k-A** (3.3 мг, 10%) **2k-B** (4.1 мг, 12%)
1k	50 мг, 90 ммоль	**11c**	30 мг, 95 ммоль	DIPEA (50 мг, 0.39 ммоль)	DMF (1 мл)	3	Преп-ВЭЖХ (способ B)	**2r** (40 мг, выход 61%)

Синтез 2a-d

[0676] Будесонид-линкеры **2a-d** приготовили с использованием трех подходов согласно Схеме 2. Первый подход заключался в реакциях связывания амидов от vcPAB-Будесонида (**4a**), полученного из активированного эфира будесонида **3a** с линкерами **5**.

Второй подход осуществлялся через первоначальные реакции связывания амидов от vcPAB-Будесонида (**4a**) с промежуточным соединением **6a**, в результате чего получили Будесонид-Линкеры **7**, с последующей 3+2 циклизацией с галактоза-азидом (**8a**), в результате чего получили промежуточные соединения **9**, и, в завершение, вторичными реакциями связывания амидов с **5**. Третий подход осуществлялся через первоначальные реакции связывания амидов **4** с промежуточным соединением **6b**, с последующим образованием амида **5b** и последовательным удалением защитных групп ацетона, в результате чего получили **2d**.

Промежуточное соединение 4a



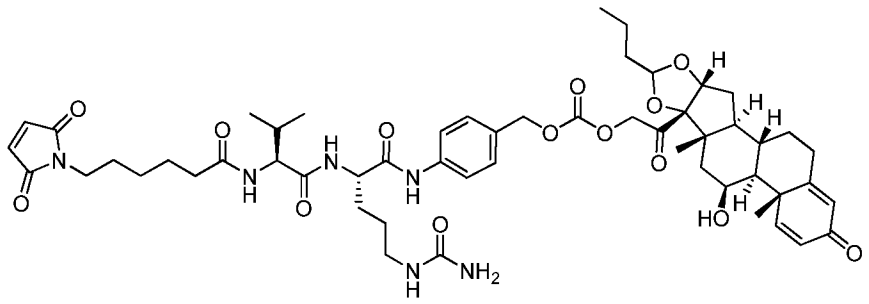
4a

[0677] 1.4 ммоль) в сухом DMF (10 мл) добавили Boc-vc-PAB (**12a**) [WO2008/34124 A2] (0.59 г, 1.2 ммоль), DMAP (0.30 г, 2.4 ммоль) и пиридин (0.29 г, 3.7 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов до полного израсходования **3a** согласно ЖХМС. Реакционную смесь очистили напрямую посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (50-80% ацетонитрил в воде) и получили промежуточное соединение **Boc-4a** (0.74 г, выход 38%, ИЭР **м/з**: 936 (M + H)$^+$) в виде белого твердого вещества, которое растворили в DCM (40 мл). К 5 мл раствора DCM (содержащего 94 мг **Boc-4a**) добавили TFA (0.5 мл) по каплям при 0 °C. После перемешивания при КТ в течение 1.5 часов до израсходования **Boc-4a** под контролем ЖХМС полученную смесь сконцентрировали in vacuo и получили сырой продукт, указанный в заголовке **4a** (83 мг, выход 34% из будесонида) как соль TFA в виде бесцветного масла, который можно применять без очистки для синтеза следующего этапа. 20 мг сырого соединения **4a**

очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили чистое соединение **4a** (8 мг) как свободное основание для проверки на стабильность в плазме. ИЭР **м/з**: 836 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.17 (s, 1H), 8.12 (br s, 1H), 7.62 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 7.31 (d, J = 10.2 Гц, 3H), 6.17 (d, J = 10.1 Гц, 1H), 5.97 (t, J = 5.7 Гц, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.22-5.01 (m, 4H), 4.89-4.62 (m, 3H), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.30 (s, 1H), 3.09-2.87 (m, 3H), 2.36-2.22 (m, 1H), 2.14-1.87 (m, 4H), 1.81 (d, J = 5.6 Гц, 2H), 1.75 (s, 2H), 1.62-1.52 (m, 4H), 1.51-1.41 (m, 2H), 1.40-1.19 (m, 8H), 1.18-0.92 (m, 2H), 0.92-0.82 (m, 9H), 0.78 (d, J = 6.8 Гц, 3H) ppm.

Пример 2a

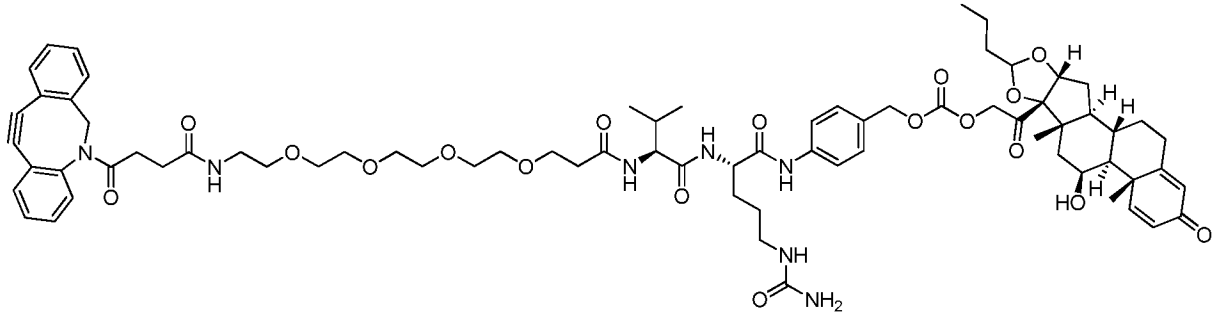
***N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)гексанамид (2a)**



[0678] В соответствии с общей процедурой A получили указанное в заголовке соединение **2a** (10 мг, выход 17%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 1029 (M + H)$^+$. Анал. ВЭЖХ: 92.5%, Время удерживания: 7.66 мин (способ A).

Пример 2b

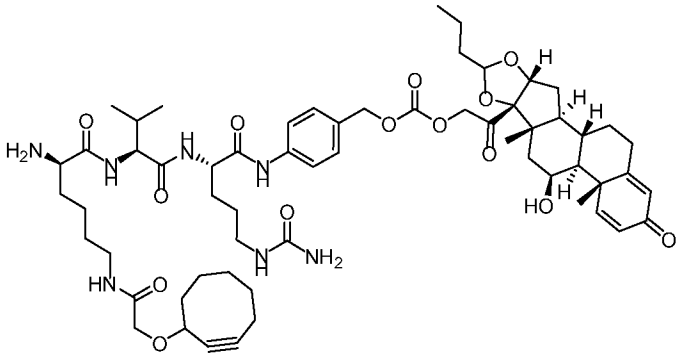
1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанам-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-идо)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (2b)



[0679] В соответствии с общей процедурой B получили указанное в заголовке соединение **2b** (3.0 мг, выход 21%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 686 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 10.05 (s, 1H), 8.15 (d, J = 7.5 Гц, 1H), 7.88 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.77 (t, J = 5.7 Гц, 1H), 7.71-7.66 (m, 1H), 7.66-7.59 (m, 3H), 7.52-7.27 (m, 9H), 6.17 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 6.03-5.95 (m, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.79-5.74 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.22-4.99 (m, 6H), 4.88-4.84 (m, 1H), 4.84-4.60 (m, 2H), 4.42-4.34 (m, 1H), 4.33-4.26 (m, 1H), 4.26-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.48-3.44 (m, 12H), 3.32-3.26 (m, 2H), 3.12-2.91 (m, 4H), 2.63-2.54 (m, 1H), 2.41-2.19 (m, 3H), 2.03-1.94 (m, 4H), 1.84-1.78 (m, 2H), 1.63-1.22 (m, 14H), 1.03-0.82 (m, 15H) ppm. Анал. ВЭЖХ: 96.9%, Время удерживания: 8.10 мин (способ B).

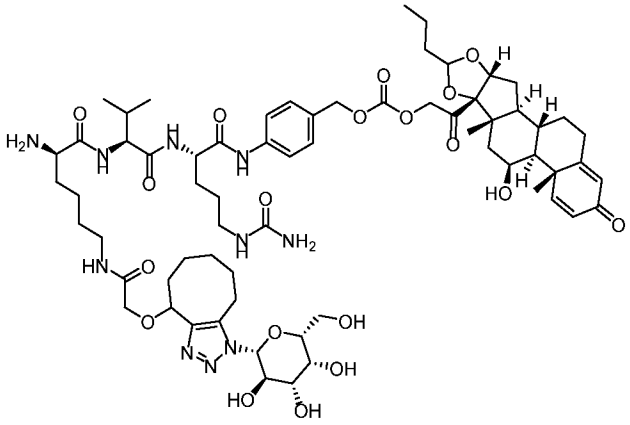
Пример 2c

(2*R*)-2-амино-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]гексанамид (7)



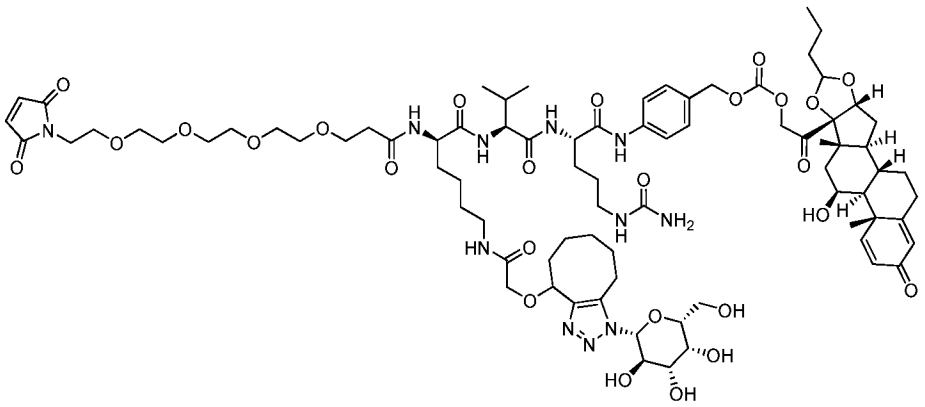
[0680] ИЭР **м/з**: 565 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 10.17-10.00 (m, 1H), 8.47-7.73 (m, 2H), 7.69-7.57 (m, 3H), 7.38-7.26 (m, 3H), 6.17 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.23-5.01 (m, 4H), 4.88-4.61 (m, 3.4H), 4.43-4.16 (m, 4.6H), 3.85 (d, J = 14.7 Гц, 1H), 3.73 (d, J = 14.5 Гц, 1H), 3.23-3.18 (m, 1H), 3.09-2.90 (m, 4H), 2.33-2.18 (m, 3H), 2.18-2.04 (m, 3H), 2.03-1.66 (m, 10H), 1.64-1.50 (m, 7H), 1.49-1.22 (m, 13H), 1.17-0.90 (m, 4H), 0.90-0.79 (m, 12H) ppm.

(2*R*)-2-амино-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-6-[2-({1-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил}окси)ацетамидо]гексанамид (9)



[0681] После фильтрации полученный раствор **9** использовали для следующего этапа. ИЭР **м/з**: 667 (M/2 + H)$^+$

***N*-[(1*R*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-5-[2-({1-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]-4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил}окси)ацетамидо]пентил]-1-(2,5-диоксопиррол-1-ил)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (Mc-ПЭГ$_4$-*N*(сахар-COT)Lys-vc-PAB-Будесонид) (2c)**

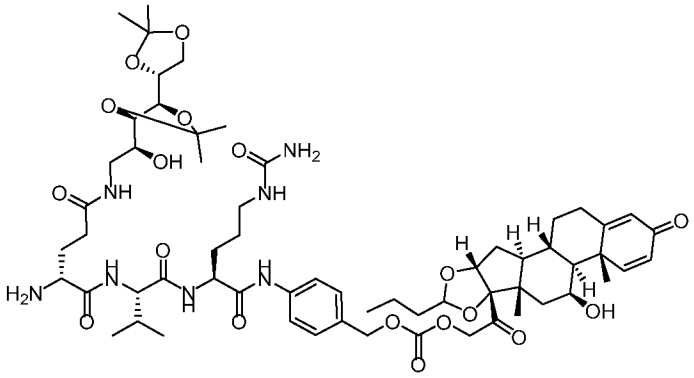


[0682] ИЭР **м/з**: 831 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.73 (s, 1H), 8.21-8.07 (m, 3H), 7.94-7.82 (m, 1H), 7.71-7.59 (m, 3H), 7.39-7.26 (m, 4H), 7.02 (s, 1H), 6.17 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 6.09-5.98 (m, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.56-5.28 (m, 4H), 5.25-5.01 (m, 4H),4.90-4.62 (m, 5H), 4.39-4.13 (m, 5H), 3.84-3.69 (m, 4H), 3.59-3.40 (m, 16H), 3.17-2.79 (m, 9H), 2.43-1.71 (m, 13H), 1.71-1.42 (m, 15H), 1.40-1.19 (m, 11H), 1.04-0.77 (m, 15H) ppm. Анал. ВЭЖХ: 97.6%, Время удерживания: 7.63 мин (способ A).

Пример 2d

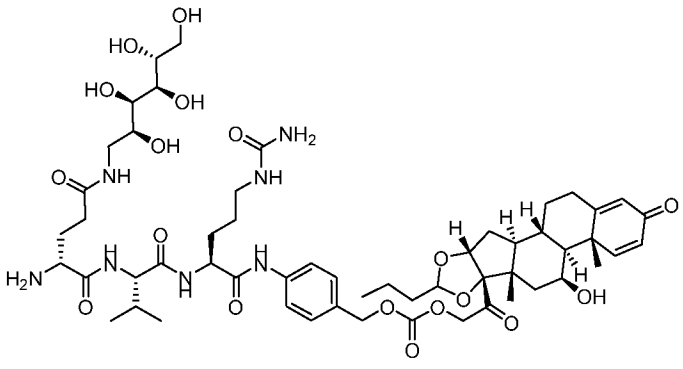
(2*R*)-2-амино-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2-

[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-*N'*-[(2*S*)-2-[(4*R*,5*R*)-5-[(4*R*)-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-ил]-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-ил]-2-гидроксиэтил]пентандиамид (**10**)



[0683] В соответствии с общей процедурой C получили соединение **10** (13 мг, выход 5%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 605 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 10.08 (s, 1H), 8.34-8.17 (m, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.93-7.81 (m, 1H), 7.62 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.42-7.26 (m, 3H), 6.17 (d, J = 10.1 Гц, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.23-5.01 (m, 4H), 4.91-4.61 (m, 4H), 4.43-4.20 (m, 3H), 4.10-3.72 (m, 6H), 3.60-3.54 (m, 1H), 3.24-3.09 (m, 2H), 3.07-2.91 (m, 2H), 2.32-2.25 (m, 1H), 2.22-2.10 (m, 2H), 2.04-1.93 (m, 2H), 1.88-1.67 (m, 5H), 1.64-1.22 (m, 27H), 1.17-0.93 (m, 3H), 0.91-0.81 (m, 12H) ppm.

(2*R*)-2-амино-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-*N'*-[(2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексил]пентандиамид (**10A**)

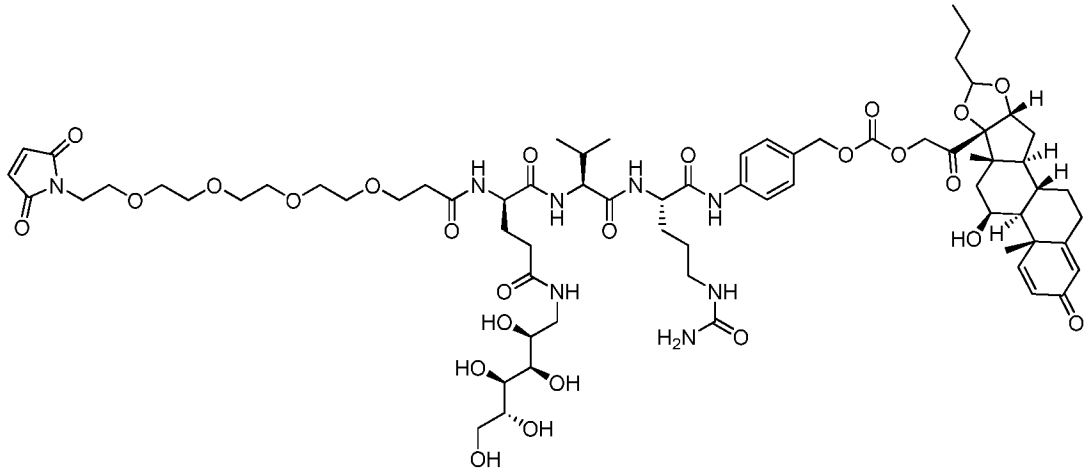


[0684] К смеси соединения **10** (13 мг, 11 ммоль) в DCM (1 мл) добавили TFA (1 мл) по каплям. Смесь перемешивали при КТ в течение часа под контролем ЖХМС. Летучие

вещества удалили *in vacuo* и получили сырой продукт со снятыми защитными группами **10A** (13 мг) в виде светло-желтого масла, который использовали для следующего этапа без дальнейшей очистки. ИЭР **м/з**: 565 (M/2 + H)$^+$.

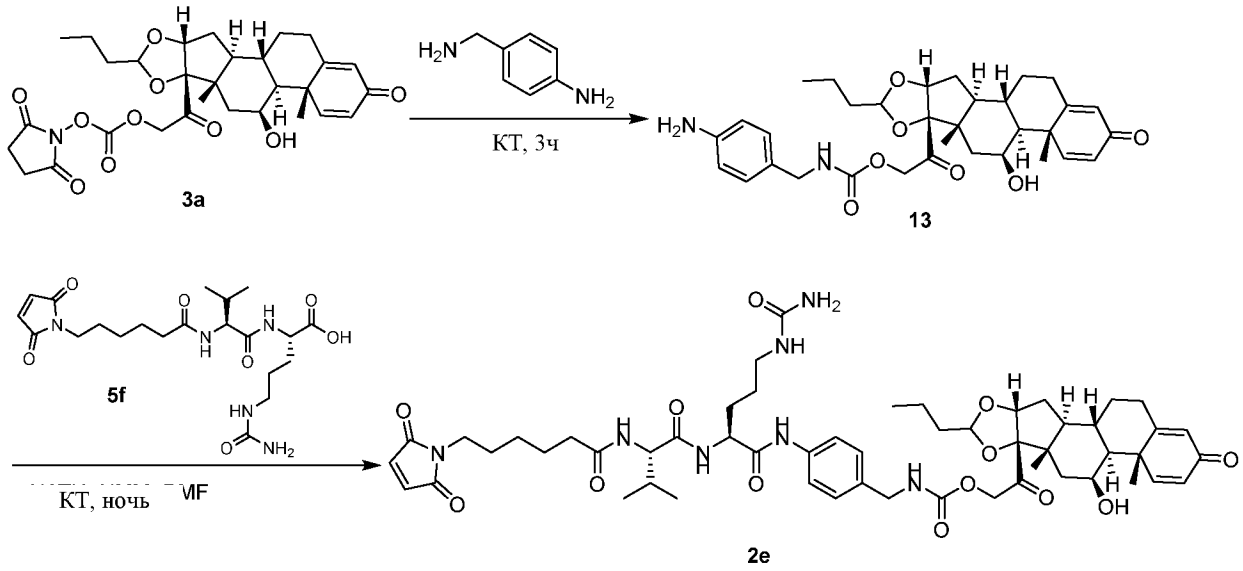
(2*R*)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-

9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-2-[1-(2,5-диоксопиррол-1-ил)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-*N'*-[(2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексил]пентандиамид (2d)



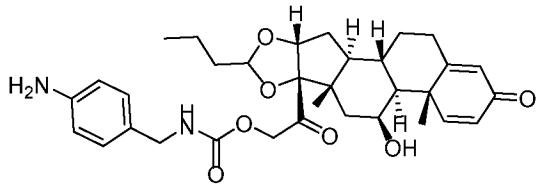
[0685] В соответствии с общей процедурой A получили указанное в заголовке соединение **2d** (3.5 мг, общий выход 1% из **4a**) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 829.7 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 10.10 (s, 0.25H), 9.79 (s, 0.75H), 8.22 (d, J = 7.1 Гц, 1H), 8.12 (d, J = 7.5 Гц, 1H), 8.07 (d, J = 7.8 Гц, 1H),7.79-7.71 (m, 1H), 7.69-7.60 (m, 2H), 7.38-7.27 (m, 4H), 7.02 (d, J = 1.4 Гц, 2H), 6.17 (dt, J = 7.6, 1.6 Гц, 1H), 6.03-5.97 (m, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.46-5.40 (m, 2H), 5.35-5.02 (m, 4H), 4.89-4.61 (m, 4H), 4.50-4.45 (m, 1H), 4.40-4.16 (m, 7H), 3.65-3.37 (m, 21H), 3.07-2.90 (m, 3H), 2.44-2.23 (m, 4H), 2.17-1.93 (m, 6H), 1.90-1.71 (m, 4H), 1.62-1.20 (m, 15H), 1.06-0.76 (m, 15H) ppm. Анал. ВЭЖХ: >99%, Время удерживания: 6.40 мин (способ A).

Схема 3. Синтез 2e



Пример 2e

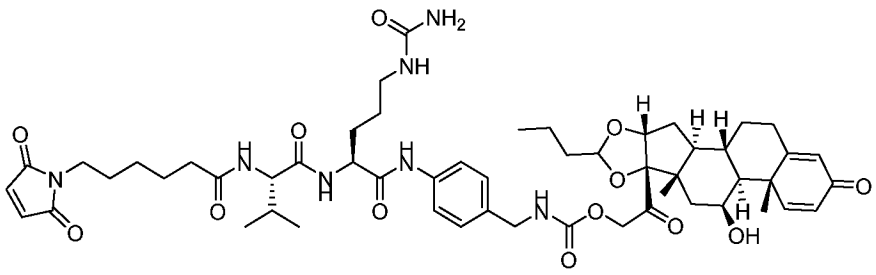
2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-[(4-аминофенил)метил]карбамат (13)



[0686] К раствору 4-аминобензиламина (9.7 мг, 79 ммоль) и DIPEA (12 мг, 93 ммоль) в THF (10 мл) добавили раствор **3a** (24 мг, 44 ммоль) в THF (5.0 мл) по каплям при КТ. Смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до полного израсходования **3a** под контролем ЖХМС. Летучие вещества удалили in vacuo и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **13** (5.6 мг, выход 22%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 579.2 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $MeOD_{d4}$) δ 7.48-7.45 (m, 3H), 7.31-7.28 (m, 2H), 6.27-6.24 (m, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.22 (m, 1H), 5.12-5.11 (m, 1 H), 4.96 (m, 1 H), 4.86-4.81 (m, 2 H), 4.66 (m, 1 H), 4.44-4.35 (m, 3 H), 2.66-2.65 (m, 1H), 2.40-2.36 (m, 1 H), 2.15-2.10 (m, 2 H), 1.97-1.60 (m, 6H), 1.53-1.36 (m, 6H), 1.09-0.92 (m, 7H) ppm.

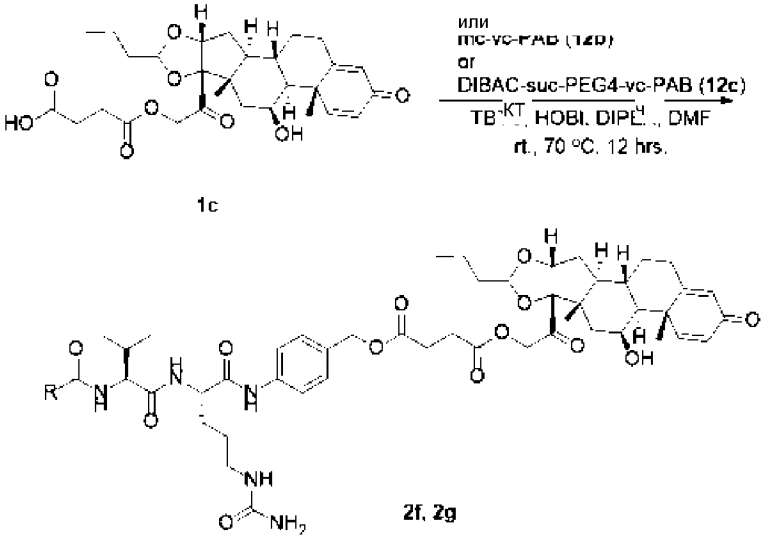
2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-({4-[(2*S*)-5-

(карбамоиламино)-2-[(2*S*)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метил)карбамат (2e)



[0687] К смеси MC-VC-OH **5f** (WO2014/191578 A1) (5.7 мг, 12 ммоль) в сухом DMF (1.5 мл) добавили HATU (4.6 мг, 12 ммоль) и NMM (4.0 мг, 40 ммоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ в течение 10 минут и затем к реакционной смеси добавили соединение **13** (4.7 мг, 8.1 ммоль). Полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Соединение **13** было полностью израсходовано, и желаемый продукт определили как основной продукт согласно ЖХМС. Смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ и получили указанное в заголовке соединение **2e** (2.9 мг, выход 35%) в виде белого твердого вещества. ЭР **м/з**: 1029.1 $(M + H)^+$, 514.7 $(M/2 + H)^+$. Анал. ВЭЖХ: >99%, Время удерживания: 7.54 мин (способ A).

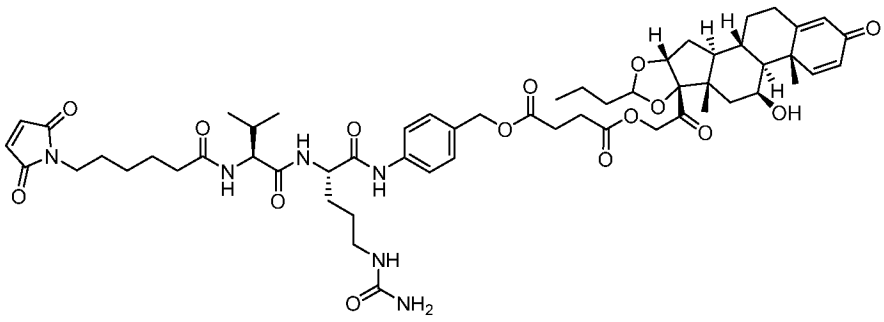
Схема 4. Синтез линкер-спейсер-будесонида (через эфир) 2f и 2g



Соед. №	R
2f	MC
2g	DIBAC-suc-PEG4

Пример 2f

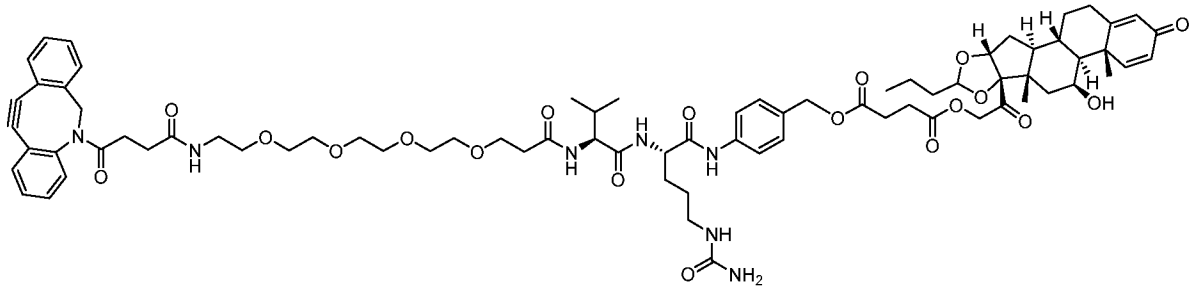
1-{4-[(2*S*)-5-(карбамоиламино)-2-[(2*S*)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метил 4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил} бутандиоат (2f)



[0688] К раствору **1c** (20 мг, 38 ммоль) в DMF (2 мл) добавили MC-VCPAB (**12b**, 0.11 г, 0.19 ммоль), TBTU (63 мг, 0.19 ммоль), HOBt (26 мг, 0.19 ммоль) и DIPEA (41 мг, 0.19 ммоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали при 70 °C в течение 12 часов. Согласно ЖХМС, больше продукт **2f** не образовался. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ A) и получили указанное в заголовке соединение **2f** (2.6 мг, выход 6%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 1085.3 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.55-7.52 (m, 1H), 7.34-7.30 (m,1H), 6.67 (br s, 1H), 6.30-6.27 (m, 1H), 6.03 (br s, 1H), 5.16-5.11 (m, 2H), 5.09-4.87 (m, 2H), 4.80-4.61 (m, 1H), 4.60-4.30 (m, 2H), 3.47-3.44 (m, 1H), 3.21-3.10 (m, 1H), 3.03-2.96 (m, 2H), 2.79-2.55 (m, 4H), 2.35-1.73 (m, 28H), 1.71-1.32 (m, 15H), 1.29-1.07 (m, 4H), 0.99-0.85 (m, 9H) ppm.

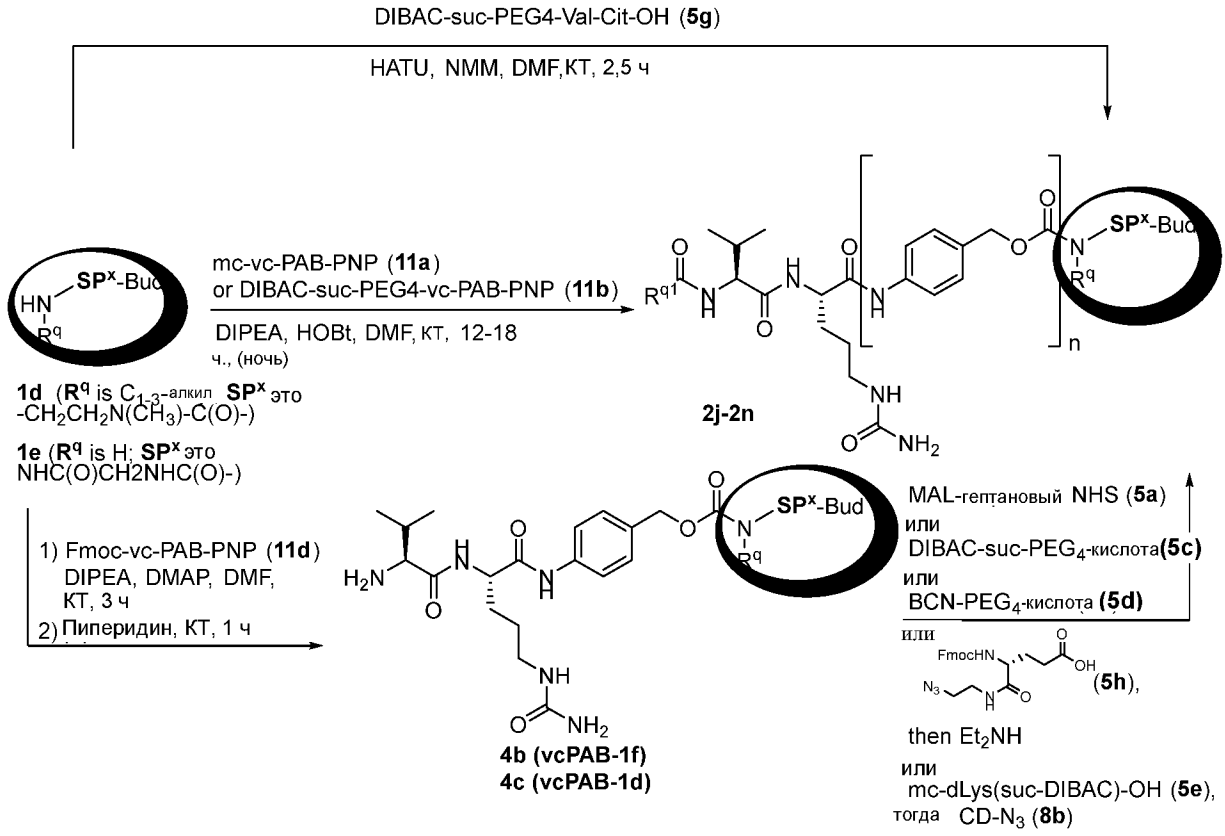
Пример 2g

1-{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил 4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил} бутандиоат (2g)



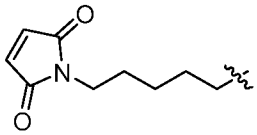
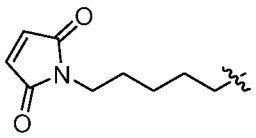
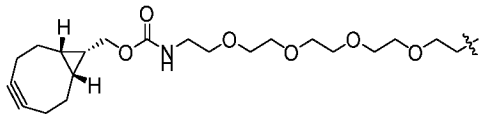
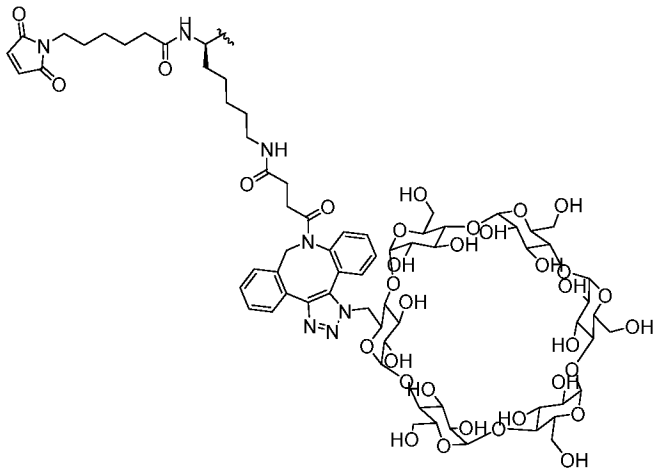
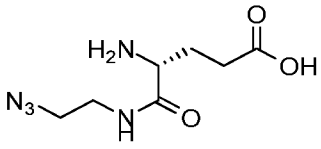
[0689] В соответствии с процедурами **примера 2f**, за исключением замены **12b** на DIBAC-suc-PEG4-vc-PAB (**12c**), получили указанное в заголовке соединение **2g** (15 мг, выход 19%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 714 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $MeOD_{d4}$) δ 7.67-7.60 (m, 4H), 7.48-7.46 (m, 4H), 7.38-7.32 (m, 4H), 7.26 (d, J = 6.8 Гц, 1H), 6.27 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.24-5.10 (m, 4H), 5.02-4.97 (m, 1H), 4.85-4.66 (m, 2H), 4.61 (s, 1H), 4.53 (dd, J = 9.1, 4.9 Гц, 1H), 4.45-4.43 (m, 1H), 4.22 (dd, J = 6.7, 4.7 Гц, 1H), 3.78-3.69 (m, 3H), 3.60-3.55 (m, 11H), 3.47-3.40 (m, 2H), 3.26-3.10 (m, 4H), 2.78-2.54 (m, 8H), 2.41-2.35 (m, 2H), 2.25-2.11 (m, 4H), 2.02-1.31 (m, 17H), 1.21-0.92 (m, 14H) ppm. Анал. ВЭЖХ: 99.5%, Время удерживания: 7.86 мин (способ B).

Схема 5. Синтез линкер-спейсер-будесонида 2j-2n (через амид или карбамат)



[0690] На Схеме 5 Bud означает будесонид.

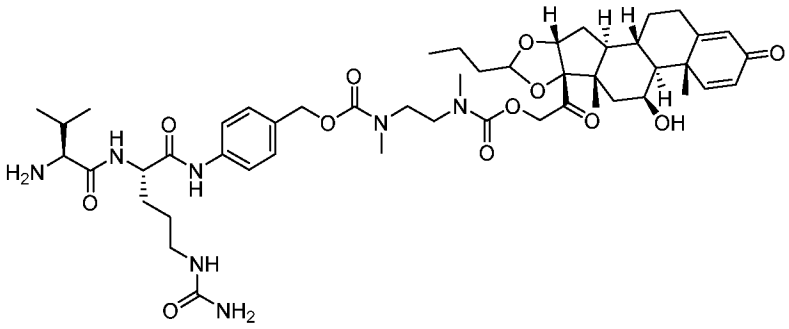
[0691] Большинство Будесонид-Линкеров (**2**), имеющих компонент VC-PAB, синтезировали с использованием трех подходов через амид или карбамат (Схема 5). Соединения **1d**, **1e** конъюгировали по-отдельности с линкерами посредством связывания амидов и получили амид или карбамат (Схема 5). В нижеприведенной таблице указана дополнительная информация.

Соед. №	**R^{q1} in 2j, 2k, 2l, 2m, 2n**	**n in 2j-n**	R^{q}-NH-Спейсер-Будесонид
2j		1	**1e**
2k		1	**1d**
2l		1	**1d**
2m		1	**1d**
2n		1	**1d**

Промежуточное соединение 4c

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-(2-{[({4-

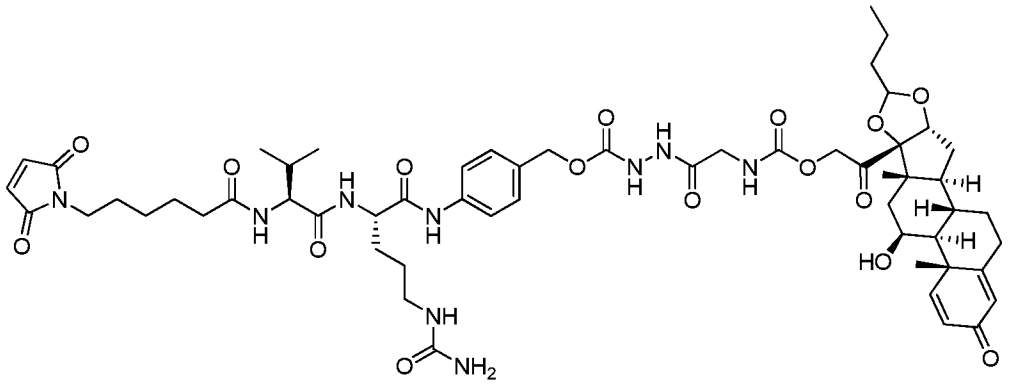
[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](метил)амино}этил)-*N*-метилкарбамат (4c)



[0692] К раствору соединения **1d** (40 мг, 73 ммоль) в DMF (3 мл) добавили Fmoc-vcPAB-PNP (**11d**, 60 мг, 78 ммоль), DMAP (9.0 мг, 74 ммоль) и DIPEA (20 мг, 0.16 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до израсходования большей части исходных материалов под контролем ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (1 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение часа до завершения реакции de-Fmoc под контролем ЖХМС, реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **4c** (9.0 мг, выход 13%, 2ой пик в ЖХ) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 951 $(M + H)^+$, 973 $(M + Na)^+$.

Пример 2j

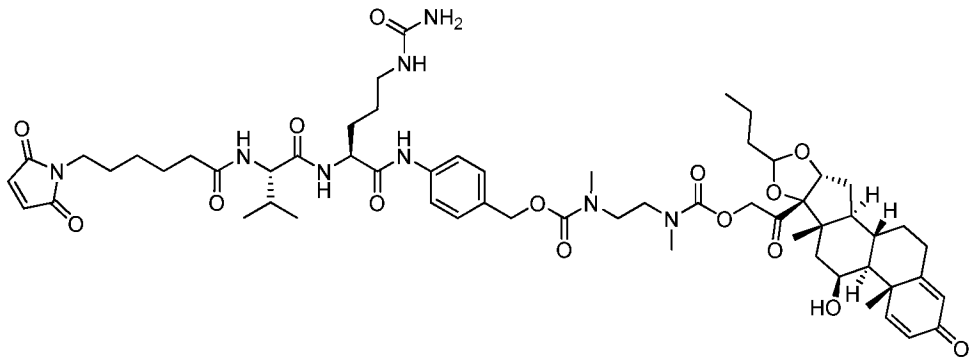
2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-({*N'*-[({4-[(2*S*)-5-(карбамоиламино)-2-[(2*S*)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]гидразинкарбонил}метил)карбамат (2j)



[0693] ИЭР **м/з**: 1144.3 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 10.02 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.12 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 7.83 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 7.73-7.70 (m, 1H), 7.61-7.59 (m, 2H), 7.32-7.29 (m, 3H), 7.01 (s, 2H), 6.19-6.16 (m, 1H), 6.00-5.92 (m, 2H), 5.05-5.00 (m, 2H), 4.95-4.85 (m, 2H), 4.71-4.62 (m, 2H), 4.40-4.17 (m, 3H), 3.71-3.58 (m, 2H), 3.45-3.39 (m, 2H), 3.06-2.89 (m, 3H), 2.33-2.28 (m, 2H), 2.20-2.07 (m, 3H), 2.02-1.91 (m, 3H), 1.81-1.75 (m, 2H), 1.75-1.62 (m, 2H), 1.60-1.44 (m, 11H), 1.42-1.20 (m, 6H), 1.19-1.12 (m, 4H), 1.00-0.92 (m, 2H), 0.88-0.81 (m, 10H) ppm.

Пример 2k

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-(2-{[({4-[(2*S*)-5-(карбамоиламино)-2-[(2*S*)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](метил)амино}этил)-*N*-метилкарбамат (2k-A и 2k-B)



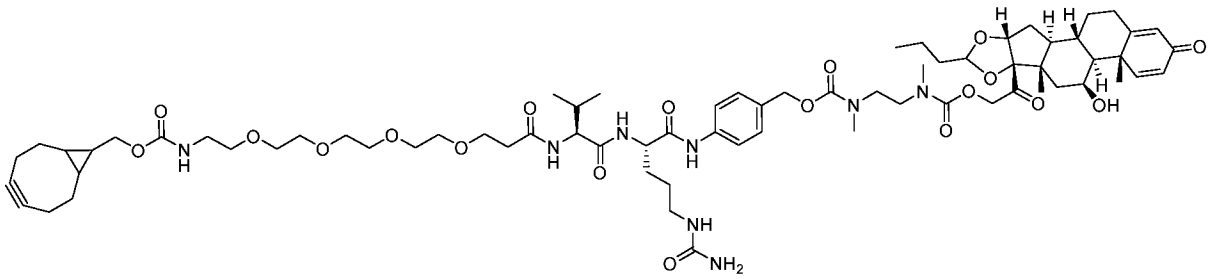
[0694] В соответствии с общей процедурой D получили указанные в заголовке соединениях **2k-A** (3.3 мг, выход 10%, второй пик в ЖХ) и **2k-B** (4.1 мг, выход 12%, первый пик в ЖХ) как диастереоизомеры в виде белых твердых веществ.

2k-A: ИЭР **м/з**: 1143.4 (M + H)$^+$, Время удерживания: 1.70 мин (способ A).

2k-B : ИЭР **м/з**: 1143.4 (M + H)$^+$, Время удерживания: 1.65 мин (способ A).

Пример 2l

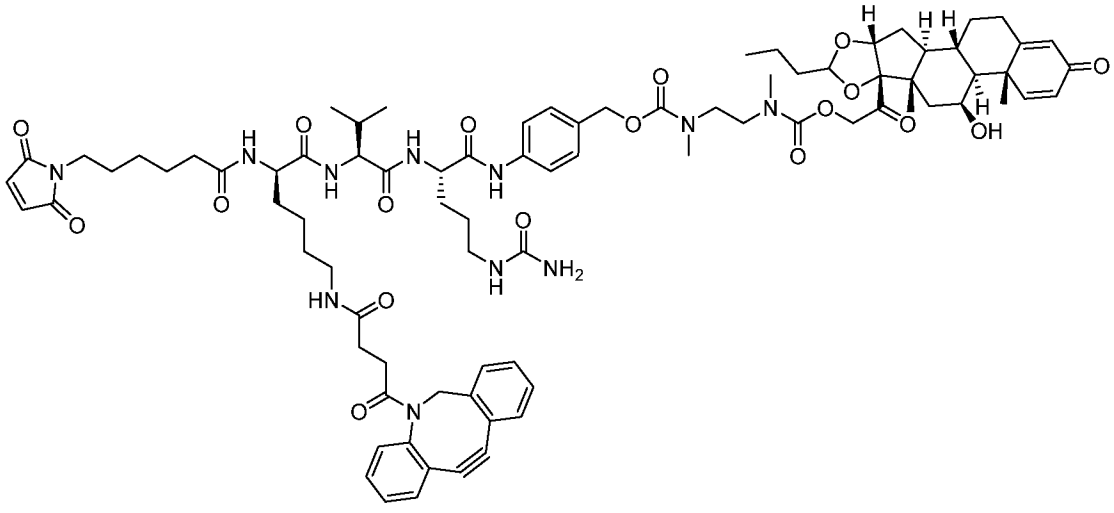
Бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил *N*-(14-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({2-[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)(метил)амино]этил}(метил)карбамоил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксатетрадекан-1-ил)карбамат (2l)



[0695] ИЭР **м/з**: 687.5 (M/2 + H)$^+$, 1396.8 (M + Na)$^+$ (50%), ^{1}H ЯМР (500 МГц, MeOD$_{d4}$) δ 7.66 (d, J = 7.5 Гц, 2H), 7.50 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 7.36 (d, J = 7.0 Гц, 2H), 6.28 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.15-5.05 (m, 2H), 4.87-4.62 (m, 4H), 4.53(s, 1H), 4.46(s, 1H), 4.21 (d, J = 6.5 Гц, 1H), 4.16 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 3.83-3.72 (m, 2H), 3.66-3.60 (m, 12H), 3.56-3.52 (m, 3H), 3.49-3.42 (m, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.25-3.09 (m, 3H), 3.02-2.96 (m, 4H), 2.87 (dd, J = 16.6, 4.8 Гц, 2H), 2.72-2.64 (m, 1H), 2.58 (t, J = 6.0 Гц, 2H), 2.40 (d, J = 13.1 Гц, 1H), 2.31-2.10 (m, 9H), 2.01-1.91 (m, 3H), 1.81-1.70 (m, 2H), 1.63 (s, 7H), 1.51 (s, 3H), 1.48-1.30 (m, 4H), 1.11 (s, 1H), 1.02-0.91 (m, 15H) ppm. Анал. ВЭЖХ: > 99.9%, Время удерживания: 9.40 мин (способ A).

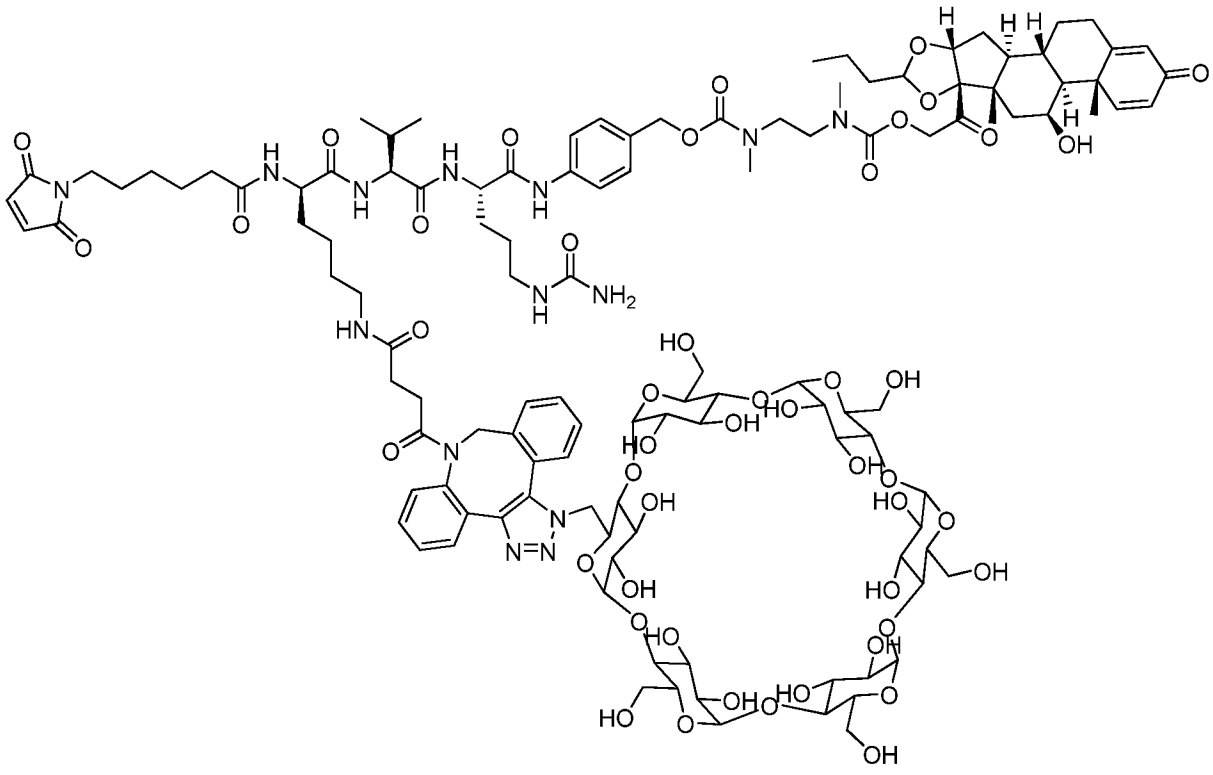
Пример 2m

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-(2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-6-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](метил) амино}этил)-*N*-метилкарбамат (2m-предшественник)



[0696] В соответствии с общей процедурой B получили сырое соединение **2m-предшественник** (предшественник **2m**) (5 мг) в виде светло-желтого масла, которое использовали для следующего этапа. *ИЭР* **м/з**: 780 $(M/2 + H)^+$

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-(2-{[({4-[(2*S*)-5-(карбамоиламино)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)гексанамидо]-6-[4-(3-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-3,4,5,13-тетраазатетрацикло[13.4.0.0^{2,6}.0^{7,12}]нонадека-1(15),2(6),4,7(12),8,10,16,18-октаен-13-ил)-4-оксобутанамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси) карбонил](метил)амино}этил)-*N*-метилкарбамат (2m)

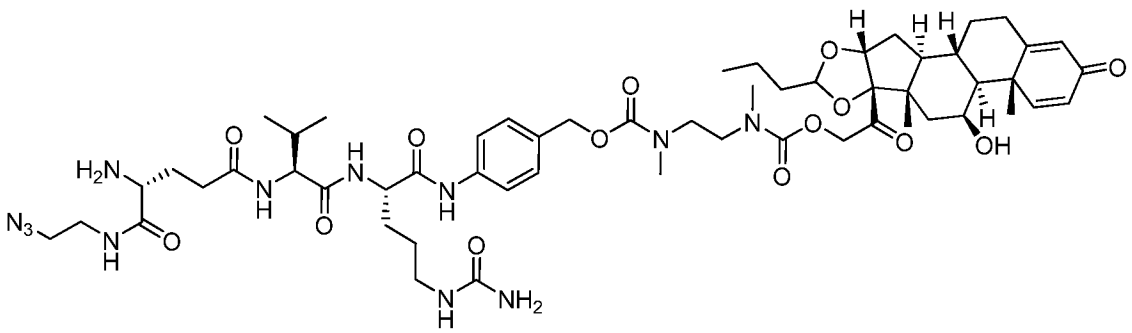


[0697] К раствору сырого соединения **2m** (5 мг) в DMF (1 мл) добавили CD-N_3 (**8b**, 63 мг, 63 ммоль). Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 72 часов под контролем

ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ A) и получили соединение **2m** (2 мг, выход 4% из **4c**) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 1278.8 (M/2 + H)$^+$. Анал. ВЭЖХ: 97.9%, Время удерживания: 6.49 мин (способ A).

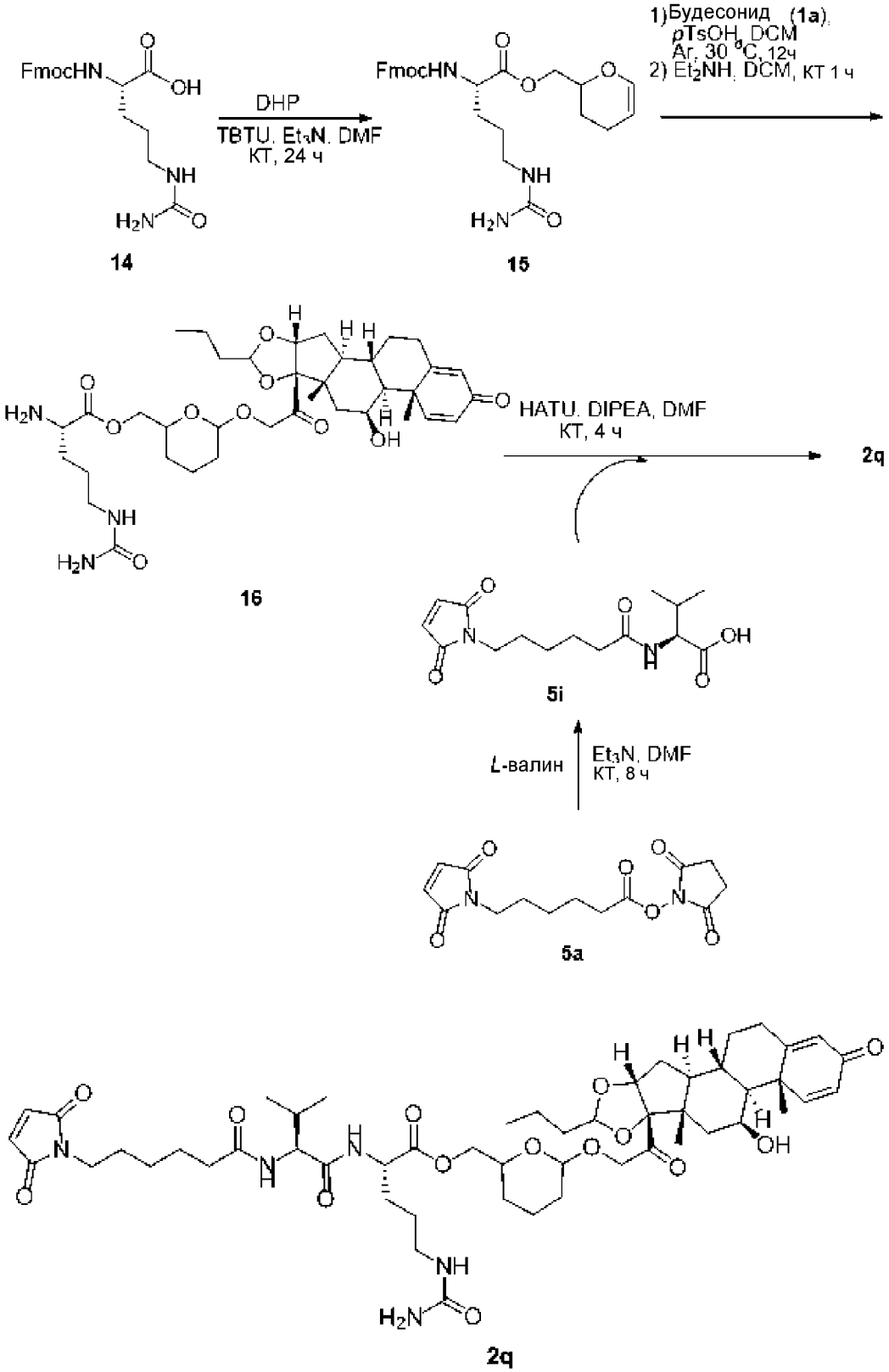
Пример 2n

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-(2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(4*R*)-4-амино-4-[(2-азидоэтил)карбамоил]бутанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](метил)амино}этил)-*N*-метилкарбамат (2n)



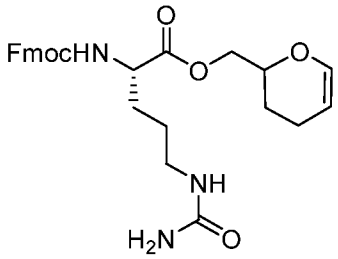
[0698] Затем реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Соединение **4c** было полностью израсходовано согласно ЖХМС. Смесь выделили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и после лиофилизации получили соединение **Fmoc-2n** (20 мг), которое растворили в DMF (2 мл). К раствору DMF добавили диэтиламин (4 капли, *с.а.* 0.08 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов до завершения реакции de-Fmoc под контролем ЖХМС. Смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и раствор очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили указанное в заголовке соединение **2n** (10 мг, выход 8.4%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 1147 (M + H)$^+$. Анал. ВЭЖХ: 99.6%, Время удерживания: 5.67 мин (способ A); 7.72 мин (способ B).

Схема 6. Синтез Линкер-Будесонида 2q (THP аналог)



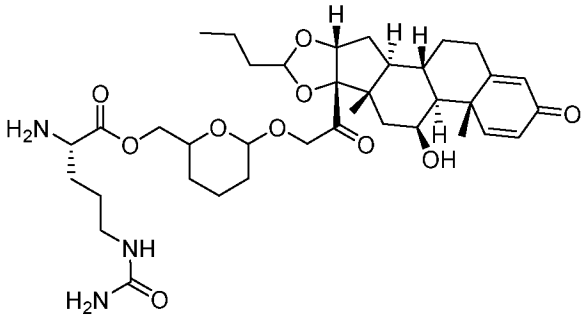
Пример 2q

(2*S*)-(3,4-Дигидро-2*H*-пиран-2-ил)метил 2-(((9*H*-флуорен-9-ил)метокси)карбониламино)-5-уреидопентаноат (15)



[0699] К смеси Fmoc-Cit-OH (**14**, 0.29 г, 0.73 ммоль) в DMF (5 мл) добавили DHP (0.10 мг, 0.88 ммоль), TBTU (0.70 г, 2.2 ммоль) и триэтиламин (0.37 г, 3.7 ммоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 24 часов. 15% желаемой массы определили посредством ЖХМС. Реакционную смесь погасили водой (30 мл) и экстрагировали этилацетатом (10 мл x 3). Объединенный органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали in vacuo. Сырой продукт очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде) и получили указанное в заголовке соединение **15** (110 мг, выход 30%) в виде бесцветного масла. ИЭР **м/з**: 494 $(M + H)^+$.

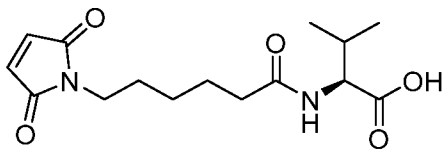
(6-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}оксан-2-ил)метил (2*S*)-2-амино-5-(карбамоиламино)пентаноат (16)



[0700] К раствору соединения **15** (80 мг, 0.16 ммоль) в безводном DCM (3 мл) добавили раствор будесонида (**1a**, 70 мг, 0.16 ммоль) и *p*-толуолсульфоновую кислоту (42 мг, 0.24 ммоль) в безводном DCM (2 мл) при помощи шприца под защитой аргона из баллона при КТ. Реакционную смесь перемешивали при 30 °C под защитой аргона из баллона в течение 12 часов. Большая часть соединения **15** была израсходована согласно ЖХМС.

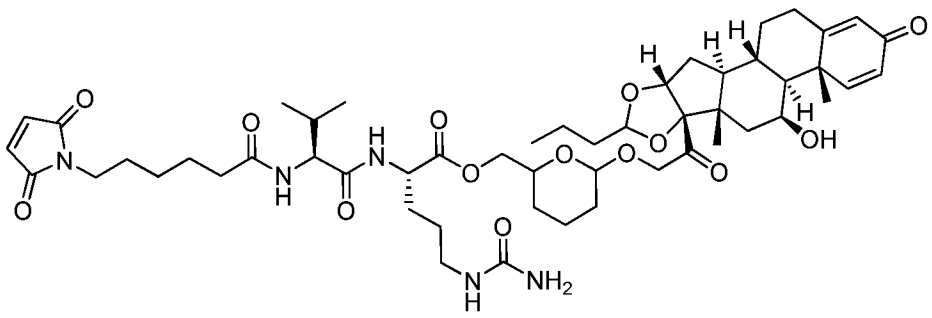
Реакционную смесь охладили до КТ и к реакционной смеси добавили диэтиламин (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 1 часа до завершения реакции de-Fmoc под контролем ЖХМС. Летучие вещества удалили in vacuo и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили указанное в заголовке соединение **16**(17 мг, выход 31%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 702 $(M + H)^+$.

(*S*)-2-(6-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)гексанамидо)-3-метилбутановая кислота (5i)



[0701] К раствору L-валина (0.12 г, 1.0 ммоль) в безводном DMF (2 мл) добавили соединение **5a** (0.31 г, 1.0 ммоль) и триэтиламин (0.51 г, 5.0 ммоль) при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 8 часов до полного израсходования соединения **5a** под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили указанное в заголовке соединение **5i**(0.14 г, выход 46%) в виде бесцветного масла. ИЭР **м/з**: 311 $(M + H)^+$.

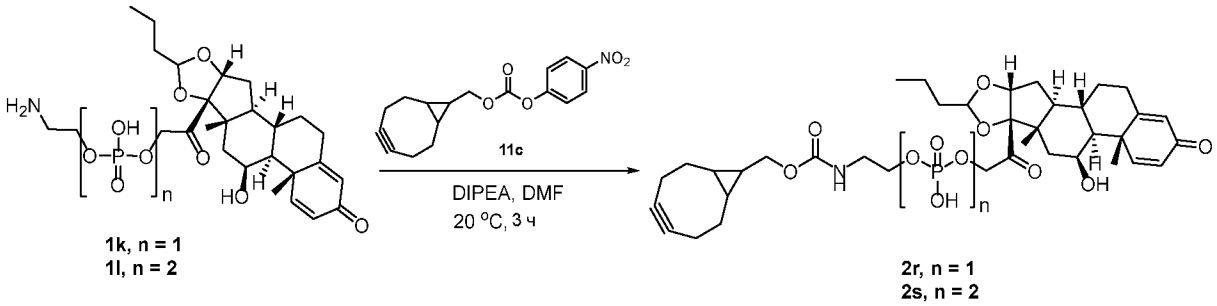
6-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}оксан-2-ил)метил (2*S*)-5-(карбамоиламино)-2-[(2*S*)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентаноат (2q)



[0702] К раствору соединения **5i**(5.8 мг, 19 ммоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (10 мг, 26 ммоль) и DIPEA (6.6 мг, 51 ммоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ в течение 15 минут и к раствору затем добавили соединение **16** (12 мг, 17 ммоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов до полного израсходования соединения

5i, под контролем ЖХМС. Затем реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и раствор очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) дважды и получили указанное в заголовке соединение **2q** (2 мг, выход 12%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 995.3 $(M + H)^+$. Анал. ВЭЖХ: 83.5%, Время удерживания: 10.36 мин (способ B).

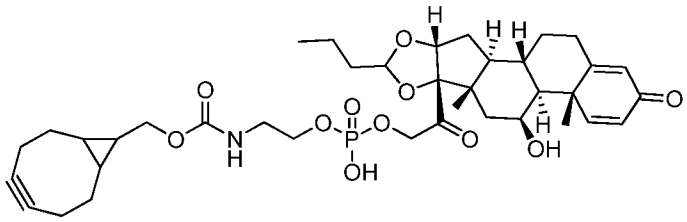
Схема 7. Синтез линкер-фосфат-будесонида 2r и 2s



[0703] Фосфат-будесониды соединили с BCN-PNP (**11c**) и получили BCN-фосфат-Будесониды (соединение **2r** и **2s**) (схема 7).

Пример 2r

{2-[({Бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино]этокси}({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси})фосфиновая кислота (**2r**)

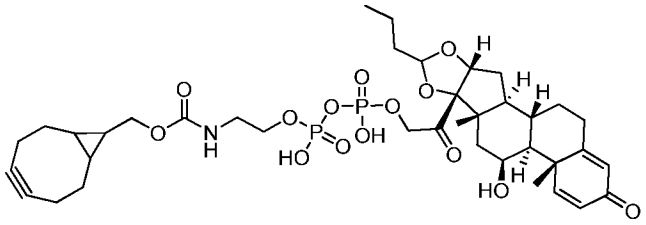


[0704] В соответствии с общей процедурой D получили соединение **2r** (40 мг, выход 61%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 730 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $MeOD_{d4}$) δ 7.49 (d, J = 10.1 Гц, 1H), 6.29-6.26 (m, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.23-5.16 (m, 1H), 4.88-4.64 (m, 3H), 4.45 (dd, J = 8.0, 3.1 Гц, 1H), 4.23-4.13 (m, 2H), 3.97 (dd, J = 11.9, 5.7 Гц, 2H), 3.36 (t, J = 4.7 Гц, 2H), 2.67 (td, J = 13.4, 5.3 Гц, 1H), 2.40 (d, J = 9.6 Гц, 1H), 2.30-1.34 (m, 23H), 1.21-0.92 (m, 10H) ppm. Анал. ВЭЖХ: > 99.9%, Время удерживания: 5.26 мин (способ B).

Пример 2s

{2-[({Бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино]этокси}({[гидрокси({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-

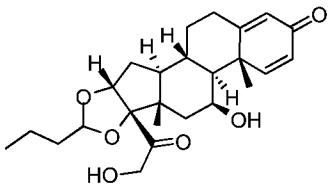
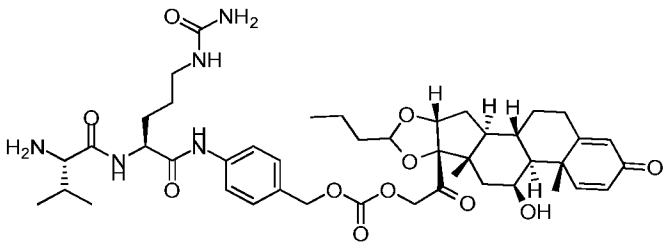
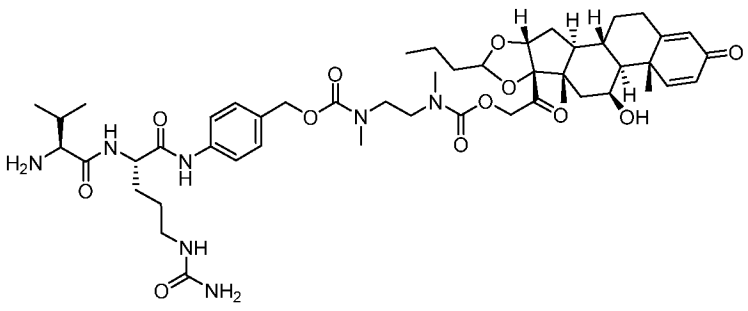
оксоэтокси})фосфорил]окси})фосфиновая кислота (2s)

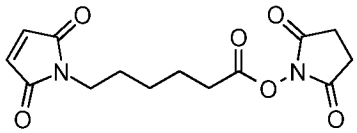
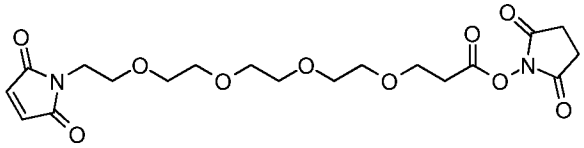
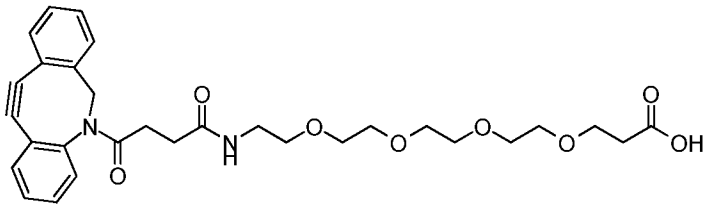
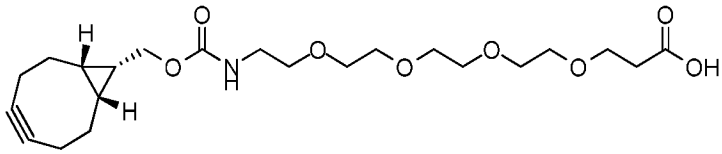
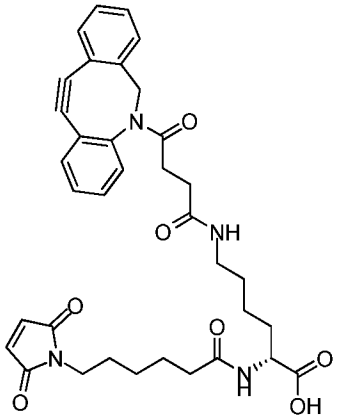


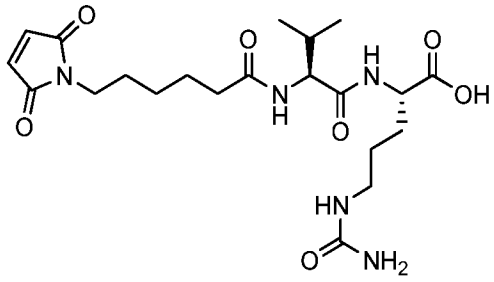
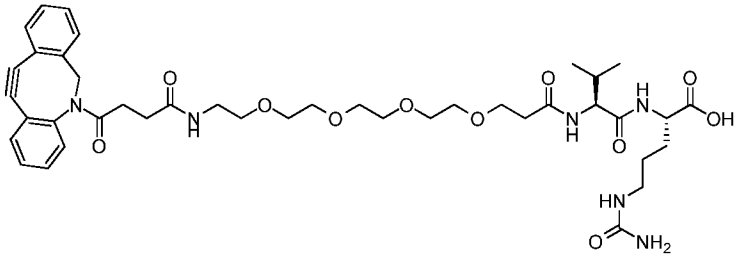
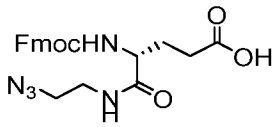
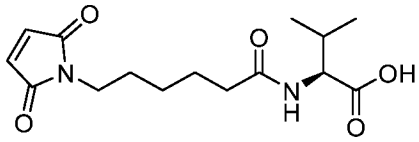
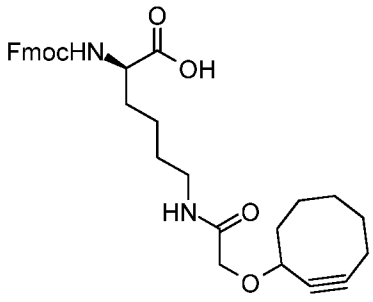
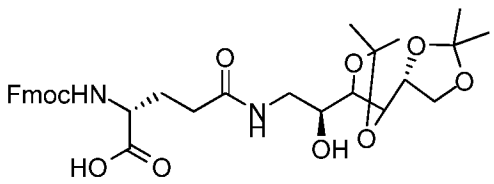
[0705] ИЭР **м/з**: 810 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, MeOD$_{d4}$) δ 7.51 (d, J = 10.1 Гц, 1H), 6.28 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.22-5.16 (m, 1H), 4.98-4.66 (m, 3H), 4.46 (s, 1H), 4.12 (dt, J = 45.0, 13.0 Гц, 4H), 3.39 (t, J = 11.9 Гц, 2H), 2.67 (dd, J = 13.3, 8.0 Гц, 1H), 2.40 (d, J = 11.2 Гц, 1H), 2.30-1.32 (m, 23H), 1.22-0.92 (m, 10H) ppm. Анал. ВЭЖХ: > 99.9%, Время удерживания: 4.03 мин (способ B).

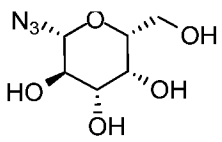
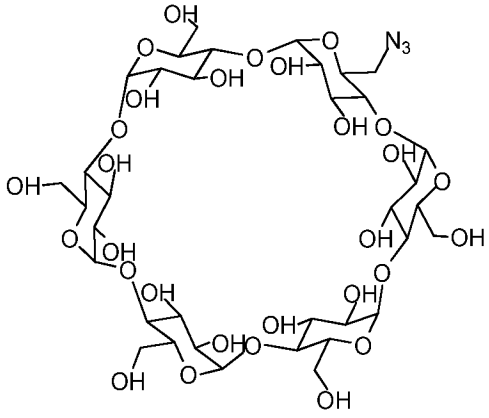
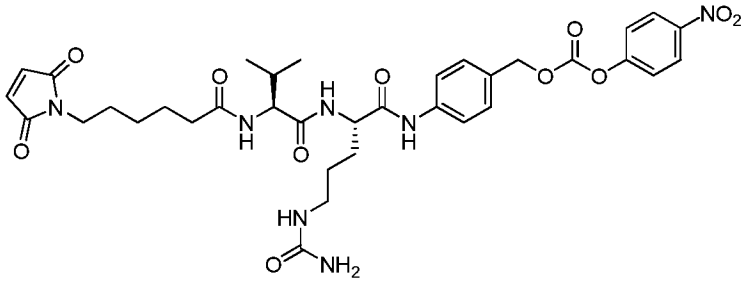
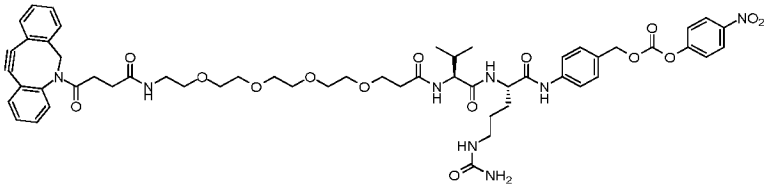
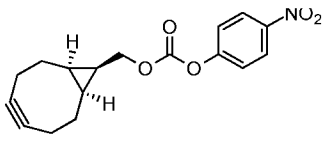
Экспериментальные процедуры для Промежуточных соединений

Таблица 4. Основные промежуточные соединения и исходные материалы

Структуры	№ промежуточного соединения	Ссылки или синтез
	**1a** (будесонид)	Коммерчески доступно (51333-22-3)
	**4a** (vcPAB-будесонид)	См. схему 2
	**4c** (vcPAB-**1d**)	См. схему 5

Структуры	№ промежуточного соединения	Ссылки или синтез
	**5a** (mc-NHS)	Коммерчески доступно (55750-63-5)
	**5b** (MAL-PEG4-NHS)	Коммерчески доступно (1325208-25-0)
	**5c** (DIBAC-suc-PEG4-кислота)	Коммерчески доступно (1537170-85-6)
	**5d** (BCN-PEG4-кислота)	Коммерчески доступно (1421932-54-8)
	**5e**	Схема 8

Структуры	№ промежуточного соединения	Ссылки или синтез
	**5f** (mc-Val-Cit-OH)	WO2014/191578 A1
	**5g** (DIBAC-suc-PEG4-Val-Cit-OH)	Схема 9
	**5h**	Схема 10
	**5i**	См. схему 6
	**6a**	Схема 11
	**6b**	*J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3685-3691

Структуры	№ промежуточного соединения	Ссылки или синтез
	**8a**	Коммерчески доступно (35899-89-9)
	**8b**	*Synth. Commun.*, **2002**, 32(21), 3367-3372 *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134(46), 19108-19117 *J. Med. Chem.*, **1997**, 40(17), 2755-2761 *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115(12), 5035-5040
	**11a** (MC-VC-PAB-PNP)	Коммерчески доступно (159857-81-5) WO2014/191578 A1
	**11b** (DIBAC-suc-PEG4-vc-PAB-PNP)	Схема 12
	**11c** (BCN-PNP)	WO2013/181697A1 *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49 (49), 9422-9425

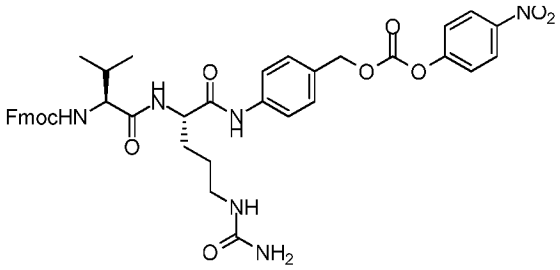
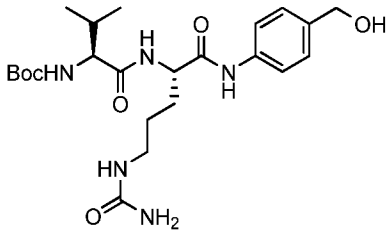
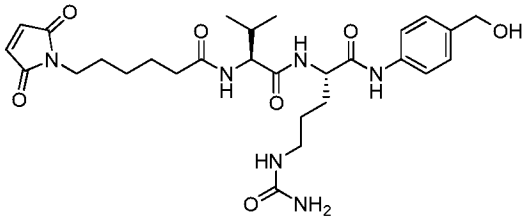
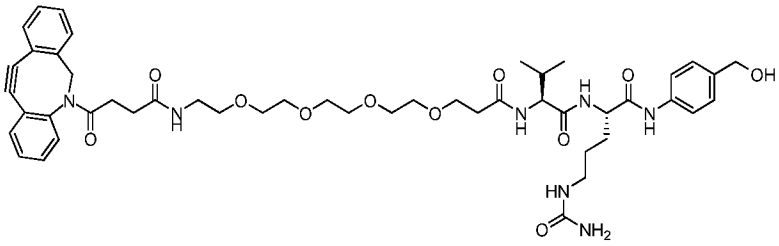
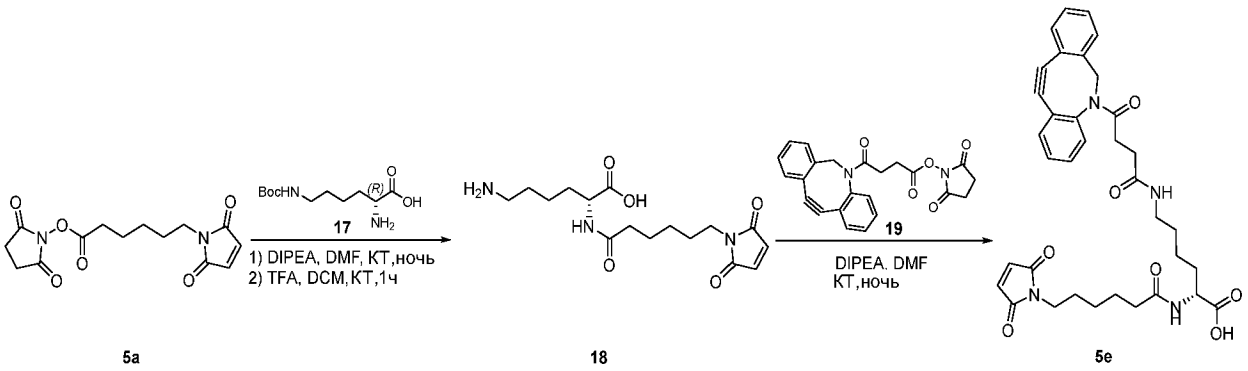
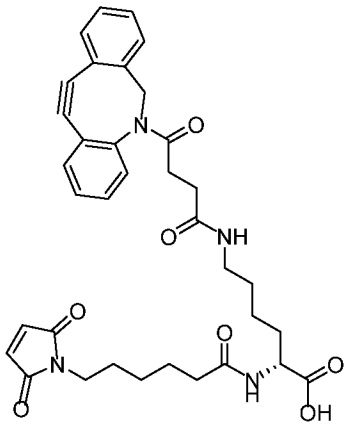
Структуры	№ промежуточного соединения	Ссылки или синтез
	**11d** (Fmoc-vc-PAB-PNP)	Коммерчески доступно 863971-53-3
	**12a** (Boc-vc-PAB)	Коммерчески доступно (870487-09-5) WO2008/34124 A2
	**12b** (MC-VC-PAB)	Коммерчески доступно 159857-80-4
	**12c** (DIBAC-suc-PEG4-vc-PAB)	Схема 12

Схема 8. Синтез 5e



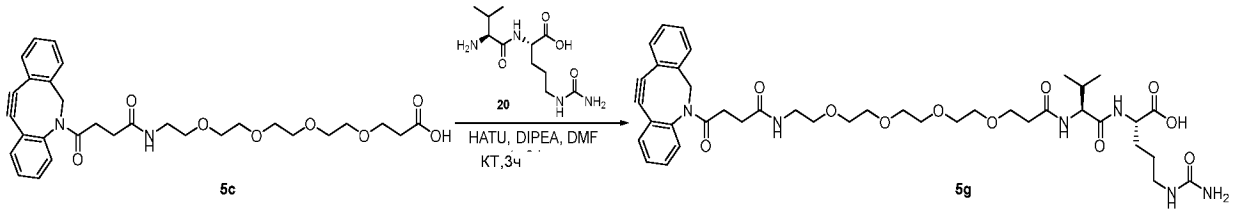
КТ, ночь

(2*R*)-6-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4,6,8,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)гексанамидо]гексановая кислота (5e)

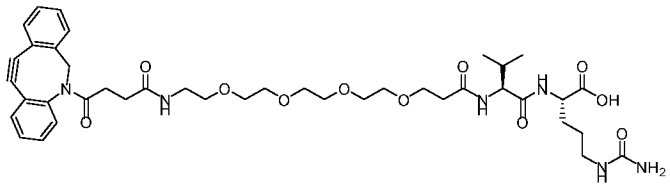


[0706] К смеси H-*D*-Lys(Boc)-OH (**17**, 0.25 г, 1.0 ммоль) в DMF (10 мл) добавили 6-Малеимидокапроновая кислота-NHS (**5a**, 0.31 г, 1.0 ммоль) и диизопропилэтиламин (DIPEA, 0.26 г, 2.0 ммоль) при КТ. После перемешивания реакционной смеси при КТ на протяжении ночи соединение **5a** было полностью израсходовано. Смесь отделили напрямую посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (0.05% TFA)) и получили промежуточное соединение **Boc-18** (ИЭР **м/з**: 440 (M + H)$^+$) в виде бесцветного масла, которое растворили в DCM (5 мл). К раствору добавили добавили TFA (0.5 мл) каплями при 0 °C и смесь перемешивали при КТ в течение часа. Реакцию контролировали посредством ЖХМС, и промежуточное соединение **Boc-18** было полностью израсходовано. Летучие вещества удалили in vacuo и получили сырое соединение **18** (ИЭР **м/з**: 340 (M/2 + H)$^+$), которое применили для следующего этапа без дальнейшей очистки. К смеси сырого соединения **18** (0.21 г, 0.62 ммоль) в DMF (5 мл) добавили активированный эфир **19** (0.20 г, 0.50 ммоль) и DIPEA (50 мг, 0.39 ммоль) при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи, и соединение **19** было полностью израсходовано, согласно ЖХМС. Затем реакционную смеь отделили напрямую посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде) и получили указанное в заголовке соединение **5e** (0.10 г, выход 20% за 3 этапа из **5a**) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 627 (M + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (DMSO$_{d6}$, 400 МГц): δ 7.89 (d, J = 13.2 Гц, 1H), 7.69-7.62 (m, 3H), 7.48-7.47 (m, 3H), 7.36-7.28 (m, 3H), 6.99 (s, 2H), 5.03 (d, J = 13.6 Гц, 1H), 4.09-4.04 (m, 1H), 3.60 (d, J = 13.6 Гц, 1H), 3.38-3.34 (m, 1H), 2.90-2.87 (m, 2H), 2.61-2.55 (m, 1H), 2.25-2.17 (m, 1H), 2.08-1.51 (m, 5H), 1.46-1.15 (m, 12H) ppm.

Схема 9. Синтез 5g

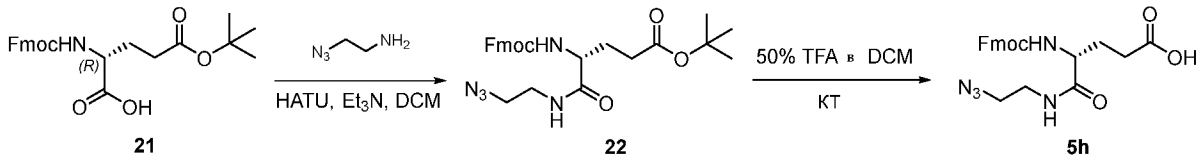


(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентановая кислота (5g)

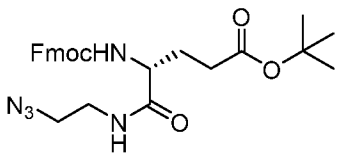


[0707] К раствору соединения **5c** (0.30 г, 0.54 ммоль) в DMF (10 мл) добавили HATU (0.31 г, 0.81 ммоль) и DIPEA (0.14 г, 1.1 ммоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ в течение 15 минут. К реакционному раствору добавили Val-Cit-OH (**20** (CAS-номер 159858-33-0), 0.21 г, 0.76 ммоль) при КТ и полученную смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до израсходования большей части материалов под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбоната аммония)) и получили указанное в заголовке промежуточное соединение **5g** (0.25 г, выход 57%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 809.5 (M + H)$^+$.

Схема 10. Синтез промежуточных соединений 5h

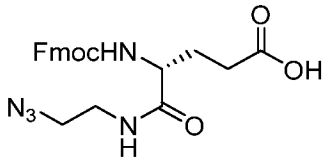


***трет*-бутил (4*R*)-4-[(2-азидоэтил)карбамоил]-4-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}бутаноат (22)**



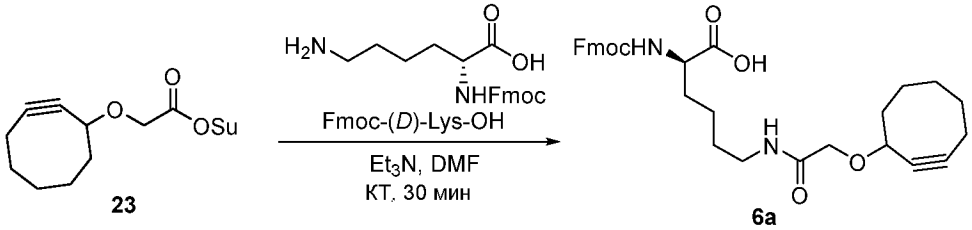
[0708] К смеси Fmoc-*D*-Glu(OTBU)-OH (**21**, (104091-08-9), 0.30 г, 0.71 ммоль) и 2-азидоэтанамида (87156-40-9, 73 мг, 0.85 ммоль) в DCM (50 мл) добавили HATU (0.41 г, 1.1 ммоль) и триэтиламин (0.3 мл) при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Большая часть соединения**21** была израсходована согласно ТСХ и ЖХМС. После гашения реакционной смеси водой (50 мл) при КТ органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали in vacuo. Остаток очистили посредством преп-ТСХ (силикагель, элюирование с петролейным эфиром / этилацетатом (об./об. = 1)) и получили указанное в заголовке соединение **22** (0.30 г, выход 76%) в виде желтого вязкого масла. ИЭР **м/з**: 494 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$): δ 8.09 (m, 1H), 7.84-7.90 (m, 4H), 7.33-7.44 (m, 4H), 6.28 (s, 2H), 3.35 (m, 6H), 3.26 (m, 1H), 2.50 (m, 2H), 2.25 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.39 (s, 9H) ppm.

(4*R*)-4-[(2-Азидоэтил)карбамоил]-4-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}бутановая кислота (5h)

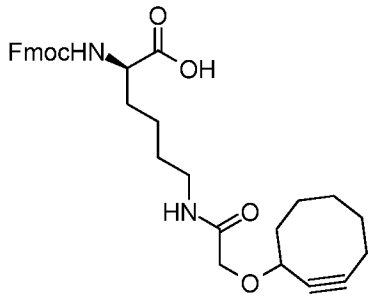


[0709] Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов до полного израсходования соединения **22**, что контролировали посредством ТСХ и ЖХМС. Летучие вещества удалили in vacuo и получили сырое соединение **5h** (17 мг, выход 96%) в виде желтого масла, которое использовали для следующего этапа без дальнейшей очистки. ИЭР **м/з**: 438 $(M + H)^+$.

Схема 11. Синтез промежуточных соединений 6a

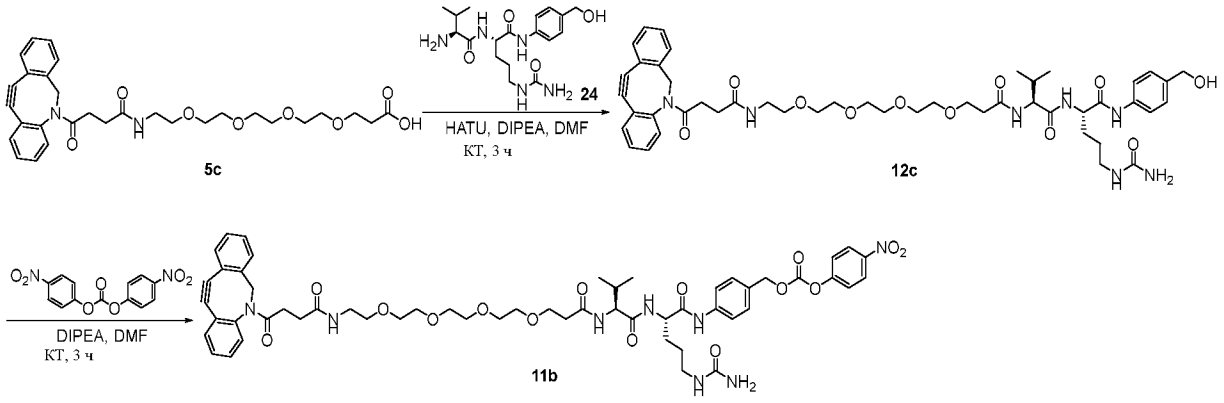


(2*R*)-6-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-2-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}гексановая кислота (6a)

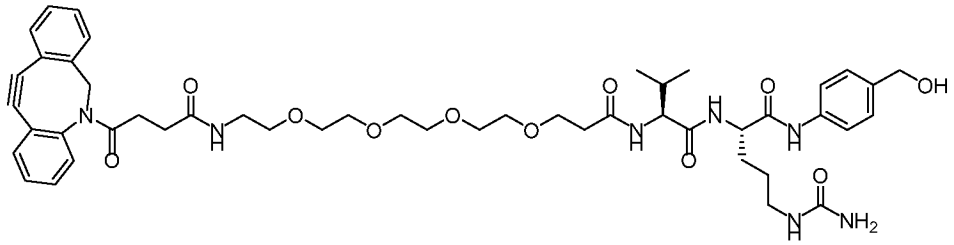


[0710] К смеси коммерческого соединения **23** (65 мг, 0.23 ммоль, CAS: 1425803-45-7) в DMF (2 мл) добавили Fmoc-*D*-Lys-OH (85 мг, 0.23 ммоль) и триэтиламин (52 мг, 0.51 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 30 минут. Смесь отделили напрямую посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (0.05% TFA)) и получили промежуточное соединение **6a** (85 мг, выход 70%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 533 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР ($MeOD_{d4}$, 500 МГц): δ 7.70 (d, J = 7.5 Гц, 2H), 7.59 (t, J = 8.0 Гц, 2H), 7.30 (t, J = 7.5 Гц, 2H), 7.22 (t, J = 7.4 Гц, 2H), 4.35-4.22 (m, 2H), 4.22-4.09 (m, 2H), 4.09-3.99 (m, 1H), 3.94-3.81 (m, 1H), 3.79-3.67 (m, 1H), 3.15 (t, J = 6.9 Гц, 2H), 2.17-1.96 (m, 3H), 1.96-1.86 (m, 1H), 1.85-1.66 (m, 4H), 1.66-1.41 (m, 5H), 1.41-1.25 (m, 3H) ppm.

Схема 12. Синтез промежуточных соединений 11b и 12c

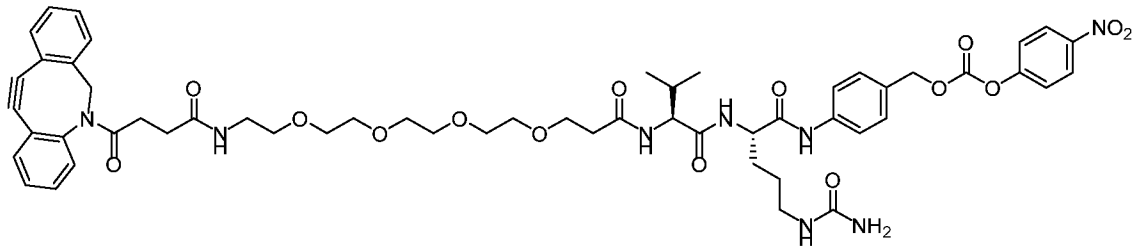


1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (12c)



[0711] Смесь перемешивали при КТ в течение 15 минут. К реакционному раствору добавили vc-PAB (**24** (159857-79-1), 0.21 г, 0.54 ммоль) при КТ и полученную смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до израсходования большей части материалов под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбоната аммония)) и получили указанное в заголовке промежуточное соединение **12c** (0.30 г, выход 60%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 617 $(M + H)^+$.

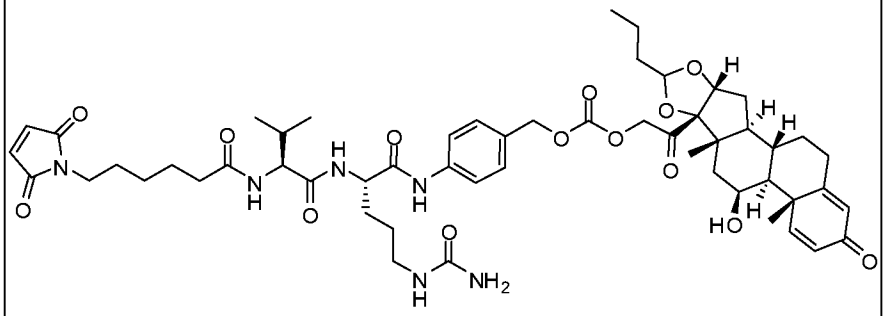
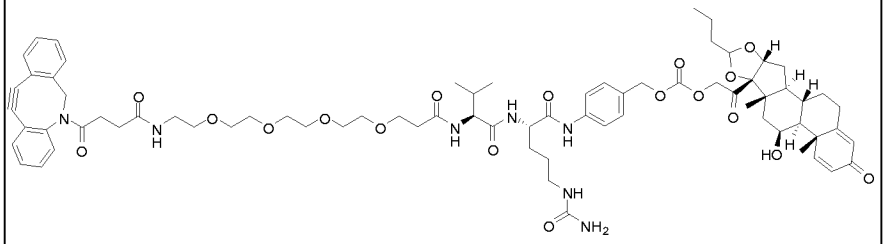
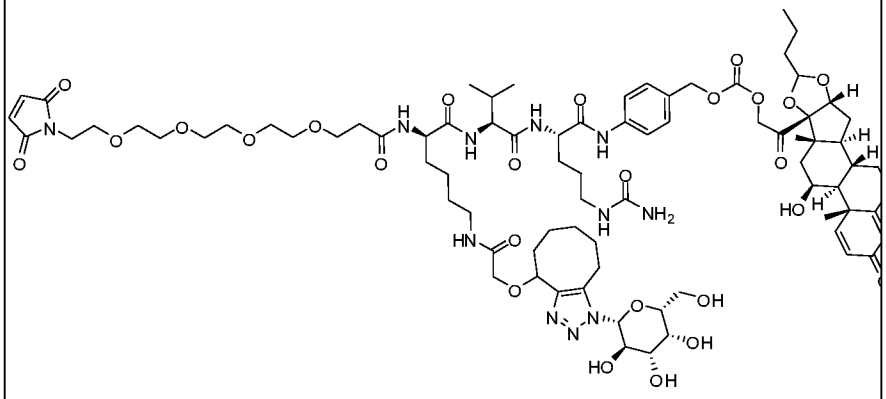
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил 4-нитрофенил карбонат (**11b**)

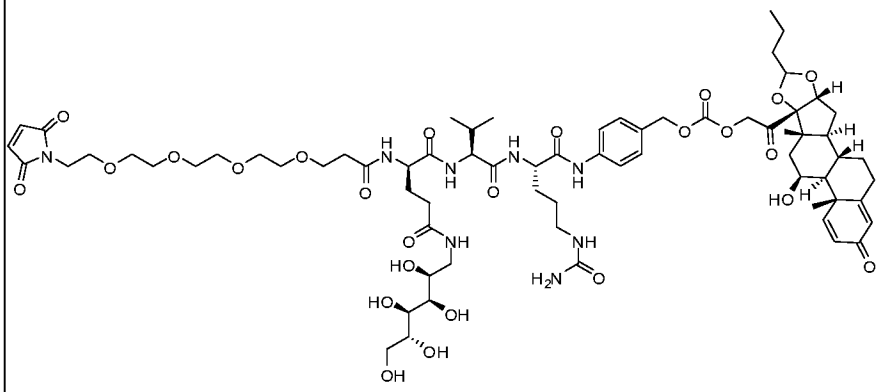
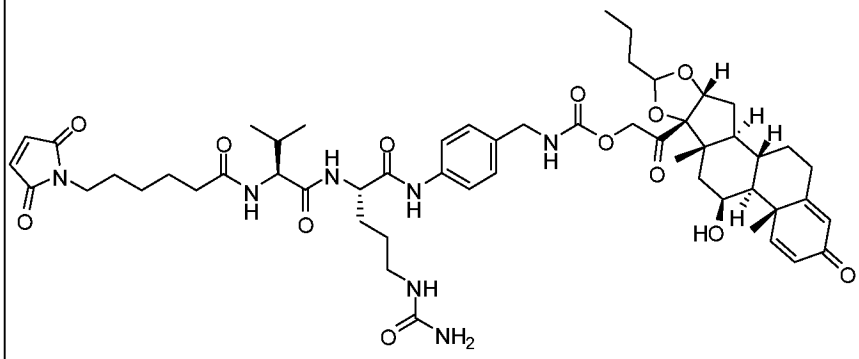
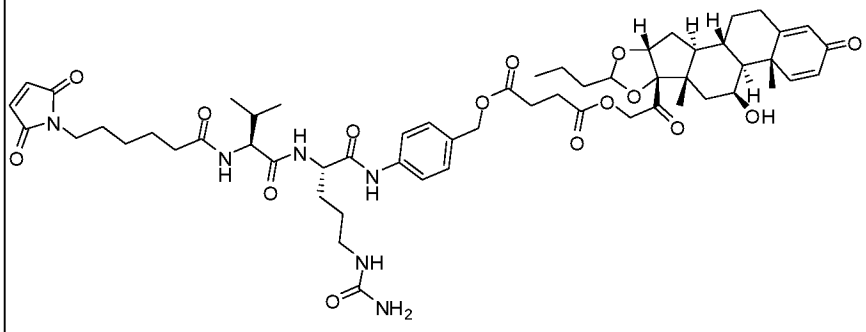
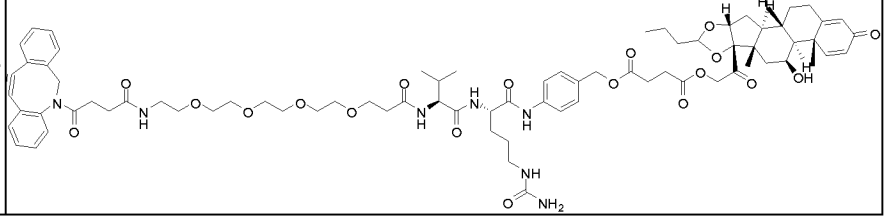


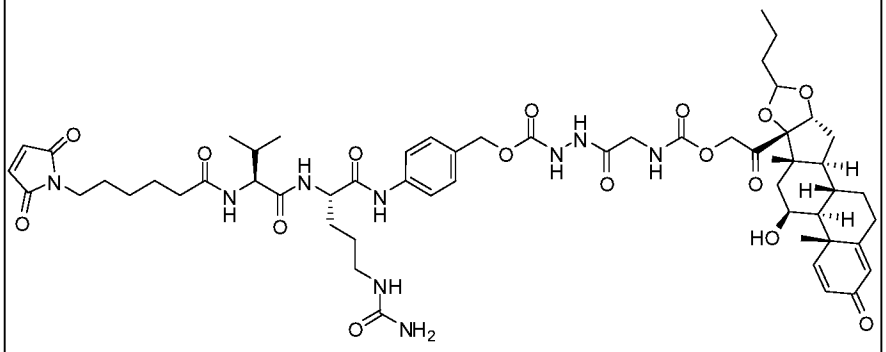
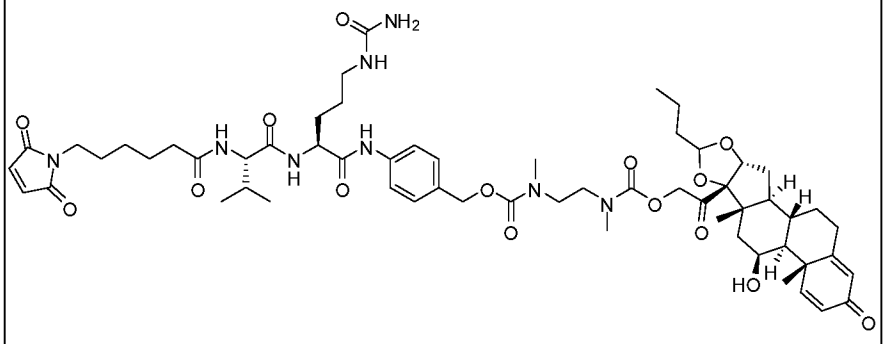
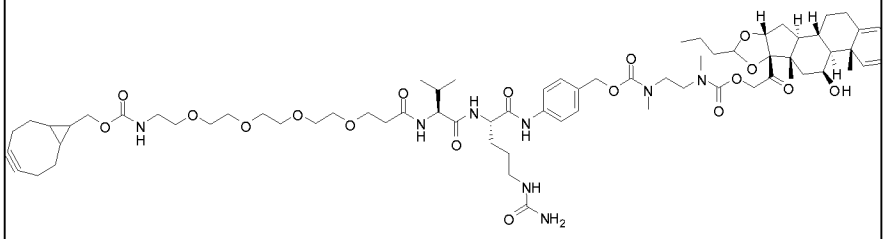
[0712] К раствору соединения **12c** (0.15 г, 0.16 ммоль) в DMF (10 мл) добавили бис(4-нитрофенил) карбонат (0.15 г, 0.49 ммоль) и DIPEA (63 мг, 0.49 ммоль) при 0 °C. Затем смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до израсходования большей части **12c** под контролем ЖХМС. Реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбоната аммония)) и получили указанное в заголовке промежуточное соединение **11b** (50 мг, выход 28%) в виде белого твердого вещества. ИЭР **м/з**: 1079 $(M + H)^+$.

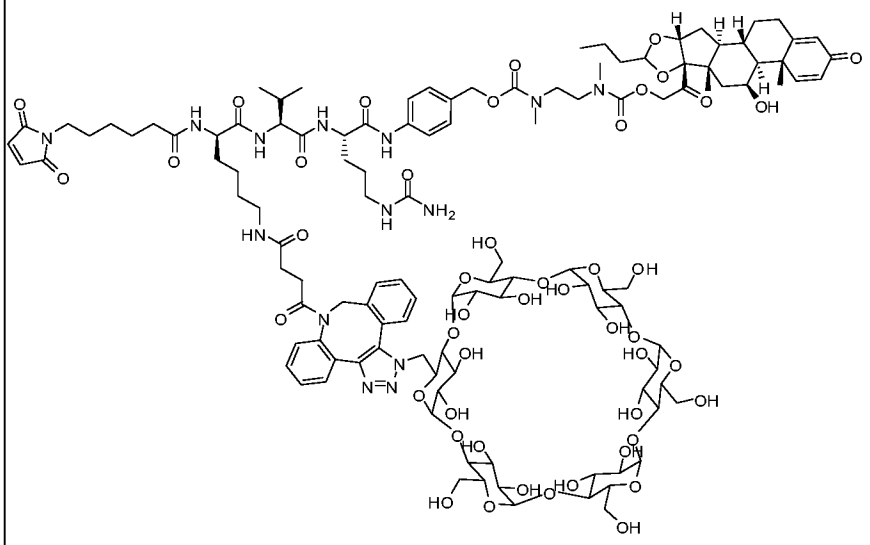
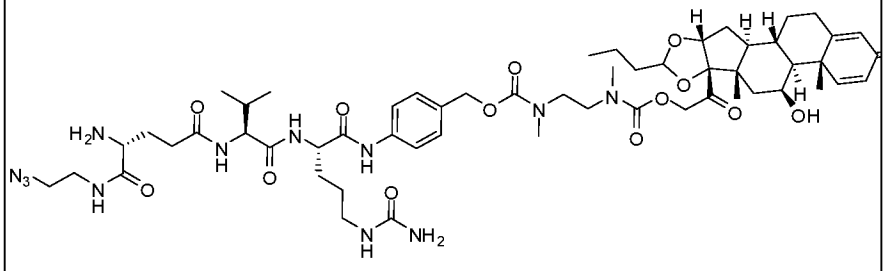
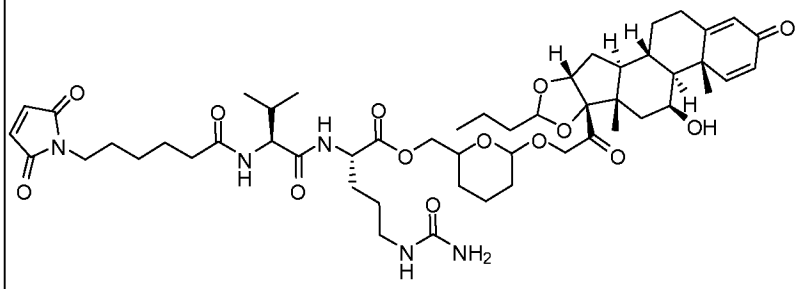
[0713] В нижеприведенной **Таблице 5A** представлены линкер-нагрузки, приготовленные при помощи описанных здесь способов.

Таблица 5А. Примеры Линкер-Нагрузок

Л Н	Нагрузка	Название линкера	Структуры
2a	**1a**	MC-VC-PAB	
2b	**1a**	DIBAC-suc-vc-PAB	
2c	**1a**	mc-PEG4-(caxap-COT)dLys-vc-PAB	

Л Н	Нагрузка	Название линкера	Структуры
2d	**1a**	mc-PEG-4-(caxap2)dGlu-vc-PAB	
2e	**1a**	MC-VC-PABA	
2f	**1c**	MC-VC-PAB	
2g	**1c**	DIBAC-suc-vc-PAB	

Л Н	Нагрузка	Название линкера	Структуры
2j	**1e**	MC-VC-PAB	
2k	**1d**	MC-VC-PAB	
2l	**1d**	BCN-PEG4-vc-PAB	

Л Н	Нагрузка	Название линкера	Структуры
2 m	1d	mc-N5(CD-DIBAC-suc)Lys-vc-PAB	
2n	1d	азидоэтил-GLu-vc-PAB	
2q	1g	MC-VC	

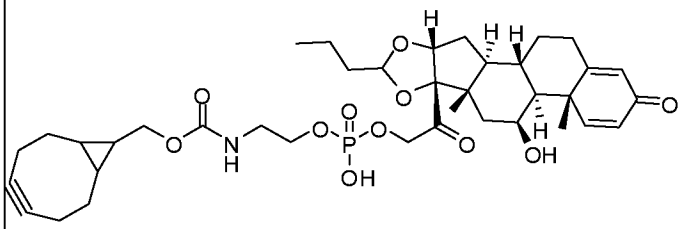
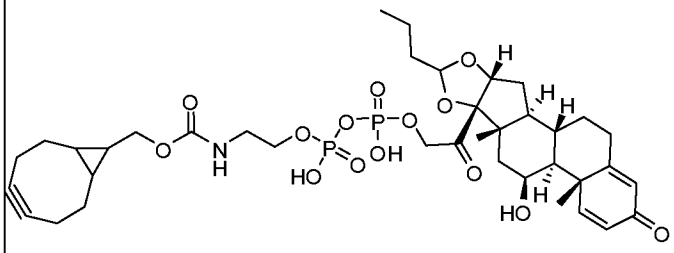
ЛН	Нагрузка	Название линкера	Структуры
2r	**1k**	BCN	
2s	**1l**	BCN	

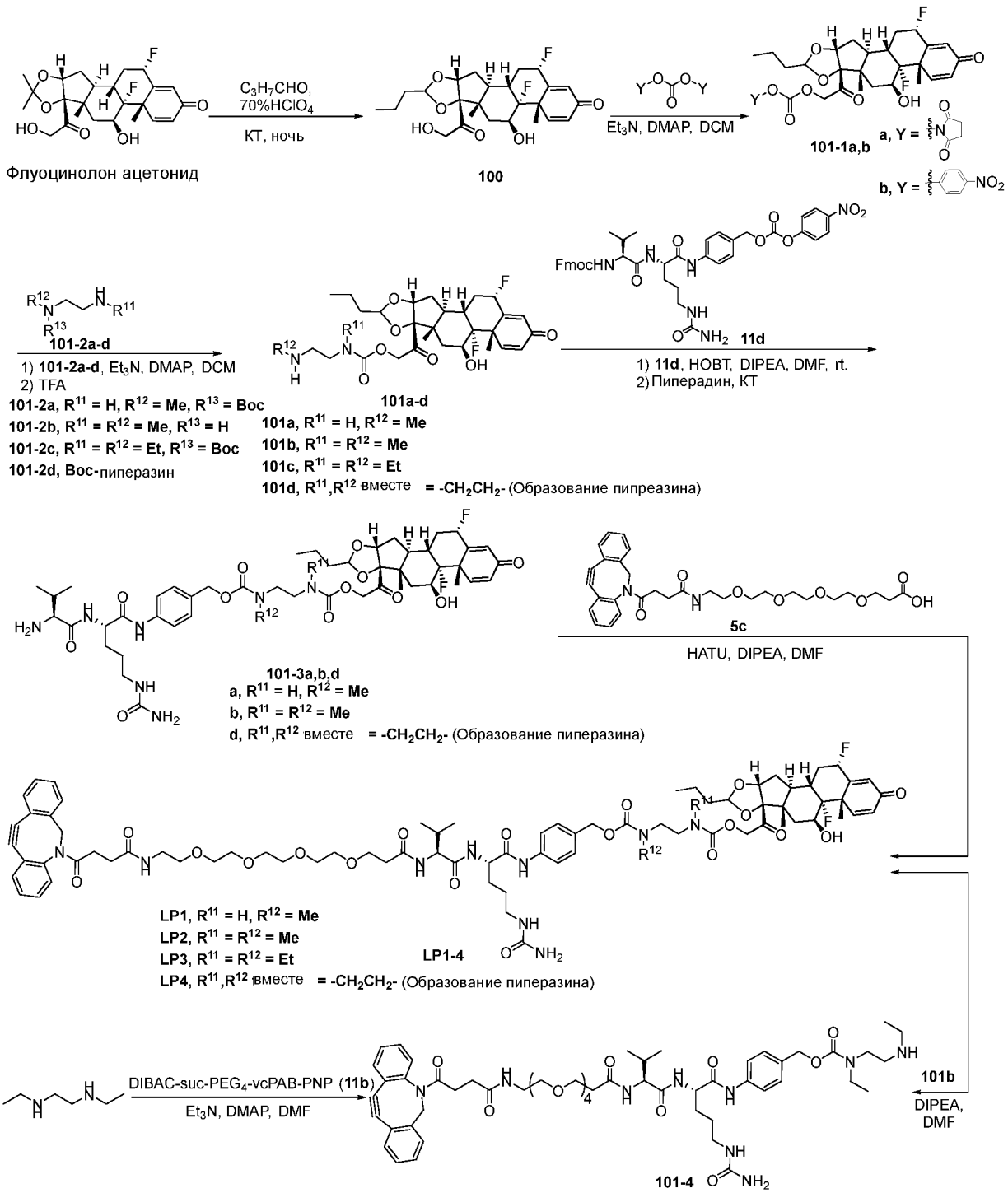
Таблица 6А. Характеристики Линкер-Нагрузок

ЛН	cLogP	МФ	МВ	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ ВУ (мин)	МС (м/з) 100%	Высочайший пик м/з
2a	4.18	$C_{54}H_{72}N_6O_{14}$	1029.2	92	7.6 (A)	1029 (M+H)	1029 (M+H)
2b	5.42	$C_{74}H_{95}N_7O_{18}$	1370.6	97	8.1 (B)	685.8 (M/2+H)	685.8 (M/2+H)
2c	1.03	$C_{81}H_{117}N_{11}O_{26}$	1660.9	97	7.0 (A)	830.8 (M/2+H)	830.8 (M/2+H)
2d	-1.87	$C_{70}H_{102}N_8O_{25}$	1455.6	100	6.48 (A)	728 (M/2+H)	1456 (M+H) (10%)
2e	3.45	$C_{54}H_{73}N_7O_{13}$	1028.2	100	7.54 (A)	1028.3 (M+H)	1028.3 (M+H)

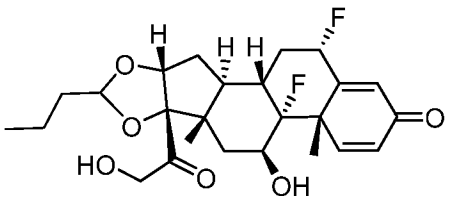
ЛН	cLogP	МФ	МВ	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ ВУ (мин)	МС (м/з) 100%	Высочайший пик м/з
2f	3.54	$C_{57}H_{76}N_6O_{15}$	1085.2	98	1.71 (ЖХМС)	1085.3 (M+H)	1085.3 (M+H)
2g	4.77	$C_{77}H_{99}N_7O_{19}$	1426.7	> 99	7.86 (B)	714.0 (M/2+H)	1427 (M+H) (15%)
2j	2.16	$C_{57}H_{77}N_9O_{16}$	1144.3	98	1.57 (ЖХМС)	1144.3 (M+H)	1144.3 (M+H)
2k	3.54	$C_{59}H_{82}N_8O_{15}$	1143.3	98	1.70 (ЖХМС)	1143.4 (M+H)	1143.4 (M+H)
2l	4.66	$C_{71}H_{104}N_8O_{19}$	1373.6	100	9.40 (A)	687.5 (M/2+H)	1396.8 (M+Na) (50%)
2m	-4.89	$C_{120}H_{166}N_{14}O_{47}$	2556.7	100	6.49 (A)	1278.8 (M/2+H)	1278.8 (M/2+H)
2n	1.68	$C_{56}H_{82}N_{12}O_{14}$	1147.3	100	7.72 (B)	1147.5 (M+H)	1147.5 (M+H)
2q	3.52	$C_{52}H_{75}N_5O_{14}$	994.2	79	10.36 (B)	995.3 (M+H)	995.3 (M+H)
2r	4.88	$C_{38}H_{52}NO_{11}P$	729.8	100	5.26 (B)	686.2 (слабая масса)	1459.1 (2M+H)
2s	0.55	$C_{38}H_{53}NO_{14}P_2$	809.8	100	4.03 (B)	766.1 (M-44)	810.1 (M+H) (70%)

Синтез Линкер-нагрузок LP1A-4A

Схема 101. Синтез Нагрузки 100, спейсер-нагрузки 101a-d и линкер-нагрузок LP1A-4A

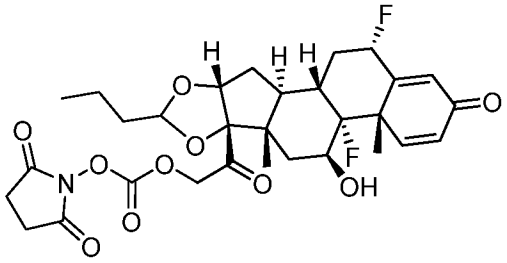


(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-8-(2-гидроксиацетил)-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2},^{9}.0^{4},^{8}.0^{13},^{18}]икоса-14,17-диен-16-он (100)



[0714] К смеси флуоцинолон ацетонида (10 г, 22 ммоль) и силикагеля (100 г) в гептанах (900 мл) добавили бутиральдегид (3.0 мл, 33 ммоль) при температуре ниже 10 °C и суспензию перемешивали при 10-20 °C в течение 30 минут. К смеси добавили перхлорную кислоту (70%, 7.6 мл, 91 ммоль) по каплям при 0 °C. Затем реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Большая часть флуоцинолон ацетонида была израсходована согласно ТСХ и ЖХМС. Реакционную смесь развели петролейным эфиром и реакционную смесь погасили нас. вод. карбонатом натрия. Суспензию отфильтровали и твердое вещество промыли DCM/метанолом (об./об. = 1:1). Объединенный фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством флэш-хроматографии (0-1.5% метанол в DCM) и получили соединение **100** (8.0 г, выход: 78%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 467.1 $(M + H)^{+}$.

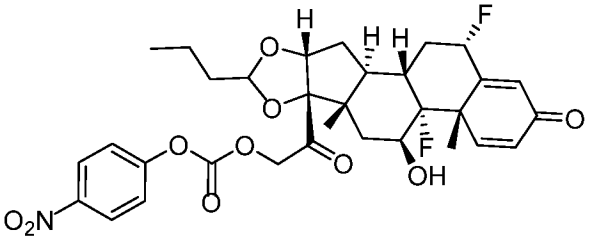
1-[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2},^{9}.0^{4},^{8}.0^{13},^{18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси]пирролидин-2,5-дион (101-1a)



[0715] К раствору соединения **100** (0.47 g, 1.0 ммоль) в DCM (20 мл) добавили бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) карбонат (0.28 г, 1.1 ммоль), триэтиламин (0.40 г, 4.0 ммоль) и DMAP (3.0 мг, кат.). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов до израсходования соединения **100**, под контролем ЖХМС. Затем реакционную смесь развели DCM и промыли водой. Органический раствор высушили над сульфатом натрия. После фильтрации раствор сконцентрировали *in vacuo* и остаток (сырой **101-1a**)

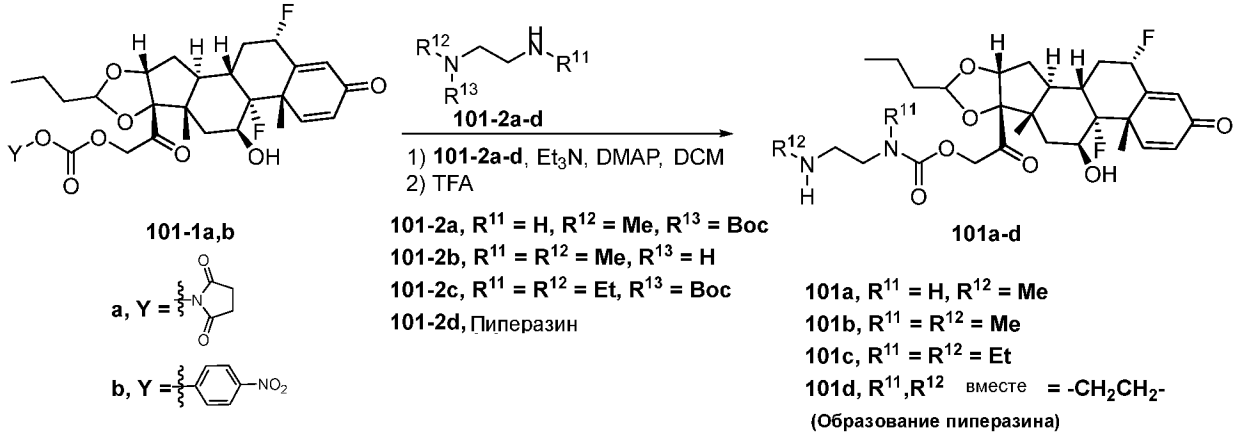
использовали для следующего этапа сразу же без дополнительной очистки. ИЭР м/з: 608.2 $(M + H)^+$.

(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-8-{2-[(4-нитрофеноксикарбонил)окси]ацетил}-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он (101-1b)



[0716] Смесь соединения **100** (0.80 г, 1.7 ммоль), бис(4-нитрофенил) карбоната (1.6 г, 5.2 ммоль) и DIPEA (1.1 г, 8.6 ммоль) в THF (20 мл) перемешивали при КТ в течение 4 часов, под контролем ЖХМС. Смесь сконцентрировали *in vacuo*. Сырой продукт очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (50% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **101-1b** (0.75 г, выход 69 %) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 632 $(M + H)^+$.

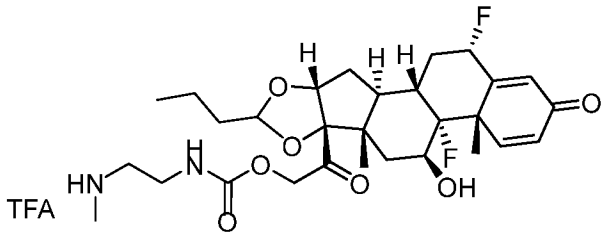
Общая процедура для соединения 101



[0717] К раствору соединения **101-1a** или **101-1b** (сырое, рассчитанное как 1.0 ммоль) в DCM (20 мл) добавили диамин **101-2(a, b, c или d)** (1.1 ммоль) и DMAP (0.1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов и затем добавили TFA (1

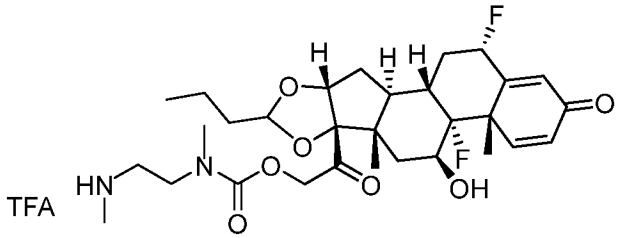
мл). Смесь перемешивали при КТ в течение получаса (для R^{13} = Boc, реакционную смесь перемешивали до полного удаления Boc, что контролировали посредством ЖХМС). Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (50-80% ацетонитрил в вод. TFA (0.5%)) и получили соединение **101**(**a, b, c или d**) в виде бесцветного масла.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-[2-(метиламино)этил]карбамат (**101a**)



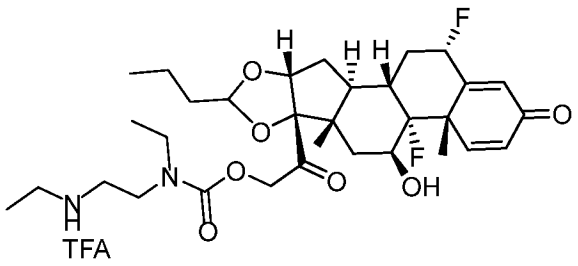
[0718] В соответствии с общей процедурой и с использованием **101-1a** с Boc-диамином **101-2a** получили соединение **101a** (0.38 г, 57% за 2 этапа, соль TFA) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 567 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-метил-*N*-[2-(метиламино)этил]карбамат (**101b**)



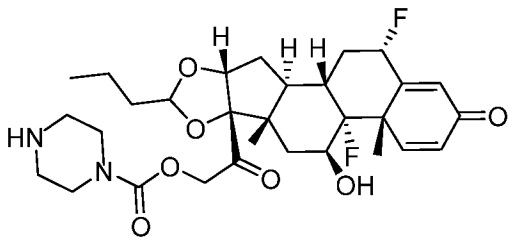
[0719] В соответствии с общей процедурой и с использованием соединения **101-1a** с диамином **101-2b** получили соединение **101b** (0.45 г, выход 66% за 2 этапа, соль TFA) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 581 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-этил-*N*-[2-(этиламино)этил]карбамат (**101c**)



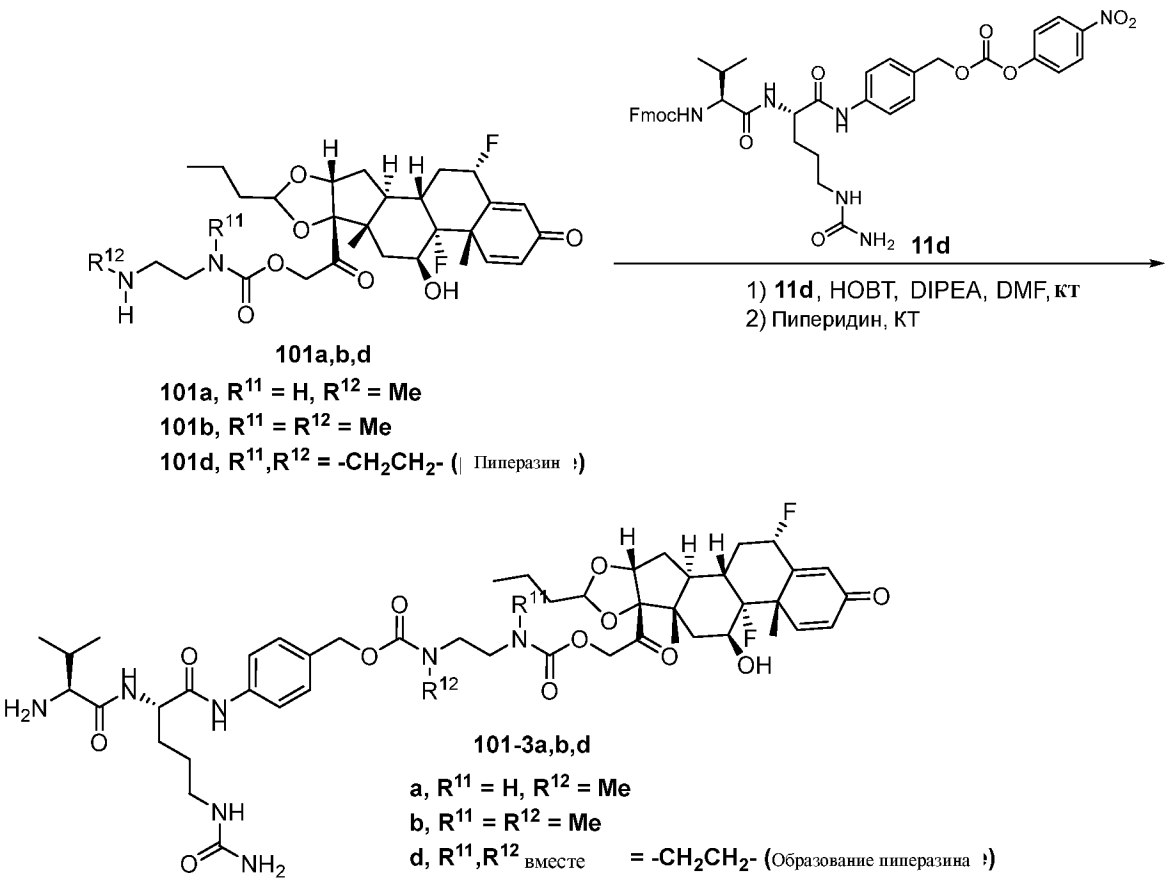
[0720] В соответствии с общей процедурой и с использованием соединения **101-1b** с диамином **101-2c** получили соединение **101c** (24 мг, выход 18% за 2 этапа, соль TFA) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 609 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.38 (s, 2H), 7.30 (d, J = 10.5 Гц, 1H), 6.24 (dd, J = 10.5 Гц, 2.0 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.70-5.54 (m, 2H), 5.10-4.91 (m, 1H), 4.85-4.65 (m, 3H), 4.25-4.16 (m, 1H), 3.60-3.40 (m, 2H), 3.33-3.20 (m, 4H), 3.20-2.90 (m, 4H), 2.67-2.53 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 1H), 2.10-2.00 (m, 2H), 1.80-1.70 (m, 1H), 1.64-1.51 (m, 4H), 1.49 (s, 3H), 1.40-1.30 (m, 2H), 1.20-1.10 (m, 4H), 1.10-1.00 (m, 1H), 0.90-0.80 (m, 6H) ppm.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил пиперазин-1-карбоксилат (**101d**)



[0721] В соответствии с общей процедурой и с использованием соединения **101-1b** с пиперазином (**101-2d**) без воздействия TFA с очисткой посредством колоночной хроматографии с силикагелем (0-10% метанол в DCM) получили соединение **101d** (0.21 г, выход 49% за 2 этапа, свободное основание) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 579 $(M + H)^+$.

Общая процедура для соединения 101-3



101a,b,d

101a, R^{11} = H, R^{12} = Me

101b, R^{11} = R^{12} = Me

101d, R^{11},R^{12} = -CH_2CH_2- (Пиперазин)

101-3a,b,d

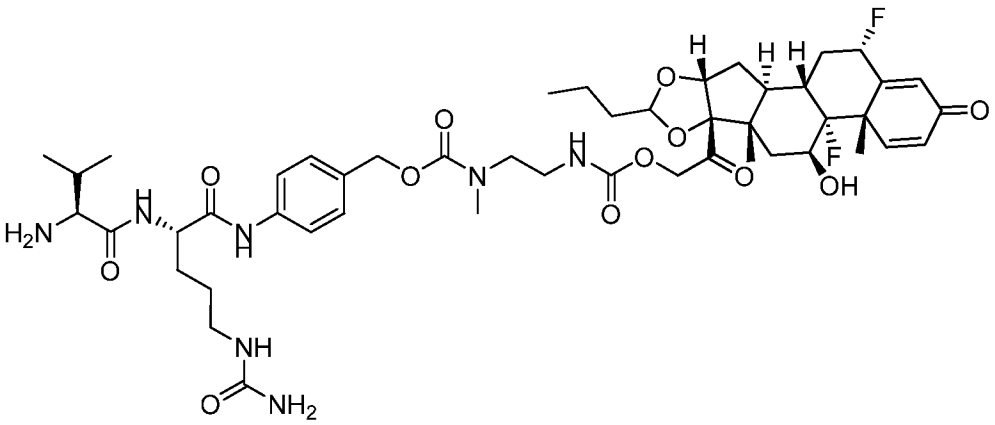
a, R^{11} = H, R^{12} = Me

b, R^{11} = R^{12} = Me

d, R^{11},R^{12} вместе = -CH_2CH_2- (Образование пиперазина)

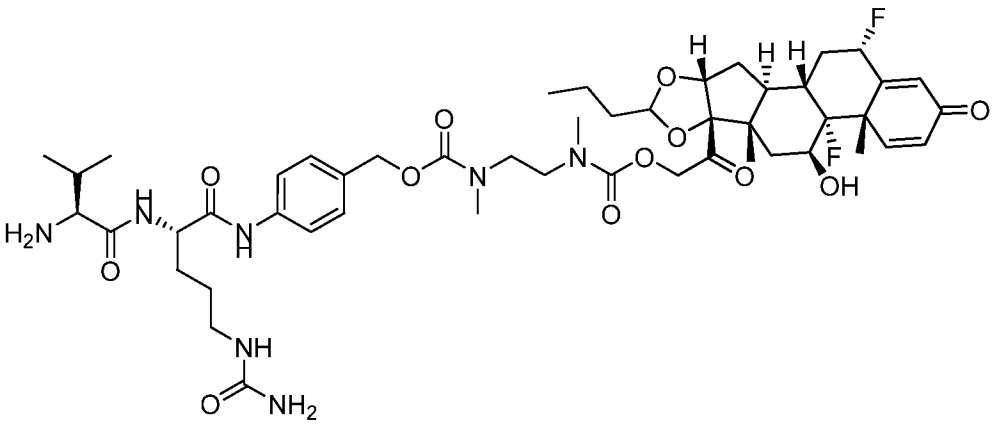
[0722] К раствору соединения **101a, b или d** (0.20 ммоль) в DMF (3 мл) добавили Fmoc-VC-PAB-PNP **11d** (0.17 г, 0.22 ммоль), HOBT (41 мг, 0.30 ммоль) и DIPEA (77 мг, 0.60 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Затем к смеси добавили пиперидин (0.3 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении часа до удаления Fmoc согласно ЖХМС. Полученную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (50-80% ацетонитрил в вод. NH_4HCO_3 (10 мМ)) и получили соединение **101-3a, b или d** в виде белого твердого вещества.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-(2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](метил)амино}этил)карбамат (101-3a)



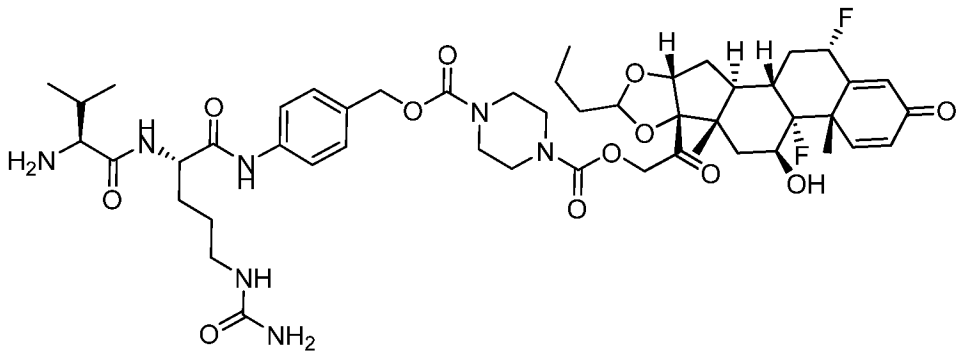
[0723] В соответствии с общей процедурой и с использованием соединения **101a** получили соединение **101-3a** (0.11 г, выход 57%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 972 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-метил-*N*-[2-(метиламино)этил]карбамат (101-3b)



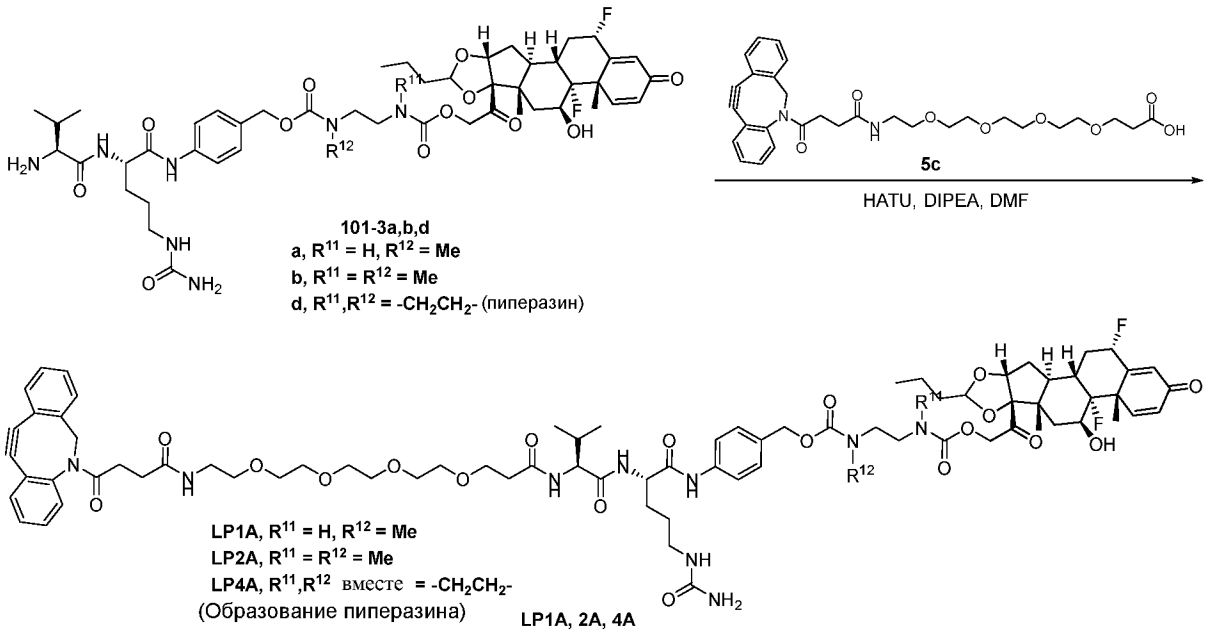
[0724] В соответствии с общей процедурой и с использованием соединения **101b** получили соединение **101-3b** (0.13 г, выход 65%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 986 $(M + H)^+$.

1-{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил 4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил} пиперазин-1,4-дикарбоксилат (101-3d)



[0725] В соответствии с общей процедурой и с использованием соединения **101d** (58 мг, 0.10 ммоль) получили соединение **101-3d** (52 мг, выход 53%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 984 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.0 (s, 1H), 8.14 (d, J = 7.5 Гц, 1H),7.60 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 7.31 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 7.26 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.30 (dd, J = 1.5 Гц, 10.5 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.02-5.88 (m, 1H), 5.70-5.50 (m, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.20-4.92 (m, 3H), 4.80-4.62 (m, 3H), 4.50-4.45 (m, 1H), 4.25-4.15 (m, 1H), 3.50-3.35 (m, 8H), 3.05-2.90 (m, 3H), 2.70-2.54 (m, 2H), 2.32-2.20 (m, 1H), 2.10-1.50 (m, 10H), 1.46 (s, 3H), 1.45-1.30 (m, 5H), 0.95 (d, J = 7.5 Гц, 1H), 0.90-0.80 (m, 9H), 0.77 (d, J = 7.0 Гц, 3H) ppm.

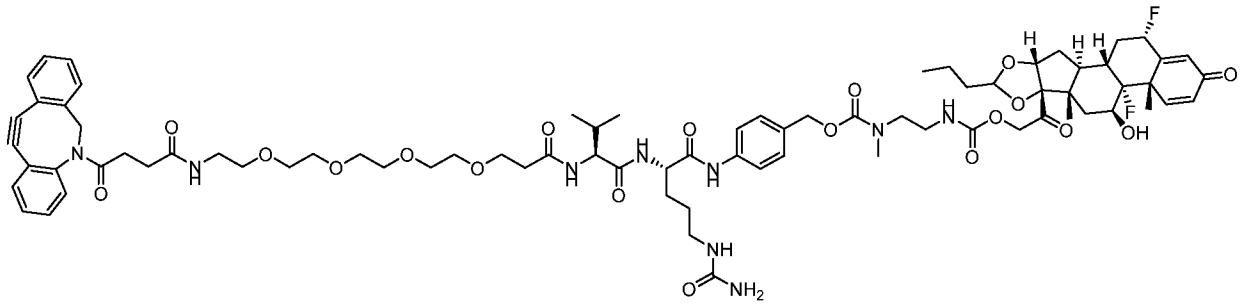
Общая процедура для соединений LP1A, LP2A и LP4A



[0726] К раствору соединения **5c** (34 мг, 60 ммоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (27 мг, 71 ммоль) и DIPEA (20 мг, 0.15 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 5 минут и затем к смеси добавили соединение **101-3a, b или d** (50 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую

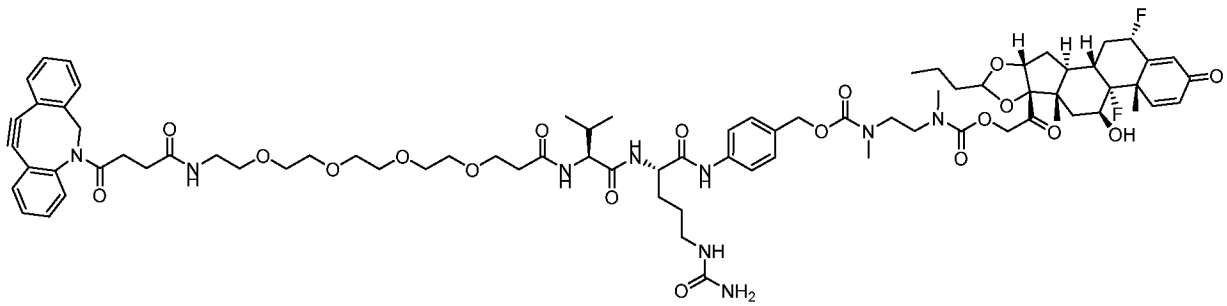
посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP1A, 2A или 4A** в виде белого твердого вещества.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-(2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](метил)амино}этил)карбамат (**LP1A**)



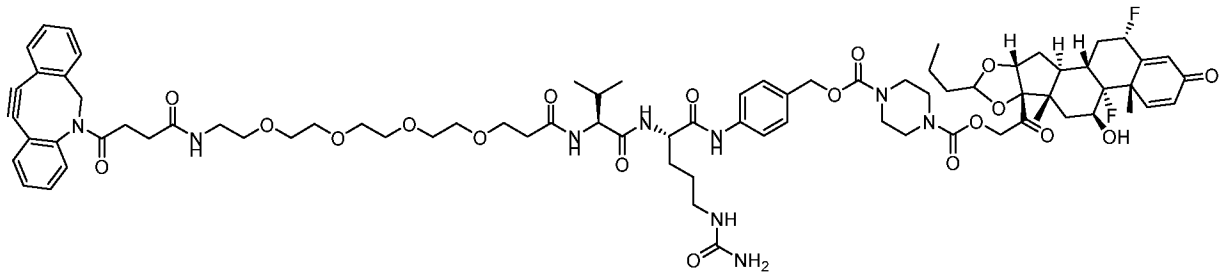
[0727] В соответствии с общей процедурой и с использованием соединения **101-3a** получили линкер-нагрузку **LP1A** (20 мг, выход 26%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 754 (M/2 + H)$^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-(2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](метил)амино}этил)-*N*-метилкарбамат (**LP2A**)



[0728] В соответствии с общей процедурой и с использованием соединения **101-3b** получили линкер-нагрузку **LP2A** (20 мг, выход 26%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 761 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.98 (s, 1H), 8.12 (d, J = 7.4 Гц, 1H), 7.87 (d, J = 8.6 Гц, 1H), 7.76 (t, J = 5.4 Гц, 1H), 7.69-7.66 (m, 1H), 7.64-7.57 (m, 3H), 7.51-7.44 (m, 3H), 7.40-7.33 (m, 2H), 7.32-7.25 (m, 4H), 6.33-6.27 (m, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.98 (t, J = 5.5 Гц, 1H), 5.70-5.55 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.08-4.91 (m, 4H), 4.79-4.66 (m, 2H), 4.41-4.35 m, 1H), 4.25-4.17 (m, 2H), 3.64-3.56 (m, 3H), 3.49-3.41 (m, 15H), 3.30-3.27 (m, 2H), 3.13-3.00 (m, 3H), 2.98-2.75 (m, 8H), 2.65-2.54 (m, 2H), 2.48-2.43 (m, 1H), 2.41-2.34 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 2H), 2.07-1.94 (m, 4H), 1.81-1.67 (m, 3H), 1.63-1.53 (m, 5H), 1.48 (s, 3H), 1.45-1.31 (m, 5H), 0.88-0.82 (m, 13H) ppm.

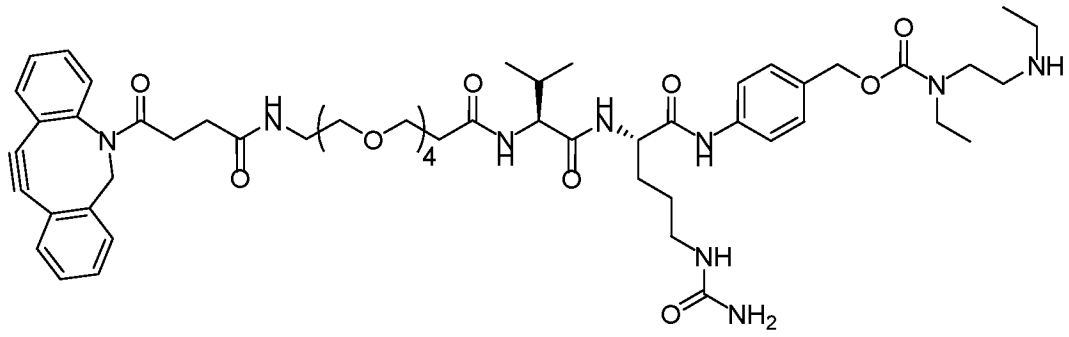
1-{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^4,^{9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил 4-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил} пиперазин-1,4-дикарбоксилат (**LP4A**)



[0729] В соответствии с общей процедурой и с использованием соединения **101-3d** получили линкер-нагрузку **LP4A** (35 мг, выход 44%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 760 (M/2 + H)+. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.0 (s, 1H), 8.14 (d, J = 7.5 Гц, 1H), 7.88 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 7.77 (t, J = 5.0 Гц, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.63-7.55 (m, 3H), 7.52-7.43 (m, 3H), 7.40-7.27 (m, 6H), 6.30 (d, J = 10.5 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.02-5.88 (m, 1H), 5.70-5.50 (m, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.20-4.92 (m, 4H), 4.80-4.62 (m, 3H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.26-4.20 (m, 2H), 3.64-3.55 (m, 3H), 3.50-3.35 (m, 17H), 3.30-3.25 (m, 3H), 3.15-2.90 (m, 4H), 2.64-2.54 (m, 2H), 2.50-2.45 (m, 1H), 2.41-2.34 (m,1H), 2.32-2.20 (m, 2H), 2.10-1.92 (m, 4H), 1.80-1.68 (m, 3H), 1.62-1.50 (m, 5H), 1.46 (s, 3H), 1.45-1.40 (m, 2H), 1.40-1.30 (m, 3H), 1.22-1.20 (m, 1H), 0.90-0.80 (m, 13H) ppm.

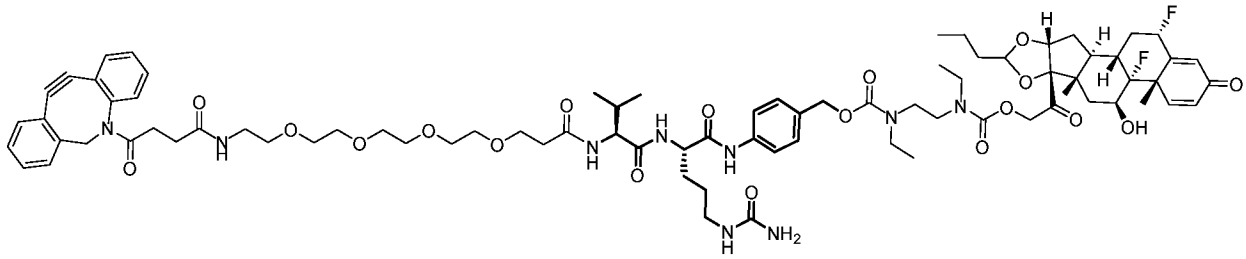
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^4,^{9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-

метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-этил-*N*-[2-(этиламино)этил]карбамат (101-4)



[0730] К раствору DIBAC-suc-PEG$_4$-vcPAB-PNP **11b** (0.11 г, 0.10 ммоль) в DMF (5 мл) добавили *N*,*N*'-диэтилэтилендиам (58 мг, 0.50 ммоль) и DMAP (1 мг, 0.01 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **101-4** в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 1056.6 $(M + H)^+$, 529 $(M/2 + H)^+$.

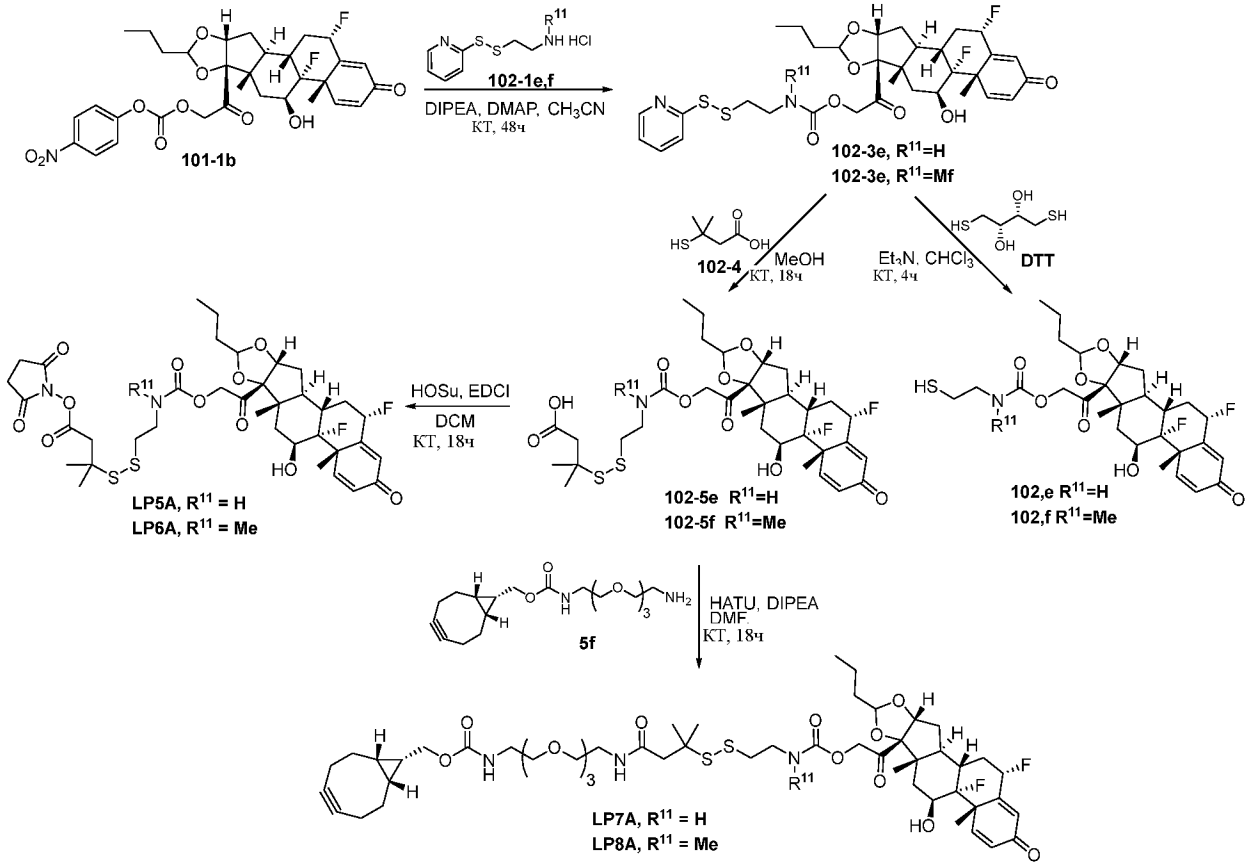
2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-(2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](этил)амино}этил)-*N*-этилкарбамат (LP3A)



[0731] Смесь соединения **101-4** (16 мг, 15 ммоль), **101-1b** (11 мг, 17 ммоль) и DIPEA (4.0 мг, 31 ммоль) в DMF (5 мл) перемешивали при КТ в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили линкер-нагрузку **LP3A** (3 мг, выход 13%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 775 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 10.0 (s, 1H), 8.14 (d, J = 7.5 Гц, 1H), 7.88 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 7.77 (t, J = 5.0 Гц, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.63-7.55 (m, 3H), 7.52-7.43 (m, 3H), 7.40-7.27 (m, 7H), 6.30 (d, J = 10.5 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.02-5.88 (m, 1H), 5.70-5.50 (m, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.20-4.92 (m, 4H), 4.80-4.62 (m, 3H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.26-4.20 (m, 2H),

3.64-3.55 (m, 4H), 3.50-3.35 (m, 18H), 3.12-2.90 (m, 7H), 2.64-2.54 (m, 3H), 2.41-2.34 (m, 2H), 2.32-2.20 (m, 3H), 2.10-1.92 (m, 5H), 1.88-1.68 (m, 3H), 1.62-1.50 (m, 6H), 1.50-1.40 (m, 6H), 1.40-1.30 (m, 4H), 1.22-1.20 (m, 1H), 1.02-0.90 (m, 4H), 0.90-0.78 (m, 6H) ppm.

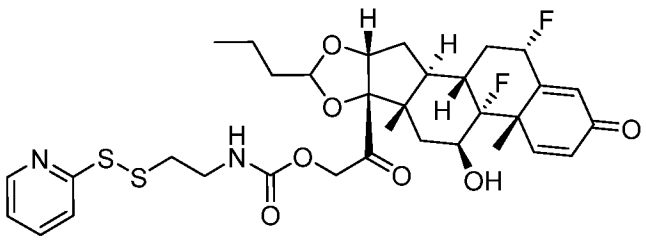
Синтез пролекарственных препаратов цистеамина: Линкер-нагрузки LP5A, 6A, 7A и LP8A



[0732] **2-(пиридин-2-илдисульфанил)этанамин гидрохлорид** (**102-1e**) был коммерчески доступным с CAS 83578-21-6. ***трет*-бутил** (**2-меркаптоэтил**)(**метил**)**карбамат** (**102-1f**) синтезировали согласно *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 95, 483-491.

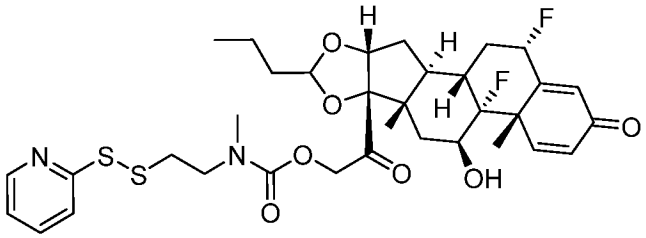
[0733] ***эндо*-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил *N*-(2-{2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этокси}этил)карбамат** (**5f**) синтезировали согласно WO2016168769.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-[2-(пиридин-2-илдисульфанил)этил]карбамат (**102-3e**)



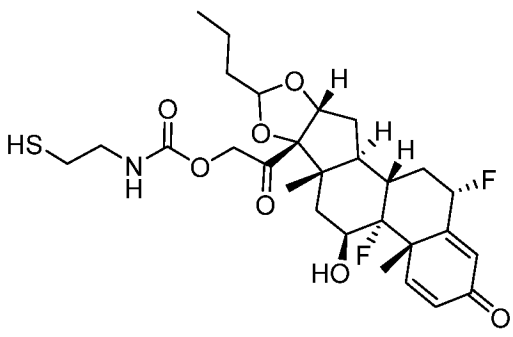
[0734] К раствору соединения **101-1b** (0.54 г, 0.86 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) добавили DIPEA (0.22 г, 1.7 ммоль), **102-1e** (0.19 г, 0.86 ммоль) и DMAP (10 мг, 86 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 48 часов до полного израсходования **101-1b** согласно ЖХМС. Затем смесь отфильтровали и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаточное масло очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (20-50% этилацетат в гексане) и получили соединение **102-3e** (0.47 г, выход 80%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 679.2 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-метил-*N*-[2-(пиридин-2-илдисульфанил)этил]карбамат (**102-3f**)



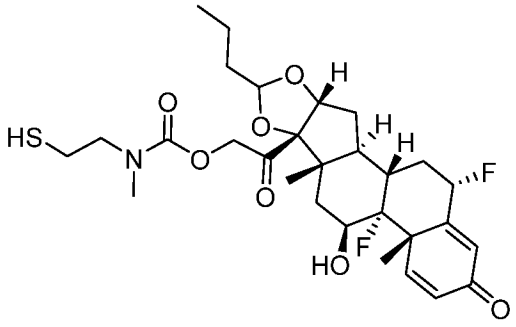
[0735] В соответствии с общей процедурой для **102-3e**, за исключением замены **102-1e** на **102-1f**, получили соединение **102-3f** (0.45 г, выход 75%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 693.2 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-(2-сульфанилэтил)карбамат (**102e**)



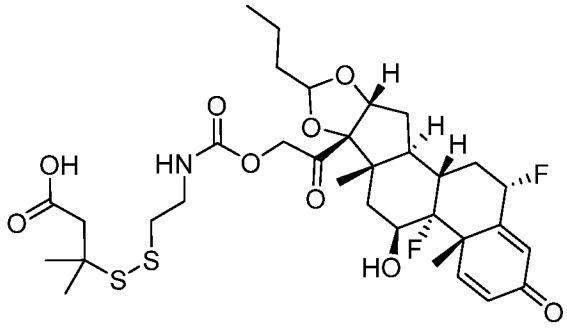
[0736] К раствору соединения **102-3e** (1.4 г, 2.1 ммоль) в хлороформе (30 мл) добавили триэтиламин (0.82 мл, 5.9 ммоль) и 1,4-дитиотреитол (реактив Клеланда, **DTT**) (1.2 г, 7.8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ под азотом в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (50-70% этилацетат в гексане) и получили соединение **102e** (0.95 г, выход 83%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 570.2 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил *N*-метил-*N*-(2-сульфанилэтил)карбамат (102f)



[0737] В соответствии с общей процедурой для **102e**, за исключением замены **102-3e** на **102-3f**, получили соединение **102f** (0.97 г, выход 83%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 584.3 $(M + H)^+$.

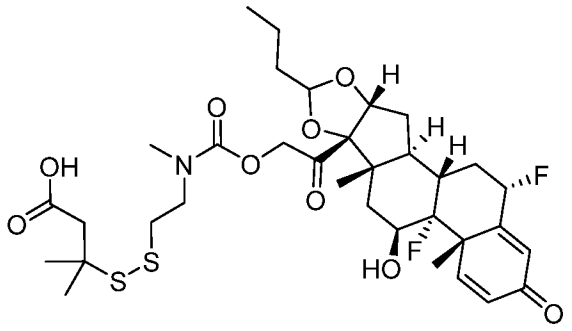
3-({2-[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)амино]этил}дисульфанил)-3-метилбутановая кислота (102-5e)



[0738] К раствору соединения **102-3e** (0.68 г, 1.0 ммоль) в метаноле (5 мл) добавили соединение **102-4** (0.13 г, 1.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 18 часов под контролем ЖХМС. Затем полученную смесь очистили напрямую

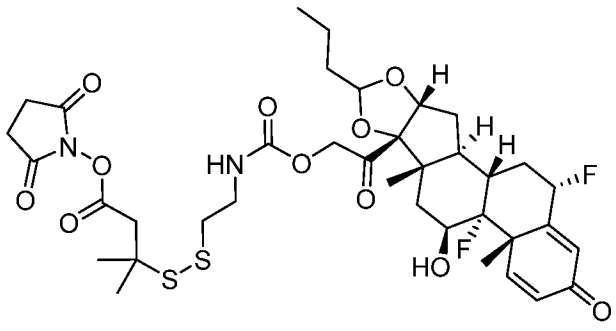
посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **102-5e** (0.39 г, выход 55%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 702.2 $(M + H)^+$.

3-({2-[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)(метил)амино]этил}дисульфанил)-3-метилбутановая кислота (102-5f)



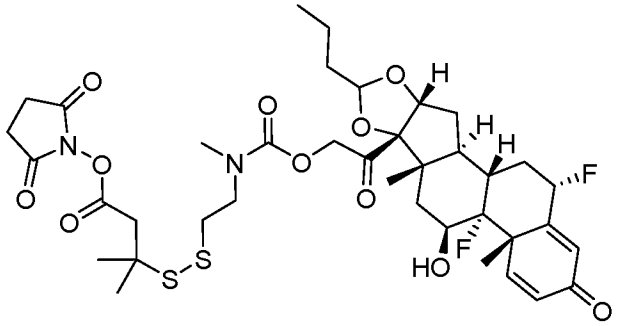
[0739] В соответствии с общей процедурой для **102-5e** , за исключением замены **102-3e** на **102-3f**, получили соединение **102-5f** (0.29 г, выход 40%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 716.3 $(M + H)^+$.

2,5-Диоксопирролидин-1-ил 3-({2-[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)амино]этил}дисульфанил)-3-метилбутаноат (LP5A)



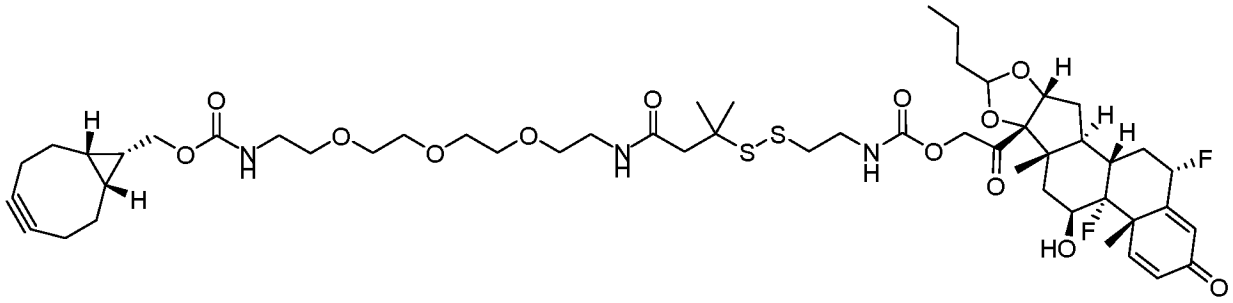
[0740] К раствору соединения **102-5e** (0.20 г, 0.29 ммоль) в DCM (10 мл) добавили HOSu (73 мг, 0.64 ммоль) и EDCI (0.12 г, 0.64 ммоль) и смесь перемешивали при КТ в течение 24 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь развели DCM (50 мл) и органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили **LP5A** (85 мг, выход 37%) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 799.3 $(M + H)^+$.

2,5-Диоксопирролидин-1-ил 3-({2-[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)(метил)амино]этил}дисульфанил)-3-метилбутаноат (**LP6A**)



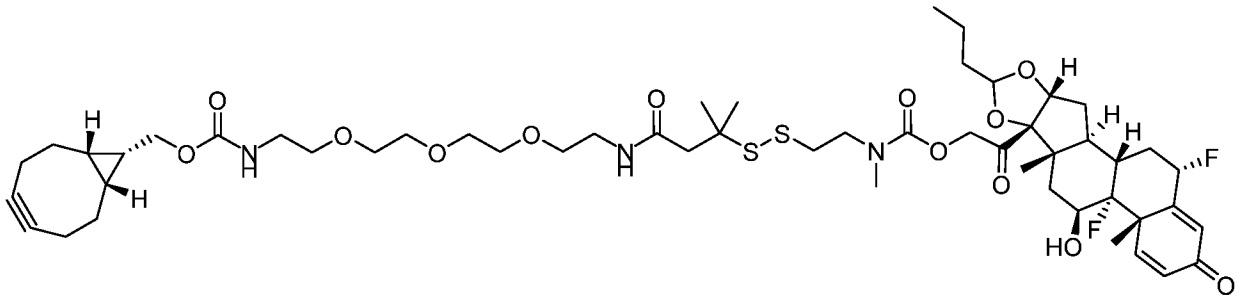
[0741] В соответствии с аналогичной процедурой для **LP5A**, за исключением замены **102-5e** на **102-5f**, получили соединение **LP6A** (86 мг, выход 36%) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 813.3 $(M + H)^+$.

***эндо*-Бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил *N*-{2-[2-(2-{2-[3-({2-[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)амино]этил}дисульфанил)-3-метилбутанамидо]этокси}этокси)этокси]этил}карбамат** (**LP7A**)



[0742] К раствору соединения **102-5e** (0.20 г, 0.29 ммоль) в DMF (10 мл) добавили HATU (0.11 г, 0.29 ммоль) и DIPEA (75 мг, 0.58 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 10 минут и затем добавили соединение **5f** (0.11 г, 0.29 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 18 часов под контролем ЖХМС. Затем полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP7A** (0.16 г, выход 55%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 526.7 $(M/2 + H)^+$.

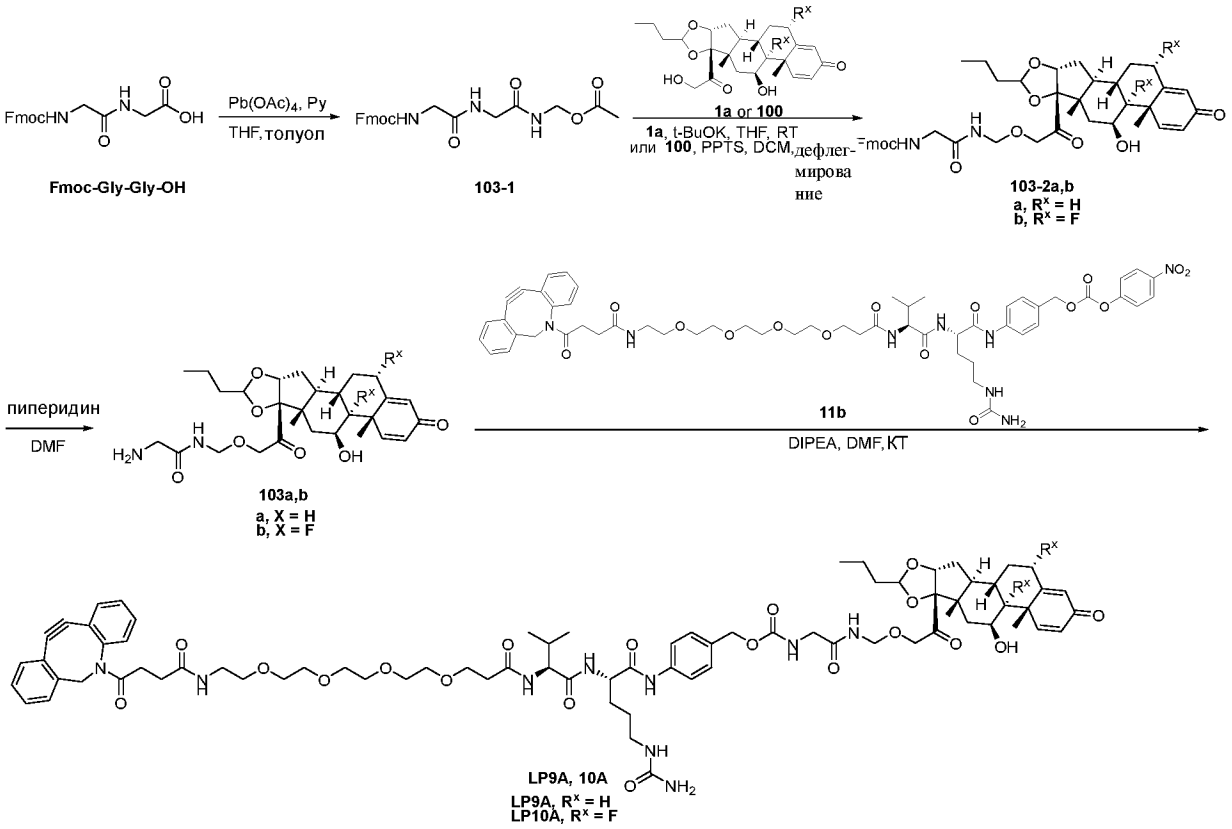
***эндо*-Бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил *N*-{2-[2-(2-{2-[3-({2-[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)(метил)амино]этил}дисульфанил)-3-метилбутанамидо]этокси}этокси)этокси]этил}карбамат (LP8A)**



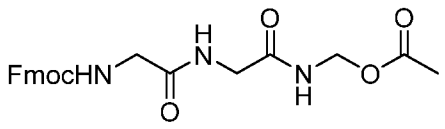
[0743] В соответствии с похожей процедурой для **LP7A**, за исключением замены **102-5e** на **102-5f**, получили соединение **LP8A** (0.13 г, выход 41%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 533.8 (M/2 + H)$^+$.

Синтез AMO линкер-нагрузок LP9A-11A

Схема 103A. Синтез нагрузок 103a,b и Линкер-нагрузок LP9A-10A

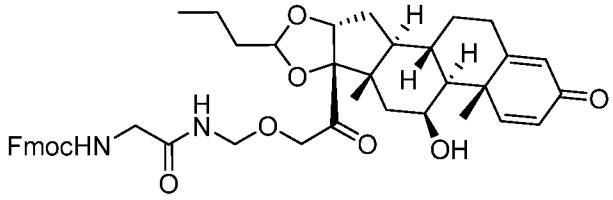


(2-(((9*H*-Флуорен-9-ил)метокси)карбониламино)ацетамидо)метил ацетат (103-1)



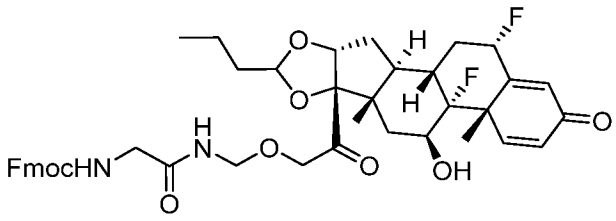
[0744] К смеси Fmoc-Gly-Gly-OH (4.3 г, 12 ммоль) в THF (0.12 л) и толуола (40 мл) добавили пиридин (1.2 мл, 15 ммоль) и тетраацетат свинца (6.8 г, 15 ммоль). Реакционную смесь дефлегмировали в течение 5 часов под контролем ЖХМС. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь отфильтровали через целит, чтобы удалить нерастворимый материал, и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток растворили в этилацетате и раствор промыли водой и рассолом. Органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (10% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **103-1** (3.0 г, выход 67%) в виде бесцветного твердого вещества. ИЭР м/з: 391 $(M + Na)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамат (**103-2a**)



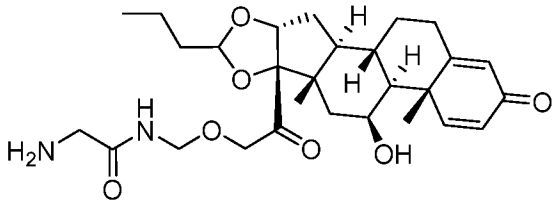
[0745] К раствору соединения **103-1** (0.37 г, 1.0 ммоль) и будесонида **1a** (1.3 г, 3.0 ммоль) в THF (4 мл) добавили калия *трет*-бутоксид (0.22 г, 2.0 ммоль) при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 15 минут под контролем ТСХ. К реакционной смеси добавили этилацетат и воду при 0 °C и экстрагировали этилацетатом и хлороформом. Объединенный органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (30-35% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **103-2a** (0.19 г, выход 40%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 739 $(M + H)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамат (**103-2b**)



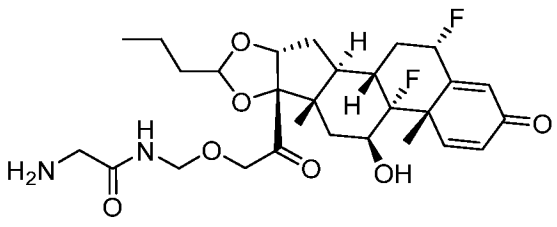
[0746] В запаянную трубку добавили раствор соединения **103-1** (0.30 г, 0.81 ммоль) и соединение **100** (0.38 г, 0.81 ммоль) в DCM (4 мл) и пиридиния *p*-толуолсульфонат (21 мг, 81 ммоль) при КТ. Реакционную трубку запаяли и смесь перемешивали при 50 °C в течение 24 часов под контролем ЖХМС. После охлаждения реакционную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **103-2b** (0.23 г, выход 37%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 775 $(M + H)^+$.

2-амино-*N*-({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)ацетамид (**103a**)

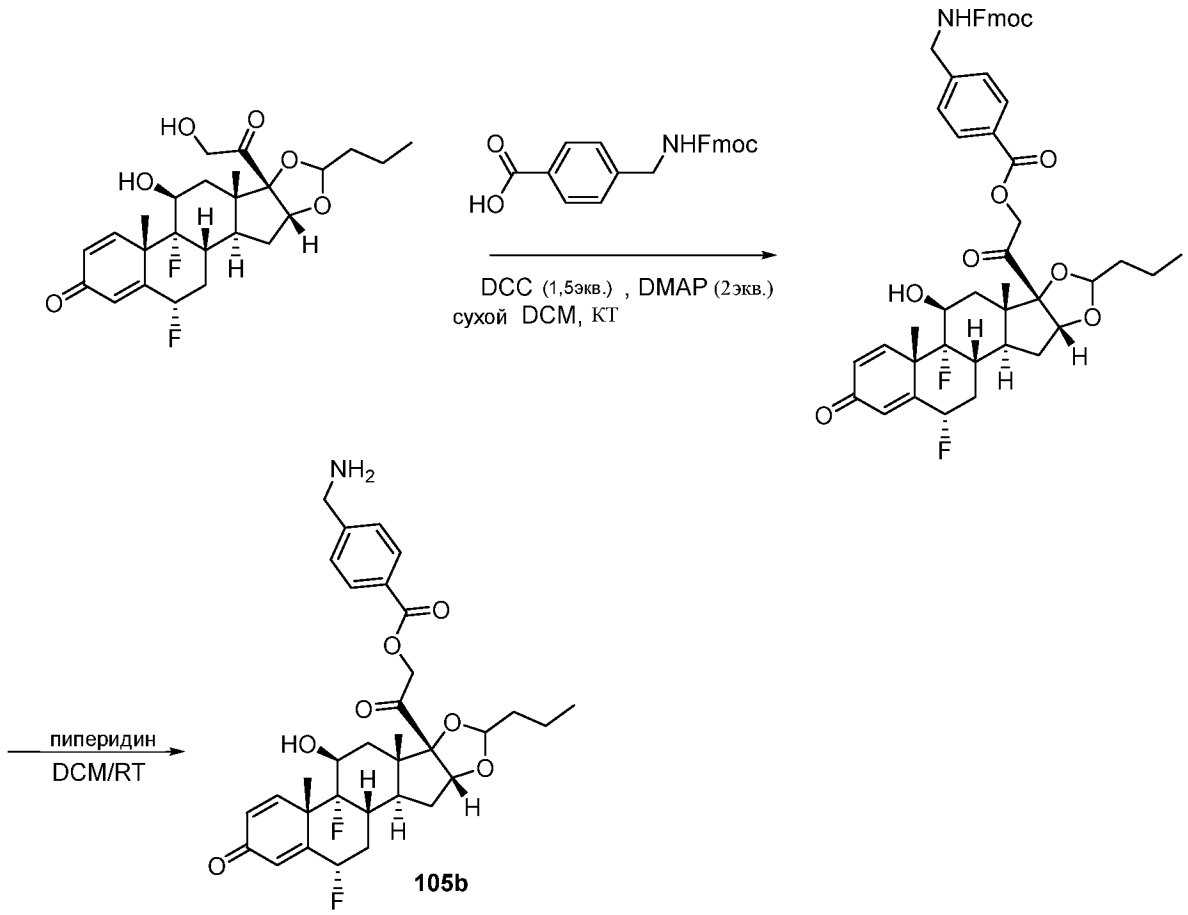


[0747] К раствору соединения **103-2a** (0.10 г, 0.14 ммоль) в DMF (2 мл) добавили пиперидин (35 мг, 0.41 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов до полного удаления Fmoc под контролем ЖХМС. Полученную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0.05%)) и получили соединение **103a** (50 мг, выход 70%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 517.6 $(M + H)^+$.

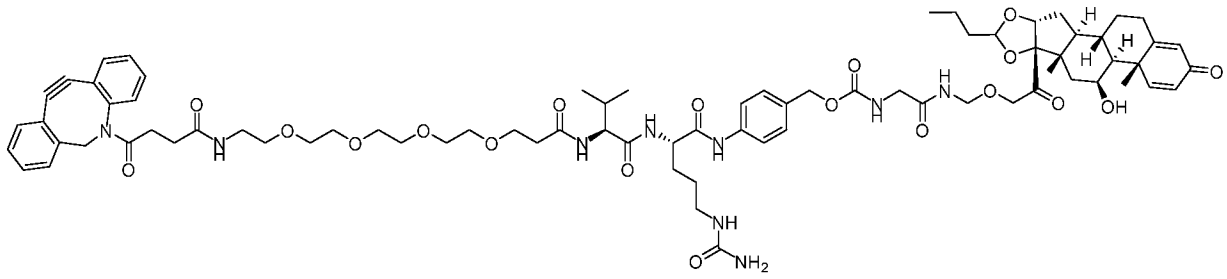
2-амино-*N*-({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)ацетамид (**103b**)



[0748] В соответствии с похожей процедурой для **103a**, за исключением замены **103-2a** на **103-2b**, получили соединение **103b** (0.26 г, выход 65%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 553.2 $(M/2 + H)^+$.



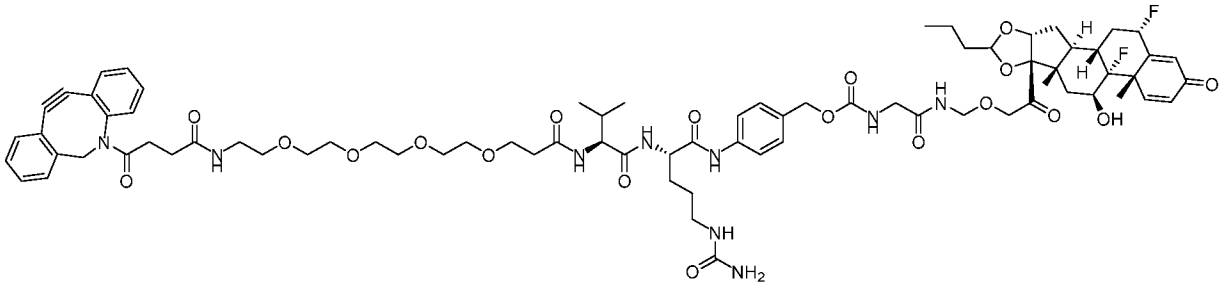
[0749] Соединение 105(b) приготовили в соответствии с вышеописанной процедурой. **{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*S*,13*R*)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамат (LP9A)



[0750] К раствору соединения **103a** (15 мг, 29 ммоль) в DMF (1.0 мл) добавили соединение **11b** (30 мг, 28 ммоль), HOBT (2.0 мг, 15 ммоль) и DIPEA (7.7 мг, 60 ммоль).

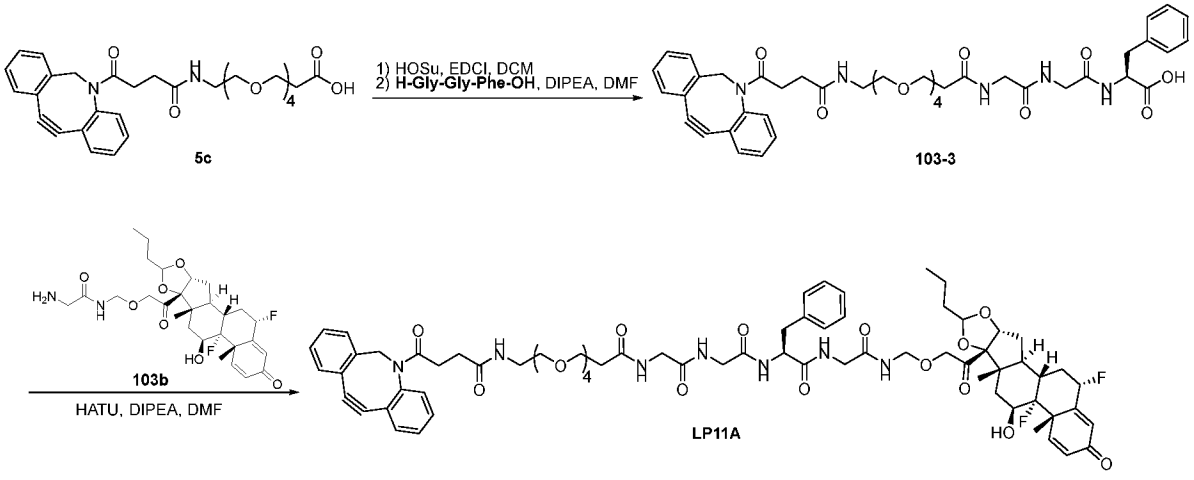
Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили линкер-нагрузку **LP9A** (5.0 мг, выход 11%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 729 (M/2 + H)$^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^4,^{9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^2,^{9}.0^4,^{8}.0^{13},^{18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамат (**LP10A**)

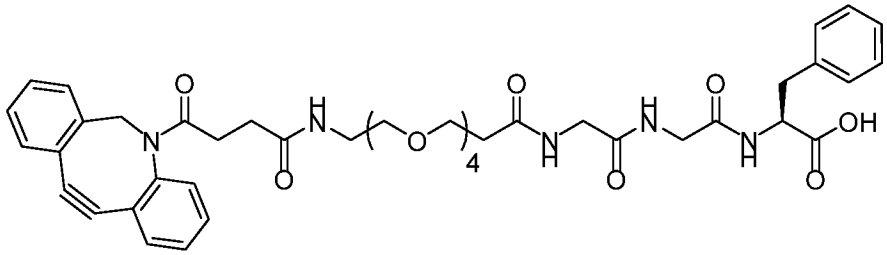


[0751] В соответствии с похожей процедурой для **LP9A**, за исключением замены **103a** на **103b**, получили линкер-нагрузку **LP10A** (23 мг, выход 58%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 747.0 (M/2 + H)$^+$; 513.8 (фрагмент, расщепленный при ЖХМС, часть, расщепленная на $NHCH_2$-O) ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.02 (s, 1H), 8.80-8.72 (m, 1H), 8.15 (d, J = 6.8 Гц, 1H), 7.89 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.68 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.64-7.58 (m, 3H), 7.54-7.22 (m, 9H), 6.29 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 6.10 (s, 1H), 6.04-5.96 (m, 1H), 5.78-4.10 (m, 15H), 3.66-3.54 (m, 5H), 3.54-3.42 (m, 13H), 3.32-3.26 (m, 2H), 3.20-2.50 (m, 7H), 2.42-2.20 (m, 4H), 2.05-1.90 (m, 4H), 1.85-1.25 (m, 15H), 0.90-0.80 (m, 13H) ppm.

Схема 103B. Синтез Линкер-нагрузки LP11A



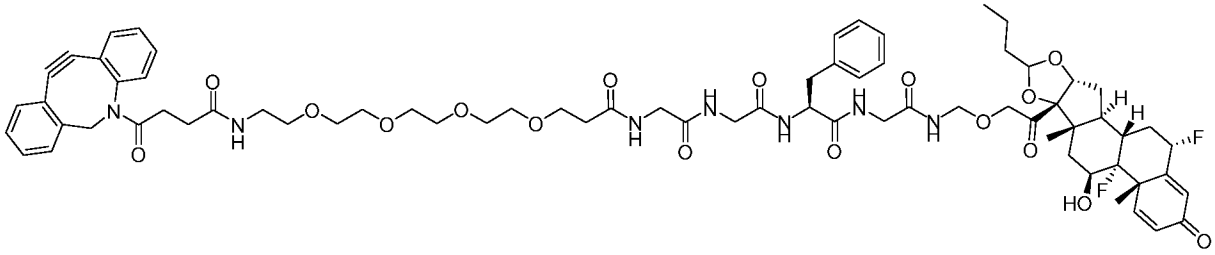
(2*S*)-2-(2-{2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]ацетамидо}ацетамидо)-3-фенилпропановая кислота (103-3)



[0752] К раствору соединения **5c** (0.16 г, 0.29 ммоль) в DCM (20 мл) добавили HOSu (73 мг, 0.64 ммоль) и EDCI (0.12 г, 0.64 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 24 часов до полного израсходования соединения **5c** согласно ЖХМС. Полученную смесь развели DCM (50 мл) и органический раствор промыли водой (50 мл) и рассолом (50 мл), высушили безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo* и получили активный эфир OSu (0.16 г, выход 84%) в виде бесцветного масла, который применили сразу же для следующего этапа.

К раствору **H-Gly-Gly-Phe-OH** (10 мг, 36 ммоль) в DMF (0.5 мл) добавили активный эфир OSu (23 мг, 36 ммоль), полученный так, как было описано выше, и DIPEA (9.0 мг, 72 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **103-3** (15 мг, выход 51%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 408.2 $(M/2 + H)^+$.

1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-{[({[(1*S*)-1-({[({2-[(19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамоил)-2-фенилэтил]карбамоил}метил)карбамоил]метил}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP11A)

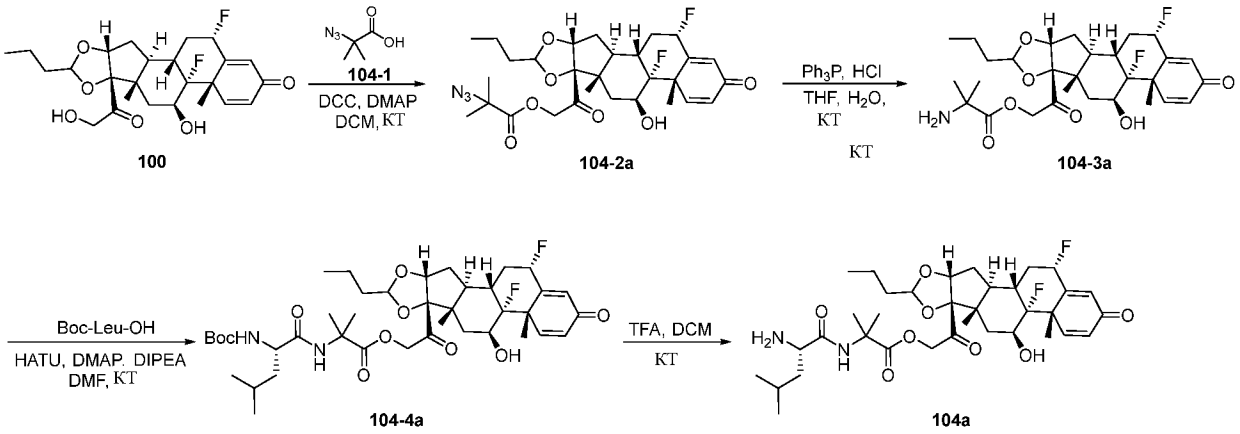


[0753] К раствору соединения **103-3** (15 мг, 18 ммоль) в DMF (0.5 мл) добавили HATU (14 мг, 36 ммоль) и DIPEA (9.3 мг, 72 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 10 мин и затем к смеси добавили соединение **103b** (10 мг, 18 ммоль). Затем

реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили линкер-нагрузку **LP11A** (5.0 мг, выход 20%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 420.2 $(M/3 + H)^+$.

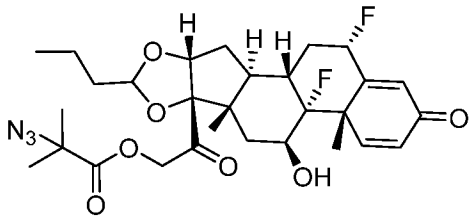
Синтез дипептидного пролекарственного препарата: Линкер-нагрузка LP12A

Схема 104A. Синтез нагрузки 104a



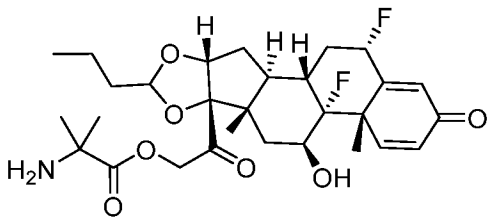
[0754] ***Альфа*-Азидоизомасляную кислоту 104-1** синтезировали согласно *Org. Lett.*, **2001**, 3(5), 781-783.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-азидо-2-метилпропаноат (104-2a)



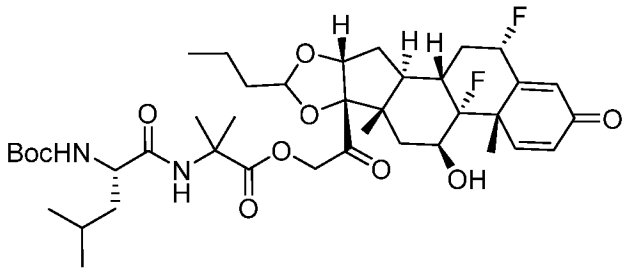
[0755] К раствору соединения **100** (0.10 г, 0.21 ммоль) в DCM (30 мл) добавили соединение **104-1** (52 мг, 0.40 ммоль), DCC (90 мг, 0.44 ммоль) и DMAP (10 мг) и смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **104-2a** (80 мг, выход 70%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 578.3 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-амино-2-метилпропаноат (104-3a)



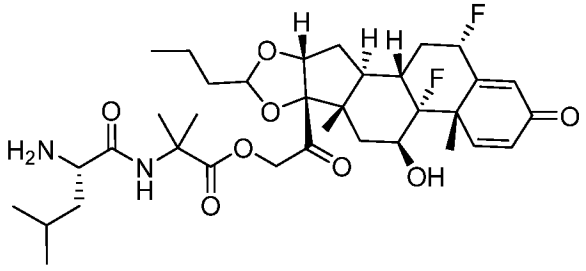
[0756] К раствору соединения **104-2a** (75 мг, 0.15 ммоль) в THF (5 мл) добавили PPh_3 (0.15 г, 0.57 ммоль), воду (5 мл) и конц. HCl (1 капля) и реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Смесь сконцентрировали *in vacuo* и разбавили DMF. Осадок удалили фильтрацией. Фильтрат очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **104-3a** (45 мг, выход 54%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 552.3 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-[(2*S*)-2-{[(*трет*-бутокси)карбонил]амино}-4-метилпентанамидо]-2-метилпропаноат (104-4a)



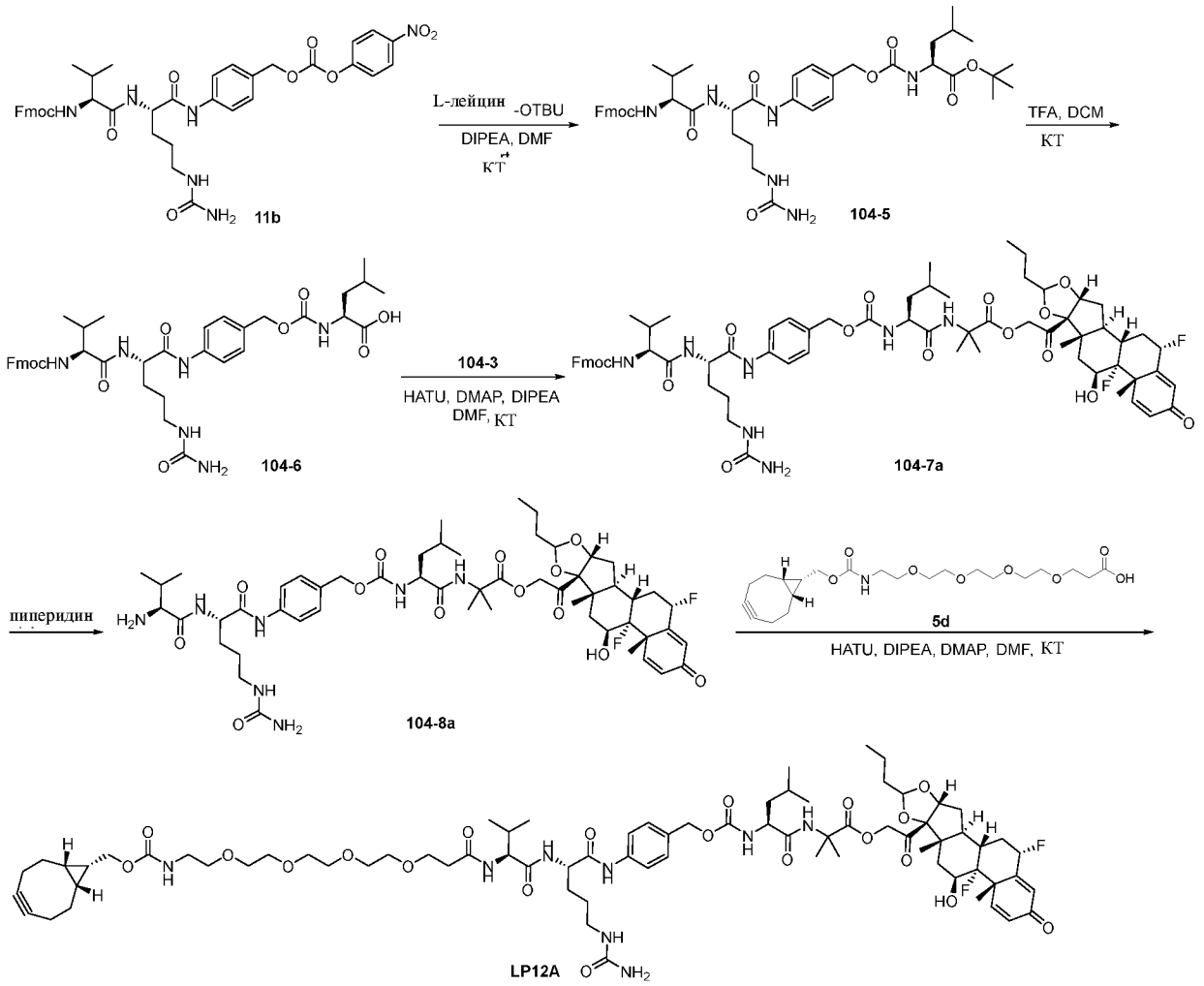
[0757] К смеси Boc-Leu-OH (20 мг, 87 ммоль) и HATU (50 мг, 0.13 ммоль) в DMF (3 мл) добавили DIPEA (30 мг, 0.23 ммоль), DMAP (2 мг) и соединение **104-3a** (30 мг, 54 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение часа под контролем ЖХМС. Смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ A) и получили соединение **104-4a** (25 мг, выход 55%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 787.4 $(M + Na)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-[(2*S*)-2-амино-4-метилпентанамидо]-2-метилпропаноат (104a)

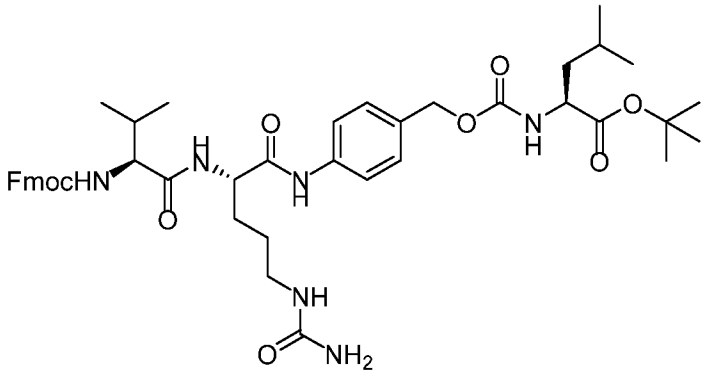


[0758] К смеси соединения **104-4a** (25 мг, 33 ммоль) в DCM (1.5 мл) добавили TFA (0.15 мл) и смесь перемешивали при КТ в течение часа до полного удаления Boc согласно ЖХМС. Реакционную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **104a** (13 мг, выход 61%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 665.4 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.39 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.27 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 6.31 (d, J = 10.1 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.63 (t, J = 24.2 Гц, 2H), 5.30-5.05 (m, 1H), 4.96 (d, J = 17.7 Гц, 1H), 4.81-4.65 (m, 2H), 4.20 (s, 1H), 2.69-2.54 (m, 1H), 2.36-2.15 (m, 1H), 2.12-1.94 (m, 2H), 1.85-1.63 (m, 2H), 1.63-1.53 (m, 3H), 1.52-1.41 (m, 11H), 1.41-1.10 (m, 6H), 0.97-0.76 (m, 12H) ppm.

Схема 104B. Синтез Линкер-нагрузки LP12A

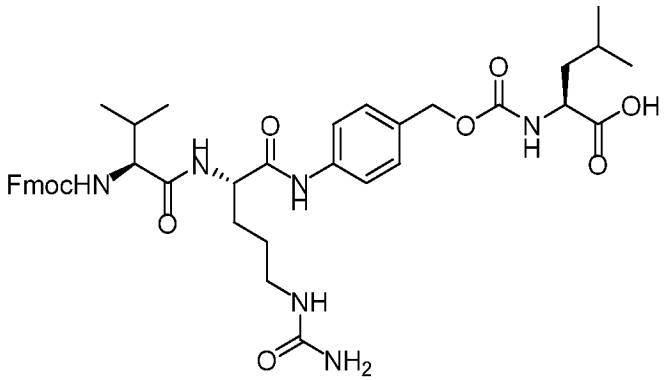


***трет*-бутил (2*S*)-2-{[({4-[(2*S*)-5-(карбамоиламино)-2-[(2*S*)-2-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-метилпентаноат (104-5)**



[0759] К раствору соединения **11b** (0.30 г, 0.39 ммоль) и H-Leu-OTBU-OH (0.14 г, 0.63 ммоль) в DMF (3 мл) добавили DIPEA (0.26 г, 2.0 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ A) и получили соединение **104-5** (0.11 г, выход 35%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 815.4 $(M + H)^+$.

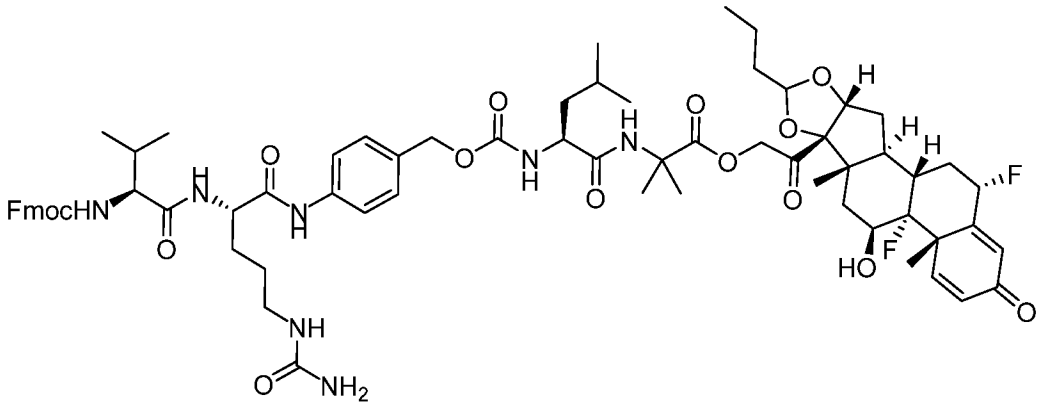
(2*S*)-2-{[({4-[(2*S*)-5-(карбамоиламино)-2-[(2*S*)-2-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-метилпентановая кислота (**104-6**)



[0760] К раствору соединения **104-5** (25 мг, 31 ммоль) в DCM (4 мл) добавили TFA (0.8 мл) и смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **104-6** (15 мг, выход 67%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 759.3 $(M + H)^+$.

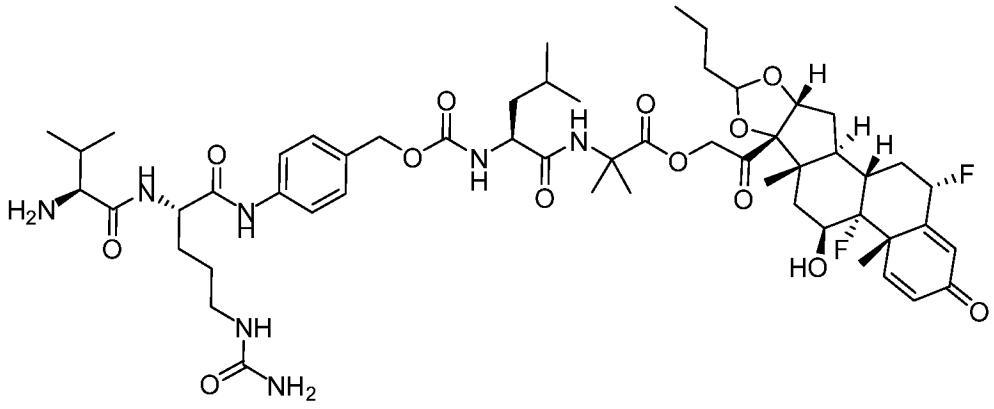
2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-[(2*S*)-2-{[({4-[(2*S*)-5-(карбамоиламино)-2-[(2*S*)-2-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-3-

метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-метилпентанамидо]-2-метилпропаноат (**104-7a**)



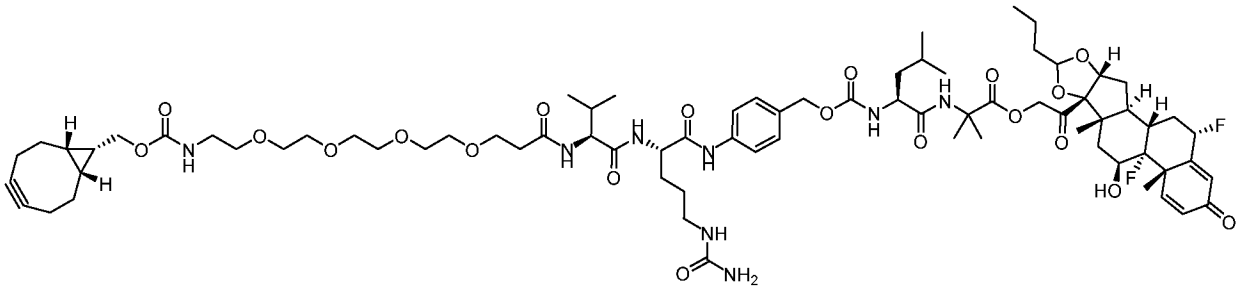
[0761] К раствору соединения **104-5** (20 мг, 26 ммоль) и соединения **104-3** (17 мг, 32 ммоль) в DMF (2 мл) добавили HATU (20 мг, 52 ммоль), DIPEA (13 мг, 0.10 ммоль) и DMAP (1 мг) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ А) и получили соединение **104-7a** (30 мг, выход 89%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1293 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-[(2*S*)-2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-метилпентанамидо]-2-метилпропаноат (**104-8a**)



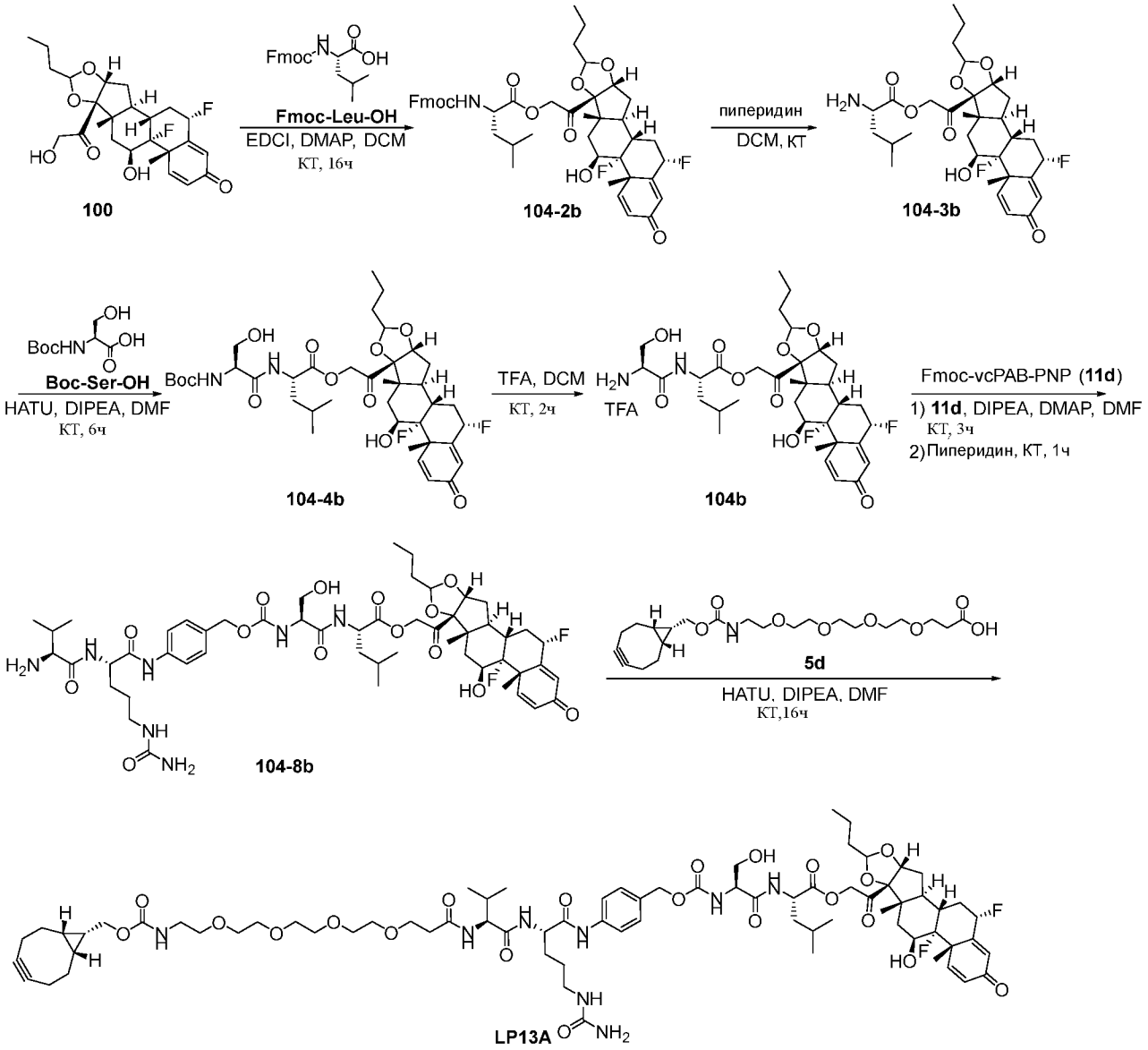
[0762] К раствору соединения **104-7a** (25 мг, 19 ммоль) в DMF (2 мл) добавили пиперидин (0.2 мл) и смесь перемешивали при КТ в течение получаса до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Полученную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-50% ацетонитрил в вод. TFA (0.03%)) и получили соединение **104-8a** (20 мг, выход 95%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 1070.5 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-[(2*S*)-2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-({[*эндо*-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-метилпентанамидо]-2-метилпропаноат (**LP12A**)

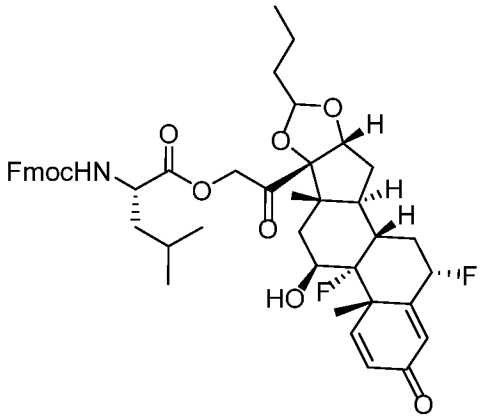


[0763] К раствору соединения **104-8a** (20 мг, 26 ммоль) и соединения **5d** (14 мг, 32 ммоль) в DMF (2 мл) добавили HATU (22 мг, 58 ммоль), DIPEA (15 мг, 0.12 ммоль) и DMAP (1 мг) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ A) и получили линкер-нагрузку **LP12A** (10 мг, выход 21%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 747.6 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.97 (s, 1H), 8.35-8.25 (m, 1H), 8.11 (d, J = 7.4 Гц, 1H), 7.87 (d, J = 8.6 Гц, 1H), 7.58 (d, J = 8.2 Гц, 2H), 7.34-7.18 (m, 4H), 7.17-7.04 (m, 1H), 6.30 (d, J = 10.1 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.03-5.90 (s, 1H), 5.72-5.50 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.34-3.91 (m, 12H), 3.66-3.38 (m, 15H), 3.15-2.88 (m, 4H), 2.73-2.53 (m, 1H), 2.50-2.45 (m, 1H), 2.41-2.31 (m, 1H), 2.30-1.90 (m, 9H), 1.83-1.62 (m, 2H), 1.63-1.17 (m, 27H), 0.92-0.77 (m, 20H) ppm.

Схема 104C. Синтез Нагрузки 104b и ее линкер-нагрузки LP13A

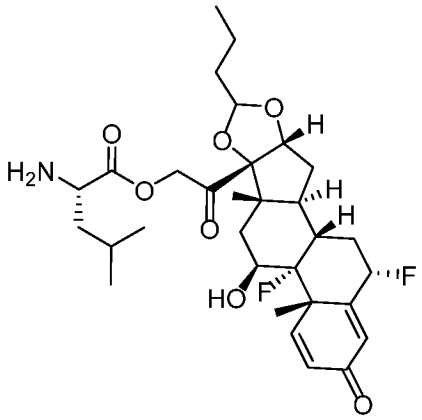


2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2*S*)-2-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-4-метилпентаноат (104-2b)



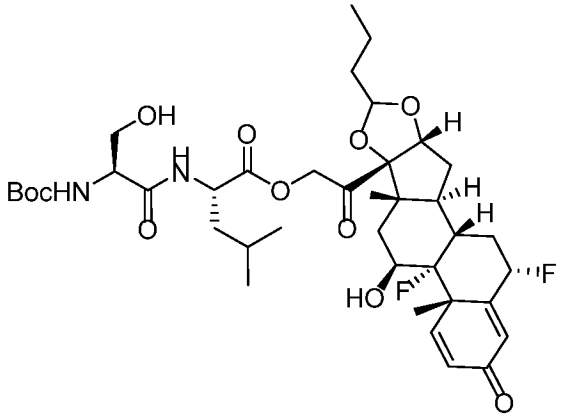
[0764] К раствору соединения **100** (0.47 г, 1.0 ммоль) и **Fmoc-Leu-OH** (0.39 г, 1.1 ммоль) в DCM (10 мл) добавили EDCI (0.23 г, 1.2 ммоль) и DMAP (12 мг, 0.10 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 16 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь разбавили водой (50 мл) и экстрагировали DCM (50 мл x 2). Объединенный органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (10-50% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **104-2b** (0.52 г, выход 65%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 802.4 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2*S*)-2-амино-4-метилпентаноат (**104-3b**)



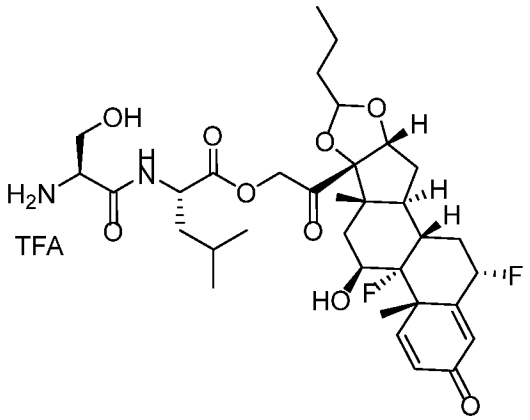
[0765] К раствору соединения **104-2b** (0.50 г, 0.62 ммоль) в DCM (9 мл) добавили пиперидин (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 30 минут до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (5-10% метанол в DCM) и получили соединение **104-3b** (0.32 г, выход 90%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 580.3 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2*S*)-2-[(2*S*)-2-{[(*трет*-бутокси)карбонил]амино}-3-гидроксипропанамидо]-4-метилпентаноат(104-4b)



[0766] К смеси соединения **104-3b** (0.32 г, 0.55 ммоль) и **Boc-Ser-OH** (0.14 г, 0.66 ммоль) в DMF (3 мл) добавили HATU (0.25 г, 0.66 ммоль) и DIPEA (0.21 г, 1.6 ммоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ в течение 6 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (10-50% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **104-4b** (0.34 мг, выход 80%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 767.4 $(M + H)^+$.

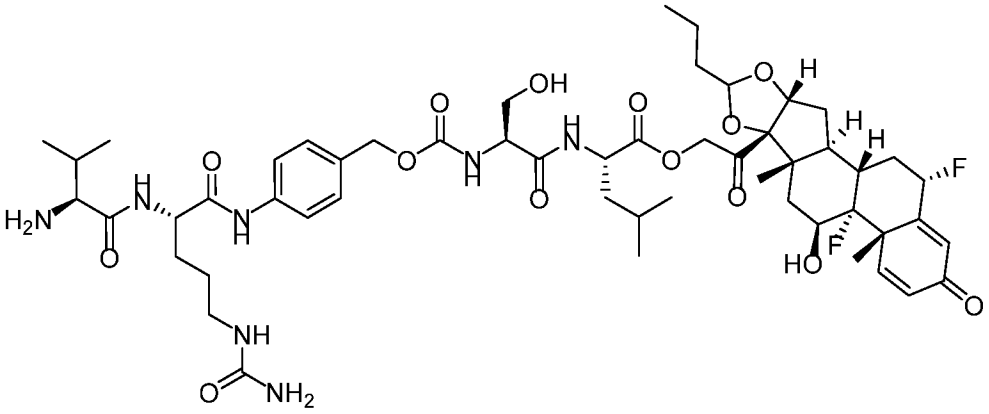
2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-гидроксипропанамидо]-4-метилпентаноат трифторуксусной кислоты соль (104b)



[0767] К раствору соединения **104-4b** (0.34 г, 0.44 ммоль) в DCM (5 мл) добавили TFA (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов до полного удаления Boc согласно ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали, и остаток (0.33 г, выход 95%) был достаточно чистым для следующего этапа. 100 мг сырого продукта очистили далее

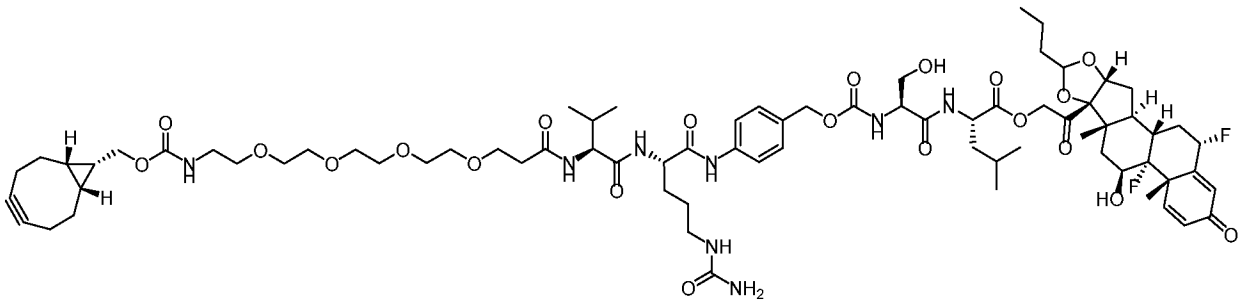
посредством преп-ВЭЖХ (способ A) и получили соединение **104b** (80 мг, выход 80%) в виде желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 667.3 $(M + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-Дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2*S*)-2-[(2*S*)-2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-3-гидроксипропанамидо]-4-метилпентаноат(104-8b)



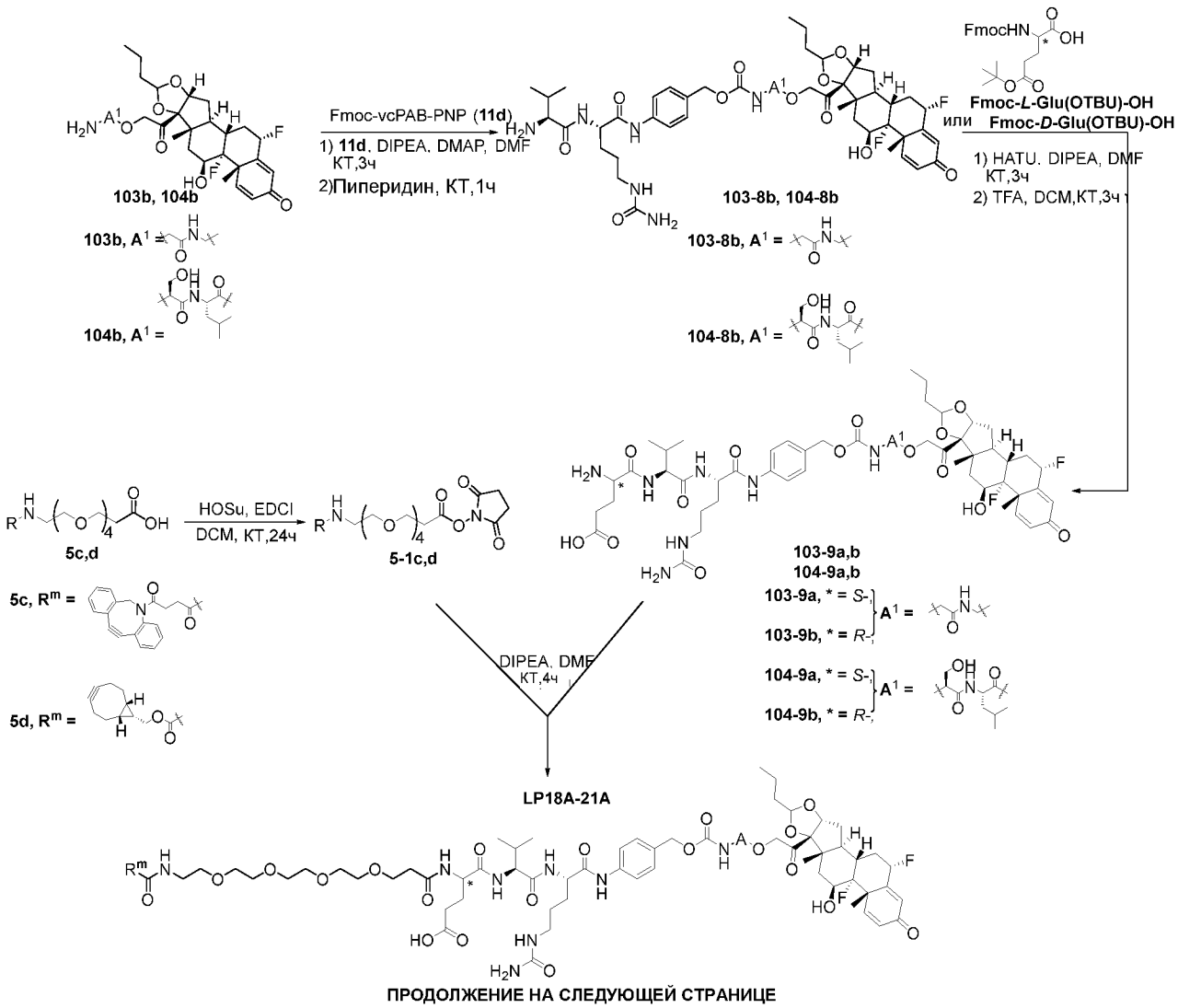
[0768] К раствору сырого соединения **104b** (0.10 г, 0.13 ммоль), полученному так, как было описано выше, в DMF (3 мл) добавили Fmoc-vcPAB-PNP (**11d**) (0.12 г, 0.16 ммоль), DMAP (16 мг, 0.13 ммоль) и DIPEA (50 мг, 0.39 ммоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до израсходования большей части исходных материалов под контролем ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (1 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **104-8b** (28 мг, выход 20%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 536.8 $(M/2 + H)^+$.

2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2*S*)-2-[(2*S*)-2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-({[*эндо*-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-3-гидроксипропанамидо]-4-метилпентаноат (LP13A)

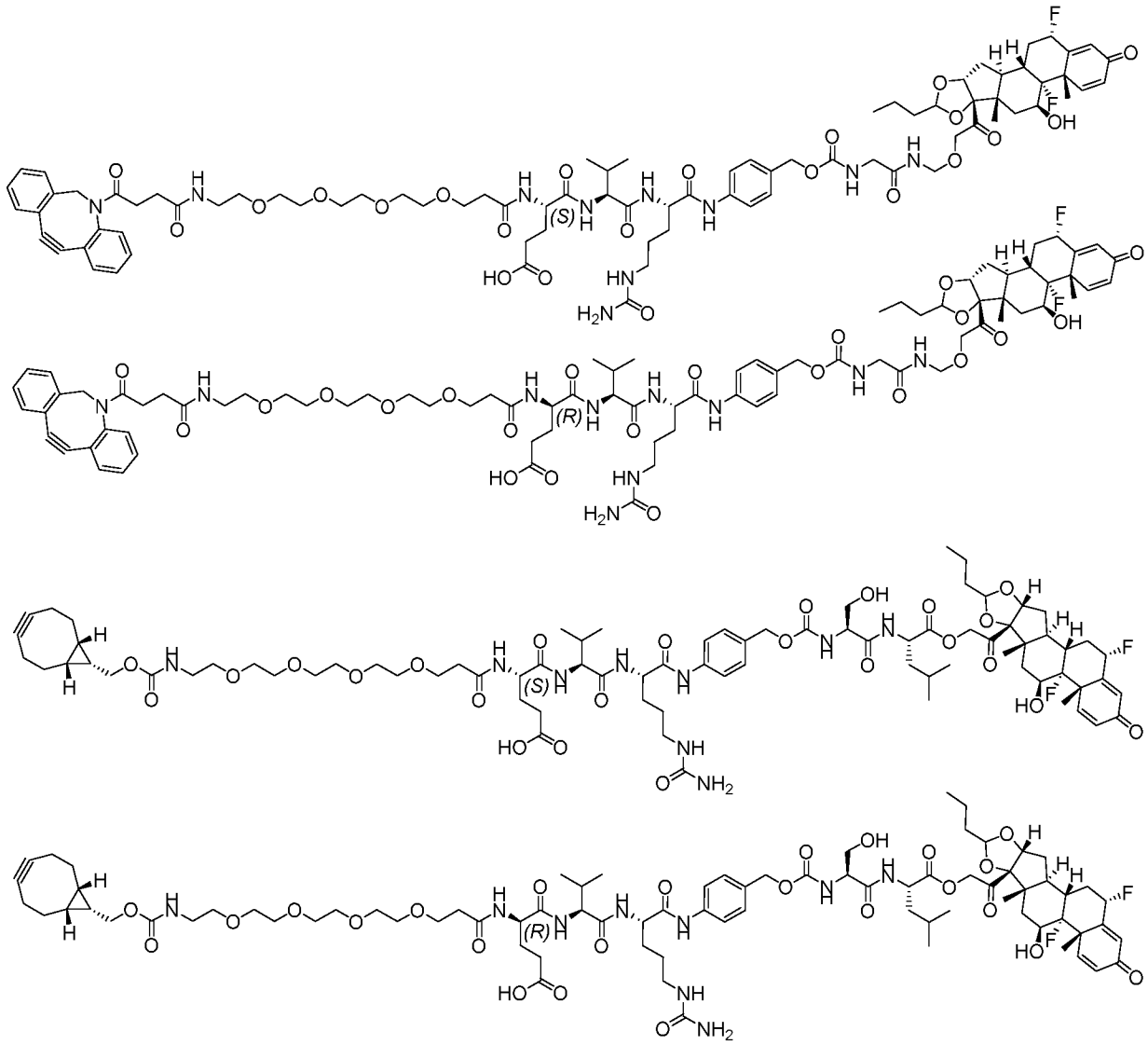


[0769] К раствору соединения **5d** (10 мг, 22 ммоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (9 мг, 22 ммоль) и DIPEA (8.0 мг, 62 ммоль) последовательно при КТ. Смесь перемешивали при КТ в течение получаса и затем добавили раствор соединения **104-8b** (20 мг, 19 ммоль) в DMF (1 мл). Полученную смесь перемешивали при КТ в течение 2 часов до израсходования соединения **104-8b** под контролем ЖХМС. После фильтрации через мембрану фильтрат очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили линкер-нагрузку **LP13A** (10 мг, выход 35%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 748.4 $(M/2 + H)^+$.

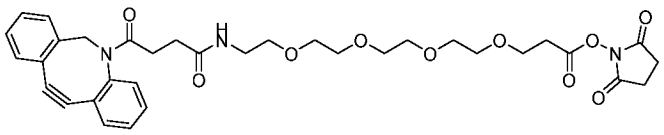
Схема 105. Синтез LP18A-21A



ПРОДОЛЖЕНИЕ НА СЛЕДУЮЩЕЙ СТРАНИЦЕ

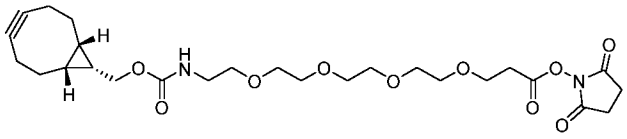


2,5-Диоксопирролидин-1-ил 1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-оат (5-1c)



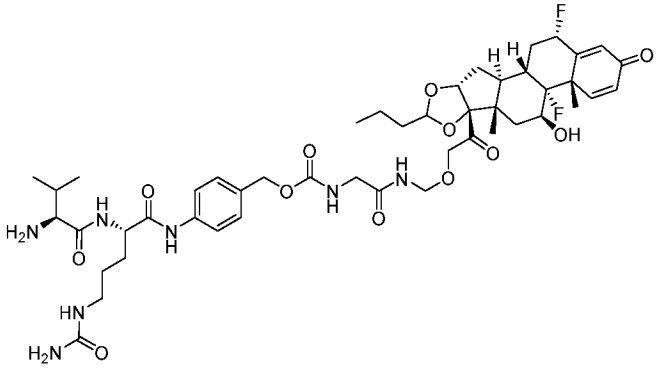
[0770] К раствору соединения **5c** (160 мг, 0.290 ммоль) в DCM (20 мл) добавили HOSu (73.3 мг, 0.637 ммоль) и EDCI (122 мг, 0.637 ммоль) и смесь перемешивали при КТ в течение 24 часов под контролем ЖХМС. Реакционную смесь разбавили DCM (50 мл) и органический слой промыли водой (50 мл) и рассолом, высушили безводным Na_2SO_4 и сконцентрировали *in vacuo* и получили соединение **5-1c** (159 мг, выход 84%) в виде бесцветного масла, которое использовали сразу же для следующего этапа. ИЭР м/з: 650 $(M + H)^+$.

2,5-Диоксопирролидин-1-ил 1-[({*эндо*-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-оат (**5-1d**)



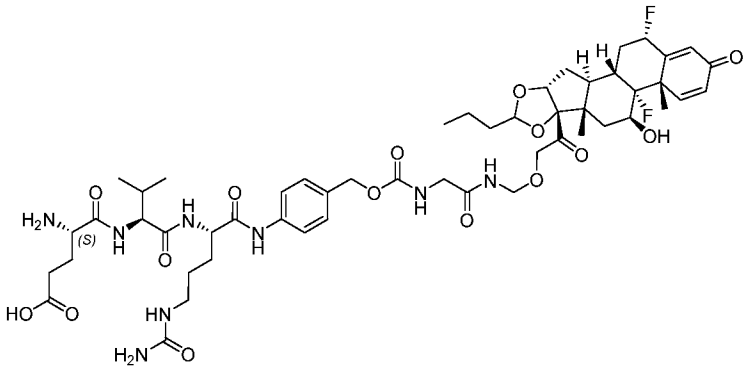
[0771] В соответствии с похожей процедурой для **5-1c**, за исключением замены **5c** на **5d**, получили соединение **5-1d** (150 мг, выход 54%) в виде бесцветного масла, которое использовали для следующего этапа сразу же без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 539 $(M + H)^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-{[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамат (**103-8b**)



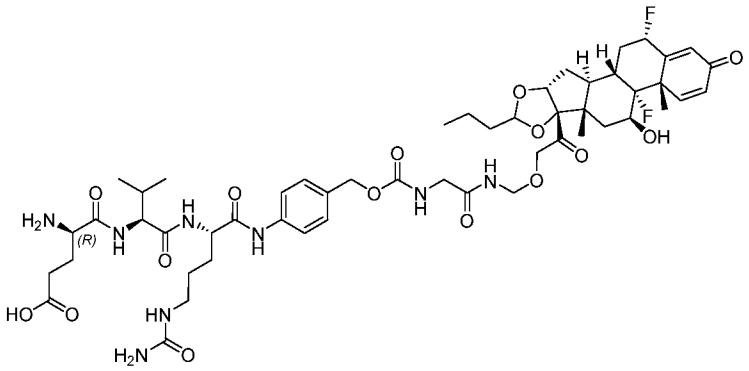
[0772] В соответствии с похожей процедурой для **104-8b** (см. схему 104C), за исключением замены **104b** на **103b**, получили соединение **103-8b** (28 мг, выход 20%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 480 $(M/2 + H)^+$.

(4*S*)-4-амино-4-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамоил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (**103-9a**)



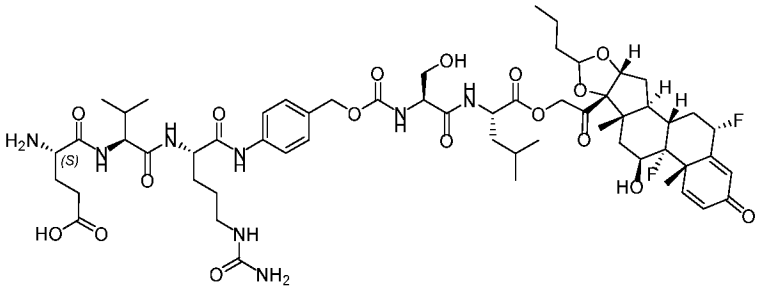
[0773] К раствору соединения **Boc-*L*-Glu(OTBU)-OH** (0.15 г, 0.50 ммоль) в DMF (5 мл) добавили HATU (0.19 г, 0.50 ммоль) и DIPEA (0.13 г, 1.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 10 минут и затем к реакционной смеси добавили соединение **103-8b** (0.48 г, 0.50 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов до полного израсходования **103-8b** согласно ЖХМС. Смесь экстрагировали при помощи EtOAc и объединенный органический раствор промыли водой, высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток растворили в DCM (10 мл). К раствору добавили TFA (2 мл) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Реакционную смесь сконцентрировали и остаток очистили сразу же посредством преп-ВЭЖХ (способ B) и получили соединение **103-9a** (0.41 г, выход 75%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 536.8 $(M/2 + H)^+$.

(4*R*)-4-амино-4-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамоил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (**103-9b**)



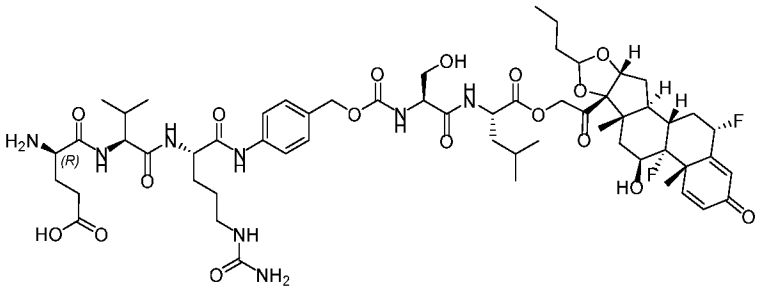
[0774] В соответствии со схожей процедурой для **103-9a**, за исключением замены **Boc-*L*-Glu(OTBU)-OH** на **Boc-*D*-Glu(OTBU)-OH**, получили соединение **103-9b** (0.40 г, выход 74%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 536.8 $(M/2 + H)^+$.

(4*S*)-4-амино-4-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-({4-[({[(1*S*)-1-{[(2*S*)-1-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}-4-метил-1-оксопентан-2-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамоил}окси)метил]фенил}карбамоил)бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (104-9a)



[0775] В соответствии со схожей процедурой для **103-9a**, за исключением замены **103-8b** на **104-8b**, получили соединение **104-9a** (0.39 г, выход 65%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 601.3 (M/2 + H)$^+$.

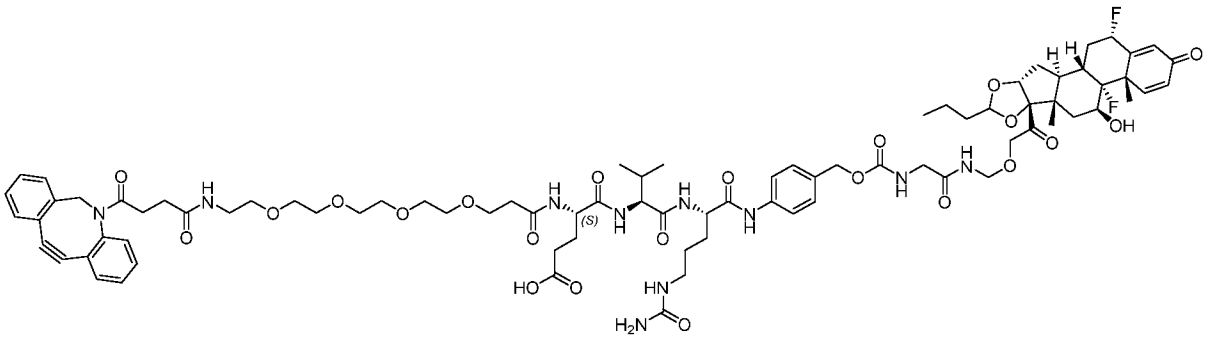
(4*R*)-4-амино-4-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-({4-[({[(1*S*)-1-{[(2*S*)-1-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}-4-метил-1-оксопентан-2-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамоил}окси)метил]фенил}карбамоил)бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (104-9b)



[0776] В соответствии со схожей процедурой для **103-9a**, за исключением замены **103-8b** на **104-8b**, **Boc-*D*-Glu(OTBU)-OH** for **Boc-*L*-Glu(OTBU)-OH**, получили соединение **104-9b** (0.39 г, выход 65%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 601.3 (M/2 + H)$^+$.

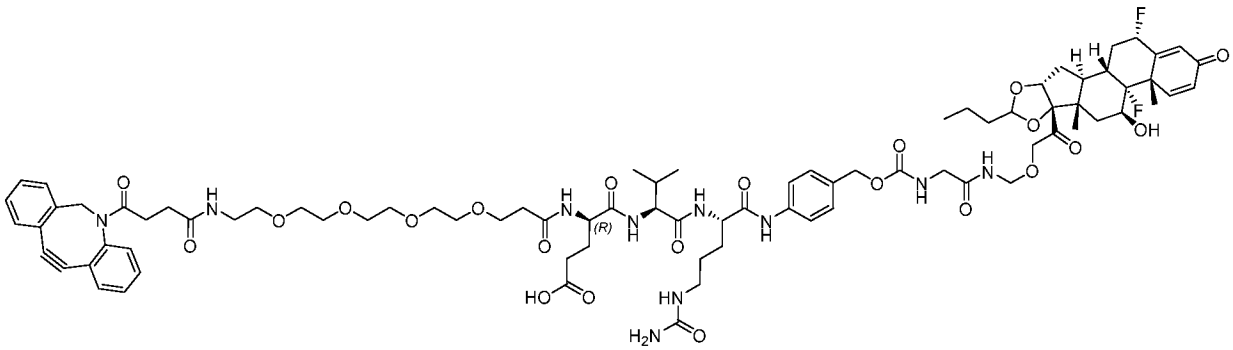
(4*S*)-4-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-

оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамоил)окси]метил}фенил)карбамоил]бути л]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (**LP18A**)



[0777] К раствору соединения **103-9a** (57 мг, 53 ммоль) в DMF (1 мл) добавили соединение **5-1c** (36 мг, 56 ммоль) и DIPEA (27 мг, 0.21 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Затем полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP18A** (12 мг, выход 15%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 811.4 $(M/2 + H)^+$.

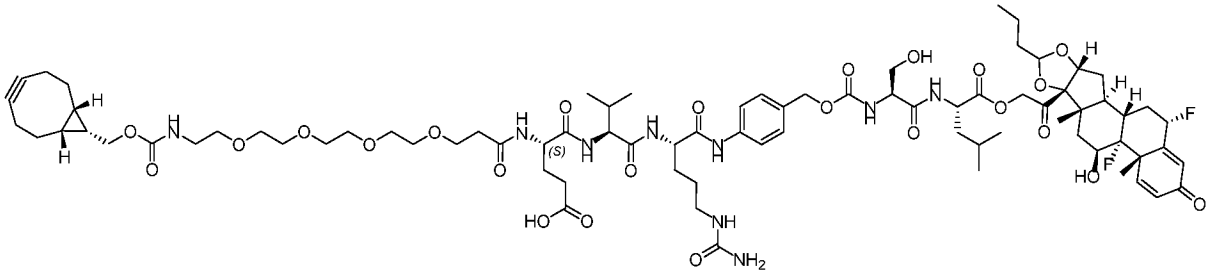
(4*R*)-4-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[({[({2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамоил)окси]метил}фенил)карбамоил]бути л]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (**LP19A**)



[0778] В соответствии со схожей процедурой для **LP18A**, за исключением замены **103-9a** на **103-9b**, получили соединение **LP19A** (14 мг, выход 17%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 811.4 $(M/2 + H)^+$.

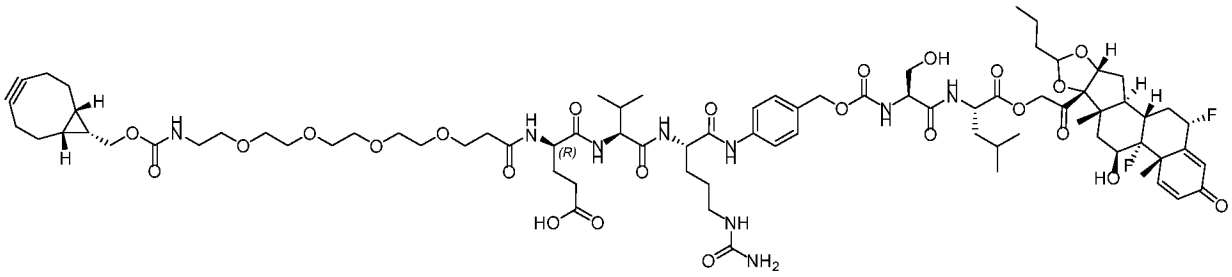
(4*S*)-4-{1-[({*эндо*-Бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}-4-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-({4-[({[(1*S*)-1-{[(2*S*)-1-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-

оксоэтокси}-4-метил-1-оксопентан-2-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамоил}окси)метил]фенил}карбамоил)бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (**LP20A**)



[0779] К раствору соединения **104-9a** (64 мг, 53 ммоль) в DMF (1 мл) добавили соединение **5-1d** (30 мг, 56 ммоль) и DIPEA (27 мг, 0.21 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Затем полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ЖХМС (способ B) и получили соединение **LP20A** (17 мг, выход 20%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 813.0 (M/2 + H)$^+$.

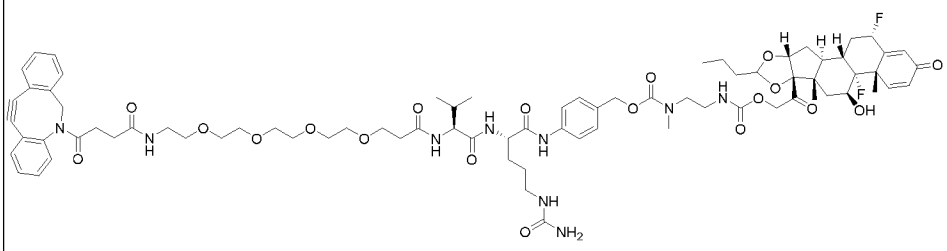
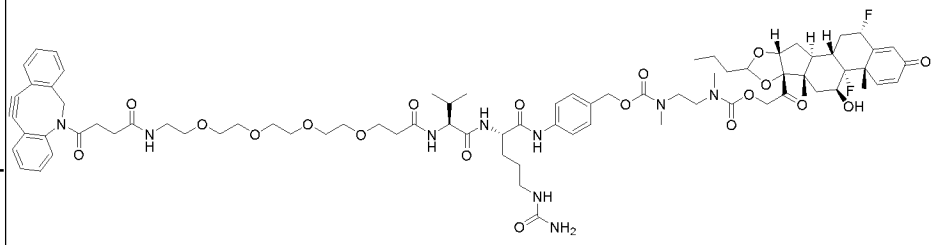
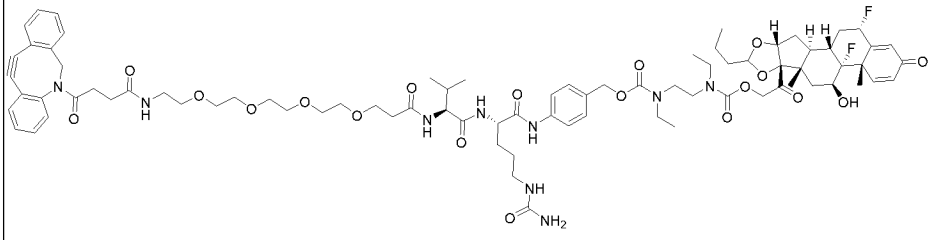
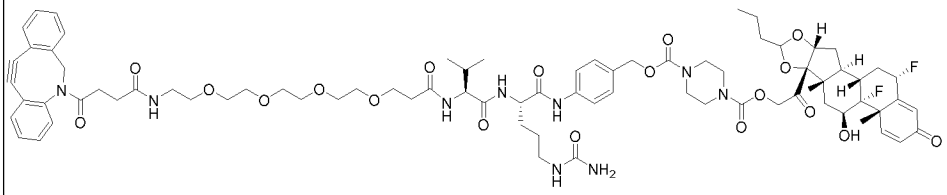
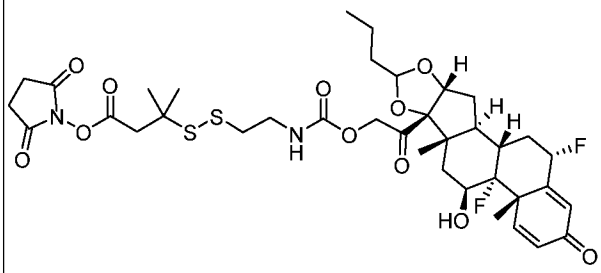
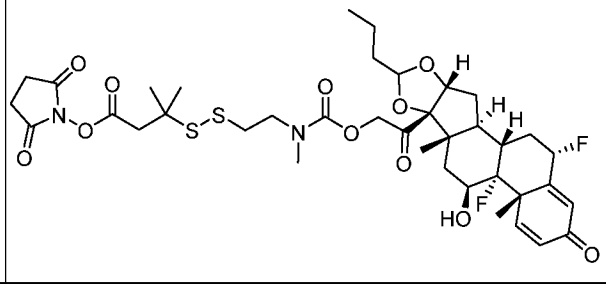
(4*R*)-4-{1-[({*эндо*-Бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}-4-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-({4-[({[(1*S*)-1-{[(2*S*)-1-{2-[(1*S*,2*S*,4*R*,8*S*,9*S*,11*S*,12*R*,13*S*,19*S*)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2},^{9}.0^{4},^{8}.0^{13},^{18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}-4-метил-1-оксопентан-2-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамоил}окси)метил]фенил}карбамоил)бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (**LP21A**)

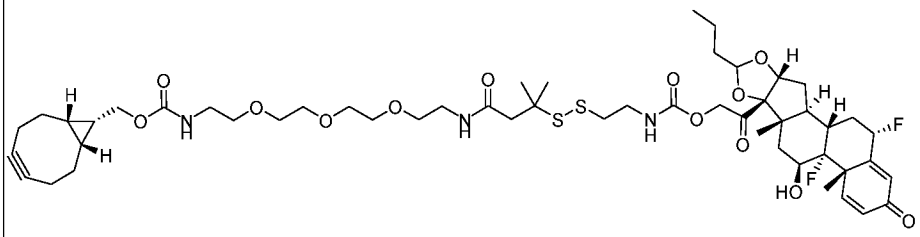
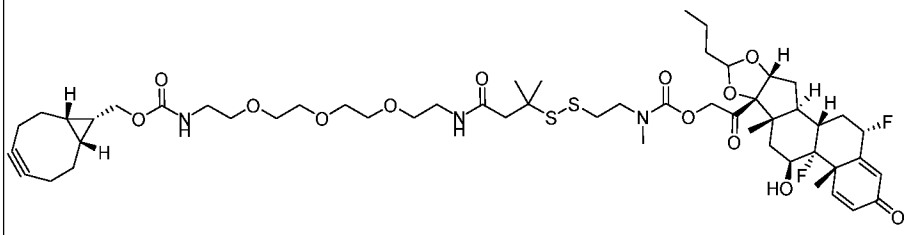
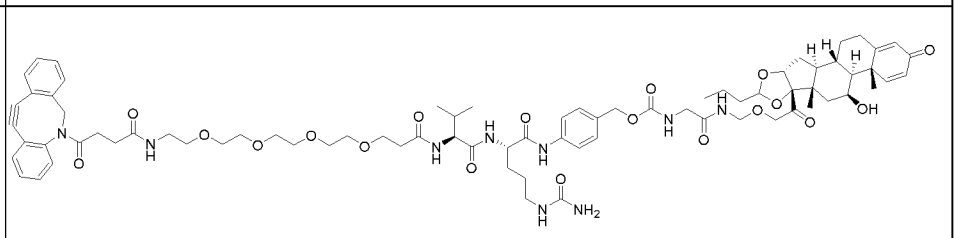
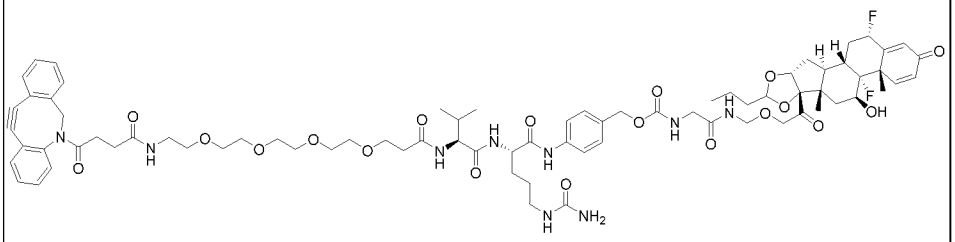
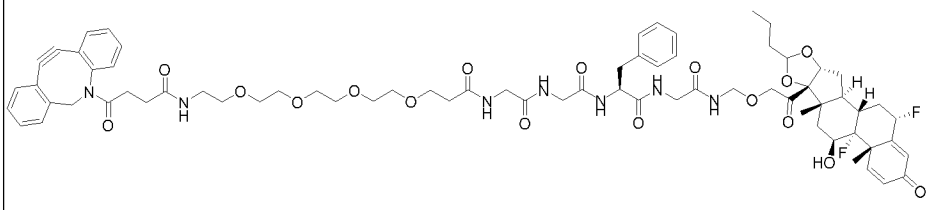
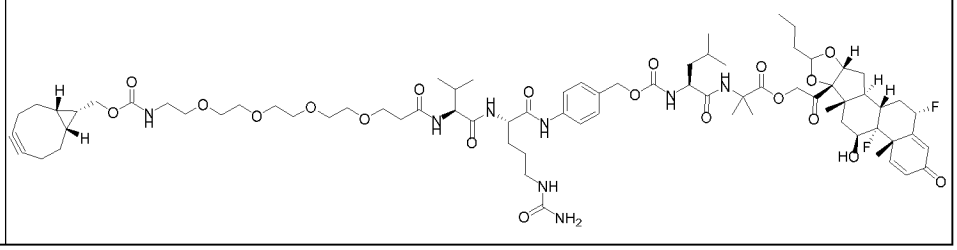


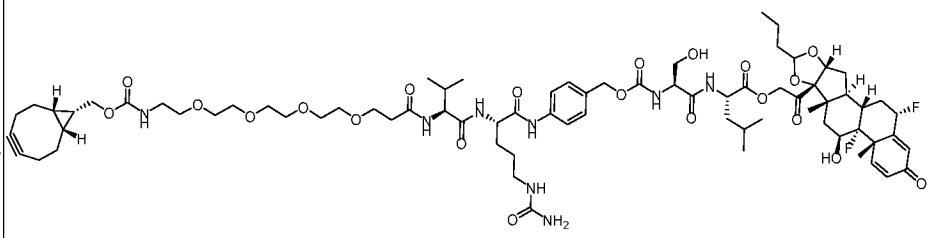
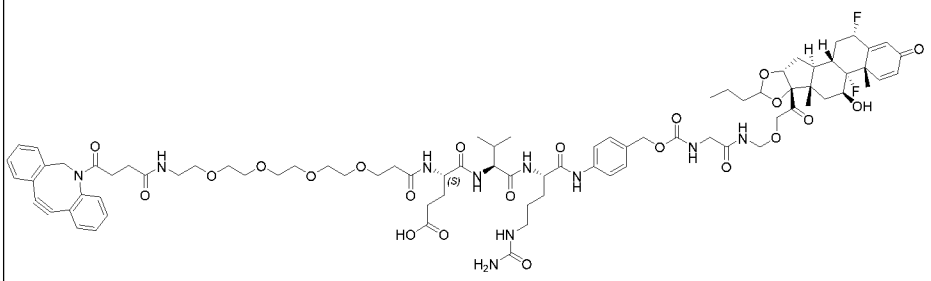
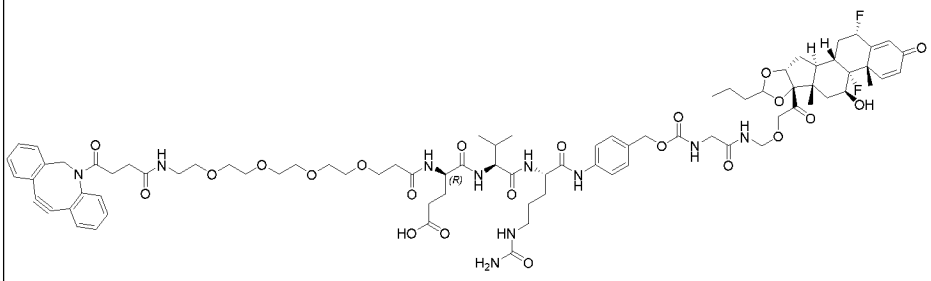
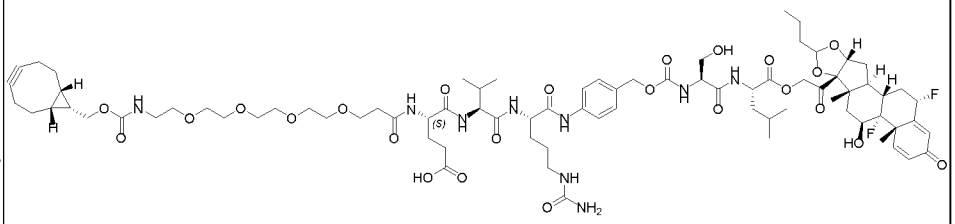
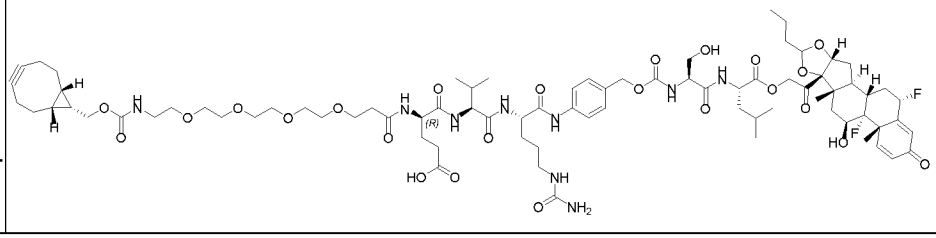
[0780] В соответствии со схожей процедурой для **LP20A**, за исключением замены **104-9a** на **104-9b**, получили соединение **LP21A** (14 мг, выход 17%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 813.0 (M/2 + H)$^+$.

[0781] В нижеприведенной Таблице 5B представлены линкер-нагрузки, приготовленные при помощи описанных здесь способов.

Таблица 5В. Примеры Линкер-Нагрузок

LP	Нагрузка	Название линкера	Структуры
LP1A	**101a**	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-MEDA-**100**	
LP2A	**101b**	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-DMEDA-**100**	
LP3A	**101c**	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-DEEDA-**100**	
LP4A	**101d**	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-Pip-**100**	
LP5A	**102e**	NHS-дисульфид-SEA-**100**	
LP6A	**102f**	NHS-дисульфид-SEMA-**100**	

LP	Нагрузка	Название линкера	Структуры
LP7A	**102e**	BCN-PEG3-дисульфид-SEA-**100**	
LP8A	**102f**	BCN-PEG3-дисульфид-SEMA-**100**	
LP9A	**103a**	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-Gly-AMO-**Bud**	
LP10A	**103b**	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-Gly-AMO-**100**	
LP11A	**103b**	DIBAC-suc-PEG4-GGFG-AMO-**100**	
LP12A	**104a**	BCN-PEG4-vcPAB-Leu-Aib-**100**	

LP	Нагрузка	Название линкера	Структуры
LP13A	**104b**	BCN-PEG4-vcPAB-Ser-Leu-**100**	
LP18A	**103b**	DIBAC-suc-PEG4-EVC-PAB-Gly-AMO-**100**	
LP19A	**103b**	DIBAC-suc-PEG4-dEVC-PAB-Gly-AMO-**100**	
LP20A	**104b**	BCN-PEG4-EVC-PAB-Ser-Leu-**100**	
LP21A	**104b**	BCN-PEG4-dEVC-PAB-Ser-Leu-**100**	

Пример 27. Характеристика Линкер-нагрузок

[0782] В Таблице 16 представлены результаты для чистоты ВЭЖХ и времени удерживания ЖХ для ВЭЖХ, М/З из масс-спектров. Аналитические методы ВЭЖХ и МС были описаны в общих процедурах, которые приведены в настоящем документе.

Таблица 16: Химико-физические свойства Линкер-нагрузок

LP	cLogP	МФ	МВ	Чистота ВЭЖХ (%)	ВУ ВЭЖХ (мин)[1]	МС (м/з) 100%	Высочайший пик м/з
13	**4.39**	C74H94F2N8O17	1405.60	>99	7.40[1]	703.5 (M/2+H)	703.5 (M/2+H)
15	**2.98**	C103H144F2N14O28S	2096.38	98	5.88	699.6 (M/3+H)	1049.0 (M/2+H) (67%)
3	6.25	$C_{80}H_{98}F_2N_8O_{18}$	1497.70	99	7.99[1]	1498.7 (M/2+H)	1498.7 (M+H) (10%)
6	6.59	$C_{115}H_{160}N_{16}O_{28}S$	2245.13	99	7.24	749.5 (M/3+H)	1123.8 (M/2 + H)$^+$

[1] Способ B для ВЭЖХ-МС

Таблица 17: Свойства Линкер-нагрузок

LP	cLogP	МФ	МВ	Чистота ВЭЖХ (%)	ВУ ВЭЖХ (мин)	МС (м/з) 100%	Высочайший пик м/з
LP1	-0.38	$C_{124}H_{175}N_{11}O_{44}$	2523.76	98	6.45, 6.55 (B)	841.8 [M/3+H]	1262.4 [M/2+H] (30%)
LP2	-3.92	$C_{136}H_{195}N_{11}O_{54}$	2848.04	96	7.48 (B)	955.0 [(M+18)/3] 949.5 (M/3+H)	1424.2 (M/2+H) (30%)
LP3	6.25	$C_{80}H_{98}F_2N_8O_{18}$	1497.67	100	7.99 (B)	749.5 (M/2+H)	1497.7 (M+H) (5%)
LP4	7.53	$C_{72}H_{100}N_{10}O_{13}$	1313.62	96	8.16 (B)	657.5 (M/2+H)	1313.6 (M+H) (5%)
LP5	-1.48	$C_{138}H_{193}N_{15}O_{49}$	2846.08	100	6.11, 6.21 (B)	949.0 (M/3+H)	1423.3 (M/2+H) (5%)
LP6	6.59	$C_{115}H_{160}N_{16}O_{28}S$	2246.66	100	7.24 (B)	749.5 (M/3+H)	1123.8 (M/2+H) (5%)
LP9	8.70	$C_{88}H_{112}N_{10}O_{18}$	1597.89	95	5.67 (B)	799.0 (M/2+H)	799.0 (M/2+H)
LP11	8.17	$C_{89}H_{117}N_{11}O_{16}$	1596.95	95	8.51 (B)	798.5 (M/2+H)	798.5 (M/2+H)
LP12	8.77	$C_{77}H_{86}Cl_2F_6N_{10}O_{15}S$	1608.53	99	9.36 (B)	804.2 (M/2+H)	804.2 (M/2+H)
LP13	4.39	$C_{74}H_{94}F_2N_8O_{17}$	1405.58	100	7.40 (B)	703.5 (M/2+H)	1405.7 (M+H) (5%)
LP14	-5.09	$C_{126}H_{177}F_2N_{13}O_{49}$	2695.81	100	6.23 (B)	899.2 (M/3+H)	1348.6 (M/2+H) (40%)

LP	cLogP	МФ	МВ	Чистота ВЭЖХ (%)	ВУ ВЭЖХ (мин)	МС (м/з) 100%	Высочайший пик м/з
LP15	2.98	$C_{103}H_{144}F_2N_{14}O_{28}S$	2096.38	98	5.88 (B)	699.6 (M/3+H)	1049.0 (M/2+H) (67%)
LP18	6.49	$C_{101}H_{142}N_{12}O_{23}S$	1924.34	97	7.57 (B)	642.2 (M/3+H)	962.5 (M/2+H) (70%)

Таблица 17A Характеристики Линкер-Нагрузок

LP	cLogP	МФ	МВ	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ ВУ (мин)	МС (м/з) 100%	Высочайший пик м/з
LP1A	4.26	$C_{78}H_{101}F_2N_9O_{19}$	1506.71	95		753.9 (m/2+H)	753.9 (m/2+H)
LP2A	4.48	$C_{79}H_{103}F_2N_9O_{19}$	1520.71	97		761.0 (m/2+H)	761.0 (m/2+H)
LP3A	5.20	$C_{81}H_{107}F_2N_9O_{19}$	1548.76	95		775.0 (m/2+H)	775.0 (m/2+H)
LP4A	4.31	$C_{79}H_{101}F_2N_9O_{19}$	1518.69	99		760.0 (m/2+H)	760.0 (m/2+H)
LP5A	3.40	$C_{37}H_{48}F_2N_2O_{11}S_2$	798.91	99		799.3 (m+H)	799.3 (m+H)
LP6A	3.62	$C_{38}H_{50}F_2N_2O_{11}S_2$	812.94	97		813.3 (m+H)	813.3 (m+H)
LP7A	5.20	C52H75F2N3O13S2	1052.29	97		526.7 (m/2+H)	526.7 (m/2+H)
LP8A	5.42	C53H77F2N3O13S2	1066.32	98		533.8 (m/2+H)	533.8 (m/2+H)
LP9A	3.65	$C_{77}H_{101}N_9O_{19}$	1456.70	96		729.0 (m/2+H)	729.0 (m/2+H)
LP10A	3.35	$C_{77}H_{99}F_2N_9O_{19}$	1492.68	95		513.8 (фрагмент)	747.0 (m/2+H)
LP11A	1.96	$C_{71}H_{87}F_2N_7O_{17}$	1348.51	95		450.2 (m/3+H)	675.2 (m/2+H)
LP12A	5.61	$C_{76}H_{110}F_2N_8O_{20}$	1493.75	90		747.6 (m/2+H)	747.6 (m/2+H)
LP13A	4.13	$C_{75}H_{108}F_2N_8O_{21}$	1495.70	95		748.4 (m/2+H)	748.4 (m/2+H)
LP18A	2.46	$C_{82}H_{106}F_2N_{10}O_{22}$	1621.77	95		811 (m/2+H)	811 (m/2+H)

LP	cLogP	МФ	МВ	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ ВУ (мин)	МС (м/з) 100%	Высочайший пик м/з
LP19A	2.46	$C_{82}H_{106}F_2N_{10}O_{22}$	1621.77	95		811 (m/2+H)	811 (m/2+H)
LP20A	3.25	$C_{80}H_{115}F_2N_9O_{24}$	1624.81	95		813 (m/2+H)	813 (m/2+H)
LP21A	3.25	$C_{80}H_{115}F_2N_9O_{24}$	1624.81	95		813 (m/2+H)	813 (m/2+H)

Пример 28. Конъюгация ADC

[0783] Данный пример демонстрирует способ сайт-специфической конъюгации, в общем, нагрузки с антителом или с его антиген-связывающим фрагментом. См. ФИГ. 16.

[0784] Полученные антитела к MSR1 (Таблица 4) видоизменили мутацией (N297Q) для включения сайта трансглутаминазы для конъюгации с терапевтической нагрузкой. Сайт-специфические агликозилированные антитела, содержащие мутацию N297Q, конъюгировали с амин–$ПЭГ_3$–N_3 для создания конъюгатов азидо-функционализованных антител (mAb-N_3), включая Ab–PEG_3–N_3 к MSR1.

[0785] Настоящий пример демонстрирует способ создания конъюгатов. Агликозилированное антитело с изотипом IgG1 человека в BupH™ (pH 7-8) смешали с ≥200 молярными эквивалентами азидо–$dPEG_3$–амина (МВ. 218.26 г/моль). Полученный раствор смешали с трансглутаминазой (25 ед/мл; 5ед MTG на мг антитела), что дало итоговую концентрацию антитела в 0.5–10 мг/мл, и затем раствор инкубировали при 37 °C на 4–24 часа при аккуратном встряхивании. Реакцию контролировали посредством SDS–PAGE или ИЭР–МС. По завершении излишек амина и МТГ удалили посредством эксклюзионной хроматографии по размеру (ЭХР) для создания азидо-функционализованного антитела (mAb-N_3). Данный продукт анализировали посредством SDS–PAGE и ИЭР–МС. Азидо–$dPEG_3$–амин добавили к двум сайтам – Q295 и Q297–антитела, что дало повышение в 804 Да для конъюгата агликозилированное антитело–$ПЭГ_3$–азид с 4DAR. Участки конъюгации определили и подтвердили при $EEQ^{Linker}YQ^{Linker}STYR$ для азидо-функционализованного антитела с 4DAR посредством пептидной карты секвенирования тяжелых цепей, перевариваемых трипсином.

[0786] Сайт-специфические конъюгаты агликозилированное антитело-лекарственное средство (ADC) с человеческим IgG1, содержащие мутацию N297Q, приготовили посредством реакции клик-химии [2+3] между азидо-функционализованным антителом (mAb-N_3) и алкин-содержащей линкер-нагрузкой (LP).

[0787] Сайт-специфический конъюгат антитела с линкер-нагрузкой (**LP**) приготовили посредством инкубирования **mAb–PEG$_3$–N$_3$** (1–12 мг / мл) в водной среде (например, PBS, PBS с содержанием 5% глицерина, HBS) с ≥6 молярными эквивалентами **LP**, растворенными в подходящем органическом растворителе, таком как DMSO, DMF или DMA (т.е. реакционная смесь содержит 5-20% органический раствор, об./об.) при 24 °C - 37 °C в течение 30 мин до 24 ч. Течение реакции контролировали посредством ИЭР–МС, и отсутствие **mAb–ПЭГ$_3$–N$_3$** указывало на завершение конъюгации. Избыточное количество **LP** и органический растворитель удалили посредством СЭХ через элюирование с PBS или посредством колоночной хроматографии на основе белка А через элюирование с кислым буфером с последующей нейтрализацией Tris (pH 8.0). Очищенные конъюгаты проанализировали посредством СЭХ, SDS–PAGE и ИЭР–МС. В Таблице 19 приведен список конъюгатов антитело-MMAE, конъюгатов антитело-стероид и конъюгатов антитело-агонист LXR от соответствующих линкер-нагрузок, их молекулярный вес и значения ИЭР–DAR.

[0788] В конкретном примере на азидо-функционализованное антитело (1 мг) в 0.800 мл PBSg (PBS, 5% глицерин, pH 7.4) воздействовали 6 молярными эквивалентами линкер-нагрузки (**LP**) в Таблице 1 (конц. 10 мг/мл в DMSO) в течение 2 часов при КТ и излишек линкер-нагрузки (**LP**) удалили посредством эксклюзионной хроматографии по размеру (ЭХР, Superdex 200 HR, GE Healthcare). Конечный продукт сконцентрировали посредством ультра-центрифугирования и охарактеризовали посредством УФ, ЭХР, SDS-PAGE и ИЭР-МС.

Пример 28A: Конъюгация ADC

[0789] Данный пример демонстрирует способ несайт-специфической конъюгации лекарственного средства с антителом при помощи тиол–малеимидной реакции.

[0790] Конъюгация через цистеины антител выполняется за два этапа с использованием способов, аналогичных описанным в *Mol Pharm.* 2015 Jun 1;12(6):1863-71.

[0791] Моноклональное антитело (mAb, 10 мг/мл в 50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl) при pH 7.5 восстанавливают 1 мМ дитиотреитола (0.006 мг на мг антитела) или TCEP (2.5 молярный эквивалент антитела) при 37 °C в течение 30 минут. Концентрацию антитела рассчитали на основании поглощения на 280 нм на Nanodrop (ThermoFisher Scientific) и коэффициента экстинкции антитела. После гель-фильтрации (G–25, pH 4.5 ацетат натрия) соединение линкер-нагрузки в DMSO (10 мг/мл) добавили к восстановленному антителу и pH смеси откорректировали до pH 7.0 с 1 M HEPES (pH 7.4). Смеси дали прореагировать в течение 3–14 часов. Полученный конъюгат очистили посредством ЭХР.

Значения DAR (УФ) определяются с использованием измеренных поглощений ncADC и коэффициентов экстинкции антитела и соединения **LP**.

Пример 29. Характеристика ADC посредством ЖХ–ИЭР–МС

[0792] Измерение массы исходного вещества для образцов ADC посредством ЖХ–ИЭР–МС провели, чтобы определить профиль распределения лекарственного средства-нагрузки и рассчитать среднее значение DAR. Каждый анализируемый образец (20-50 нг, 5 мкл) загрузили в колонку Acquity UPLC Protein BEH C4 (10K psi, 300 Å, 1.7 мкм, 75 мкм × 100 мм; Кат. № 186003810). Через 3 минуты обессоливания белок элюировали и масс-спектры получили при помощи масс-спектрометра Waters Synapt G2–Si. Как указано в Таблице 18, большинство сайт-специфических ADC имеют DAR 3.9 – 4 для сайт-специфических конъюгатов.

Таблица 18: Свойства ADC

LP №	**MB (LP)**	**Ab, Ab–N_3 или ncADC**	**MC м/з (ncADC)**	**DAR (ИЭР–МС)**
		H1H27729P		
		H1H27729P-N_3	144166	4
1	2523.8	H1H27729P-LP1		
		H1H27731P	144620	4
		H1H27731P-N_3		
1	2523.8	H1H27731P-LP1		
		H1H27732P	144176	5.7
		H1H27732P-N_3		
1	2523.8	H1H27732P-LP1		
		H1H27734P	145110	4.4
		H1H27734P-N_3		
1	2523.8	H1H27734P-LP1		
		H1H27736P	145940	4
		H1H27736P-N_3		
1	2523.8	H1H27736P-LP1		
		H1H27739P	145251	4
		H1H27739P-N_3		
1	2523.8	H1H27739P-LP1		
		H1H27747P	145214	5.3
		H1H27747P-N_3		

LP №	MB (LP)	Ab, Ab–N_3 или ncADC	МС м/з (ncADC)	DAR (ИЭР–МС)
1	2523.8	H1H27747P-LP1		
		H1H27749P	143441	4
		H1H27749P-N_3		
1	2523.8	H1H27749P-LP1		
		H1H17751P	146092	3.8
		H1H17751P-N_3		
1	2523.8	H1H17751P-LP1		
		H1H27754P	145477	4.2
		H1H27754P-N_3		
1	2523.8	H1H27754P-LP1		
		H1H27756P	145503	
		H1H27756P-N_3	146310	4
1	2523.8	H1H27756P-LP1	156424	4
		H1H17759P2	145126	
		H1H17759P2-N_3	145930	4
1	2523.8	H1H17759P2-LP1	156046	4
		H1H17760P	145611	
		H1H17760P2-N_3	146431	4
1	2523.8	H1H17760P2-LP1	156533	4
		H1H17761P2	145508	
		H1H17761P2-N_3	146717	6
1	2523.8	H1H17761P-LP1	161884 159158	5.34
		H1H27762P2	144371	
		H1H27762P2-N_3	145177	4
1	2523.8	H1H27762P2-LP1	155294	4
		H1H27766P2	146314	
		H1H27766P2-N_3	147121	4
1	2523.8	H1H27766P2-LP1	157236	4
		H1H27771P2	145966	
		H1H27771P2-N_3	146774	4
1	2523.8	H1H27771P2-LP1	156890	4
		H1H27773P2	145533	

LP №	MB (LP)	Ab, Ab–N_3 или ncADC	МС м/з (ncADC)	DAR (ИЭР–МС)
		H1H27773P2-N_3	146337	4
1	2523.8	H1H27773P2-LP1	156453	4
		H1H27778P2	145310	
		H1H27778P2-N_3	146115	4
1	2523.8	H1H27778P2-LP1	156227	4
		H1H21231N		
		H1H21231N-N_3	Партия2	2
1	2523.8	H1H21231N-LP1	Партия4	1.9
		H1H21227N		
		H1H21227N -N_3	Партия2	4
1	2523.8	H1H21227N -LP1	Партия3	3.7
		H1H21231N		
		H1H21231N -N_3	Партия2	6
1	2523.8	H1H21231N -LP1	Партия3	5.9
		H1H21235N	145487	
		H1H21235N -N_3	146288	4
1	2523.8	H1H21235N -LP1	156390	4.1
		H1H25700N	145484	
		H1H25700N -N_3	146688	6
1	2523.8	H1H25700N -LP1	161873	6
		H1H25690N	145157	
		H1H25690N -N_3	145969	4
1	2523.8	H1H25690N -LP1	156060	4.1
		H1H25695N	145736	
		H1H25695N -N_3	146537	4
1	2523.8	H1H25695N -LP1	156637	3.9
		H1H25685N	145380	
		H1H25685N -N_3	146582	6
1	2523.8	H1H25685N -LP1	161767	5.8
		H1H21228N	144830	
		H1H21228N -N_3	145631	4
1	2523.8	H1H21228N -LP1	155732	4.2
		H1H21234N	145790	

LP №	MB (LP)	Ab, Ab–N_3 или ncADC	МС м/з (ncADC)	DAR (ИЭР–МС)
		H1H21234N -N_3	146583	4
1	2523.8	H1H21234N -LP1	156691	4
2	2848.1	H1H21234N -LP2	157983	3.9
4	1313.7	H1H21234N -LP4	151841	3.9
5	2846.2	H1H21234N -LP5	157963	3.9
6	2246.7	H1H21234N -LP6	155570	3.9
9	1597.9	H1H21234N -LP9	152975	3.9
11	1597.0	H1H21234N -LP11	152979	3.9
12	1608.6	H1H21234N -LP12	153019	3.9
13	1405.6	H1H21234N -LP13	152218	3.9
14	2695.9	H1H21234N -LP14	157369	3.6
15	2096.4	H1H21234N -LP15	154964	3.9
3	1497.7	H1H21234N -LP3	152568	3.9
Fel D1		Изотипический контроль-N297Q		
		Изотипический контроль-N297Q-N_3	146251	4
1	2523.8	Изотипический контроль-N297Q-LP1	156352	3.9
13	1405.6	Изотипический контроль-N297Q-LP13	152218	3.9
14	2695.9	Изотипический контроль-N297Q-LP14	157369	3.6
15	2096.4	Изотипический контроль-N297Q-LP15	154964	3.9
3	1496.7	Изотипический контроль-N297Q-LP3	152568	4

Пример 30. Кинетика связывания конъюгатов антитело к MSR1-лекарственное средство, определенная методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсора Biacore

[0793] Описанные здесь антитела к MSR1 были конъюгированы с различными нагрузками рецептора X печени (LXR) или различными стероидными нагрузками. Данный пример описывает то, как были определены значения равновесной константы диссоциации (K_D) для реактивов MSR1 человека, связывающихся с конъюгатами антитело к MSR1-лекарственное средство и с их соответствующими неконъюгированными исходными антителами, при помощи биосенсора Biacore T200 методом поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени.

[0794] Все исследования связывания провели в подвижном буфере 10 мМ HEPES, 300 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0.05% об./об. ПАВ Tween-20, pH 7.4 (HBS-ET) при 25°C. Поверхность сенсорного чипа Biacore CM4 первоначально дериватизировали посредством связывания аминов со специфическим поликлональным антителом козы, специфическим к Fcγ человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories, кат. № BR-1008-39) для захвата моноклональных антител к MSR1. Исследования связывания выполнили на человеческом внеклеточном домене MSR1, экспрессированным с нонагистидиновой меткой на N-конце (His9-hMSR1; R&D Systems, кат. № 2708-MS). Разные концентрации His9-hMSR1 (100 нМ – 3.7 нМ или 30 нМ – 3.33 нМ; 3-кратное последовательное разведение) сначала приготовили в подвижном буфере HBS-ET и вводили на поверхности моноклонального антитела к MSR1 в течение 3 минут с расходом 50 мкл/мин, и диссоциацию реактива MSR1, связанного с моноклональным антителом, контролировали на протяжении 8-10 минут в подвижном буфере HBS-ET.

[0795] Скорость ассоциации (k_a) и скорость диссоциации (k_d) определили посредством подстановки сенсограмм связывания реального времени в модель связывания 1:1 с ограничением массопереноса с использованием программного обеспечения для подбора аппроксимирующей кривой Scrubber 2.0c. Константу равновесия при диссоциации связывания (K_D) и диссоциативный период полужизни ($t_{½}$) рассчитали на основании кинетических скоростей следующим образом:

$$K_D\ (M) = \frac{kd}{ka},\ и\ t_{½}\ (мин) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

[0796] Параметры кинетики связывания для связывания His9-hMSR1 с разными конъюгатами антитело к MSR1-LXR и их неконъюгированными исходными антителами

при 25°C показаны в Таблице 19. "LP1" представляет линкер-нагрузку, для которой в Примере 11 представлена структура нагрузки.

Таблица 19: Кинетика связывания His-hMSR1 с конъюгатами антитело к MSR1-LXR и соответствующими неконъюгированными антителами при 25°C

Захваченное антитело	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	K_D (моляр)	t½ (мин)
H1H27729P-N297Q	1.05E+05	9.06E-04	8.67E-09	12.8
H1H27729P-N297Q-LP1	5.47E+04	7.18E-04	1.31E-08	16.1
H1H27731P-N297Q	1.17E+05	1.00E-05	8.55E-11	1155.2
H1H27731P-N297Q-LP1	1.28E+05	1.00E-05*	7.80E-11	1155.2
H1H27732P-N297Q	2.20E+05	1.00E-05*	4.50E-11	1155.2
H1H27732P-N297Q-LP1	1.50E+05	1.00E-05*	6.60E-11	1155.2
H1H27734P-N297Q	7.72E+04	5.96E-04	7.72E-09	19.4
H1H27734P-N297Q-LP1	6.93E+04	4.49E-04	6.49E-09	25.7
H1H27736P-N297Q	1.14E+05	1.47E-04	1.29E-09	78.7
H1H27736P-N297Q-LP1	9.59E+04	1.21E-04	1.26E-09	95.5
H1H27739P-N297Q	1.19E+05	5.55E-04	4.68E-09	20.8
H1H27739P-N297Q-LP1	8.88E+04	7.22E-04	8.14E-09	16.0
H1H27747P-N297Q	1.17E+05	2.62E-04	2.24E-09	44.1
H1H27747P-N297Q-LP1	1.36E+05	2.03E-04	1.49E-09	56.9
H1H27749P-N297Q	1.43E+05	1.00E-05*	6.99E-11	1155.2
H1H27749P-N297Q-LP1	1.40E+05	1.00E-05*	7.16E-11	1155.2
H1H27751P-N297Q	2.10E+05	1.75E-04	8.33E-10	66.1
H1H27751P-N297Q-LP1	2.29E+05	1.52E-04	6.64E-10	76.1
H1H27754P-N297Q	2.00E+05	1.00E-05*	4.99E-11	1155.2
H1H27754P-N297Q-LP1	1.77E+05	1.00E-05*	5.64E-11	1155.2
H1H27756P-N297Q	7.21E+04	1.19E-04	1.65E-09	97.4
H1H27756P-N297Q-LP1	6.27E+04	1.10E-04	1.76E-09	104.7

Захваченное антитело	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	K_D (моляр)	t½ (мин)
H1H27759P-N297Q	1.03E+05	4.35E-04	4.23E-09	26.6
H1H27759P-N297Q-LP1	1.30E+05	5.95E-04	4.57E-09	19.4
H1H27760P-N297Q	2.31E+05	3.83E-04	1.66E-09	30.2
H1H27760P-N297Q-LP1	2.59E+05	4.34E-04	1.67E-09	26.6
H1H27761P-N297Q	5.95E+05	3.62E-04	6.09E-10	31.9
H1H27761P-N297Q-LP1	2.53E+05	5.11E-04	2.02E-09	22.6
H1H27762P-N297Q	4.05E+05	5.60E-04	1.38E-09	20.6
H1H27762P-N297Q-LP1	4.83E+05	6.23E-04	1.29E-09	18.5
H1H27766P-N297Q	1.72E+05	1.00E-05*	5.83E-11	1155.2
H1H27766P-N297Q-LP1	4.16E+05	2.70E-05	6.49E-11	427.4
H1H27771P-N297Q	3.83E+05	3.55E-04	9.26E-10	32.6
H1H27771P-N297Q-LP1	3.38E+05	4.42E-04	1.31E-09	26.1
H1H27773P-N297Q	5.49E+04	7.52E-04	1.37E-08	15.4
H1H27773P-N297Q-LP1	2.72E+04	9.47E-04	3.48E-08	12.2
H1H27778P-N297Q	1.66E+05	2.71E-04	1.63E-09	42.6
H1H27778P-N297Q-LP1	2.85E+05	2.76E-04	9.70E-10	41.8
H1H21234N-N297Q	2.20E+05	1.00E-05*	4.54E-11	1155.2
H1H21234N-N297Q-LP1	4.90E+05	1.00E-05*	2.04E-11	1155.2
H1xH29273P2	8.20E+04	7.63E-03	9.30E-08	1.5
H1xH29282P2	8.28E+04	3.62E-03	4.37E-08	3.2
H1xH29283P2	1.39E+05	1.85E-03	1.34E-08	6.2

* означает, что диссоциация His9-hMSR1 не наблюдалась в текущих условиях эксперимента и значение k_d было зафиксировано вручную на 1.00E-05 при подстановке данных

$ означает, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента (ОС, отсутствие связывания).

[0797] При 25°C разные конъюгаты антитело к MSR1-LXR связывались с 9xHis-hMSR1 со значениями K_D, варьирующимися в диапазоне от 0.6 пМ или менее до 34.8 нМ, а неконъюгированные исходные антитела связывались с 9xHis-hMSR1 со значениями K_D, варьирующимися в диапазоне от 0.6 пМ или менее до 13.7 нМ, что показано в Таблице 19.

[0798] Исследования связывания повторили с антителом к MSR1 H1H21234-N297Q и стероидными линкер-нагрузками (LP). Параметры кинетики связывания для связывания His9-hMSR1 при 25°C приведены в Таблице 20. "LP3" представляет линкер-нагрузку, для которой структура показана в Примере 23, а "LP13" представляет линкер-нагрузку, для которой структура показана в Примере 24.

Таблица 20: Кинетика связывания His-hMSR1 с конъюгатами антитело к MSR1-стероид и соответствующим неконъюгированным антителом при 25°C

Захваченное антитело	**ka ($M^{-1}s^{-1}$)**	**kd (s^{-1})**	**K_D (моляр)**	**t½ (мин)**
H1H21234N-N297Q *	3.00E+05	1.00E-05	3.33E-11	1155.2
H1H21234N-N297Q-LP3 *	4.17E+05	1.00E-05	2.40E-11	1155.2
H1H21234N-N297Q-LP13 *	4.00E+05	1.00E-05	2.50E-11	1155.2

* означает, что диссоциация His9-hMSR1 не наблюдалась в текущих условиях эксперимента и значение k_d было зафиксировано вручную на 1.00E-05 при подстановке данных

$ означает, что связывание не наблюдалось в текущих условиях эксперимента (ОС, отсутствие связывания).

[0799] При 25°C моноклональное антитело к MSR1, конъюгированное с LP3 и LP13, связывалось с His9-hMSR1 со значениями K_D, варьирующимися в диапазоне от 25.0 пМ и 24.0 пМ, соответственно, что показано в Таблице 20. Для сравнения, соответствующее неконъюгированное моноклональное антитело к MSR1 связалось с His9-hMSR1 со значением K_D в 33.3 пМ.

Пример 31. Конъюгаты антитело к MSR1-LXR активируют сигнализацию LXR в биоанализе гена-репортера люциферазы с чувствительностью к LXR

[0800] *Создание клеточной линии для анализа.* Для проверки эффективности конъюгатов антитело к MSR1-LXR *in vitro* был разработан клеточный анализ гена-репортера люциферазы с чувствительностью к LXR-. Для создания клеточной линии для анализа ген-репортер люциферазы с регуляцией LXR [набор Cignal Lenti LXR Reporter (luc) (Qiagen, кат. № CLS-001L)] трансдуцировали в клетки THP1 и клеточную селекцию

выполняли в течение двух недель в пуромицине. Лентивирус экспрессирует ген люциферазы светлячка под контролем минимального промотера CMV и тандемных повторов LXR транскрипционного ответного элемента. Полученная клеточная линия обозначается как "клетки THP1/LXR-Luc".

[0801] *Аналитический протокол.* Клетки THP1/LXR-Luc высеяли на 96-луночные планшеты с концентрацией 40000 клеток на лунку в средах, содержащих среду RPMI, дополненную 10% FBS и пенициллином/стрептомицином, и в последующем дифференцировали с 200 нМ Форбол Миристат Ацетата (PMA) в течение 3 дней. Спустя 3-дневный период дифференциации трехкратные последовательные разведения конъюгатов антитело-лекарственное средство, неконъюгированных антител или свободных нагрузок в свежих средах добавили к клеткам с конечной концентрацией, варьирующейся от 100 нМ до 0.01 нМ. Только среды использовали в качестве пустого контроля. Через сорок восемь часов активность люциферазы определили после добавления реактива One-Glo™ (Promega, кат. № E6130) в каждую лунку. Количество относительных световых единиц (RLU) измерили на люминометре Victor (PerkinElmer) и значения EC_{50} определили при помощи четырех-параметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой доза-эффект (GraphPad Prism). Значение EC_{50} каждого проанализированного реактива показано в Таблице 21. Отношение сигнала к шуму (С/Ш) определили путем расчетов отношения RLU стандарта 1 к RLU стандарта 8 для каждого из неконъюгированных антител к MSR1 или свободных нагрузок. "№ LP" представляет линкер-нагрузку, для которой здесь представлена соответствующая структура, а "№ P" представляет нагрузку, для которой здесь представлена соответствующая структура.

Таблица 21: Агонистическая активность конъюгатов антитело к MSR1-LXR, нагрузок и неконъюгированных антител

Анализируемая молекула	**EC_{50} (M)**	**С/Ш**
H1H21231N-N297Q-LP1	8.6E-10	14.5
H1H21227N-N297Q-LP1	8.9E-10	31.0
H1H21231N-N297Q-LP1	1.73E-09	38.6
H1H21234N-N297Q-LP1	3.65E-09	18.4
H1H21234N-N297Q-LP4	6.3E-10	9.0
H1H21234N-N297Q-LP5	9.8E-10	9.6
H1H21234N-N297Q-LP6	1.02E-09	9.2
H1H21234N-N297Q-LP12	Нет активации	1.5

Анализируемая молекула	EC_{50} (M)	С/Ш
H1H21234N-N297Q-LP9	1.12E-09	8.3
H1H21234N-N297Q-LP11	8.1E-10	10.0
H1H21234N-N297Q-LP2	8.7E-10	9.1
H1H27729P-N297Q-LP1	1.64E-09	14.5
H1H27731P-N297Q-LP1	1.46E-09	15.5
H1H27732P-N297Q-LP1	8.2E-10	19.1
H1H27734P-N297Q-LP1	5.19E-09	17.8
H1H27736P-N297Q-LP1	1.01E-09	16.4
H1H27739P-N297Q-LP1	1.60E-09	21.0
H1H27747P-N297Q-LP1	4.77E-09	20.6
H1H27749P-N297Q-LP1	1.46E-09	13.1
H1H27751P-N297Q-LP1	1.54E-09	17.9
H1H27754P-N297Q-LP1	1.30E-09	17.3
H1H27756P-N297Q-LP1	1.61E-09	18.6
H1H27759P-N297Q-LP1	5.94E-09	18.9
H1H27760P-N297Q-LP1	6.34E-09	21.5
H1H27761P-N297Q-LP1	5.72E-09	20.7
H1H27762P-N297Q-LP1	7.02E-09	16.4
H1H27766P-N297Q-LP1	1.277E-08	11.3
H1H27771P-N297Q-LP1	2.41E-09	17.3
H1H27773P-N297Q-LP1	>4.05E-08	12.9
H1H27778P-N297Q-LP1	1.51E-09	16.1
H1H21235N-N297Q-LP1	8.3E-10	8.2
H1H25700N-N297Q-LP1	1.13E-09	7.4
H1H25690N-N297Q-LP1	2.5E-10	8.0
H1H25695N-N297Q-LP1	1.87E-09	9.8

Анализируемая молекула	EC_{50} (M)	С/Ш
H1H25685N-N297Q-LP1	7.8E-10	8.3
H1H21228N-N297Q-LP1	1.8E-09	8.6
Изотипический контроль-N297Q-LP1	>6.6E-08	2.7
H1H21234N-N297Q	Нет активации	Нет активации
P1	1.14E-09	15.9
P5	4.6E-10	5.7
P7	2.09E-09	8.9
P6	3.7E-10	8.3

[0802] Как показано в Таблице 21, во временной точке 48 часов все антитела к MSR1, конъюгированные с **LP1** , продемонстрировали стимуляцию клеток THP1/Luc со значениями EC_{50}, варьирующимися от 0.2 нМ до более, чем 140.5 нМ, со значениями С/Ш, варьирующимися от 7.4 до 38.6. Один иллюстративный конъюгат антитело к MSR1-LXR (H1H21234N-N297Q-LP1) продемонстрировал стимуляцию клеток THP1/Luc со значением EC_{50} в 3.7 нМ и С/Ш в 18.4. Свободная нагрузка, **P1**, продемонстрировала стимуляцию клеток THP1/Luc со средним значением EC_{50} в 15.9 нМ. Антитело изотипического контроля, конъюгированное с **LP1 (**Изотипический контроль-LP1) имело среднее значение EC_{50} >66 нМ и С/Ш в 2.7. Кроме того, проанализированное H1H21234N-N297Q, конъюгированное с дополнительными линкер-нагрузками агониста LXR (H1H21234N-N297Q-LP4, H1H21234N-N297Q-LP5, H1H21234N-N297Q-LP6, H1H21234N-N297Q-LP12, H1H21234N-N297Q-LP9, H1H21234N-N297Q-LP11 и H1H21234N-N297Q-LP2), продемонстрировало стимуляцию клеток THP1/Luc со значениями EC_{50}, варьирующимися от 0.63 нМ до более, чем 73 нМ, и отношением С/Ш, варьирующимся от 1.4 до 10. Напротив, антитело к MSR1, конъюгированное с линкер-нагрузкой агониста LXR (H1H21234N-N297Q-LP12), которое выступало в качестве компараторов в данном анализе, не продемонстрировало активации клеток THP1/Luc. Дополнительные проанализированные нагрузки агониста LXR (P5, P7 и P6) продемонстрировали

стимуляцию клеток THP1/Luc со значениями EC_{50}, варьирующимися от 0.37 нМ до 2.09 нМ, и отношением С/Ш, варьирующимся от 5.7 до 8.9. Только одно неконъюгированное антитело к MSR1 (H1H21234N) не оказало никакого влияния на стимуляцию клеток THP/Luc.

Пример 32. Конъюгаты антитело к MSR1-стероид ингибируют ЛПС-опосредованное высвобождение IL-1β In Vitro

[0803] Для анализа противовоспалительных свойств конъюгатов антитело к MSR1-стероид был выполнен *in vitro* анализ липополисахарид(ЛПС)-опосредованного высвобождения IL-1β. Для анализа клетки THP-1 высеяли на 96-луночные планшеты с концентрацией 40000 клеток на лунку в средах, содержащих среду RPMI, дополненную 10% FBS и пенициллином/стрептомицином, и в последующем дифференцировали 200 нМ Форбол Миристат Ацетата (PMA) в течение 3 дней. Спустя 3-дневный период дифференциации трехкратные последовательные разведения конъюгатов антитело-лекарственное средство, неконъюгированных антител или свободных нагрузок в свежих средах добавили к клеткам с конечной концентрацией, варьирующейся от 100 нМ до 0.01 нМ. Только среды использовали в качестве пустого контроля. Затем через 24, 48 или 72 часов на клетки воздействовали 100 нг/мл LPS (InVivoGen, Кат. № tlrl-eklps) в течение 5 часов. Затем выполнили забор клеточных сред и уровни IL-1β измерили с помощью человеческого набора V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (Meso Scale Diagnostics, кат. № 15049D-2) в соответствии с инструкциями производителя. Затем выполнили считывание планшета на приборе Meso Scale Diagnostics.

[0804] Значения IC_{50} определили при помощи четырех-параметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой зависимости (GraphPad Prism). Все значения IC_{50} выражаются в М (молярной) концентрации. Значения IC_{50} и количество IL-1β при максимальной концентрации конъюгатов антитело-стероид или контролей показаны в Таблице 22 для каждой из проанализированных временных точек.

Таблица 22: ЛПС-индуцированное высвобождение IL-1β конъюгатов антитело к MSR1-стероид

	24 часа		48 часов		72 часа	
Молекула	**EC_{50} (M)**	**Высвобождение IL1бета при макс. концентрации в анализе (пг/мл)**	**EC_{50} (M)**	**Высвобождение IL1бета при макс. концентрации в анализе (пг/мл)**	**EC_{50} (M)**	**Высвобождение IL1бета при макс. концентрации в анализе (пг/мл)**
H1H21234N-N297Q-LP13	6.287E-09	119.43	3.586E-09	69.3	1.7E-09	70.31
Изотипический контроль-N297Q-LP13	НД	209.6	НД	279.4	НД	276.27
H1H21234N-N297Q	НД	234.21	НД	267.7	НД	355.76
P4	8.486E-10	43.39	1.017E-09	9.3	1.199E-09	12.95
Дексаметазон	4.199E-10	45.33	7.941E-10	11.8	5.433E-10	13.34

[0805] Как показано в Таблице 22, во временной точке 24 часа конъюгат антитело к MSR1-стероид (H1H21234N-N297Q-LP13) ингибировал ЛПС-индуцированную секрецию IL-1β с IC_{50} в 6.287 нМ. Свободная нагрузка **P4** и контроль свободной нагрузки **Дексаметазон** ингибировали ЛПС-индуцированную секрецию IL-1β со значениями IC_{50} в 0.8486 нМ и 0.4199 нМ, соответственно. Ни антитело изотипического контроля, конъюгированное с **LP13** (Изотипический контроль-N297Q-LP13), ни неконъюгированное антитело к MSR1 (H1H21234N-N297Q) не повлияли на ЛПС-индуцированное высвобождение IL-1β.

[0806] Как показано в Таблице 22, во временной точке 48 часов конъюгат антитело к MSR1-стероид (H1H21234N-N297Q-LP13) ингибировал ЛПС-индуцированную секрецию IL-1β с IC_{50} в 3.586 нМ. Свободная нагрузка **P4** и контроль свободной нагрузки **Дексаметазон** ингибировали ЛПС-индуцированную секрецию IL-1β со значениями IC_{50} в 1.017 нМ и 0.7941 нМ, соответственно. Ни антитело изотипического контроля, конъюгированное с **LP13** (Изотипический контроль-N297Q-LP13), ни неконъюгированное антитело к MSR1 (H1H21234N-N297Q) не повлияли на ЛПС-индуцированное высвобождение IL-1β.

[0807] Как показано в Таблице 22, во временной точке 72 часа конъюгат антитело к MSR1-стероид (H1H21234N-N297Q-LP13) ингибировал ЛПС-индуцированную секрецию IL-1β с IC_{50} в 1.7 нМ. Свободная нагрузка **P4** и контроль свободной нагрузки **Дексаметазон** ингибировали ЛПС-индуцированную секрецию IL-1□ со значениями IC_{50} в 1.199 нМ и 0.5433 нМ, соответственно. Ни антитело изотипического контроля, конъюгированное с **LP13** (Изотипический контроль-N297Q-LP13), ни неконъюгированное антитело к MSR1 (H1H21234N-N297Q) не повлияли на ЛПС-индуцированное высвобождение IL-1β.

Пример 33. Конъюгаты антитело к MSR1-стероид ингибируют ЛПС-опосредованные воспалительные реакции In Vivo

[0808] Чтобы проанализировать противовоспалительное действие конъюгатов антитело к MSR1-стероид, была использована модель ЛПС-индуцированной воспалительной иммунной реакции *ex-vivo* и *in vivo*.

[0809] *Создание модели воспалительной иммунной реакции мыши.* Применили мышей, гомозиготно экспрессирующих внеклеточный домен MSR1 человека вместо внеклеточного домена MSR1 мыши и с гомозиготной делецией гена ApoE (полученные мыши обозначаются как мыши $Msr1^{hu/hu}$ $ApoE^{-/-}$).

[0810] *Протокол анализа для ex vivo ЛПС-индуцированных реакций.* В экспериментах *ex vivo* мышам внутрибрюшинно ввели 10 мкл/г конъюгатов антитело к MSR1-стероид (H1H21234N-N297Q-LP13), конъюгат изотипический контроль-стероид (Изотипический контроль-LP13), неконъюгированное антитело к MSR1 (H1H21234N-N297Q) и антитела изотипического контроля в разные временные точки (24, 48 и 72 часа) до забора брюшинных клеток из брюшной полости. PBS и свободные стероиды **P4** и Дексаметазон (Henry Schein Animal Health, Кат. № NDC#11695-4017-1) ввели внутрибрюшинно посредством инъекции за 2 часа до выделения брюшинных клеток. Протокол экспериментального дозирования и лечения для групп мышей показаны в Таблице 23. Всех мышей умертвили во временную точку 0 часов и получили брюшинные клетки из брюшинной полости методом перитонеального лаважа. Вкратце, 5 мл охлажденного до температуры льда 1xPBS (ThermoFisher Scientific, Кат. № 20012027), содержащего 2% BSA (Gibco, Кат. №A9576) и 0.6 мМ EDTA (ThermoFisher Scientific, Кат. №15575020), ввели посредством инъекции в брюшиную полость при помощи иглы 27g. Забор брюшинных клеток выполнили в трубки 15 мл с иглой 20g, присоединенной к шприцу 5-мл, затем их центрифугировали при 300xg в течение 8 минут и откорректировали до $1x10^6$ клеток/мл в среде RPMI-1640 (ThermoFisher Scientific, №15140122), содержащей 10% FBS (ThermoFisher Scientific, кат. №10082147) и 1% пенициллина-стрептомицина (ThermoFisher Scientific, кат. №11875093). Ресуспендированные клетки высеяли с концентрацией 500000 клеток на лунку в 24-луночные планшеты для тканевых культур и инкубировали с 10 нг/мл ЛПС или без них в течение 18 часов.

Таблица 23: Планирование эксперимента, дозировка и протокол лечения для Ex Vivo эксперимента, связанного с ЛПС

	In vivo				*Ex vivo*
	Группа	**Мыши (n)**	**Анализируемая молекула**	**Доза (мг/кг)**	**ЛПС (10 нг/мл)**
72 часа	1	3	H1H21234N-N297Q-LP13	96.08	+/- ЛПС
	2	3	Изотипический контроль-N297Q-LP13	97.07	+/- ЛПС
	3	3	H1H21234N-N297Q	96.08	+/- ЛПС
	4	3	Изотипический контроль-N297Q	97.07	+/- ЛПС
48 часов	5	3	H1H21234N-N297Q-LP13	96.08	+/- ЛПС
	6	3	Изотипический контроль-N297Q-LP13	97.07	+/- ЛПС
	7	3	H1H21234N-N297Q	96.08	+/- ЛПС
	8	3	Изотипический контроль-N297Q	97.07	+/- ЛПС

	In vivo				*Ex vivo*
24 часа	9	3	H1H21234N-N297Q-LP13	96.08	+/- ЛПС
	10	3	Изотипический контроль-N297Q-LP13	97.07	+/- ЛПС
	11	3	H1H21234N-N297Q	96.08	+/- ЛПС
	12	3	Изотипический контроль-N297Q	97.07	+/- ЛПС
2 часа	13	3	PBS	-	+/- ЛПС
	14	3	Дексаметазон	1	+/- ЛПС
	15	3	P4	1.48	+/- ЛПС

[0811] *Протокол анализа для in vivo ЛПС-индуцированных реакций.* В экспериментах, связанных с ЛПС, *in vivo* мышам внутрибрюшинно ввели 10 мкл/г уменьшающихся концентраций конъюгатов антитело к -MSR1-стероид (H1H21234N-N297Q-LP13) и конъюгата изотипический контроль-стероид (Изотипический контроль-N297Q-LP13) за 24 часа до *in vivo* провокации ЛПС. PBS и свободный стероид **P4** ввели внутрибрюшинно посредством инъекции за 2 часа до *in vivo* провокации ЛПС. Экспериментальное дозирование и протокол лечения для групп мышей показаны в Таблице 24. Во временную точку 0 часов из максиллярной вены каждой мыши выполнили забор трех крупных капель крови (объем ~ 100 мкл) в пробирки для отделения сыворотки. Трубки центрифугировали со скоростью 2200-2500 об/мин в течение 15 минут и сыворотку собрали в 96-луночные планшеты для последующего измерения цитокинов. Через 18 часов после *in vivo* провокации ЛПС брюшинные клетки получили из брюшинной полости так, как было описано выше, для последующего анализа методом проточной цитометрии.

Таблица 24: Планирование эксперимента, дозировка и протокол лечения для In Vivo эксперимента с провокацией ЛПС

	In vivo				*In vivo*
	Группа	**Мыши (n)**	**Анализируемая молекула**	**Доза (мг/кг)**	**Провокация ЛПС (1μг/мышь)**
24 часа	1	5	H1H21234N-N297Q-LP13	96.08	+
	2	5	Изотипический контроль-N297Q-LP13	97.07	+
	3	5	H1H21234N-N297Q-LP13	32.03	+
	4	5	Изотипический контроль-N297Q-LP13	32.36	+
	5	5	H1H21234N-N297Q-LP13	10.67	+
	6	5	Изотипический контроль-N297Q-LP13	10.79	+

	In vivo				*In vivo*
2 часа	7	3	PBS	-	-
	8	5	PBS	-	+
	9		P4	1.48	+
	10	5	P4	0.49	+
	11	5	P4	0.16	+

[0812] *Измерение цитокинов через 18 часов после провокации ЛПС ex vivo.* Надосадочные жидкости собрали в 96-луночные круглодонные планшеты для тканевых культур через 18 часов после-*ex vivo* провокации ЛПС и хранили при 20°C до дальнейшего анализа. Концентрации цитокинов в надосадочных жидкостях измерили при помощи набора для мультиплексного иммунологического анализа Proinflammatory Panel 1 (мышь) (MesoScale Diagnostics, кат. № K15048D) в соответствии с инструкциями изготовителя. Электрохемилюминесценцию считывали на приборе SECTOR® от Meso Scale Diagnostics. Анализ данных выполнили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism™. Статистическую значимость в группах определили посредством однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием множественного сравнения Turkey (*p<0.01; **p<0.001; ***p<0.0001).

[0813] *Анализ экспрессии маркеров активации на перитонеальных макрофагах после ex vivo провокации ЛПС.* После сбора надосадочных жидкостей для анализа цитокинов планшеты промыли дважды 1xPBS без Ca^{++}/мг2^{++} (ThermoFisher Scientific, кат. № 14190144) и выполнили забор адгезивных брюшинных клеток посредством добавления 250-300 мкл холодного раствора для отделения макрофагов DXF (PromoCell, кат. №C41330) в течение 40 минут. Забор отделенных клеток выполнили в 50-мл трубки и их центрифугировали при 350xg в течение 15 минут. Клетки дважды промыли 1xPBS, дополненным 2 мМ EDTA, и ресуспендировали в буфере для окрашивания клеток (Biolegend, №420201) и высеяли на 96-луночный планшет с V-образным дном с концентрацией $1x10^6$ клеток на лунку. Клетки центрифугировали и клеточную массу ресуспендировали в 100 мкл синего флуоресцентного реактивного красителя LIVE/DEAD (Life Technologies, кат. № L34962), растворенного в соотношении 1:600 в 1xPBS, для определения жизнеспособности клеток. Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут в темноте. Клетки промыли один раз 1xPBS и инкубировали в буфере для окрашивания клеток, содержащем 10μг/мл очищенных антител крысы к CD16/CD32 мыши, Fc-блокатора (Клон: 2.4G2; BD Biosciences, кат. №553142) в течение 10 минут при 4°C. Клетки промыли один раз и инкубировали в

подходящей смеси антител, разбавленной в Бриллиантовом буфере для окрашивания (Brilliant Stain Buffer) (BD Biosciences, кат. № 566345) в течение 30 минут при 4°C в темноте. Панель антител, используемая для анализа методом поточной цитометрии, показана в Таблице 25. Затем клетки промыли 1xPBS, ресуспендировали в Буфере для окрашивания клеток и использовали поточный цитометр по методу анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией LSRFortessa X-20 (Becton Dickinson). Анализ данных выполнили при помощи FlowJo (Tree Star).

Таблица 25: Антитела, использованные при анализе посредством поточной цитометрии

Антитело	**Флуорохром**	**Производитель**	**Номер по каталогу**	**Конечное разведение**
к CD45 мыши	BV510	Biolegend	103138	1/200
к B220 мыши	APC-Cy7	Biolegend	103224	1/200
к TCR мышиβ	BV711	Biolegend	109243	1/200
к мыши CD11b	PercP-Cy5.5	Biolegend	101228	1/300
к мыши F4/80	FITC	Biolegend	123108	1/200
к SR-AI/MSR1 человека	PE	R&D Systems	FAB2708P	1/30
к TLR4 мыши	APC	Biolegend	145405	1/200
к MHCII мыши	BV421	Biolegend	107631	1/200
к CD80 мыши	PE-Cy7	Biolegend	104733	1/200

[0814] Результаты представлены в Таблицах 26-28. Анализ посредством поточной цитометрии брюшинных клеток, полученных от мышей *Msr1*$^{hu/hu}$ *ApoE*$^{-/-}$, показал, что hMSR1 и TLR4 преимущественно экспрессируются на поверхности F4/80^{+}CD11b^{+} перитонеальных макрофагов, что указывает на то, что MSR1^{+} клетки - основные респондеры на стимуляцию ЛПС.

Таблица 26: Ex Vivo ЛПС-индуцированное производство цитокинов для конъюгатов антитело к -MSR1-стероид и контролей

Антитело/Реактив	Время	Цитокин [нг/мл]		
		IL-6	KC-GRO	TNF-α
PBS	2 часа	224.8 ± 11.04	26.4 ± 2.1	1.8 ± 0.3
Дексаметазон		134.5 ± 18.2*	19.9 ± 1.5	0.63 ± 0.11*
P4		12.98 ± 5.8****	2.6 ± 1.3**	0.43 ± 0.06**
H1H21234N-N297Q-LP13	24 часа	21.1 ± 1.38****	9.3 ± 1.7	0.26 ± 0.08***
Изотипический контроль-N297Q-LP13		165.6 ± 20.7	17.8 ± 1.7	0.96 ± 0.14
H1H21234N-N297Q		261.9 ± 18.3	36.4 ± 2.9	2.02 ± 0.4
Изотипический контроль-N297Q		215.8 ± 40.1	21.9 ± 5.2	1.9 ± 0.1
H1H21234N-N297Q-LP13	48 часов	34.02 ± 7.8**	6.3 ± 2.3*	0.58 ± 0.06*
Изотипический контроль-N297Q-LP13		113.4 ± 11.3	22.2 ± 4.2	1.2 ± 0.2
H1H21234N-N297Q		158.3 ± 11.6	15.2 ± 0.8	1.6 ± 0.3
Изотипический контроль-N297Q		143.4 ± 12.4	18.8 ± 1.8	1.12 ± 0.1
H1H21234N-N297Q-LP13	72 часа	50.7 ± 14.1*	13.1 ± 1.1	0.47 ± 0.1**
Изотипический контроль-N297Q-LP13		132.1 ± 18.9	20.8 ± 2.7	0.92 ± 0.07
H1H21234N-N297Q		228.6 ± 19.7	27.1 ± 3.5	1.09 ± 0.2
Изотипический контроль-N297Q		284.5 ± 14.9	29.4 ± 8.2	1.2 ± 0.2

[0815] Как показано в Таблице 26, *ex vivo* провокация ЛПС индуцировала активное производство IL-6, KC-GRO и TNF-α брюшинными клетками, полученными от мышей *Msr1*$^{hu/hu}$ *ApoE*$^{-/-}$, на которых предаврительно воздействовали PBS. Напротив, *in vivo* введение конъюгатов MSR1-ncADC (H1H21234N-N297Q-LP13) с дозой, эквивалентной 1мг/кг Дексаметазона, было эффективным в ингибировании ЛОС-индуцированного производства цитокинов брюшинными клетками зависимым от времени образом. Сопоставимое ингибирование ЛПС-индуцированных иммунных реакций наблюдалось между введением конъюгатов антитело-стероид через 24, 48 и 72 часа и введением свободной нагрузки **P4** через 2 часа (Таблица 26). Похожее воздействие на ингибирование ЛПС-индуцированной иммунной реакции наблюдалось между введением конъюгатов изотипический контроль-стероид через 24, 48 и 72 часа и Дексаметазоном через 2 часа (Таблица 26). Отсутствие влияния на ЛПС-индуцированное производство цитокинов наблюдалось для конъюгата изотипический контроль-стероид (Изотипический контроль-N297Q-LP13),

неконъюгированного антитела к MSR1 (H1H21234N-N297Q) и антител изотипического контроля, вводимых в разные временные точки (Таблица 26).

Таблица 27: In Vivo ЛПС-индуцированное производство цитокинов в сыворотке для конъюгатов антитело к -MSR1-стероид и контролей

Антитело/ Реактив	Вводимая концентрация (мг/кг)	Время	Цитокин [нг/мл]		
			IL-6	KC-GRO	TNF-α
PBS	-	2 часа	56.94 ± 9.3	13.97 ± 1.7	1.7 ± 0.3
P4	1.48		3.51 ± 0.7***	4.1 ± 1.5*	0.09 ± 0.02***
P4	0.49		11.89 ± 7.7**	6.7 ± 2.3	0.2 ± 0.04***
P4	0.16		19.15 ± 1.1*	15.1 ± 1.2	0.6 ± 0.05***
H1H21234N-N297Q-LP13	96.08	24 часа	7.7 ± 3.1***	5.1 ± 1.5*	0.42 ± 0.14***
	32.03		15.34 ± 5.2***	10.6 ± 2.8	0.48 ± 0.18***
	10.67		33 ± 8.1	13.3 ± 1.2	0.51 ± 0.08***
Изотипический контроль-N297Q-LP13	97.07	24 часа	33.6 ± 4.1	19.2 ± 0.6	2.6 ± 0.92
	32.36		65.9 ± 7.8	18.2 ± 1.7	2 ± 0.67
	10.79		76.3 ± 9.9	19.9 ± 2.1	1.9 ± 0.62

[0816] *In vivo* введение конъюгатов MSR1-стероид (H1H21234N-N297Q-LP13) также было эффективным в ингибировании *in vivo* ЛПС-индуцированного производства цитокинов зависимым от дозы образом у мышей *Msr1*$^{hu/hu}$ *ApoE*$^{-/-}$ через 2 часа после провокации ЛПС (Таблица 27). Отсутствие влияния на ЛПС-индуцированное производство цитокинов *in vivo* наблюдалось для конъюгатов изотипический контроль-ncADC (Изотипический контроль-N297Q-LP13, Таблица 27).

Таблица 28: Ex Vivo ЛПС-индуцированное производство цитокинов для конъюгатов антитело к -MSR1-стероид и контролей

Антитело/Реактив	Время	ЛПС-опосредованная экспрессия CD80 [% относительно воздействия PBS/ЛПС]	
		рМФ клетки	не-рМФ клетки
Дексаметазон	2 часа	77.69 ± 2.6	99.6 ± 5.8
P4		54.7 ± 3.8****	93.02 ± 4.4
H1H21234N-N297Q-LP13	24 часа	61.1 ± 1.3***	95.5 ± 2.6
Изотипический контроль-N297Q-LP13		94.9 ±7.2	90.22 ± 5.2
H1H21234N-N297Q		76.8 ± 2.3	98.9 ± 3.1
Изотипический контроль-N297Q		75.6 ± 4	100.8 ± 8.5

Антитело/Реактив	Время	ЛПС-опосредованная экспрессия CD80 [% относительно воздействия PBS/ЛПС]	
H1H21234N-N297Q-LP13	48 часов	58.7 ± 4.2****	99 ± 1.8
Изотипический контроль-N297Q-LP13		75.9 ± 3.8	95.4 ± 5.2
H1H21234N-N297Q		81.9 ± 2	100.4 ± 3.3
Изотипический контроль-N297Q		87.4 ± 0.6	107.7 ± 6.7
H1H21234N-N297Q-LP13	72 часа	63.9 ± 1.01***	102.3 ± 0.14
Изотипический контроль-N297Q-LP13		85.3 ± 12.04	95.6 ± 2.2
H1H21234N-N297Q		82.9 ± 5.9	96.3 ± 3.3
Изотипический контроль-N297Q		86.4 ± 4.3	96.8 ± 8.8

[0817] Кроме того, как показано в Таблице 28, *in vivo* введение конъюгата антитело к MSR1-стероид (H1H21234N-N297Q-LP13*)* привело к значительному снижению ЛПС-опосредованной экспрессии CD80 на $hMSR1^{+}F4/80^{+}CD11b^{+}$перитонеальных макрофагах (рМФ), но не на $hMSR1^{-}F4/80^{-}CD11b^{-}$ клетках (не-рМФ). Отсутствие влияния на экспрессию CD80 наблюдалось для антител изотипического контроля (Таблица 28).

Пример 34. Конъюгаты антитело к MSR1-LXR активируют эффлюкс холестерина в клетках THP-1

[0818] Способность конъюгатов антитело к MSR1-LXR активировать эффлюкс холестерина в клеточной линии макрофагов человека (THP-1; ATCC, кат. № TIB-202) проанализировали с использованием флуоресцентного аналога холестерина.

[0819] Если описать вкратце, клетки THP-1 высеяли на 96-луночные покрытые полилизином планшеты (Corning, кат. № 354640) с концентрацией 100000 клеток на лунку в среде RPMI 1640 (Irvine Scientific, Каталожный № 9160), содержащей 10% FBS (Gibco, кат. №1043010), 10 мкг/мл пенициллина-стрептомицина (Gibco, Каталожный № 15140122) и инкубировали в 5% CO_2 при 37 °C. Клетки дифференцировали в макрофаги посредством добавления 100 нМ Форбол-12 миристат 13-ацетата (Sigma, кат. № P8139) к среде и подвергли дальнейшей инкубации в течение 96 часов. Затем дифференцированные макрофаги инкубировали в среде RPMI 1640 без фенолового красного (Gibco, кат. № 32404-014) с содержанием 25 мкм BODIPY-холестерина (Avanti Polar Lipids, кат. № 810255P), 0.2% бычьего сывороточного альбумина (БСА; Sigma, кат. № A7211) и 10 мкг/мл пенициллина-стрептомицина в течение 24 часов, с последующим 24-часовым воздействием последовательными разведениями, варьирующимися от $1x\ 10^{7}$ M до 5×10^{-14} M либо свободной нагрузки, либо конъюгата антитело к MSR1-LXR (H1H21234N-N297Q-LP1), конъюгата Изотипический контроль-LXR (Изотипический контроль-N297Q-LP1) и

неконъюгированного антитела к -MSR1 (H1H21234N-N297Q) в среде RPMI 1640 без фенолового красного с содержанием 0.2% БСА. Клетки промыли раствором RPMI 1640 без фенолового красного и инкубировали с 100 мкл акцепторной среды, содержащей 50 мкг/мл липопротеина высокой плотности (Millipore, кат. № 437641), 10 мкг/мл аполипопротеина A1 (Millipore, кат. № ALP10) в среде RPMI 1640 без фенолового красного в течение 5 часов, после чего акцепторную среду собрали и клетки лизировали в 100 мкл буфера для радиоиммунопреципитационного анализа (Millipore, кат. № 20-188) в течение 2 часов при легком перемешивании при комнатной температуре. Флуоресценцию измерили в этих фракциях на волне возбуждения 482 нм, испускания 515 нм в планшет-ридере SpectraMax i3 (Molecular Devices).

[0820] Процентную долю эффлюкса BODIPY-холестерина рассчитали при помощи следующей формулы: [флуоресценция в акцепторной среде / (флуоресценция в акцепторной среде + флуоресценция в клеточном лизате)] x 100. В Таблице 29 представлен активированный эффлюкс холестерина для проверяемых материалов, и ФИГ. 17 иллюстрирует данные в виде графика.

Таблица 29: Активация эффлюкса холестерина конъюгатами антитело-LXR и компараторами

Анализируемая молекула	**Активация эффлюкса холестерина EC_{50} (M)**	**Максимальный эффлюкс (%)**
P1	1.5E-10	36.7
H1H21234N-N297Q-LP1	5.0E-11	36.7
Изотипический контроль-N297Q-LP1	> 6.4E-8	30.3
H1H21234N-N297Q	Н/Д	18.7

[0821] Как показано в Таблице 29, через 24 часа конъюгат H1H21234N-N297Q-LP1 показал наибольший объем эффлюкса холестерина с максимальным процентом эффлюкса в 36.6% и значением EC_{50} в 50 пМ. Свободная нагрузка **P1** показала второй по величине объем эффлюкса холестерина с максимальным процентным эффлюксом в 36.6% и значением EC_{50} в 150 пМ. Конъюгат изотипический контроль-N297Q-LP1 показал минимальный объем эффлюкса холестерина с максимальным процентным эффлюксом в 30.3%.

Неконъюгированное антитело, H1H21234N-N297Q, не показало измеримого эффлюкса холестерина.

Пример 34A Активность нагрузок агониста LXR в клеточном анализе LXR-чувствительного люциферазного репортера

[0822] Активность определенных нагрузок агониста LXR, описанных здесь, проанализировали в клеточном анализе LXR-чувствительного люциферазного репортера. Для создания клеточной линии для анализа LXR-регулируемый люциферазный ген-репортер [набор Cignal Lenti LXR Reporter (luc) (Qiagen, кат. № CLS-001L)] трансдуцировали в клетки THP1 и клеточную селекцию выполняли в течение двух недель в пуромицине. Лентивирус экспрессирует ген люциферазы светлячка под контролем минимального промотера CMV и тандемных повторов LXR транскрипционного ответного элемента. Полученная клеточная линия обозначается как "клетки THP1/LXR-Luc". Для анализа клетки THP1/LXR-Luc высеяли на 96-луночные планшеты с концентрацией 40000 клеток на лунку в средах, содержащих среду RPMI, дополненную 10% FBS и пенициллином/стрептомицином, и в последующем дифференцировали с 200 нМ Форбол Миристат Ацетата (PMA) в течение 3 дней. Затем среду удалили и заменили ее 80 мкл свежей среды без PMA. Приготовили трехкратные последовательные разведения свободных нагрузок в 100% DMSO, перенесли их в свежую среду и 20 мкл добавили к клеткам с конечной постоянной концентрацией DMSO в 0.2% и свободным нагрузкам с итоговыми концентрациями от 100 нМ до 0.015 нМ. Последняя лунка в планшете служила пустой контрольной пробой, содержащей только среду и 0.2% DMSO (необработанная лунка), и была обозначена как продолжение 3-кратного последовательного разведения. Через сорок восемь часов активность люциферазы определили после добавления реактива One-Glo™ (Promega, кат. № E6130) в каждую лунку. Количество относительных световых единиц (RLU) измерили на люминометре Victor (PerkinElmer) и значения EC_{50} определили при помощи четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой доза-эффект (GraphPad Prism). Значение EC_{50} каждой проанализированной молекулы показано в Таблице 21. Отношение сигнал-шум (С/Ш) определили при помощи отношения самого высокого количества RLU на кривой доза-эффект к RLU в необработанных лунках. Как показано в Таблице 5, все проверенные соединения нагрузок повышали LXR-зависимую активность люциферазы в клетках THP1/LXR-Luc со значениями EC_{50} от 112 пМ до 3.51 нМ и значениями С/Ш от 10.4 до 13.8.

Таблица 30: Активность LXR-репортера под воздействием соединений нагрузок в дифференцированных клетках THP-1/LXR-Luc

Соединение нагрузки	EC_{50} (M)	С/Ш
P1	1.14E-09	11.4
P2B	2.92E-10	11.3
P4B	1.25E-10	10.4
P6B	3.34E-09	10.9
P5B	1.74E-10	13.8
P7B	2.53E-10	12.5
P9B	2.34E-10	12.8
P8B	3.51E-09	10.8
P10B	2.22E-10	11.1
P12B	2.96E-10	11.4
P11B	1.12E-10	10.7

Пример 34B Конъюгация антител

[0823] Конъюгация через цистеины антитела выполняется в два этапа с использованием методов, аналогичных методам, описанным в *Mol. Pharm.* **2015**, 12(6), 1863-71. В иллюстративной процедуре моноклональное антитело (mAb) восстанавливается дитиотреитолом или TCEP. После гель-фильтрации соответствующую линкер-нагрузку в растворе DMSO добавляют к восстановленному антителу, и pH смеси корректируют до соответствующего pH. Реакционную смесь перемешивают. Полученный конъюгат очищают посредством ЭХР. Значения DAR (УФ) определяют с использованием измеренных поглощений ADC и коэффициентов экстинкции линкер-нагрузки антитела.

[0824] Сайт-специфическую конъюгацию антитела можно осуществить, например, в два этапа: (1) ферментное присоединение на основе микробной трансглутаминазы, *например*, (MTG EC 2.3.2.13, Zedira, Дармштадт, Германия) азидо-ПЭГ-амина к сайт-специфически мутированному антителу и (2) присоединение соответствующей линкер-нагрузки к азидо–ПЭГ-амин-функционализованному антителу посредством [2+3] циклоприсоединения, *например*, 1,3–диполярного циклоприсоединения между азидо компонентом функционализованного антитела и соответствующим циклооктинным компонентом линкер-нагрузки, например, реакции клик-химии без меди. См. *Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. PNAS* ***2007***, *104*

(43), 16793–7. Например, агликозилированное человеческое антитело IgG (IgG1, IgG4 и т.д.) или изотип человеческого IgG1 в BupH™ (pH 6.5–8.0) смешивают с ≥200 молярными эквивалентами азидо–dPEG$_3$–амина (MW= 218.26 г/моль). Полученный раствор смешивают с трансглутаминазой (25 ед./мл; 5 ед. МТГ на мг антитела, из Zedira, Дармштадт, Германия, или Ajinomoto, Япония), что дает конечную концентрацию антитела в 0.5–5 мг/мл, и раствор сохраняют при pH 6.5–8.0 и затем инкубируют при 37 °C в течение 4–24 ч при легком перемешивании. Реакцию контролируют посредством ИЭР–МС. По завершению реакции излишек амина и МТГ удаляют посредством ЭХР или элюирования в колонке с белком A с кислым буфером и последующей нейтрализацией с буфером Tris (pH 8) для создания азидо-функционализованного антитела. Данный продукт анализируют посредством SDS–PAGE и ИЭР. Азидо–dPEG$_3$–амин добавляют к двум сайтам – Q295 и Q297– антитела, что дает повышение в 804 Да для конъюгата агликозилированное антитело–ПЭГ$_3$–азид с 4DAR. Участки конъюгации определяют и подтверждают при EEQ^{Linker}YQ^{Linker}STYR для азидо-функционализованного антитела с 4DAR посредством пептидной карты секвенирования тяжелых цепей, перевариваемых трипсином.

[0825] В другом примере сайт-специфические конъюгаты агликозилированное антитело-лекарственное средство с человеческим IgG (IgG1, IgG4 и т.д.), содержащим мутацию N297Q (нумерация EU), приготавливают посредством [2+3] клик-реакции между азидо-функционализованными антителами с алкином, содержащим линкер-нагрузку. В частности, азидо-функционализованное агликозилированное антитело IgG1 человека (mAb–PEG$_3$–N$_3$) конъюгируют с подходящей линкер-нагрузкой посредством инкубирования mAb–PEG$_3$–N$_3$ (1–3 мг / мл) в водной среде (например, PBS, PBS с содержанием 5% глицерина, HBS) с ≥6 молярными эквивалентами линкер-нагрузки, растворенными в подходящем органическом растворителе, таком как DMSO, DMF или DMA (т.е. реакционная смесь содержит 5-20% органический растворитель, об./об.) при температуре от 24 °C до 37 °C на протяжении более 6 ч. Течение реакции контролируют посредством ИЭР–МС, и отсутствие mAb–PEG$_3$–N$_3$ указывало на завершение конъюгации. Избыточное количество линкер-нагрузки и органический растворитель удаляют посредством ЭХР через элюирование с PBS или посредством колоночной хроматографии на основе белка A через элюирование с кислым буфером с последующей нейтрализацией Tris (pH 8). Очищенные конъюгаты анализируют посредством ЭХР, SDS–PAGE и ИЭР–МС.

[0826] Антитело и конъюгаты антитело-лекарственное средство можно охарактеризовать посредством SDS–PAGE, ЭХР и МС (ИЭР). Согласно одному способу, условия SDS–PAGE,

включающие невосстановленые и восстановленные образцы (2-4 мкг), вместе с эталонным предварительно окрашенным набором маркерных белков BenchMark Pre–Stained Protein Ladder (Invitrogen, кат. №10748–010; LN№ 1671922.) загружают на трек в (1.0 мм x 10 лунок) трис-глициновом геле Novex 4-20% и прогоняют при 180 В, 300 мА, в течение 80 мин. Образец для анализа готовят при помощи трис-глицинового SDS буфера Novex (2X) (Invitrogen, кат. LC2676), а восстанавливающий образец готовят при помощи SDS буфера для образца (2X) с содержанием 10% 2-мекаптоэтанола.

Пример 34C

[0827] Несколько линкер-нагрузок (LP) получили от соединений нагрузки в Таблице C и конъюгировали с антителом к MSR1 (H1H21234N-N297Q) или несвязывающим контролем при помощи способов, описанных в предыдущем примере. Полученные конъюгаты антитело к MSR1-агонист LXR (ADC) проанализировали на активность в анализе репортера THP1/LXRLuc так, как было описано выше для соединений нагрузок. Как показано в Таблице 31, все проанализированные конъюгаты антитело к MSR1-агонист LXR продемонстрировали стимуляцию клеток THP1/LXR-Luc со значениями EC_{50} от 414 пМ до 2.11 нМ и значения С/Ш от 9.4 до 13.7. Неконъюгированное антитело к MSR1 не влияло на активность LXR-Luc, а антитело несвязывающего контроля, конъюгированное с LP1 (контрольный ADC-LP1) имело значения EC_{50} > 100 нМ и максимальные значения С/Ш < 5.0.

[0828] Антитело к MSR1 H1H21234N имеет HCVR в соответствии с SEQ ID NO:50 и LCVR в соответствии с SEQ ID NO:58. Оно содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с SEQ ID NOS:52, 54, 56, 60, 62 и 64, соответственно. Полипептидные последовательности могут быть закодированы полинуклеотидными последовательностями SEQ ID NOS: 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61 и 63. N297Q показывает, что остаток 297 мутирует из аспарагина (N) в глутамин (Q). Вся нумерация соответствует системе нумерации EU.

Таблица 31: Активность конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR в дифференцированных клетках THP-1/LXR-Luc

Конъюгат антитело к MSR1-агонист LXR	Линкер-нагрузка агониста LXR	Нагрузка агониста LXR	EC_{50} (M)	С/Ш
H1H21234N-N297Q-LP1	LP1	P2B	7.38E-10	11.8
H1H21234N-N297Q- LP4B	LP4B	P2B	9.23E-10	11.9
H1H21234N-N297Q-LP5B	LP5B	P2B	1.20E-09	11.0

Конъюгат антитело к MSR1-агонист LXR	Линкер-нагрузка агониста LXR	Нагрузка агониста LXR	EC_{50} (M)	С/Ш
H1H21234N-N297Q-LP2B	LP2B	P2B	8.68E-10	13.7
H1H21234N-N297Q-LP12B	LP12B	P2B	1.30E-09	11.6
H1H21234N-N297Q-LP6B	LP6B	P4B	6.85E-10	12.5
H1H21234N-N297Q-LP7B	LP7B	P4B	5.60E-10	11.6
H1H21234N-N297Q-LP8B	LP8B	P4B	6.19E-10	12.5
H1H21234N-N297Q-LP9B	LP9B	P6B	4.14E-10	11.2
H1H21234N-N297Q-LP10B	LP10B	P6B	9.60E-10	12.5
H1H21234N-N297Q-LP11B	LP11B	P8B	9.78E-10	12.4
Неконъюгированное антитело к MSR1	НД	НД	>1.00E-07	0.8
Контрольный ADC-LP1	LP1	P2	>1.00E-07	4.4

Пример 35. In vivo действие конъюгатов антитело к MSR1-LXR на атеросклероз в модели мыши

[0829] Воздействие конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR, H1H21234N-N297Q-LP1, на развитие атеросклероза проанализировали *in vivo* у мышей, гомозиготных к экспрессии внеклеточного домена MSR1 человека вместо внеклеточного домена MSR1 мыши и гомозиготных к делеции гена *apoE* (которые называются здесь мыши *Msr1*$^{hu/hu}$ *ApoE*$^{-/-}$).

[0830] У мышей *Msr1*$^{hu/hu}$ *ApoE*$^{-/-}$ взяли предварительные образцы крови за 6 дней до начала эксперимента после 4-часового голодания, и затем им утвердили атерогенную западную диету (Research Diets, кат. № 106452). Мышей разделили на группы (n=7-9 в каждой) на основании их исходных значений триглицеридов (ТГ) и холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-Х). Антитело к MSR1 (H1H21234N-N297Q) или конъюгат антитело к MSR1-агонист LXR (H1H21234N-N297Q-LP1) вводили еженедельно посредством подкожной инъекции с дозой в 25 мг/кг (на основании концентраци антитела), начиная со дня 0 на протяжении 16 недель. Образцы сыворотки брали через 4, 8 и 16 недель исследования после 4-часового голодания для анализа липидов сыворотки крови при помощи системы AdviaXPT Chemistry System (Siemens). Средние значения липидов в

сыворотке крови рассчитали для каждой временной точки. Результаты, выраженные как (среднее ± СОС), показаны на ИЛЛ 18. ФИГ. 18 показывает, что введение конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR H1H21234N-N297Q-LP1 не повлияло на уровни липидов в сыворотке крови.

[0831] Мышей умертвили в конце исследования без голодания через 6 дней после последней инъекции антитела к MSR1 или конъюгата ncADC антитело к MSR1-агонист LXR и извлекли их сердца и печени. Сердца поместили в среду для быстрого замораживания (ОСТ) и разрезали перпендикулярно оси аорты, начиная в сердце и двигаясь в направлении дуги аорты. После того, как был обнаружен корень аорты по появлению створок аортального клапана сделали последовательные поперечные срезы (толщиной 12 мкм) и поместили их на последовательные предметные стекла (VWR International, кат. № 16004-406). Эти срезы окрасили гематоксилином и эозином, масляным красным О липидным красителем и антителом к CD68 крысы (Abcam, кат. № ab201844) для маркировки макрофагов для анализа. Для сканирования предметных стекол и получения изображений использовали сканер для предметных стекол Aperio AT2 (Leica Biosystems, Иллинойс). Для каждой мыши липидную площадь измерили при помощи программного обеспечения HALO (Indica Labs, Нью-Мексико) в 7 последовательных поперечных срезах на основании окрашивания масляным красным О и затем при помощи результатов этих измерений рассчитали среднее значение для общей липидной площади поражения на мышь. Все измерения выполнял аналитик, от которого были скрыты группы лечения. Результаты, выраженные как (среднее ± СОС), показаны на ФИГ. 19А. ФИГ. 19А показывает, что введение конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR H1H21234N-N297Q-LP1 привело к уменьшению области атеросклеротического поражения.

[0832] Кроме того, предметные стекла с окрашиванием гематоксилином и эозином использовали для расчета отношения Интима/Медиа, которое представляет собой нормализованное значение размера бляшки. Внутренние и наружные эластичные тонкие слои медиа артерии и зоны просвета измерили в 7 последовательных поперечных срезах для каждой мыши при использовании слоев с окрашиванием гематоксилином и эозином и рассчитали средние значения на мышь. Отношение Интима/Медиа рассчитали при помощи следующего уравнения:

Отношение Интима/Медиа = (Область внутреннего эластичного слоя - Область просвета) / (Область наружного эластичного слоя - Область внутреннего эластичного слоя)

Результаты, выраженные как (среднее ± СОС), показаны на ФИГ. 19В.

[0833] Содержание макрофагов в срезах измерили при использовании срезов, окрашенных антителом к CD68 крысы. Для каждой мыши макрофаг-положительную область измерили при помощи программного обеспечения HALO минимум в 5 последовательных поперечных срезах и среднее значение общего содержания макрофагов на мышь рассчитали ри помощи результатов этих измерений. Результаты, выраженные как (среднее ± СОС), показаны на ФИГ. 19С. ФИГ. 19С показывает, что введение конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR H1H21234N-N297Q-LP1 привело к снижению содержания макрофагов.

[0834] Печени, взятые после умерщвления мышей, использовали для экстракции липидов и qRT-PCR. Один фрагмент печени от каждой мыши поместили в раствор RNAlader (Invitrogen, кат. № AM7023) для экстракции РНК и затем проанализировали экспрессию липогенных генов (*Srebf1*, *Acc*, *Fasn*) для анализа липогенеза *de novo* посредством qRT-PCR при помощи стандартных способов. Результаты, выраженные как (среднее ± СОС), показаны на ФИГ. 21. ФИГ. 21 показывает, что введение конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR H1H21234N-N297Q-LP1 не влияет на уровень триглицеридов или холестерина в печени.

[0835] Липиды экстрагировали из второго фрагмента печени от каждой мыши по Фолшу и солюбилизировали по Карру. Уровни ТГ, общего и свободного холестерина измерили посредством ферментного анализа для определения (Teco Diagnostics, кат. № T532-480 (ТГ); Thermo Fisher Scientific, кат. № TR13421 (общий холестерин); Waco Diagnostics, кат. № 993-02501 (свободный холестерин)) и нормализовали по весу влажной ткани. Результаты, выраженные как (среднее ± СОС), показаны на ФИГ. 20. ФИГ.20 показывает, что введение конъюгата антитело к MSR1-агонист LXR H1H21234N-N297Q-LP1 не влияет на липогенез *de novo* в печени.

Общие способы для Примеров 36-41:

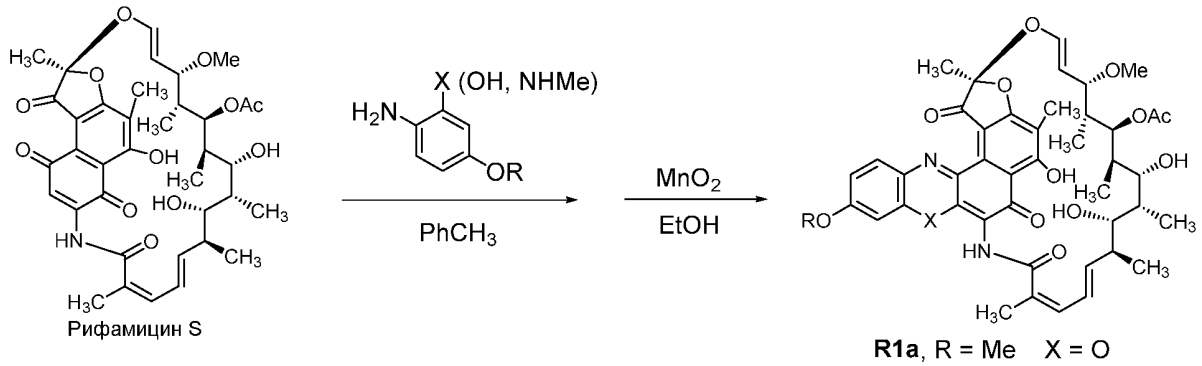
[0836] Все использованные растворители были приобретены либо в Sigma Aldrich, либо в Fisher Scientific и были использованы как есть. Рифамицин S приобрели в Bosche Scientific. ^{1}H-ЯМР спектры были зарегистрированы на приборах ЯМР Varian Inova 300 МГц и 500 МГц. Химические сдвиги (δ) сообщаются в ppm в отношении растворителей ЯМР, использованных для анализа, и сообщаются как s – синглет, d – дублет, t – триплет, q – квартет, dd – дублет дублета, dt – дублет триплета, dq – дублет квартета и m - мультиплет. Константы связывания (*J*) указываются в герцах (Гц). Хроматографические чистоты определяли на системах Agilent 1100, 1260 Infinity или LC/MS серии 1200 с использованием колонок для

анализа Chromolith® FastGradient RP-18e (50×2 мм, Merck KGaA, артикул 1.52007.0001) и следующего метода аналитической ВЭЖХ: впрыскиваемый объем 5 или 10 μл; расход 1 мл/мин; 5-95% ацетонитрил в воде более 4 мин; детектор на диодной матрице Agilent при λ=254 нм; комнатная температура. Масс-спектрометрию низкого разрешения провели на системе Agilent с использованием источников ионизации электрораспыления и анализ выполнили с использованием одиночного квадрупольного детектора или детектора для масс-спектрометрии с ионной ловушкой.

Пример 36. Синтез аналогов **R1a-R1d**

[0837] На нижеприведенной **Схеме R1** отображен синтез иллюстративных соединений **1a-1d** согласно описанию изобретения из коммерчески доступных исходных материалов.

Схема R1



Рифамицин S

R1a, R = Me X = O
R1b, R = Bn X = O
R1c, R = H X = O
R1d, R = H X = NHMe

ПРИМЕР 36A: Аналог Рифамицина 4-MeO-Фенол (R1a):

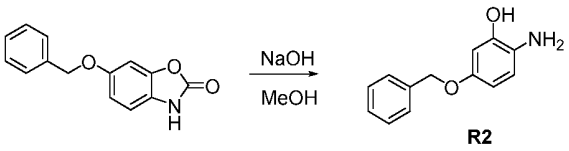
[0838] *Общая процедура связывания Примера 36 используется для приготовления указанного в заголовке соединения:* К перемешиваемому раствору под аргоном рифамицина S (200 мг, 0.287 ммоль) в 15 мл толуола при комнатной температуре добавили 2-амино-5-метоксифенол (44 мг, 0.316 ммоль). Раствор смеси перемешивали на протяжении 3 дней при комнатной температуре. Течение реакции контролировали посредством ЖХ/МС, затем смесь испарили до сухого состояния. Темный осадок растворили в 10 мл этанола и 100 мг (1.14 ммоль) оксида марганца (MnO_2) добавили одной частью к раствору этанола. Вязкую смесь перемешивали на протяжении 15ч при комнатной температуре. После фильтрации нерастворимых материалов с использованием целитной подушки фильтрат испарили под пониженным давлением. Темный осадок очистили на колонке с силикагелем 40 g HP Gold

RediSep *посредством* ISCO (градиентное элюирование: 5 → 95% ЭА в гексанах), и чистые фракции испарили и высушили *in vacuo*, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R1a** в виде темно-красного твердого вещества (85 мг, 37%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{44}H_{50}N_2O_{13}$, 814.33; обнаружено 815.3 (M+H), 837.3 (M+Na). ^{1}H ЯМР (500 МГц; $CDCl_3$) *δ* 7.96 (d, *J* = 9.0 Гц, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.05 - 7.01 (m, 2H), 6.86 (s, 1H), 5.99 (s, 2H), 4.97 (dd, *J* = 12.4, 7.4 Гц, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 3.00 - 2.99 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.03 (d, *J* = 18.1 Гц, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.70 - 1.67 (m, 1H), 1.59 - 1.54 (m, 16H), 1.53 (s, 3H), 0.96 - 0.95 (m, 3H).

ПРИМЕР 36B: Аналог Рифамицина 4-BnO-Фенол (R1b):

[0839] Аналог **R1b** приготовили с использованием промежуточного соединения **R2**, синтез которого показан на нижеприведенной **Схеме R2**.

Схема R2



R2

[0840] *Синтез соединения **R2***. На смесь 6-(бензилокси)бензо[d]оксазол-2(3H)-она (500 мг, 2.07 ммоль) и метанола (6 мл) воздействовали раствором 1.2 г NaOH в 6 мл воды. Суспензию нагревали при 90°C на протяжении ночи. После охлаждения до комнатной температуры на смесь воздействовали 6*N* HCl (5 мл), затем выполнили фильтрацию. Фильтрат откорректировали до достижения pH = 8-9 с помощью нас. вод. $NaHCO_3$ и осадок отфильтровали, промыли водой и получили темное твердое вещество, которое очистили на колонке с силикагелем 40 g HP Gold RediSep (0 → 90% ЭА в гексанах) и получили 220 мг (49%) соединения **R2**. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{13}H_{13}NO_2$, 215.09; обнаружено 216.1 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) *δ* 7.39 - 7.37 (m, 5H), 7.31 (d, *J* = 7.0 Гц, 1H), 6.49 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 6.37 (d, *J* = 2.7 Гц, 1H), 6.25 (dd, *J* = 8.4, 2.7 Гц, 1H), 4.91 (s, 2H).

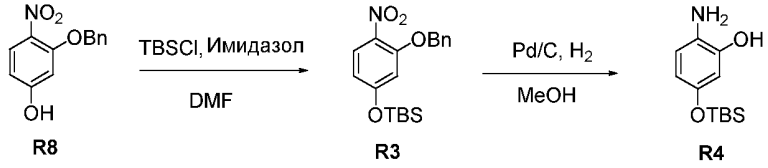
[0841] *Синтез аналога **R1b**.* К перемешиваемому раствору рифамицина S (20 мг, 0.0287 ммоль) под аргоном в 1 мл толуола при комнатной температуре добавили 2-амино-5-(бензилокси)фенол **R2** (6.8 мг, 0.0316 ммоль). Раствор перемешивали на протяжении 3 дней при комнатной температуре и добавили еще 2-амино-5-(бензилокси)фенола (6.8 мг). Ход реакции контролировали посредством ЖХ/МС. Через 5 дней смесь испарили до сухого состояния. Темный осадок растворили в 3.5 мл этанола и 10 мг (0.11 ммоль) оксида марганца (MnO_2) добавили одной частью к раствору этанола. Вязкую смесь перемешивали

на протяжении 3ч при комнатной температуре. После фильтрации нерастворимых материалов с использованием целитной подушки фильтрат испарили под пониженным давлением. Темный осадок очистили на колонке с силикагелем 24 g HP Gold RediSep посредством ISCO (градиентное элюирование: 5 → 98% ЭА в гексанах), и чистые фракции испарили и высушили *in vacuo*, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R1b** в виде темно-красного твердого вещества (8.5 мг, 33%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{50}H_{54}N_2O_{13}$, 890.36; обнаружено 891.3 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; $CDCl_3$) δ 7.97 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.44 - 7.41 (m, 5H), 7.14 - 7.11 (m, 2H), 7.07 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.23 (s, 1H), 5.18 (d, J = 11.9 Гц, 2H), 4.99 (s, 2H), 3.11 (s, 3H), 3.04 (dd, J = 2.0, 0.6 Гц, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.07 (s, 6H), 1.83 (s, 3H), 1.71 - 1.69 (m, 1H), 1.61 (d, J = 0.4 Гц, 9H), 1.58—1.52 (m, 6H), 1.28 (s, 1H), 0.97 (td, J = 1.9, 1.2 Гц, 3H), 0.79 (t, J = 0.8 Гц, 1H).

ПРИМЕР 36C: Аналог Рифамицина 4-OH-Фенол (36c):

[0842] Аналог **R1c** приготовили с использованием промежуточного соединения **R4**, синтез которого показан на нижеприведенной **Схеме R3**.

Схема R3



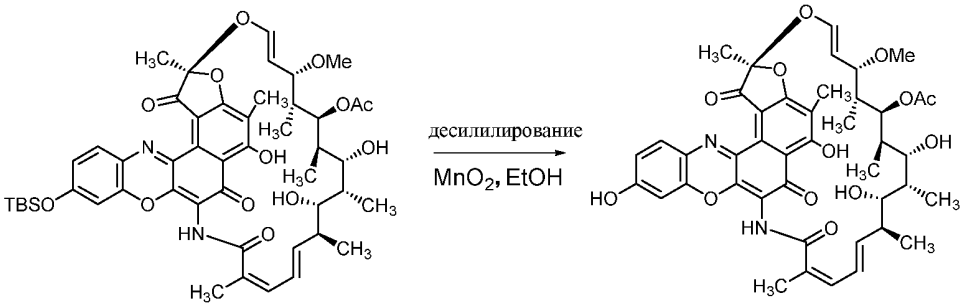
[0843] 2-амино-5-((трет-бутилдиметилсилил) окси)фенол (**R4**):

[0844] *Синтез соединения **R3***. Соединение **R8** приготовили из продукта в Примере 36B. К раствору 3-бензилокси-4-нитрофенола **R8** (400 мг, 1.63 ммоль) под аргоном в DMF (2 мл) добавили TBSCl (0.247 мл, 2.44 ммоль), имидазол (222 мг, 3.26 ммоль) и DMAP (0.5 мг). Смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи, затем развели этилацетатом (25 мл), промыли водой (2 x 10 мл), рассолом (10 мл) и высушили над сульфатом натрия. Сырой продукт очистили на колонке с силикагелем 40g HP Gold RediSep посредством ISCO (градиентное элюирование: 0 → 20 % ЭА в гексанах) и чистые фракции испарили, в результате чего получили необходимое соединение **R3** (540 мг, 92%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{19}H_{25}N_2O_4Si$, 359.16; обнаружено 382.1 (M+Na).

[0845] *Синтез соединения **R4.*** К раствору под аргоном соединения **R3** (120 мг, 0.33 ммоль) в 3 мл метанола (дегазировали аргоном трижды) добавили 10% Pd/C (10 мг). Смесь еще раз дегазировали и барботировали водородом из баллона. Баллон с водородом подсоединили

через мембрану и смесь оставили на ночь. Смесь отфильтровали через целит и сконцентрировали, в результате чего получили твердое вещество темно-зеленого цвета (71 мг, 90%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{12}H_{21}NO_2Si$, 239.13; обнаружено 240.2 (M+H).

[0846] *Синтез аналога **R1c.*** К перемешиваемому раствору под аргоном рифамицина S (120 мг, 0.172 ммоль) в 10 мл толуола при комнатной температуре добавили соединение **R4** (46 мг, 0.192 ммоль). Раствор смеси перемешивали на протяжении 3 дней при комнатной температуре. Течение реакции контролировали посредством ЖХ/МС, затем смесь испарили до сухого состояния. Темный осадок растворили в 10 мл этанола и 50 мг (0.6 ммоль) оксида марганца (MnO_2) добавили одной частью к раствору этанола. Вязкую смесь перемешивали на протяжении 12 ч при комнатной температуре. После фильтрации нерастворимых материалов с использованием целитной подушки фильтрат испарили под пониженным давлением. Темный осадок очистили на колонке с силикагелем 24 g HP Gold RediSep column посредством ISCO (градиентное элюирование: 5 → 95% ЭА в гексанах). Чистые фракции испарили и высушили *in vacuo*, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R1c** в виде твердого вещества темно-красного цвета (48 мг, 35%). МС: рассчитано для $C_{43}H_{48}N_2O_{13}$, 800.32; обнаружено 801.3 (M+H), 799.2 (M-H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 11.43 (d, J = 1.7 Гц, 1H), 9.33 - 9.32 (m, 1H), 7.82 (dt, J = 2.0, 1.0 Гц, 1H), 7.02 - 7.01 (m, 1H), 6.89 (t, J = 1.3 Гц, 1H), 6.04 (dd, J = 2.5, 0.9 Гц, 1H), 5.83 (dt, J = 1.9, 1.0 Гц, 1H), 5.25 - 5.24 (m, 1H), 4.78 - 4.77 (m, 1H), 4.14 - 4.14 (m, 1H), 3.52 (d, J = 0.8 Гц, 1H), 3.07 (d, J = 0.7 Гц, 1H), 3.03 (t, J = 0.6 Гц, 3H), 2.89 (s, 1H), 2.78 (t, J = 2.7 Гц, 1H), 2.19 (d, J = 16.7 Гц, 3H), 1.99 (d, J = 12.2 Гц, 4H), 1.95 (t, J = 0.5 Гц, 4H), 1.67 (d, J = 1.9 Гц, 3H), 1.24 (s, 2H), 0.89 (dd, J = 2.5, 1.1 Гц, 2H), 0.85 (d, J = 6.5 Гц, 6H), 0.69 (d, J = 1.5 Гц, 3H).

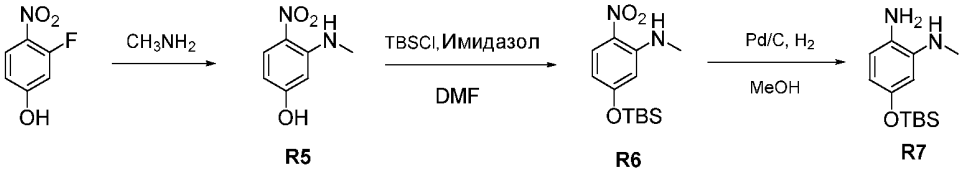


R1c-TBS **R1c**

ПРИМЕР 36D: Аналоги Рифамицина 4-OH-Фенол N-метил (36d):

[0847] Аналог **36d** приготовили с использованием промежуточного соединения**R7**, синтез которого показан на нижеприведенной **Схеме R4**.

Схема R4



[0848] 5-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-N1-метилбензол-1,2-диамин (**R7**):

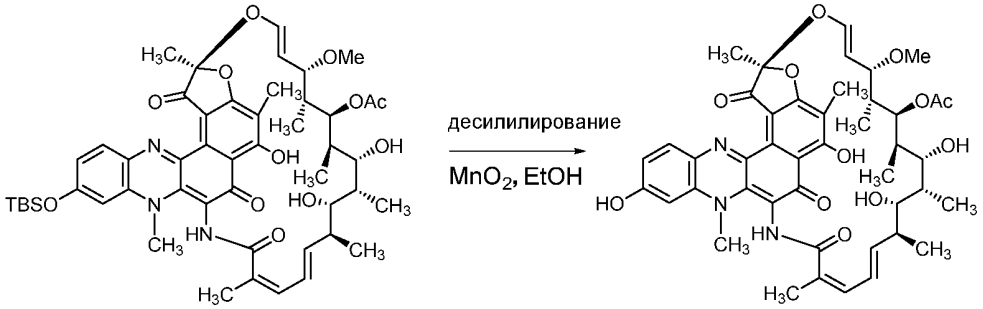
[0849] *Синтез соединения **R5**.* Указанное в заголовке соединение приготовили с использованием способа, описанного в PTC *Int. Appl.* 2008051805. В герметичную трубку поместили смесь 3-фтор-4-нитрофенила (1 г, 6.36 ммоль) и 2 мл 40% водного раствора метиламина. Сосуд загерметизировали через прокладку, продули аргоном и нагревали при 80° С в масляной ванне на протяжении 18 ч. Согласно анализу ЖХМС реакция была завершена, после чего реакционную смесь охладили до комнатной температуры. Раствор растворили посредством добавления воды (15-20 мл) и экстрагировали с использованием этилацетата (3 x 30 мл). Затем комбинированный органический слой промыли водой, рассолом, высушили (Na_2SO_4) и затем сконцентрировали, в результате чего получили сырой продукт, твердое вещество коричневого и белого цвета (900 мг, 84%) **R5**, которое использовали на следующем этапе без дальнейшего очищения. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_7H_8N_2O_3$, 168.05; обнаружено 169.1 (M+H).

[0850] *Синтез соединения **R6**.* Под аргоном 3-(метиламино)-4-нитрофенол **R5** (200 мг, 1.19 ммоль) и имидазол (162 мг, 2.38 ммоль) растворили в безводном DMF в присутствии катализатора DMAP (0.7 мг). Перемешиваемый раствор желтого цвета охладили в ледяной ванне и добавили TBSCl (269 мг, 1.79 ммоль) одной частью к раствору желтого цвета. Через 5 мин ванну убрали и раствору дали согреться до комнатной температуры на протяжении ночи. К смеси добавили насыщенный раствор $NaHCO_3$ и выполнили экстрацию этилацетатом (2 x 25 мл). Комбинированный органический продукт высушили посредством добавления Na_2SO_4 и затем сконцентрировали, в результате чего получили сырой продукт. Осадок очистили на колонке с силикагелем 24g HP Gold RediSep посредством ISCO (градиентное элюирование: 0 → 90% ЭА в гексанах) и чистые фракции испарили, высушили *in vacuo* и получили указанное в заголовке соединение **R6** в виде твердого вещества желтого цвета (220 мг, 66%). МС: рассчитано для $C_{13}H_{22}N_2O_3Si$, 282.14; обнаружено 283.1 (M+H).

[0851] *Синтез соединения **R7**.* Под аргоном 5-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-N1-метилбензол-1,2-диамин **6** (50 мг, 0.177 ммоль) растворили в 2 мл метанола. Раствор

дегазировали аргоном трижды посредством добавления Pd/C (5 мг). Затем смесь дегазировали аргоном и подключили баллон с водородом через прокладку. Спустя 2.5 ч анализ посредством ЖХ/МС показал, что реакция завершена. Смесь отфильтровали через целит и сконцентрировали, в результате чего получили 46 мг соединения **R7** в количественном отношении, которое использовали на следующем этапе сразу же без дальнейшей очистки. МС: рассчитано для $C_{13}H_{24}N_2OSi$, 252.17; обнаружено 253.2 (M+H).

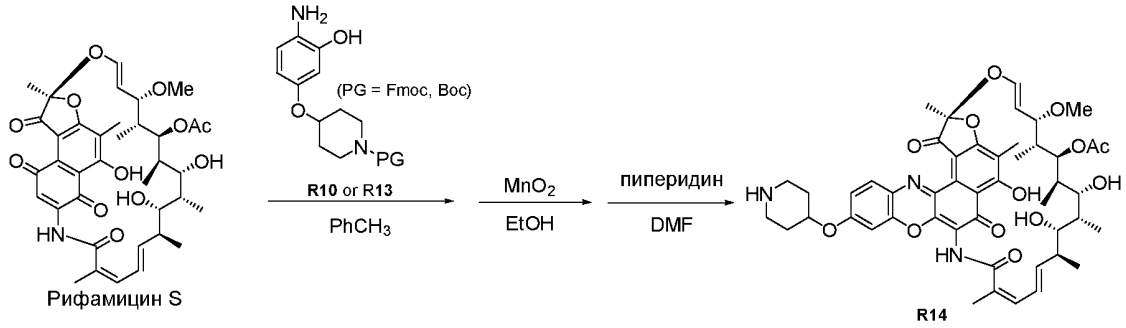
[0852] *Синтез аналога **R1d.*** К перемешиваемому раствору под аргоном рифамицина S (58 мг, 0.083 ммоль) в 3 мл толуола при комнатной температуре добавили соединение **R7** (21 мг, 0.083 ммоль). Раствор перемешивали на протяжении 2 дней при комнатной температуре. Течение реакции контролировали посредством ЖХ/МС, затем раствор испарили до сухого состояния. Темный осадок растворили в 5 мл этанола и 10 мг оксида марганца (MnO_2) добавили одной частью к раствору этанола. Вязкую смесь перемешивали на протяжении 12 ч при комнатной температуре. После фильтрации нерастворимых материалов с использованием целитной подушки фильтрат испарили под пониженным давлением. Темный осадок очистили на колонке с силикагелем 12 g HP Gold RediSep посредством ISCO (градиентное элюирование: 5 → 95% ЭА в гексанах), и чистые фракции испарили и высушили *in vacuo*, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R1d** в виде темно-красного твердого вещества (22.3 мг, 33%). Согласно ЖХ/МС, продукт был нечистым, поэтому его растворили в растворе MeCN/вода и еще раз очистили на колонке с силикагелем 15.5 g C18 Aq Gold (градиентное элюирование: 10 – 95% MeCN в воде, 0.05% уксусная кислота в обоих случаях, на протяжении более 20 мин). Фракции продукта объединили, заморозили на сухом льду и лиофилизировали, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R1d** в виде белого твердого вещества (13.5 мг, 20%). МС: рассчитано для $C_{44}H_{51}N_3O_{12}$, 813.35; обнаружено 814.3 (M+H), 812.3 (M-H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 11.31 (b, J = 0.8 Гц, 2H), 9.41 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.01 - 7.95 (m, 2H), 7.19 - 7.13 (m, 2H), 7.04 (s, 2H), 6.79 - 6.74 (m, 1H), 6.39 - 6.37 (m, 1H), 6.19 (t, J = 11.4 Гц, 2H), 6.08 (d, J = 12.4 Гц, 1H), 6.02 - 5.92 (m, 1H), 5.73 (d, J = 26.4 Гц, 1H), 5.49 (d, J = 11.2 Гц, 1H), 5.28 (d, J = 0.6 Гц, 1H), 5.09 - 5.02 (m, 2H), 4.82 (dd, J = 11.5, 10.2 Гц, 1H), 4.54 (d, J = 6.6 Гц, 1H), 4.36 (d, J = 2.6 Гц, 1H), 3.96 (d, J = 4.4 Гц, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.79 (s, 1H), 3.70 (s, 1H), 3.09 (s, 1H), 2.91 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.15 (d, J = 5.9 Гц, 1H), 1.97 (s, 2H), 1.72 (s, 2H), 1.64 (s, 2H), 1.59 (s, 2H), 0.90 (d, J = 7.0 Гц, 1H), 0.70 (d, J = 6.6 Гц, 1H), 0.62 (d, J = 6.8 Гц, 1H), 0.20 - 0.18 (m, 1H), 0.07 (d, J = 0.7 Гц, 1H).



ПРИМЕР 37: Синтез аналога R14

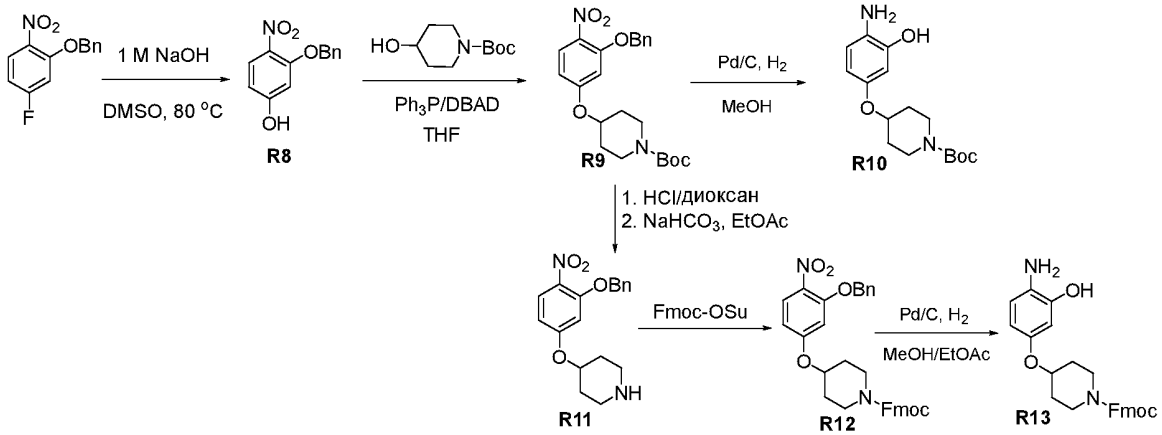
[0853] Аналог Рифамицина **R14** синтезировали из рифамицина S так, как показано на нижеприведенной **Схеме R5**, и так, как описано далее.

Схема R5



ПРИМЕР 37A: Приготовление соединение (R10 и R13):

[0854] Промежуточные соединения **R10** и **R13** приготовили согласно **Схеме R6**, показанной далее.



[0855] *Синтез соединения **R8**.* Указанное в заголовке соединение приготовили с использованием несколько измененного способа, описанного в работе Otten *et. al.* (*Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 76−83). К раствору 3-фтор-4-нитрофенила (2.09 г, 8.45 ммоль) в DMSO (10 мл) добавили 1M NaOH (10 мл) и нагревали его до 80 °C на термостате в течение 18 ч. Согласно анализу ЖХМС реакция была завершена, после чего реакционную смесь охладили до комнатной температуры. Реакционную смесь окислили при помощи 1M HCl (15-20 мл) до pH = 3-4 и полученный раствор экстрагировали этилацетатом (3 x 30 мл). Комбинированные органические слои промыли водой, рассолом, высушили (Na_2SO_4) и сконцентрировали *in vacuo*. Затем сырое масло очистили на колонке с силикагелем 80 g HP Gold RediSep column посредством ISCO (градиентное элюирование: 0 → 100% этилацетат в гексанах) и чистые фракции испарили, затем высушили *in vacuo* и получили указанное в заголовке соединение **R8** в виде твердого вещества желтовато-белого цвета (1.51 г, 73%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{13}H_{11}NO_4$, 245.1; обнаружено 268.1 (M+Na), 244.1 (M-H).

[0856] *Синтез соединения **R9**.* К перемешиваемому раствору под аргоном соединения **R8** (1.51 г, 6.157 ммоль) в THF (16 мл) при комнатной температуре добавили BOC-пиперидин-4-ол (1.61 г, 8.005 ммоль) и PPh_3 (2.91 г, 11.083 ммоль). Раствор DBAD (2.55 г, 11.083 ммоль) в THF (9 мл) добавили к реакционной смеси по каплям. После перемешивания в течение 16 ч смесь испарили до сухого состояния и остаток очистили на колонке с силикагелем 40 g HP Gold RediSep посредством ISCO (градиентное элюирование: 0 → 100% этилацетат в гексанах) и чистые фракции испарили, затем высушили *in vacuo* и получили указанное в заголовке соединение **R9** в виде твердого вещества желтовато-белого цвета (2.41 г, 91%). МС: рассчитано для $C_{23}H_{28}N_2O_6$, 428.2; обнаружено 451.1 (M+Na).

[0857] *Синтез соединения **R10**.* К дегазированному раствору под аргоном соединения **R9** (100 мг, 0.233 ммоль) в 3 мл метанола добавили 5 мг 10% Pd/C. Затем смесь еще раз дегазировали и выполнили подключение баллона с водородом. Спустя 2.5 ч анализ посредством ЖХ/МС показал, что реакция завершена. Смесь отфильтровали через целит и сконцентрировали, в результате чего получили 75 мг соединения **R10** в количественном отношении, которое использовали на следующем этапе сразу же без дальнейшей очистки. МС: рассчитано для $C_{16}H_{24}N_2O_4$, 308.17; обнаружено 331.2 (M+Na), 307.1 (M-H).

[0858] *Синтез соединения **R11**.* К раствору соединения **R9** (1100 мг, 2.561 ммоль) в 1,4-диоксане (15 мл) добавили 4 M HCl в 1,4-диоксане (5 мл). После перемешивания в течение 15 ч анализ показал, что реакция завершена. К раствору добавили диэтиловый эфир (50 мл), затем активно смесь перемешивали в течение 1 ч до образования осадка белого

цвета. Твердое вещество отфильтровали и промыли эфиром, в результате чего получили соль HCl **R11**. К белому твердому веществу добавили EtOAc (10 мл) и нас. $NaHCO_3$ (15 мл) до достижения pH = 8-9 и перемешивали смесь в течение 15 мин. Отделили два слоя и водный слой экстрагировали при помощи EtOAc (3 x 30 мл). Комбинированные органические слои высушили (Na_2SO_4) и сконцентрировали *in vacuo* , в результате чего получили соединение **R11** (372 мг, 44%), которое использовали для следующего этапа сразу же без дальнейшей очистки. МС: рассчитано для $C_{18}H_{21}N_2O_4$, 328.1; обнаружено 329.1 (M+H).

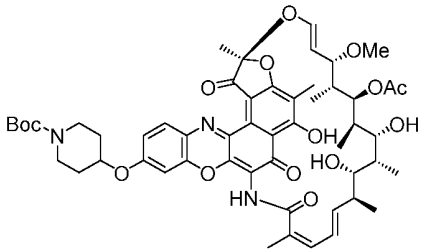
[0859] *Синтез соединения **R12**.* К раствору под аргоном соединения **R11** (372 мг, 1.128 ммоль) в 1,4-диоксане/воде (об./об., 10:1, 11 мл) добавили Fmoc-OSu (399 мг, 1.184 ммоль). После перемешивания в течение 15 ч анализ ЖХ/МС показал, что реакция завершена. Реакционную смесь сконцентрировали *in vacuo* и получили соединение **R12**, которое использовали на следующем этапе сразу же без дальнейшей очистки. МС: рассчитано для $C_{33}H_{30}N_2O_6$, 550.2; обнаружено 551.2 (M+H).

[0860] *Синтез соединения **R13**.* К раствору под аргоном соединения **R12** (72 мг, 0.131 ммоль) в 2 мл метанола и дегазированному аргоном добавили 9 мг 10% Pd/C. Затем смесь дегазировали аргоном и выполнили подключение баллона с водородом. Через 45 мин анализ посредством ЖХ/МС показал, что реакция завершена. Смесь отфильтровали через целит и сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили 55 мг соединения **R13** в количественном отношении, которое использовали на следующем этапе сразу же без дальнейшей очистки. МС: рассчитано для $C_{26}H_{26}N_2O_4$, 430.1; обнаружено 431.2 (M+H).

ПРИМЕР 37B: Приготовление аналога R14 из промежуточного соединения R10

[0861] *Синтез соединения **R14-Boc**:* К перемешиваемому раствору рифамицина S (100 мг, 0.143 ммоль) в 5 мл толуола при комнатной температуре добавили соединение **R10** (44 мг, 0.143 ммоль). Раствор смеси перемешивали на протяжении 4 дней при комнатной температуре. Течение реакции контролировали посредством ЖХ/МС до ее завершения, затем смесь испарили до сухого состояния. Темный осадок растворили в 10 мл этанола и 62 мг (0.715 ммоль) оксида марганца (MnO_2) добавили одной частью к раствору этанола. Вязкую смесь перемешивали на протяжении 15 ч при комнатной температуре. После фильтрации нерастворимых материалов с использованием целитной подушки фильтрат испарили под пониженным давлением. Темный осадок очистили на колонке с силикагелем 12 g HP Gold RediSep column посредством ISCO (градиентное элюирование: 5 → 95% ЭА в гексанах). После концентрации под пониженным давлением сырой продукт (приблизит. 85%

чист.) очистили на колонке 50 g C18 Aq Gold (градиентное элюирование: 10 – 95% MeCN в воде, 0.05% уксусная кислота). Чистые фракции объединили, заморозили на сухом льду и лиофилизировали, в результате чего получили **R14-Boc** в виде твердого вещества темно-красного цвета (36 мг, 26%). МС: рассчитано для $C_{53}H_{65}N_3O_{15}$, 983.44; обнаружено 984.4 (M+H).



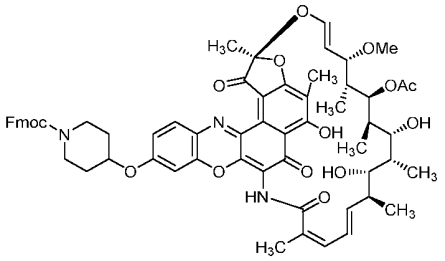
R14 -Boc

[0862] *Синтез соединения **R14:*** На **R14-Boc** (30 мг, 0.03 ммоль) воздействовали смесью TFA/ацетонитрил/вода (0.25 мл/5 мл/5 мл) при комнатной температуре в течение 20 ч, в результате чего получили соединение **R14**. Реакционную смесь очистили на колонке 15.5g C18 Aq. Gold посредством ISCO системы (градиентное элюирование: 10% – 100% MeCN в воде 0.05% уксусная кислота, более 30 мин). Содержащие продукт фракции объединили заморозили на льду и лиофилизировали на протяжении ночи, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R14** (10 мг, 37%) в виде твердого вещества темно-красного цвета. MS: рассчитано для $C_{48}H_{57}N_3O_{13}$, 883.4; обнаружено 884.3 (M+H).

ПРИМЕР 37C: Приготовление аналога R14 из промежуточного соединения R13

[0863] *Синтез соединения **R14**:* В круглодонную колбу с гидроксианилином **R13** (55 мг, 0.1278 ммоль) добавили толуол (1.5 мл) и рифамицин S (67 мг, 0.0956 ммоль). Реакционную смесь обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин для растворения реакционной смеси, колбу загерметизировали через резиновую прокладку, продули аргоном и реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 2 дня добавили другую часть гидроксианилина (45 мг, 0.1045 ммоль) и перемешивали смесь в течение 1 суток. Реакционную смесь сконцентрировали *in vacuo* для удаления толуола, растворили в EtOH (6 мл) и добавили MnO_2 (20 мг). После перемешивания на протяжении 3 суток реакционную смесь сконцентрировали *in vacuo* и очистили посредством хроматографии на колонке с силикагелем 40 g HP Gold RediSep посредством ISCO (градиентное элюирование: 0 → 100% этилацетат в гексанах). Чистые фракции испарили и высушили *in vacuo*, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R14-Fmoc** в виде твердого вещества темно-

красного цвета (35 мг, 33%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{63}H_{67}N_3O_{15}$, 1105.4; обнаружено 1106.5 (M+H), 1128.5 (M+Na).

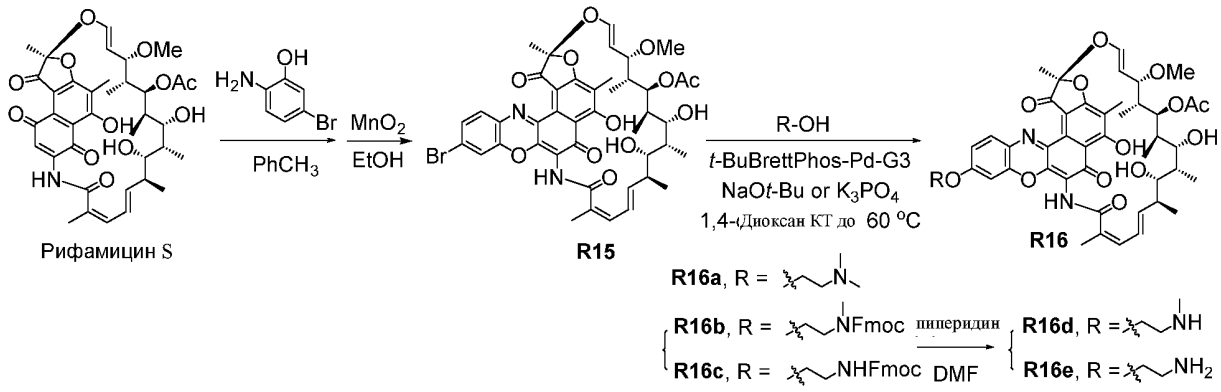


R14 -Fmoc

[0864] К перемешиваемому раствору под аргоном Fmoc-рифамицин-пиперидин-О-фенола **R14-Fmoc** из предыдущего этапа (35 мг, 0.0361 ммоль) в *N,N*-диметилформамиде (DMF, 1 мл) добавили раствор 2% пиперидина (3.5 мг, 0.2 мл, 0.0411 ммоль) в DMF и реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 2 ч реакционную смесь очистили напрямую на колонке 50 g C18 RediSep Gold посредством системы ISCO (градиентное элюирование: 0 – 100% MeCN в воде 0.05% уксусная кислота, более 30 мин). Содержащие продукт фракции объединили, заморозили на сухом льду и лиофилизировали на протяжении ночи, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R14** в виде твердого вещества темно-красного цвета (12 мг, 43%). МС: рассчитано для $C_{48}H_{57}N_3O_{13}$, 883.4; обнаружено 884.3 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 9.40 (s, 1H), 7.87 (d, J = 8.9 Гц, 1H), 7.16 – 7.23 (m, 4H), 5.99 – 6.05 (m, 2H), 5.76 – 5.85 (m, 2H), 5.18 – 5.23 (m, 2H), 4.83 – 4.95 (m, 2H), 4.80 (br. s, 2H), 4.12 (br. S., 1H), 2.91 – 3.18 (m, 13H), 2.88 (s, 1H), 2.78 (t, J = 0.9 Гц, 2H), 2.67 (s, 2H), 2.22 (d, J = 3.7 Гц, 4H), 2.15 (s, 2H), 2.02 (s, 2H), 1.96 (d, J = 1.2 Гц, 2H), 1.90 (s, 1H), 1.68 (s, 2H), 0.85 – 0.92 (m, 12H), 0.69 (br. s, 9H).

ПРИМЕР 38: Синтез аналогов R16a-R16e

[0865] Аналоги рифамицина **R16a-R16e** синтезировали из рифамицина S так, как показано на нижеприведенной **Схеме R7**, и так, как описано далее.



ПРИМЕР 38A: Pd-катализированное O-алкилирование (R16a-R16c):

[0866] *Синтез соединения **R15**.* К перемешиваемому раствору под аргоном рифамицина S (2.0 г, 2.87 ммоль) в 80 мл толуола при комнатной температуре добавили 2-амино-5-бромофенол (0.54 г, 2.87 ммоль). Раствор перемешивали на протяжении 2 дней при комнатной температуре. Затем реакционную смесь испарили до сухого состояния и темный осадок растворили в 20 мл этанола и 300 мг оксида марганца (MnO_2) добавили одной частью из раствора этанола. Вязкую смесь перемешивали под аргоном на протяжении 15 ч при комнатной температуре. После фильтрации нерастворимых материалов с использованием целитной подушки фильтрат испарили под пониженным давлением. Темный осадок очистили на колонке с силикагелем 120 g HP Gold RediSep посредством ISCO (градиентное элюирование: 5 → 95% ЭА в гексанах). Чистые фракции испарили и высушили *in vacuo*, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R15** в виде твердого вещества темно-красного цвета (1.6 г, 65%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{43}H_{47}BrN_2O_{13}$, 862.23; обнаружено 863.1 и 865.1 (M+H), 885.1 и 888.0 (M+Na). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6): δ 9.49 (d, J = 6.0 Гц, 1H), 7.92 (ddd, J = 3.6, 2.9, 1.8 Гц, 1H), 7.86 - 7.85 (m, 1H), 7.75 - 7.74 (m, 1H), 6.06 - 6.05 (m, 1H), 5.84 (dt, J = 2.6, 1.4 Гц, 2H), 5.25 - 5.23 (m, 2H), 4.80 (dt, J = 2.5, 1.0 Гц, 1H), 4.23 (td, J = 2.4, 1.0 Гц, 1H), 3.49 (d, J = 1.1 Гц, 1H), 3.10 - 3.09 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.79 (s, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.01 (s, 4H), 1.96 (s, 4H), 1.81 (d, J = 2.2 Гц, 1H), 1.68 (s, 3H), 1.60 (dq, J = 2.8, 0.9 Гц, 1H), 1.48 (t, J = 1.4 Гц, 1H), 0.90 (dt, J = 2.1, 1.1 Гц, 2H), 0.84 (d, J = 7.1 Гц, 4H), 0.69 (dd, J = 2.2, 1.2 Гц, 5H).

[0867] *Синтез соединения **R16a**.* С использованием способа, описанного в работе Buchwald S. L. *et al.* (*Org. Lett.* **2018**, *20*, 1580), для получения указанных в заголовке соединений **R16a-R16c**применили палладий-катализируемое C-O соединение первичных спиртов с соединением **R15**. В 2-драхмовую высушенную в печи пробирку с

завинчивающейся крышкой, оснащенную магнитным мешальником и герметически закрытой завинчивающейся крышкой, добавили соединение **R15** (40 мг, 0.0463 ммоль, 1.00 экв.), 2-(диметиламино)этан-1-ол (42 мг, 0.462 ммоль, 10 экв.), tBuBrettPhos Pd G3-палладацикл (11.8 мг, 30 мол.%) и NaO*t*-Bu (5 мг, 0.051 ммоль, 1.1 экв.). Реакционную пробирку закрыли прокладкой и проткнули ее иглой, присоединенной для эвакуации с заполнением аргоном (этот процесс повторили дважды) с последующим добавлением 1,4-диоксана (2.0 мл) при помощи шприца. Реакционную смесь нагревали до 55°C ± 5 в масляной ванне под давлением аргона в течение 15 ч, реакционной смеси дали остыть до комнатной температуры, отфильтровали ее через подушку из Celite® и промыли EtOAc. Сырой материал сконцентрировали in vacuo и очистили на колонке 15.5 g C18 Aq Gold (градиентное элюирование: 10 – 95% MeCN в воде, 0.05% уксусная кислота). Фракции продукта объединили, заморозили на сухом льду и лиофилизировали, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R16a** в виде твердого вещества темно-красного цвета (12.5 мг, 32%). МС: рассчитано для $C_{47}H_{57}N_3O_{13}$, 871.39; обнаружено 872.3 (M+H), 870.2 (M-H). ^{1}H ЯМР (300 МГц; DMSO-d_6) δ 9.40 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.9 Гц, 1H), 7.23—7.16 (m, 2H), 6.83 (dt, *J* = 2.3, 1.1 Гц, 1H), 6.23 (d, *J* = 4.6 Гц, 1H), 6.06 (dd, *J* = 5.9, 1.1 Гц, 1H), 5.82 (dd, *J* = 2.3, 1.5 Гц, 2H), 5.24 (dt, *J* = 1.4, 0.7 Гц, 1H), 4.83—4.75 (m, 1H), 4.24 (d, *J* = 29.9 Гц, 3H), 3.80 (d, *J* = 1.3 Гц, 1H), 3.03 (t, *J* = 0.5 Гц, 3H), 2.88 (s, 1H), 2.78 (t, *J* = 0.9 Гц, 2H), 2.67 (s, 2H), 2.22 (d, *J* = 3.7 Гц, 4H), 2.15 (s, 2H), 2.02 (s, 2H), 1.96 (d, *J* = 1.2 Гц, 2H), 1.90 (s, 1H), 1.68 (s, 2H), 0.85 (d, *J* = 6.7 Гц, 3H), 0.69 (t, *J* = 1.2 Гц, 3H).

[0868] *Синтез соединения **R16b**.* В высушенный в печи флакон объемом 8 мл с завинчивающейся крышкой, оснащенный магнитным мешальником и герметично закрытый завинчивающейся крышкой, добавили соединение **R15** (40 мг, 0.0463 ммоль, 1.00 экв.), Fmoc-глицинол (131 мг, 0.463 ммоль, 10 экв.), *t*-BuBrettPhos-Pd-G3-палладацикл (16 мг, 0.4 экв.) и K_3PO_4 (20 мг, 0.0942 ммоль, 2.0 экв.). Реакционную пробирку закрыли резиновой прокладкой и проткнули ее иглой, присоединенной для эвакуации с заполнением аргоном (этот процесс повторили дважды) с последующим добавлением 1,4-диоксана (2.0 мл). Реакционную смесь нагревали до 60°C ± 5 в термостате под давлением аргона в течение 15 ч, реакционной смеси дали остыть до комнатной температуры, отфильтровали ее через подушку из Celite® и промыли MeOH. Сырой материал сконцентрировали *in vacuo* и очистили на колонке 50 g C18 Aq Gold (градиентное элюирование: 5 – 100% MeCN в воде, 0.05% уксусная кислота). Фракции продукта объединили, заморозили на сухом льду и лиофилизировали, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R16b** в

виде твердого вещества темно-красного цвета (19 мг, 38%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{60}H_{63}N_3O_{15}$, 1065.4; обнаружено 1066.4 (M+H).

[0869] *Синтез соединения **R16d**.* Соединение **R16b** из предыдущего этапа (26 мг, 0.0244 ммоль) растворили в DMF (1 мл), к нему добавили 2% пиперидина (3.1 мг, 0.2 мл, 0.0366 ммоль) в DMF и реакционную смесь перемешивали под аргоном при температуре окружающей среды. Через 2 ч реакционную смесь очистили напрямую на колонке 50 g C18 RediSep Gold посредством системы ISCO (градиентное элюирование: 0 – 100% MeCN в воде, 0.05% уксусная кислота, более 30 мин). Содержащие продукт фракции объединили, заморозили на сухом льду и лиофилизировали на протяжении ночи, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R16d** в виде твердого вещества темно-синего цвета (9 мг, 44%). МС: рассчитано для $C_{45}H_{53}N_3O_{13}$, 843.4; обнаружено 844.4 (M+H), 842.3 (M-H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; CD_3OD): δ 7.83 (d, *J* = 8.8 Гц, 1H), 6.91 - 7.03 (m, 2H), 6.55 (s, 1H), 6.43 (d, *J* = 11.2 Гц, 1H), 6.21 - 6.30 (m, 2H), 4.98 - 5.08 (m, 2H), 3.76 (br. s, 3H), 3.43 - 3.47 (m, 1H), 3.41 (d, *J* = 5.37 Гц, 2H), 3.12 (br. s, 1H), 2.97 - 3.04 (m, 4H), 2.39 (br. s, 1H), 2.19 - 2.32 (m, 4H), 2.09 - 2.14 (m, 4H), 1.95 - 2.07 (m, 4H), 1.78 (s, 4H), 1.67 (d, *J* = 6.84 Гц, 1H), 1.31 (br. s., 2H), 0.97 (br. s, 8H), 0.66 - 0.85 (m, 4H), 0.08 (d, *J* = 5.5 Гц, 3H), -0.26 (d, *J* = 6.5 Гц, 3H).

[0870] *Синтез соединения **R16c**.* В высушенный в печи флакон объемом 8 мл с завинчивающейся крышкой, оснащенный магнитным мешальником и герметично закрытый завинчивающейся крышкой, добавили соединение **R15** (80 мг, 0.0926 ммоль, 1.00 экв.), Fmoc-саркозинол (275 мг, 0.9262 ммоль, 10 экв.), *t*-BuBrettPhos-Pd-G3-палладацикл (16 мг, 0.4 экв.) и K_3PO_4 (39 мг, 0.1852 ммоль, 2 экв.). Реакционную пробирку закрыли резиновой прокладкой и проткнули ее иглой, присоединенной для эвакуации с заполнением аргоном (этот процесс повторили дважды) с последующим добавлением 1,4-диоксана 32.0 мл) при помощи шприца. Реакционную смесь нагревали до 60°C ± 5 в термостате под давлением аргона в течение 15 ч, реакционной смеси дали остыть до комнатной температуры, отфильтровали ее через подушку из Celite® и промыли MeOH. Сырой материал сконцентрировали *in vacuo* и очистили на колонке 50 g C18 Aq Gold (градиентное элюирование: 5 – 100% MeCN в воде, 0.05% уксусная кислота). Фракции продукта объединили, заморозили на сухом льду и лиофилизировали, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R16c** в виде твердого вещества темно-красного цвета (49 мг, 49%). МС: рассчитано для $C_{61}H_{65}N_3O_{15}$, 1079.4; обнаружено 1080.5 (M+H).

[0871] *Синтез соединения **R16e**.* Соединение **R16c** из предыдущего этапа (49 мг, 0.045 ммоль) растворили в DMF (1 мл), к нему добавили 2% пиперидина (7.7 мг, 0.45 мл, 0.091

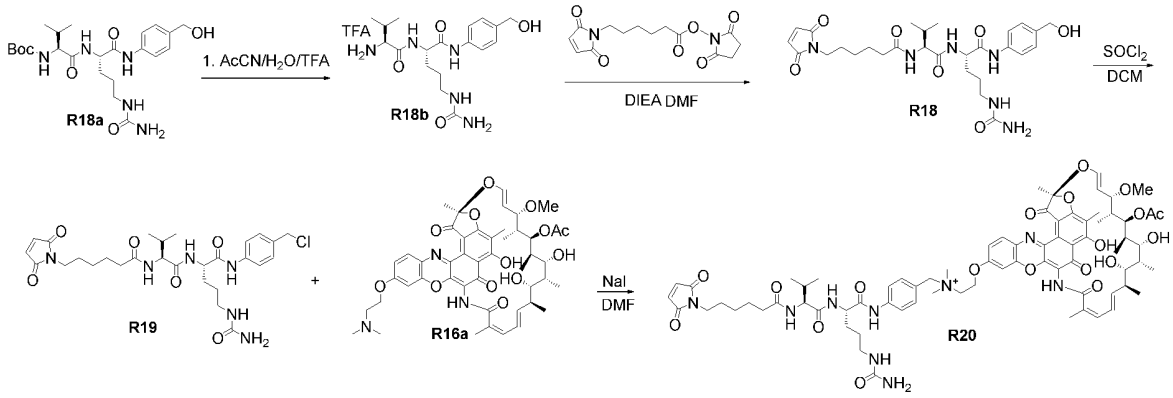
ммоль) в DMF и реакционную смесь перемешивали под аргоном при температуре окружающей среды. Через 2 ч реакционную смесь очистили напрямую на колонке 50 g C18 RediSep Gold посредством системы ISCO (градиентное элюирование: 0 – 100% MeCN в воде, 0.05% уксусная кислота, более 30 мин). Содержащие продукт фракции объединили, заморозили на сухом льду и лиофилизировали на протяжении ночи, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R16e** в виде твердого вещества темно-синего цвета (18 мг, 46%). МС: рассчитано для $C_{46}H_{55}N_3O_{13}$, 857.3; обнаружено 858.3 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; CD_3OD): δ 7.84 (d, *J* = 8.79 Гц, 1H), 7.11 - 7.20 (m, 1H), 6.88 - 6.96 (m, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.42 (d, *J* = 10.26 Гц, 1H), 6.17 - 6.28 (m, 2H), 4.93 - 5.06 (m, 2H), 3.86 (br. s, 1H), 3.66 - 3.84 (m, 8H), 3.18 - 3.31 (m, 7H), 3.10 (br. s, 2H), 2.94 - 3.05 (m, 6H), 2.37 (br. s, 1H), 2.25 (d, *J* = 4.88 Гц, 4H), 2.05 - 2.22 (m, 7H), 1.85 - 2.05 (m, 7H), 1.78 (s, 6H), 1.65 (br. s, 1H), 1.30 (br. s., 2H), 0.95 (br. s, 8H), 0.82 - 0.92 (m, 4H), 0.78 (br. s., 1H), 0.70 (br. s, 1H), 0.03 (d, *J* = 5.86 Гц, 3H), -0.28 (d, *J* = 5.86 Гц, 3H).

ПРИМЕР 39: Синтез аналогов Рифамицина R17

Аналоги Рифамицина (**R17**) синтезировали из соединения **R14** посредством восстановительного аминирования. К раствору соединения **R14** (9 мг, 0.0102 ммоль) и параформальдегида (1.52 мг, 0.051 ммоль) в 1.0 мл безводного DCM при комнатной температуре добавили $NaBH(OAc)_3$ (4.3 ммоль, 0.0204 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1 ч. Течение реакции контролировали посредством ЖХ/МС до получения требуемого продукта. К сырой реакционной смеси добавили 2-3 капли воды. Все летучие соединения удалили под пониженным давлением, затем выполнили разбавление DMSO (0.5 мл). Сырую смесь очистили посредством препаративной ВЭЖХ (Gemini, 5 мкм, 150 мм x 30 мм, элюенты: 10 - 95% MeCN в воде, 0.05% AcOH), чистые фракции объединили и лиофилизировали, в результате чего получили 6 мг (66%) **R17** в виде твердого вещества красноватого цвета. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{49}H_{59}N_3O_{13}$, 897.40; обнаружено 898.4 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6): δ 9.38 (br. s., 1H), 7.86 (br. s., 1H), 7.17 - 7.25 (m, 4H), 6.04 (d, *J* = 6.35 Гц, 1H), 5.81 (br. s., 2H), 4.79 (br. s., 2H), 4.70 (br. s., 2H), 4.15 (br. s., 1H), 3.53 (br. s., 1H), 3.30 (br. s., 5H), 3.09 (br. s., 3H), 3.03 (br. s., 4H), 2.87 (s, 1H), 2.78 (br. s., 2H), 2.58 - 2.66 (m, 6H), 2.54 (br. s., 8H), 2.37 (d, *J* = 1.47 Гц, 2H), 2.15 - 2.27 (m, 20H), 2.12 (br. s., 1H), 2.03 - 2.09 (m, 3H), 2.00 (s, 9H), 1.95 (br. s., 10H), 1.91 (s, 3H), 1.72 (br. s., 3H), 1.67 (br. s., 8H), 1.58 (s, 1H), 1.50 (br. s., 1H), 1.24 (br. s., 2H), 0.81 - 0.94 (m, 15H), 0.78 (d, *J* = 6.84 Гц, 3H), 0.69 (br.s., 9H).



ПРИМЕР 40



[0872] Данный пример описывает химические реакции линкер-нагрузок, которые применяются для приготовления указанного в заголовке соединения **R20**.

[0873] *Соединение **R18**:* Указанное в заголовке соединение приготовили при использовании процедуры, описанной в PCT Int. Appl., 2014145090. трет-бутил ((S)-1-(((S)-1-((4-(гидроксиметил) фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат **R18a**, (500 мг, 1.04 ммоль) растворили в смеси CH_3CN/H_2O/TFA (3:1:1 = об./об./об., 12 мл/4 мл/4 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч. Согласно ЖХМС реакция была завершена. После концентрации *in vacuo* сырой продукт **R18b** (0.9 г во влажном состоянии) применили сразу же для следующего этапа без дальнейшей очистки. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{18}H_{29}N_5O_4$, 379.22; обнаружено 380.2 (M+H).

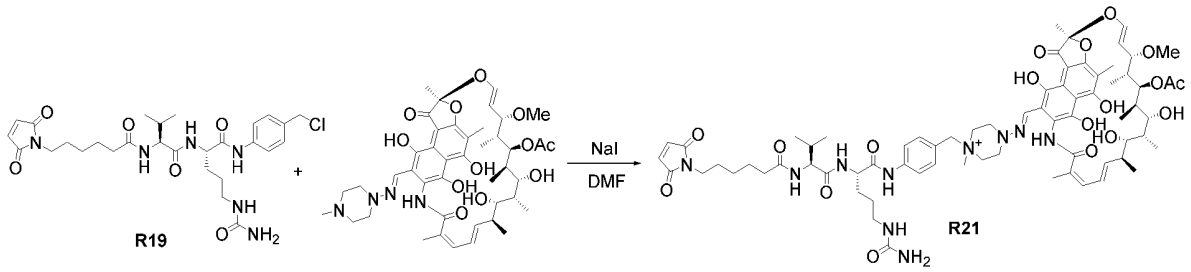
[0874] Раствор **R18b** (700 мг, 1.47 ммоль, 1.0 экв.) в воде (8 мл) разбавили 2 мл водного раствора $NaHCO_3$ при 4° C и на смесь (pH = 8.0) воздействовали коммерчески доступным 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноатом (408 мг, 0.9 экв.) в 10 мл ацетонитрила. Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч до завершения реакции. Сырой продукт сконцентрировали под пониженным давлением и разбавили DMSO (5 мл). Сырой продукт очистили при помощи колонки ISCO

150g C18 (элюенты: 10 - 95% MeCN в воде, 0.05 % в AcOH). Чистые фракции объединили лиофилизировали, в результате чего получили 368 мг (44%) соединения **R18** в виде белого твердого вещества. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{28}H_{40}N_6O_7$, 572.30; обнаружено 573.6 (M+H), (2M+H), 1145.9. ^{1}H NMR (500 МГц; DMSO-d_6): δ 9.89 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 7.33 Гц, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.79 Гц, 1H), 7.52 - 7.57 (m, *J* = 8.79 Гц, 2H), 7.21 - 7.26 (m, *J* = 8.79 Гц, 2H), 6.99 - 7.02 (m, 2H), 5.98 (br. s., 1H), 5.40 (s, 2H), 5.10 (t, *J* = 5.62 Гц, 1H), 4.35 - 4.45 (m, 3H), 4.18 (dd, *J* = 6.84, 8.30 Гц, 1H), 3.26 - 3.33 (m, 2H), 2.91 - 3.06 (m, 2H), 2.08 - 2.22 (m, 2H), 1.93 - 2.01 (m, 1H), 1.66 - 1.74 (m, 1H), 1.59 (dd, *J* = 4.40, 9.28 Гц, 1H), 1.43 - 1.55 (m, 5H), 1.32 - 1.43 (m, 1H), 1.19 (quin, *J* = 7.57 Гц, 2H), 0.84 (d, *J* = 8.30 Гц, 3H), 0.80 - 0.89 (m, 3H).

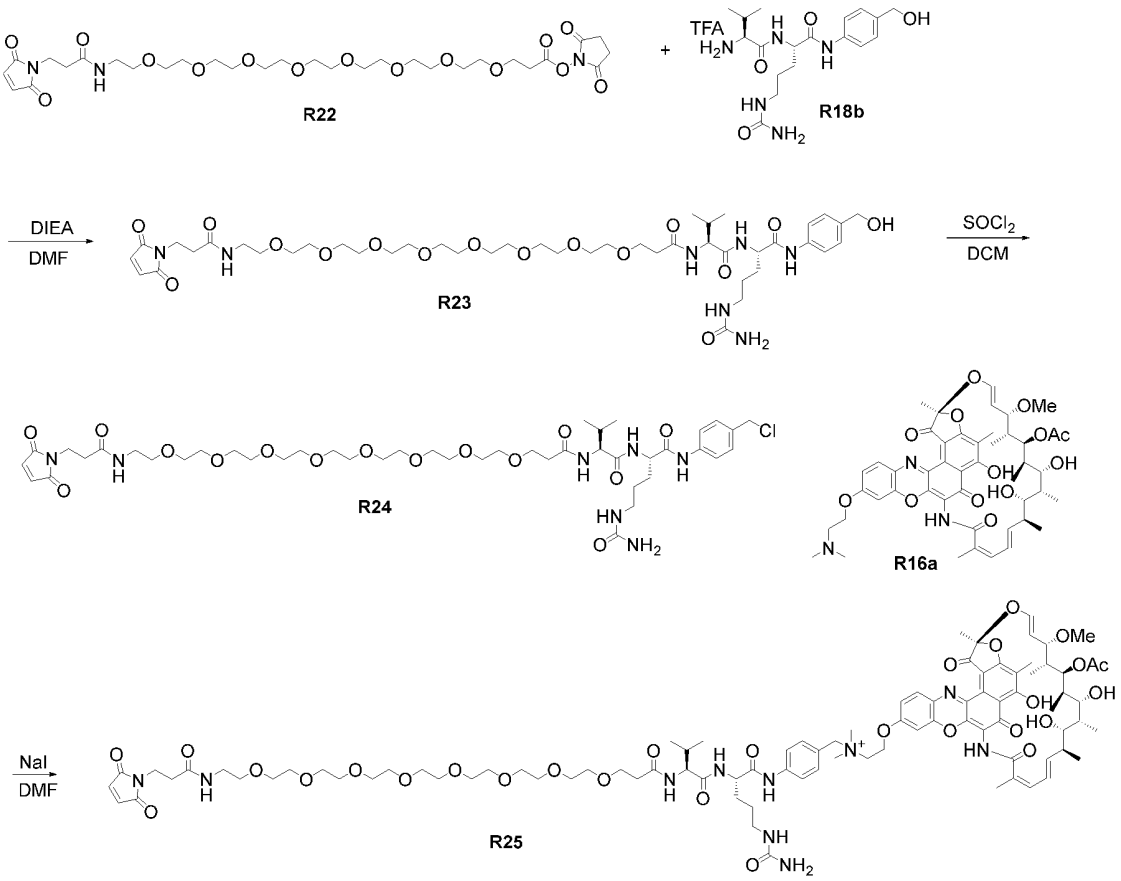
[0875] *Соединение **R19**:* К перемешиваемой суспензии **R18** (100 мг, 0.174 ммоль, 1.0 экв.) при комнатной температуре медленно добавили $SOCl_2$ (14 мкл, 0.192 ммоль, 1.1 экв.) при помощи микрошприца. Пастообразную реакционную смесь перемешивали в течение 1.5 ч, и анализ посредством ЖХ/МС показал образование необходимого продукта. Сырую смесь сконцентрировали для удаления всех летучих веществ под пониженным давлением. Смесь разбавили 2 мл DMSO и загрузили в колонку ISCO C18 Aq 50g для очистки (10 - 95% MeCN в воде, 0.05% AcOH). Чистые фракции объединили и лиофилизировали, в результате чего получили 72 мг (71%) **R19** в виде твердого вещества грязно-белого цвета. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{28}H_{39}ClN_6O_6$, 590.26; обнаружено 591.3 (M+H), 1181.5 (2M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 10.03 (s, 1H), 8.03 - 8.11 (m, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.30 Гц, 1H), 7.57 - 7.63 (m, *J* = 8.79 Гц, 2H), 7.34 - 7.38 (m, *J* = 8.79 Гц, 2H), 6.99 - 7.02 (m, 2H), 5.97 (br. s., 1H), 5.40 (br. s., 2H), 4.71 (s, 2H), 4.34 - 4.43 (m, 2H), 4.16 - 4.21 (m, 1H), 3.36 - 3.42 (m, 3H), 2.90 - 3.06 (m, 3H), 2.07 - 2.22 (m, 3H), 1.91 - 2.00 (m, 1H), 1.66 - 1.73 (m, 1H), 1.31 - 1.41 (m, 1H), 1.18 (quin, *J* = 7.69 Гц, 3H), 0.79 - 0.89 (m, 7H).

[0876] *Соединение **R20**:* Смесь **R19** (13.5 мг, 0.0228 ммоль, 1.2 экв.), **R16a** (16.6 мг, 0.0190 ммоль, 1.0 экв.) и NaI (14.2 мг, 0.095 ммоль) в 2-драхмовом флаконе растворили в 1 мл безводного DMF. Каталитическое количество (10 мкл) 0.5 М раствора DIPEA в DMF добавили при помощи шприца. Смесь нагревали при 55 °C в масляной ванне на протяжении ночи. Согласно ЖХ/МС, реакция была завершена и был получен требуемый продукт. Смесь охладили до 4° C и разбавили 1 мл воды. После фильтрации темную сырую смесь очистили при помощи колонки EZ препаративной ВЭЖХ (Gemini, 5 мкм, 150 мм x 30 мм, элюенты: 10 - 95% MeCN в воде, 0.05% AcOH). Чистые фракции объединили лиофилизировали, в результате чего получили 14.6 мг (55%) **R20** в виде твердого вещества темно-красного цвета. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{75}H_{96}N_9O_{19}^+$, 1426.68; обнаружено 1427.3 (M+1) и

1425.5 (M-1). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 10.25 (s, 1H), 8.19 (d, J = 6.84 Гц, 1H), 7.82 (d, J = 8.30 Гц, 2H), 7.76 (d, J = 8.79 Гц, 3H), 7.50 (d, J = 8.30 Гц, 3H), 7.00 (s, 2H), 6.12 (d, J = 12.70 Гц, 1H), 6.03 (br. s., 1H), 5.43 (s, 2H), 4.70 - 4.80 (m, 2H), 4.58 (br. s., 3H), 4.36 - 4.41 (m, 1H), 4.18 (t, J = 7.82 Гц, 1H), 3.77 (br. s., 2H), 3.36 - 3.45 (m, 8H), 3.13 (d, J = 8.30 Гц, 1H), 2.89 - 3.06 (m, 12H), 2.78 (t, J = 9.04 Гц, 1H), 2.06 - 2.22 (m, 3H), 2.03 (br. s., 1H), 1.91 - 2.00 (m, 10H), 1.85 (s, 3H), 1.66 - 1.74 (m, 1H), 1.56 - 1.64 (m, 6H), 1.42 - 1.56 (m, 8H), 1.38 (d, J = 6.84 Гц, 2H), 1.15 - 1.25 (m, 3H), 0.75 - 0.88 (m, 14H), 0.07 (s, 1H).



[0877] *Соединение **R21**:* Смесь **R19** (20 мг, 0.0349 ммоль, 1.0 экв.), рифамицина (25.8 мг, 0.0314 ммоль, 0.9 экв.) и NaI (39 мг, 0.261 ммоль) в 2-драхмовом флаконе растворили в 1 мл безводного DMF. Смесь нагревали при 55 °C в масляной ванне на протяжении ночи. Завершение реакции контролировали посредством ЖХ/МС. Смесь охладили до 4°C и разбавили 1 мл воды. После фильтрации темную сырую смесь очистили при помощи колонки EZ препаративной ВЭЖХ (Gemini, 5 мкм, 150 мм x 30 мм, элюенты: 10 - 95% MeCN в воде, 0.05% AcOH). Чистые фракции объединили и лиофилизировали в течение 30 ч, в результате чего получили 2 мг (51%) **R21** в виде твердого вещества красновато-желтого цвета. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{71}H_{97}N_{10}O_{18}^+$, 1377.70; обнаружено 1377.6 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 12.55 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.13 (s, 2H), 7.77 (dd, J = 23.3, 8.4 Гц, 4H), 7.47 (d, J = 8.2 Гц, 2H), 7.13 - 7.07 (m, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.25 - 6.20 (m, 2H), 5.98 (d, J = 0.4 Гц, 1H), 5.90 (dd, J = 15.9, 6.9 Гц, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.08 - 5.06 (m, 1H), 5.02 - 5.02 (m, 1H), 4.95 - 4.91 (m, 1H), 4.58 (dd, J = 1.0, 0.4 Гц, 2H), 4.39 - 4.38 (m, 1H), 4.20 - 4.15 (m, 2H), 3.74 - 3.73 (m, 1H), 3.56 - 3.54 (m, 3H), 3.03 - 3.01 (m, 2H), 2.96 - 2.93 (m, 6H), 2.90 (s, 5H), 2.81 - 2.81 (m, 1H), 2.17 (dd, J = 9.5, 5.3 Гц, 3H), 1.97 (s, 5H), 1.91(d, J = 11.0 Гц, 8H), 1.63 (s, 6H), 1.58 (dd, J = 6.5, 0.8 Гц, 2H), 1.48 (t, J = 7.4 Гц, 8H), 1.37 - 1.32 (m, 2H), 1.20 - 1.17 (m, 2H), 1.04 (dd, J = 6.1, 0.6 Гц, 1H), 0.86 (td, J = 12.9, 6.9 Гц, 14H), 0.77 (d, J = 6.5 Гц, 3H), 0.43 (d, J = 6.5 Гц, 3H).



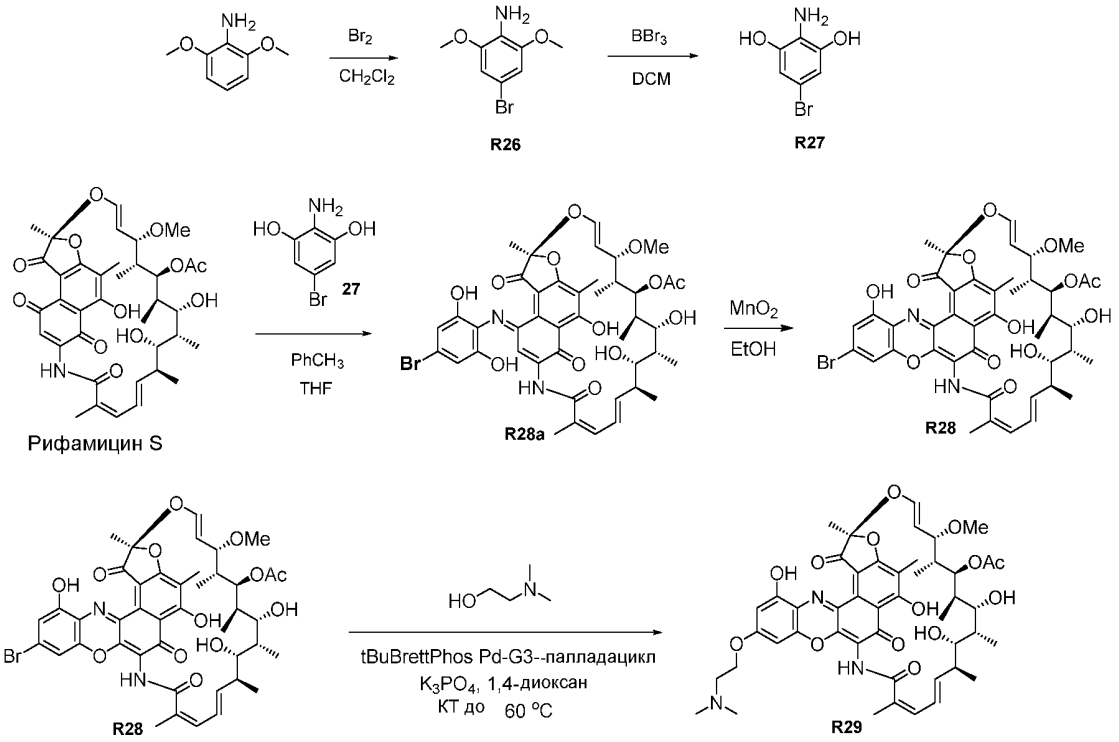
[0878] *Соединение **R23**:* К смеси **R22** (100 мг, 0.144 ммоль) и **R18b** (82 мг, 0.217 ммоль) в безводном DMF (1.5 мл) затем добавили DIEA (50 мкл, 0.288 ммоль) при помощи микрошприца. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре и получили **R23** согласно ЖХ/МС. Сырую смесь очистили при помощи колонки ISCO C18 100g Aq (элюенты: 10 - 95% MeCN в воде, 0.05 % в AcOH), чистые фракции объединили и лиофилизировали, в результате чего получили 84.4 мг (62%) **23**. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{44}H_{71}N_7O_{16}$, 953.50; обнаружено 954.4 (M+H), 976.4 (M+Na), 952.4 (M-H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 9.88 (s, 1H), 8.08 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.86 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 7.55 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.23 (d, J = 8.3 Гц, 2H), 7.00 (s, 2H), 5.98 (s, 1H), 5.40 (s, 1H), 4.43 (s, 2H), 4.39 (d, J = 5.4 Гц, 1H), 4.23 (dd, J = 8.3, 6.8 Гц, 2H), 3.60 (d, J = 6.9 Гц, 6H), 3.44 - 3.54 (m, 30H), 3.37 (t, J = 5.8 Гц, 3H), 3.15 (d, J = 5.7 Гц, 2H), 2.99 (d, J = 29.6 Гц, 2H), 2.33 (t, J = 7.3 Гц, 3H), 1.98 (d, J = 6.7 Гц, 1H), 1.71 - 1.70 (m, 1H), 1.61 - 1.58 (m, 1H), 1.44 - 1.36 (m, 2H), 0.85 (dd, J = 15.5, 6.7 Гц, 7H).

[0879] *Соединение **R24**:* К перемешиваемой суспензии **R23** (15 мг, 0.0157 ммоль, 1.0 экв.) во флаконе при комнатной температуре медленно добавили $SOCl_2$ (1.3 мкл, 0.0173 ммоль,

1.1 экв.) при помощи микрошприца. Через 1 ч анализ посредством ЖХ/МС показал образование желаемого продукта. Сырую смесь сконцентрировали для удаления всех летучих веществ под пониженным давлением. Сырую смесь разбавили 0.8 мл MeCN и загрузили в колонку EZ препаративной ВЭЖХ и элюировали (Gemini, 5 мкм, 150 мм x 30 мм, элюенты: 10 - 95% MeCN в воде, 0.05% AcOH). Чистые фракции объединили и лиофилизировали, в результате чего получили 9.5 мг (63%) **R24** в виде твердого вещества грязно-белого цвета. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{44}H_{70}ClN_7O_{15}$, 971.46; обнаружено 972.4 (M+H), 994.4 (M+Na), 970.3 (M-1).

[0880] *Соединение **R25**:* Смесь **R24** (9.5 мг, 0.00976 ммоль, 1.0 экв.), **R16a** (8.51 мг, 0.00976 ммоль, 1.0 экв.) и NaI (7.3 мг, 0.0488 ммоль) в 1-драхмовом флаконе растворили в 1 мл безводного DMF. Каталитическое количество (20 мкл) 0.5M раствора DIEA в DMF добавили при помощи шприца. Смесь нагревали при 55 °C в масляной ванне на протяжении ночи. Согласно ЖХ/МС, реакция была завершена и был получен требуемый продукт. Смесь охладили в ледяной ванне и разбавили 1 мл воды. После фильтрации темную сырую смесь очистили при помощи колонки EZ препаративной ВЭЖХ (Gemini, 5 мкм, 150 мм x 30 мм, элюенты: 10 - 95% MeCN в воде, 0.05% AcOH). Чистые фракции объединили лиофилизировали, в результате чего получили 7.4 мг (42%) **R25** в виде твердого вещества темно-красного цвета. МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{91}H_{127}N_{10}O_{28}^{+}$, 1807.88; обнаружено 1808.8 (M+H) и 1806.5 (M-1). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 10.23 (s, 1H), 8.22—8.17 (m, 1H), 8.03—7.98 (m, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.3 Гц, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.2 Гц, 4H), 7.50 (d, *J* = 8.3 Гц, 3H), 7.00 (s, 2H), 6.01 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 4.80—4.80 (m, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.43—4.41 (m, 1H), 4.27—4.23 (m, 1H), 3.76 (t, *J* = 0.6 Гц, 2H), 3.59 (t, *J* = 7.3 Гц, 5H), 3.49 (d, *J* = 2.9 Гц, 54H), 3.14 (d, *J* = 5.8 Гц, 4H), 3.03 (s, 8H), 2.90 (t, *J* = 0.7 Гц, 3H), 2.77 (d, *J* = 0.7 Гц, 1H), 2.33 (t, *J* = 7.3 Гц, 4H), 2.08 (d, *J* = 6.1 Гц, 4H), 1.94 (d, *J* = 18.9 Гц, 10H), 1.83 (s, 5H), 1.59 (s, 8H), 0.85 (dd, *J* = 16.1, 6.7 Гц, 8H).

ПРИМЕР 41



[0881] *Соединение **R26***: К перемешиваемому раствору 2,6-диметоксианилина (9.0 г, 58.7 ммоль, 1.0 экв.) в 350 мл безводного DCM по каплям добавляли в течение периода более 30 мин раствор Br_2 в 50 мл безводного DCM при 4° C. Еще 200 мл добавили к вязкой смеси и получили полугомогенный раствор. Реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи при комнатной температуре. Темно-коричневую смесь охладили до 4° C и ощелачили посредством добавления 1.0 M раствора NaOH (приблизит. 100 мл) до pH = 10-11. Смесь разбавили 200 мл DCM с последующим разделением слоев. Водный слой экстрагировали DCM (200 мл всего). Комбинированные слои DCM промыли водой, рассолом и высушили над Na_2SO_4. После концентрации *in vacuo* получили сырой продукт в виде твердого вещества красноватого цвета. Остаток растворили в DCM (8 мл) и загрузили в колонку с силикагелем 220 g HP Gold RediSep и очистили посредством ISCO (градиентное элюирование: 5 - 95% ЭА в гексанах), чистые фракции объединили и растворитель испарили *in vacuo*. Твердое вещество очистили растворением в DCM и гексанах и отфильтровали. Грязно-белое твердое вещество высушили *in vacuo* и получили указанное в заголовке соединение **R26** в виде твердого вещества грязно-белого цвета (9.4 г, 70%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_8H_{10}BrNO_2$, 230.99; обнаружено 231.9 и 234.0 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; $CDCl_3$) δ 6.66 (s, 2H), 3.84 (s, 6H)

[0882] *Соединение **R27***: Соединение **R26** (2.2 г, 9.47 ммоль, 1.0 экв.) растворили в 10 мл безводного DCM и раствор BBr_3 добавляли по каплям в течение периода более 10 мин (10 мл, 1.0 М раствор в DCM) при 4° С. Реакция была экзотермической, и был образован осадок. Добавили дополнительное количество BBr_3 (9 мл, 94.7 ммоль, 10 экв.) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Суспензию красноватого цвета проанализировали посредством ЖХ/МС для подтверждения образования желаемого продукта. Реакционную смесь перенесли в колбу 250 мл и охладили до 4° С. К смеси осторожно добавили воду и затем водный насыщенный раствор $NaHCO_3$ до достижения pH = 7-8. Смесь экстрагировали DCM и водный слой охладили до 4° С, в результате чего получили осадок темно-коричневого цвета. Смесь отфильтровали и твердое вещество коричневого цвета растворили в 10 мл метанола и высушили над Na_2SO_4, в результате чего получили необходимый продукт **R27** (1.9 г, 100%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_6H_6BrNO_2$, 202.96; обнаружено 204.0 и 206.1 (M+H). ^{1}Н ЯМР (500 МГц; CD_3OD) δ 6.45 (s, 2H), 4.87 (s, 2H).

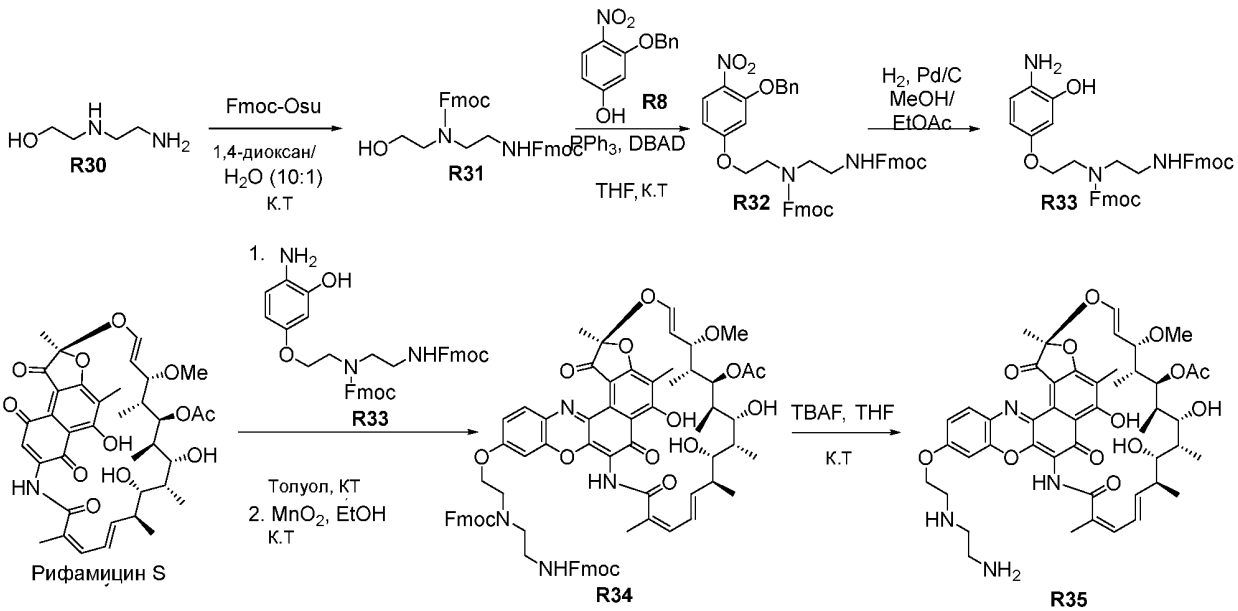
[0883] *Соединение **R28**:* К перемешиваемому раствору соединения **R27** (0.146 г, 0.72 ммоль) в смеси толуола (20 мл) и THF (20 мл) при комнатной температуре добавили рифамицин S (0.5 г, 0.72 ммоль). Раствор перемешивали в течение 3 дней при комнатной температуре и получили желаемый продукт. Растворители удалили *in vacuo*, темный осадок растворили в 10 мл этанола с последующим добавлением 100 мг диоксида марганца (MnO_2). Вязкую смесь перемешивали на протяжении 5 ч при комнатной температуре. После фильтрации нерастворимых материалов с использованием целитной подушки фильтрат испарили *in vacuo*. Темный осадок очистили на колонке с силикагелем 120 g HP Gold RediSep посредством ISCO (градиентное элюирование: 5 → 95% ЭА в гексанах). Чистые фракции испарили и высушили *in vacuo*, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R28** в виде твердого вещества темно-красного цвета (270 мг, 43%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{43}H_{47}BrN_2O_{13}$, 878.23; обнаружено 879.2 и 880.2 (M+H), 878.1 и 879.1 (M-1). ^{1}Н ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 10.22 (br. s., 1H), 9.52 (br. s., 1H), 7.43 (br. s., 1H), 7.35 (br. s., 1H), 6.04 (br. s., 1H), 5.83 (br. s., 2H), 5.21 (d, J = 6.35 Гц, 2H), 4.89 (t, J = 10.50 Гц, 1H), 4.16 (br. s., 1H), 3.51 (br. s., 1H), 3.15 (br. s., 2H), 3.02 (br. s., 4H), 2.80 (t, J = 8.55 Гц, 1H), 2.21 (br. s., 3H), 2.08 (br. s., 1H), 1.96 (s, 4H), 1.99 (s, 4H), 1.78 (br. s., 1H), 1.71 (br. s., 3H), 1.60 (br. s., 1H), 1.47 (br. s., 1H), 0.84 (d, J = 6.84 Гц, 6H), 0.69 (br. s., 6H).

[0884] *Соединение **R29**:* В высушенный в печи флакон объемом 8 мл с завинчивающейся крышкой, оснащенный магнитным мешателем, поместили соединение **R15** (60 мг, 0.069

ммоль, 1.00 экв.), 2-(диметиламино)этан-1-ол (61 мг, 0.69 ммоль, 10 экв.), *t*-BuBrettPhos-Pd-G3-палладацикл (31 мг, 0.0345 ммоль, 0.5 экв.) и K_3PO_4 (30 мг, 0.141 ммоль, 2.0 экв.). Реакционный флакон закрыли резиновой прокладкой. Прокладку проткнули иглой, присоединенной для эвакуации с заполнением аргоном (этот процесс повторили дважды) с последующим добавлением 1,4-диоксана (1.5 мл). Реакционную смесь нагревали до 60°C ± 5 под давлением аргона в течение 15 ч, реакционной смеси дали остыть до комнатной температуры, отфильтровали ее через подушку из Celite® и промыли MeOH. Сырой материал сконцентрировали *in vacuo* и очистили на колонке 50 g C18 Aq Gold (градиентное элюирование: 10 – 95% MeCN в воде, 0.05% уксусная кислота). Фракции продукта объединили и лиофилизировали, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R29** в виде твердого вещества темно-красного цвета (21 мг, 35%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{47}H_{57}N_3O_{14}$, 887.38; обнаружено 888.3 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 10.12 (br. s., 1H), 9.39 (br. s., 1H), 6.75 (br. s., 1H), 6.70 (br. s., 1H), 6.03 (br. s., 1H), 5.77 (d, J = 15.14 Гц, 1H), 5.21 (br. s., 1H), 4.83 - 4.90 (m, 1H), 4.15 - 4.30 (m, 2H), 4.08 (br. s., 1H), 3.53 (br. s., 1H), 3.29 (s, 1H), 3.16 (br. s., 1H), 3.03 (br. s., 3H), 2.87 (br. s., 1H), 2.79 (br. s., 1H), 2.62 - 2.71 (m, 2H), 2.36 (s, 1H), 2.23 (s, 6H), 2.19 (br. s., 3H), 1.93 - 2.11 (m, 7H), 1.91 (s, 1H), 1.76 (br. s., 1H), 1.69 (br. s., 3H), 1.53 - 1.65 (m, 1H), 1.50 (br. s., 1H), 1.32 - 1.45 (m, 1H), 0.76 - 0.94 (m, 6H), 0.68 (br. s., 5H).

ПРИМЕР 42: Синтез аналогов рифамицина R35

[0885] Аналог рифамицина **R35** синтезировали из рифамицина S, что описано далее.



[0886] *Соединение **R31**:* К раствору соединения **R30** (200 мг, 1.920 ммоль) под аргоном в 1,4-диоксане/воде (об./об., 10:1, 11 мл) добавили Fmoc-OSu (1360 мг, 4.032 ммоль). После перемешивания в течение 5 ч анализ ЖХ/МС показал, что реакция завершена. На реакционную смесь воздействовали нас. раствором $NaHCO_3$ (5 мл) и экстрагировали EtOAc (3 X 15 мл). Затем объединенный органический слой промыли рассолом (10 мл), высушили (Na_2SO_4) и сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили сырое соединение **R31** в виде белой пены (800 мг, 76%), которое сразу же использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. МС: рассчитано для $C_{34}H_{32}N_2O_5$, 548.2; обнаружено 549.2 (M+H).

[0887] *Соединение **R32**:* К перемешиваемому раствору соединения **R8** (160 мг, 0.652 ммоль) под аргоном в THF (2 мл) при комнатной температуре добавили спирт **R31** (432 мг, 0.788 ммоль) и PPh_3 (308 мг, 1.174 ммоль). Затем раствор DBAD (270 мг, 1.174 ммоль) в THF (1 мл) добавили к реакционной смеси по каплям. После перемешивания в течение 15 ч смесь испарили до сухого состояния и остаток очистили на колонке с силикагелем 40 g HP Gold RediSep посредством ISCO (градиентное элюирование: 0 → 100% этилацетат в гексанах) и чистые фракции испарили, затем высушили *in vacuo* и получили указанное в заголовке соединение **R32** в виде твердого вещества желтовато-белого цвета (286 мг, 56%). МС: рассчитано для $C_{47}H_{41}N_3O_8$, 775.3; обнаружено 776.3 (M+H), 798.2 (M+Na).

[0888] *Соединение **R33**:* К раствору под аргоном соединения **R32** (220 мг, 0.284 ммоль) в 5 мл метанола/EtOAc (2:3) и дегазированному аргоном добавили 31 мг 10% Pd/C. Затем смесь дегазировали аргоном и выполнили подключение баллона с водородом. Спустя 2 ч анализ посредством ЖХ/МС показал, что реакция завершена. Смесь отфильтровали через целит и сконцентрировали, в результате чего получили 150 мг соединения **R33** (85% чист. согласно ЖХ/МС) в виде масла желтоватого цвета, которое использовали на следующем этапе сразу же без дальнейшей очистки. МС: рассчитано для $C_{40}H_{37}N_3O_6$, 655.3; обнаружено 656.3 (M+H).

[0889] *Соединение **R34**:* В круглодонную колбу с гидроксианилином **R33** (150 мг, 0.194 ммоль, 85% чист.), добавили толуол (2 мл) и рифамицин S (129 мг, 0.185 ммоль). Реакционную смесь обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин для растворения реакционной смеси, колбу загерметизировали через резиновую прокладку, продули аргоном и реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 1 день добавили другую часть гидроксианилина **R33** (45 мг, 0.059 ммоль, 86% чист., синтезированный с использованием той же процедуры, которая была описана ранее) в толуоле (2 мл) и смесь перемешивали в течение 5 дней. Реакционную смесь сконцентрировали in vacuo для удаления толуола, растворили в EtOH (4 мл) и добавили

MnO_2 (20 мг). После перемешивания на протяжении 4 суток реакционную смесь сконцентрировали *in vacuo* и очистили посредством хроматографии на колонке с силикагелем 40 g HP Gold RediSep посредством ISCO (градиентное элюирование: 0 → 100% этилацетат в гексанах). Чистые фракции испарили и высушили *in vacuo*, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **R34** в виде твердого вещества темно-красного цвета (65 мг, 26%). МС (ИЭР, поз.): рассчитано для $C_{77}H_{78}N_4O_{17}$, 1330.5; обнаружено, 1353.5 (M+Na).

[0890] *Соединение **R35**:* К перемешиваемому раствору соединения **R34** (28 мг, 0.021 ммоль) под аргоном в THF (1 мл) добавили раствор TBAF (13 мг, 0.05 мл, 0.050 ммоль, 1М в THF) и реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды. Через 2 ч реакционную смесь очистили напрямую на колонке 50 g C18 RediSep Gold посредством системы ISCO (градиентное элюирование: 0 – 100% MeCN в воде 0.05% уксусная кислота, более 30 мин). Содержащие продукт фракции объединили, заморозили на сухом льду и лиофилизировали на протяжении ночи, в результате чего получили указанное в заголовке соединение **35** в виде твердого вещества темно-красного цвета (9 мг, 48%). МС: рассчитано для $C_{47}H_{58}N_4O_{13}$, 886.4; обнаружено 887.3 (M+H). ^{1}H-ЯМР (500 МГц; CD_3OD): δ 7.86-7.74 (m, 1H), 7.18-7.08 (m, 1H), 6.98-6.84 (m, 1H), 6.78-6.68 (m, 1H), 6.53-6.40 (m, 1H), 6.23-6.15 (m, 1H), 6.23-6.15 (m, 1H), 6.00-5.79 (m, 1H), 6.00-5.79 (m, 1H), 5.30-4.95 (m, 2H), 3.81-3.65 (m, 6H), 3.35 (s, 3H), 3.09-2.93 (m, 7H), 2.25-2.20 (m, 2H), 2.17-2.03 (m, 4H), 2.00-1.87 (m, 5H), 1.76-1.68 (m, 4H), 1.03-0.85 (m, 7H), 0.78-0.65 (m, 2H), 0.14-0.03 (m, 4H), 0.13-0.00 (m, 3H), -0.30 (m, 2H).

ПРИМЕР 43: Анализ минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в бульоне

[0891] Для анализа аналогов рифамицина по настоящему изобретению *in vitro* был разработан анализ ингибирования роста в бульоне. Для анализа *S. aureus* NRS384 выращивали в триптическом соевом бульоне (ТСБ) на протяжении ночи, затем субкультивировали 1:50 в свежем ТСБ и выращивали еще на протяжении двух часов. Затем культуру осадили центрифугированием и промыли дважды в PBS. Затем культуру разбавили до $1x10^4$ кое/мл в ТСБ и 50 мкл суспензии добавили на лунку в 96-луночную чашку для микротитрования в двух параллелях. Серию разведений указанного антибиотика (аналог согласно описанию изобретения или ранее известный аналог рифамицина) добавили в соотношении 1:1 для конечной исходной концентрации в $1x10^{-5}$ М с разведениями 1:3. Планшеты инкубировали при 37°C при встряхивании в течение 24 ч и затем OD600 нм считали на Spectramax i3 Minimax 300.

[0892] Использованные реактивы и номера партий указаны в нижеприведенной **Таблице R2**.

Таблица R2: Реактивы и номера партий для анализа МИК

Реактив	Поставщик	Номер по каталогу	Партия
PBS	Gibco	20012-043	2003838
S. aureus NRS384	BEI resources	NR-46070	
Триптический соевый бульон (ТСБ)	Teknova	T1525	T014420G1801
Планшеты для разведения	Greiner Bio one	780261	B17073CP

[0893] Минимальные концентрации, которые ингибировали рост *S. aureus* (минимальная ингибирующая концентрация, МИК), указаны в **Таблице R3**. График анализа ингибирования *S. aureus*, проведенный с аналогами рифамицина в соответствии с описанием изобретения, показан на **Рисунке 35**.

Таблица R3: Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) антибиотиков в анализе ингибирования роста в бульоне.

Проанализированный аналог рифамицина	Мол. вес (Да)	МИК в бульоне *S. aureus* (М)
Рифампицин	**823**	**4.6E-09**
R1a	815	1.4E-08
R1b	890	1.2E-07
R1d	813	3.7E-07
R14	883	4.1E-08
R16a	823	1.5E-09
R16d	843	4.1E-08
R16e	858	4.6E-09

[0894] Как показано в **Таблице R3**, все аналоги рифамицина согласно описанию изобретения являются эффективными в ингибировании роста *S. aureus* в концентрациях от субмикромолярных до наномолярных. Аналог **16a** ингибировал рост S. aureus эффективнее рифампицина с МИК 1.5 x 10^{-9}М.

ПРИМЕР 44: Внутриклеточный анализ

[0895] Активность соединений аналога рифамицина в отношении *S. aureus* исследовали в ходе анализа внутриклеточного киллинга.

[0896] Использованные реактивы и номера партий указаны в нижеприведенной **Таблице R4**.

Таблица R2: Реактивы и номера партий для внутриклеточного анализа

Реактив	Поставщик	Номер по каталогу	Партия
ТСБ	Teknova	T1525	T152517E1701
PBS	Gibco	20012-043	1951145
Triton X-100	Sigma	TX1568-1	
RPMI	Gibco	11875-093	1989237
FBS	Gibco	172667	138252-100
PMA	Sigma	P8139	MkBV849TV
96-луночный планшет Costa	Corning	3904	16618025
Планшеты TSA	Teknova	T0144	T014420G1801
Пен/Стреп	Gibco	15140-122	1953095
Планшеты для разведения	Greiner Bio one	780261	B17073CP
Гентамицин	Gibco	10131-035	1729122

[0897] Клеточную линию моноцитов THP-1 вырастили в среде (RMPI + 10% FBS + 1% пенициллин/стрептомицин), затем высеяли с плотностью 1e5 клеток на лунку в 96-луночном планшете и дифференцировали в макрофаги в течение трех дней до инфекции с использованием 200 нМ PMA. На протяжении ночи культуру *S. aureus* NRS384 выращивали в среде RPMI, дважды промыли PBS и ресуспендировали при 1e7 кое/мл в PBS. THP-1 промыли теплой средой (RMPI без FBS) для удаления Пенициллина/Стрептомицина и затем инфицировали суспензией *S. aureus* с множественностью заражения 10:1 (*S. aureus*: макрофаги). Планшеты вращали при 300 xg в течение 5 минут для синхронизации адгезии бактерий, затем инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Свободноплавающие бактерии удалили промывкой дважды теплой средой и оставшиеся внеклеточные *S. aureus*

подверглись киллингу посредством добавления среды, содержащей гентамицин (50 мкг/мл). Через 1ч среду аспирировали и указанное соединение добавили к инфицированным макрофагам в среде, содержащей 50 мкг/мл гентамицина для предотвращения внеклеточного роста *S. aureus*. Через 2 ч планшеты промыли дважды теплой средой RPMI без FBS и 100 мкл буфера для лизиса THP-1 (0.1% Triton в PBS) добавили в каждую лунку. Выживаемость *S. aureus* определили в численном отношении при помощи колониеобразующих единиц через последовательное разведение и посев на TSA.

[0898] Результаты анализа внутриклеточного киллинга показаны в **Таблице R5** и на **ФИГ. 36** и **37**. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) соответствует минимальной концентрации каждого соединения, которая обусловила уничтожение внутриклеточной *S. aureus*.

Таблица R5

Проанализированный аналог рифамицина	МИК внутриклеточного киллинга
Рифампицин	>1.0E-06
R1a	1.0E-06
R1b	>1.0E-06
R1d	>1.0E-06
R14	1.0E-06
R16a	4.0E-08
R16d	1.0E-06
R16e	1.0E-06

[0899] Как показывают **Таблица R5** и **ФИГ. 36** и **37**, соединения**R1a, R14, R16a, R16d** и **R16e** повысили способность киллинга внутриклеточной *S. aureus* по сравнению с рифампицином, при этом соединение **R16a** имело самую высокую активность.

Пример 45: Способ конъюгации для малеимидов

[0900] На антитело (1-10 мг/мл) в 50 mM HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7.5, воздействовали 1 мМ дитиотреитола при 37 °C в течение 30 мин. После гель-фильтрации (G-25, pH 4.5 ацетат натрия) соединение-производное линкер-нагрузки малеимидо R25 (1.2 эквиваленты/SH группа) в DMSO (10 мг/мл) добавили к восстановленному антителу и pH смеси

откорректировали до pH 7.0 с 1 M HEPES (pH 7.4). Через 1 ч к реакции добавили N-этил малеимид в избыточном количестве. Конъюгаты очистили с использованием PBS с 5% глицерином посредством эксклюзионной хроматографии по размеру и провели стерилизующую фильтрацию. Концентрации белка и отношения нагрузки к антителу определили посредством УФ спектрального анализа. Эксклюзионная ВЭЖХ по размеру показала, что все используемые конъюгаты были >90% мономерными, и ОФ-ВЭЖХ показала, что было <1% неконъюгированной линкер-нагрузки. Все конъюгированные антитела проанализировали посредством ГИХ на значения загрузки линкер-нагрузки.

[0901] Характеристика конъюгатов посредством гидрофобной интерактивной хроматографии (ГИХ):

[0902] Для определения загрузки линкер-нагрузок на антитело конъюгаты пропустили на Agilent 1260 с использованием TSK-NPR бутил ГИХ колонки и линейного градиента в 1M фосфата калия pH 8.5 к воде на протяжении более 60 мин. Загрузку нагрузки определили посредством интеграции площадей пика, соответствующих видам конъюгированного и неконъюгированного антитела. Отношения нагрузки к антителу указаны в **Таблице R6**.

Таблица R6

Выход в процентах и отношения нагрузки к антителу для каждого из конъюгатов антитело-лекарственное средство

Антитело	**Выход (%)**	**DAR (ГИХ)**
H1H21234N-Соединение **R25**	50	3
Изотипический контроль-соединение **R25**	50	2

ПРИМЕР 46:

[0903] Конъюгат нецитотоксичное антитело к MSR1-лекарственное средство (ncADC) проанализировали при артрите, индуцированном антителом к коллагену II типа (CAIA) *in vivo*; обнаружение цитокинов в воспаленных суставах с использованием набора для мультиплексного иммуноанализа Proinflammatory Panel 1 (mouse) Multiplex Immunoassay kit (MSD)

[0904] **Липополисахарид** (LPS; 0111:B4) (Chondrex, кат. № 53100, Партия № 180141). Исходная концентрация: 2.5 мг/мл; рабочая концентрация: 0.5 мг/мл.

[0905] Для дальнейшего анализа противовоспалительного воздействия конъюгата (ncADC) антитело к MSR1-стероид ncADC проанализировали в модели артрита, индуцированного антителом к коллагену (CAIA) *in vivo*. Для данной модели применили мышей, гомозиготно экспрессирующих внеклеточный домен и трансмембранный домен MSR1 человека вместо внеклеточного и трансмембранного доменов MSR1 мыши (гуманизированный MSR1) и с гомозиготной делецией гена ApoE (ApoE-KO) (таких мышей обозначают как hMSR1/ApoE-KO).

[0906] Анализ ncADC в модели CAIA in vivo:

[0907] Для индуцирования CAIA мышам hMSR1/ApoE-KO сделали внутрибрюшинные инъекции смеси пяти mAb к коллагену II типа 8 мг/кг (Chondrex, кат. № 53100, Партия № 180140) в день 0, с последующим внутрибрюшинным введением 50 μг липополисахарида (LPS; 0111:B4; Chondrex, кат. № 53100, партия № 180141) на день 3. Уровень тяжести микроскопических уровней артрита оценивали в течение срока до 13 дней после инъекции mAb в каждой из четырех конечностей мыши по шкале 1-4. Критерии для оценки были следующими: 0, нормальный уровень; 1, легкая краснота и отек лодыжки/запястья или отдельных пальцев; 2, умеренная краснота и отек лодыжки/запястья; 3, сильная краснота и отек всей конечности, включая пальцы; 4, максимальный отек в конечностях, охватывающий разные суставы. Максимальное значение суммы баллов, полученных для четырех конечностей каждой мыши, составило 16. У мышей появились первые признаки артрита в день 5, и им внутрибрюшинно вводили через день 20 μл/г снижающихся концентраций (21 мг/кг, 63 мг/кг и 191 мг/кг) конъюгатов антитело к MSR1-стероид (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**P4-3**) и конъюгата изотипический контроль-стероид (ncADC) (изотипический контроль-N297Q-**P4-3**), начиная со дня 6. PBS, неконъюгированное антитело к MSR1 (H1H21234N-N297Q) и свободную стероидную нагрузку (**P4-1**) вводили посредством внутрибрюшинной инъекции через день или ежедневно (обозначается **P4-1**ED). Экспериментальное дозирование и протокол лечения для групп мышей показаны в **Таблице 32**. Всех мышей умертвили на день 13 и воспаленные надколенные чашки взяли для последующей гомогенизации и удаления цитокинов.

[0908] Измерение цитокинов в гомогенатах суставов:

[0909] Воспаленные коленные чашки поместили в микроцентрифужные пробирки 2 мл, содержащие два зерна карбида вольфрама (Qiagen, кат. № 69997) и 500 μл буфера T-per (Thermo Scientific, кат. № 78510, партия № QF217759) с содержанием смеси ингибиторов протеаз и 0.5M EDTA (Thermo Scientific, кат. № 78444, партия № RF231047). Ткани

деструктировали на частоте $30s^{-1}$ в течение 10 минут с использованием Qiagen Tissue Lyser II, центрифугировали на скорости 14000 об/мин в течение 7 минут и затем надосадочные жидкости взяли без нарушения осаждения центрифугированием. Концентрации цитокинов в надосадочных жидкостях измерили при помощи набора для мультиплексного иммунологического анализа Proinflammatory Panel 1 (мышь) (MesoScale Diagnostics, кат. №K15048D) в соответствии с инструкциями изготовителя. Если описать процесс вкратце, 50 μл на лунку калибраторов и образцов (разведенных в Разбавителе 41) добавили к планшетам, на которые предварительно нанесли захваченные антитела и инкубировали при комнатной температуре при встряхивании со скоростью 700 об/мин в течение 2 часов. Затем планшеты промыли 3 раза 1xPBS, содержащим 0.05% (мас./об.) Tween-20, с последующим добавлением 25 мкл раствора для обнаружения антител, разведенного в Разбавителе 45. Через 2 часа инкубирования при комнатной температуре при встряхивании планшеты промыли 3 раза и 150 мкл 2x буфера считывания добавили к каждой лунке. Электрохемилюминесценцию сразу же считали на инструменте MSD Spector®. Концентрации цитокинов нормализовали на общее содержание белка в гомогенатах тканей, измеренных с использованием метода Бредфорда (BioRad, кат. № 5000006, партия № 64144266). Анализ данных выполнили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism™. Статистическую значимость в группах определили посредством однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием множественного сравнения Turkey (*p<0.01; **p<0.001; ***p<0.0001).

Таблица 32: Планирование эксперимента, дозировка и протокол лечения для мышей hMSR1/ApoE-KO по модели CAIA

Группа	Мыши (n)	Анализируемая молекула	Доза (мг/кг)	Частота (д=день)
1	5	PBS	-	каждые 2 дня: д6, д8, д10, д12
2	5	**P4-1**ED	2.95	каждый день: д6, д7, д8, д9, д10, д11, д12
3	5	**P4-1**	2.95	каждые 2 дня: д6, д8, д10, д12
4	3	H1H21234N-N297Q	191	каждые 2 дня: д6, д8, д10, д12
5	5	H1H21234N-N297Q-**P4-3**	191	каждые 2 дня: д6, д8, д10, д12
6	5	H1H21234N-N297Q-**P4-3**	63	каждые 2 дня: д6, д8, д10, д12
7	5	H1H21234N-N297Q-**P4-3**	21	каждые 2 дня: д6, д8, д10, д12

Группа	Мыши (n)	Анализируемая молекула	Доза (мг/кг)	Частота (д=день)
8	5	Изотипический контроль-N297Q-**P4-3**	191	каждые 2 дня: д6, д8, д10, д12
9	5	Изотипический контроль-N297Q-**P4-3**	63	каждые 2 дня: д6, д8, д10, д12
10	5	Изотипический контроль-N297Q-**P4-3**	21	каждые 2 дня: д6, д8, д10, д12

[0910] Как показано в **Таблице 33**, смесь mAb к коллагену II типа индуцировала устойчивую модель CAIA у мышей hMSR1/ApoE-KO, которым давали PBS. Терапевтическое введение конъюгата антитело к MSR1-стероид (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**P4-3**) *in vivo* было эффективным в отношении ингибирования прогрессирования и уменьшении степени тяжести CAIA дозозависимым способом, при этом все дозы демонстрировали значительную эффективность. Сопоставимое ингибирование CAIA наблюдали между конъюгатом антитело к MSR1-стероид (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**P4-3**) с дозой в 21 мг/кг и свободной **P4-1** с ежедневной дозировкой (**P4-1**ED). Конъюгат антитело к MSR1-стероид (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**P4-3**) с дозой в 191 мг/кг и 63 мг/кг показал более высокую эффективность по сравнению с ежедневной дозировкой нагрузки. Терапевтическое введение изотипический контроль-ncADC с дозой 63 мг/кг и 21мг/кг (изотипический контроль-**P4-3**), неконъюгированного антитела к MSR1 (H1H21234N) и свободной **P4-1** через день не ослабило CAIA у мышей hMSR1/ApoE-KO. Самая высокая доза ncADC изотипического контроля оказалась эффективной в снижении степени тяжести CAIA.

[0911] Как показано в **Таблице 34**, in *vivo* терапевтическое введение конъюгата антитело к MSR1-стероид (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**P4-3**) также было эффективным в ингибировании *in vivo* производства провоспалительных цитокинов у мышей hMSR1/ApoE-KO дозозависимым образом, при этом все проанализированные дозы продемонстрировали значительное влияние на IL-6, IL-1бета и KC-GRO; тем не менее, только самая высокая доза оказала значительное воздействие на TNF-альфа. Отсутствие влияния на уровни провоспалительных цитокинов в воспаленных суставах наблюдали для неконъюгированного антитела к MSR1 (H1H21234N-N297Q) и свободной **P4-1** с введением через день. ncADC изотипического контроля показал влияние на уровни провоспалительных цитокинов для более высоких проанализированных доз.

Таблица 33: Конъюгат антитело к MSR1-стероид (ncADC) снижает клинические показатели CAIA у мышей hMSR1/ApoE-KO *in vivo* дозозависимым образом. Статистическую значимость для групп, получавших PBS- и изотипический контроль-**P4-3**, определили посредством однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием множественного сравнения Turkey и рассчитанной стандартной ошибки среднего (COC±).

Таблица 33

Анализируемая молекула	**PBS**	**P4-1ED**	**P4-1**	**H1H21234N-N297Q**	**H1H21234N-N297Q-P4-3**			**Изотипический контроль-N297Q-P4-3**		
Доза (мг/кг)	Н/Д	*2.95*	*2.95*	*191*	*191*	*63*	*21*	*191*	*63*	*21*
Клинический показатель	11.3±2.36	5±1.54	9.4±2.46	13.67±2.02	0.5±0.35**	2.3±0.84**	5.1±2.1*	3.2±0.84	7.5±0.94	9.6±3.96

*p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.00001

Таблица 34: Терапевтическое лечение конъюгатом антитело к MSR1-стероид (ncADC) ингибирует CAIA-индуцированное производство провоспалительных цитокинов у мышей hMSR1/ApoE-KO. Статистическую значимость для групп, получавших PBS- и изотипический контроль-N297Q-**P4-3**, определили посредством однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием множественного сравнения Turkey и рассчитанной стандартной ошибки среднего (COC±).

Таблица 34

		PBS	**P4-1ED**	**P4-1**	**H1H21234N**	**H1H21234N-N297Q-P4-3**			**Изотипический контроль-N297Q-P4-3**		
	Доза (мг/кг)		*2.95*	*2.95*	*191*	*191*	*63*	*21*	*191*	*63*	*21*
Цитокины [пг на мг общего белка]	**IL-6**	155.4±41	22.8±5.2****	131.4±40.9	116.3±23.8	18.8±3.7****	23.5±4.2****	51.9±27.8****	40.3±15.5****	75.2±24.3***	99.1±25.5
	IL-1β	23.1±6.1	1.1±0.6****	20.6±4.3	23.7±7.9	0.5±0.2****	1.6±1.3****	12.8±2.2**	6.3±2.1****	13.7±7.3*	17.3±2.9
	KC-GRO	16.6±6.8	8±4.4****	8.9±9	7.8±16	5.9±1.5****	10.8±6.9****	9.9±13*	11.7±2.7****	18.2±8.6	15±10
	TNF-α	7.9±2.8	3.5±1.4	8.3±1.9	10.2±5	1.9±0.8*	3.8±1.9	7.9±3.5	4.3±2	9.3±4.3	9.5±1.6

*p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.00001

ПРИМЕР 47:

[0912] Анализ киллинга внутриклеточной *S. aureus*

[0913] Были проанализированы следующие конъюгаты антител к MSR1 (ncADC).

H1H21234N-N297Q-**R25**
Антитело изотипического контроля-N297Q-**R25**

[0914] Для анализа эффективности конъюгата антитело к MSR1-антибиотик (ncADC) по изобретению *in vitro* применили анализ внутриклеточного киллинга *S. aureus*. Для анализа клеточную линию моноцитов THP-1 вырастили в среде, состоящей из RPMI с содержанием 10% FBS и 1% Пенициллин/Стрептомицин, затем высеяли с плотностью $1x10^5$ клеток на лунку в 96-луночный планшет и дифференцировали в макрофаги на три дня до инфекции с использованием 200 нМ Форбол Миристат Ацетата (PMA). На протяжении ночи культуру *S. aureus* NRS384 выращивали в среде RPMI, дважды промыли PBS и ресуспендировали при $1x10^7$ кое/мл в PBS. Клетки THP-1 промыли теплой средой (RPMI без FBS) для удаления Пенициллина/Стрептомицина и затем инфицировали суспензией *S. aureus* с множественностью заражения 10:1 (*S. aureus*: макрофаги). Планшеты вращали при 300 xg в течение 5 минут для синхронизации адгезии бактерий, затем инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Свободноплавающие бактерии удалили промывкой дважды теплой средой и оставшиеся внеклеточные *S. aureus* подверглись киллингу посредством добавления среды, содержащей 100 мкг/мл гентамицина. Через 1 час среду аспирировали и конъюгат антитело к MSR1-антибиотик (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**R25**) с разными дозами (10 мкг/мл, 3.3 мкг/мл, 1.1 мкг/мл, 0.4 мкг/мл, 0.1 мкг/мл) и конъюгат изотипический контроль- антибиотик (ncADC) (изотипический контроль-N297Q-**R25**) при 10 мкг/мл добавили к инфицированным макрофагам в среде, содержащей 50 мкг/мл гентамицина для предотвращения внеклеточного роста *S. aureus*. Также для сравнения включили образец без ncADC. Через 24 часа планшеты промыли дважды теплой средой RPMI без FBS и затем добавили 100 мкл 0.1% Triton X-100 в PBS и инкубировали в течение 10 минут для лизиса THP-1. Выживаемость *S. aureus* определили в численном отношении в колониеобразующих единицах через последовательное разведение и посев на планшеты с триптиказо-соевым агаром.

[0915] Как показано в **Таблице R7**, конъюгат антитело к MSR1-антибиотик (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**R25**) с концентрациями в 10, 3.3 и 1.1 мкг/мл продемонстрировал способность удаления внутриклеточных *S. aureus* из инфицированных макрофагов *in vitro*. Меньшие дозы конъюгата антитело к MSR1-антибиотик (ncADC) с 0.4 мкг/мл и 0.1 мкг/мл продемонстрировали способность удалять внутриклеточные *S. aureus* из инфицированных макрофагов *in vitro*, но не до предела обнаружения, как более высокие

дозы. Макрофаги, на которые воздействовали конъюгатом изотипический контроль-антибиотик (ncADC) (изотипический контроль-N297Q-**R25**) с 10 мкг/мл содержали внутриклеточные *S. aureus* на уровнем, схожем с уровнем контроля. Эти данные показывают, что конъюгат антитело к MSR1-антибиотик (ncADC) может применяться для эффективного уничтожения патогенов, находящихся в резервуаре макрофагов.

Таблица R7: Среднее число колниеобразующих единиц конъюгата антитело к MSR1-антибиотик

	(ncADC) (мкг/мл)	**Среднее значение, кое/мл**	**Стандартное отклонение**
Контроль S. aureus	нет	275,000	0
Изотипический контроль-N297Q-**R25**	10	200,000	35,355
MSR1 ncADC H1H21234N-N297Q-**R25**	10	50 (предел обнаружения)	0
	3.3	50 (предел обнаружения)	0
	1.1	50 (предел обнаружения)	0
	0.4	663	124
	0.1	33,750	1,768

ПРИМЕР 48:

[0916] Модель диссеминированной инфекции *S. aureus* IV у мышей

[0917] В данном эксперименте использовали следующие конъюгаты (ADC):

Антитело
MSR1 ncADC H1H21234N-N297Q-**R25**
Изотипический контроль-N297Q-**R25**
MSR1 ncADC H1H21234N 3-N297Q
Изотипический контроль-N297Q

[0918] Для анализа эффективности конъюгата антитело к MSR1-антибиотик (ncADC) по изобретению *in vivo* применили модель внутривенной диссеминированной инфекции. Штамм MSRA *S. aureus* MSRA NRS384 выращивали на протяжении ночи в триптическом соевом бульоне (ТСБ) и субкультивировали в средней логарифмической фазе роста. Затем бактерии дважды промыли PBS и ресуспендировали в PBS с концентрацией 1.2x10^8 сое/мл. Затем мышей, гомозиготно экспрессирующих внеклеточный домен и

трансмембранный домен MSR1 человека вместо внеклеточного и трансмембранного доменов MSR1 мыши (гуманизированный MSR, MAID 7343-MSR1 HumIn delHyg) инфицировали внутривенно через хвостовую вену с использованием 100 мкл бактериальной суспензии для получения конечной инфекционной дозы в 1.2x10^7 кое/мышь. В течение периода от одного до трех дней после инфицирования мышам вводили 110 мг/кг ванкомицина подкожно дважды в день по указаниям. Подкожно вводили моноклональное антитело к MSR1 (H1H21234N-N297Q), конъюгат антитело к MSR1-антибиотик (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**R25**), антитело изотипического контроля или изотипический контроль ncADC (изотипический контроль-**R25**) с указанной дозой, что описано в **Таблице R8**, через один день после инфицирования. У мышей контролировали потерю массы тела и упитанность в баллах на протяжении инфекции. Через четыре дня после инфекции мышей умертвили и *S. aureus* в почках определили количественно посредством гомогенизации тканей с последующим подсчетом колониеобразующих единиц через последовательное разведение в PBS и нанесения на планшеты с триптиказо-соевым агаром. Данные из этого эксперимента показаны в **Таблице R8**.

Таблица R8

Средний показатель *S. aureus* в почках у мышей, которым давали конъюгат антитело к MSR1-антибиотик в комбинации с ванкомицином

Лечение	**Лечение ванко-мици-ном**	**Доза антитела (mAb) или конъюга-та (мг/кг)**	**Среднее значение в кое/ пара почек**	**Число мышей с *S. aureus* ниже порога обнаружения**	**Стандартное отклонение**
Инфицированный контроль	-	(-)	4.33E+08	0/5	2.32E+08
Ванкомицин	+	(-)	2.07E+06	0/6	2.76E+06
Изотипический контроль 1мг/кг	+	1	2.44E+06	0/4	1.51E+06
Изотипический контроль ncADC (изотипический контроль-N297Q-**R25**)	+	1	4.01E+05	1/5	6.49E+05
Антитело к MSR1 (H1H21234N-N297Q)	+	1	1.55E+05	4/8	2.72E+05

Лечение	Лечение ванко-мици-ном	Доза антитела (mAb) или конъюга-та (мг/кг)	Среднее значение в кое/ пара почек	Число мышей с *S. aureus* ниже порога обнаружения	Стандартное отклонение
Антитело к MSR1 (H1H21234N-N297Q)	+	0.1	2.43E+05	0/6	2.64E+05
Конъюгат антитело к MSR1-антибиотик (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**R25**)	+	1	6.17E+03	7/9	1.69E+04
Конъюгат антитело к MSR1-антибиотик (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**R25**)	+	0.1	1.16E+03	6/8	1.78E+03

Предел обнаружения = 250 колониеобразующих единиц (кое)

[0919] Как показано в **Таблице R8**, внутривенное инфицирование штаммом MRSA *S. aureus* NRS384 дает высокую бактериальную нагрузку в почках, и лечение мышей стандартным антибиотиком ванкомицином снижает показатель *S. aureus* в почках приблизительно на 2 порядка, однако ни у одной из мышей уровни *S. aureus* не снизились ниже предела обнаружения (ПО). Конъюгат антитело к MSR1-антибиотик (ncADC) (H1H21234N-N297Q-**R25**) с дозами 1 и 0.1 мг/кг в комбинации с ванкомицином привел к снижению у 77% и 75% мышей уровней *S. aureus* ниже ПО, что показало улучшение в клиренсе *S. aureus* у мышей, для которых проводили комбинированную терапию конъюгатом антитело-антибиотик (ncADC). Клиренс *S. aureus* был менее выраженным у мышей, которым дали конъюгат изотипического контроля (ncADC) (изотипический контроль-N297Q-**R25**) плюс ванкомицин, что показало преимущество целенаправленного воздействия нагрузки на макрофагов.

[0920] Настоящее изобретение не ограничивается в своем объеме описанными здесь конкретными вариантами осуществления. В действительности, специалистам в данной области очевидны разные модификации изобретения в дополнение к тем, которые описаны здесь, на основании приведенного описания и сопутствующих иллюстраций. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются со скавенджер-рецептором макрофагов 1 (MSR1), где антитело или его антиген-связывающий фрагмент демонстрируют одно или более свойств, выбираемых из группы, которая включает следующие свойства:

   (i) связывается с MSR1 человека при 37ºC с K_D менее, чем около 1.4 нМ, согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса;

   (ii) связывается с MSR1 при 37ºC с t½ более, чем около 4 минут, согласно измерениям методом поверхностного плазмонного резонанса;

   (iii) демонстрирует максимальное ингибирование захвата модифицированного ЛПНП MSR1 человека менее, чем около 90%, с IC_{50} менее, чем около 10 нМ, согласно измерениям при анализе захвата лигандов;

   (iv) блокирует < 50% связывания модифицированного ЛПНП с MSR1 человека согласно измерениям по методу конкурентного анализа ELISA; и

   (v) демонстрирует связывание MSR1 человека и интернализацию связанного комплекса более, чем около 10%, по результатам анализа связывания в клетках THP-1.

2. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются с экспрессируемым клеточной поверхностью скавенджер-рецептором макрофагов 1 (MSR1) и блокируют ингибирование захвата модифицированного ЛПНП рецептором MSR1 менее, чем на 80%, с IC_{50} менее 3.5 нМ.

3. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по пункту 2, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент блокируют ингибирование захвата модифицированного ЛПНП рецептором MSR1 менее, чем на 60%, с an IC_{50} менее 1.5 нМ.

4. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются со скавенджер-рецептором макрофагов 1 (MSR1), при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат: (a) определяющие комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность, указанную в Таблице 4; и (b) CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), имеющей аминокислотную последовательность, указанную в Таблице 4.

5. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по пункту 4, где

антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в Таблице 4, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в Таблице 4.

6. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по пункту 4, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат:

(i) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 36, 52, 92 и 284;

(ii) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 38, 54, 94 и 286;

(iii) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 40, 56, 96 и 288;

(iv) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 44, 60, 100 и 292;

(v) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 46, 62, 102 и 294; и

(vi) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, которая выбирается из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 48, 64, 104 и 296.

7. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент по пункту 4, при этом антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат:

(i) определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 52; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 54; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 56; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID NO: 60; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 62; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 64;

(ii) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 6; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 8; LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 12; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 14; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 16;

(iii) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 36; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 38; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 40; LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 44; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 46; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 48;

(iv) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 92; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 94; HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 96; LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 100; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 102; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 104;

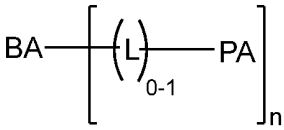
(v) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 284; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 286;

HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 288; LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 292; LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 294; и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 296.

8. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конкурируют за связывание с MSR1 человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, которая выбирается из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 23/42, 50/58; 90/98 и 282/290.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пунктов 1 - 8, конъюгированные с остатком нагрузки необязательно через линкер или через линкер-спейсер.

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 9, имеющий структуру Формулы (**I**):



Формула (**I**)

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомерная форма, региоизомер или смеси региоизомеров;

где:

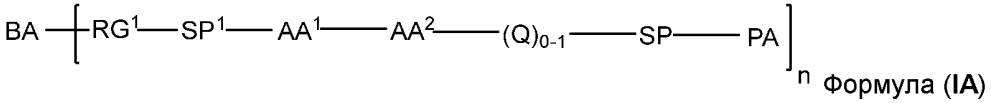
BA представляет собой связующий агент;

L представляет собой линкер;

PA представляет собой нагрузку, которая выбирается из группы, состоящей из стероидного остатка, остатка модулятора LXR или остатка аналога рифамицина; и

нижний индекс **n** представляет собой целое число от 1 до 30.

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 9 или пункту 10, имеющий структуру Формулы (**IA**):



Формула (**IA**)

где

SP^1 отсутствует или является спейсером;

RG^1 представляет собой остаток реактивной группы;

AA^1 отсутствует или является двухвалентным или трехвалентным линкером, содержащим аминокислотный остаток, который может быть связан напрямую

или косвенно с группой **HG**;

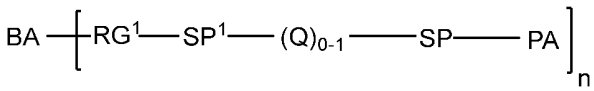
AA^{2} отсутствует или является дипептидным, трипептидным или тетрапептидным остатком;

Q, если имеется, представляет собой остаток коннекторной группы;

SP отсутствует или является спейсером; и

HG, если имеется, представляет собой гидрофильную группу.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 9-11 со структурой Формулы (**IB-1**):



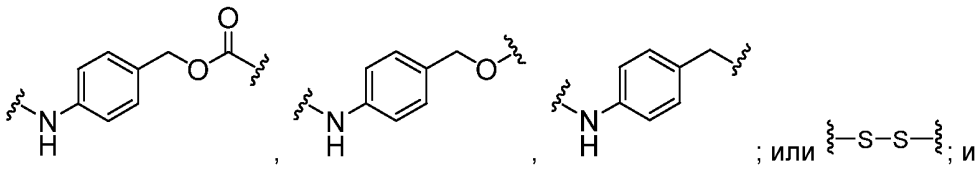
Формула (**IB-1**)

где

SP^{1} отсутствует или является спейсером;

RG^{1} представляет собой остаток реактивной группы;

Q, если имеется, представляет собой

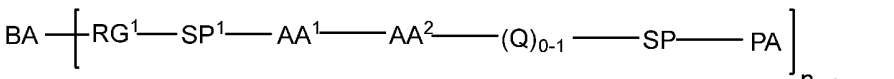


; или ; и

SP отсутствует или является спейсером;

где  обозначает атомы, через которые указанная группа связана с соседними группами в формуле.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 9-11, имеющий структуру Формулы (**IB-2**):



Формула (**IB-2**)

где

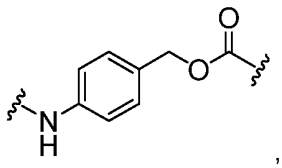
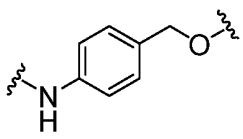
SP^{1} отсутствует или является спейсером;

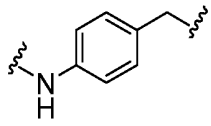
RG^{1} представляет собой остаток реактивной группы;

AA^{1} отсутствует или является двухвалентным или трехвалентным линкером, содержащим аминокислотный остаток, который может быть связан напрямую

или косвенно с группой **HG**;

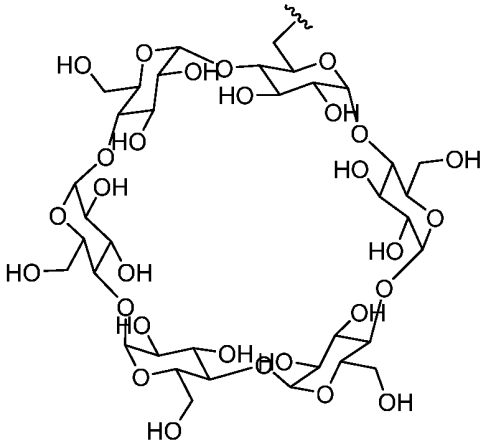
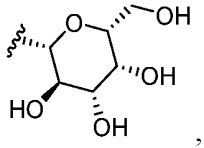
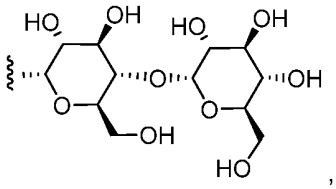
AA² отсутствует или является дипептидным, трипептидным или тетрапептидным остатком;

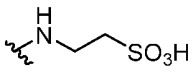
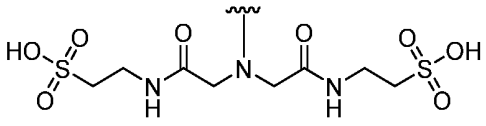
Q, если имеется, представляет собой  , 

или  ;

SP отсутствует или является спейсером; и

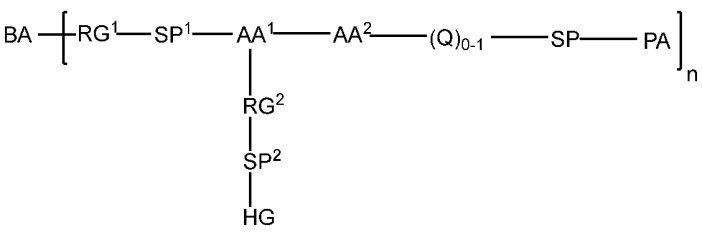
HG, если имеется, является

 ,  ,  ,

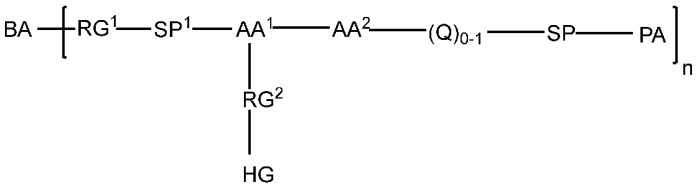
 , или  ,

где  обозначает атомы, через которые указанная группа связана с соседними группами в формуле.

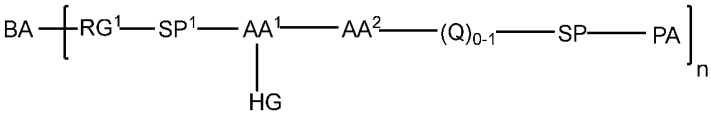
14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 9-11 и 13, имеющий структуру Формулы (**IC**), Формулы (**ID**) или Формулы (**IE**):



Формула (**IC**)



Формула (**ID**)



Формула (**IE**)

где

SP[1] отсутствует или является спейсером;

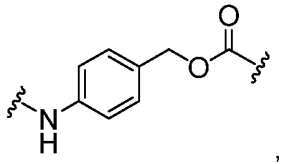
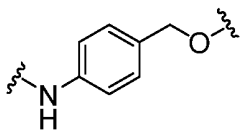
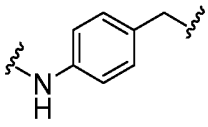
RG[1] представляет собой остаток реактивной группы;

SP[2] отсутствует или является спейсером;

RG[2] представляет собой остаток реактивной группы;

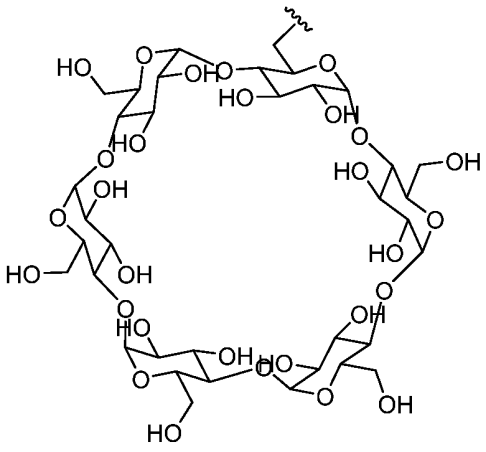
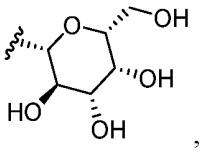
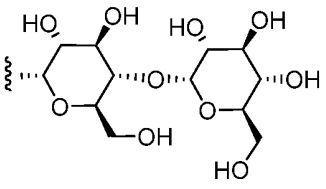
AA[1] представляет собой двухвалентный или трехвалентный линкер, содержащий аминокислотный остаток;

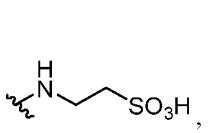
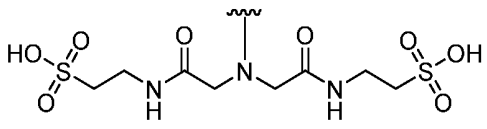
AA[2] является дипептидным, трипептидным или тетрапептидным остатком;

Q, если имеется, представляет собой  ,  , или  ;

SP отсутствует или представляет собой спейсер; и

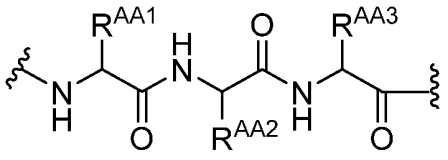
HG представляет собой

 ,  ,  ,


, или 
,

где  означает атомы, через которые указанная группа связана с соседними группами в формуле.

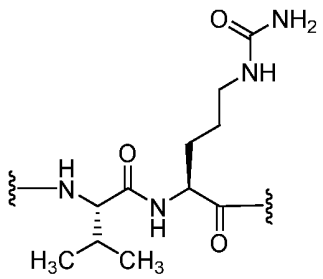
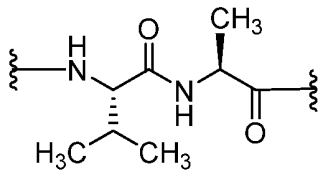
15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 11 и 13-14, где **AA**^{1}-**AA**^{2} соответствует Формуле (**LL1**):


(**LL1**)

где $\mathbf{R}^{AA1}$, $\mathbf{R}^{AA2}$ и $\mathbf{R}^{AA3}$ каждый независимо являются аминокислотными боковыми цепями, минимум одна из которых связана с –(**RG**^{2})-**SP**^{2}-**HG**, –(**RG**^{2})-**HG** или **HG**;

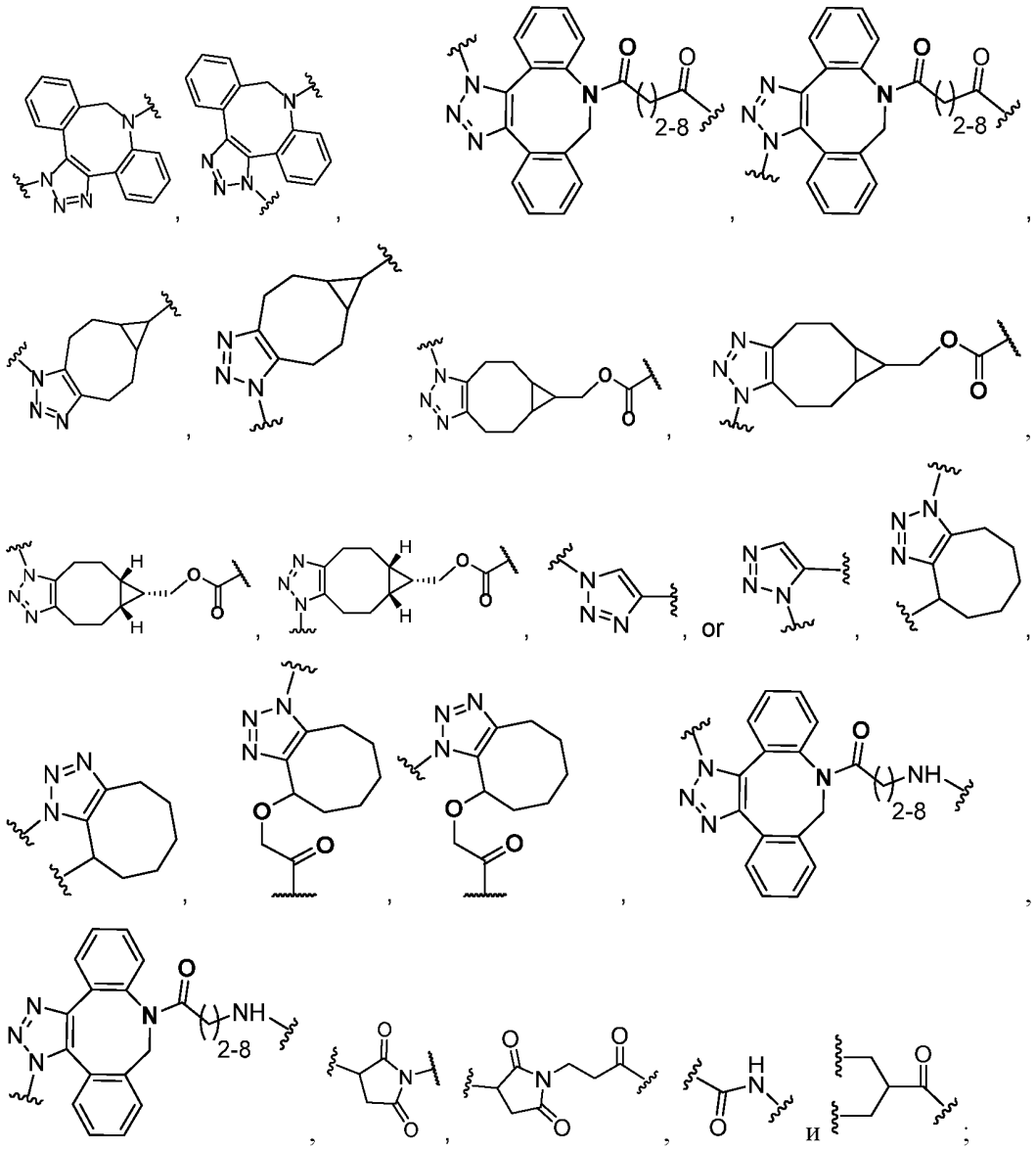
где  означает атомы, через которые **AA**^{1}-**AA**^{2} связана с соседними группами в формуле.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 15, где $\mathbf{R}^{AA1}$ представляет собой боковую цепь лизина, глутамина, глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты, связанную напрямую или косвенно с **HG**, и $\mathbf{R}^{AA2}$ и $\mathbf{R}^{AA3}$ представляют собой боковые цепи либо валина и аланина, либо валина и цитруллина, соответственно.

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 11 и 13-16, где **AA**^{1}-**AA**^{2} представляет собой  или  , где  означает атомы, через которые **AA**^{1}-**AA**^{2} связывается с примыкающими группами в формуле.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 11-17, где остатки **RG**^{1} и **RG**^{2} независимо в каждом случае выбираются из группы, состоящей

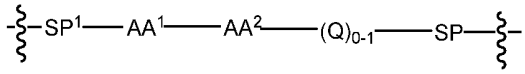
из:

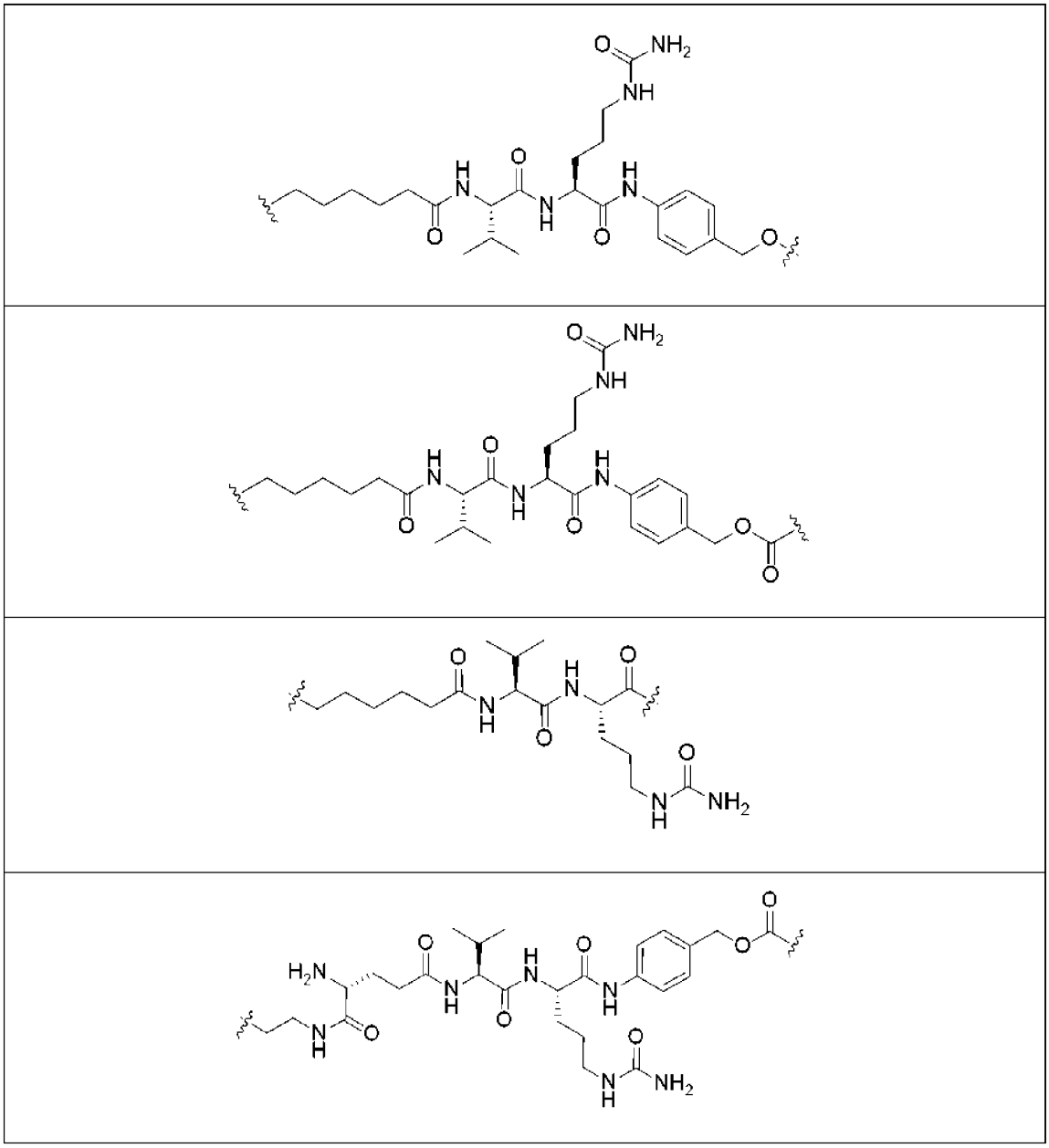


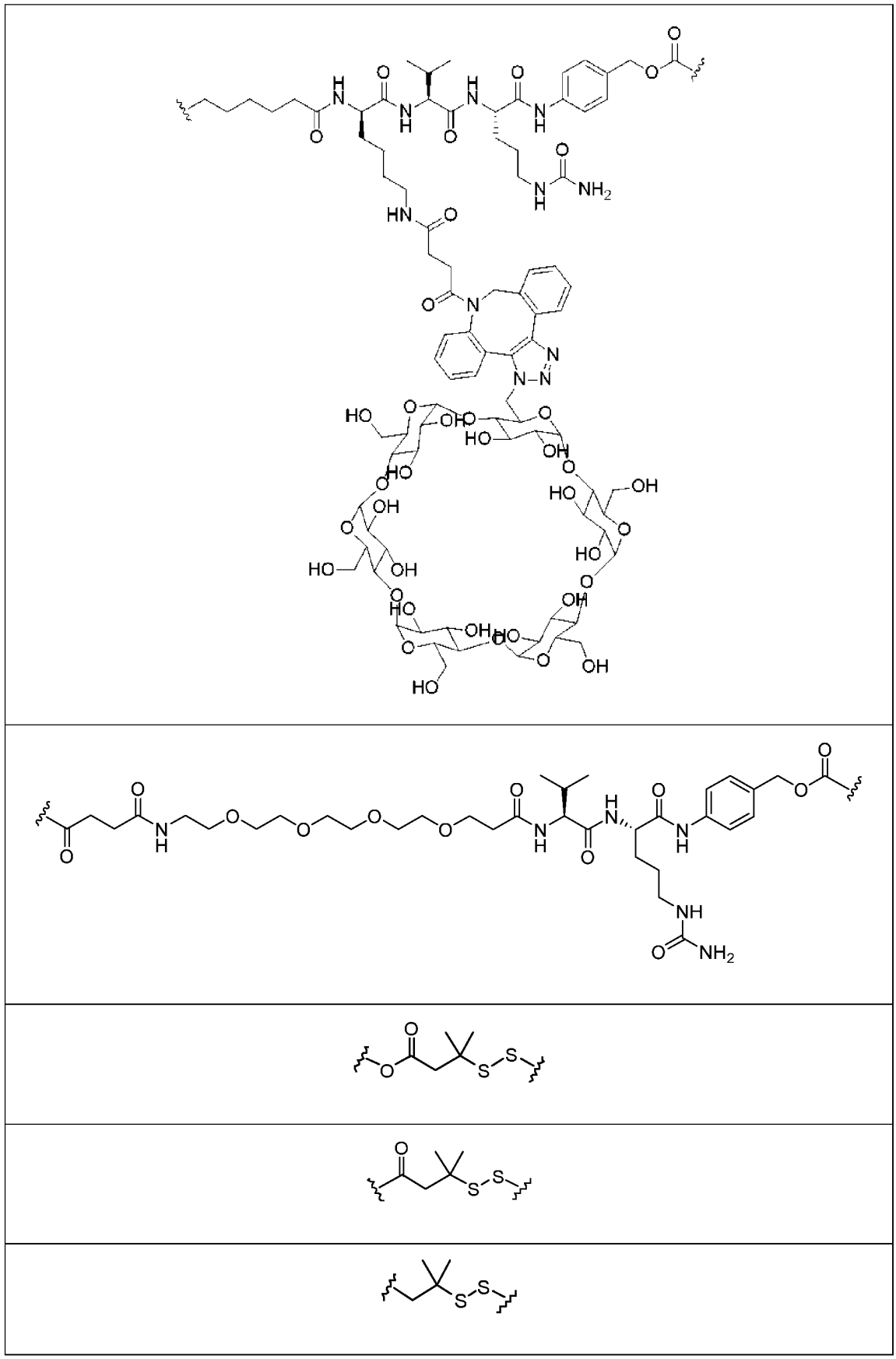
где  указывает на атомы, через которые остаток **RG**[1] или **RG**[2] связан с соседними группами в формуле.

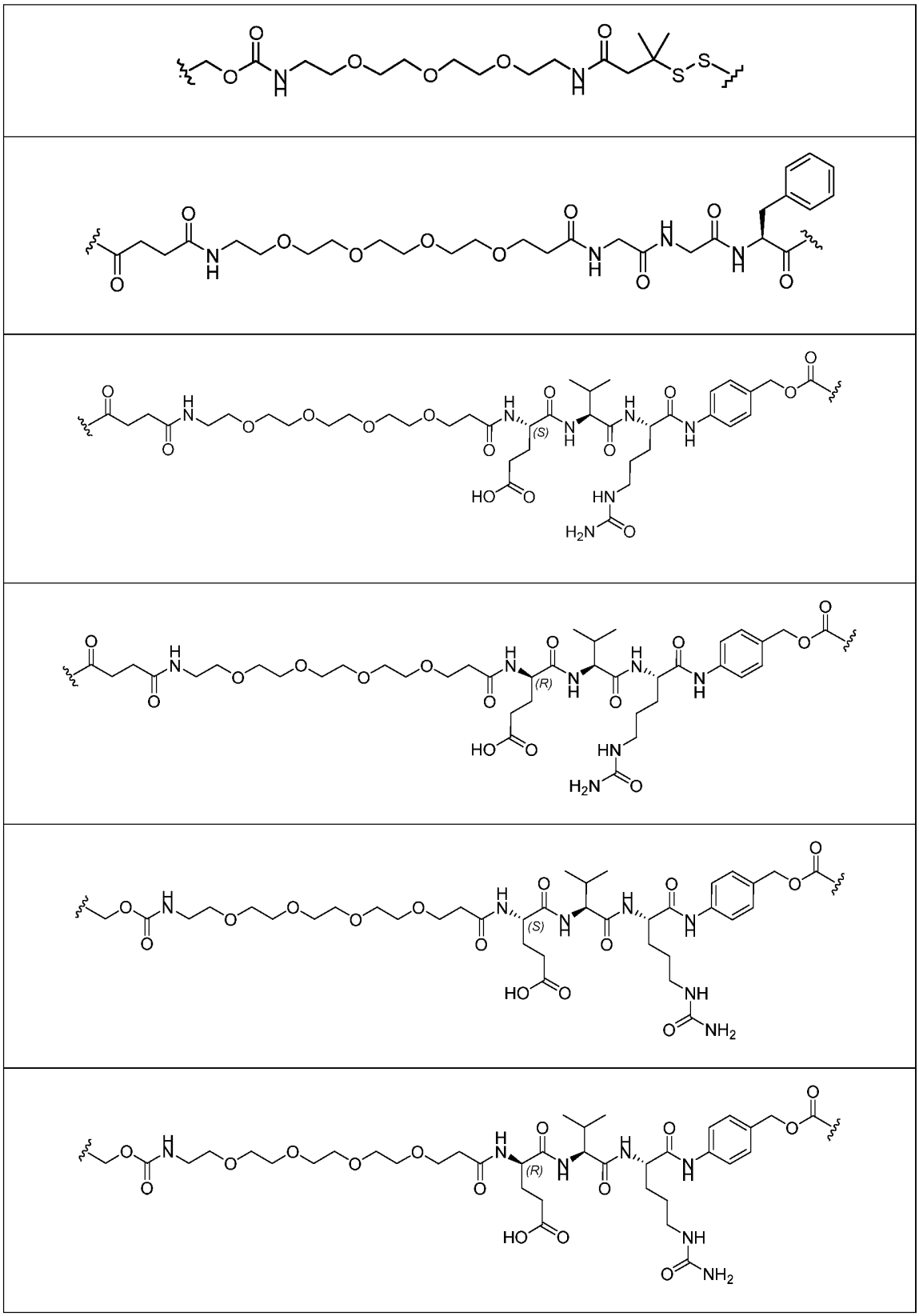
19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 11-18, где **SP**, **SP**[1] и **SP**[2] независимо в каждом случае отсутствуют или выбираются из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, -NH-, -S-, -O-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, -NH-CH_2-CH_2-(-O-CH_2-$CH_2)_e$-C(O)-, -C(O)-$(CH_2)_u$-C(O)-, -C(O)-NH-$(CH_2)_v$-, (глицин)$_4$-серина и их комбинаций, при этом нижний индекс **e** представляет собой целое число от 0 до 4, нижний индекс **u** представляет собой целое число от 1 до 8 и нижний индекс **v** представляет собой целое число от 1 до 8.

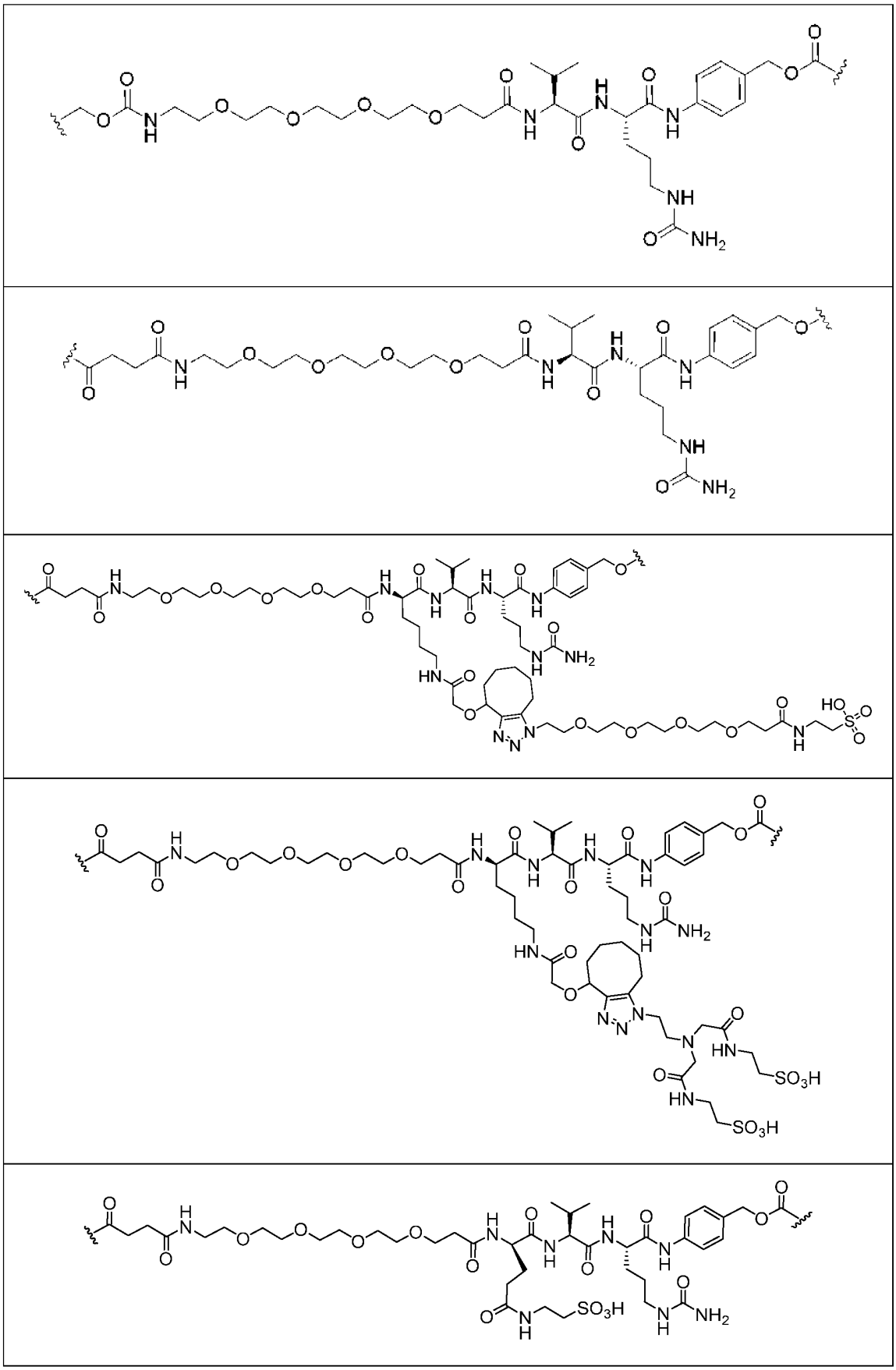
20. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 9-19, при этом n равен 1, 2, 3 или 4.

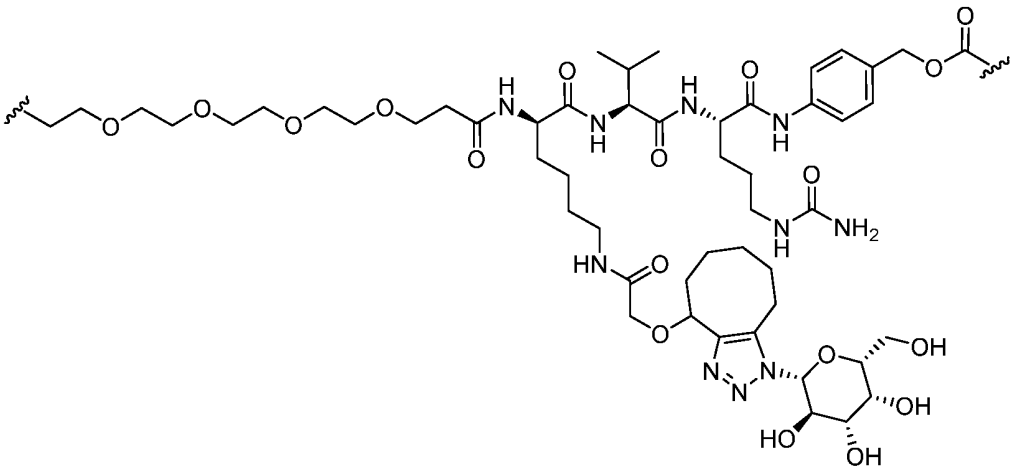
21. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 11-20, при этом  представляет собой

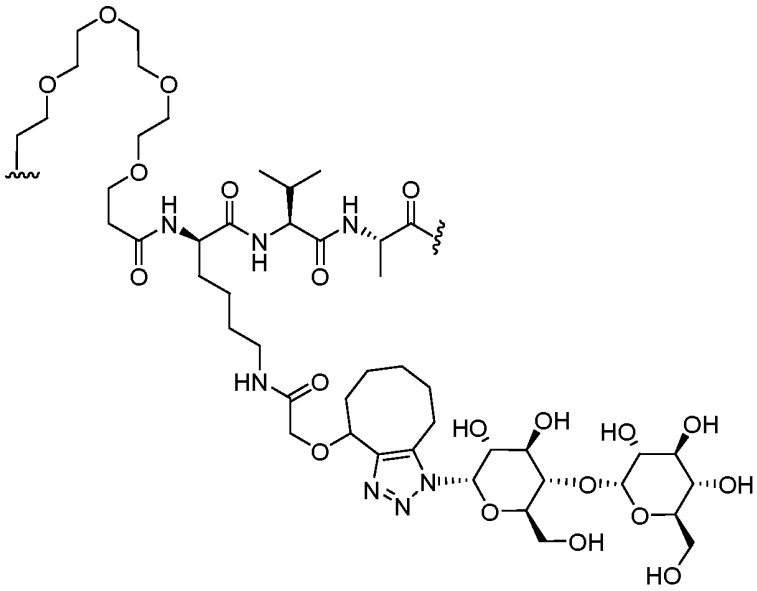


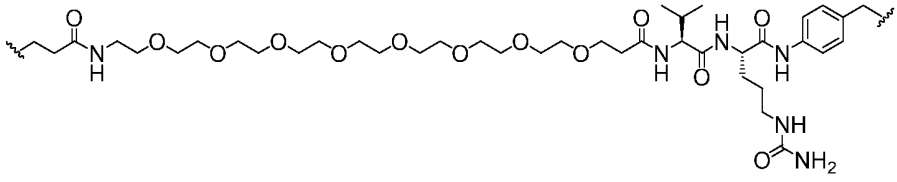




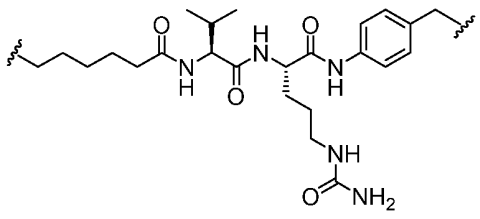








или



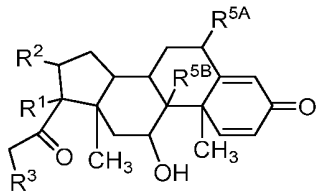
.

22. Молекула конъюгата антитело-лекарственное средство по пункту 9, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгированы со стероидной нагрузкой через линкер или линкер-спейсер.

23. Молекула конъюгата антитело-лекарственное средство по пункту 9, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгированы с нагрузкой LXR модулятора через линкер.

24. Молекула конъюгата антитело-лекарственное средство по пункту 9, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгированы с нагрузкой аналога рифамицина через линкер.

25. Молекула конъюгата антитело-лекарственное средство по пункту 22, где стероид конъюгирован с антителом или его антиген-связывающим фрагментом через линкер или линкер-спейсер, представляет собой соединение Формулы (**A-1**)

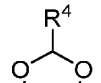


Формула (**A-1**)

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где

R^1 и R^2 представляет собой независимо –H, алкил, алкил-C(O)-O–, –OH или гало;

или R^1 и R^2 вместе образуют 

,

где R^4 представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил,

где алкил, арил, арилалкил и N-содержащий гетероциклоалкил независимо в каждом случае могут быть замещены -$NR^{Aa}R^{Ab}$;

R^3 представляет собой –O, R^Z-C(O)-**X**–, –гетероалкил, –пиперидинил, –$NR^{Aa}R^{Ab}$, –оксиарил–$NR^{Aa}R^{Ab}$ или –**Z-A′**$(R^P)_t$;

R^Z представляет собой алкил;

X представляет собой O или NR^{Aa};

Z представляет собой S, S(O), $S(O)_2$, SO_2NR^{Aa}, O, C(O)NR^{Aa}, C(O) или NR^{Aa};

A′ представляет собой арил, арилалкил или гетероарил;

R^P представляет собой независимо в каждом случае гало, необязательно замещенный алкил, –OH или $-NR^{Aa}R^{Ab}$;

R^{Aa} и R^{Ab} представляет собой независимо в каждом случае –H, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный арил;

нижний индекс **a** представляет собой целое число от 0 до 19; и

t представляет собой целое число от 1 до 3;

и

R^{5A} и R^{5B} представляет собой в каждом случае независимо гало или атом водорода;

где группа R^3 или R^4 связана с линкером.

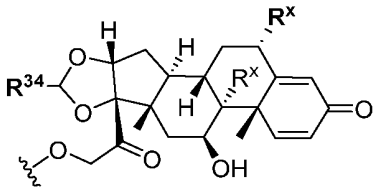
26. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 22, имеющий структуру Формулы (**3000**):

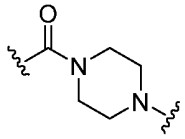
$$\mathbf{BA}\text{-}(\mathbf{L'}\text{-}\mathbf{SP}\text{-}\mathbf{D})_n \qquad \text{Формула (3000)}$$

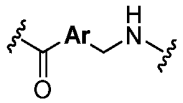
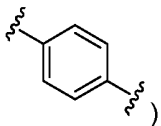
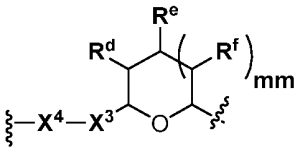
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

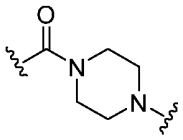
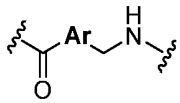
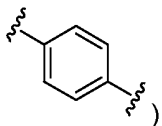
где

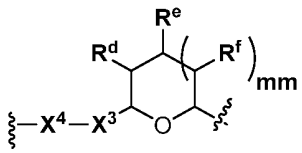
D выбирается из

а)  Формула (а),

где оба R^x в Формуле (а) представляют собой водород; R^{34} представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил; и **SP** представляет собой -C(O)-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-X^1-, где X^1 присоединен к **L′** в Формуле (3000), -C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}-алкилен)-S- , где S присоединен к **L′** в Формуле (3000), -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-(C_1-C_{10}-алкилен)-S- , где S присоединен к **L′** в Формуле (3000),  , где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) - к **L′** в Формуле (3000), -CH_2-NH- , где N присоединен к

L′ в Формуле (3000),  , где N присоединен к **L′** в Формуле (3000) и где **Ar** представляет собой необязательно замещенный арилен (в некоторых вариантах осуществления ) или необязательно замещенный гетероарилен, -(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}-, где N**R**^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (3000), -C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}- , где N**R**^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (3000) и где каждый C_1-C_{10}-алкилен независимо необязательно замещен одной или более гидрокси, -C(O)-N(**R**^{35})-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)NH-**X**^{2}- , где **X**^{2} присоединен к **L′** в Формуле (3000), или  где **X**^{4} присоединен к **L′** в Формуле (3000); или

где оба **R**^{x} в Формуле (a) представляют собой фтор; **R**^{34} представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил; и **SP** представляет собой -C(O)-C_1-C_{10}-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C_{1-6}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-**X**^{1b}-, где **X**^{1b} присоединен к **L′** в Формуле (3000), -C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}-алкилен)-**X**^{1b}-, где **X**^{1b} присоединен к **L′** в Формуле (3000),  где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) - к **L′** в Формуле (3000), -CH_2-NH-, где N присоединен к **L′** в Формуле (3000),  где N присоединен к **L′** в Формуле (3000) и где **Ar** представляет собой необязательно замещенный арилен (в некоторых вариантах осуществления ) или необязательно замещенный гетероарилен, -(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}- , где N**R**^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (3000), -C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50}C(O)-(C_1-C_{10}-алкилен)-N**R**^{50a}- , где N**R**^{50a} присоединен к **L′** в Формуле (3000) и где каждый C_1-C_{10}-алкилен независимо необязательно замещен одной или более гидрокси, -C(O)-N(**R**^{35})-(C_1-C_{10}-алкилен)-

C(O)NH-**X**^{2}- , где **X**^{2} присоединен к **L′** в Формуле (3000), или  где **X**^{4} присоединен к **L′** в Формуле (3000); и/или

b) соединения в Таблице A, где соединения в Таблице A связаны с **BA** Соединения Формулы (**III**) через гидрокси -C(O)CH_2OH группы или через гидрокси Мапракората;

X^{1} представляет собой -N(C_{1-6}алкил)-;

X^{1b} представляет собой -S-, -NH- или -N(C_{1-6}алкил)-;

X^{2} представляет собой -NH-;

X^{3} представляет собой -CH_2-, **X**^{3} представляет собой -CH_2-O-(C_1-C_{10}-алкилен)-C(O)- , где C(O) присоединен к **X**^{4}, или **X**^{3} представляет собой -C(O)-;

X^{4} представляет собой -O-;

R^{35} представляет собой H, -OH, -OCH_3 или C_{1-6}алкил;

R^{50} и **R**^{50a} представляет собой независимо водород или C_1-C_6-алкил;

R^{d}, **R**^{e} и **R**^{f} представляет собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил, алкоксикарбонил, -C(O)OH или -CH_2O**R**^{g}, где каждый **R**^{g} представляет собой независимо -CH_2C(O)OH или -CH_2C(O)O(алкил); и

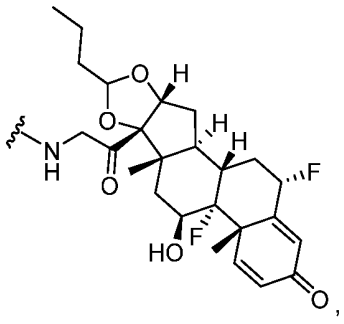
mm равен 0 или 1;

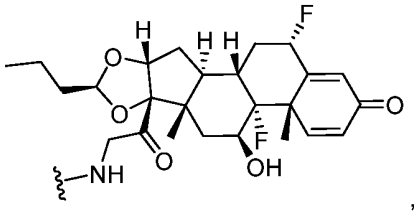
n представляет собой целое число, выбираемое в диапазоне 1-30, включительно;

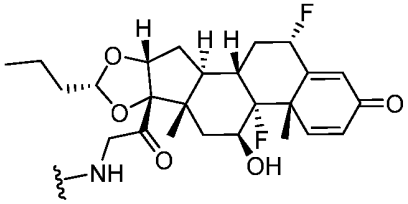
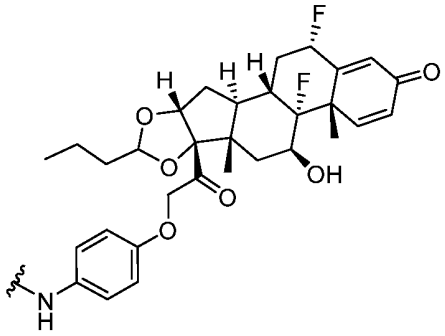
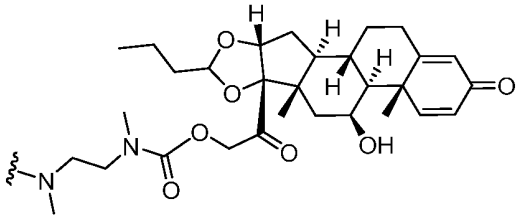
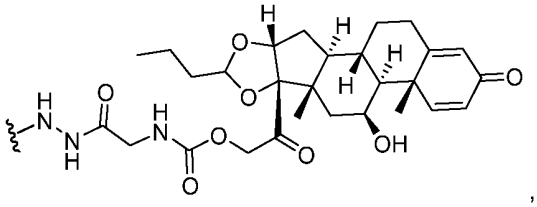
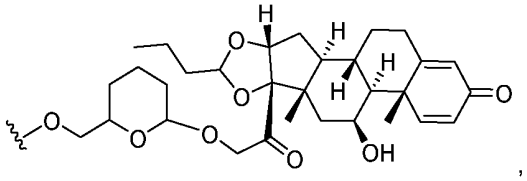
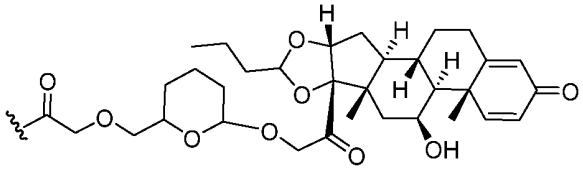
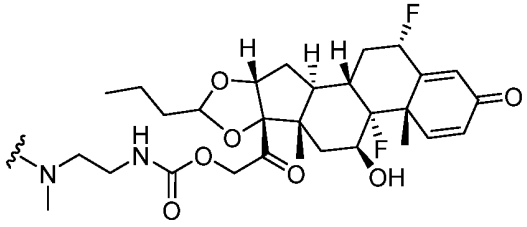
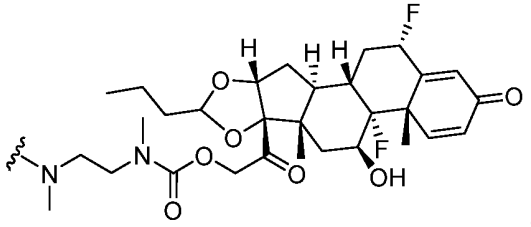
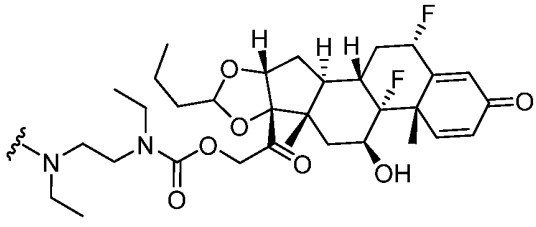
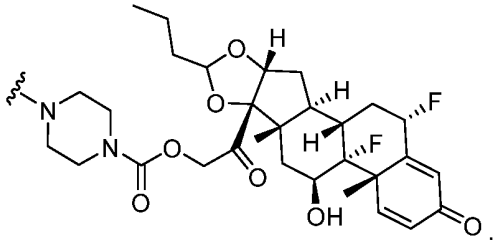
L′ представляет собой линкер; и

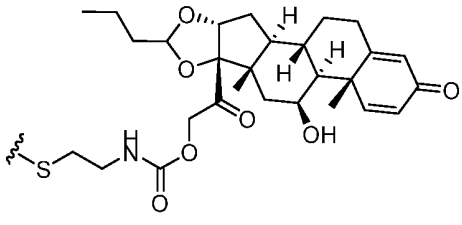
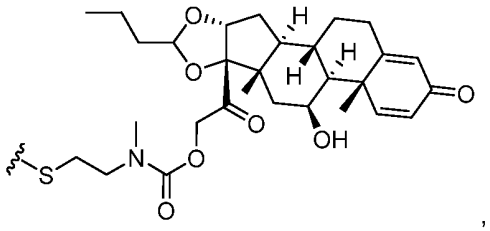
BA представляет собой связующий агент.

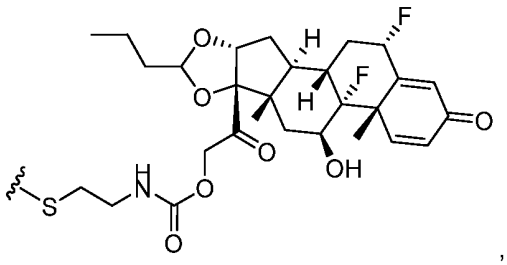
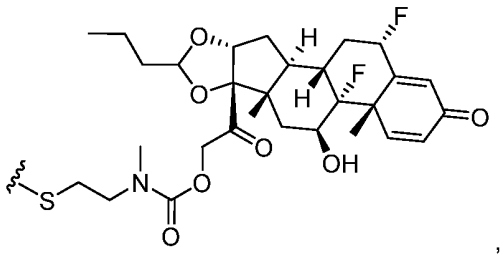
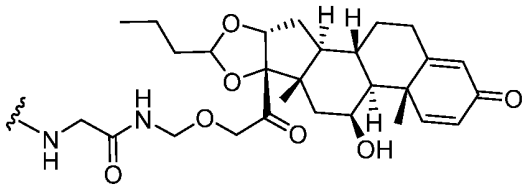
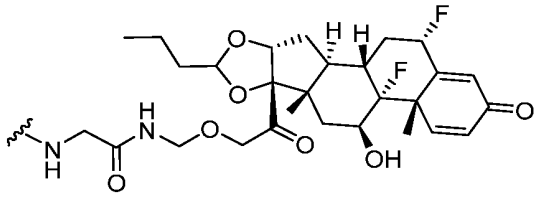
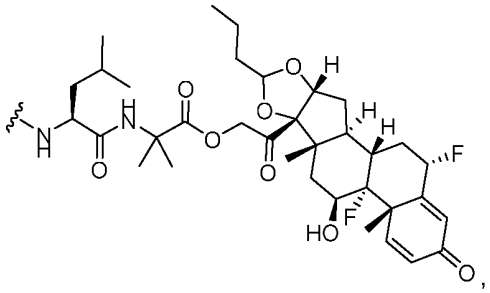
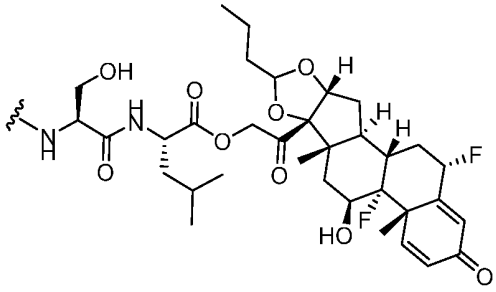
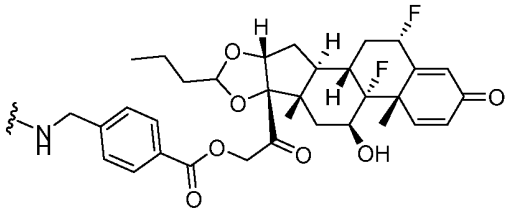
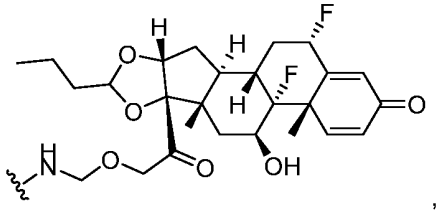
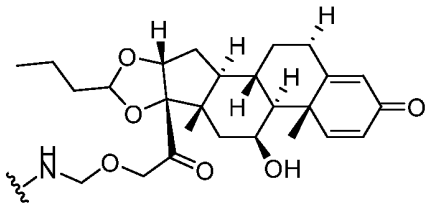
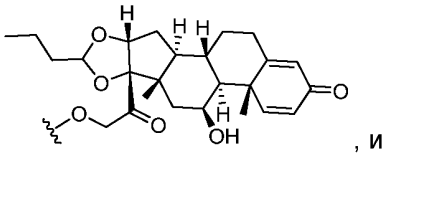
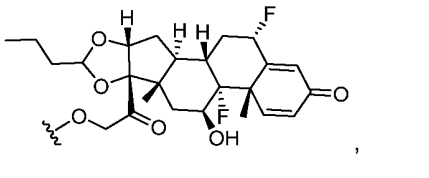
27. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 22, в котором стероидная нагрузка выбирается из группы, состоящей из:






,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

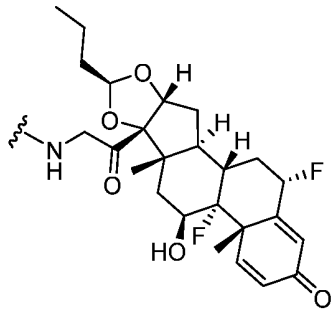
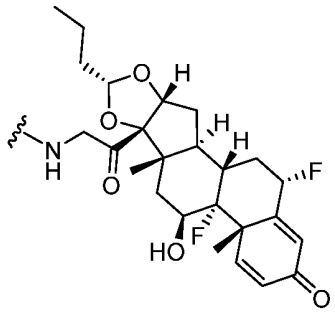

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

, и

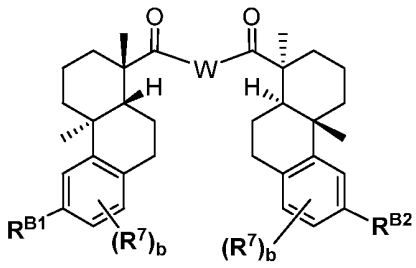
,

где представляет собой связь с линкером.

28. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 22, в котором стероидная нагрузка выбирается из группы, состоящей из:


и

, или их смеси.

29. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 23, в котором модулятор LXR конъюгирован с антителом или его антиген-связывающим фрагментом через линкер - соединение Формулы (**B**):


Формула (**B**)

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где

W представляет собой $–CH_2–$, –N(H)– или –O–;

$\mathbf{R^{B1}}$ представляет собой –H, –OH, $–NH_2$, алкил или $–OP(O)(O\mathbf{R^6})_2$;

$\mathbf{R^{B2}}$ представляет собой –H, –OH, $–CH_2NH_2$, $\mathbf{R^{B3}}$, $\mathbf{R^{B4}}$, $\mathbf{R^{B5}}$ или $–O–\mathbf{R^{B5}}$, где $\mathbf{R^{B1}}$ и $\mathbf{R^{B2}}$ не являются одновременно –H;

$\mathbf{R^{B3}}$ представляет собой $–N(\mathbf{R^6})_2$;

$\mathbf{R^{B4}}$ представляет собой **–X–Y–Z**;

X выбирается из группы, состоящей из –O– и –N(H)–;

Y выбирается из группы, состоящей из алкилена, замещенного алкилена (включая, помимо прочего, оксо замещение, т.е. =O)), гетероалкилена и замещенного гетероалкилена (включая, помимо прочего, оксо замещение, т.е. =O));

Z выбирается из группы, состоящей из –OH и $–NH_2$;

$\mathbf{R^{B5}}$ представляет собой алкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный

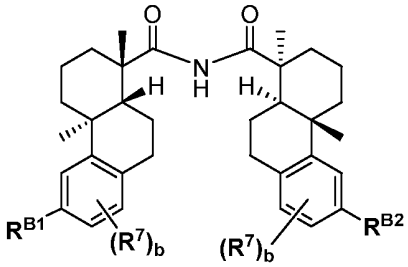
гетероциклоалкил включает один, два или три гетероатома, выбираемых из азота и кислорода, и включает минимум один –OH и $–CH_2OH$ заместитель или минимум один первичный или вторичный азот, например, O-глюкозу;

каждый $\mathbf{R^6}$ представляет собой в каждом случае –H, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептид или алкил; и

каждый $\mathbf{R^7}$ представляет собой независимо гало, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси, –CN, O-глюкоза, O-аминокислотный остаток и O-$ПЭГ_b$, где каждый нижний индекс **b** представляет собой целое число от 0 до 3;

где группа $\mathbf{R^{B1}}$ или $\mathbf{R^{B2}}$ связана с линкером.

30. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 23, в котором модулятор LXR конъюгирован с антителом или его антиген-связывающим фрагментом через линкер представляет собой соединение Формулы (**B-1**):



Формула **(B-1)**

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где:

$\mathbf{R^{B1}}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^8}$ или $–N(\mathbf{R^9})_2$;

$\mathbf{R^{B2}}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^8}$;

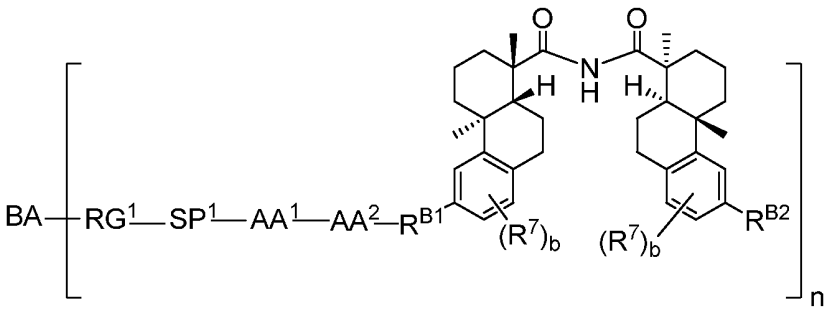
каждый $\mathbf{R^8}$ представляет собой независимо в каждом случае водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый компонент или алкил;

$\mathbf{R^9}$ представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбираемые из азота и кислорода, и, когда он является замещенным, включает минимум один –OH и $-CH_2OH$ или минимум один первичный или вторичный азот;

каждый $\mathbf{R^7}$ представляет собой независимо гало, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси, –CN, O-глюкоза, O-аминокислотный остаток или O-$ПЭГ_b$, где каждый нижний индекс **b** представляет собой целое число от 0 до 3;

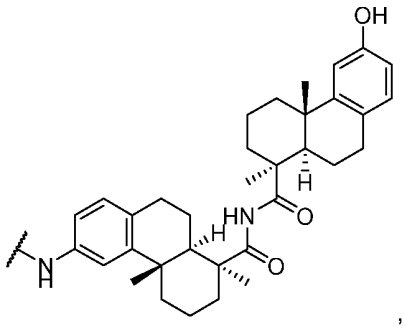
где группа $\mathbf{R^{B1}}$ или $\mathbf{R^{B2}}$ связана с линкером.

31. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 9-21, 23 и 29-30, имеющий структуру Формулы (**6005**)

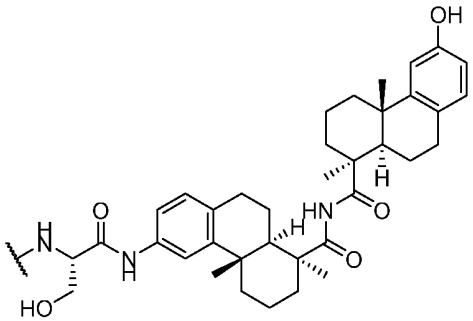


Формула (**6005**)

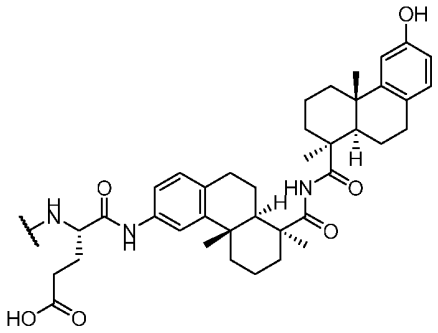
32. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 23, в котором модулятор LXR выбирается из группы, состоящей из:



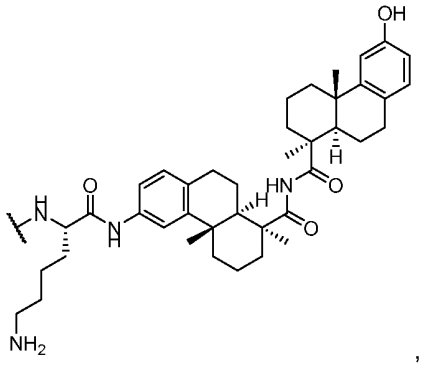
,



,



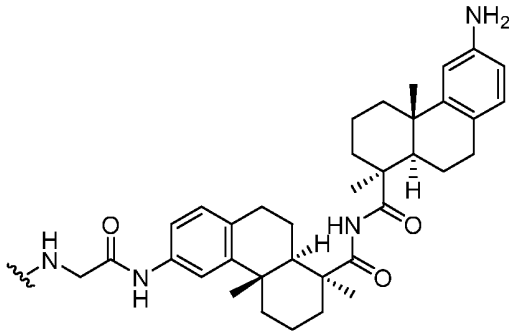
, и



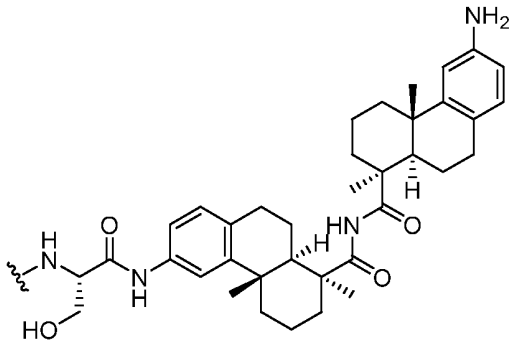
,

где  представляет собой связь с линкером.

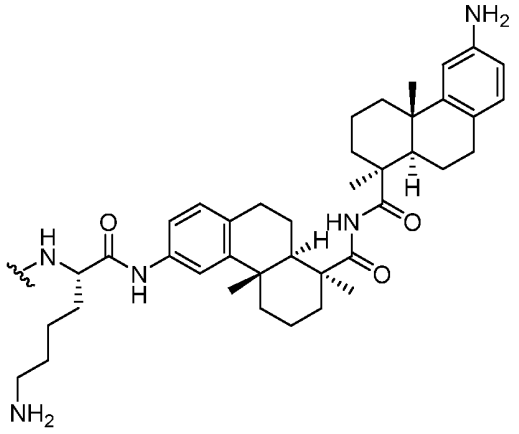
33. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 23, в котором модулятор LXR выбирается из группы, состоящей из:



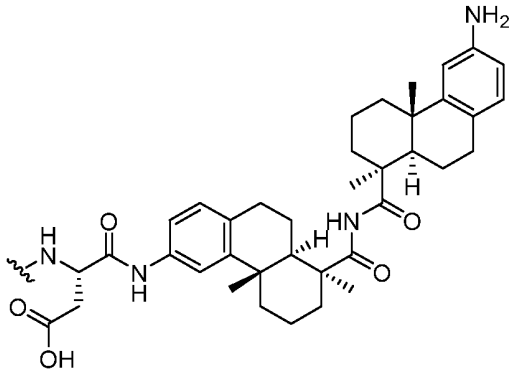
P4B;



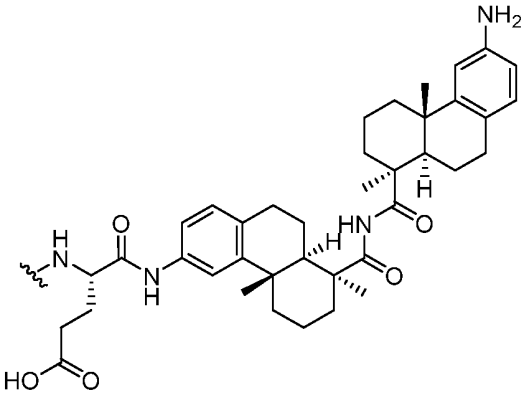
P5B;



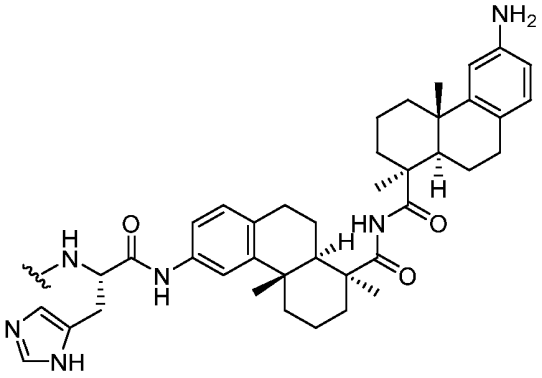
P6B;



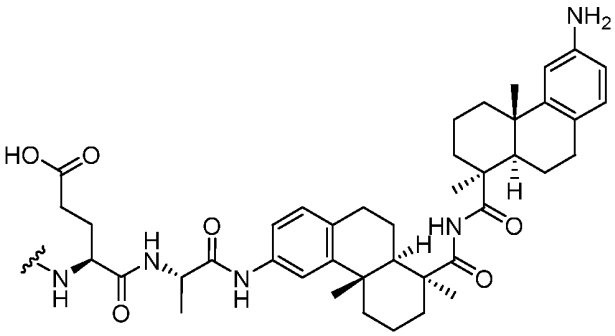
P7B;



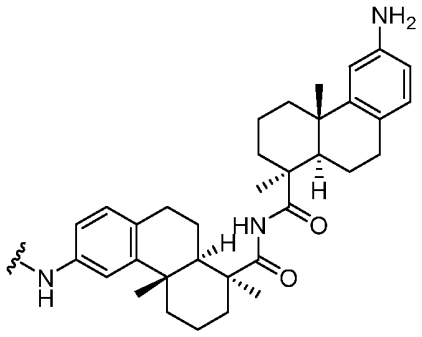
P8B;



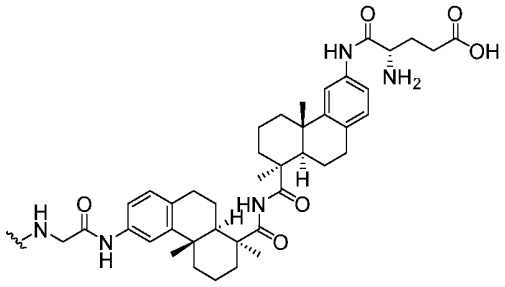
P9B;



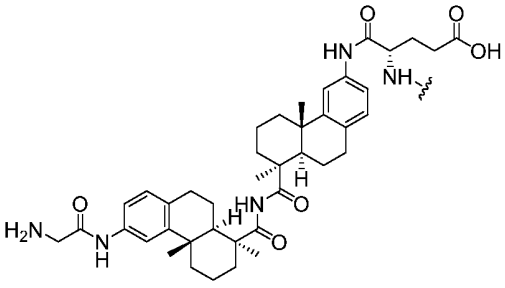
P12B;



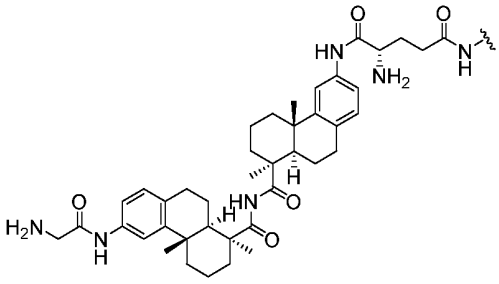
P2B;



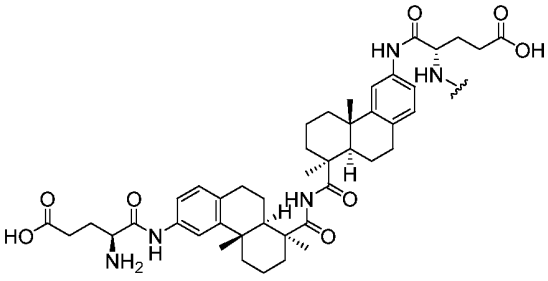
или



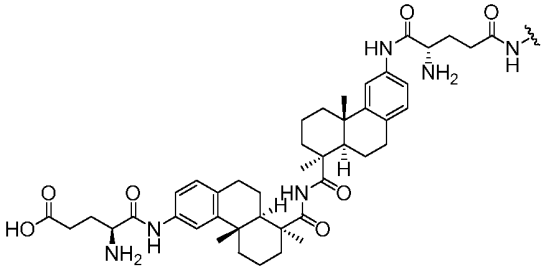
или



P10B;

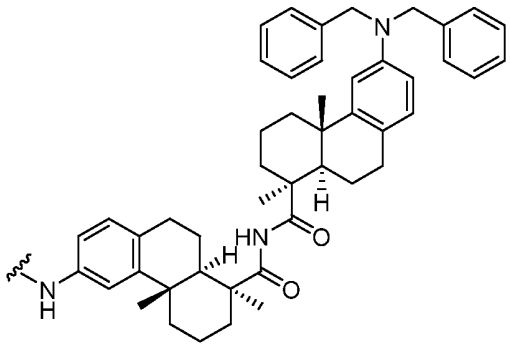


или



P11B;

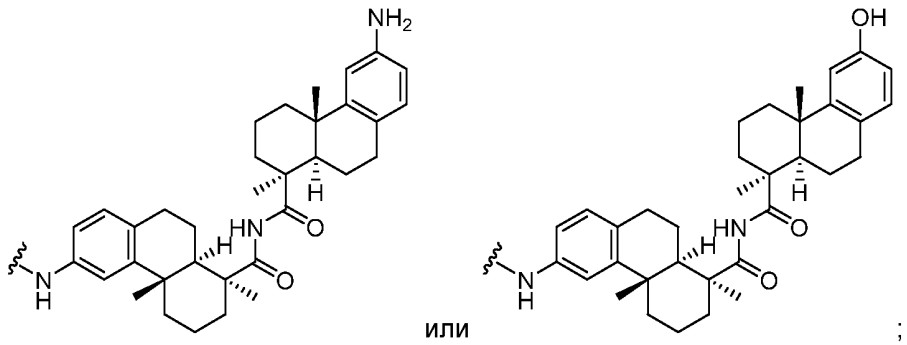
и



P3B;

где  представляет собой связь с линкером.

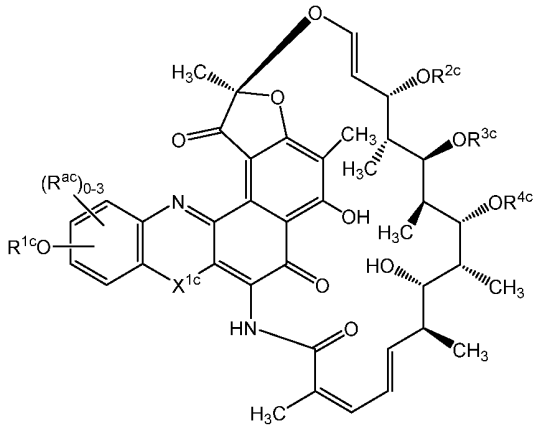
34. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 23, в котором модулятор LXR -



или ;

где  - связь с линкером.

35. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 24, в котором аналог рифамицина представляет собой соединение Формулы (**C-1**):



Формула (**C-1**)

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где:

$\mathbf{X^{1c}}$ выбирается из –S-; -O- и –N$\mathbf{R^{5c}}$;

$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой амино-C_{1-6}алкил; C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; ди-C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; гидрокси-C_{1-6}алкил; HS-C_{1-6}алкил; ($\mathbf{R^{5c}}$)$_2$N-C_{1-6}алкилен-N($\mathbf{R^{5c}}$)-C_{1-6}алкил; ($\mathbf{R^{5c}}$)$_2$N-C_{1-6}алкилен-O-C_{1-6}алкил; ($\mathbf{R^{5c}}$)$_2$N-C_{1-6}алкилен-S-C_{1-6}алкил; гетероциклоалкил или гетероциклоалкил-C_{1-6}алкил; где гетероциклоалкил включает один, два или три гетероатома, выбираемых из O, N и S; и где гетероциклоалкил необязательно замещен гало, C_{1-6}алкилом, -OH, =O или –N($\mathbf{R^{5c}}$)$_2$;

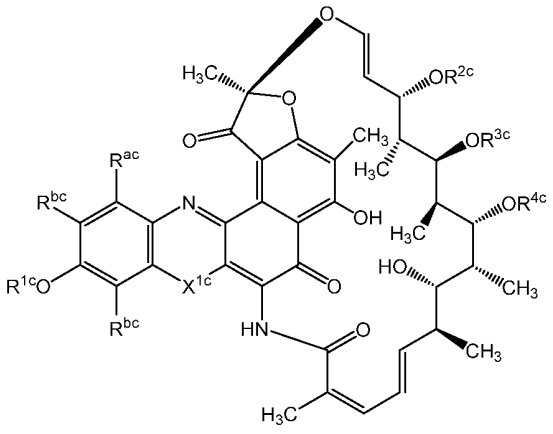
$\mathbf{R^{2c}}$, $\mathbf{R^{3c}}$ и $\mathbf{R^{4c}}$ независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и -(C=O)-$\mathbf{R^{5c}}$;

каждый $\mathbf{R^{ac}}$, если имеется, независимо выбирается из -F; -Cl; -Br; -I; -OH; -NH_2; и C_{1-6}алкокси; и

$\mathbf{R^{5c}}$ независимо в каждом случае выбирается из водорода; и C_{1-6}алкила;

где группа $\mathbf{R^{1c}}$ связана с линкером.

36. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 24, в котором аналог рифамицина представляет собой соединение Формулы (**C-2**):



Формула (**C-2**)

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где:

$\mathbf{X^{1c}}$ выбирается из –S–; –O– и –N$\mathbf{R^{5c}}$;

$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой амино-C_{1-6}алкил; C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; ди-C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; гидрокси-C_{1-6}алкил; HS-C_{1-6}алкил; ($\mathbf{R^{5c}}$)$_2$N-C_{1-6}алкилен-N($\mathbf{R^{5c}}$)-C_{1-6}алкил; ($\mathbf{R^{5c}}$)$_2$N-C_{1-6}алкилен-O-C_{1-6}алкил; ($\mathbf{R^{5c}}$)$_2$N-C_{1-6}алкилен-S-C_{1-6}алкил; гетероциклоалкил или гетероциклоалкил-C_{1-6}алкил; где гетероциклоалкил включает один, два или три гетероатома, выбираемых из O, N

и S; и где гетероциклоалкил необязательно замещен гало, C_{1-6}алкилом, -OH, =O или $–N(\mathbf{R^{5c}})_2$;

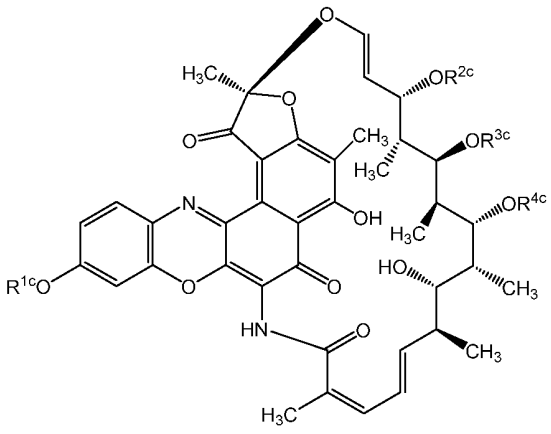
$\mathbf{R^{2c}}$, $\mathbf{R^{3c}}$ и $\mathbf{R^{4c}}$ независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и $-(C=O)-\mathbf{R^{5c}}$;

$\mathbf{R^{ac}}$и $\mathbf{R^{bc}}$ независимо выбираются из -F; -Cl; -Br; -I; -OH; $-NH_2$; и C_{1-6}алкокси; и

$\mathbf{R^{5c}}$ независимо в каждом случае выбирается из водорода; и C_{1-6}алкила;

где группа $\mathbf{R^{1c}}$ связана с линкером.

37. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 24, где аналог рифамицина представляет собой соединение Формулы (**C-3**):



Формула (**C-3**)

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где:

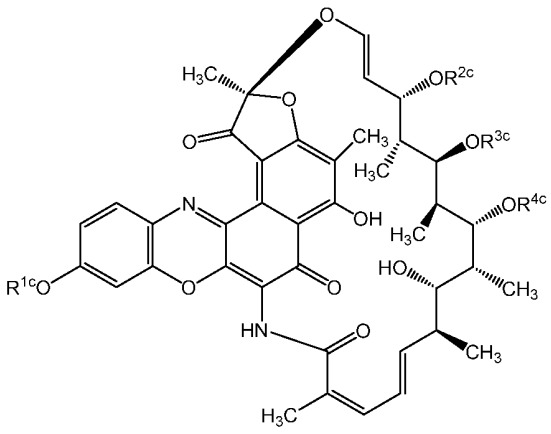
$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой ди-C_{1-6}алкиламиноC_{1-6}алкил; $(\mathbf{R^{5c}})_2$N-C_{1-6}алкилен-N($\mathbf{R^{5c}}$)-C_{1-6}алкил; гетероциклоалкил или гетероциклоалкил-C_{1-6}алкил; где гетероциклоалкил включает один, два или три гетероатома, выбираемых из O, N и S; и где гетероциклоалкил необязательно замещен гало, C_{1-6}алкилом, -OH, =O или $–N(\mathbf{R^{5c}})_2$; и

$\mathbf{R^{2c}}$, $\mathbf{R^{3c}}$ и $\mathbf{R^{4c}}$ независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и $-(C=O)-\mathbf{R^{5c}}$; и

$\mathbf{R^{5c}}$ выбирается из водорода и C_{1-6}алкила;

где группа $\mathbf{R^{1c}}$ связана с линкером.

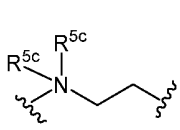
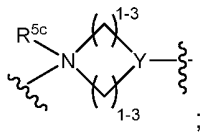
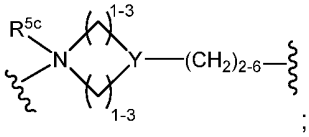
38. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 24, в котором аналог рифамицина представляет собой соединение Формулы (**C-4**):



Формула (**C-4**)

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где:

R^{1c} представляет собой  ,  ; или  ;

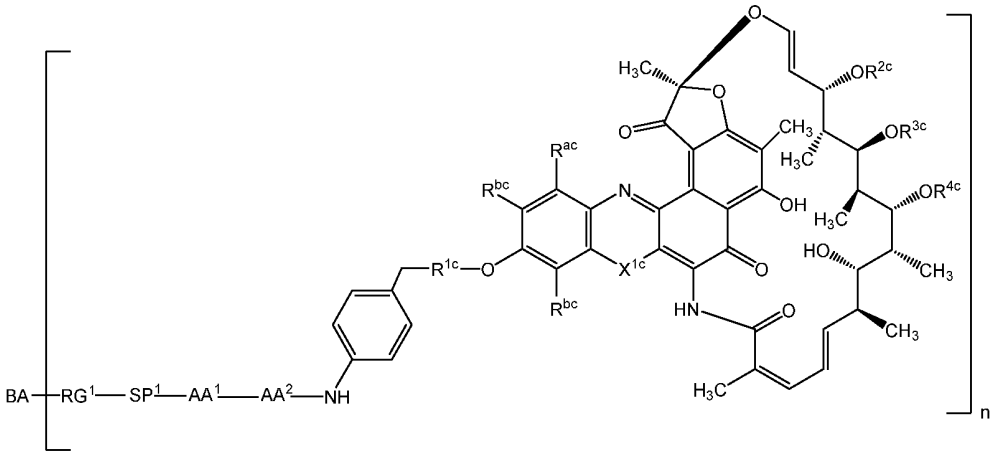
где **Y** представляет собой C или N;

R^{2c}, **R^{3c}** и **R^{4c}** независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и -(C=O)-**R^{5c}**; и

R^{5c} независимо в каждом случае отсутствует или выбирается из водорода и C_{1-6}алкила;

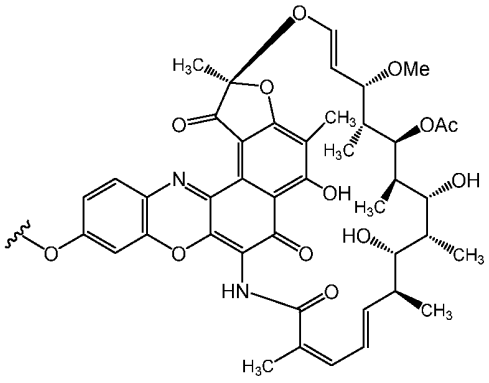
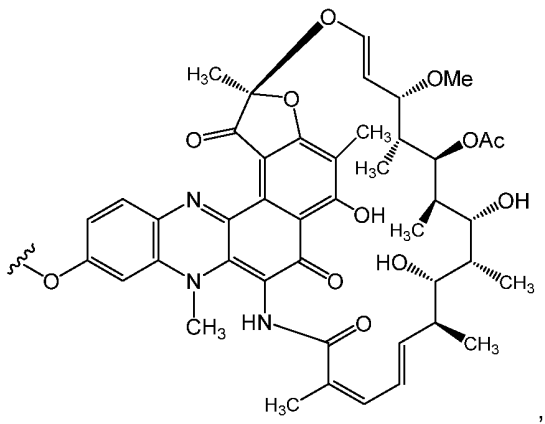
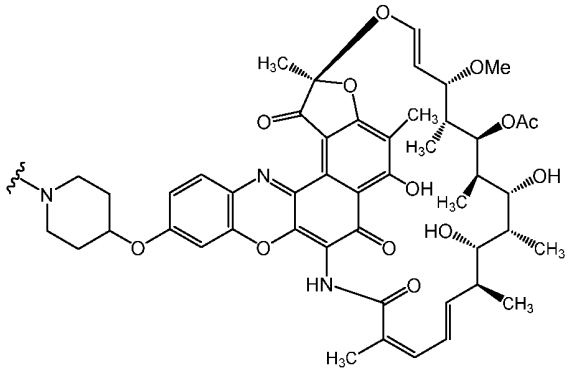
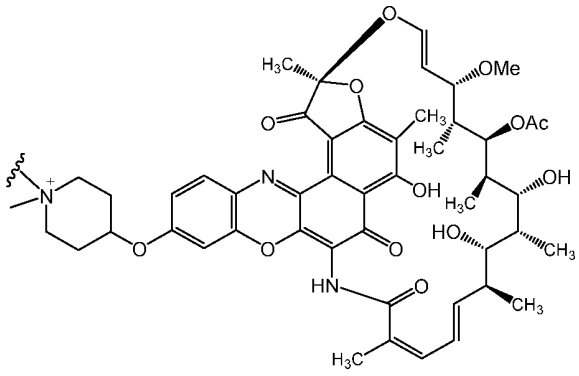
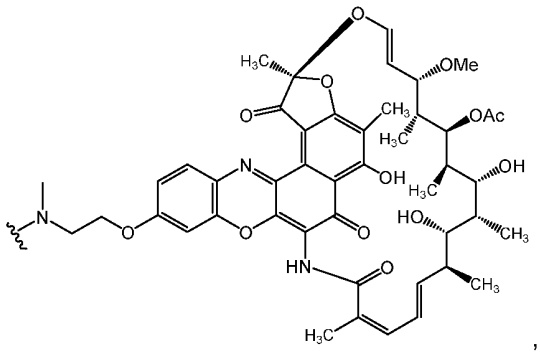
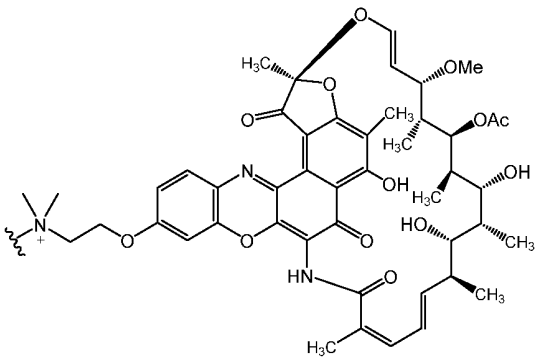
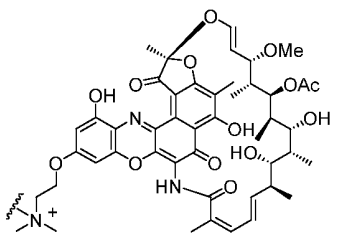
где группа **R^{1c}** связана с линкером через атом азота, что показано волнистой линией  .

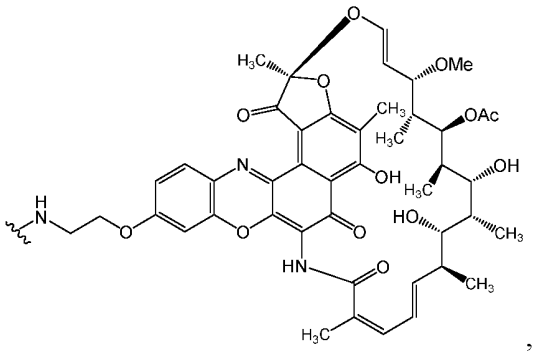
39. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 9-11, 13, 17-21, 24 и 35-38, имеющий структуру Формулы (**7002**):



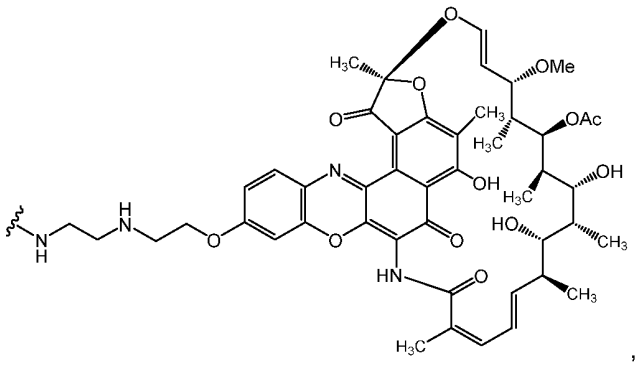
Формула (**7002**).

40. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 9-11, 13, 17-21, 24 и 35-39, в котором аналог рифамицина выбирается из группы, состоящей из:


,

,

,

,

,

,

,



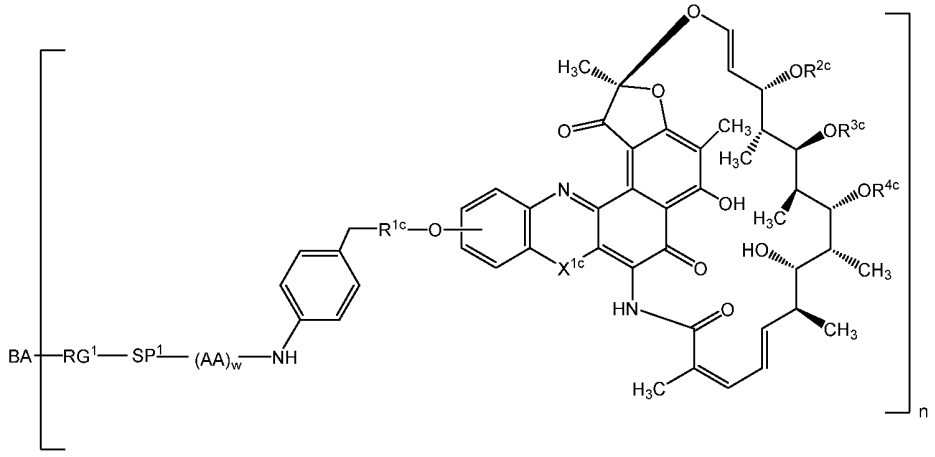
, и



,

где  представляет собой связь с линкером.

41. Конъюгат антитело-аналог рифамицина, имеющий структуру Формулы (**7003**):

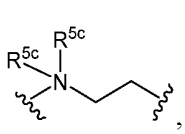
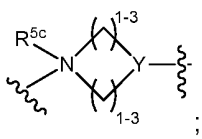
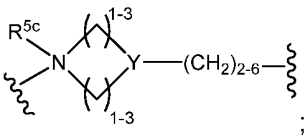


Формула (**7003**)

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма;

где:

X^{1c} выбирается из –S-; -O- и –N**R**^{5c};

R^{1c} представляет собой  ,  ; или  ;

где **Y** представляет собой C или N;

R^{2c}, R^{3c} и R^{4c} независимо выбираются из водорода, C_{1-6}алкила и -(C=O)-R^{5c};

R^{5c} независимо в каждом случае отсутствует или выбирается из водорода; и C_{1-6}алкила;

каждый **AA** представляет собой независимо выбранную аминокислоту;

SP^1 отсутствует или является спейсером;

RG^1 представляет собой остаток реактивной группы;

BA представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент;

нижний индекс **n** представляет собой целое число от 1 до 30;

нижний индекс **w** равен 2, 3 или 4;

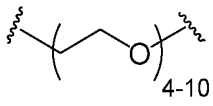
где R^{1c} связывается с линкером через атом азота, что указывается волнистой линией  .

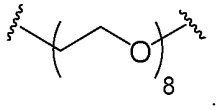
42. Конъюгат антитело-аналог рифамицина по пункту 41, где X^{1c} представляет собой O.

43. Конъюгат антитело-аналог рифамицина по пункту 41 или пункту 42, где **BA** представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие мутацию N297Q.

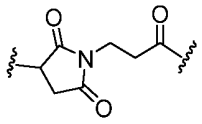
44. Конъюгат антитело-аналог рифамицина по любому из пунктов 41-43, где нижний индекс **w** равен 2.

45. Конъюгат антитело-аналог рифамицина по любому из пунктов 41-44, где $(AA)_2$ представляет собой валин-цитруллин.

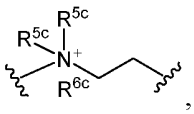
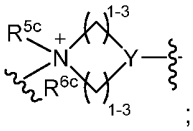
46. Конъюгат антитело-аналог рифамицина по любому из пунктов 41-45, где SP^1 содержит  .

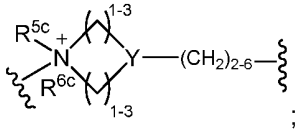
47. Конъюгат антитело-аналог рифамицина по любому из пунктов 41-45, где SP^1 содержит  .

48. Конъюгат антитело-аналог рифамицина по любому из пунктов 41-47, где RG^1 содержит

 .

49. Конъюгат антитело-аналог рифамицина по любому из пунктов 41-47, где $\mathbf{X^{1c}}$ представляет собой O;

$\mathbf{R^{1c}}$ представляет собой  ,  ; или

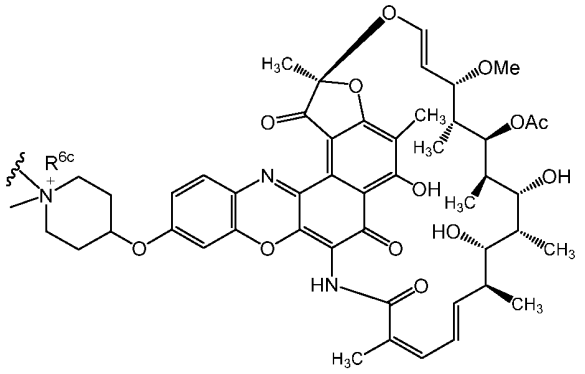
 ; где **Y** представляет собой C или N;

где $\mathbf{R^{1c}}$ связан с линкером через четвертичный атом азота $\mathbf{R^{1c}}$;

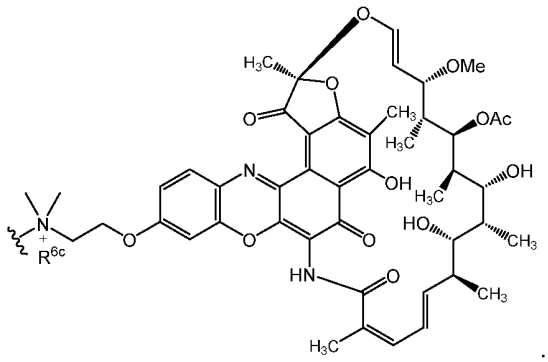
$\mathbf{R^{5c}}$ is $C_{1\text{-}6}$алкил; и

$\mathbf{R^{6c}}$ представляет собой противоион.

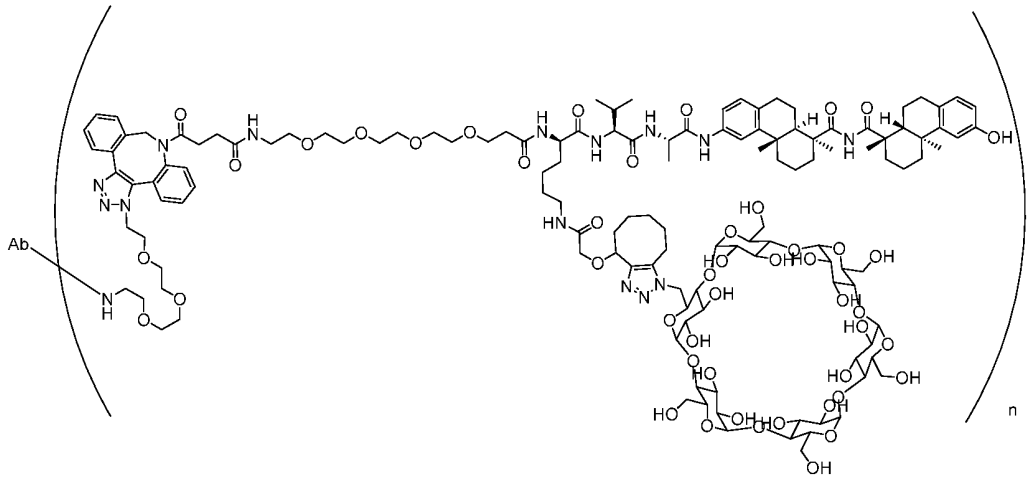
50. Конъюгат антитело-аналог рифамицина по любому из пунктов 41-49, где таким аналогом рифамицина является:

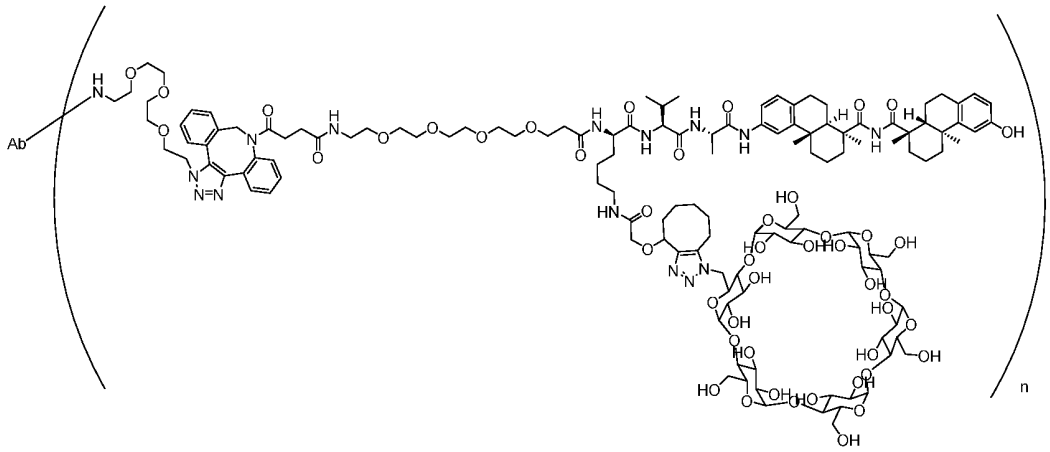


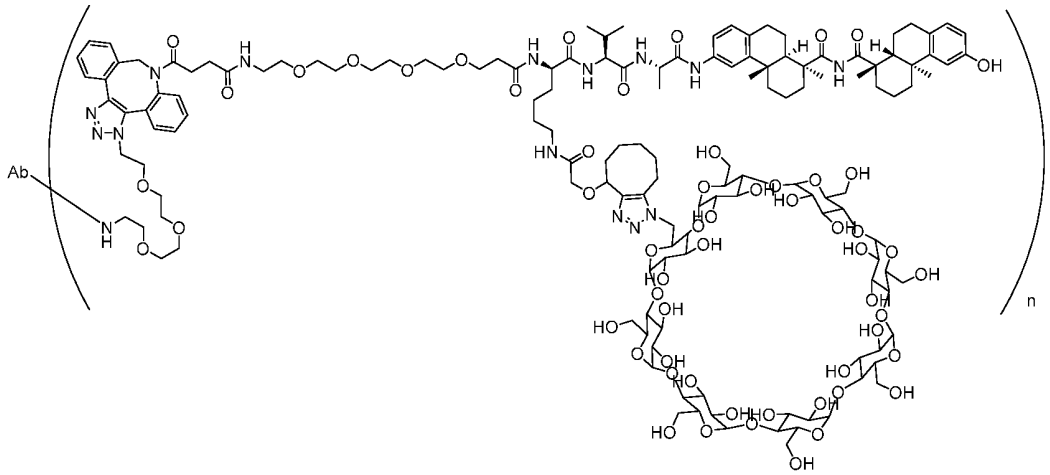
или

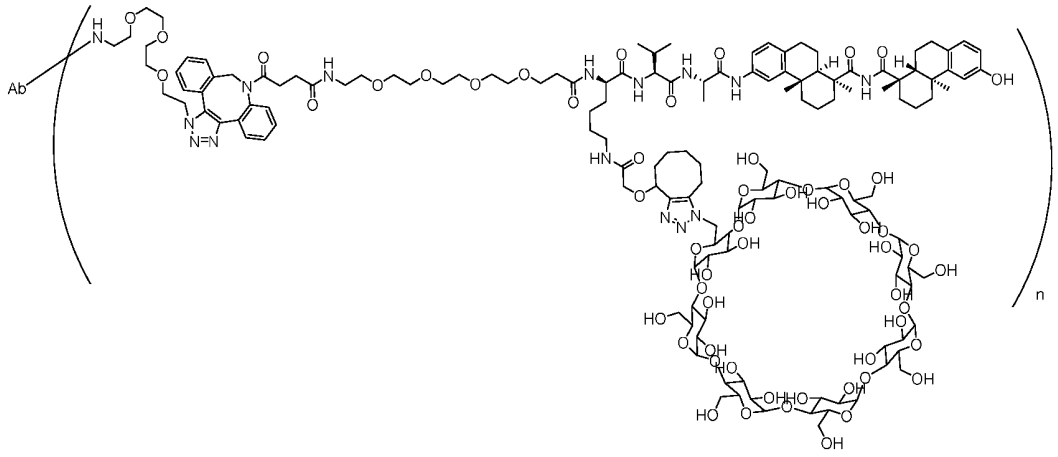
 .

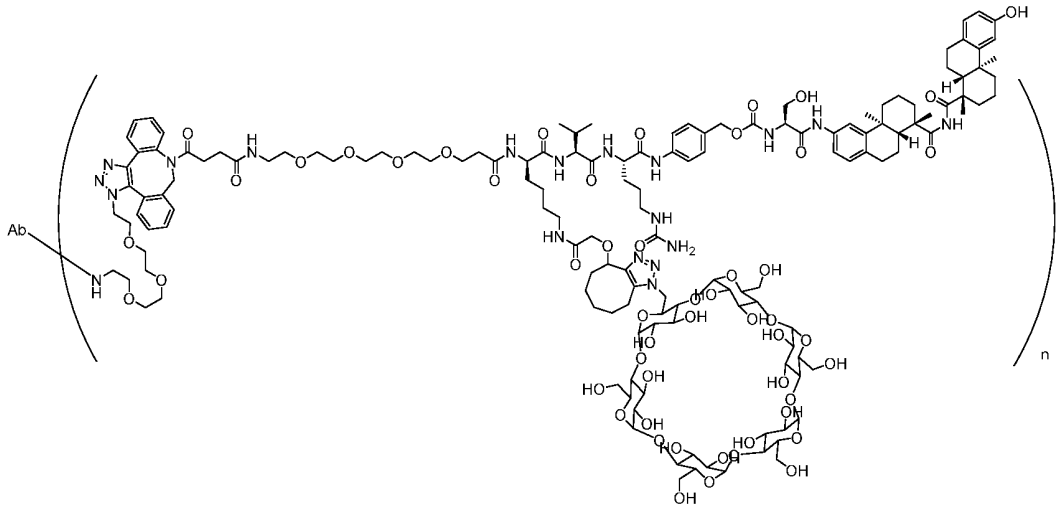
51. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 9-24, который выбирается из группы, состоящей из:

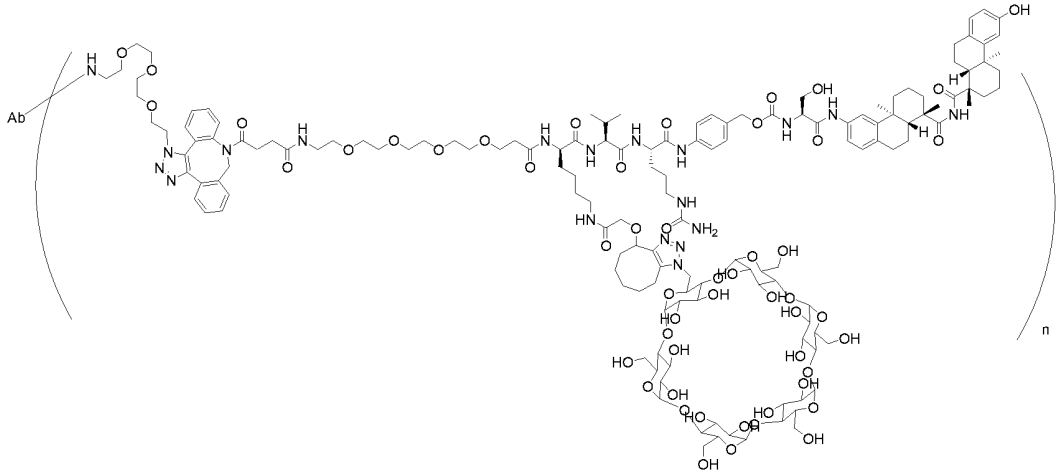


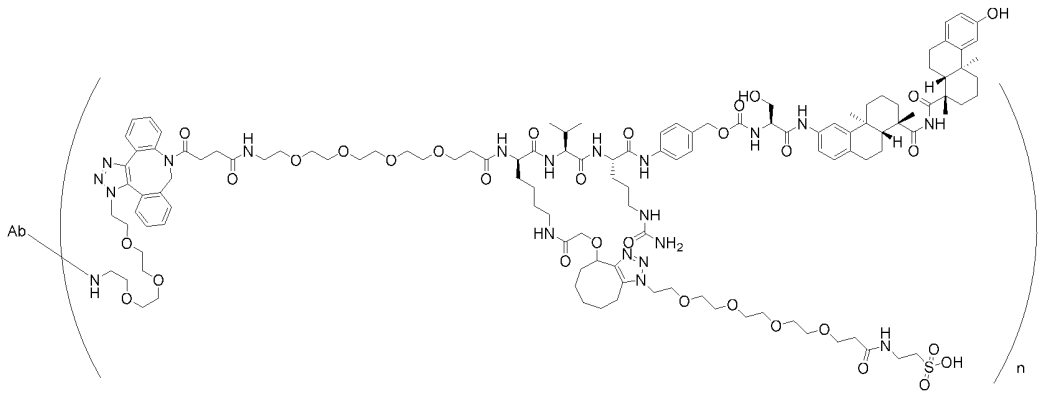


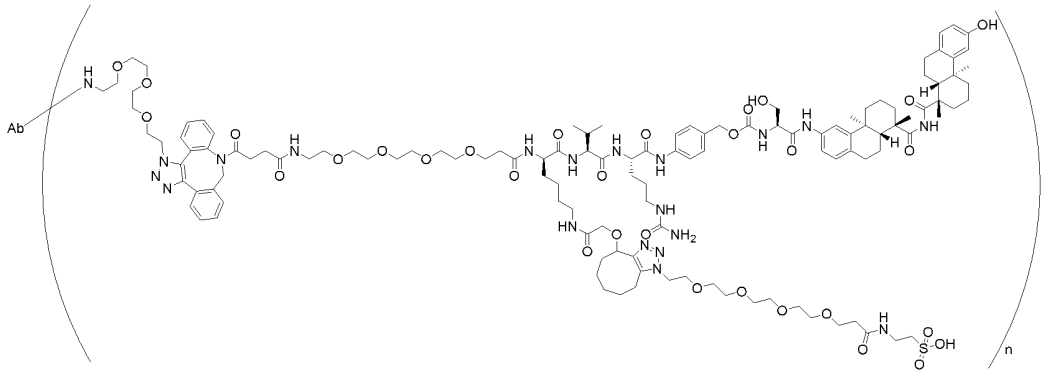


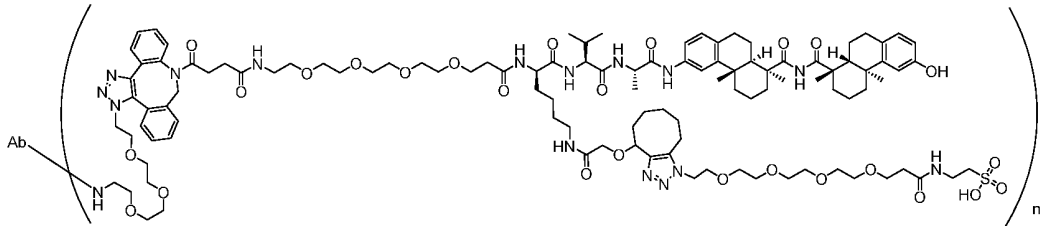


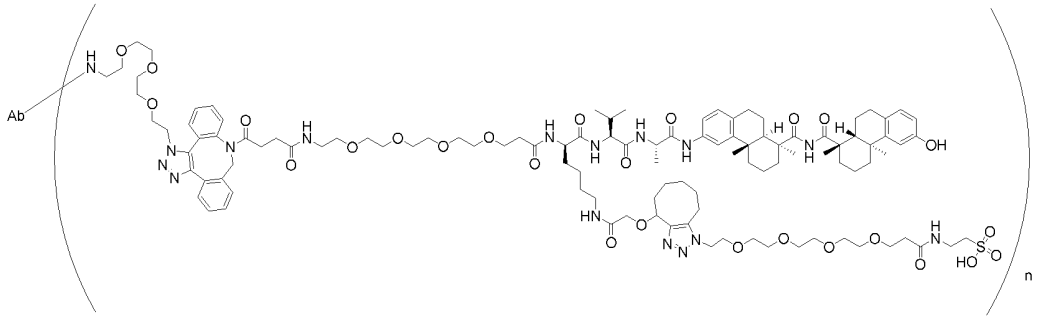


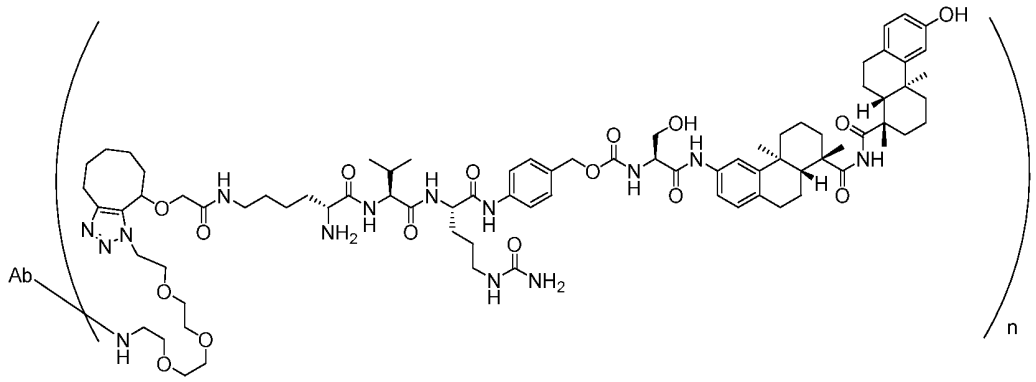


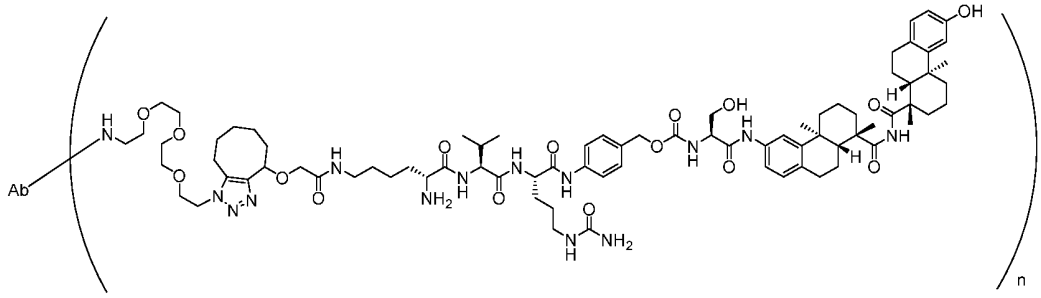


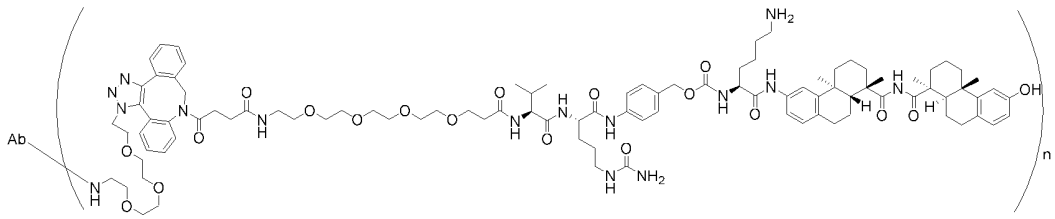


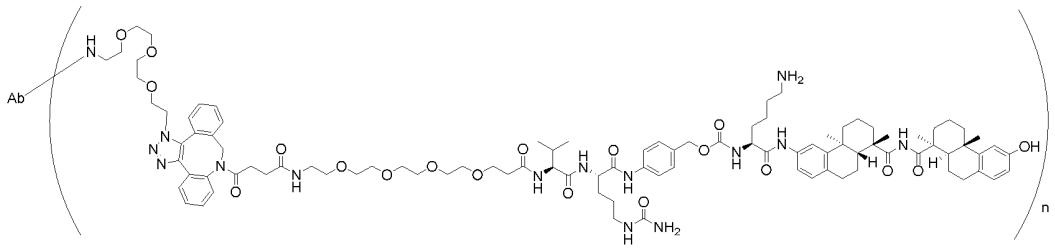


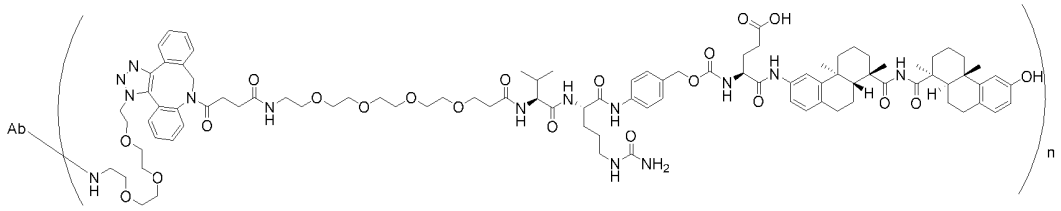


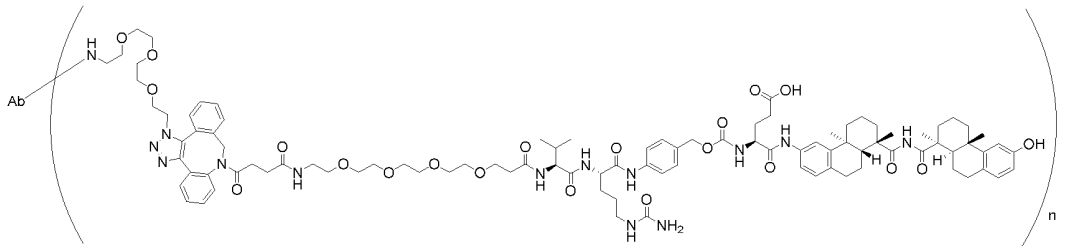


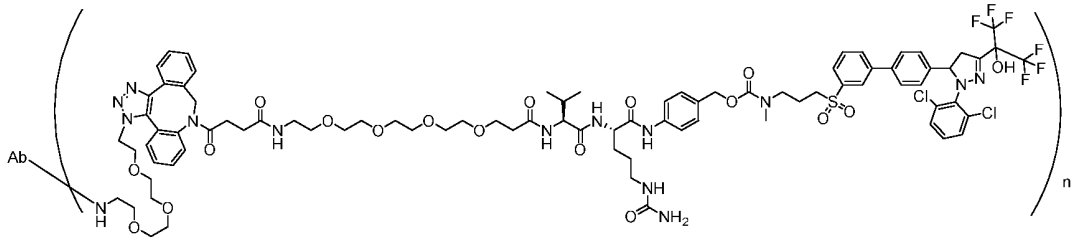


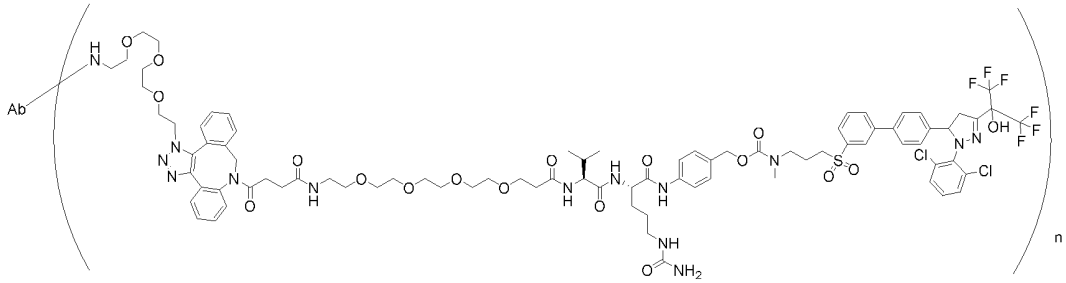


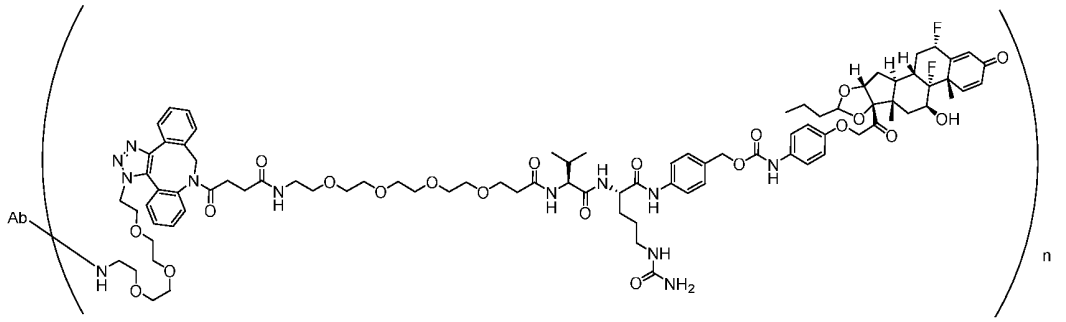


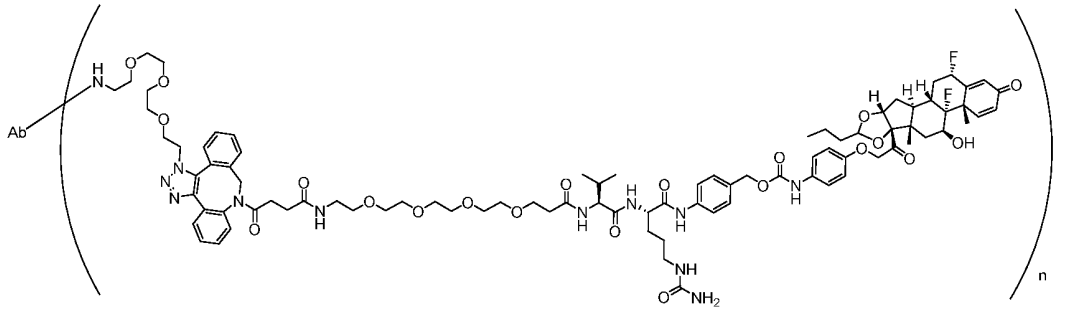


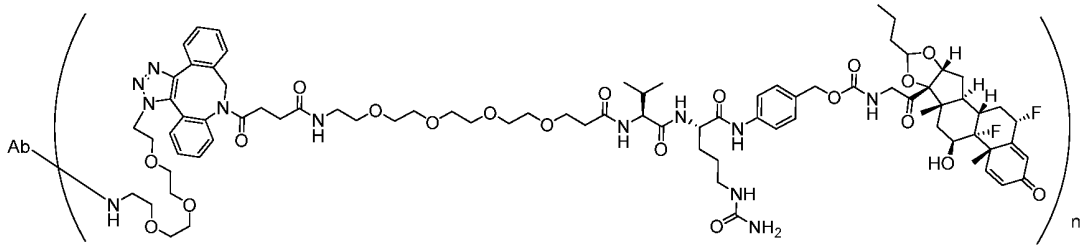


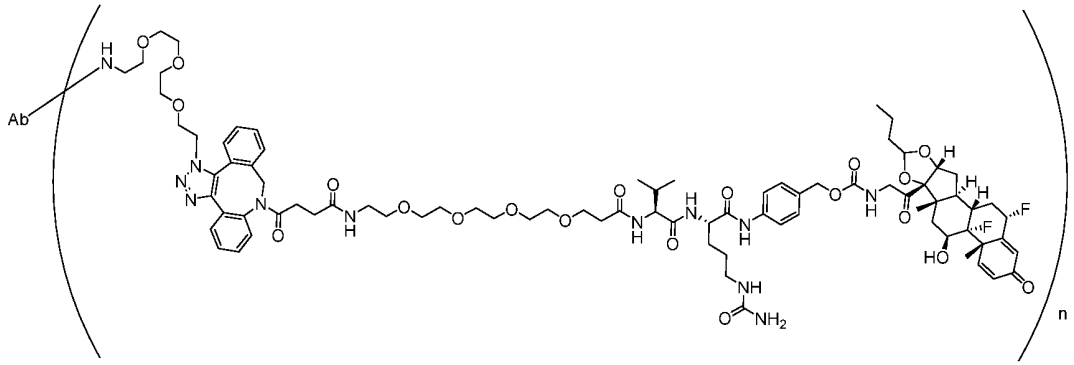


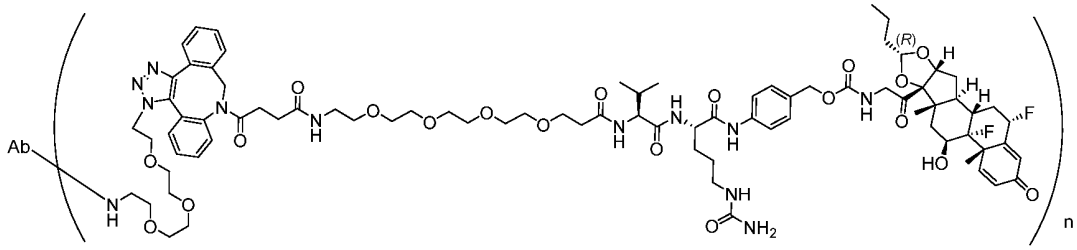


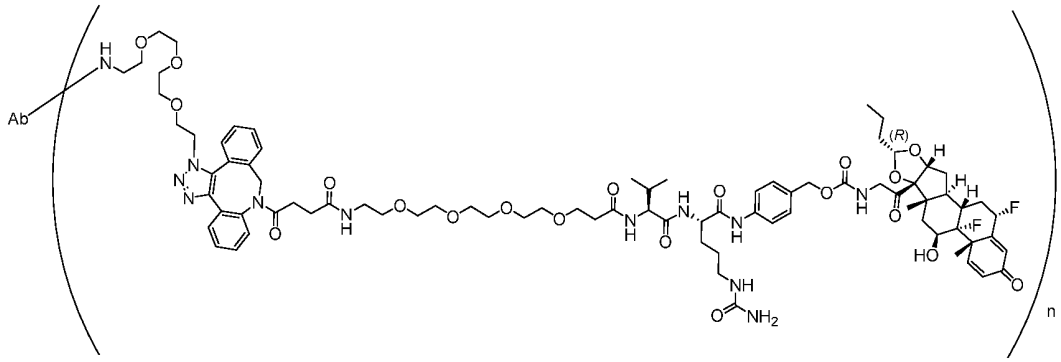


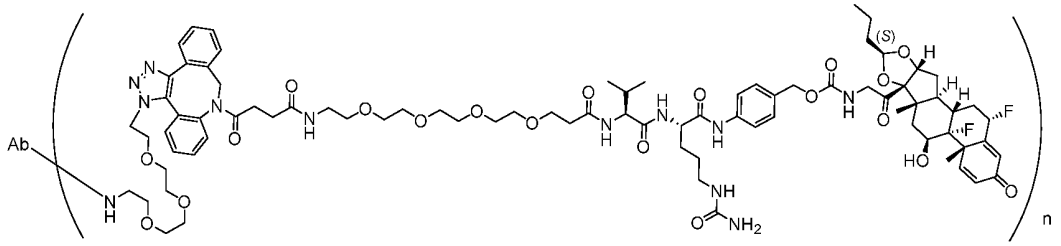


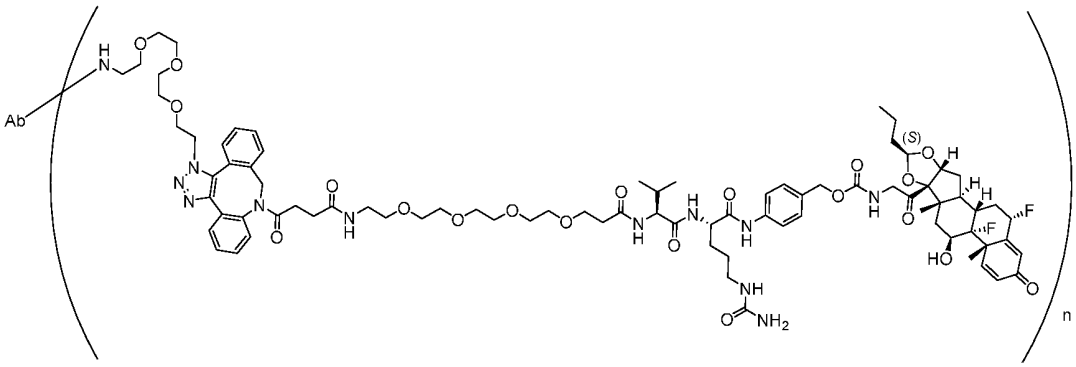


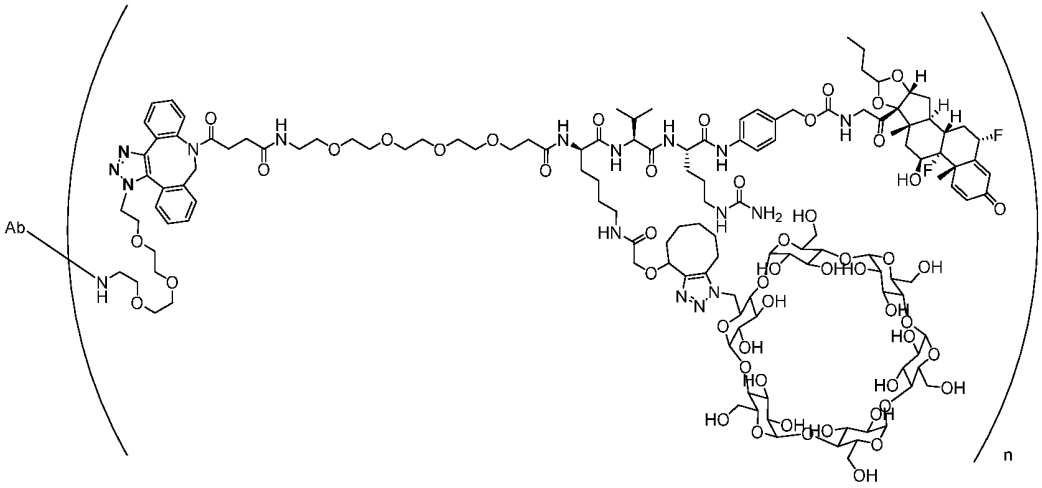


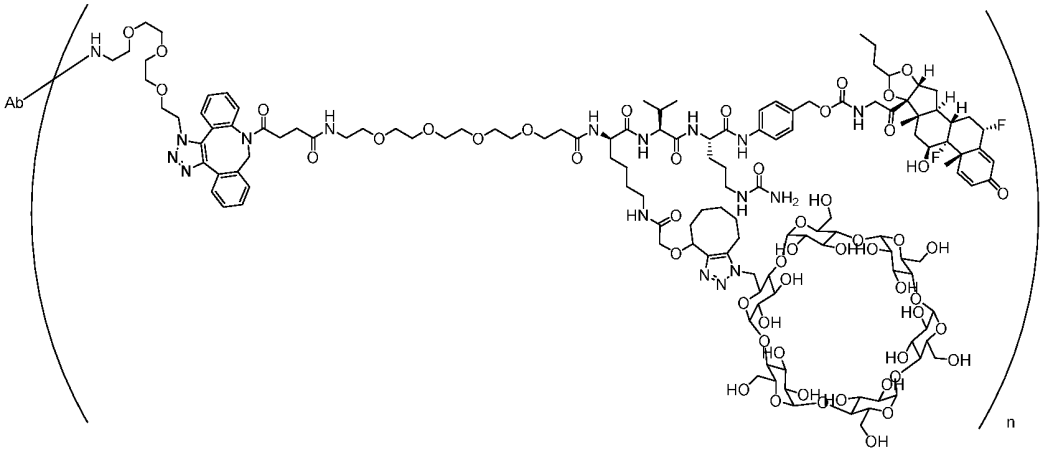


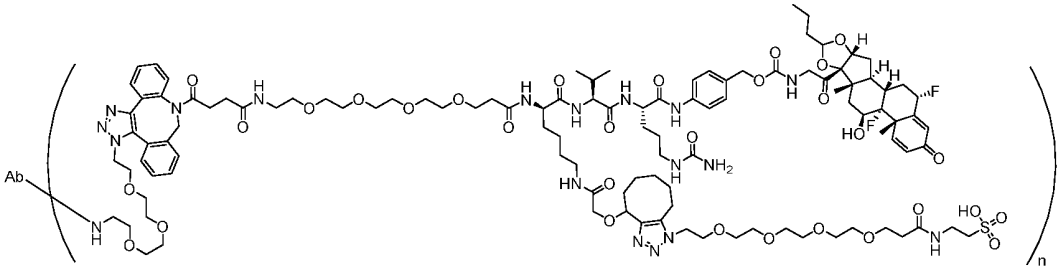




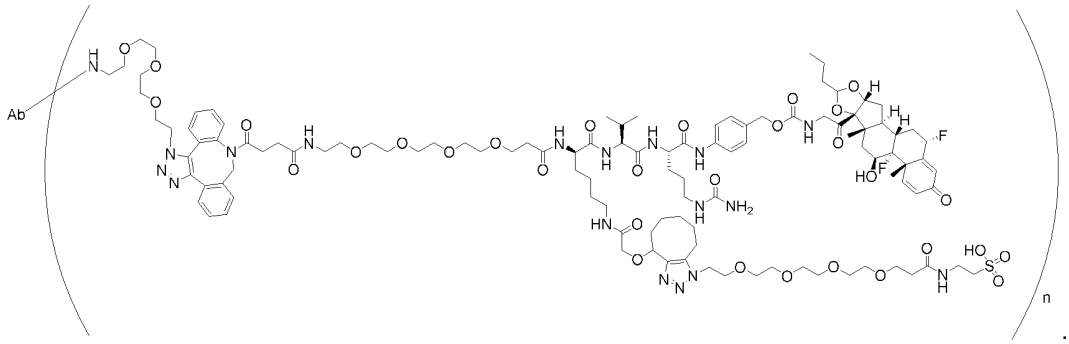


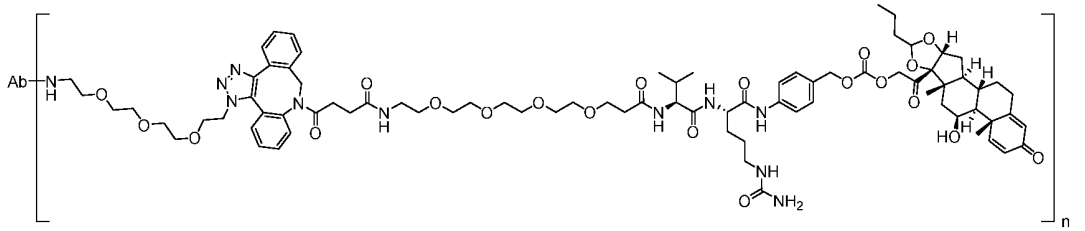


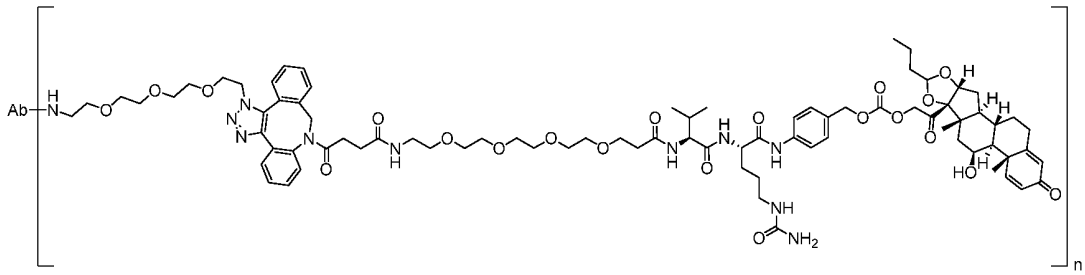




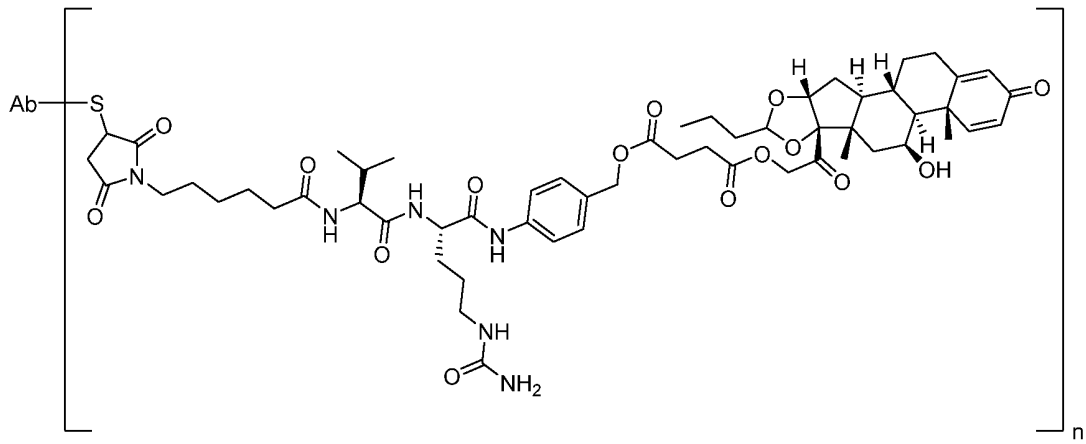
и



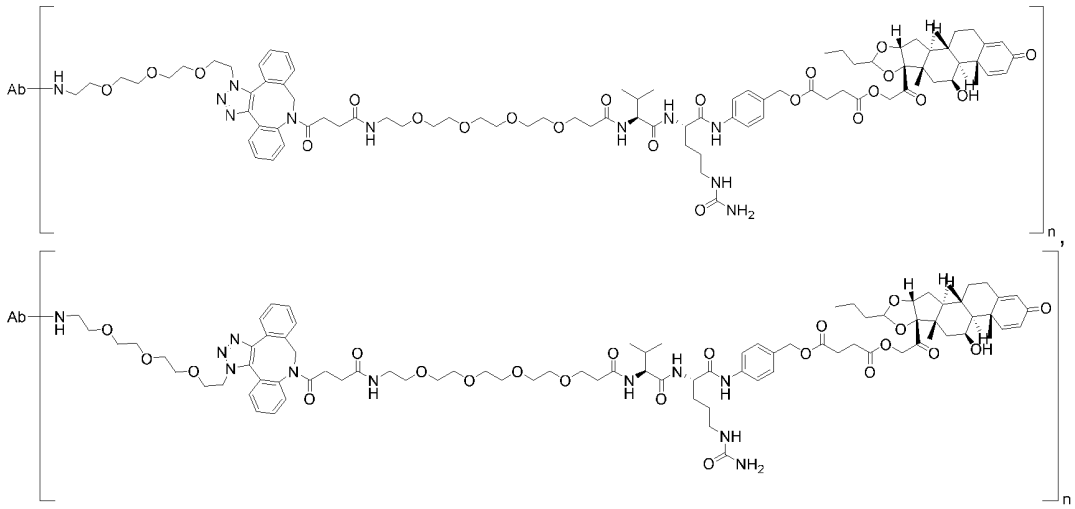




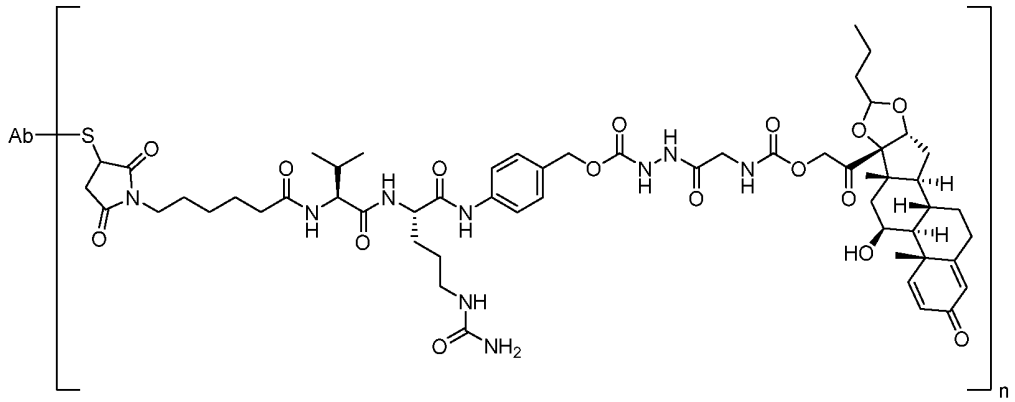
или их смеси;



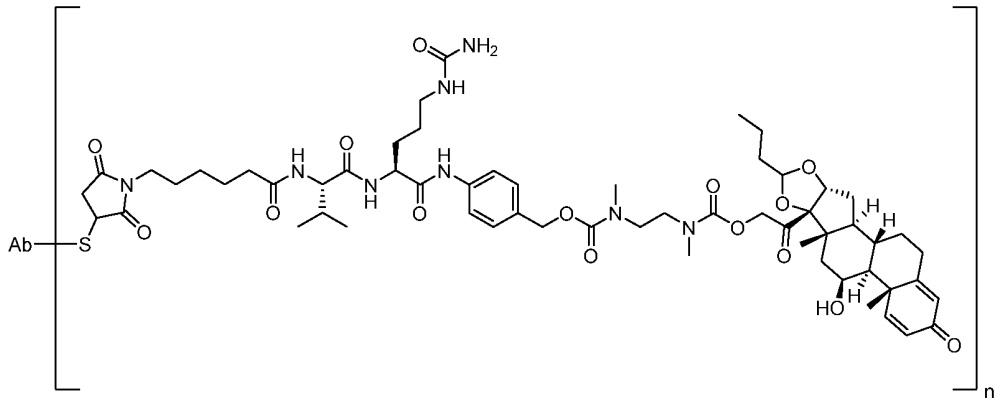
или стереоизомера, или смеси стереоизомеров;



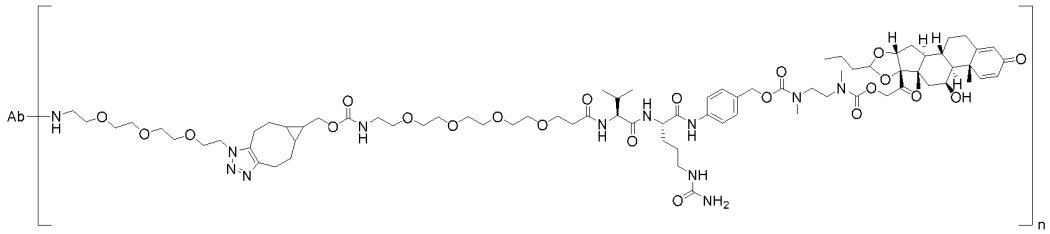
или их смеси;

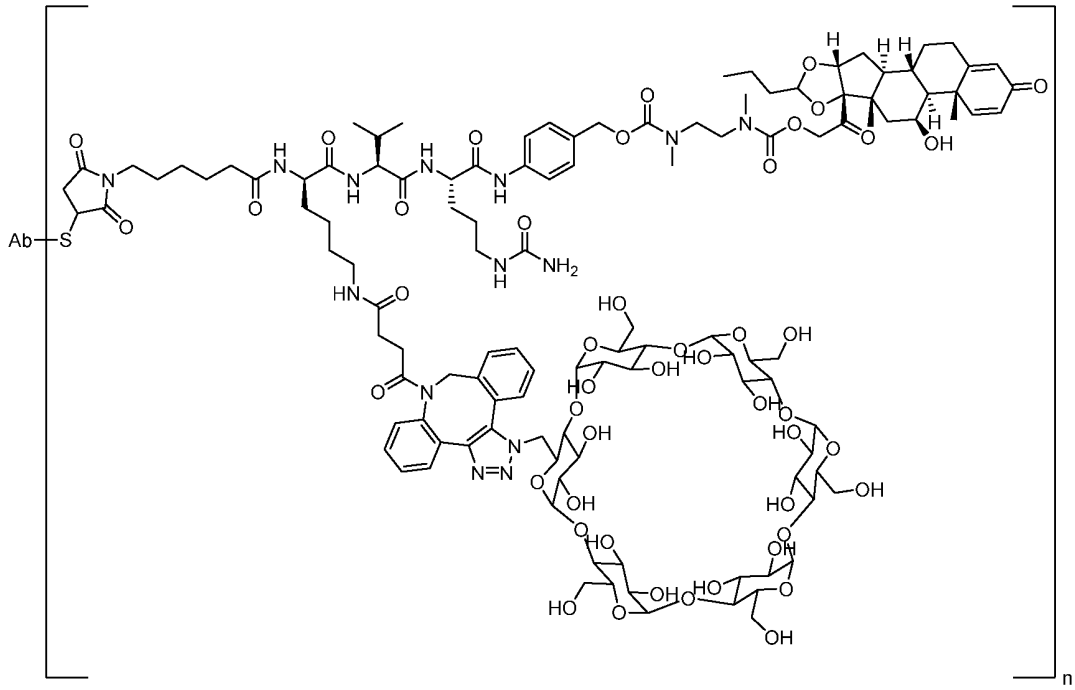


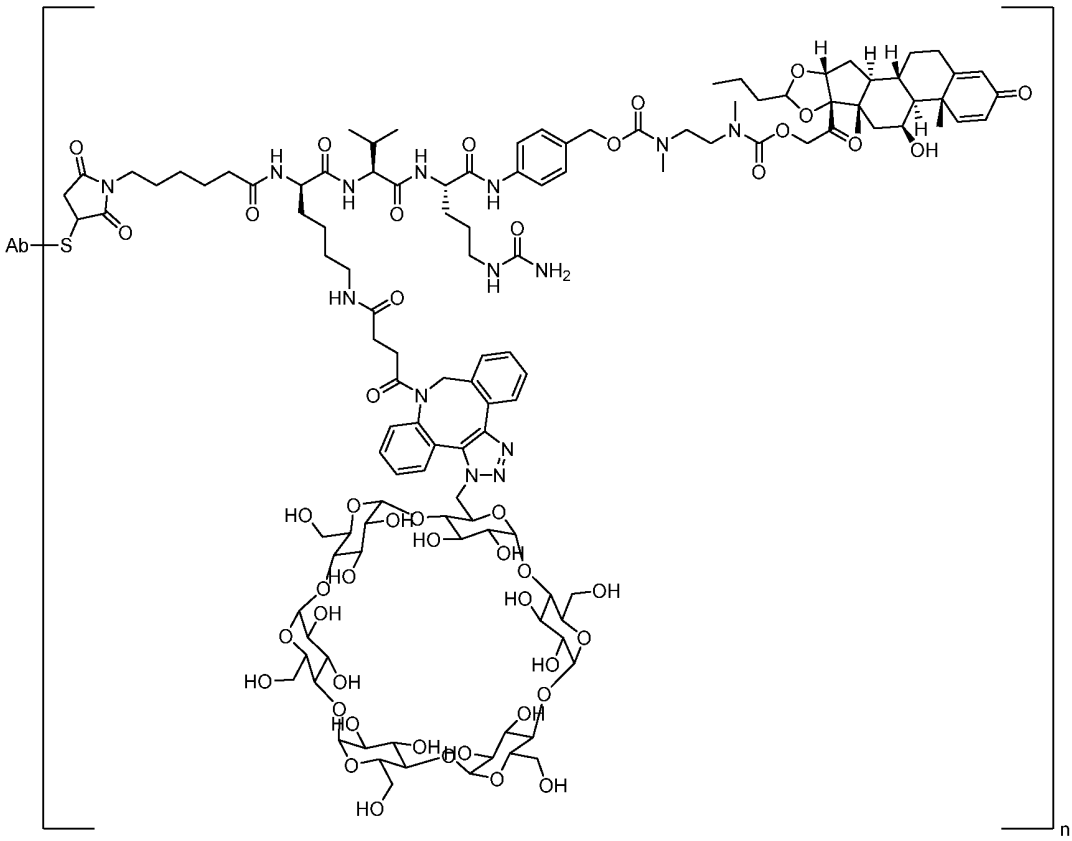
или стереоизомера, или смеси стереоизомеров;



или стереоизомера, или смеси стереоизомеров;



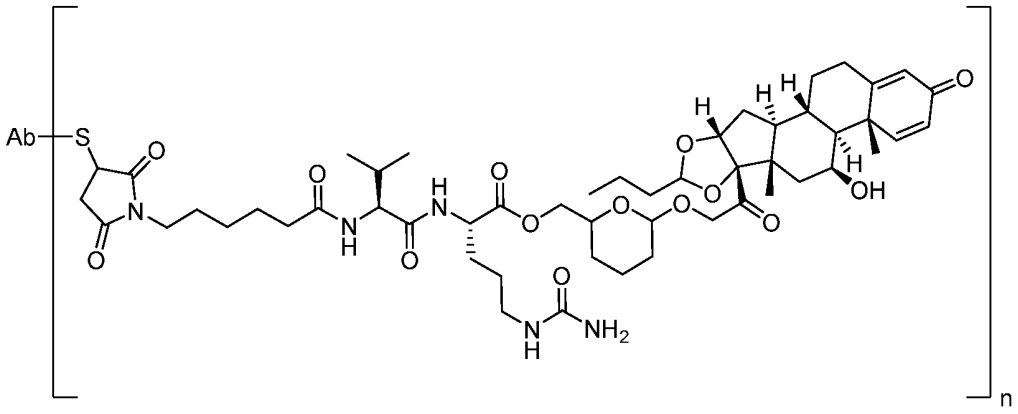




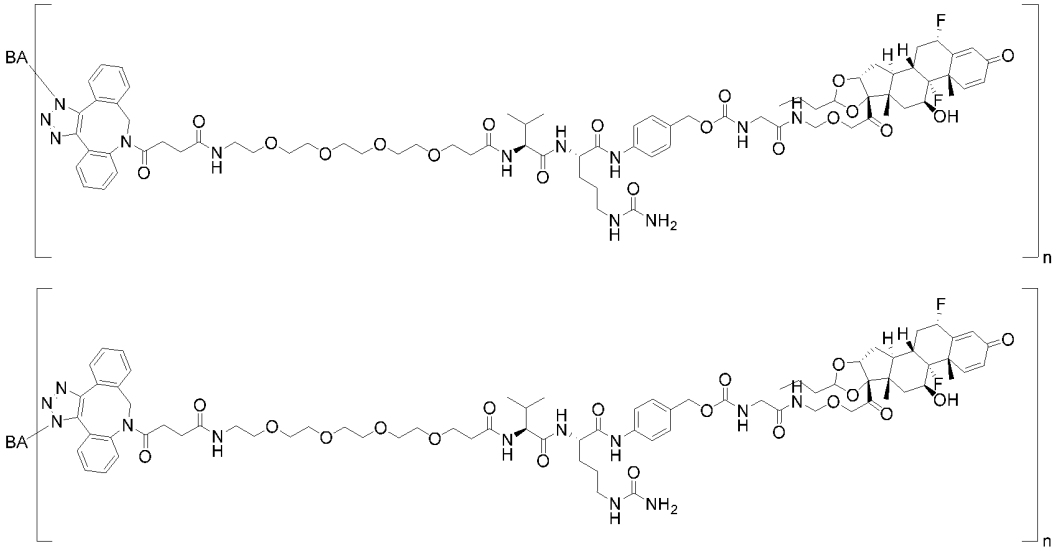
или их смеси



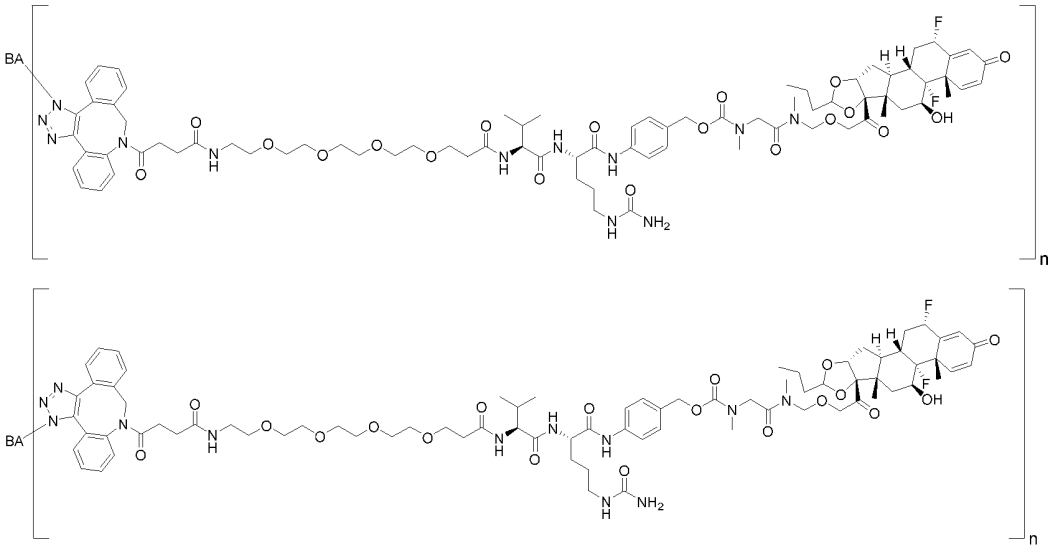
или их смеси



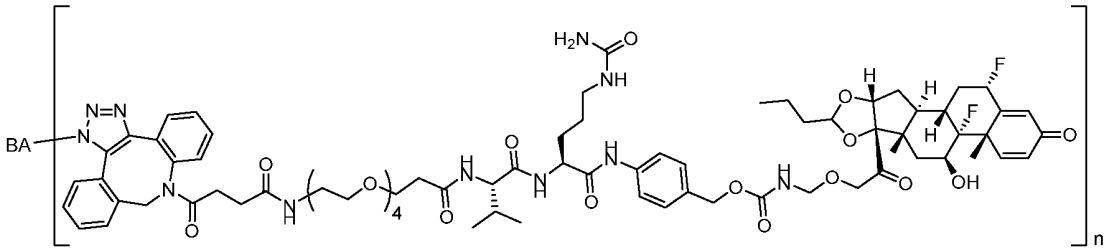
или стереоизомера, или смеси их стереоизомеров

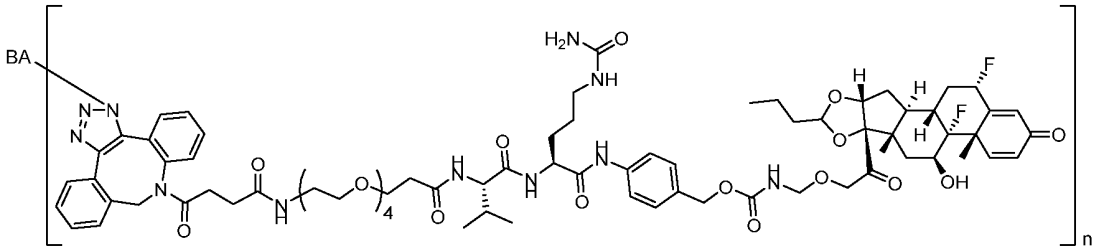


или их смеси

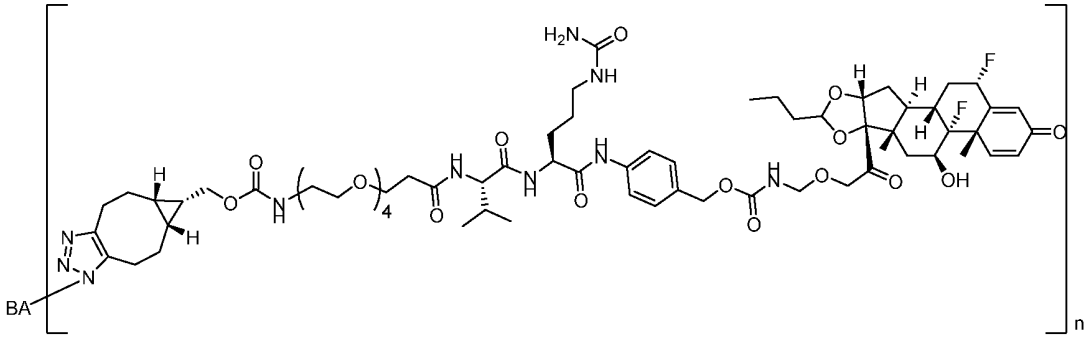


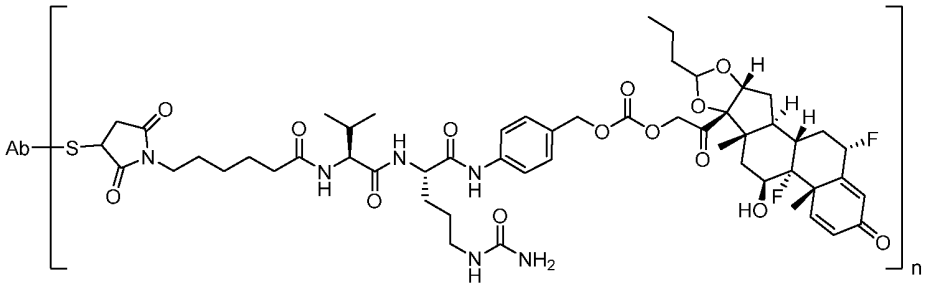
или их смеси

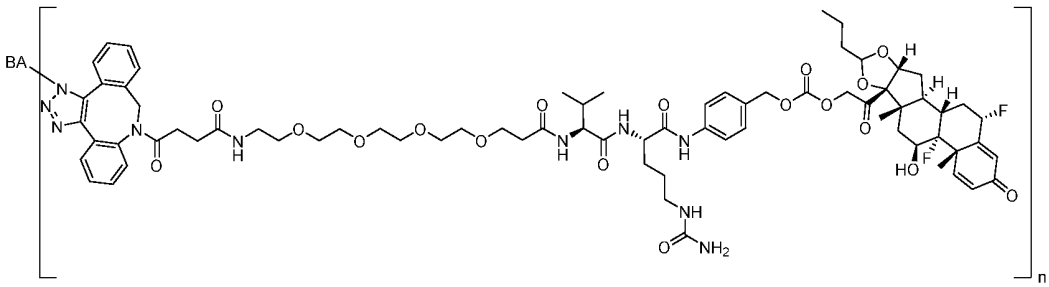


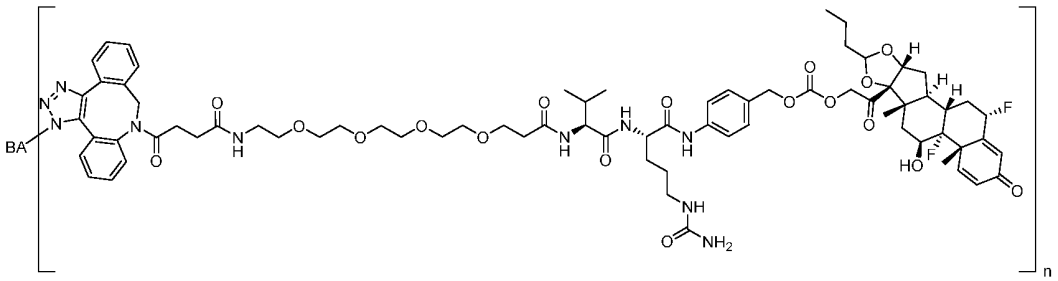


или их смеси

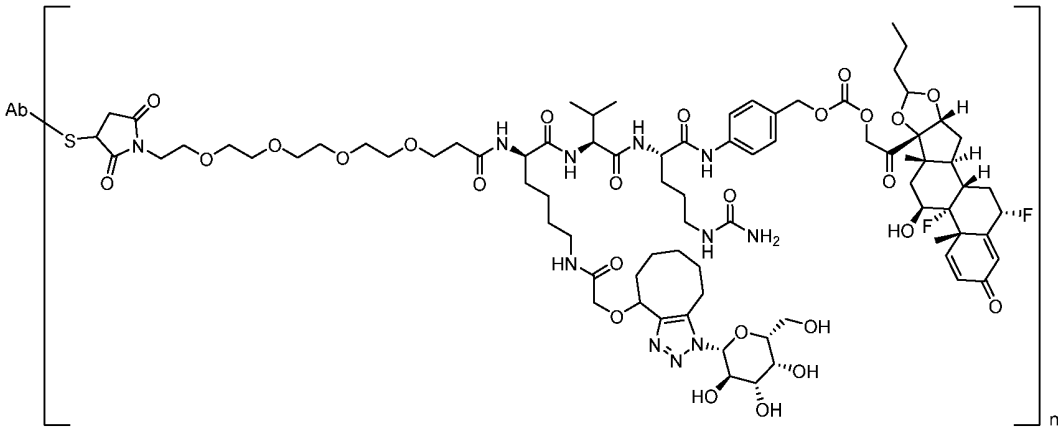


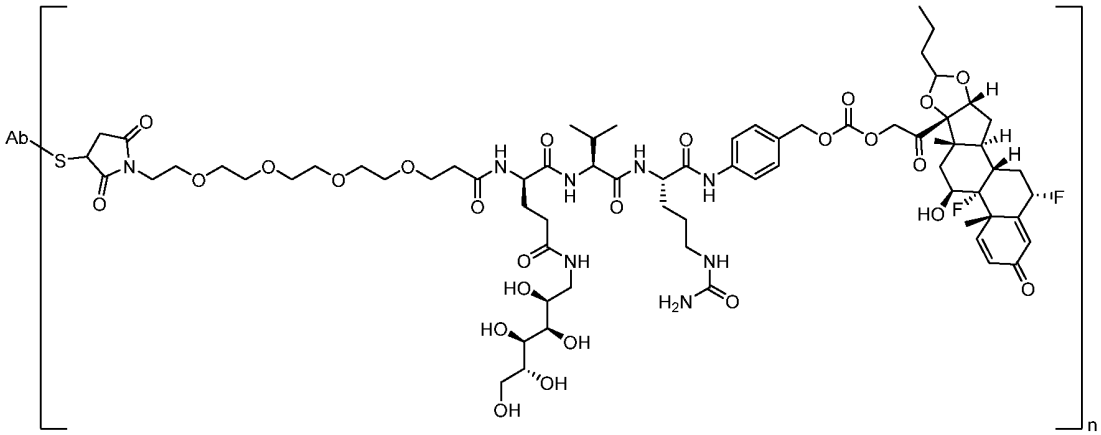


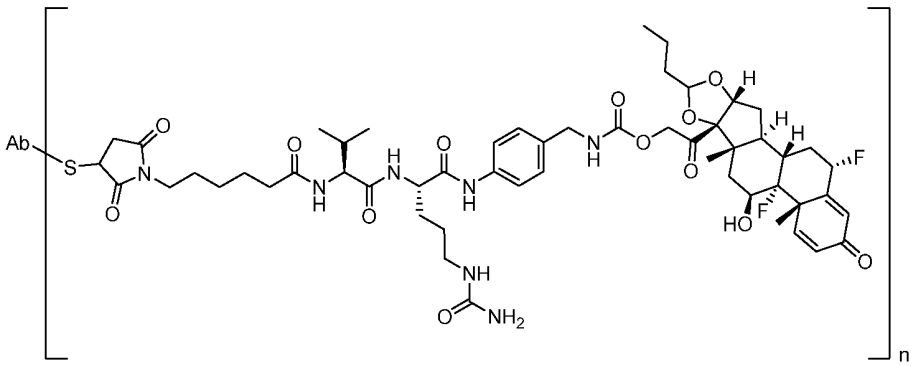


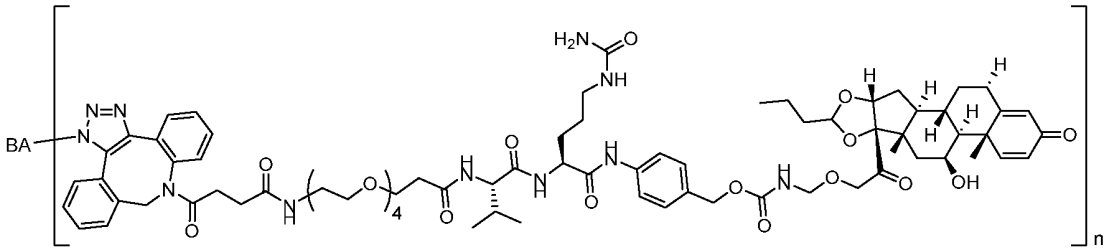


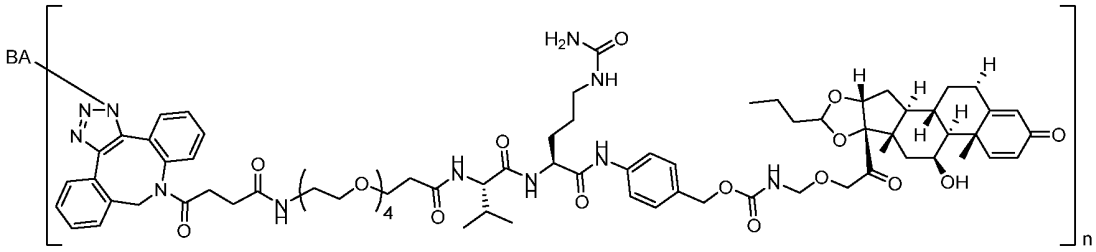
или их смеси



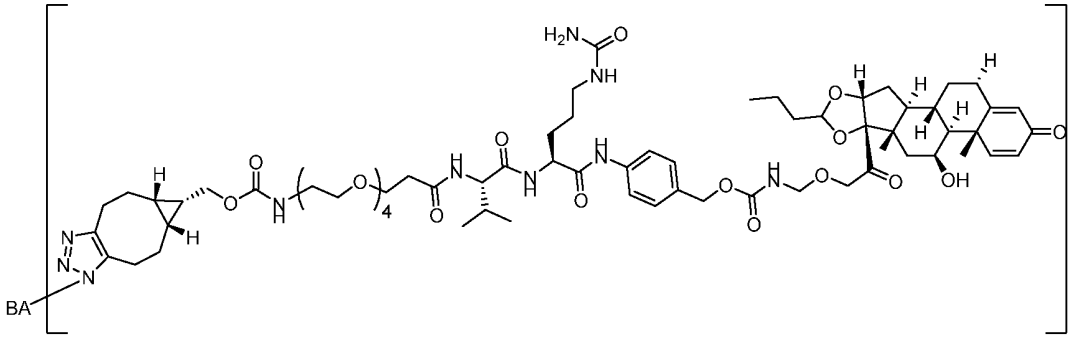


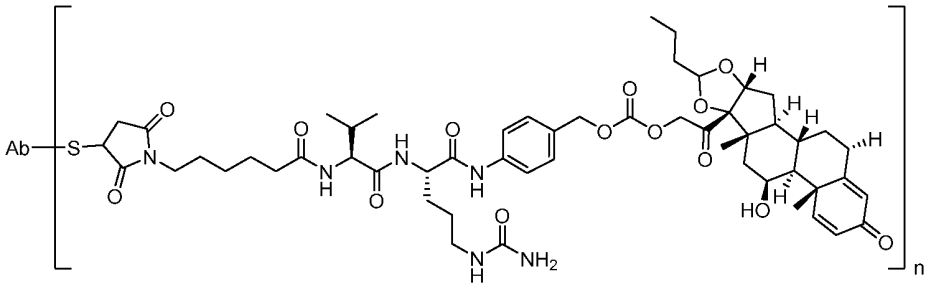


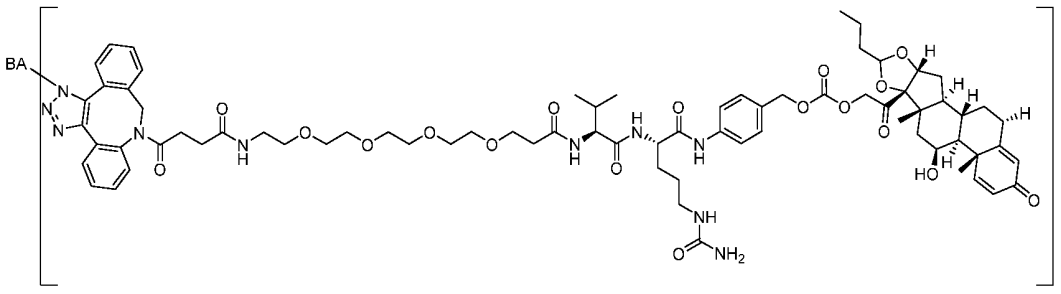


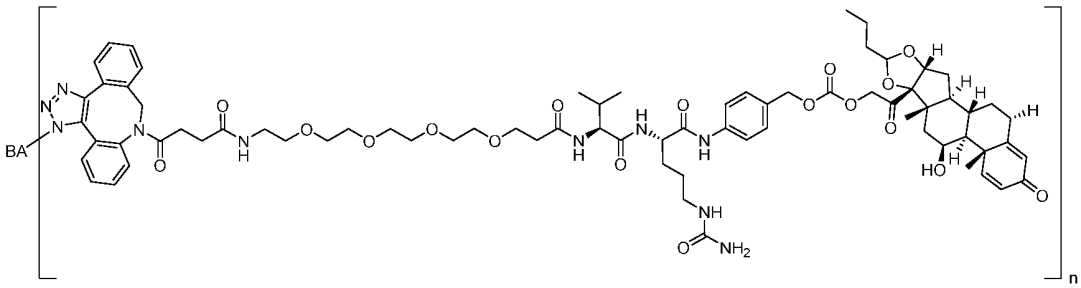


или их смеси

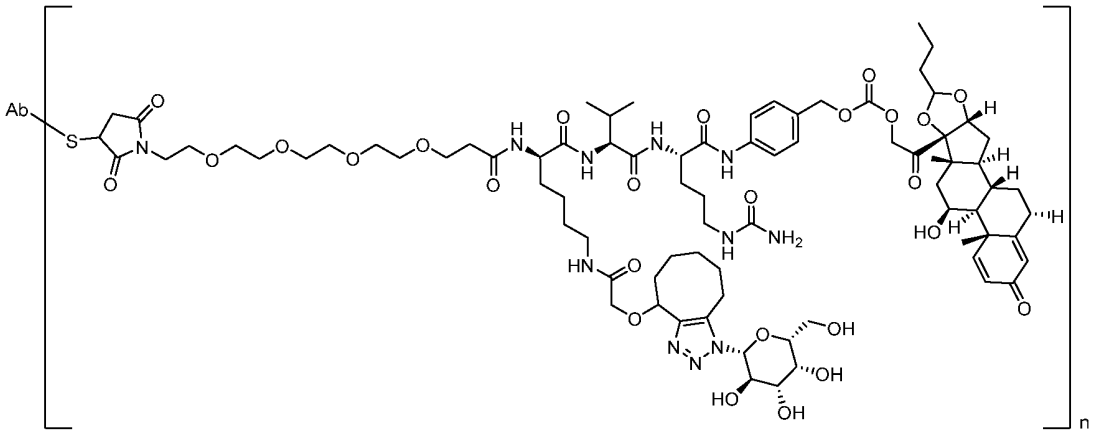


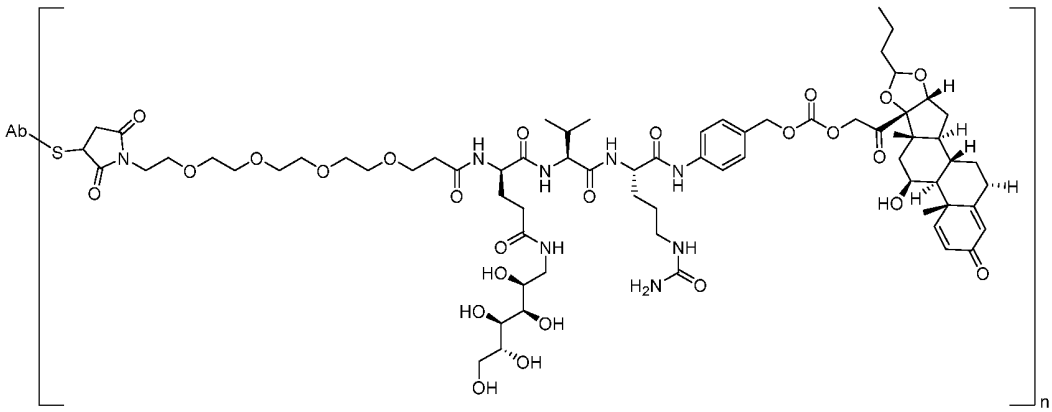


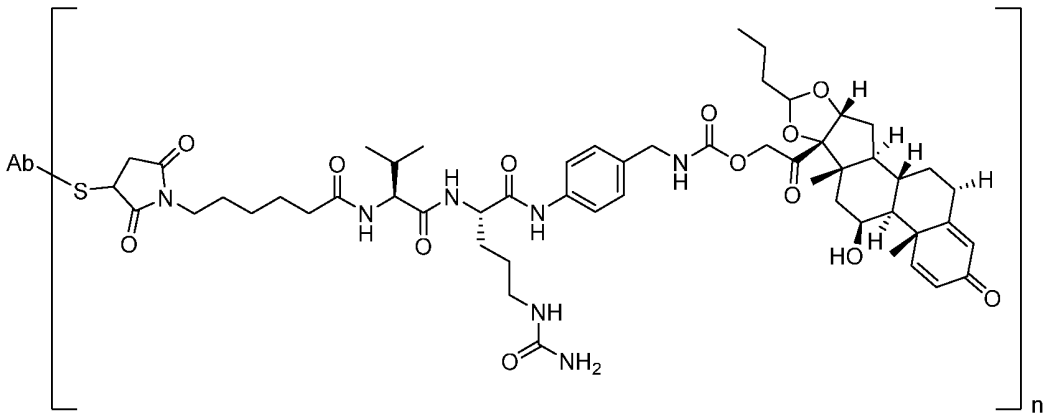


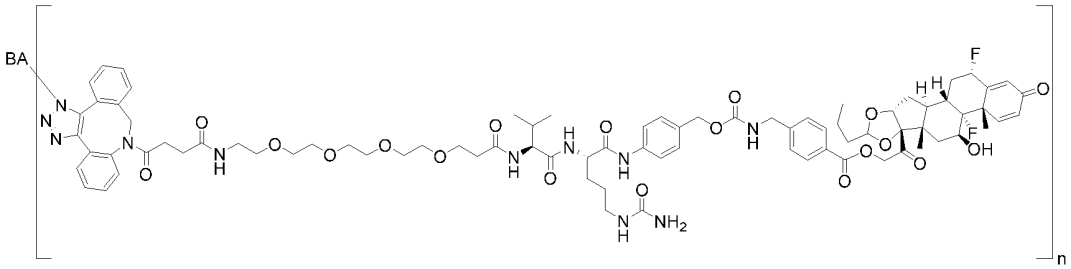


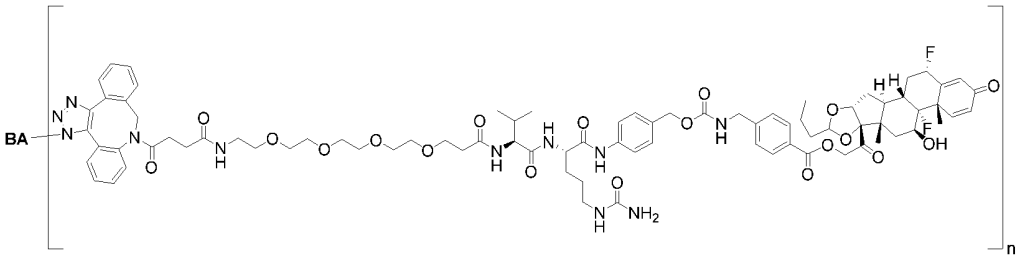
или их смеси



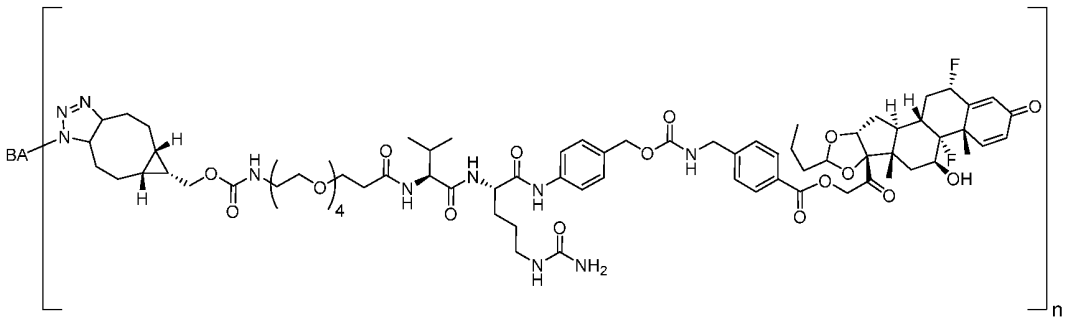


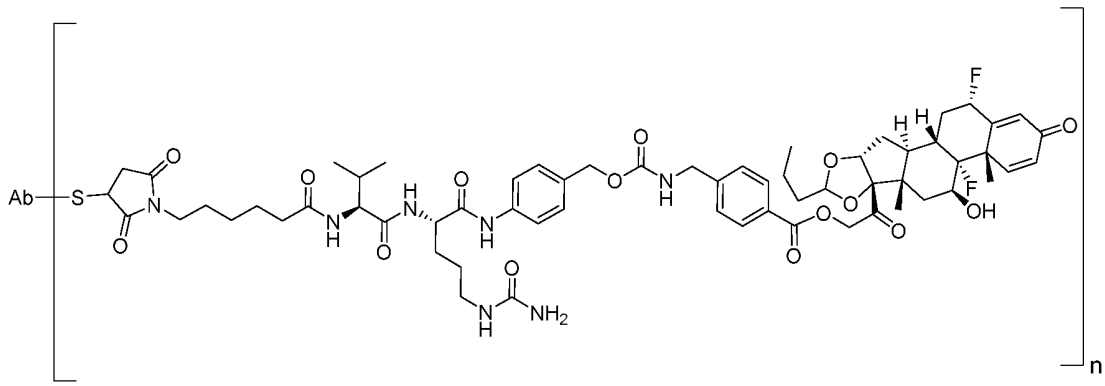


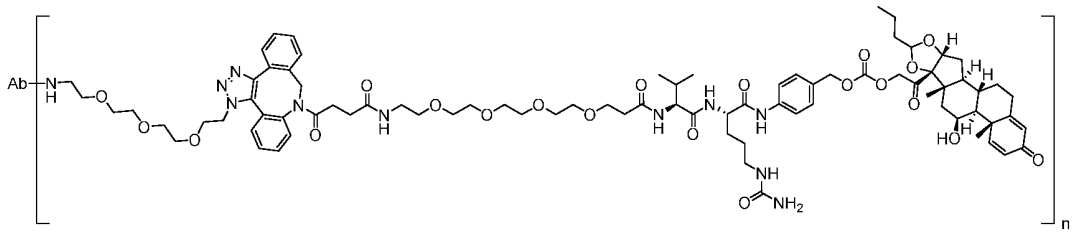


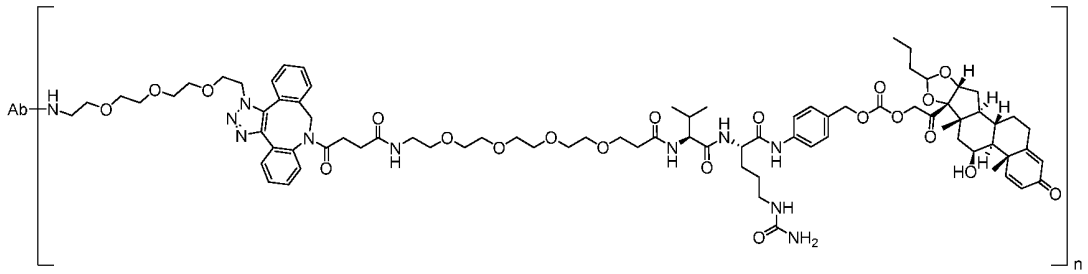


или их смеси

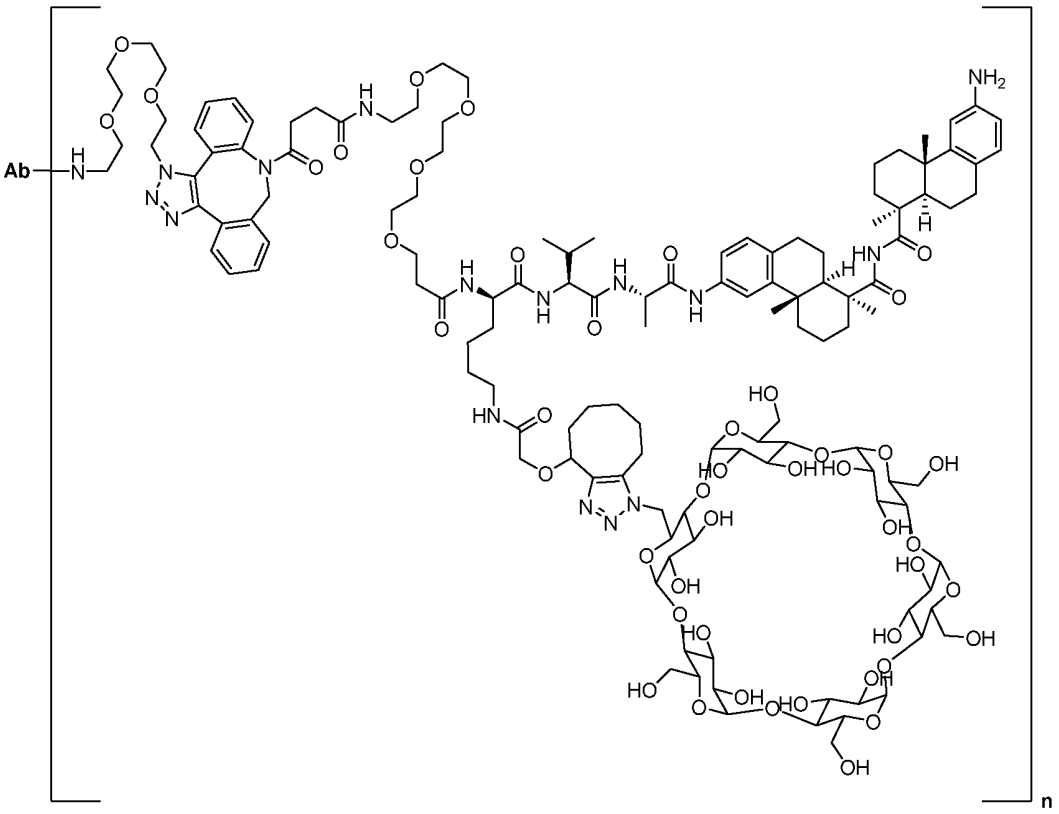


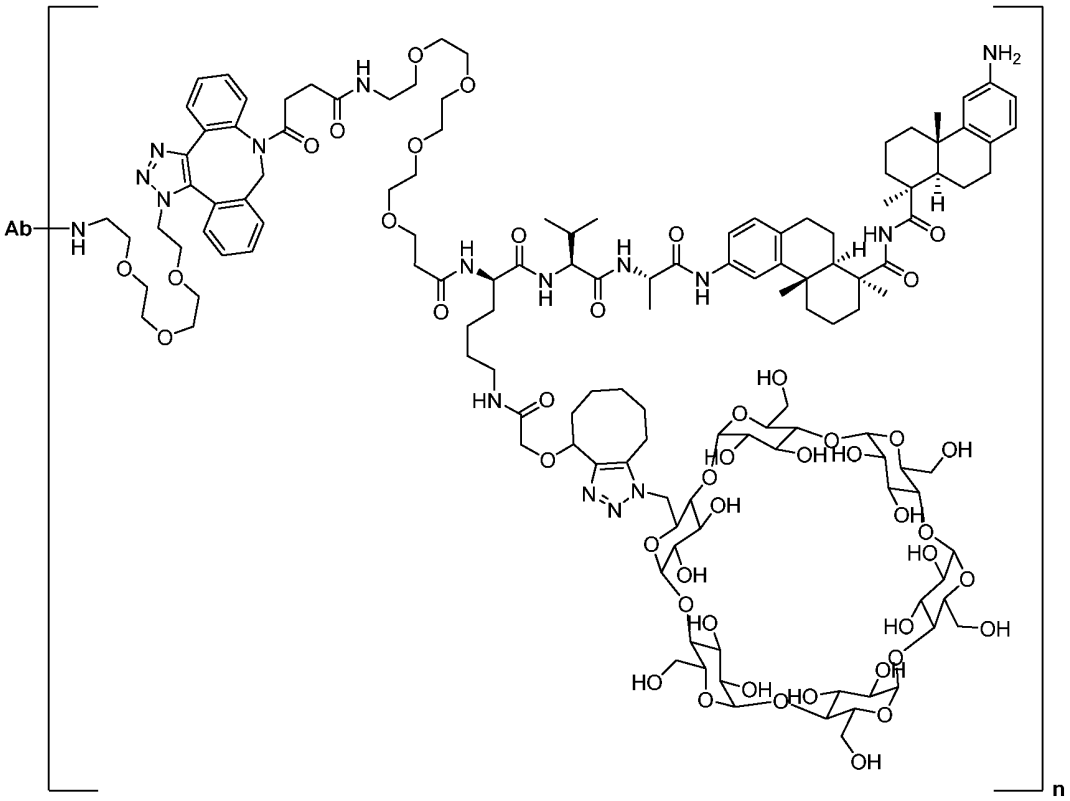


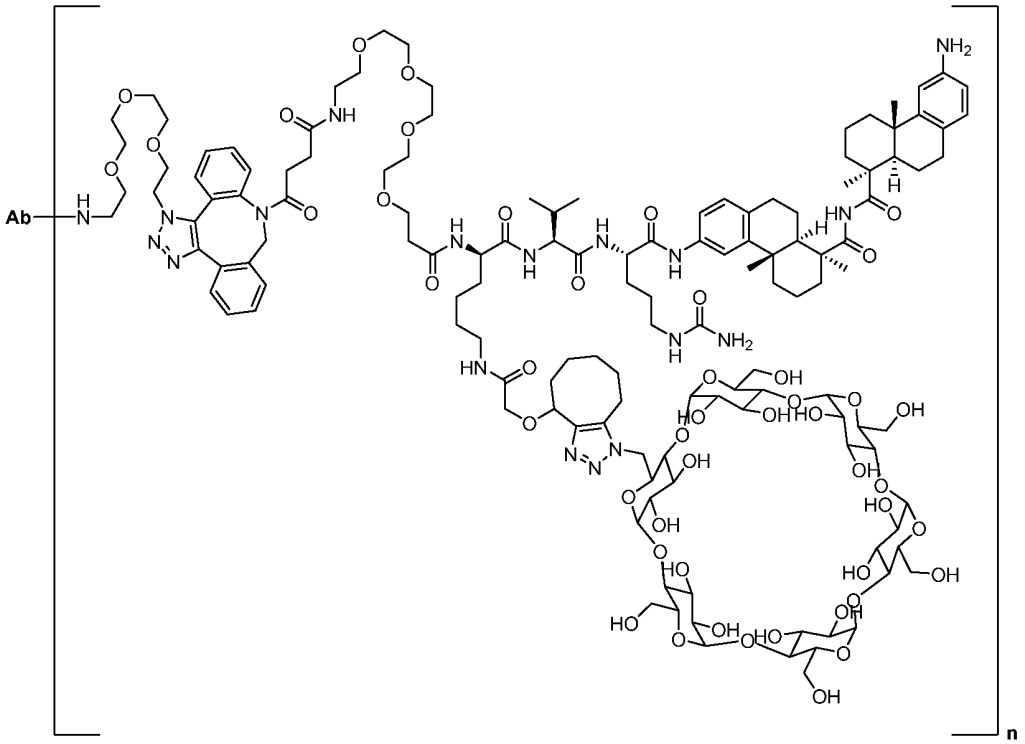


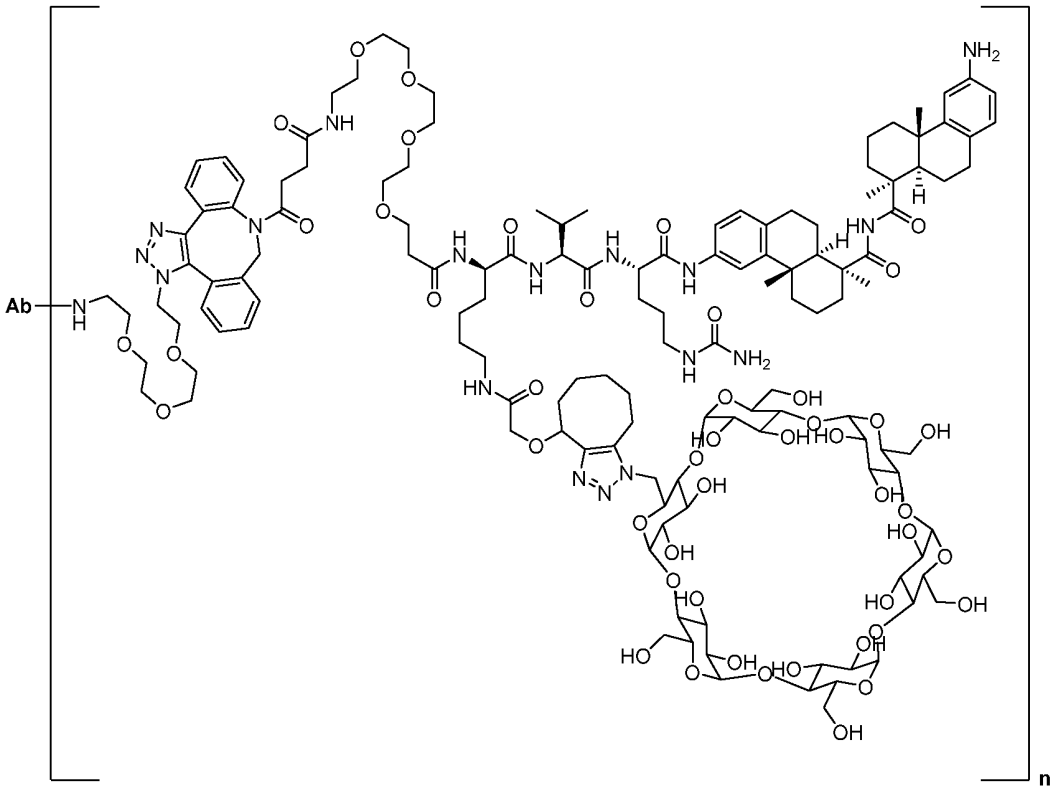


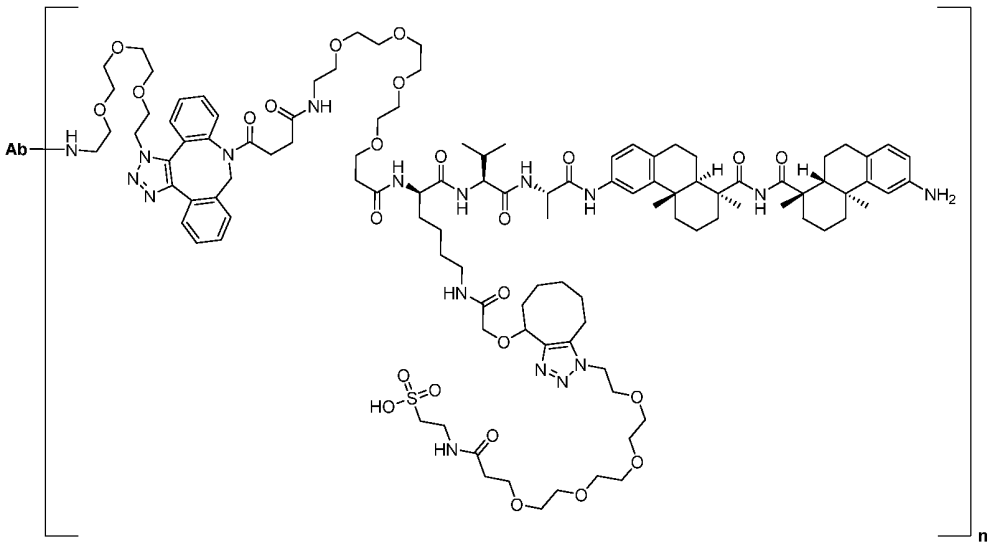
или их смеси;

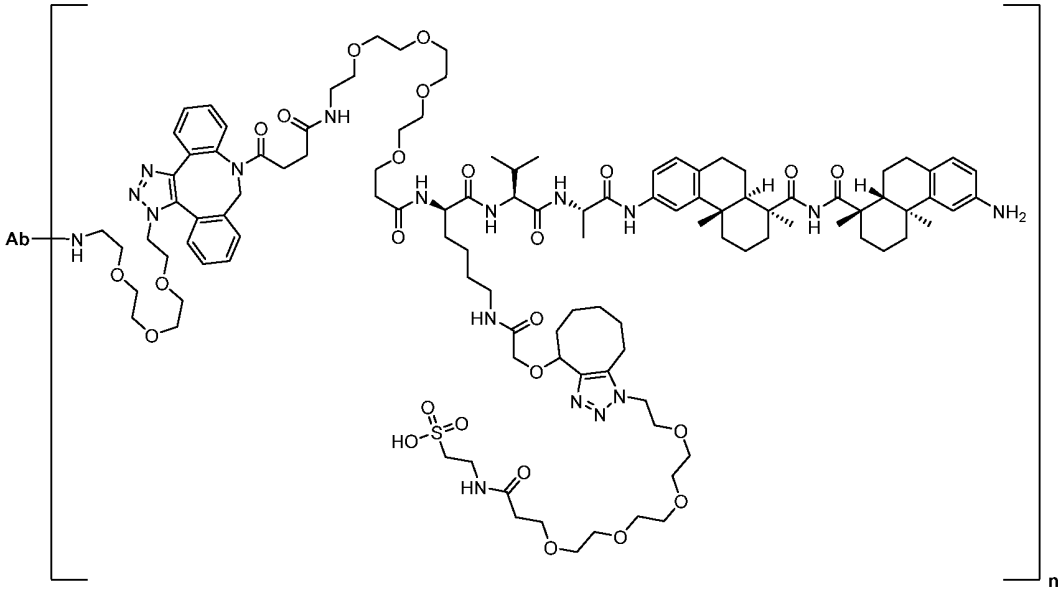


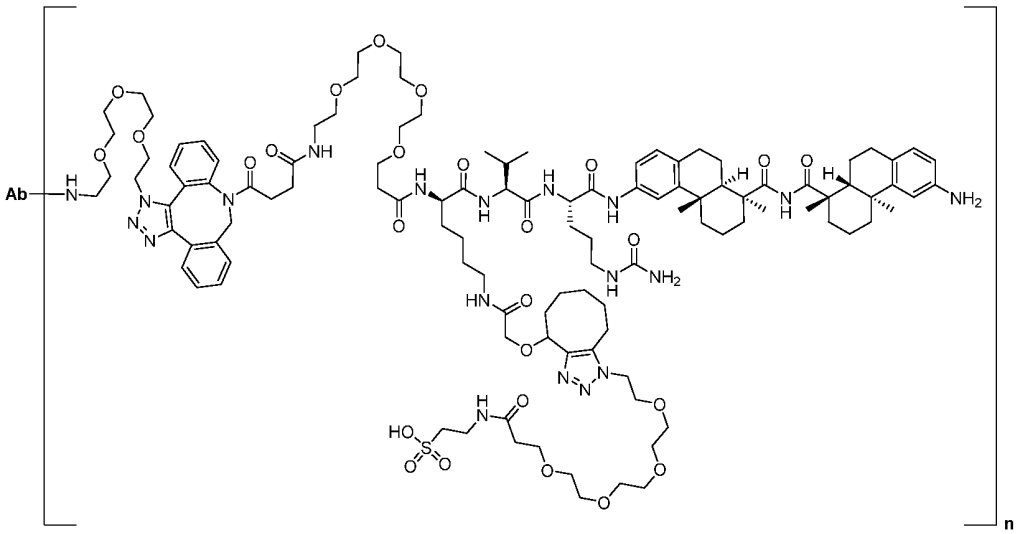


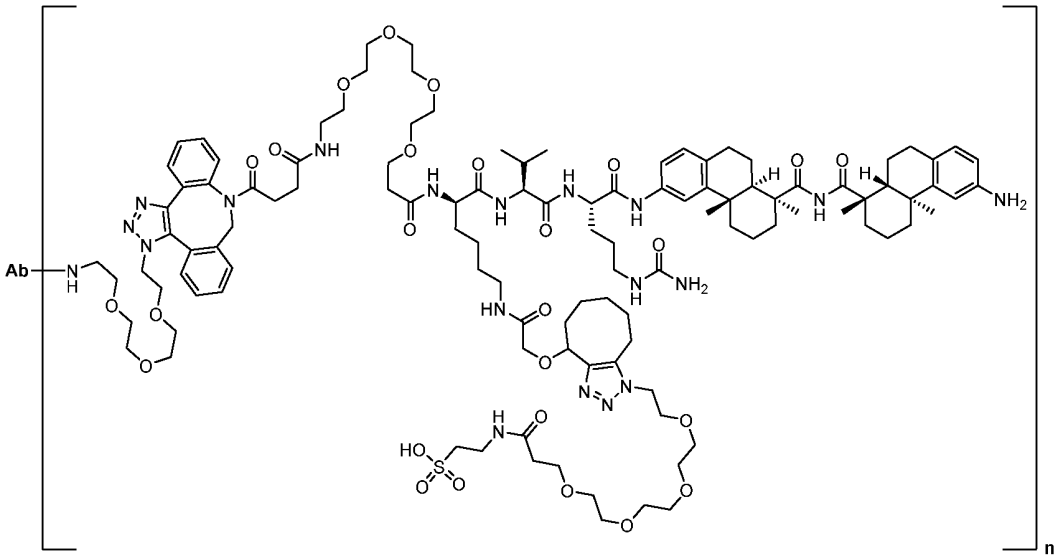


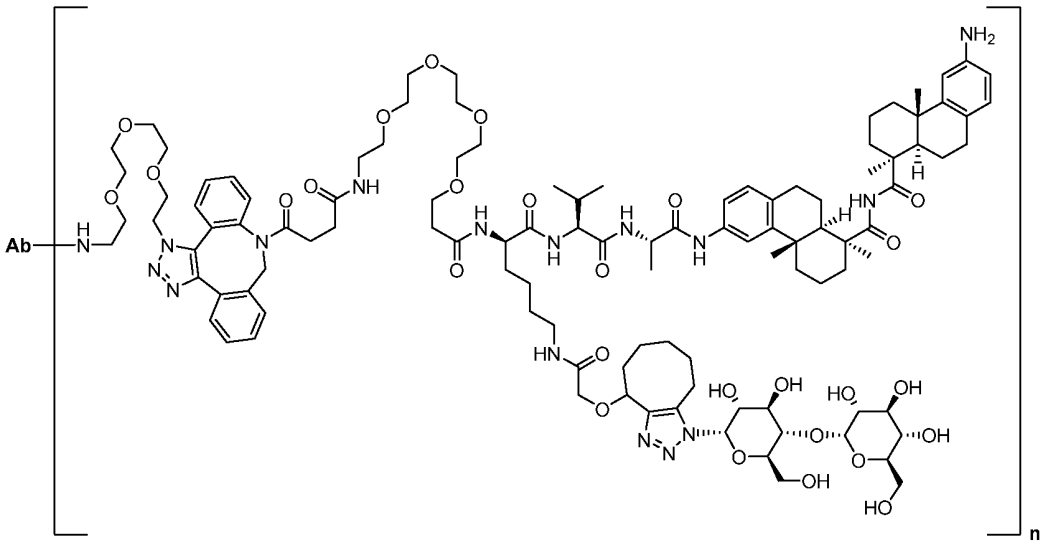


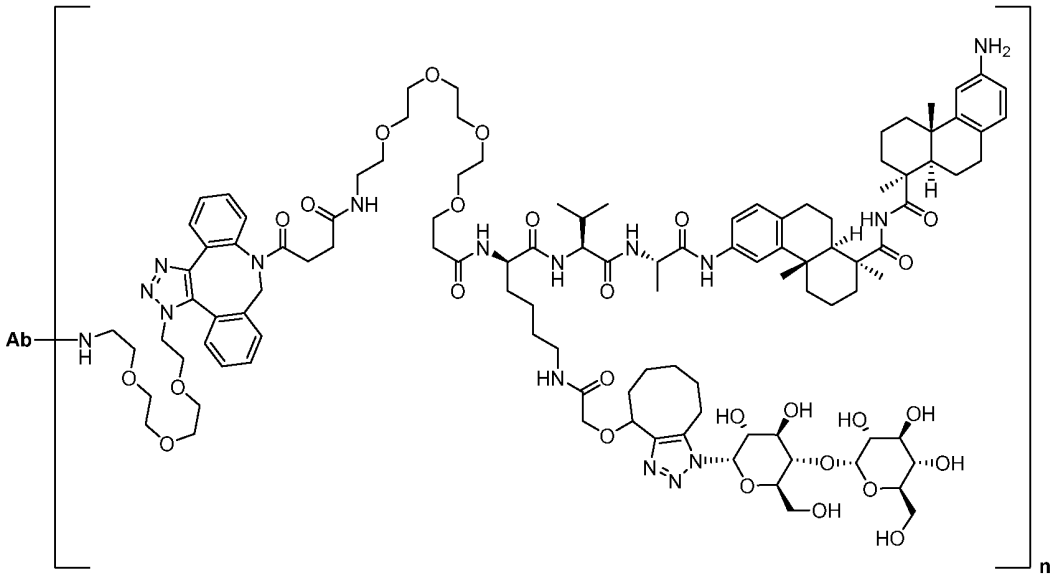


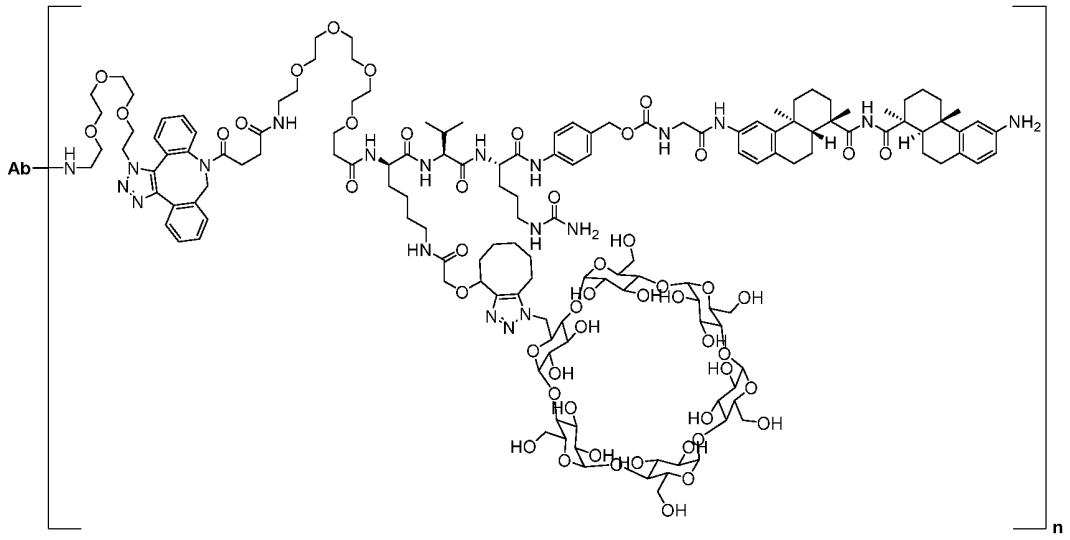


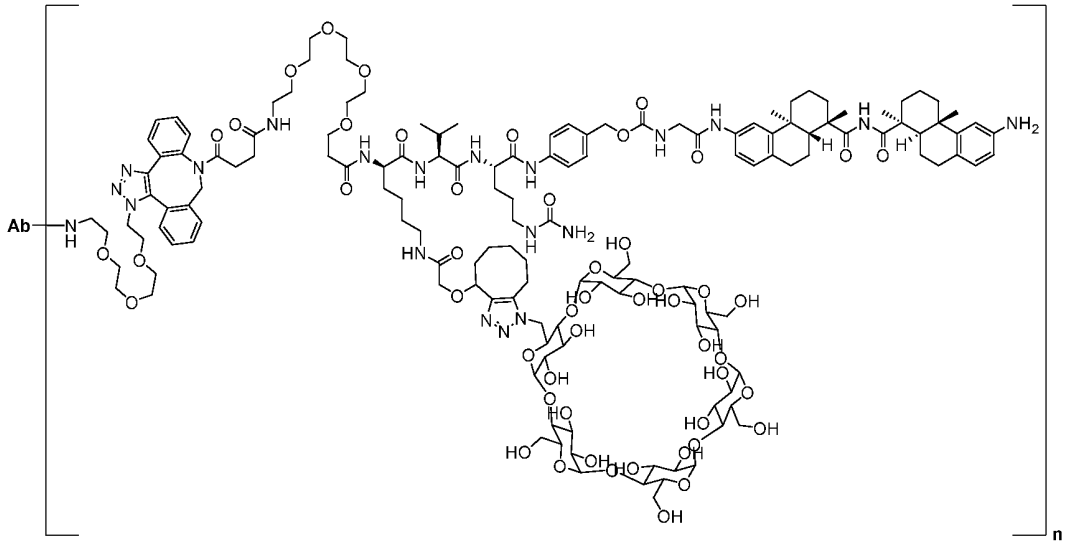


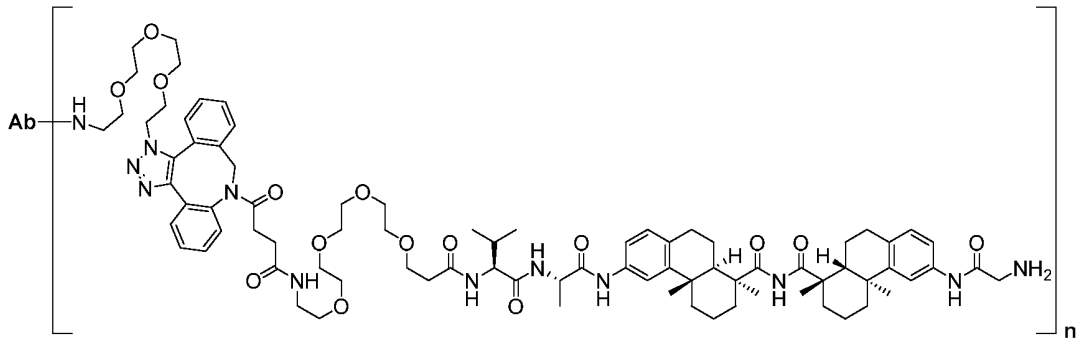


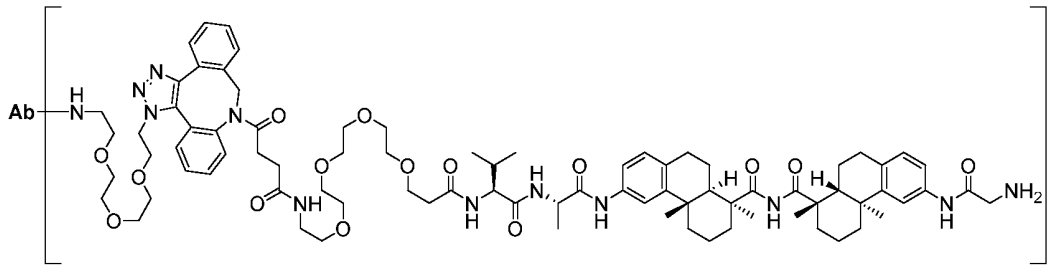


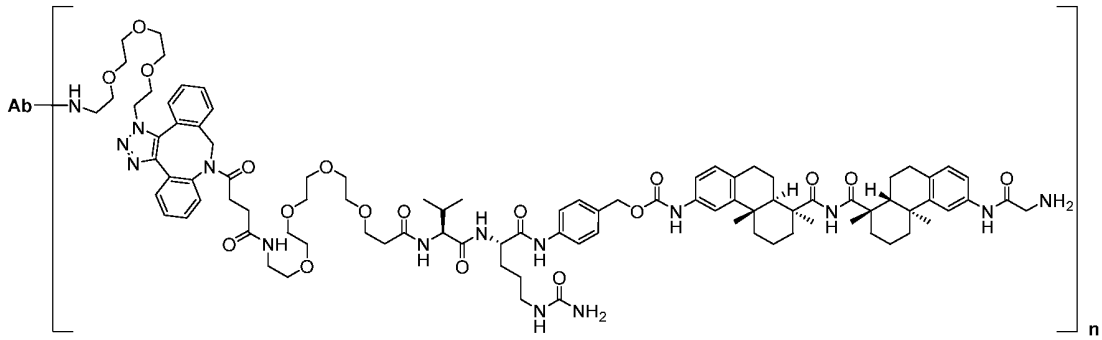


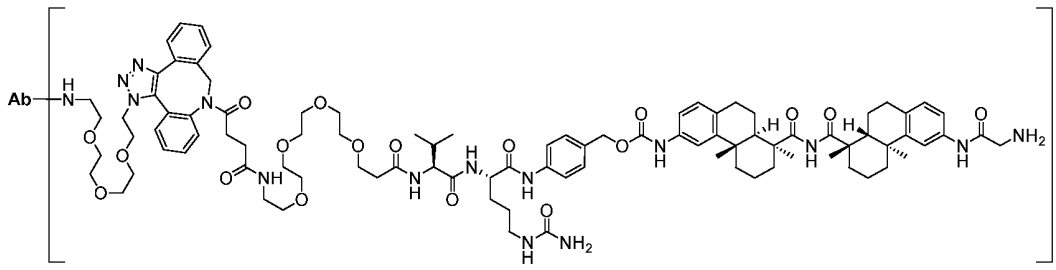


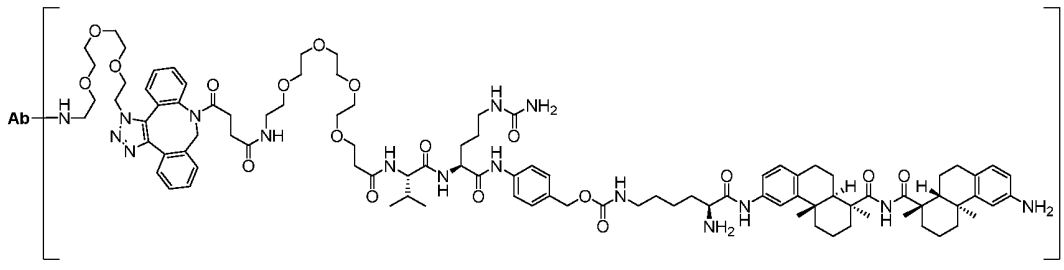


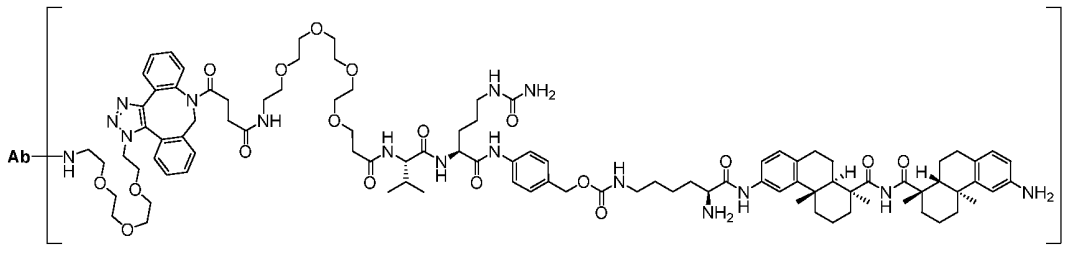


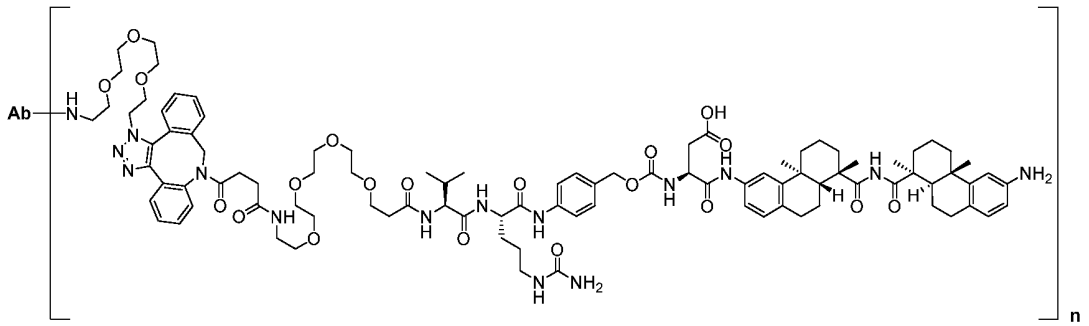


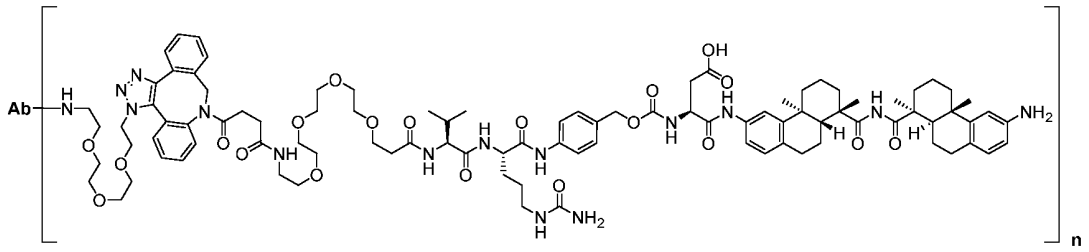


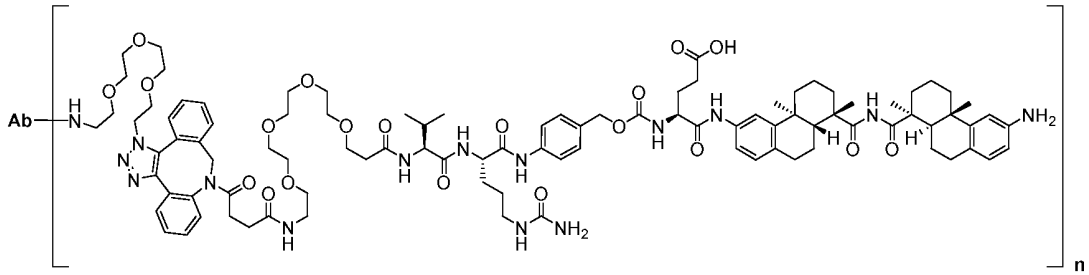


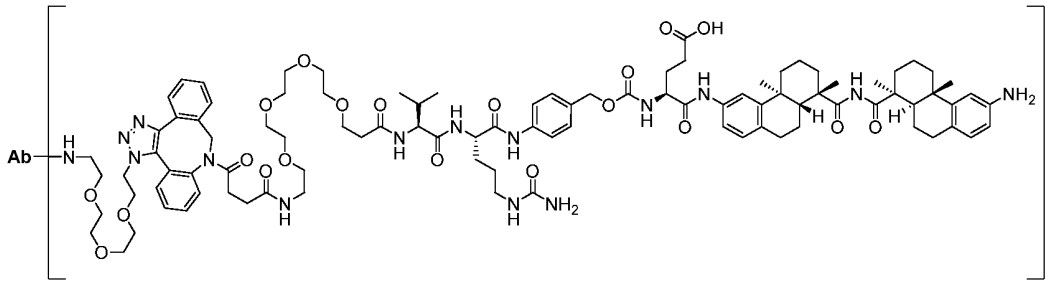


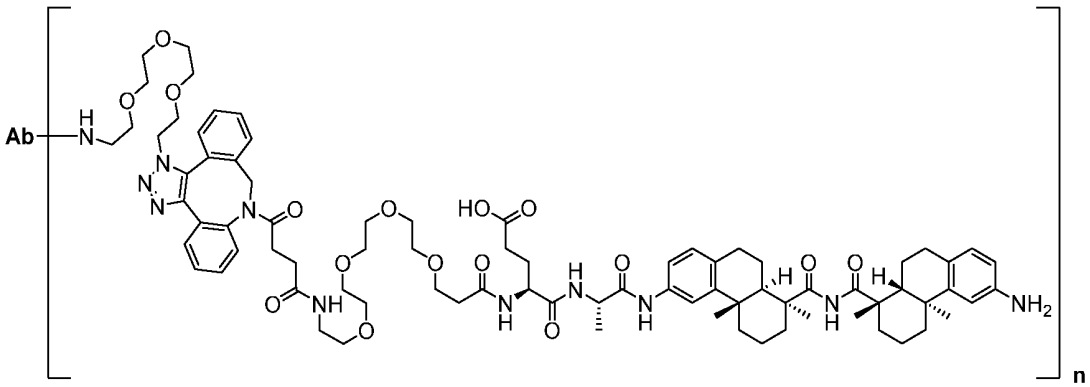


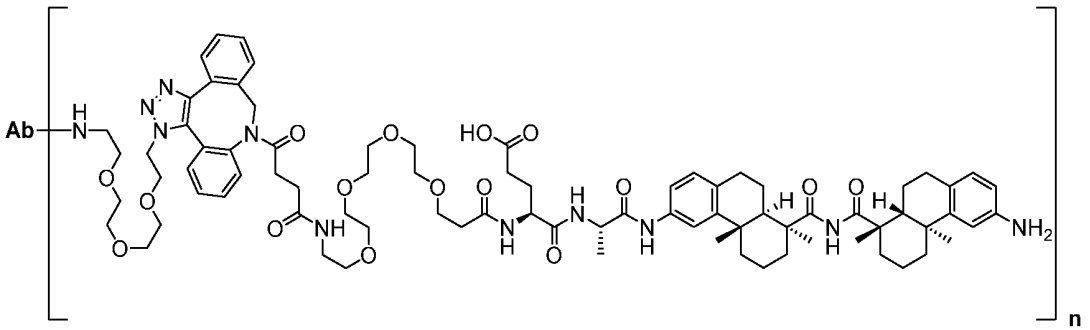


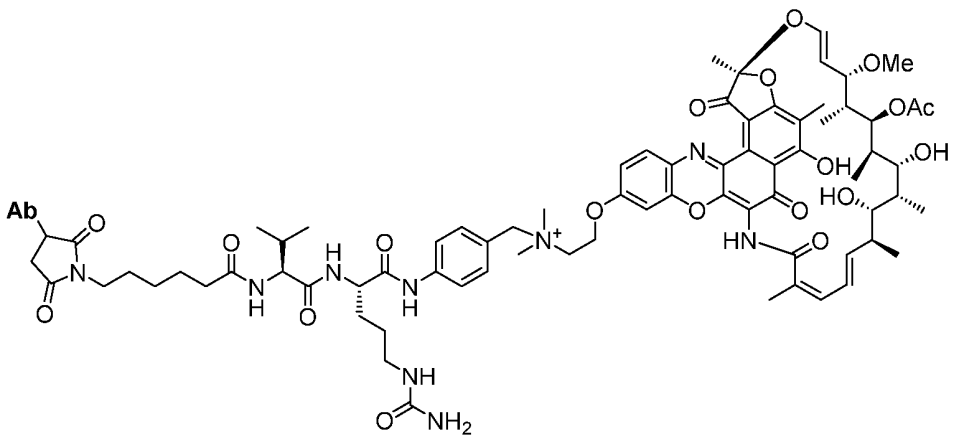


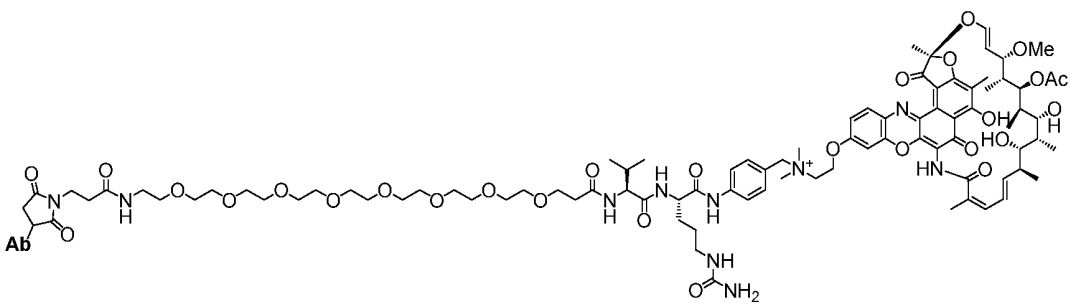






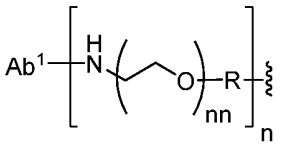






или его стереоизомерной формы, или региоизомера, или смеси региоизомеров, где

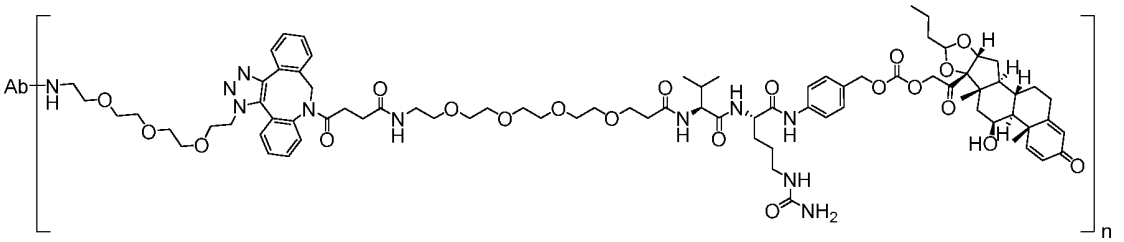
каждый **Ab** представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент;

каждый **BA** представляет собой  , где **Ab**^{1} представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент; **R** представляет собой C_{2-4}-алкилен; и **nn** представляет собой целое число, которое выбирается от 2 до 4, включительно.

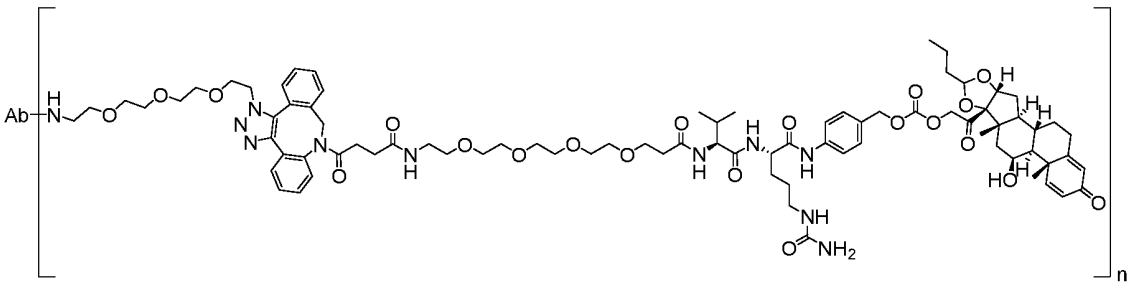
и

каждый **n** представляет собой целое число от 1 до 4.

52. Конъюгат антитело-лекарственное средство, которы выбирается из:



, и



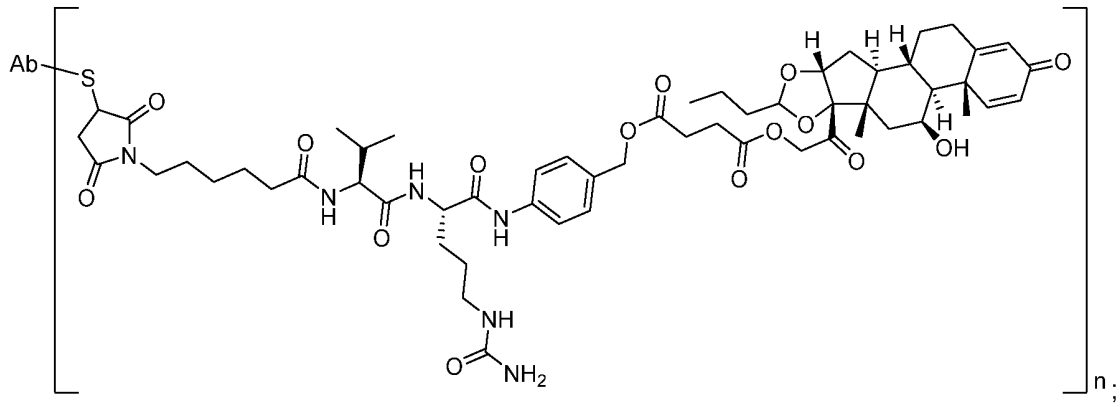
или их смеси;

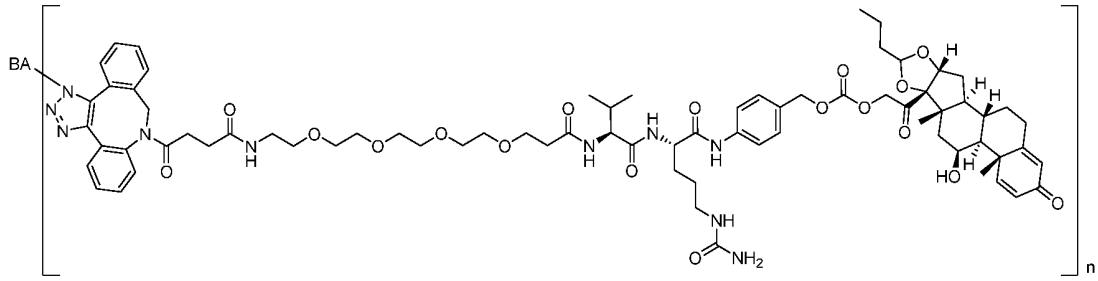
или его стереоизомерной формы, или региоизомера, или смеси региоизомеров, где

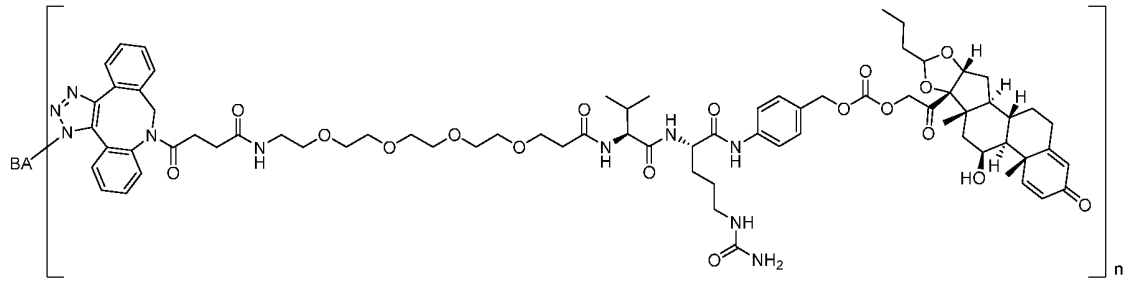
каждый Ab представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент; и

каждый n представляет собой целое число от 1 до 4.

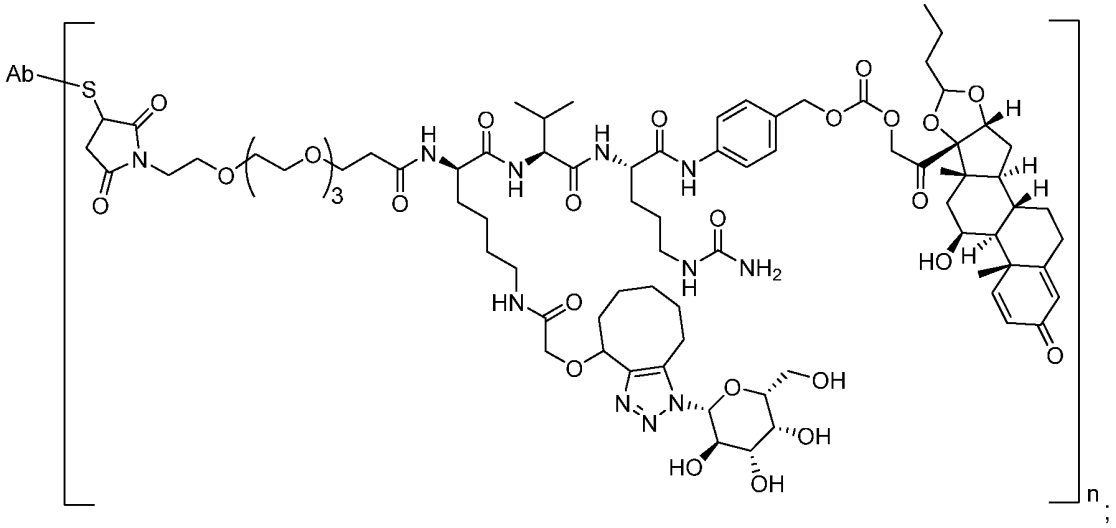
53. Конъюгат антитело-лекарственное средство согласно одной из следующих формул:

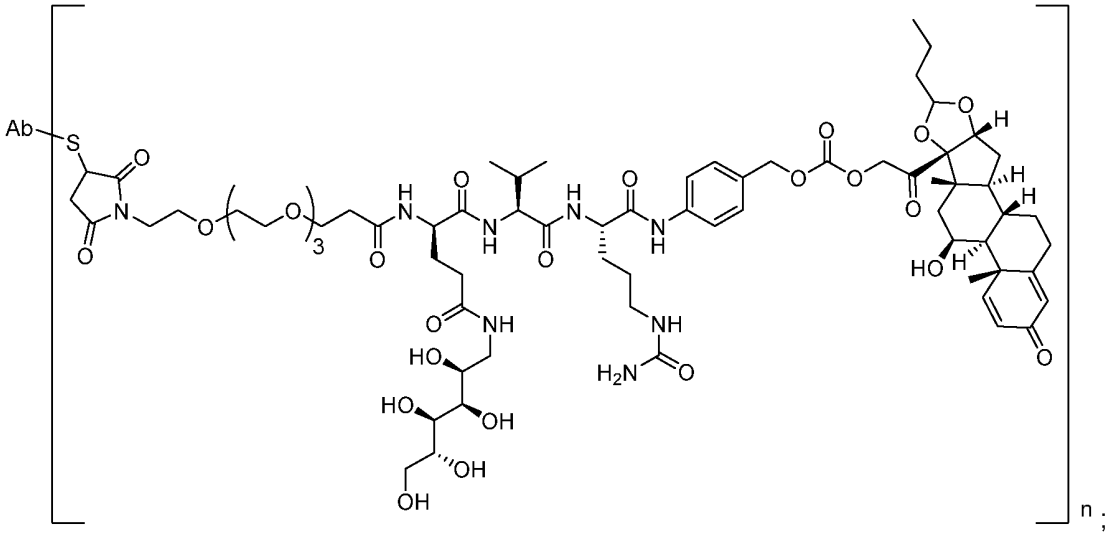


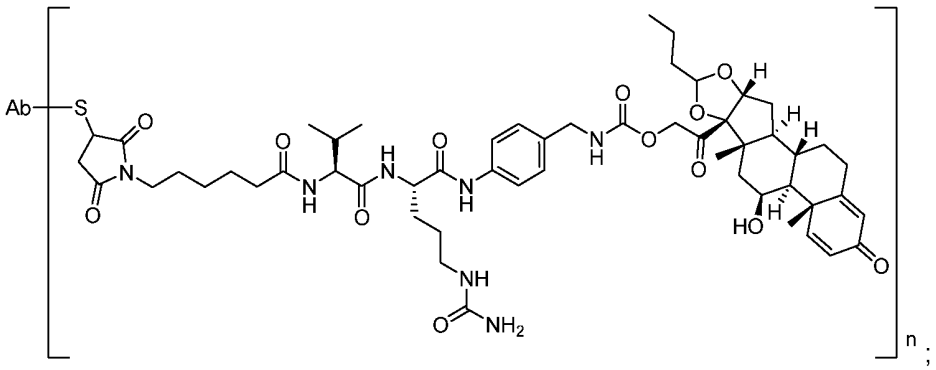


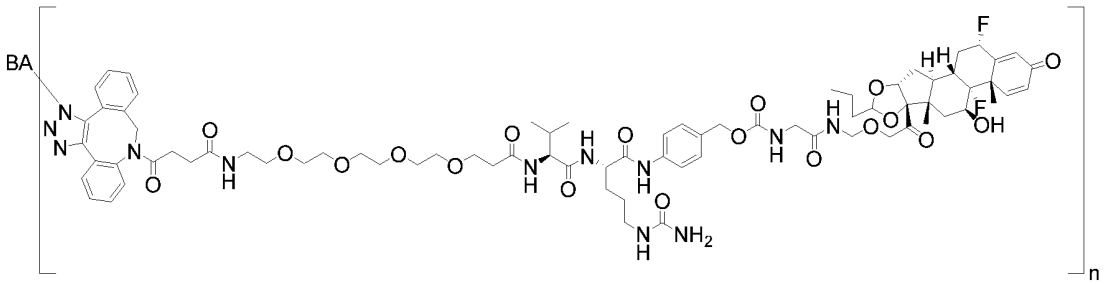


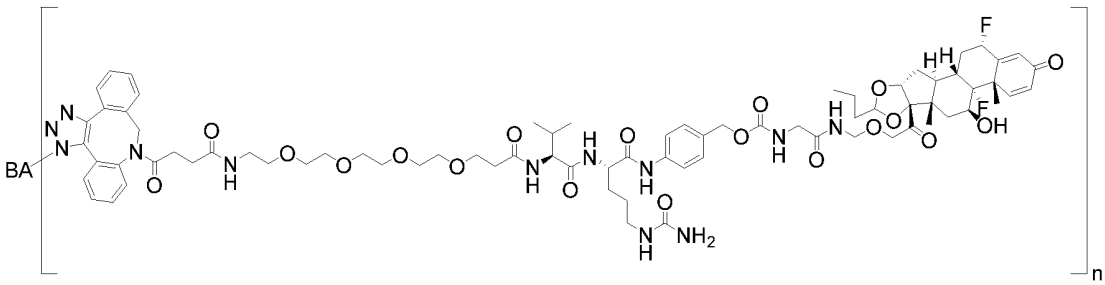
или их смеси;

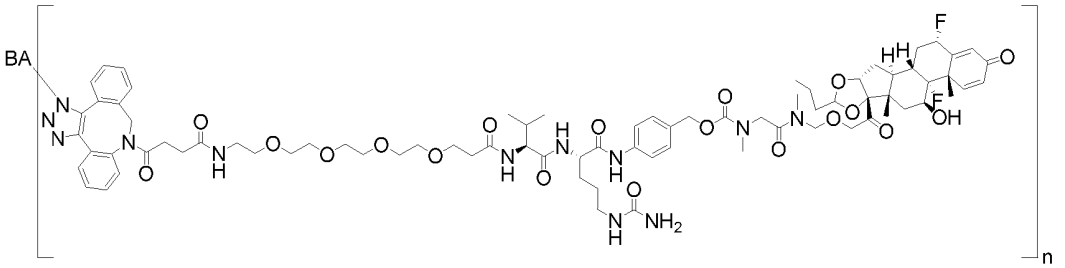


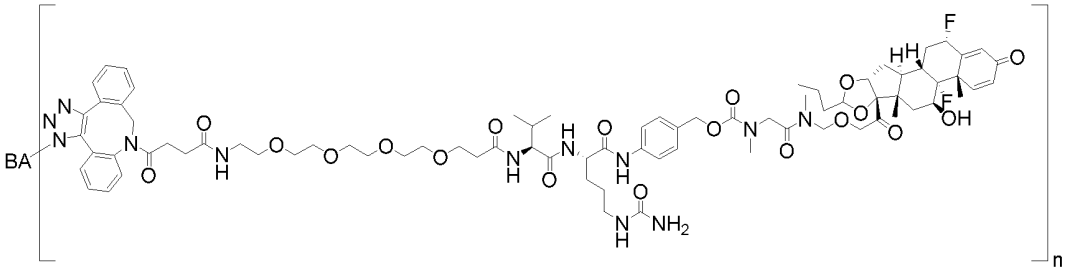




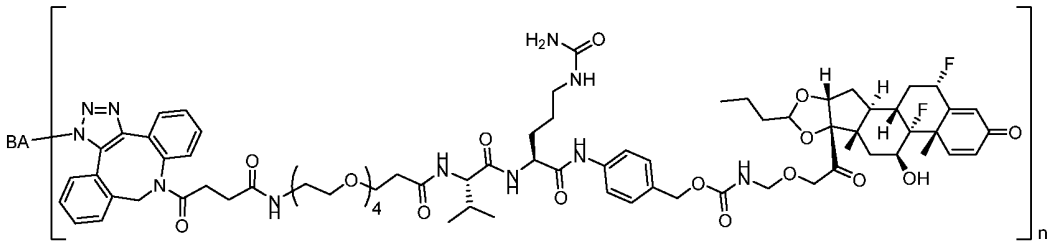


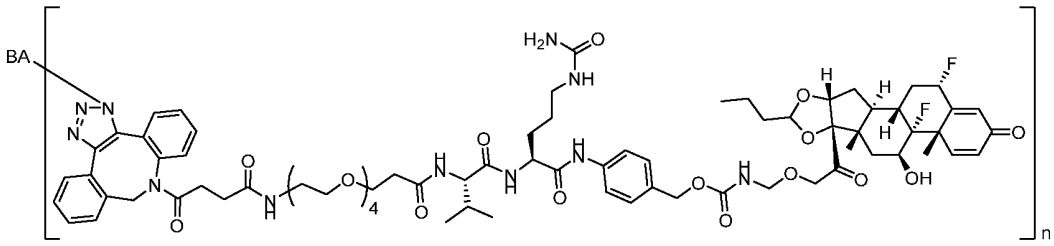




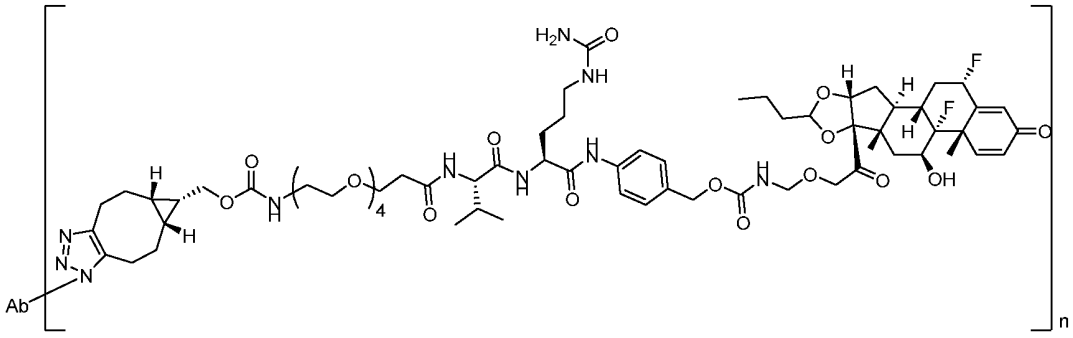


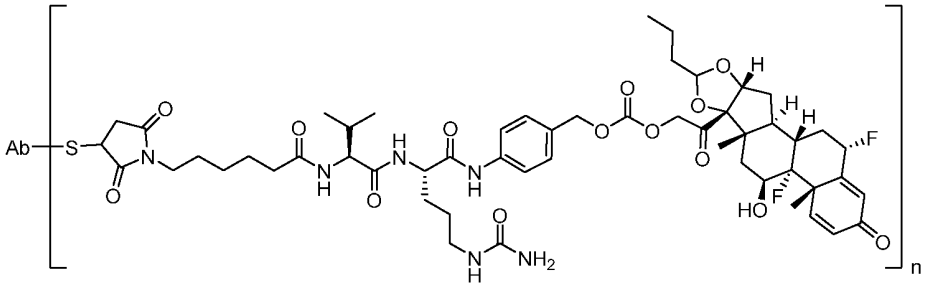
или их смеси,

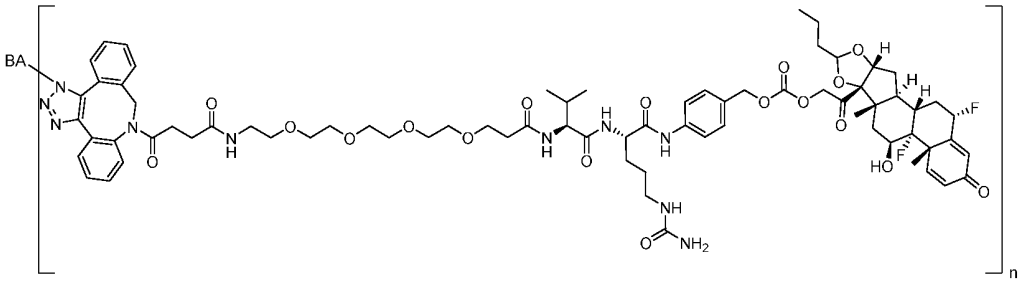


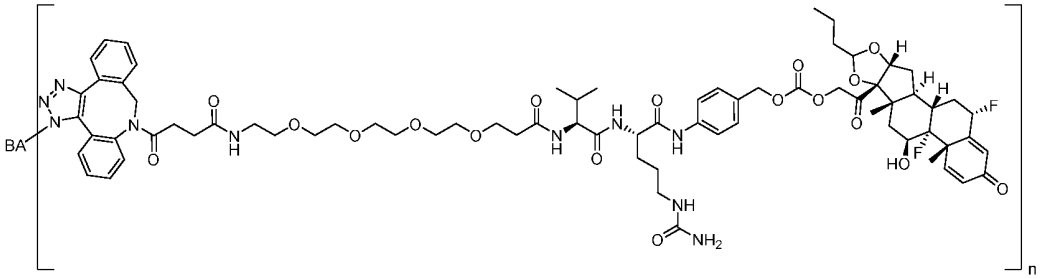


или их смеси

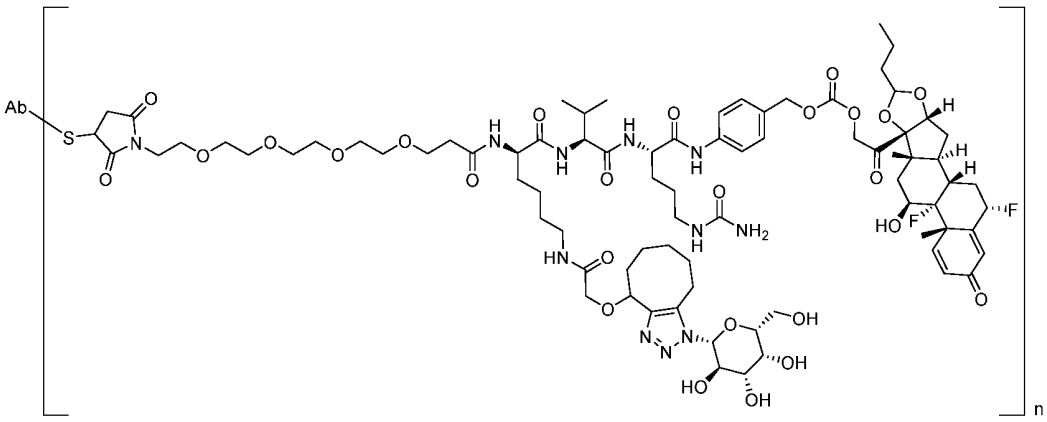


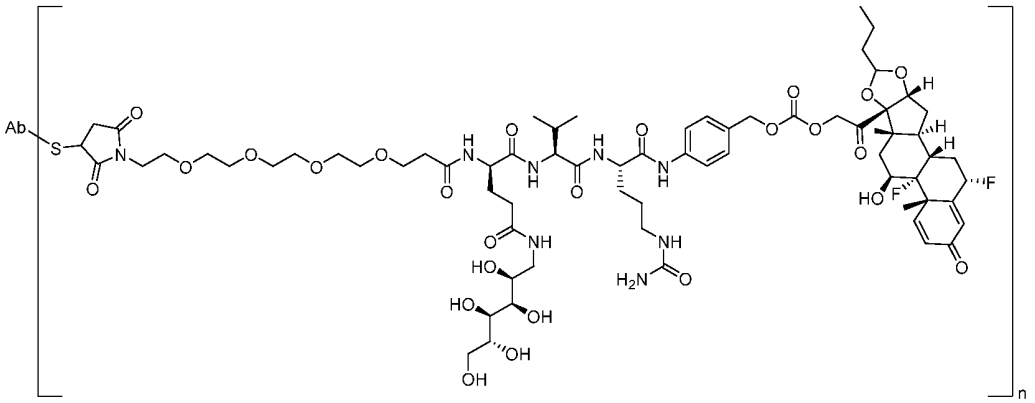


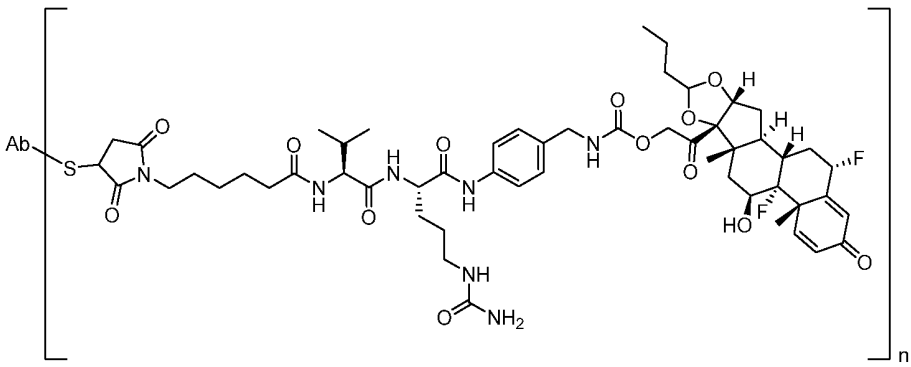


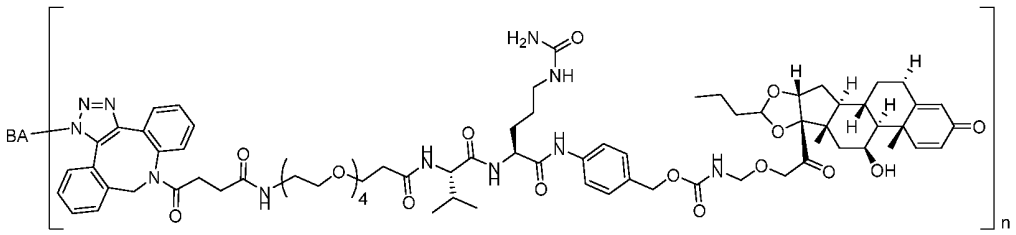


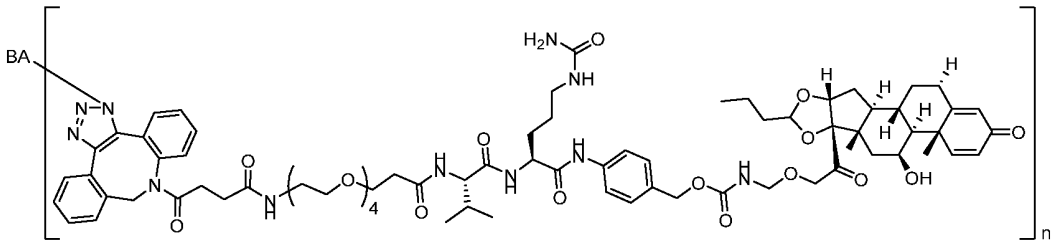
или их смеси



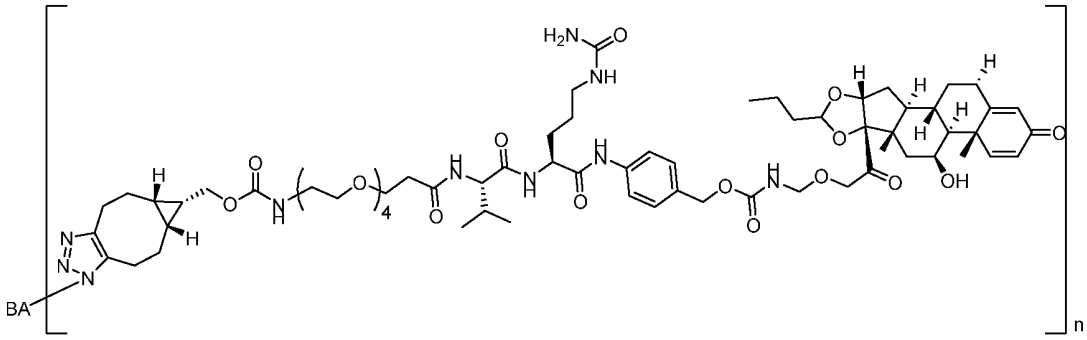






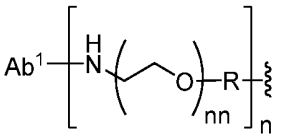


или их смеси



или его стереоизомерная форма, или региоизомер, или смесь региоизомеров, где

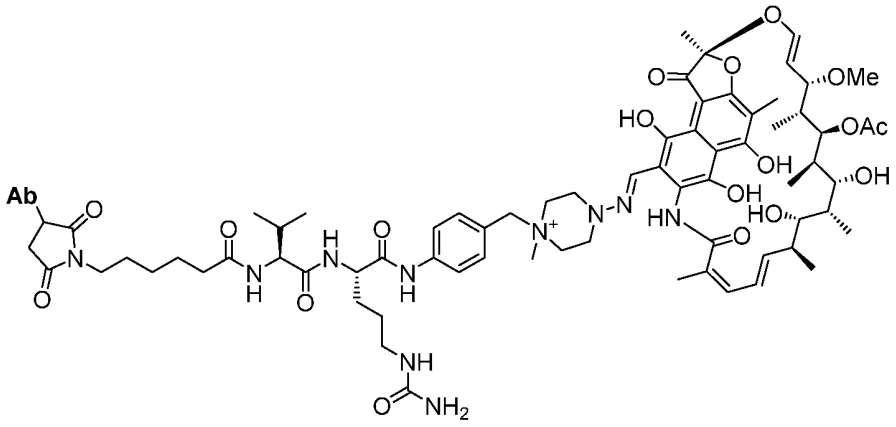
каждый **Ab** представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент;

каждый **BA** представляет собой  , где **Ab**^{1} представляет собой антитело к MSR1 или его антиген-связывающий фрагмент; **R** представляет собой C_{2-4}-алкилен; и **nn** представляет собой целое число, которое выбирается от 2 до 4, включительно.

и

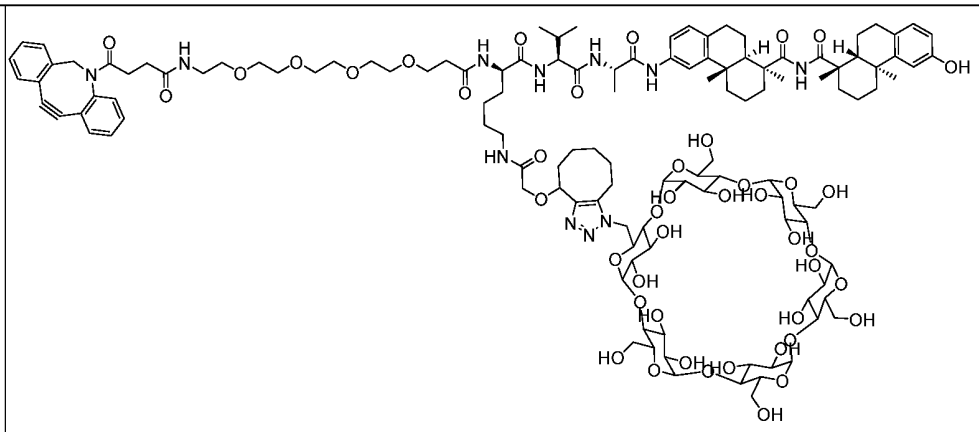
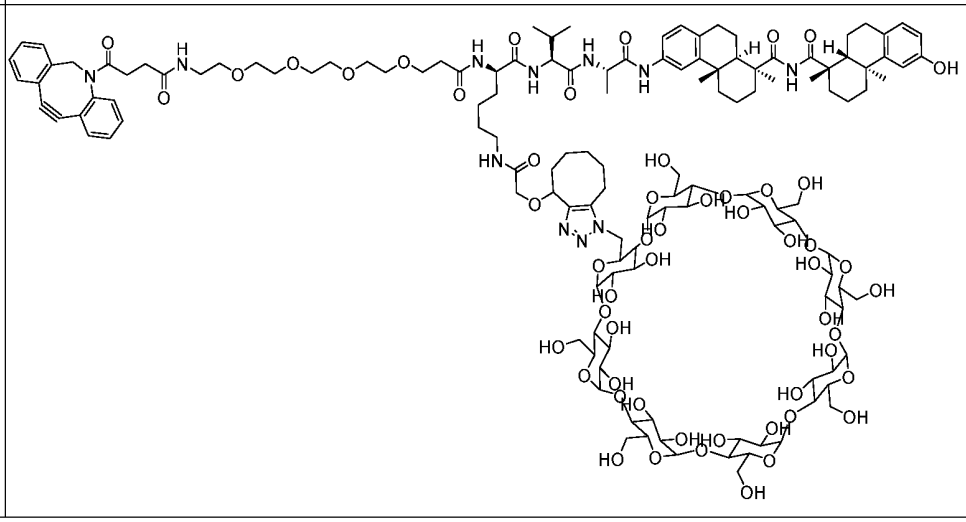
каждый **n** представляет собой целое число от 1 до 4.

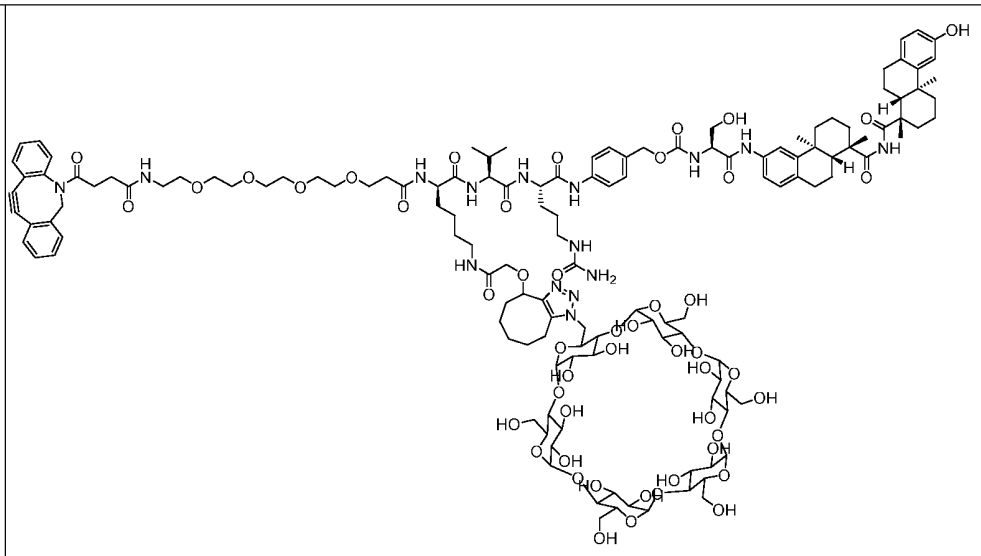
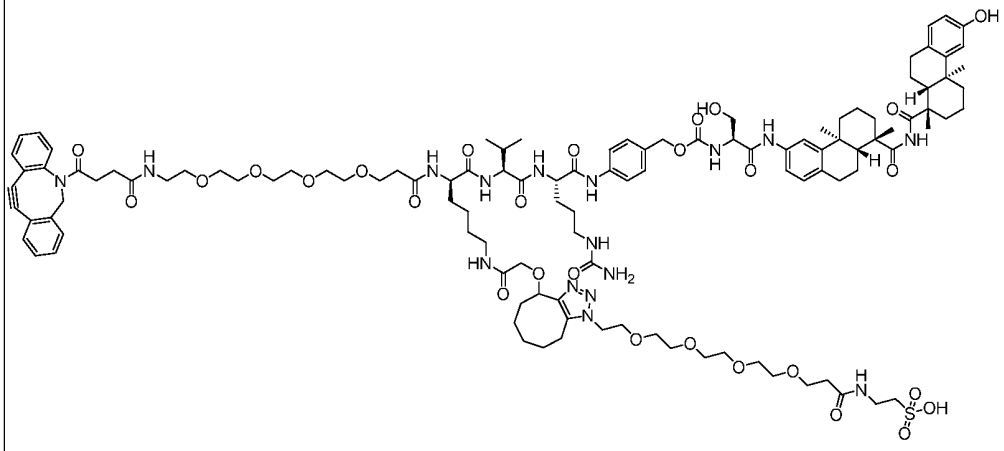
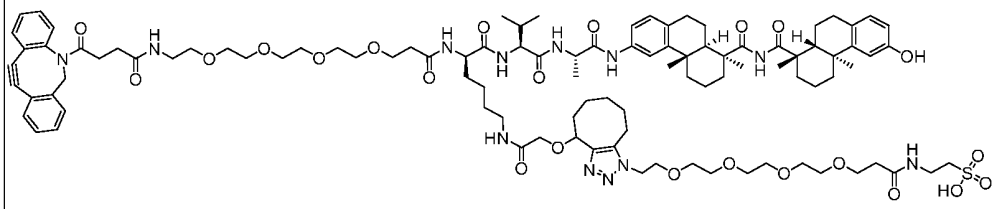
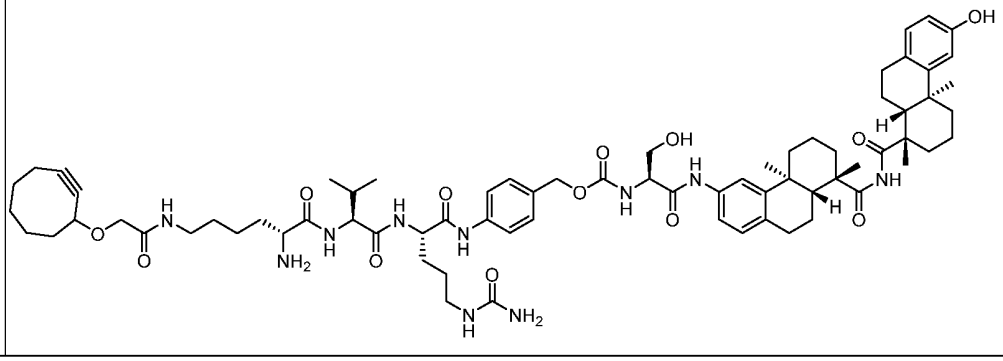
54. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 9-10 и 24 согласно Формуле (**7004**):

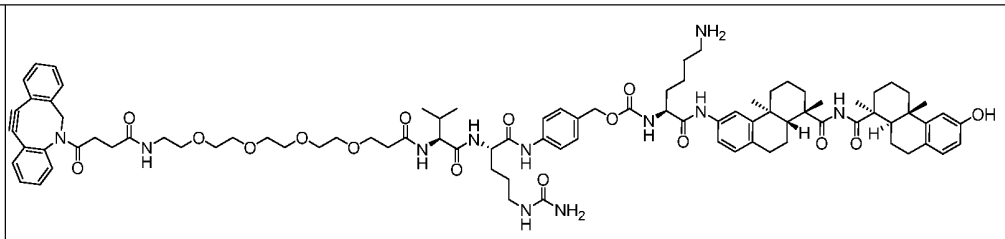
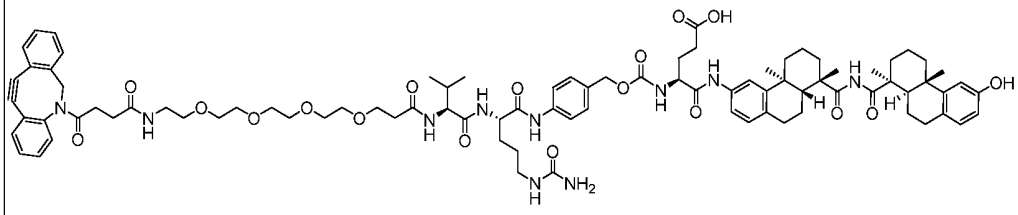
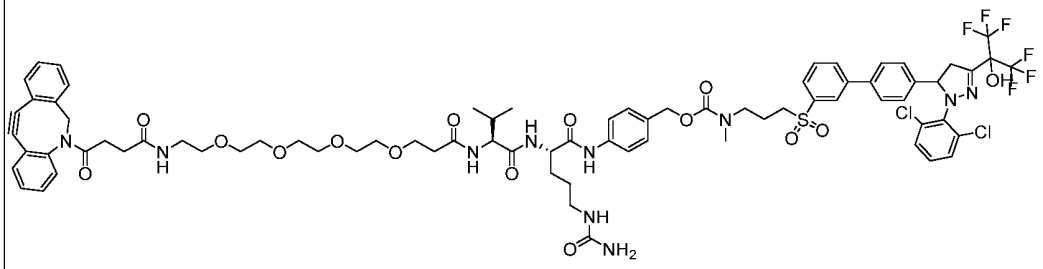
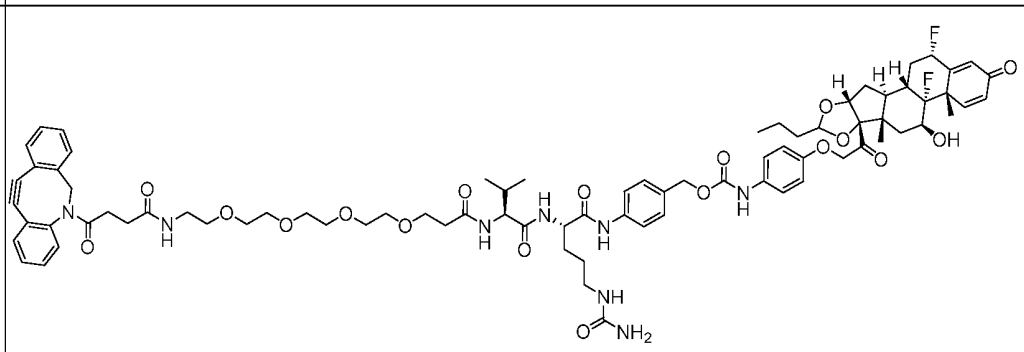
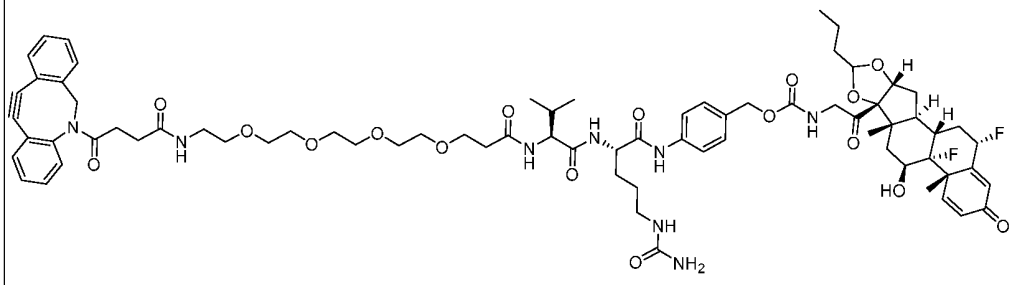
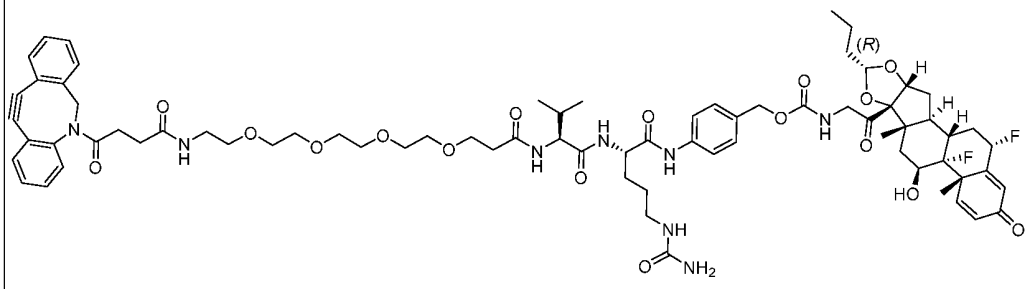


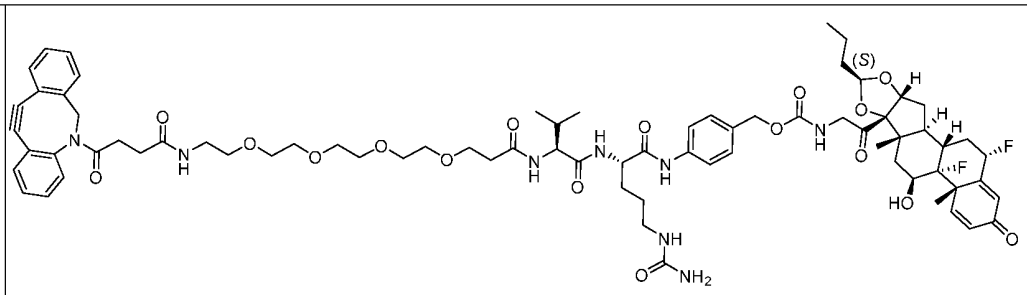
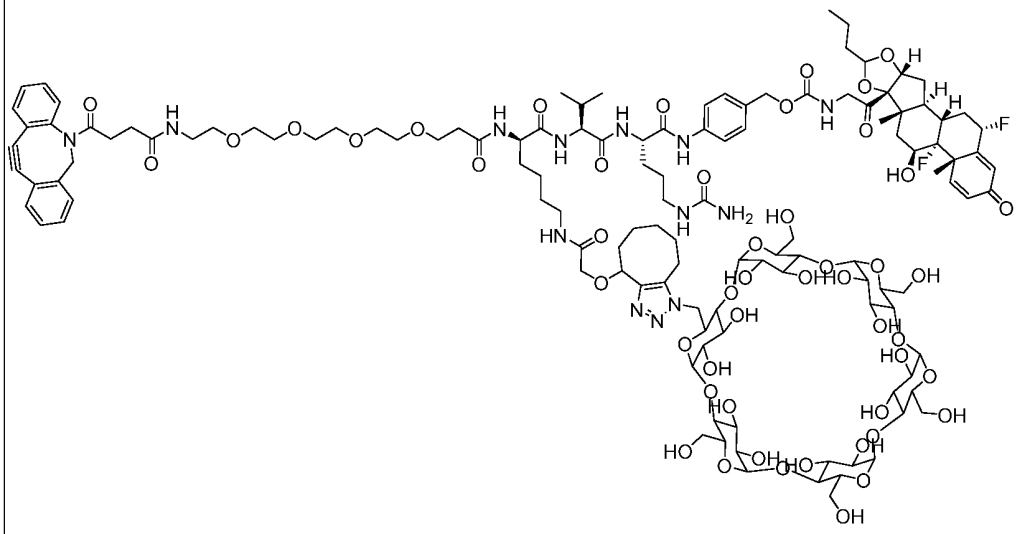
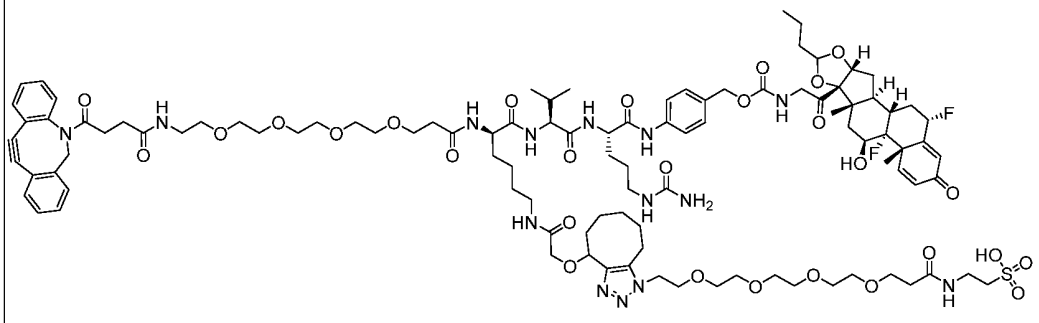
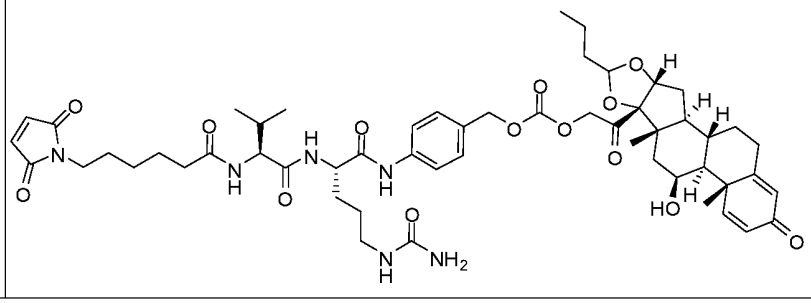
Формула (**7004**).

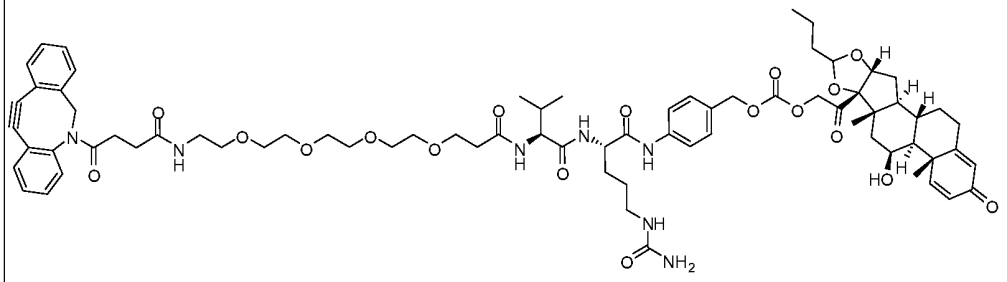
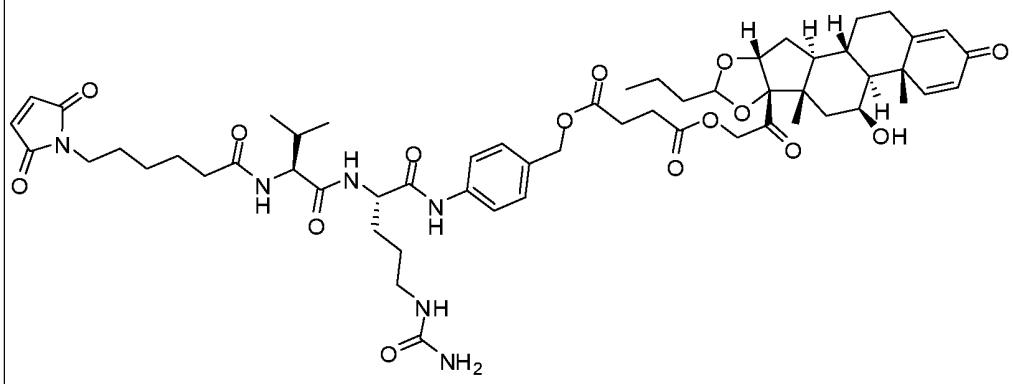
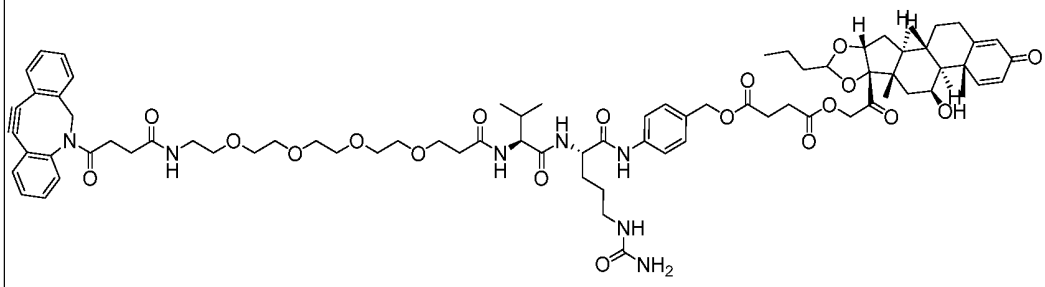
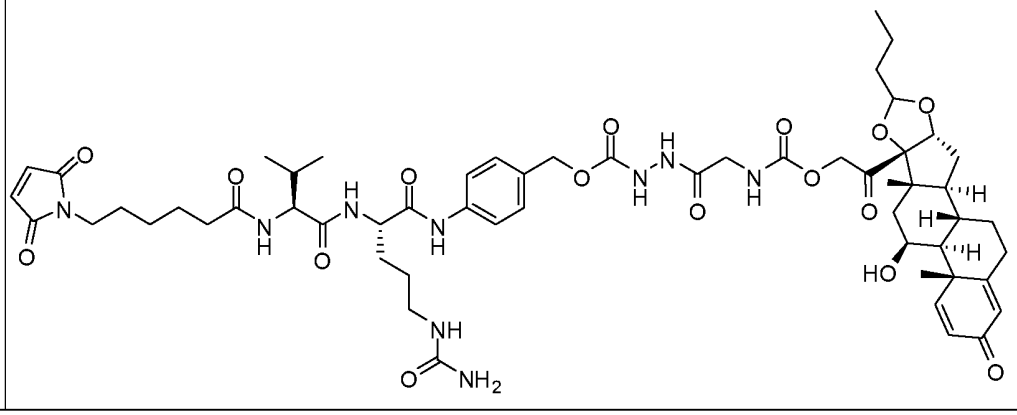
55. Конъюгат антитело-лекарственное средство, приготовленный посредством конъюгации антитела к MSR1, или ПЭГ-модифицированного антитела к MSR1, или его антиген-связывающего фрагмента с линкер-нагрузкой, или ее стереоизомерной формой, или региоизомером, или смесью региоизомеров, которые выбираются из группы, состоящей из:

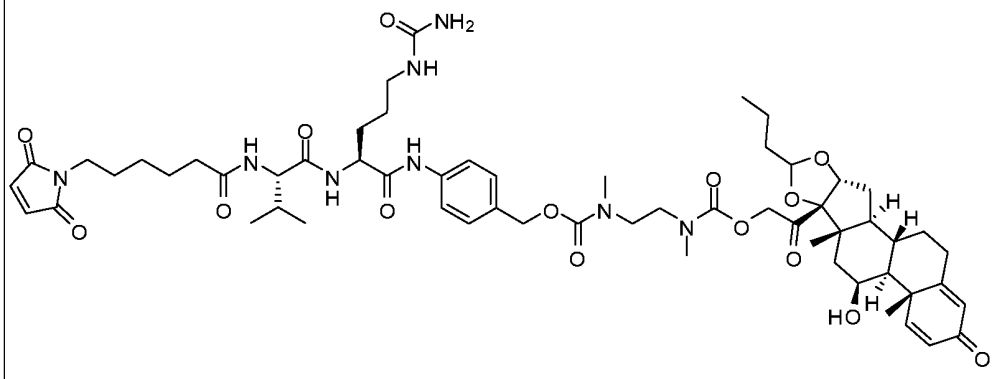
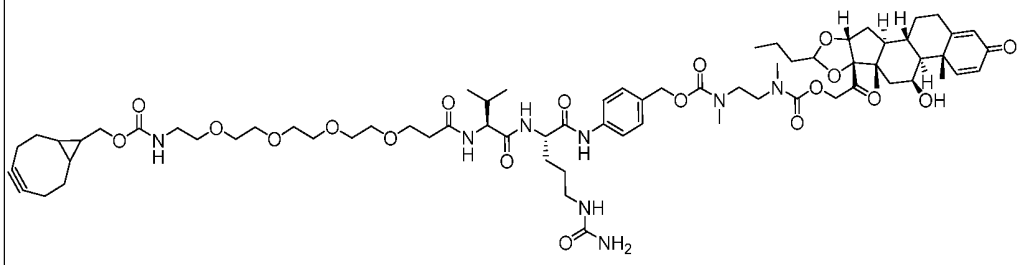
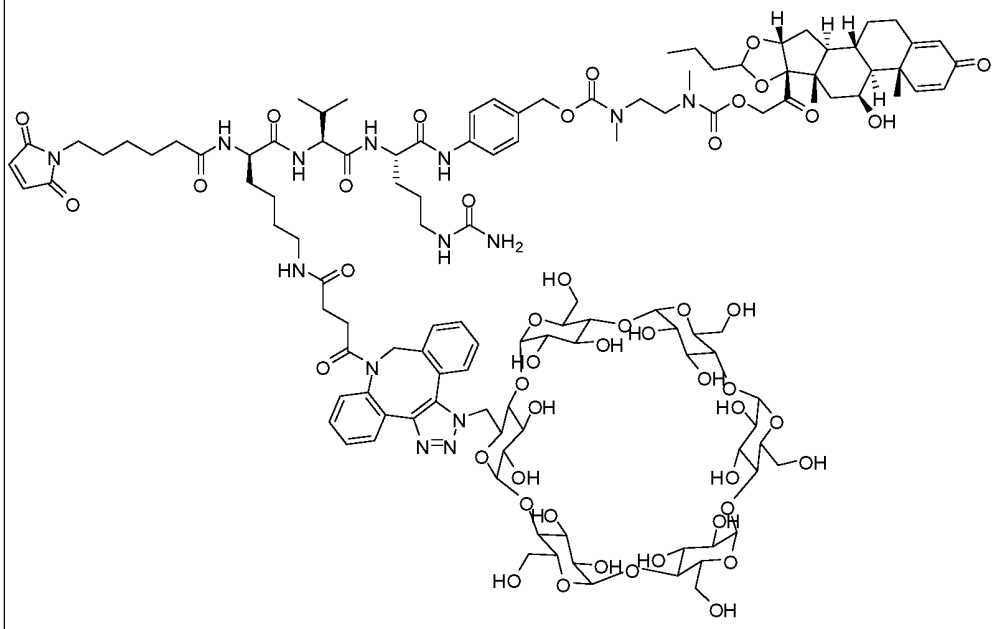
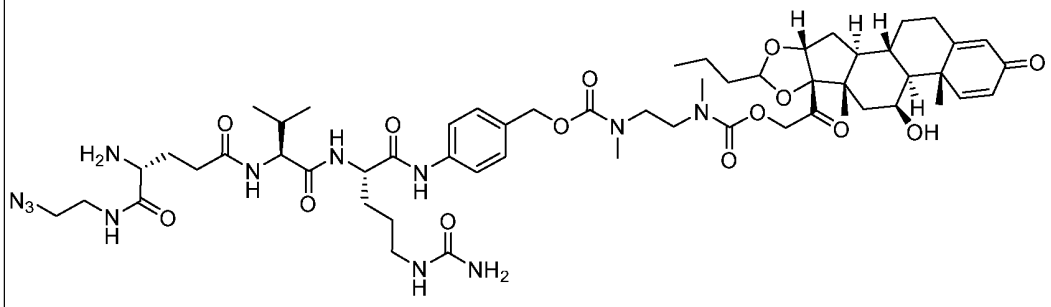
LP1	
LP2	

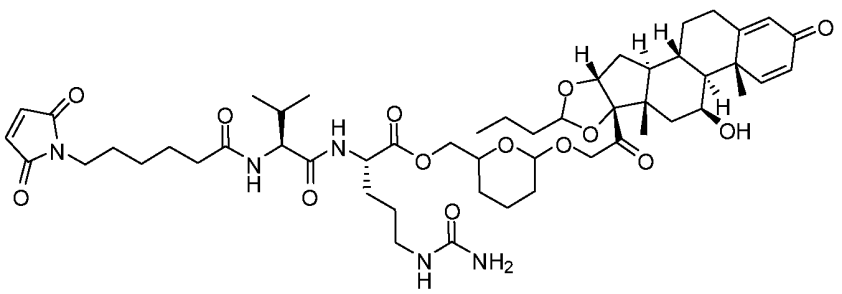
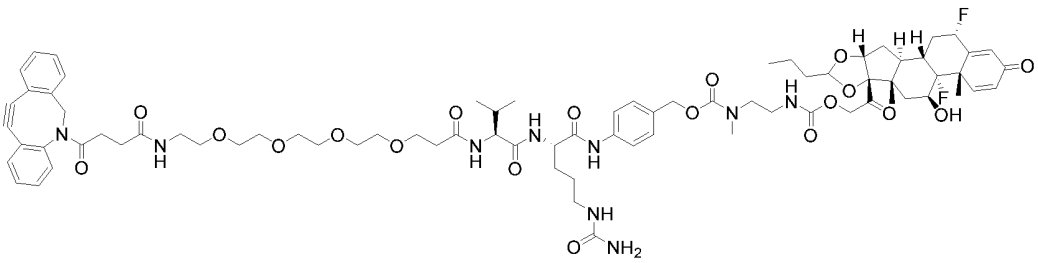
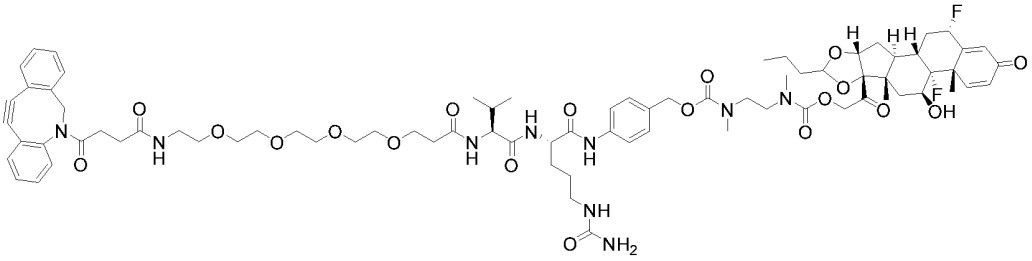
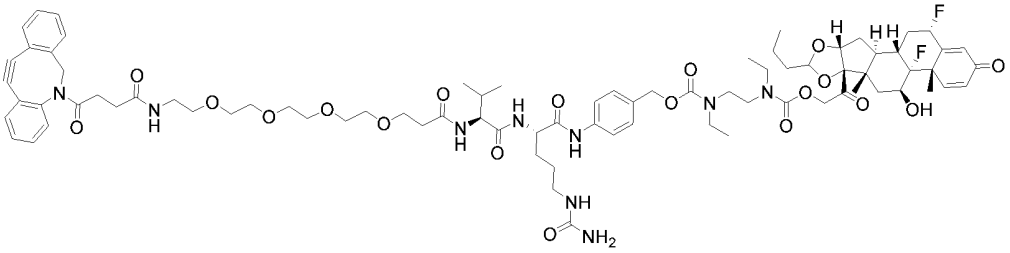
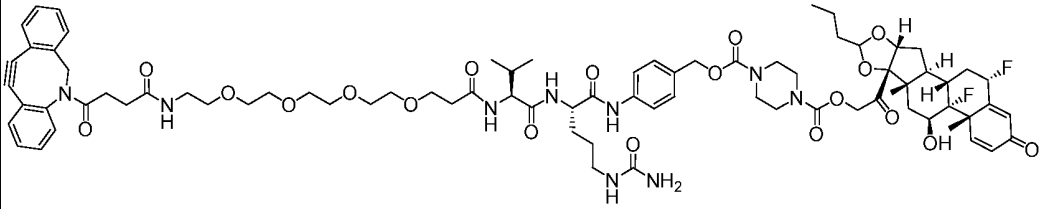
LP5	
LP6	
LP18	
LP4	

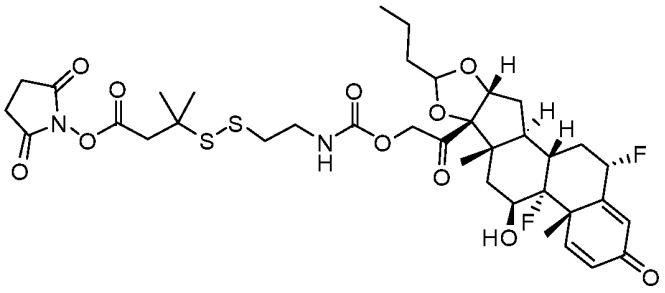
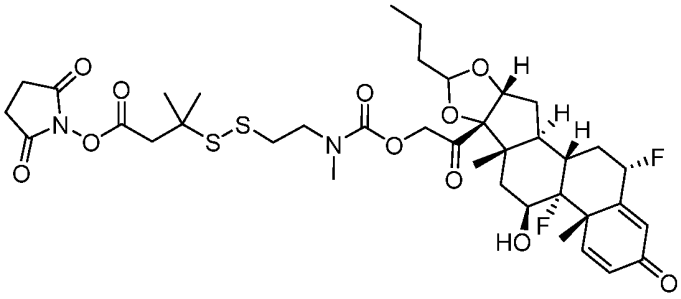
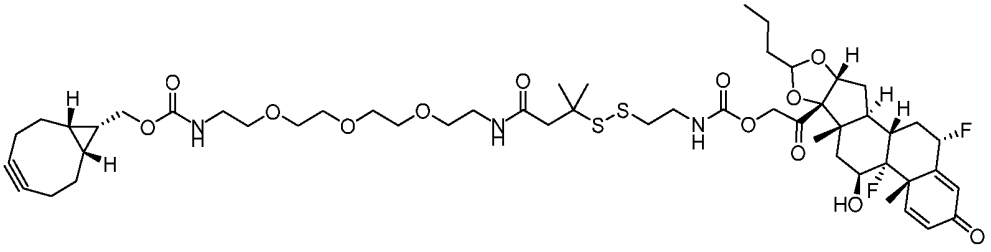
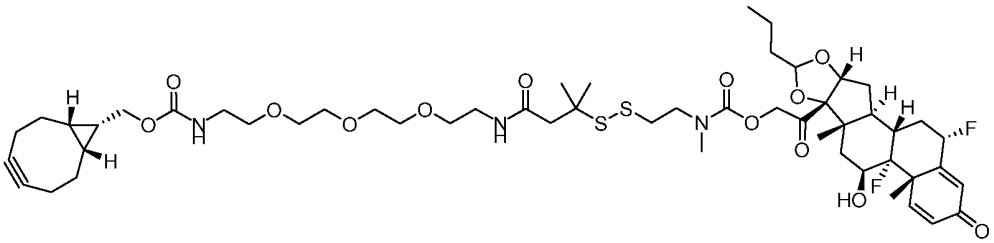
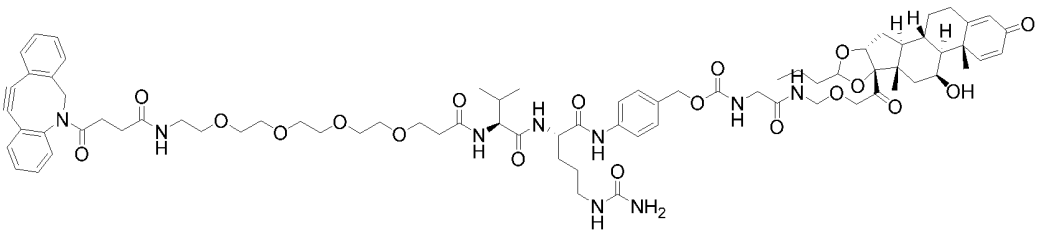
LP11	
LP9	
LP12	
LP3	
LP13	
	

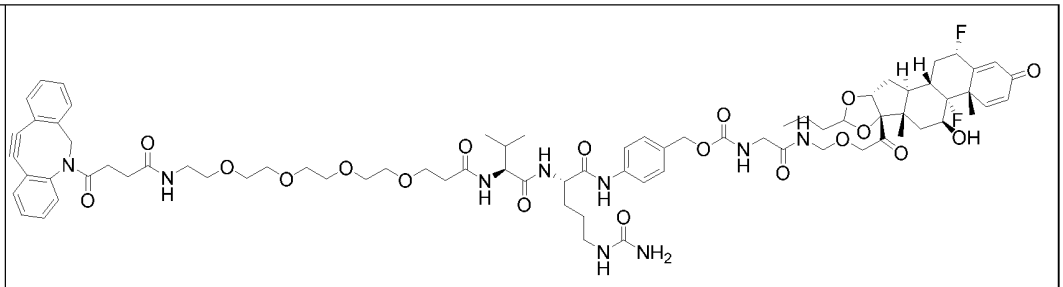
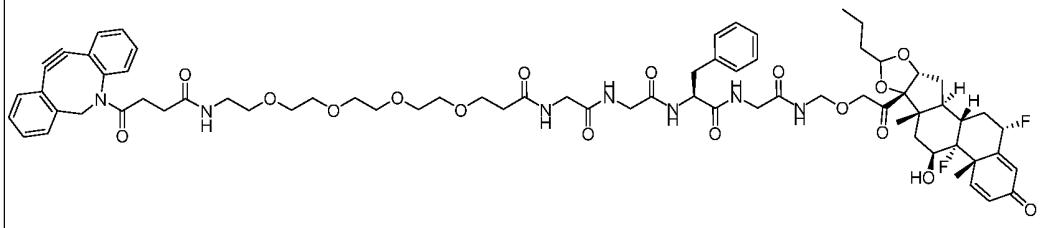
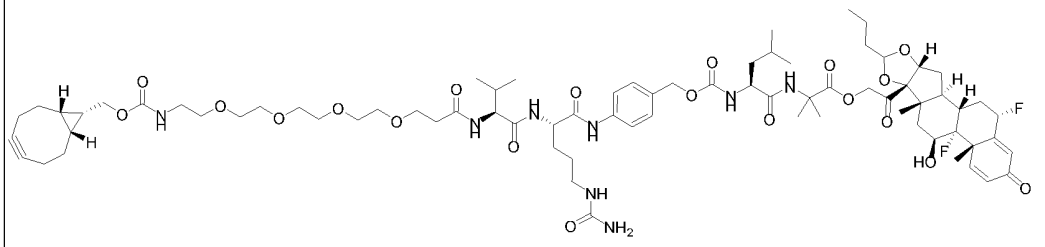
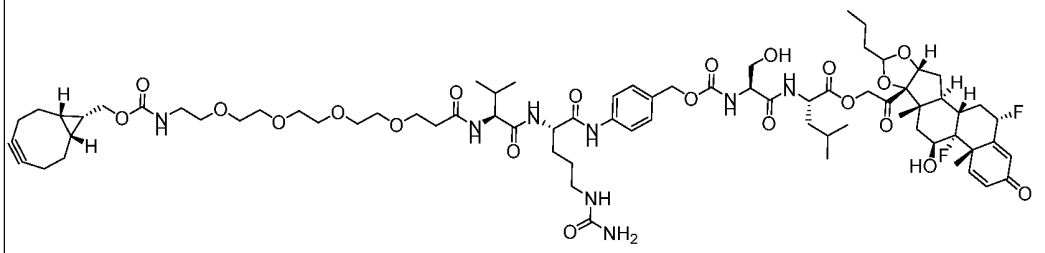
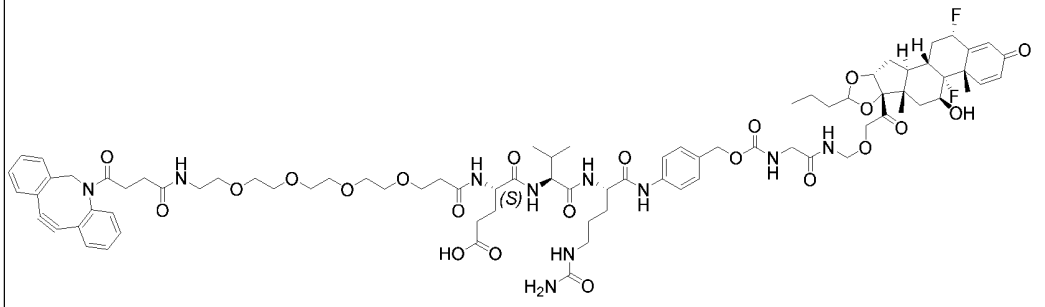
	
LP14	
LP15	
2a	

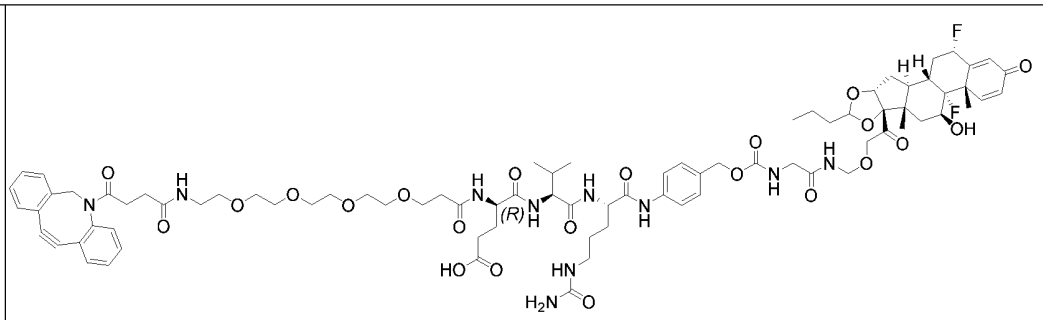
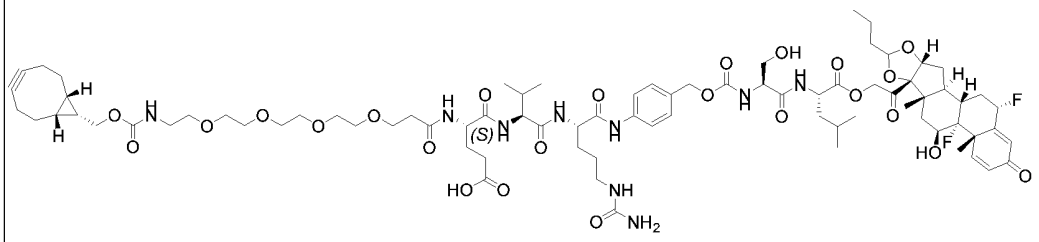
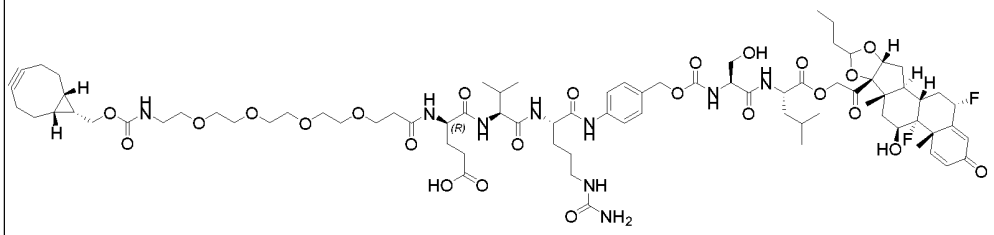
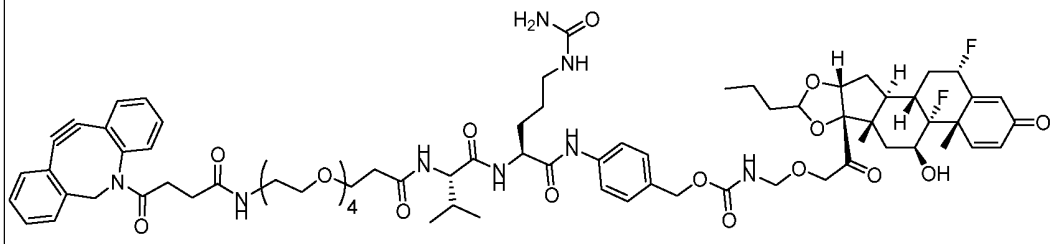
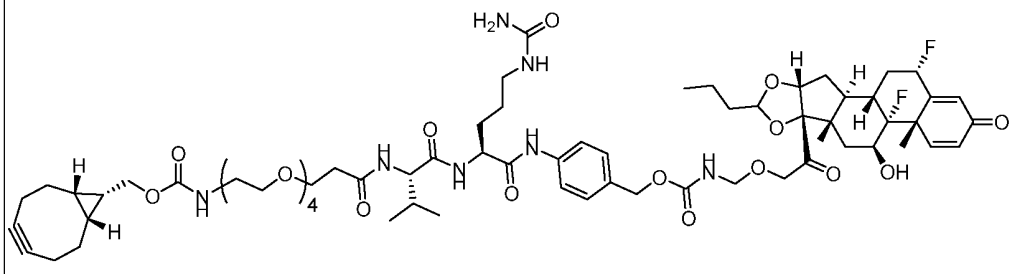
2b	
2f	
2g	
2j	

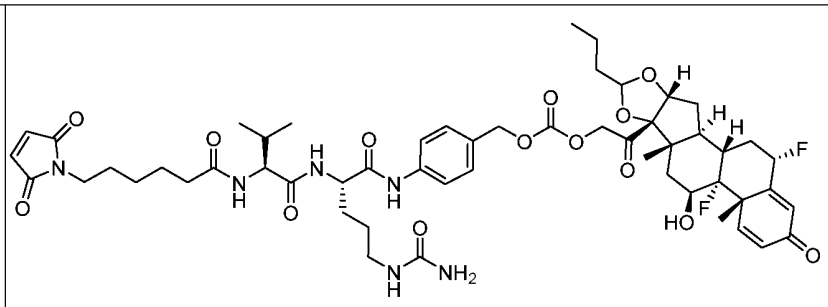
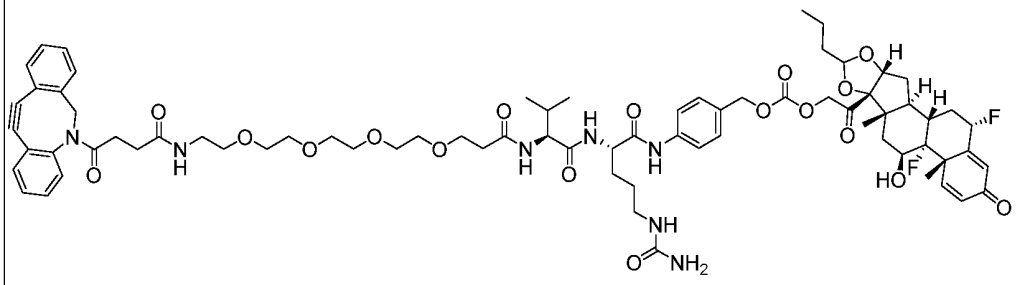
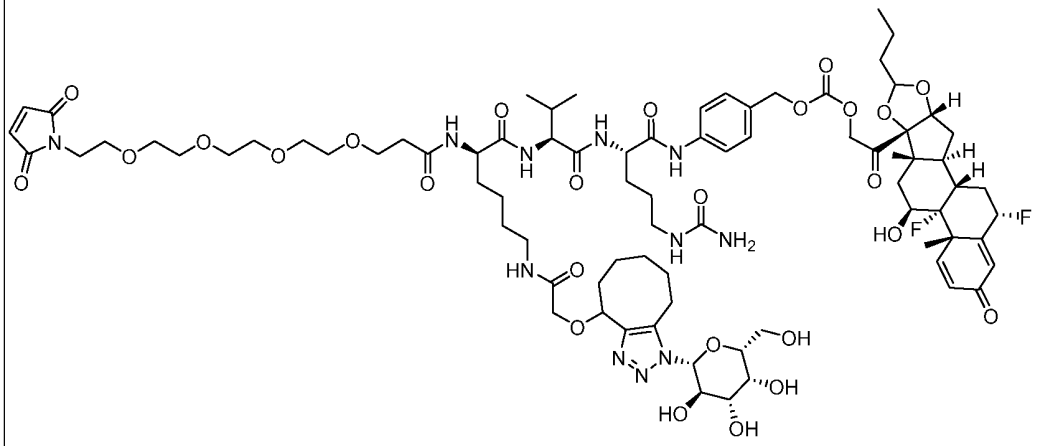
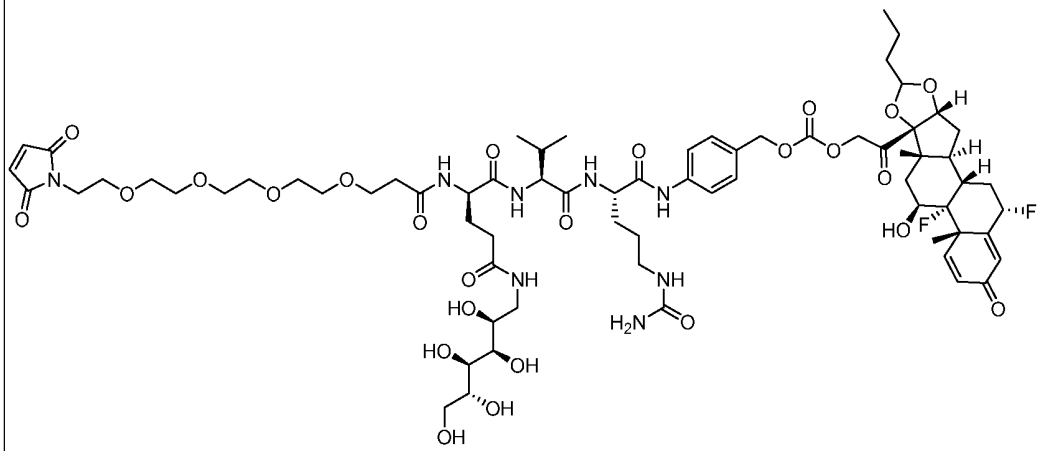
2k	
2l	
2m	
2n	 или их смеси

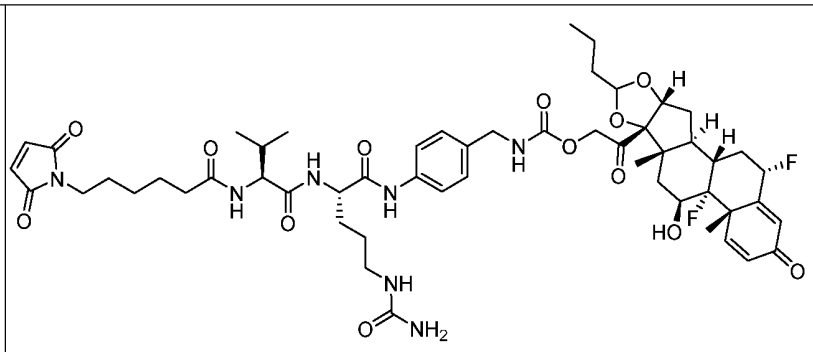
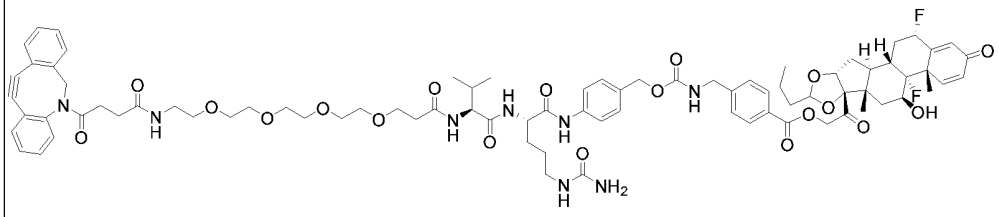
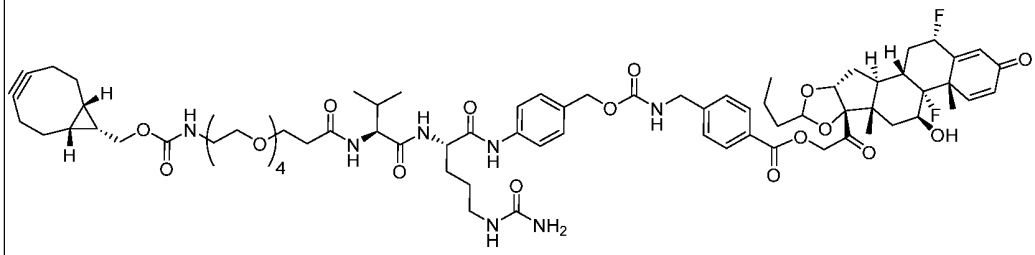
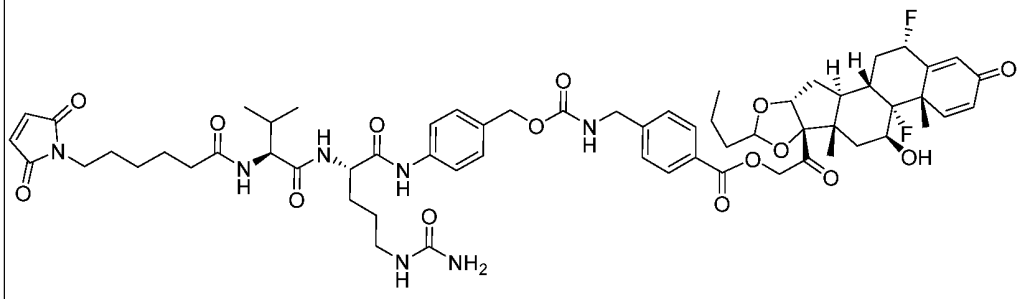
2q	
LP1A	
LP2A	
LP3A	
LP4A	

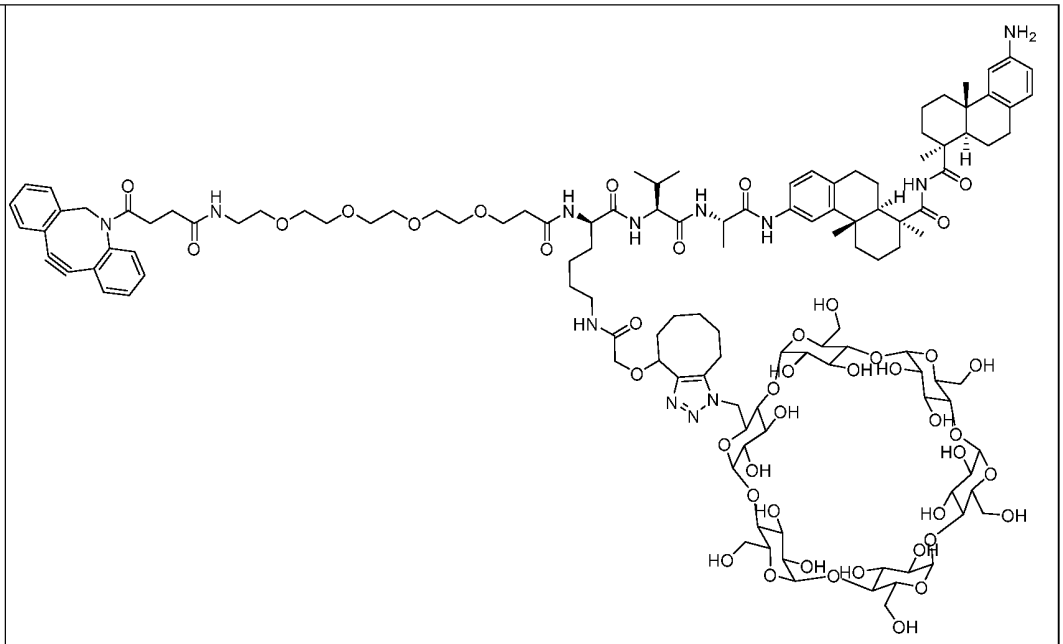
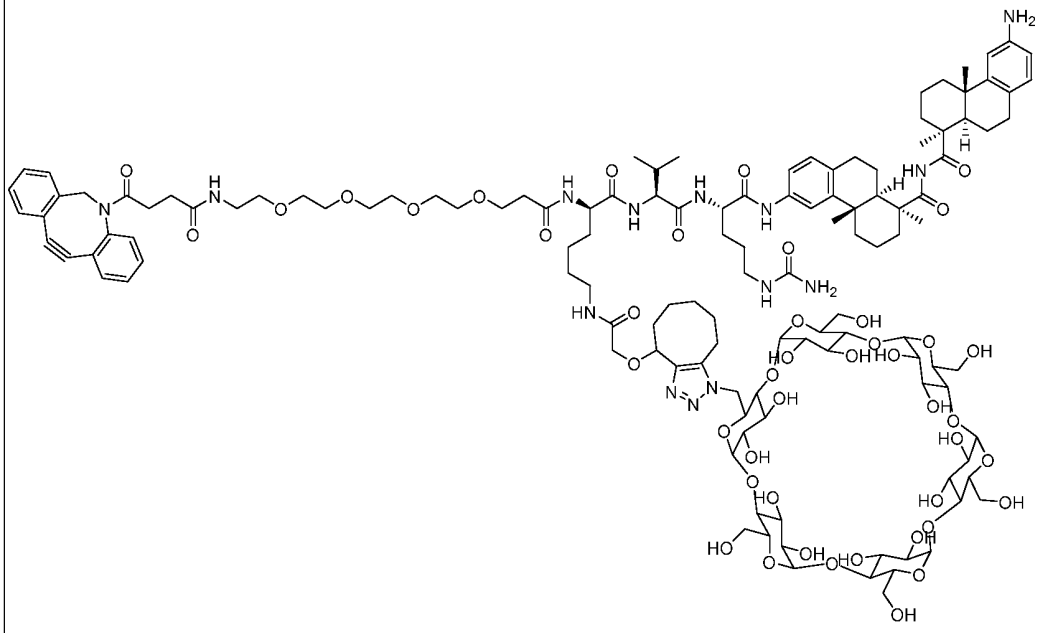
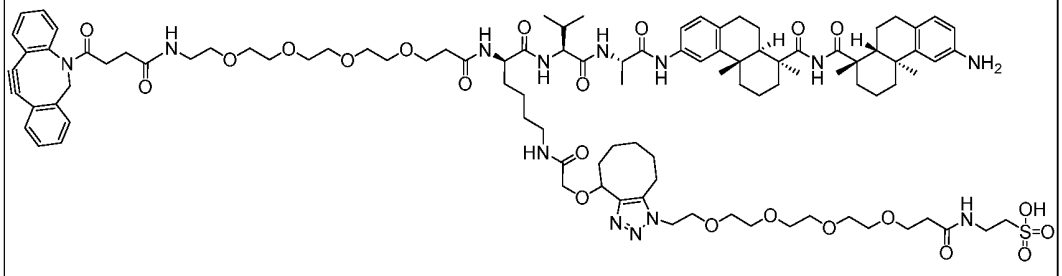
LP5A	
LP6A	
LP7A	
LP8A	
LP9A	

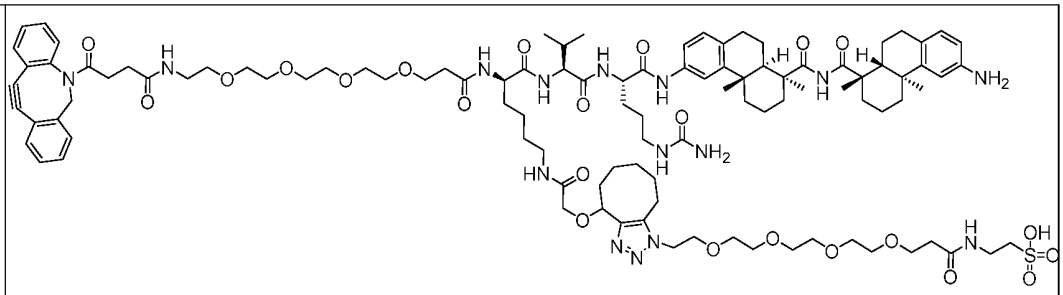
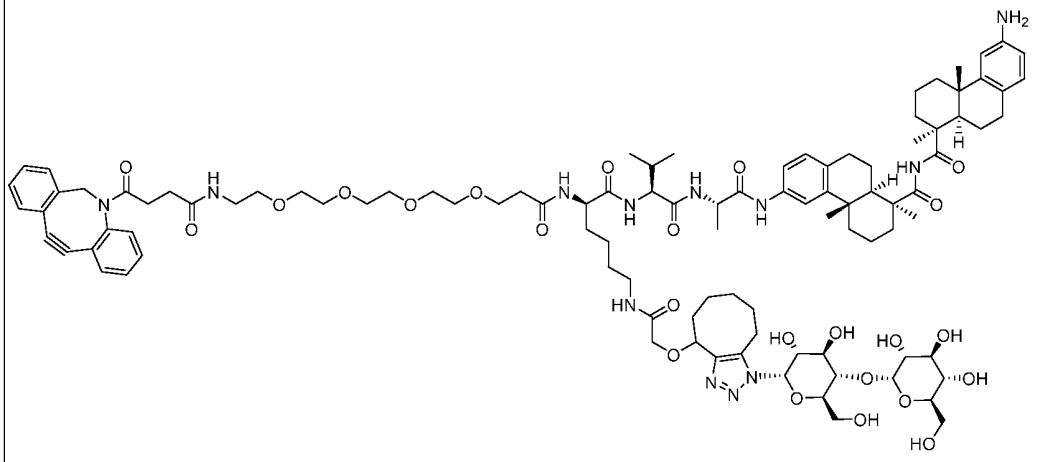
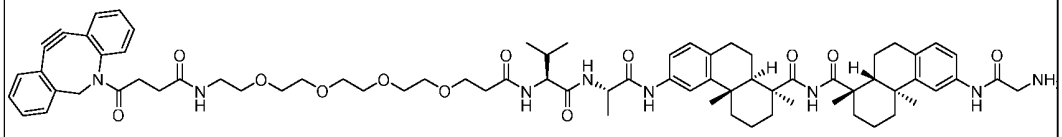
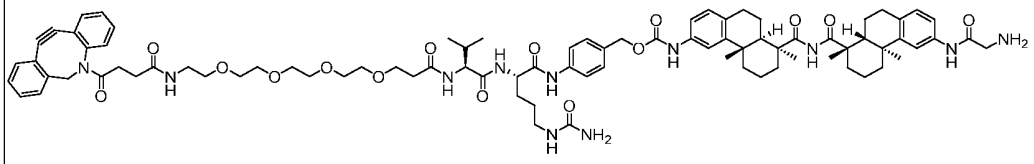
LP10 A	
LP11 A	
LP12 A	
LP13 A	
LP18 A	

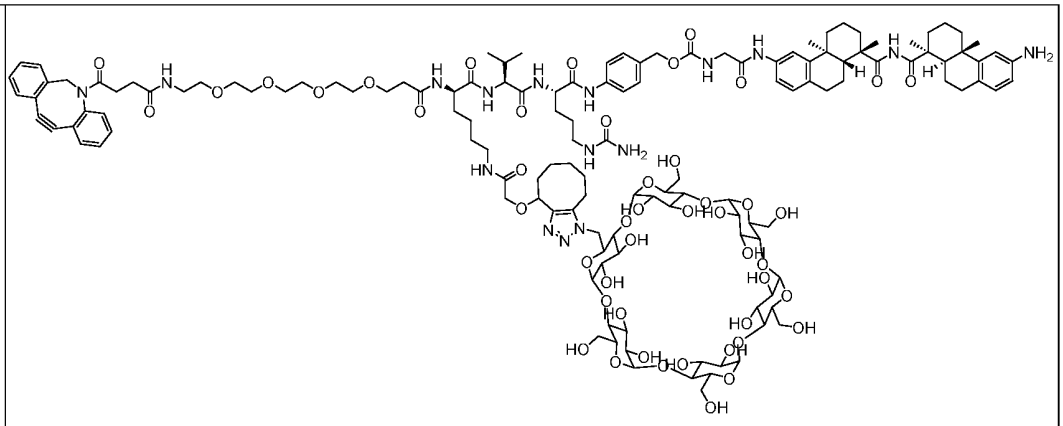
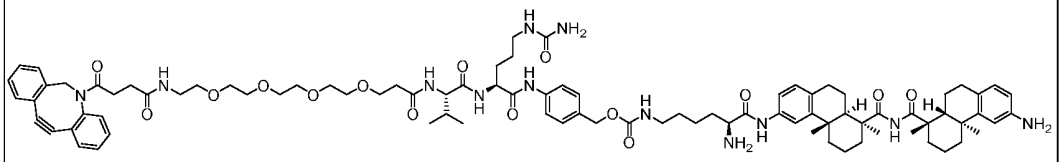
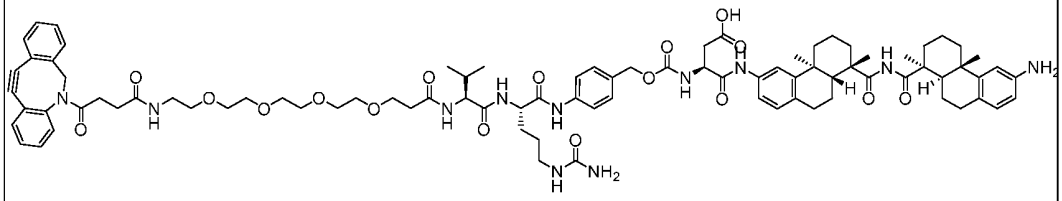
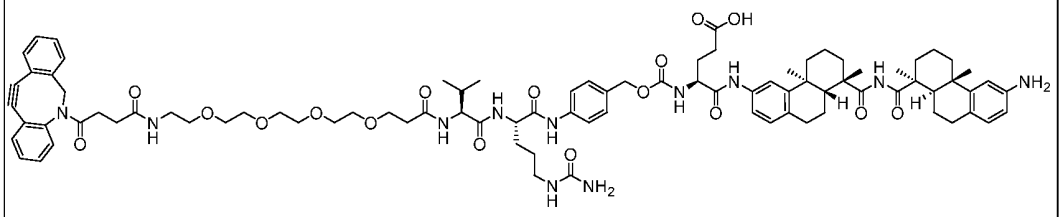
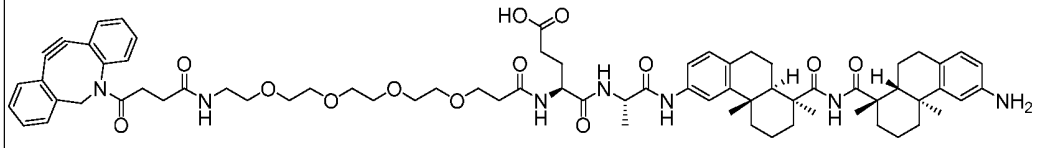
LP19 A	
LP20 A	
LP21 A	
LP22 A	
LP23 A	

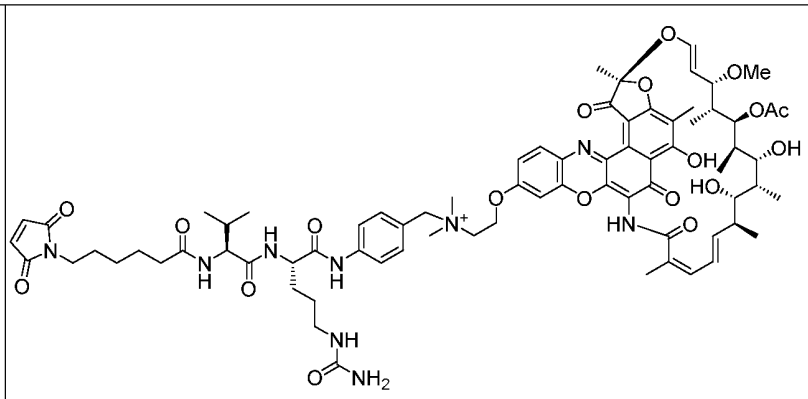
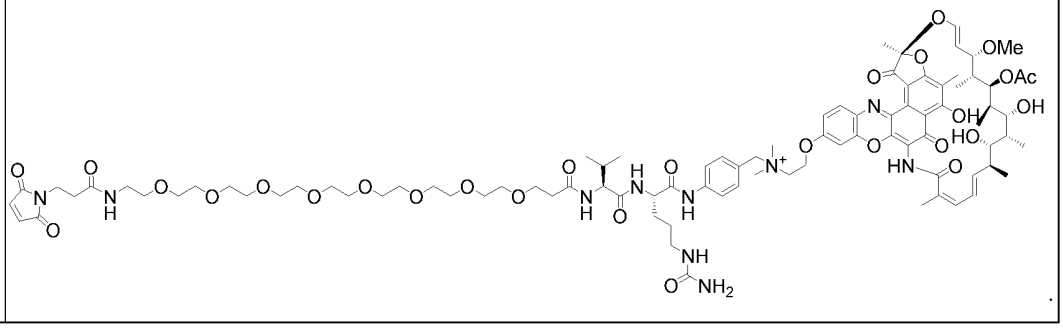
LP24 A	
LP25 A	
LP26 A	
LP27 A	

LP28 A	
LP29 A	
LP30 A	
LP31 A	

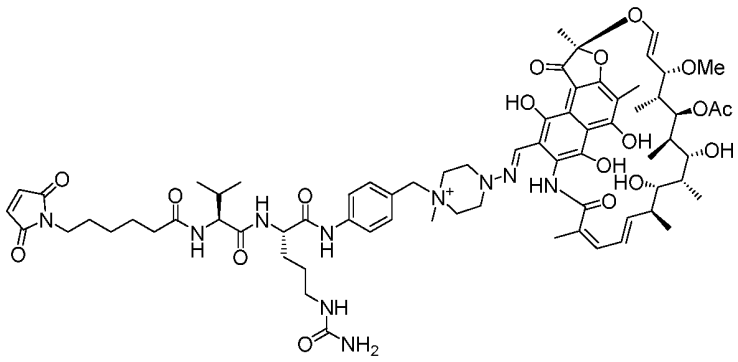
LP1B	
LP2B	
LP3B	

LP4B	
LP5B	
LP6B	
LP7B	

LP8B	
LP9B	
LP10B	
LP11B	
LP12B	

R20	 и
R25	 .

56. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 9, приготовленный посредством взаимодействия антитела к MSR1 или ПЭГ-модифицированного антитела к MSR1 или его антиген-связывающего фрагмента с линкер-нагрузкой или ее стереоизомерной формой или региоизомером, согласно Формуле (**D**):



Формула (**D**).

в условиях, подходящих для образования связи между антителом к MSR1 или его антиген-связывающим фрагментом.

57. Фармацевтическая композиция, включающая антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пунктов 1 - 8 и фармацевтически приемлемый носитель.

58. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 9 - 54 и фармацевтически приемлемый носитель.

59. Способ лечения пролиферативного заболевания, метаболического заболевания,

воспаления, нейродегенеративного заболевания или заболевания, нарушения или состояния, связанного с сигнализацией глюкокортикоидного рецептора, у субъекта, включающий введение этому субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 1-23, 25-34, 51-53 или фармацевтической композиции по любому из пунктов 47-48.

60. Способ по пункту 59, где способ направлен на лечение атеросклероза.

61. Способ по пункту 59, где заболеванием, нарушением или состоянием, связанным с сигнализацией глюкокортикоидного рецептора, является воспалительное заболевание, нарушение или состояние.

62. Способ по пункту 59, где способ направлен на лечение артрита.

63. Способ по пункту 59, при котором побочные действия, связанные с введением неконъюгированной стероидной нагрузки указанного соединения, уменьшаются.

64. Способ по пункту 59, где метаболическим заболеванием является дислипидемия.

65. Способ профилактики или лечения бактериальной инфекции у субъекта, включающий введение этому субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 1-21, 24, 35-50 и 54 или фармацевтической композиции по любому из пунктов 57-58.

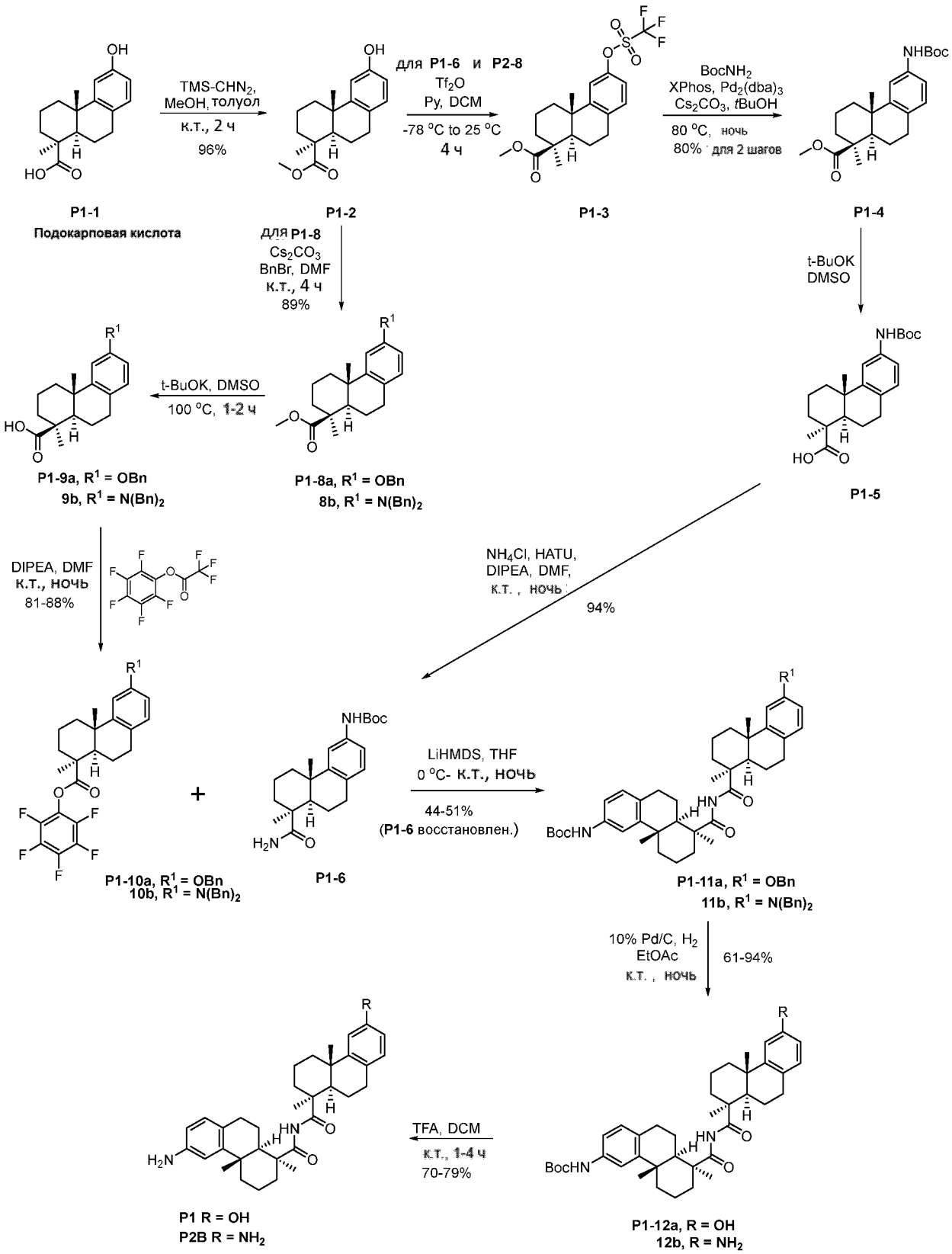
66. Способ по пункту 65, где бактерией является грам-положительная бактерия, резистентная к пенициллину бактерия Staphylococcus aureus, резистентная к метициллину бактерия Staphylococcus aureus (MRSA), чувствительная к метициллину бактерия Staphylococcus aureus (MSSA) или резистентная к ванкомицину бактерия Staphylococcus aureus (VRSA) или мультирезистентная Mycobacterium tuberculosis.

67. Способ по пункту 65, где конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 1-21, 24, 35-50 и 54 или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 57-58 вводятся в комбинации с ванкомицином.

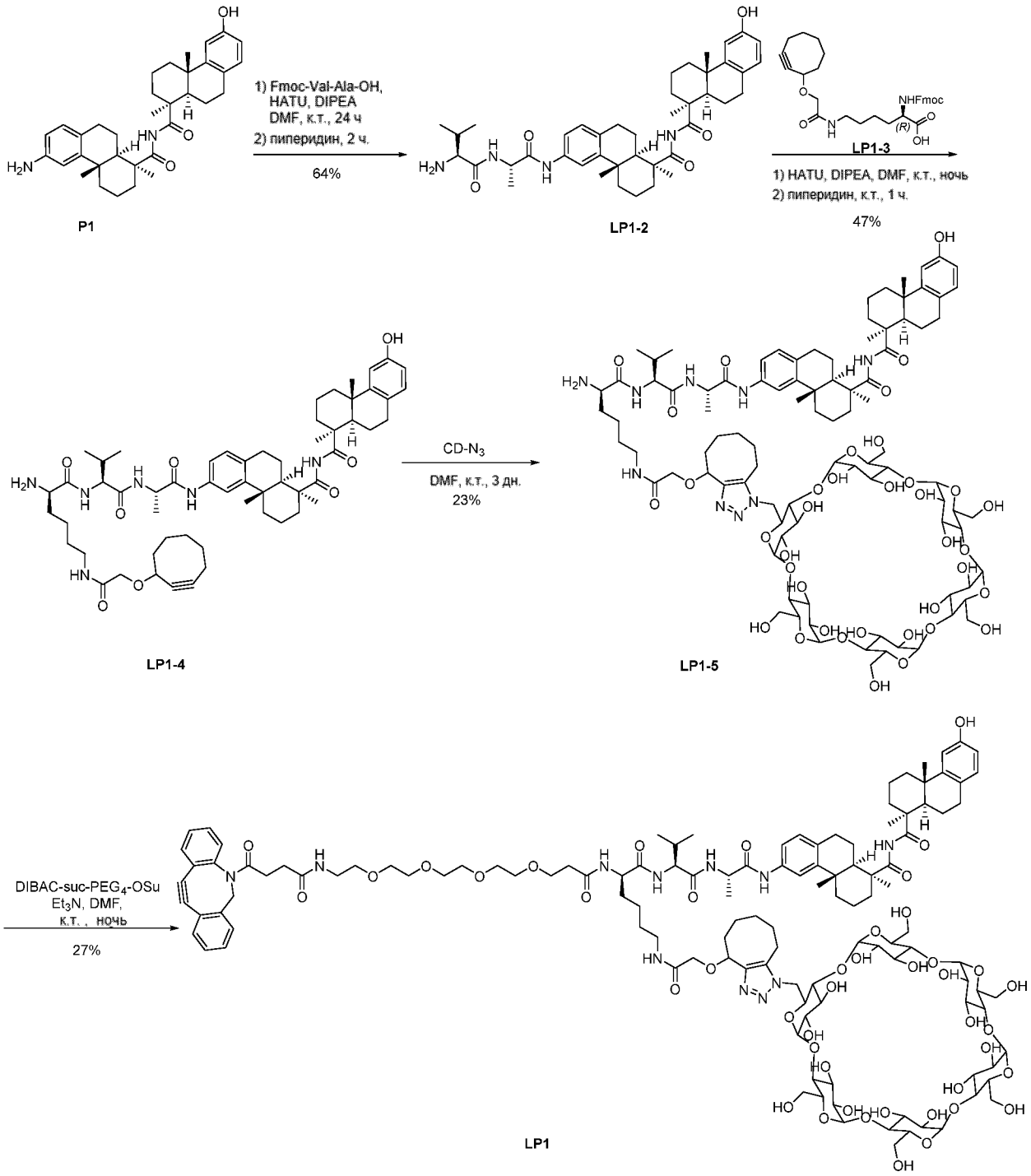
68. Способ профилактики или лечения целлюлита, бактериемии, дермонекроза, инфекции глазного века, глазной инфекции, конъюнктивита новорожденных, остеомиелита, импетиго, фурункулеза, синдрома ошпаренной кожи, пищевого отравления, пневмонии, хирургической инфекции, инфекции мочевыводящих путей, ожоговой инфекции, менингита, эндокардита, септицемии, синдрома токсического шока, септического артрита, мастита, инфекции, связанной с эндопротезом сустава, инфекции, связанной с катетером или инфекции, связанной с имплантатом, у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство по любому

из пунктов 11-21, 24, 35-50 и 54 или фармацевтической композиции по любому из пунктов 57-58.

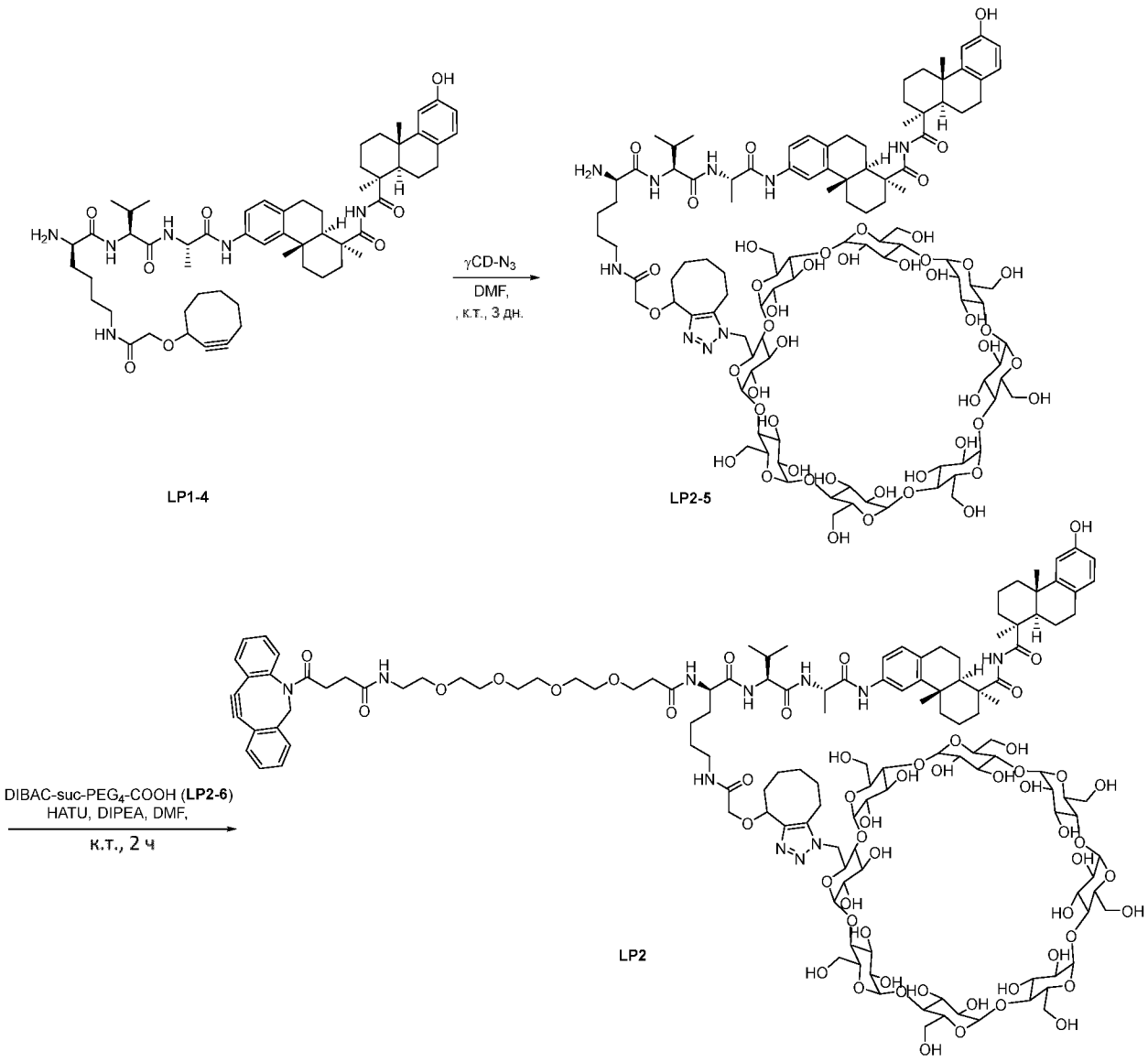
69. Способ профилактики или лечения внутриклеточной бактериальной инфекции у субъекта, включающий введение этому субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пунктов 11-21, 24, 35-50 и 54 или фармацевтической композиции по любому из пунктов 57-58.


TMS-CHN2, MeOH, толуол
к.т., 2 ч
96%
для P1-6 и P2-8
Tf2O
Py, DCM
-78 °C to 25 °C
4 ч
BocNH2
XPhos, Pd2(dba)3
Cs2CO3, tBuOH
80 °C, ночь
80% для 2 шагов
P1-1
Подокарповая кислота
P1-2
P1-3
P1-4
для P1-8
Cs2CO3
BnBr, DMF
к.т., 4 ч
89%
t-BuOK
DMSO
P1-5
t-BuOK, DMSO
100 °C, 1-2 ч
P1-9a, R1 = OBn
9b, R1 = N(Bn)2
P1-8a, R1 = OBn
8b, R1 = N(Bn)2
DIPEA, DMF
к.т., ночь
81-88%
NH4Cl, HATU,
DIPEA, DMF,
к.т., ночь
94%
P1-10a, R1 = OBn
10b, R1 = N(Bn)2
P1-6
LiHMDS, THF
0 °C- к.т., ночь
44-51%
(P1-6 восстановлен.)
P1-11a, R1 = OBn
11b, R1 = N(Bn)2
10% Pd/C, H2
EtOAc
к.т., ночь
61-94%
TFA, DCM
к.т., 1-4 ч
70-79%
P1 R = OH
P2B R = NH2
P1-12a, R = OH
12b, R = NH2

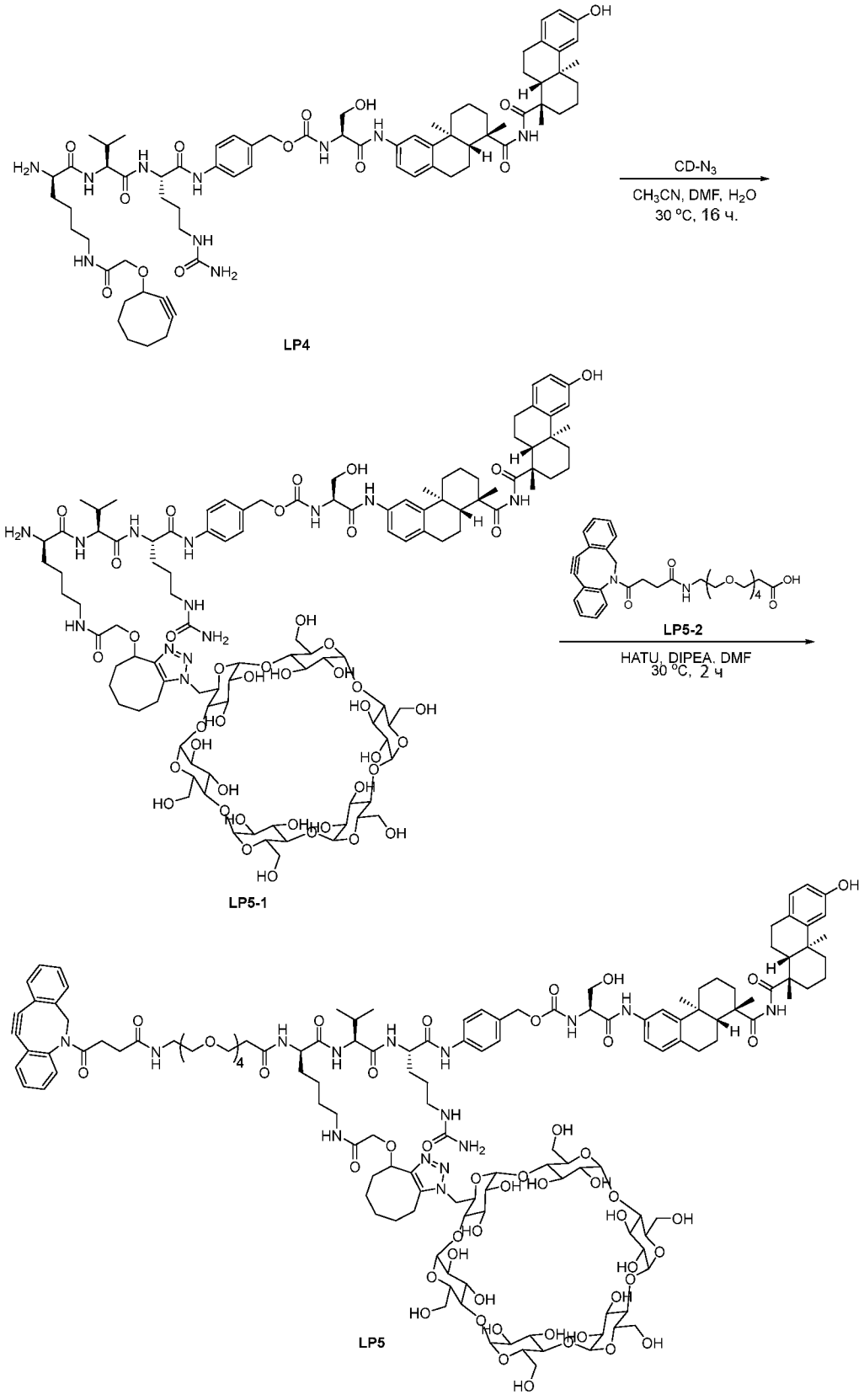
ФИГ. 1


1) Fmoc-Val-Ala-OH,
HATU, DIPEA
DMF, к.т., 24 ч
2) пиперидин, 2 ч.
64%
LP1-3
1) HATU, DIPEA, DMF, к.т., ночь
2) пиперидин, к.т., 1 ч.
47%
P1
LP1-2
CD-N3
DMF, к.т., 3 дн.
23%
LP1-4
LP1-5
DIBAC-suc-PEG4-OSu
Et3N, DMF,
к.т., ночь
27%
LP1

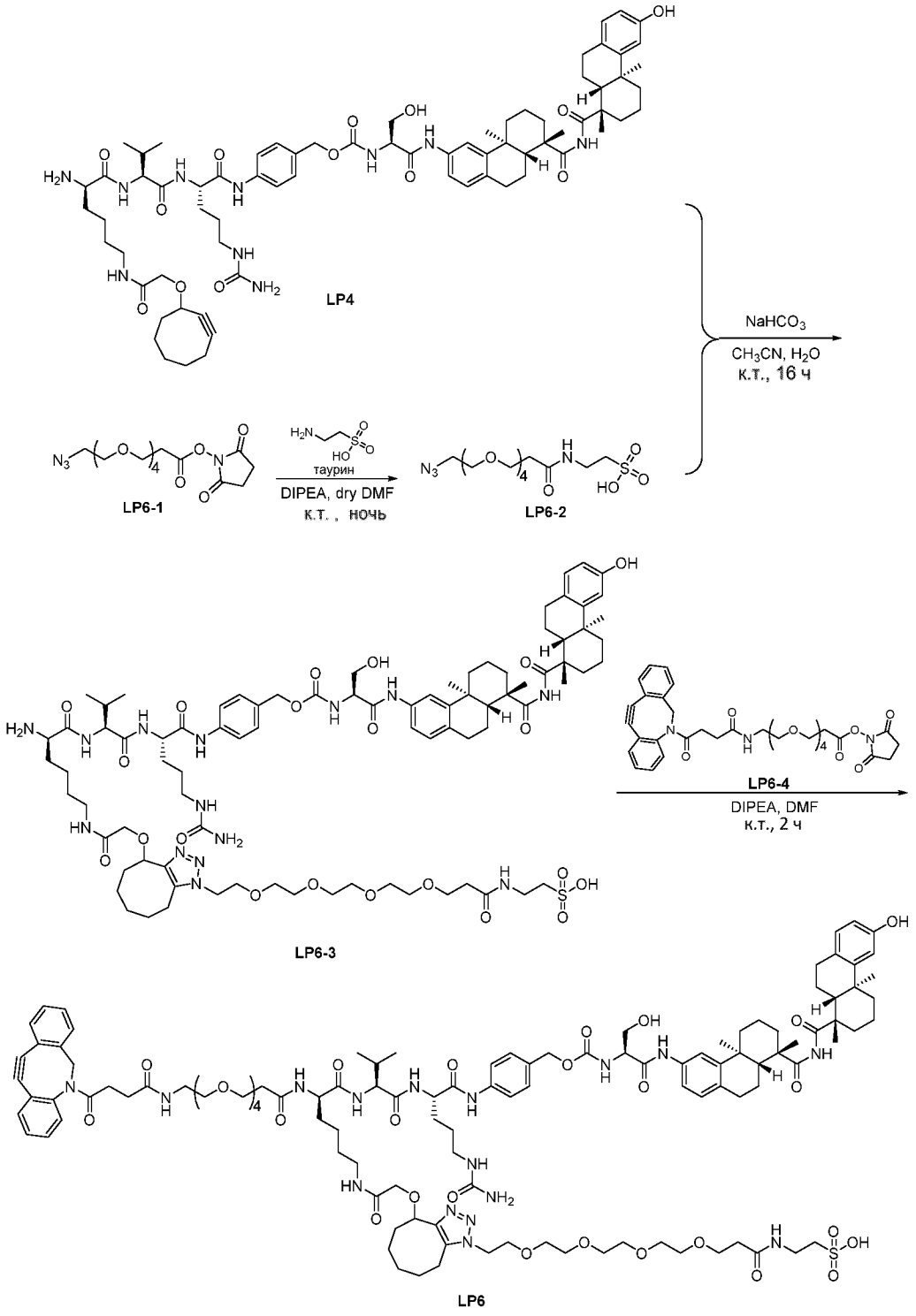
ФИГ. 2


γCD-N3
DMF,
, к.т., 3 дн.
LP1-4
LP2-5
DIBAC-suc-PEG4-COOH (LP2-6)
HATU, DIPEA, DMF,
к.т., 2 ч
LP2

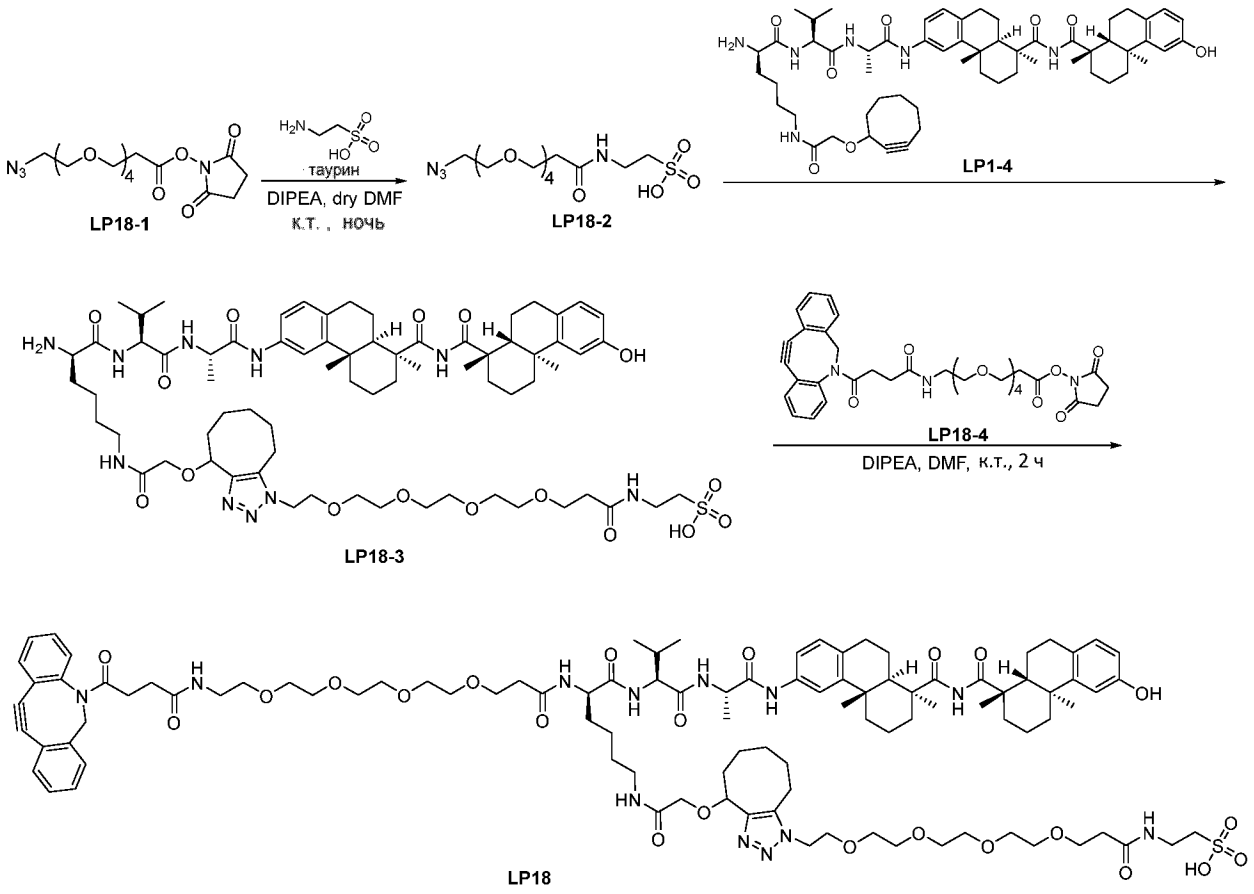
ФИГ. 3


CD-N3
CH3CN, DMF, H2O
30 °C, 16 ч.
LP4
LP5-2
HATU, DIPEA, DMF
30 °C, 2 ч
LP5-1
LP5

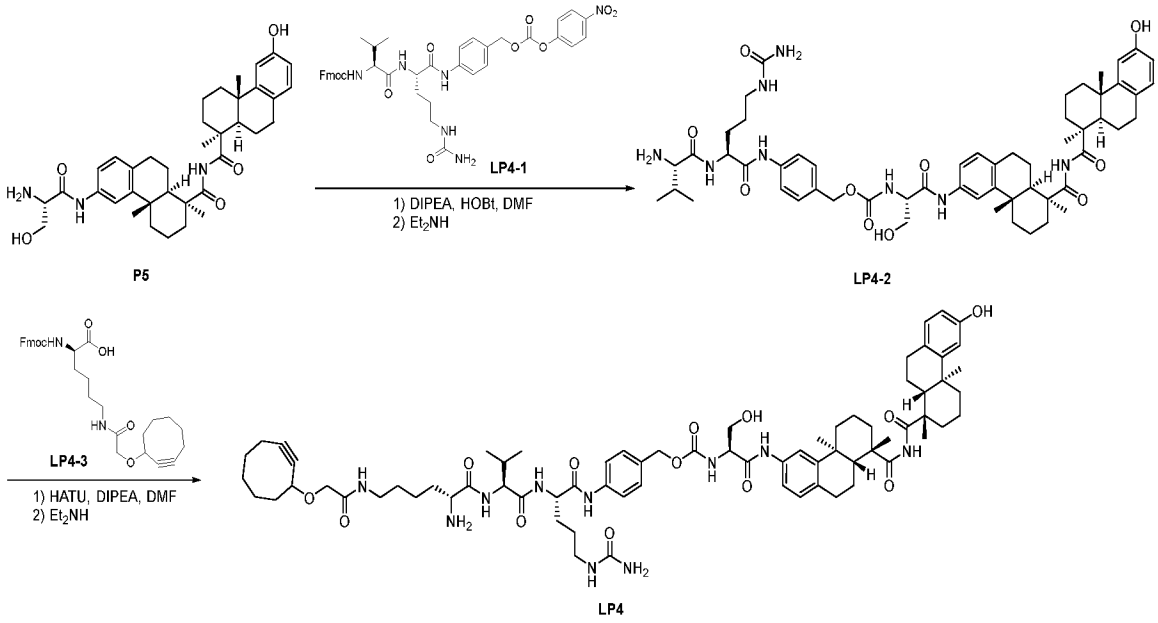
ФИГ. 4


LP4
NaHCO3
CH3CN, H2O
к.т., 16 ч
LP6-1
таурин
DIPEA, dry DMF
к.т., ночь
LP6-2
LP6-4
DIPEA, DMF
к.т., 2 ч
LP6-3
LP6

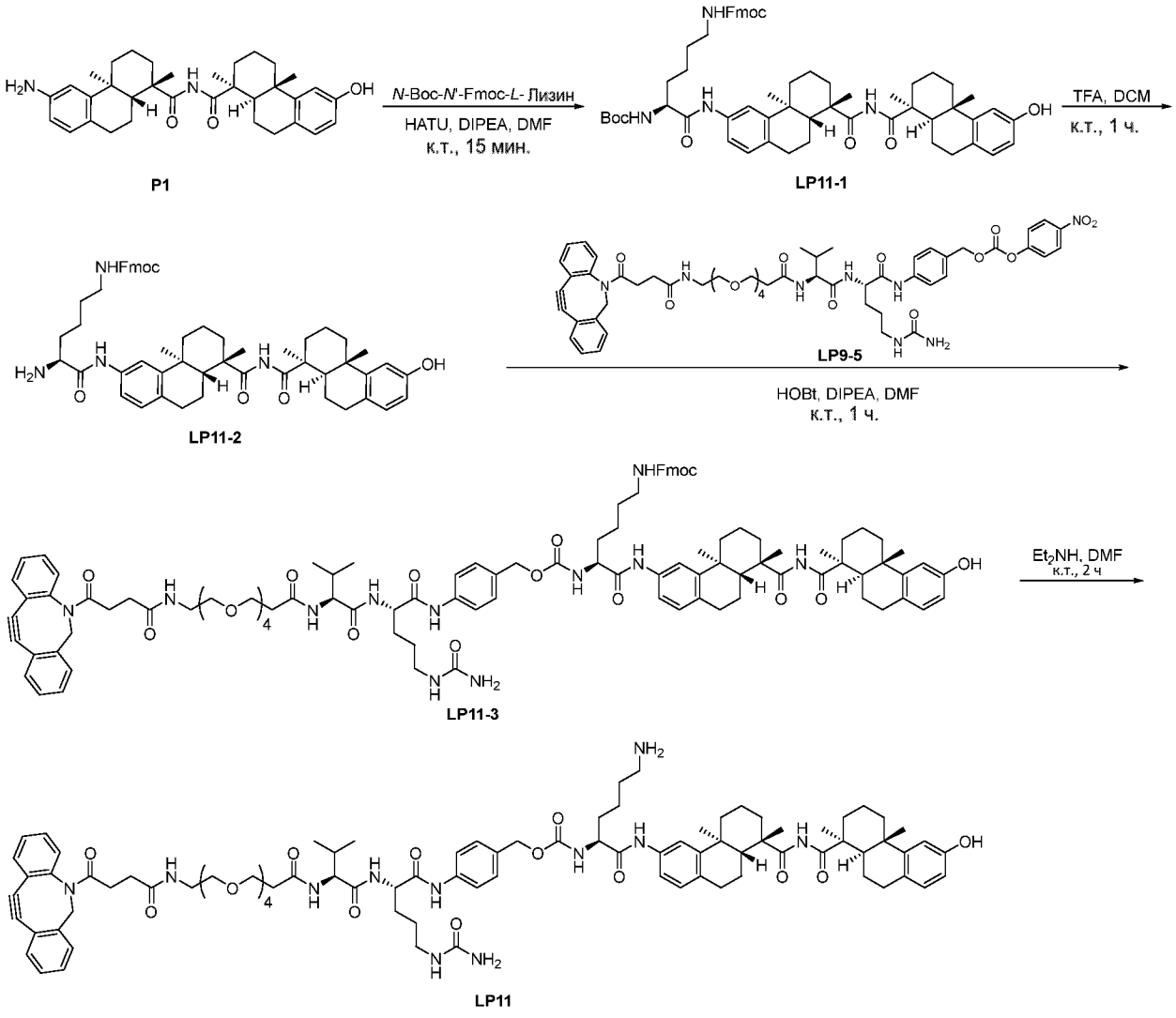
ФИГ. 5


LP18-1
таурин
DIPEA, dry DMF
к.т., ночь
LP18-2
LP1-4
LP18-4
DIPEA, DMF, к.т., 2 ч
LP18-3
LP18

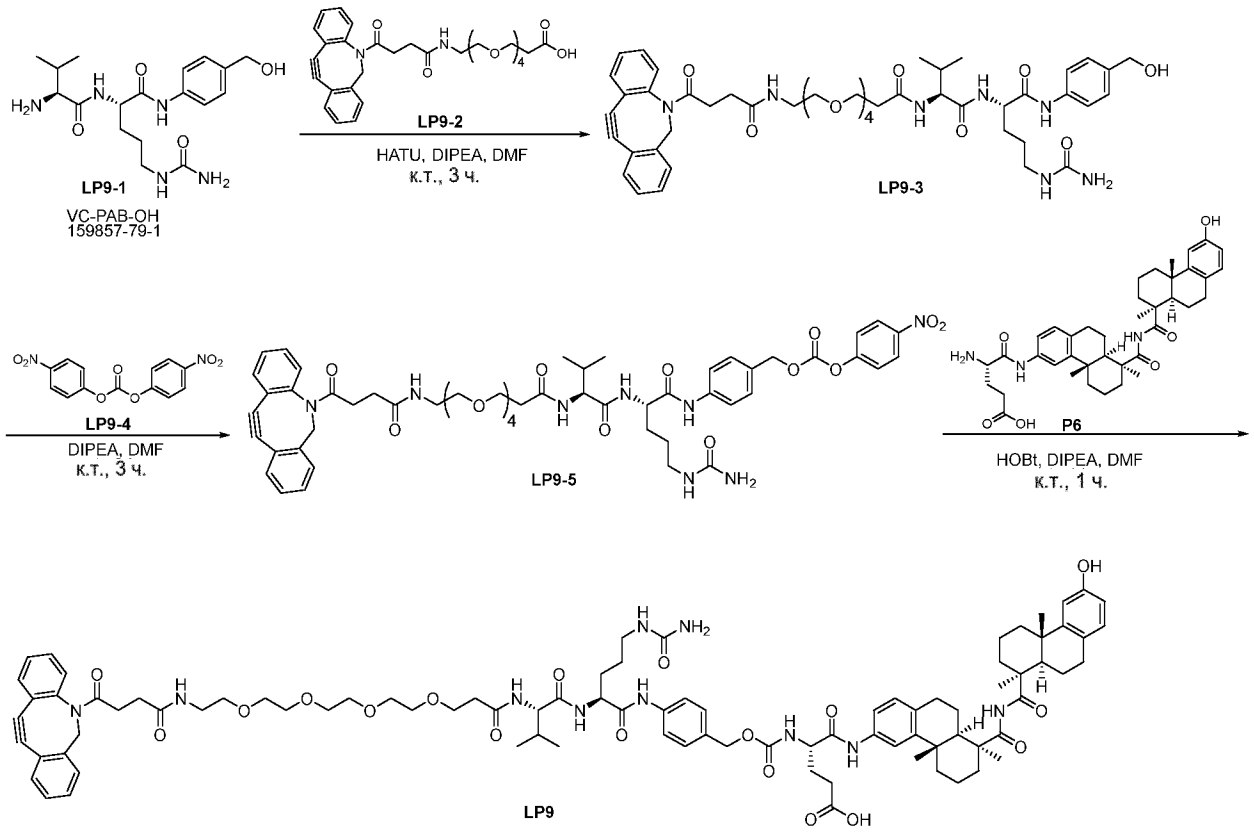
ФИГ. 6


P5
LP4-1
1) DIPEA, HOBt, DMF
2) Et2NH
LP4-2
LP4-3
1) HATU, DIPEA, DMF
2) Et2NH
LP4

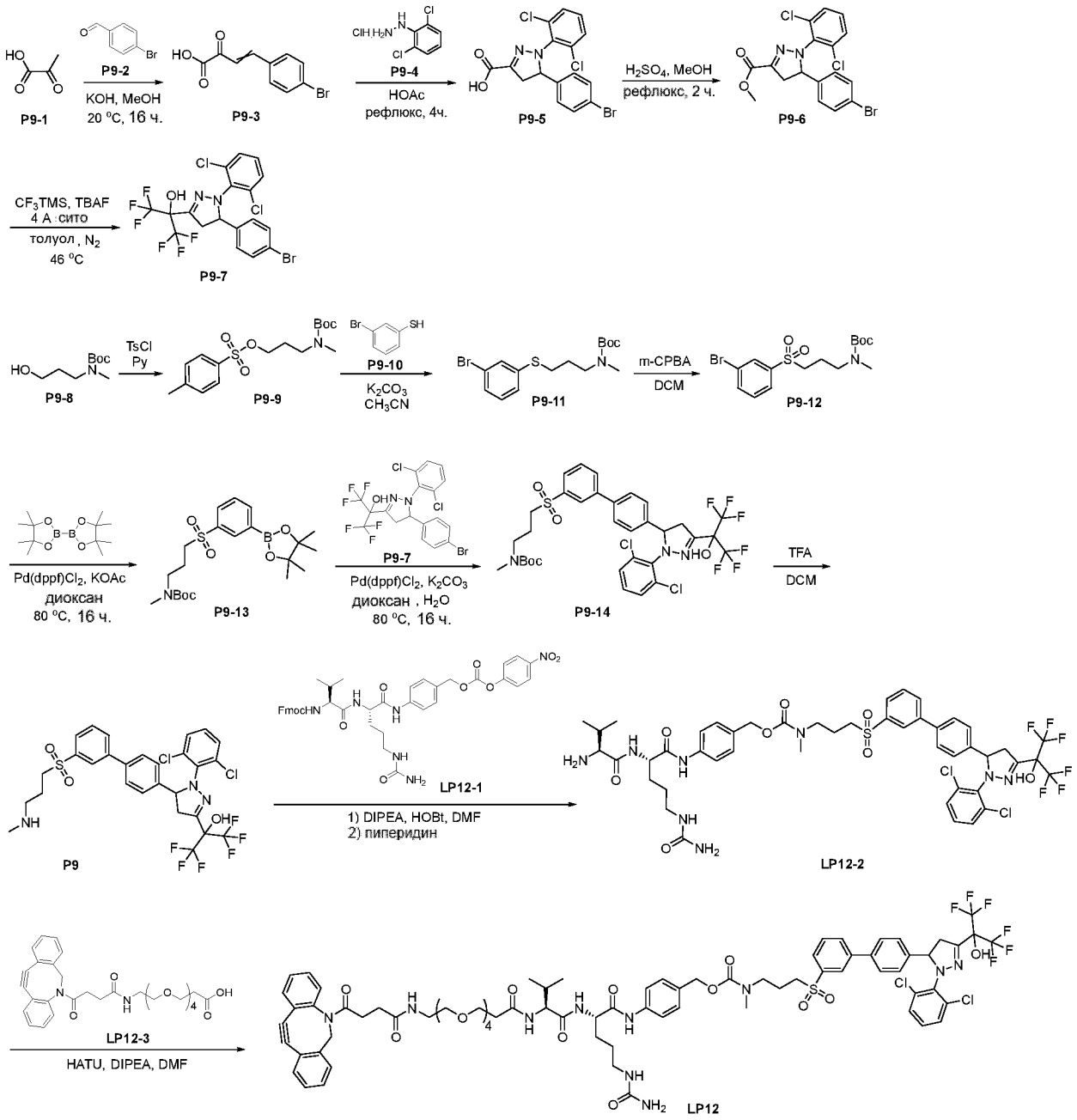
ФИГ. 7


P1
N-Boc-N'-Fmoc-L- Лизин
HATU, DIPEA, DMF
к.т., 15 мин.
LP11-1
TFA, DCM
к.т., 1 ч.
LP11-2
LP9-5
HOBt, DIPEA, DMF
к.т., 1 ч.
LP11-3
Et2NH, DMF
к.т., 2 ч
LP11

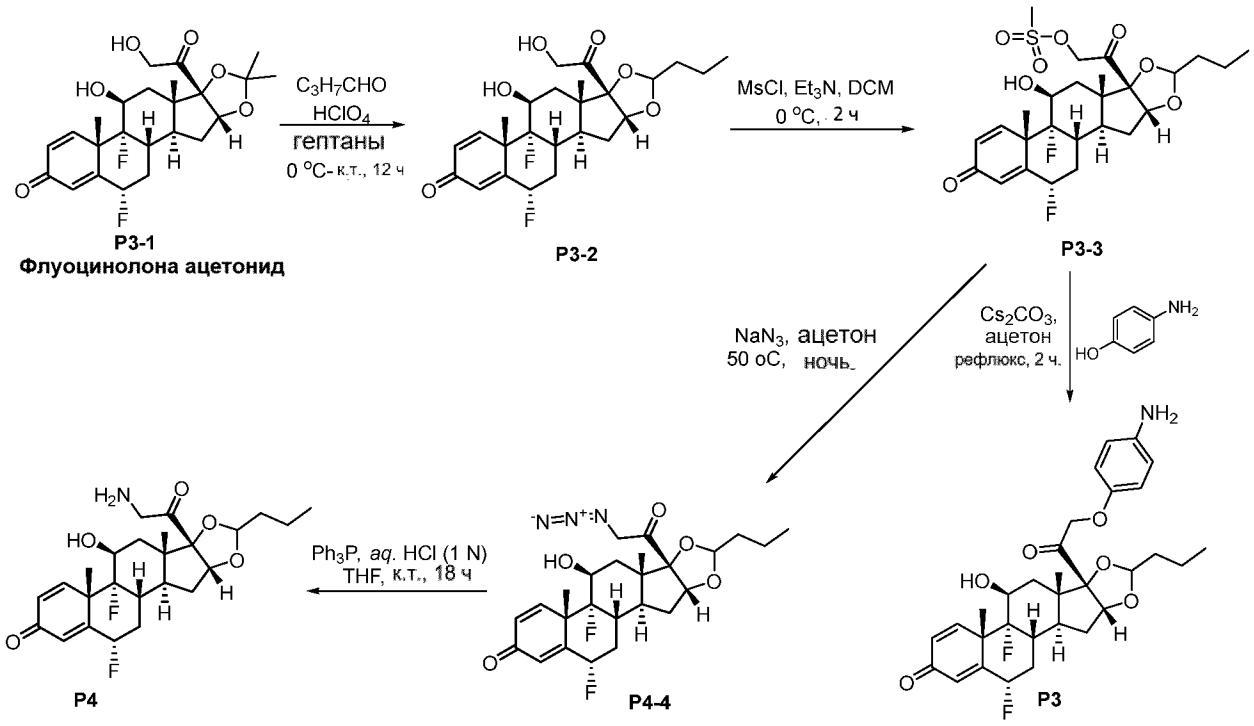
ФИГ. 8


LP9-1
VC-PAB-OH
159857-79-1
LP9-2
HATU, DIPEA, DMF
к.т., 3 ч.
LP9-3
LP9-4
DIPEA, DMF
к.т., 3 ч.
LP9-5
P6
HOBt, DIPEA, DMF
к.т., 1 ч.
LP9

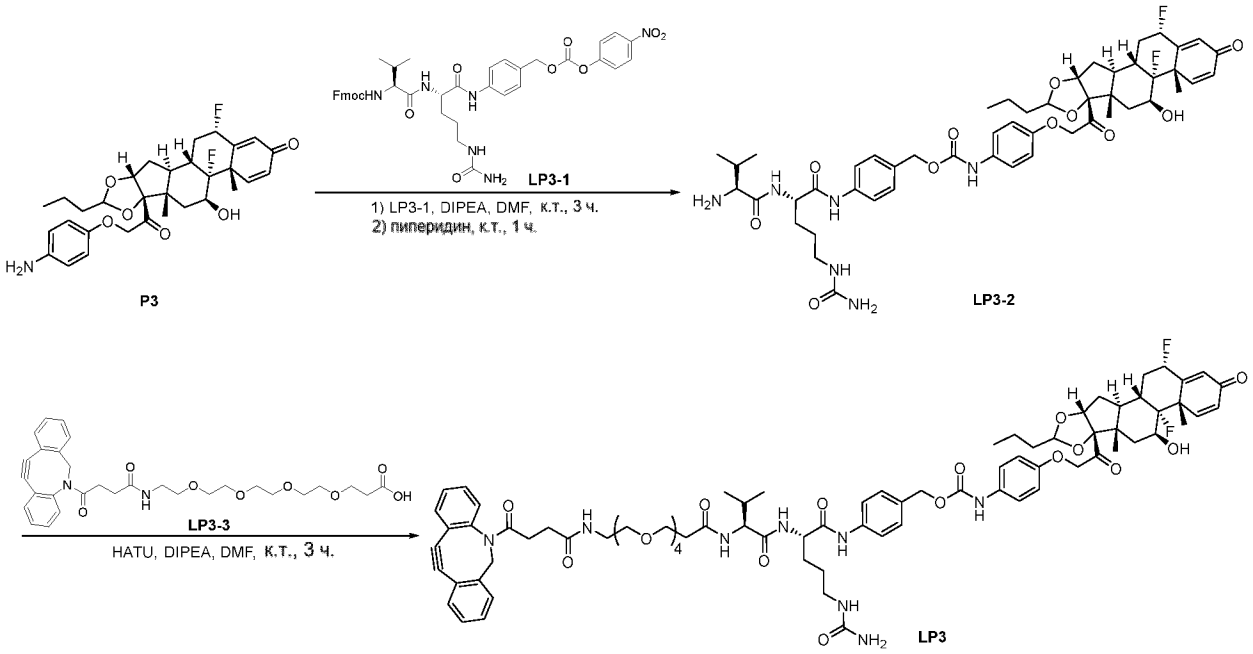
ФИГ. 9


P9-1
P9-2
KOH, MeOH
20 °C, 16 ч.
P9-3
P9-4
HOAc
рефлюкс, 4ч.
P9-5
H2SO4, MeOH
рефлюкс, 2 ч.
P9-6
CF3TMS, TBAF
4 A сито
толуол, N2
46 °C
P9-7
P9-8
TsCl
Py
P9-9
P9-10
K2CO3
CH3CN
P9-11
m-CPBA
DCM
P9-12
Pd(dppf)Cl2, KOAc
диоксан
80 °C, 16 ч.
P9-13
P9-7
Pd(dppf)Cl2, K2CO3
диоксан , H2O
80 °C, 16 ч.
P9-14
TFA
DCM
P9
LP12-1
1) DIPEA, HOBt, DMF
2) пиперидин
LP12-2
LP12-3
HATU, DIPEA, DMF
LP12

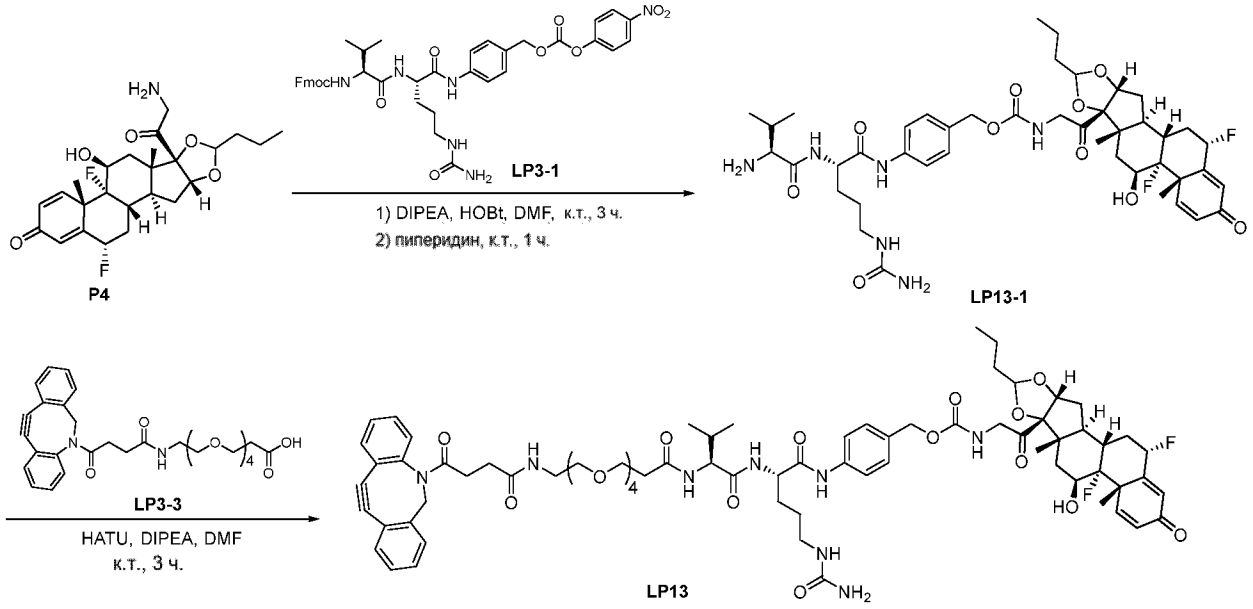
ФИГ. 10


P3-1
Флуоцинолона ацетонид
C3H7CHO
HClO4
гептаны
0 °C- к.т., 12 ч
P3-2
MsCl, Et3N, DCM
0 °C, 2 ч
P3-3
NaN3, ацетон
50 oC, ночь
Cs2CO3,
ацетон
рефлюкс, 2 ч.
P3
Ph3P, aq. HCl (1 N)
THF, к.т., 18 ч
P4-4
P4

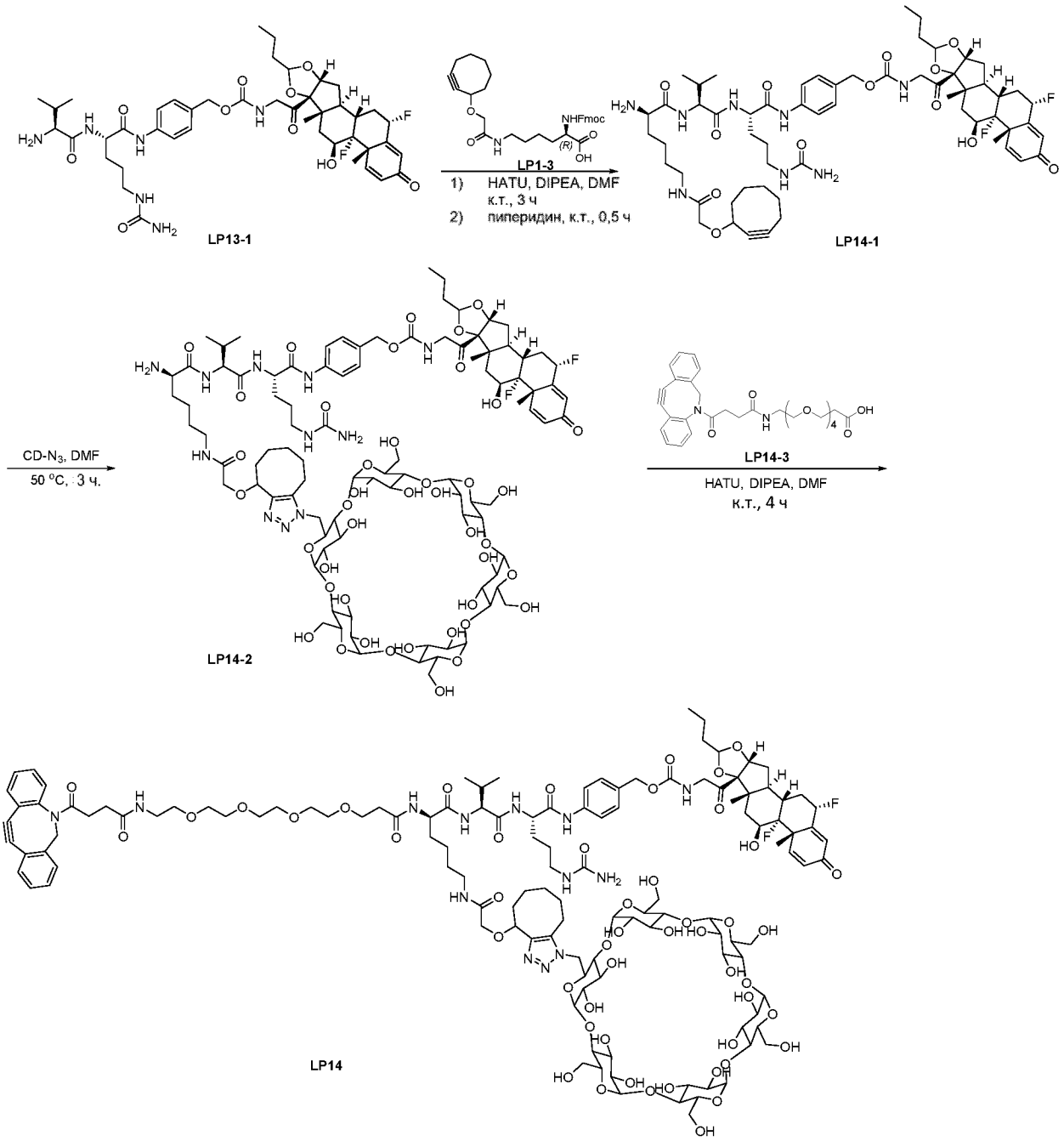
ФИГ. 11


P3
LP3-1
1) LP3-1, DIPEA, DMF, к.т., 3 ч.
2) пиперидин, к.т., 1 ч.
LP3-2
LP3-3
HATU, DIPEA, DMF, к.т., 3 ч.
LP3

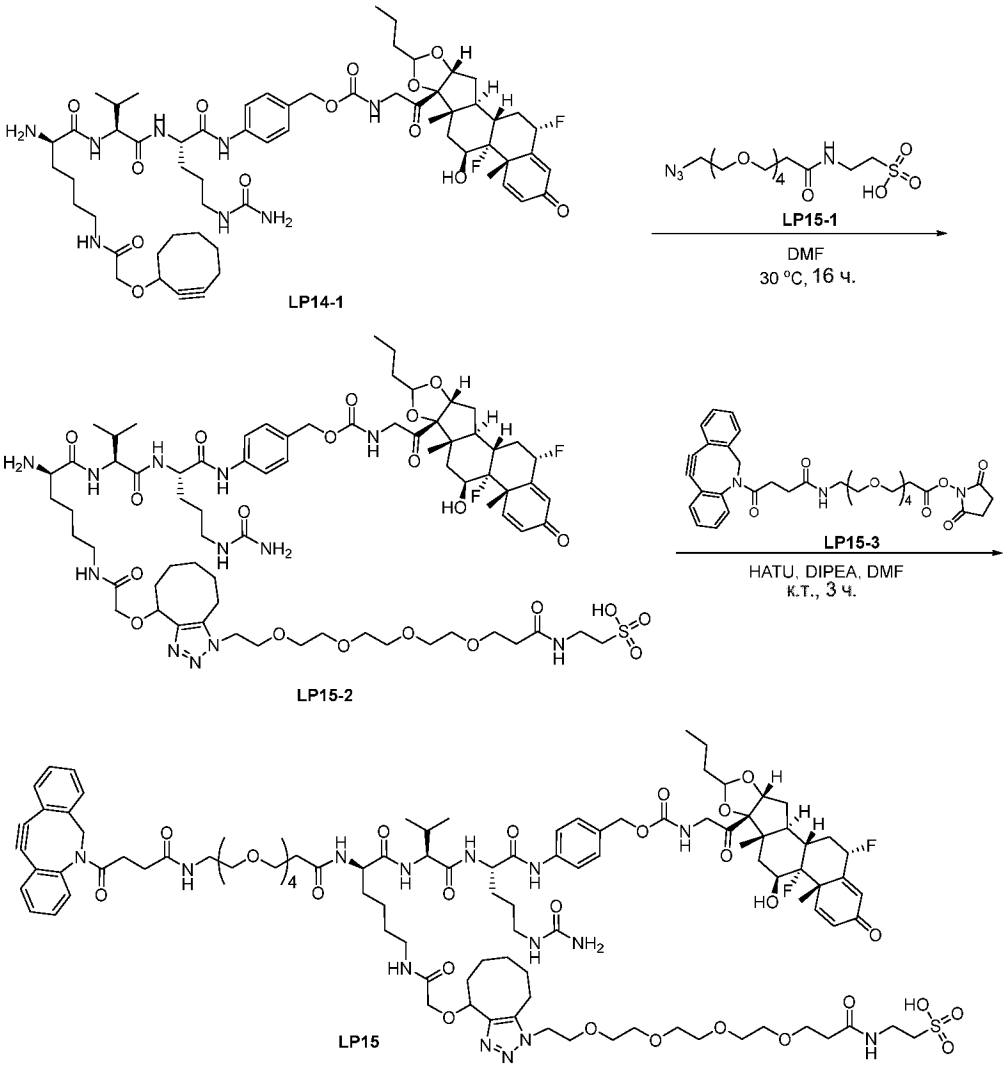
ФИГ. 12


P4
LP3-1
1) DIPEA, HOBt, DMF, к.т., 3 ч.
2) пиперидин, к.т., 1 ч.
LP13-1
LP3-3
HATU, DIPEA, DMF
к.т., 3 ч.
LP13

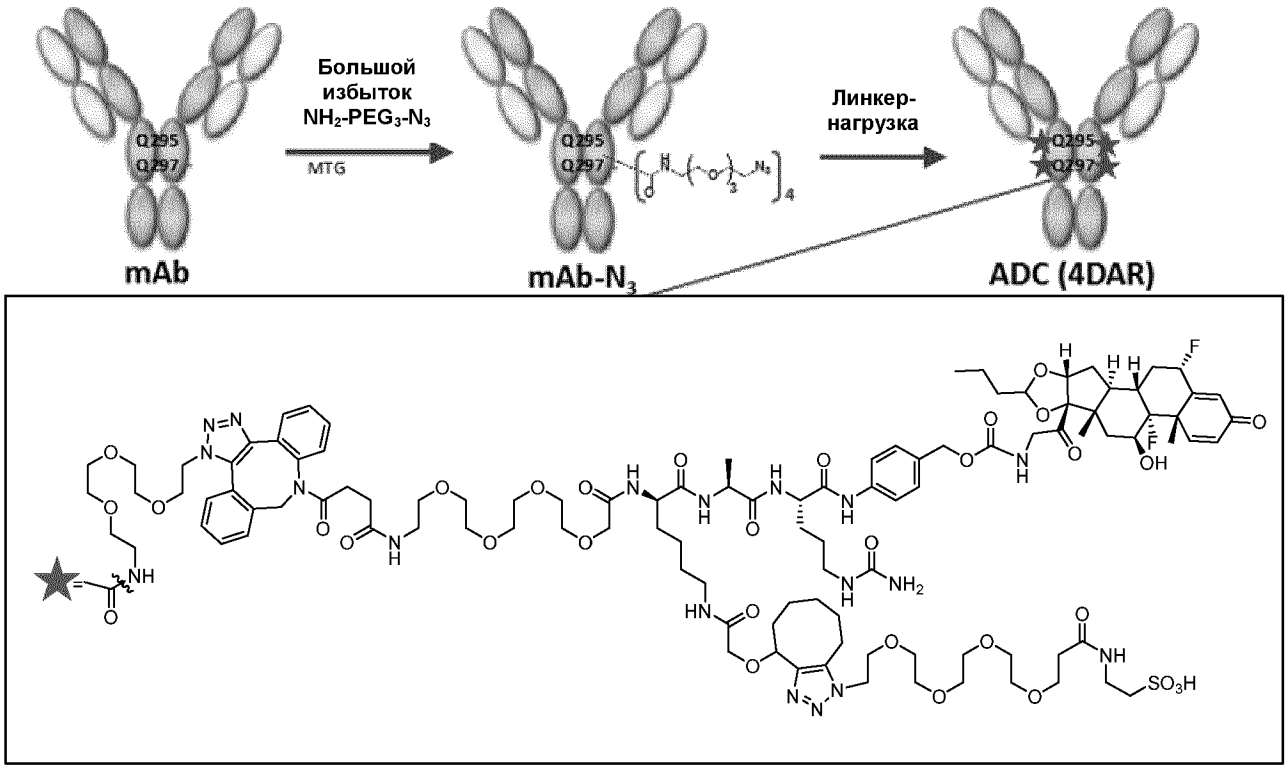
ФИГ. 13


LP13-1
LP1-3
1) HATU, DIPEA, DMF
к.т., 3 ч
2) пиперидин, к.т., 0,5 ч
LP14-1
CD-N3, DMF
50 °C, 3 ч.
LP14-2
LP14-3
HATU, DIPEA, DMF
к.т., 4 ч
LP14

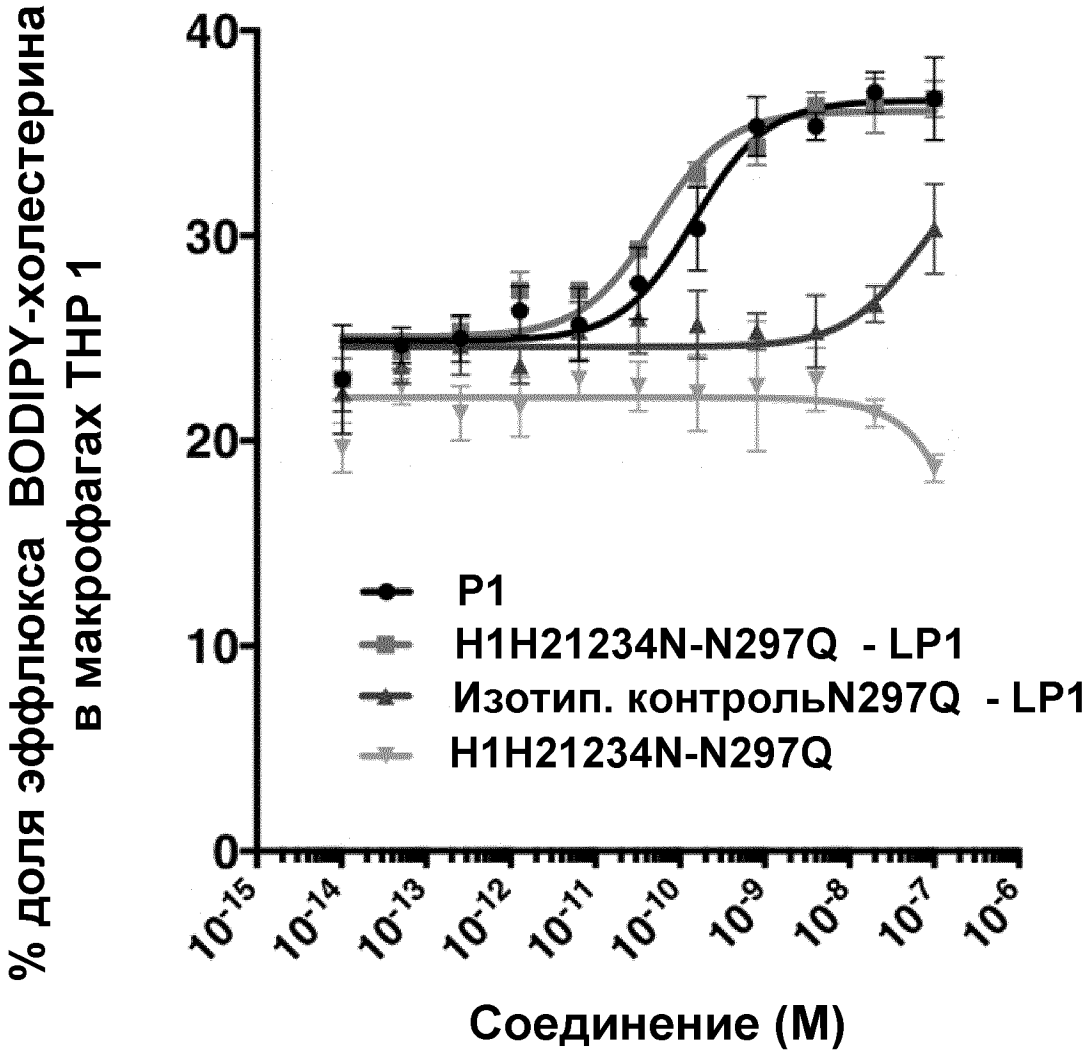
ФИГ. 14



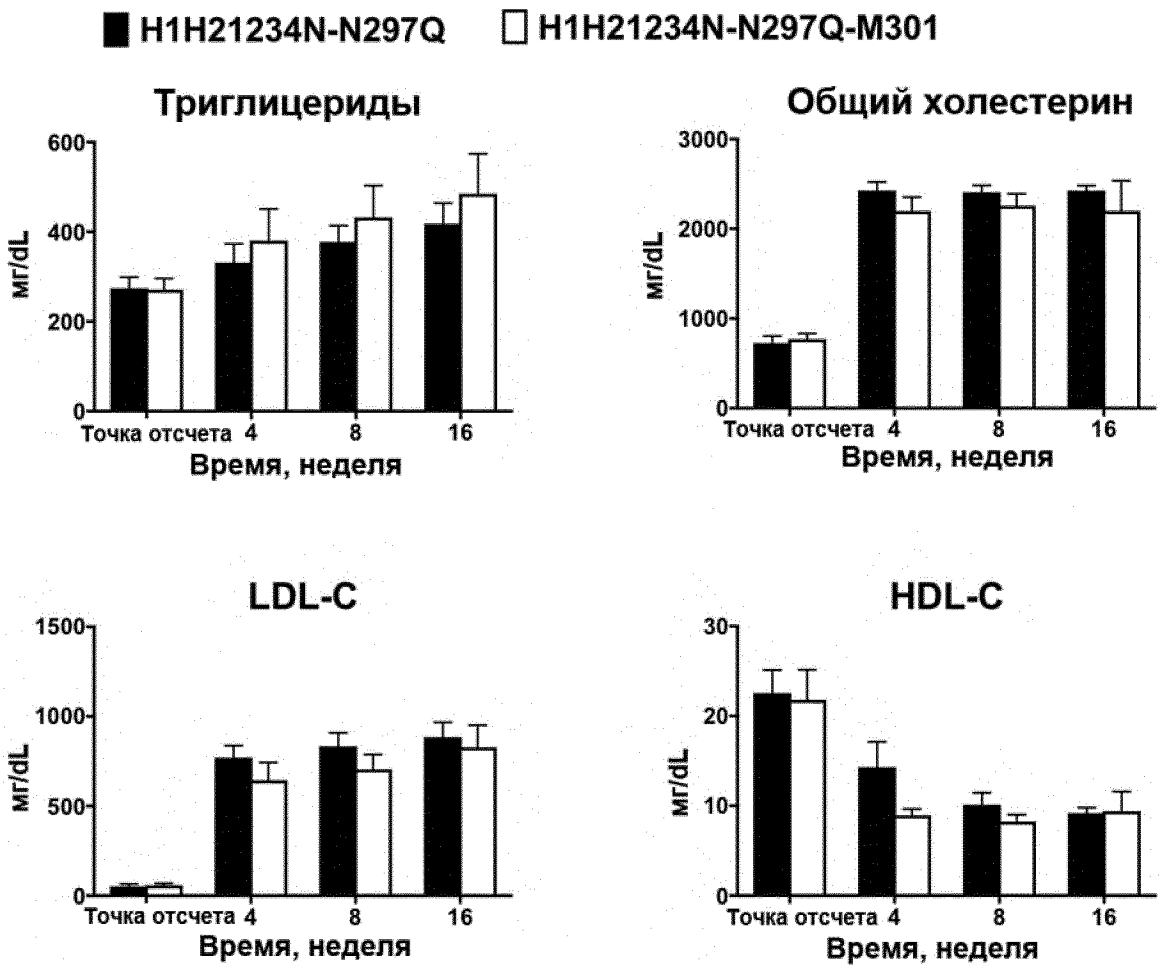
ФИГ. 15


Q295
Q297
Большой избыток
NH2-PEG3-N3
MTG
mAb
mAb-N3
Линкер-нагрузка
ADC (4DAR)

ФИГ. 16


% доля эффлюкса BODIPY-холестерина в макрофагах THP 1
40
30
20
10
0
10-15
10-14
10-13
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
P1
H1H21234N-N297Q - LP1
Изотип. контрольN297Q - LP1
H1H21234N-N297Q
Соединение (M)

ФИГ. 17

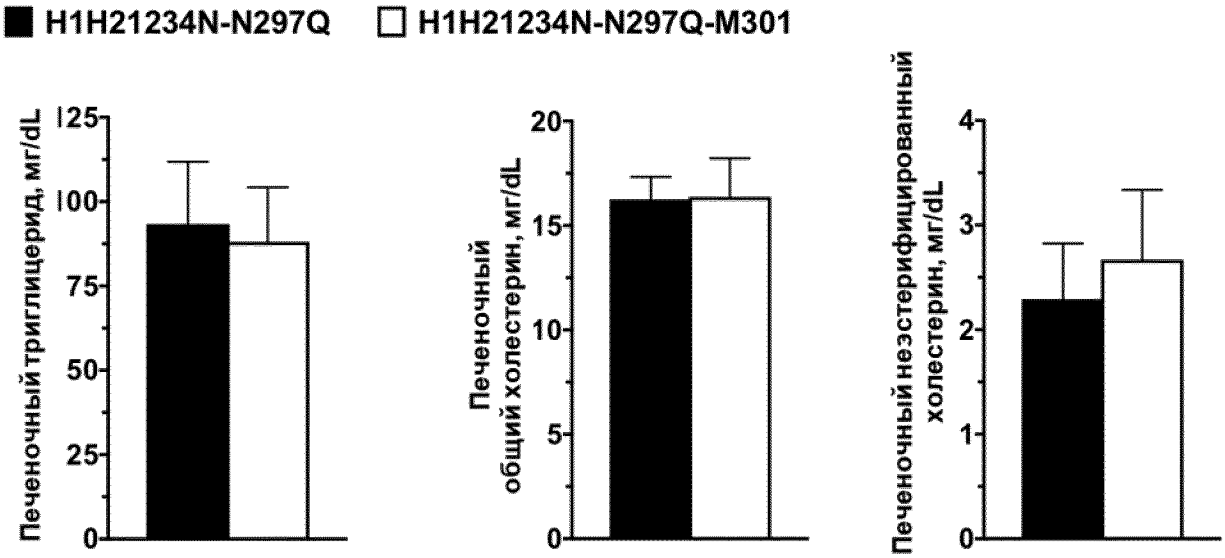

H1H21234N-N297Q
H1H21234N-N297Q-M301
Триглицериды
мг/dL
600
400
200
0
Точка отсчета 4 8 16
Время, неделя
Общий холестерин
мг/dL
3000
2000
1000
0
Точка отсчета 4 8 16
Время, неделя
LDL-C
мг/dL
1500
1000
500
0
Точка отсчета 4 8 16
Время, неделя
HDL-C
мг/dL
30
20
10
0
Точка отсчета 4 8 16
Время, неделя

ФИГ. 18

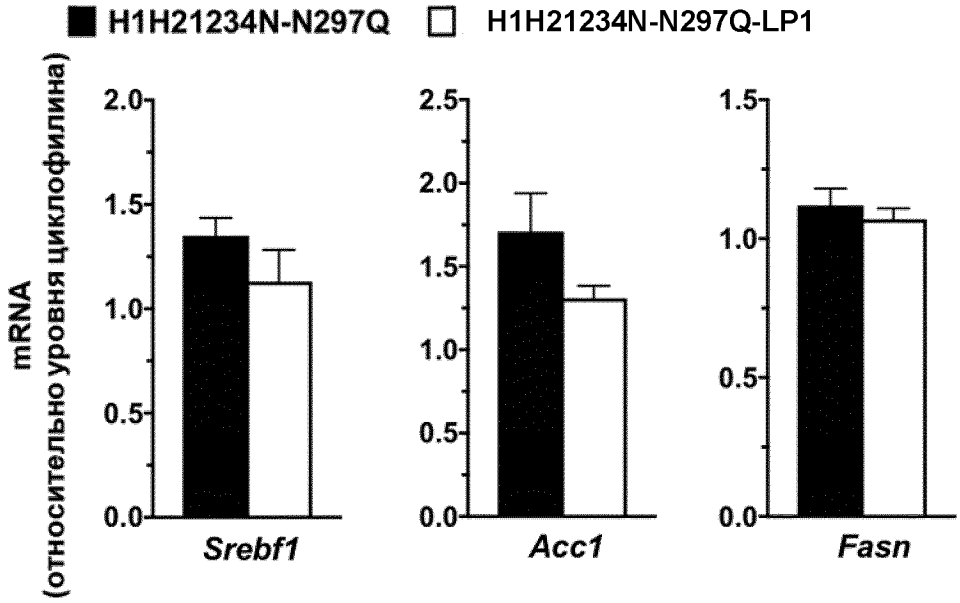


Статистическое сравнение по t-критерию Уэлча, *p<0.05

ФИГ. 19

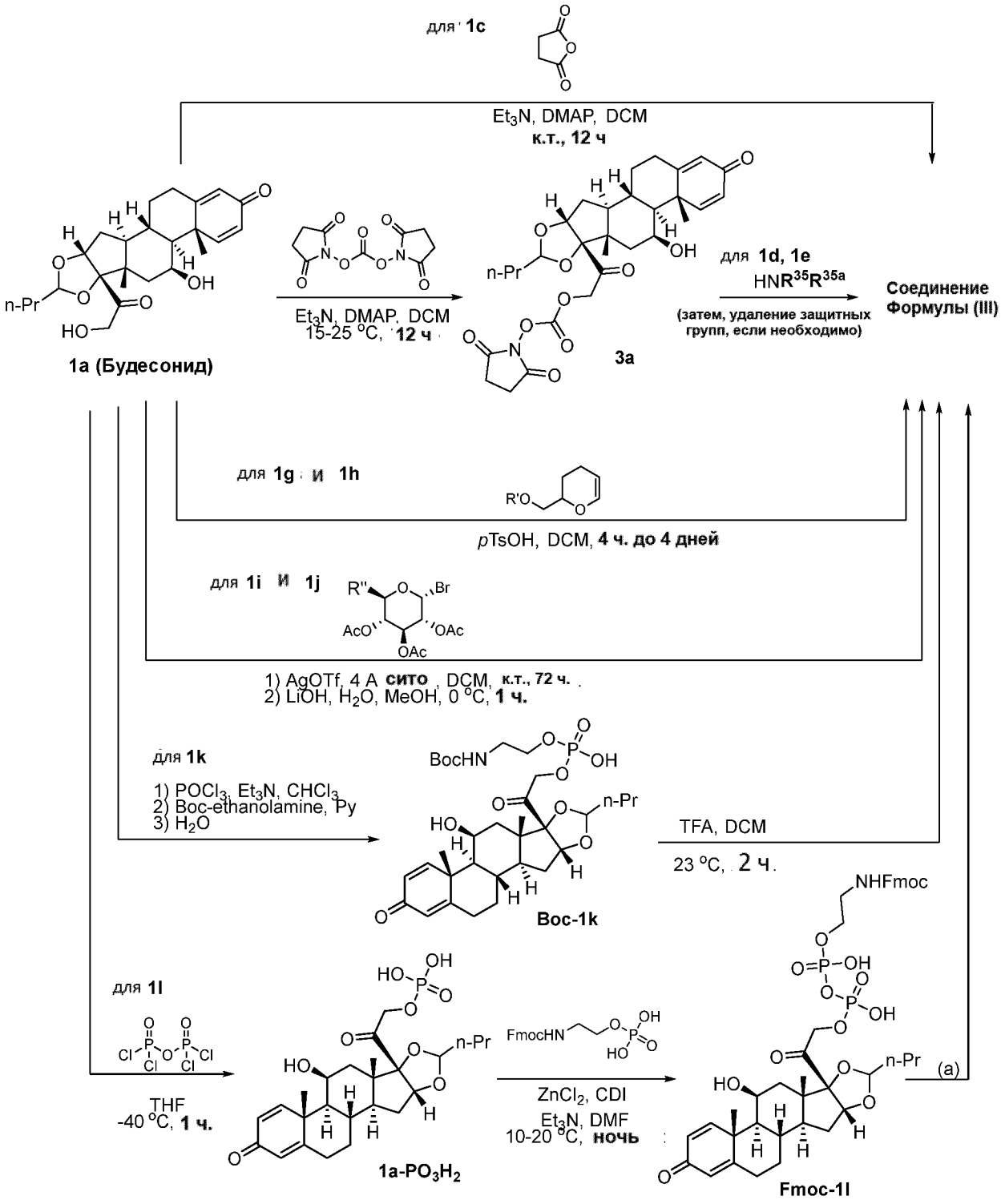

H1H21234N-N297Q
H1H21234N-N297Q-M301
Печеночный триглицерид, мг/dL
125
100
75
50
25
0
Печеночный общий холестерин, мг/dL
20
15
10
5
0
Печеночный неэстерифицированный холестерин, мг/dL
4
3
2
1
0

ФИГ. 20


H1H21234N-N297Q
H1H21234N-N297Q-LP1
mRNA
(относительно уровня циклофилина)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Srebf1
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Acc1
1.5
1.0
0.5
0.0
Fasn

ФИГ. 21

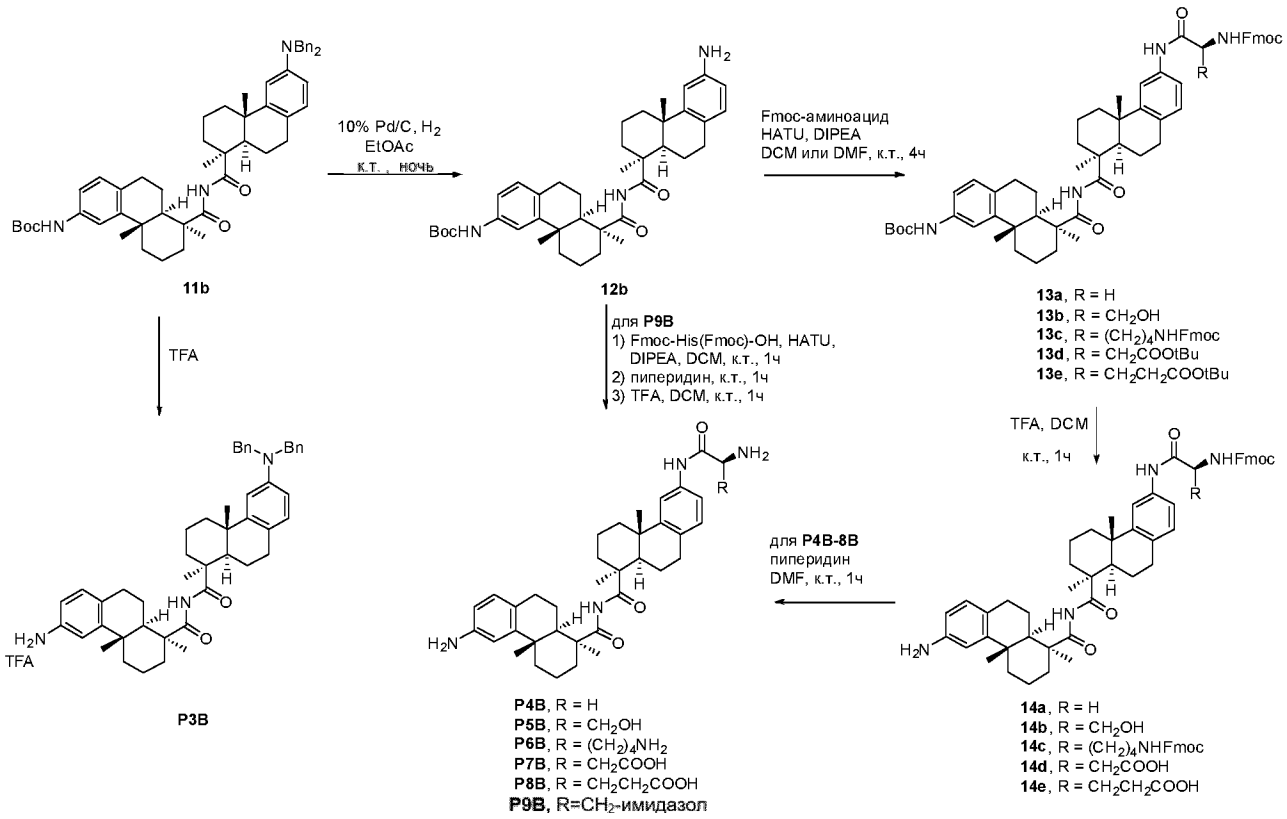
Схема 1. Синтез Спейсер-Будесонид 1c-1e, 1g-1i, и 1j-1l



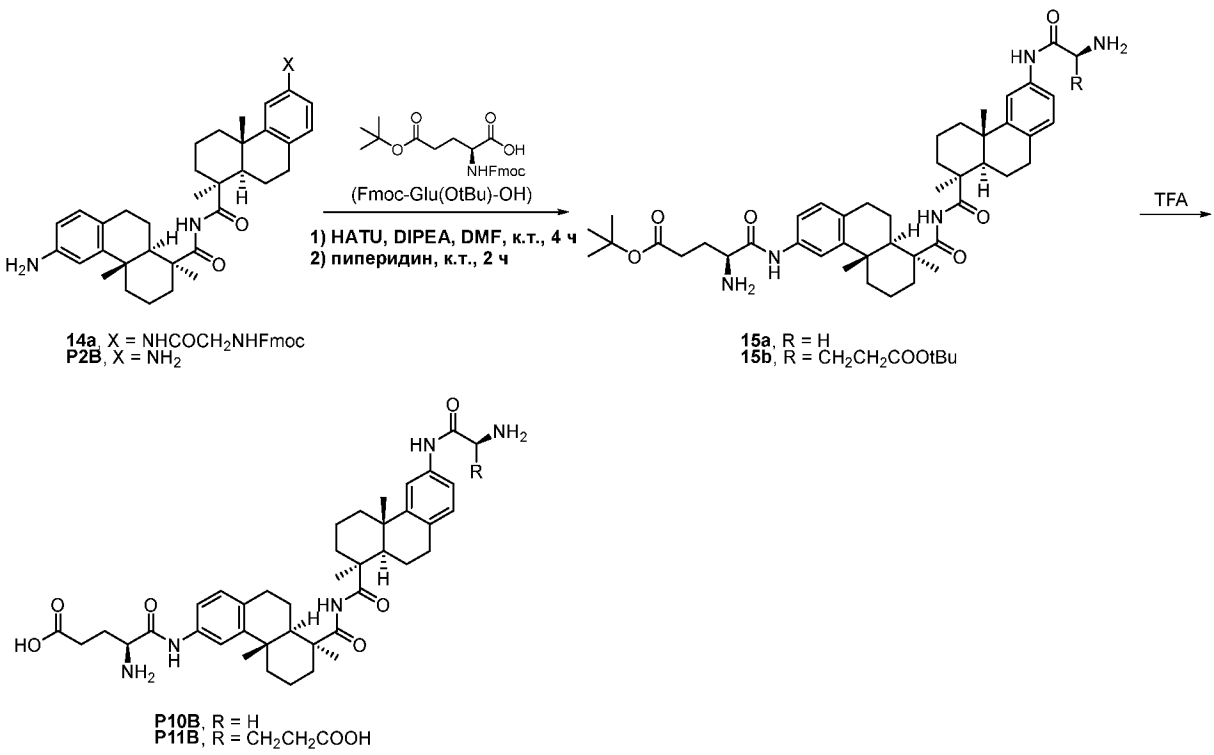
a) пиперидин, DCIM, 10-20°C, 16 ч.

Где Соединение Формулы (III) включает **1c, 1d, 1e, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k, 1l**

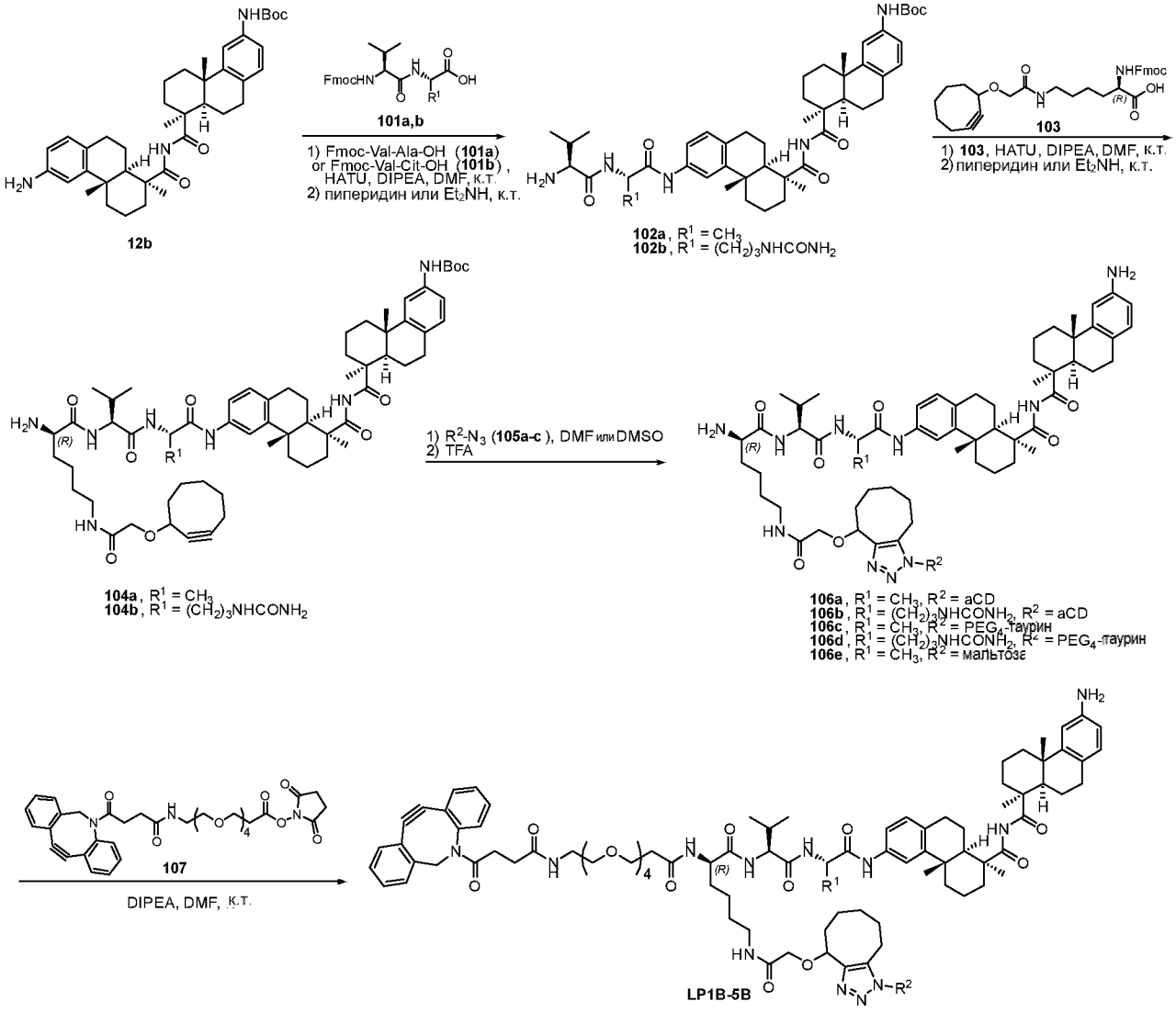
ФИГ. 22



ФИГ. 23 Синтез нагрузок P3B-P9B

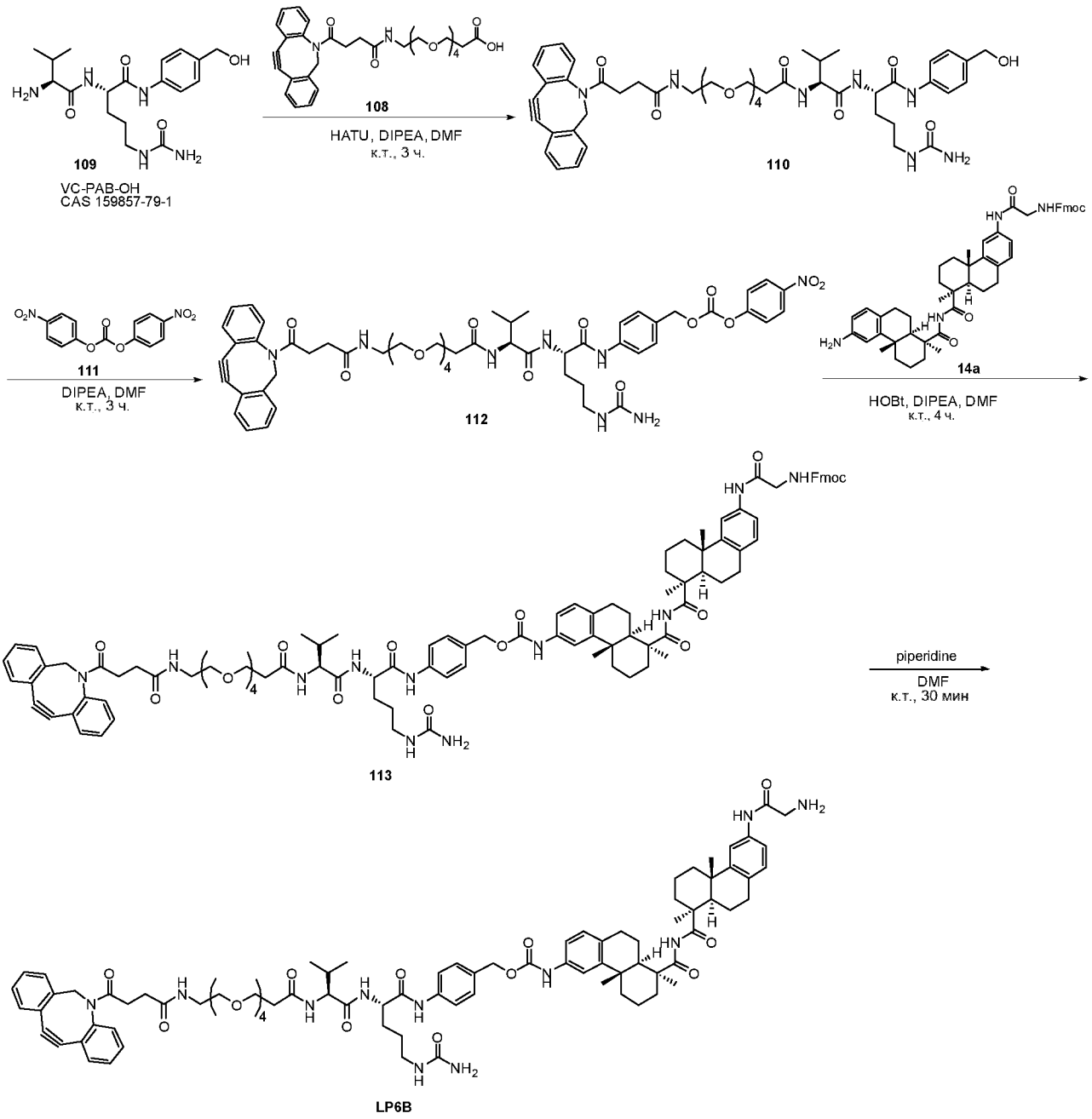


ФИГ. 24 Синтез нагрузок P10B и P11B

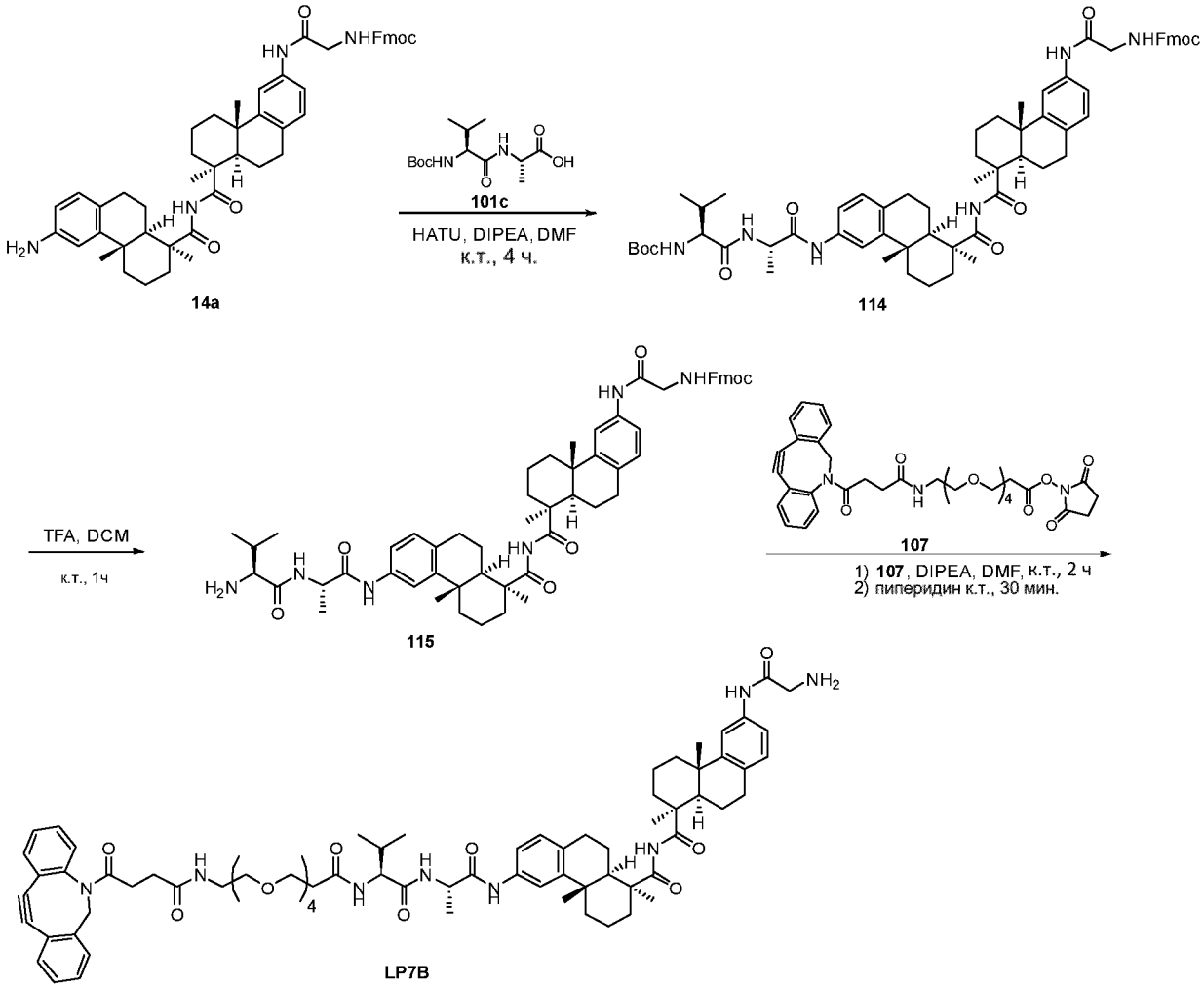


Cpd#	R^1	R^2
LP1B	CH_3	αCD
LP2B	$(CH_2)_3NHCONH_2$	αCD
LP3B	CH_3	PEG_4-таурин
LP4B	$(CH_2)_3NHCONH_2$	PEG_4-таурин
LP5B	CH_3	мальтоза

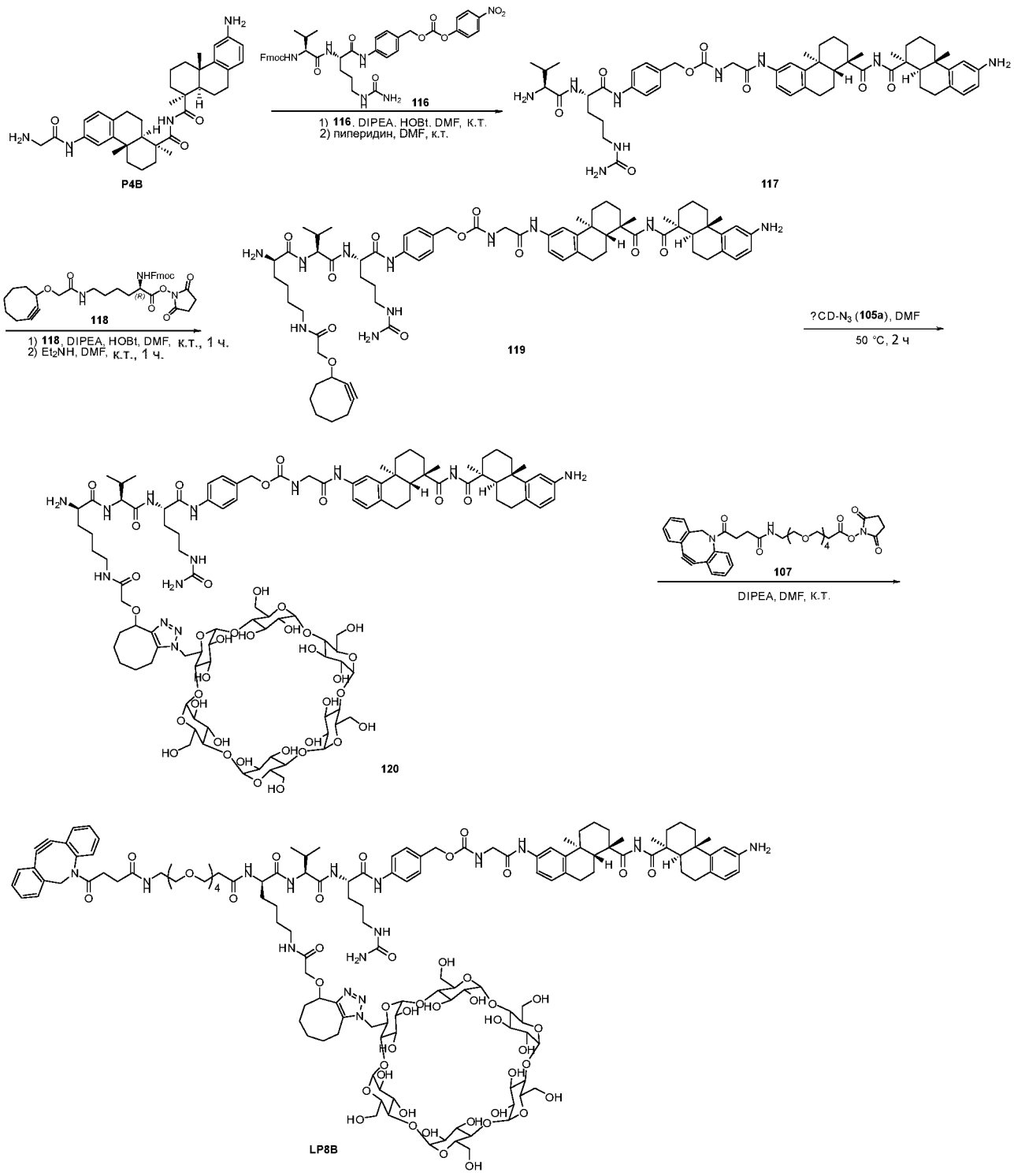
ФИГ. 25 Общий синтез линкера и LP1B-5B



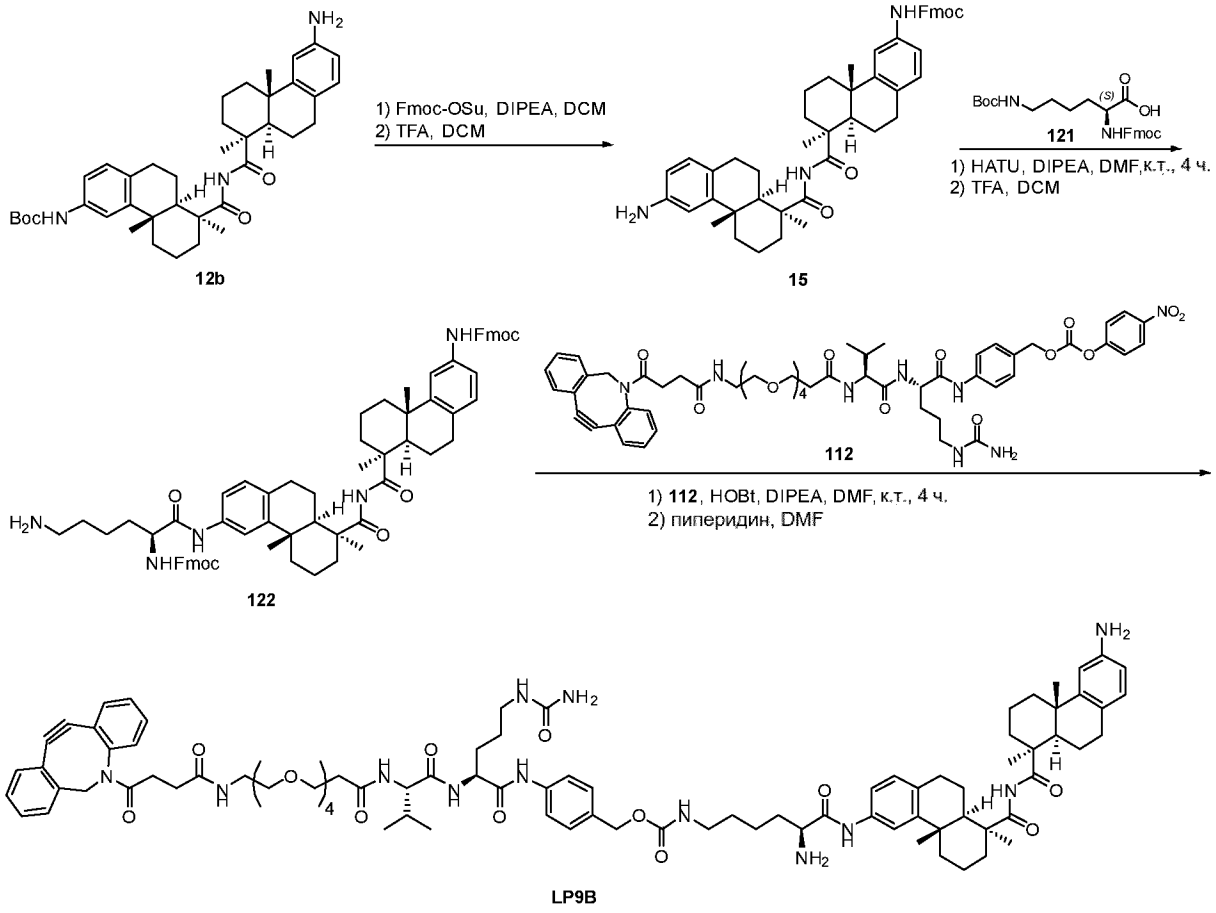
ФИГ. 26 Synthesis of LP6B



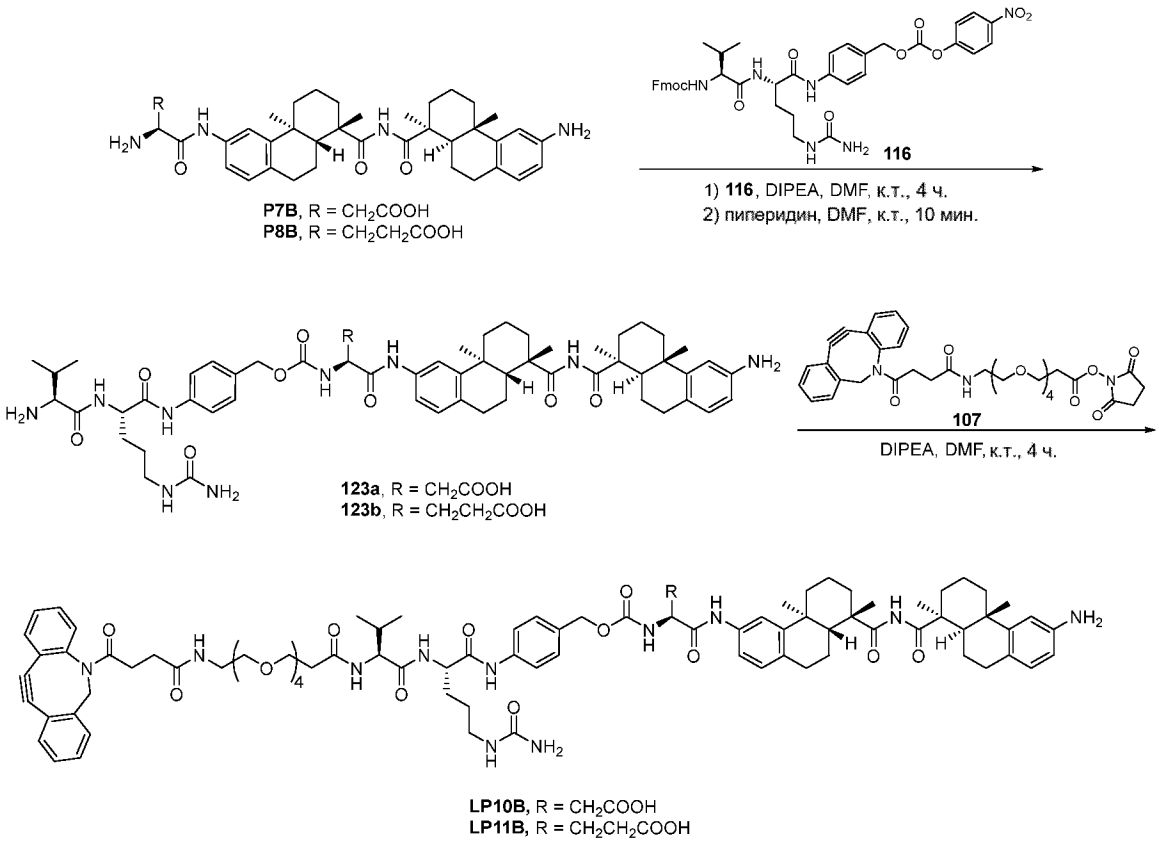
ФИГ. 27 Синтез LP7B



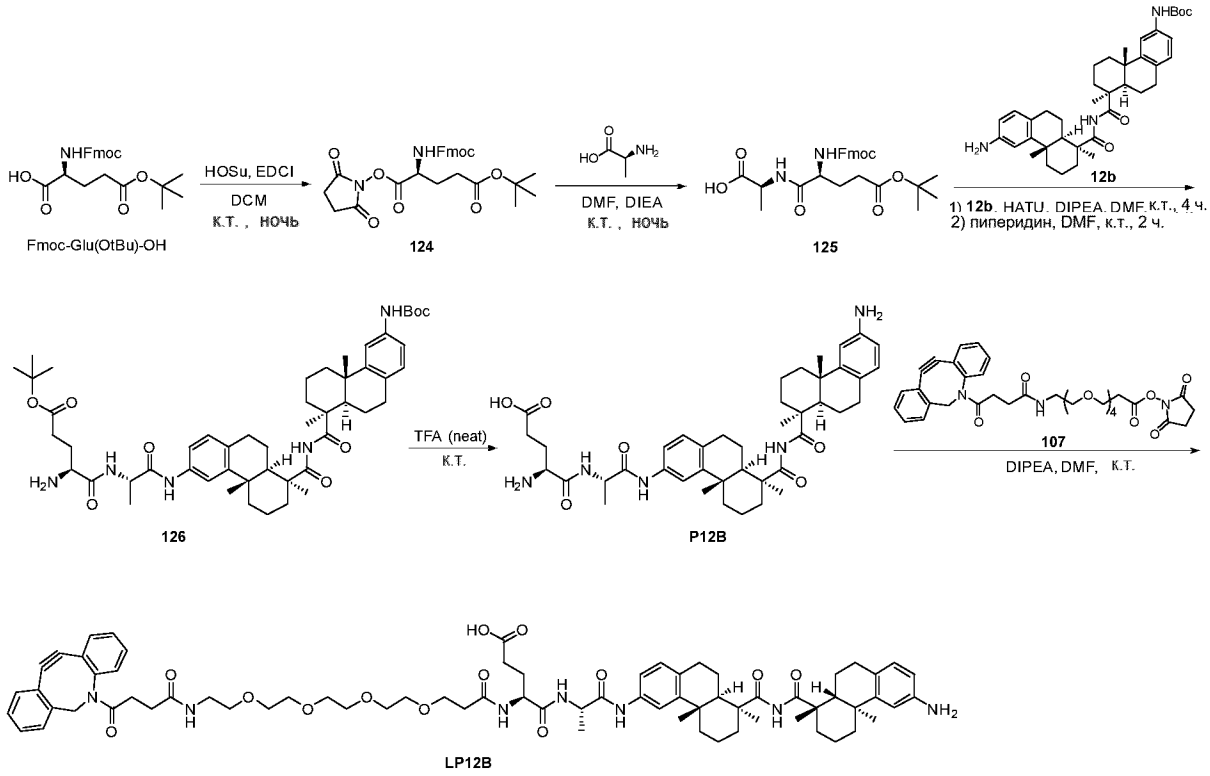
ФИГ.28 Синтез LP8B



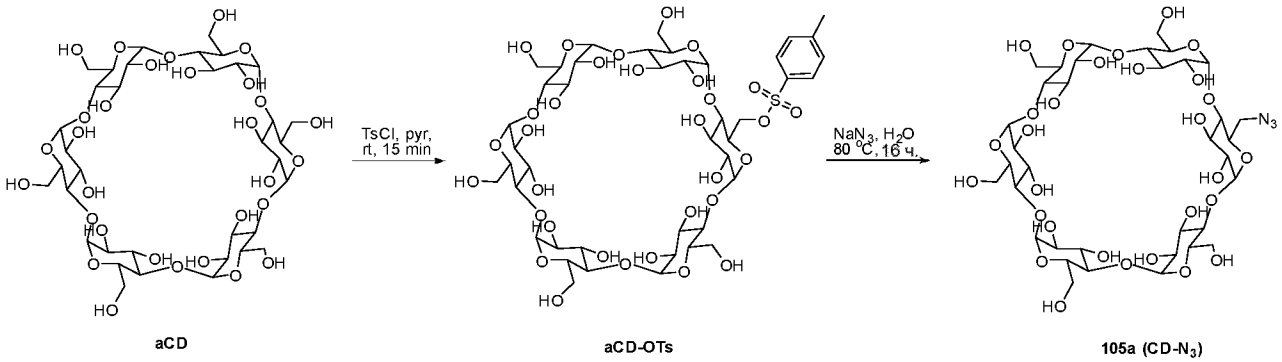
ФИГ.29 Синтез LP9B



ФИГ.30 Синтез LP10B и LP11B



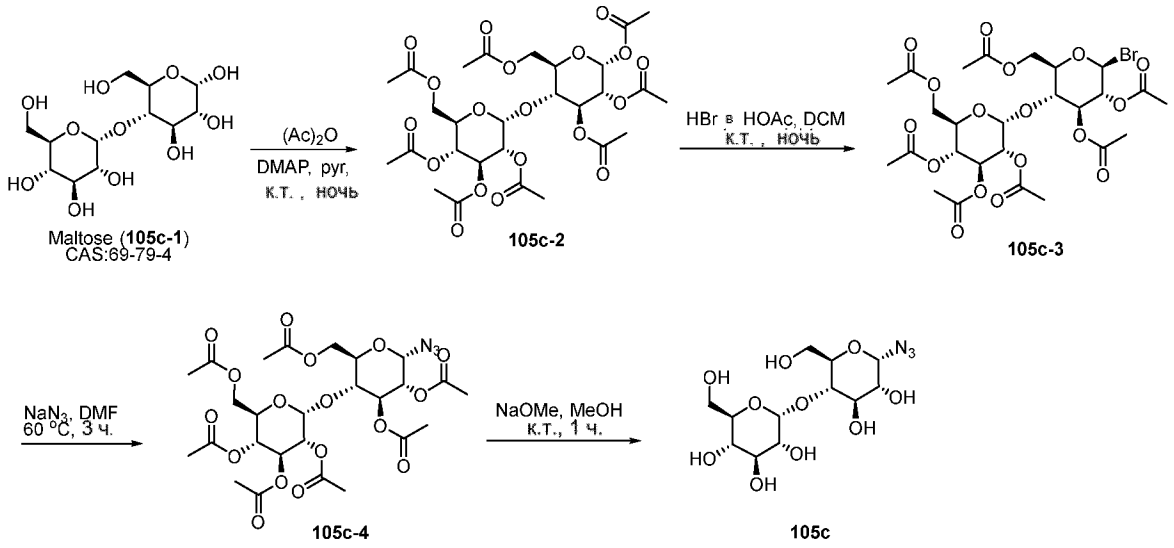
ФИГ.31 Синтез P12B и LP12B



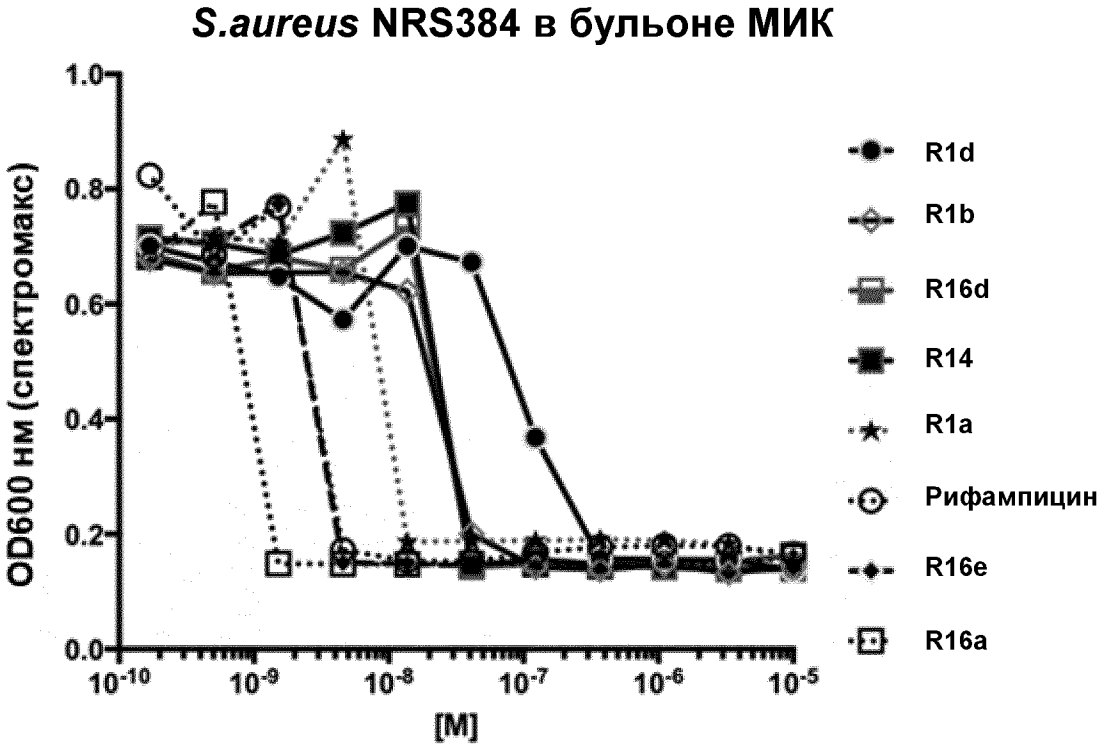
ФИГ.32 Синтез азида 105a



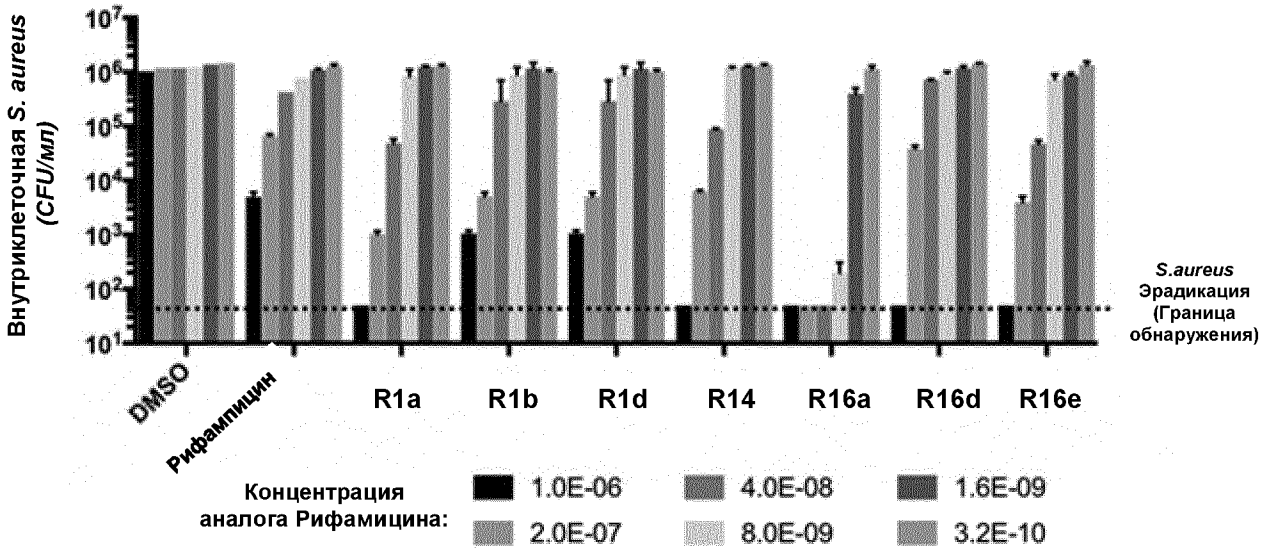
ФИГ. 33 Синтез азида 105b



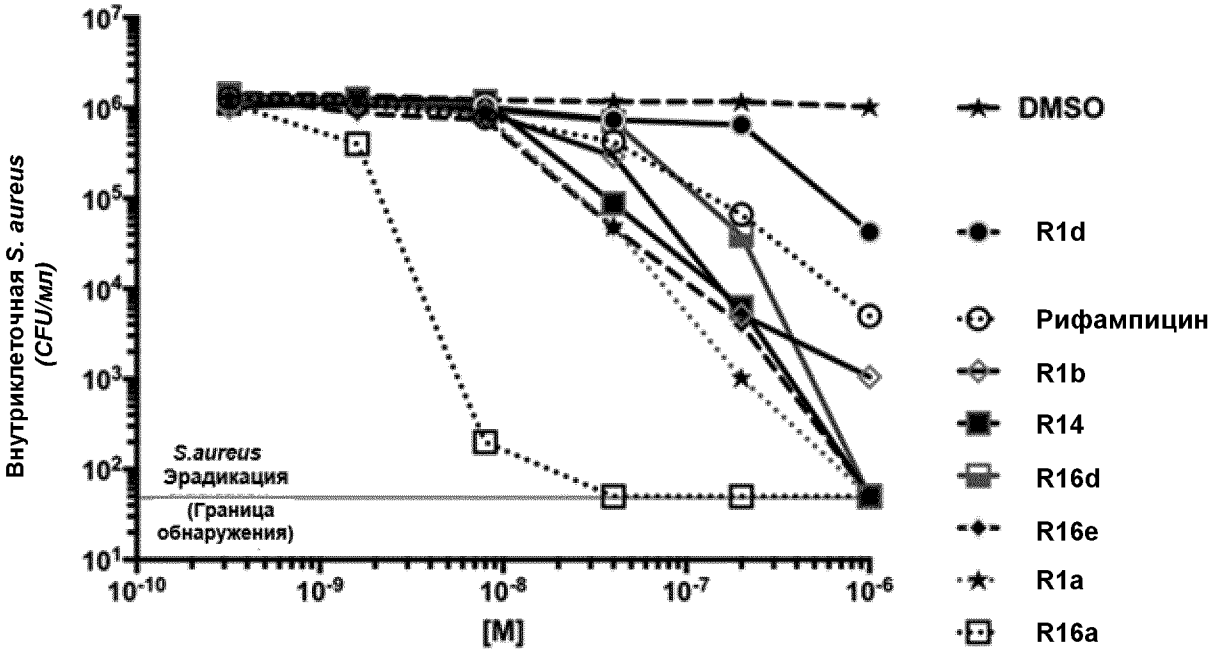
ФИГ. 34 Синтез интермедиата 105c


S.aureus NRS384 в бульоне МИК
OD600 нм (спектромакс)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
[M]
R1d
R1b
R16d
R14
R1a
Рифампицин
R16e
R16a

ФИГ. 35


Внутриклеточная S. aureus (CFU/мл)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
DMSO
Рифампицин
R1a
R1b
R1d
R14
R16a
R16d
R16e
S.aureus Эрадикация (Граница обнаружения)
Концентрация аналога Рифамицина:
1.0E-06
2.0E-07
4.0E-08
8.0E-09
1.6E-09
3.2E-10

ФИГ. 36


Внутриклеточная S. aureus (CFU/мл)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
S.aureus Эрадикация
(Граница обнаружения)
10^{-10}
10^{-9}
10^{-8}
10^{-7}
10^{-6}
[M]
DMSO
R1d
Рифампицин
R1b
R14
R16d
R16e
R1a
R16a

ФИГ. 37