

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390142** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.06

(22) Дата подачи заявки
2021.06.25

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛА К В7-Н3

(31) **63/044,764**

(32) **2020.06.26**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2021/000445**

(87) **WO 2021/260438 2021.12.30**

(71) Заявитель:
**ИНТОСЕЛЛ, ИНК.; УАЙ-
БАЙОЛОДЖИКС ИНК. (KR)**

(72) Изобретатель:

**Парк Тэкё, Ким Суньянг, Парк
Сухо, Дзунг Доохван, Сео Донгхоон,
Ли Сангкванг, Юн Сангхиен, Ха
Дзихиен, Ли Хян Сук, Парк Окку,
Сео Беомсеок, Ким Сена, Соль Мина,
Сонг Дзина, У Сун Хо, Чо Дзонгун, Ли
Дзаехо, Ли Хиун Ми, Парк Дзае Еун,
Сонг Юунгдза, Ли Еундзин, Ли Хиун
Дзу, Шим Еун-Юунг, Ко Юндзунг, Ли
Миндзу, Парк Юунг Ву, Рью Йосуп
(KR)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (КАЛС), в которых один или более активных агентов конъюгированы с антителом к В7-Н3 через линкер. Линкер может содержать единицу, которая ковалентно связывает активные агенты с антителом. Кроме того, данное изобретение относится к моноклональным антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, вариантам, мультимерным версиям или их биспецифическими формами, которые специфически связывают В7-Н3, а также к способам получения и применения данных антител к В7-Н3 и их антигенсвязывающих фрагментов в широком спектре лечебных, диагностических и профилактических показаний.

A1

202390142

202390142

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576797EA/042

КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛА К В7-Н3

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/044764, поданной 26 июня 2020 г. Данная заявка включена в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (КАЛС) сочетают специфичность связывания антител с активностью химиотерапевтических агентов. Поскольку технология КАЛС позволяет точно доставлять лекарственное средство к клетке-мишени онкологического заболевания и высвобождать его при определенных условиях, сводя к минимуму побочное повреждение здоровых клеток, технология КАЛС повышает эффективность терапевтического антитела и снижает риск побочных реакций.

В7-Н3 (CD276) является новым членом семейства В7 и имеет до около 30% гомологии последовательности. Первоначально В7-Н3 был введен в качестве костимулирующей молекулы для Т-клеток, но зарекомендовал себя как ко-ингибирующий лиганд контрольной точки, который может регулировать хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, и естественные клетки-киллеры в иммунитете человека. Экспрессия белка В7-Н3 очень ограничена в нормальных тканях, но индуцируется на клеточной поверхности антигенпрезентирующих клеток и широко распространена в различных солидных опухолях при первичном и метастатическом онкологическом заболевании. Также экспрессия В7-Н3 обнаружена на нескольких типах клеток онкологического заболевания, включая стволовые клетки онкологического заболевания и опухолевую васкулатуру. Сверхэкспрессия В7-Н3, по-видимому, глубоко коррелирует с тяжестью заболевания и плохими клиническими исходами в опухолевых заболеваниях.

Соответственно, существует потребность в улучшенных конъюгатах антитело-лекарственное средство, нацеленных на В7-Н3.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

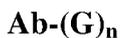
В некоторых аспектах изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (КАЛС). В некоторых вариантах реализации изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему антитело, линкер и активный агент (например, лекарственное средство). Конъюгат антитело-лекарственное средство может содержать саморазрушающуюся группу, например, для использования при высвобождении активного агента из антитела и линкера.

В описании предложены моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты или любые их фрагменты, варианты, мультимерные версии или биспецифические формы, которые связывают В7-Н3. Эти антитела и антигенсвязывающие фрагменты или любые их фрагменты, варианты, мультимерные версии или их

биспецифические формы в совокупности называются в данном документе моноклональными антителами к В7-Н3 или В7-Н3 mAb или антигенсвязывающими фрагментами или любыми фрагментами, вариантами, мультимерными версиями, или их биспецифическими формами. Предпочтительно моноклональные антитела и антигенсвязывающие фрагменты или любые их фрагменты, варианты, мультимерные версии или биспецифические формы являются специфичными, по меньшей мере, в отношении В7-Н3 человека. В некоторых вариантах реализации моноклональные антитела и антигенсвязывающие фрагменты или любые их фрагменты, варианты, мультимерные версии или их биспецифические формы, которые распознают В7-Н3 человека, также обладают перекрестной реактивностью по меньшей мере в отношении одного другого нечеловеческого белка В7-Н3, такого как, в качестве неограничивающего примера, В7-Н3 примата, отличного от человека, например, В7-Н3 яванского макака и/или В7-Н3 грызуна.

В некоторых аспектах изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (КАЛС), содержащим антитело, по меньшей мере один разветвленный линкер, ковалентно связанный с антителом, и по меньшей мере один или два активных агента, ковалентно связанных с разветвленным линкером. Разветвленный линкер может содержать элемент ветвления, по меньшей мере, с одним лекарственным средством, связанным с элементом ветвления через вторичный линкер; элемент ветвления связан с антителом первичным линкером. Первичный и/или вторичный линкер может содержать по меньшей мере одно звено полиэтиленгликоля.

В некоторых аспектах изобретение относится к конъюгату антитела, представленному Формулой I, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвату:



Формула I

где:

Ab представляет собой антитело к В7-Н3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3); где,

CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37 или 43;

CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 8, 14, 20, 26, 32, 38 или 44;

CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39 или 45;

CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40 или 46,

CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41 или 47;

CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 или 48;

каждый G независимо представляет собой химическую группу, содержащую активный агент и линкер, где линкер связывает Ab с активным агентом; и

n равно целому числу от 1 до 20.

Краткое описание графических материалов

На **Фиг. 1** показана IC_{50} , полученная с использованием сигмоидальной кривой нелинейной регрессии «доза-реакция» (программное обеспечение GraphPad Inc.) для T-Int-102-D1-5 AB2.1 в JMT-1.

На **Фиг. 2** показана IC_{50} , полученная с использованием сигмоидальной кривой нелинейной регрессии «доза-реакция» (программное обеспечение GraphPad Inc.) для T-Int-112-AB2.1 в JMT-1.

На **Фиг. 3** показана IC_{50} , полученная с использованием сигмоидальной кривой нелинейной регрессии «доза-реакция» (программное обеспечение GraphPad Inc.) для T-Int-112-AB2.1 в NCI-N87.

На **Фиг. 4** показана IC_{50} , полученная с использованием сигмоидальной кривой нелинейной регрессии «доза-реакция» (программное обеспечение GraphPad Inc.) для T-Int-102-D1-5 AB2.1 в HCT-116.

На **Фиг. 5** показана IC_{50} , полученная с использованием сигмоидальной кривой нелинейной регрессии «доза-реакция» (программное обеспечение GraphPad Inc.) для T-Int-112-AB2.1 в HCT-116.

На **Фиг. 6** показана IC_{50} , полученная с использованием сигмоидальной кривой нелинейной регрессии «доза-реакция» (программное обеспечение GraphPad Inc.) для T-Int-102-D1-5 AB2.1 в NCI-H23.

На **Фиг. 7** показана IC_{50} , полученная с использованием сигмоидальной кривой нелинейной регрессии «доза-реакция» (программное обеспечение GraphPad Inc.) для T-Int-102-D1-5 AB2.1 в NCI-H460.

На **Фиг. 8** показана IC_{50} , полученная с использованием сигмоидальной кривой нелинейной регрессии «доза-реакция» (программное обеспечение GraphPad Inc.) для T-Int-112-AB2.1 в NCI-H23.

На **Фиг. 9** показана IC_{50} , полученная с использованием сигмоидальной кривой нелинейной регрессии «доза-реакция» (программное обеспечение GraphPad Inc.) для T-Int-112-AB2.1 в NCI-H460.

На **Фиг. 10** показано влияние T-20-AB2.1 и T-21-AB2.1 на объем опухоли в ксенотрансплантате JMT-1.

На **Фиг. 11** показано влияние T-20-AB2.1 и T-21-AB2.1 на массу тела животного в

ксенотрансплантате JMT-1.

На **Фиг. 12** показано влияние T-Int-102-D1-5 AB2.1 и T-Int-112-AB2.1 на объем опухоли в ксенотрансплантате HCT-116.

На **Фиг. 13** показано влияние T-Int-102-D1-5 AB2.1 и T-Int-112-AB2.1 на массу тела животного в ксенотрансплантате HCT-116.

На **Фиг. 14** показано влияние T-Int-112-AB2.1 на объем опухоли в ксенотрансплантате NCI-H23.

На **Фиг. 15** показано влияние T-Int-112-AB2.1 на массу тела животного в ксенотрансплантате NCI-H23.

На **Фиг. 16** показано влияние T-Int-112-AB2.1 на объем опухоли в ксенотрансплантате NCI-H460.

На **Фиг. 17** показано влияние T-Int-112-AB2.1 на массу тела животного в ксенотрансплантате NCI-H460.

ПОДНОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Базовая структура конъюгата антитело-лекарственное средство выглядит следующим образом: антитело-линкер-низкомолекулярное лекарственное средство или токсин. В идеальном случае линкер позволяет лекарственному средству оказывать действие на клетку-мишень онкологического заболевания, например, после отделения от антитела после того, как лекарственное средство достигает клетки-мишени. Линкер также играет функциональную роль, соединяя антитело и лекарственное средство.

V7-H3 (CD276) является членом семейства V7 и демонстрирует высокую гомологию последовательностей [до ~ 30%] с этим семейством. Экспрессия V7-H3 очень ограничена в нормальных тканях, но она широко распространена при различных солидных онкологических заболеваниях, включая онкологическое заболевание молочной железы, легких, поджелудочной железы, предстательной железы, почки и толстой кишки, и меланому и глиобластому. V7-H3 наблюдался в опухолевом эпителии, и в сосудах и строме, связанных с опухолью. Кроме того, сверхэкспрессия V7-H3 коррелирует с плохим исходом при многих онкологических заболеваниях. Высокая экспрессия V7-H3, распространенная (около 85%) при НМРЛ, связана с метастазированием и поздней стадией. Более высокая частота и уровни экспрессии V7-H3 наблюдались при онкологических заболеваниях, устойчивых к анти-PD-1 терапии. Таким образом, нацеливание на V7-H3 оправдано при рецидивирующем или рефрактерном НМРЛ. Был приготовлен и протестирован ряд анти-V7-H3 КАЛС. Ключевыми компонентами КАЛС являются линкер ОНРАС и бензодиазепины, снабженные функциональными группами, совместимыми с ОНРАС. С доказанной стабильностью в плазме КАЛС эффективно высвобождают токсины в опухолевых клетках-мишенях, что подразумевает потенциальное усиление терапевтического окна. КАЛС продемонстрировали превосходную эффективность при минимальном изменении массы тела *in vivo*, предлагая новый вариант терапии для пациентов с НМРЛ, рефрактерных к анти-PD-1 терапии.

Был получен ряд прочно связывающихся моноклональных антител к V7-H3 и их

тиомаб вариантов ($K_d \sim 1,7 \sim 5,4 \times 10^{-11}$ М). Используя недавно обнаруженный линкер ОНРАС и бензодиазепиновые полезные нагрузки, совместимые с ОНРАС, была подготовлена и протестирована серия анти-V7-N3 КАЛС. Примеры линкеров ОНРАС дополнительно описаны в данном документе, и раскрыты, например, в публикации международной заявки WO 2019/008441, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Типовые бензодиазепиновые полезные нагрузки, совместимые с ОНРАС, дополнительно описаны в данном документе, и раскрыты, например, в публикации заявки на патент US 2019/0367488, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. КАЛС были высокоэффективны по отношению к V7-N3-положительным линиям опухолевых клеток *in vitro*. КАЛС были эффективны при тестировании на моделях ксенотрансплантатов НМРЛ у мышей.

Описанные в данном документе КАЛС могут быть нацелены на определенные опухоли, экспрессирующие V7-N3 (например, онкологическое заболевание молочной железы, легких, поджелудочной железы, предстательной железы, почки и толстой кишки, и меланому и глиобластому) (Cancer Cell. 2017 Apr 10; 31(4): 501-515.e8). Сверхэкспрессия V7-N3 имеет хорошую корреляцию с тяжестью заболевания и плохим исходом. V7-N3 сильно экспрессируется с высокой частотой в широком диапазоне опухолей. Нацеливание на V7-N3 для лечения онкологического заболевания полезно из-за его экспрессии в популяции стволовых клеток онкологического заболевания, и в сосудистой сети и строме опухоли (Journal of Clinical Oncology 35, no. 15_suppl). И опухолевые клетки, и сосудистая сеть опухоли являются V7-N3 (CD276) положительными (Cancer Cell. 2017 Apr 10; 31(4): 501-515.e8). Описанные антитела V7-N3 обладают улучшенной способностью к интернализации, подтвержденной Fab-анализом. Соответственно, ожидается, что усовершенствованные конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в данном документе, которые нацелены на V7-N3, будут полезны в способах лечения или облегчения симптомов, связанных с онкологическим заболеванием.

Примеры антител к V7-N3 и их применение перечислены в Таблице 1.

В Таблице 1 показано состояние разработки V7-N3 КАЛС.

Название	Полезная нагрузка	Статус	Показание к применению	Линкер	K_D
Эноблитузумаб (МГА271)	- Усиленная функция Fc	Фаза II	* Солидные опухоли (многократные показания к применению)	-	$K_D=7$ нМ
Омбуртамаб (8Н9)	I^{131} - I^{124} -	Фаза II/III	Нейробластома головного	-	-

			мозга и ЦНС Саркома		
КАЛС В7-Н3- DUBA (*MGC018)	DUBA (~2,7) Алкилирование ДНК (А-Т)	Фаза I	Солидные опухоли	VC	$K_D=20$ нМ
DS-7300	Dxd (~8,0) Торо Ингибитор	Фаза I	Солидные опухоли	GGPG	-
BVD CD276- КАЛС (m276-КАЛС)	PBD (~ 2,0) Алкилирование ДНК (G-C)	Доклиниче ские исследован ия (IgG1)	Солидные опухоли	VA	Сайт- специфиче ская на основе гликана $K_D=24\sim 33$ нМ
huB7H3	TBD	Доклиниче ские исследован ия	Солидные опухоли	-	-

*Показание к применению: Онкологическое заболевание у детей с экспрессией В7-Н3 (нейробластома, рабдомиосаркома, остеосаркома, саркома Юинга, опухоль Вильмса, десмопластическая мелкокруглоклеточная опухоль), рефрактерное онкологическое заболевание (предстательной железы, меланома, ПКК, ТНРМЖ, мочевого пузыря головы и шеи, НМРЛ), онкологическое заболевание простаты с промежуточным и высоким риском.

Экспрессия В7-Н3 способствует инвазии и метастазированию опухоли. Различные паттерны фукозилирования В7-Н3 или экспрессии различных изоформ в клетках онкологического заболевания показывают противоречивые костимулирующие и коингибирующие функции (Immunological Reviews 2017; 276: 52-65). В7-Н3 имеет высокий уровень экспрессии в опухолевых тканях (Фиг. 26А-26В). Экспрессия В7-Н3 в значительной степени связана с плохим исходом у пациентов с ПКК, онкологическим заболеванием легких, онкологическим заболеванием предстательной железы, колоректальной карциномой, онкологическим заболеванием желчного пузыря, плоскоклеточным онкологическим заболеванием пищевода, онкологическим заболеванием шейки матки, остеосаркомой, онкологическим заболеванием молочной железы, головы и шеи, онкологическим заболеванием поджелудочной железы и онкологическим заболеванием яичников (Clin Cancer Res 2008;14:5150-7; J. Cell. Mol.

Med. Vol 21, No 9, 2017 pp. 2199-2210; OncoTargets and Therapy 2014;7 1465-1472; Cell Research volume 27, pages1034-1045(2017); Am J Transl Res 2015;7(12):2646-2660; Clin Cancer Res, 2012, 18(14): 3834-3845).

B7-H3 не экспрессируется во многих гематологических клеточных линиях (Tissue Antigens 2005: 66: 83-92). 44,8% случаев острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) демонстрируют экспрессию B7-H3, и 65% случаев мантийно-клеточной лимфомы (МКЛ) демонстрируют экспрессию B7-H3. Экспрессия B7-H3 отсутствует в В-клетках, Т-клетках и моноцитах (СМІ 2005 2(4) 307-311). B7-H3 индуцибельно экспрессируется в макрофагах, DCsm и опухолях. B7-H3 конститутивно экспрессируется в дендритных клетках, происходящих из моноцитов (Mo-DC). B7-H3 слабо экспрессируется в DC, происходящих из моноцитов (Clin Cancer Res 18(14); 3834-45, 2012).

В описании также предложены моновалентные антитела и/или биспецифические антитела, которые включают по меньшей мере первое плечо, специфичное в отношении B7-H3. Предпочтительно моновалентные антитела и/или биспецифические антитела являются специфичными по меньшей мере в отношении B7-H3 человека. В некоторых вариантах реализации моновалентные антитела и/или биспецифические антитела, которые распознают B7-H3 человека, также обладают перекрестной реактивностью по меньшей мере с одним другим нечеловеческим B7-H3 белком, таким как, в качестве неограничивающего примера, B7-H3 нечеловеческого примата, например, B7-H3 яванского макака и/или B7-H3 грызуна. В описании также представлены антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и моновалентное антитело к B7-H3 и/или биспецифическое антитело к B7-H3, раскрытое в данном документе.

Типичные моноклональные антитела к B7-H3 по данному изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты включают, например, антитела, перечисленные в Таблицах 19-24.

В некоторых вариантах реализации типовые моноклональные антитела к B7-H3 по данному изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты включают комбинацию определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (CDR), выбранных из последовательностей CDR, представленных в Таблице 19, и CDR легкой цепи, выбранных из последовательностей CDR представленных в Таблице 19. В некоторых вариантах реализации типовые моноклональные антитела к B7-H3 по данному изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты включают комбинацию переменных последовательностей тяжелого домена и легкого домена, представленных в Таблицах 20-24. В некоторых вариантах реализации типовые моноклональные антитела к B7-H3 по данному изобретению включают комбинацию константных последовательностей тяжелого домена и легкого домена, представленных в Таблицах 21-24.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

В некоторых аспектах раскрытые в данном документе конъюгаты антитело-лекарственное средство представлены Формулой I или их фармацевтически приемлемой

солью или сольватом:

Ab-(G)_n

Формула I

где:

Ab представляет собой антитело к B7-H3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3); где

CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37 или 43;

CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 8, 14, 20, 26, 32, 38 или 44;

CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39 или 45;

CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40 или 46,

CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41 или 47;

CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 или 48;

каждый G независимо представляет собой химическую группу, содержащую один или более активных агентов и линкер, где линкер ковалентно связывает Ab с активным(и) агентом(ами); и

n равно целому числу от 1 до 20.

В некоторых вариантах реализации Ab представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело (dAb), одноцепочечное антитело (scAb), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), scFv- Fc-фрагмент, однодоменное антитело с тяжелой цепью, однодоменное антитело с легкой цепью, вариант антитела, мультимерное антитело или биспецифическое антитело. Ab может представлять собой кроличье, мышинное, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело. В некоторых вариантах реализации Ab представляет собой изотип IgG, такой как изотип IgG1.

В некоторых вариантах реализации Ab содержит комбинацию варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 или 81, и варибельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62,

64, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95 или 97.

В некоторых вариантах реализации Ab содержит комбинацию вариабельной последовательности тяжелой цепи и вариабельной последовательности легкой цепи, выбранных из:

(a) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

(b) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52;

(c) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

(d) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

(e) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; и

(f) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

(g) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и

(h) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах реализации B7-H3 представляет собой B7-H3 человека.

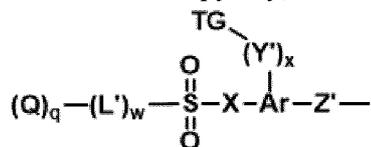
В некоторых вариантах реализации группа расщепления способна расщепляться внутри клетки-мишени. В некоторых вариантах реализации группа расщепления способна высвободить один или более активных агентов. В некоторых вариантах реализации конъюгат антитела содержит Ab; по меньшей мере один разветвленный линкер, ковалентно связанный с Ab; и по меньшей мере два активных агента, ковалентно связанных с разветвленным линкером. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере два разветвленных линкера связаны с Ab, и каждый разветвленный линкер связан по меньшей мере с двумя активными агентами. В некоторых вариантах реализации три разветвленных линкера связаны с Ab. В других вариантах реализации четыре разветвленных линкера связаны с Ab. В еще других вариантах реализации ровно один разветвленный линкер связан с Ab. В других вариантах реализации каждый

разветвленный линкер связан ровно с двумя активными агентами. В некоторых вариантах реализации конъюгат содержит по меньшей мере два разных активных агента. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один разветвленный линкер связан с двумя разными активными агентами.

В некоторых вариантах реализации каждый активный агент связан с разветвленным линкером расщепляемой (например, гидролизуемой) связью. В некоторых вариантах реализации каждый разветвленный линкер содержит единицу разветвления, и каждый активный агент связан с единицей разветвления через вторичный линкер, и единица разветвления связана с антителом к В7-Н3 посредством первичного линкера. В некоторых вариантах реализации единица разветвления представляет собой атом азота, например, амина или амида. В некоторых вариантах реализации единица разветвления представляет собой амид, и первичный линкер содержит карбонил амида. В некоторых вариантах реализации единица разветвления представляет собой амид, и вторичный линкер содержит карбонил амида. В некоторых предпочтительных вариантах реализации единица разветвления представляет собой единицу лизина.

Линкеры и партнеры по конъюгации

В некоторых предпочтительных вариантах реализации каждый G независимо представляет собой группу, имеющую структуру Формулы (II):



(II)

каждый Q независимо представляет собой активный агент, связанный с L' через гетероатом, предпочтительно O или N;

Z' представляет собой линкерную группу;

L' представляет собой спейсерный фрагмент, присоединенный к SO₂ через гетероатом, выбранный из O, S и N, предпочтительно O или N, и выбран таким образом, что разрыв связи между L' и SO₂ способствует разрыву связи между L' и Q для высвобождения активного агента;

X представляет собой-O-, -C(R^b)₂- или-N(R^c)-, предпочтительно-O-;

Ar представляет собой кольцо, такое как арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклоалкил, предпочтительно арил или гетероарил;

Y' представляет собой-(CR^b)_yN(R^a)-, -(CR^b)_yO- или-(CR^b)_yS-, расположенные таким образом, что атом N, O или S присоединен к TG, если y равно 1;

X и Y' расположены на соседних атомах Ar;

TG представляет собой триггерную группу, которая при активации генерирует атом N, O или S, способный реагировать с SO₂ с замещением (Q)_q-(L')_w и образованием 5-6-членного кольца, включающего X- SO² и промежуточные атомы Ar;

q равен целому числу, имеющему значение от 1 до около 20, предпочтительно от 1

до около 10;

каждый из w , x и y независимо равен целому числу, имеющему значение 0 или 1; каждый R^a и R^c независимо представляет собой водород или низший алкил; и каждый R^b независимо представляет собой водород или низший алкил; или два R^b вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют 3-5-членное кольцо, предпочтительно 3-4-членное кольцо,

при условии, что если w равен 0, то q равен 1.

Каждый активный агент может представлять собой любой подходящий активный агент, как более подробно описано ниже. В то время как многие традиционные способы конъюгации требуют присутствия функциональных групп, таких как аминогруппы или гидроксильные группы, для образования стабильной связи, раскрытие в данном документе предлагает стратегии образования соединений с использованием ранее недоступных для этой цели функциональных групп, таких как фенолы и третичные амины. Эти функциональные группы образуют стабильные связи в раскрытых в данном документе конъюгатах, при этом все еще допуская высвобождение в заранее определенных условиях, которые активируют триггерную группу.

Многие подходящие триггерные группы известны в данной области техники и примерные триггерные группы, и условия, которые их активируют, обсуждаются ниже, например фрагменты, описанные для Y ниже. Некоторые триггерные группы включают атом N , O или S , но в ненуклеофильной форме. Например, группа NO_2 представляет собой триггерную группу, которая в восстановительных условиях восстанавливается до NH_2 или $NHOH$ группы, которые могут реагировать с SO_2 , и ацетатная группа представляет собой триггерную группу, которая в гидролитических условиях гидролизуется до гидроксильной группы, которая может реагировать с SO_2 . Другие триггерные группы не включают атом N , O или S , но при активации превращаются в нуклеофильный атом N , O или S . Например, боронатная группа является иницирующей группой, которая в окислительных условиях (таких как в присутствии пероксида) превращается в гидроксильную группу, которая может реагировать с SO_2 . Предпочтительно триггерную группу выбирают таким образом, чтобы условия, которые ее активируют, делали это избирательно, без расщепления или деградации других частей конъюгата, таких как нацеливающий фрагмент. Как только образуется нуклеофильный атом N , O или S , этот атом внутримолекулярно атакует фрагмент SO_2 с образованием кольца, вытесняя фрагмент $(Q)_q-(L')_w-H$, где H связан с гетероатомом Q или L' , который ранее был присоединен к фрагменту SO_2 .

В вариантах реализации, где w равен 0, q равен 1 и Q непосредственно присоединен к SO_2 через гетероатом. Соответственно, активация триггерной группы генерирует нуклеофильный гетероатом, который внутримолекулярно атакует фрагмент SO_2 с образованием кольца, вытесняя активный агент $Q-H$, где H связан с гетероатомом, ранее присоединенным к SO_2 .

В вариантах реализации, где w равен 1, L' может быть выбран для обеспечения

возможности присоединения нескольких Q, которые могут быть одинаковыми или разными. Соответственно, каждый Q косвенно присоединен к SO₂ через спейсерный фрагмент. В таких вариантах реализации активация триггерной группы генерирует нуклеофильный гетероатом, который внутримолекулярно атакует фрагмент SO₂ с образованием кольца, вытесняя фрагмент (Q)_q-L'-H, где H связан с гетероатомом в L', который был ранее присоединен к SO₂. В таких вариантах реализации высвобожденный гетероатом запускает внутримолекулярную реакцию, которая вытесняет активный агент (агенты) Q (например, если Q имеет группу третичного амина, присоединенную к L' в виде четвертичного аммония) или Q-H. Например, гетероатом может подвергаться внутримолекулярной реакции циклизации со сложноэфирной группой, образованной гидроксилом QH, с образованием кольца и выбросом активного агента Q-H. Альтернативно, гетероатом может подвергаться внутримолекулярной таутомеризации, которая вытесняет активный агент Q или Q-H.

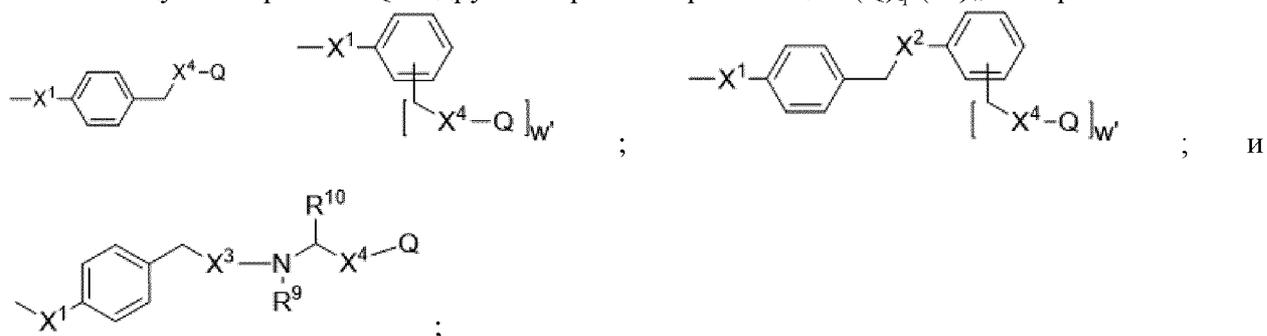
Ag может быть любым подходящим кольцом, включая кольцо бицикла или другого полицикла, так что фрагменты, которые подвергаются внутримолекулярной циклизации, удерживаются в непосредственной близости, чтобы облегчить эту реакцию после активации триггерной группы. Плоский характер ароматических и гетероароматических колец предпочтителен, поскольку жесткая геометрия заместителей в таких кольцах обеспечивает благоприятное размещение реакционноспособных частей, хотя другие типы колец, такие как циклоалкенил или гетероциклоалкенил, могут обеспечивать подобную геометрию. Пяти- или шестичленное кольцо и/или количество или идентичность гетероатомов в кольце и/или заместители (например, электронодонорные или электроноакцепторные заместители) в другом кольце могут быть выбраны для модуляции скорости циклизации на основе полученных валентных углов кольца. Точно так же более гибкие конформации циклоалкильных и гетероциклических колец могут быть полезны, когда желательно замедлить скорость внутримолекулярной циклизации.

Z' может быть любой подходящей связующей группой, которая соединяет Ag с одной или более группами Ab. Как правило, связующая группа должна быть достаточно гидрофильной, чтобы способствовать растворимости в воде и препятствовать агрегации конъюгата, например, путем включения фрагментов, таких как фрагменты полиэтиленгликоля, пептидные последовательности, фрагменты, несущие заряд (такие как карбоксилаты, амины, азотсодержащие кольца, и т.д.) и т.д., чтобы сбалансировать гидрофобный характер любых алкильных цепей, которые могут быть включены в структуру молекулы. Поскольку часто выгодно получать конъюгаты модульным образом, Z' может содержать линкерный фрагмент, функциональную группу, которая образуется в результате конъюгации одного реакционноспособного фрагмента с другим. Репрезентативные линкерные группы более подробно обсуждаются ниже (например, в связи с переменной Z), и обычные линкерные группы включают амиды, триазолы, оксимы, карбаматы и т.д. Репрезентативные группы Z' включают группы L¹-Z, как более подробно обсуждается ниже. В некоторых вариантах реализации все группы G,

присоединенные к каждому Ab, идентичны, в то время как в других вариантах реализации каждое Ab может быть присоединено к двум или более различным группам G. Например, некоторые группы G могут иметь триггерную группу, которая активируется при первом условии, в то время как другие группы G могут иметь триггерную группу, которая активируется при втором условии, так что, например, один активный агент может быть избирательно высвобожден при первом условии, но второй активный агент может быть избирательно высвобожден при втором условии.

В некоторых вариантах реализации Формулы (II)-Y' представляет собой $(\text{CH}_2)_y\text{NR}''$ -, $(\text{CH}_2)_y\text{O}$ - или $(\text{CH}_2)_y\text{S}$ -, расположенные таким образом, что атом N, O или S присоединен к TG, если y равно 1; R'' представляет собой водород или C₁-C₆-алкил; и y равно целому числу, имеющему значение 0 или 1. В некоторых таких вариантах реализации TG представляет собой β-галактозид, β-глюкуронид или комбинацию β-галактозида и β-глюкуронида.

В некоторых вариантах формулы (II) (L')_w связывает каждый Q с-SO₂-; и каждый Q представляет собой активный агент, связанный с одной из групп L' через гетероатом, предпочтительно O или N, и образующий -O-, -OC(O)-, -OC(O)O- или -OC(O)NH- связь, включающую гетероатом Q. В других вариантах реализации (Q)_q-(L')_w выбрана из:



где:

Q представляет собой активный агент, связанный с L' через гетероатом, предпочтительно O или N,

X⁴ отсутствует или образует связь -O-, -OC(O)-, -OC(O)O- или -OC(O)NH-, включающую гетероатом Q;

X¹ представляет собой -O- или -NR^a-;

X² представляет собой -O-, -OC(O)-, -OC(O)O- или -OC(O)NH-;

X³ представляет собой -OC(=O)-;

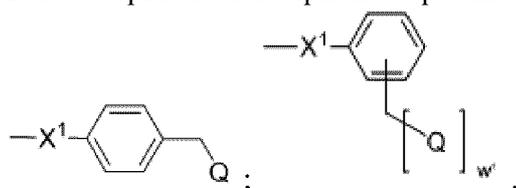
w' равен целому числу, имеющему значение 1, 2, 3, 4 или 5;

Каждый из R⁹ и R¹⁰ независимо представляет собой водород, алкил, арил или гетероарил, где алкил, арил и гетероарил незамещены или замещены одним или более заместителями, например, выбранными из алкила, $(\text{CH}_2)_u\text{NH}_2$, $(\text{CH}_2)_u\text{NR}^{u1}\text{R}^{u2}$ и $(\text{CH}_2)_u\text{SO}_2\text{R}^{u3}$;

R^{u1}, R^{u2} и R^{u3} каждый независимо представляет собой водород, алкил, арил или гетероарил; и

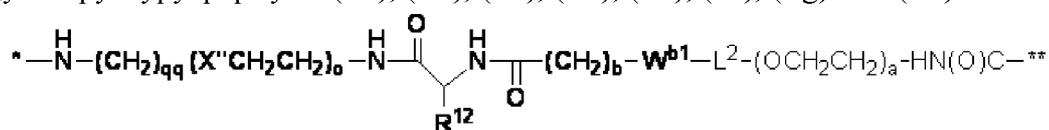
u равен целому числу, имеющему значение от 1 до около 10.

В некоторых таких вариантах реализации $(Q)_q-(L')_w$ - выбран из:

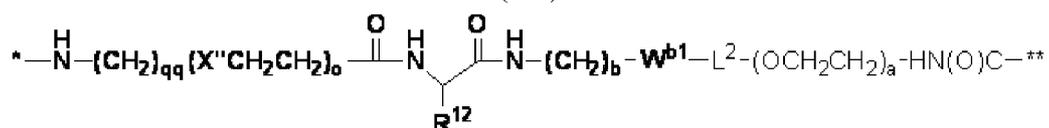


В некоторых вариантах реализации Z' включает реакционноспособную группу (например, группу-предшественник, как более подробно обсуждается ниже в отношении Z), которую можно использовать для присоединения соединения к триггерному агенту, к твердой поверхности (например, для образования комплекса на твердом носителе или сенсорных частиц), или к любой другой интересующей молекуле или подложке.

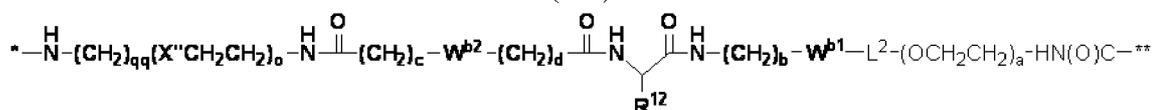
В некоторых вариантах реализации Z' представляет собой линкерную группу, имеющую структуру формулы (IIa), (IIb), (IIc), (IId), (IIe), (IIf), (IIg) или (IIh):



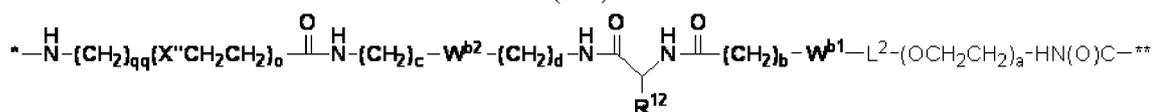
(IIa)



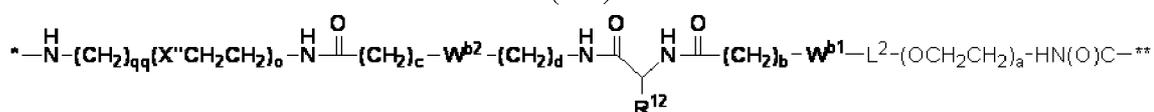
(IIb)



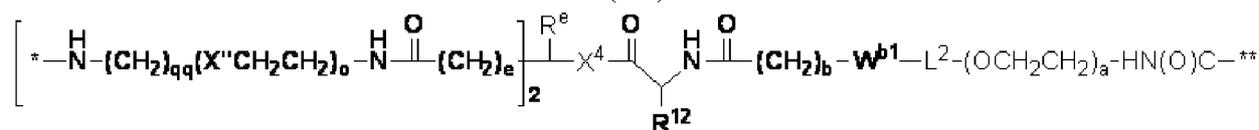
(IIc)



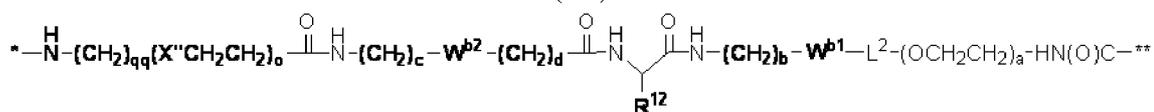
(IId)



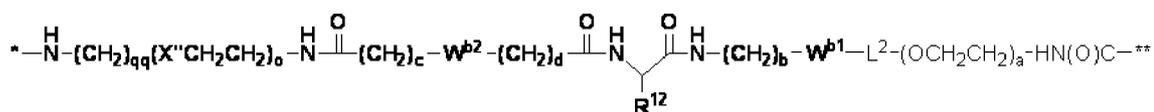
(IIe)



(IIf)



(IIg)



(IIIh)

где:

* представляет собой точку присоединения к Ab;

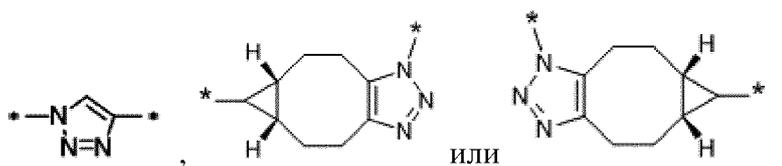
** представляет собой точку присоединения к Ag;

R^e представляет собой алкил;

X'' представляет собой -O-, -S-, -NH- или -CH₂-;

X⁴ представляет собой -NHC(O)-(CH₂)_g-NH- или -C(O)NH-(CH₂)_h-NH-;

W^{b1} и W^{b2}, каждый независимо, представляют собой -C(O)NH-, -NHC(O)-, ,



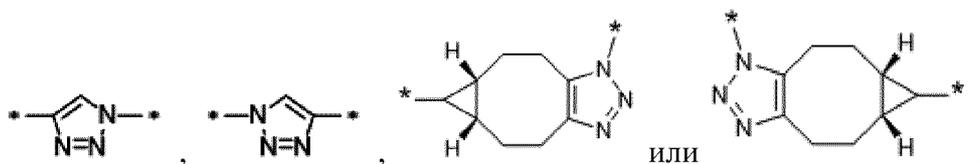
L² представляет собой необязательно присутствующий спейсер и может быть дополнительно замещен одним или более заместителями, такими как C₁-C₆ алкил, C₅-C₁₄ арил и C₃-C₈ гетероарил, где алкил, арил и гетероарил может быть дополнительно замещен, например, одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из C₁-C₁₀ алкила, -(CH₂)_uNH₂, -(CH₂)_uNR^{u1}R^{u2}, -(CH₂)_uCO₂H, -(CH₂)_uCO₂R^{u1}, и -(CH₂)_uSO₂R^{u3}, где каждый из R^{u1}, R^{u2} и R^{u3} независимо представляет собой водород, C₁-C₁₅ алкил, C₆-C₂₀ арил или C₃-C₁₀ гетероарил; и u равен целому числу, имеющему значение от 1 до около 10;

R¹² представляет собой водород, C₁-C₈ алкил или аминокислотный фрагмент, такой как натуральный аминокислотный фрагмент;

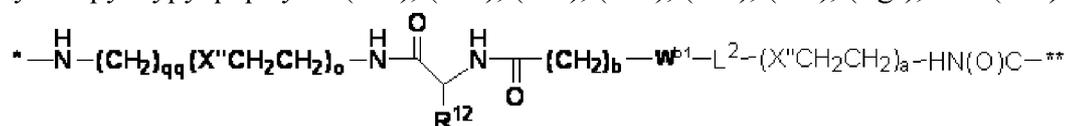
a, b, c, d, e, g, h, o и qq, каждый независимо, равен целому числу, имеющему значение от 1 до около 10; и

s' равен целому числу, имеющему значение от 1 до около 10.

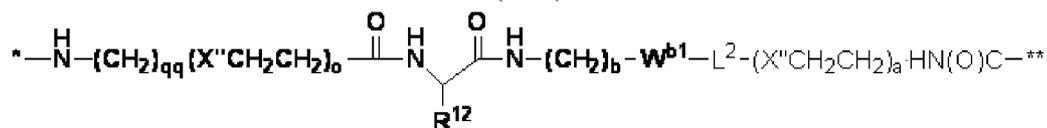
В предпочтительных вариантах реализации каждый из W^{b1} и W^{b2} независимо представляет собой



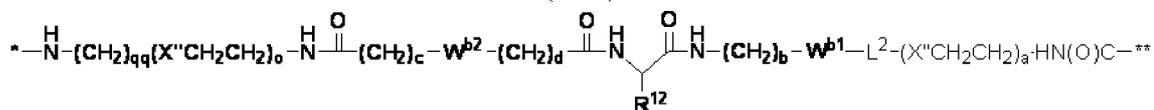
В других вариантах реализации Z' представляет собой линкерную группу, имеющую структуру формулы (IIa'), (IIb'), (IIc'), (IId'), (IIe'), (IIf'), (IIg'), или (IIh'):



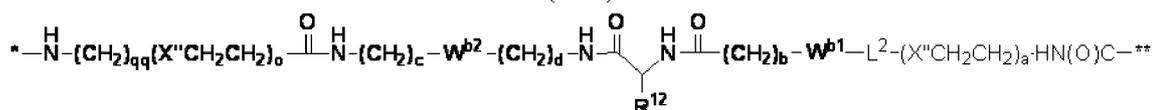
(IIa')



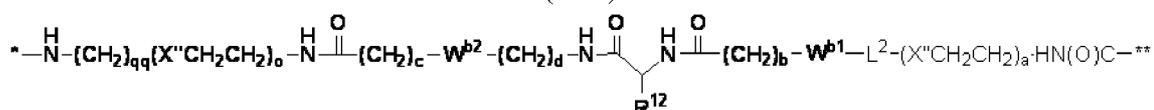
(IIb')



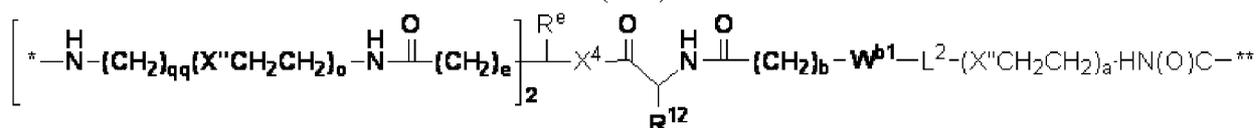
(IIc')



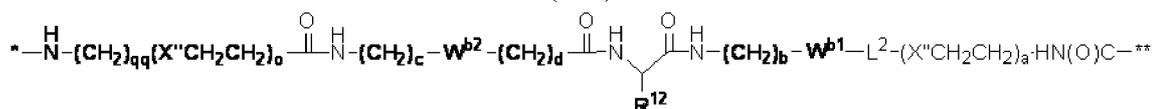
(IId')



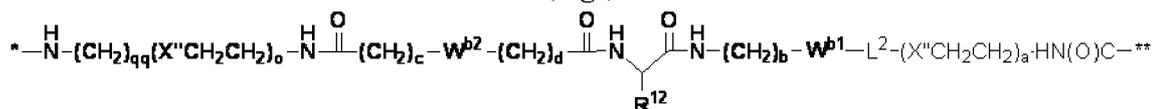
(IIe')



(IIf')



(IIg')



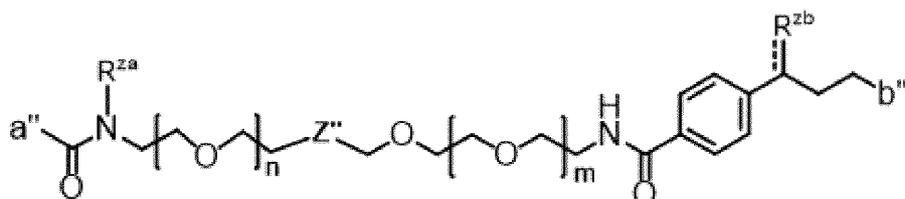
(IIh'),

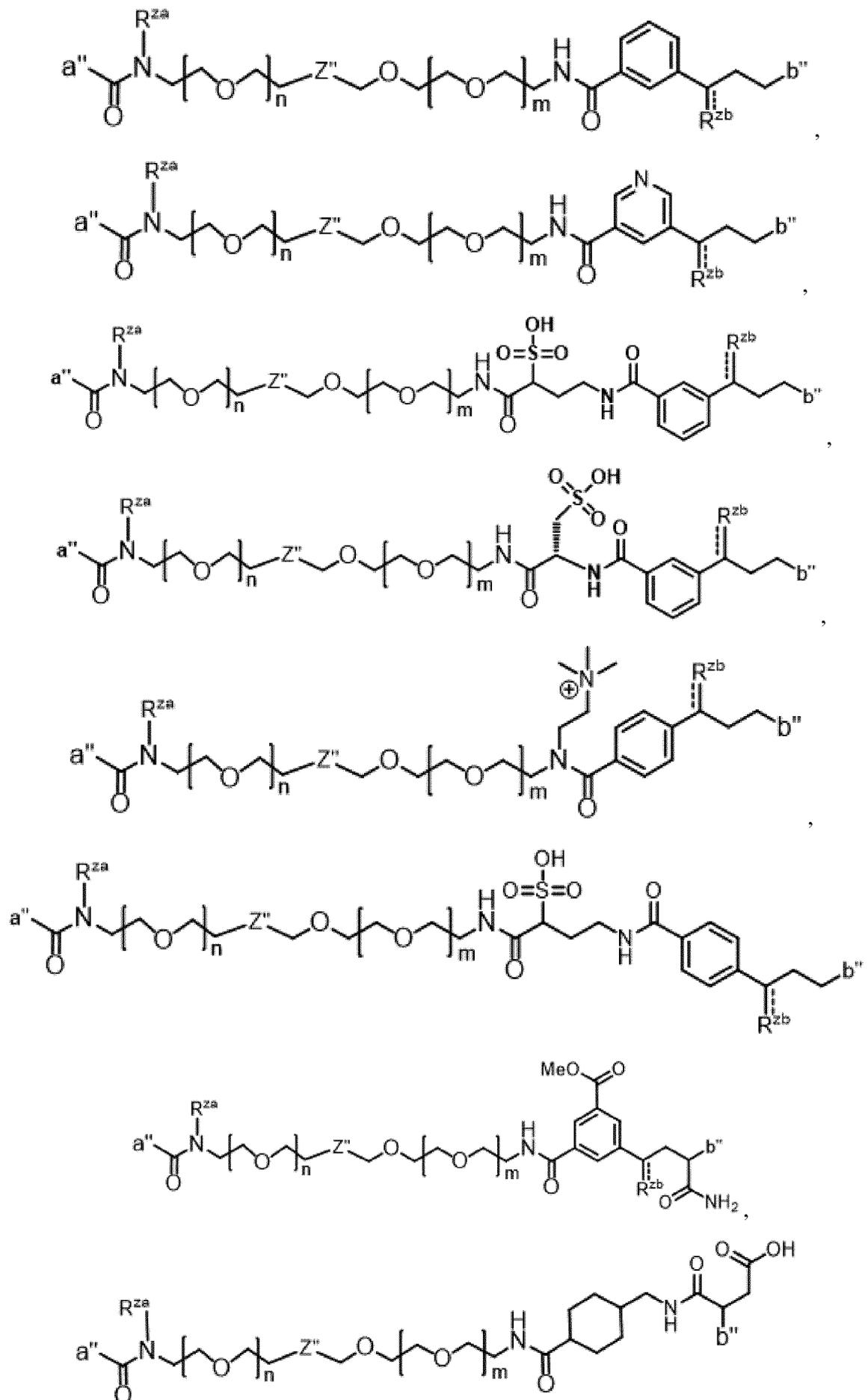
где:

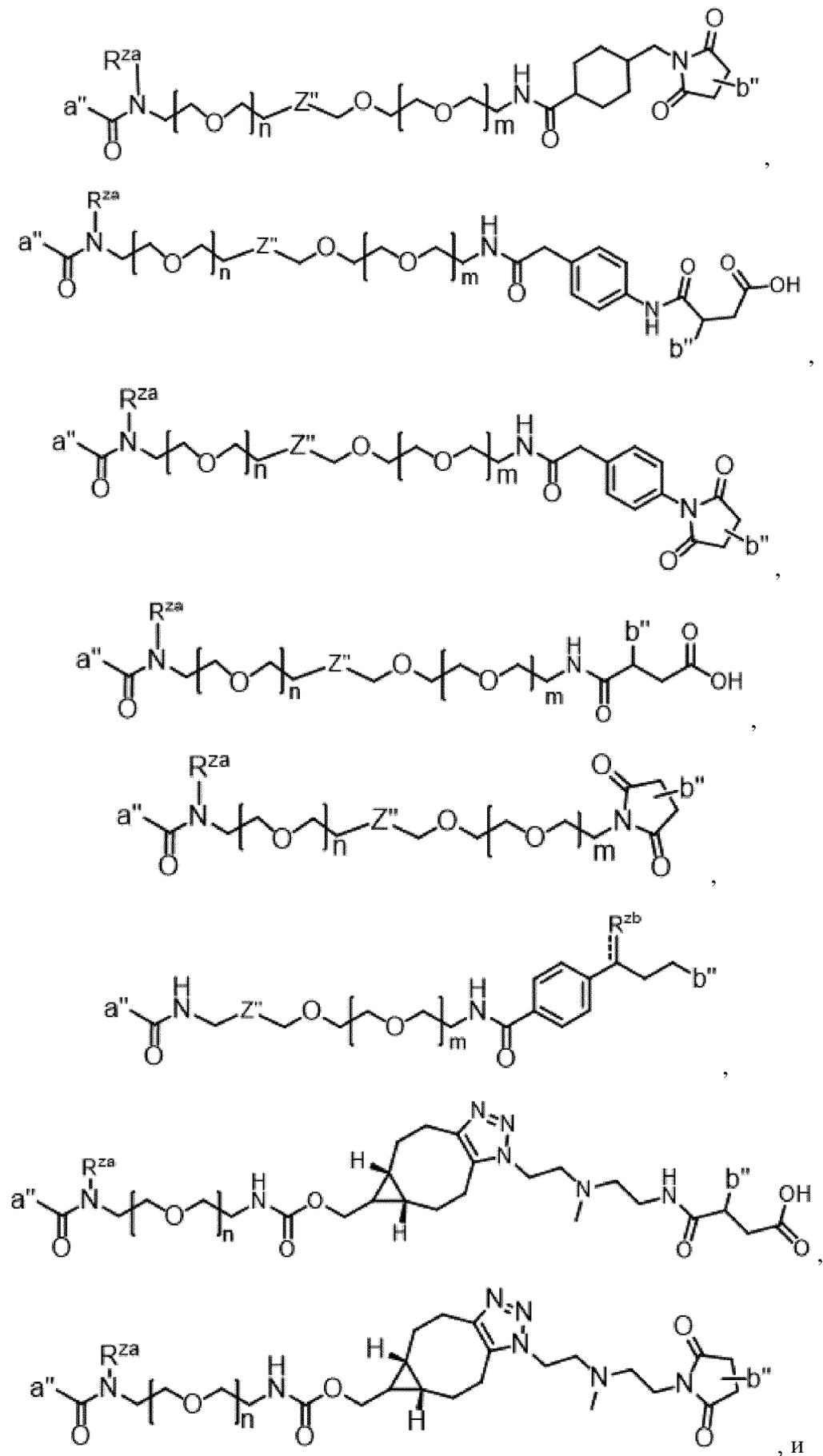
* представляет собой точку присоединения к Ab;

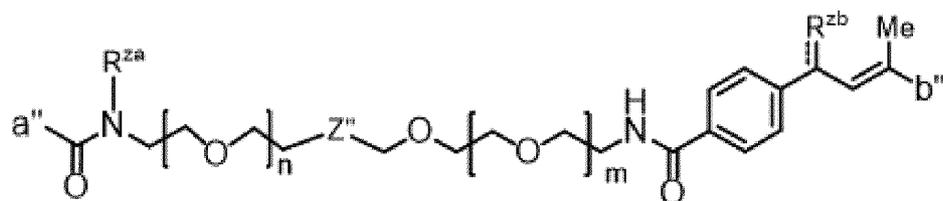
** представляет собой точку присоединения к Ag.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации Z' представляет собой линкерную группу, выбранную из









где

R^{za} представляет собой H или метил;

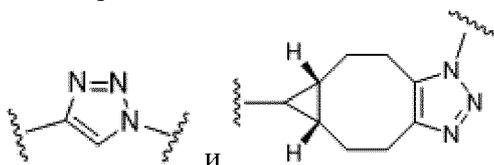
R^{zb} представляет собой -OH, =O или =NHOH;

----- представляет собой одинарную связь или двойную связь;

a'' представляет собой связь между Z' и Ag Формулы (II);

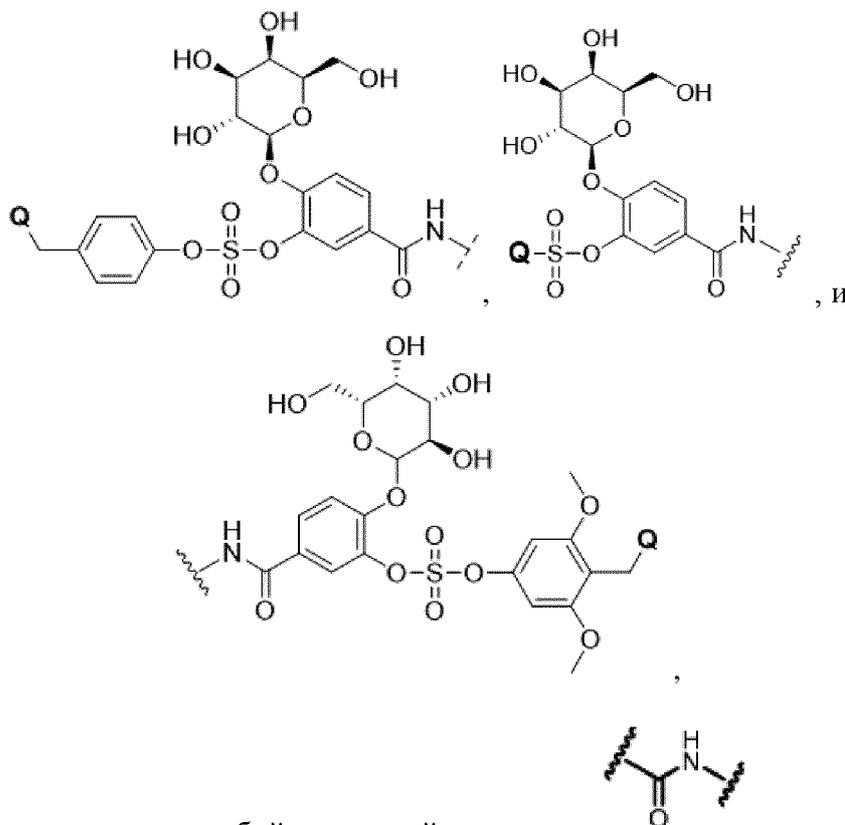
b'' представляет собой связь между Z' и Ab; и

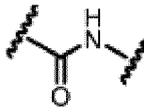
Z'' выбран из



, расположенных в любом направлении.

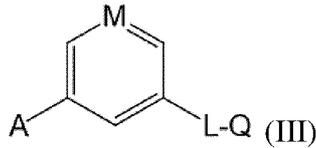
В некоторых вариантах реализации G содержит фрагмент, выбранный из следующего:



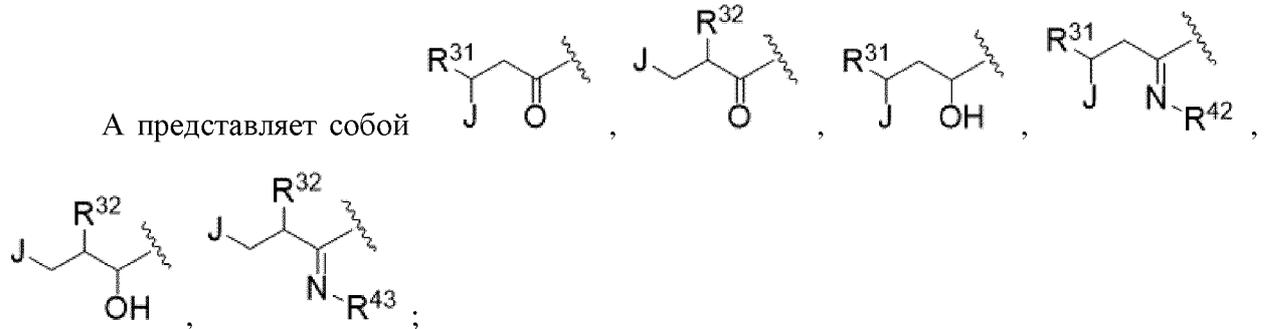
где Q представляет собой активный агент и  представляет собой фрагмент линкерной группы Z' , который соединяет Z' с замещенной фенильной группой (представленной как Ag в формуле (II)).

В некоторых вариантах реализации $Ab-(G)_n$ представлен соединением формулы

(III):



или его соли, где:

M представляет собой N, CR³⁰, или C(-L-Q);

каждый L независимо выбран из спейсерного фрагмента;

каждый Q представляет собой активный агент;

J представляет собой антитело В7-Н3, как описано в данном документе;

каждый из R³⁰ и R³¹ независимо выбран из электроноакцепторной группы, водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила;

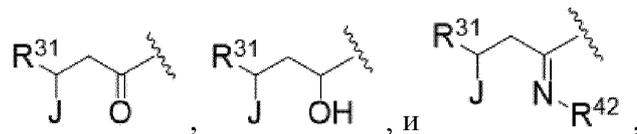
каждый из R⁴² и R⁴³ независимо выбран из -ОН, алкокси, -NR⁴⁴R⁴⁵, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила и гетероциклила, где R⁴⁴ и R⁴⁵ вместе с атомом азота, к которому они присоединены могут образовывать 5-8-членный цикл, необязательно конденсированный с арильным или гетероарильным кольцом;

каждый из R³², R⁴⁴ и R⁴⁵ независимо выбран из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила; и n равен от 1 до 4.

В некоторых вариантах реализации M представляет собой N.

В некоторых вариантах реализации M представляет собой CR³⁰, и R³⁰ представляет собой электроноакцепторную группу.

В некоторых вариантах реализации A выбран из



где R³¹ представляет собой электроноакцепторную группу, предпочтительно, где L соединен с C электроноакцепторной группой, выбранной из амида или сложного эфира.

В некоторых вариантах реализации M представляет собой C(-LQ), и где L связан с C электроноакцепторной группой.

В некоторых вариантах реализации R³⁰ представляет собой -CO₂NR³³R³⁴ или -CO₂R³⁵ и R³³, R³⁴ и R³⁵ каждый независимо выбран из водорода, алкила, алкенила,

алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила.

В некоторых вариантах реализации каждая электроноакцепторная группа независимо выбрана из $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, -галогеналкила, $-\text{CO}_2\text{NR}^{33}\text{R}^{34}$, $-\text{CO}_2\text{R}^{35}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{36}$, $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^{37}$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{OR}^{38}$ и $-\text{NR}^{39}\text{R}^{40}\text{R}^{41}$; и R^{36} , R^{37} , R^{38} , R^{39} , R^{40} и R^{41} каждый независимо выбран из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила.

В некоторых вариантах реализации каждая электроноакцепторная группа независимо выбрана из $-\text{CN}$, $-\text{CONR}^{33}\text{R}^{34}$ и $-\text{CO}_2\text{R}^{35}$.

В некоторых вариантах реализации каждая электроноакцепторная группа независимо выбрана из $-\text{CN}$, $-\text{CONH}_2$ и $-\text{CO}_2\text{Me}$.

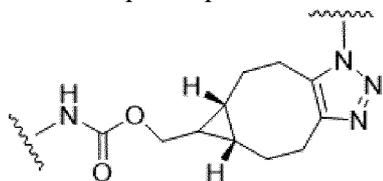
В некоторых вариантах реализации Q представляет собой агент.

В некоторых вариантах реализации Q включает L' и Q', где L' представляет собой линкер, и Q' представляет собой активный агент.

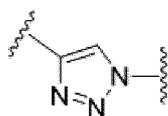
В некоторых вариантах реализации L' содержит группу сочетания, при этом группа сочетания связана с L.

В некоторых вариантах реализации группа сочетания выбрана из $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{32}$ -, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}$ -, $-\text{C}(=\text{NR}^{32})$ -, $-\text{C}=\text{NO}$ -, $-\text{NR}^{32}-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}^{32}$ -, $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}$ -, $-\text{S}-\text{S}$ -, $-\text{NR}^{32}\text{S}(=\text{O})_2\text{O}$ - и $\text{OS}(=\text{O})_2\text{O}$ -.

В некоторых предпочтительных вариантах группа сочетания выбрана из



и

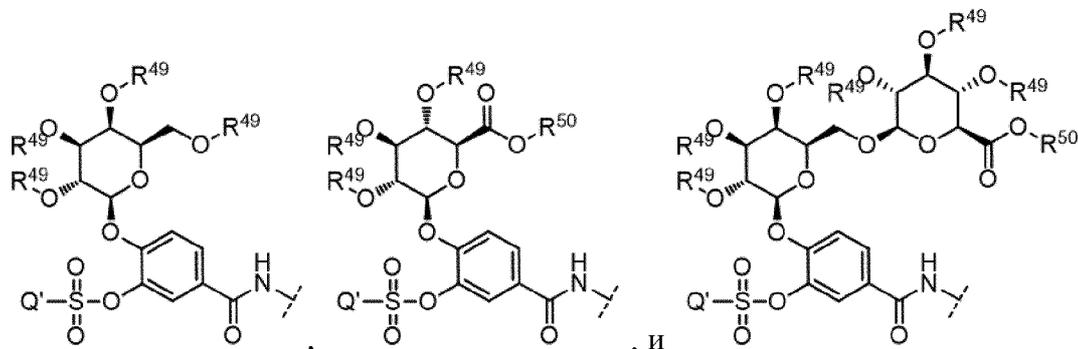


, ориентированные в любом

направлении.

В некоторых вариантах реализации L' дополнительно содержит расщепляемую группу, при этом расщепляемая группа связана с Q'.

В некоторых вариантах реализации фрагмент расщепляемая группа-Q' выбран из



где

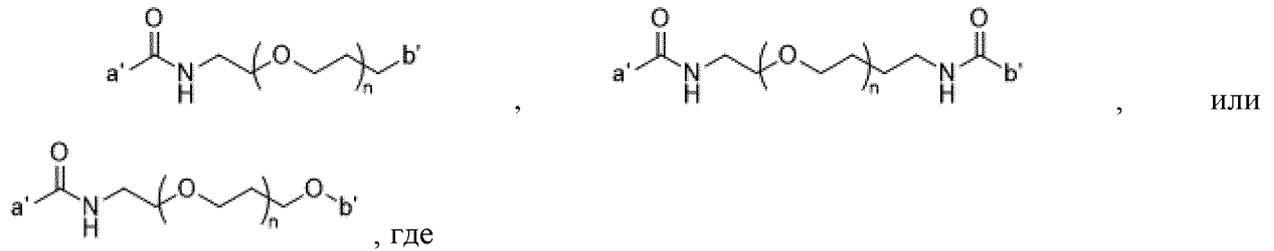
R^{49} представляет собой водород или $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{50}$; и

R^{50} представляет собой низший алкил.

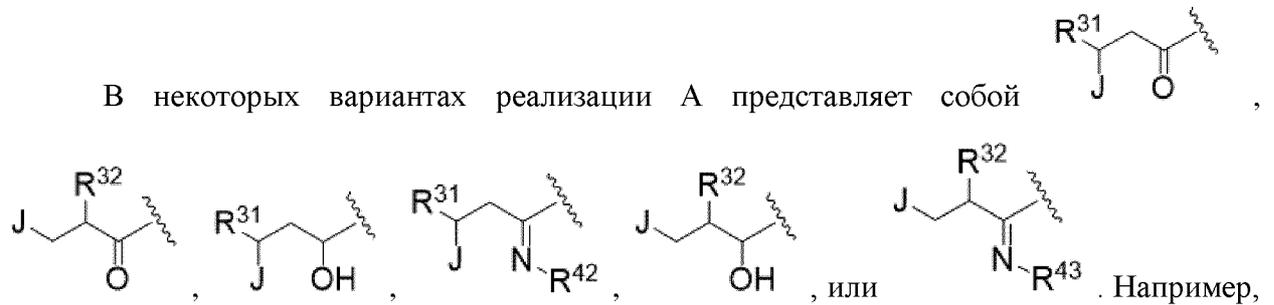
В некоторых вариантах реализации L' дополнительно содержит C_6 - C_{100} алкилен, содержащий по меньшей мере одну группу, выбранную из $-\text{NH}$ -, $-\text{C}(=\text{O})$ -, $-\text{O}$ -, $-\text{S}$ -, $-\text{S}(\text{O})$ - и

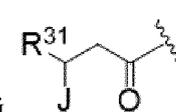
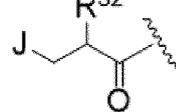
$-S(=O)_2-$.

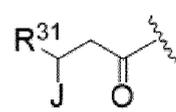
В некоторых вариантах реализации L' содержит C_6-C_{100} алкилен, содержащий по меньшей мере одну группу, выбранную из $-NH-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$ и $-S(=O)_2-$. Например, L включает

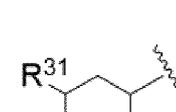
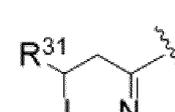
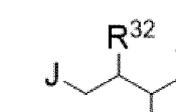
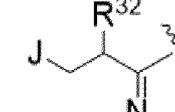


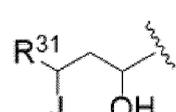
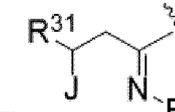
a' представляет собой связь с M -содержащим ароматическим кольцом, и b' представляет собой связь с L' ; и n равно 2-20.



A может представлять собой  или . В качестве альтернативы A

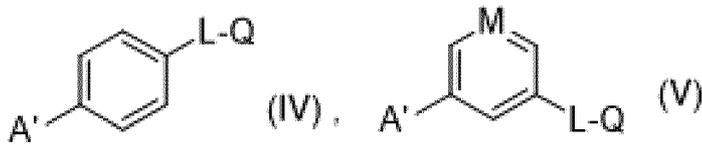
может представлять собой . В других вариантах реализации A может

представлять собой , , , или . В

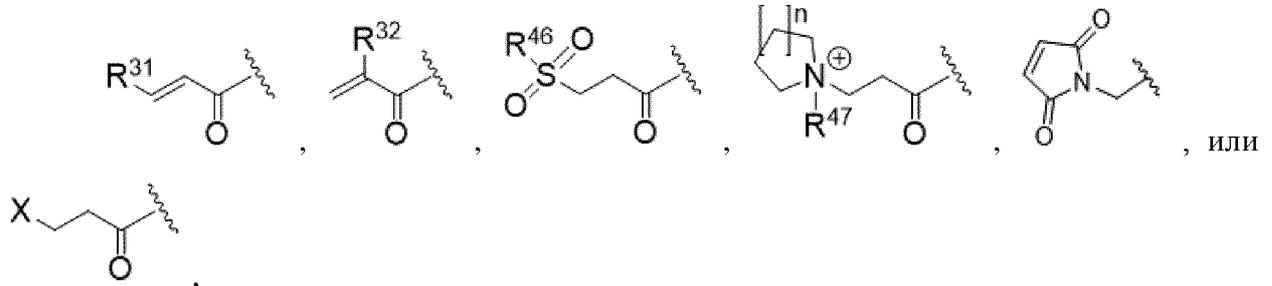
некоторых вариантах реализации A представляет собой  или 

В некоторых вариантах реализации R^{42} представляет собой $-OH$ или $-NR^{44}R^{45}$.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к способам получения КАЛС, как описано в данном документе, включающим приведение в контакт антитела, как раскрыто в данном документе, с соединениями Формулы (IV) или Формулы (V):



где A' представляет собой



M представляет собой N, CR³⁰ или C(-L-Q);

каждый L независимо выбран из спейсерного фрагмента;

каждый Q независимо выбран из активного агента или реакционноспособной группы;

X выбран из -Cl, -Br и -I;

каждый из R³⁰ и R³¹ независимо выбран из электроноакцепторной группы, водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила;

R⁴⁶ выбран из алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила;

R³² выбран из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила;

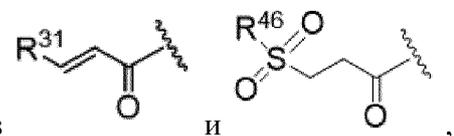
R⁴⁷ представляет собой O⁻, алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, карбоциклил, гетероциклил; и

n равен от 1 до 4.

В некоторых вариантах реализации M представляет собой N.

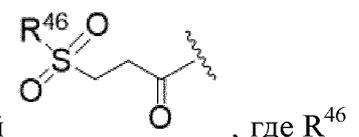
В некоторых вариантах реализации M представляет собой CR³⁰ и R³⁰ представляет собой электроноакцепторную группу.

В некоторых вариантах реализации A' выбран из



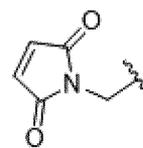
где R³¹ представляет собой электроноакцепторную группу, предпочтительно, где L соединен с C электроноакцепторной группой, выбранной из амида или сложного эфира.

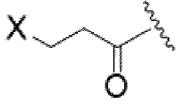
В некоторых вариантах реализации A' представляет собой



представляет собой арильную группу, замещенную C₁₋₃ алкилом.

В некоторых вариантах реализации А' представляет собой



В некоторых вариантах реализации А' представляет собой , где X представляет собой -C(O)NH₂.

В некоторых вариантах реализации М представляет собой C(-LQ), и где L связан с С электроноакцепторной группой.

В некоторых вариантах реализации R³⁰ представляет собой -CO₂NR³³R³⁴ или -CO₂R³⁵ и R³³, R³⁴ и R³⁵ каждый независимо выбран из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила.

В некоторых вариантах реализации каждая электроноакцепторная группа независимо выбрана из -NO₂, -CN, -галогеналкила, -CO₂NR³³R³⁴, -CO₂R³⁵, -C(=O)R³⁶, -S(=O)R³⁷, -S(=O)₂OR³⁸ и -NR³⁹R⁴⁰R⁴¹, и R³⁶, R³⁷, R³⁸, R³⁹, R⁴⁰ и R⁴¹ каждый независимо выбран из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила.

В некоторых вариантах реализации каждая электроноакцепторная группа независимо выбрана из -CN, -CONR³³R³⁴ и -CO₂R³⁵.

В некоторых вариантах реализации каждая электроноакцепторная группа независимо выбрана из -CN, -CONH₂ и -CO₂Me.

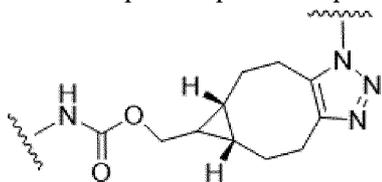
В некоторых вариантах реализации Q представляет собой активный агент;

В некоторых вариантах реализации Q включает L' и Q', где L' представляет собой линкер, и Q' представляет собой активный агент.

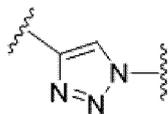
В некоторых вариантах реализации L' содержит группу сочетания, при этом группа сочетания связана с L.

В некоторых вариантах реализации группа сочетания выбрана из -C(=O)NR³²-, -C(=O)O-, -C(=NR³²)-, -C=NO-, -NR³²-C(=O)-NR³²-, -OC(=O)O-, -S-S-, -NR³²S(=O)₂O- и OS(=O)₂O-.

В некоторых вариантах реализации группа сочетания выбрана из



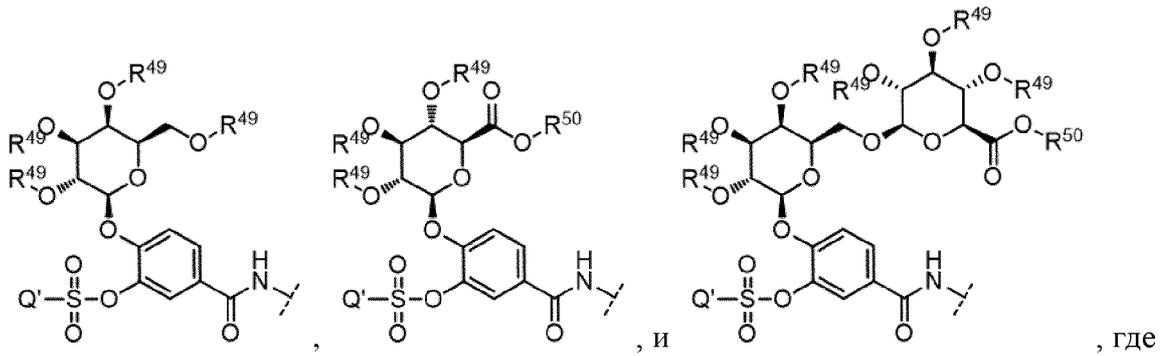
и



, ориентированных в любом направлении.

В некоторых вариантах реализации L' дополнительно содержит расщепляемую группу, при этом расщепляемая группа связана с Q'.

В некоторых вариантах реализации расщепляемая группа, связанная с Q', выбрана из



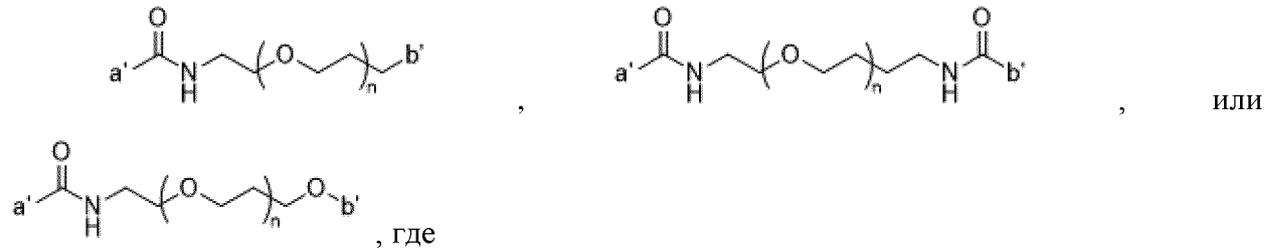
R^{49} представляет собой водород или $-C(=O)R^{50}$; и

R^{50} представляет собой низший алкил.

В некоторых вариантах реализации L' дополнительно содержит C_6-C_{100} алкилен, содержащий по меньшей мере одну группу, выбранную из $-NH-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$ и $-S(=O)_2-$.

В некоторых вариантах реализации L' содержит C_6-C_{100} алкилен, содержащий по меньшей мере одну группу, выбранную из $-NH-$, $-C(=O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$ и $-S(=O)_2-$.

Например, L включает



a' представляет собой связь с M -содержащим ароматическим кольцом, и b' представляет собой связь с L' ; и

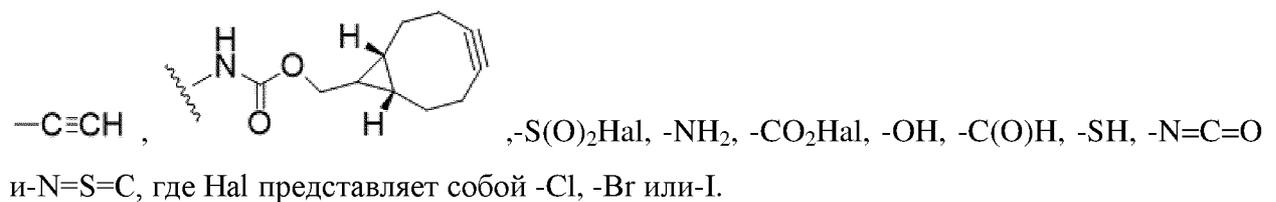
n равно 2-20.

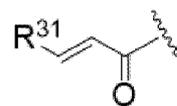
В некоторых вариантах реализации Q' представляет собой гормон, олигонуклеотид, токсин, аффинный лиганд, зонд для обнаружения или их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации Q' выбран из цитокина, иммуномодулирующего соединения, противоракового средства, противовирусного средства, антибактериального средства, противогрибкового средства, антигельминтного средства или их комбинации.

В некоторых вариантах реализации Q представляет собой реакционноспособную группу.

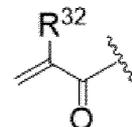
В некоторых вариантах реализации реакционноспособная группа выбрана из $-N_3$,





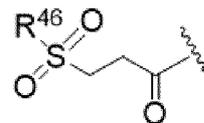
В некоторых вариантах реализации А представляет собой

В некоторых вариантах реализации R^{31} представляет собой -CN, $-\text{CO}_2\text{NR}^{33}\text{R}^{34}$, или $-\text{CO}_2\text{R}^{35}$.



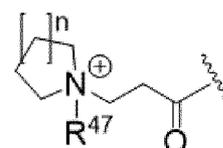
В некоторых вариантах реализации А представляет собой

В некоторых вариантах реализации R^{32} представляет собой водород или C_{1-3} алкил.



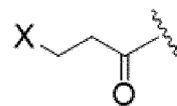
В некоторых вариантах реализации А представляет собой

В некоторых вариантах реализации R^{46} представляет собой необязательно замещенный C_{1-3} алкил, необязательно замещенный $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ арил или необязательно замещенный гетероарил.



В некоторых вариантах реализации А представляет собой

В определенных вариантах реализации R^{47} представляет собой O^- или C_{1-3} алкил.



В некоторых вариантах реализации А представляет собой

Активные агенты

Как описано выше, в предпочтительных вариантах реализации изобретения Q представляет собой активный агент, который образует часть КАЛС, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах реализации активный агент независимо выбран из химиотерапевтических агентов и токсинов. В некоторых вариантах реализации активный агент представляет собой иммуномодулирующее соединение, противораковое средство, противовирусное средство, антибактериальное средство, противогрибковое средство, противопаразитарное средство или их комбинацию.

Примеры лекарственных средств для конъюгации

КАЛС по изобретению обеспечивают направленную терапию, которая может, например, уменьшить побочные эффекты, часто наблюдаемые при противораковой терапии, поскольку один или более активных агентов доставляются в конкретную клетку.

Например, активный агент может быть выбран из группы, состоящей из эрлотиниба (TARCEVA; Genentech/OSI Pharm.); бортезомиба (VELCADE; MilleniumPharm.); фулвестранта (FASLODEX; AstraZeneca); сутента (SU11248; Pfizer); летрозол (FEMARA; Novartis); мезилата иматиниба (GLEEVEC; Novartis); PTK787/ZK 222584 (Novartis); оксалиплатина (Eloxantin; Sanofi); 5-фторурацила (5-ФУ); лейковорина;

рапамицина (Sirolimus, RAPAMUNE; Wyeth); лапатиниба (TYKERB, GSK572016; GlaxoSmithKline); лонафарниба (SCH 66336); сорафениба (BAY43-9006; Bayer Labs); гефитиниба (IRESSA; Astrazeneca); AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen); алкилирующего агента (*например*, тиотепы или циклофосфамида CYTOXAN®); алкилсульфоната (*например*, бусульфанаа, импросульфана или пипосульфана); азиридинов (*например*, бензодопы, карбоквона, метуредопы или уредопы); этиленимина, метилмеламина, альтретаминаа, триэтиленмеламина, триэтиленфосфорамида, триэтилентиофосфорамида, триметилломеламинаа; ацетогенинов (*например*, буллатацина или буллатацинона); камптотецина, включая синтетический аналог топотекана; бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая их синтетические аналоги адозелезин, карзелезин или бизелезин); криптофицинов (*например*, криптофицина 1 или криптофицина 8); доластатина; дуокармицинаа (включая синтетический аналог KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробина; панкратистатинаа; саркодиктина; спонгистатинаа; азотистого иприта (*например*, хлорамбуцила, хлорнафазина, холофосфамида, эстрамустина, ифосфамида, мехлорэтамина, гидрохлорида мехлорэтамина оксида, мелфалана, новембихина, фенестерина, преднимустинаа, трофосфамида или урацила иприта); нитромочевины (*например*, кармустина, хлорзотоцина, фотемустинаа, ломустина, нимустина или ранимнустина); антибиотиков (*например*, калихеамицина, выбранного из калихеамицина гамма1 I и калихеамицина омега II, или динемидина, включая динемидин A, в качестве эндиновых антибиотиков); бисфосфонатаа (*например*, клодроната); эсперамицина, неокарзиностатина хромофора или родственных хромопротеиновых хромофоров эндиновых антибиотиков, аклациномицина, актиномицина, антрамицина, азасерина, блеомицина, кактиномицина, карабина, карниномицина, карцинофилина, хромомицина, дактиномицина, даунорубицина, деторубуцина, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцина, ADRLIMYCIN® доксорубицина (*например*, морфолино-доксорубицина, цианоморфолино-доксорубицина, 2-пирролино-доксорубицина, липосомального доксорубицина или дезоксидоксорубицина), эпирубицина, эсорубицина, марцелломицина, митомицина (*например*, митомицина C, микофеноловой кислоты, ногаламицина, оливомицина, пепломицина, потфиروмицина, пиромицина, келамицина, родорубицина, стрептомигринина, стрептозоцина, туберцидина, убенимекса, зиностатина или зорубицина); антиметаболитов (*например*, 5-фторурацила (5-ФУ)); аналогов фолиевой кислоты (*например*, деноптерина, метотрексата, птероптерина или триметрексата); аналогов пурина (*например*, флударабина, 6-меркаптопурина, тиамиприна или тигуанина); аналогов пиримидина (*например*, анцитабина, азацитидина, 6-азауридина, кармофура, цитарабина, дидезоксиуридина, доксифлуридина, эноцитабина или флоксуридина); андрогенов (*например*, калустерона, дромостанолон пропионата, эпителиостанола, мепитиостана или тестолактона); антиадреналовых средств (*например*, аминоглютетимида, митотана или трилостана); восполнителя фолиевой кислоты (*например*, фолиевой кислоты); ацеглатона; альдофосфамидный гликозида; аминоклевулиновой кислоты; энилурацила; амсакрина; бестрабуцила; бисантрена; эдатраксата; дефамина; демеколцина; диазиквона;

эльфорнитина; ацетата эллиптиния; эпотилона; этоглюцида; нитрата галлия; гидроксимочевины; лентинана; лонидаинина; майтанзиноида (*например*, майтансина или ансамитоцина; трихотецена (*например*, токсина Т-2, верракурина А, роридинаА или ангицина); митогуазона; митоксантрона; мопиданмола; нитраэрина; пентостатина; фенамета; пирарубицина; лосоксантрона; 2-этилгидразида; прокарбазина; PSK® полисахарида, разоксана, ризоксина, сизофирана, спирогермания, тенуазоновой кислоты, триазиквона, 2,2',2''-трихлортриэтиламина, трихотецена (в частности, Т-2 токсина, верракурина А, роридина А или ангицина), уретана, виндезина, дакарбазина, манномустин; митобронитолаа; митолактола; пипобромана; гацитозина; арабинозида ('Ara-C'); циклофосфами; тиотепы; таксоидов (*например*, паклитаксела TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, штат Нью-Джерси), ABRAXANE™, не содержащий кремофора, модифицированный альбумином состав наночастиц паклитаксела, American Pharmaceutical Partners, Schaumber, Ill., или доксетаксел TAXOTERE® ((Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France))); хлоранбуцила; гемцитабина; 6-тиогуанина; меркаптопурина; аналогов платины (*например*, цисплатина или карбоплатина); винбластина; платины; этопозида, ифосфамида; митоксантрона; винкристина; NAVELBINE® винорелбина; новантрона; тенипозида; эдатрексата; дауномицина; аминоптерина; кселоды; ибандроната; СРТ-11; ингибитора топоизомеразы RFS 2000; дифторметиллорнитина (ДФМО); ретиноида (*например*, ретиноевой кислоты); капецитабина; и его фармацевтически приемлемой соли, его сольвата, его кислоты или его производного.

Ингибиторы митоза

В некоторых вариантах реализации линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела с одним или более ингибиторами митоза с образованием КАЛС для лечения онкологического заболевания. Термин «ингибитор митоза», используемый в данном документе, относится к цитотоксическому и/или терапевтическому агенту, который блокирует митоз или клеточное деление, биологический процесс, особенно важный для клеток онкологического заболевания. Ингибитор митоза разрушает микротрубочки таким образом, что деление клеток предотвращается, часто путем воздействия на полимеризацию микротрубочек или деполимеризацию микротрубочек. Таким образом, в некоторых вариантах реализации антитело конъюгировано с одним или более ингибиторами митоза, которые нарушают образование микротрубочек путем ингибирования полимеризации тубулина. В некоторых вариантах реализации ингибитор митоза, используемый в КАЛС по данному изобретению, представляет собой Taxol® (паклитаксел), Taxotere® (доцетаксел) или Ixempra® (иксабепилон). Примеры ингибиторов митоза, которые можно использовать в раскрытых в данном документе КАЛС, представлены ниже. В род ингибиторов митоза входят ауристатины, описанные выше.

Ауристатины

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним ауристатином. Ауристатины представляют собой группу

аналогов доластатина, которые, как правило, обладают противораковой активностью, препятствуя динамике микротрубочек и гидролизу GTP, тем самым ингибируя клеточное деление. Например, ауристин Е (пат. США № 5635483) представляет собой синтетический аналог морского природного продукта доластатина 10, соединения, которое ингибирует полимеризацию тубулина путем связывания с тем же участком на тубулине, что и противораковое лекарство винкристин (GR Pettit, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 70: 1-79 (1997)). Доластин 10, ауристин PE и ауристин E представляют собой линейные пептиды, содержащие четыре аминокислоты, три из которых являются уникальными для соединений класса доластатина. Примеры вариантов реализации подкласса ингибиторов митоза ауристинина включают, но не ограничиваются ими, монометилауристин D (MMAD или производное ауристинина D), монометилауристин E (MMAE или производное ауристинина E), монометилауристин F (MMAF или производное ауристинина F), ауристин F фенилендиамин (AFP), ауристин EB (AEB), ауристин EFP (AEFP) и сложный эфир 5-бензоилвалериановой кислоты (AEVB). Синтез и структура производных ауристинина описаны в публикациях патентных заявок США № 2003-0083263, 2005-0238649 и 2005-0009751; публикациях международного патента № WO 04/010957, публикации международного патента № WO 02/088172 и патента США № 6323315; 6239104; 6034065; 5780588; 5665860; 5663149; 5635483; 5599902; 5554725; 5530097; 5521284; 5504191; 5410024; 5138036; 5076973; 4986988; 4978744; 4879278; 4816444; и 4486414, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Доластатины

В некоторых вариантах реализации активный агент в КАЛС, описанных в данном документе, представляет собой доластин. Доластатины представляют собой короткие пептидные соединения, выделенные из морского зайца *Dolabella auricularia* обитающего в Индийском океане (см. Pettit et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 98, 4677). Примеры доластатинов включают доластин 10 и доластин 15. Доластин 15, семисубъединичный депсипептид, полученный из *Dolabella auricularia*, является мощным антимитотическим средством, структурно связанным с антитубулиновым средством доластином 10, пятисубъединичным пептидом, полученным из того же организма. Таким образом, в некоторых вариантах реализации КАЛС по данному изобретению содержит антитело, линкер, как описано в данном документе, и по меньшей мере один доластин. Описанные выше ауристинины представляют собой синтетические производные доластатина 10.

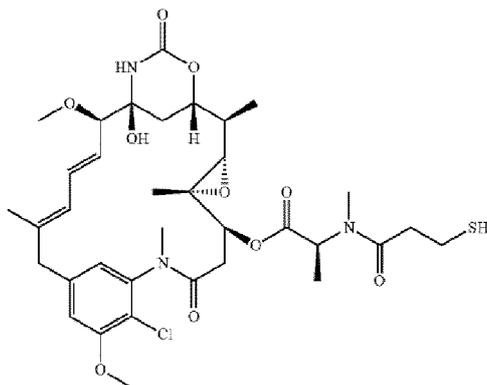
Майтансиноиды

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним майтансиноидом с образованием КАЛС. Майтансиноиды являются мощными противоопухолевыми агентами, которые первоначально были выделены из членов семейств высших растений *Celastraceae*, *Rhamnaceae* и *Euphorbiaceae*, и некоторых видов мхов (Kupchan et al, *J. Am. Chem. Soc.* 94:1354-1356 [1972]; Wani et al, *J. Chem. Soc. Chem. Commun* 390: [1973]; Powell et al, *J. Nat. Prod.* 46:660-666 [1983]; Sakai

et al, J. Nat. Prod. 51:845-850 [1988]; и Suwanborirux et al, Experientia 46:117-120 [1990]). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что майтанзиноиды ингибируют митоз путем ингибирования полимеризации белка микротрубочек тубулина, тем самым предотвращая образование микротрубочек (см., например, патент США № 6441163 и Remillard et al., Science, 189, 1002-1005 (1975)). Было показано, что майтансиноиды ингибируют рост опухолевых клеток *in vitro* с использованием моделей клеточных культур и *in vivo* с использованием лабораторных животных. Более того, цитотоксичность майтансиноидов в 1000 раз выше, чем у традиционных химиотерапевтических средств, таких как, например, метотрексат, даунорубин и винкристин (см., например, патент США № №5208020).

Майтансиноиды, включая майтансин, майтансинол, С-3 сложные эфиры майтансинола и другие аналоги и производные майтансинола (см., например, патент США № 5208020 и 6441163, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки). С-3 сложные эфиры майтансинола могут быть природными или синтетическими. Кроме того, встречающиеся в природе и синтетические эфиры майтансинола С-3 можно классифицировать как эфир С-3 с простыми карбоновыми кислотами или эфир С-3 с производными N-метил-L-аланина, причем последний более цитотоксичен, чем предыдущий. Синтетические аналоги майтансиноидов описаны, например, в Kurchan et al., J. Med. Chem., 21, 31-37 (1978).

Подходящие майтанзиноиды для применения в КАЛС по данному изобретению могут быть выделены из природных источников, получены синтетическим или полусинтетическим путем. Более того, майтансиноид можно модифицировать любым подходящим образом, пока сохраняется достаточная цитотоксичность конечной молекулы конъюгата. Структура типичного майтансиноида, мертанзина (DM1), представлена ниже.



Мертанзин (DM1)

Репрезентативные примеры майтансиноидов включают, но не ограничиваются ими, DM1 (N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзин; также называемый мертанзином, лекарственное средство майтансиноид 1; ImmunoGen, Inc.; см. также Charí et al. (1992) Cancer Res 52:127), DM2, DM3 (N2'-деацетил-N2'-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтансин), DM4 (4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)- майтансин) и майтансинол (синтетический аналог майтансиноида). Другие примеры майтансиноидов описаны в патенте США № № 8142784, включенном в данный документ посредством ссылки.

Ансамитоцины представляют собой группу майтансиноидных антибиотиков, которые были выделены из различных бактериальных источников. Эти соединения обладают мощной противоопухолевой активностью. Репрезентативные примеры включают, но не ограничиваются ими, ансамитоцин Р1, ансамитоцин Р2, ансамитоцин Р3 и ансамитоцин Р4.

Алкалоиды растений

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним растительным алкалоидом, *например*, таксаном или алкалоидом барвинка. Растительные алкалоиды представляют собой химиотерапевтические препараты, полученные из определенных видов растений. Алкалоиды барвинка производятся из растения барвинок (*catharanthus rosea*), и таксаны производятся из коры тихоокеанского тиса (*Taxus*). И алкалоиды барвинка, и таксаны также известны как агенты против микротрубочек и более подробно описаны ниже.

Таксаны

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним таксаном. Используемый в данном документе термин «таксан» относится к классу противоопухолевых агентов, обладающих механизмом действия на микротрубки и имеющих структуру, включающую кольцевую структуру таксана и стереоспецифическую боковую цепь, необходимую для цитостатической активности. Также в термин «таксан» включено множество известных производных, включая как гидрофильные производные, так и гидрофобные производные. Производные таксана включают, но не ограничиваются ими, производные галактозы и маннозы, описанные в международной патентной заявке № WO 99/18113; пиперазино и другие производные, описанные в WO 99/14209; производные таксана, описанные в WO 99/09021, WO 98/22451 и патенте США № 5869680; 6-тиопроизводные, описанные в WO 98/28288; сульфенамидные производные, описанные в патенте США № 5821263; и производное таксола, описанное в патенте США № 5415869, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. Соединения таксана ранее также были описаны в патенте США № 5641803, 5665671, 5380751, 5728687, 5415869, 5407683, 5399363, 5424073, 5157049, 5773464, 5821263, 5840929, 4814470, 5438072, 5403858, 4960790, 5433364, 4942184, 5362831, 5705503 и 5278324, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. Дополнительные примеры таксанов включают, но не ограничиваются ими, доцетаксел (Таксотер[®]; Санофи Авентис), паклитаксел (Абраксан[®] или Таксол[®]; Abraxis Oncology) и паклитаксел в виде наночастиц (ABI-007/ Абраксан[®]; Abraxis Bioscience).

В некоторых вариантах реализации линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним доцетакселом. В некоторых вариантах реализации линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним паклитакселом.

Алкалоиды барвинка

В некоторых вариантах реализации линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним алкалоидом барвинка. Алкалоиды барвинка представляют собой класс препаратов, специфичных для клеточного цикла, которые действуют путем ингибирования способности клеток онкологического заболевания к делению, воздействуя на тубулин и предотвращая образование микротрубочек. Примеры алкалоидов барвинка, которые можно использовать в КАЛС по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, сульфат виндезина, винкристин, винбластин и винорелбин.

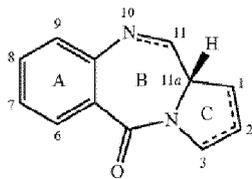
Противоопухолевые антибиотики

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела с одним или более противоопухолевыми антибиотиками для лечения онкологического заболевания. Используемый в данном документе термин «противоопухолевый антибиотик» означает противоопухолевый препарат, который блокирует рост клеток путем вмешательства в ДНК и производится из микроорганизма. Часто противоопухолевые антибиотики либо разрушают нити ДНК, либо замедляют или останавливают синтез ДНК. Примеры противоопухолевых антибиотиков, которые могут быть включены в описанные в данном документе КАЛС, включают, но не ограничиваются ими, актиномицины (*например*, пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепины), антрациклины, калихеамицины и дуокармицины, описанные в более подробно ниже.

Актиномицины

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним актиномицином. Актиномицины представляют собой подкласс противоопухолевых антибиотиков, выделенных из бактерий рода *Streptomyces*. Репрезентативные примеры актиномицинов включают, но не ограничиваются ими, актиномицин D (Cosmegen [также известный как актиномицин, дактиномицин, актиномицин IV, актиномицин C1], Lundbeck, Inc.), антрамицин, чикамицин A, DC-81, мазетрамицин, неотрамицин A, неотрамицин B, поротрамицин, протракарцин B, SG2285, сибаномицин, сибиромицин и томаймицин. В некоторых вариантах реализации D представляет собой пирролобензодиазепин (PBD). Примеры PBD включают, но не ограничиваются ими, антрамицин, чикамицин A, DC-81, мазетрамицин, неотрамицин A, неотрамицин B, поротрамицин, протракарцин B, SG2000 (SJG-136), SG2202 (ZC-207), SG2285 (ZC-423), сибаномицин, сибиромицин и томаймицин. Таким образом, в некоторых вариантах реализации D представляет собой актиномицин, *например*, актиномицин D, или PBD, *например*, димер пирролобензодиазепина (PBD).

Структуры PBD можно найти, например, в заявке на патент США № 2013/0028917 и 2013/0028919, и в WO 2011/130598 A1, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки. Общая структура PBD представлена ниже.



PBD различаются по количеству, типу и положению заместителей как в их ароматических кольцах А, так и в пирроло-кольцах С, и по степени насыщения кольца С. В кольце В обычно имеется имин ($N=C$), карбиноламин ($NH-CH(OH)$) или метиловый эфир карбиноламина ($NH-CH(OMe)$) в положении N10-C11, которое является электрофильным центром, отвечающим за алкилирование ДНК. Все известные природные продукты имеют (S)-конфигурацию в хиральном положении C11a, что придает им правосторонний поворот, если смотреть от кольца С к кольцу А. Дополнительные примеры PBD, которые могут быть конъюгированы с антителами посредством раскрытых в данном документе линкеров, можно найти, например, в публикациях патентных заявок США № 2013/0028917 A1 и 2013/0028919 A1, в патентах США № № 7741319 B2, и в WO 2011/130598 A1 и WO 2006/111759 A1, все из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Антрациклины

Линкеры по данному изобретению могут быть использованы для конъюгации антител по меньшей мере с одним антрациклином. Антрациклины представляют собой подкласс противоопухолевых антибиотиков, выделенных из бактерий рода *Streptomyces*. Репрезентативные примеры включают, помимо прочего, даунорубицин (Cerubidine, Bedford Laboratories), доксорубицин (Adriamycin, Bedford Laboratories; также называемый гидрохлоридом доксорубицина, гидроксидаунорубицином и Rubex), эпирубицин (Ellence, Pfizer) и идарубицин (Idamycin; Pfizer Inc.). Таким образом, в некоторых вариантах реализации D представляет собой антрациклин, *например*, доксорубицин.

Калихеамицины

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним калихеамицином. Калихеамицины представляют собой семейство эндиновых антибиотиков, полученных из почвенного организма *Micromonospora echinospora*. Калихеамицины связываются с малой бороздкой ДНК и индуцируют двухцепочечные разрывы ДНК, что приводит к 100-кратному увеличению количества погибших клеток по сравнению с другими химиотерапевтическими средствами (Damle et al. (2003) *Curr Opin Pharmacol* 3:386). Получение калихеамицинов, которые можно использовать в качестве конъюгатов лекарственных средств, описано в патентах США № 5712374; 5714586; 5739116; 5767285; 5770701; 5770710; 5773001; и 5877296. Структурные аналоги калихеамицина, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, γ II, α 2I, α 3I, N-ацетил- γ II, PSAG и θ II (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) и вышеупомянутые патенты США № 5712374; 5714586; 5739116; 5767285; 5770701;

5770710; 5773001; и 5877296). Таким образом, в некоторых вариантах реализации D представляет собой калихеамицин.

Дуокармицины

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним дуокармицином. Дуокармицины представляют собой подкласс противоопухолевых антибиотиков, выделенных из бактерий рода *Streptomyces*. (см. Nagamura and Saito (1998) *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Vol. 34, No. 12). Дуокармицины связываются с малой бороздкой ДНК и алкилируют аденин азотистого основания в положении N3 (Boger (1993) *Pure and Appl Chem* 65(6):1123; and Boger and Johnson (1995) *PNAS USA* 92:3642). Синтетические аналоги дуокармицинов включают, но не ограничиваются ими, адозелезин, бизелезин и карзелезин. Таким образом, в некоторых вариантах реализации D представляет собой дуокармицин.

Другие противоопухолевые антибиотики

В дополнение к вышеизложенному, дополнительные противоопухолевые антибиотики, которые можно использовать в КАЛС по данному изобретению, включают блеомицин (Blenoxane, Bristol-Myers Squibb), митомицин и пликамицин (также известный как митрамицин).

Иммуномодулирующие агенты

В некоторых вариантах реализации линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним иммуномодулирующим агентом. Используемый в данном документе термин «иммуномодулирующий агент» относится к агенту, который может стимулировать или модифицировать иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации иммуномодулирующее средство представляет собой иммуностимулятор, который усиливает иммунный ответ субъекта. В некоторых вариантах реализации иммуномодулирующее средство представляет собой иммунодепрессант, который предотвращает или ослабляет иммунный ответ субъекта. Иммуномодулирующий агент может модулировать миелоидные клетки (моноциты, макрофаги, дендритные клетки, мегакариоциты и гранулоциты) или лимфоидные клетки (Т-клетки, В-клетки и естественные клетки-киллеры (NK)) и любые другие их дифференцированные клетки. Репрезентативные примеры включают, но не ограничиваются ими, бациллу кальметта-герина (BCG) и левамизол (эргамизол). Другие примеры иммуномодулирующих агентов, которые можно использовать в КАЛС по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, вакцины против онкологического заболевания, цитокины и иммуномодулирующую генную терапию.

Вакцины против онкологического заболевания

Линкеры по данному изобретению могут быть использованы для конъюгации антитела с вакциной против онкологического заболевания. Используемый в данном документе термин «вакцина против онкологического заболевания» относится к композиции (например, опухолевый антиген и цитокин), которая вызывает опухолеспецифический иммунный ответ. Реакцию вызывают у собственной иммунной

системы субъекта путем введения вакцины против онкологического заболевания или, в случае настоящего описания, введение КАЛС, содержащего антитело и вакцину против онкологического заболевания. В предпочтительных вариантах реализации иммунный ответ приводит к эрадикации опухолевых клеток в организме (например, первичных или метастатических опухолевых клеток). Применение вакцин против онкологического заболевания обычно включает введение определенного антигена или группы антигенов, которые, например, присутствуют на поверхности конкретной раковой клетки или присутствуют на поверхности конкретного инфекционного агента, который, как показано, способствует образованию онкологического заболевания. В некоторых вариантах реализации вакцины против онкологического заболевания используются в профилактических целях, в то время как в других вариантах реализации они используются в терапевтических целях. Неограничивающие примеры вакцин против онкологического заболевания, которые могут быть использованы в КАЛС, описанных в данном документе, включают рекомбинантную бивалентную вакцину против вируса папилломы человека (ВПЧ) типов 16 и 18 (Cervarix, GlaxoSmithKline), рекомбинантную четырехвалентную вакцину против вируса папилломы человека (ВПЧ) типов 6, 11, 16, 18 (Gardasil, Merck & Company) и сипулеуцел-Т (Provence, Dendreon). Таким образом, в некоторых вариантах реализации D представляет собой вакцину против онкологического заболевания, которая является либо иммуностимулятором, либо иммунодепрессантом.

Цитокины

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним цитокином. Термин «цитокин» обычно относится к белкам, высвобождаемым одной клеточной популяцией, которые действуют на другую клетку как межклеточные медиаторы. Цитокины непосредственно стимулируют иммунные эффекторские клетки и стромальные клетки в месте опухоли и усиливают распознавание опухолевых клеток цитотоксическими эффекторскими клетками (Lee and Margolin (2011) *Cancers* 3:3856). Многочисленные исследования моделей опухолей на животных продемонстрировали, что цитокины обладают широкой противоопухолевой активностью, и это было воплощено в ряде основанных на цитокинах подходов к терапии онкологического заболевания (Lee and Margoli, см. выше). В последние годы ряд цитокинов, включая GM-КСФ, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 и IL-21, вошли в клинические испытания для пациентов с онкологическим заболеванием на поздней стадии (Lee and Margoli, см. выше).

Примеры цитокинов, которые можно использовать в КАЛС по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреотропный гормон (ТТГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ); фактор роста печени; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли; мюллер-ингибирующее вещество; мышинный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин; активин; фактор

роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбopoэтин (ТПО); факторы роста нервов, такие как NGF; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF); инсулиноподобный фактор роста-I и-II; эритропоэтин (ЭПО); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон α , β и γ , колониестимулирующие факторы (КСФ); гранулоцитарно-макрофагальный C-SF (GM-КСФ); и гранулоцитарно-КСФ (G-КСФ); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; фактор некроза опухоли; и другие полипептидные факторы, включая LIF и набор лигандов (KL). Используемый в данном документе термин цитокин включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты цитокинов с нативной последовательностью. Таким образом, в некоторых вариантах реализации D представляет собой цитокин.

Колониестимулирующие факторы (КСФ)

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним колониестимулирующим фактором (КСФ). Колониестимулирующие факторы (КСФ) представляют собой факторы роста, которые помогают костному мозгу вырабатывать эритроциты. Поскольку некоторые виды лечения онкологического заболевания (*например*, химиотерапия) могут воздействовать на лейкоциты (которые помогают бороться с инфекцией), можно вводить колониестимулирующие факторы, чтобы поддерживать уровень лейкоцитов и укреплять иммунную систему. Колониестимулирующие факторы также можно использовать после трансплантации костного мозга, чтобы помочь новому костному мозгу начать вырабатывать лейкоциты. Репрезентативные примеры КСФ, которые можно использовать в КАЛС, раскрытых в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, эритропоэтин (эпоэтин), филграстим (неопоген (также известный как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-КСФ); Amgen, Inc.), сарграмостим (лейкин (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и GM-КСФ); Genzyme Corporation), промегапоэтин и опрелвекин (рекомбинантный IL-11; Pfizer, Inc.). Таким образом, в некоторых вариантах реализации D представляет собой КСФ.

Генная терапия

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одной нуклеиновой кислотой (прямо или косвенно через носитель) для генной терапии. Генная терапия обычно относится к введению генетического материала в клетку, при этом генетический материал предназначен для лечения заболевания. Что касается иммуномодуляторов, генная терапия используется для стимуляции естественной способности субъекта ингибировать пролиферацию клеток онкологического заболевания или убивать раковые клетки. В некоторых вариантах реализации КАЛС по данному изобретению содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональный терапевтический ген, который используется для замены мутированного или иным образом нефункционального (*например*, укороченного) гена, связанного с онкологическим заболеванием. В других вариантах реализации КАЛС по данному изобретению содержит

нуклеиновую кислоту, которая кодирует или иным образом обеспечивает выработку терапевтического белка для лечения онкологического заболевания. Нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтический ген, может быть непосредственно конъюгирована с антителом или альтернативно может быть конъюгирована с антителом через носитель. Примеры носителей, которые можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты для генной терапии, включают, но не ограничиваются ими, вирусные векторы или липосомы.

Алкилирующие агенты

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела с одним или более алкилирующими агентами. Алкилирующие агенты представляют собой класс противоопухолевых соединений, которые присоединяют алкильную группу к ДНК. Примеры алкилирующих агентов, которые можно использовать в КАЛС по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, алкилсульфонаты, этиленимины, производные метиламина, эпоксиды, азотистые иприты, нитрозомочевины, триазины и гидразины.

Алкилсульфонаты

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним алкилсульфонатом. Алкилсульфонаты представляют собой подкласс алкилирующих агентов с общей формулой: $R-SO_2-O-R^1$, где R и R^1 обычно представляют собой алкильные или арильные группы. Типичным примером алкилсульфоната является бусульфан (Myleran[®], GlaxoSmithKline; Busulfex IV[®], PDL BioPharma, Inc.).

Азотные иприты

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним азотистым ипритом. Репрезентативные примеры этого подкласса противораковых соединений включают, но не ограничиваются ими, хлорамбуцил (Leukeran[®], GlaxoSmithKline), циклофосфамид (Cytosan[®], Bristol-Myers Squibb; Neosar, Pfizer, Inc.), эстрамустин (эстрамустинфосфат натрия или Estracyt[®], Pfizer, Inc.), ифосфамид (Ifex[®], Bristol-Myers Squibb), мехлорэтамин (Mustargen[®], Lundbeck Inc.) и мелфалан (Alkeran[®] или L-Pam[®] или фенилаланиновый иприт; GlaxoSmithKline).

Нитрозомочевины

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одной нитрозомочевинной. Нитрозомочевины представляют собой подкласс жирорастворимых алкилирующих агентов. Репрезентативные примеры включают, но не ограничиваются ими, кармустин (BCNU [также известный как BiCNU, N, N-бис (2-хлорэтил)-N-нитрозомочевина или 1,3-бис (2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина], Bristol-Myers Squibb), фотемустин (также известный как Muphoran[®]), ломустин (CCNU или 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевина, Bristol-Myers Squibb), нимустин (также известный как ACNU) и стрептозоцин (Zanosar[®], Teva Pharmaceuticals).

Триазины и гидразины

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела

по меньшей мере с одним триазином или гидразином. Триазины и гидразины относятся к подклассу азотсодержащих алкилирующих агентов. В некоторых вариантах реализации эти соединения самопроизвольно разлагаются или могут метаболизироваться с образованием промежуточных соединений алкилдиазония, которые облегчают перенос алкильной группы на нуклеиновые кислоты, пептиды и/или полипептиды, тем самым вызывая мутагенные, канцерогенные или цитотоксические эффекты. Репрезентативные примеры включают, но не ограничиваются ими, дакарбазин (DTIC-Dome, Bayer Healthcare Pharmaceuticals Inc.), прокарбазин (Mutalane[®], Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.) и темозоломид (Temodar[®], Schering Plough).

Другие алкилирующие агенты

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним этиленимином, производным метиламина или эпоксидом. Этиленимины представляют собой подкласс алкилирующих агентов, которые обычно содержат по крайней мере одно азиридиновое кольцо. Эпоксиды представляют собой подкласс алкилирующих агентов, которые характеризуются как циклические простые эфиры только с тремя атомами в кольце.

Типичные примеры этилениминов включают, но не ограничиваются ими, тиопету (Thioplex, Amgen), диазиквон (также известный как азиридинилбензохинон (AZQ)) и митомицин С. Митомицин С представляет собой натуральный продукт, который содержит азиридиновое кольцо и, по-видимому, вызывает цитотоксичность путем сшивания ДНК (Dorr R T, et al. Cancer Res. 1985; 45:3510; Kennedy K A, et al Cancer Res. 1985; 45:3541). Репрезентативные примеры производных метиламина и их аналогов включают, но не ограничиваются ими, альтретамином (Hexalen, MGI Pharma, Inc.), который также известен как гексаметиламин и гексастат. Репрезентативные примеры эпоксидов этого класса противораковых соединений включают, но не ограничиваются ими, диангидрогалактит. Диангидрогалактитол (1,2:5,6-диангидродульцит) химически связан с азиридинами и обычно способствует переносу алкильной группы по механизму, аналогичному описанному выше. Дибромодульцит гидролизует до диангидрогалактита и, таким образом, является пролекарством для эпоксида (Sellei C, et al. Cancer Chemother Rep. 1969; 53:377).

Антиангиогенные агенты

В некоторых вариантах реализации линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним антиангиогенным агентом. Антиангиогенные агенты подавляют рост новых кровеносных сосудов. Антиангиогенные агенты проявляют свои эффекты различными способами. В некоторых вариантах реализации эти агенты препятствуют способности фактора роста достигать своей цели. Например, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является одним из основных белков, участвующих в инициации ангиогенеза путем связывания с определенными рецепторами на клеточной поверхности. Таким образом, некоторые антиангиогенные агенты, которые предотвращают взаимодействие VEGF с родственным ему рецептором, не позволяют VEGF инициировать ангиогенез. В других вариантах

реализации эти агенты препятствуют внутриклеточным сигнальным каскадам. Например, как только активируется определенный рецептор на поверхности клетки, инициируется каскад других химических сигналов, способствующих росту кровеносных сосудов. Таким образом, определенные ферменты, например, некоторые тирозинкиназы, которые, как известно, облегчают внутриклеточные сигнальные каскады, способствующие, например, клеточной пролиферации, являются мишенями для лечения онкологического заболевания. В других вариантах реализации эти агенты препятствуют межклеточным сигнальным каскадам. Тем не менее, в других вариантах реализации эти агенты выводят из строя определенные мишени, которые активируют и стимулируют рост клеток или непосредственно препятствуют росту клеток кровеносных сосудов. Ингибирующие свойства ангиогенеза были обнаружены более чем у 300 веществ с многочисленными прямыми и косвенными ингибирующими эффектами.

Репрезентативные примеры антиангиогенных агентов, которые можно использовать в КАЛС по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, ангиостатин, АВХ EGF, C1-1033, PKI-166, вакцину EGF, ЕКВ-569, GW2016, ICR-62, EMD 55900, CP358, PD153035, AG1478, IMC-C225 (Erbix, ZD1839 (Iressa), OSI-774, Эрлотиниб (Tarceva), ангиостатин, аррестин, эндостатин, ВАУ 12-9566 и с фторурацилом или доксорубицином, канстатином, карбоксиамидотриозолом и с паклитакселем, EMD121974, S-24, витаксин, диметилксантеноноксусную кислоту, IM862, интерлейкин-12, интерлейкин-2, NM-3, HuMV833, РТК787, RhuMab, ангиозим (рибозим), IMC-1C11, Неовастат, маримстат, приномастат, BMS-275291, COL-3, MM1270, SU101, SU6668, SU11248, SU5416, с паклитакселем, с гемцитабином и цисплатином, с иринотеканом и цисплатином и с облучением, текогалан, темозоломид и ПЭГ-интерферона2b, тетраптомолибдат, TNP-470, талидомид, СС-5013 и с таксотером, тумстатином, 2-метоксиэстрадиолом, ловушкой VEGF, ингибиторы mTOR (дефоролимуc, эверолимуc (Afinitor, Novartis Pharmaceutical Corporation) и темсиролимуc (Torisel, Pfizer, Inc.)), ингибиторы тирозинкиназы (например, эрлотиниб (Tarceva, Genentech, Inc.), иматиниб (Gleevec, Novartis Pharmaceutical Corporation), гефитиниб (Iressa, AstraZeneca Pharmaceuticals), дазатиниб (Sprycel, Bristol-Myers Squibb), сунитиниб (Sutent, Pfizer, Inc.), нилотиниб (Tasigna, Novartis Pharmaceutical Corporation), лапатиниб (Tykerb, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals), сорафениб (Nexavar, Bayer и Опух), ингибиторы фосфоинозитид 3-киназы (PI3K).

Антиметаболиты

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним антиметаболитом. Антиметаболиты представляют собой виды химиотерапевтического лечения, которые очень похожи на нормальные вещества внутри клетки. Когда клетки включают антиметаболит в клеточный метаболизм, результат для клетки является отрицательным, например, клетка не может делиться. Антиметаболиты классифицируются в зависимости от веществ, с которыми они взаимодействуют. Примеры антиметаболитов, которые можно использовать в КАЛС по данному

изобретению, включают, но не ограничиваются ими, антагонист фолиевой кислоты (*например*, метотрексат), антагонист пиримидинов (*например*, 5-фторурацил, фоксуридин, цитарабин, капецитабин и гемцитабин), антагонист пуринов (*например*, 6-меркаптопурин и 6-тиогуанин) и ингибитор аденозиндезаминазы (*например*, кладрибин, флударабин, неларабин и пентостатин), как более подробно описано ниже.

Антифолаты

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним антифолатом. Антифолаты представляют собой подкласс антиметаболитов, структурно сходных с фолатом. Репрезентативные примеры включают, но не ограничиваются ими, метотрексат, 4-аминофолиевую кислоту (также известную как аминоптерин и 4-аминоптеровая кислота), лометрексол (LMTX), пеметрексед (Alimpta, Eli Lilly and Company) и триметрексат (нейтрексин, Ben Venue Laboratories, Inc.)

Антагонисты пуринов

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним антагонистом пурина. Аналоги пуринов представляют собой подкласс антиметаболитов, структурно сходных с группой соединений, известных как пурины. Репрезентативные примеры антагонистов пуринов включают, но не ограничиваются ими, азатиоприн (Azasan, Salix; Imuran, GlaxoSmithKline), кладрибин (Leustatin [также известный как 2-CdA], Janssen Biotech, Inc.), меркаптопурин (Purinethol [также известный как 6-меркаптоэтанол], GlaxoSmithKline), флударабин (Fludara, Genzyme Corporation), пентостатин (Nipent, также известный как 2'-дезоксикоформин (DCF)), 6-тиогуанин (Lanvis [также известный как тиогуанин], GlaxoSmithKline).

Антагонисты пиримидина

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним антагонистом пиримидина. Антагонисты пиримидина представляют собой подкласс антиметаболитов, структурно сходных с группой соединений, известных как пурины. Репрезентативные примеры антагонистов пиримидина включают, но не ограничиваются ими, азациитидин (Vidaza, Celgene Corporation), капецитабин (Xeloda, Roche Laboratories), цитарабин (также известный как цитозинарабинозид и арабинозилцитозин, Bedford Laboratories), децитабин (Dacogen, Eisai Pharmaceuticals), 5-фторурацил (Adrucil, Teva Pharmaceuticals; Efudex, Valeant Pharmaceuticals, Inc), 5-фтор-2'-дезоксипуридин-5'-фосфат (FdUMP), 5-фторуридинтрифосфат и гемцитабин (Gemzar, Eli Lilly and Company).

Борсодерживающие агенты

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним борсодерживающим агентом. Борсодерживающие агенты включают класс противораковых терапевтических соединений, которые препятствуют пролиферации клеток. Репрезентативные примеры борсодерживающих агентов включают, но не ограничиваются ими, борофицин и бортезомиб (Velcade, Millenium Pharmaceuticals).

Химиопротекторы

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним химиопротекторным агентом. Химиопротекторные препараты представляют собой класс соединений, которые помогают защитить организм от специфических токсических эффектов химиотерапии. Химиопротекторные агенты можно вводить с различными видами химиотерапии, чтобы защитить здоровые клетки от токсического действия химиотерапевтических препаратов, одновременно позволяя лечить раковые клетки с помощью вводимого химиотерапевтического средства. Репрезентативные химиозащитные агенты включают, но не ограничиваются ими, амифостин (Ethyol, Medimmune, Inc.), который используется для снижения почечной токсичности, связанной с кумулятивными дозами цисплатина, дексразоксан (Totect, Arpicus Pharma; Zinecard), для лечения экстравазации, вызванной введением антрациклина (Тотект), и для лечения сердечных осложнений, вызванных введением противоопухолевого антибиотика доксорубицина (Зинекард) и месны (Меснекс, Bristol-Myers Squibb), которая используется для профилактики геморрагического цистита во время химиотерапевтического лечения ифокфамидом.

Гормональные агенты

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним гормональным агентом. Гормональный агент (включая синтетические гормоны) представляет собой соединение, которое препятствует выработке или активности эндогенно вырабатываемых гормонов эндокринной системы. В некоторых вариантах реализации эти соединения препятствуют росту клеток или оказывают цитотоксическое действие. Неограничивающие примеры включают андрогены, эстрогены, ацетат медроксипрогестерона (Provera, Pfizer, Inc.) и прогестины.

Антигормональные агенты

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним антигормональным агентом. «Антигормональный» агент представляет собой агент, который подавляет выработку и/или предотвращает функцию определенных эндогенных гормонов. В некоторых вариантах реализации антигормональный агент препятствует активности гормона, выбранного из андрогенов, эстрогенов, прогестерона и гоанадотропин-высвобождающего гормона, тем самым препятствуя росту различных клеток онкологического заболевания. Репрезентативные примеры антигормональных средств включают, но не ограничиваются ими, аминоглутетимид, анастрозол (Arimidex, AstraZeneca Pharmaceuticals), бикалутамид (Casodex, AstraZeneca Pharmaceuticals), ципротерона ацетат (Cyprostat, Bayer PLC), дегареликс (Firmagon, Ferring Pharmaceuticals), экземестан (Aromasin, Pfizer Inc.), флутамид (Drogenil, Schering-Plough Ltd), фулвестрант (Faslodex, AstraZeneca Pharmaceuticals), гозерелин (Zolodex, AstraZeneca Pharmaceuticals), летрозол (Femara, Novartis Pharmaceuticals Corporation), лейпролид (Prostap), люпрон, медроксипрогестерон ацетат (Provera, Pfizer Inc.), мегестрола ацетат (Megace, Bristol-Myers Squibb Company), тамоксифен (Nolvadex, AstraZeneca Pharmaceuticals) и трипторелин (Decapetyl, Ferring).

Кортикостероиды

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним кортикостероидом. Кортикостероиды могут быть использованы в КАЛС по данному изобретению для уменьшения воспаления. Пример кортикостероида включает, но не ограничивается ими, глюкокортикоид, например, преднизолон (Deltasone, Pharmacia & Upjohn Company, подразделение Pfizer, Inc.).

Фотоактивные терапевтические агенты

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним фотоактивным терапевтическим агентом. Фотоактивные терапевтические агенты включают соединения, которые можно использовать для уничтожения обработанных клеток при воздействии электромагнитного излучения определенной длины волны. Терапевтически важные соединения поглощают электромагнитное излучение с длинами волн, проникающими в ткани. В предпочтительных вариантах реализации соединения вводят в нетоксичной форме, способной производить фотохимический эффект, токсичный для клеток или тканей при достаточной активации. В других предпочтительных вариантах эти соединения удерживаются раковой тканью и легко выводятся из нормальных тканей. Неограничивающие примеры включают различные хромогены и красители.

Олигонуклеотиды

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним олигонуклеотидом. Олигонуклеотиды состоят из коротких цепочек нуклеиновых кислот, которые препятствуют обработке генетической информации. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды для применения в КАЛС представляют собой немодифицированные одноцепочечные и/или двухцепочечные молекулы ДНК или РНК, в то время как в других вариантах реализации эти терапевтические олигонуклеотиды представляют собой химически модифицированные одноцепочечные и/или двухцепочечные молекулы ДНК или РНК. В некоторых вариантах реализации олигонуклеотиды, используемые в КАЛС, являются относительно короткими (19-25 нуклеотидов) и гибридизуются с уникальной последовательностью нуклеиновой кислоты в общем пуле нуклеиновых кислот-мишеней, присутствующих в клетках. Некоторые из важных технологий олигонуклеотидов включают антисмысловые олигонуклеотиды (включая РНК-интерференцию (РНКи)), аптамеры, олигонуклеотиды CpG и рибозимы.

Антисмысловые олигонуклеотиды

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним антисмысловым олигонуклеотидом. Антисмысловые олигонуклеотиды предназначены для связывания с РНК посредством гибридизации Уотсона-Крика. В некоторых вариантах реализации антисмысловой олигонуклеотид комплементарен нуклеотиду, кодирующему область, домен, часть или сегмент конъюгированного антитела. В некоторых вариантах реализации антисмысловой

олигонуклеотид содержит от около 5 до около 100 нуклеотидов, от около 10 до около 50 нуклеотидов, от около 12 до около 35 и от около 18 до около 25 нуклеотидов.

Существует множество механизмов, которые можно использовать для ингибирования функции РНК после связывания олигонуклеотида с РНК-мишенью (Crooke ST. (1999). *Biochim. Biophys. Acta*, 1489, 30-42). Наиболее хорошо охарактеризованный антисмысловой механизм приводит к расщеплению РНК-мишени эндогенными клеточными нуклеазами, такими как РНКазы H или нуклеаза, связанная с механизмом РНК-интерференции. Однако олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию гена-мишени с помощью некаталитических механизмов, таких как модуляция сплайсинга или остановка трансляции, также могут быть мощными и селективными модуляторами функции гена.

Другим РНКазо-зависимым антисмысловым механизмом, которому в последнее время уделяется большое внимание, является РНКи (Fire et al. (1998). *Nature*, 391, 806-811; Zamore PD. (2002). *Science*, 296, 1265-1269.). РНК-интерференция (РНКи) представляет собой посттранскрипционный процесс, при котором двухцепочечная РНК ингибирует экспрессию гена специфичным для последовательности способом. В некоторых вариантах реализации эффект РНКи достигается за счет введения относительно более длинной двухцепочечной РНК (дцРНК), тогда как в предпочтительных вариантах реализации этот эффект РНКи достигается за счет введения более коротких двухцепочечных РНК, например, малой интерферирующей РНК (киРНК) и/или микроРНК (миРНК). В еще одном варианте реализации РНКи также можно получить путем введения плазмиды, которая генерирует дцРНК, комплементарную гену-мишени. В каждом из предыдущих вариантов реализации двухцепочечная РНК предназначена для вмешательства в экспрессию гена конкретной последовательности-мишени в клетках. Как правило, этот механизм включает превращение дцРНК в короткие РНК, которые направляют рибонуклеазы на гомологичные мРНК-мишени (обобщено, Ruvkun, *Science* 2294:797 (2001)), что затем приводит к деградации соответствующей эндогенной мРНК, что приводит к модуляции экспрессии генов. Примечательно, что дцРНК, как сообщается, обладает антипролиферативными свойствами, что позволяет также предусмотреть терапевтическое применение (Aubel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 88:906 (1991)). Например, было показано, что синтетическая дцРНК ингибирует рост опухоли у мышей (Levy et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 62:357-361 (1969)), активна при лечении мышей с лейкозом (Zeleznick et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130:126-128 (1969)), и ингибирует химически индуцированный онкогенез в коже мыши (Gelboin et al., *Science* 167:205-207 (1970)). Таким образом, в предпочтительных вариантах реализации изобретение обеспечивает применение антисмысловых олигонуклеотидов в КАЛС для лечения онкологического заболевания молочной железы. В других вариантах реализации в описании представлены композиции и способы инициации лечения антисмысловыми олигонуклеотидами, где дцРНК препятствует экспрессии EGFR в клетке-мишени на уровне мРНК. дцРНК, как использовано выше, относится к встречающейся в природе

РНК, частично очищенной РНК, рекомбинантно полученной РНК, синтетической РНК, и к измененной РНК, которая отличается от встречающейся в природе РНК включением нестандартных нуклеотидов, нунуклеотидного материала, аналогов нуклеотидов (например, заблокированная нуклеиновая кислота (LNA)), дезоксирибонуклеотидов и любых их комбинаций. РНК по данному изобретению должна быть достаточно похожа на природную РНК, чтобы она могла опосредовать модуляцию на основе антисмысловых олигонуклеотидов, описанную в данном документе.

Аптамеры

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним аптамером. Аптамер представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, выбранную из случайных пулов на основе ее способности связывать другие молекулы. Подобно антителам, аптамеры могут связывать молекулы-мишени с необычайной аффинностью и специфичностью. Во многих вариантах реализации аптамеры принимают сложные, зависящие от последовательности, трехмерные формы, которые позволяют им взаимодействовать с белком-мишенью, что приводит к образованию прочно связанного комплекса, аналогичного взаимодействию антитело-антиген, тем самым нарушая функцию указанного белка. Особая способность аптамеров прочно и специфически связываться с их белком-мишенью подчеркивает их потенциал в качестве направленной молекулярной терапии.

СрG-олигонуклеотиды

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним олигонуклеотидом СрG. Известно, что бактериальная и вирусная ДНК являются сильными активаторами как врожденного, так и специфического иммунитета человека. Эти иммунологические характеристики были связаны с метилированными динуклеотидными мотивами СрG, обнаруженными в бактериальной ДНК. Из-за того, что эти мотивы редко встречаются у людей, иммунная система человека развила способность распознавать эти мотивы как ранние признаки инфекции и впоследствии инициировать иммунные ответы. Следовательно, олигонуклеотиды, содержащие этот мотив СрG, можно использовать для инициации противоопухолевого иммунного ответа.

Рибозимы

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним рибозимом. Рибозимы представляют собой каталитические молекулы РНК длиной от 40 до 155 нуклеотидов. Способность рибозимов распознавать и разрезать специфические молекулы РНК делает их потенциальными кандидатами в терапевтические средства. Типичный пример включает ангиозим.

Радионуклидные агенты (радиоактивные изотопы)

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним радионуклидным агентом. Радионуклидные агенты включают агенты, характеризующиеся нестабильным ядром, которое способно подвергаться

радиоактивному распаду. Основа успешного лечения радионуклидами зависит от достаточной концентрации и длительного удержания радионуклида раковой клеткой. К другим факторам, которые следует учитывать, относятся период полураспада радионуклида, энергия испускаемых частиц и максимальное расстояние, которое может пройти испускаемая частица. В предпочтительных вариантах реализации терапевтическое средство представляет собой радионуклид, выбранный из группы, состоящей из ^{111}In , ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{142}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , и ^{211}Pb . Также предпочтительными являются радионуклиды, которые в значительной степени распадаются с Auger-испускающими частицами. Например, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111 1, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m и Ir-192. Энергии распада полезных бета-излучающих нуклидов предпочтительно выделяются Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211 1, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 and Fm-255. Энергии распада полезных альфа-излучающих радионуклидов, предпочтительно составляют 2000-10000 кэВ, более предпочтительно 3000-8000 кэВ и наиболее предпочтительно 4000-7000 кэВ. Дополнительные потенциальные радиоизотопы для использования включают ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , ^{121}mTe , ^{122}mTe , ^{125}mTe , ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb , и т.п.

Радиосенсибилизаторы

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним радиосенсибилизатором. Термин «радиосенсибилизатор», используемый в данном документе, определяется как молекула, предпочтительно молекула с низкой молекулярной массой, вводимая животным в терапевтически эффективных количествах для повышения чувствительности клеток, подлежащих радиосенсибилизации, к электромагнитному излучению и/или для стимуляции лечения заболеваний, поддающихся лечению электромагнитным излучением. Радиосенсибилизаторы представляют собой агенты, которые делают раковые клетки более чувствительными к лучевой терапии, но обычно оказывают гораздо меньшее влияние на нормальные клетки. Таким образом, радиосенсибилизатор можно использовать в сочетании с меченым радиоактивным изотопом антителом или КАЛС. Добавление радиосенсибилизатора может привести к повышенной эффективности по сравнению с лечением одним радиоактивно меченым антителом или фрагментом антитела. Радиосенсибилизаторы описаны в M. Goldberg (ed.), *Cancer Therapy with Radiolabeled Antibodies*, CRC Press (1995). Примеры радиосенсибилизаторов включают гемцитабин, 5-фторурацил, таксан и цисплатин.

Радиосенсибилизаторы могут активироваться электромагнитным излучением рентгеновских лучей. Репрезентативные примеры активируемых рентгеновским

излучением радиосенсибилизаторов включают, но не ограничиваются ими, следующие вещества: метронидазол, мизонидазол, десметилмизонидазол, пимонидазол, этанидазол, ниморазол, митомицин С, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, никотинамид, 5-бромдезоксисуридин (BUdR), 5-йоддезоксисуридин (IUdR), бромдезоксцитидин, фтордезоксисуридин (FUdR), гидроксимочевина, цисплатин и их терапевтически эффективные аналоги и производные. В качестве альтернативы радиосенсибилизаторы можно активировать с помощью фотодинамической терапии (ФДТ). Репрезентативные примеры фотодинамических радиосенсибилизаторов включают, но не ограничиваются ими, производные гематопорфирина, Photofrin(r), производные бензопорфирина, NРeб, этиопорфирин олова (SnET2), феоборбид а, бактериохлорофилл а, нафталоцианины, фталоцианины, фталоцианин цинка и терапевтически эффективные аналоги и производные того же.

Ингибиторы топоизомеразы

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним ингибитором топоизомеразы. Ингибиторы топоизомеразы представляют собой химиотерапевтические агенты, предназначенные для вмешательства в действие ферментов топоизомеразы (топоизомеразы I и II), которые представляют собой ферменты, контролируемые изменения в структуре ДНК путем катализа, и затем разрыва и воссоединения фосфодиэфирного остова нитей ДНК во время нормального клеточного цикла. Репрезентативные примеры ингибиторов ДНК-топоизомеразы I включают, но не ограничиваются ими, камптотецины и их производные иринотекан (СРТ-11, Camptosar, Pfizer, Inc.) и топотекан (Tucamtin, GlaxoSmithKline Pharmaceuticals). Репрезентативные примеры ингибиторов ДНК-топоизомеразы II включают, но не ограничиваются ими, амсакрин, даунорубицин, доксотрубицин, эпиподофиллотоксины, эллиптицины, эпирубицин, этопозид, разоксан и тенипозид.

Ингибиторы тирозинкиназы

Линкеры по данному изобретению можно использовать для конъюгации антитела по меньшей мере с одним ингибитором тирозинкиназы. Тирозинкиназы представляют собой ферменты внутри клетки, которые присоединяют фосфатные группы к аминокислоте тирозину. Блокируя способность протеинтирозинкиназ функционировать, можно ингибировать рост опухоли. Примеры тирозинкиназ, которые можно использовать в КАЛС по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, акситиниб, бозутиниб, цедираниб, дазатиниб, эрлотиниб, гефитиниб, иматиниб, лапатиниб, лестауртиниб, нилотиниб, семаксаниб, сунитиниб и вандетаниб.

Другие агенты

Примеры других агентов, которые можно использовать в КАЛС по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, абрин (например, абрин А-цепь), альфа-токсин, белки *Aleurites fordii*, аматоксин, кротин, курцин, диантиновые белки, дифтерийный токсин (например, дифтерийная А-цепь и несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина), дезоксирибонуклеазу (Дназу), гелонин, митогеллин,

модекцин А-цепь, ингибитор *momordica charantia*, неомицин, онконазу, феномицин, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), противовирусный белок лаконоса, эндотоксин *Pseudomonas*, экзотоксин *Pseudomonas* (например, цепь экзотоксина А (из *Pseudomonas aeruginosa*)), рестриктоцин, цепь А рицина, рибонуклеаза (РНКаза), ингибитор *saponaia officinalis*, сапорин, альфа-сарцин, стафилококковый энтеротоксин-А, столбнячный токсин, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин (Eloxatin, Sanofi Aventis), ингибиторы протеасом (например, PS-341 [бортезомиб или велкейд]), ингибиторы HDAC (вориностат (Zolinza, Merck & Company, Inc.)), белиностат, энтиностат, моцетиностат, и панобиностат), ингибиторы COX-2, замещенные мочевины, ингибиторы белков теплового шока (например, гелданамицин и его многочисленные аналоги), адренкортикальные супрессанты и трикотечены. (См., например, WO 93/21232). Другие агенты также включают аспарагиназу (Esparg, Lundbeck Inc.), гидроксимочевину, левамизол, митотан (Lysodren, Bristol-Myers Squibb) и третиноин (Renova, Valeant Pharmaceuticals Inc.).

Следует отметить, что вышеупомянутые группы лекарственных средств, которые могут быть использованы в КАЛС по данному изобретению, не являются исключительными, поскольку некоторые примеры лекарственных средств могут быть найдены более чем в одной категории, например, ансамитоцины являются как ингибиторами митоза, так и противоопухолевыми антибиотиками.

Для соединений по данному изобретению предусмотрены все стереоизомеры указанных выше групп лекарственных средств, то есть любая комбинация R- и S-конфигураций у хиральных атомов углерода D.

«Обнаруживаемый фрагмент» или «маркер» относится к композиции, которая поддается обнаружению спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими, радиоактивными или химическими средствами. Например, полезная метка включает ^{32}P , ^{35}S , флуоресцентные красители, электронно-плотные реагенты, ферменты (например, ферменты, которые обычно используются в ИФА), биотин-стрептавидин, диоксигенин, гаптен и белки, для которых используются доступные антисыворотки или моноклональные антитела, или молекулы нуклеиновой кислоты с последовательностью, комплементарной мишени. Детектируемый фрагмент часто генерирует измеримый сигнал, например, радиоактивный сигнал, цветовой сигнал или флуоресцентный сигнал, который можно использовать для количественного определения количества обнаруживаемого фрагмента, который связывается с образцом. Количественную оценку сигнала можно выполнить, например, сцинтилляционным счетом, плотномером, анализом проточной кюветы, ИФА или прямым анализом с помощью масс-спектропии кольцевых или последовательно расщепленных пептидов (можно анализировать один или более пептидов). Специалисты в данной области техники знакомы с методиками и средствами обнаружения интересующего соединения-метки. Эти методики и способы являются обычными и хорошо известны в данной области техники.

Зонд для обнаружения относится к (i) материалу, способному давать детектируемый сигнал, (ii) материалу, способному взаимодействовать с первым зондом

или вторым зондом для изменения обнаруживаемого сигнала, обеспечиваемого первым зондом или вторым зондом, например как перенос энергии флуоресцентного резонанса (FRET), (iii) материал, способный стабилизировать взаимодействие с антигеном или лигандом или повышать аффинность связывания, (iv) материал, способный влиять на электрическую подвижность или инвазивное действие на клетку посредством физических параметров, таких как заряд, гидрофобность и *т.д.*, или (v) материал, способный регулировать аффинность лиганда, связывание антиген-антитело или образование ионного комплекса.

В некоторых вариантах реализации каждый активный агент независимо выбран из:

(а) эрлотиниба, бортезомиба, фулвестранта, сутента, летрозолола, мезилата иматиниба, РТК787/ЗК 222584, оксалиплатина, 5-фторурацила, лейковорина, рапамицина, лапатиниба, лонафарниба, сорафениба, гефитиниба, AG1478, AG1571, тиотепы, циклофосамида, бусульфана, импросульфана, пипосульфана, бензодопы, карбоквона, метуредопы, уредопы, этиленимина, альтретамина, триэтиленмеламина, триэтиленфосформид, триэтилентиофосфорамид, триметилломеламина, буллатацина, буллатацинона, камптотецина, топотекана, бриостатина, каллистатина, СС-1065, адозелезина, карзелезина, бизелезина, криптофицина 1, криптофицина 8, доластатина, дуокармицина, KW-2189, СВ1-ТМ1, элеутеробина, панкреатистатина, саркодиктиина, спонгистатина, хлорамбуцила, хлорнафазина, холофосамида, эстрамустина, ифосамида, мехлорэтамидина, мелфалана, новембихина, фенестерина, преднимустина, трофосамида, урацилового иприта, кармустина, хлорозотоцина, фоемустина, ломустина, нимустина, ранимнустина, калихимицина, калихимицина гамма 1, калихимицина омега 1, динемидина, динемидина А, клодроната, эсперамицина, неокарзинонстатина хромофора, аклациномицинов, актиномицина, антрмицина, азасерина, блеомицинов, кактиномицина, карабицина, карниномицина, карцинофиллина, хромомицинов, дактиномицина, даунорубицина, деторубуцина, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцина, доксорубицина, морфолино-доксорубицина, цианоморфолино-доксорубицина, 2-пирролино-доксорубицина, липосомального доксорубицина, дезоксидоксорубицина, эпирубицина, эзорубицина, марцелломицина, митомицина С, микофеноловой кислоты, ногаламицина, оливомицина, пепломицина, потфиромидина, пуромидина, келомицина, родорубицина, стрептомицина, стрептозоцина, туберцидина, убенимекса, зиностатина, зорубицина, 5-фторурацила, деноптерина, метотрексата, птероптерина, триметрексата, флударабина, 6-меркаптопурина, тиамиприна, тигуанина, анцитабина, азацитидина, 6-азауридина, кармофура, цитарабина, дидеоксиуридина эноцитабина, флоксуридина, калустерона, дромостанолон пропионата, эпителиостанола, мепитиостана, тестолактона, аминоклотиетимида, митотана, трилостана, фолиновой кислоты, ацеглатона, гликозида альдофосамида, аминоклевулиновой кислоты, этилурацила, амсакрина, бестрабуцила, бисантрена, эдатраксата, дефофамидина, демеколцина, диазиквона, элфорнитина, эллиптиниума ацетат, этоглюцида, нитрата галлия, гидроксимочевина, лентинана, лонидаинина, майтанцина, ансамитоцина, митогуазона, митоксантрона, мопиданмола,

нитраэрина, пентостатина, фенамета, пирарубицина, лосоксантрона, 2-этилгидразида, прокарбазина, полисахарида-к, разоксана, ризоксина, сизофирана, спирогермания, тенуазоновой кислоты, триазиквона, 2,2',2''-трихлортриэтиламина, токсина Т-2, верракурина А, роридина А и ангидина, уретана, виндезина, дакарбазина, манномустина, митобронитола, митолактола, пипобромана, гацитозина, арабинозида, циклофосфамида, тиотепы, паклитаксела, наночастиц паклитаксела, созданных с помощью альбумина, доксетаксела, хлорамбуцила, гемцитабина, 6-тиогуанина, меркаптопурина, цисплатина, карбоплатина, винбластина, платины, этопозиды, ифосфамида, митоксантрона, винкристина, винорелбина, новантрона, тенипозиды, эдатрексата, дауномицина, аминоптерина, кселоды, ибандроната, СРТ-11, ингибитора топоизомеразы RFS 2000, дифторметилорнитина, ретиноевой кислоты, капецитабина или фармацевтически приемлемые соли, сольватов или кислоты любого из вышеперечисленных;

(b) монокина, лимфокина, традиционного полипептидного гормона, паратгормона, тироксина, релаксина, прорелаксина, гликопротеинового гормона, фолликулостимулирующего гормона, тиреотропного гормона, лютеинизирующего гормона, фактора роста печени, фактор роста фибробластов, пролактина, плацентарного лактогена, фактора некроза опухоли- α , фактора некроза опухоли- β , мюллерин-ингибирующего вещества, гонадотропин-ассоциированного пептида мыши, ингибина, активина, фактора роста эндотелия сосудов, тромбopoэтина, эритропоэтина, остеоиндуктивного фактора, интерферона, интерферона- α , интерферона- β , интерферона- γ , колониестимулирующего фактора («КСФ»), макрофагального-КСФ, гранулоцитарно-макрофагального-КСФ, интерлейкина («IL»), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, фактора некроза опухоли, ФНО- α , ФНО- β , полипептидного фактора, LIF, лиганда набора или комбинации любого из вышеперечисленного;

(c) дифтерийного токсина, ботулотоксина, столбнячного токсина, дизентерийного токсина, холерного токсина, аманитина, производных аманитина, α -аманитина, пирролобензодиазепина, производных пирролобензодиазепина, тетродотоксина, бреветоксина, цигуатоксина, рицина, АМ-токсина, ауристатины, тубулизина, майтанданамицина, калихеамицина, дауномицина, доксорубицина, метотрексата, виндезина, SG2285, доластатина, аналогов доластатина, криптофицина, камптотецина, производных и метаболитов камптотецина, ризоксина, производных ризоксина, СС-1065, аналогов или производных СС-1065, дуокармицина, энедиинового антибиотика, эсперамицина, эпотилона, азнафида, аплидина, анатоксина или комбинации любого из вышеперечисленного;

(d) аффинного лиганда, где аффинный лиганд представляет собой субстрат, ингибитор, стимулирующий агент, нейротрансмиттер, радиоизотоп или комбинацию любого из вышеперечисленного;

(e) радиоактивной метки, ^{32}P , ^{35}S , флуоресцентного красителя, электронно-плотного реагента, фермента, биотина, стрептавидина, диоксигенина, гаптена,

иммуногенного белка, молекулы нуклеиновой кислоты с последовательностью, комплементарной мишени, или комбинации любого из вышеперечисленного;

(f) иммуномодулирующего соединения, противоракового средства, противовирусного средства, антибактериального средства, противогрибкового средства и противопаразитарного средства или комбинации любого из вышеперечисленного;

(g) тамоксифена, ралоксифена, дролоксифена, 4-гидрокситамоксифена, триоксифена, кеоксифена, LY117018, онапристона или торемифена;

(h) 4(5)-имидазолов, аминоглутетимида, мегестрола ацетата, экземестана, летрозолола или анастрозолола;

(i) флутамида, нилутамида, бикалутамида, лейпролида, гозерелина или троксацитабина;

(j) ингибитора ароматазы;

(k) ингибитора протеинкиназы;

(l) ингибитора липидкиназы;

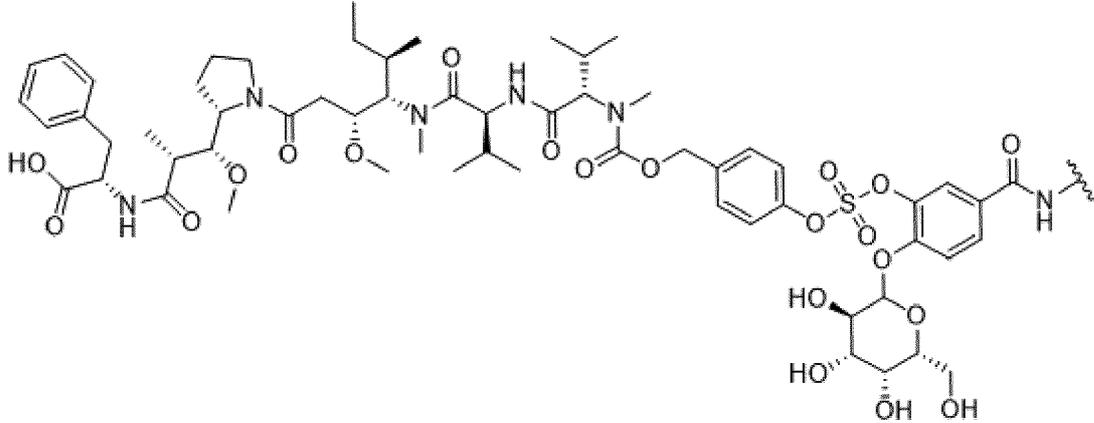
(m) антисмыслового олигонуклеотида;

(n) рибозима;

(o) вакцины; и

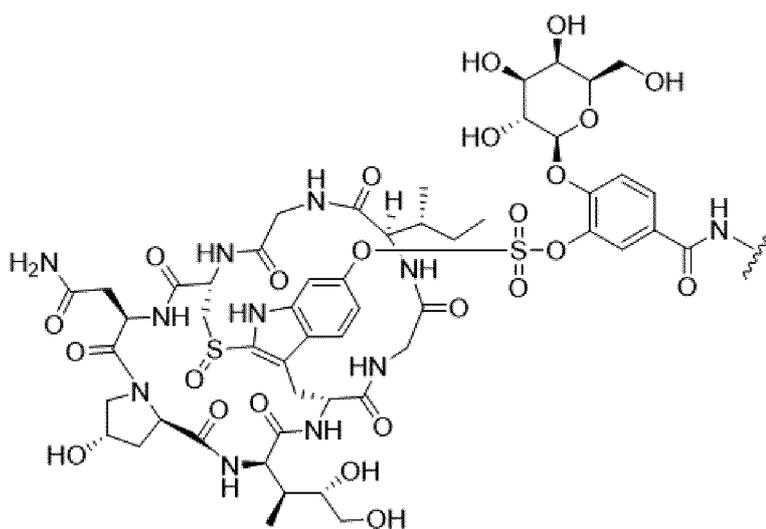
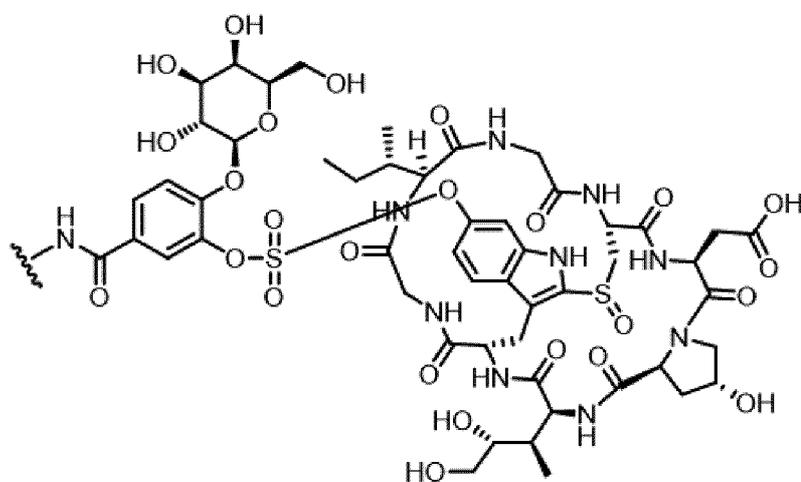
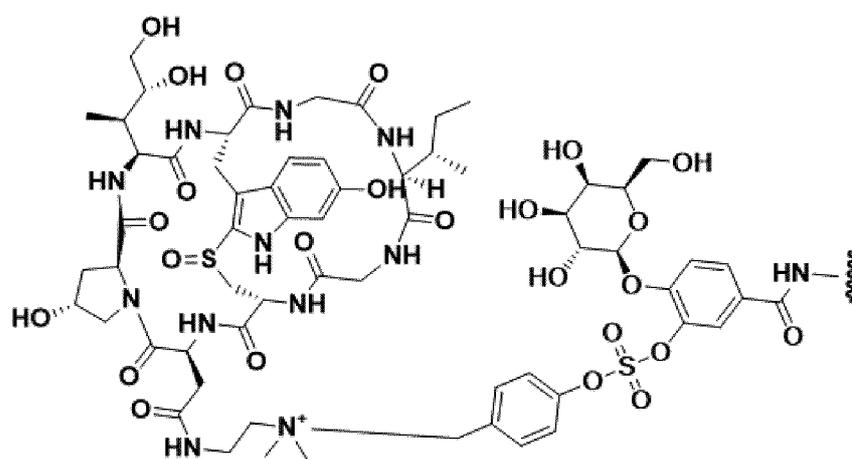
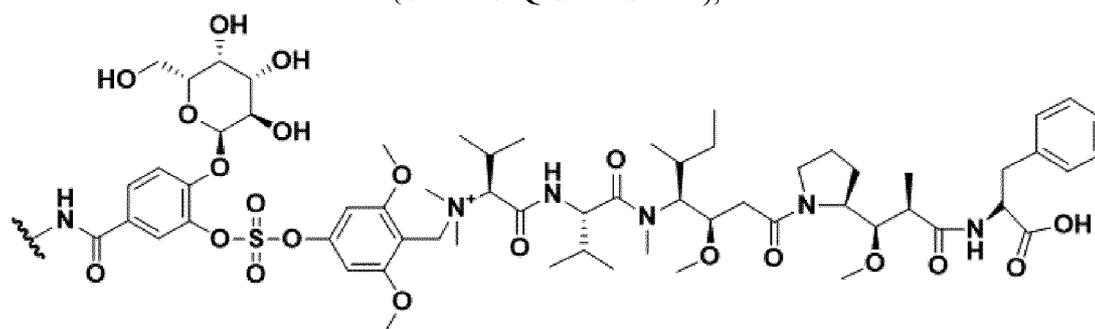
(p) антиангиогенного агента.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации, G содержит фрагмент, выбранный из следующего:

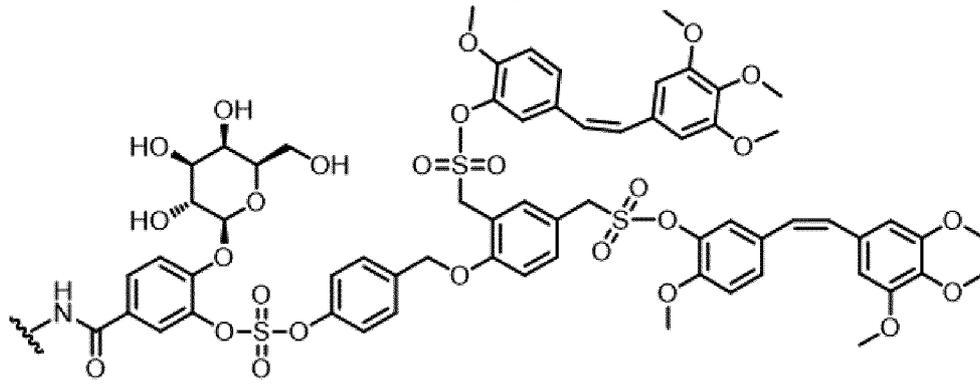


(ONPAS-

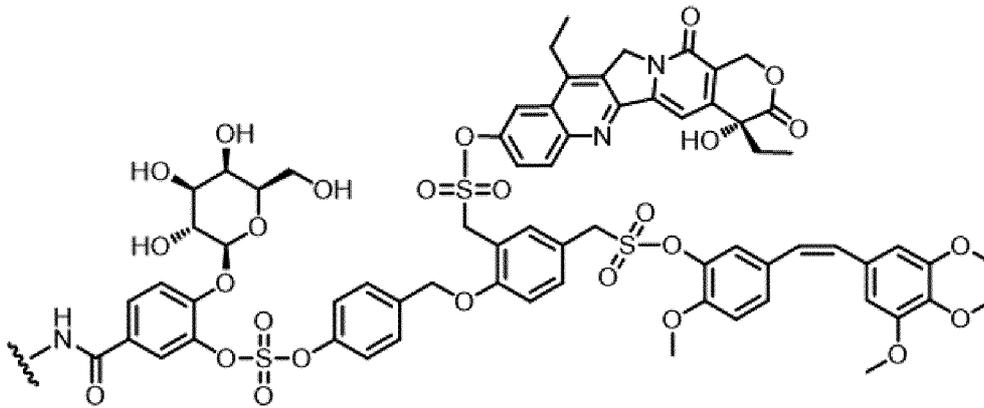
MMAF),

(OHPAS- α -Амантин),(OHPAS- β -Амантин),(OHPAS-Q- α -Амантин),

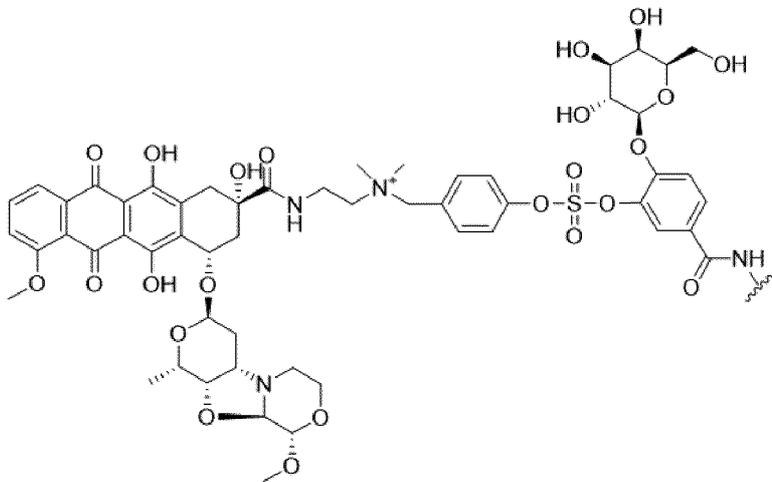
(ОHPAS-Q-Ауристин F),



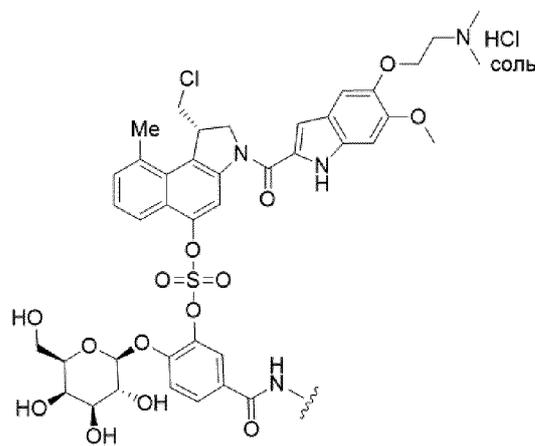
(ОHPAS-CA4-CA4),



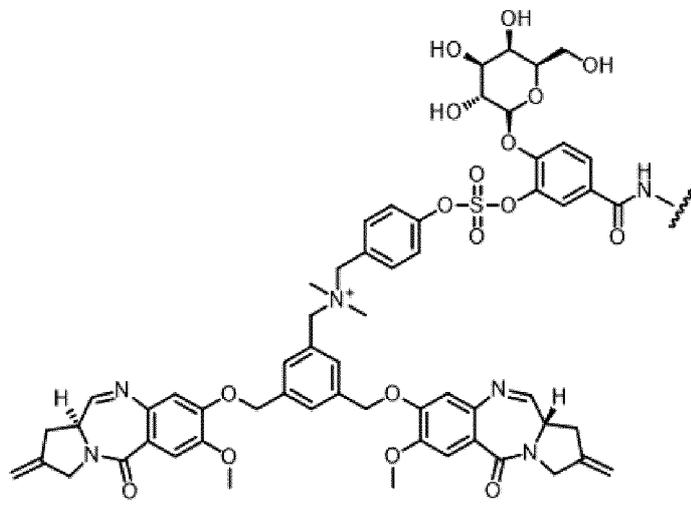
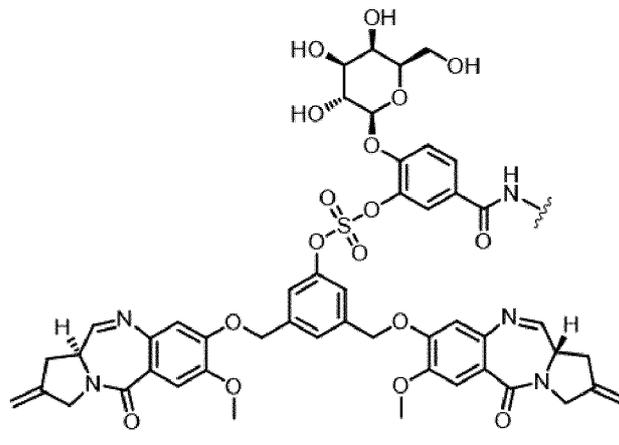
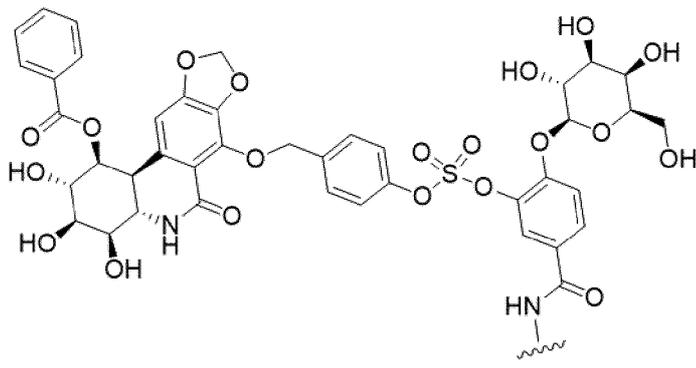
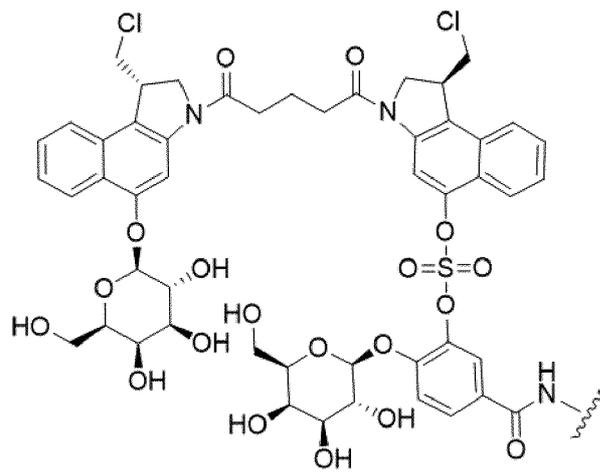
(ОHPAS-CA4-SN38),

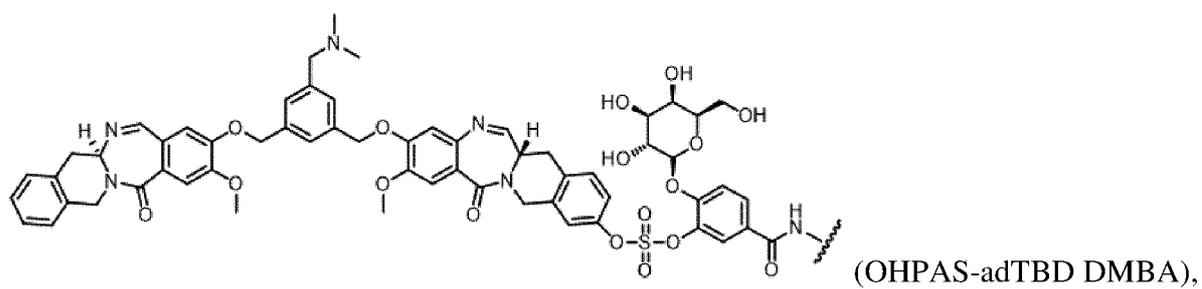
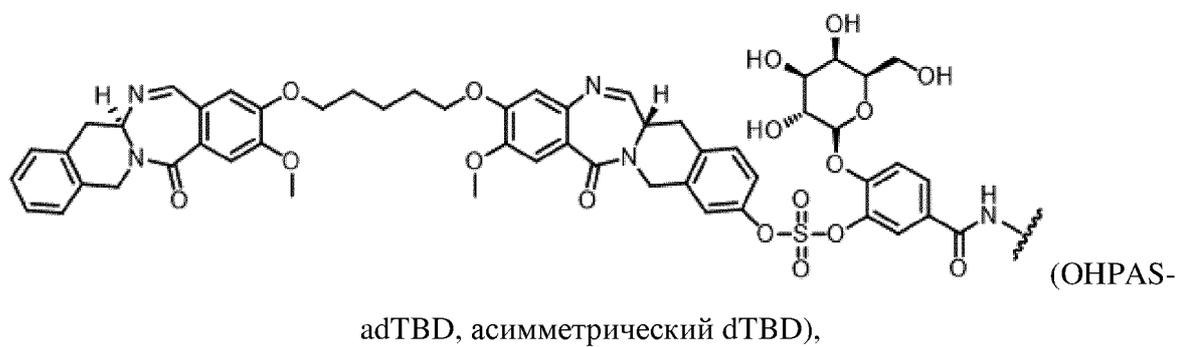
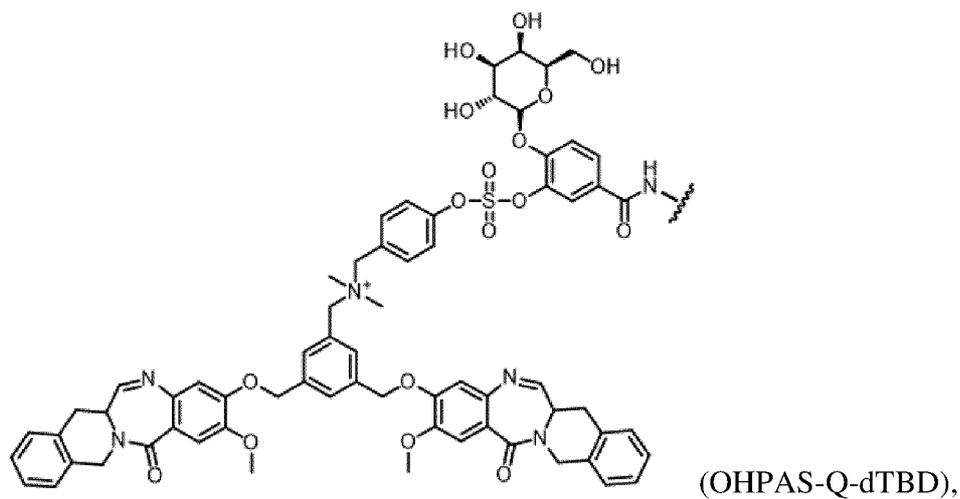
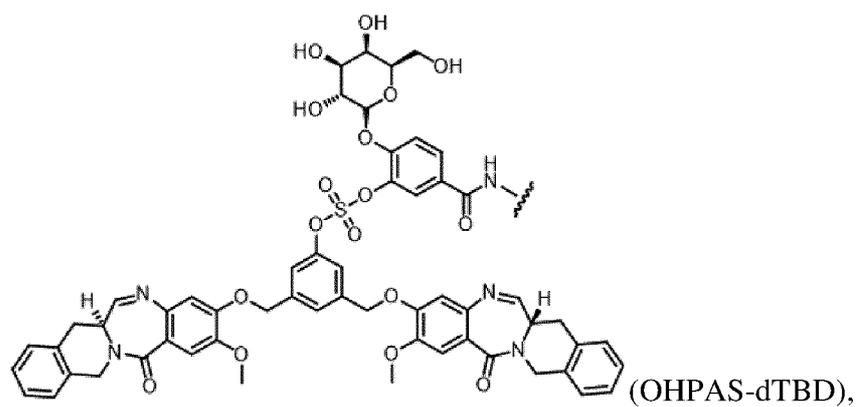


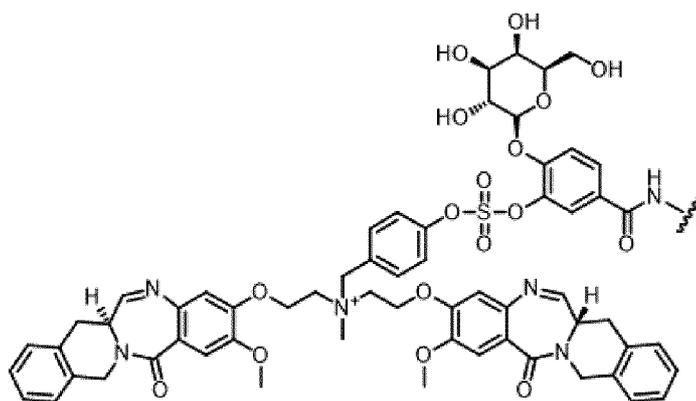
(ОHPAS-Q-PNU),



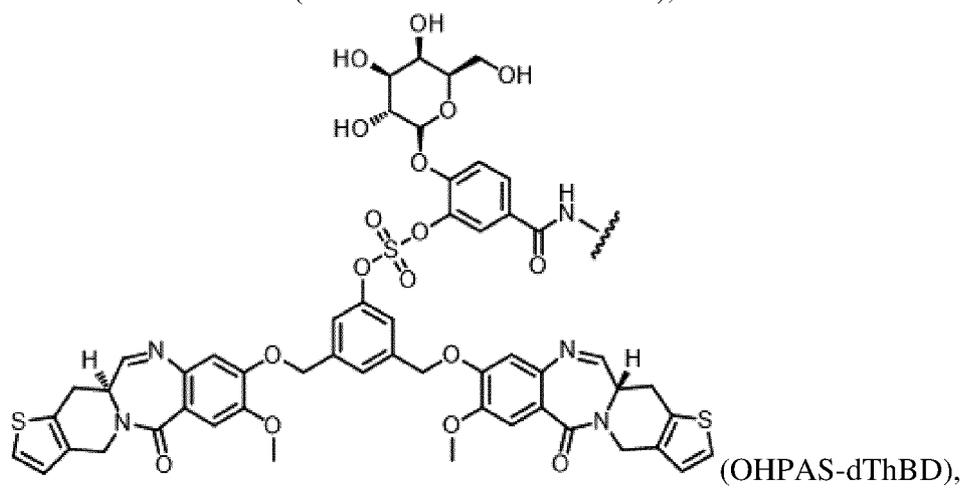
(ОHPAS-СВІ индол),



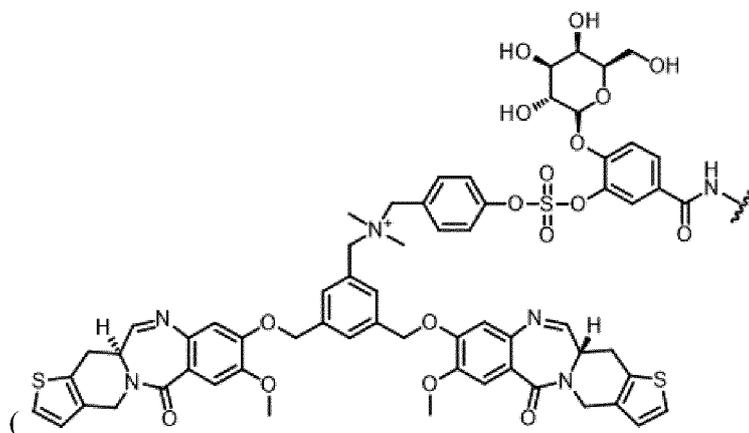




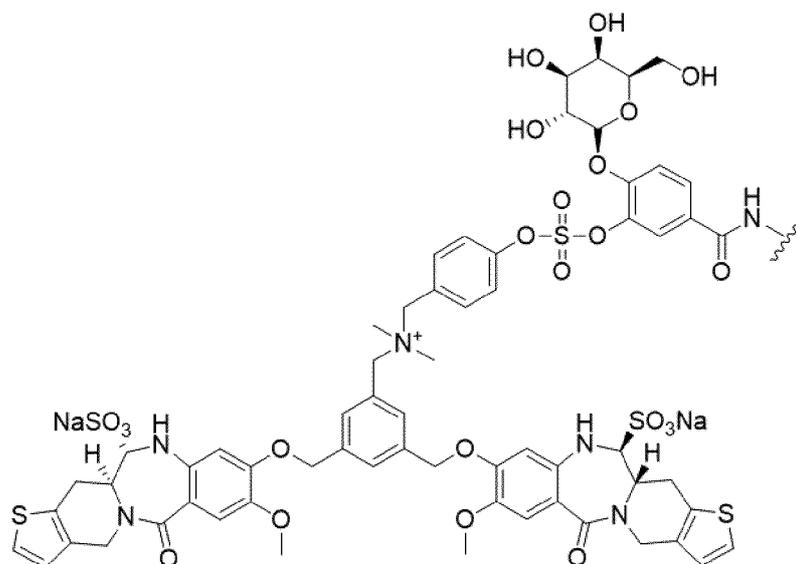
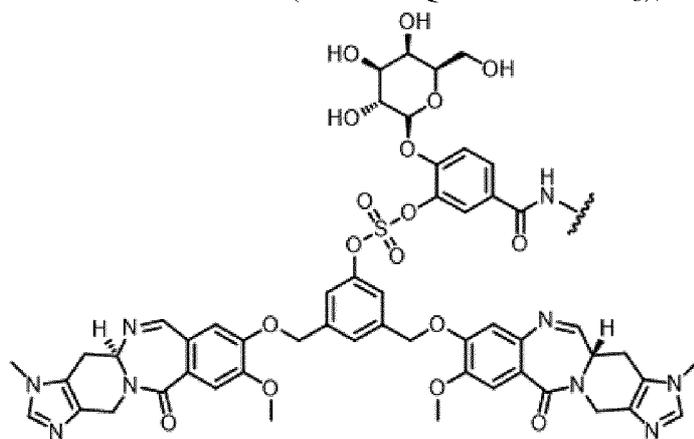
(OHPAS-dTBD алкиламин),



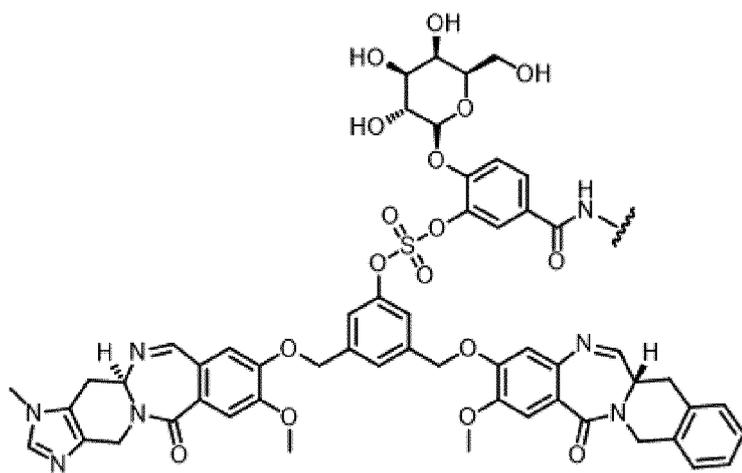
(OHPAS-dThBD),



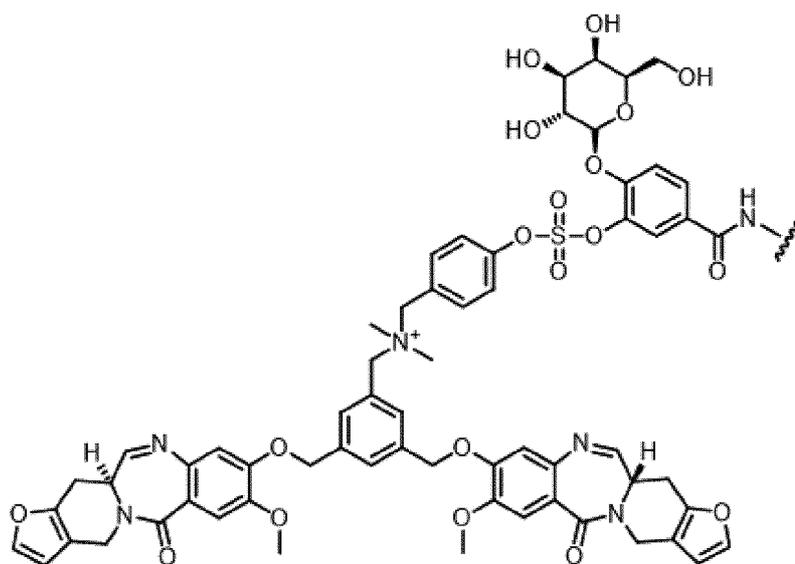
(OHPAS-Q-dThBD),

(OHPAS-Q-dThBD NaSO₃),

(OHPAS-dImBD),



(OHPAS-ImBD-TBD), и



где представляет собой фрагмент линкерной группы Z' , который соединяет Z' с Ag , в данном случае замещенную группу Ph.

Стратегии конъюгации

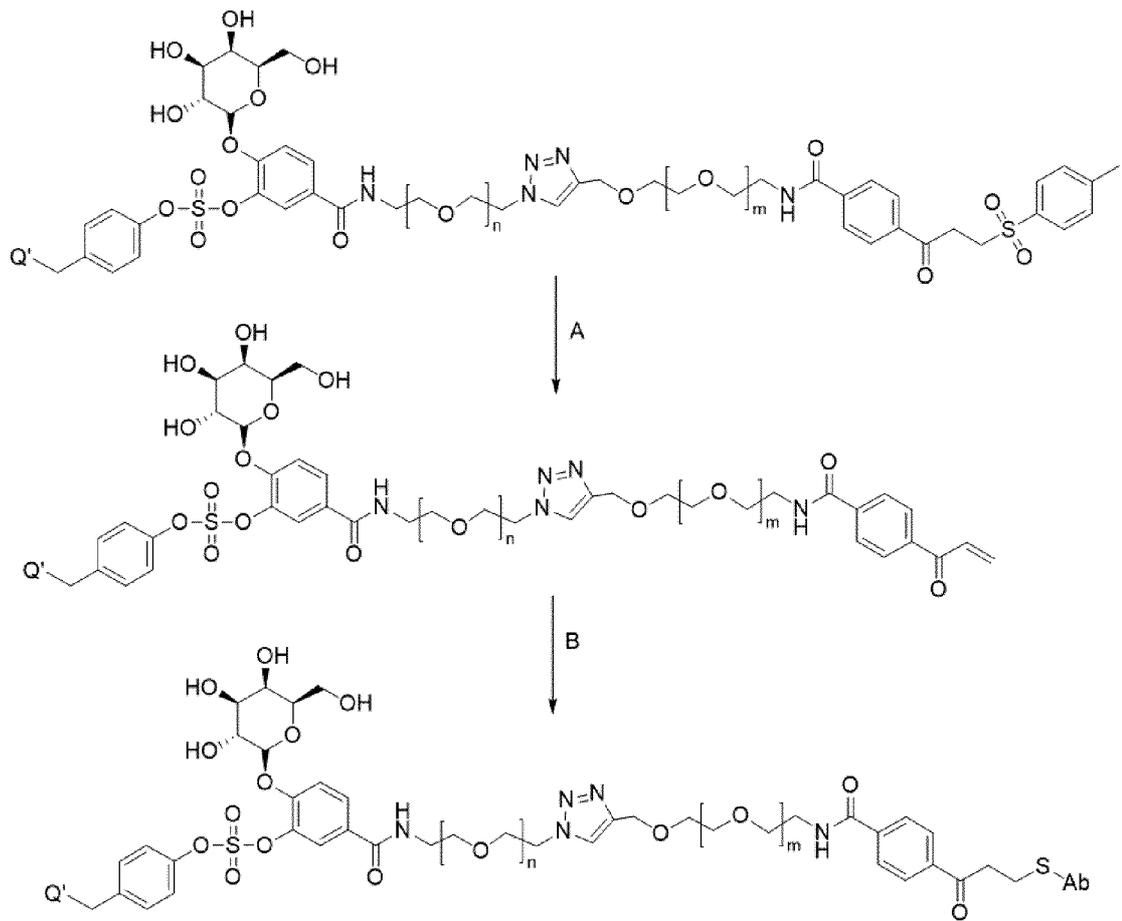
Соединения Формулы I могут быть получены по одно- или двухстадийной процедуре конъюгации.

Одностадийная процедура конъюгации

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к способам получения соединений Формулы I, которые включают одностадийную процедуру конъюгации между антителом и линкером. Соединения Формул (II) и (III), описанные выше, подходят для одностадийной процедуры конъюгации с антителами.

Например, предшественники, содержащие фрагмент метилфенилсульфона (MPS), могут подвергаться конъюгации в соответствии с последовательностью стадий, указанной на Схеме 1. Стадия А включает отщепление *p*-метилфенилсульфонильной группы *in situ*, что приводит к образованию реакционноспособного промежуточного продукта; на стадии В промежуточное соединение подвергают конъюгации с тиоловым остатком антитела.

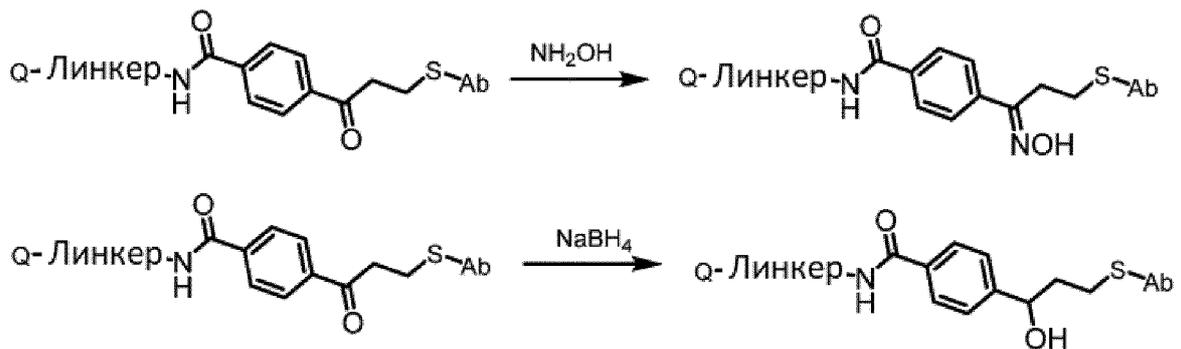
Схема 1.



Полученный КАЛС можно дополнительно стабилизировать обработкой гидросиламином или восстанавливающим агентом, как показано на Схеме 2:

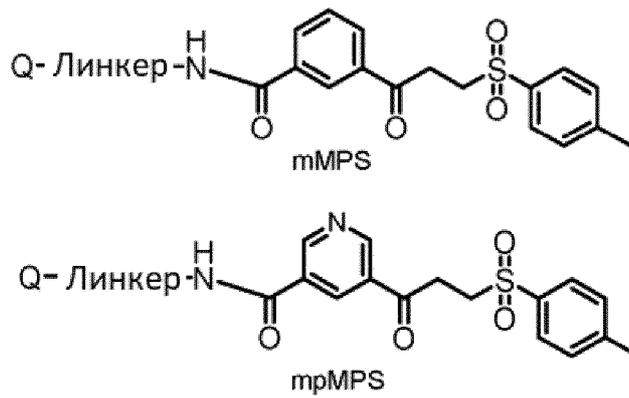
Схема

2.



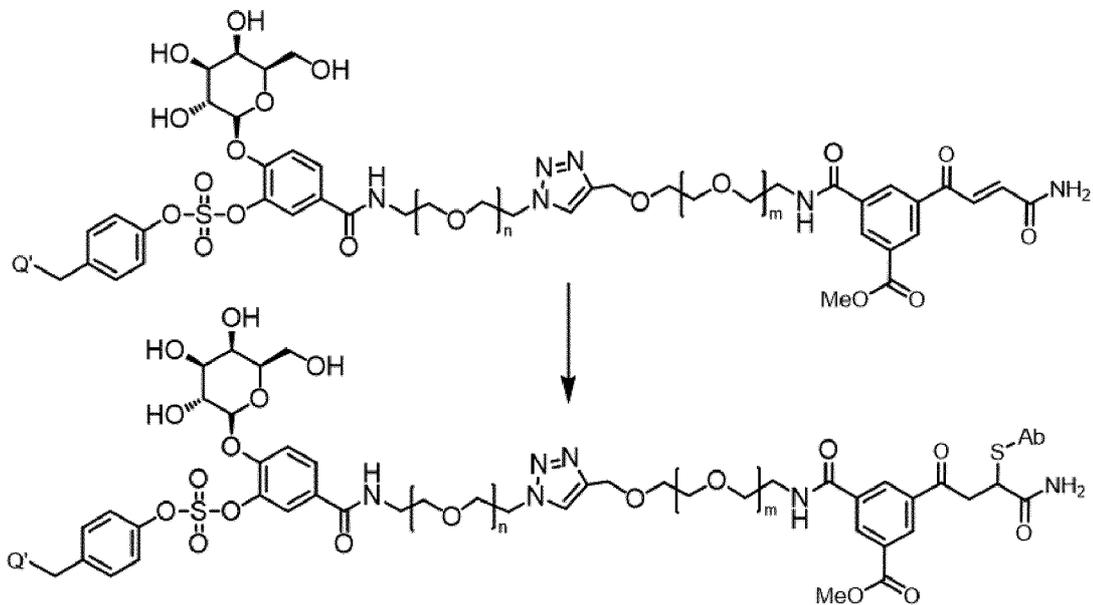
В некоторых вариантах реализации MPS-содержащие предшественники содержат фрагменты, которые генерируют активированные акцепторы Михаэля при удалении сульфоновой кислоты. Примеры таких предшественников показаны на Схеме 3.

Схема 3.



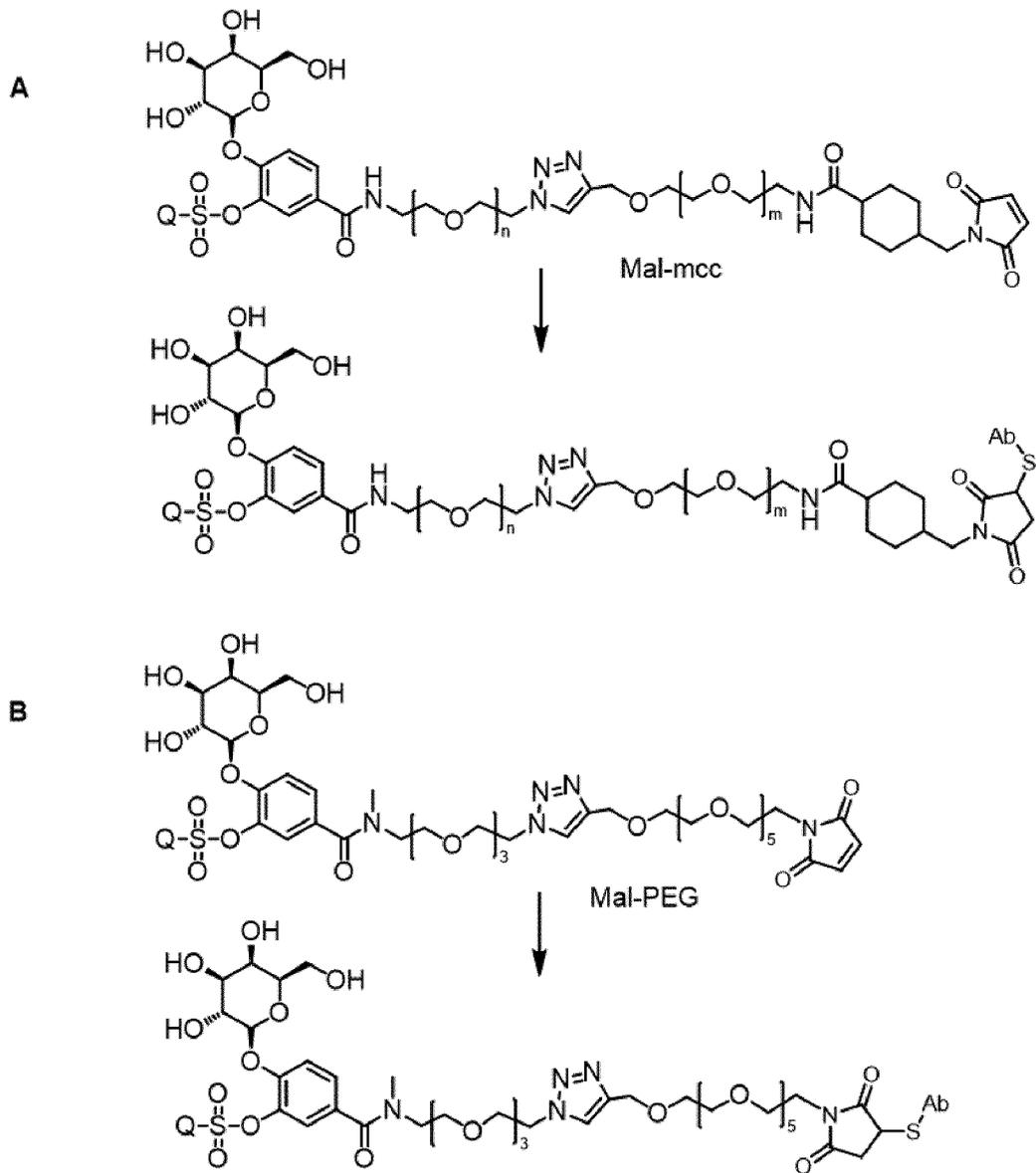
В некоторых вариантах реализации предшественники содержат фрагменты, которые действуют как активированные акцепторы Михаэля в реакции конъюгации. Пример реакции конъюгации с активированным акцептором Михаэля показан на Схеме 4.

Схема 4.



В некоторых вариантах реализации предшественники для одностадийной процедуры конъюгации содержат малеимид. Примеры конъюгации тиолсодержащих антител с малеимидсодержащими предшественниками показаны на Схеме 5. Предшественник, содержащий линкер малеимидометилциклогексан-1-карбоксилата (Mal-тсс), показан в части А; предшественник с мелимидным фрагментом, связанным непосредственно со спейсером ПЭГ, показан в части В.

Схема 5.

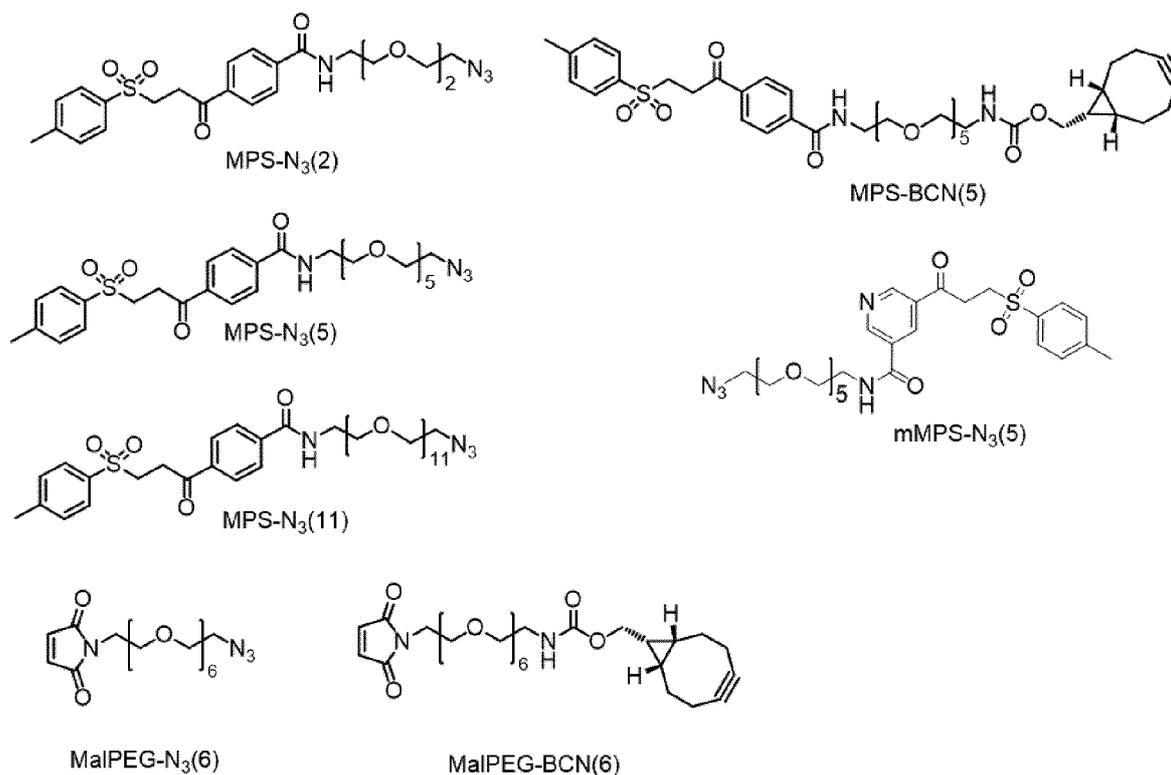


Двухстадийная процедура конъюгации

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к способам получения соединений Формулы I, которые включают двухстадийную процедуру конъюгации. Первая стадия включает конъюгацию антитела и линкера, где линкер заканчивается реакционноспособной группой, такой как азид или алкин. На второй стадии предшественник, содержащий антитело, подвергается реакции с предшественником, содержащим активный агент, с образованием конечного КАЛС.

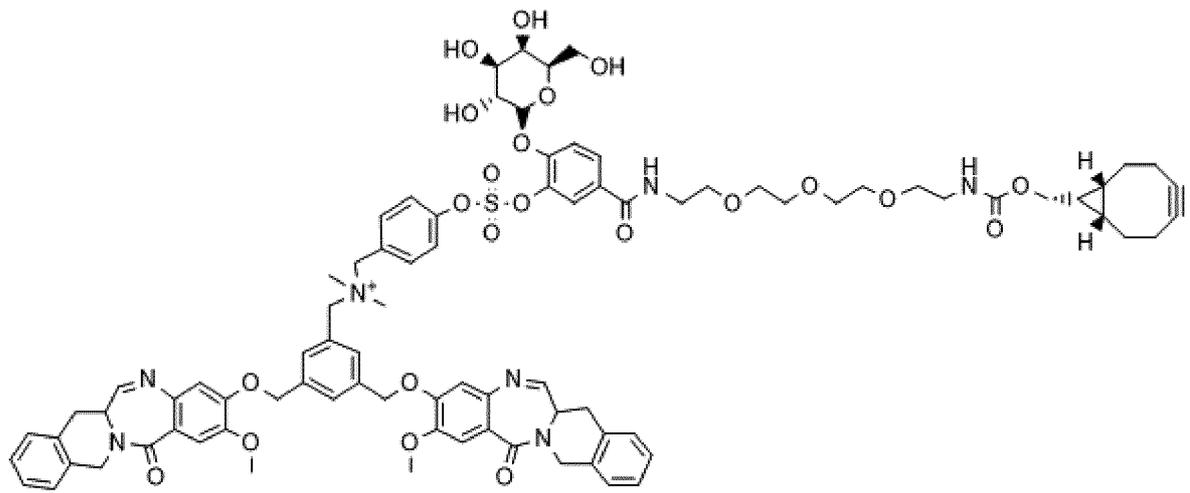
В некоторых вариантах реализации первая стадия двухстадийной процедуры включает конъюгацию антитела с предшественником, содержащим любую из реакционноспособных групп, описанных выше в разделе «Одностадийная конъюгация». Примеры предшественников для первой стадии конъюгации показаны на Схеме 6.

Схема 6.

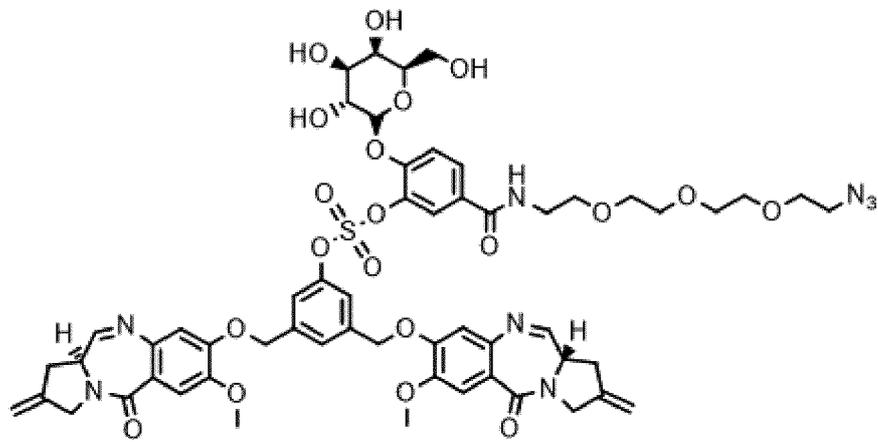


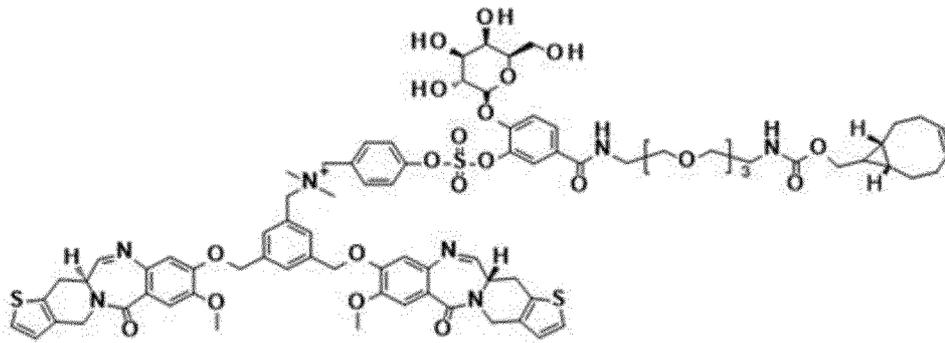
В некоторых вариантах реализации вторая стадия процедуры конъюгации включает приведение в контакт предшественника, содержащего антитело, полученного на первой стадии, с предшественником, содержащим активный агент. Предшественники, содержащие активный агент, содержат реакционноспособную группу, комплементарную реакционноспособной группе предшественника, полученного на первой стадии. Например, предшественник, содержащий антитело, имеет на конце азидную группу, и предшественник, содержащий активный агент, имеет на конце алкин, или наоборот. Примеры предшественников, содержащих активный агент, показаны на Схеме 7.

Схема 7.

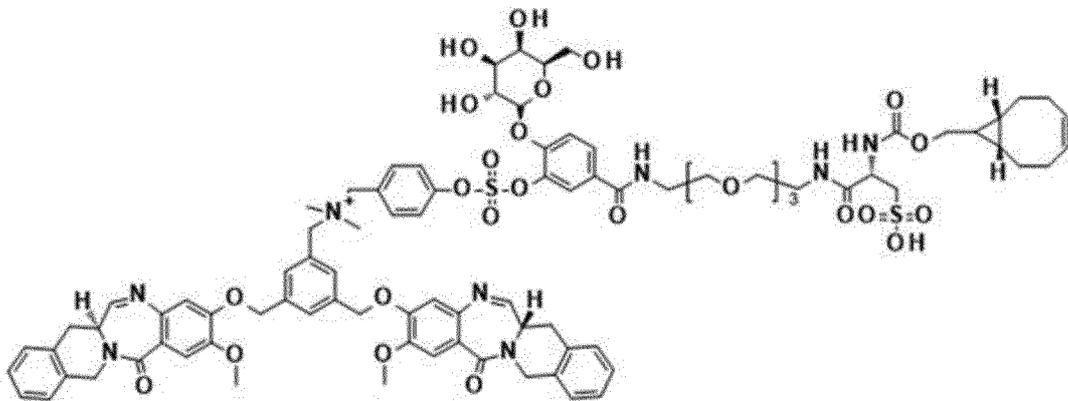
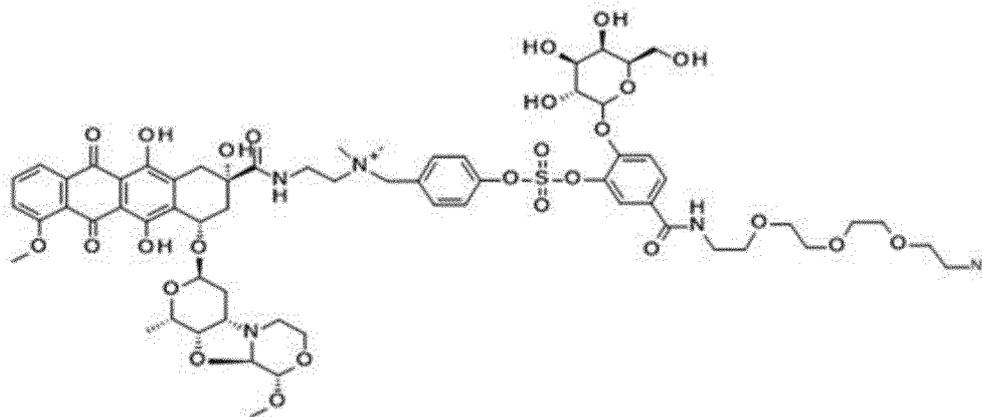


BCN-Q-dTBD(3)

N₃-dPBD(3)



BCN-Q-dThBD(3)

BCN-SO₃H-Q-dTBD(3)N₃-Q-PNU(3)

Антитела к В7-Н3

Типичные антитела к В7-Н3 включают антитела, указанные в данном документе в Таблицах 19-24, или любые их фрагменты, варианты, мультимерные версии или биспецифические формы. Аналогичным образом, антитело к В7-Н3 может представлять собой антитело или любой его фрагмент, вариант, мультимерную версию или биспецифическую форму, которая связывается с тем же эпитопом, что и антитела, перечисленные в Таблицах 19-24. Подходящие антитела к В7-Н3 по данному изобретению

включают полностью человеческие моноклональные антитела, и гуманизированные моноклональные антитела и химерные антитела или любые их фрагменты, варианты, мультимерные версии или биспецифические формы. Эти антитела проявляют специфичность в отношении В7-Н3 человека, и было показано, что они модулируют, *например*, блокируют, ингибируют, уменьшают, противодействуют, нейтрализуют или иным образом препятствуют по меньшей мере одной биологической функции или активности В7-Н3.

Считается, что антитела полностью модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, противодействуют, нейтрализуют или иным образом мешают по меньшей мере одной функциональной активности В7-Н3, когда уровень функциональной активности В7-Н3 в присутствии антитела снижается на по меньшей мере 95%, *например*, на 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с уровнем функциональной активности В7-Н3 в отсутствие связывания с описанным в данном документе антителом. Считается, что антитела частично модулируют, блокируют, ингибируют, уменьшают, противодействуют, нейтрализуют или иным образом мешают по меньшей мере одной функциональной активности В7-Н3, когда уровень функциональной активности В7-Н3 в присутствии антитела снижается на менее чем 95%, *например*, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% или 90% по сравнению с уровнем функциональной активности В7-Н3 в отсутствие связывания с описанным в данном документе антителом.

Каждое из моноклональных антител к В7-Н3 или любой их фрагмент, вариант, мультимерная версия или биспецифическая форма, описанные в данном документе, включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), как показано в аминокислотной последовательности и соответствующей ей последовательности нуклеиновых кислот, перечисленных в Таблицах 20-24.

Определения

Если иное не определено в данном документе, научные и технические термины, используемые в данной заявке, должны иметь значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. Как правило, номенклатура, используемая в связи с химией, культурой клеток и тканей, молекулярной биологией, клеточной и раковой биологией, нейробиологией, нейрохимией, вирусологией, иммунологией, микробиологией, фармакологией, генетикой и химией белков и нуклеиновых кислот, описанная в данном документе, и их методы, хорошо известны и обычно используются в данной области техники.

Способы и методики по данному изобретению обычно осуществляют, если не указано иное, в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в данном описании. См., например, "Principles of Neural Science", McGraw-Hill Medical, New York, N.Y. (2000); Motulsky, "Intuitive Biostatistics", Oxford University Press, Inc. (1995); Lodish et al., "Molecular Cell Biology, 4th ed.", W. H. Freeman & Co., New York (2000); Griffiths et al., "Introduction to Genetic Analysis, 7th ed.",

W. H. Freeman & Co., N.Y. (1999); and Gilbert et al., "Developmental Biology, 6th ed.", Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (2000).

Химические термины, используемые в данном документе, если иное не определено в данном документе, используются в соответствии с общепринятым использованием в данной области техники, как проиллюстрировано в "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms", Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco, C.A. (1985).

Все вышеперечисленное и любые другие публикации, патенты и опубликованные заявки на патенты, упомянутые в данной заявке, специально включены в данный документ посредством ссылки. В случае конфликта настоящая спецификация, включая ее конкретные определения, будет иметь преимущественную силу.

Термин «агент» используется в данном документе для обозначения химического соединения (такого как органическое или неорганическое соединение, смесь химических соединений), биологической макромолекулы (такой как нуклеиновая кислота, антитело, включая их части, и гуманизированные, химерные и антитела человека и моноклональные антитела, белок или его часть, например, пептид, липид, углевод) или экстракт, полученный из биологических материалов, таких как бактерии, растения, грибы или клетки или ткани животных (в частности, млекопитающих). К агентам относятся, например, агенты, структура которых известна, и агенты, структура которых неизвестна. Способность таких агентов ингибировать AR или способствовать деградации AR может сделать их подходящими в качестве «терапевтических агентов» в способах и композициях по данному изобретению.

Термины «пациент», «субъект» или «индивидуум» используются взаимозаменяемо и относятся либо к человеку, либо к животному, отличному от человека. Эти термины включают млекопитающих, таких как люди, приматы, домашний скот (включая крупного рогатого скота, свиней и т.д.), домашних животных (например, псовых, кошачьих и т.д.) и грызунов (например, мышей и крыс).

«Лечение» состояния или пациента относится к принятию мер для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Как используется в данном документе и как хорошо понимается в данной области, «лечение» представляет собой подход для получения полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Благоприятные или желаемые клинические результаты могут включать, помимо прочего, облегчение или улучшение одного или более симптомов или состояний, уменьшение распространенности заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, предотвращение распространения заболевания, отсрочку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), выявляемую или неопределяемую. «Лечение» также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится.

Термин «предотвращение» признан в данной области техники, и когда он используется в отношении состояния, такого как локальный рецидив (например, боль),

такого заболевания, как онкологическое заболевание, комплекса синдромов, такого как сердечная недостаточность, или любого другого медицинского состояния, хорошо изученного в данной области, и включает введение композиции, которая снижает частоту или задерживает появление симптомов заболевания у субъекта по сравнению с субъектом, который не получает композицию. Таким образом, профилактика онкологического заболевания включает, например, уменьшение количества обнаруживаемых раковых новообразований в популяции пациентов, получающих профилактическое лечение, по сравнению с контрольной популяцией, не получавшей лечения, и/или задержку появления обнаруживаемых раковых новообразований в пролеченной популяции по сравнению с необработанной контрольной популяцией, например, на статистически и/или клинически значимое количество.

«Введение» или «введение» вещества, соединения или агента субъекту может осуществляться с использованием одного из множества способов, известных специалистам в данной области техники. Например, соединение или агент можно вводить внутривенно, артериально, внутривожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно, глазно, сублингвально, перорально (путем приема внутрь), интраназально (ингаляцией), интраспинально, интрацеребрально и чрескожно (путем абсорбции, например, через кожный проток). Соединение или агент можно также соответствующим образом вводить с помощью перезаряжаемых или биоразлагаемых полимерных устройств или других устройств, например, пластырей и насосов, или составов, которые обеспечивают пролонгированное, медленное или контролируемое высвобождение соединения или агента. Введение также может быть выполнено, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или более продолжительных периодов времени.

Соответствующие способы введения вещества, соединения или агента субъекту также будут зависеть, например, от возраста и/или физического состояния субъекта, и от химических и биологических свойств соединения или агента (например, растворимость, усвояемость, биодоступность, стабильность и токсичность). В некоторых вариантах реализации соединение или агент вводят перорально, например, субъекту путем приема внутрь. В некоторых вариантах реализации перорально вводимое соединение или агент находится в составе с пролонгированным или медленным высвобождением или вводится с использованием устройства для такого пролонгированного или медленного высвобождения.

Используемая в данном документе фраза «совместное введение» относится к любой форме введения двух или более различных терапевтических средств, при которой второе средство вводят в то время, когда ранее введенное терапевтическое средство все еще эффективно в организме (например, два агента одновременно эффективны у пациента, что может включать синергетический эффект двух агентов). Например, различные терапевтические соединения можно вводить либо в одном и том же составе, либо в виде отдельных составов либо одновременно, либо последовательно. Таким образом, индивидуум, получающий такое лечение, может получить пользу от

комбинированного действия различных терапевтических агентов.

«Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или агента представляет собой количество лекарственного средства или агента, которое при введении субъекту будет иметь предполагаемый терапевтический эффект. Полный терапевтический эффект не обязательно достигается при введении одной дозы и может проявляться только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически эффективное количество можно вводить за один или более приемов. Точное эффективное количество, необходимое субъекту, будет зависеть, например, от размера, состояния здоровья и возраста субъекта, и от характера и степени состояния, подлежащего лечению, такого как рак или MDS. Квалифицированный специалист может легко определить эффективное количество для данной ситуации с помощью рутинных экспериментов.

Используемые в данном документе термины «необязательный» или «необязательно» означают, что описанное впоследствии событие или обстоятельство может произойти или не произойти, и что описание включает случаи, когда событие или обстоятельство имеет место, и случаи, когда они не происходят. Например, «необязательно замещенный алкил» относится к алкилу, который может быть замещен, и к незамещенному алкилу.

Понятно, что заместители и схемы замещения в соединениях по данному изобретению могут быть выбраны обычным специалистом в данной области техники с получением химически стабильных соединений, которые можно легко синтезировать способами, известными в данной области техники, и способами, установленными далее ниже, из легкодоступных исходных материалов. Если заместитель сам замещен более чем одной группой, подразумевается, что эти несколько групп могут находиться на одном и том же атоме углерода или на разных атомах углерода при условии, что в результате получается стабильная структура.

Используемый в данном документе термин «необязательно замещенный» относится к замещению от одного до шести атомов водорода в данной структуре определенным заместителем, включая, но не ограничиваясь этим: гидроксил, гидроксилалкил, алкокси, галоген, алкил, нитро, силлил, ацил, ацилокси, арил, циклоалкил, гетероциклил, amino, aminoалкил, циано, галогеналкил, галогеналкокси, -OSO-CH₂-O-алкил, -OP(O)(O-алкил)₂ или -CH₂-OP(O)(O-алкил)₂. Предпочтительно «необязательно замещенный» относится к замещению от одного до четырех атомов водорода в данной структуре заместителями, упомянутыми выше. Более предпочтительно от одного до трех водородных заместителей заменены заместителями, как указано выше. Понятно, что заместитель может быть дополнительно замещен.

Используемый в данном документе термин «алкил» относится к насыщенным алифатическим группам, включая, но не ограничиваясь ими, C₁-C₁₀ алкильные группы с прямой цепью или C₁-C₁₀ алкильные группы с разветвленной цепью. Предпочтительно "алкильная" группа относится к C₁-C₆ алкильным группам с прямой цепью или C₁-C₆

алкильным группам с разветвленной цепью. Наиболее предпочтительно "алкильная" группа относится к C_1 - C_4 алкильным группам с прямой цепью или C_1 - C_4 алкильным группам с разветвленной цепью. Примеры «алкила» включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, 1-пропил, 2-пропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, 1-пентил, 2-пентил, 3-пентил, нео-пентил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, 1-гептил, 2-гептил, 3-гептил, 4-гептил, 1-октил, 2-октил, 3-октил или 4-октил и т.п. Группа «алкил» может быть необязательно замещена.

Термин «ацил» известен специалистам и относится к группе, представленной общей формулой гидрокарбил- $C(O)$ -, предпочтительно алкил $C(O)$ -.

Термин «ациламино» известен специалистам и относится к аминогруппе, замещенной ацильной группой, и может быть представлен, например, формулой гидрокарбил $C(O)NH$ -.

Термин «ацилокси» известен специалистам и относится к группе, представленной общей формулой гидрокарбил- $C(O)O$ -, предпочтительно алкил $C(O)O$ -.

Термин «алкокси» относится к алкильной группе, к которой присоединен кислород. Типичные алкоксигруппы включают метокси, этокси, пропокси, трет-бутокси и т.п.

Термин «алкоксиалкил» относится к алкильной группе, замещенной алкоксигруппой, и может быть представлен общей формулой алкил- O -алкил.

Термин «алкил» относится к насыщенным алифатическим группам, включая алкильные группы с прямой цепью, алкильные группы с разветвленной цепью, циклоалкильные (алициклические) группы, алкилзамещенные циклоалкильные группы и циклоалкилзамещенные алкильные группы. В предпочтительных вариантах реализации алкил с прямой или разветвленной цепью имеет 30 или меньше атомов углерода в своей основной цепи (например, C_{1-30} для прямых цепей, C_{3-30} для разветвленных цепей), и более предпочтительно 20 или меньше.

Кроме того, термин «алкил», используемый в описании, примерах и формуле изобретения, включает как незамещенные, так и замещенные алкильные группы, последняя из которых относится к алкильным остаткам, имеющим заместители, замещающие водород на одном или более атомах углерода углеводородной цепи, включая галогеналкильные группы, такие как трифторметил и 2,2,2-трифторэтил, и т.д.

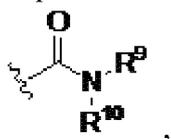
Термин « C_{xy} » или « C_x-C_y », когда он используется в сочетании с химическим фрагментом, таким как ацил, ацилокси, алкил, алкенил, алкинил или алкокси, включает группы, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи. C_0 алкил указывает на водород, где группа находится в концевом положении, связь, если она внутренняя. C_{1-6} алкильная группа, например, содержит от одного до шести атомов углерода в цепи.

Термин «алкиламино», используемый в данном документе, относится к аминогруппе, замещенной по меньшей мере одной алкильной группой.

Термин «алкилтио», используемый в данном документе, относится к тиоловой группе, замещенной алкильной группой, и может быть представлен общей формулой

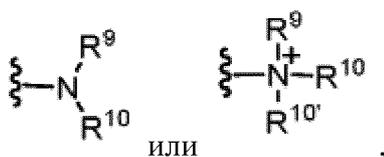
алкилS-

Термин «амид», используемый в данном документе, относится к группе



где каждый из R^9 и R^{10} независимо представляет собой водород или гидрокарбильную группу, или R^9 и R^{10} , взятые вместе с атомом N, к которому они присоединены, образуют гетероцикл, содержащий от 4 до 8 атомов в кольцевой структуре.

Термины «амин» и «амино» известны в данной области техники и относятся как к незамещенным, так и к замещенным аминам и их солям, например, фрагменту, который может быть представлен



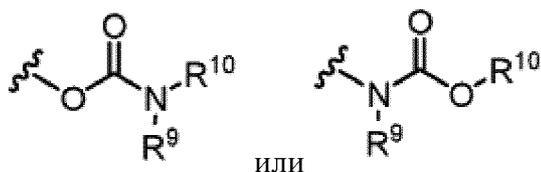
где R^9 , R^{10} и R^{10} , каждый независимо представляет собой водород или гидрокарбильную группу, или R^9 и R^{10} вместе с атомом N, к которому они присоединены, составляют гетероцикл, содержащий от 4 до 8 атомов в кольце структуры.

Термин «аминоалкил», используемый в данном документе, относится к алкильной группе, замещенной аминогруппой.

Термин «аралкил», используемый в данном документе, относится к алкильной группе, замещенной арильной группой.

Используемый в данном документе термин «арил» включает замещенные или незамещенные ароматические группы с одним кольцом, в которых каждый атом кольца представляет собой углерод. Предпочтительно кольцо представляет собой 5-7-членное кольцо, более предпочтительно 6-членное кольцо. Термин «арил» также включает полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец, где по крайней мере одно из колец является ароматическим, например, другие циклические кольца могут быть циклоалкилами, циклоалкенилами, циклоалкинилами, арилами, гетероарилами и/или гетероциклами. Арильные группы включают бензол, нафталин, фенантрен, фенол, анилин и т.п.

Термин «карбамат» признан в области техники и относится к группе



где R^9 и R^{10} независимо представляют собой водород или гидрокарбильную группу.

Термин «карбоциклилалкил», используемый в данном документе, относится к

алкильной группе, замещенной карбоциклической группой.

Термин «карбоцикл» включает 5-7-членные моноциклические и 8-12-членные бициклические кольца. Каждое кольцо бициклического карбоцикла может быть выбрано из насыщенных, ненасыщенных и ароматических колец. Карбоцикл включает бициклические молекулы, в которых один, два или три или более атомов являются общими для двух колец. Термин «конденсированный карбоцикл» относится к бициклическому карбоциклу, в котором каждое из колец имеет два общих атома с другим кольцом. Каждое кольцо конденсированного карбоцикла может быть выбрано из насыщенных, ненасыщенных и ароматических колец. В типичном варианте реализации ароматическое кольцо, например, фенил, может быть конденсировано с насыщенным или ненасыщенным кольцом, например, циклогексаном, цикlopентаном или циклогексенom. Любая комбинация насыщенных, ненасыщенных и ароматических бициклических колец, если позволяет валентность, включается в определение карбоциклический. Примеры «карбоциклов» включают цикlopентан, циклогексан, бицикло[2,2,1]гептан, 1,5-циклооктадиен, 1,2,3,4-тетрагидронафталин, бицикло[4,2,0]окт-3-ен, нафталин и адамантан. Примеры конденсированных карбоциклов включают декалин, нафталин, 1,2,3,4-тетрагидронафталин, бицикло[4,2,0]октан, 4,5,6,7-тетрагидро-1H-инден и бицикло[4,1,0]гепт-3-эн. «Карбоциклы» могут быть замещены в любом одном или более положениях, способных нести атом водорода.

Термин «карбоциклилалкил», используемый в данном документе, относится к алкильной группе, замещенной карбоциклической группой.

Термин «карбонат» известен специалистам в данной области техники и относится к группе- OCO_2 -.

Используемый в данном документе термин «карбоксил» относится к группе, представленной формулой- CO_2H .

Используемый в данном документе термин «эфир» относится к группе- $\text{C}(\text{O})\text{OR}^9$, где R^9 представляет собой гидрокарбильную группу.

Используемый в данном документе термин «эфир» относится к гидрокарбильной группе, связанной через атом кислорода с другой гидрокарбильной группой. Соответственно, эфирный заместитель гидрокарбильной группы может представлять собой гидрокарбил-О-. Эфиры могут быть как симметричными, так и несимметричными. Примеры простых эфиров включают, но не ограничиваются ими, гетероцикл-О-гетероцикл и арил-О-гетероцикл. Простые эфиры включают «алкоксиалкильные» группы, которые могут быть представлены общей формулой алкил-О-алкил.

Используемые в данном документе термины «галоген» и «галоген» означают галоген и включают хлор, фтор, бром и йод.

Термины «гетаралкил» и «гетероаралкил», используемые в данном документе, относятся к алкильной группе, замещенной гетарильной группой.

Термины «гетероарил» и «гетарил» включают замещенные или незамещенные ароматические одинарные кольцевые структуры, предпочтительно 5-7-членные кольца,

более предпочтительно 5-6-членные кольца, чьи кольцевые структуры включают по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно от одного до четырех гетероатомов, более предпочтительно один или два гетероатома. Термины «гетероарил» и «гетарил» также включают полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец, где по крайней мере одно из колец является гетероароматическим, например, другие циклические кольца могут быть циклоалкилами, циклоалкенилами, циклоалкинилами, арилами, гетероарилами и/или гетероциклами. Гетероарильные группы включают, например, пиррол, фуран, тиофен, имидазол, оксазол, тиазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиридазин и пиримидин и т.п.

Используемый в данном документе термин «гетероатом» означает атом любого элемента, отличного от углерода или водорода. Предпочтительными гетероатомами являются азот, кислород и сера.

Термин «гетероциклалкил», используемый в данном документе, относится к алкильной группе, замещенной гетероциклической группой.

Термины «гетероцикл», «гетероцикл» и «гетероциклический» относятся к замещенным или незамещенным неароматическим кольцевым структурам, предпочтительно 3-10-членным кольцам, более предпочтительно 3-7-членным кольцам, чьи кольцевые структуры включают по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно от одного до четырех гетероатомов, более предпочтительно один или два гетероатома. Термины «гетероциклалкил» и «гетероциклический» также включают полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических кольца, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец, где по крайней мере одно из колец является гетероциклическим, например, другие циклические кольца могут быть циклоалкилами, циклоалкенилами, циклоалкинилами, арилами, гетероарилами и/или гетероциклами. Гетероциклильные группы включают, например, пиперидин, пиперазин, пирролидин, морфолин, лактоны, лактамы и т.п.

Термин «гидрокарбил», используемый в данном документе, относится к группе, которая связана через атом углерода, который не имеет заместителя =O или =S, и обычно имеет по меньшей мере одну углерод-водородную связь и преимущественно углеродную основную цепь, но может необязательно включать гетероатомы. Таким образом, такие группы, как метил, этоксиэтил, 2-пиридил и даже трифторметил, считаются гидрокарбилами для целей данной заявки, но такие заместители, как ацетил (который имеет заместитель =O на связывающем углероде) и этокси (который связан через кислород, и не углерод) не являются. Гидрокарбильные группы включают, но не ограничиваются ими, арил, гетероарил, карбоцикл, гетероцикл, алкил, алкенил, алкинил и их комбинации.

Термин «гидроксиалкил», используемый в данном документе, относится к алкильной группе, замещенной гидроксильной группой.

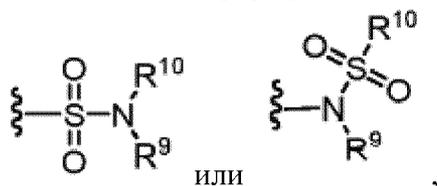
Термин «низший» при использовании в сочетании с химическим фрагментом,

таким как ацил, ацилокси, алкил, алкенил, алкинил или алкокси, включает группы, в которых в заместителе десять или меньше атомов, предпочтительно шесть или меньше. Например, «низший алкил» относится к алкильной группе, которая содержит десять или меньше атомов углерода, предпочтительно шесть или меньше. В некоторых вариантах реализации ацил, ацилокси, алкил, алкенил, алкинил или алкокси заместители, определенные в данном документе, представляют собой, соответственно, низший ацил, низший ацилокси, низший алкил, низший алкенил, низший алкинил или низший алкокси, независимо от того, появляются ли они отдельно или в комбинации с другими заместителями, например, в перечислениях гидроксикал и аралкил (в этом случае, например, атомы в арильной группе не учитываются при подсчете атомов углерода в алкильном заместителе).

Термины «полицикл», «полицикл» и «полициклический» относятся к двум или более кольцам (например, циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклы), в которых два или более атомов являются общими для двух соседних колец, например, кольца представляют собой «конденсированные кольца». Каждое из колец полицикла может быть замещенным или незамещенным. В некоторых вариантах реализации каждое кольцо полицикла содержит от 3 до 10 атомов в кольце, предпочтительно от 5 до 7.

Термин «сульфат» известен в данной области техники и относится к группе OSO_3H или ее фармацевтически приемлемой соли.

Термин «сульфонамид» признан в данной области техники и относится к группе, представленной общей формулой



где R^9 и R^{10} независимо представляют собой водород или гидрокарбил.

Термин «сульфоксид» известен специалистам и относится к группе $-S(O)-$.

Термин «сульфонат» известен в данной области техники и относится к группе SO_3H или ее фармацевтически приемлемой соли.

Термин «сульфон» известен в данной области техники и относится к группе $-S(O)_2-$.

Термин «замещенный» относится к фрагментам, имеющим заместители, замещающие водород на одном или более атомах углерода основной цепи. Следует понимать, что «замещение» или «замещено» включает неявное условие, что такое замещение соответствует допустимой валентности замещенного атома и заместителя, и что замещение приводит к стабильному соединению, например, которое самопроизвольно не подвергается трансформации, такой как перегруппировка, циклизация, элиминирование и т. д. Предполагается, что используемый в данном документе термин «замещенный» включает все допустимые заместители органических соединений. В

широком аспекте допустимые заместители включают ациклические и циклические, разветвленные и неразветвленные, карбоциклические и гетероциклические, ароматические и неароматические заместители органических соединений. Допустимые заместители могут быть одним или более и одинаковыми или разными для соответствующих органических соединений. Для целей настоящего изобретения гетероатомы, такие как азот, могут иметь водородные заместители и/или любые допустимые заместители органических соединений, описанных в данном документе, которые удовлетворяют валентности гетероатомов. Заместители могут включать любые заместители, описанные в данном документе, например, галоген, гидроксил, карбонил (такой как карбоксил, алкоксикарбонил, формил или ацил), тиокарбонил (такой как тиоэфир, тиоацетат или тиоформиат), алкокси, фосфорил, фосфат, фосфонат, фосфинат, амино, амидо, амидин, имин, циано, нитро, азидо, сульфгидрил, алкилтио, сульфат, сульфонат, сульфоамид, сульфоамидо, сульфонил, гетероциклил, аралкил или ароматический или гетероароматический фрагмент. Специалистам в данной области должно быть понятно, что фрагменты, замещенные в углеводородной цепи, сами могут быть замещены, если это целесообразно.

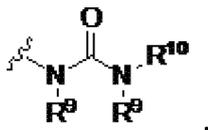
Термин «тиоалкил», используемый в данном документе, относится к алкильной группе, замещенной тиольной группой.

Используемый в данном документе термин «тиоэфир» относится к группе $-C(O)SR^9$ или $-SC(O)R^9$

где R^9 представляет собой гидрокарбил.

Используемый в данном документе термин «тиоэфир» эквивалентен простому эфиру, в котором кислород заменен серой.

Термин «мочевина» признан в данной области техники и может быть представлен общей формулой



где R^9 и R^{10} независимо представляют собой водород или гидрокарбил.

Используемый в данном документе термин «модулировать» включает ингибирование или подавление функции или активности (такой как пролиферация клеток), и усиление функции или активности.

«Фармацевтически приемлемая соль» или «соль» используются в данном документе для обозначения кислотно-аддитивной соли или щелочно-аддитивной соли, которая подходит или совместима с лечением пациентов.

Термин «фармацевтически приемлемая кислотно-аддитивная соль», используемый в данном документе, означает любую нетоксичную органическую или неорганическую соль любых основных соединений, представленных Формулой I. Иллюстративные неорганические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают хлористоводородную, бромистоводородную, серную и фосфорную кислоты, и соли

металлов, такие как моногидроортофосфат натрия и гидросульфат калия. Примеры органических кислот, которые образуют подходящие соли, включают моно-, ди- и трикарбоновые кислоты, такие как гликолевая, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, глутаровая, фумаровая, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, малеиновая, бензойная, фенилуксусная, коричная и салициловая кислоты, и сульфокислоты, такие как п-толуолсульфокислоты и метансульфокислоты. Могут быть образованы либо моно-, либо двухкислотные соли, и такие соли могут существовать либо в гидратированной, сольватированной, либо практически в безводной форме. Как правило, кислотно-аддитивные соли соединений Формулы I более растворимы в воде и различных гидрофильных органических растворителях и обычно демонстрируют более высокие точки плавления по сравнению с их формами свободного основания. Выбор подходящей соли известен специалисту в данной области техники. Другие нефармацевтически приемлемые соли, например оксалаты, можно использовать, например, при выделении соединений Формулы I для лабораторного применения или для последующего превращения в фармацевтически приемлемую кислотно-аддитивную соль.

Термин «фармацевтически приемлемая основно-аддитивная соль», используемый в данном документе, означает любую нетоксичную органическую или неорганическую основно-аддитивную соль любых кислотных соединений, представленных Формулой I, или любых их промежуточных соединений. Примеры неорганических оснований, которые образуют подходящие соли, включают литий, натрий, калий, кальций, магний или гидроксид бария. Примеры органических оснований, которые образуют подходящие соли, включают алифатические, алициклические или ароматические органические амины, такие как метиламин, триметиламин и пиколин или аммиак. Выбор подходящей соли будет известен специалисту в данной области техники.

Многие из соединений, используемых в способах и композициях по данному описанию, имеют в своей структуре по меньшей мере один стереогенный центр. Этот стереогенный центр может присутствовать в конфигурации R или S, указанные обозначения R и S используются в соответствии с правилами, описанными в *Pure Appl. Chem.* (1976), 45, 11-30. В описании рассматриваются все стереоизомерные формы, такие как энантиомерные и диастереоизомерные формы соединений, солей, пролекарств или их смесей (включая все возможные смеси стереоизомеров). См., например, WO 01/062726.

В некоторых вариантах реализации соединения по данному изобретению могут быть рацемическими. В некоторых вариантах реализации соединения по данному изобретению могут быть обогащены одним энантиомером. Например, соединение по данному изобретению может иметь более чем около 30% ee, 40% ee, 50% ee, 60% ee, 70% ee, 80% ee, 90% ee, 95%, 96% ee, 97% ee, 98% ee, 99% ee или выше ee.

Как обычно понимают в данной области техники, одинарные связи, проведенные без стереохимии, не указывают на стереохимию соединения. Соединение Формулы I представляет собой пример соединения, для которого не указана стереохимия.

В некоторых вариантах реализации композиция или соединение по данному

изобретению могут быть обогащены для получения преимущественно одного энантиомера соединения. Обогащенная энантиомерами композиция или соединение может содержать, например, по меньшей мере 60 мольных процентов одного энантиомера или, более предпочтительно, по меньшей мере 75, 90, 95 или даже 99 мольных процентов. В некоторых вариантах реализации соединение, обогащенное одним энантиомером, по существу не содержит другого энантиомера, где «существенно свободное» означает, что рассматриваемое вещество составляет менее 10%, или менее 5%, или менее 4%, или менее 3%, или менее 2%, или менее 1% по сравнению с количеством другого энантиомера, *например*, в композиции или смеси соединений. Например, если композиция или соединение содержит 98 граммов первого энантиомера и 2 грамма второго энантиомера, можно сказать, что они содержат 98 мольных процентов первого энантиомера и только 2 мольных процента второго энантиомера.

Кроме того, некоторые соединения, содержащие алкенильные группы, могут существовать в виде изомеров Z (zusammen) или E (entgegen). В каждом случае описание включает как смесь, так и отдельные индивидуальные изомеры.

Некоторые из соединений могут также существовать в таутомерных формах. Такие формы, хотя и не указанные явно в формулах, описанных в данном документе, предназначены для включения в объем настоящего изобретения.

«Пролекарство» или «фармацевтически приемлемое пролекарство» относится к соединению, которое метаболизируется, например, гидролизуется или окисляется в организме хозяина после введения с образованием соединения по данному изобретению (например, соединений формулы I). Типичные примеры пролекарств включают соединения, которые имеют биологически лабильные или отщепляемые (защитные) группы на функциональной части активного соединения. Пролекарства включают соединения, которые можно окислять, восстанавливать, аминировать, дезаминировать, гидроксिलировать, дегидроксिलировать, гидролизовать, дегидролизовать, алкилировать, деалкилировать, ацилировать, деацилировать, фосфорилировать или дефосфорилировать с получением активного соединения. Примеры пролекарств, использующих сложный эфир или фосфорамидат в качестве биологически лабильных или отщепляемых (защитных) групп, раскрыты в патентах США 6875751, 7585851 и 7964580, описание которых включено в данный документ посредством ссылки. Пролекарства по данному изобретению метаболизируются с образованием соединения Формулы I. Настоящее изобретение включает в себя пролекарства соединений, описанных в данном документе. Обычные процедуры выбора и получения подходящих пролекарств описаны, например, в “Design of Prodrugs” Ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Используемый в данном документе термин «логарифм растворимости», «логарифм S» или «log S» используется в данной области техники для количественного определения растворимости соединения в воде. Растворимость соединения в воде существенно влияет на характеристики его абсорбции и распределения. Низкая растворимость часто сочетается с плохой абсорбцией. Значение LogS представляет собой без единицы

измерения логарифм (по основанию 10) растворимости, измеренной в моль/литр.

Общий способ получения антител

Различные процедуры, известные в данной области, могут быть использованы для получения поликлональных или моноклональных антител, направленных против данной мишени, такой как, например, B7-H3, опухолеассоциированный антиген или другая мишень, или против производных, фрагментов, аналогов, гомологов или их ортологов. (См., например, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, включен в данный документ в качестве ссылки).

Антитела могут быть очищены с помощью хорошо известных способов, таких как аффинная хроматография с использованием протеина А или протеина G, которые в первую очередь обеспечивают фракцию IgG иммунной сыворотки. Впоследствии или альтернативно специфический антиген, который является мишенью искомого иммуноглобулина, или его эпитоп можно иммобилизовать на колонке для очистки иммуноспецифического антитела с помощью иммуноаффинной хроматографии. Очистка иммуноглобулинов обсуждается, например, D. Wilkinson (*The Scientist*, опубликовано The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

В некоторых вариантах реализации антитела по данному изобретению представляют собой моноклональные антитела. Моноклональные антитела получают, например, с использованием процедур, изложенных в приведенных в данном документе примерах. Антитела получают, например, путем иммунизации мышей BALB/c комбинациями клеточных трансфектантов, экспрессирующих высокие уровни данной мишени на своей поверхности. Гибридомы, полученные в результате слияния миеломы/B-клеток, затем подвергают скринингу на реактивность по отношению к выбранной мишени.

Моноклональные антитела получают, например, с использованием гибридомных методов, таких как способы, описанные Kohler и Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). В гибридном методе мышь, хомяк или другое подходящее животное-хозяин обычно иммунизируют иммунизирующим агентом для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с иммунизирующим агентом. Альтернативно, лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*.

Иммунизирующий агент обычно будет включать белковый антиген, его фрагмент или его слитый белок. Как правило, используют либо лимфоциты периферической крови, если желательны клетки человеческого происхождения, либо клетки селезенки или клетки лимфатических узлов, если желательны источники млекопитающих, отличных от человека. Затем лимфоциты сливают с иммортализованной клеточной линией с использованием подходящего агента для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридной клетки (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Иммортализованные клеточные линии обычно

представляют собой трансформированные клетки млекопитающих, особенно клетки миеломы грызунов, крупного рогатого скота и человека. Обычно используют клеточные линии миеломы крыс или мышей. Клетки гибридомы можно культивировать в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, ингибирующих рост или выживание неслитых иммортализованных клеток. Например, если в родительских клетках отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом обычно будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин («среда НАТ»), эти вещества предотвращают рост HGPRT- дефицитных клеток.

Предпочтительными иммортализованными клеточными линиями являются те, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильно высокий уровень экспрессии антител выбранных клеток, продуцирующих антитела, и чувствительны к среде, такой как среда НАТ. Более предпочтительными иммортализованными клеточными линиями являются линии миеломы мыши, которые могут быть получены, например, из Центра распределения клеток Института Солка, Сан-Диего, Калифорния, и из Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния. Клеточные линии миеломы человека и мышино-человеческой гетеромиеломы также были описаны для продукции моноклональных антител. (См. Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).

Культуральную среду, в которой культивируют клетки гибридомы, можно затем проанализировать на наличие моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют с помощью иммуноосаждения или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Такие методики и анализы известны в данной области техники. Аффинность связывания моноклонального антитела можно, например, определить с помощью анализа Скэтчарда Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980). Более того, при терапевтическом применении моноклональных антител важно идентифицировать антитела, обладающие высокой степенью специфичности и высокой аффинностью связывания с антигеном-мишенью.

После идентификации нужных гибридомных клеток клоны можно субклонировать с помощью процедур лимитирующих разведений и выращивать стандартными способами. (См. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Подходящие для этой цели питательные среды включают, например, среду Игла, модифицированную Дульбекко, и среду RPMI-1640. Альтернативно, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде асцита у млекопитающего.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, могут быть выделены или очищены из культуральной среды или асцитной жидкости с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, протеин А-сефароза, хроматография на

гидроксилпатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

Моноклональные антитела могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, такими как способы, описанные в патенте США № 4816567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела по данному изобретению, может быть легко выделена и секвенирована с использованием обычных процедур (*например*, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Гибридомные клетки по данному изобретению служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК можно поместить в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как обезьяньи COS-клетки, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, для получения синтеза моноклонального антитела в рекомбинантных клетках-хозяевах. ДНК также можно модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательности константных доменов тяжелой и легкой цепи человека на гомологичные мышинные последовательности (см. патент США № 4816567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) или путем ковалентного присоединения к кодирующей иммуноглобулин последовательности всей или части кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида. Такой неиммуноглобулиновый полипептид может быть заменен на константные домены антитела по данному изобретению или может быть заменен на переменные домены одного антигенсвязывающего сайта антитела по данному изобретению для создания химерного двухвалентного антитела.

Моноклональные антитела по данному изобретению включают гуманизированные антитела или антитела человека. Эти антитела подходят для введения людям, не вызывая у человека иммунного ответа против введенного иммуноглобулина. Гуманизированные формы антител представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые в основном состоят из последовательности иммуноглобулина человека, и содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизация осуществляется, *например*, по методу Винтера с сотрудниками (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), путем замены CDR грызунов или последовательностей CDR на соответствующие последовательности человеческого антитела. (См. также патент США № 5225539). В некоторых случаях каркасные остатки Fv человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Гуманизированные антитела содержат, *например*, остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированных CDR или каркасных последовательностях. Как правило, гуманизированное антитело включает по существу все, по меньшей мере один, и обычно два переменных домена, в которых все или по существу все области CDR соответствуют участкам CDR нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все каркасные

области являются консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизованное антитело оптимально также включает по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно часть иммуноглобулина человека (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

Полностью антитела человека представляют собой молекулы антител, в которых вся последовательность как легкой цепи, так и тяжелой цепи, включая CDR, возникает из генов человека. Такие антитела в данном документе называются «человеческими антителами» или «полностью человеческими антителами». Моноклональные антитела можно получить, используя методику триомы; метод гибридомы В-клеток человека (*см. Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72*); и метод гибридомы EBV для получения моноклональных антител (*см. Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96*). Моноклональные антитела могут быть использованы и могут быть получены с использованием гибридом человека (*см. Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030*) или путем трансформации В-клеток человека вирусом Эпштейна-Барра *in vitro* (*см. Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96*).

Кроме того, антитела человека могут быть получены с использованием дополнительных технологий, включая библиотеки фагового дисплея. (*См. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)*). Подобным образом антитела человека могут быть получены путем введения локусов иммуноглобулина человека трансгенным животным, *например*, мышам, у которых частично или полностью инактивированы эндогенные гены иммуноглобулина. При контрольном заражении наблюдается продукция антител человека, которая во всех отношениях очень похожа на таковую у людей, включая перестройку генов, сборку и репертуар антител. Этот подход описан, например, в патентах США № 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5661016, и в Marks et al., *Bio/Technology 10, 779-783 (1992)*; Lonberg et al., *Nature 368 856-859 (1994)*; Morrison, *Nature 368, 812-13 (1994)*; Fishwild et al., *Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996)*; Neuberger, *Nature Biotechnology 14, 826 (1996)*; и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)*.

Антитела человека могут быть дополнительно получены с использованием трансгенных животных, отличных от человека, которые модифицированы таким образом, чтобы продуцировать полностью человеческие антитела, и не эндогенные антитела животного в ответ на контрольное воздействие антигеном. (*См. публикацию PCT WO 94/02602*). Эндогенные гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина в нечеловеческом хозяине, были выведены из строя, и активные локусы, кодирующие тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина человека, вставлены в геном хозяина. Гены человека встраиваются, например, с использованием искусственных хромосом дрожжей, содержащих необходимые сегменты ДНК человека. Животное, которое обеспечивает все желаемые модификации, затем получают в качестве потомства путем скрещивания промежуточных трансгенных животных, содержащих менее чем полный набор

модификаций. Примером такого животного, отличного от человека, является мышь, названная XenomouseTM, как описано в публикациях РСТ WO 96/33735 и WO 96/34096. Это животное продуцирует В-клетки, которые секретируют полностью человеческие иммуноглобулины. Антитела могут быть получены непосредственно от животного после иммунизации представляющим интерес иммуногеном, таким как, например, препарат поликлонального антитела, или альтернативно из иммортализованных В-клеток, полученных от животного, таких как гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела. Кроме того, гены, кодирующие иммуноглобулины с переменными областями человека, могут быть выделены и экспрессированы для непосредственного получения антител или могут быть дополнительно модифицированы для получения аналогов антител, таких как, например, молекулы одноцепочечного Fv (scFv).

Пример способа получения хозяина, отличного от человека, представленного мышью, у которого отсутствует экспрессия тяжелой цепи эндогенного иммуноглобулина, раскрыт в патенте США № 5939598. Его можно получить способом, который включает удаление генов J-сегмента по крайней мере из одного эндогенного локуса тяжелой цепи в эмбриональной стволовой клетке для предотвращения перестройки локуса и предотвращения образования транскрипта реаранжированного локуса тяжелой цепи иммуноглобулина, делецию осуществляют вектором-мишенью, содержащим ген, кодирующий селективируемый маркер; и получение из эмбриональной стволовой клетки трансгенной мыши, соматических и зародышевых клеток, которые содержат ген, кодирующий селективируемый маркер.

Один способ получения представляющего интерес антитела, такого как антитело человека, раскрыт в патенте США № 5916771. Этот способ включает введение вектора экспрессии, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь, в одну клетку-хозяина млекопитающего в культуре, введение вектора экспрессии, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь, в другую клетку-хозяина млекопитающего и слияние двух клеток с образованием гибридной клетки. Гибридная клетка экспрессирует антитело, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь.

В качестве дополнительного усовершенствования этой процедуры в публикации США 2003/009212 раскрыты способ идентификации клинически значимого эпитопа на иммуногене и корреляционный способ выбора антитела, которое специфически связывается с соответствующим эпитопом с высокой аффинностью.

Антитело может быть экспрессировано вектором, содержащим сегмент ДНК, кодирующий описанное выше одноцепочечное антитело.

Они могут включать векторы, липосомы, голую ДНК, ДНК с адьювантом, генную пушку, катетеры и *т.д.* Векторы включают химические конъюгаты, такие как описанные в WO 93/64701, которые имеют направляющую часть (*например*, лиганд к рецептору клеточной поверхности) и часть, связывающую нуклеиновую кислоту (*например*, полилизин), вирусный вектор (*например*, ДНК или РНК вирусный вектор), слитые белки,

такие как описанные в патенте США № 7186697, который представляет собой слитый белок, содержащий молекулу-мишень (*например*, антитело, специфичное в отношении клетки-мишени) и часть, связывающую нуклеиновую кислоту (*например*, протамин), плазмиды, фаги и др. Векторы могут быть хромосомными, нехромосомными или синтетическими.

Предпочтительные векторы включают вирусные векторы, слитые белки и химические конъюгаты. Ретровирусные векторы включают вирусы мышиноного лейкоза Молони. ДНК-вирусные векторы являются предпочтительными. Эти векторы включают векторы на основе оспы, такие как ортопокс- или авипокс-векторы, векторы на основе герпесвируса, такие как вектор вируса простого герпеса I (HSV) (*см.* Geller, A. I. et al., *J. Neurochem*, 64:487 (1995); Lim, F., et al., in *DNA Cloning: Mammalian Systems*, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., *Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A.* 90:7603 (1993); Geller, A. I., et al., *Proc Natl. Acad. Sci USA* 87:1149 (1990), аденовирусные векторы (*см.* LeGal LaSalle et al., *Science*, 259:988 (1993); Davidson, et al., *Nat. Genet* 3:219 (1993); Yang, et al., *J. Virol.* 69:2004 (1995) и аденоассоциированные вирусные векторы (*см.* Kaplitt, M. G. et al., *Nat. Genet.* 8:148 (1994).

Вирусные векторы на основе оспы вводят ген в цитоплазму клеток. Вирусные векторы авипокс вызывают лишь кратковременную экспрессию нуклеиновой кислоты. Аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса (HSV) предпочтительны для введения нуклеиновой кислоты в нервные клетки. Аденовирусный вектор приводит к более короткому времени экспрессии (около 2 месяцев), чем аденоассоциированный вирус (около 4 месяцев), который, в свою очередь, короче, чем векторы на основе ВПГ. Конкретный выбранный вектор будет зависеть от клетки-мишени и подлежащего лечению состояния. Введение может осуществляться стандартными способами, *например*, инфекцией, трансфекцией, трансдукцией или трансформацией. Примеры способов переноса генов включают, *например*, голую ДНК, осаждение CaPO_4 , декстран DEAE, электропорацию, слияние протопластов, липофекцию, микроинъекцию клеток и вирусные векторы.

Вектор можно использовать для нацеливания по существу на любую желаемую клетку-мишень. Например, можно использовать стереотаксическую инъекцию для направления векторов (*например*, аденовируса, ВПГ) в нужное место. Кроме того, частицы могут быть доставлены путем интрацеребровентрикулярной (icv) инфузии с использованием миниасосной инфузионной системы, такой как SynchronMed Infusion System. Способ, основанный на объемном потоке, называемый конвекцией, также доказал свою эффективность при доставке больших молекул в расширенные области мозга и может быть полезен для доставки вектора в клетку-мишень. (*См.* Bobo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2076-2080 (1994); Morrison et al., *Am. J. Physiol.* 266:292-305 (1994)). Другие способы, которые можно использовать, включают катетеры, внутривенную, парентеральную, внутрибрюшинную и подкожную инъекцию, и пероральный или другие подходящие пути введения.

Биспецифические антитела представляют собой антитела, обладающие специфичностью связывания как минимум с двумя различными антигенами. В данном случае одна из специфичностей связывания относится к мишени, такой как В7-Н3 или любого его фрагмента. Вторая мишень связывания представляет собой любой другой антиген и предпочтительно представляет собой белок клеточной поверхности или рецептор или субъединицу рецептора.

В данной области техники известны многие способы получения биспецифических антител. Традиционно рекомбинантное производство биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, где две тяжелые цепи обладают различной специфичностью (Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Из-за случайного набора тяжелых и легких цепей иммуноглобулина эти гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь десяти различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы обычно осуществляется с помощью аффинной хроматографии. Подобные процедуры описаны в WO 93/08829, опубликованной 13 мая 1993 г., и в Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Биспецифические и/или моновалентные антитела по данному изобретению могут быть получены с использованием любого из множества способов, признанных в данной области техники, включая способы, описанные в заявке WO 2012/023053, поданной 16 августа 2011 г., содержание которой включено в данный документ во всей своей полноте с помощью ссылки. Способы, описанные в WO 2012/023053, генерируют биспецифические антитела, идентичные по структуре иммуноглобулину человека. Этот тип молекулы состоит из двух копий уникального полипептида тяжелой цепи, первой вариабельной области легкой цепи, слитой с константным каппа-доменом, и второй вариабельной области легкой цепи, слитой с константным лямбда-доменом. Каждый комбинирующий сайт демонстрирует различную антигенную специфичность, в которую вносят вклад как тяжелая, так и легкая цепи. Вариабельные области легкой цепи могут принадлежать к семейству лямбда или каппа и предпочтительно слиты с константными доменами лямбда и каппа соответственно. Это предпочтительно для того, чтобы избежать образования неприродных полипептидных соединений. Однако также возможно получить биспецифические антитела по данному изобретению путем слияния вариабельного домена легкой цепи каппа с константным доменом лямбда для первой специфичности и слияния вариабельного домена легкой цепи лямбда с константным доменом каппа для второй специфичности. Биспецифические антитела, описанные в WO 2012/023053, называются антителами IgGκλ или «тельцами κλ», новым полностью биспецифическим форматом IgG человека. Этот формат κλ-тела позволяет проводить аффинную очистку биспецифического антитела, неотличимого от стандартной молекулы IgG, с характеристиками, неотличимыми от стандартного моноклонального антитела, и, следовательно, благоприятными по сравнению с предыдущими форматами.

Важной стадией способа является идентификация двух Fv-областей антитела

(каждая из которых состоит из вариабельного домена легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи), обладающих различной антигенной специфичностью, которые имеют один и тот же вариабельный домен тяжелой цепи. Описаны многочисленные способы получения моноклональных антител и их фрагментов. (См., например, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, включена в данный документ в качестве ссылки). Полностью человеческие антитела представляют собой молекулы антител, в которых последовательности как легкой цепи, так и тяжелой цепи, включая CDR 1 и 2, происходят из генов человека. Область CDR3 может иметь человеческое происхождение или быть получена синтетическим путем. Такие антитела называются в данном документе «человеческими антителами» или «полностью человеческими антителами». Моноклональные антитела человека могут быть получены с использованием методики триомы; методики гибридомы В-клеток человека (см. Kozbor, et al., 1983 *Immunol Today* 4: 72); и методики гибридомы EBV для получения моноклональных антител человека (см. Cole, et al., 1985 In: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Моноклональные антитела человека могут быть использованы и могут быть получены с использованием гибридом человека (см. Cote, et al., 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) или путем трансформации В-клеток человека вирусом Эпштейна-Барра *in vitro* (см. Cole, et al., 1985 In: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Моноклональные антитела получают, например, путем иммунизации животного антигеном-мишенью или его иммуногенным фрагментом, производным или вариантом. Альтернативно животное иммунизируют клетками, трансфицированными вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген-мишень, так что антиген-мишень экспрессируется и связывается с поверхностью трансфицированных клеток. В данной области техники хорошо известно множество подходящих способов получения ксеногенных животных, отличных от человека. Например, см. патент США № 6075181 и 6150584, которые включены в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки.

Альтернативно, антитела получают путем скрининга библиотеки, которая содержит антитело или последовательности антигенсвязывающего домена на предмет связывания с антигеном-мишенью. Эту библиотеку получают, например, в бактериофаге в виде белковых или пептидных слияний с белком оболочки бактериофага, который экспрессируется на поверхности собранных фаговых частиц и кодирующие последовательности ДНК, содержатся внутри фаговых частиц (*т.е.* «библиотека, отображаемая фагом»).

Гибридомы, полученные в результате слияния миеломы/В-клеток, затем подвергают скринингу на реактивность к антигену-мишени. Моноклональные антитела получают, например, с использованием гибридомных методов, таких как способы, описанные Kohler и Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). В гибридном методе мышь, хомяк

или другое подходящее животное-хозяин обычно иммунизируют иммунизирующим агентом для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с иммунизирующим агентом. Альтернативно, лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*.

Хотя это и не является абсолютно невозможным, случайная идентификация различных антител, имеющих один и тот же переменный домен тяжелой цепи, но направленных против разных антигенов, весьма маловероятна. Действительно, в большинстве случаев тяжелая цепь вносит большой вклад в антигенсвязывающую поверхность, и имеет наиболее переменную последовательность. В частности, CDR3 тяжелой цепи представляет собой наиболее разнообразный CDR по последовательности, длине и структуре. Таким образом, два антитела, специфичные к разным антигенам, почти всегда будут нести разные переменные домены тяжелой цепи.

Способы, раскрытые в заявке на патент США № 9926382, преодолевают это ограничение и значительно облегчают выделение антител, имеющих один и тот же переменный домен тяжелой цепи, путем использования библиотек антител, в которых переменный домен тяжелой цепи одинаков для всех членов библиотеки и, таким образом, разнообразие ограничено переменным доменом легкой цепи. Такие библиотеки описаны, например, в патенте США №8921281 и заявке WO 2011/084255, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки. Однако, поскольку переменный домен легкой цепи экспрессируется вместе с переменным доменом тяжелой цепи, оба домена могут способствовать связыванию антигена. Для дальнейшего облегчения процесса, библиотеки антител, содержащие один и тот же переменный домен тяжелой цепи и различные переменные легкие цепи лямбда или переменные легкие цепи каппа, можно использовать параллельно для селекции *in vitro* антител к различным антигенам. Этот подход позволяет идентифицировать два антитела, имеющие общую тяжелую цепь, но одно из которых несет переменный домен легкой цепи лямбда, и другое несет переменный домен легкой цепи каппа, которые можно использовать в качестве строительных блоков для создания биспецифического антитела в формате полного иммуноглобулина раскрытия. Биспецифические антитела по данному изобретению могут относиться к разным изотипам, и их часть Fc может быть модифицирована для изменения свойств связывания с различными рецепторами Fc и, таким образом, модификации эффекторных функций антитела, и его фармакокинетических свойств. Были описаны многочисленные способы модификации Fc-фрагмента, которые применимы к антителам по данному изобретению. (см., например, Strohl, WR Curr Opin Biotechnol 2009 (6):685-91; патент США № 6528624; PCT/US2009/0191199, подана 9 января 2009 г.). Способы данного изобретения также можно использовать для получения биспецифических антител и смесей антител в формате F(ab')₂, в котором отсутствует часть Fc.

Общая тяжелая цепь и две разные легкие цепи совместно экспрессируются в одной клетке, чтобы обеспечить сборку биспецифического антитела по данному изобретению.

Если все полипептиды экспрессируются на одном уровне и одинаково хорошо собираются в молекулу иммуноглобулина, то соотношение моноспецифических (одинаковые легкие цепи) и биспецифических (две разные легкие цепи) должно составлять 50%. Однако вполне вероятно, что разные легкие цепи экспрессируются на разных уровнях и/или не собираются с одинаковой эффективностью. Таким образом, средства для модуляции относительной экспрессии различных полипептидов используют для компенсации их внутренних характеристик экспрессии или различной склонности к сборке с общей тяжелой цепью. Эта модуляция может быть достигнута за счет силы промотора, использования внутренних участков посадки рибосом (IRES) с различной эффективностью или других типов регуляторных элементов, которые могут действовать на уровне транскрипции или трансляции, и влиять на стабильность мРНК. Различные промоторы разной силы могут включать CMV (промотор непосредственно-раннего вируса цитомегаловируса); EF1-1 α (промотор 1 α -субъединицы фактора элонгации человека); Ubc (промотор убиквитина С человека); SV40 (промотор обезьяньего вируса 40). Также были описаны различные IRES млекопитающих и вирусного происхождения. (См., например, Hellen CU and Sarnow P. Genes Dev 2001 15: 1593-612). Эти IRES могут сильно различаться по своей длине и эффективности рекрутирования рибосом. Кроме того, можно дополнительно настроить активность, введя несколько копий IRES (Stephen et al. 2000 Proc Natl Acad Sci USA 97: 1536-1541). Модуляция экспрессии также может быть достигнута путем многократной последовательной трансфекции клеток для увеличения количества копий отдельных генов, экспрессирующих ту или иную легкую цепь, и, таким образом, модификации их относительных экспрессий. Приведенные в данном документе примеры демонстрируют, что контроль относительной экспрессии различных цепей имеет решающее значение для максимизации сборки и общего выхода биспецифического антитела.

Совместная экспрессия тяжелой цепи и двух легких цепей приводит к образованию смеси трех разных антител в супернатанте клеточной культуры: двух моноспецифических бивалентных антител и одного биспецифического бивалентного антитела. Последнее должно быть очищено от смеси, чтобы получить интересующую молекулу. Описанный в данном документе способ значительно облегчает эту процедуру очистки за счет использования сред для аффинной хроматографии, которые специфически взаимодействуют с константными доменами легкой цепи каппа или лямбда, таких как аффинные матрицы CaptureSelect Fab Kappa и CaptureSelect Fab Lambda (BAC BV, Голландия). Этот подход к очистке с помощью многоступенчатой аффинной хроматографии эффективен и обычно применим к антителам по данному изобретению. Это резко контрастирует со специфическими способами очистки, которые должны быть разработаны и оптимизированы для каждого биспецифического антитела, полученного из квадром или других клеточных линий, экспрессирующих смеси антител. Действительно, если биохимические характеристики различных антител в смесях аналогичны, их разделение с использованием стандартных способов хроматографии, таких как

ионообменная хроматография, может быть затруднительным или вообще невозможным.

Другие подходящие способы очистки включают способы, раскрытые в US 2013/0317200, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки.

В других вариантах реализации получения биспецифических антител переменные домены антител с желаемой специфичностью связывания (сайты объединения антитело-антиген) могут быть слиты с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Слияние предпочтительно происходит с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, включающим по меньшей мере часть шарнирной, СН2- и СН3-областей. Предпочтительно, чтобы первая константная область тяжелой цепи (СН1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствовала по крайней мере в одном из гибридов. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, при желании, легкой цепи иммуноглобулина, встраивают в отдельные векторы экспрессии и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Для получения дополнительной информации о получении биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

В соответствии с другим подходом, описанным в WO 96/27011, поверхность раздела между парой молекул антител может быть сконструирована таким образом, чтобы максимизировать процент гетеродимеров, выделенных из рекомбинантной клеточной культуры. Предпочтительный интерфейс включает по меньшей мере часть области СН3 константного домена антитела. В этом способе одна или более небольших боковых цепей аминокислот с поверхности первой молекулы антитела заменяются более крупными боковыми цепями (*например*, тирозином или триптофаном). Компенсационные «полости» идентичного или сходного размера с большой боковой цепью (цепями) создаются на границе второй молекулы антитела путем замены больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (*например*, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

В литературе описаны способы получения биспецифических антител из фрагментов антител. Например, биспецифические антитела могут быть получены с использованием химической связи. Полученные биспецифические антитела можно использовать в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов.

Также были описаны различные способы получения и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из рекомбинантной клеточной культуры. Например, биспецифические антитела были получены с использованием лейциновых молний. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой молнии из белков Fos и Jun были связаны с частями Fab' двух разных антител путем слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливались в шарнирной области с образованием мономеров, и затем повторно окислялись с образованием гетеродимеров антител. Этот способ также можно использовать для получения гомодимеров антител. Технология

«диатела», описанная Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) представляет собой альтернативный механизм получения биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) линкером, который слишком короткий, чтобы сделать возможным образование пар между двумя доменами в одной цепи. Соответственно, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными доменами V_H и V_L другого фрагмента, тем самым образуя два сайта связывания антигена. Также сообщалось о другой стратегии получения фрагментов биспецифических антител с использованием одноцепочечных димеров Fv (sFv). См., Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

Рассматриваются антитела с более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифические антитела. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

Типичные биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами, по меньшей мере один из которых происходит от белкового антигена по данному изобретению. Альтернативно, антиантигенное плечо молекулы иммуноглобулина может быть объединено с плечом, которое связывается с запускающей молекулой на лейкоците, такой как молекула рецептора Т-клеток (*например*, CD2, CD3, CD28 или B7), или Fc-рецепторы для IgG (FcγR), таких как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), чтобы сфокусировать механизмы клеточной защиты на клетке, экспрессирующей конкретный антиген. Биспецифические антитела можно использовать для направления цитотоксических агентов к клеткам, которые экспрессируют определенный антиген. Эти антитела обладают антигенсвязывающим плечом и плечом, которое связывает цитотоксический агент или радионуклидный хелатор, такой как EOTUBE, DPTA, DOTA или TETA. Другое представляющее интерес биспецифическое антитело связывает белковый антиген, описанный в данном документе, и дополнительно связывает тканевой фактор (TF).

Гетероконъюгированные антитела входят в объем данного изобретения. Гетероконъюгированные антитела состоят из двух ковалентно связанных антител. Такие антитела, например, были предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (*см.* патент США № 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (*см.* WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Предполагается, что антитела могут быть получены *in vitro* с использованием химии синтетических белков, в том числе с использованием сшивающих агентов. Например, иммунотоксины можно сконструировать с помощью реакции дисульфидного обмена или образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих реагентов для этой цели включают имиотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат, и реагенты, раскрытые, например, в патенте США № 4676980.

Может оказаться желательным модифицировать антитело по данному изобретению в отношении эффекторной функции, чтобы повысить, *например*, эффективность антитела при лечении онкологического заболевания и/или других заболеваний и нарушений, связанных с aberrантной экспрессией и/или активностью B7-H3. Например, остатки

цистеина могут быть введены в область Fc, тем самым обеспечивая образование межцепочечной дисульфидной связи в этой области. Генерируемое таким образом гомодимерное антитело может обладать улучшенной способностью к интернализации и/или повышенной комплемент-опосредованной гибелью клеток и антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). (См. Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) и Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). В качестве альтернативы можно сконструировать антитело, которое имеет двойные Fc-участки и, таким образом, может иметь усиленный лизис комплемента и возможности ADCC. (См. Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

Конъюгированные антитела

Настоящее изобретение также относится к конъюгированным антителам, также называемым в данном документе иммуноконъюгатами, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с цитотоксическим агентом, таким как токсин (*например*, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или его фрагменты), или радиоактивный изотоп (*т.е.* радиоконъюгат).

В некоторых вариантах реализации токсин представляет собой ингибитор микротрубочек или его производное. В некоторых вариантах реализации токсин представляет собой доластатин или его производное. В некоторых вариантах реализации токсин представляет собой ауристатин E, ауристатин F, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF или DMAE. В некоторых вариантах реализации токсин представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах реализации токсин представляет собой DM1 или DM4. В некоторых вариантах реализации токсин представляет собой токсин, повреждающий нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах реализации токсин представляет собой дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах реализации токсин представляет собой калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах реализации агент представляет собой пирролобензодиазепин или его производное. В некоторых вариантах реализации агент представляет собой эксатекан или его производное.

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают цепь A дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь A экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь A рицина, цепь A абрина, цепь A модекцин, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор момордики харантии, курцин, кротин, ингибитор сапаонарии лекарственной, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. Для производства радиоконъюгированных антител доступны различные радионуклиды. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , и ^{186}Re .

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных связывающих белков агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), имиотиолан (IT),

бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметил адипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(*p*-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(*p*-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и биактивные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицина можно получить, как описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является типичным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклеотида с антителом. (См. WO 94/11026).

Специалистам в данной области техники будет понятно, что с полученными антителами по данному изобретению может быть связано большое разнообразие возможных группировок. (См., например, Conjugate Vaccines, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки).

Связывание может быть осуществлено любой химической реакцией, которая свяжет две молекулы, пока антитело и другой фрагмент сохраняют свои соответствующие активности. Эта связь может включать множество химических механизмов, например, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. Однако предпочтительным связыванием является ковалентное связывание. Ковалентное связывание может быть достигнуто либо путем прямой конденсации существующих боковых цепей, либо путем включения внешних мостиковых молекул. Многие двухвалентные или поливалентные связывающие агенты применимы для связывания белковых молекул, таких как антитела по данному изобретению, с другими молекулами. Например, характерные связывающие агенты могут включать органические соединения, такие как сложные тиозфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимиды, диизоцианаты, глутаровый альдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. Этот список не претендует на то, чтобы быть исчерпывающим для различных классов связывающих агентов, известных в данной области техники, и скорее является примером наиболее распространенных связывающих агентов. (См. Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); и Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)).

Подходящие линкеры описаны в литературе. (См., например, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984), описывающую применение MBS (эфир *N*-малеимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимиды). См. также патент США № 5030719, описывающий применение галогенированного производного ацетилгидразида, связанного с антителом посредством олигопептидного линкера. Особенно предпочтительные линкеры включают: (i) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид; (ii) SMPT (4-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридил-дитио)-толуол). (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6-[3-(2-

пиридилдитио)пропионамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co., кат № 21651G); (iv) Сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6-[3-(2-пиридилдитио)-пропианамид]гексаноат (Pierce Chem. Co., кат № 2165-G); и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид: Pierce Chem. Co., кат №24510), конъюгированный с EDC.

Описанные выше линкеры содержат компоненты с разными свойствами, что приводит к конъюгатам с разными физико-химическими свойствами. Например, сульфо-NHS-эфиры алкилкарбоксилатов более стабильны, чем сульфо-NHS-эфиры ароматических карбоксилатов. Линкеры, содержащие сложный эфир NHS, менее растворимы, чем сложные эфиры сульфо-NHS. Кроме того, линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с повышенной стабильностью. Дисульфидные связи, как правило, менее стабильны, чем другие связи, потому что дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, что приводит к меньшему количеству доступного конъюгата. В частности, сульфо-NHS может повышать стабильность карбодимидных сочетаний. Карбодимидные сочетания (такие как EDC) при использовании в сочетании с сульфо-NHS образуют сложные эфиры, более устойчивые к гидролизу, чем продукты реакции карбодимидного сочетания отдельно.

Описанные в данном документе антитела могут быть составлены в виде иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, могут быть получены любыми подходящими способами, такими как описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); и патент США № 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции раскрыты в патенте США №5013556.

Особенно полезные липосомы могут быть получены способом обращенно-фазового испарения с липидной композицией, включающей фосфатидилхолин, холестерин и фосфатидилэтаноламин, дериватизированный ПЭГ (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор, чтобы получить липосомы желаемого диаметра. Фрагменты Fab' антитела по данному изобретению могут быть конъюгированы с липосомами, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) посредством реакции дисульфидного обмена.

Использование антител к В7-Н3

Следует понимать, что введение терапевтических средств в соответствии с изобретением будет осуществляться с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, включенными в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), особенно во главе 87 Blaug, Seymour, там же. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, везикулы, содержащие липиды (катионные или анионные) (такие как Lipofectin™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбокса (полиэтиленгликоли различной

молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любая из вышеуказанных смесей может быть подходящей для лечения и терапии в соответствии с данным изобретением, при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется составом, и состав физиологически совместим и переносим при выбранном способе введения. См. также Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) и ссылки в них для получения дополнительной информации, относящейся к составам, вспомогательным веществам и носителям, хорошо известным химикам-фармацевтам.

Терапевтические составы по данному изобретению, которые включают конъюгат по данному изобретению, применяют для лечения или облегчения симптома, связанного с онкологическим заболеванием, например, в качестве неограничивающего примера, лейкоза, лимфомы, онкологического заболевания молочной железы, онкологического заболевания толстой кишки, онкологического заболевания яичников, онкологического заболевания мочевого пузыря, онкологического заболевания предстательной железы, глиомы, онкологического заболевания легких и бронхов, колоректального онкологического заболевания, онкологического заболевания поджелудочной железы, онкологического заболевания пищевода, онкологического заболевания печени, онкологического заболевания мочевого пузыря, онкологического заболевания почки и почечной лоханки, онкологического заболевания полости рта и глотки, онкологического заболевания тела матки и/или меланомы. Настоящее раскрытие также предлагает способы лечения или облегчения симптома, связанного с онкологическим заболеванием. Терапевтическая схема может включать идентификацию субъекта, *например*, пациента-человека, страдающего (или подверженного риску развития) онкологического заболевания, например, с использованием стандартных способов.

Терапевтические составы по данному изобретению, которые включают конъюгат по данному изобретению, распознающий В7-Н3, и, необязательно, вторую мишень, можно использовать для лечения или облегчения симптома, связанного с аутоиммунным заболеванием и/или воспалительным заболеванием, таким как, например, опосредованные В-клетками аутоиммунные заболевания и/или воспалительные заболевания, включая, в качестве неограничивающих примеров, системную красную волчанку (СКВ), ревматоидный артрит (РА), идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), гипергаммаглобулинемию Вальденстрема, синдром Шегрена, рассеянный склероз (РС) и/или волчаночный нефрит.

Эффективность лечения может быть определена в сочетании с любым подходящим способом диагностики или лечения конкретного нарушения, связанного с иммунитетом. Облегчение одного или более симптомов иммунного расстройства указывает на то, что

конъюгат дает клиническую пользу.

Конъюгаты, направленные против мишени, такой как В7-Н3, антиген, ассоциированный с опухолью, или другой антиген, могут быть использованы в способах, связанных с локализацией и/или количественным определением этих мишеней, *например*, для использования при измерении уровней этих мишеней в соответствующих физиологических образцах, для использования в диагностических способах, для использования при визуализации белка и т.п.). Например, конъюгаты, специфичные для любой из этих мишеней, или их производные, фрагменты, аналоги или гомологи, которые содержат полученный из антитела антигенсвязывающий домен, могут быть использованы в качестве фармакологически активных соединений (далее именуемых «терапевтические средства»).

Конъюгат по данному изобретению может быть использован для выделения конкретной мишени с использованием стандартных способов, таких как иммуноаффинность, хроматография или иммуноосаждение. Конъюгаты по данному изобретению можно использовать в диагностических целях для мониторинга уровней белка в ткани в рамках процедуры клинического тестирования, *например*, для определения эффективности данной схемы лечения. Обнаружение может быть облегчено связыванием (*m.e.* физическим связыванием) антитела с обнаруживаемым веществом. Примеры обнаруживаемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетической группы включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного материала включает люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и аэкворин, и примеры подходящих радиоактивных материалов включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H .

Конъюгаты по данному изобретению могут быть использованы в качестве терапевтических агентов. Такие агенты обычно применяют для лечения или предупреждения заболевания, или патологии, связанной с aberrантной экспрессией или активацией данной мишени у субъекта. Препарат конъюгата, предпочтительно обладающий высокой специфичностью и высокой аффинностью к антигену-мишени, вводят субъекту и обычно он оказывает действие благодаря связыванию с мишенью. Введение конъюгата может аннулировать, ингибировать или препятствовать сигнальной функции мишени. Введение конъюгата может аннулировать, ингибировать или препятствовать связыванию мишени с эндогенным лигандом, с которым она естественным образом связывается.

Терапевтически эффективное количество конъюгата по данному изобретению

обычно относится к количеству, необходимому для достижения терапевтической цели. Как отмечалось выше, это может быть связывающее взаимодействие между антителом и его антигеном-мишенью, которое в некоторых случаях препятствует функционированию мишени и/или эффекту активного агента, конъюгированного с антителом. Количество, необходимое для введения, будет, кроме того, зависеть от аффинности связывания антитела с его специфическим антигеном и/или активности активного агента, и будет зависеть от скорости, с которой введенное антитело истощается из свободного объема другого субъекта, которому оно введено. Обычные диапазоны терапевтически эффективных доз конъюгата по данному изобретению могут составлять, в качестве неограничивающего примера, от около 0,1 мг/кг массы тела до около 50 мг/кг массы тела. Обычная частота дозирования может варьироваться, например, от двух раз в день до одного раза в неделю.

Конъюгаты по данному изобретению можно вводить для лечения различных заболеваний и нарушений в виде фармацевтических композиций. Принципы и соображения, связанные с составлением таких композиций, и рекомендации по выбору компонентов приведены, например, в Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; и Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Лекарственная форма может также содержать более одного активного соединения, если это необходимо для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно веществами с взаимодополняющей активностью, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. В качестве альтернативы или в дополнение, композиция может содержать агент, усиливающий ее функцию, такой как, например, цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтический агент или агент, ингибирующий рост. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для намеченной цели.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, приготовленные, например, способами коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в виде макроэмульсий.

Составы, используемые для введения *in vivo*, предпочтительно являются стерильными. Это легко достигается путем фильтрования через стерильные фильтровальные мембраны.

Могут быть приготовлены составы пролонгированного действия. Подходящие примеры составов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем матрицы имеют

форму формованных изделий, *например*, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают полиэферы, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (пат. № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPRON DEPOTM (инъекционные микросферы, состоящие из молочной и гликолевой кислот сополимер и ацетат лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота. В то время как полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочно-гликолевая кислота, обеспечивают высвобождение молекул в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

Конъюгат в соответствии с изобретением можно использовать в качестве средства для обнаружения присутствия заданной мишени (или ее белкового фрагмента) в образце. В некоторых вариантах реализации конъюгат содержит обнаруживаемую метку. Антитела могут быть поликлональными или, более предпочтительно, моноклональными. Можно использовать интактное антитело или его фрагмент (*например*, Fab, scFv или F_(ab)₂). Предполагается, что термин «биологический образец» включает ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные от субъекта, и ткани, клетки и жидкости, присутствующие в субъекте. Таким образом, термин «биологический образец» включает кровь и фракцию или компонент крови, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. То есть способ обнаружения по данному изобретению можно использовать для обнаружения мРНК, белка или геномной ДНК анализируемого вещества в биологическом образце *in vitro*, и *in vivo*. Например, способы обнаружения мРНК анализируемого вещества *in vitro* включают нозерн-гибридизацию и гибридизацию *in situ*. Способы обнаружения анализируемого белка *in vitro* включают твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), Вестерн-блоттинг, иммуноосаждение и иммунофлуоресценцию. Способы обнаружения геномной ДНК анализируемого вещества *in vitro* включают Саузерн-гибридизацию. Процедуры проведения иммуноанализов описаны, например, в «ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology», Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; «Immunoassay», E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; и «Practice and Theory of Enzyme Immunoassays», P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Кроме того, способы обнаружения анализируемого белка *in vivo* включают введение субъекту меченого анти-аналитного конъюгата. Например, антитело может быть помечено радиоактивным маркером, присутствие и местонахождение которого у субъекта можно обнаружить с помощью стандартных способов визуализации.

Фармацевтические композиции

Конъюгат антитело-лекарственное средство можно использовать для переноса активного агента в клетку-мишень субъекта для лечения субъекта с использованием любого подходящего способа приготовления композиции. В некоторых аспектах изобретение относится к композиции (*например*, фармацевтической композиции),

содержащей конъюгат антители-лекарственное средство, как описано в данном документе.

Композиции и способы по данному изобретению могут быть использованы для лечения индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах реализации индивидуумом является млекопитающее, такое как человек, или млекопитающее, отличное от человека. При введении животному, такому как человек, композицию или соединение предпочтительно вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, соединение по данному изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области и включают, например, водные растворы, такие как вода или физиологически забуференный солевой раствор, или другие растворители или носители, такие как гликоли, глицерин, масла, такие как оливковое масло, или органические сложные эфиры для инъекций. В предпочтительных вариантах реализации, когда такие фармацевтические композиции предназначены для введения человеку, в частности, для инвазивных путей введения (т.е. путей, таких как инъекция или имплантация, которые обходят транспорт или диффузию через эпителиальный барьер), водный раствор является апирогенным, или практически апирогенным. Вспомогательные вещества могут быть выбраны, например, для реализации замедленного высвобождения агента или для избирательного воздействия на одну или более клеток, тканей или органов. Фармацевтическая композиция может быть в стандартной дозированной форме, такой как лиофилизат для восстановления, порошок, раствор, инъекция и т.п.

Фармацевтически приемлемый носитель может содержать физиологически приемлемые агенты, которые действуют, например, стабилизируя, увеличивая растворимость или увеличивая абсорбцию соединения, такого как соединение по данному изобретению. Такие физиологически приемлемые агенты включают, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы, или вспомогательные вещества. Выбор фармацевтически приемлемого носителя, в том числе физиологически приемлемого агента, зависит, например, от пути введения композиции. Состав или фармацевтическая композиция может представлять собой самоэмульгирующуюся систему доставки лекарственного средства или самомикроэмульгирующуюся систему доставки лекарственного средства. Фармацевтическая композиция (состав) также может представлять собой липосому или другую полимерную матрицу, в которую может быть включено, например, соединение по данному изобретению. Липосомы, например, которые содержат фосфолипиды или другие липиды, являются нетоксичными, физиологически приемлемыми и метаболизируемыми носителями, которые относительно просто изготовить и ввести.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерного воздействия, токсичности,

раздражения, аллергической реакции или других проблем, или осложнений, соответствующих разумному соотношению польза/риск.

Фармацевтическую композицию (состав) можно вводить субъекту любым из ряда способов введения. Например, соединение можно просто растворить или суспендировать в стерильной воде. Подробности соответствующих путей введения и композиций, подходящих для них, можно найти, например, в патенте США № 6110973, 5763493, 5731000, 5541231, 5427798, 5358970 и 4172896, и в цитируемых в них патентах.

Композиции могут быть удобно представлены в виде стандартной лекарственной формы и могут быть приготовлены любым подходящим способом известным в области фармацевтики. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя для получения разовой лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от подвергаемого лечению хозяина и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя для получения разовой лекарственной формы, обычно будет таким количеством соединения, которое оказывает терапевтическое действие. Как правило, из ста процентов, это количество составляет от около 1 до около девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от около 5 до около 70 процентов, наиболее предпочтительно от около 10 до около 30 процентов.

Способы приготовления этих составов или композиций включают стадию связывания активного соединения, такого как соединение по данному изобретению, с носителем и, необязательно, с одним или более вспомогательными ингредиентами. Как правило, составы готовят путем однородного и тесного связывания соединения по данному изобретению с жидкими носителями, или тонкоизмельченными твердыми носителями, или обоими, и затем, при необходимости, формованием продукта.

Фразы «парентеральное введение» и «вводимый парентерально», используемые в данном документе, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутриглазную (например, интравитреальную), внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсульную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкожную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную и интрастернальную инъекцию и инфузию. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, содержат одно или более активных соединений в сочетании с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые могут быть преобразованы в стерильные растворы или дисперсии для инъекций непосредственно перед применением, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загущающие агенты.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях согласно изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования материалов покрытия, таких как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и за счет использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адьюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предупреждение действия микроорганизмов может быть обеспечено включением в состав различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включать в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной фармацевтической формы может быть вызвано включением агентов, замедляющих всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых случаях для продления действия лекарственного средства желательно замедлить всасывание лекарственного средства при подкожном или внутримышечном введении. Этого можно достичь путем использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, плохо растворимого в воде. Тогда скорость всасывания лекарственного средства зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера и формы кристаллов. Альтернативно, замедленное всасывание парентерально вводимой лекарственной формы достигается путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе.

Депозитивные формы для инъекций изготавливают путем формирования микроинкапсулированных матриц рассматриваемых соединений в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера и природы конкретного используемого полимера можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Инъекционные составы пролонгированного действия также получают путем включения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии, совместимые с тканями организма.

Для применения в способах по данному изобретению активные соединения можно давать сами по себе или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1 до 99,5% (более предпочтительно от 0,5 до 90%) активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Способы введения также могут быть обеспечены перезаряжаемыми или биоразлагаемыми устройствами. В последние годы были разработаны и испытаны *in vivo*

различные полимерные устройства с медленным высвобождением для контролируемой доставки лекарств, включая белковые биофармацевтические препараты. Разнообразные биосовместимые полимеры (включая гидрогели), включая как биоразлагаемые, так и неразлагаемые полимеры, можно использовать для формирования имплантата для замедленного высвобождения соединения в конкретном целевом участке.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях можно варьировать таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не оказывая при этом токсического воздействия на организм пациента.

Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного соединения или комбинации используемых соединений, или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого(ых) соединения(ий), продолжительности лечения, других лекарств, соединений и/или материалов, используемых в сочетании с конкретным используемым соединением(ями), возраста, пола, массы тела, состояния, общего состояния здоровья и предшествующей истории болезни пациента, которого лечат, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Врач или ветеринар, обладающие обычными знаниями в данной области, могут легко определить и прописать терапевтически эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начинать введение доз фармацевтической композиции или соединения с более низких уровней, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. Под «терапевтически эффективным количеством» понимают концентрацию соединения, достаточную для получения желаемого терапевтического эффекта. Обычно понятно, что эффективное количество соединения будет варьироваться в зависимости от массы тела, пола, возраста и истории болезни субъекта. Другие факторы, влияющие на эффективное количество, могут включать, но не ограничиваться ими, тяжесть состояния пациента, заболевание, которое лечат, стабильность соединения и, при желании, другой тип терапевтического средства, вводимого с соединением раскрытия. Большая общая доза может быть доставлена путем многократного введения агента. Специалистам в данной области известны многие способы определения эффективности и дозировки (Isselbacher et al. (1996) *Harrison's Principles of Internal Medicine* 13 ed., 1814-1882, включенная в данный документ посредством ссылки).

Как правило, подходящей суточной дозой активного соединения, используемого в композициях и способах по данному изобретению, будет такое количество соединения, которое представляет собой наименьшую дозу, эффективную для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от факторов, описанных выше.

Пациентом, получающим такое лечение, может быть любое нуждающееся животное, включая приматов, в частности человека; и другие млекопитающие, такие как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, кошки и собаки; домашняя птица; и домашние животные в целом.

В некоторых вариантах реализации соединения по данному изобретению можно применять отдельно или совместно вводить с другим типом терапевтического средства.

В композициях также могут присутствовать смачивающие агенты, эмульгаторы и смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, и красители, антиадгезивы, агенты покрытия, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) агенты, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Композиции могут быть составлены в форме для инъекций либо в виде жидкого раствора, либо в виде суспензии. Твердые формы, пригодные для инъекций, также могут быть составлены, *например*, в виде эмульсий или конъюгата антитело-лекарственное средство, инкапсулированного в липосомы. Конъюгаты антитело-лекарственное средство можно комбинировать с фармацевтически приемлемым носителем, который включает любой носитель, не индуцирующий выработку антител, вредных для субъекта, получающего носитель. Подходящие носители обычно содержат большие макромолекулы, которые медленно метаболизируются, например белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот, агрегаты липидов и т.п.

Композиции могут также содержать разбавители, например воду, физиологический раствор, глицерин и этанол. Вспомогательные вещества, например смачивающие или эмульгирующие агенты, рН-буферные вещества и т.п., также могут присутствовать в составе композиций. Композиции можно вводить парентерально путем инъекции, при этом такая инъекция может быть либо подкожной, либо внутримышечной инъекцией. В некоторых вариантах реализации композицию можно вводить в опухоль. Композиция может быть введена (*например*, инъецирована) в опухоль. Дополнительные составы подходят для других форм введения, таких как суппозиторий или пероральное введение. Пероральные композиции можно вводить в виде раствора, суспензии, таблетки, пилюли, капсулы или состава с замедленным высвобождением.

Композиции можно вводить способом, совместимым с дозой и составом. Композиция предпочтительно содержит терапевтически эффективное количество

конъюгата антитело-лекарственное средство. Доза может варьироваться в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, состояния здоровья и физического состояния субъекта, желаемой степени защиты и других соответствующих факторов. Точное количество активного ингредиента (*например*, конъюгата антитело-лекарственное средство) может зависеть от решения врача. Например, терапевтически эффективное количество конъюгата антитело-лекарственное средство или содержащей его композиции можно вводить пациенту, страдающему онкологическим заболеванием или опухолью, для лечения онкологического заболевания или опухоли.

Конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с данным изобретением или композиция, содержащая его, может вводиться в форме его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах реализации конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с данным изобретением или композиция, содержащая его, может вводиться с фармацевтически приемлемым носителем, фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом и/или фармацевтически приемлемой добавкой. Эффективное количество и тип фармацевтически приемлемой соли, вспомогательного вещества и добавки можно измерить с использованием стандартных способов (*см., например*, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th Edition, 1990).

В некоторых вариантах реализации изобретение относится к способу лечения онкологического заболевания у субъекта, включающему введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитело-лекарственное средство, как описано в данном документе. В предпочтительных вариантах реализации субъект представляет собой млекопитающее. Например, субъект может быть выбран из грызунов, зайцеобразных, кошачьих, псовых, свиней, овец, крупного рогатого скота, лошадей и приматов. В некоторых предпочтительных вариантах реализации субъектом является человек.

Конъюгаты по данному изобретению (также называемые в данном документе «активными соединениями») и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно содержат конъюгат и фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» предназначен для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических средств и средств, замедляющих абсорбцию, и т.п., совместимых с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в самом последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартном справочном тексте в данной области, который включен в данный документ в качестве ссылки. Предпочтительные примеры таких носителей или разбавителей включают, но не ограничиваются ими, воду, физиологический раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Также можно использовать липосомы и неводные носители, такие как нелетучие масла. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо

известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо обычные среды или агенты несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению составлена таким образом, чтобы быть совместимой с ее предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, *например*, внутривенное, внутрикожное и подкожное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный состав может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы (где растворяются в воде) или дисперсии и стерильные порошки для импровизированного составления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко ввести шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях будет предпочтительнее включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как манит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено включением в композицию агента, замедляющего всасывание, например моностеарата алюминия и

желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способами приготовления являются вакуумная сушка и лиофилизация, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, предварительно стерильно отфильтрованного.

В некоторых вариантах реализации активные соединения готовят с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, такими как лекарственная форма с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы приготовления таких композиций будут очевидны специалистам в данной области техники. Материалы также могут быть получены коммерчески от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно приготовить в соответствии с подходящими способами, например, как описано в патенте США № 4522811.

Особенно выгодно составлять композиции для перорального или парентерального введения в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и однородности дозировки. Единичная лекарственная форма, используемая в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных дозированных форм по данному изобретению диктуется и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и от ограничений, присущих области приготовления таких активных соединений для лечения субъекта.

Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по применению.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие конъюгат антитело-лекарственное средство, как описано в

данном документе, необязательно дополнительно содержащие терапевтически эффективное количество химиотерапевтического агента.

В некоторых аспектах настоящее изобретение обеспечивает способы лечения онкологического заболевания, включающие введение конъюгата антитело-лекарственное средство по данному изобретению или его фармацевтической композиции. В некоторых таких вариантах реализации, онкологическое заболевание выбрано из лейкоза, лимфомы, онкологического заболевания молочной железы, онкологического заболевания толстой кишки, онкологического заболевания яичников, онкологического заболевания мочевого пузыря, онкологического заболевания предстательной железы, глиомы, онкологического заболевания легких, онкологического заболевания бронхов, колоректального онкологического заболевания, онкологического заболевания поджелудочной железы, онкологического заболевания пищевода, онкологического заболевания печени, онкологического заболевания мочевого пузыря, онкологического заболевания почки, онкологического заболевания почечной лоханки, онкологического заболевания полости рта, онкологического заболевания глотки, онкологического заболевания тела матки и меланомы.

В некоторых аспектах данное изобретение предлагает способы лечения аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, включающие введение конъюгата антитело-лекарственное средство по данному изобретению или его фармацевтической композиции. В некоторых вариантах реализации аутоиммунные заболевания или воспалительное заболевание выбирают из аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, опосредованных В-клетками, например, системной красной волчанки (СКВ), ревматоидного артрита (РА), идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), гипергаммаглобулинемии Вальденстрема, синдрома Шегрена, рассеянного склероза (РС) или волчаночного нефрита.

Далее, конфигурации данного раскрытия будут подробно описаны с помощью примеров, но следующие примеры предназначены только для помощи в понимании данного раскрытия. Объем данного раскрытия не ограничивается ими. Кроме того, если специально не указано иное, реагент, растворитель и исходный материал, описанные в описании, могут быть легко получены от коммерческого поставщика.

ПРИМЕР

В таблице ниже перечислены сокращения, используемые в следующих примерах:

Сокращенное название	Ссылка
Ac	ацетил
AcOH	уксусная кислота
водн.	водный
Bn	бензил
насыщенный	насыщенный водный раствор хлорида натрия

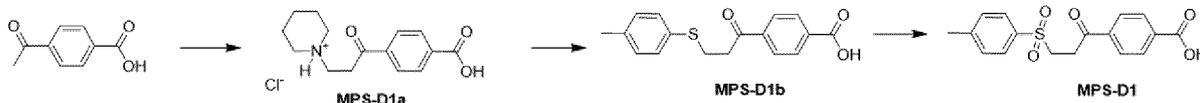
водный раствор хлорида натрия	
Boc	<i>трет</i> -бутоксикарбонил
Cbz	бензилоксикарбонил
DBU	1,8-диазабицикло[5,4,0]ундец-7-ен
ДХМ	дихлорметан
DIC	<i>N, N'</i> -диизопропилкарбодиимид
DIPEA	<i>N, N</i> -диизопропилэтиламин
DMAP	4-(диметиламино)пиридин
DMФА	<i>N, N</i> -диметилформаид
DMCO	диметилсульфоксид
EDC	<i>N</i> -(3-диметиламинопропил)- <i>N'</i> -этилкарбодиимид
Et	этил
Et ₂ O	диэтиловый эфир
EtOAc	этилацетат
EtOH	этиловый спирт
HBTU	О-(бензотриазол-1-ил)- <i>N, N, N', N'</i> -тетраметилурония гексафторфосфат
Hex	н-гексан
HOBT	1-гидроксибензотриазол
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
Me	Метил
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол
MMAE	монометилауристатин E
MMAF	монометилауристатин F
MMAF-OMe	метиловый эфир монометилауристатина F
<i>i</i> -PrOH	изопропанол
RuBOP	(бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторфосфат
TBAF	фторид тетрабутиламмония
TBS	<i>трет</i> -бутилдиметилсилил
ТГФ	тетрагидрофуран
ТФУ	трифторуксусная кислота

Ts	<i>para</i> -толуолсульфонил
масс.	по массе

Примеры

Пример 1. Синтез производных MPS

Пример 1.1. Получение MPS-D1



Получение соединения MPS-D1a

К раствору 4-ацетилбензойной кислоты (9 г, 54,82 ммоль) в EtOH (50 мл) добавляли гидрохлорид пиперидина (6,66 г, 54,82 ммоль), параформальдегид (4,95 г, 164,5 ммоль), и конц. HCl (0,6 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂. смесь перемешивали при 100 °С в течение 16 часов и после этого охлаждали до комнатной температуры и добавляли ацетон (90 мл) по каплям. Смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 часа. Твердое вещество отфильтровывали и промывали диэтиловым эфиром (30 мл X 2) получая соединение MPS-D1a (6,11 г, 38%).

¹H ЯМР (400 Гц, DMSO-d₆) δ 8,08 (с, 4H), 5,73 (с, 1H), 3,65 (т, J=7,2 Гц, 2H), 3,35 (т, J=7,2 Гц, 2H), 3,31 (м, 6H), 1,74 (с, 4H).

Получение соединения MPS-D1b

К раствору MPS-D1a (6,11 г, 20,52 ммоль) в EtOH (40 мл) и MeOH (26 мл) добавляли 4-метоксибензентиол (2,55 г, 20,52 ммоль) и пиперидин (0,3 мл, 3,08 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при 100 °С в течение 16 часов и охлаждали до 0 °С и дополнительно перемешивали в течение 1 часа. Твердое вещество отфильтровывали и промывали эфиром (30 мл X 2) получая соединение MPS-D1b (5,56 г, 90%).

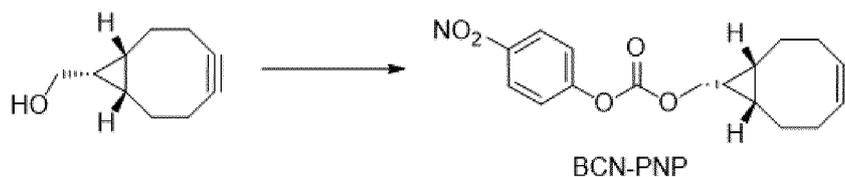
¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃) δ 8,04-7,99 (м, 4H), 7,27 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,15 (д, J=7,6 Гц, 2H), 3,39-3,36 (м, 2H), 3,25-3,21 (м, 2H), 2,27 (с, 3H).

Получение соединения MPS-D1

К раствору MPS-D1b (5,56 г, 18,51 ммоль) в MeOH (90 мл) и дистиллированной воде (90 мл) добавляли оксон (25,03 г, 40,72 ммоль) при 0 °С в атмосфере N₂. После перемешивания при комнатной температуре в течение 14 часов, реакцию останавливали дистиллированной водой (100 мл) и хлороформом (150 мл X 3). Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (200 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении получая соединение MPS-D1 (5,29 г, 86%).

¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃) δ 8,04-7,99 (м, 4H), 7,81 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,46 (д, J=8,4 Гц, 2H), 3,63 (т, J=7,2 Гц, 2H), 3,41 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,44 (с, 3H). ЭСИ-МС m/z: 333 (M⁺).

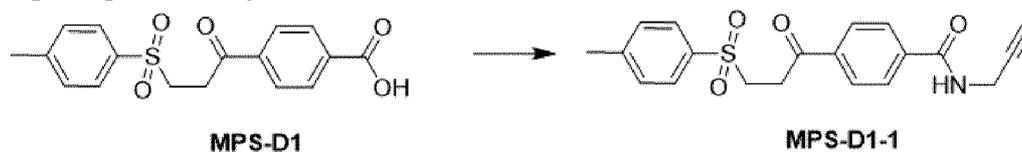
Пример 1.2. Получение BCN-PNP



(1R,8S,9S)-Бицикло[6,1,0]нон-4-ин-9-ил метанол (800 мг, 5,3 ммоль) растворяли в ДХМ (125 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂. Пиридин (1,22 мл, 15,9 ммоль) и 4-нитрофенилхлороформат (1,75 г, 8,74 ммоль) добавляли в смесь. После этого смесь перемешивали в течение 4 часов при той же температуре, реакцию останавливали добавлением насыщенного раствора NH₄Cl (100 мл) и экстрагировали ЭА (100 мл x 4). Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Hex: ЭА=10: 1) получая соединение BCN-PNP (1,34 г, 84%) в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ 8,29 (д, J=9 Гц, 2H), 7,39 (д, J=9 Гц, 2H), 4,41 (д, J=8,4 Гц, 2H), 2,36- 2,24 (м, 6H), 1,62- 1,55 (м, 2H), 1,53- 1,49 (м, 1H), 1,07 (т, J=10,2 Гц, 2H).

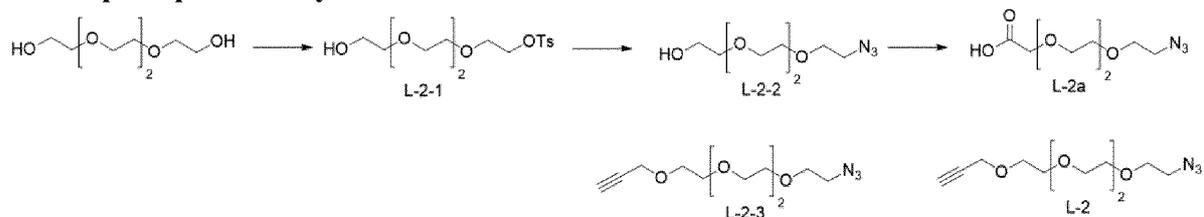
Пример 1.3. Получение MPS-D1-1



К раствору соединения MPS-D1 (500 мг, 1,50 ммоль) в ДМФА (8 мл) добавляли пропаргиламин (106 мл, 1,65 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли RuVor (1,17 г, 2,26 ммоль) и DIPEA (524 мл, 3,01 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов и разбавляли ЭА (30 мл × 2) и дистиллированной водой (20 мл). Органический слой экстрагировали и промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией получая соединение MPS-D1-1 (510 мг, 92%).

¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃) δ 9,11 (т, J=5,2 Гц, 1H), 7,98-7,89 (м, 4H), 7,79 (д, J=8,0 Гц, 2H), 7,43 (д, J=8,4 Гц, 2H), 4,05-4,03 (м, 2H), 3,60 (т, J=7,6 Гц, 2H), 3,39 (т, J=7,2 Гц, 2H), 3,12 (с, 1H), 2,38 (с, 3H).

Пример 1.4. Получение L-2 и L-2a



Соединение L-2 синтезировали аналогично синтетическому пути, описанному в Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry, 2012, 50(19), 3986-3995, включенной в виде ссылки.

Получение соединения L-2-1

Выход 30%

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,80 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,34 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 4,16 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 3,74-3,58 (м, 14H), 2,45 (с, 3H).

Получение соединения L-2-2

Выход 68%

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 3,74-3,61 (м, 14H), 3,40 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 2,45 (т, $J=6,0$ Гц, 2H).

Получение соединения L-2-3

Выход 63%

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 4,21 (д, $J=2,4$ Гц, 2H), 3,72-3,67 (м, 14H), 3,39 (т, $J=5,2$ Гц, 2H), 2,43 (т, $J=2,4$ Гц, 1H).

Получение соединения L-2

Выход 76%

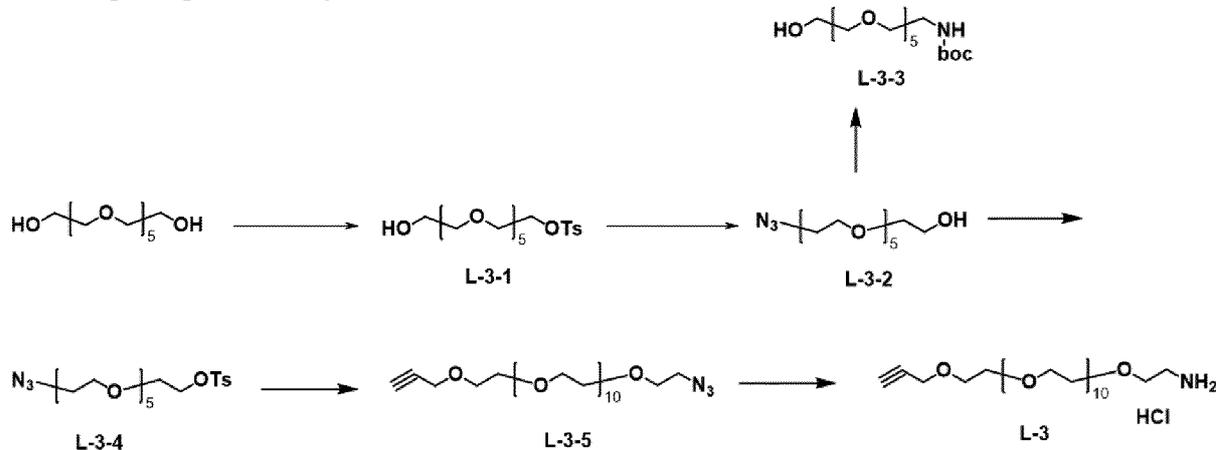
^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 4,20 (д, $J=2,4$ Гц, 2H), 3,71-3,61 (м, 12H), 3,51 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 2,87 (т, $J=5,6$ Гц, 2H), 2,43 (т, $J=2,4$ Гц, 1H).

Получение соединения L-2a

К раствору соединения L-2-2 (3,0 г, 13,7 ммоль) в ацетоне (100 мл) при 0 °С в атмосфере N_2 добавляли реагент Джонса (20 мл) и смесь перемешивали в течение 4 часов. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток экстрагировали ДХМ (50 мл \times 2) и дистиллированной водой (15 мл). Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией получая соединение L-2a (2,8 г, 88%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 4,22-4,14 (м, 2H), 3,80-3,64 (м, 10H), 3,42 (т, $J=4,4$ Гц, 2H).

Пример 1.5. Получение L-3



Получение соединения L-3-1

К раствору гексаэтиленгликоля (5,0 г, 17,71 ммоль) в безводном ДХМ (178 мл) добавляли KI (294 мг, 1,77 ммоль) и Ag_2O (4,92 г, 19,48 ммоль) в атмосфере N_2 . Смесь

перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции, смесь фильтровали через Целит® и промывали ДХМ (100 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией получая соединение L-3-1 (5,98 г, 73%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,80 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,35 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 4,16 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 3,71-3,58 (м, 22H), 2,88 (уш, 1H), 2,45 (с, 3H).

Получение соединения L-3-2

К раствору соединения L-3-1 (5,98 г, 13,7 ммоль) в ДМФА (30 мл) добавляли NaN_3 (1,34 г, 20,55 ммоль) в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 110°C в течение 1 ч и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией получая соединение L-3-2 (4,1 г, 97%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 3,72- 3,60 (м, 22H), 3,39 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 2,78 (уш, 1H).

Получение соединения L-3-3

5% Pd/C (1,04 г, 0,49 ммоль) добавляли в перемешиваемый раствор L-3-2 (1,0 г, 3,25 ммоль) в EtOH (5 мл) при комнатной температуре. Газообразный водород пробулькивали через реакционную смесь в течение 4 ч. Смесь фильтровали через Целит® для удаления Pd/C, и концентрировали при пониженном давлении. После этого остаток растворяли в ДХМ (25 мл), и к смеси добавляли VOCl_2 (852,1 мг, 3,9 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией получая соединение L-3-3 (330 мг, 28%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 5,19 (уш.с., 1H), 3,73 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 3,67 (с, 12H), 3,63-3,60 (м, 6H), 3,54 (т, $J=5,2$ Гц, 2H), 3,34- 3,27 (м, 1H), 1,44 (с, 9H).

ЭСИ-МС m/z : 382 (M^++1).

Получение соединения L-3-4

Соединение L-3-2 (1,9 г, 6,18 ммоль) растворяли в ДХМ (20 мл) в атмосфере N_2 . В смесь добавляли триэтиламин (2,0 мл, 14,22 ммоль) и $p\text{-TsCl}$ (2,4 г, 12,36 ммоль), и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции, смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией получая соединение L-3-4 (2,58 г, 91%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,80 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,35 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 4,16 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 3,70- 3,61 (м, 16H), 3,56 (с, 1H), 3,39 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 2,45 (с, 3H).

ЭСИ-МС m/z : 462 (M^++1).

Получение соединения L-3-5

В гомогенный раствор L-2 (1,1 г, 3,4 ммоль) в безводном ТГФ (30 мл) в атмосфере N_2 добавляли NaN (60% дисперсия в минеральном масле, 135 мг, 3,4 ммоль) и смесь охлаждали до 0°C . После того, как смесь перемешивали при 0°C в течение 20 мин, в нее добавляли L-3-4 (1,56 г, 3,4 ммоль). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали ее в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали, реакцию останавливали MeOH (5 мл) и смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток

очищали колоночной хроматографией получая соединение L-3-5 (1,91 г, 93%).

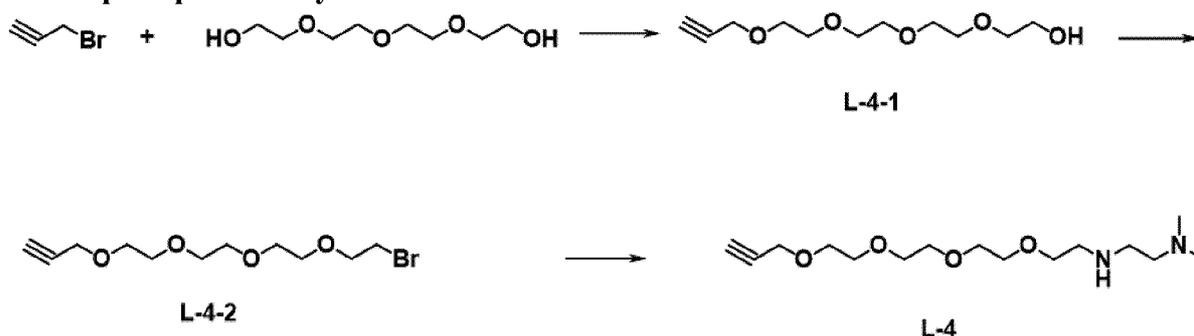
ЭСИ-МС m/z : 610 ($M^+ + 1$).

Получение соединения L-3

При 0 °С, к раствору соединения L-3-5 (906,7 мг, 1,49 ммоль) в ЭА (4 мл) и эфире (4 мл) в атмосфере N₂ медленно добавляли 5% раствор HCl (8 мл) и трифенилфосфин (390 мг, 1,49 ммоль). Смесь перемешивали при 0 °С в течение ночи. Смесь разбавляли ДХМ (10 мл). Водный слой экстрагировали ДХМ (10 мл × 3). Водную фазу концентрировали в высоком вакууме получая соединение L-3 (495 мг, 54%).

ЭСИ-МС m/z : 584 ($M^+ + 1$).

Пример 1.6. Получение L-4



Получение соединения L-4-1

При -20 °С в атмосфере N₂, к раствору KOtBu (943 мг, 8,41 ммоль) в сухом ТГФ (50 мл) добавляли тетраэтиленгликоль (4,35 мл, 25,22 ммоль) и затем пропаргилбромид (1,0 г, 8,41 ммоль). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 17 часов. Реакцию останавливали добавлением MeOH (1 мл) и H₂O (50 мл) с охлаждением в ледяной бане и смесь экстрагировали ЭА (100 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией получая соединение L-4-1 (1,46 г, 75%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,26- 4,20 (м, 2H), 3,78- 3,60 (м, 16H), 2,42- 2,40 (м, 1H).

Получение соединения L-4-2

К раствору CBr₄ (1,43 г, 4,31 ммоль) в безводном ДХМ (20 мл), охлажденному в водяной бане добавляли трифенилфосфин (1,13 г, 4,31 ммоль) с последующим добавлением L-4-1 (500 мг, 2,15 ммоль). Смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 18 часов. Реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали ДХМ (100 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией получая соединение L-4-2 (410 мг, 65%).

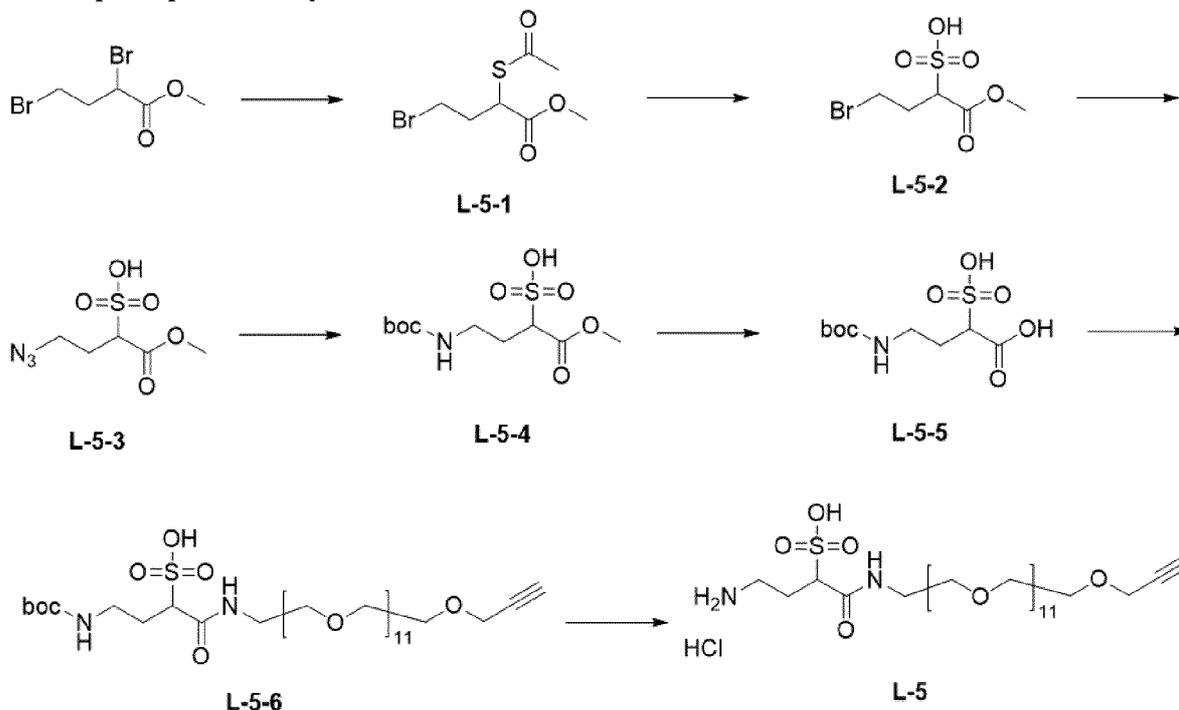
¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃) δ 4,21 (с, 2H), 3,82 (т, J=6,4 Гц, 2H), 3,74- 3,64 (м, 12H), 3,45 (т, J=6,4 Гц, 2H), 2,45- 2,42 (м, 1H).

Получение соединения L-4

К раствору соединения L-4-2 (300 мг, 1,02 ммоль) в ДМФА (10 мл) добавляли N, N-диметилендиамин (555 мкл, 5,08 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. После завершения реакции, смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией получая соединение L-4 (218 мг, 71%).

ЭСИ-МС m/z: 303 (M⁺).

Пример 1.7. Получение L-5



Получение соединения L-5-1

К гомогенному раствору метил-2,4-дибромбутирата (10 г, 38,47 ммоль) в безводном ТГФ (100 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли по каплям смесь тиоуксусной кислоты (2,75 мл, 38,47 ммоль, 1,0 экв.) и DIPEA (8,5 мл, 48,9 ммоль, 1,3 экв.) в безводном ТГФ (50 мл) в течени 1,5 ч. После перемешивания в течение 4 часов при -20°C в атмосфере N₂, смесь концентрировали, разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали ЭА (200 мл × 3). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Hex : ЭА=12 : 1) получая соединение L-5-1 (9,67 г, 98%) в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ 4,38 (т, J=7,6 Гц, 1H), 3,46-3,39 (м, 2H), 2,56- 2,47 (м, 1H), 2,36 (с, 3H), 2,32- 2,23 (м, 1H).

Получение соединения L-5-2

К раствору L-5-1 (9,67 г, 37,90 ммоль) в AcOH (80 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли 35% пероксид водорода (40 мл). Смесь перемешивали в течение ночи, и затем концентрировали, разбавляли водой (20 мл), нейтрализовали NaHCO₃ и промывали ЭА/Hex (1/1, 30 мл X 2). Водный слой концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (ДХМ: MeOH: AcOH=8: 1: 0,01

до 5: 1: 0,01) получая соединение L-5-2 (7,0 г, 71%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (600 МГц, D_2O) δ 4,11 (дд, $J=5,4$, 4,8 Гц, 1H), 3,82 (с, 3H), 3,65- 3,62 (м, 1H), 3,52- 3,47(м, 1H), 2,62- 2,48 (м, 2H).

Получение соединения L-5-3

К раствору L-5-2 (7,0 г, 26,81 ммоль) в ДМФА (20 мл) добавляли NaN_3 (4,5 г, 69,71 ммоль, 2,6 экв) в атмосфере N_2 , и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции, смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (ДХМ: MeOH: AcOH=7: 1: 0,01 до 5: 1: 0,01) получая соединение L-5-3 (5,4 г, 90%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (600 МГц, D_2O) δ 3,82 (дд, $J=4,2$, 6,0 Гц, 1H), 3,63 (с, 3H), 3,36- 3,26 (м, 2H), 2,29- 2,02 (м, 2H).

Получение соединения L-5-4

В 50 мл круглодонную колбу добавляли L-5-3 (500 мг, 2,24 ммоль), 10 мл MeOH, 5% Pd/C (715мг, 0,34 ммоль, 0,15 экв.) и Woc_2O (538 мг, 2,46 ммоль, 1,1 экв). После удаления воздуха, смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере H_2 в течение 15 ч. Катализатор отфильтровали с помощью Целита® и Целит® промывали MeOH (20 мл x 2). Растворитель удаляли на роторном испарителе, и остаток очищали колоночной хроматографией (ДХМ: MeOH: AcOH=7: 1: 0,01 до 5: 1: 0,01) получая соединение L-5-4 (450,2 мг, 68%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (600 МГц, DMSO-d_6) δ 6,79 (с, 1H), 4,13 (уш.с., 1H), 3,55 (с, 3H), 2,88- 2,80 (м, 2H), 1,96- 1,88 (м, 2H), 1,3 6(с, 9H).

Получение соединения L-5-5

К гомогенному раствору L-5-4 (100 мг, 0,34 ммоль) в ТГФ/вода (4 мл/8 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли LiOH (21,2 мг, 0,50 ммоль, 1,5 экв.) и смесь перемешивали в течение 8 часов. Реакционную смесь нейтрализовали 2N раствором HCl и концентрировали при пониженном давлении. Соединение L-5-5 использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

ЭСИ-МС m/z: 284 (M^++1).

Получение соединения L-5-6

Гомогенный раствор L-5-5 (0,34 ммоль), N-гидроксисукцинимид (77,4 мг, 0,67 ммоль, 2,0 экв.) и EDCI-HCl (260,7 мг, 1,36 ммоль, 4,0 экв.) в ДМФА (2 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 перемешивали в течение ночи. Смесь обрабатывали L-3 (210,8 мг, 0,34 ммоль, 1,0 экв.), DIPEA (177,6 мкл, 1,02 ммоль, 3,0 экв.) и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (ДХМ: MeOH: AcOH=12: 1: 0,01 до 5: 1: 0,01) получая соединение L-5-6 (159,1 мг, 55%) в виде желтого масла.

ЭСИ-МС m/z: 850 (M^++1).

Получение соединения L-5

К гомогенному раствору L-5-6 (100 мг 0,12 ммоль) в 1,4-диоксане (2 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли конц. HCl (500 мкл) и смесь

^1H ЯМР (600 МГц, CDCl_3) δ 5,24 (с, 1H), 4,53-4,49 (м, 1H), 3,75 (с, 3H), 2,45 (с, 3H), 4,41-4,31 (м, 2H).

Получение соединения L-6-3

К L-6-2 (1,2 г, 4,33 ммоль) в AcOH (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли 35% пероксид водорода (4 мл). Смесь перемешивали в течение 7 часов, затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли водой (5 мл) и подщелачивали насыщенным водным раствором NaHCO_3 при 0°C до pH 9. Добавляли Vos_2O (1,4 г, 6,49 ммоль, 1,5 экв.) и полученную смесь перемешивали в течение ночи. Смесь нейтрализовали 2 н HCl при 0°C и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (ДХМ: MeOH : AcOH =от 8: 1: 0,01 до 5: 1: 0,01) с получением соединения L-6-3 (521,5 мг, 42%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 6,96 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 4,20 (кв., $J=6,8$, 4,8 Гц, 1H), 3,58 (с, 3H), 2,84 (дд, $J=14$, 6,4 Гц, 1H), 2,76 (дд, $J=9,2$, 4,4 Гц, 1H), 1,37 (с, 9H).

Получение соединения L-6-4

К гомогенному раствору L-6-3 (71 мг, 0,25 ммоль) в ТГФ/ H_2O (2,0 мл/4,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли LiOH (17,3 мг, 0,41, 1,5 экв.) и перемешивали в течение 3 часов. Смесь нейтрализовали 2 н HCl при 0°C и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения L-6-4 (67 мг, 99%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 6,40 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 3,96 (кв., $J=6,4$, 5,6 Гц, 1H), 2,88-2,78 (н, 2H), 1,36 (с, 9H).

Получение соединения L-6-5

L-6-4 (35 мг, 0,13 ммоль), N-гидроксисукцинимид (22,4 мг, 0,19 ммоль, 1,5 экв.) и EDCI-HCl (50 мг, 0,26 ммоль, 2,0 экв.) растворяли в ДМФА (2 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . После перемешивания смеси в течение ночи, соединение L-6-5 использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

ИЭР-МС m/z : 367 (M^++1).

Получение соединения L-6-6

К перемешиваемому раствору L-6-5 (0,13 ммоль) в ДМФА (2 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли L-2 (0,19 ммоль, 1,5 экв.) и EDCI-HCl (50 мг, 0,26 ммоль, 2,0 экв.). Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После того как полученную смесь концентрировали при пониженном давлении, остаток очищали колоночной хроматографией (ДХМ: MeOH : AcOH =от 12: 1: 0,01 до 5: 1: 0,01) с получением соединения L-6-6 (34,8 мг, 64%) в виде желтого масла.

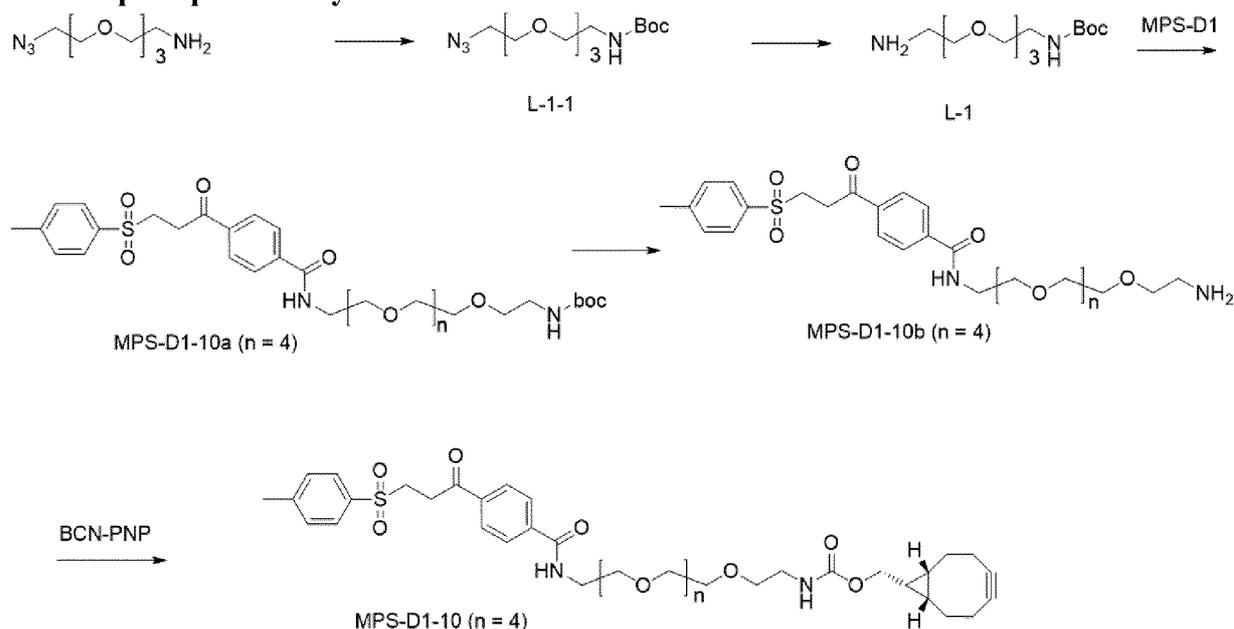
ИЭР-МС m/z : 483 (M^++1).

Получение соединения L-6

Конц- HCl (300 мкл) добавляли к перемешиваемому раствору L-6-6 (29,6 мг, 0,061 ммоль) в 1,4-диоксане (1,2 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 и смесь перемешивали в течение 30 минут. Смесь концентрировали при пониженном давлении с получением соединения L-6 (25,4 мг, 99%) в виде желтого масла.

ИЭР-МС m/z : 382 ($M^+ + 1$).

Пример 1.9. Получение MPS-D1-10



Получение соединения L-1-1

К прозрачному раствору 11-азидо-3,6,9-триоксаундекан-1-амина (Aldrich, CAS 134179-38-7, 5,0 г, 22,9 ммоль) в 1,4-диоксане (100 мл) и H_2O (25 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли $NaHCO_3$ (3,8 г, 45,8 ммоль, 2,0 экв.) и BOC_2O (6,0 г, 27,5 ммоль, 1,2 экв.) и затем перемешивали в течение 6 часов. В реакционную смесь добавляли воду (50 мл) и экстрагировали ДХМ (100 мл x 3). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (от 1% до 3% $MeOH$ в ДХМ) с получением соединения L-1-1 (7,2 г, 99%) в виде бесцветного масла.

1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 5,03 (уш.с., 1H), 3,72-3,60 (м, 10H), 3,98-3,52 (м, 1H), 3,43-3,36 (м, 1H), 3,35-3,24 (м, 1H), 1,26 (с, 9H).

ИЭР-МС m/z : 319 ($M^+ + 1$).

Получение соединения L-1

К прозрачному раствору L-1-1 (7,2 г, 22,6 ммоль) в ТГФ (30 мл), эфира (15 мл) и H_2O (15 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли трифенилфосфин (6,5 г, 24,9 ммоль, 1,1 экв.), а затем перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли водой (10 мл) и экстрагировали ДХМ (60 мл x 3). Водный слой концентрировали при пониженном давлении с получением соединения L-1-1 (6,3 г, 95%) в виде бесцветного масла.

ИЭР-МС m/z : 293 ($M^+ + 1$)

Соединение MPS-D1-10a синтезировали способом, аналогичным способу получения соединения MPS-D1-1 из примера 2.

Получение соединения MPS-D1-10a

Выход 71%, светло-желтое масло

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,99-7,93 (м, 4H), 7,83 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,39 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,30 (уш.с., 1H), 5,01 (уш.с., 1H), 3,74-3,46 (м, 26H), 3,34-3,26 (м, 2H), 2,46 (с, 3H), 1,43 (с, 9H); ИЭР-МС m/z : 695 (M^++1).

Соединение MPS-D1-10b синтезировали способом, аналогичным способу получения соединения L-6 в примере 1,8.

Получение соединения MPS-D1-10b

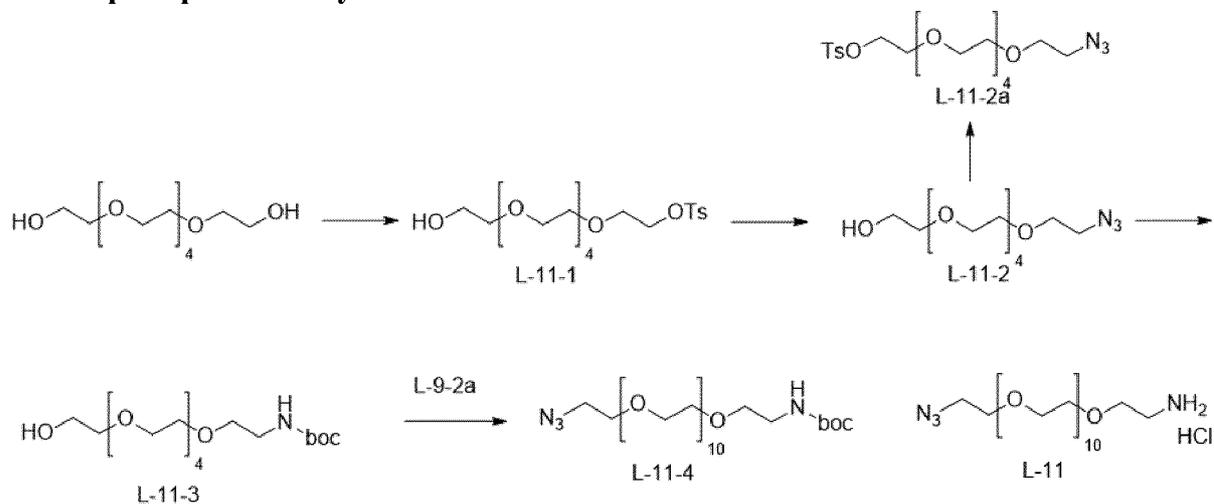
Выход 99%, светло-желтое масло.

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMFSO}-d_6$) δ 8,74 (т, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,98 (дд, $J=12, 8,4$ Гц, 2H), 7,82 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,46 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,68-3,36 (м, 24H), 3,01-2,94 (м, 2H), 2,22 (с, 3H); ИЭР-МС m/z : 595 (M^++1).

Получение соединения MPS-D1-10

К гомогенному раствору MPS-D1-10b (63 мг, 0,10 ммоль) и BSN-PNP (31,5 мг, 0,10 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДМФА (2,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли DIPEA (52 мкл, 0,3 ммоль, 3 экв.) и HBTU (57 мг, 0,15 ммоль, 1,5 экв.), и перемешивали в течение 2 часов. В реакционную смесь добавляли H_2O (20 мл) и экстрагировали ЭА (30 мл X 3). Объединенный органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (10 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ТСХ с получением соединения MPS-D1-10 (57 мг, 74%). ИЭР-МС m/z : 771 (M^++1).

Пример 1.10. Получение L-11



Получение соединения L-11-1

К раствору гексаэтиленгликоля (5,0 г, 17,71 ммоль) в безводном ДХМ (178 мл) добавляли KI (294 мг, 1,77 ммоль), Ag_2O (4,92 г, 19,48 ммоль) и п-TsCl (3,7 г, 19,48 ммоль) в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции смесь фильтровали через Целите®, слой на Целите® промывали ДХМ (100 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения L-11-1 (5,98 г, 73%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,80 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,35 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 4,16 (т,

$J=4,8$ Гц, 2H), 3,71-3,58 (м, 22H), 2,88 (уш., 1H), 2,45 (с, 3H).

Получение соединения L-11-2

К раствору соединения L-11-1 (5,98 г, 13,7 ммоль) в ДМФА (30 мл) добавляли NaN_3 (1,34 г, 20,55 ммоль) в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 110°C в течение 1 часа и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения L-11-2 (4,1 г, 97%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 3,72-3,60 (м, 22H), 3,39 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 2,78 (уш., 1H).

Получение соединения L-11-2а

Соединение L-11-2 (1,9 г, 6,18 ммоль) растворяли в ДХМ (20 мл) в атмосфере N_2 и к нему добавляли триэтиламин (2,0 мл, 14,22 ммоль) и $p\text{-TsCl}$ (2,4 г, 12,36 ммоль), и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После завершения реакции, смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения L-11-2а (2,58 г, 91%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,80 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,35 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 4,16 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 3,70-3,61 (м, 16H), 3,56 (с, 1H), 3,39 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 2,45 (с, 3H).

ИЭР-МС m/z : 462 (M^++1).

Получение соединения L-11-3

К раствору соединения L-11-2 (1,0 г, 3,25 ммоль) в EtOH (5 мл) добавляли 5% Pd/C (1,04 г, 0,49 ммоль) в атмосфере H_2 . Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Смесь фильтровали через Целите® для удаления Pd/C, и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в ДХМ (25 мл). Добавляли VOCl_2 (852,1 мг, 3,9 ммоль) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения L-11-3 (330 мг, 28%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 5,19 (уш.с., 1H), 3,73 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 3,67 (с, 12H), 3,63-3,60 (м, 6H), 3,54 (т, $J=5,2$ Гц, 2H), 3,34-3,27 (м, 1H), 1,44 (с, 9H).

ИЭР-МС m/z : 382 (M^++1).

Получение соединения L-11-4

К гомогенному раствору соединения L-11-3 (450 мг, 1,18 ммоль) в безводном ТГФ (10 мл) в атмосфере N_2 при 0°C добавляли NaH (60% дисперсия в минеральном масле, 47,2 мг, 1,18 ммоль), затем смесь перемешивали при 0°C в течение 20 минут, к ней добавляли L-11-2а (544,5 мг, 1,18 ммоль). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционной смеси давали остыть, добавляли MeOH (5 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения L-11-4 (582,9 мг, 74%).

Получение соединения L-11

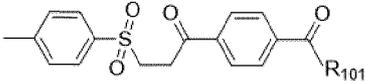
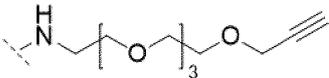
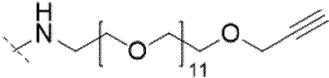
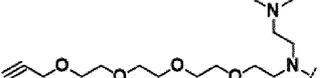
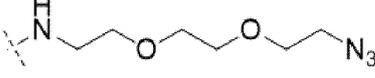
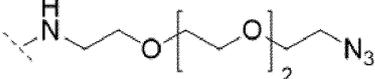
К раствору соединения L-11-4 (582,9 мг, 0,87 ммоль) в ДХМ (3 мл) добавляли 4M- HCl (в 1,4-диоксане, 1 мл) при 0°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Смесь концентрировали с получением соединения L-11

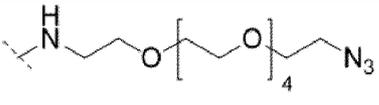
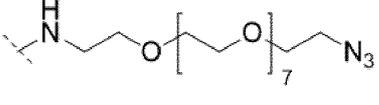
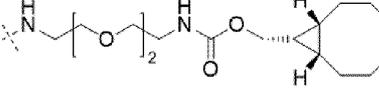
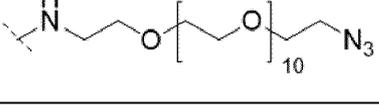
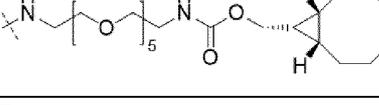
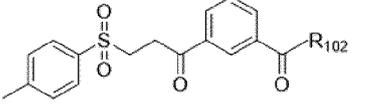
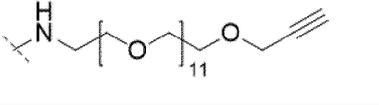
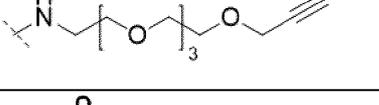
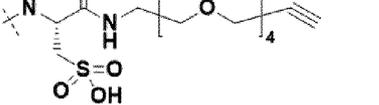
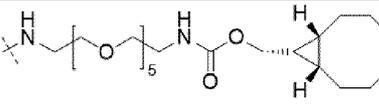
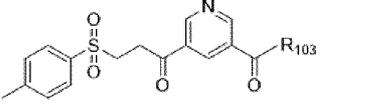
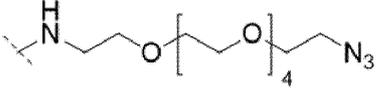
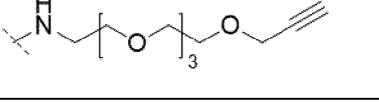
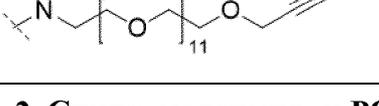
(527,6 мг, количественный показатель).

ИЭР-МС m/z : 571 ($M^+ + 1$).

В приведенной ниже Таблице 2 перечислены соединения, которые были синтезированы аналогичным способом синтеза, как описано в Примере 2.

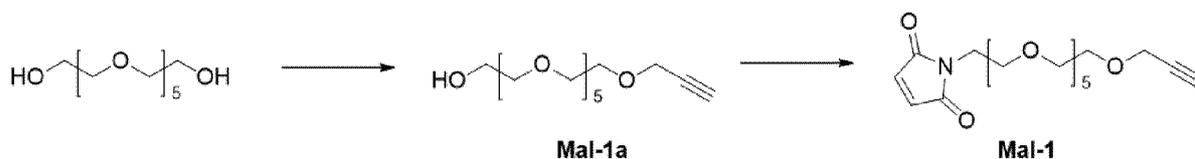
Таблица 2

	R₁₀₁ в соединении 	Характеристики данных
MPS-D1-2		Выход 80%; ¹ H ЯМР (400 Гц, CDCl ₃) δ 8,11-7,94 (м, 4H), 7,83 (д, J=7,6 Гц, 2H), 7,44 (уш.с., 1H), 7,38 (д, J=8,0 Гц, 2H), 4,15 (с, 2H), 3,69-3,65 (м, 14H), 3,58-3,48(м, 4H), 2,80 (с, 1H), 2,46(с, 3H). ИЭР-МС m/z : 546 ($M^+ + 1$).
MPS-D1-3		Выход 72% ИЭР-МС m/z : 899(M^+)
MPS-D1-4	 MPS-D1-4	Выход 48% ИЭР-МС m/z : 617(M^+)
MPS-D1-5		Выход 53%, светло-желтое твердое вещество ¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 7,98 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,88 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,83 (д, J=8,0 Гц, 2H), 7,38 (д, J=8,0 Гц, 2H), 6,75 (уш.с., 1H), 3,74-3,66 (м, 10H), 3,58-3,48 (м, 4H), 3,37 (т, J=5,2 Гц, 2H), 2,46 (с, 3H); ИЭР-МС m/z : 489 ($M^+ + 1$).
MPS-D1-6		Выход 52%, желтое твердое вещество ¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 7,98 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,90 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,83 (д, J=8,0 Гц, 2H), 7,38 (д, J=8,0 Гц, 2H), 6,93 (уш.с., 1H), 3,74-3,62 (м, 14H), 3,58-3,47 (м, 4H), 3,34 (т, J=5,2 Гц, 2H), 2,46 (с, 3H); ИЭР-МС m/z : 533 ($M^+ + 1$).

MPS-D1-7		Выход 84%, светло-желтое масло ИЭР-МС m/z: 621 (M ⁺ +1).
MPS-D1-8		Выход 53%, желтое масло ИЭР-МС m/z: 753 (M ⁺ +1).
MPS-D1-9		Выход 82%, светло-желтое масло. ИЭР-МС m/z: 639 (M ⁺ +1).
MPS-D1-11		Выход 67%. ИЭР-МС m/z: 886 (M ⁺ +1).
MPS-D1-12		Выход 74%, ИЭР-МС m/z: 771 (M ⁺ +1).
	R₁₀₂ в соединении 	Характеристики данных
MPS-D2-1		Выход 36%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 898(M ⁺)
MPS-D2-2		Выход 60%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 546 (M ⁺ +1).
MPS-D2-3		Выход 20% в виде желтого масла; ИЭР-МС m/z: 1064(M ⁺)
MPS-D2-4		Выход 383%; ИЭР-МС m/z: 771(M ⁺)
	R₁₀₃ в соединении 	Характеристики данных
MPS-D3-1		Выход 13%, желтоватое масло. ИЭР-МС m/z: 622 (M ⁺ +1).
MPS-D3-2		Выход 22%. ИЭР-МС m/z: 547 (M ⁺).
MPS-D3-3		Выход 26%. ИЭР-МС m/z: 900 (M ⁺).

Пример 2. Синтез малеимид- и POS-производных

Пример 2.1. Получение Mal-1



Соединение L-4 было синтезировано аналогичным синтетическим путем, как описано в *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(19), 5816-5825; 2009, включенной в данный документ в качестве ссылки.

Получение соединения Mal-1a

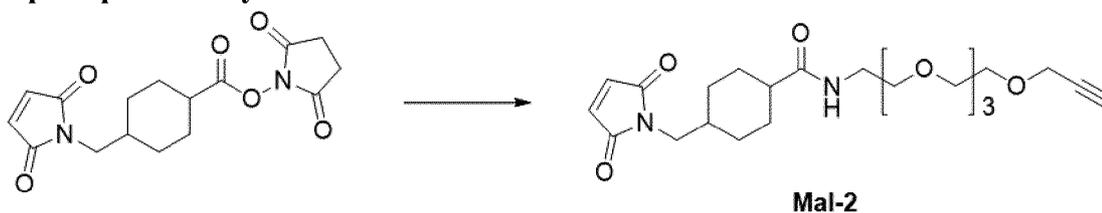
Выход 55%

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 4,21 (д, $J=2,0$ Гц, 2H), 3,72-3,60 (м, 24H), 2,79 (уш.с., 1H), 2,43 (т, $J=2,4$ Гц, 1H).

Получение соединения Mal-1

ИЭР-МС m/z : 400(M^+)

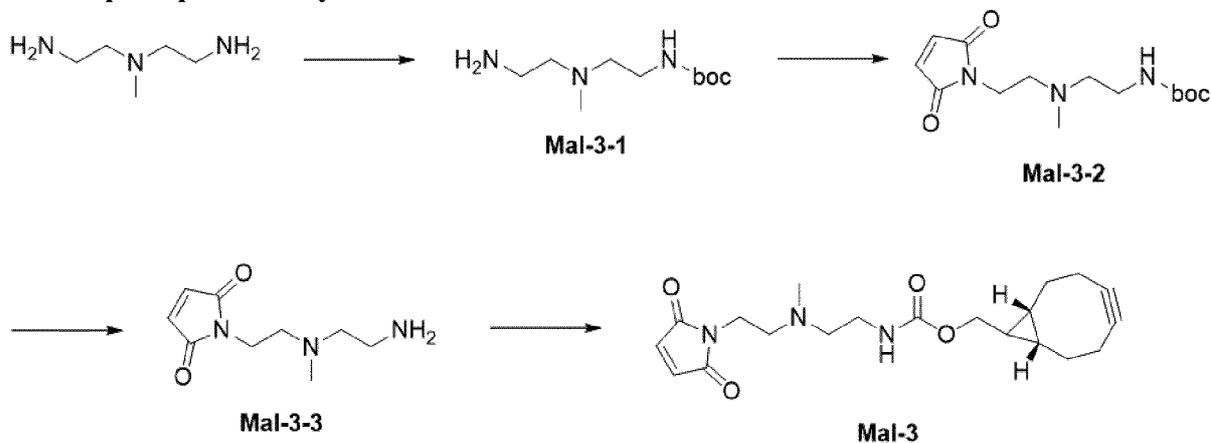
Пример 2.2. Получение Mal-2



К гомогенному раствору N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-карбоксилата (85,5 мг, 0,26 ммоль) и L-2 (75,3 мг, 0,28 ммоль) в сухом ДХМ при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли DIPEA (44,5 мкл, 0,26 ммоль, 1 экв.) и перемешивали при комнатной температуре в течение 45 минут. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (32 мл) и промывали 1 н HCl (30 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (30 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением указанного в заголовке соединения L-5 (70,8 мг, 61%, смесь 9 мг) в виде белой смолы.

ИЭР-МС m/z : 451(M^+)

Пример 2.3. Получение Mal-3



Получение соединения Mal-3-1

К раствору VOCl_2 (9,6 г, 44,0 ммоль) в ТГФ (50 мл) при 0 °С добавляли 2,2'-диамино-N-метилдиэтиламин (10,3 г, 88,0 ммоль) в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. В смесь вливали H_2O (100 мл) и ДХМ (150 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке с получением соединения Mal-3-1 (3,3 г, 35%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 5,04 (уш.с., 1H), 3,26-3,16 (м, 2H), 2,78 (т, J =6,0 Гц, 2H), 2,47 (т, J =6,0 Гц, 2H), 2,43 (т, J =6,0 Гц, 2H), 2,22 (с, 3H), 1,45 (с, 9H).

Получение соединения Mal-3-2

К раствору Mal-3-1 (500 мг, 2,3 ммоль) в AcOH (3,0 мл) при комнатной температуре добавляли малеиновый ангидрид (248 мг, 2,53 ммоль) в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Смесь концентрировали при пониженном давлении, остаток растворяли в уксусном ангидриде (5,0 мл) при комнатной температуре. К реакционной смеси добавляли NaOAc (95,7 мг, 1,17 ммоль) и перемешивали в течение 5 часов при 75 °С. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке с получением соединения Mal-3-2 (415 мг, 60%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 6,70 (с, 2H), 3,63 (т, J =6,4 Гц, 2H), 3,18-3,10 (м, 2H), 2,57 (т, J =6,4 Гц, 2H), 2,48 (т, J =6,0 Гц, 2H), 2,24 (с, 3H), 1,44 (с, 9H).

ИЭР-МС m/z: 298(M^+).

Получение соединения Mal-3-3

К раствору соединения Mal-3-2 (370 мг, 1,24 ммоль) в ДХМ (4,0 мл) добавляли ТФК (3,0 мл) при 0 °С. Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 2,5 часов. Смесь концентрировали при пониженном давлении и использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (387 мг, количественно).

ИЭР-МС m/z: 198(M^+).

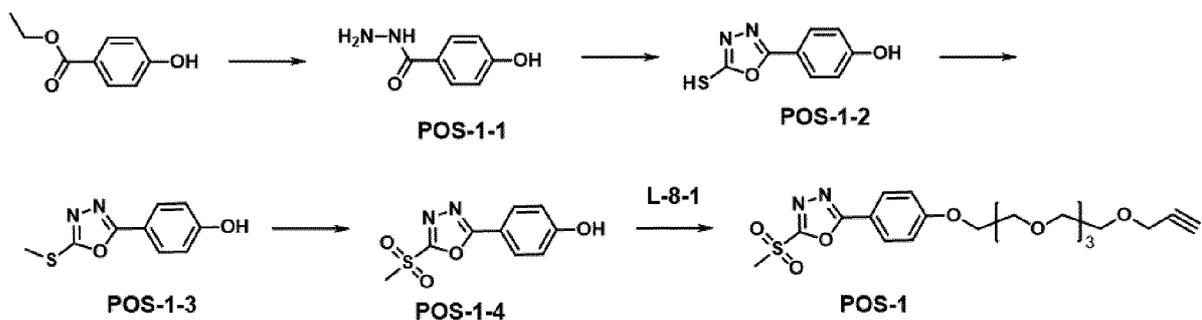
Получение соединения Mal-3

К раствору соединения Mal-3-3 (50 мг, 0,16 ммоль) и BCN-PNP (50,6 мг, 0,16 ммоль) в ДМФА (3,0 мл) добавляли DIPEA (57 мкл, 0,32 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали в течение 2,5 часов и добавляли ЭА (50 мл × 2) и H_2O (30 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Mal-3 (13,2 мг, 22%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 6,70 (с, 2H), 5,12 (уш.с., 1H), 4,14 (д, J =8,0 Гц, 2H), 3,63 (т, J =6,0 Гц, 2H), 3,24-3,18 (м, 2H), 2,58 (т, J =6,4 Гц, 2H), 2,50 (т, J =6,0 Гц, 2H), 2,30-2,20 (м, 9H), 1,28-1,22 (м, 3H), 0,98-0,94 (м, 1H).

ИЭР-МС m/z: 374(M^+).

Пример 2.4. Получение POS-1



Получение соединения POS-1-1

К раствору этил 4-гидробензоата (20 г, 120,35 ммоль) в EtOH (60 мл) добавляли $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (88 мл, 1805,4 ммоль) в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали в течение ночи при температуре кипения с обратным холодильником. Смесь охлаждали до комнатной температуры, и концентрировали при пониженном давлении, с последующим растиранием с EtOH, в результате чего получали соединение POS-1-1 (17,54 г, 9 6%).

^1H ЯМР (400 Гц, ДМСО- d_6) δ 9,50 (с, 1H), 7,68 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 6,78 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 4,37 (с, 2H). ИЭР-МС m/z : 431 (M^++1).

Получение соединения POS-1-2

К раствору соединения POS-1-1 (17,54 г, 115,28 ммоль) в EtOH (200 мл) и ДМФА (100 мл) добавляли CS_2 (45 мл, 749,32 ммоль) и KOH (6,5 г, 115,28 ммоль) в атмосфере N_2 . После перемешивания при 85 °C в течение 18 часов pH реакционной смеси довели до 4 добавлением 1M раствора HCl и разбавляли дистиллированной водой (500 мл) и ЭА (500 мл²). Органический слой промывали H_2O (500 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (500 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с эфиром/гексаном с получением соединения POS-1-2 (20,7 г, 93%).

^1H ЯМР (400 Гц, ДМСО- d_6) δ 10,44 (с, 1H), 7,72 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 6,94 (д, $J=8,0$ Гц, 2H). ИЭР-МС m/z : 195(M^++1).

Получение соединения POS-1-3

К раствору соединения POS-1-2 (5 г, 25,75 ммоль) в ТГФ (100 мл) по каплям добавляли Et_3N (4,3 мл, 30,9 ммоль) и MeI (1,76 мл, 28,33 ммоль) при 0 °C. После перемешивания при 0°C в течение 10 минут, смеси давали нагреться до комнатной температуры при перемешивании в течение 2 часов. Смесь разбавляли H_2O (150 мл) и экстрагировали ЭА (100 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с эфиром с получением соединения POS-1-3 (5,15 г, 96%).

^1H ЯМР (400 Гц, ДМСО- d_6) δ 7,80 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 6,94 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 2,74 (с, 3H). ИЭР-МС m/z : 209 (M^++1).

Получение соединения POS-1-4

К раствору соединения POS-1-3 (3,2 г, 15,37 ммоль) в EtOH (150 мл) добавляли 70% m-CPBA (11,4 г, 46,11 ммоль) при 0°C в атмосфере N_2 . После перемешивания при комнатной температуре в течение 5 часов дополнительно добавляли 70% m-CPBA (11,4 г,

46,11 ммоль). Затем смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и добавляли H₂O (500 мл), насыщенный NaHCO₃ (300 мл) и экстрагировали ЭА (500 мл X 2). Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с Гекс/ЭА=1:1 (100 мл) с получением соединения POS-1-4 (3,2 г, 89%).

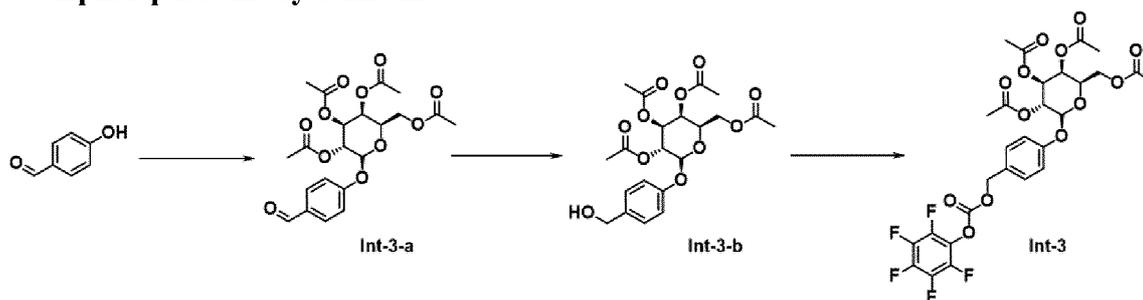
¹H ЯМР (400 Гц, ДМСО-d₆) δ 7,95 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,01 (д, J=8,8 Гц, 2H), 3,69 (4с, 3H). ИЭР-МС m/z: 241 (M⁺+1).

Получение соединения POS-1

К раствору POS-1-4 (310 мг, 1,29 ммоль) и L-8-1 (660 мг, 2,84 ммоль) в ТГФ (8 мл) и ДМФА (0,8 мл) добавляли PPh₃ (667 мг, 2,58 ммоль). Смесь охлаждали до 0°C и к ней добавляли DEAD (1,17 мл, 2,58 ммоль), и смесь перемешивали при 0°C в течение 3 часов. Смесь разбавляли водой (15 мл) и экстрагировали ЭА (15 мл × 2). Полученный органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения POS-1 (205 мг, 30%).

ИЭР-МС m/z: 455 (M⁺+1).

Пример 2.5. Получение Int-3



Получение соединения Int-3-a

К раствору Int-TG (18,5 г, 45,0 ммоль), 4-гидроксibenзальдегида (5,0 г, 40,9 ммоль) молекулярному сити (10,0 г) в ACN (150 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли Ag₂O (38,0 г, 0,164 моль) и перемешивали в течение 3 часов. Реакционную смесь фильтровали через слой целита и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Int-3-a (16,0 г, 86%)

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,93 (с, 1H), 7,86 (д, J=6,8 Гц, 2H). 7,11 (д, J=6,8 Гц, 2H), 5,52-5,47 (м, 2H), 5,18-5,14 (м, 2H), 4,24-4,11 (м, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,07(с, 6H), 2,02 (с, 3H).

Получение соединения Int-3-b

К раствору Int-3-a (540 мг, 1,19 ммоль) в безводном ТГФ (15 мл) при 0 °C в атмосфере N₂ добавляли NaBH₄ (113 мг, 2,98 ммоль) и перемешивали в течение 10 минут при 0 °C. После перемешивания в течение 4 часов при комнатной температуре, реакцию смесь разбавляли H₂O и ЭА. Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали

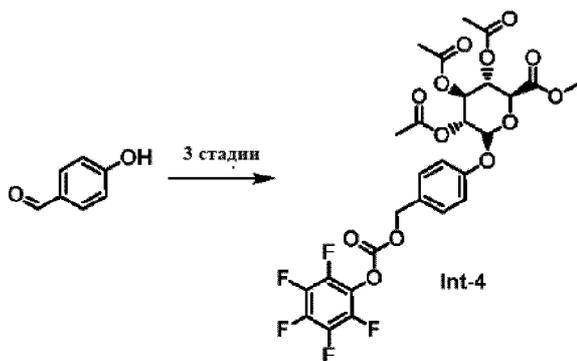
колоночной хроматографией (ЭА:Гекс=1:1) с получением соединения Int-3-b (430 мг, 79%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,30 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 6,99 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 5,51-5,54 (м, 2H), 5,11 (дд, $J=10,8$ Гц, 1H), 5,03 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 4,65 (д, $J=5,6$ Гц, 2H), 4,25-4,04 (м, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,07 (с, 3H), 2,06 (с, 3H), 2,01 (с, 3H).

Получение соединения Int-3

К раствору Int-3-b (1,0 г, 2,2 ммоль) в сухом ДМФА (6,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли бис(пентафторфенилкарбонат) (1,3 г, 3,3 ммоль) и перемешивали в течение 3 часов. Реакционную смесь экстрагировали ЭА (20 мл X2), H_2O (30 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали, концентрировали при пониженном давлении. Реакционную смесь очищали колоночной хроматографией с получением Int-3 (1,4 г, 98%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,384 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,039 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 5,529-5,465 (м, 2H), 5,280 (с, 2H), 5,141-5,068 (м, 2H), 4,262-4,070 (м, 4H), 2,195 (с, 3H), 2,078 (с, 3H), 2,073 (с, 3H), 2,025 (с, 3H).

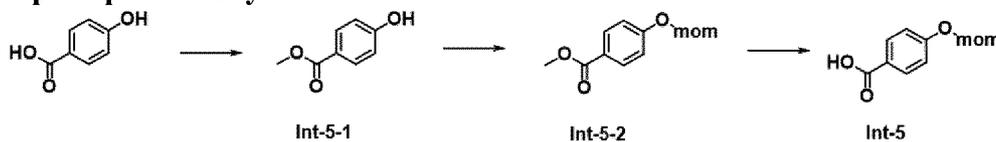
Пример 2.6. Получение Int-4



Соединение Int-4 синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 2.5. Выход 72%.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9,93 (с, 1H), 7,86 (д, $J=6,8$ Гц, 2H), 7,11 (д, $J=6,8$ Гц, 2H), 5,52-5,47 (м, 2H), 5,18-5,14 (м, 2H), 4,24-4,11 (м, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,07 (с, 6H), 2,02 (с, 3H).

Пример 2.7. Получение Int-5



Получение соединения Int-5-1

К раствору 4-гидроксibenзойной кислоты (5,0 г, 36,2 ммоль) в метаноле (150 мл) добавляли тионилхлорид (26,3 мл, 362 ммоль) при 0°C в атмосфере N_2 . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. В реакционную смесь добавляли водный раствор NaHCO_3 и экстрагировали EtOAc. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Int-5-1 (4,87 г,

89%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,87 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 6,82 (д, $J=9,2$ Гц, 2H), 3,85 (с, 3H)
ИЭР-МС m/z : 153 (M^++1).

Получение соединения Int-5-2

К раствору соединения Int-5-1 (1,0 г, 6,57 ммоль) в ДХМ (22,0 мл) добавляли DIPEA (2,3 мл, 13,4 ммоль) и MOM-Cl (0,55 мл, 7,23 ммоль) при 0°C в атмосфере N_2 . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч. В реакционную смесь добавляли воду и экстрагировали EtOAc. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Int-5-2 (1,14 г, 88%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 8,01-7,97 (м, 2H), 7,07-7,04 (м, 2H), 5,23 (с, 2H), 3,89 (с, 3H), 3,48 (с, 3H)

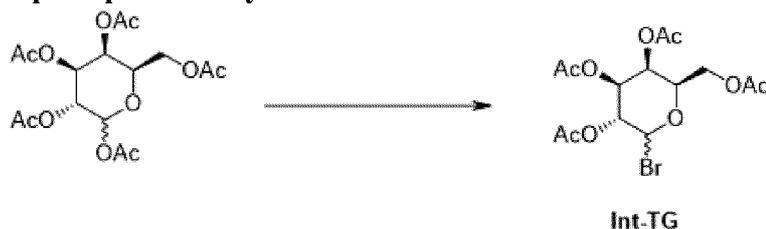
Получение соединения Int-5

К раствору соединения Int-5-2 (1,14 г, 5,81 ммоль) в метаноле/ H_2O /1,4-диоксане (16,0 мл/ 8,0 мл/ 16,0 мл) добавляли моногидрат гидроксида лития (975 мг, 23,2 ммоль) при 0°C в атмосфере N_2 . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. В реакционную смесь добавляли 2 н HCl и экстрагировали EtOAc. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Соединение Int-5 использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. (995 мг, 94%)

^1H ЯМР (400 Гц, MeOH-D_4) δ 7,96 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,08 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 5,25 (с, 2H), 3,55 (с, 3H)

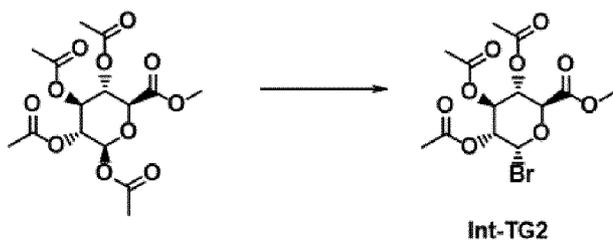
Пример 3. Синтез производных ОНРАС-линкера

Пример 3.1. Получение Int-TG



Пентаацетат β -D-галактозы (Alfa, CAS 4163-60-4, 5,0 г, 12,81 ммоль) растворяли в 33% NBr в AcOH (20 мл) при 0°C в атмосфере N_2 . Смесь нагревали до комнатной температуры. После перемешивания при комнатной температуре в течение 4 часов, смесь концентрировали при пониженном давлении, и затем добавляли ЭА (1000 мл) и насыщенный гидрокарбонат натрия (1000 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Int-TG (5,2 г, 99%).

Пример 3.1.2 Получение Int-TG2

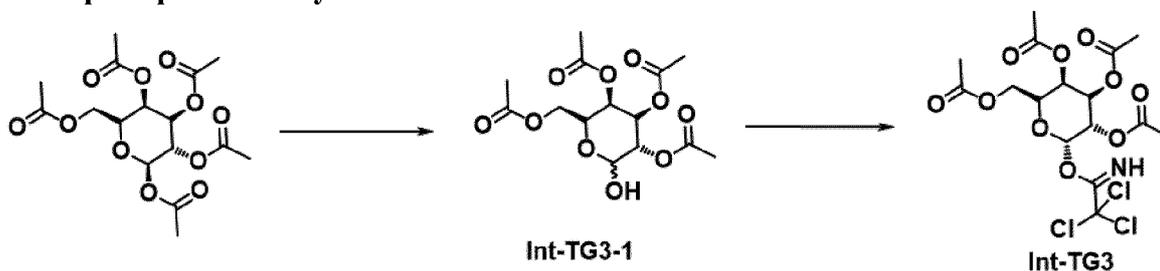


Соединение Int-TG2 синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 3.1.1.

Выход 80%

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 6,654 (д, $J=4,0$ Гц, 1H), 5,627 (т, $J=10,0$ Гц, 1H), 5,252 (дд, $J=10,4$ Гц, 9,6 Гц, 1H), 4,865 (дд, $J=10,0$ Гц, 4,0 Гц, 1H), 4,593 (д, $J=10,4$ Гц, 1H), 3,777 (с, 3H), 2,113 (с, 3H), 2,071 (с, 3H), 2,065 (с, 3H)

Пример 3.1.3 Получение Int-TG3



Получение соединения Int-TG3-1

К раствору пентаацетата бета-D-галактозы (1 г, 2,56 ммоль) в ТГФ (10 мл) добавляли 3-(диметиламино)1-пропиламин (1,61 мл, 12,8 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . После перемешивания при той же температуре в течение 3 часов реакционную смесь экстрагировали ЭА (250 мл x 3), H_2O (200 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Получали соединение Int-TG3-1 (891 мг, 100%), которое использовали без дополнительной очистки.

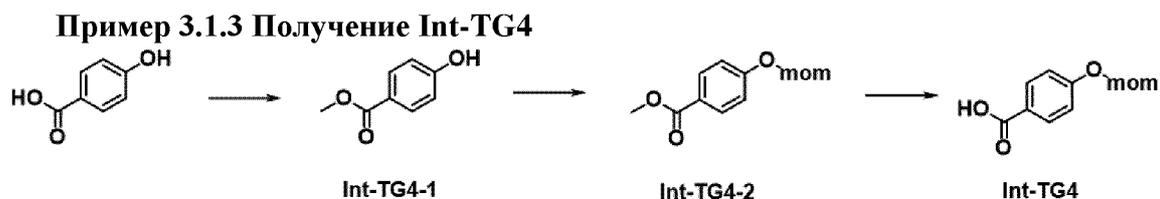
ИЭР-МС m/z : 371 ($\text{M}^+\text{+Na}$).

Получение соединения Int-TG3

К раствору Int-TG3-1 (891 мг, 2,56 ммоль) в ДХМ (10 мл) добавляли трихлорацетонитрил (2,57 мл, 25,6 ммоль) и DBU (0,3 мл, 2,05 ммоль) при 0 °С в атмосфере N_2 . После перемешивания при комнатной температуре в течение 30 минут, реакционную смесь экстрагировали ДХМ (250 мл x 3), H_2O (200 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Int-TG3 (880 мг, 70%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,70 (с, 1H), 6,61 (д, $J=3,6$ Гц, 1H), 5,57 (дд, $J=2,8$, 0,8 Гц, 1H), 5,55-5,35 (м, 2H), 4,44 (т, $J=7,6$ Гц, 1H), 4,19-4,06 (м, 2H), 2,17 (с, 3H), 2,04 (с, 3H), 2,03 (с, 3H), 2,02 (с, 3H).

ИЭР-МС m/z : 515 ($\text{M}^+\text{+Na}$).



Получение соединения Int-TG4-1

К раствору 4-гидроксibenзойной кислоты (5,0 г, 36,2 ммоль) в метаноле (150 мл) добавляли тионилхлорид (26,3 мл, 362 ммоль) при 0°C в атмосфере N₂. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. В реакционную смесь добавляли водный раствор NaHCO₃ и экстрагировали EtOAc. Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Int-TG4-1 (4,87 г, 89%).

¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃) δ 7,87 (д, J=8,8 Гц, 2H), 6,82 (д, J=9,2 Гц, 2H), 3,85 (с, 3H)
ИЭР-МС m/z: 153 (M⁺+1).

Получение соединения Int-TG4-2

К раствору соединения Int-TG4-1 (1,0 г, 6,57 ммоль) в ДХМ (22,0 мл) добавляли DIPEA (2,3 мл, 13,4 ммоль) и MOM-Cl (0,55 мл, 7,23 ммоль) при 0°C в атмосфере N₂. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч. В реакционную смесь добавляли воду и экстрагировали EtOAc. Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Int-TG4-2 (1,14 г, 88%).

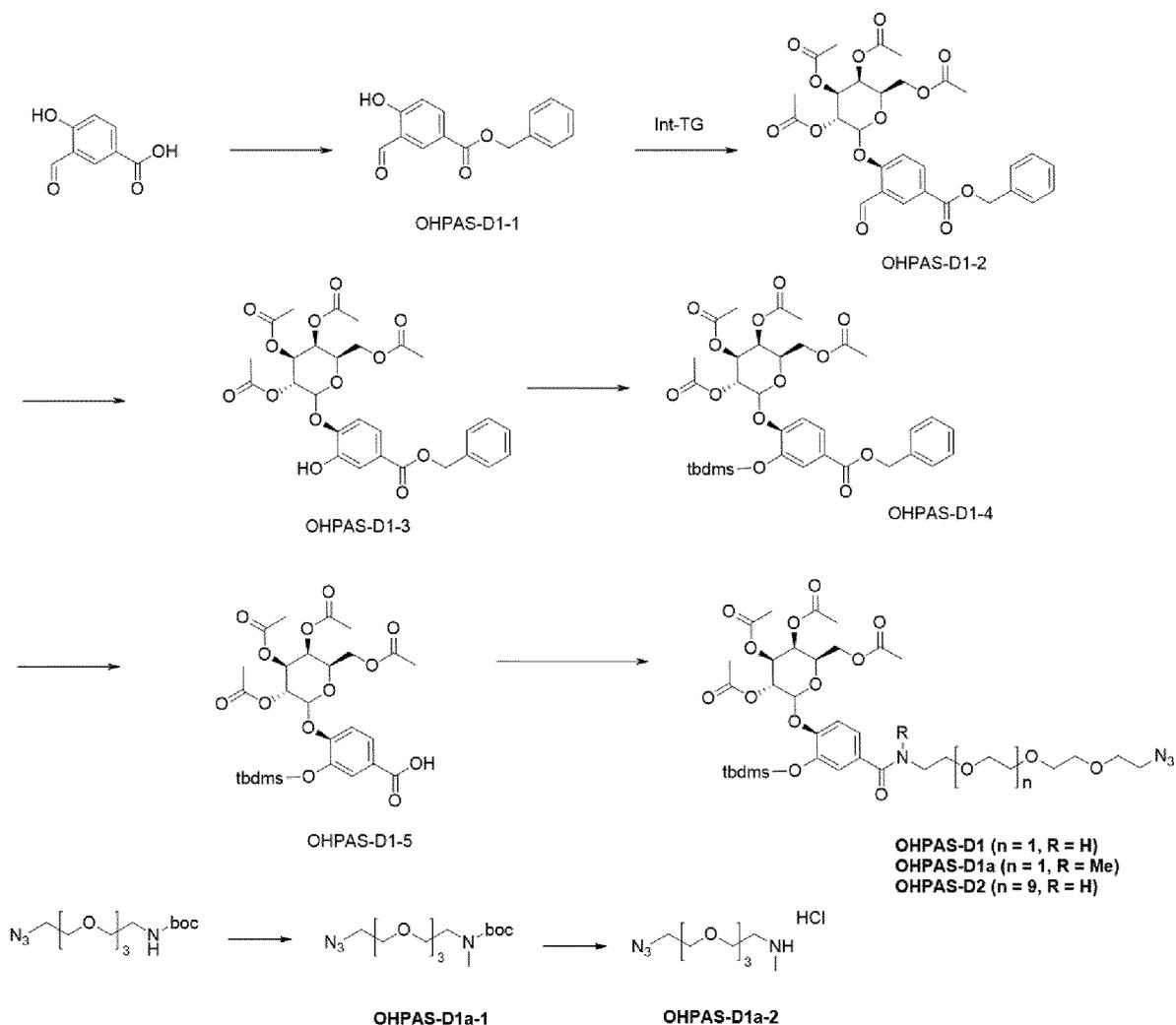
¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃) δ 8,01-7,97 (м, 2H), 7,07-7,04 (м, 2H), 5,23 (с, 2H), 3,89 (с, 3H), 3,48 (с, 3H)

Получение соединения Int-TG4

К раствору соединения Int-TG4-2 (1,14 г, 5,81 ммоль) в метаноле/H₂O/1,4-диоксане (16,0 мл/ 8,0 мл/ 16,0 мл) добавляли моногидрат гидроксида лития (975 мг, 23,2 ммоль) при 0°C в атмосфере N₂. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. В реакционную смесь добавляли 2 н HCl и экстрагировали EtOAc. Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Соединение Int-TG4 использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. (995 мг, 94%)

¹H ЯМР (400 Гц, MeOH-D₄) δ 7,96 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,08 (д, J=8,8 Гц, 2H), 5,25 (с, 2H), 3,55 (с, 3H)

Пример 3.2. Получение OHPAS-D1, OHPAS-D1a и OHPAS-D2



Получение соединения OHPAS-D1a-1

К раствору L-1-1 (2 г, 6,282 ммоль) в ДМФА (25 мл) добавляли гидрид натрия (301 мг, 12,56 ммоль, 60%) при 0 °С в атмосфере N₂. Через 10 минут добавляли йодметан (3,9 мл, 62,82 ммоль) при той же температуре в атмосфере N₂. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов в атмосфере N₂. После завершения реакции, реакционную смесь гасили 2 н HCl (10 мл) и экстрагировали ЭА (500 мл X 3). Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Соединение OHPAS-D1a-1 (желтое масло) использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 3,70-3,62 (м, 12H), 3,4 (т, J=5,2 Гц, 4H), 2,91(с, 3H), 1,46 (с, 9H). ИЭР-МС m/z: 333 (M⁺1)

Получение соединения OHPAS-D1a-2

К раствору соединения OHPAS-D1a-1 (3,3 г, 6,282 ммоль) в ДХМ (70 мл) добавляли 4 н HCl в диоксане (25 мл) при 0 °С в атмосфере N₂. Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 часа в атмосфере N₂. После завершения реакции, реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Соединение OHPAS-D1a-2 использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 3,92 (т, J=4,8 Гц, 2H), 3,73-3,69 (м, 10H), 3,45 (т, J=5,2

Гц, 2H), 3,22-3,16 (м, 2H), 2,77 (т, J=5,6 Гц, 3H), 2,35 (уш.с., 1H). ИЭР-МС m/z: 233 (M⁺1)

Получение соединения ОНРАС-D1-1

К раствору 3-формил-4-гидроксибензойной кислоты (5 г, 43,06 ммоль) в ДМФА (100 мл) добавляли бензилбромид (5,1 мл, 43,06 ммоль) и NaHCO₃ (2,53 г, 43,06 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере N₂. Реакционную смесь экстрагировали ЭА (200 мл × 2) и дистиллированной водой (100 мл). Полученный органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D1-1 (2,56 г, 39%).

¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃) δ 11,41 (с, 1H), 9,95 (с, 1H), 8,34 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,23 (дд, J=6,4 Гц, 2,4 Гц, 1H), 7,46-7,35 (м, 5H), 7,04 (д, J=9,2 Гц, 1H), 5,37 (с, 2H).

Получение соединения ОНРАС-D1-2

К раствору соединения Int-TG-1 (1,0 г, 3,90 ммоль) и соединения Int-TG (1,6 г, 3,90 ммоль) в безводном ACN (30 мл) добавляли молекулярное сито (8 г) и Ag₂O (3,62 г, 15,61 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем фильтровали через Целите®. Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D1-2 (2,1 г, 92%).

¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃) δ 10,34 (с, 1H), 8,55 (д, J=2,0 Гц, 1H), 8,26 (дд, J=6,8, 2,0 Гц, 1H), 7,45-7,35 (м, 5H), 7,17 (д, J=8,8 Гц, 1H), 5,63-5,60 (м, 1H), 5,50 (д, J=3,6 Гц, 1H), 5,37 (с, 2H), 5,23 (д, J=8,0 Гц, 1H), 5,16 (дд, J=7,2, 3,6 Гц, 1H) 4,24-4,10 (м, 4H), 2,20 (с, 3H), 2,10-2,03 (м, 9H).

Получение соединения ОНРАС-D1-3

К раствору соединения ОНРАС-D1-2 (2,1 г, 3,58 ммоль) в ДХМ (30 мл) добавляли m-CPBA (2,65 г, 10,74 ммоль) при 0°C в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 7 часов при 0°C, смесь гасили добавлением насыщенного раствора гидрокарбоната натрия (40 мл × 2). Смесь разделяли и органические слои промывали насыщенным соляным раствором, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в ДХМ (5 мл) добавляли гидразин-гидрат (261 мкл, 5,37 ммоль) при 0°C в атмосфере N₂. После перемешивания при 0°C в течение 1 часа, добавляли ЭА (30 мл × 2) и 1M водный раствор HCl (10 мл). Полученный органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения ОНРАС-D1-3 (1,1 г, 55%).

ИЭР-МС m/z: 574 (M⁺+Na)

Получение соединения ОНРАС-D1-4

К раствору соединения ОНРАС-D1-3 (280 мг, 0,49 ммоль) в ДХМ (5 мл) добавляли ТВДМС-OTf (224 мкл, 0,97 ммоль) и Et₃N (207 мкл, 1,46 ммоль) при 0°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали в течение 1,5 часов при комнатной температуре, а затем гасили

добавлением лимонной кислоты (20 мл). Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (20 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D1-4 (246,3 мг, 68%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,67 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,57 (с, 1H), 7,44-7,34 (м, 5H), 7,02 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 5,49-5,44 (м, 2H), 5,30 (с, 2H), 5,19 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 5,10 (дд, $J=6,8, 3,2$ Гц, 1H) 4,20-4,11 (м, 2H), 4,05 (т, $J=6,8$ Гц, 2H), 2,19 (с, 3H), 2,04(с, 3H), 2,01 (д, $J=6,0$ Гц, 6H), 1,02 (с, 9H), 0,20 (д, $J=15,6$ Гц, 6H).

Получение соединения ОНРАС-D1-5

К раствору соединения ОНРАС-D1-4 (283,2 мг, 0,41 ммоль) в ЭА (5 мл) добавляли Pd/C (5%, 87,5 мг, 0,04 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере H_2 . Смесь перемешивали в течение 1 часа и фильтровали через Целите®, а затем концентрировали при пониженном давлении. Соединение ОНРАС-D1-5 использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (246 мг, количественно).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,67 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,57 (с, 1H), 7,05 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 5,49-5,45 (м, 2H), 5,22 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 5,12 (дд, $J=7,2, 3,6$ Гц, 1H) 4,20-4,06 (м, 4H), 2,19 (с, 3H), 2,05(с, 3H), 2,02 (д, $J=7,6$ Гц, 6H), 1,01 (с, 9H), 0,21 (д, $J=15,2$ Гц, 6H).

Получение соединения ОНРАС-D1

К раствору соединения ОНРАС-D1-5 (243,2 мг, 0,41 ммоль) и 11-азидо-3,6,9-триоксаундекан-1-амин (Aldrich, CAS 134179-38-7, 89,5 мг, 0,41 ммоль) в ДМФА (5 мл) добавляли PyBOP (275 мг, 0,53 ммоль) и DIPEA (176 мкл, 1,02 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре в атмосфере N_2 . Реакционную смесь экстрагировали ЭА (30 мл \times 2) и дистиллированной водой (10 мл). Полученный органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D1 (272,8 мг, 84%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,34(с, 1H), 7,31 (д, $J=9,2$ Гц, 1H), 7,02 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 6,73(с, 1H), 5,48-5,44 (м, 2H), 5,19 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 5,10 (дд, $J=6,4, 3,6$ Гц, 1H), 4,20-4,10 (м, 2H), 4,06 (т, $J=6,4$ Гц, 2H), 3,66 (с, 14H), 3,38 (т, $J=4,4$ Гц, 2H), 2,19 (с, 3H), 2,02 (т, $J=8,4$ Гц, 9H), 1,00 (с, 9H), 0,20 (д, $J=14,4$ Гц, 6H).

ИЭР-МС m/z : 799 (M^++1).

Соединение ОНРАС-D1a и ОНРАС-D2 синтезировали способом, аналогичным способу получения соединения ОНРАС-D1.

Получение соединения ОНРАС-D1a

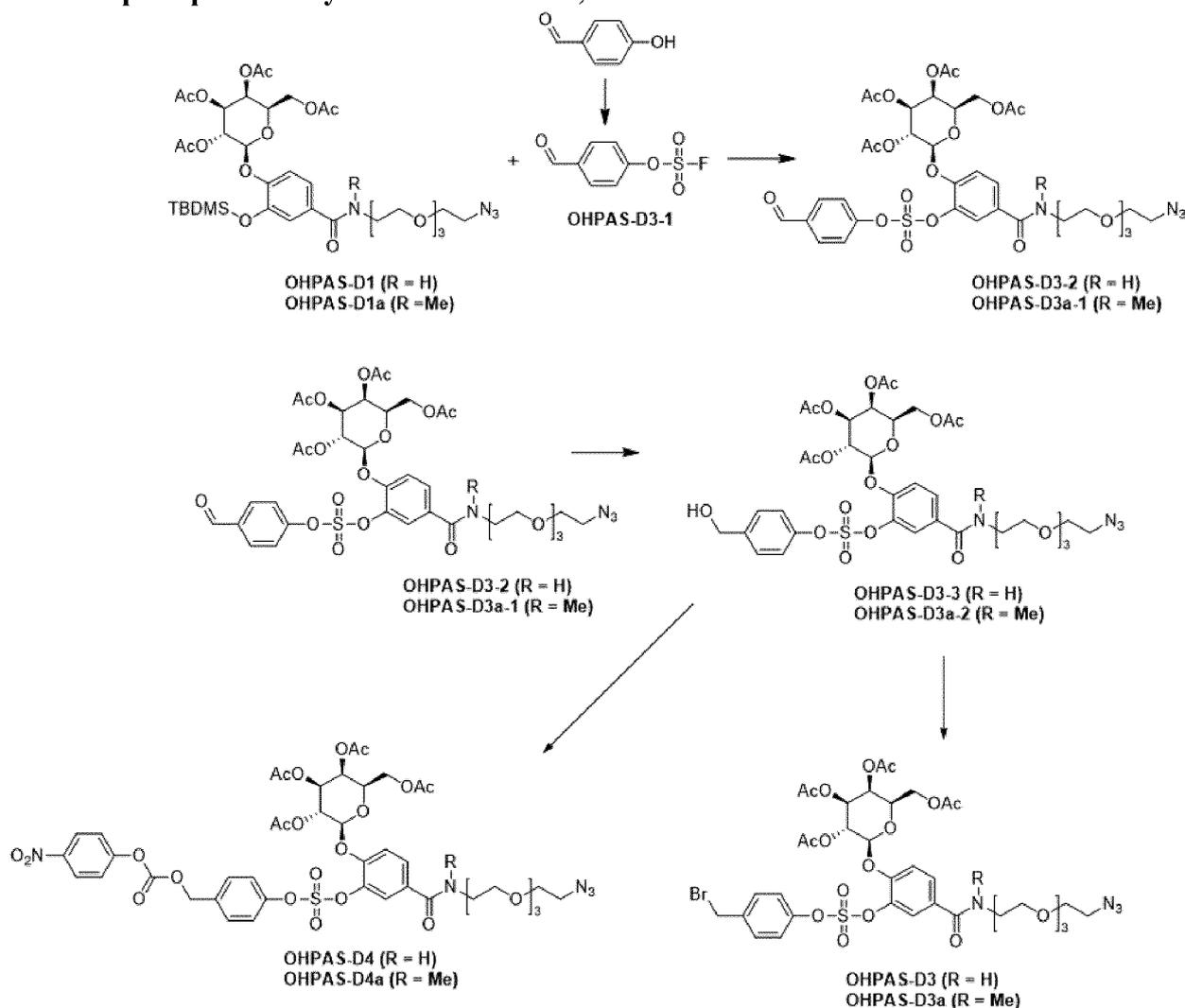
Выход: 83%;

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,00-6,96 (м, 2H), 6,90 (с, 1H), 5,48-5,43 (м, 2H), 5,16 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 5,10 (дд, $J=3,2, 10,4$ Гц, 1H), 4,20-4,11 (м, 2H), 4,05 (т, $J=7,2$ Гц, 1H), 3,76-3,49 (м, 14H), 3,46-3,39 (м, 2H), 3,10-3,04 (м, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,04 (с, 3H), 2,03 (с, 3H), 2,01 (с, 3H), 0,99 (с, 9H), 0,21 (с, 3H), 0,17 (с, 3H). ИЭР-МС m/z : 813 (M^++1)

Получение соединения ОНРАС-D2

Выход: 81%, ИЭР-МС m/z : 1152 (M^+).

Пример 3.3. Получение ОНПАС-D3, ОНПАС-D3а и ОНПАС-D4



Получение соединения ОНПАС-D3-1

К раствору 4-гидроксибензальдегида (1 г, 8,19 ммоль) в ДХМ (3 мл) добавляли Et_3N (2,28 мл, 16,38 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . Через баллон вводили газообразный SO_2F_2 и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем смесь промывали ДХМ (30 мл \times 3) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (30 мл), органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНПАС-D3-1 (790 мг, 63%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 10,06 (с, 1H), 8,05 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,55 (д, $J=8,8$ Гц, 2H).

Получение соединения ОНПАС-D3-2

К раствору соединения ОНПАС-D1 (100 мг, 0,13 ммоль) и соединения ОНПАС-D3-1 (26 мг, 0,13 ммоль) в безводном ACN (3 мл) добавляли DBU (4 мкл, 25 мкмоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и промывали дистиллированной водой (10 мл) и ЭА (10 мл \times 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток

очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D3-2 (103 мг, 94%).

ИЭР-МС m/z : 869(M^+).

Получение соединения ОНРАС-D3-3

К раствору соединения ОНРАС-D3-2 (103 мг, 0,12 ммоль) в ТГФ (8 мл) добавляли $NaBH_4$ (9 мг, 0,24 ммоль) при 0 °С в атмосфере N_2 . После перемешивания при комнатной температуре в течение 2 часов, добавляли дистиллированную воду (10 мл) и ЭА (10 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения ОНРАС-D3-3 (101 мг, 98%).

ИЭР-МС m/z : 871(M^+).

Получение соединения ОНРАС-D3

К раствору соединения ОНРАС-D3-3 (320,5 мг, 0,037 ммоль) в ДХМ (3 мл) добавляли 1М $PbCl_2$ в ДХМ (165 мкл, 0,19 ммоль) при 0°С в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 2 часов, смесь гасили добавлением насыщенного гидрокарбоната натрия (8 мл × 2). Органические слои промывали насыщенным водным соляным раствором, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D3(202,6 мг, 59%).

ИЭР-МС m/z : 934 (M^+).

Получение соединения ОНРАС-D4

К раствору соединения ОНРАС-D3-3 (47 мг, 54 мкмоль) в ДМФА (2 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (25 мг, 81 мкмоль) и DIPEA (14 мкл, 81 мкмоль) при комнатной температуре в атмосфере азота. Смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем добавляли дистиллированную воду (10 мл) и ЭА (10 мл X 2), органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D3-4 (53 мг, 94%).

ИЭР-МС m/z : 1036(M^+).

Соединение ОНРАС-D3а и ОНРАС-D4а получали аналогичным синтетическим способом получения соединения ОНРАС-D3 или ОНРАС-D4.

Получение соединения ОНРАС-D3а-1

Выход 80%; 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 10,04 (с, 1H), 8,00 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,57 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,44-7,27 (м, 3H), 5,57-5,51 (м, 1H), 5,47 (д, $J=3,2$ Гц, 1H), 5,14-5,10 (м, 2H), 4,27-4,09 (м, 3H), 3,76-3,53 (м, 14H), 3,42-3,36 (м, 2H), 3,12-3,04 (м, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,07 (с, 3H), 2,06 (с, 3H), 2,02 (с, 3H). ИЭР-МС m/z : 883 (M^{+1})

Получение соединения ОНРАС-D3а-2

Выход 81%; 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,47-7,42 (м, 2H), 7,40-7,31 (м, 3H), 7,24-7,21 (м, 2H), 5,54-5,45 (м, 2H), 5,11-5,07 (м, 2H), 4,74-4,70 (м, 2H), 4,25-4,21 (м, 1H), 4,17-4,12 (м, 1H), 4,06 (т, $J=7,2$ Гц, 1H), 3,74-3,44 (м, 12H), 3,37 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 3,07-3,04 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 2,06 (с, 6H), 2,02 (с, 3H). ИЭР-МС m/z : 885(M^{+1}).

комнатной температуре в течение 4 часов в атмосфере N_2 , реакционную смесь гасили добавлением H_2O (10 мл) и экстрагировали H_2O (100 мл) и ЭА (100 мл X 2). Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D5-3 (180 мг, 71%) в виде белого твердого вещества.

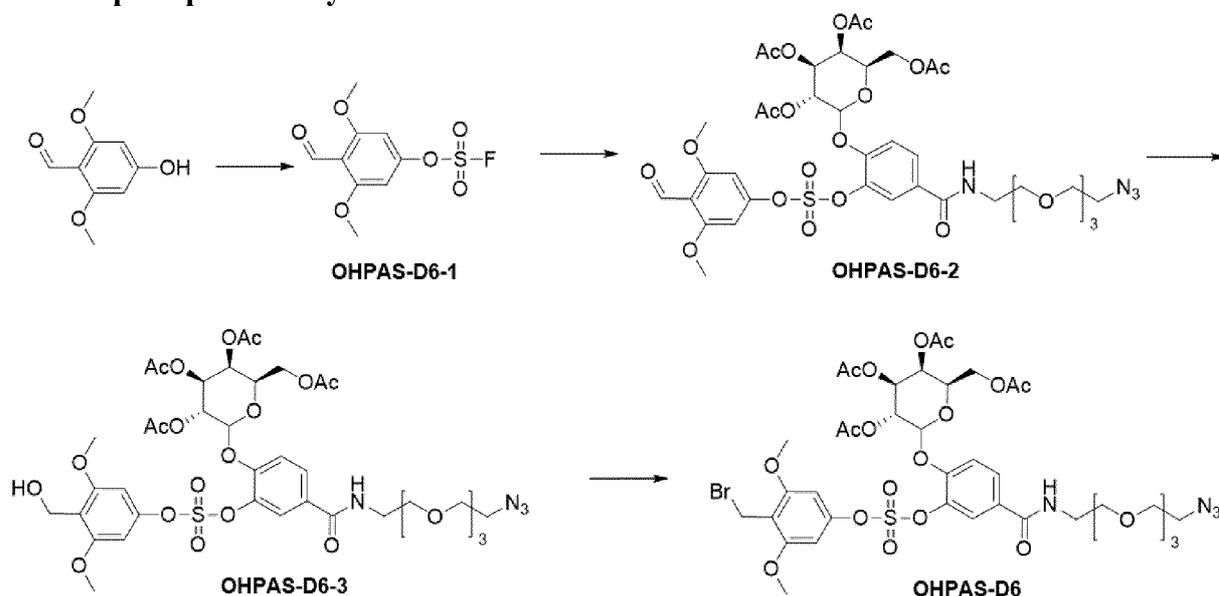
1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 10,54 (с, 1H), 9,98 (с, 1H), 8,38 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 8,14 (дд, $J=2,0, 8,8$ Гц, 1H), 7,60 (д, $J=9,2$ Гц, 2H), 7,43 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,19 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 5,33 (с, 2H).

Получение соединения ОНРАС-D5

К раствору соединения ОНРАС-D5-3 (1 г, 2,96 ммоль) в ТГФ (8 мл) добавляли боргидрид натрия (391 мг, 10,35 ммоль) в MeOH (1,5 мл) и ТГФ (1 мл) при $-78^\circ C$ в атмосфере N_2 . Реакционную смесь перемешивали при $0^\circ C$ в течение 1 часа в атмосфере N_2 . После завершения реакции, в смесь добавляли 2 н HCl (2 мл) и экстрагировали H_2O (100 мл) и ЭА (100 мл X 3). Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D5 (850 мг, 85%) в виде белого твердого вещества.

1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,55 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,39-7,37 (м, 3H), 7,30-7,28 (м, 1H), 6,89 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 5,16 (с, 2H), 4,76 (д, $J=6,0$ Гц, 2H), 4,65 (д, $J=5,6$ Гц, 2H).

Пример 3.5. Получение ОНРАС-D6



Получение соединения ОНРАС-D6-1

К раствору 2,6-диметокси-4-гидроксибензальдегида (0,5 г, 2,74 ммоль) в ДХМ (8 мл) добавляли Et_3N (3,8 мл, 27,4 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . Через баллон вводили газообразный SO_2F_2 и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем смесь промывали ДХМ (30 мл X 3) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (30 мл), органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали

колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D6-1 (728 мг, 99%).

Выход 99%

ИЭР-МС m/z : 265(M⁺). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,41 (с, 1H), 6,54 (с, 2H), 3,91 (с, 6H).

Получение соединения ОНРАС-D6-2

К раствору соединения ОНРАС-D6-1 (101 мг, 0,38 ммоль) и соединения ОНРАС-D1 (254 мг, 0,32 ммоль,) в ацетонитриле (6 мл) добавляли ВЕМР (19 мкл, 0,064 ммоль) при комнатной температуре. Через 2 часа реакционную смесь разбавляли водным раствором лимонной кислоты (8 мл) и экстрагировали EtOAc (2×8 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D6-2 (295 мг, 99%). ИЭР-МС m/z : 929(M⁺).

Соединение ОНРАС-D6 синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 3.3.

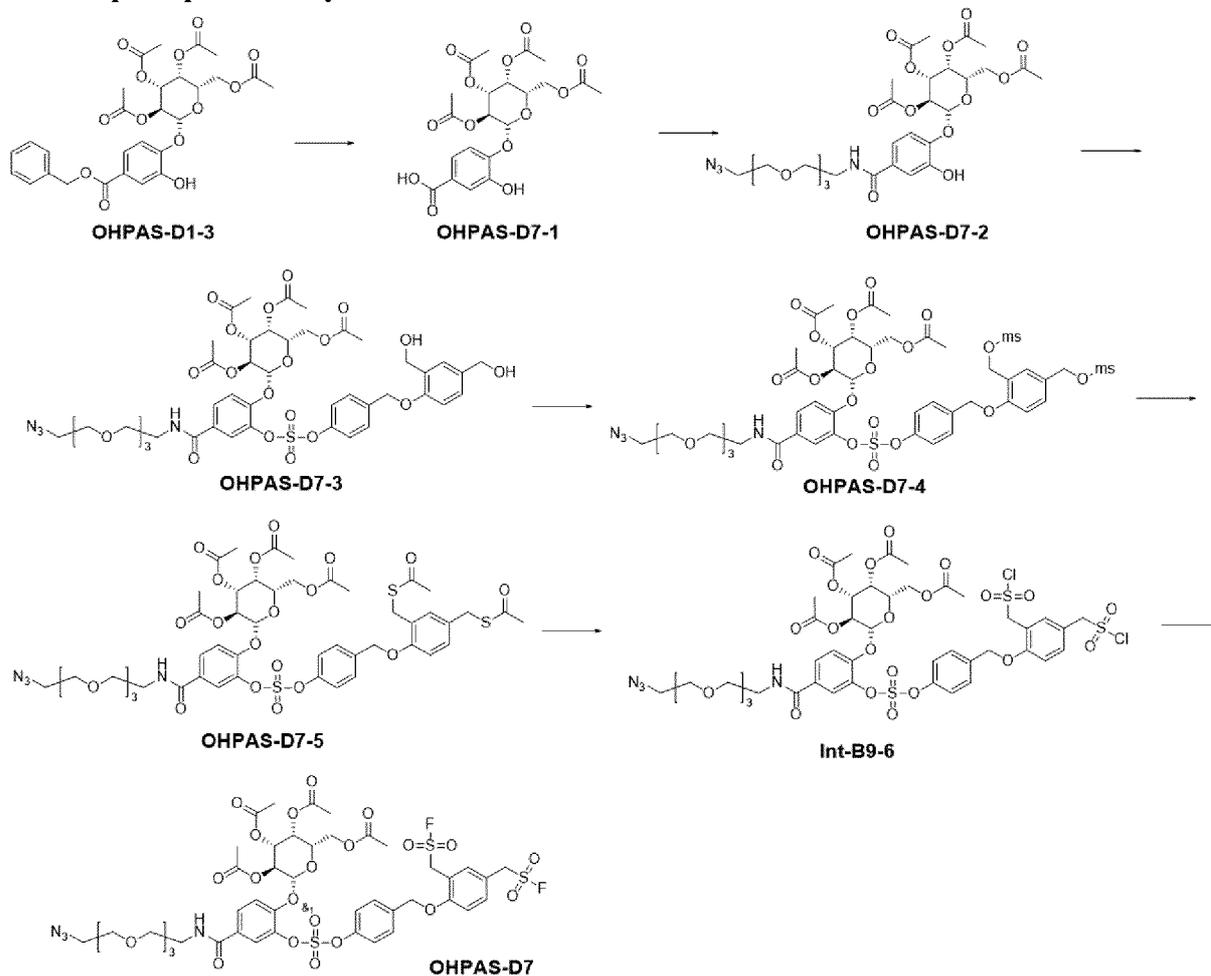
Получение соединения ОНРАС-D6-3

Выход 96%; ИЭР-МС m/z : 931 (M⁺).

Получение соединения ОНРАС-D6

Выход 75%; ИЭР-МС m/z : 750 (M⁺).

Пример 3.6. Получение ОНРАС-D7



Получение соединения ОНРАС-D7-1

К раствору соединения ОНРАС-D1-3 (3 г, 5,22 ммоль) в ЭА (240 мл) добавляли Pd/C (300 мг, 10% масс.) при 0 °С, и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов при нагнетании газа H₂. После завершения реакции смесь фильтровали через Целите®, а затем концентрировали при пониженном давлении. Соединение ОНРАС-D7-1 использовали непосредственно в следующей реакции без дополнительной очистки (2,84 г, 100%, бежевая пена)

ЕТ-МС m/z : 507,2(M⁺+Na)

ОНРАС-D7-2 получали способом, аналогичным получению соединения ОНРАС-D1 в примере 3.2.

Получение соединения ОНРАС-D7-2

Выход 84%, а белое твердое вещество; ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,38-7,34 (м, 2H), 7,00 (д, J=8,0 Гц, 1H), 6,82 (д, J=5,2 Гц, 1H), 6,10 (уш.с., 1H), 5,49-5,45 (м, 2H), 5,14 (дд, J=3,6, 10,4 Гц, 1H), 4,99 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,27-4,08 (м, 3H), 3,74-3,63 (м, 14H), 3,37 (т, J=5,2 Гц, 2H), 2,20 (с, 3H), 2,12 (с, 3H), 2,08 (с, 3H), 2,03 (с, 3H). ЕТ-МС m/z : 685,3 (M⁺).

ОНРАС-D7-3 получали способом, аналогичным получению соединения ОНРАС-D3-2 в примере 3.3.

Получение соединения ОНРАС-D7-3

Выход 81%, а белое твердое вещество; ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,80 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,76 (дд, J=2,4, 8,8 Гц, 1H), 7,50 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,43-7,40 (м, 2H), 7,37 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,29-7,25 (м, 2H), 7,08 (д, J=4,8 Гц, 1H), 6,90 (д, J=8,4 Гц, 1H), 5,60-5,56 (м, 1H), 5,47 (д, J=3,2 Гц, 1H), 5,17-5,10 (м, 4H), 4,74 (д, J=6,4 Гц, 2H), 4,64 (д, J=6,0 Гц, 2H), 4,26-4,08 (м, 3H), 3,71-3,58 (м, 14H), 3,34 (т, J=4,8 Гц, 2H), 2,41 (т, J=6,4 Гц, 1H), 2,18 (с, 3H), 2,08 (с, 3H), 2,07 (с, 3H), 2,01 (с, 3H), 1,77 (т, J=6,0 Гц, 1H). ЕТ-МС m/z : 1007,2 (M⁺).

Получение соединения ОНРАС-D7-4

К раствору соединения ОНРАС-D7-3 (150 мг, 0,15 ммоль) в CH₂Cl₂ (3 мл) добавляли метансульфонилхлорид (150 мг, 0,15 ммоль) при 0°С в атмосфере N₂. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов в атмосфере N₂. После завершения реакции, в смесь добавляли H₂O (50 мл) и экстрагировали CH₂Cl₂ (50 мл X 3). Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая соединение ОНРАС-D7-4 (214 мг, 100%) в виде пены бежевого цвета, которую использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

Получение соединения ОНРАС-D7-5

К раствору соединения ОНРАС-D7-4 (214 мг, 0,15 ммоль) в ACN (3 мл) добавляли тиоацетат калия (43 мг, 0,37 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. После перемешивания при комнатной температуре в течение 3 часов в атмосфере N₂, в смесь добавляли H₂O (50 мл) и экстрагировали ЭА (50 мл X 3). Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения ОНРАС-D7 (147 мг, 88%) в виде

бледно-желтой пены.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,87 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,78 (дд, $J=2,0$, 8,4 Гц, 1H), 7,51 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,43-7,41 (м, 2H), 7,31-7,27 (м, 2H), 7,15 (дд, $J=2,0$, 8,0 Гц, 1H), 7,07-7,06 (м, 1H), 6,79 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 5,61-5,56 (м, 1H), 5,47 (д, $J=3,2$ Гц, 1H), 5,17 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 5,14-5,10 (м, 3H), 4,26-4,09 (м, 5H), 4,05 (с, 2H), 3,66-3,59 (м, 14H), 3,34 (т, $J=5,6$ Гц, 2H), 2,34 (с, 3H), 2,32 (с, 3H), 2,18 (с, 3H), 2,08 (с, 3H), 2,07 (с, 3H), 2,01 (с, 3H). ЕТ-МС m/z : 1123,2 (M^+).

Получение соединения ОНРАС-D7-6

К раствору соединения ОНРАС-D7-5 (100 мг, 0,089 ммоль) в АСН (2 мл) добавляли N-хлорсукцинимид (90 мг, 0,676 ммоль) и 2 н НСl (356 мкл, 0,712 ммоль) при 0°C в атмосфере N_2 . После перемешивания при 0°C в течение 1 часа в атмосфере N_2 , к раствору добавляли диметилсульфид (19,6 мкл, 0,267 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь дополнительно перемешивали при той же температуре в течение 5 минут. Для проведения экстракции добавляли H_2O (20 мл) и ЭА (20 мл X 3), и полученные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая соединение ОНРАС-D7 (140 мг, 100%) в виде белой пены, которую использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

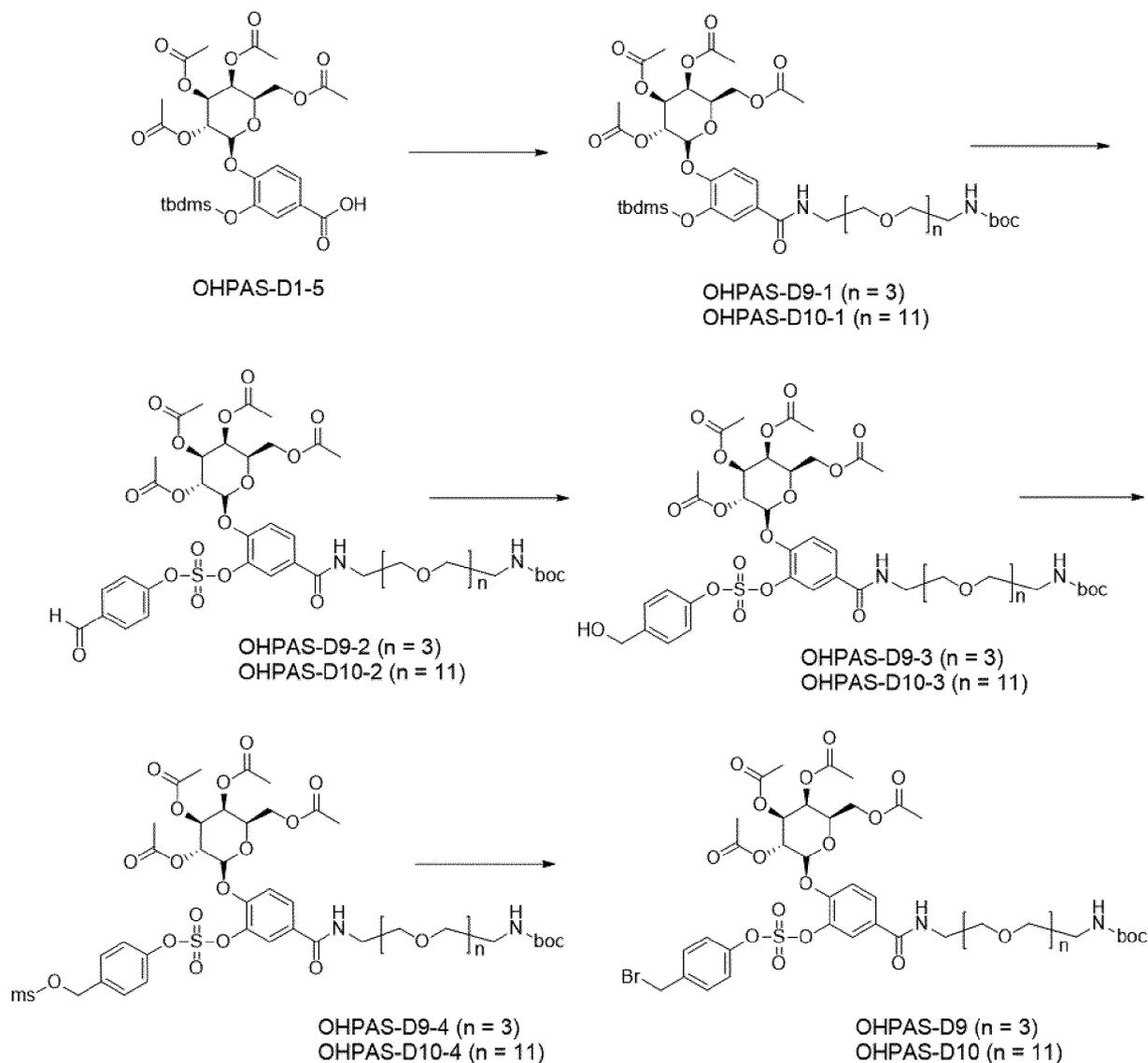
ЕТ-МС m/z : 1173,9 (M^+).

Получение соединения ОНРАС-D7

К раствору соединения ОНРАС-D7-6 (140 мг, 0,089 ммоль) в АСН (2 мл) добавляли гидрофторид калия (41,7 мг, 0,534 ммоль) в H_2O (0,2 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 2 часов при комнатной температуре, смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения ОНРАС-D7 (42 мг, 41%) в виде белой пены.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,86 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,78 (дд, $J=2,0$, 8,4 Гц, 1H), 7,53-7,43 (м, 6H), 7,29 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,13-7,11 (м, 1H), 7,05 (д, $J=9,2$ Гц, 1H), 5,61-5,56 (м, 1H), 5,48 (д, $J=2,4$ Гц, 1H), 5,20 (с, 2H), 5,17 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 5,12 (дд, $J=3,2$, 10,4 Гц, 1H), 4,78 (д, $J=3,6$ Гц, 2H), 4,26-4,09 (м, 3H), 3,70-3,60 (м, 14H), 3,5 (т, $J=5,2$ Гц, 2H), 2,18 (с, 3H), 2,08 (с, 3H), 2,07 (с, 3H), 2,01 (с, 3H). ЕТ-МС m/z : 1139,1 (M^+).

Пример 3.7. Получение ОНРАС-D9 и ОНРАС-D10



Получение соединения ОНРАS-D9-1

К гомогенному раствору соединения ОНРАS-D1-5 (1,0 г, 0,26 ммоль) и L-1 (586 мг, 2,0 ммоль, 1,2 экв.) в ДМФА (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли РувОР (1,13 г, 2,17 ммоль, 1,3 экв.), DIPEA (873 мкл, 5,01 ммоль, 3,0 экв.) и перемешивали в течение 4 часов. В реакционную смесь добавляли воду (20 мл) и экстрагировали ЭА (30 мл × 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Гекс: ЭА=от 1:1 до 1:3) с получением соединения ОНРАS-D9-1 (1,05 г, 72%) в виде белой пены.

ИЭР-МС m/z: 874 (M⁺+1).

Получение соединения ОНРАS-D9-2

К гомогенному раствору соединения ОНРАS-D9-1 (500 мг, 0,57 ммоль) и соединения ОНРАS-D3-1 (140 мг, 0,69 ммоль, 1,2 экв.) в безводном АСN (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли ВЕМР (66,3 мкл, 0,23 ммоль, 0,4 экв.) и перемешивали в течение 4 часов. В реакционную смесь добавляли воду (20 мл) и экстрагировали ЭА (30 мл × 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄,

фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (4% MeOH в ДХМ) с получением соединения ОНРАС-D9-2 (495 мг, 85%) в виде белой пены.

ИЭР-МС m/z : 869 ($M^+ + 1$).

Получение соединения ОНРАС-D9-3

К раствору соединения ОНРАС-D9-2 (495 мг, 0,52 ммоль) в безводном ТГФ (5,0 мл) при 0°C в атмосфере N₂ добавляли NaBH₄ (39,7 мг, 1,05 ммоль, 2,0 экв.) и перемешивали в течение 2 часов. В реакционную смесь добавляли воду (20 мл) и экстрагировали ЭА (30 мл × 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (от 2% до 3% MeOH в ДХМ) с получением соединения ОНРАС-D9-3 (418 мг, 91%) в виде белой пены.

ИЭР-МС m/z : 945 ($M^+ + 1$).

Получение соединения ОНРАС-D9-4

К раствору соединения ОНРАС-D9-3 (214,2 мг, 0,23 ммоль) в безводном ТГФ (5,0 мл) при 0°C в атмосфере N₂ добавляли метансульфонилхлорид (24,6 мкл, 0,32 ммоль, 1,4 экв.) и ТЭА (79,2 мкл, 0,57 ммоль, 1,5 экв.) и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. В реакционную смесь добавляли воду (10 мл) и экстрагировали ДХМ (20 мл × 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (от 100% ДХМ до 5% MeOH в ДХМ) с получением соединения ОНРАС-D9-4 (164 мг, 70%) в виде белой пены.

ИЭР-МС m/z : 1024 ($M^+ + 1$).

Получение соединения ОНРАС-D9

К раствору соединения ОНРАС-D9-4 (164 мг, 0,16 ммоль) в безводном ТГФ (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли LiBr (69,6 мг, 0,80 ммоль, 5,0 экв.) и перемешивали в течение 3 часов. Реакционную смесь разбавляли водой (10 мл) и экстрагировали ДХМ (20 мл × 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (от 3% до 5% MeOH в ДХМ) с получением соединения ОНРАС-D9 (161 мг, 99%) в виде белой пены.

ИЭР-МС m/z : 1008 ($M^+ + 1$).

Соединение ОНРАС-D10 синтезировали способом, аналогичным способу получения соединения ОНРАС-D9.

Получение соединения ОНРАС-D10-1

Выход 72%, бесцветное масло

ИЭР-МС m/z : 1226 ($M^+ + 1$).

Получение соединения ОНРАС-D10-2

Выход 82%, бесцветное масло

ИЭР-МС m/z : 1296 ($M^+ + 1$).

Получение соединения ОНРАS-D10-3

Выход 75%, бесцветное масло

ИЭР-МС m/z : 1298 ($M^+ + 1$).

Получение соединения ОНРАS-D10-4

Выход 82%, бесцветное масло

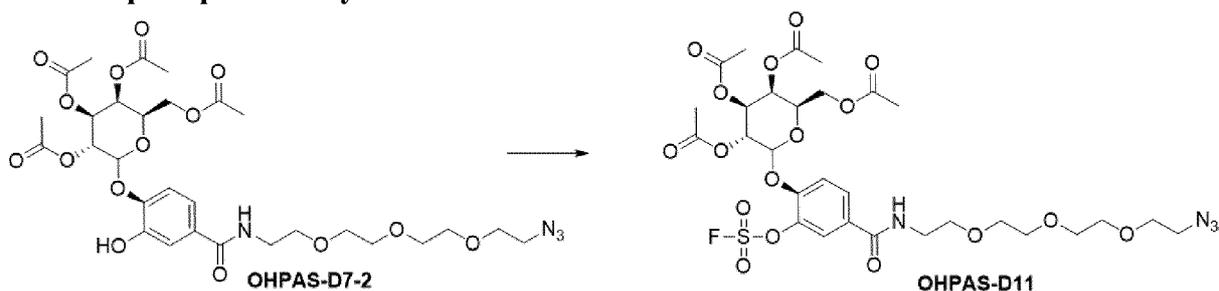
ИЭР-МС m/z : 1376 ($M^+ + 1$).

Получение соединения ОНРАS-D10

Выход 82%, бесцветное масло

ИЭР-МС m/z : 1361 ($M^+ + 1$).

Пример 3.8. Получение ОНРАS-D11



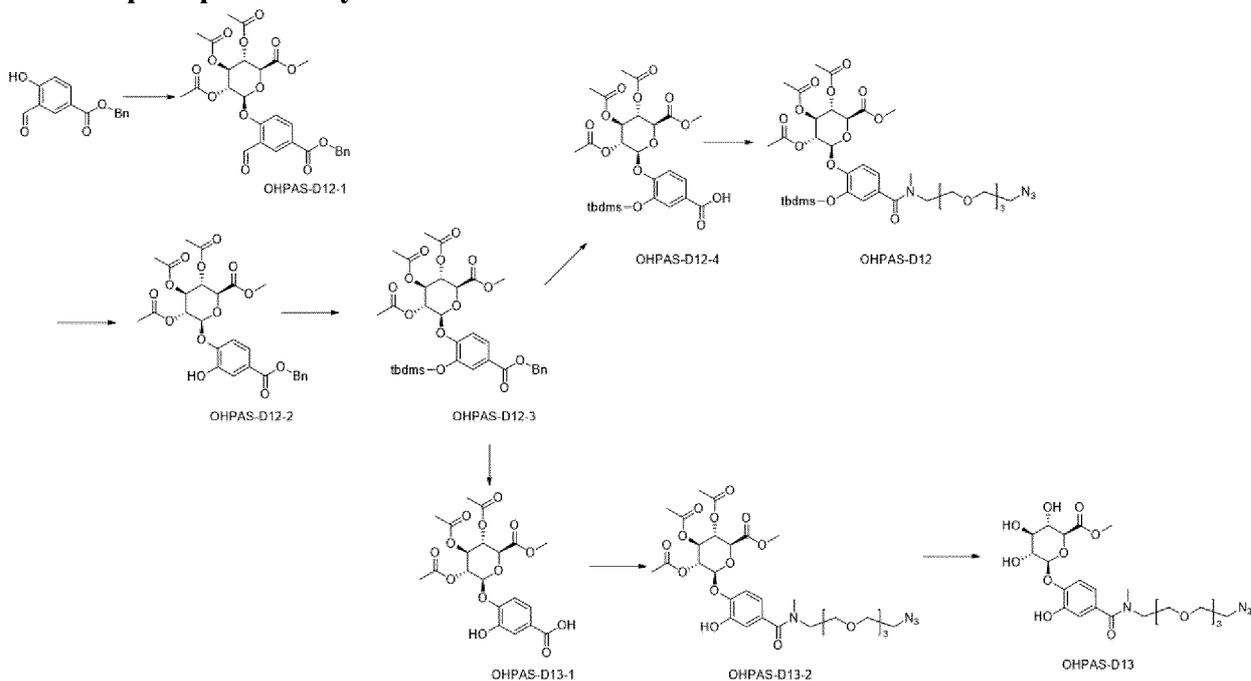
Соединение ОНРАS-D11 синтезировали способом, аналогичным способу получения соединения ОНРАS-D3-1 в примере 3.3.

Получение соединения ОНРАS-D11

Выход 81%, белая пена

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,88 (с, 1H), 7,68 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,30 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,05 (уш.с., 1H), 5,62-5,56 (м, 1H), 5,48 (д, $J=2,8$ Гц 1H), 5,17 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 5,12 (дд, $J=7,2, 3,2$ Гц, 1H), 4,26-4,08 (м, 3H), 3,72-3,60 (м, 14H), 3,36 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 2,20 (с, 3H), 2,08 (с, 6H), 2,02 (с, 3H); ИЭР-МС m/z : 767($M^+ + 1$).

Пример 3.9. Получение ОНРАS-D12 и ОНРАS-D13



Соединение ОНРАS-D12 синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 3.2.

Соединение ОНРАS-D12-1

Выход 65%

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,32 (с, 1H), 8,54 (д, J=2,4 Гц, 1H), 8,28 (дд, J=8,8 Гц, 1H), 7,45-7,35 (м, 5H), 7,16 (д, J=8,8 Гц, 1H), 5,39-5,34 (м, 6H), 4,28-4,26 (м, 1H), 3,72 (с, 3H), 2,11-2,06 (м, 9H).

Соединение ОНРАS-D12-2

Выход 63%

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,66 (д, J=2 Гц, 1H), 7,60 (дд, J=8,4 Гц, 1H), 7,43-7,31 (м, 5H), 7,00 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,13 (с, 1H), 5,41-5,28 (м, 5H), 5,12 (д, J=7,2 Гц, 1H), 4,23 (д, J=9,2 Гц, 1H), 3,76 (с, 3H), 2,09 (с, 3H), 2,06 (д, J=3,6 Гц, 6H).

Соединение ОНРАS-D12-3

Выход 70%

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,60 (дд, J=2,0, 2,0 Гц, 1H), 7,43 (д, J=0,8 Гц, 1H), 7,48-7,32 (м, 5H), 7,01 (д, J=8,4 Гц, 1H), 5,40-5,26 (м, 6H), 4,18 (д, J=9,2 Гц, 1H), 3,72 (с, 3H), 2,09-2,04 (м, 9H), 0,99 (с, 9H), 0,18 (д, J=12,8 Гц, 1H).

Соединение ОНРАS-D12-4

Количественный выход

ИЭР-МС m/z: 607 (M⁺+Na)

Соединение ОНРАS-D13-1

Выход 96%

¹H ЯМР (400 Гц, DMSO-d₆) δ 9,73 (уш.с., 1H), 7,44 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,37 (дд, J=2,4, 6,4 Гц, 1H), 7,08 (д, J=8,4 Гц, 1H), 5,61 (д, J=7,6 Гц, 2H), 5,45 (т, J=9,6 Гц, 1H), 5,15-5,02 (м, 2H), 4,67 (д, J=10 Гц, 1H), 3,63 (с, 3H), 2,04-1,98 (м, 9H).

ИЭР-МС m/z: 785 (M⁺+1)

Соединение ОНРАS-D13-2

Выход 78%

ИЭР-МС m/z: 685 (M⁺+1)

Соединение ОНРАS-D12

Выход 85%

ИЭР-МС m/z: 785 (M⁺+1)

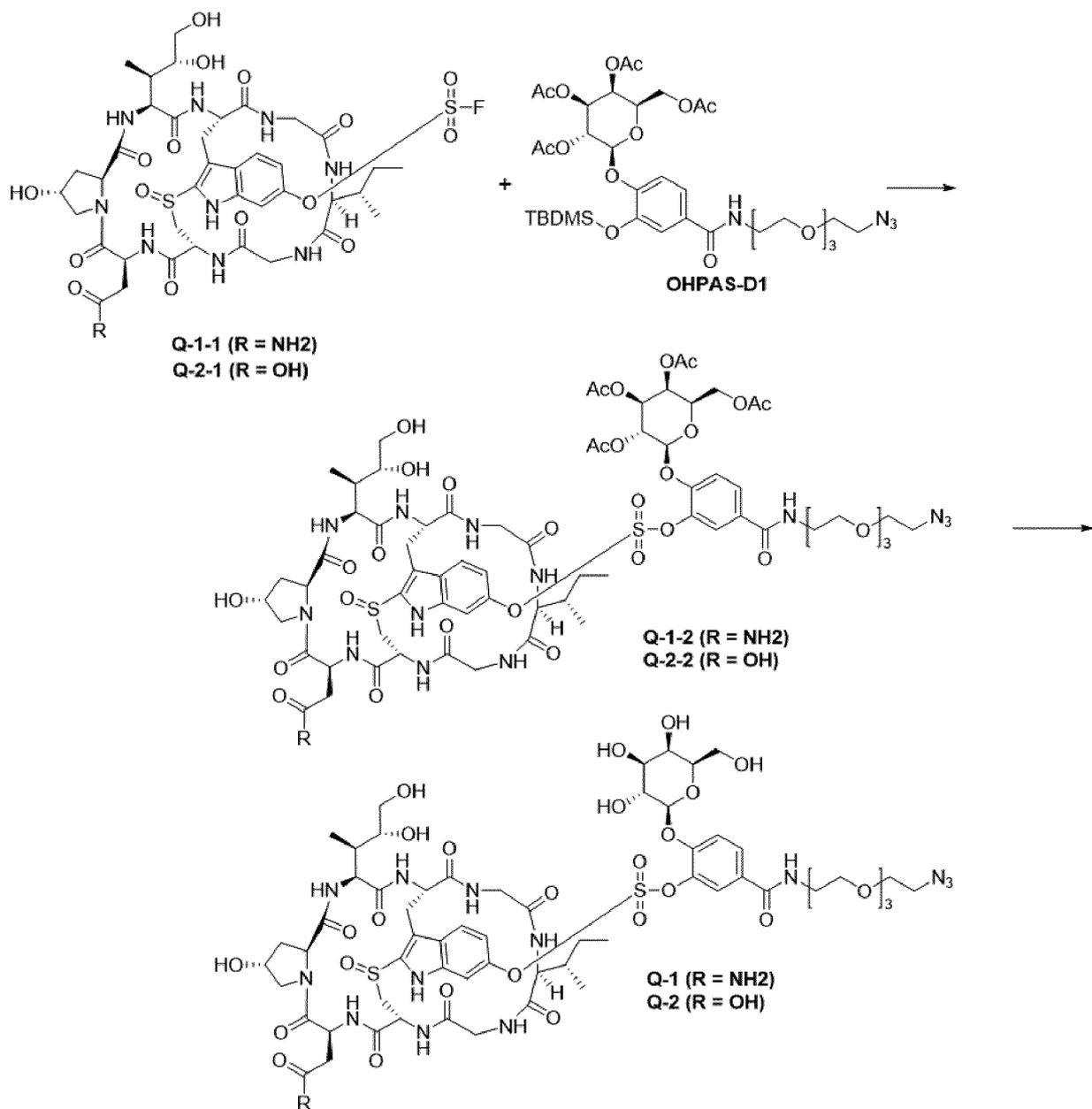
Соединение ОНРАS-D12a

Выход 70%

ИЭР-МС m/z: 559 (M⁺+1)

Пример 4. Синтез производных лекарственных средств

Пример 4.1.1 Получение Q-1 и Q-2



Q-1-1 и Q-2-1 получали из β- и α-аманитина способом, аналогичным получению соединения ОНРАS-D3-1 в примере 3.3.

Получение соединения Q-1-1

Выход 89%; ИЭР-МС m/z: 1002 (M+1).

Получение соединения Q-2-1

Выход 88%; ИЭР-МС m/z: 1003 (M+1).

Q-1-2 и Q-2-2 получали способом, аналогичным получению соединения ОНРАS-D3-2 в примере 3.3.

Получение соединения Q-1-2

Выход 62%; ИЭР-МС m/z: 1666 (M⁺).

Получение соединения Q-2-2

Выход 41%; ИЭР-МС m/z: 1667 (M⁺).

Получение соединения Q-1

К раствору соединения Q-1-2 (50 мг, 0,30 мкмоль) в MeOH (4 мл) добавляли K_2CO_3 (21 мг, 1,5 мкмоль) при $0^\circ C$ в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 0,5 ч, полученный остаток разбавляли ДМСО (0,5 мл) и очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения Q-1 (10,5 мг, 19%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

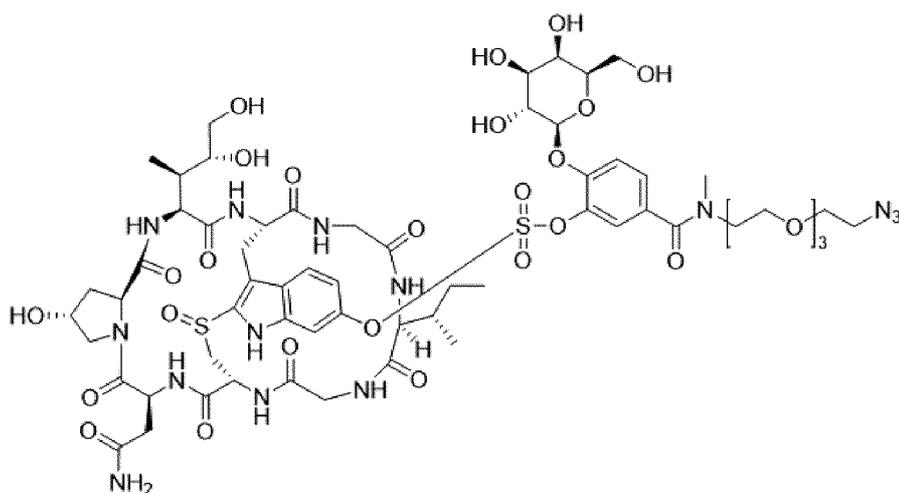
ИЭР-МС m/z: 1498 (M^+).

Получение соединения Q-2

Выход 61% за 2 стадии; ИЭР-МС m/z: 1499 (M^+).

Пример 4.1.2. Получение Q-1a

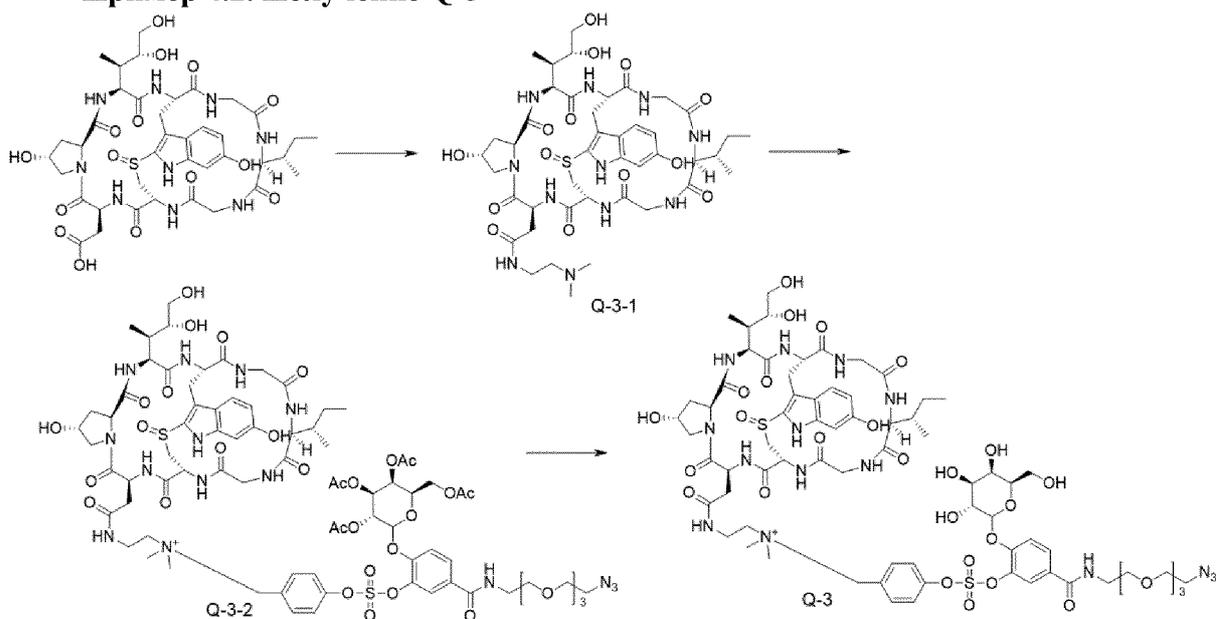
Соединение Q-1a синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 4.1.1.



Получение соединения Q-1a

Выход 83%; ИЭР-МС m/z: 756 ($M/2^+$).

Пример 4.2. Получение Q-3



Получение соединения Q-3-1

К раствору β -аманитина (40 мг, 43,5 мкмоль) в ДМФА (3 мл) добавляли N, N-димилэтилендиамин (10 мкл, 47,83 мкмоль) и ТВТУ (46 мг, 0,11 ммоль) и ТЭА (18 мкл,

0,13 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания в течение ночи при температуре 40 °С, смесь разделяли и очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения Q-3-1 (28 мг, 65%).

ИЭР-МС m/z: 991 (M+1)

Получение соединения Q-3-2

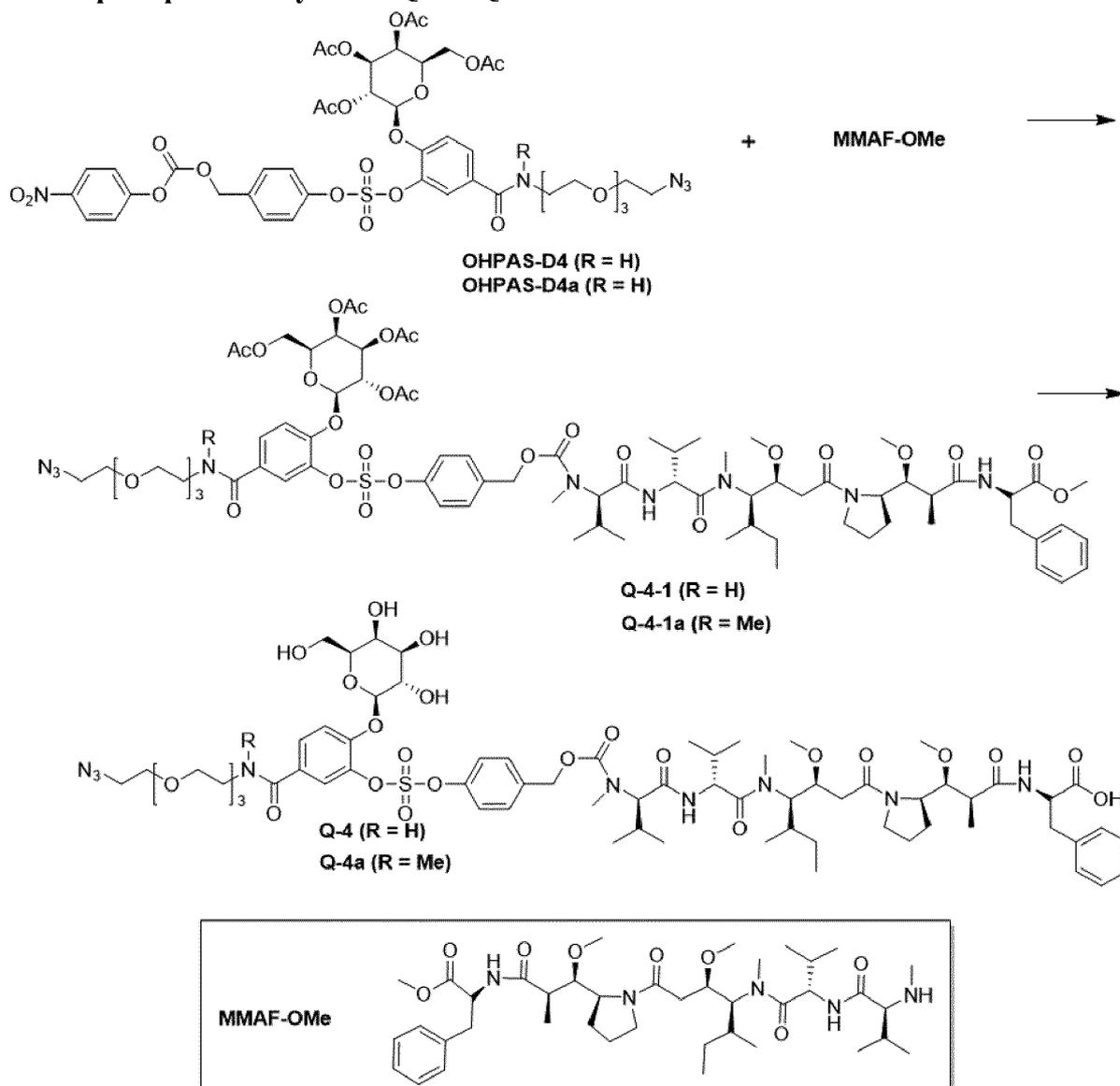
К раствору соединения Q-3-1 (20 мг, 20,2 мкмоль) и ОНРАС-D3 (30 мг, 24,2 мкмоль) в ДМФА (2 мл) по каплям добавляли DIPEA (11 мкл, 60,6 ммоль) в атмосфере N₂. После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре, смесь разделяли и очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения Q-3-2 (34 мг, выход 65%), ИЭР-МС m/z: 992(M/2⁺).

Соединение Q-3 синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 4.1.1.

Получение соединения Q-3

Выход 71%; ИЭР-МС m/z: 838(M/2⁺)

Пример 4.3. Получение Q-4 и Q-4a



Получение соединения Q-4-1

К раствору соединения ОНРAS-D4 (65 мг, 0,063 ммоль) и MMAF-OMe (52 мг, 0,069 ммоль) в ДМФА (1 мл) добавляли НОВt (2 мг, 0,013 ммоль), DIPEA (12 мкл, 0,069 ммоль) и пиридин (330 мкл) при комнатной температуре в атмосфере N₂. После перемешивания в течение ночи, рН смеси доводили до значения от 2 до 3 с помощью 1 н HCl, экстрагировали ЭА (8 мл X 2). Органический слой промывали дистиллированной водой (8 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (12 мл, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Q-4-1 (73 мг, 71%).

ИЭР-МС m/z: 1644(M⁺).

Соединение Q-4 синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 4.2.

Получение соединения Q-4

Выход 69%; ИЭР-МС m/z: 1462(M⁺).

Соединение Q-4a синтезировали аналогичным синтетическим путем, как описано выше.

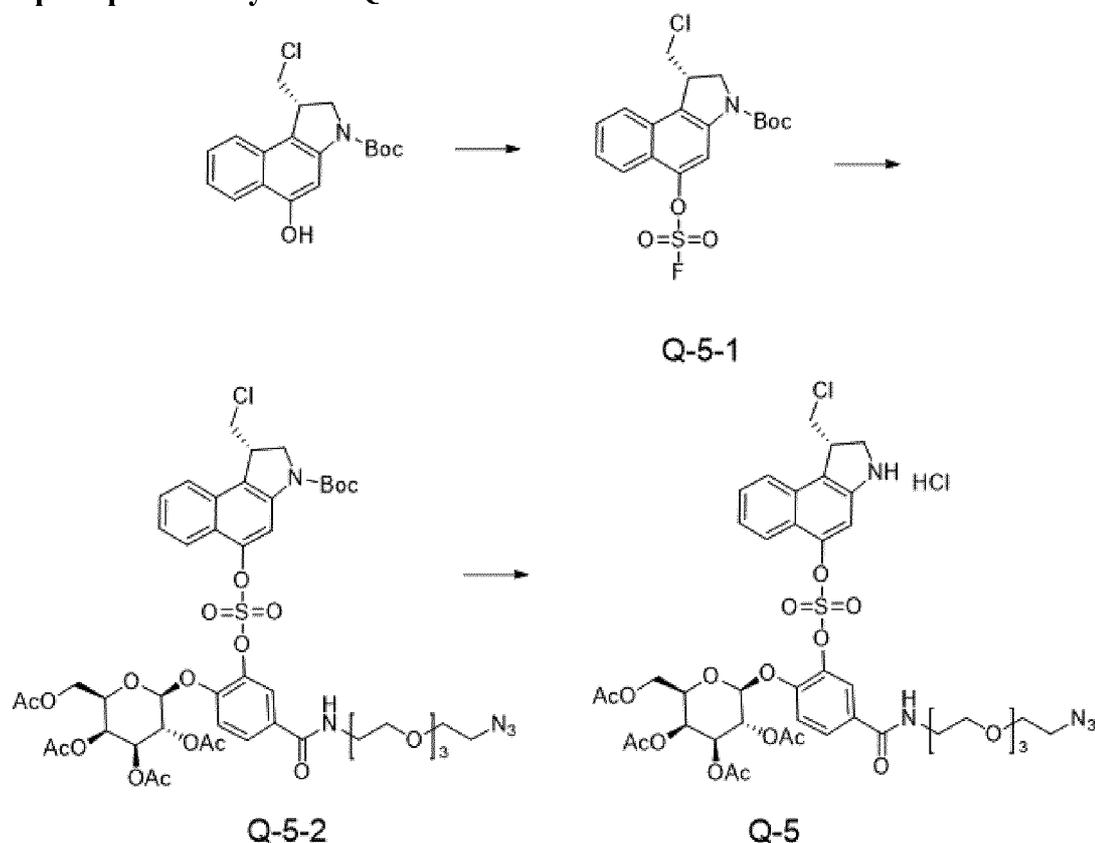
Получение соединения Q-4-1a

Выход 99%; ИЭР-МС m/z: 828 (M/2⁺).

Получение соединения Q-4a

Выход 46%; ИЭР-МС m/z: 738 (M/2⁺).

Пример 4.4. Получение Q-5



Q-5-1 и Q-5-2 были синтезированы аналогичным способом синтеза, как описано в примере 3.5.

Получение соединения Q-5-1

Выход 98%

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,37 (уш.с., 1H) 8,02 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,75 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,61 (т, $J=7,2$, 1H), 7,51 (т, $J=8,0$ Гц, 1H), 4,32 (уш.с., 1H), 4,18 (т, $J=8,8$, 1H), 4,05 (м, 1H), 3,93 (дд, $J=11,2$, 2,8 Гц, 1H), 3,52 (т, $J=10,8$ Гц, 1H), 1,61 (с, 9H). ИЭР-МС m/z : 438,2($\text{M}^+ + \text{Na}$).

Получение соединения Q-5-2

Выход 79%

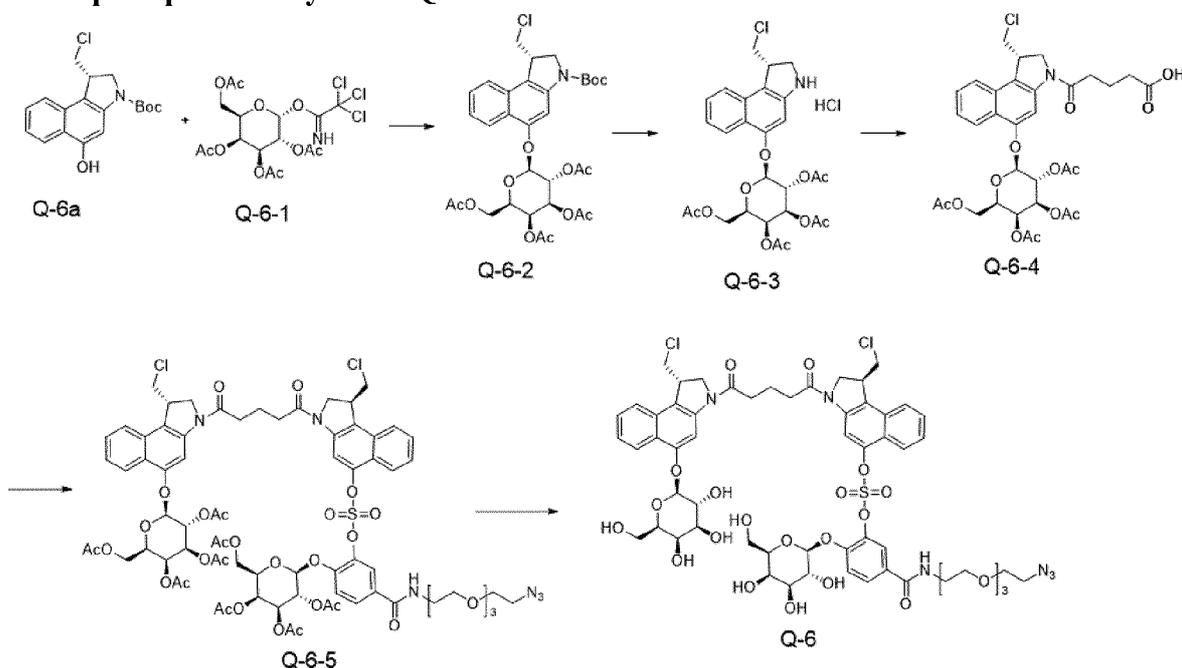
^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,09 (уш.с., 1H) 7,77 (м, 3H), 7,57 (т, $J=7,2$ Гц, 1H), 7,46 (т, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,32 (м, 1H), 6,78 (м, 1H), 5,56 (м, 1H), 5,46 (д, $J=2,8$ Гц, 1H), 5,22 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 5,12 (дд, $J=10,4$, 3,2 Гц, 1H), 4,30 (уш.с., 1H), 4,25-4,02 (м, 5H), 3,93 (м, 1H), 3,60 (м, 15H), 3,31 (м, 2H), 2,17 (с, 3H), 2,04 (с, 3H), 1,95 (с, 6H), 1,56 (с, 9H). ИЭР-МС m/z : 1080,6(M^+).

Получение соединения Q-5

Соединение Q-5-2 (50 мг, 0,046 ммоль) растворяли в 4 н HCl в 1,4-диоксане (1 мл) при 0°C в атмосфере N_2 . После перемешивания при комнатной температуре в течение 4 часов, смесь разбавляли ДХМ (5 мл) и концентрировали. Соединение Q-5 использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (47 мг, 99%).

ИЭР-МС m/z : 980,5(M^+).

Пример 4.5. Получение Q-6



Получение соединения Q-6a

Соединение Q-6a было синтезировано аналогичным синтетическим путем, как описано в документе [см. Mol. Pharmaceutics 2015, 12, 1813-1835]

Получение соединения Q-6-1

Соединение Q-6-1 было синтезировано аналогичным синтетическим путем, как описано в документе [см. Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 7336-7339 и WO2015110935A1]

Получение соединения Q-6-2

К раствору соединения Q-6a (80 мг, 0,239 ммоль) и соединения Q-6-1 (118 мг, 0,239 ммоль) в ДХМ (10 мл) добавляли молекулярное сито и $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (14,8 мкл, 0,12 ммоль) при 0 °С в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 2 часов, смесь фильтровали через Целите® и промывали ДХМ (50 мл), и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Q-6-2 (105 мг, 66%) в виде белой пены.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,12 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,89 (уш.с., 1H), 7,63 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,50 (м, 1H), 7,35 (м, 1H), 5,70 (м, 1H), 5,51 (с, 1H), 5,33 (м, 1H), 5,20 (м, 1H), 4,23 (м, 3H), 4,11 (м, 2H), 3,93 (м, 2H), 3,42 (т, $J=10,8$ Гц, 1H), 2,18 (с, 3H), 2,08 (с, 3H), 2,04 (с, 3H), 2,00 (с, 3H), 1,55 (с, 9H). ИЭР-МС m/z : 564,4(M^+).

Получение соединения Q-6-3

Соединение Q-6-2 (100 мг, 0,15 ммоль) растворяли в ДХМ (2 мл) и затем добавляли 4 н HCl в 1,4-диоксане (1 мл) при 0°С в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 4 часов, реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов в атмосфере N_2 . Соединение Q-6-2 использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (90 мг, 99%).

ИЭР-МС m/z : 564,2(M^+).

Получение соединения Q-6-4

К раствору соединения Q-6-3 (90 мг, 0,149 ммоль) в ТГФ (5 мл) добавляли глутаровый ангидрид (18,8 мкл, 0,164 ммоль), Et_3N (52 мкл, 0,373 ммоль) и 4-DMAP (2 мг, 0,015 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов и очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения Q-6-4 (30 мг, 30%) в виде белого твердого вещества.

Получение соединения Q-6-5

К раствору соединения Q-6-4 (30 мг, 0,043 ммоль) и соединения Q-5 (51 мг, 0,05 ммоль) в ДМФА (3 мл) добавляли $\text{EDC} \cdot \text{HCl}$ (27,2 мг, 0,142 ммоль) при 0°С в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 11 часов, смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения Q-6-5 (20 мг, 28%) в виде твердого вещества светло-коричневого цвета.

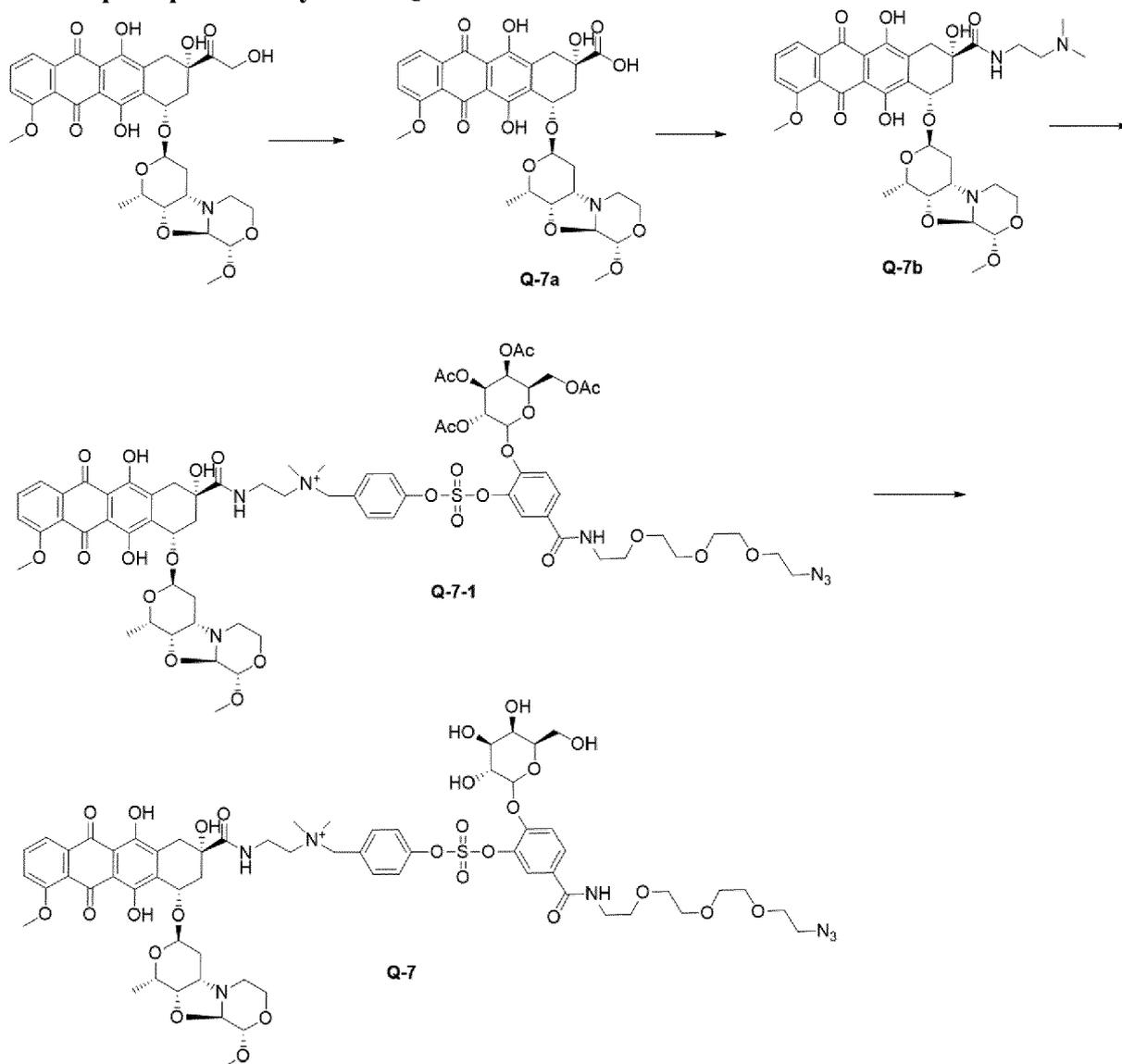
ИЭР-МС m/z : 821,7($\text{M}^+ / 2$).

Получение соединения Q-6

К раствору соединения Q-6-5 (10 мг, 0,006 ммоль) в MeOH (1,5 мл) добавляли NaOMe 25% в MeOH (11 мкл, 0,048 ммоль) при 0°С в атмосфере N_2 . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа в атмосфере N_2 и pH доводили до значения 7 добавлением 5% ТФК в растворе ACN . Смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения Q-6 (5 мг, 63%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

ИЭР-МС m/z : 1305,3(M^+).

Пример 4.6. Получение Q-7



Получение соединения Q-7a

К раствору PNU-159682 (52 мг, 0,081 ммоль) в MeOH (5 мл) / дистиллированной воде (3 мл) добавляли NaIO₄ (18 мг, 0,081 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания 2 часов, смесь концентрировали при пониженном давлении, что давало неочищенное соединение Q-7a (51 мг, 99%). ИЭР-МС m/z: 628 (M⁺).

Получение соединения Q-7b

К раствору соединения Q-7a (51 мг, 0,081 ммоль) в сухом ДХМ (5 мл) добавляли 2-(диметиламино)этиламина (6,1 мкл, 0,089 ммоль) и ТЭА (34 мкл, 0,243 ммоль), ТВТУ (52 мг, 0,162 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания 1 час, смесь разбавляли ДХМ (2×8 мл). Органический слой промывали H₂O (8 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Q-7b (38 мг, 67%).

ИЭР-МС m/z: 698 (M⁺).

Q-7 получали способом, аналогичным получению соединения Q-3-2 в примере 4.2.

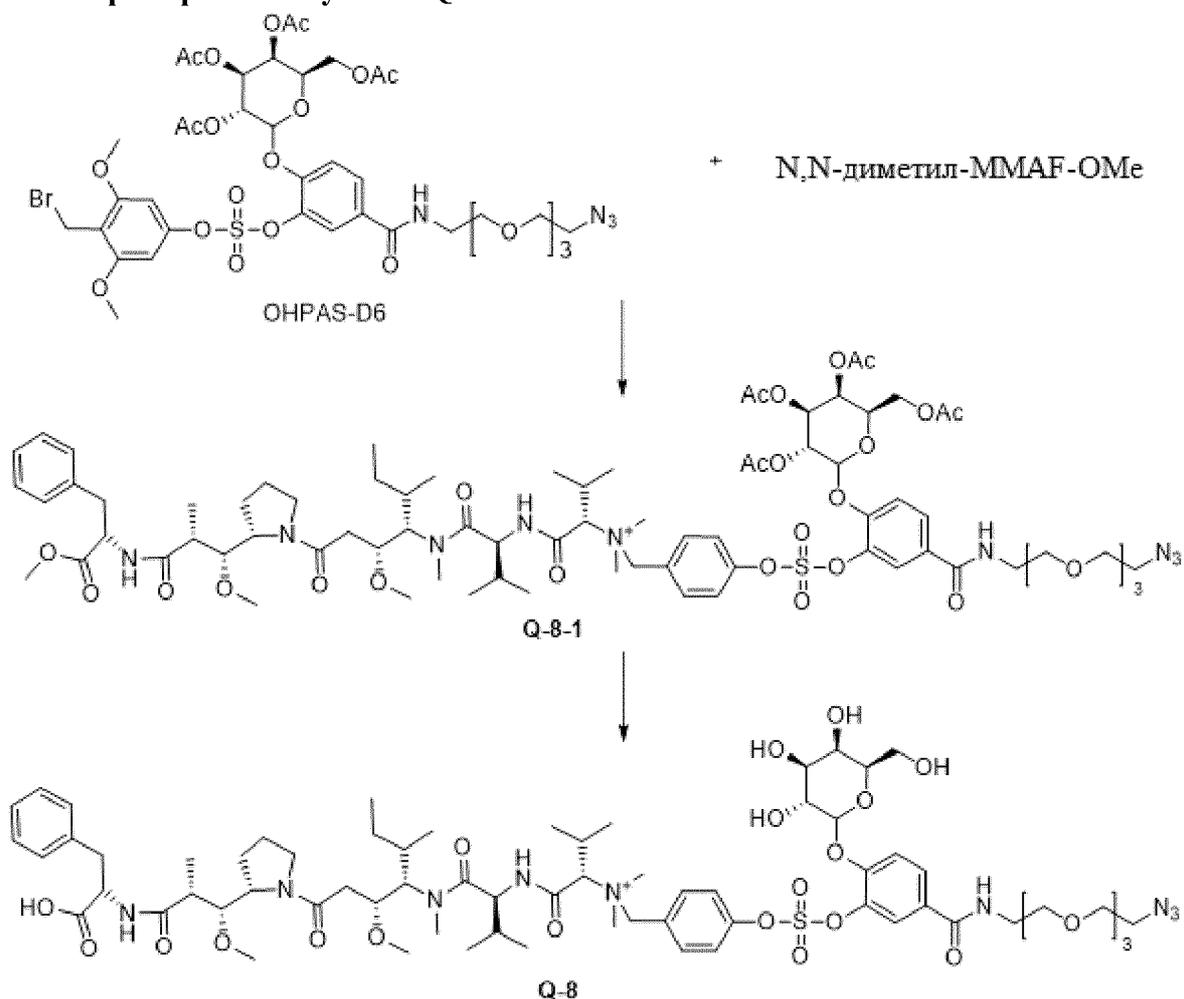
Получение соединения Q-7-1

Выход 38%; ИЭР-МС m/z : 1551 (M^{+1}).

Получение соединения Q-7

Выход 54%; ИЭР-МС m/z : 1383 (M^{+1}).

Пример 4.7. Получение Q-8



Соединение Q-8 синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 4.6.

Получение соединения Q-8-1

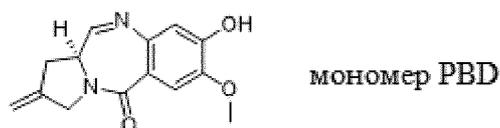
Выход 42%; ИЭР-МС m/z : 837 ($M/2^{+1}$).

Получение соединения Q-8

Выход 81%; ИЭР-МС m/z : 746 ($M/2^{+1}$).

Пример 4.8. Получение производных бензодиазепинового мономера

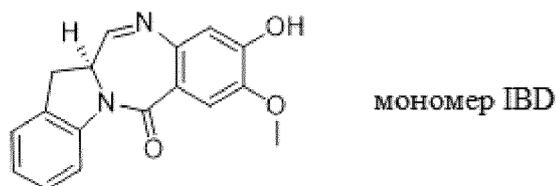
Пример 4.8.1 Получение пирролобензодиазепинового мономера (далее «мономер PBD»)



Мономер PBD был получен проведением реакции аналогичным способом, описанным в EP20071813614.

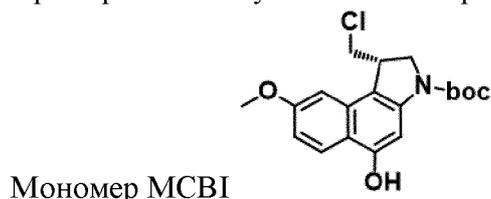
Пример 4.8.2 Получение мономера индолино-бензодиазепина (далее «мономер

IBD»)



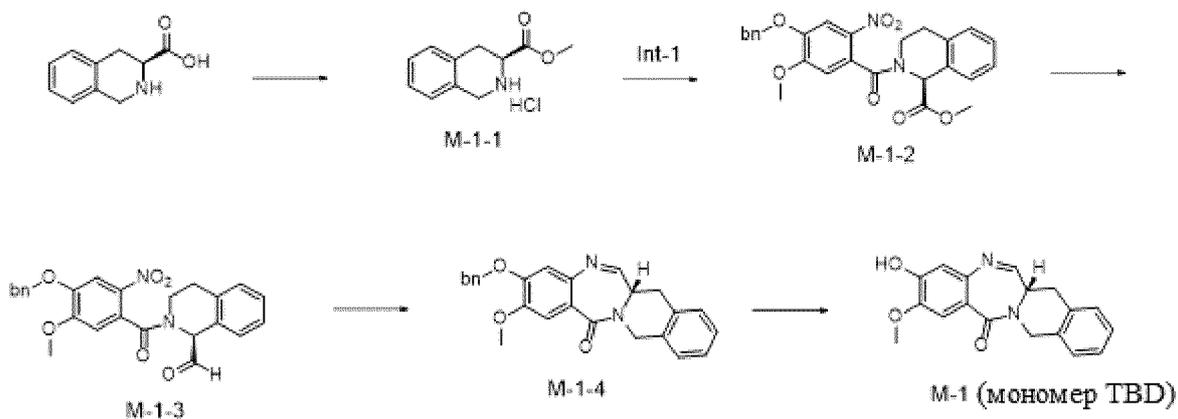
Мономер IBD был получен путем проведения реакции по аналогичному способу синтеза, описанному в WO 2010091150.

Пример 4.8.3 Получение мономера МСВІ



Мономер IBD был получен путем проведения реакции по аналогичному способу синтеза, описанному в US5985908.

Пример 4.8.4 Получение мономера тетрагидроизохинолинобензодиазепина (далее «мономер TBD»)



Получение соединения M-1-1

К раствору (s)-(-)-1, 2, 3, 4,-тетрагидроизохинолин-3-карбоновой кислоты (5,0 г, 28,22 ммоль) в MeOH (140 мл) по каплям добавляли SOCl_2 (2,30 мл, 31,04 ммоль) при 0 °С в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 21 часов при 40 °С, смесь концентрировали при пониженном давлении. Добавляли диэтиловый эфир (50 мл) с получением осадка, который фильтровали с диэтиловым эфиром, получая соединение M-1-1 (6,42 г, выход 99%).

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 10,02 (с, 2H), 7,27 (с, 4H), 4,60-4,56 (м, 1H), 4,39-4,29 (м, 2H), 3,82 (с, 3H), 3,19-3,12 (м, 2H); ИЭР-МС m/z: 192 (M^+ +1).

Получение соединения M-1-2

К раствору соединения Int-1 (9,07 г, 28,22 ммоль) в безводном ТГФ (50 мл) добавляли соединение M-1-1 (6,42 г, 28,22 ммоль) в ТГФ (100 мл) и ТЭА (7,9 мл, 56,43 ммоль) при 0 °С. После перемешивания в течение 2 часов при комнатной температуре,

реакционную смесь разбавляли дистиллированной водой (500 мл) и экстрагировали ЭА (800 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-1-2 (12,01 г, 90%). ИЭР-МС m/z : 477 ($\text{M}^+ + 1$).

Получение соединения М-1-3

К раствору соединения М-1-2 (4 г, 8,39 ммоль) в безводном ДХМ (18 мл) и толуоле (52 мл) по каплям добавляли DIBAL (16,8 мл, 16,79 ммоль, 1,0М в толуоле) при -78°C в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 4 часов при -78°C , в реакционную смесь добавляли MeOH (0,4 мл) и 2 н HCl (25 мл) при -78°C . Смесь разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали ЭА (500 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-1-3 (3,07 г, 82%). ИЭР-МС m/z : 447 ($\text{M}^+ + 1$).

Получение соединения М-1-4

К раствору соединения М-1-3 (3 г, 6,72 ммоль) в ТГФ (130 мл) и дистиллированной воде (86 мл) добавляли $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,3 г, 53,76 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 5 часов реакционную смесь концентрировали четыре раза при пониженном давлении, используя толуол в качестве соразтворителя, тем самым удаляя воду. Затем полученное желтое твердое вещество растворяли в безводном MeOH (220 мл) и добавляли к нему ацетилхлорид (4,8 мл, 67,19 ммоль). После перемешивания в течение 15 минут pH реакционной смеси довели до 7 добавлением насыщенного раствора NaHCO_3 , разбавляли дистиллированной водой (100 мл) и экстрагировали ЭА (250 мл \times 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-1-4 (2,48 г, 93%).

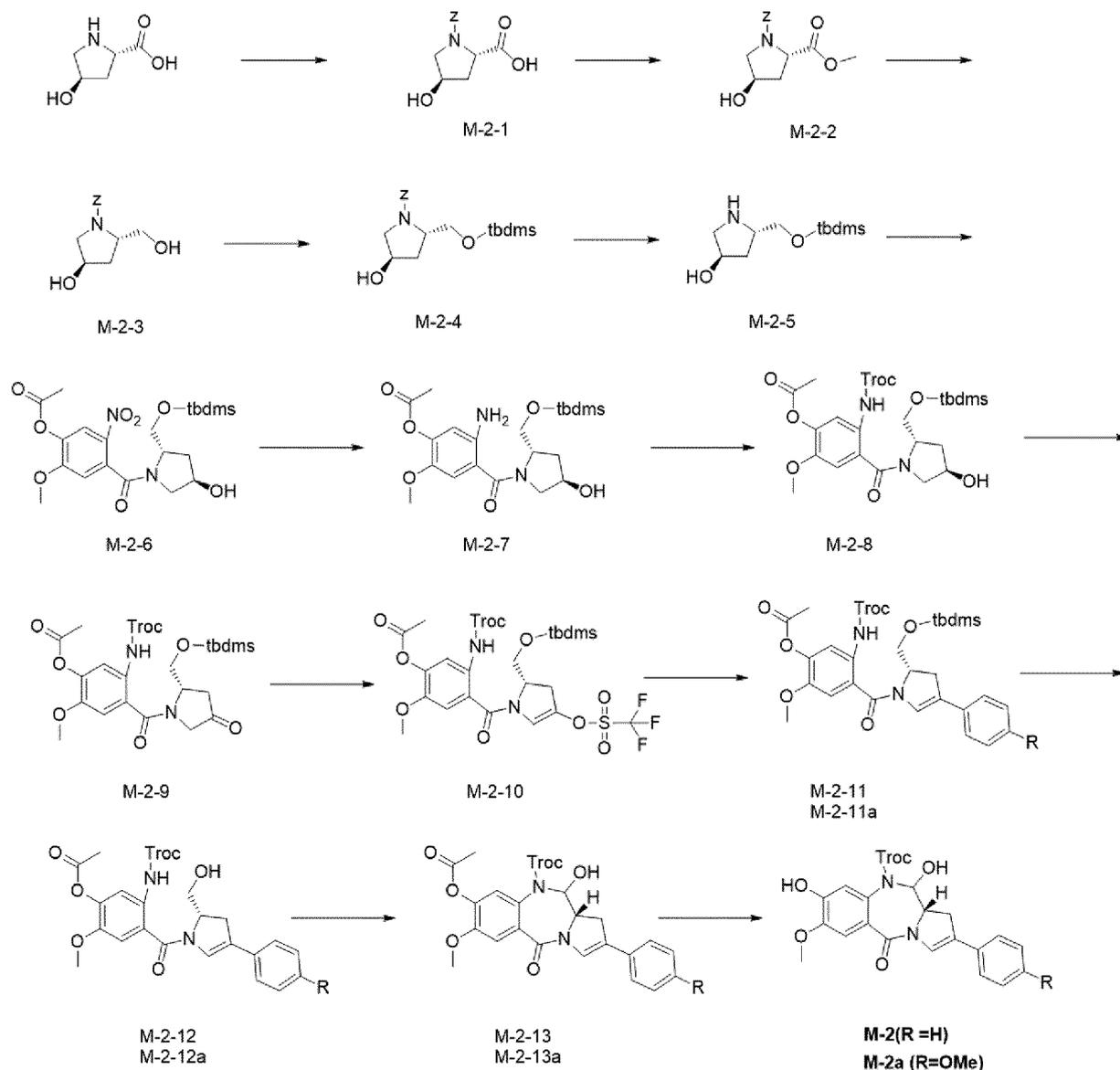
^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,55 (с, 1H), 7,45-7,27 (м, 10H), 6,84 (с, 1H), 5,24-5,15 (м, 2H), 5,00 (д, $J=15,2$, 1H), 4,56 (д, $J=15,6$, 1H), 3,97 (с, 3H), 3,93-3,92 (м, 1H), 3,31-3,12 (м, 2H). ИЭР-МС m/z : 399($\text{M}^+ + 1$).

Получение соединения М-1

К раствору соединения М-1-4 (1 г, 2,51 ммоль) в безводном ДХМ (10 мл) добавляли метансульфокислоту (5 мл) в ДХМ (10 мл) при 0°C . После перемешивания в течение 3 ч при 0°C , в смесь добавляли раствор NaHCO_3 , воду (100 мл) и экстрагировали ЭА (400 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-1 (703 мг, 91%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,54 (с, 1H), 7,48 (д, $J=4,8$ Гц, 1H), 7,37-7,26 (м, 4H), 6,88 (с, 1H), 6,03 (с, 1H), 5,00 (д, $J=15,6$ Гц, 1H), 4,56 (д, $J=15,6$ Гц, 1H), 3,98 (с, 3H), 3,95-3,90 (м, 1H), 3,30-3,13 (м, 2H). ИЭР-МС m/z : 309($\text{M}^+ + 1$).

Пример 4.8.5. Получение соединения PBD, содержащего C2-арильные заместители.



Получение соединения M-2-1

К перемешиваемому раствору транс-4-гидрокси-L-пролина (30 г, 230 ммоль) и NaHCO_3 (43 г, 570 ммоль, 2,5 экв.) в H_2O /толуоле (500 мл/120 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли Cbz-Cl (37,4 мл, 260 ммоль, 1,15 экв.) После добавления смесь перемешивали при этой температуре в течение ночи. Смесь экстрагировали ЭА (500 мл \times 3). Органический слой промывали водой (500 мл \times 2) и сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения M-2-1 (57,5 г, 95%) в виде масла светло-коричневого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 12,7 (уш.с., 1H), 7,40-7,28 (м, 5H), 5,18-5,02 (м, 2H), 4,31-4,24 (м, 2H), 3,51-3,35 (м, 2H), 2,23-2,10 (м, 1H), 2,00-1,87 (м, 1H); ИЭР-МС m/z : 266 (M^++1).

Получение соединения M-2-2

К коричневому раствору соединения M-2-1 (57,5 г, 220 ммоль) в MeOH (400 мл) при 0°C в атмосфере N_2 добавляли тионилхлорид (45,3 мл, 610 ммоль, 2,8 экв.).

Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Смесь концентрировали при пониженном давлении с получением соединения М-2-2 (60,5 г, количественно) в виде масла светло-коричневого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,38-7,28 (м, 5H), 5,23-5,09 (м, 2H), 4,56-4,47 (м, 2H), 3,80 (с, 1H), 3,76-3,66 (м, 2H), 3,58-3,52 (м, 1H), 2,38-2,26 (м, 1H), 2,16-2,08 (м, 1H); ИЭР-МС m/z: 270 (M^+ +1).

Получение соединения М-2-3

К коричневому раствору соединения М-2-2 (60,5 г, 220 ммоль) в безводном ТГФ (500 мл) при 0°C в атмосфере N_2 добавляли LiBH_4 (3,9 г, 180 ммоль, 0,8 экв.) и перемешивали в течение 30 минут. Затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение дополнительных 2 дней. В смесь добавляли воду (200 мл) и 2 н HCl (100 мл). Органический растворитель удаляли на роторном испарителе. Остаток экстрагировали ЭА (500 мл \times 3) и затем органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения М-2-3 (54,6 г, 98%) в виде масла светло-коричневого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,39-7,30 (м, 5H), 5,21-5,12 (м, 2H), 4,66 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 4,39 (с, 1H), 4,21 (кв., $J=7,6, 7,2$ Гц, 1H), 3,76 (т, $J=9,6$ Гц, 2H), 3,66-3,58 (м, 1H), 3,50 (дд, $J=8,0, 4,0$ Гц, 1H), 2,10-2,23 (м, 1H), 1,78-1,64 (м, 1H); ИЭР-МС m/z: 252 (M^+ +1).

Получение соединения М-2-4

К коричневому раствору М-2-3 (53 г, 210 ммоль) в безводном ДХМ (500 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли трет-бутилдидиметилсилилхлорид (25,4 г, 170 ммоль, 0,8 экв.), ТЭА (30 мл, 210 ммоль, 1,0 экв.) и DBU (6,3 мл, 42,2 ммоль, 0,2 экв.). После добавления смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь промывали NH_4Cl (300 мл), затем насыщенным водным раствором хлорида натрия (300 мл), а затем органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Гекс: ЭА=1: 1) с получением соединения М-2-4 (48,2 г, 63%) в виде масла светло-коричневого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,38-7,28 (м, 5H), 5,20-5,08 (м, 2H), 4,50 (с, 1H), 4,12-4,00 (м, 1H), 3,97 (дд, $J=6,4, 4,0$ Гц, 1H), 3,71 (дд, $J=5,6, 4,8$ Гц, 1H), 3,66-3,58 (м, 1H), 3,52-3,48 (м, 1H), 2,28-2,18 (м, 1H), 2,02-1,92 (м, 1H), 0,10 -0,08 (м, 6H); ИЭР-МС m/z: 366 (M^+ +1).

Получение соединения М-2-5

К перемешиваемому раствору М-2-4 (15 г, 41,0 ммоль) в ЭА (50 мл) в атмосфере N_2 добавляли палладий на угле, 5% Pd/C (1,3 г, 1,23 ммоль, 0,03 экв.). Колбу промывали барботированием газообразного водорода через раствор при комнатной температуре. Смесь перемешивали при той же температуре в течение 5 часов. Смесь разбавляли ЭА (30 мл), фильтровали через Целите®, слой Целите® промывали ЭА (50 мл \times 2). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением соединения М-2-5 (9,5 г, количественно) в виде светло-коричневого масла.

^1H ЯМР 400 МГц, CDCl_3) δ 4,41 (уш.с., 1H), 3,60-3,44 (м, 3H), 3,12 (дд, $J=7,2$ Гц, 4,8 Гц, 1H), 2,89 (д, $J=12$ Гц, 1H), 1,84-1,79 (м, 1H), 1,74-1,67 (м, 1H), 0,89 (с, 9H), 0,06 (с, 6H); ИЭР-МС m/z : 232 (M^++1).

Получение соединения М-2-6

К коричневому раствору соединения М-2-5 (11,9 г, 51,42 ммоль) и Int-2 (14,4 г, 56,6 ммоль, 1,1 экв.) в безводном ТГФ (400 мл) при 0°C в атмосфере N_2 добавляли DIPEA (26,9 мл, 154,3 ммоль, 3,0 экв.) и перемешивали в течение 5 часов. Реакционную смесь разбавляли дистиллированной водой (50 мл) и экстрагировали ЭА (150 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Гекс: ЭА=от 2:1 до 2:1) с получением соединения М-2-6 (20 г, 8 3%) в виде твердого вещества желтого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,95 (с, 1H), 6,87 (с, 1H), 4,60-4,51(м, 1H), 4,49-4,41 (м, 1H), 4,24-4,08 (м, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,80-3,68 (м, 1H), 3,37 (дд, $J=7,6$ Гц, 4,0 Гц, 1H), 3,14 (д, $J=10,4$ Гц, 1H), 2,35 (с, 3H), 2,18-2,08 (м, 1H), 0,91 (с, 9H), 0,1 (с 6H); ИЭР-МС m/z : 469 (M^++1).

Получение соединения М-2-7

К перемешиваемому раствору М-2-6 (20 г, 42,68 ммоль) в ЭА (213 мл) в атмосфере N_2 добавляли палладий на угле, 5% Pd/C (9,1 г, 4,27 ммоль, 0,1 экв.). Колбу промывали барботированием газообразного водорода через раствор при комнатной температуре. После перемешивания в течение 8 часов смесь разбавляли ЭА (50 мл), фильтровали через Целите®, слой на Целите® промывали ЭА (50 мл x2). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением соединения М-2-7 (18,5 г, 99%) в виде твердого вещества желтого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 6,81 (с, 1H), 6,44 (с, 1H), 5,79 (уш.с., 1H), 4,58-4,50 (м, 1H), 4,42-4,36 (м, 1H), 4,10 (уш.с., 1H), 3,79 (с, 3H), 3,59 (дд, $J=8,4$ Гц, 2,8 Гц, 1H), 3,50 (д, $J=11,2$ Гц, 1H), 2,30-2,24 (м, 1H), 2,06-2,01 (м, 1H), 0,89 (с, 9H), 0,05 (д, $J=1,6$ Гц, 6H); ИЭР-МС m/z : 439 (M^++1).

Получение соединения М-2-8

К желтому раствору М-2-7 (18,5 г, 42,18 ммоль) в безводном ДХМ (210 мл) при 0°C в атмосфере N_2 добавляли 2,2,2-трихлорэтилхлорформиат (6,4 мл, 46,4 ммоль, 1,1 экв.) и пиридин (6,9 мл, 87,4 ммоль, 2,0 экв.), а затем перемешивали в течение 3 часов. Смесь промывали раствором CuSO_4 (50 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Гекс: ЭА=2: 1) с получением соединения М-2-8 (21,2 г, 82%) в виде твердого вещества коричневого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,87 (уш.с., 1H), 7,86 (с, 1H), 6,89 (с, 1H), 4,84 (д, $J=12,8$ Гц, 1H), 4,71 (д, $J=10,8$ Гц, 1H), 4,61 (уш.с., 1H), 4,45 (с, 1H), 4,20 (уш.с., 1H), 3,78 (с, 3H), 3,70-3,62 (м, 1H), 3,57 (с, 2H), 2,32 (с, 4H), 2,11-2,02 (м, 1H), 1,80 (с, 1H), 0,90 (с, 9H), 0,05

(с, 6H); ИЭР-МС m/z : 615($M^+ + 1$).

Получение соединения М-2-9

К гомогенному раствору оксалилхлорида (21 мл, 24,4 ммоль, 1,5 экв.) в безводном ДХМ (50 мл) при -78°C в атмосфере N_2 добавляли ДМСО (3,5 мл, 48,9 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДХМ (20 мл) и перемешивали в течение 1 часа. К реакционной смеси по каплям добавляли раствор М-2-8 (10 г, 0,33 ммоль) в безводном ДХМ (100 мл) и перемешивали в течение 2 часов. В реакционную смесь добавляли ТЭА (22,7 мл, 162,9 ммоль, 10 экв.) и перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Смесь экстрагировали раствором NH_4Cl (30 мл) и ДХМ (100 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Гекс: ЭА=от 4:1 до 1:1) с получением соединения М-2-9 (8,2 г, 83%) в виде твердого вещества коричневого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,68 (уш.с., 1H), 7,91 (с, 1H), 6,86 (с, 1H), 5,12 (уш.с., 1H), 4,80 (с, 2H), 4,13 (уш.с., 1H), 4,04 (д, $J=17,2$ Гц, 1H), 3,98 -3,86 (м, 1H), 3,80 (с, 3H), 3,76-3,62 (м, 1H), 2,84-2,72 (м, 2H), 2,54 (д, $J=17,2$ Гц, 1H), 2,32 (с, 3H), 2,08-1,98 (м, 1H), 0,88 (с, 9H), 0,21 (с, 6H); ИЭР-МС m/z : 612 ($M^+ + 1$).

Получение соединения М-2-10

К желтому раствору М-2-9 (2,0 г, 3,27 ммоль) и 2,6-лутидина (4,6 мл, 12 экв.) в безводном ДХМ (100 мл) при -10°C в атмосфере N_2 добавляли трифторангидрид (5,5 мл, 32,68 ммоль, 10 экв.) и перемешивали в течение 6 часов. Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали еще в течение 1 часа. Смесь разбавляли дистиллированной водой (50 мл) и экстрагировали ДХМ (100 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Гекс: ЭА=4:1) с получением соединения М-2-10 (502 мг, 21%) в виде желтого масла.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,78 (уш.с., 1H), 7,97 (с, 1H), 6,85 (с, 1H), 6,80 (с, 1H), 4,86-4,72 (м, 3H), 4,20-4,32 (м, 1H), 3,80 (с, 3H), 3,76-3,68 (м, 1H), 3,20-3,00 (м, 2H), 2,33 (с, 3H), 0,89 (с, 9H), 0,06 (д, $J=10,6$ Гц 6H); ИЭР-МС m/z : 745 ($M^+ + 1$).

Получение соединения М-2-11

К желтому раствору М-2-10 (500 мг, 0,67 ммоль) в толуоле (4,0 мл), H_2O (0,6 мл) и этаноле (4,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли 4,4,5,5-тетраметил-2-фенил-1,3,2-диоксаборолан (164,6 мг, 0,81 ммоль, 1,2 экв.), $\text{Pd}(\text{TPP})_4$ (77,5 мг, 0,067 ммоль, 0,1 экв.) и ТЭА (234,2 мкл, 1,68 ммоль, 2,5 экв.), а затем перемешивали в течение 3 часов. Смесь разбавляли дистиллированной водой (100 мл) и экстрагировали ЭА (100 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Гекс: ЭА=3:1) с получением соединения М-2-11 (343 мг, 76%) в виде твердого вещества желтого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,76 (уш.с., 1H), 7,96 (с, 1H), 7,38-7,28 (м, 5H), 6,98 (с, 1H), 6,93 (с, 1H), 4,78-4,68 (м, 3H), 4,16-4,04 (м, 2H), 3,92-3,84 (м, 1H), 3,79 (с, 3H), 3,24-

3,12 (м, 1H), 3,08-2,90 (м, 1H), 2,34 (с, 3H), 0,85 (с, 9H), 0,05 (с, 6H); ИЭР-МС m/z: 673 ($M^+ + 1$).

Получение соединения М-2-12

К желтому раствору М-2-11 (340 мг, 0,505 ммоль) в ТГФ (4,0 мл) и H₂O (2,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли уксусную кислоту (8,0 мл) и перемешивали в течение 20 часов. Смесь разбавляли дистиллированной водой (10 мл) и экстрагировали ЭА (20 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Гекс: ЭА=2:1) с получением соединения М-2-12 (250 мг, 89%) в виде твердого вещества желтого цвета.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,86 (уш.с., 1H), 7,87 (с, 1H), 7,36-7,28 (м, 5H), 7,00 (с, 1H), 6,85 (с, 1H), 4,93 (уш.с., 1H), 4,75 (с, 2H), 4,16-4,10 (м, 3H), 3,82 (с, 3H), 3,64 (с, 1H), 3,33 (т, J=13,6, 5,6 Гц, 1H), 2,77 (д, J=17,2 Гц, 1H) 2,34 (с, 3H); ИЭР-МС m/z: 558 ($M^+ + 1$).

Получение соединения М-2-13

К гомогенному раствору оксалилхлорида (58 мкл, 0,67 ммоль, 1,5 экв.) в безводном ДХМ (1,0 мл) при -78°C в атмосфере N₂ добавляли ДМСО (80 мкл, 1,12 ммоль, 3,0 экв.) в безводном ДХМ (1,0 мл) и перемешивали в течение 15 минут. К реакционной смеси по каплям добавляли раствор М-2-12 (250 мг, 0,45 ммоль) в безводном ДХМ (3,0 мл) и перемешивали в течение 3 часов, затем добавляли ТЭА (500 мкл, 3,58 ммоль, 8,0 экв.) и перемешивали в течение дополнительных 30 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли дистиллированной водой (5,0 мл) и экстрагировали ЭА (15 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Гекс: ЭА=3:1) с получением соединения М-2-13 (202 мг, 81%) в виде твердого вещества желтого цвета.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,45 (с, 1H), 7,38 (с, 5H), 7,12 (с, 1H), 5,84 (уш.с., 1H), 5,18 (д, J=10,6 Гц, 1H), 4,31 (д, J=12,8 Гц, 1H), 4,18-4,06 (м, 3H), 3,84 (с, 3H), 3,72 (с, 1H), 3,43 (т, J=10,0 Гц, 1H), 3,12 (д, J=18,0 Гц, 1H), 2,32 (с, 3H); ИЭР-МС m/z: 556 ($M^+ + 1$)

Получение соединения М-2

К желтому раствору М-2-13 (175 мг, 0,31 ммоль) в MeOH (16 мл) и H₂O (3,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли K₂CO₃ (109 мг, 0,79 ммоль, 2,5 экв.) и перемешивали в течение 2 часов. Смесь разбавляли водой (5 мл) и экстрагировали ЭА (10 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (Гекс: ЭА=2:1) с получением соединения М-2 (135 мг, 85%) в виде твердого вещества желтого цвета.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,49 (с, 1H), 7,37 (с, 5H), 6,94 (с, 1H), 5,93 (уш.с., 1H), 5,88-5,82 (м, 1H), 5,14 (д, J=11,6 Гц, 1H), 4,32 (д, J=10,8 Гц, 1H), 4,18-4,00 (м, 2H), 3,97 (с, 3H), 3,41 (т, J=9,6 Гц, 1H), 3,10 (д, J=16,0 Гц, 1H); ИЭР-МС m/z: 514 ($M^+ + 1$)

М-2а получали способом, аналогичным получению соединения М-2.

Получение соединения М-2-11а

Выход 59% в виде твердой пены желтого цвета; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,78 (уш.с., 1H), 7,95 (с, 1H), 7,22 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 6,97 (с, 1H), 6,85 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 6,81 (с, 1H), 4,87-4,69 (м, 3H), 4,09-4,02 (м, 1H), 3,93-3,88 (м, 1H), 3,80 (д, $J=8,0$ Гц, 6H), 3,20-3,12 (м, 1H), 3,05-2,97 (м, 1H), 2,34 (с, 3H), 0,85 (с, 9H), 0,60 (д, $J=8,4$ Гц, 6H); ИЭР-МС m/z : 703(M^++1).

Получение соединения М-2-12а

Выход 79% в виде твердой пены желтого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,85 (уш.с., 1H), 7,85 (с, 1H), 7,2 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,00 (с, 1H), 6,85 (д, $J=7,2$ Гц, 1H), 6,72 (с, 1H), 4,95-4,87 (м, 1H), 4,74 (д, $J=2,8$ Гц, 2H), 4,04-3,84 (м, 3H), 3,81 (д, $J=3,6$ Гц, 6H), 3,34-3,24 (м, 1H), 2,72 (дд, $J=13,2, 3,2$ Гц, 1H), 2,34 (с, 3H); ИЭР-МС m/z : 588(M^++1).

Получение соединения М-2-13а

Выход 80% в виде твердой пены желтого цвета.

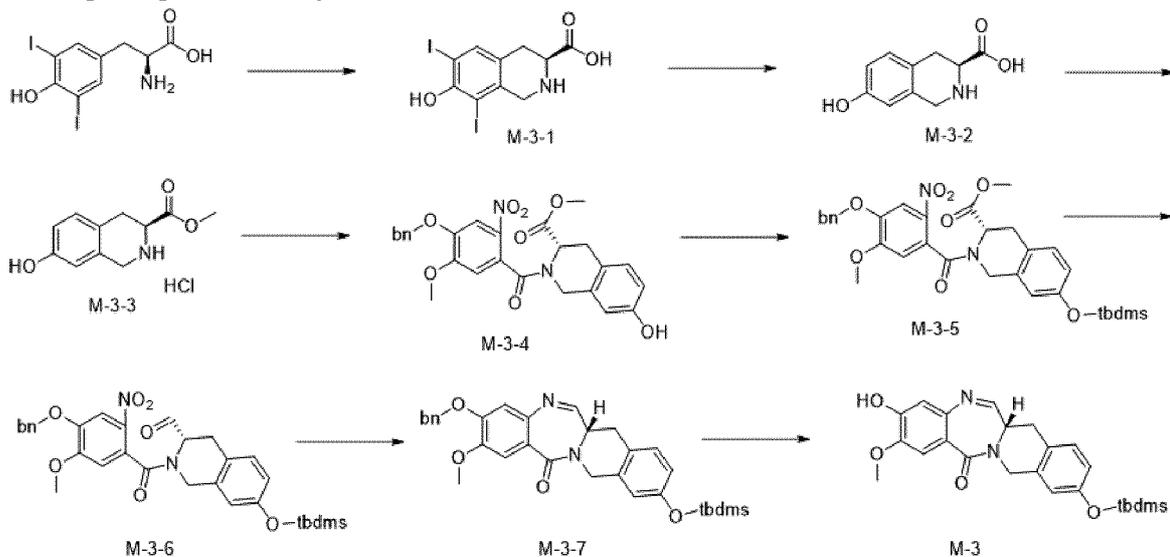
^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,37 (с, 2H), 7,32 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,11 (с, 1H), 6,90 (д, $J=9,2$ Гц, 2H), 5,86-5,81 (м, 1H), 5,18 (д, $J=12$ Гц, 1H), 4,30 (д, $J=11,6$ Гц, 1H), 4,10-4,05 (м, 1H), 3,90 (с, 3H), 3,83 (с, 3H), 3,73 (д, $J=4,8$ Гц, 1H), 3,44-3,35 (м, 1H), 3,12-3,05 (м, 1H), 2,37 (с, 3H); ИЭР-МС m/z : 586(M^++1).

Получение соединения М-2а

Выход 75% в виде твердой пены желтого цвета.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,37 (с, 1H), 7,31 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,30 (с, 1H), 6,94 (с, 1H), 6,89 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 5,93 (с, 1H), 5,84 (дд, $J=5,2, 4,4$ Гц, 1H), 5,14 (д, $J=11,6$ Гц, 1H), 4,32 (д, $J=12$ Гц, 1H), 4,07-3,99 (м, 1H), 3,97 (с, 3H), 3,83 (с, 1H), 3,64 (д, $J=4,4$ Гц, 1H), 3,43-3,34 (м, 1H), 3,10-3,03 (м, 1H); ИЭР-МС m/z : 544(M^++1).

Пример 4.8.6 Получение соединения М-3



Получение соединения М-3-1

К раствору (S)-2-амино-3-(4-гидрокси-3,5-дииодфенил)пропановой кислоты (8,0 г, 18,48 ммоль) в концентрированной водной HCl (90 мл) добавляли 1,2-диметоксиэтан (7,5

мл) и параформальдегид (37% масс. в H₂O, 92,38 ммоль). Смесь энергично перемешивали и медленно нагревали до 72 °С. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при 72 °С. Затем суспензию охлаждали на бане со льдом, твердые вещества собирали фильтрованием, тщательно промывали 1,2-диметоксиэтаном (3×10 мл) и сушили в вакууме с получением соединения М-3-1 (2,49 г, выход 28%).

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 10,02 (уш.с., 1H), 9,69 (с, 1H), 7,73 (с, 1H), 4,31 (дд, J=6,8 Гц, 4,4 Гц, 1H), 4,05 (кв., J=18,8 Гц, 16 Гц, 2H), 3,21 (дд, J=12 Гц, 4,8 Гц, 1H), 3,12-3,02 (м, 1H); ИЭР-МС m/z: 446 (M⁺+1).

Получение соединения М-3-2

Смесь М-3-1 (1,4 г, 3,1 ммоль), ТЭА (1,4 мл, 10,38 ммоль) и 5% Pd/C (335 мг, 0,16 ммоль) в EtOH/ H₂O (40 мл/ мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере H₂ в течение 3 часов. Смесь фильтровали через Целите® и фильтрат концентрировали. Полученный остаток разбавляли водой и осадок отфильтровывали. Твердое вещество промывали холодной водой и сушили в высоком вакууме с получением соединения М-3-2 (337,3 мг, 60%).

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,55 (уш.с., 1H), 9,69 (с, 1H), 6,98 (д, J=9,0 Гц, 1H), 6,64 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,57 (с, 1H), 4,06 (с, 2H), 3,46 (дд, J=6,0 Гц, 4,8 Гц, 1H), 3,46 (дд, J=11,6 Гц, 5,2 Гц, 1H), 2,82-2,75 (м, 1H); ИЭР-МС m/z: 194 (M⁺+1).

Получение соединения М-3-3

К раствору М-3-2 (337,3 мг, 1,74 ммоль) в MeOH (5,0 мл) по каплям добавляли SOCl₂ (380 мкл, 5,24 ммоль) до 0 °С в атмосфере N₂. После кипячения с обратным холодильником в течение 2 часов, реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (406 мг, выход 96%).

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,83 (уш.с., 2H), 9,56 (с, 1H), 7,05 (д, J=8,0 Гц, 1H), 6,70 (д, J=8,0 Гц, 1H), 6,63 (с, 1H), 4,53-4,49 (м, 1H), 4,28-4,22 (м, 2H), 3,81 (с, 1H), 3,18 (дд, J=11,6 Гц, 5,2 Гц, 1H), 3,04-2,97 (м, 1H); ИЭР-МС m/z: 208 (M⁺+1).

Получение соединения М-3-4

К раствору соединения Int-1 (640,9 мг, 1,86 ммоль) в безводном ТГФ (4,0 мл) добавляли соединение М-3-3 (350 мг, 1,43 ммоль) в ДМФА (5,0 мл), затем добавляли DIPEA (750 мкл, 4,3 ммоль) при 0 °С. После перемешивания в течение 2 часов при комнатной температуре, смесь разбавляли дистиллированной водой (10 мл) и ЭА (2 X 50 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-3-4 (616 мг, 87%); ИЭР-МС m/z: 493 (M⁺+1).

Получение соединения М-3-5

К раствору М-3-4 (616 мг, 1,25 ммоль) и имидазола (102,2 мг, 1,50 ммоль) в безводном ДХМ (6,0 мл) при 0 °С добавляли трет-бутилдиметилсилилхлорид (188,5 мг, 1,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. В реакционную смесь добавляли 2 н HCl (5 мл) и насыщенный водный

раствор хлорида натрия (10 мл) и экстрагировали ДХМ (10 мл x 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-3-5 (655,2 мг, 86%). ИЭР-МС m/z : 607 ($\text{M}^+ + 1$).

Получение соединения М-3-6

К раствору соединения М-3-5 (309 мг, 0,51 ммоль) в безводном ДХМ (1,5 мл) и толуоле (3,5 мл) при -78°C в атмосфере N_2 по каплям добавляли DIBAL (990 мкл, 0,99 ммоль, 1,0М в толуоле). После перемешивания в течение 1,5 часов, в реакционную смесь добавляли MeOH (0,4 мл) и 2 н HCl (15 мл) при -78°C , затем экстрагировали H_2O (20 мл) и ЭА (30 мл x 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-3-6 (280,4 мг, 95%); ИЭР-МС m/z : 577 ($\text{M}^+ + 1$).

Получение соединения М-3-7

К раствору соединения М-3-6 (280,4 мг, 0,49 ммоль) в ТГФ (6,0 мл) и дистиллированной воды (86 мл) добавляли $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (677,2 мг, 3,89 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 5 часов смесь концентрировали четыре раза при пониженном давлении, используя толуол в качестве соразтворителя, тем самым удаляя воду. Полученное желтое твердое вещество растворяли в безводном MeOH (12 мл). К раствору добавляли ацетилхлорид (345,6 мкл, 4,86 ммоль). После перемешивания в течение 15 минут реакционную смесь фильтровали и фильтрат перемешивали в течение 1 часа. pH реакционной смеси доводили до 7 добавлением насыщенного раствора NaHCO_3 и разбавляли дистиллированной водой (10 мл) и ЭА (2 X 50 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-3-7 (107,7 мг, 42%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,55 (с, 1H), 7,48-7,31 (м, 6H), 7,16 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 6,94 (с, 1H), 6,82-6,76 (м, 2H), 5,28-5,15 (м, 2H), 4,93 (д, $J=15,6$ Гц, 1H), 4,46 (д, $J=15,6$ Гц, 1H), 3,97 (с, 3H), 3,92-3,86 (м, 1H), 3,18 (дд, $J=9,6$ Гц, 5,6 Гц, 1H), 3,10-3,02 (м, 1H), 0,99 (с, 9H), 0,21 (с, 6H); ИЭР-МС m/z : 529 ($\text{M}^+ + 1$).

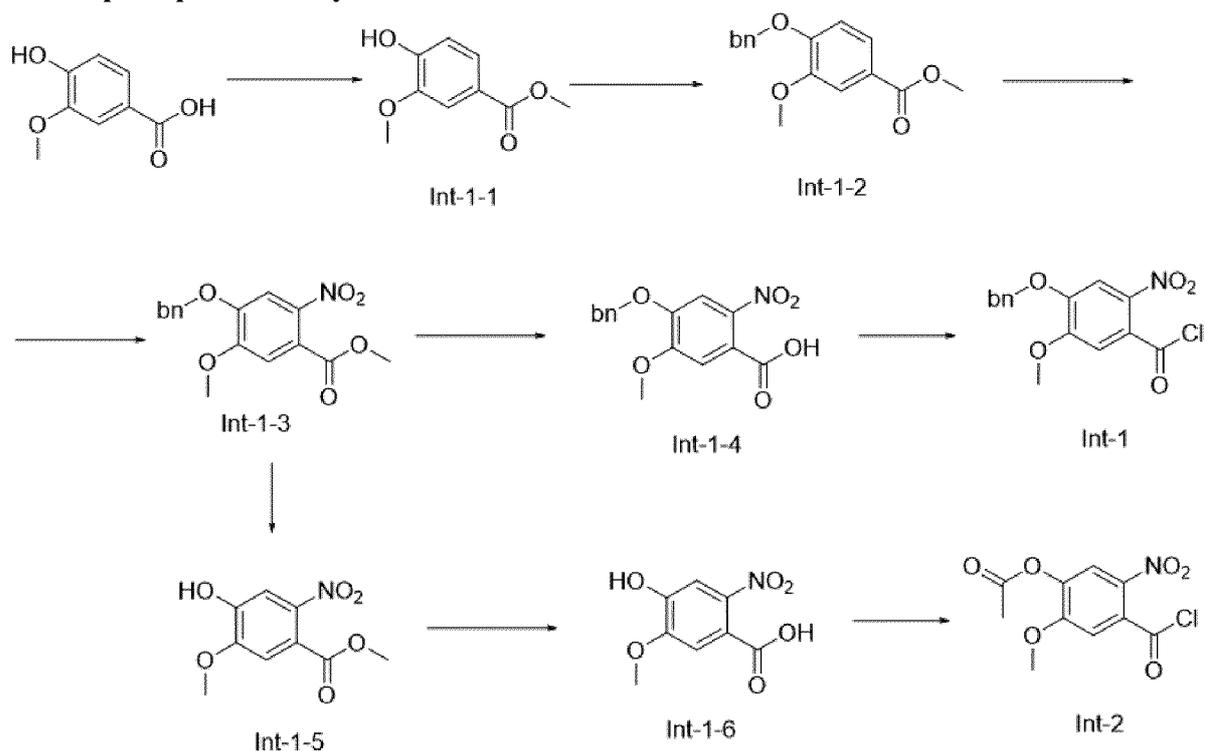
Получение соединения М-3

К раствору соединения М-3-7 (53,4 мг, 0,1 ммоль) в EtOH (6,0 мл) добавляли 5% Pd/C (107,5 мг, 0,05 ммоль) в атмосфере N_2 . Затем в реакционную смесь добавляли 1,4-циклогексадиен (764,4 мкл, 8,08 ммоль). После перемешивания в течение 3 часов, смесь фильтровали через Целите® для удаления Pd/C, и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-3 (30,3 мг, 68%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,54 (с, 1H), 7,47 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 7,20 (д, $J=8,82$ Гц, 1H), 6,87 (с, 1H), 6,84-6,75 (м, 2H), 5,98 (с, 1H), 4,93 (д, $J=15,6$ Гц, 1H), 4,47 (д, $J=15,2$ Гц, 1H), 3,98 (с, 3H), 3,94-3,85 (м, 1H), 3,19 (дд, $J=11,2$ Гц, 5,2 Гц, 1H), 3,12-3,02 (м, 1H), 0,99

(с, 9H), 0,21 (с, 6H); ИЭР-МС m/z: 439 (M⁺+1).

Пример 4.8.7 Получение соединения Int-1



Получение соединения Int-1-1

К раствору ванилиновой кислоты (50,0 г, 0,30 моль) в MeOH (700 мл) по каплям добавляли SOCl_2 (207 мл, 2,85 моль) при 0°C в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 15 часов при комнатной температуре pH реакции довели до 7-8 с помощью насыщенного водного раствора NaHCO_3 , а затем разбавляли дистиллированную воду (100 мл) и ЭА (400 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Int-1-1 (54,2 г, количественно).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,64 (дд, $J=6,4, 1,6$ Гц, 1H), 7,55 (с, 1H), 6,94 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 6,05 (с, 1H), 3,95 (с, 3H), 3,89 (с, 3H).

Получение соединения Int-1-2

К раствору соединения Int-1-1 (54,2 г, 0,30 моль) в ДМФА (200 мл) добавляли K_2CO_3 (61,6 г, 0,45 моль) и бензилбромид (39,0 мл, 0,33 моль) в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 6 часов при 100°C смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли дистиллированной водой (100 мл) и ЭА (400 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Int-1-2 (79,8 г, 98%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,60 (дд, $J=6,4, 2,0$ Гц, 1H), 7,56 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,44-7,31 (м, 5H), 6,89 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 5,22 (с, 2H), 3,94 (с, 3H), 3,88 (с, 3H).

Получение соединения Int-1-3

Соединение Int-1-2 (79,8 г, 0,29 моль) растворяли в уксусном ангидриде (550 мл) в

атмосфере N_2 и затем охлаждали до $0\text{ }^\circ\text{C}$. Порциями добавляли полу(пентагидрат) нитрата меди (II) (75,0 г, 0,32 моль). После перемешивания в течение 6 часов при $0\text{ }^\circ\text{C}$, в реакционную смесь добавляли ледяную воду (800 мл). Твердое вещество отфильтровывали и промывали дистиллированной водой (100 мл) и гексаном (400 мл) с получением соединения Int-1-3 (85,5 г, 92%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,52 (с, 1H), 7,45-7,35 (м, 5H), 7,08 (с, 1H), 5,22 (с, 2H), 3,98 (с, 3H), 3,91 (с, 3H).

Получение соединения Int-1-4

К раствору соединения Int-1-3 (85,5 г, 0,27 моль) в ТГФ (800 мл) и MeOH (300 мл) добавляли 2 н NaOH (404 мл, 0,81 моль). После перемешивания в течение 5 ч при $65\text{ }^\circ\text{C}$ реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и доводили до pH 2 добавлением 2 н раствора HCl, а затем экстрагировали дистиллированной водой (100 мл) и ЭА (300 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Твердый остаток собирали и промывали гексаном с получением соединения Int-1-4 (79,2 г, 97%).

^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 7,69 (с, 1H), 7,47-7,35 (м, 5H), 7,03 (с, 1H), 5,24 (с, 2H), 3,91 (с, 3H).

Получение соединения Int-1

К раствору соединения Int-1-4 (100 мг, 0,33 ммоль) в безводном ТГФ (500 мкл) и безводном ДХМ (1,5 мл) медленно по каплям добавляли оксалилхлорид (42,4 мкл) и добавляли 1 каплю ДМФА при $0\text{ }^\circ\text{C}$ в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 30 мин, реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Соединение Int-1 использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки.

Получение соединения Int-1-5

К раствору соединения Int-1-3 (5,0 г, 15,8 ммоль) в ДХМ (300 мл) при $0\text{ }^\circ\text{C}$ в атмосфере N_2 медленно по каплям добавляли раствор метансульфокислоты (50 мл) в ДХМ (100 мл) и перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь гасили раствором NaHCO_3 и экстрагировали H_2O (100 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Int-1-5 (2,54 г, 71%)

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,48 (с, 1H), 7,14 (с, 1H), 6,05 (с, 1H), 4,02 (с, 3H), 3,89 (с, 3H).

Получение соединения Int-1-6

К раствору Int-1-5 (2,0 г, 8,8 ммоль) в 1,4-диоксане (28 мл) в атмосфере N_2 добавляли 6 н раствор NaOH (4,4 мл, 26,4 ммоль) и перемешивали в течение 4 часов при $40\text{ }^\circ\text{C}$. Реакционной смеси давали охладиться до $0\text{ }^\circ\text{C}$ и подкисляли 2 н HCl. Смесь экстрагировали ЭА/ H_2O . Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали, концентрировали при пониженном давлении и сушили под вакуумом с получением белого твердого вещества Int-1-6 (2,0 г, количественно).

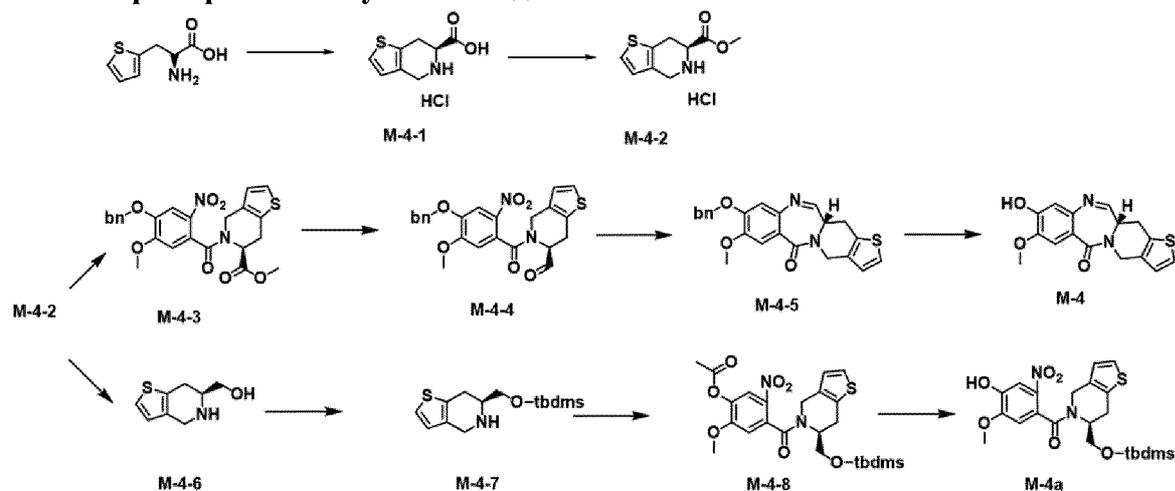
^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ 10,60 (с, 1H), 7,305 (с, 1H), 7,24 (с, 1H), 3,89 (с, 3H)

Получение соединения Int-2

К раствору Int-1-6 (1,8 г, 8,77 ммоль) в уксусном ангидриде (1,0 мл, 10,5 ммоль) в атмосфере N_2 добавляли ТЭА (1,8 мл, 13,1 ммоль), DMAP (0,2 г, 1,75 ммоль) и перемешивали в течение 3,5 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь экстрагировали ЭА/ H_2O . Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали, концентрировали при пониженном давлении и сушили под вакуумом с получением белого твердого вещества Int-2 (2,2 г коричневого твердого вещества, 49%).

1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$): δ 7,981 (с, 1H), 7,451 (с, 1H), 3,933 (с, 3H), 2,294 (с, 3H).

Пример 4.8.8 Получение соединения М-4



Получение соединения М-4-1

К раствору тиенилаланина (500 мг, 2,92 ммоль) в дистиллированной воде (5,0 мл) по каплям добавляли конц. HCl (206 мкл) и перемешивали при 0 °С в атмосфере N_2 , а затем к смеси добавляли формальдегид (37%, 261 мкл, 3,5 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. После завершения реакции, смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток суспендировали в ИПС (3,0 мл) и к смеси добавляли 4М HCl (в 1,4-диксоане, 1,0 мл). После перемешивания в течение 2 часов твердое вещество отфильтровывали и промывали ИПС (5 мл), эфиром (20 мл) с получением соединения М-4-1 (495,7 мг, 77%).

1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 9,95 (уш.с., 1H), 7,48 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 6,94 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,48-4,44 (м, 1H), 4,28 (д, $J=15,6$ Гц, 1H), 4,18 (д, $J=16,0$ Гц, 1H), 3,39 (дд, $J=11,6, 5,2$ Гц, 1H), 3,17-3,10 (м, 1H). ИЭР-МС m/z : 184 ($M^+ + 1$).

Получение соединения М-4-2

Соединение М-4-1 (495,7 мг, 2,25 ммоль) растворяли в MeOH (10,0 мл) в атмосфере N_2 , а затем охлаждали до 0 °С. По каплям добавляли $SOCl_2$ (491,3 мкл, 6,76 ммоль) при 0 °С. Затем реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 3 часов. После завершения реакции, смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток промывали эфиром (5 мл X 2) с получением соединения М-4-2 (521,5 мг, 99%)

1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 10,22 (уш.с., 2H), 7,49 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 6,94 (д,

J=5,2 Гц, 1H), 4,65-4,61 (м, 1H), 4,30 (д, J=15,6 Гц, 1H), 4,19 (д, J=15,6 Гц, 1H), 3,80 (с, 3H), 3,60 (дд, J=11,6, 5,2 Гц, 1H), 3,21-3,14, (м, 1H). ИЭР-МС m/z: 198 (M⁺+1).

Получение соединения М-4-3

К раствору соединения Int-1 (856,5 мг, 2,66 ммоль) в безводном ТГФ (3,0 мл) добавляли соединение М-4-2 (518,5 мг, 2,22 ммоль) и растворяли в ДМФА (3,0 мл), DIPEA (772,8 мкл, 4,44 ммоль) при 0 °С. И затем реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем реакция завершалась. В реакцию смесь добавляли дистиллированную воду (20 мл) и ЭА (50 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-4-3 (888,5 мг, 89%)

ИЭР-МС m/z: 483 (M⁺+1).

Получение соединения М-4-4

К раствору соединения М-4-3 (880 мг, 1,82 ммоль) в безводном ДХМ (5,0 мл) и толуоле (15,0 мл) по каплям добавляли DIBAL (3,6 мл, 3,6 ммоль, 1,0М в толуоле) при -78 °С в атмосфере N₂. Реакционную смесь перемешивали при -78 °С в течение 3 часов. В реакцию смесь добавляли MeOH (5 мл), 2 н HCl (20,0 мл) при -78 °С. Затем в реакцию смесь добавляли дистиллированную воду (20 мл) и ЭА (50 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-4-4 (701,9 мг, 85%).

ИЭР-МС m/z: 453(M⁺+1).

Получение соединения М-4-5

К раствору соединения М-4-4 (700 мг, 1,55 ммоль) в ТГФ (15,0 мл) и дистиллированной водой (3,0 мл) добавляли Na₂S₂O₄ (2,2 г, 12,4 ммоль) при комнатной температуре в течение 4 часов. Затем реакция завершалась. В реакцию смесь добавляли MeOH (5 мл). И затем реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток суспендировали в толуоле (20 мл) и выпаривали, чтобы помочь удалить всю оставшуюся воду. Полученное белое твердое вещество далее полностью сушили, оставляя на ночь в высоком вакууме. Остаток суспендировали в безводном MeOH (10 мл) с последующим добавлением ацетилхлорида (1,1 мл, 15,5 ммоль). Через 15 минут мутный раствор отфильтровывали и твердое вещество промывали безводным MeOH (5 мл X2). Фильтрат перемешивали в течение 2 часов. Реакция была завершена. Реакционную смесь гасили раствором NaHCO₃ (pH~7). После этого в реакцию смесь добавляли дистиллированную воду (20 мл) и ЭА (50 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-4-5 (701,9 мг, 85%)

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,55 (д, J=5,6 Гц, 1H), 7,47 (м, 5H), 7,22 (д, J=5,2 Гц, 1H), 6,95 (д, J=5,2 Гц, 1H), 6,85 (с, 1H), 5,26-5,14 (м, 2H), 4,98 (д, J=16,4 Гц, 1H), 4,44 (д,

$J=16,8$ Гц, 1H), 4,08-4,02 (м, 1H), 3,98 (с, 3H), 3,32-3,26 (м, 1H).

ИЭР-МС m/z : 453 ($M^+ + 1$).

Получение соединения М-4

Раствор соединения М-4-5 (60 мг, 0,15 ммоль) в безводном ДХМ (3 мл) охлаждали до 0 °С. Затем добавляли метансульфовую кислоту (700 мкл) в ДХМ (2,0 мл) и перемешивали в течение 2 часов при 0 °С. Затем реакция завершалась. В реакционную смесь добавляли раствор NaHCO_3 (рН ~7). Затем в реакционную смесь добавляли дистиллированную воду (5 мл) и ЭА (20 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-4 (38,3 мг, 82%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,58 (д, $J=5,6$ Гц, 1H), 7,54 (с, 1H), 7,23 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 6,95 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 6,89 (с, 1H), 6,06 (с, 1H), 5,30 (с, 1H), 4,99 (д, $J=16,4$ Гц, 1H), 4,44 (д, $J=16,4$ Гц, 1H), 4,10-4,04 (м, 1H), 3,99 (с, 3H), 3,32-3,26 (м, 1H).

ИЭР-МС m/z : 315($M+1$).

Получение соединения М-4-6

К раствору М-4-2 (1 г, 4,28 ммоль) в 20 мл сухого ТГФ при 0 °С в атмосфере азота добавляли 1М раствор ЛАН в ТГФ (5,31 мл, 5,31 ммоль) и перемешивали в течение 15 часов. Реакционную смесь гасили водой (5,3 мл), 15% NaOH (5,3 мл), H_2O (16,0 мл) и перемешивали в течение 30 минут. Неорганическое твердое вещество отфильтровывали и промывали ЭА. Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением соединения М-4-6 (652 мг, 3,85 ммоль, 90%) виде твердого вещества красного цвета, которое использовали без дополнительной очистки.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,08 (д, $J=4,8$, 1H), 6,73 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,01- 3,88 (м, 2H), 3,80 (дд, $J=11,2$ Гц, 1H), 3,55 (дд, $J=8,4$ Гц, 1H), 3,13-3,07 (м, 1H), 2,78-2,74 (м, 1H), 2,60-2,51 (м, 1H); ЕТ-МС m/z : 170,0 ($M^+ + 1$).

Получение соединения М-4-7

К раствору М-4-6 (700 мг, 4,14 ммоль) в безводном ДХМ (20 мл) при 0 °С в атмосфере N_2 добавляли имидазол (844 мг, 12,41 ммоль), TBDMS-Cl (686 мг, 4,55 ммоль) и перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь экстрагировали H_2O (100 мл), ДХМ (100 мл X 3). Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-4-7 (792 мг, 67%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,07 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 6,75 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 4,04-3,92 (м, 2H), 3,77 (дд, $J=9,6$ Гц, 1H), 3,65 (дд, $J=9,6$ Гц, 1H), 3,05-3,00 (м, 1H), 2,75-2,71 (м, 1H), 2,65-2,59 (м, 1H); ЕТ-МС m/z : 284,1($M^+ + 1$).

Получение соединения М-4-8

К раствору Int-2 (536 мг, 1,96 ммоль) и М-4-7 (666 мг, 2,35 ммоль) в безводном ДМФА (1,8 мл) при 0 °С в атмосфере N_2 добавляли DIPEA (0,85 мл, 4,89 ммоль) и перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь экстрагировали ЭА/ H_2O . Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 ,

фильтровали, концентрировали при пониженном давлении. Реакционную смесь очищали колоночной хроматографией (ЭА/Гекс: 1/1) с получением желтого твердого вещества М-4-8 (758,5 мг 76%); EI-МС m/z: 521 ($M^+ + 1$).

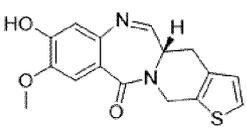
Получение соединения М-4а

К раствору М-4-8 (200 мг, 0,384 ммоль) в MeOH (4,5 мл) при 0°C в атмосфере N₂ добавляли K₂CO₃ (63,7 мг, 0,461 ммоль) и перемешивали в течение 20 минут. Реакционную смесь экстрагировали ЭА/H₂O. Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали, концентрировали при пониженном давлении и сушили под вакуумом с получением желтого твердого вещества М-4а (189,8 мг, количественно); EI-МС m/z: 479 ($M^+ + 1$).

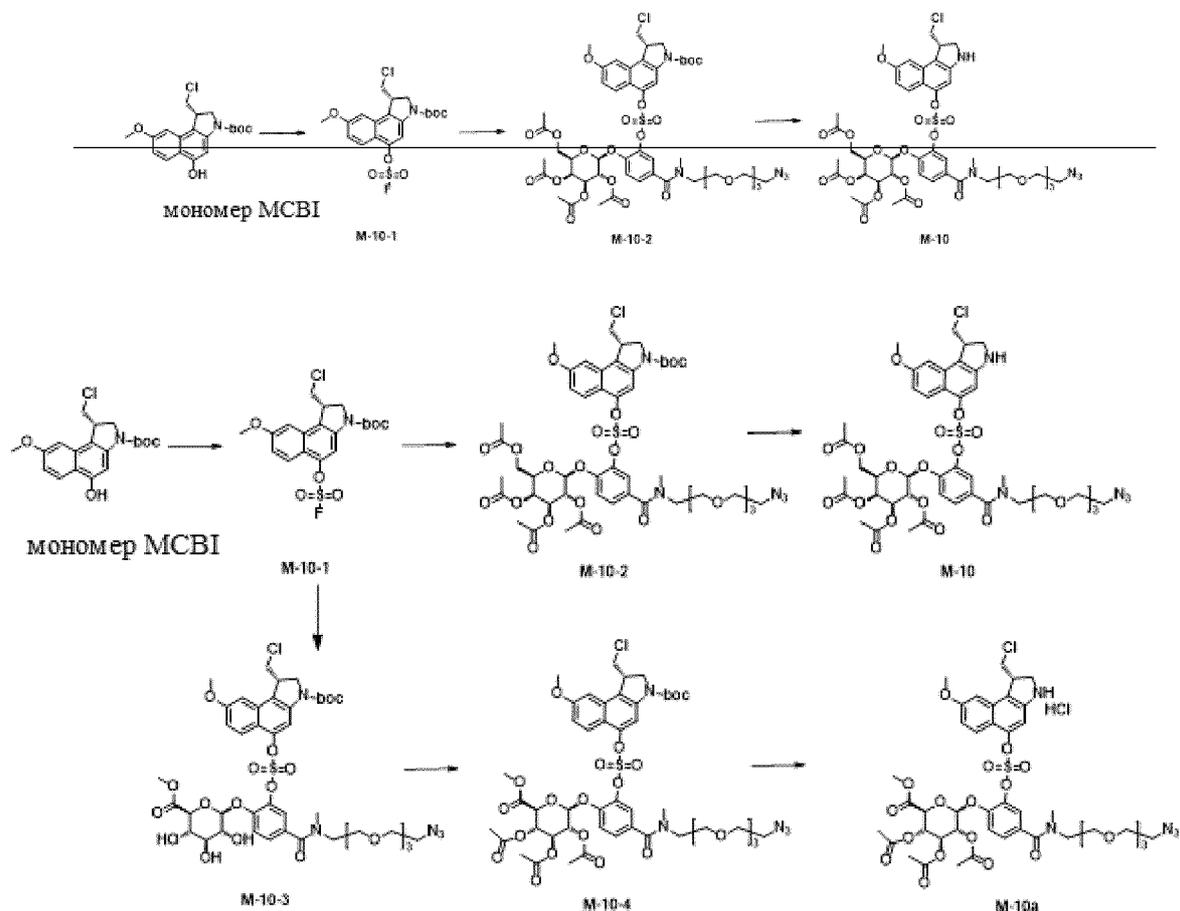
В приведенной ниже таблице 3 перечислены производные мономеров, которые были синтезированы с помощью аналогичного способа синтеза, как описано в примере 4.8.7.

Таблица 3

Мономер	Структура	Характеристики данных
М-5		Выход 40%; ¹ H ЯМР (400 МГц, CD ₃ OD) δ 8,34 (уш.с., 1H), 7,68 (с, 1H), 7,28 (с, 1H), 6,42 (с, 1H), 4,83 (д, J=16,4 Гц, 1H), 4,63 (д, J=16,4 Гц, 1H), 4,26 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,02-3,99 (м, 1H), 3,87 (с, 3H), 3,68 (с, 3H), 2,98-2,86 (м, 2H). ИЭР-МС m/z: 313 ($M^+ + 1$).
М-6		Выход 31%; ¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 7,67 (д, J=6,0 Гц, 1H), 7,50 (с, 1H), 7,41 (с, 1H), 7,37 (д, J=3,2 Гц, 1H), 6,89 (с, 1H), 6,37 (с, 1H), 4,58 (с, 2H), 4,15 (т, J=6,8 Гц, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,24 (дд, J=9,6, 6,8 Гц, 1H), 3,12 (д, J=16,8 Гц, 1H); ИЭР-МС m/z: 299 ($M^+ + 1$).
М-7		Выход 71%; ¹ H ЯМР (400 МГц, CD ₃ OD) δ 8,34 (уш.с., 1H), 7,68 (с, 1H), 7,28 (с, 1H), 6,42 (с, 1H), 4,77 (д, J=16,0 Гц, 1H), 4,56 (д, J=16,0 Гц, 1H), 4,33 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,10-4,02 (м, 1H), 3,84 (с, 3H), 3,66 (с, 3H), 3,02-2,82 (м, 2H). ИЭР-МС m/z: 313 ($M^+ + 1$).
М-8		Выход: 84%; ¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃) δ 7,61 (д, J=5,6 Гц, 1H), 7,52 (с, 1H), 6,91 (д, J=12,4 Гц, 1H), 6,02 (с, 1H), 4,87 (д, J=16,4 Гц, 1H), 4,39 (д, J=16,8 Гц, 1H), 4,07-4,02 (м, 1H), 3,99 (с, 3H), 3,28-3,16 (м, 2H); ИЭР-МС m/z: 394 ($M^+ + 1$).

M-9		<p>Выход: 89%; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,53 (с, 1H), 7,52 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 7,02 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 6,89 (с, 1H), 6,06 (с, 1H), 5,09 (д, $J=16,4$, 1H), 4,57 (д, $J=16,4$, 1H), 4,08-3,99 (м, 1H), 3,98 (с, 3H), 3,19-3,14 (м, 2H); ИЭР-МС m/z: 315 (M^++1).</p>
-----	---	---

Пример 4.8.9 Получение M-10 и M-10a



Получение соединения M-10-1

К раствору соединения мономера MSVI (330 мг, 0,907 ммоль) в ДХМ (15,0 мл) добавляли Et_3N (0,510 мл, 3,63 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . Газ SO_2F_2 вводили через баллон и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Смесь экстрагировали ДХМ. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения M-10-1 (306 мг, 76%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 8,20-7,82 (м, 1H), 7,93 (д, $J=9,6$ Гц, 1H), 7,16 (дд, $J=9,2$, 2,4 Гц, 1H), 6,94 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 4,31 (уш.с., 1H), 4,18-4,11 (м, 1H), 4,01-3,89 (м, 2H), 3,95 (с, 3H), 3,50 (т, $J=11,2$ Гц, 1H), 1,60 (с, 9H)

ИЭР-МС m/z : 468 ($M^++\text{Na}$).

Получение соединения M-10-2

К раствору соединения M-10-1 (150 мг, 0,336 ммоль) в ДМФА (1,50 мл) добавляли

ОНРАС-D1a (247 мг, 0,353 ммоль) и ВЕМР (84 мкл, 0,302 ммоль) при 0°C в атмосфере N₂. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 40 мин. В реакционную смесь добавляли воду и экстрагировали EtOAc. Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-10-2 (344 мг, 91%).

ИЭР-МС m/z: 1124 (M⁺).

Получение соединения М-10

К раствору соединения М-10-2 (140 мг, 0,124 ммоль) в ДХМ (6,0 мл) добавляли 4,0 М раствор хлороводорода в 1,4-диоксане (2,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 1,5 часов реакционную смесь разбавляли ДХМ и концентрировали при пониженном давлении. Соединение М-10 использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. (128 мг, 97%)

ИЭР-МС m/z: 1024 (M⁺).

Получение соединения М-10-3

К раствору соединения М-10-1 (30,2 мг, 0,068 ммоль) в ДМФА (0,30 мл) добавляли ОНРАС-D13 (37,8 мг, 0,068 ммоль), ВЕМР (23,5 мкл, 0,081 ммоль) и K₂CO₃ (9,35 мг, 0,068 ммоль) при 0°C в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 2 часов при комнатной температуре, реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения М-10-3 (10 мг, 15%).

ИЭР-МС m/z: 984 (M⁺).

Получение соединения М-10-4

К раствору соединения М-10-3 (32,1 мг, 0,033 ммоль) в пиридине (0,65 мл) добавляли уксусный ангидрид (24,7 мкл, 0,261 ммоль) и DMAP (0,40 мг, 0,033 ммоль) при 0°C в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 1 часа при комнатной температуре, реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения М-10-4 (35,0 мг, 97%).

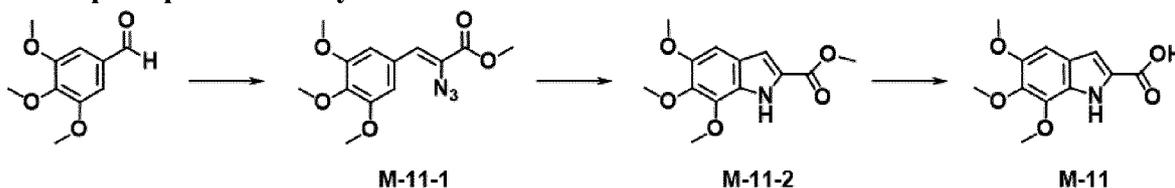
ИЭР-МС m/z: 1110 (M⁺).

Получение соединения М-10a

К раствору соединения М-10-4 (19,8 мг, 0,018 ммоль) в ДХМ (0,50 мл) добавляли 4,0 М раствор хлористого водорода в 1,4-диоксане (0,20 мл) при 0°C в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 1,5 часов при комнатной температуре реакционную смесь разбавляли ДХМ и концентрировали при пониженном давлении. Соединение М-10a использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. (14,5 мг, 78%)

ИЭР-МС m/z: 1010 (M⁺).

Пример 4.8.10 Получение М-11



обратным холодильником в течение ночи. После завершения реакции, смесь охлаждали при комнатной температуре. Реакционную смесь экстрагировали ДХМ. Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-12-1 (5,60 г, 66%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 9,85 (с, 1H), 7,53-7,50 (м, 1H), 7,42 (д, $J=1,6$ Гц, 1H), 7,01 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 4,40 (т, $J=6,4$ Гц, 2H), 3,97 (с, 3H), 3,70 (т, $J=6,8$ Гц, 2H)

ИЭР-МС m/z : 260 (M^++1).

Соединения М-12-2 и М-12-3 синтезировали способом, аналогичным способу получения соединений М-11-1 и М-11-2 в Примере 4.8.10.

Соединение М-12-2

Выход 18%

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,56 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,39 (дд, $J=8,4, 2,0$ Гц, 1H), 6,90 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 6,86 (с, 1H), 4,38 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,91 (с, 3H), 3,90 (с, 3H), 3,69 (т, $J=6,8$ Гц, 2H)

Соединение М-12-3

Выход 73%

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 7,14 (с, 1H), 7,11-7,10 (м, 1H), 6,86 (с, 1H), 4,35 (т, $J=6,8$ Гц, 2H), 3,93 (с, 3H), 3,92 (с, 3H), 3,69 (т, $J=6,8$ Гц, 2H)

ИЭР-МС m/z : 329 (M^++1).

Получение соединения М-12-4

К раствору соединения М-12-3 (100 мг, 0,305 ммоль) в ДМФА (2,50 мл) добавляли диметиламин (0,77 мл, 1,53 ммоль) и карбонат калия (42,2 мг, 0,305 ммоль) в атмосфере N_2 . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. В реакционную смесь добавляли воду и экстрагировали EtOAc . Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-12-4 (90,0 мг, количественно).

ИЭР-МС m/z : 293 (M^++1).

Получение соединения М-12

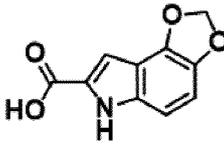
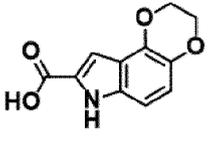
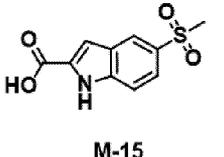
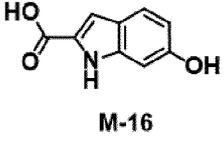
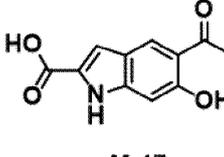
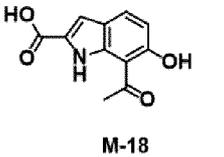
К раствору соединения М-12-4 (45,0 мг, 0,154 ммоль) в метаноле (1,0 мл) при 0°C в атмосфере N_2 добавляли 2 н раствор NaOH (0,92 мл, 1,85 ммоль) и перемешивали в течение ночи. Смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения М-12 (53 мг, количественно).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 11,6 (с, 1H), 7,24 (с, 1H), 6,97 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 6,92 (с, 1H), 4,24 (т, $J=4,8$ Гц, 2H), 3,82 (с, 3H), 3,48-3,44 (м, 2H), 2,86 (с, 6H)

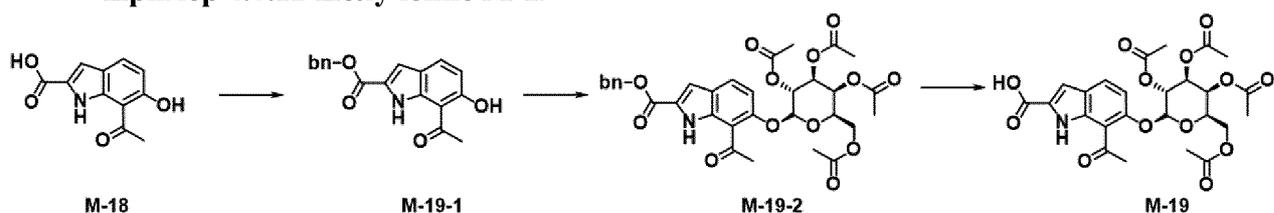
ИЭР-МС m/z : 279 (M^++1).

В приведенной ниже таблице 4 перечислены производные мономеров, которые были синтезированы с помощью аналогичного способа синтеза, как описано в примере 4.8.9.

Таблица 4

Мономер	Структура	Характеристики данных
M-13	 M-13	Выход 27% ¹ H ЯМР (400 Гц, Метанол-D4) δ 6,91-6,81 (м, 3H), 5,94 (с, 2H); ИЭР-МС m/z: 206 (M ⁺⁺¹).
M-14	 M-14	Выход 71% ¹ H ЯМР (400 Гц, CDCl ₃) δ 7,06 (с, 1H), 6,89 (д, J=8,8 Гц, 1H), 6,80 (д, J=8,4 Гц, 1H), 4,36-4,34 (м, 2H), 4,26-4,25 (м, 2H)
M-15	 M-15	Выход 99% ¹ H ЯМР (400 Гц, ДМСО) δ 12,3 (с, 1H), 8,30 (д, J=1,6 Гц, 1H), 7,75 (дд, J=9,2, 2,0 Гц, 1H), 7,64 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,32 (д, J=1,2 Гц, 1H), 3,18 (с, 3H); ИЭР-МС m/z: 239 (M ⁺).
M-16	 M-16	Выход 99% ¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) δ 11,32 (с, 1H), 9,32 (с, 1H), 7,41 (дд, J=8,8, 2,8 Гц, 1H), 6,96 (с, 1H), 6,77 (с, 1H), 6,61-6,58 (м, 1H); ИЭР-МС m/z: 178 (M ⁺ +1).
M-17	 M-17	¹ H ЯМР (400 МГц, MeOH-d4) δ 8,34 (с, 1H), 7,18 (д, J=0,8 Гц, 1H), 6,80 (с, 1H), 2,70 (с, 3H). ИЭР-МС m/z: 220 (M ⁺ +1).
M-18	 M-18	Выход 99% ¹ H ЯМР (400 МГц, MeOH-d4) δ 7,68 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,97 (с, 1H), 6,72 (д, J=8,8 Гц, 1H), 2,76 (с, 3H); ИЭР-МС m/z: 220 (M ⁺ +1).

Пример 4.8.12 Получение M-19



Получение соединения M-19-1

К раствору соединения M-18 (90 мг, 0,411 ммоль) в ДМФА (2 мл) добавляли

DIPEA (0,193 мл, 1,13 ммоль) и бензибромид (0,079 мл, 0,658 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов в атмосфере N₂. После завершения реакции, реакционную смесь экстрагировали ЭА (50 мл x 3), H₂O (50 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-19-1 (99 мг, 78%).

¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃) δ 9,06 (с, 1H), 7,77 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,47-7,36 (м, 5H), 7,27 (с, 1H), 6,84 (д, J=8,8 Гц, 1H), 5,40 (с, 2H), 2,82 (с, 3H).

ИЭР-МС m/z: 310 (M⁺+1).

Получение соединения М-19-2

К раствору соединения М-19-1 (5 мг, 0,411 ммоль) в безводном ДМФА (2 мл) добавляли Int-TG (66,5 мг, 0,162 ммоль), оксид серебра (56,3 мг, 0,243 ммоль) и молекулярное сито (200 мг) при комнатной температуре в атмосфере N₂. После перемешивания при той же температуре в течение 18 часов реакционную смесь фильтровали через ЦЕЛИТЕ®, а затем концентрировали при пониженном давлении. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения М-19-2 (3,2 мг, 31%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,95 (с, 1H), 7,81 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,47-7,33 (м, 5H), 7,24 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,94 (д, J=8,8 Гц, 1H), 5,61 (дд, J=10,4, 8,0 Гц, 1H), 5,49 (д, J=3,2 Гц, 1H), 5,39 (с, 2H), 5,34 (д, J=8,0 Гц, 1H), 5,17 (дд, J=10,4, 3,6 Гц, 1H), 4,31-4,05 (м, 3H), 2,71 (с, 3H), 2,22 (с, 3H), 2,07 (с, 3H), 2,04 (с, 3H), 2,03 (с, 3H).

ИЭР-МС m/z: 662 (M⁺+Na).

Получение соединения М-19

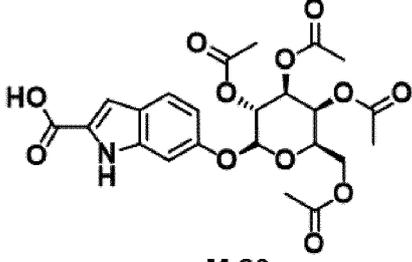
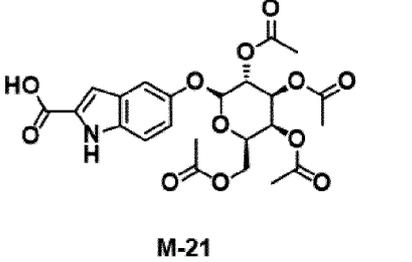
К раствору соединения М-19-2 (3,2 мг, 0,005 ммоль) в MeOH (1 мл) добавляли Pd/C (5%, 1 мг, 0,0005 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере H₂. Смесь перемешивали в течение 1 часа и фильтровали через ЦЕЛИТЕ®, а затем концентрировали при пониженном давлении. Соединение М-19 использовали непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки (2,7 мг, 100%).

ИЭР-МС m/z: 572 (M⁺+Na).

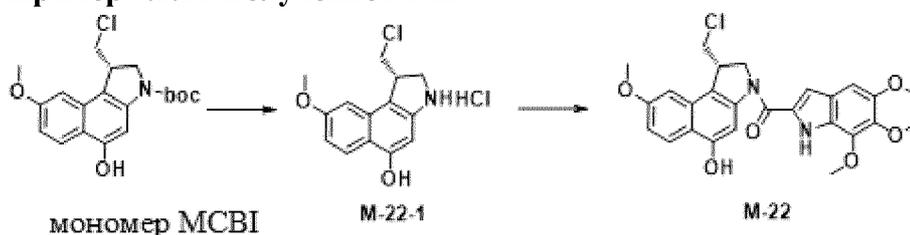
В приведенной ниже таблице 5 перечислены производные мономеров, которые были синтезированы с помощью аналогичного способа синтеза, как описано в примере 4.8.12.

Таблица 5

Мономер	Структура	Характеристики данных
---------	-----------	-----------------------

M-20	 <p style="text-align: center;">M-20</p>	<p style="text-align: center;">Выход 100%). ИЭР-МС m/z: 508 (M⁺+1).</p>
M-21	 <p style="text-align: center;">M-21</p>	<p style="text-align: center;">Выход 100% ИЭР-МС m/z: 507(M⁺).</p>

Пример 4.8.13 Получение M-22



Получение соединения M-22-1

К раствору МСВИ-мономера (100 мг, 0,274 ммоль) в сухом ДХМ (5,5 мл) добавляли раствор хлористого водорода (3 мл, 4,0 М в диоксане) при 0 °С в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 3 часов при комнатной температуре, реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Получение соединения M-22-1 (82 мг, 100%), которое использовали без дополнительной очистки.

ИЭР-МС m/z : 264 (M⁺+1).

Получение соединения M-22

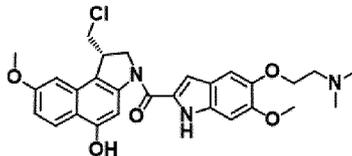
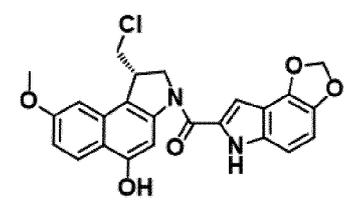
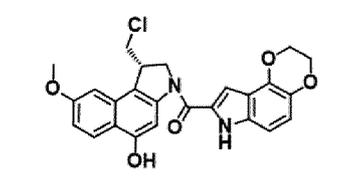
К раствору M-22-1 (7,0 мг, 0,023 ммоль) в ДМФА (1 мл) добавляли соединение M-11 (8,6 мг, 0,035 ммоль) и EDCI (13,2 мг, 0,069 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 2 часов при той же температуре, реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения M-22 (6,5 мг, 58%).

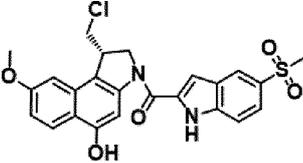
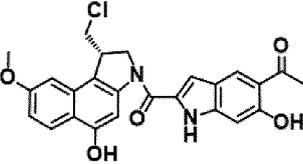
¹H ЯМР (400 МГц, MeOH-d₄) δ 8,09 (д, J=9,2 Гц, 1H), 7,60 (уш.с., 1H), 7,06-6,98 (м, 4H), 4,65 (д, J=4,8 Гц, 2H), 4,10-4,07 (м, 1H), 4,05 (с, 3H), 3,97 (дд, J=11,2, 3,2 Гц, 1H), 3,93 (с, 3H), 3,89 (с, 3H), 3,88 (с, 3H), 3,64 (дд, J=11,2, 9,2 Гц, 1H).

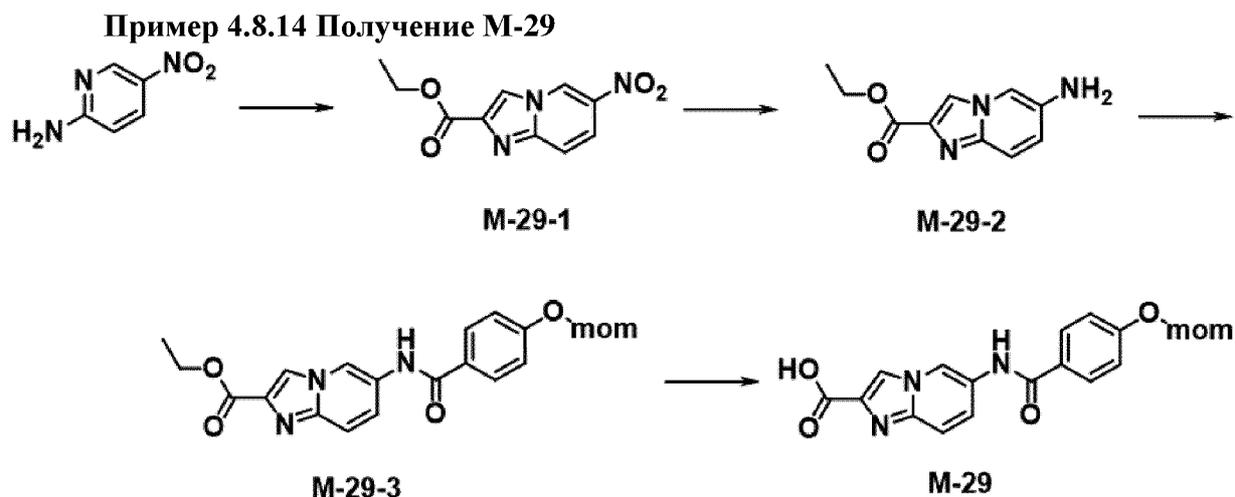
ИЭР-МС m/z: 496 (M⁺).

В приведенной ниже таблице 6 перечислены производные, которые были синтезированы с помощью аналогичного способа синтеза, как описано в примере 4.8.13.

Таблица 6

Мономер	Структура	Характеристики данных
M-23		<p>Выход 68%</p> <p>^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 11,57 (с, 1H), 10,33 (с, 1H), 9,63 (уш.с., 1H), 8,01 (д, J=9,2 Гц, 1H), 7,82 (с, 1H), 7,32 (с, 1H), 7,11-7,09 (м, 2H), 7,03 (с, 1H), 6,98 (дд, J=9,2, 2,4 Гц, 1H), 4,75 (т, J=10,4 Гц, 1H), 4,53 (д, J=10,4 Гц, 1H), 4,29 (т, J=4,4 Гц, 2H), 4,19 (т, J=8,4 Гц, 1H), 4,05 (дд, J=11,2, 3,2 Гц, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,85 (с, 3H), 3,82-3,81 (м, 1H), 3,54-3,51 (м, 2H), 2,94 (с, 3H), 2,93 (с, 3H); ИЭР-МС m/z : 524 (M⁺).</p>
M-24		<p>Выход 60%</p> <p>^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 11,76 (с, 1H), 10,34 (с, 1H), 8,02 (д, J=9,2 Гц, 1H), 7,80 (с, 1H), 7,12 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,05 (д, J=1,6 Гц, 1H), 7,01-6,97 (м, 3H), 6,07 (с, 2H), 4,80 (т, J=10,4 Гц, 1H), 4,53 (д, J=9,6 Гц, 1H), 4,19 (т, J=2,0 Гц, 1H), 4,05 (дд, J=11,2, 3,2 Гц, 1H), 3,91 (с, 3H), 3,87 (дд, J=11,2, 7,2 Гц, 1H); ИЭР-МС m/z : 451 (M⁺+1).</p>
M-25		<p>Выход 62%)</p> <p>^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,09 (д, J=9,2 Гц, 1H), 7,64 (с, 1H), 7,09-6,95 (м, 4H), 6,84 (д, J=8,8 Гц, 1H), 5,34 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,70 (д, J=4,4 Гц, 1H), 4,60 (с, 1H), 4,39-4,37 (м, 2H), 4,29-4,27 (м, 2H), 4,14-4,06 (м, 1H), 4,01-3,97 (м, 1H), 3,94 (с, 3H); ИЭР-МС m/z: 465 (M⁺+1).</p>

M-26		<p>Выход 60%</p> <p>^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 12,31 (с, 1H), 10,37 (с, 1H), 8,33 (с, 1H), 8,03 (д, J=9,2 Гц, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,77 (дд, J=8,8, 2,0 Гц, 1H), 7,70 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,44 (с, 1H), 7,13 (д, J=2,8 Гц, 1H), 7,05 (дд, J=9,2, 2,4 Гц, 1H), 4,80 (т, J=10,0 Гц, 1H), 4,55 (д, J=10,8 Гц, 1H), 4,23 (т, J=8,0 Гц, 1H), 4,05 (дд, J=11,2, 3,2 Гц, 1H), 3,92 (с, 3H), 3,87 (дд, J=11,2, 7,6 Гц, 1H), 3,20 (с, 3H); ИЭР-МС m/z: 485 (M⁺+1).</p>
M-27		<p>Выход 59%</p> <p>^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 12,11 (с, 1H), 11,77 (с, 1H), 10,35 (с, 1H), 8,44 (с, 1H), 8,02 (д, J=9,2 Гц, 1H), 7,82 (с, 1H), 7,28 (с, 1H), 7,12 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,00 (дд, J=9,2, 2,4 Гц, 1H), 6,85 (с, 1H), 4,78 (т, J=9,2 Гц, 1H), 4,54 (дд, J=10,8, 1,6 Гц, 1H), 4,22 (т, J=2,0 Гц, 1H), 4,05 (дд, J=11,2, 3,2 Гц, 1H), 3,92 (с, 3H), 3,85 (дд, J=10,8, 7,6 Гц, 1H), 2,72 (с, 3H); ИЭР-МС m/z : 465 (M⁺+1).</p>
M-28		<p>Выход 58%</p> <p>^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 11,08 (с, 1H), 10,35 (с, 1H), 8,01 (д, J=9,2 Гц, 1H), 7,85 (с, 1H), 7,84 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,25 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,11 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,99 (дд, J=9,2, 2,8 Гц, 1H), 6,89 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,54 (с, 1H), 4,75 (т, J=10,8 Гц, 1H), 4,55 (дд, J=10,8, 1,6 Гц, 1H), 4,23 (т, J=9,2 Гц, 1H), 4,05 (дд, J=10,8, 2,8 Гц, 1H), 3,92 (с, 3H), 3,87 (дд, J=11,2, 7,6 Гц, 1H), 2,71 (с, 3H). ИЭР-МС m/z: 465 (M⁺⁺+1).</p>



Получение соединения М-29-1

К раствору 2-амино-5-нитропиридина (5,0 г, 35,9 ммоль) в этаноле (72,0 мл) добавляли этилбромпируват (6,31 мл, 50,3 ммоль) в атмосфере N_2 . Смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи. После завершения реакции, смесь охлаждали при комнатной температуре. После добавления холодной воды образовавшийся осадок собирали фильтрованием. Твердое вещество промывали водой и сушили в вакууме с получением соединения М-29-1 (6,28 г, 74%) в виде коричневого твердого вещества.

1H ЯМР (400 Гц, $CDCl_3$) δ 9,30-9,29 (м, 1H), 8,38 (с, 1H), 8,05 (дд, $J=10, 2,4$ Гц, 1H), 7,81 (д, $J=10$ Гц, 1H), 4,53-4,47 (м, 2H), 1,44 (т, $J=7,2$ Гц, 3H)

ИЭР-МС m/z : 236 (M^++1).

Получение соединения М-29-2

Суспензию соединения М-29-1 (2,0 г, 8,50 ммоль) в метаноле (20,0 мл) охлаждали до $0^\circ C$ и по каплям добавляли соляную кислоту (6,4 мл), а затем добавляли цинк (2,22 г, 34,0 ммоль) небольшими порциями. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин. Затем добавляли метанол (14 мл) и в реакционную смесь добавляли концентрированный аммиак. Суспензию фильтровали и остаток промывали метанолом. Объединенный фильтрат концентрировали и остаток суспендировали в смеси хлороформа (70 мл), воды (30 мл) и концентрированного аммиака (30 мл, 30% раствор). Смесь перемешивали до тех пор, пока она не становилась прозрачной. Слои разделяли и водный слой один раз экстрагировали хлороформом. Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором $NaCl$, сушили над $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Соединение М-29-2 использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. (1,12 г, 64%)

1H ЯМР (400 Гц, $CDCl_3$) δ 8,01 (с, 1H), 7,54-7,51 (м, 2H), 6,86 (дд, $J=9,6, 2,4$ Гц, 1H), 4,45 (м, 2H), 3,53 (с, 2H), 1,47 (т, $J=6,8$ Гц, 3H)

Получение соединения М-29-3

К раствору М-29-2 (1,12 г, 5,46 ммоль) в DMA (18 мл) добавляли соединение Int-TG4 (995 мг, 5,46 ммоль) и EDC·HCl (1,26 г, 6,55 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем реакционную смесь

концентрировали. Остаток растворяли в воде и CH_2Cl_2 , и слои разделяли. Органический слой промывали водой, сушили над Na_2SO_4 и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения М-29-3 (927 мг, 46%).

^1H ЯМР (400 Гц, CDCl_3) δ 9,33-9,32 (м, 1H), 8,45 (д, $J=0,8$ Гц, 1H), 7,97-7,93 (м, 2H), 7,61-7,52 (м, 2H), 7,18-7,15 (м, 2H), 5,28 (с, 1H), 4,62 (с, 1H), 4,44-4,38 (м, 2H), 3,48 (с, 3H), 1,41 (т, $J=6,8$ Гц, 3H)

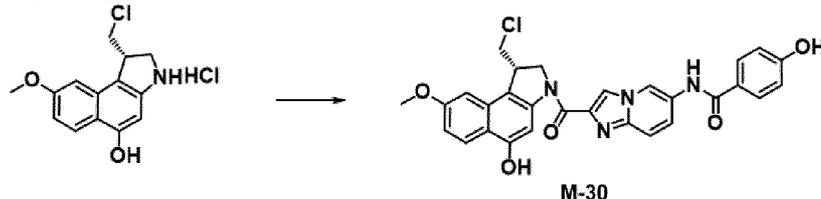
Получение соединения М-29

К раствору М-29-3 (300 мг, 0,812 ммоль) в 1,4-диоксане/ H_2O (1,5 мл/1,5 мл) добавляли 2 н NaOH (3,0 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при 70 °С. Смесь перемешивали при 70 °С в течение 1 часа. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли воду и смесь подкисляли 4 М раствором соляной кислоты. Полученную суспензию фильтровали и остаток сушили, получая соединение М-29 (242 мг, 87%) в виде желто-коричневого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 Гц, DMSO) δ 10,37 (с, 1H), 9,47 (с, 1H), 7,99 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,67 (т, $J=14$ Гц, 2H), 7,17 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 5,26 (с, 2H), 3,38 (с, 3H)

ИЭР-МС m/z : 342 (M^++1).

Пример 4.8.15 Получение М-30

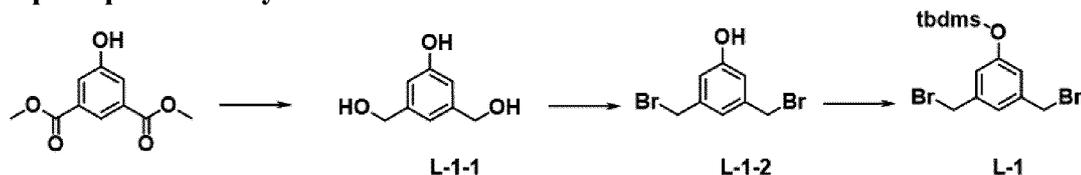


Соединение М-30 синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 4.8.13.

Выход 23%; ИЭР-МС m/z : 588 (M^++1).

Пример 4.9. Получение производных димеров бензодиазепина

Пример 4.9.1 Получение L-1



Получение соединения L-1-1

К раствору диметил-5-гидроксиизофталата (5 г, 23,79 ммоль) в сухом ТГФ (300 мл) добавляли по каплям ЛАН (3,6 г, 95,15 ммоль) при -78°С в атмосфере N_2 . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 17 часов. После завершения реакции добавляли 15% раствор NaOH (4 мл), H_2O (8 мл) и ЭА (100 мл), а затем реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа. Смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения L-1-1 (3,02 г, 82%).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 9,21 (с, 1H), 6,66 (с, 1H), 6,58 (с, 2H), 5,07 (т, $J=6,0$

Гц, 2H), 4,38 (д, J=4,6 Гц, 4H).

Получение соединения L-1-2

Соединение L-1-1 (2 г, 12,97 ммоль) растворяли в HBr (5,0 мл, 33% в AcOH) в атмосфере N₂. После перемешивания при 60°C в течение 18 часов реакцию гасили добавлением раствора NaHCO₃ (pH~8). Затем в реакционную смесь добавляли дистиллированную воду (50 мл) и ЭА (100 мл × 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения L-1-2 (2,9 г, 80%).

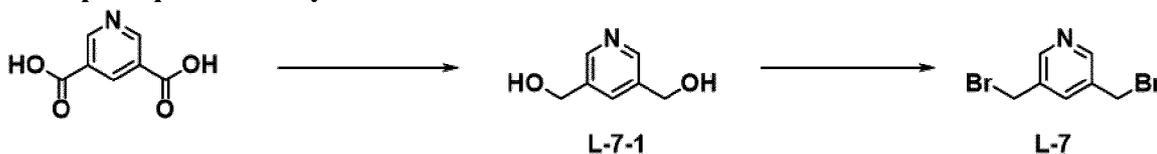
¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 6,99 (с, 1H), 6,81 (с, 2H), 4,85 (с, 1H), 4,41 (с, 2H).

Получение соединения L-1

К раствору соединения L-1-2 (100 мг, 0,36 ммоль) в сухом ДХМ (3 мл) добавляли имидазол (27 мг, 0,39 ммоль) и TBDMS-Cl (59 мг, 0,39 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 16 часов к реакционной смеси добавляли дистиллированную воду (50 мл) и ЭА (100 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения L-1 (110 мг, 79%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,00 (с, 1H), 6,80 (с, 2H), 4,41 (с, 4H), 0,99 (с, 9H), 0,21 (с, 6H).

Пример 4.9.2 Получение L-7



Получение соединения L-7-1

К раствору 3,5-пиридиндикарбоновой кислоты (1,0 г, 5,98 ммоль) в безводном ТГФ (50 мл) при 0°C в атмосфере N₂ добавляли тетрагидрофурановый комплекс трифторида бора (30,0 мл, 30,0 ммоль, 1М ТГФ). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 18 часов. Смесь гасили 2 н HCl до pH 2 и экстрагировали дистиллированной водой (20 мл) и ЭА (50 мл × 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ТСХ с получением соединения L-7-1 (363 мг, 48%).

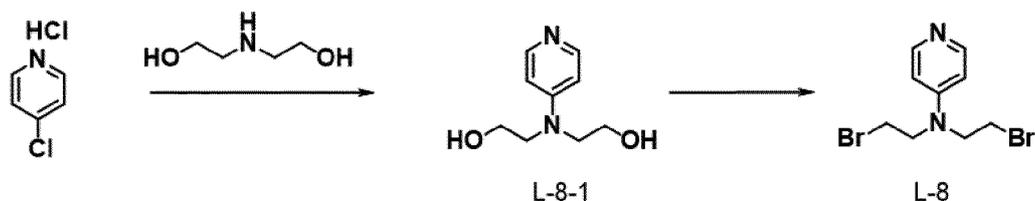
¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,38 (с, 2H), 7,99 (с, 1H), 5,59 (т, J=4,0 Гц, 2H), 4,61 (д, J=5,2 Гц, 2H).

Соединение L-7 синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 4.9.1.

Получение соединения L-7

Выход 65%; ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,56 (с, 2H), 7,77 (с, 1H), 4,47 (с, 2H).

Пример 4.9.3 Получение L-8



Получение соединения L-8-1

Раствор 4-хлорпиридин-хлорхлорида (1,0 г, 6,67 ммоль) и диэтаноламина (1,05 г, 10,00 ммоль) в H₂O (12 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ обрабатывали NaOH (1,07 г, 26,67 ммоль) и нагревали до 110 °С в течение 1 часа с использованием микроволнового реактора. После реакцию гасили дистиллированной водой (18 мл)/метанолом (10 мл) и экстрагировали ЭА (200 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения L-8-1 (160 мг, 13%).

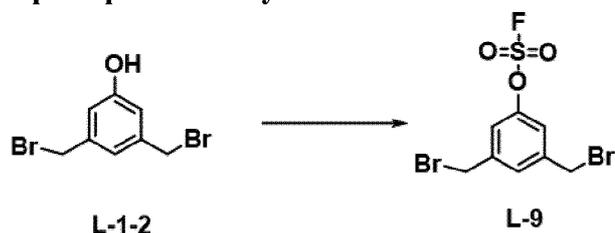
¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,10 (д, J=5,6 Гц, 2H), 6,83 (д, J=6,0 Гц, 2H), 4,91 (уш.с., 2H), 3,57 (с, 8H). ИЭР-МС m/z: 183 (M⁺+1).

Соединение L-8 синтезировали способом, аналогичным описанному в примере 4.9.1.

Получение соединения L-8

Выход 70%; ИЭР-МС m/z: 309 (M⁺+1).

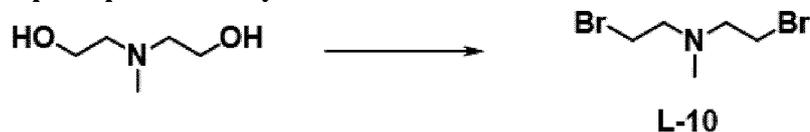
Пример 4.9.4 Получение L-9



Соединение L-9 синтезировали способом, аналогичным способу получения соединения ОНРАС-D6-1 в примере 3.5.

Выход 73%; ¹H ЯМР (400 Гц, CDCl₃) δ 7,47 (с, 1H), 7,32 (с, 2H), 4,46 (с, 4H).

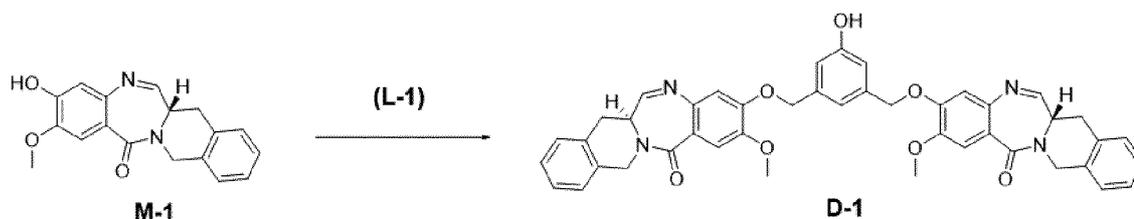
Пример 4.9.5 Получение L-10



Соединение L-10 синтезировали способом, аналогичным способу получения соединения L-1-2 в примере 4.9.1.

ИЭР-МС m/z: 245 (M⁺+1).

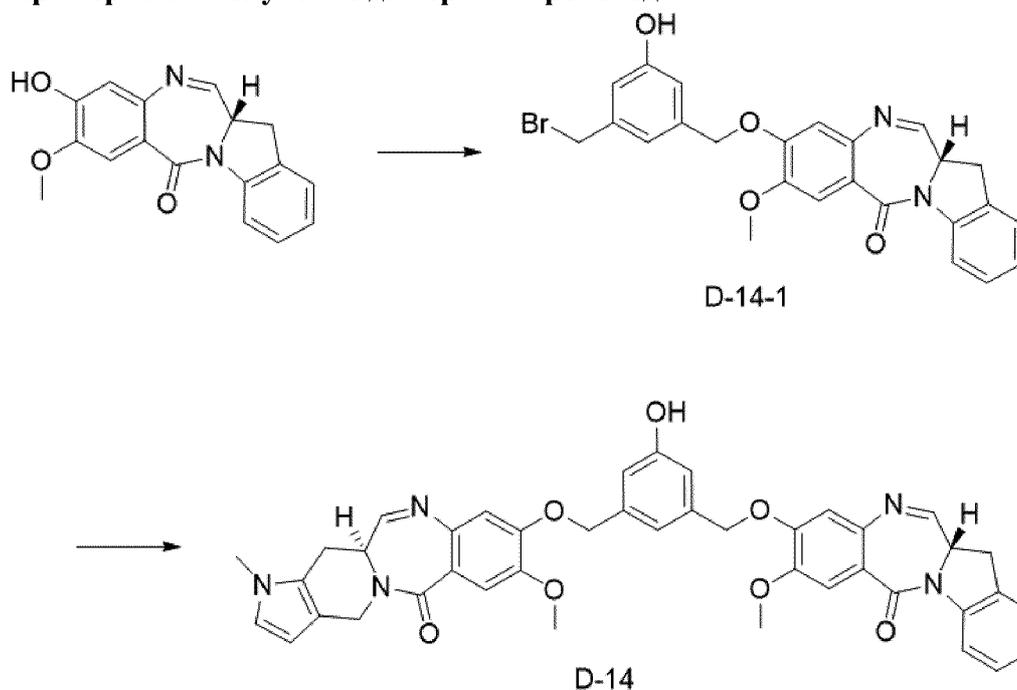
Пример 4.9.6 Получение димерных производных



К раствору соединения М-1 (31 мг, 0,10 ммоль) и соединения L-1 (20 мг, 0,05 ммоль) в ДМФА (1,0 мл) добавляли K_2CO_3 (14 мг, 0,10 ммоль) в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 7 часов при комнатной температуре, реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Innoval ODS-2 10 мкм, 100 Å, 50×250 мм; скорость потока: 40 мл/мин, буфер А 0,1% Муравьиная кислота в смеси вода/буфер В 0,1% Муравьиная кислота в АСN, градиент метода, растворитель А: растворитель В от 80: 20 до 20: 80, 45 минут, длина волны 214 нм) с получением соединения D-3 (13 мг, 30%).

ИЭР-МС m/z : 734(M^++1).

Пример 4.9.7 Получение димерных производных



Соединение D-14 синтезировали аналогично синтезу соединения D-1 из примера 4.9.6.

Соединение D-14-1

Выход 32%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z : 494 (M^++1).

Соединение D-14

Выход 7%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z : 725 (M^++1)

В приведенной ниже таблице 7 перечислены димерные производные, которые были синтезированы аналогичным способом синтеза, как описано в примере 4.9.6 или 4.9.7.

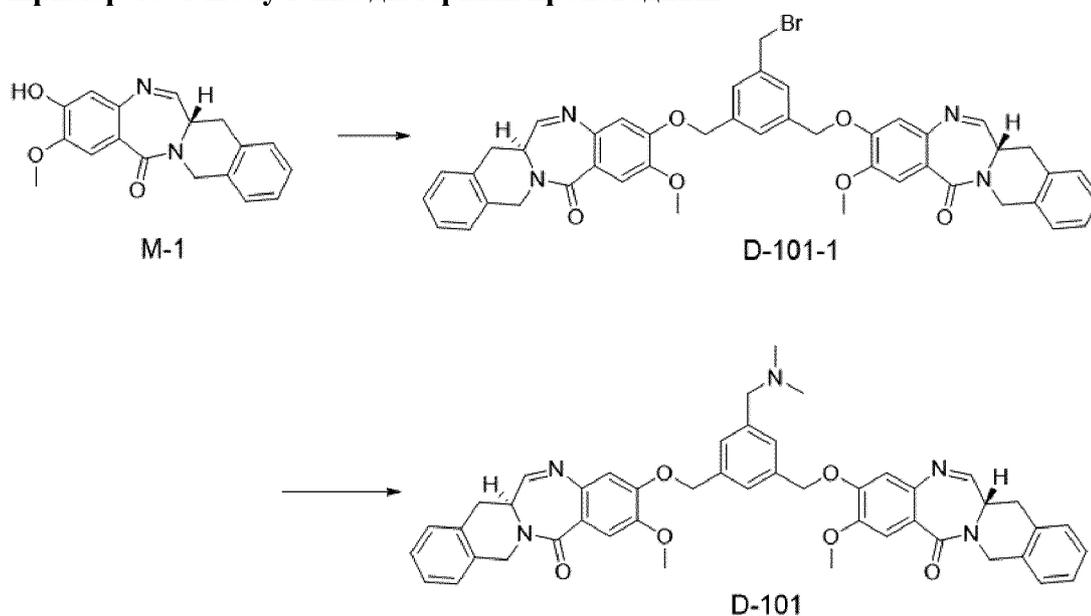
Таблица 7

Димер	Структура	Характеристики
-------	-----------	----------------

		данных
D-2		Выход 85%, ИЭР-МС m/z: 720 (M ⁺ +1).
D-3		Выход 53%, ИЭР-МС m/z: 763 (M ⁺ +1).
D-4		ИЭР-МС m/z: 707 (M ⁺ +1).
D-5		Выход 55%, ИЭР-МС m/z: 700 (M ⁺ +1).
D-6		Выход 10%, ИЭР-МС m/z: 759 (M ⁺ +1)
D-7		Выход 51%, ИЭР-МС m/z: 717 (M ⁺ +1)
D-8		Выход 34%, ИЭР-МС m/z: 743 (M ⁺ +1)
D-9		Выход 34%, ИЭР-МС m/z: 743 (M ⁺ +1)
D-10		Выход 50%, ИЭР-МС m/z: 747 (M ⁺ +1)
D-11		Выход 23%, ИЭР-МС m/z: 739 (M ⁺ +1)

D-12		Выход 33%, ИЭР-МС m/z: 772 (M ⁺ +1)
D-13		Выход 11%, белое твердое вещество. ИЭР- МС m/z: 745 (M ⁺ +1)
D-14		Выход 7%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 725 (M ⁺ +1)

Пример 4.9.8 Получение димерных производных



Получение соединения D-101-1

К раствору соединения M-1 (100 мг, 0,32 ммоль) и 1,3,5-трис(бромметил)бензола (57 мг, 0,16 ммоль) в ДМФА (1 мл) добавляли K₂CO₃ (45 мг, 0,32 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 4 часов для проведения экстракции добавляли ЭА (100 мл), H₂O (50 мл) и 2 н водный раствор HCl (5 мл), полученный органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения D-101-1 (54 мг, 42%).

ИЭР-МС m/z: 812 (M⁺).

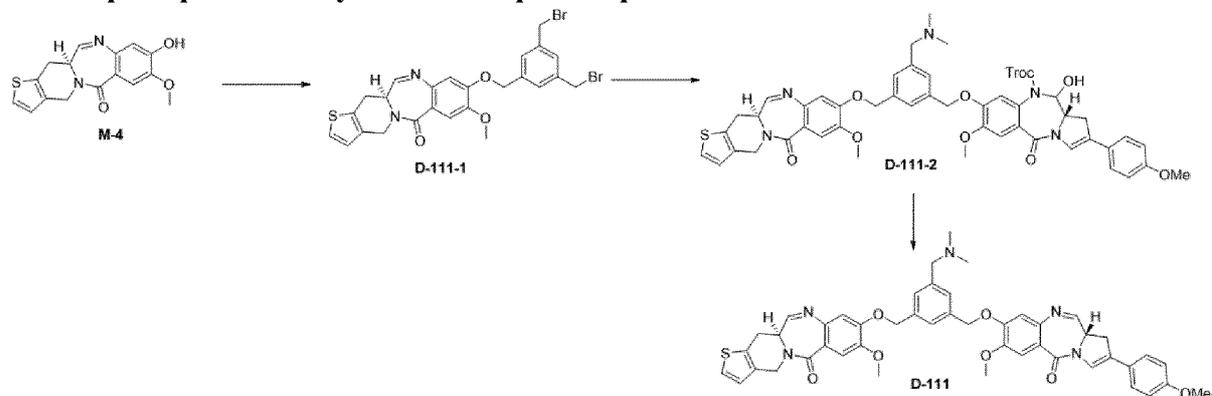
Получение соединения D-101

Соединение D-101-1 (50 мг, 0,01 ммоль) растворяли в диметилаmine (1 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 1 часа смесь очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Innoval ODS-2 10 мкм, 100 Å, 50×250 мм;

скорость потока: 40 мл/мин, буфер А 0,1% Муравьиная кислота в смеси вода/буфер В 0,1% Муравьиная кислота в АСN, градиент метода, растворитель А: растворитель В от 80: 20 до 20: 80, 45 минут, длина волны 214 нм) с получением соединения D-101 (2,2 мг, 17%).

ИЭР-МС m/z : 776 ($M^+ + 1$).

Пример 4.9.9 Получение димерных производных



Получение соединения D-111-1

К желтому раствору соединения M-4 (10 мг, 0,032 ммоль) и 1,3,5-трис(бромметил)бензола (11,35 мг, 0,032 ммоль, 1,0 экв.) в ДМФА (1 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли K_2CO_3 (4,4 мг, 0,032 ммоль, 1,0 экв.) и перемешивали в течение 5 часов. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (Колонка: Innoval ODS-2 10 мкм, 100 Å, 21,2×250 мм; скорость потока: 15 мл/мин, буфер А 0,1% Муравьиная кислота в смеси вода/буфер В 0,1% Муравьиная кислота в АСN, градиент метода, растворитель А: растворитель В от 95: 5 до 5: 95, 1 час, длина волны 214 нм) с получением соединения D-111-1 (20,9 мг, 22%) в виде белого твердого вещества.

ИЭР-МС m/z : 591 ($M^+ + 1$).

Получение соединения D-111-2

К гомогенному раствору соединения D-111-1 (20 мг, 0,034 ммоль) и M-2 (18,4 мг, 0,034 ммоль) в ДМФА (1 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли K_2CO_3 (4,7 мг, 0,034 ммоль) и перемешивали в течение 5 часов. В реакционную смесь добавляли 1M диметиламин в ТГФ (0,5 мл) и перемешивали в течение 30 минут. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (Колонка: Innoval ODS-2 10 мкм, 100 Å, 21,2×250 мм; скорость потока: 15 мл/мин, буфер А 0,1% муравьиная кислота в смеси вода/буфер В 0,1% муравьиная кислота в АСN, градиент метода, растворитель А: растворитель В от 95: 5 до 5: 95, 1 час, длина волны 214 нм) с получением соединения D-111-2 (3,4 мг, 9,8%) в виде белого твердого вещества.

ИЭР-МС m/z : 1018 ($M^+ + 1$).

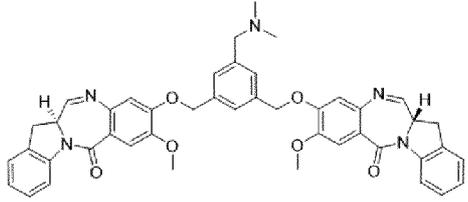
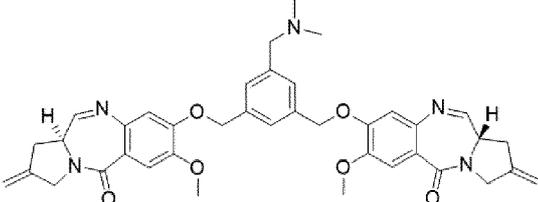
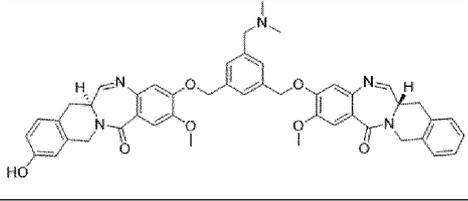
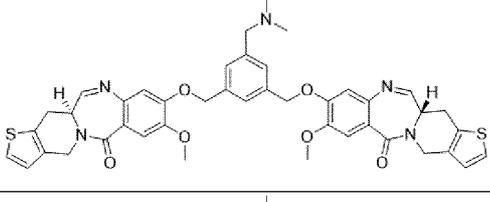
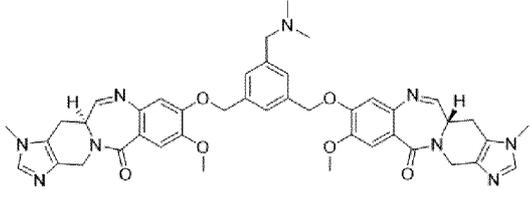
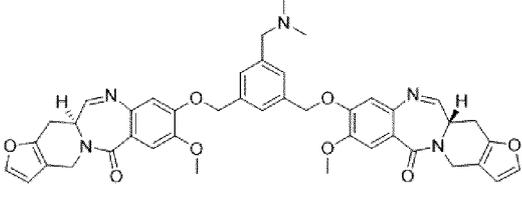
Получение соединения D-111

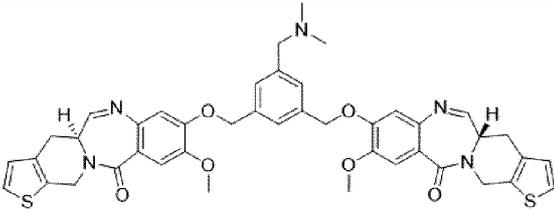
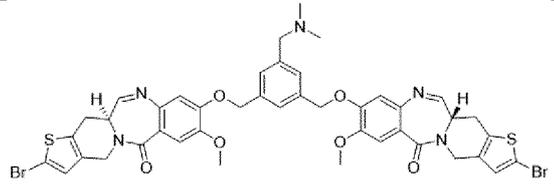
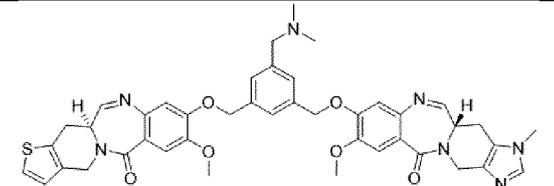
Раствор соединения D-111-2 (3,4 мг, 0,003 ммоль) и 10% Cd/Pb (100 мг) в ТГФ (0,5 мл) при комнатной температуре в атмосфере N_2 добавляли 1 н NH_4OAc (300 мкл) и перемешивали в течение 3 дней. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ

(Колонка: Innoval ODS-2 10 мкм, 100 Å, 21,2×250 мм; скорость потока: 15 мл/мин, буфер А 0,1% муравьиная кислота в смеси вода/буфер В 0,1% муравьиная кислота в АСN, градиент метода, растворитель А: растворитель В от 95: 5 до 5: 95, 1 час, длина волны 214 нм) с получением соединения D-111 (0,8 мг, 29%) в виде белого твердого вещества. ИЭР-МС m/z: 824 (M⁺+1).

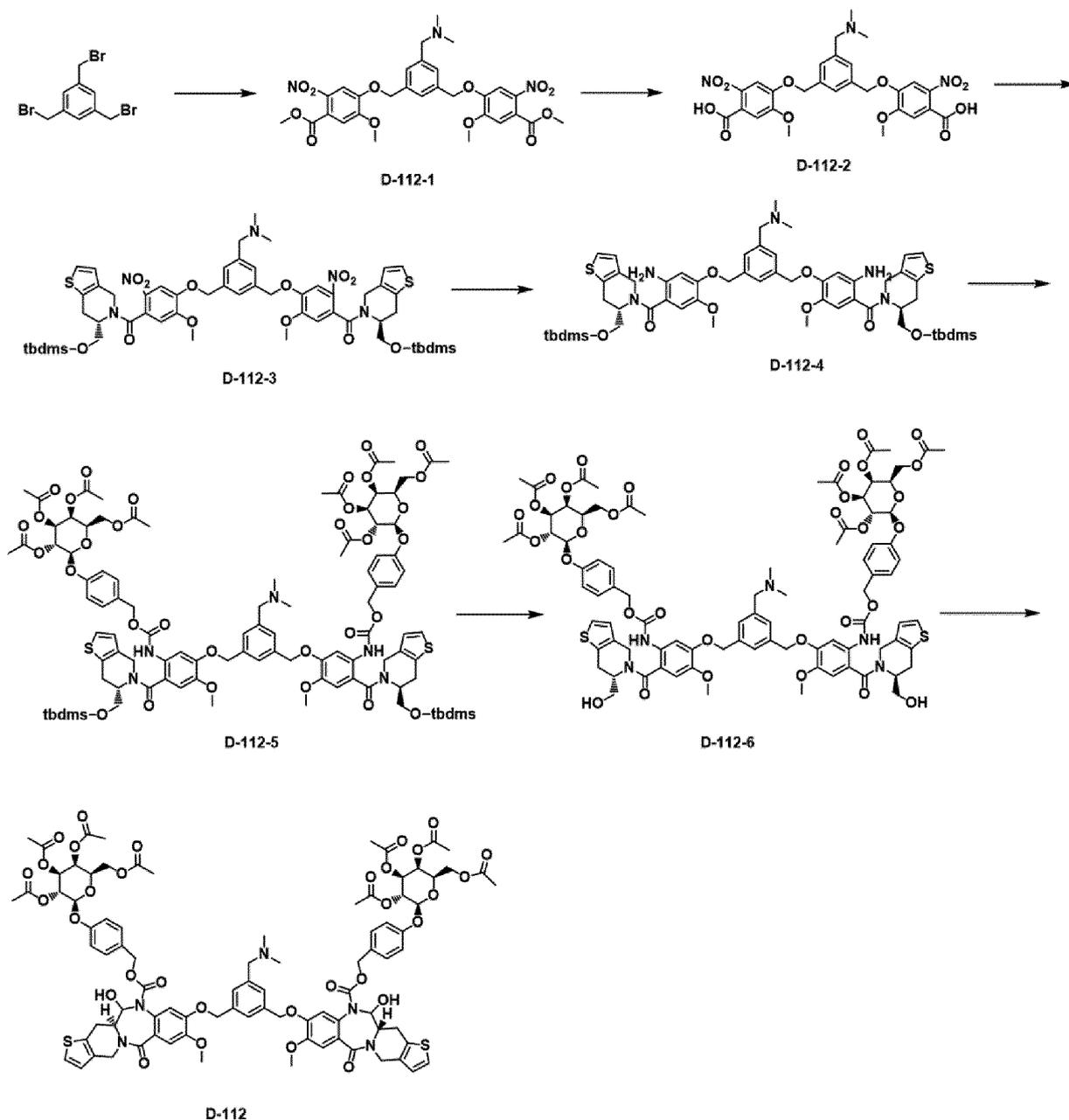
В приведенной ниже таблице 8 перечислены димерные производные, которые были синтезированы аналогичным способом синтеза, как описано в примере 4.9.8 или 4.9.9.

Таблица 8

Димер	Структура	Характеристики данных
D-102		Выход 50%, ИЭР-МС m/z: 748 (M ⁺ +1)
D-103		Выход 23%, ИЭР-МС m/z: 658 (M ⁺ +1)
D-104		Выход 23%, ИЭР-МС m/z: 792 (M ⁺ +1)
D-105		Выход 60%, ИЭР-МС m/z: 788 (M ⁺ +1)
D-106		ИЭР-МС m/z: 784 (M ⁺ +1)
D-107		ИЭР-МС m/z: 756 (M ⁺ +1)

D-108		Выход 16%, ИЭР-МС m/z: 788 (M ⁺ +1)
D-109		Выход 56%, ИЭР-МС m/z: 946 (M ⁺ +1)
D-110		Выход 9%, ИЭР-МС m/z: 786 (M ⁺ +1)

Пример 4.9.10 Получение D-112



Получение соединения D-112-1

К раствору 1,3,5-трис(бромметил)бензола (3,9 г, 11,0 ммоль), соединения Int-2 (4,96 г, 21,9 ммоль, в ДМФА (10,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли K₂CO₃ (44,2 мг, 0,32 ммоль, 1,0 экв.) и перемешивали в течение 6 часов. В реакционную смесь добавляли диметил амин (5,0 мл) и перемешивали в течение 30 минут. Реакционную смесь разбавляли дистиллированной водой (50 мл) и ДХМ (100 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения D-112-1 (2,74 г, 41%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,50 (с, 2H), 7,41 (д, J=12,0 Гц, 3H), 7,08 (с, 2H), 5,20 (с, 4H), 3,97 (с, 6H), 3,91 (с, 6H), 3,47 (с, 2H), 2,25 (с 6H) ; ИЭР-МС m/z: 614(M⁺+1).

Получение соединения D-112-2

К раствору соединения D-112-1 (2,74 г, 4,46 моль) в ТГФ (75 мл) и H₂O (50 мл)

добавляли LiOH (937 мг, 22,33 моль). После перемешивали в течение 5 часов. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток охлаждали до 0 °С и доводили до pH 2 добавлением 2 н. раствора HCl, а затем твердое вещество фильтровали и промывали H₂O (30 мл), ЭА (100 мл) с получением соединения D-112-2 (2,5 г, 96%).

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,71 (с, 2H), 7,60 (д, J=17,6 Гц, 3H), 7,32 (с, 2H), 5,30 (с, 4H), 3,91 (с, 6H), 2,67 (с, 6H); ИЭР-МС m/z: 586(M⁺+1).

Получение соединения D-112-3

К раствору соединения D-112-2 (1,5 г, 2,56 ммоль), соединения M-4a (1,52 г, 5,38 ммоль) в ДМФА (50,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли RuVop (3,5г, 6,40 ммоль), DIPEA (2,2 мл, 12,8 ммоль) и перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли дистиллированной водой (100 мл) и ЭА (100 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения D-112-3 (2,7 г, 94%); ИЭР-МС m/z: 1116(M⁺).

Получение соединения D-112-4

К раствору соединения D-112-3 (2,7 г, 2,42 ммоль) в ЭА (50,0 мл) добавляли 5% Pd/C (5,1 г, 2,42 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере H₂ и перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь фильтровали через ЦЕЛИТЕ®, а затем концентрировали при пониженном давлении с получением соединения D-112-4 (1,87 г, 93%); ИЭР-МС m/z: 1056(M⁺).

Получение соединения D-112-5

К раствору соединения D-112-4 (100 мг, 0,095 ммоль), Int-3 (189 мг, 0,28 ммоль) в безводном ТГФ (3,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли НОВТ (13,0 мг, 0,095 ммоль), DIPEA (36 мкл, 0,208 ммоль) и перемешивали в течение 44 часов. Реакционную смесь экстрагировали дистиллированной водой (10 мл) и ЭА (20 мл X 2), и органический слой промывали насыщенным раствором NH₄Cl (50 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения D-112-5 (76 мг, 40%); ИЭР-МС m/z: 2017(M⁺).

Получение соединения D-112-6

К раствору соединения D-112-5 (116,7 мг, 0,06 ммоль) в ACN (2,0 мл), H₂O (800 мкл) при 0 °С в атмосфере N₂ добавляли ТФК/ACN (1,0 мл) и перемешивали в течение 2 часов. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения D-112-6 (83,3 мг, 80%); ИЭР-МС m/z: 1788(M⁺).

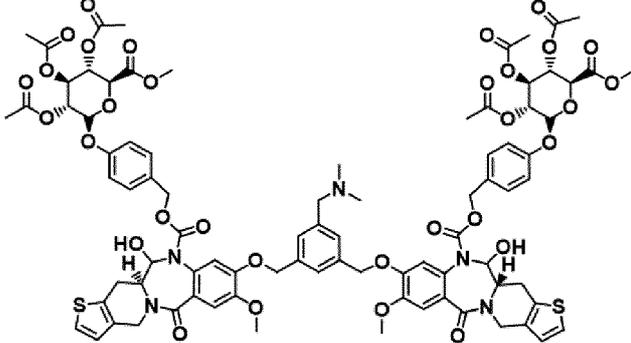
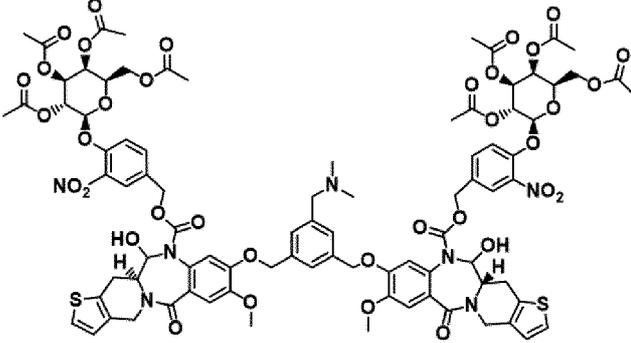
Получение соединения D-2

К раствору соединения D-112-6 (83,3 мг, 0,046 ммоль) в безводном ДХМ (3,0 мл) при 0°С в атмосфере N₂ добавляли периодинан Десс-Мартина (45,4 мг, 0,11 ммоль) и перемешивали в течение 4 часов. Реакционную смесь разбавляли дистиллированной водой (10 мл) и ЭА (30 мл X 2). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали

и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения D-112 (59,3 мг, 71%); ИЭР-МС m/z : 1784(M^+).

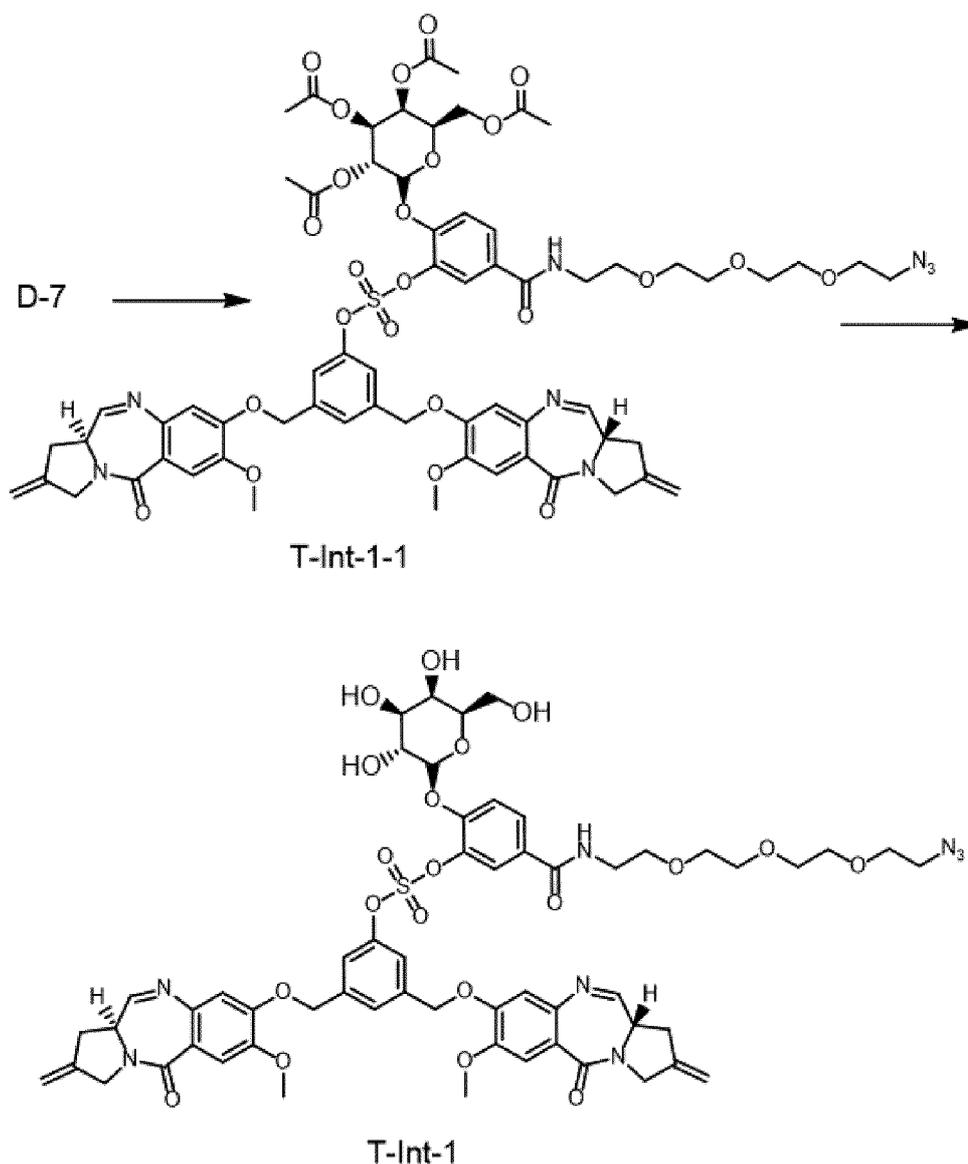
В приведенной ниже таблице 9 перечислены димерные производные, которые были синтезированы аналогичным способом синтеза, как описано в примере 4.9.10.

Таблица 9

Димер	Структура	Характеристики данных
D-113		<p>Выход 48% ИЭР-МС m/z: 1756 (M^+).</p>
D-114		<p>Выход 74% ИЭР-МС m/z: 1874,36(M^+).</p>

Пример 4.10.

Пример 4.10.1 Получение T-Int-1



Получение соединения T-Int-1-1

К раствору соединения D-7 (10 мг, 0,01 ммоль) и соединения ОНРАС-D1 (11 мг, 0,01 ммоль) в АСN (1 мл) добавляли ВЕМР (0,8 мг, 0,003 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 1 часа при комнатной температуре, реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ с получением соединения T-Int-1-1 (12 мг, 63%). ИЭР-МС m/z: 1382 (M⁺).

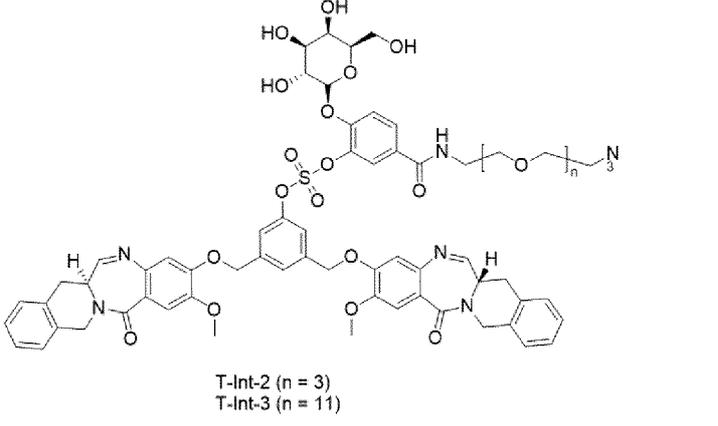
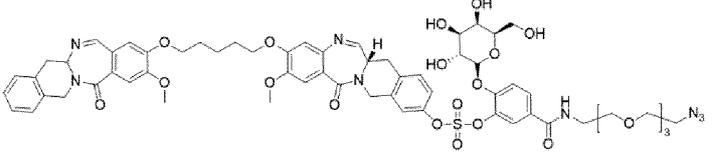
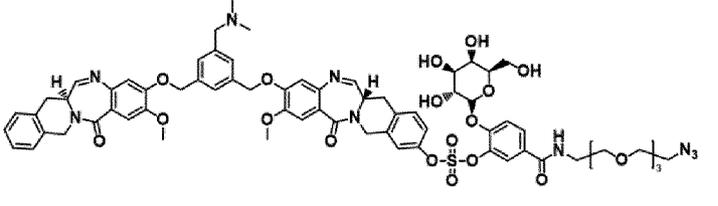
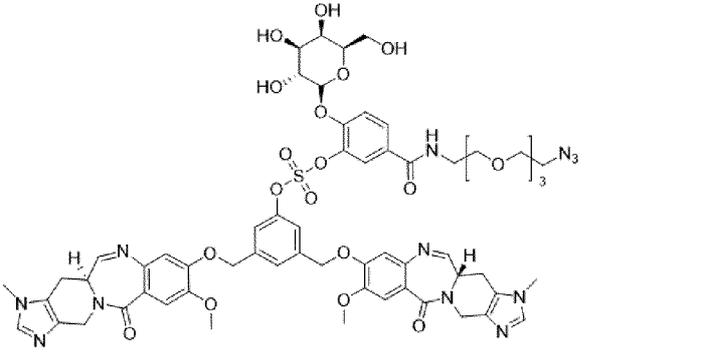
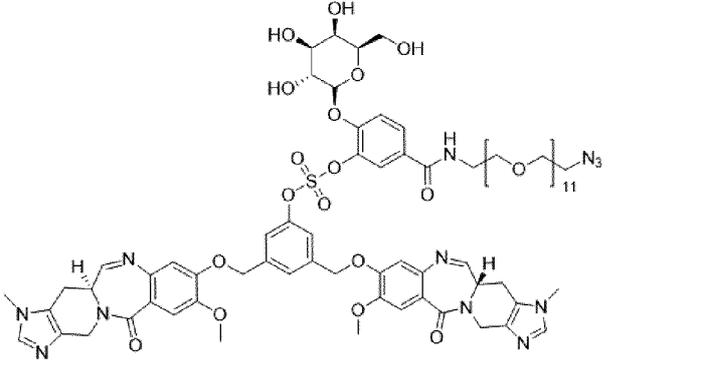
Получение соединения T-Int-1

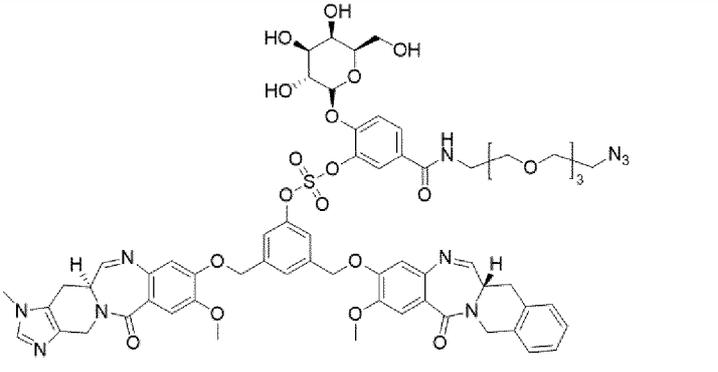
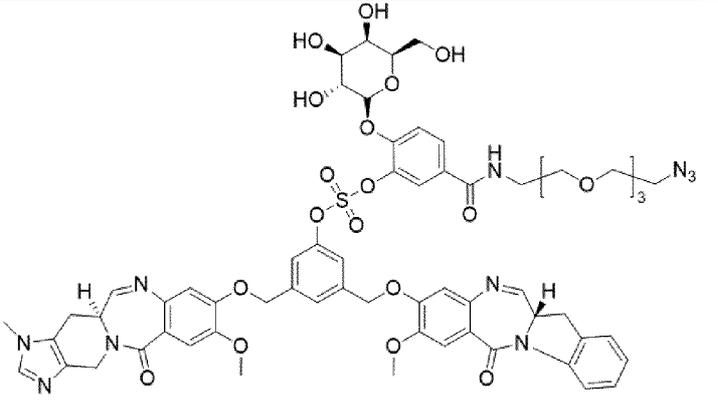
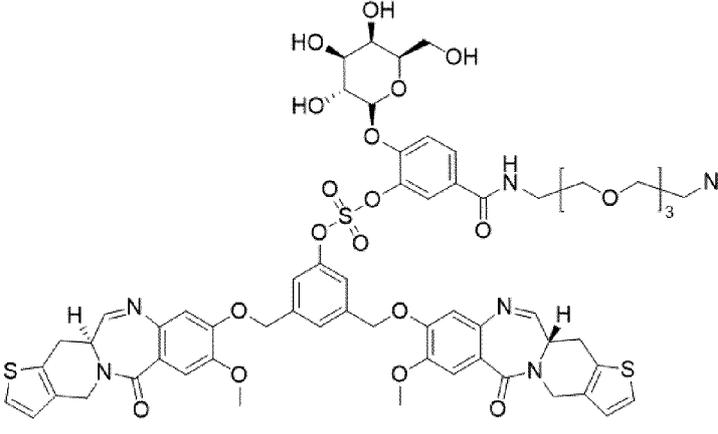
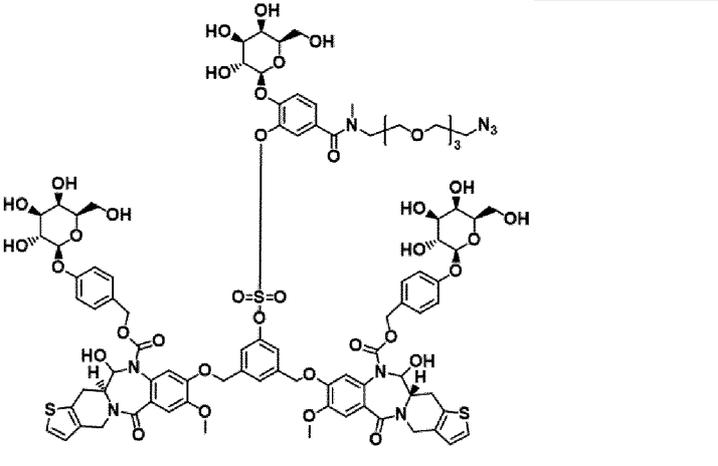
К раствору соединения T-Int-1-1 (10 мг, 0,007 ммоль) в MeOH (1,0 мл) добавляли K₂CO₃ (5 мг, 0,036 ммоль) в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 2 часов при комнатной температуре, смесь очищали с помощью ВЭЖХ с получением соединения T-Int-1 (7,4 мг, 85%). ИЭР-МС m/z: 1214 (M⁺).

В приведенной ниже таблице 10 перечислены димерные производные, которые были синтезированы аналогичным способом синтеза, как описано в примере 4.10.1.

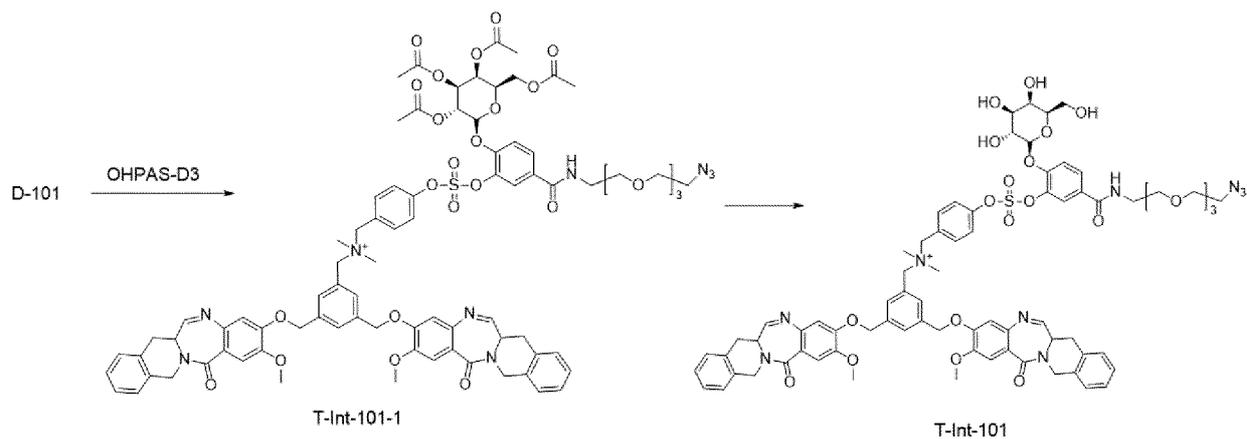
Таблица 10

Димер	Структура	Характеристики
-------	-----------	----------------

		данных
T-Int-2 T-Int-3	 <p style="text-align: center;">T-Int-2 (n = 3) T-Int-3 (n = 11)</p>	<p>T-Int-2: Выход 71%, ИЭР-МС m/z: 1314 (M⁺+1)</p> <p>T-Int-3: Выход 83%, ИЭР-МС m/z: 1666 (M⁺+1)</p>
T-Int-4		<p>Выход 67%, ИЭР-МС m/z: 1280 (M⁺+1)</p>
T-Int-5		<p>Выход 72%, белое твердое вещество ИЭР-МС m/z: 1371 (M⁺+1)</p>
T-Int-6		<p>Выход 76%, ИЭР-МС m/z: 1322 (M⁺+1)</p>
T-Int-7		<p>Выход 62% ИЭР-МС m/z: 1674 (M⁺+1).</p>

T-Int-8		<p>Выход 63%, белое твердое вещество.</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1318 (M⁺+1).</p>
T-Int-9		<p>Выход 57%, желтое твердое вещество.</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1304(M⁺+1).</p>
T-Int-10		<p>Выход 71%, желтое твердое вещество.</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1326 (M⁺+1).</p>
T-Int-11		<p>Выход 66%; ИЭР-МС m/z: 1000(M⁺/2), 2000 (M⁺).</p>

Пример 4.10.2 Получение T-Int-101



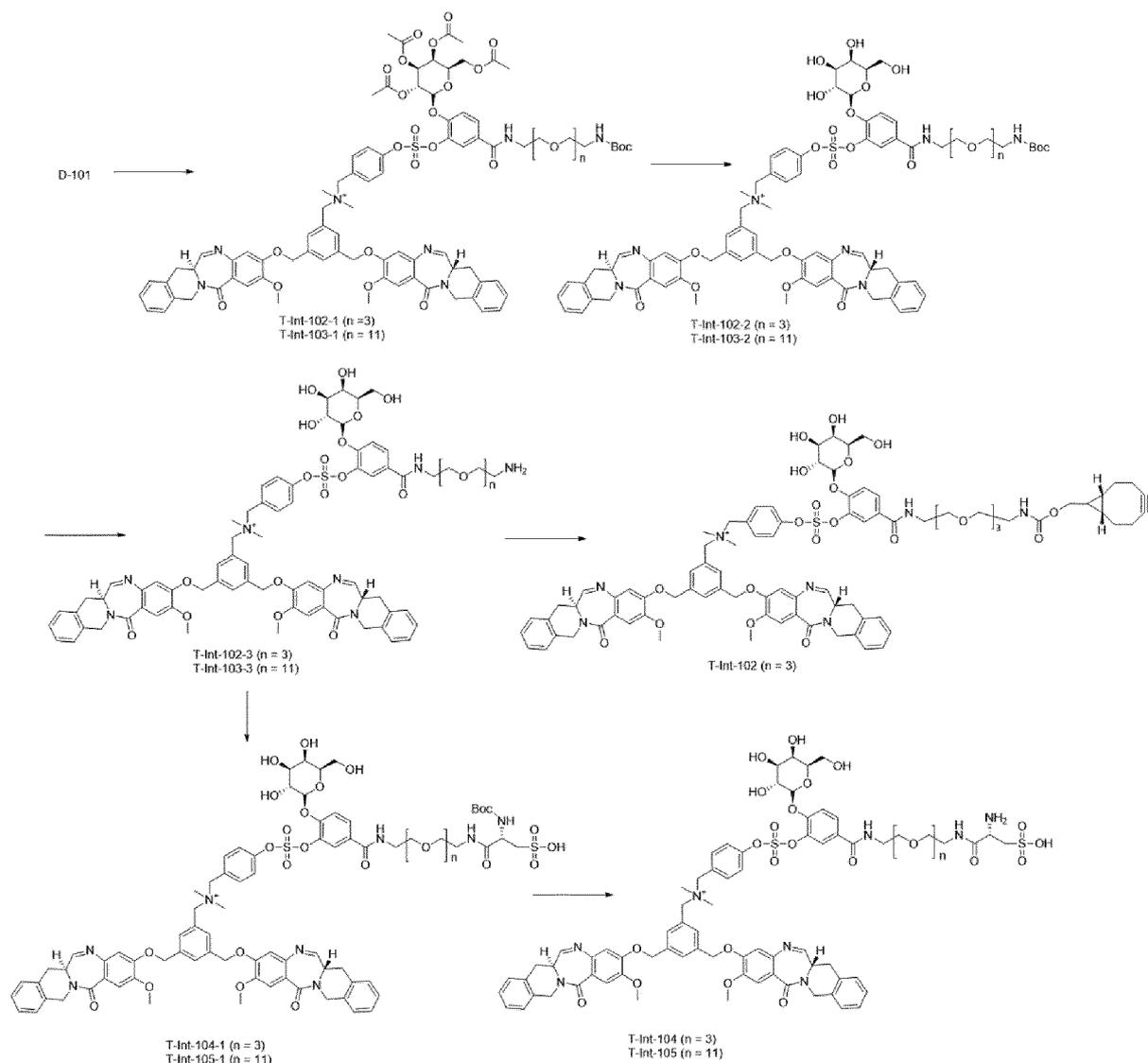
Получение соединения T-Int-101-1

К раствору соединения D-101 (8,0 мг, 0,01 ммоль) и соединения OHPAS-D3 (11,5 мг, 0,01 ммоль) в ДМФА (1 мл) добавляли ДПЭА (5,4 мкл, 0,03 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 6 часов при комнатной температуре, реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ с получением соединения T-Int-101-1 (11,9 мг, 71%). ИЭР-МС m/z : 1630 (M^{+1}).

Получение соединения T-Int-101

К раствору соединения T-Int-101-1 (11,9 мг, 0,01 ммоль) в MeOH (1 мл) добавляли K_2CO_3 (5 мг, 0,04 ммоль) в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 1 часа при комнатной температуре, реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ (Колонка: Innoval ODS-2 10 мкм, 100 Å, 50×250 мм; скорость потока: 15 мл/мин, буфер А 0,1% муравьиная кислота в смеси вода/буфер В 0,1% муравьиная кислота в ACN, градиент метода, растворитель А: растворитель В от 80: 20 до 20: 80, 45 минут, длина волны 214 нм) с получением соединения T-Int-101 (6,4 мг, 60%). ИЭР-МС m/z : 1462 (M^{+1}).

Пример 4.10.3 Получение T-Int-102, T-Int-104 и T-Int-105



T-Int-102-2 и T-Int-103-2 были синтезированы способом, аналогичным способу получения соединения T-Int-101.

Получение соединения T-Int-102-1

Выход 70% в виде белого твердого вещества.

ИЭР-МС m/z: 1704 ($M^+ + 1$).

Получение соединения T-Int-102-2

Выход 81%, белое твердое вещество

ИЭР-МС m/z: 1536 ($M^+ + 1$).

Получение соединения T-Int-103-1

Выход 84%, желтое твердое вещество

ИЭР-МС m/z: 2057 ($M^+ + 1$), 1029 ($M/2^+ + 1$).

Получение соединения T-Int-103-2

Выход 84%, бесцветное масло

ИЭР-МС m/z: 1889 ($M^+ + 1$), 945 ($M/2^+ + 1$).

Получение соединения T-Int-102-3

К гомогенному раствору соединения T-Int-102-2 (56 мг, 0,036 ммоль) в безводном

ДХМ (1,0 мл) при 0°C в атмосфере N₂ добавляли ТФК (0,2 мл) в ДХМ (1 мл) и перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (Колонка: Innoval ODS-2 10 мкм, 100 Å, 21,2×250 мм; скорость потока: 15 мл/мин, буфер А 0,1% муравьиная кислота в смеси вода/буфер В 0,1% муравьиная кислота в АСН, градиент метода, растворитель А: растворитель В от 95: 5 до 5: 95, 1 час, длина волны 214 нм) с получением соединения T-Int-102-3 (44,4 мг, 82%) в виде твердого вещества цвета слоновой кости.

ИЭР-МС m/z: 1436 (M⁺+1).

T-Int-103-3 синтезировали способом, аналогичным способу получения соединения T-Int-102-3.

Получение соединения T-Int-103-3

Выход 74%, твердое вещество цвета слоновой кости

ИЭР-МС m/z: 1789 (M⁺+1), 895 (M/2⁺+1).

Получение соединения T-Int-102

К гомогенному раствору соединения T-Int-102-3 (50 мг, 0,035 ммоль) и BСN-PNP (11 мг, 0,035 ммоль, 1,0 экв.) в ДМФА (3,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли DIPEA (11 мкл, 0,068 ммоль, 2,0 экв.) и перемешивали в течение 2 часов. Смесь очищали препаративной ВЭЖХ (Колонка: Innoval ODS-2 10 мкм, 100 Å, 21,2×250 мм; скорость потока: 15 мл/мин, буфер А 0,1% муравьиная кислота в смеси вода/буфер В 0,1% муравьиная кислота в АСН, градиент метода, растворитель А: растворитель В от 95: 5 до 5: 95, 1 час, длина волны 214 нм) с получением соединения T-Int-102 (22 мг, 39%) в виде твердого вещества бежевого цвета.

ИЭР-МС m/z: 1612 (M⁺+1).

Получение соединения T-Int-104-1

К гомогенному раствору T-Int-103-3 (20 мг, 0,014 ммоль) и L-6-5 (5,1 мг, 0,014 ммоль, 1,0 экв.) в ДМФА (2,0 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли DIPEA (7,3 мкл, 0,042 ммоль, 3,0 экв.) и перемешивали в течение 2 часов. Смесь очищали препаративной ВЭЖХ (Колонка: Innoval ODS-2 10 мкм, 100 Å, 21,2×250 мм; скорость потока: 15 мл/мин, буфер А 0,1% муравьиная кислота в смеси вода/буфер В 0,1% муравьиная кислота в АСН, градиент метода, растворитель А: растворитель В от 95: 5 до 5: 95, 1 час, длина волны 214 нм) с получением соединения T-Int-104-1 (19,9 мг, 85%) в виде желтого твердого вещества.

ИЭР-МС m/z: 1687 (M⁺+1), 844 (M/2⁺+1).

Получение соединения T-Int-104

T-Int-104 синтезировали способом, аналогичным способу получения соединения T-Int-102-3.

Выход 72%, твердое вещество цвета слоновой кости

ИЭР-МС m/z: 1789 (M⁺+1), 895 (M/2⁺+1).

T-Int-105 синтезировали способом, аналогичным способу получения соединения T-Int-104.

Получение соединения T-Int-105-1

Выход 75%, твердое вещество цвета слоновой кости

ИЭР-МС m/z: 2040 ($M^+ + 1$), 1010 ($M/2^+ + 1$).

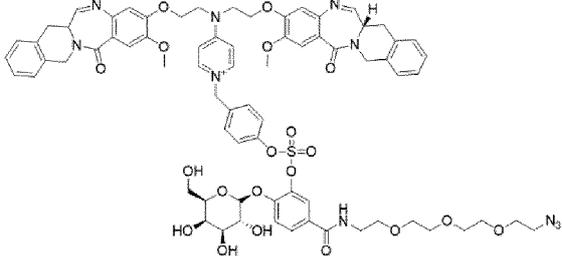
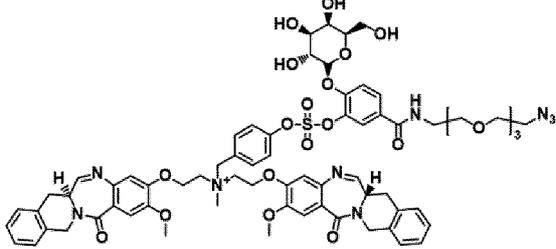
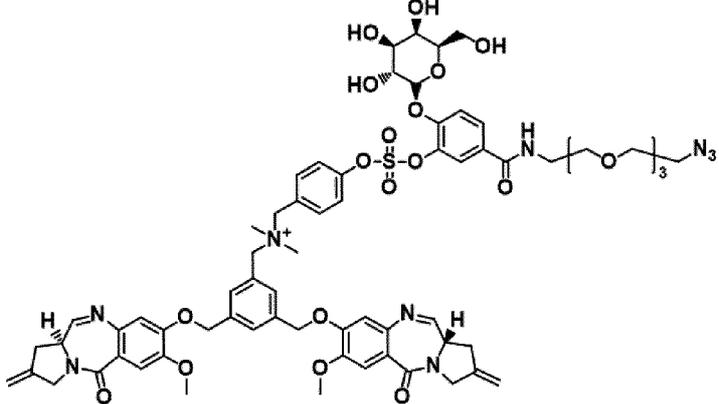
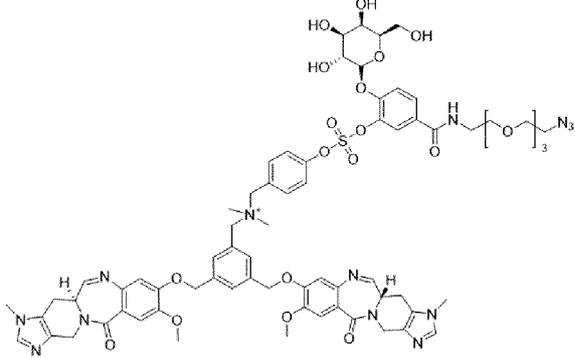
Получение соединения T-Int-105

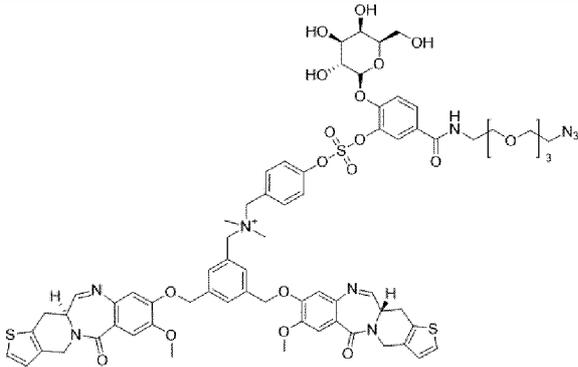
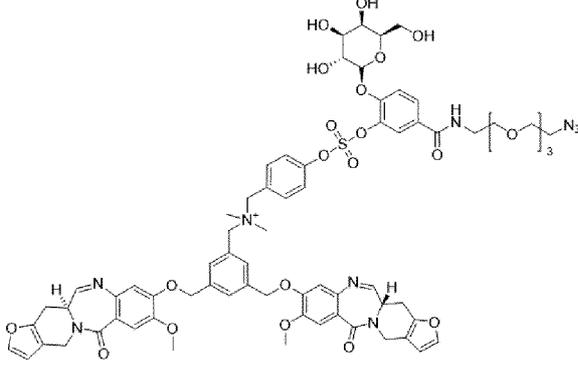
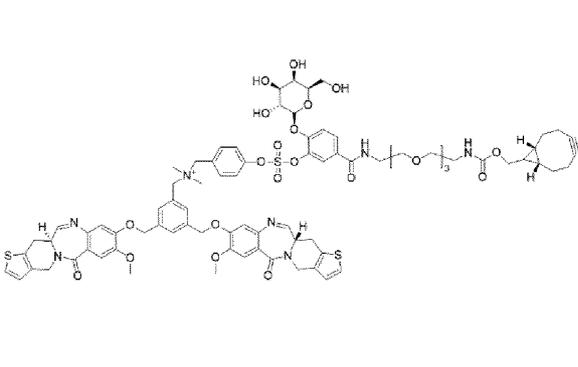
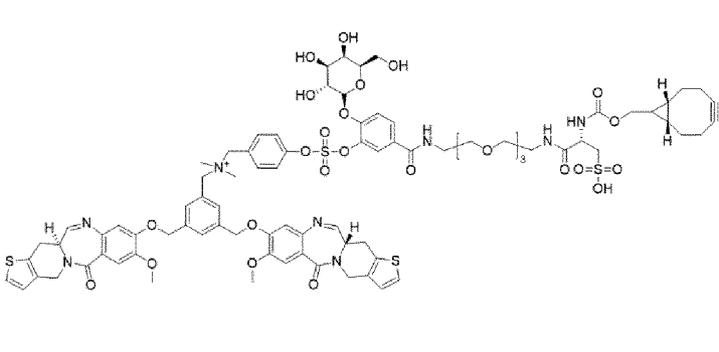
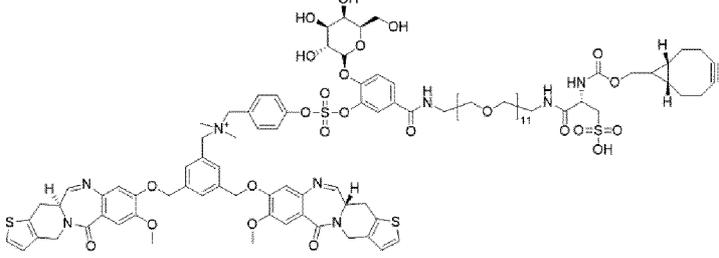
Выход 60%, твердое вещество цвета слоновой кости

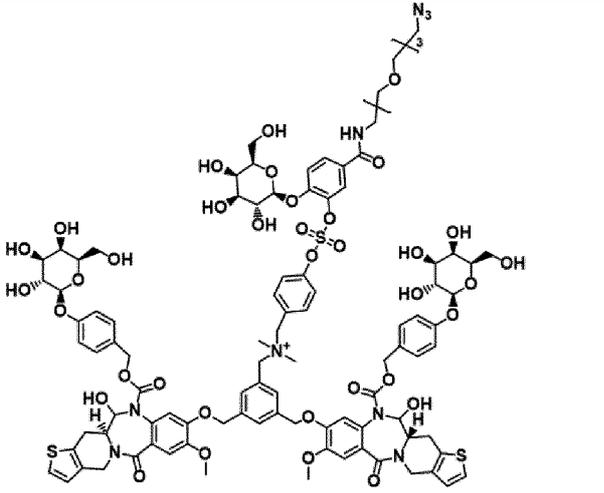
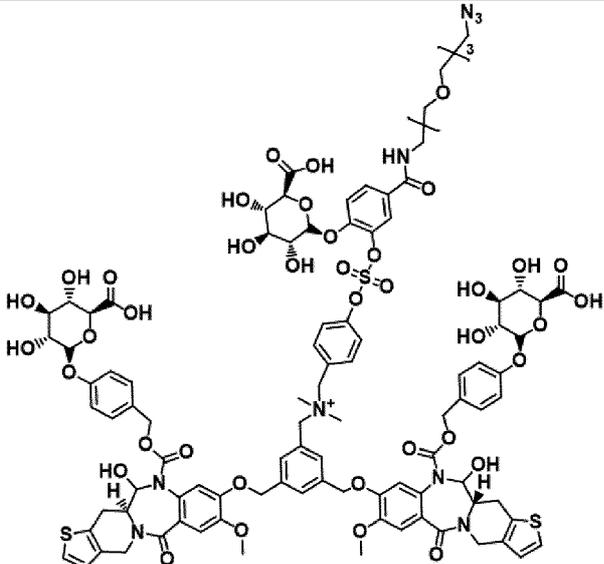
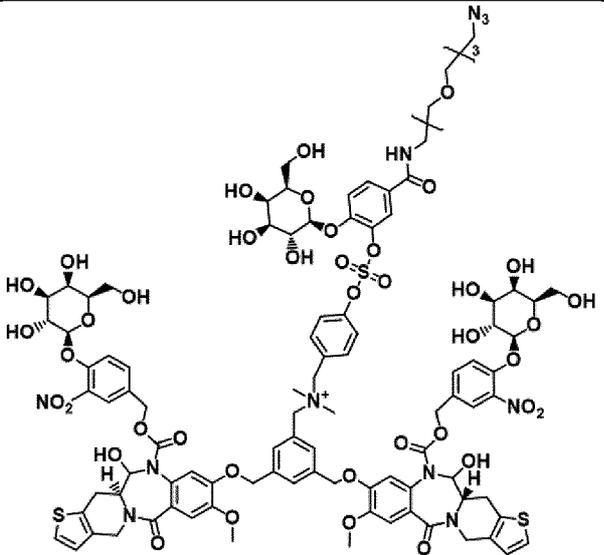
ИЭР-МС m/z: 1940 ($M^+ + 1$), 970 ($M/2^+ + 1$).

В приведенной ниже таблице 11 перечислены димерные производные, которые были синтезированы аналогичным способом синтеза, как описано в примере 4.10.1.

Таблица 11

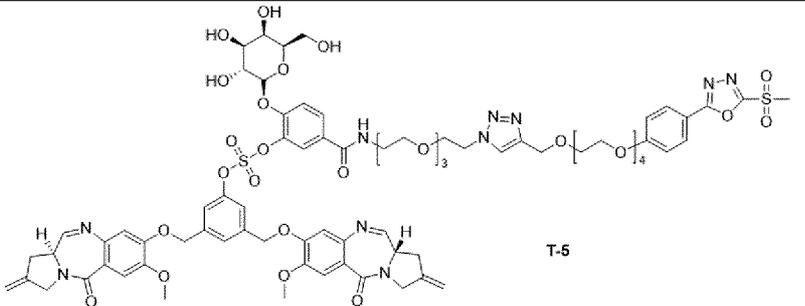
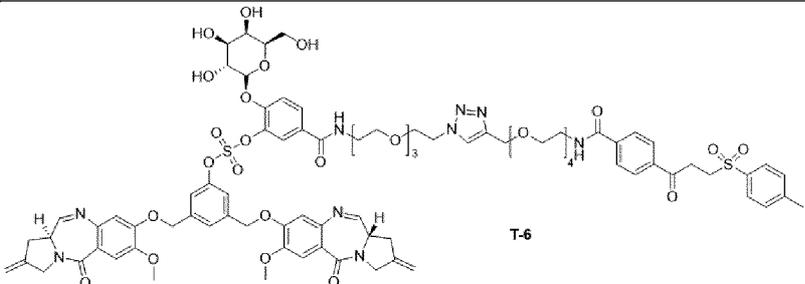
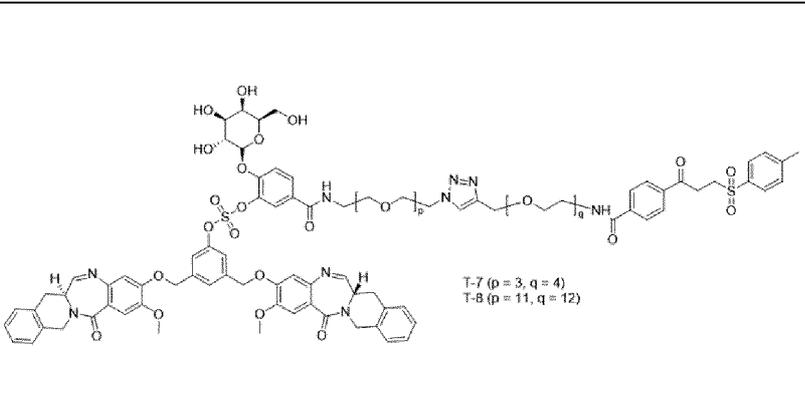
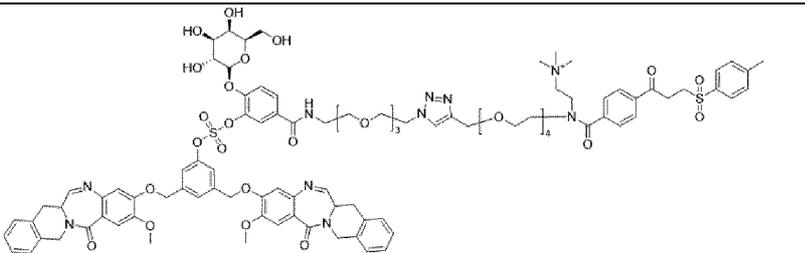
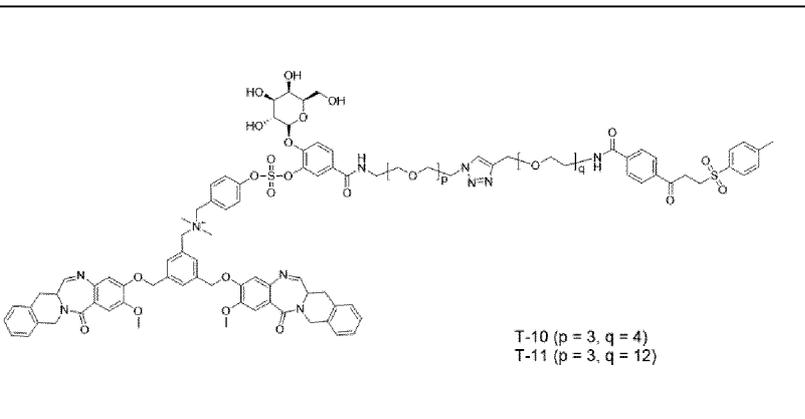
Димер	Структура	Характеристики данных
T-Int-106		Выход 68%, ИЭР-МС m/z: 1449 ($M^+ + 1$)
T-Int-107		Выход 74%, желтое твердое вещество ИЭР-МС m/z: 1386 ($M^+ + 1$).
T-Int-108		Выход 81%, желтое твердое вещество ИЭР-МС m/z: 1362 ($M^+ + 1$).
T-Int-109		Выход 72%, ИЭР-МС m/z: 1469 ($M^+ + 1$).

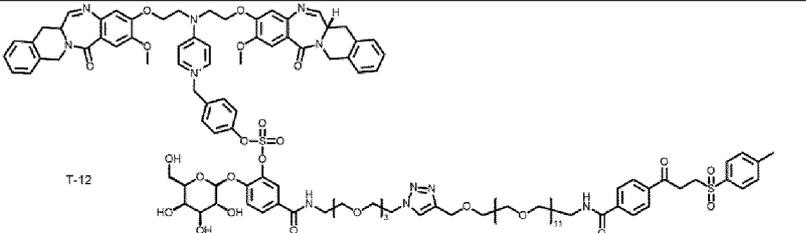
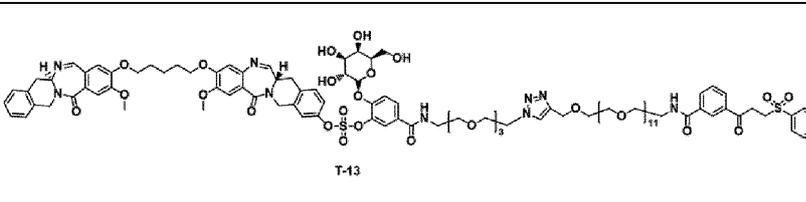
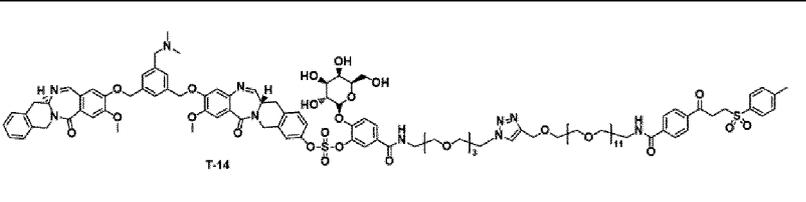
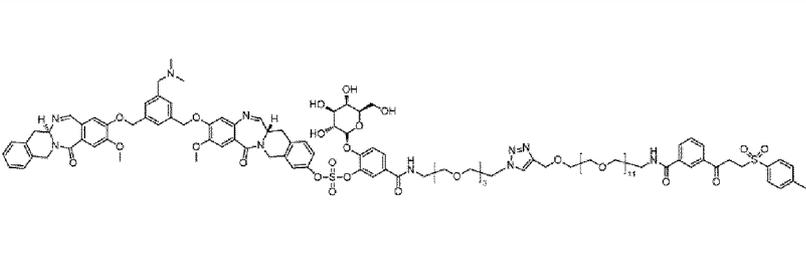
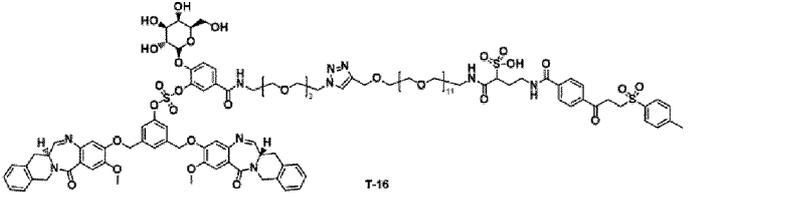
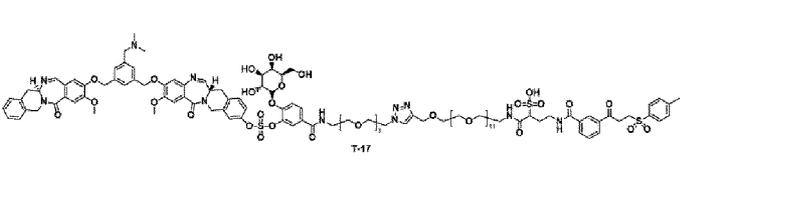
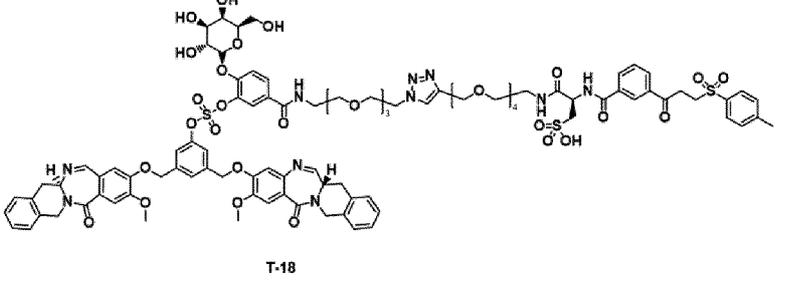
T-Int-110		<p>Выход 71%</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1473 (M⁺+1).</p>
T-Int-111		<p>Выход 55%;</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1441 (M⁺+1).</p>
T-Int-112		<p>Выход 62% в виде твёрдого вещества светло-желтого цвета;</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1624(M⁺+1), 812(M⁺/2+1).</p>
T-Int-113		<p>Выход 35% в виде твёрдого вещества светло-желтого цвета.</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1776(M⁺+1), 888(M⁺/2+1).</p>
T-Int-114		<p>Выход 31%, белое твёрдое вещество.</p> <p>ИЭР-МС m/z: 2128(M⁺+1), 1064(M⁺/2+1)</p>

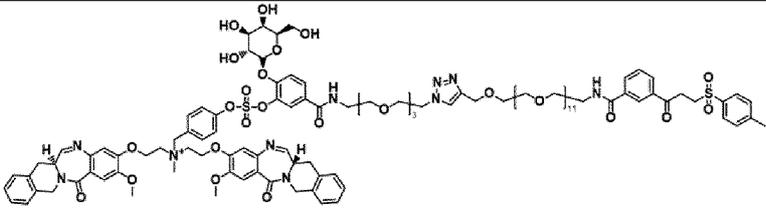
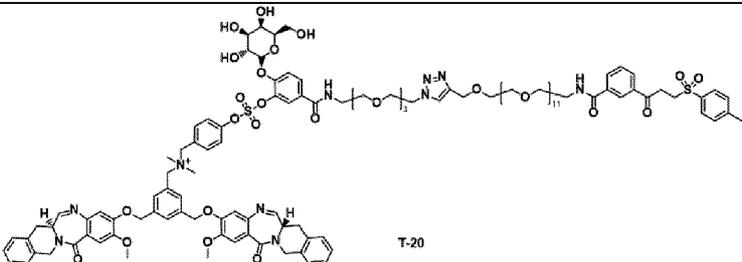
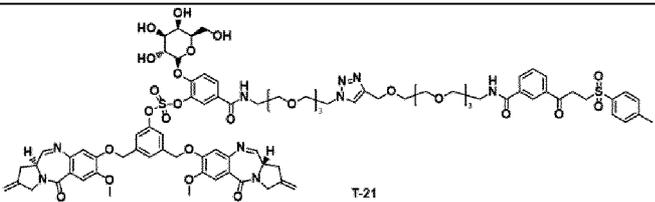
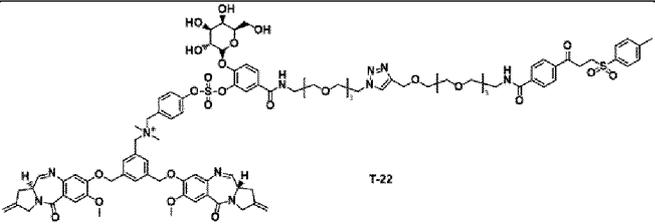
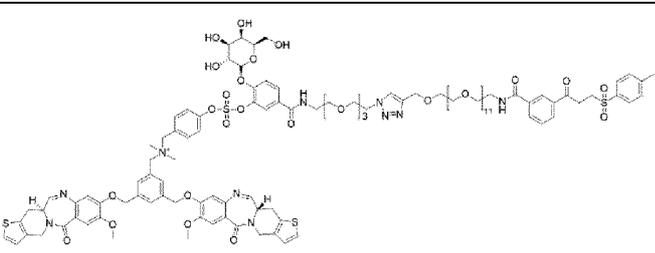
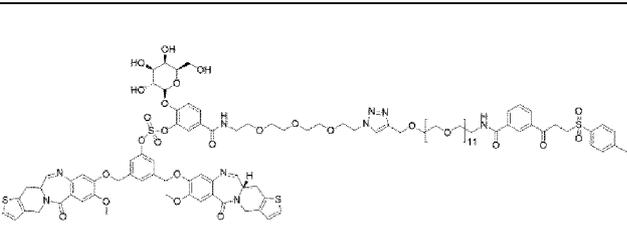
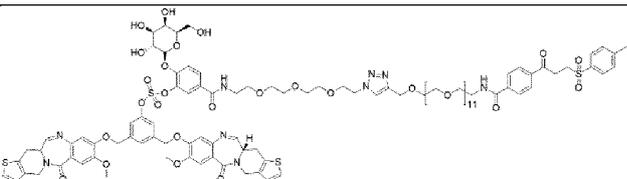
T-Int-115		<p>Выход 68%</p> <p>ИЭР-МС m/z: 2134 (M⁺).</p>
T-Int-116		<p>Выход 64%</p> <p>ИЭР-МС m/z: 2176 (M⁺).</p>
T-Int-117		<p>Выход 63%</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1311(M⁺/2), 2623(M⁺).</p>

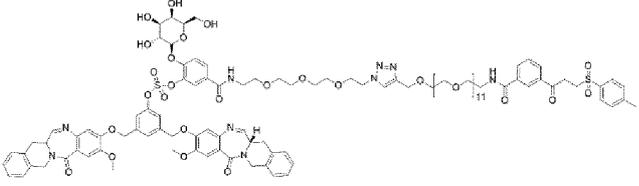
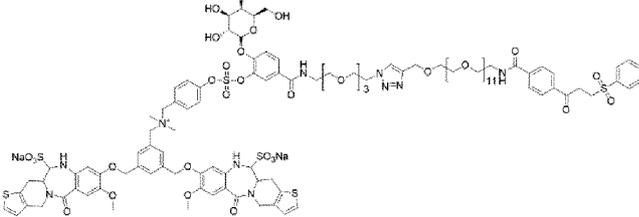
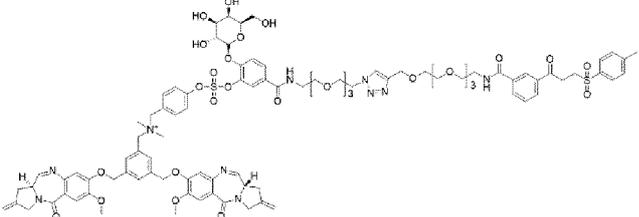
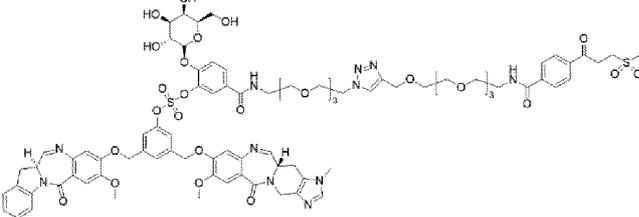
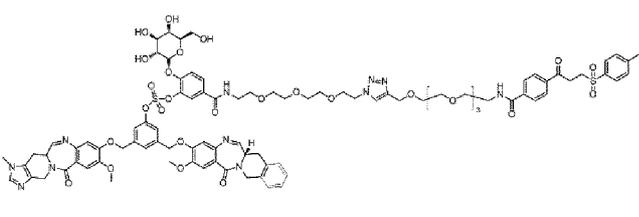
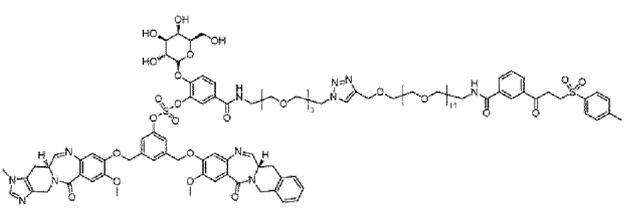
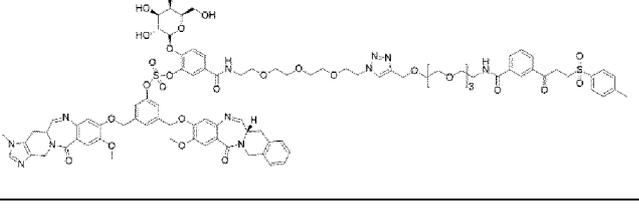
Пример 4.11.

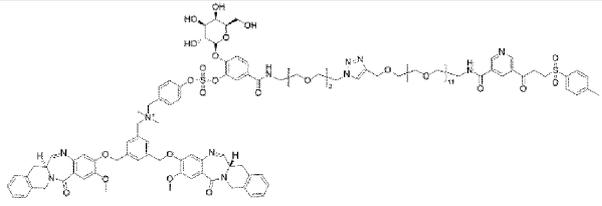
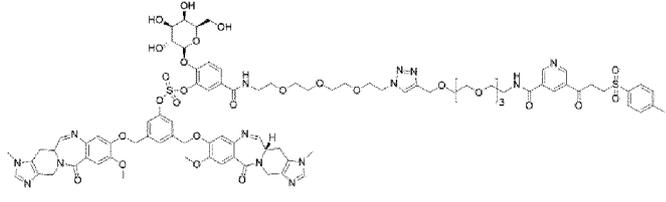
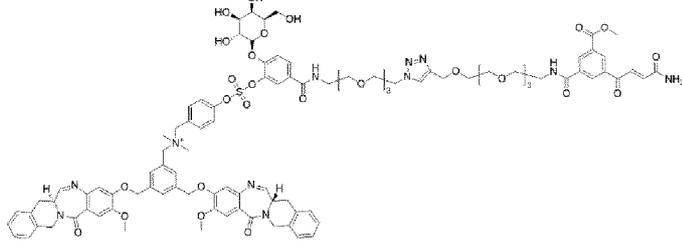
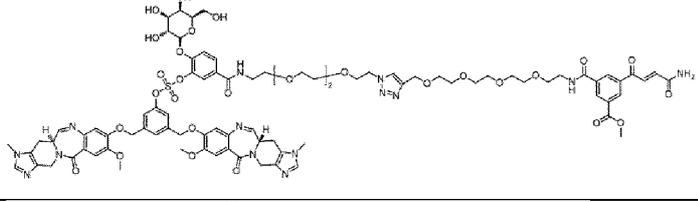
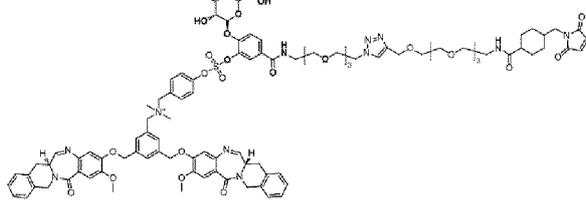
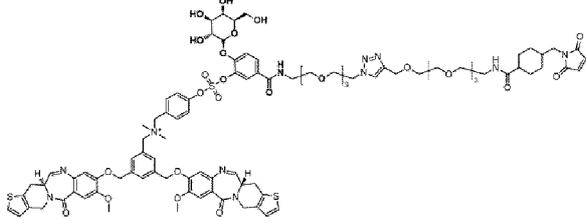
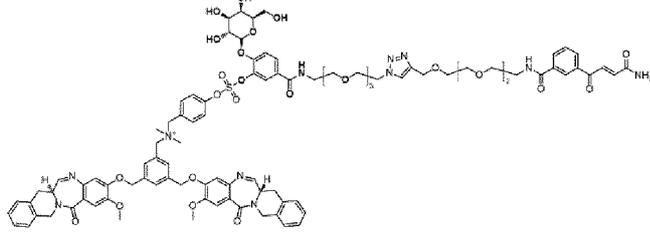
Пример 4.11.1 Получение Т-1

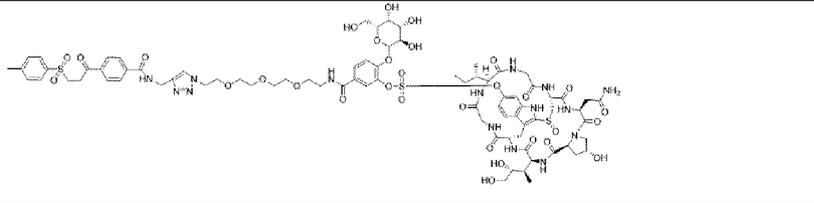
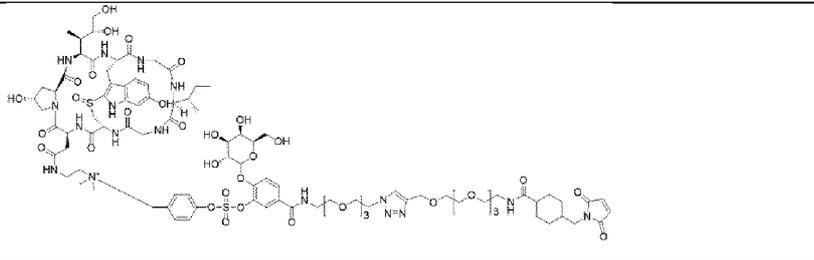
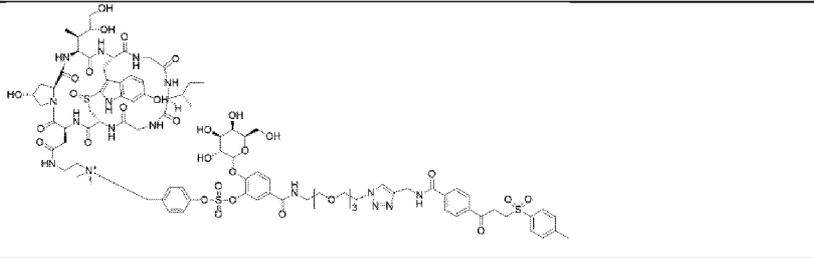
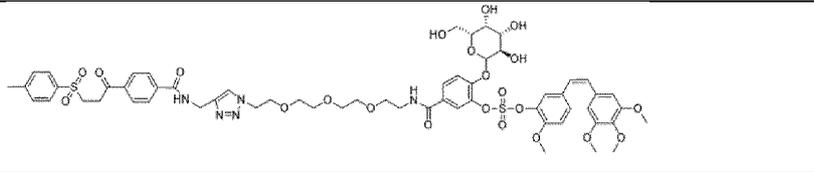
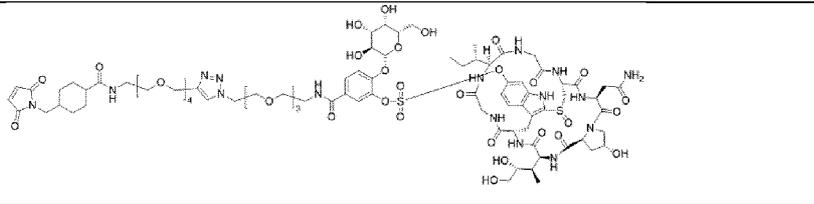
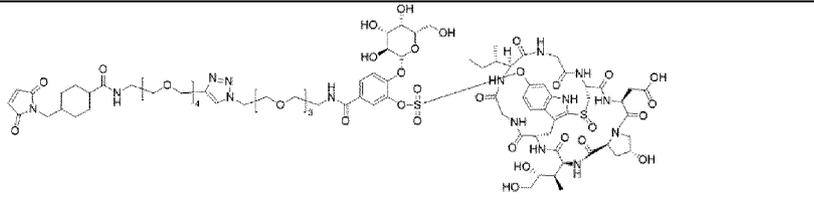
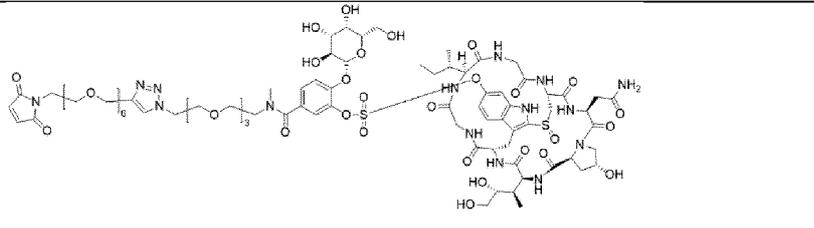
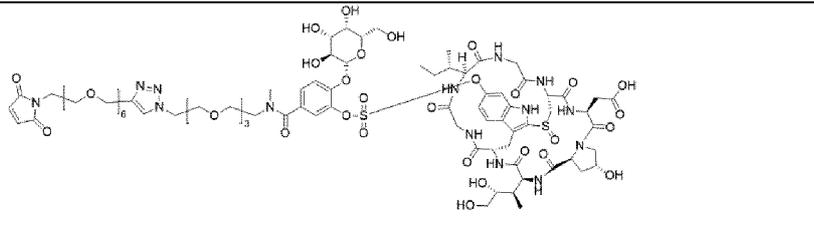
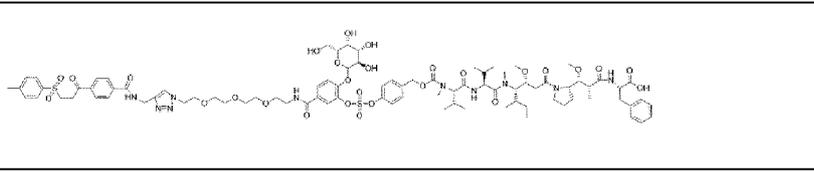
T-5	 <p style="text-align: center;">T-5</p>	<p>Выход 12%, ИЭР-МС m/z: 1668 ($M^+ + 1$)</p>
T-6	 <p style="text-align: center;">T-6</p>	<p>Выход 7%, ИЭР-МС m/z: 1759 ($M^+ + 1$)</p>
T-7 T-8	 <p style="text-align: center;">T-7 (p = 3, q = 4) T-8 (p = 11, q = 12)</p>	<p>Соединение T-7 Выход 9,0%; ИЭР-МС m/z: 1860 ($M^+ + 1$). Соединение T-8 Выход 26%; ИЭР-МС m/z: 1282 ($M/2^+ + 1$).</p>
T-9		<p>Выход 27%; ИЭР-МС m/z: 1945 ($M/2^+ + 1$).</p>
T-10 T-11	 <p style="text-align: center;">T-10 (p = 3, q = 4) T-11 (p = 3, q = 12)</p>	<p>Соединение T-10 Выход 25%; ИЭР-МС m/z: 1004 ($M/2^+ + 1$). Соединение T-11 Выход 62%; ИЭР-МС m/z: 1180 ($M/2^+ + 1$).</p>

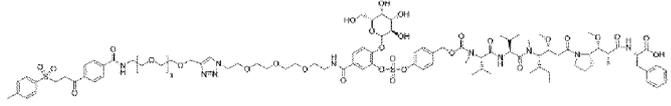
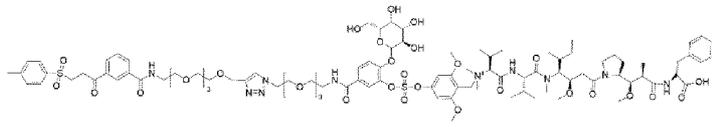
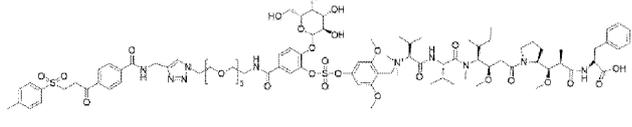
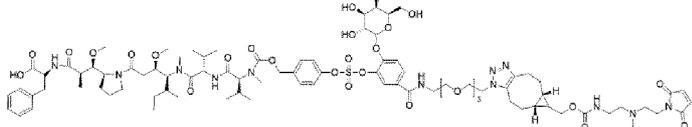
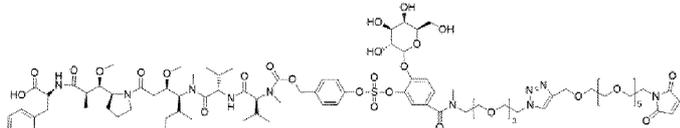
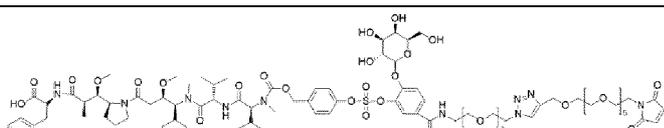
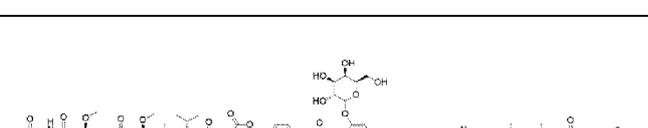
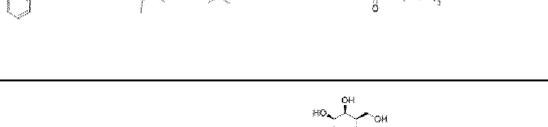
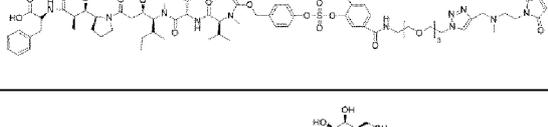
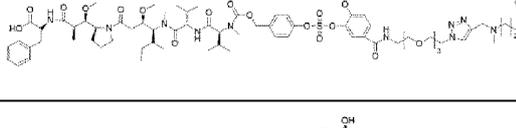
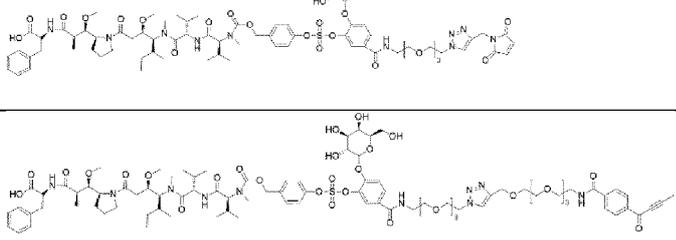
T-12	 <p style="text-align: center;">T-12</p>	<p>Выход 27%; ИЭР-МС m/z: 1174 (M/2⁺).</p>
T-13	 <p style="text-align: center;">T-13</p>	<p>Выход 64%; ИЭР-МС m/z: 2178 (M⁺+1), 1089 (M/2⁺+1).</p>
T-14	 <p style="text-align: center;">T-14</p>	<p>Выход 56%; ИЭР-МС m/z: 2269 (M⁺+1), 1135 (M/2⁺+1).</p>
T-15	 <p style="text-align: center;">T-15</p>	<p>Выход 64%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 2178 (M⁺+1), 1089 (M/2⁺+1).</p>
T-16	 <p style="text-align: center;">T-16</p>	<p>Выход 34%; ИЭР-МС m/z: 2377 (M⁺+1), 1189 (M/2⁺+1).</p>
T-17	 <p style="text-align: center;">T-17</p>	<p>Выход 58%; ИЭР-МС m/z: 2434 (M⁺+1), 1217 (M/2⁺+1).</p>
T-18	 <p style="text-align: center;">T-18</p>	<p>Выход 72%; ИЭР-МС m/z: 2011 (M⁺+1), 1006 (M/2⁺+1).</p>

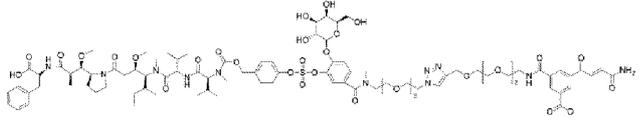
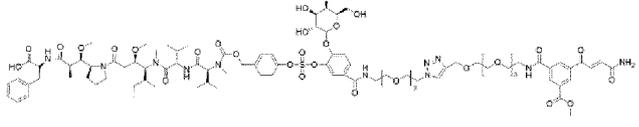
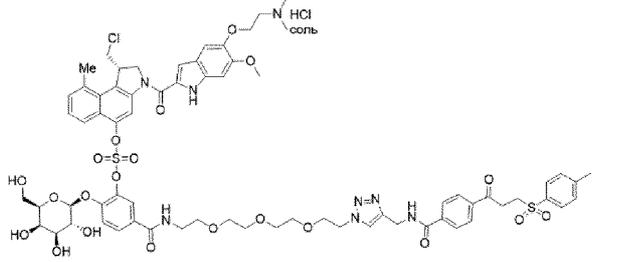
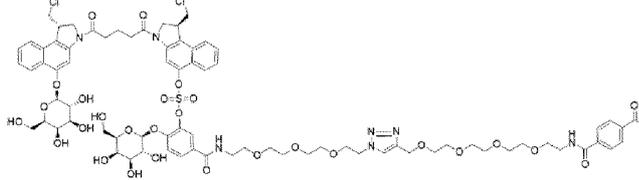
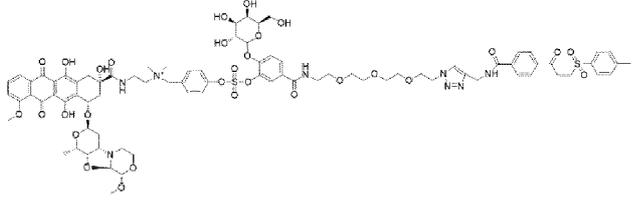
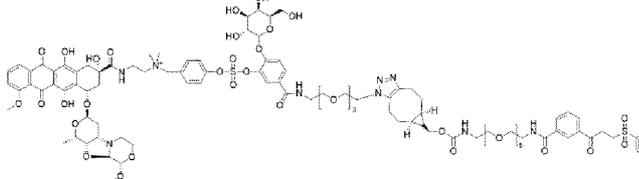
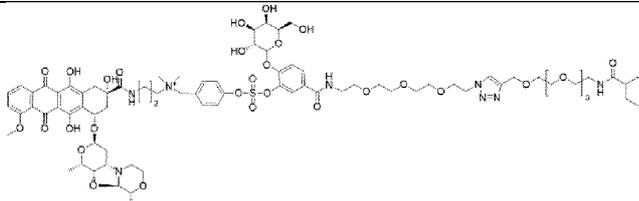
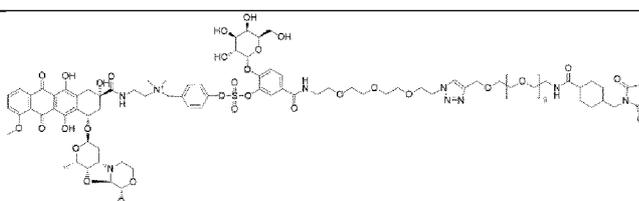
T-19	 <p style="text-align: center;">T-19</p>	<p>Выход 48%;</p> <p>ИЭР-МС m/z: 2284 (M^++1), 1142 ($M/2^+$+1).</p>
T-20	 <p style="text-align: center;">T-20</p>	<p>Выход 69%;</p> <p>ИЭР-МС m/z: 2360 (M^++1), 1180 ($M/2^+$+1).</p>
T-21	 <p style="text-align: center;">T-21</p>	<p>Выход 40%;</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1759 (M^++1), 880 ($M/2^+$+1).</p>
T-22	 <p style="text-align: center;">T-22</p>	<p>Выход 71%;</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1908 (M^++1), 954 ($M/2^+$+1).</p>
T-23	 <p style="text-align: center;">T-23</p>	<p>Выход 79%, белое твердое вещество.</p> <p>ИЭР-МС m/z: 2372(M^++1), 1186($M^+/2$+1).</p>
T-24	 <p style="text-align: center;">T-24</p>	<p>Выход 66%, белое твердое вещество</p> <p>ИЭР-МС m/z: 2224(M^++1), 1112($M^+/2$+1).</p>
T-25	 <p style="text-align: center;">T-25</p>	<p>Выход%; 34%</p> <p>ИЭР-МС m/z: 2371(M^++1).</p>

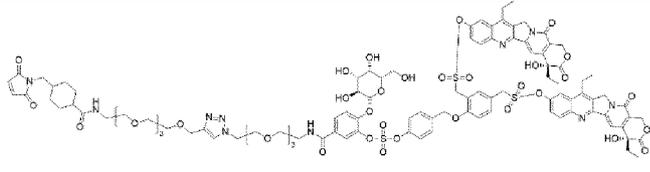
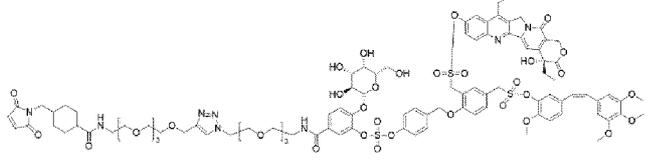
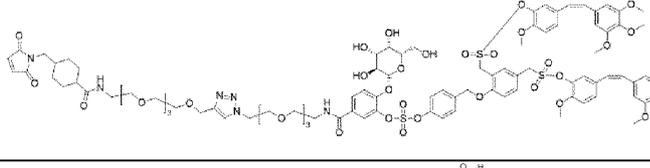
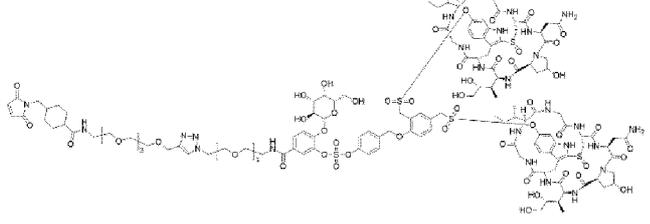
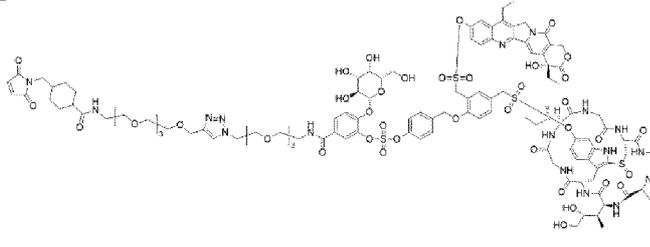
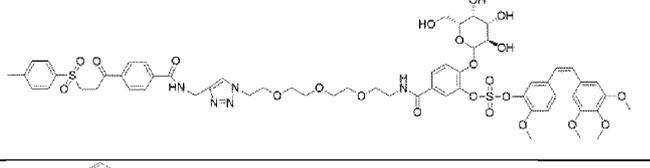
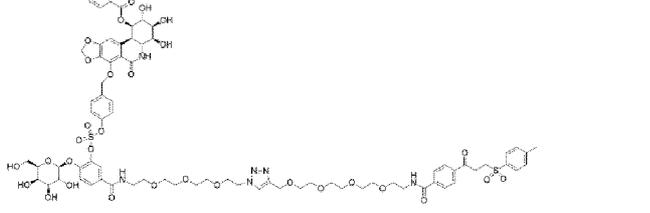
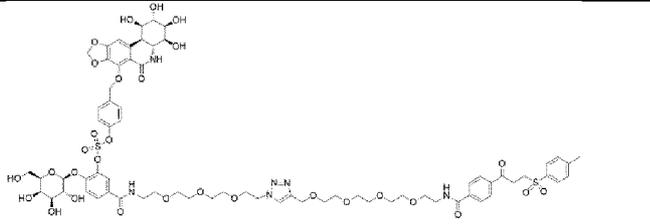
T-26		<p>Выход 69%, бледно-желтое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 2360 ($M^{+}+1$), 1180 ($M/2^{+}+1$).</p>
T-27		<p>Выход 92%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 2580 ($M^{+}+1$).</p>
T-28		<p>Выход 40%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 1759 ($M^{+}+1$), 880 ($M/2^{+}+1$).</p>
T-29		<p>Выход 75%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 1849 ($M^{+}+1$), 925 ($M/2^{+}+1$).</p>
T-30		<p>Выход 59%, белое твердое вещество ИЭР-МС m/z: 1864($M^{+}+1$), 932($M^{+}/2+1$).</p>
T-31		<p>Выход 50%, белое твердое вещество ИЭР-МС m/z: 2216($M^{+}+1$), 1108($M^{+}/2+1$).</p>
T-32		<p>Выход 32%, белое твердое вещество ИЭР-МС m/z: 1864($M^{+}+1$),</p>

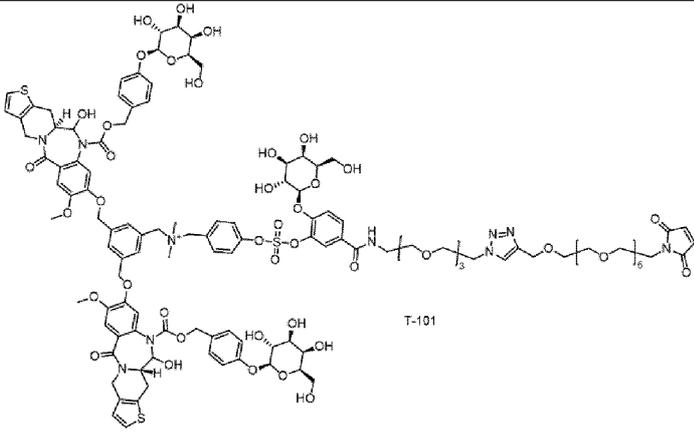
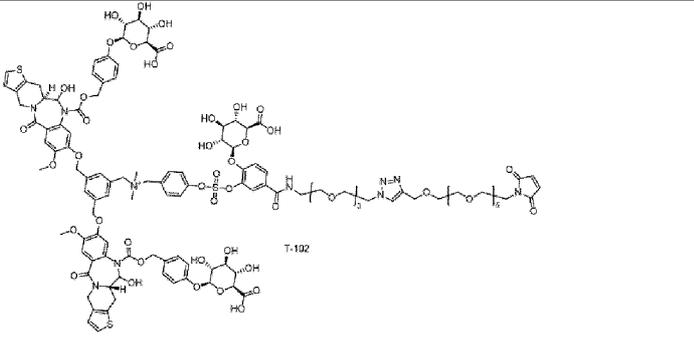
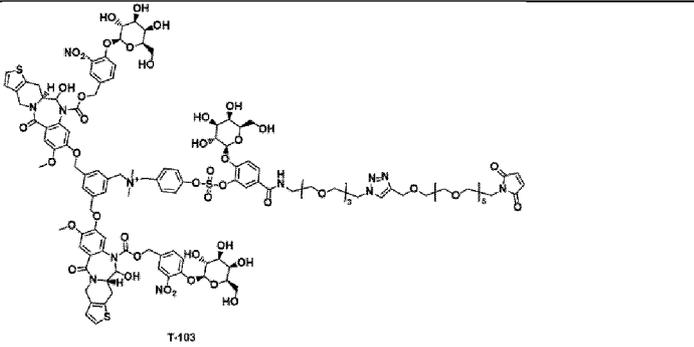
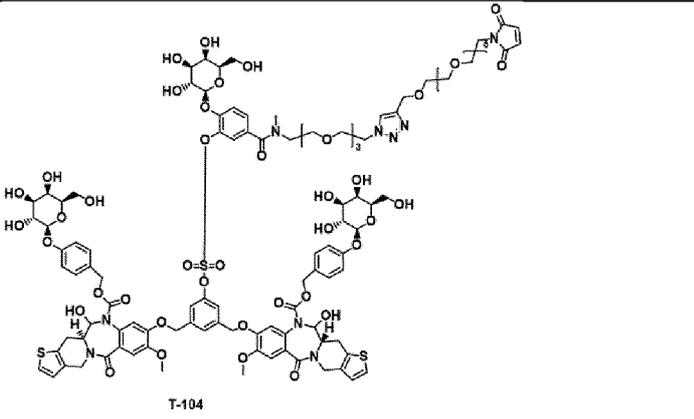
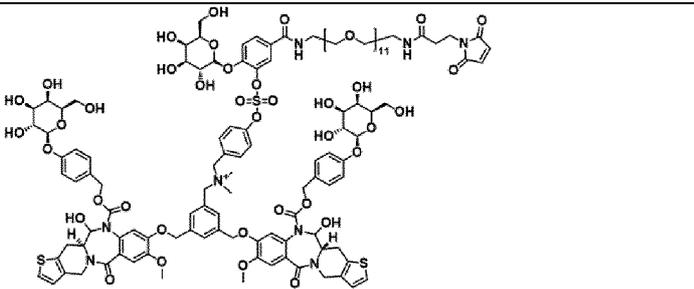
		932(M ⁺ /2+1).
T-33		Выход 53%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 1181 (M/2 ⁺).
T-34		Выход 15%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 935 (M/2 ⁺).
T-35		Выход 77%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 977 (M/2 ⁺).
T-36		Выход 40%, ИЭР-МС m/z: 906 (M/2 ⁺)
T-37		Выход 61%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 957 (M/2 ⁺).
T-38		Выход 65%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 963 (M/2 ⁺).
T-39		Выход 54%, ИЭР-МС m/z: 925 (M/2 ⁺).

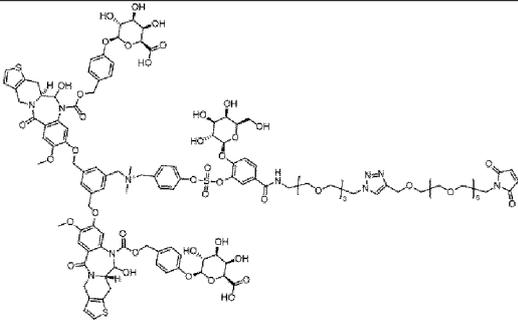
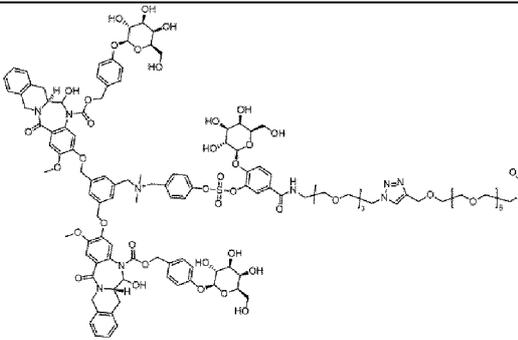
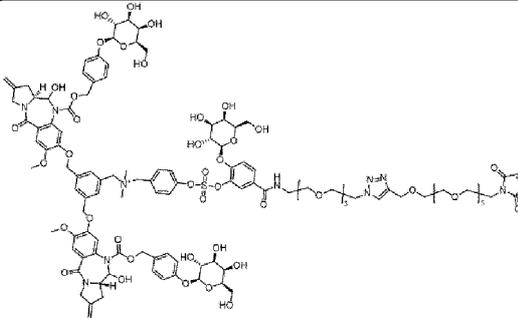
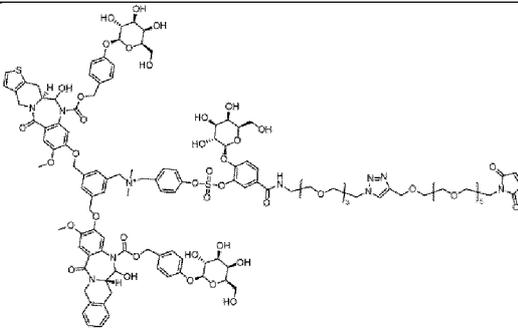
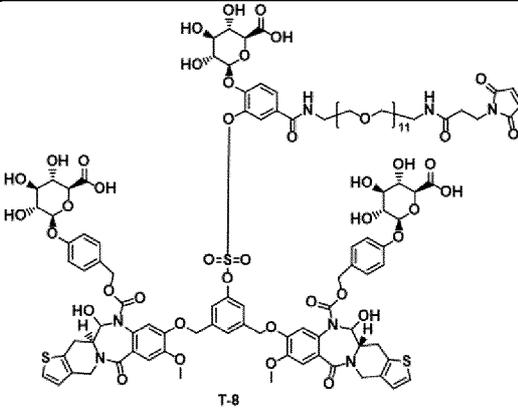
T-47		Выход 35%; ИЭР-МС m/z: 934 (M/2 ⁺¹).
T-48		Выход 16%; ИЭР-МС m/z: 1063 (M/2 ⁺¹).
T-49		Выход 39%; ИЭР-МС m/z: 1023 (M/2 ⁺¹)
T-50		Выход 50%; ИЭР-МС m/z: 1264 (M ⁺¹).
T-51		Выход 64%; ИЭР-МС m/z: 975 (M/2 ⁺¹).
T-52		Выход 0%; 22% ИЭР-МС m/z: 975 (M/2 ⁺¹).
T-53		Выход 48%; ИЭР-МС m/z: 956 (M/2 ⁺¹).
T-54		Выход 68%; ИЭР-МС m/z: 955 (M/2 ⁺¹).
T-55		Выход 43%; ИЭР-МС m/z: 916 (M/2 ⁺¹).

T-56		Выход 70%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 1007 (M/2 ⁺).
T-57		Выход 27%; ИЭР-МС m/z: 1019 (M/2 ⁺).
T-58		Выход 18%; ИЭР-МС m/z: 930 (M/2 ⁺).
T-59		Выход 0%; 57%, ИЭР-МС m/z: 1835 (M ⁺)
T-60		Выход 44%; ИЭР-МС m/z: 937 (M/2 ⁺).
T-61		Выход 17%; ИЭР-МС m/z: 1861 (M ⁺)
T-62		Выход 64%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 957 (M/2 ⁺).
T-63		Выход 57%; ИЭР-МС m/z: 827 (M/2 ⁺).
T-64		Выход 70%; ИЭР-МС m/z: 1667 (M ⁺ +1).
T-65		Выход 68%; ИЭР-МС m/z: 1596 (M ⁺).
T-67		Выход 25%; ИЭР-МС m/z:

		1863 (M^{+1}).
T-68		Выход 44%; ИЭР-МС m/z: 937 ($m/2^{+1}$)
T-69		Выход 33%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 976 ($M/2^{+1}$).
T-70		ИЭР-МС m/z: 728,8($M/2^{+1}$).
T-71		ИЭР-МС m/z: 1580,5 (M^{+1})
T-72		Выход 13%; ИЭР-МС m/z: 1753 (M^{+1}).
T-73		Выход 32%; ИЭР-МС m/z: 1077 ($M/2^{+1}$).
T-74		Выход 21%; ИЭР-МС m/z: 925 ($M/2^{+1}$).
T-75		Выход 35%; ИЭР-МС m/z: 917 ($M/2^{+1}$).

T-76		Выход 81%; ИЭР-МС m/z: 1084 (M/2 ⁺).
T-77		Выход 55%; ИЭР-МС m/z: 1046 (M/2 ⁺).
T-78		Выход 50%; ИЭР-МС m/z: 1008 (M/2 ⁺).
T-79		Выход 54% ИЭР-МС m/z: 1610 (M/2 ⁺).
T-80		Выход 73% ИЭР-МС m/z: 1610 (M/2 ⁺).
T-81		Выход 50%; ИЭР-МС m/z: 1347 (M ⁺).
T-82		Выход 12%; ИЭР-МС m/z: 830 (M/2 ⁺).
T-83		Выход 19%; ИЭР-МС m/z: 1556 (M ⁺), 778 (M/2 ⁺).

T-101	 <p style="text-align: center;">T-101</p>	<p>Выход 61%; ИЭР-МС m/z: 1267 (M⁺/2), 2534 (M⁺+1).</p>
T-102	 <p style="text-align: center;">T-102</p>	<p>Выход 58% ИЭР-МС m/z: 1288 (M⁺/2), 2576 (M⁺+1).</p>
T-103	 <p style="text-align: center;">T-103</p>	<p>Выход 63% ИЭР-МС m/z: 1312(M⁺/2), 2623(M⁺).</p>
T-104	 <p style="text-align: center;">T-104</p>	<p>Выход 63% ИЭР-МС m/z: 1200(M⁺/2), 2399(M⁺).</p>
T-105	 <p style="text-align: center;">T-105</p>	<p>Выход 60% ИЭР-МС m/z: 1305 (M⁺/2).</p>

<p>T-106</p>		<p>Выход 54% ИЭР-МС m/z: 1281(M/2)⁺¹, 2562(M⁺+1)</p>
<p>T-107</p>		<p>Выход 74% ИЭР-МС m/z: 1260 (M+/2+1), 2519 (M+).</p>
<p>T-108</p>		<p>Выход 63% ИЭР-МС m/z: 1210 (M+/2).</p>
<p>T-109</p>		<p>Выход 70% ИЭР-МС m/z: 1263 (M+/2).</p>
<p>T-110</p>	 <p style="text-align: center;">T-8</p>	<p>Выход 47% ИЭР-МС m/z: 1177 (M⁺/2)</p>

0137015.

Соединения А-4, А-5, А-6 и А-7 получали аналогичным синтетическим путем получения соединения ОНРАС-D1 или Q-1 в примере 3.2 или примере 4.1.1.

Получение соединения А-4

ИЭР-МС m/z: 1426(M⁺).

Получение соединения А-5

Выход 75%, ИЭР-МС m/z: 1457(M⁺).

Получение соединения А-6

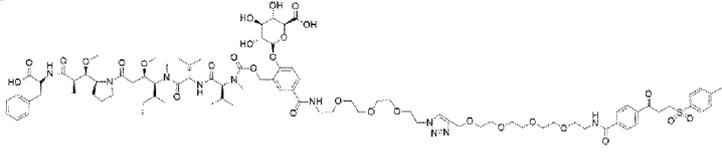
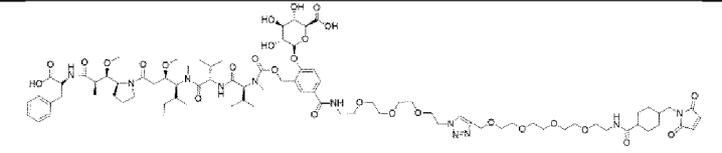
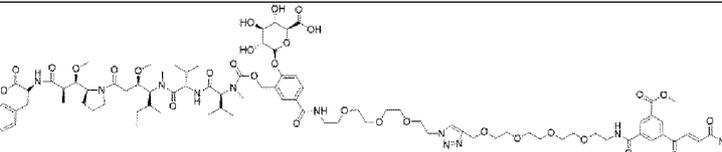
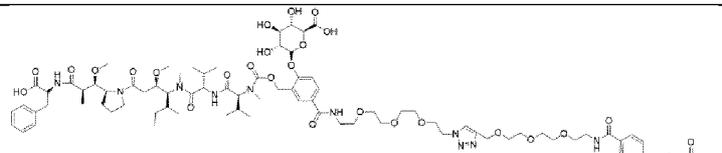
Выход 63%, ИЭР-МС m/z: 1272(M⁺).

Получение соединения А-5

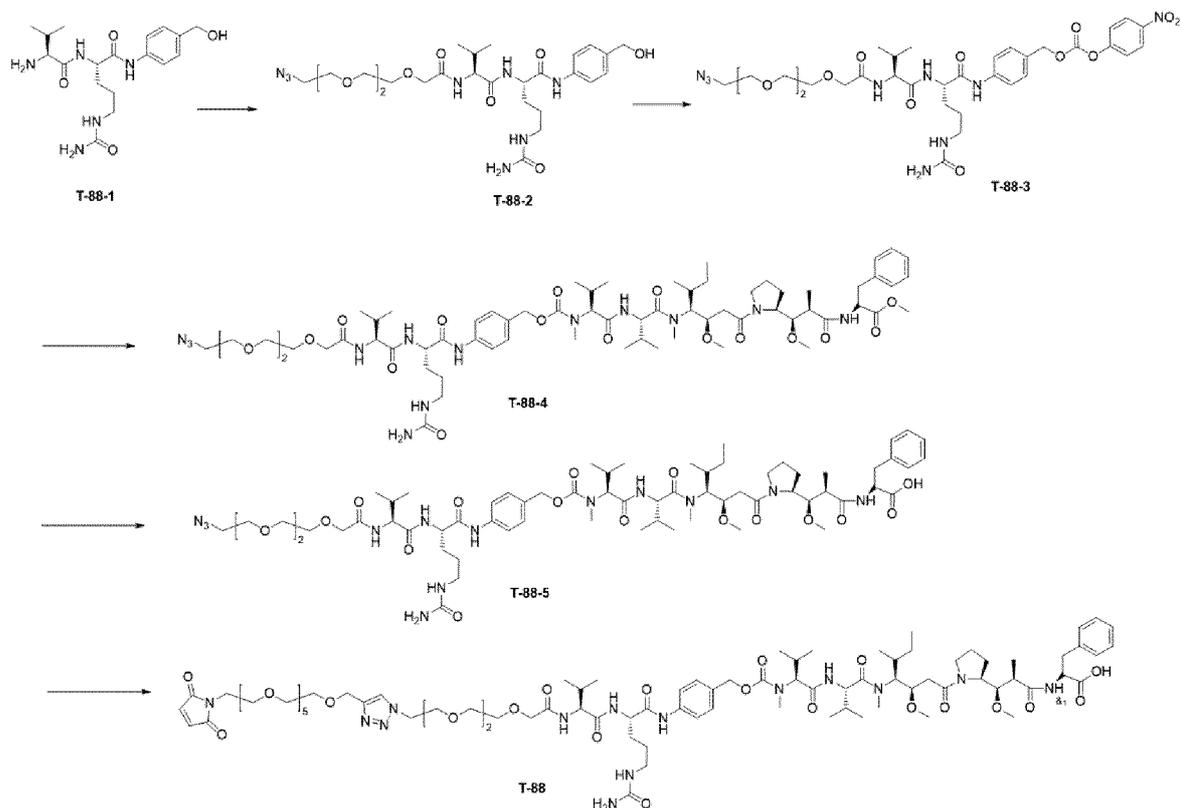
Выход 89%, ИЭР-МС m/z: 1303(M⁺).

В приведенной ниже таблице 9 перечислены димерные производные, которые были синтезированы аналогичным способом синтеза, как описано в примере 4.11.1.

Таблица 9

Т-84		Выход 71%; ИЭР-МС m/z: 925(M/2 ⁺).
Т-85		Выход 56%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 877(M/2 ⁺).
Т-86		Выход 70%, белое твердое вещество. ИЭР-МС m/z: 897(M/2 ⁺).
Т-87		Выход 80%; ИЭР-МС m/z: 846(M/2 ⁺).

Пример 4.11.3 Получение Т-88



Соединение T-88 было синтезировано аналогичным синтетическим путем, как описано в WO2015/095227 A2, включенной в данный документ в качестве ссылки.

Получение соединения T-88-2

К раствору T-88-1 (320 мг, 0,84 ммоль) в ДМФА (5 мл) добавляли L-2a (280 мг, 0,85 ммоль) при 0 °С в атмосфере N₂. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа в атмосфере N₂. После завершения реакции ДМФА удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения T-88-2 (310 мг, 62%).

ИЭР-МС m/z: 595 (M⁺+1).

Получение соединения T-88-3

К раствору T-88-2 (70 мг, 0,12 ммоль) в ДМФА (3 мл) в атмосфере N₂ добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (54 мг, 0,18 ммоль), а затем добавляли DIPEA (41 мкл, 0,24 ммоль). Смесь перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. После завершения реакции, смесь экстрагировали насыщенным водным раствором хлорида натрия (50 мл) и ЭА (50 мл). Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения T-88-3 (44 мг, 49%).

ИЭР-МС m/z: 760(M⁺+1).

Получение соединения T-88-4

Соединение T-88-3 (40 мг, 0,05 ммоль) растворяли в ДМФА (1 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота. Добавляли MMAF-OMe (43 мг, 0,06 ммоль) и HOBT (1,4 мг, 0,01 ммоль) с последующим добавлением пиридина (0,33 мл) и DIPEA (10 мкл, 0,06 ммоль). Смесь перемешивали в течение 22 часов при комнатной температуре. После

завершения реакции смесь экстрагировали ЭА (100 мл), дистиллированной водой (300 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (100 мл) и 1 н водным раствором хлористоводородной кислоты (20 мл). Органический слой сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией с получением соединения Т-88-4 (47 мг, 65%).

ИЭР-МС m/z : 1367($M^+ + 1$).

Получение соединения Т-88-5

К раствору соединения Т-88-4 (40 мг, 0,03 ммоль) в метаноле (1 мл) добавляли $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (10 мг, 0,23 ммоль), растворенный в воде (0,5 мл) при 0°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 0°C в течение 2 часов. После завершения реакции полученный остаток разбавляли 2 н водным раствором хлористоводородной кислоты (2 мл) и очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения Т-88-5 (29,5 мг, 75%).

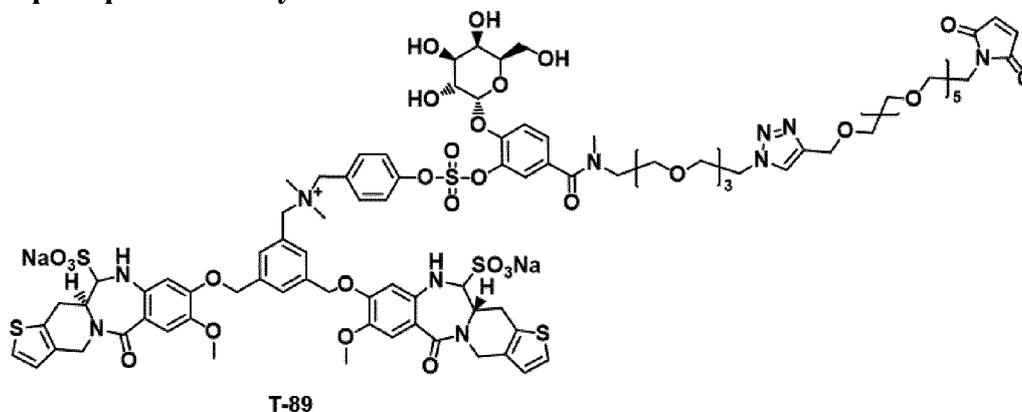
ИЭР-МС m/z : 1353($M^+ + 1$).

Получение соединения Т-88

К гомогенному раствору соединения Т-88-5 (3,0 мг, 2,20 мкмоль) и Mal-1 (1,85 мг, 4,60 мкмоль) в ДМСО (1,5 мл) и H_2O (0,1 мл) добавляли при комнатной температуре в атмосфере азота, и $(\text{VimC}_4\text{A})_3$ (5,67 мг, 6,90 мкмоль), CuBr (3,32 мг, 23,10 мкмоль) и перемешивали в течение 10 минут. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением указанного в заголовке соединения Т-88 (3,0 мг, 77%).

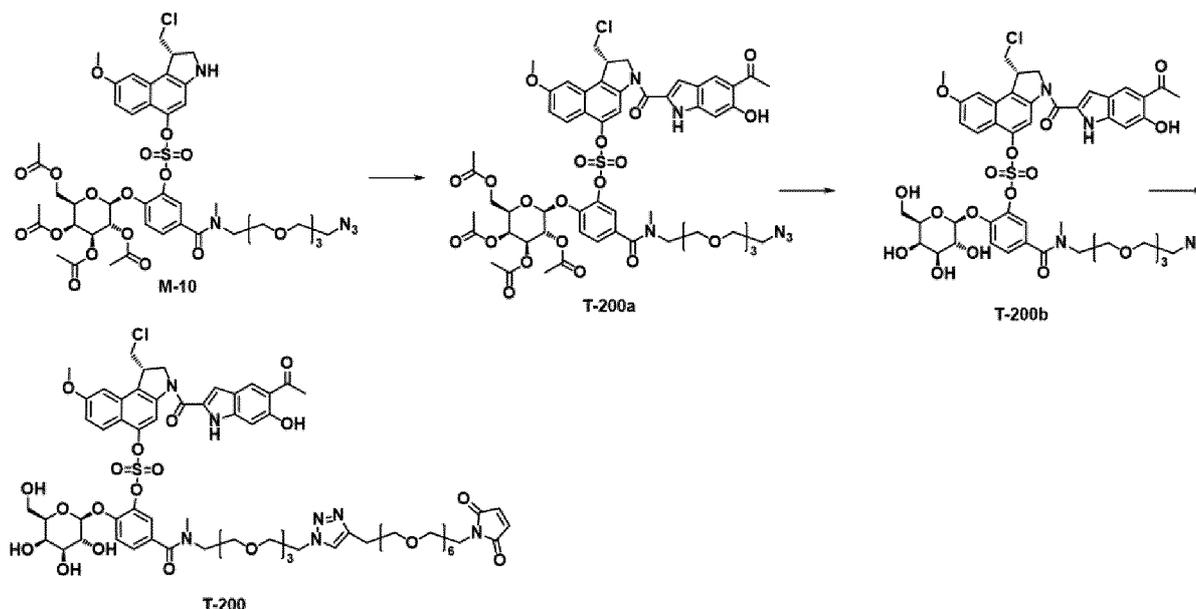
ИЭР-МС m/z : 877 ($M/2^{+1}$).

Пример 4.11.4 Получение Т-89



К раствору соединения Т-42 (2,4 мг, 0,0013 ммоль) в 0,1% муравьиной кислоте в H_2O (1,0 мл) при комнатной температуре добавляли NaHSO_3 и перемешивали в течение 6 часов. Реакционную смесь сушили вымораживанием с получением соединения Т-89 (2,7 мг, количественно).

Пример 4.11.5 Получение Т-200



Получение соединения T-200a

К раствору M-10 (35 мг, 0,033 ммоль) в ДМФА (0,3 мл) добавляли соединение M-17 (8,7 мг, 0,04 ммоль) и EDCI (19 мг, 0,099 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 1 часа при той же температуре, реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения T-200a (29 мг, 69%).

ИЭР-МС m/z: 1225 (M⁺).

Получение соединения T-200b

К раствору T-200a (4 мг, 0,0032 ммоль) в MeOH (0,5 мл) добавляли карбонат калия (4,5 мг, 0,032 ммоль) при 0 °С в атмосфере N₂. После перемешивания в течение 1 часа при той же температуре, реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения T-200b (2,8 мг, 82%).

ИЭР-МС m/z: 1057 (M⁺).

Получение соединения T-200

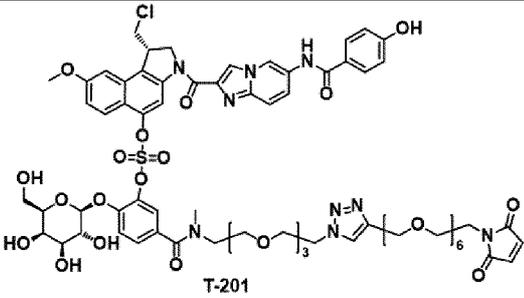
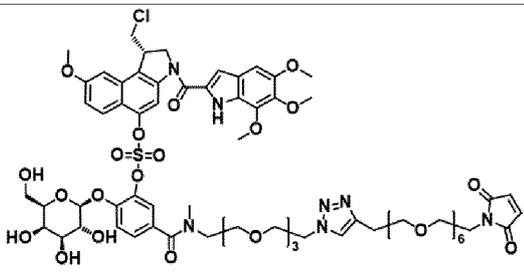
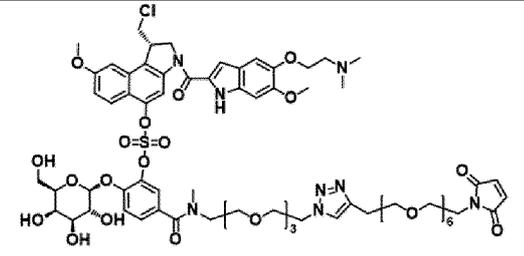
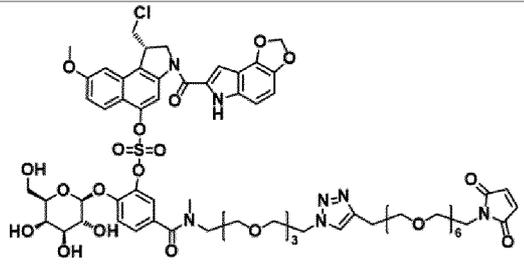
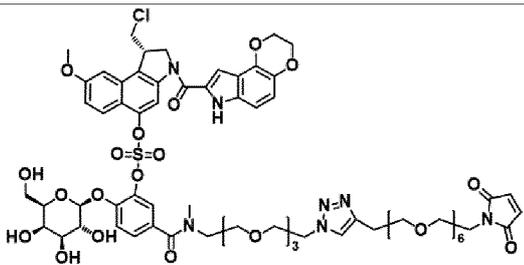
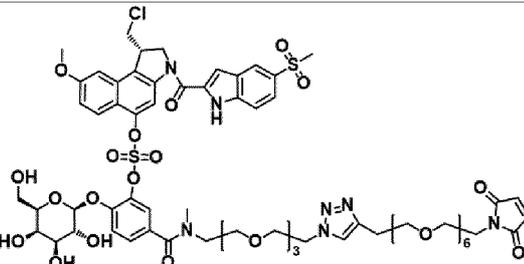
К раствору соединения T-200b (6,3 мг, 0,006 ммоль), Mal-1 (4,8 мг, 0,012 ммоль) в ДМСО (2 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли CuBr (5,1 мг, 0,036 ммоль) и перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения T-200 (5,3 мг, 61%).

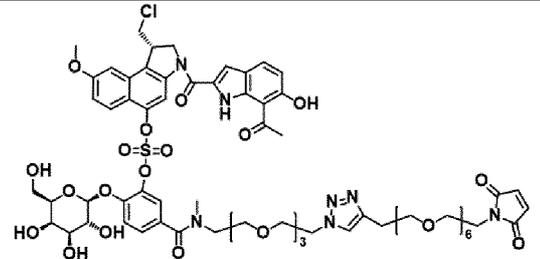
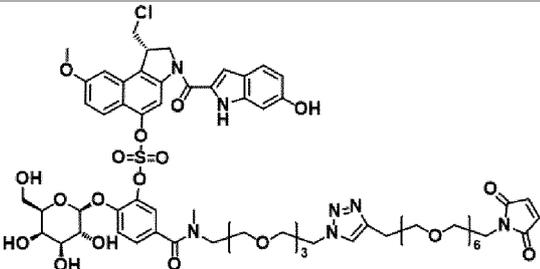
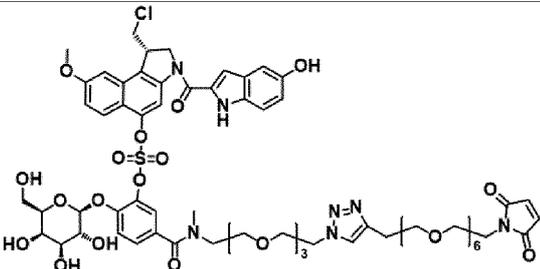
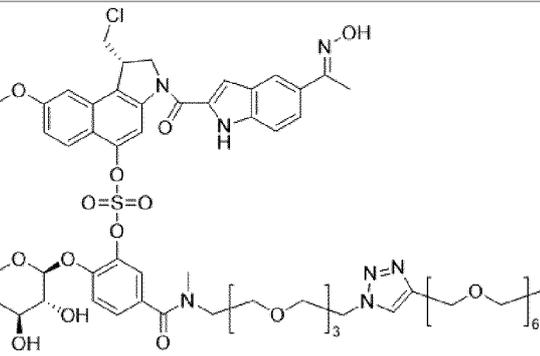
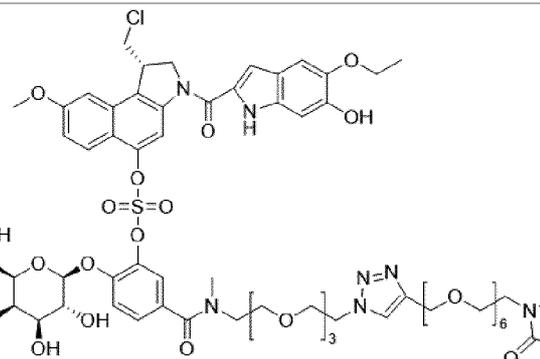
ИЭР-МС m/z: 1456 (M⁺).

В приведенной ниже таблице 14 перечислены производные мономеров, которые были синтезированы с помощью аналогичного способа синтеза, как описано в примере 4.11.5.

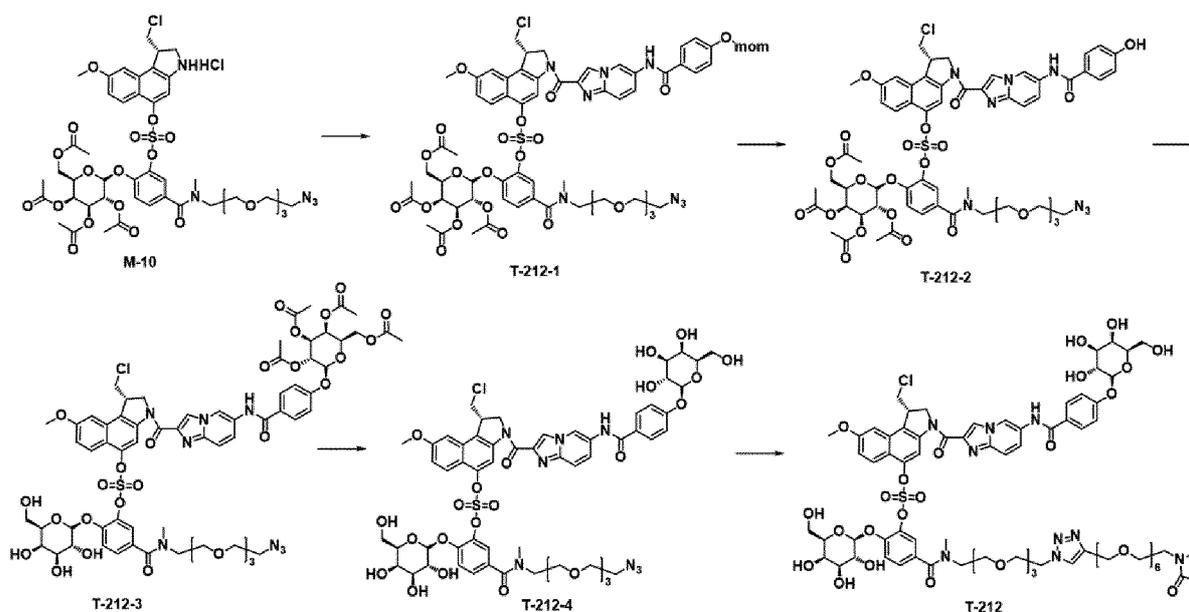
Таблица 14

Соединения	Структура	Аналитические данные
------------	-----------	----------------------

T-201	 <p>Chemical structure of T-201: A complex molecule featuring a central pyridine ring substituted with a chlorine atom, a methoxy group, and a hydroxyl group. This pyridine is linked via a carbonyl group to a benzimidazole ring system. The benzimidazole is further substituted with a methoxy group and a hydroxyl group. A sulfonamide group (-SO₂-NH-) is attached to the benzimidazole, which is connected to a sugar moiety (a pyranose ring with multiple hydroxyl groups). The sugar is linked to a polyether chain consisting of a trimethylene glycol unit and a hexamethylene glycol unit, which is terminated by a cyclic urea-like structure.</p>	Выход 64%; ИЭР-МС m/z: 1535 (M ⁺).
T-202	 <p>Chemical structure of T-202: Similar to T-201, but the benzimidazole ring is substituted with a methoxy group and a hydroxyl group, and the pyridine ring is substituted with a chlorine atom and a methoxy group.</p>	Выход 43% ИЭР-МС m/z: 1488 (M ⁺).
T-203	 <p>Chemical structure of T-203: Similar to T-201, but the benzimidazole ring is substituted with a methoxy group and a hydroxyl group, and the pyridine ring is substituted with a chlorine atom and a methoxy group.</p>	Выход 64% ИЭР-МС m/z: 1516 (M ⁺).
T-204	 <p>Chemical structure of T-204: Similar to T-201, but the benzimidazole ring is substituted with a methoxy group and a hydroxyl group, and the pyridine ring is substituted with a chlorine atom and a methoxy group.</p>	Выход 32% ИЭР-МС m/z: 1442 (M ⁺).
T-205	 <p>Chemical structure of T-205: Similar to T-201, but the benzimidazole ring is substituted with a methoxy group and a hydroxyl group, and the pyridine ring is substituted with a chlorine atom and a methoxy group.</p>	Выход 32% ИЭР-МС m/z: 1456 (M ⁺).
T-206	 <p>Chemical structure of T-206: Similar to T-201, but the benzimidazole ring is substituted with a methoxy group and a hydroxyl group, and the pyridine ring is substituted with a chlorine atom and a methoxy group.</p>	Выход 70% ИЭР-МС m/z: 1476 (M ⁺).

T-207		<p>Выход 66%</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1456</p> <p>(M⁺).</p>
T-208		<p>Выход 84%</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1414</p> <p>(M⁺).</p>
T-209		<p>Выход 68%</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1414</p> <p>(M⁺).</p>
T-210		<p>Выход 80%</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1455</p> <p>(M⁺).</p>
T-211		<p>Выход 60%</p> <p>ИЭР-МС m/z: 1458</p> <p>(M⁺).</p>

Пример 4.11.6 Получение T-212



Получение соединения T-212-1

К раствору M-10 (70 мг, 0,0660 ммоль) в ДМФА (1,2 мл) добавляли соединение M-29 (22,5 мг, 0,0660 ммоль) и EDCI (37,9 мг, 0,198 ммоль) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 1 часа при той же температуре, реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения T-212-1 (48,3 мг, 54%).

ИЭР-МС m/z : 1347 (M^+)

Получение соединения T-212-2

К раствору T-212-1 (48,3 мг, 0,0358 ммоль) в ДХМ (2,0 мл) добавляли HCl в 4 н 1,4-диоксане (0,7 мл) при $0^\circ C$ в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 1 часа при той же температуре, реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения T-212-2 (43,5 мг, 93%).

ИЭР-МС m/z : 1303 (M^+).

Получение соединения T-212-3

К раствору соединения T-212-2 (43,5 мг, 0,0334 ммоль) в безводном ACN (1,0 мл) добавляли β Gal-Br (192 мг, 0,468 ммоль), оксид серебра (171 мг, 0,73 ммоль) и молекулярное сито (90 мг) при комнатной температуре в атмосфере N_2 . После перемешивания при той же температуре в течение ночи реакционную смесь фильтровали через ЦЕЛИТЕ®, а затем концентрировали при пониженном давлении. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения T-212-3 (33,1 мг, 61%).

ИЭР-МС m/z : 1635 ($M^+ + 1$).

Получение соединения T-212-4

К раствору T-212-3 (33,1 мг, 0,0203 ммоль) в метаноле (2,0 мл) добавляли карбонат калия (28,1 мг, 0,203 ммоль) при $0^\circ C$ в атмосфере N_2 . После перемешивания в течение 1 часа при той же температуре, реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения T-212-4 (21,2 мг, 81%).

ИЭР-МС m/z : 1297 (M^+).

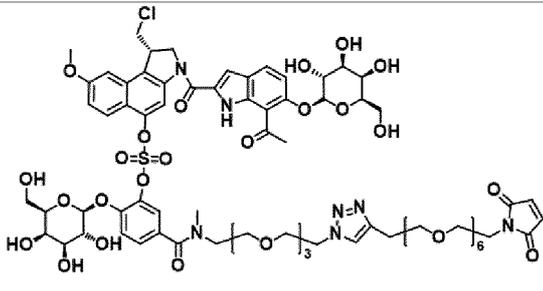
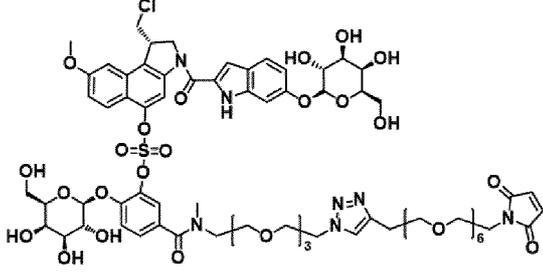
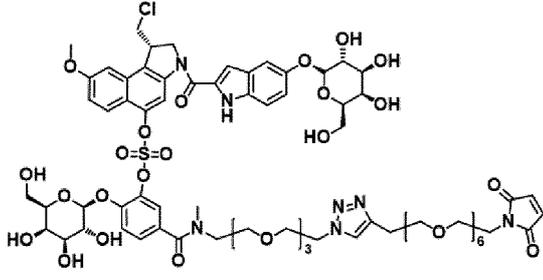
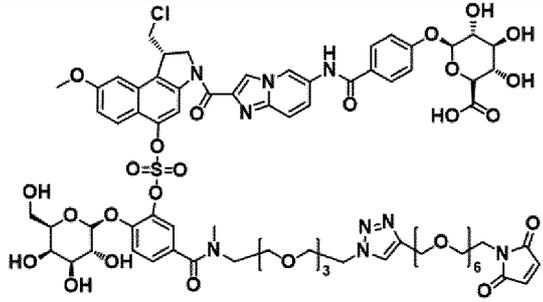
Получение соединения T-212

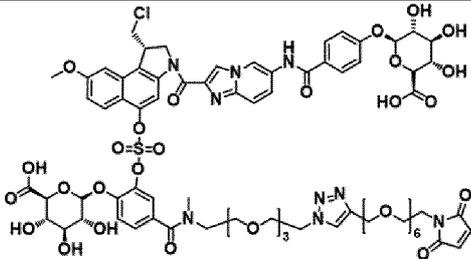
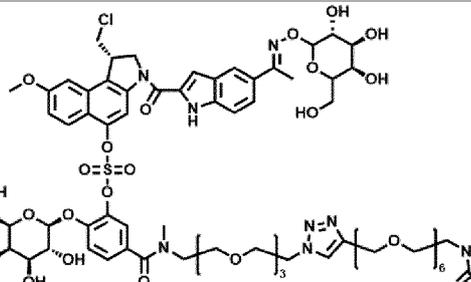
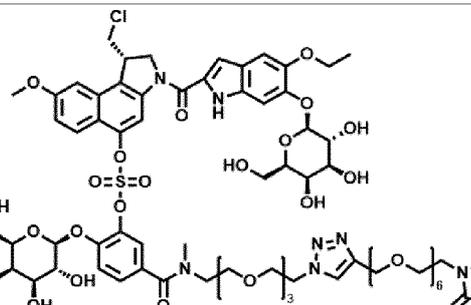
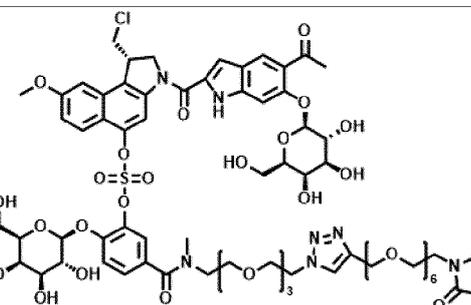
К раствору соединения T-212-4 (5,0 мг, 0,00385 ммоль), Mal-1 (3,08 мг, 0,00771 ммоль) в ДМСО (2 мл) при комнатной температуре в атмосфере N₂ добавляли CuBr (3,3 мг, 0,0231 ммоль) и перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения T-212 (5,4 мг, 82%).

ИЭР-МС m/z: 1697 (M⁺).

В приведенной ниже таблице 15 перечислены производные мономеров, которые были синтезированы с помощью аналогичного способа синтеза, как описано в примере 4.11.6.

Таблица 15

Соединения	Структура	Аналитические данные
T-213		Выход 67% ИЭР-МС m/z: 1619 (M ⁺).
T-214		Выход 83% ИЭР-МС m/z: 1577 (M ⁺).
T-215		Выход 84% ИЭР-МС m/z: 1577 (M ⁺).
T-216		Выход 97% ИЭР-МС m/z: 1709 (M ⁺).

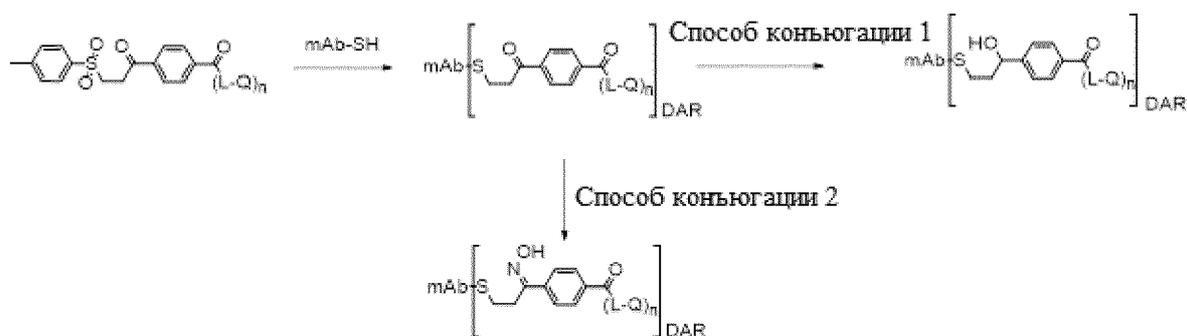
T-217		Выход 30% ИЭР-МС m/z: 1725 (M ⁺).
T-218		Выход 45% ИЭР-МС m/z: 1618 (M ⁺).
T-219		Выход 60% ИЭР-МС m/z: 1621 (M ⁺).
T-220		Выход 62% ИЭР-МС m/z: 1619 (M ⁺).

Пример 5. Восстановление/окисление антител для конъюгации:

Моноклональные антитела, модифицированные цистеином, восстанавливали около в 20-50 раз избытком ТСЕР (трис(2-карбоксиэтил)фосфингидрохлорида или ДТТ (дителиотреитол) в 4 мМ трис, рН 7,3, с 1 мМ ЭДТА в течение 1 часа при 37 °С. Восстановленный тиомаб разводили и наносили на колонку PD-10 в ФСБ. Колонку элюировали 10 мМ ФСБ, рН 7,3. Элюированный восстановленный тиомаб восстанавливали путем окисления воздухом. Значение тиол/Ab проверяли путем определения сниженной концентрации антител по поглощению раствора при 280 нм и концентрации тиолов путем реакции с DTNB (Aldrich, CAS № D8130) и определения поглощения при 412 нм.

Пример 6. Одностадийный способ конъюгации для получения КАЛС

Пример 6.1.



Конъюгаты антитело-лекарственное средство (КАЛС) синтезировали в соответствии с процедурами конъюгации, обобщенными в таблицах 15А-Е. В таблице 15А приведены способы конъюгации 1 и 2; в таблице 15В показаны способы конъюгации 2, 3 и 4; в таблице 15С показаны способы конъюгации 5 и 6; в таблице 15D показаны способы конъюгации 3 и 4; в таблице 15Е показаны способы конъюгации 3 и 4. Данные *in vitro* для КАЛС показаны в таблицах 15F-J.

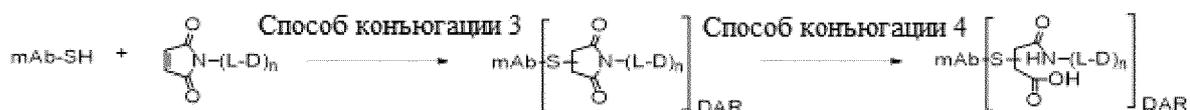
Способ конъюгации 1: Протокол конъюгации MPS. (NaBH₄)

После реакции восстановления и реокисления антитело растворяли в ФСБ. Соединение Т-47, полученное в примере 4.11.1 (3,80 мкл, 3,0 ммоль, в качестве промежуточного соединения линкер-токсин) в ДМСО, обрабатывали восстановленным повторно окисленным антителом (45 мкл, 0,053 ммоль) и осторожно встряхивали в течение 3 часов при комнатной температуре. К раствору реакционной смеси добавляли боргидрид натрия (3,80 мкл, 300 ммоль) и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа, чтобы заблокировать обратимую реакцию деконъюгации. Смесь конъюгации загружали и элюировали через колонку PD-10 для удаления избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер и других примесей.

Способ конъюгации 2: Протокол конъюгации MPS. (NH₂OH)

После реакции восстановления и реокисления антитело растворяли в ФСБ. Раствор соединения Т-11, полученного в примере 4.11.1 (8,86 мкл, 3,0 ммоль, в качестве промежуточного соединения линкер-токсин) в ДМСО, обрабатывали восстановленным повторно окисленным антителом (70 мкл, 0,053 ммоль) и осторожно встряхивали в течение 3 часов при комнатной температуре. К раствору реакционной смеси добавляли гидроксилламин (8,86 мкл, 1500 ммоль) и инкубировали при 37°С в течение 8 часов, чтобы заблокировать обратимую реакцию деконъюгации. Смесь конъюгации загружали и элюировали через колонку PD-10 для удаления избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер и других примесей.

Пример 6.2.



Способ конъюгации 3: Протокол конъюгации малеимида.

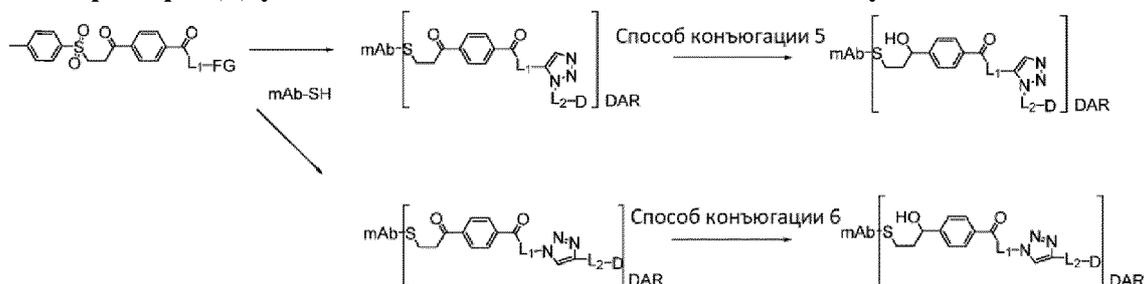
После реакции восстановления и реокисления антитело растворяли в ФСБ. Раствор

соединения T-48, полученного в примере 4.11.1 (5,04 мкл, 3,0 ммоль, в качестве промежуточного соединения линкер-токсин) в ДМСО, обрабатывали восстановленным повторно окисленным антителом (36 мкл, 0,12 ммоль) и осторожно встряхивали в течение 1 часа при 40 °С. Смесь конъюгации загружали и элюировали через колонку PD-10 для удаления избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер и других примесей. DAR (отношение лекарственного средства к антителу) конъюгированного антитела анализировали с помощью ИГХ.

Способ конъюгации 4: Протокол конъюгации малеимида (гидролиз)

После конъюгации малеимида конъюгат антитело-лекарственное средство инкубировали в боратном буфере (рН 9,2) в течение 16 часов при 37°С для гидролиза малеимидного кольца. И боратный буфер заменяли ФСБ (рН 7,3) через колонку viva-spin (GE Healthcare).

Пример 7. Двухстадийный способ конъюгации для получения КАЛС



FG = клик компоненты примеров: N₃, производные ацетиленов, BCN, и др.

Способ конъюгации 5: MPS-N₃+BCN-Лекарственное средство. (NaBH₄)

После реакции восстановления и повторного окисления соединение MPS-D1-11, полученное в примере 2 (таблица 2), использовали для проведения 1-й стадии реакции конъюгации с тиоловыми группами сконструированного цистеина антитела. Антитело в ФСБ обрабатывали каждым соединением (6,62 мкл, 3,0 ммоль) в ДМСО. Через 3 часа к раствору конъюгата добавляли боргидрид натрия (6,62 мкл, 300 ммоль) для блокирования обратимой реакции деконъюгации при комнатной температуре в течение 1 часа. И первые конъюгированные антитела очищали на колонке PD-10. Для 2-го конъюгирования T-Int-102 (13,24 мкл, 3,0 ммоль), полученный в примере 4.10.2, с функциональной группой, такой как N₃, для промотирования циклоприсоединения в отсутствие катализатора Cu(I), подвергали T-Int-102-D1-11 конъюгированное антитело AB2.1 (7,4 мкл, 0,117 ммоль) и инкубировали при 37 °С. Через около 24 часа конъюгат антитело-лекарственное средство очищали на колонке PD-10 и концентрировали с помощью центрифужной ультрафильтрации. DAR (отношение лекарственного средства к антителу) конъюгированного антитела анализировали с помощью ИГХ.

Способ конъюгации 6: MPS-BCN+N₃-Лекарственное средство. (NaBH₄)

После реакции восстановления и повторного окисления соединение MPS-D1-10, полученное в примере 1.9, использовали для проведения реакции конъюгации 1-й стадии с

тиоловыми группами сконструированного цистеина антитела. Антитело в ФСБ обрабатывали каждым соединением (6,62 мкл, 3,0 ммоль) в ДМСО. Через 3 часа к раствору конъюгата добавляли боргидрид натрия (6,62 мкл, 300 ммоль) для блокирования обратимой реакции деконъюгации при комнатной температуре в течение 1 часа. И первые конъюгированные антитела очищали на колонке PD-10. Для 2-го конъюгирования Q-7 (13,24 мкл, 3,0 ммоль), полученный в примере 4.6, с функциональной группой, такой как BCN, для промотирования циклоприсоединения в отсутствие катализатора Cu(I), подвергали воздействию конъюгированного антитела Q-7 AB2.1 (7,4 мкл, 0,117 ммоль) и инкубировали при 37 °С. Через около 24 часа конъюгат антитело-лекарственное средство очищали на колонке PD-10 и концентрировали с помощью центрифужной ультрафильтрации. DAR (отношение лекарственного средства к антителу) конъюгированного антитела анализировали с помощью ИГХ.

Таблица 15А

КАЛС	Антитело	Стабилизация	Ручка конъюгации (ПЭГ)	(ПЭГ) Линкер	Активная часть
T-11 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	MPS (12)	(3) bGal- ONPAS	Q-dTBD
T-1 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	MPS (4)	(3) bGal- ONPAS	dImBD
T-47 AB2.1	SA2107 A121C	NaBH ₄	MPS (0)	(3) bGal- ONPAS	а-аманитин
T-6 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	MPS (4)	(3) bGal- ONPAS	dPBD
T-55 AB2.1	SA2107 A121C	NaBH ₄	MPS (0)	(3) bGal- ONPAS	MMAF
T-70 AB2.1	SA2107 A121C	NaBH ₄	MPS (0)	(3) bGal- ONPAS	СВІ-индол
T-71 AB2.1	SA2107 A121C	NaBH ₄	MPS (4)	(3) bGal- ONPAS	dСВІ
T-82 AB2.1	SA2107 A121C	NaBH ₄	MPS (4)	(3) bGal- ONPAS	Фенпанстатин
T-2 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	MPS (12)	(3) bGal- ONPAS	Q-dThBD
T-4 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	MPS (12)	(3) bGal- ONPAS	Q-dFuBD
T-30 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	MPS (4)	(3) bGal- ONPAS	ImBD-TBD
T-32 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mpMPS (4)	(3) bGal- ONPAS	ImBD-TBD
T-33 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mpMPS (12)	(3) bGal- ONPAS	Q-dTBD
T-34 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mpMPS (4)	(3) bGal- ONPAS	dImBD
T-72 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	MPS (0)	(3) bGal- ONPAS	Q-PNU
T-21 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (4)	(3) bGal- ONPAS	dPBD

T-22 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	MPS (4)	(3) bGal- OHPAS	Q-dPBD
T-28 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (4)	(3) bGal- OHPAS	Q-dPBD
T-20 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (12)	(3) bGal- OHPAS	Q-dTBD
T-23 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (12)	(3) bGal- OHPAS	Q-dThBD
T-25 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	MPS (12)	(3) bGal- OHPAS	dThBD
T-24 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (12)	(3) bGal- OHPAS	dThBD

Таблица 15В

КАЛС	Антитело	Стабилизация	Ручка конъюгации (ПЭГ)	(ПЭГ) Линкер	Активная часть
T-8 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	MPS (12)	(11) bGal- OHPAS	dTBD
T-26 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mpMPS (12)	(3) bGal- OHPAS	dTBD
T-57 AB2.1	SA2107 A121C	NaBH ₄	mMPS (4)	(3) bGal- OHPAS	Q-ауристатин F
T-13 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (12)	(3) bGal- OHPAS	adTBD
T-27 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (12)	(3) bGal- OHPAS	Q-dThBD, NaSO ₃
T-19 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (12)	(3) bGal- OHPAS	dTBD, алкиламин
T-73 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (5)	(3) bGal- OHPAS	Q-PNU
T-31 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (12)	(3) bGal- OHPAS	ImBD-TBD
T-15 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (12)	(3) bGal- OHPAS	adTBD, DMBA
T-17 AB2.1	SA2107 A121C	NH ₂ OH	mMPS (12), сульфиновая кислота	(3) bGal- OHPAS	adTBD, DMBA
T-38 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (4)	(3) bGal- OHPAS	Q-dThBD
T-48 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (4)	(3) bGal- OHPAS	Q-а-аманитин
T-51 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (4)	(3) bGal- OHPAS	а-аманитин
T-52 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (4)	(3) bGal- OHPAS	б-аманитин
T-77 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (4)	(3) bGal- OHPAS	SN38/CA4
T-78 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (4)	(3) bGal- OHPAS	CA4/CA4
T-59 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (0)	(3) bGal- OHPAS	MMAF

T-43 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (6)	(3) bGal- OHPAS	Q-dThBD
T-45 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (6)	(3) bGal- OHPAS	Q-dThBD_SO ₃
T-45RO AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (6)	(3) bGal- OHPAS	Q-dThBD_SO ₃
T-60 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (6)	(3) bGal- OHPAS	MMAF
T-88 AB2.1	SA2107 A121C	-	Mal (6)	(3) VC	MMAF
T-6 AB2.1	SA2566 A121C	NH ₂ OH	MPS (4)	(3) bGal- OHPAS	dPBD
T-21 AB2.1	SA2566 A121C	NH ₂ OH	mMPS (4)	(3) bGal- OHPAS	dPBD
T-20 AB2.1	SA2566 A121C	NH ₂ OH	mMPS (12)	(3) bGal- OHPAS	Q-dTBD
T-55 AB2.1	m8524 A121C	NaBH ₄	MPS (0)	(3) bGal- OHPAS	MMAF
T-55 AB2.1	m8524 S442C	NaBH ₄	MPS (0)	(3) bGal- OHPAS	MMAF
T-6 AB2.1	m8524 S442C	NH ₂ OH	MPS (4)	(3) bGal- OHPAS	dPBD
T-21 AB2.1	m8524 S442C	NH ₂ OH	mMPS (4)	(3) bGal- OHPAS	dPBD

Таблица 15C

КАЛС	Антитело	Ручка конъюгации (ПЭГ)	(ПЭГ) Линкер	Активная часть
T-Int-102-D3-1 AB2.1	SA2107 A121C	mpMPS-N ₃ (5)	(3) BCN-bGal- OHPAS	Q-dTBD
Q-7 AB2.1	SA2107 A121C	MPS-BCN (5)	(3) N ₃ -bGal- OHPAS	Q-PNU
T-Int-1 AB2.1	SA2107 A121C	MPS-BCN (5)	(3) N ₃ -bGal- OHPAS	dPBD
	SA2107 A121C	mpMPS-N ₃ (5)	(3) BCN-bGal- OHPAS	Q-dThBD
T-Int-102-D1- 17AB2.1	SA2107 A121C	MPS-N ₃ (5)	(3) BCN-bGal- OHPAS	Q-dTBD
T-Int-102-D1-11 AB2.1	SA2107 A121C	MPS-N ₃ (11)	(3) BCN-bGal- OHPAS	Q-dTBD
T-Int-102-D1-5 AB2.1	SA2107 A121C	MPS-N ₃ (2)	(3) BCN-bGal- OHPAS	Q-dTBD
T-Int-113 AB2.1	SA2107 A121C	MPS-N ₃ (2)	(3) BCN-SO ₃ H- bGal-OHPAS	Q-dTBD
T-Int-112 AB2.1	SA2107 A121C	MPS-N ₃ (2)	(3) BCN-bGal- OHPAS	Q-dThBD

Таблица 15D

КАЛС	Антитело	Ручка конъюгации (ПЭГ)	(ПЭГ) Линкер	Активная часть
T-101 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	Q dThBD_bGal

T-102 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	Q dThBD_bG
T-103 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	Q dThBD NO ₂ _bGal
T-104 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	dThBD_bGal
T-105 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (11)	bGal-OHPAS	Q dThBD_bGal
T-106 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	Q dThBD_bG
T-107 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	Q dTBD_bGal
T-108 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	Q PBD_bGal
T-109 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	Q ThBD- TBD_bGal
T-110 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (11)	bG-OHPAS	Q dThBD_bG
T-111 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	Q dThBD_bG

Таблица 15E

КАЛС	Антитело	Ручка конъюгации (ПЭГ)	(ПЭГ) Линкер	Активная часть
T-201 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco DUBA
T-203 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco MCBI DEI
T-206 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco MCBI MSI
T-207 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco MCBI 6H7AI
T-208 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco MCBI 6HI
T-209 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco MCBI 5HI
T-210 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco MCBI 6H7AI- bGal
T-211 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco MCBI 6HI- bGal
T-212 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco MCBI 5HI- bGal
T-213 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco MCBI-bGal
T-214 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bGal- OHPAS	seco DUBA-bG
T-215 AB2.1	SA2107 A121C	малеимид (6)	(3) bG- OHPAS	seco DUBA-bG

Таблица 15F

КАЛС	Антигено	Активная часть	mDAR	HEK293/B7-H3 (1,2X10 ⁷)	JIMT1 (6,7X10 ⁵)	Calu-6 (4,6X10 ⁵)	H460 (3,0X10 ⁵)	A549 (2,3X10 ⁵)	HCT-116 (2,1X10 ⁵)	NCI-N87 (1,5X10 ⁵)	DU-145 (8,5X10 ⁴)	NCI-H23 (8,2X10 ⁴)
T-11 AB2. 1	SA210 7 A121C	Q-dTBD	0,62	0,002	0,063		0,268		0,052	0,222	-	-
T-1 AB2. 1	SA210 7 A121C	dImBD	0,78	0,055	>100		-		>100	>100	-	-
T-47 AB2. 1	SA210 7 A121C	α-аманитин	2,0	0,059	0,1~1,0		-		>100	>100	-	-
T-6 AB2. 1	SA210 7 A121C	dPBD	1,94	0,011	0,079		-		0,557	4,641	-	-
T-55 AB2. 1	SA210 7 A121C	MMAF	1,62	-	-		-		-	-	-	-
T-70 AB2. 1	SA210 7 A121C	СВІ-индол	0,88	-	-		-		-	-	-	-
T-71 AB2. 1	SA210 7 A121C	dСВІ	2,0	-	0,019	0,024	0,014	0,176	-	-	0,035	0,046
T-82 AB2. 1	SA210 7 A121C	Фенпанстати н	1,67	-	-		-		-	-	-	-
T-2 AB2. 1	SA210 7 A121C	Q-dThBD	1,89	-	0,012	0,003	-	-	0,004	0,098	-	-
T-4 AB2. 1	SA210 7 A121C	Q-dFuBD	0,62	-	-		-		-	-	-	-
T-30 AB2. 1	SA210 7 A121C	ImBD-TBD	0,39	0,043	>100		-		>100	>100	-	-
T-32 AB2. 1	SA210 7 A121C	ImBD-TBD	0,16	-	-		-		-	-	-	-
T-33 AB2. 1	SA210 7 A121C	Q-dTBD	0,24	-	-		-		-	-	-	-
T-34 AB2. 1	SA210 7 A121C	dImBD	0,08	-	-		-		-	-	-	-
T-72 AB2. 1	SA210 7 A121C	Q-PNU	-	-	-		-		-	-	-	-

T-21 AB2. 1	SA210 7 A121C	dPBD	1,93	-	0,034	0,039	0,120	4,084	0,200	0,494	0,198	3,727
T-22 AB2. 1	SA210 7 A121C	Q-dPBD	1,33	-	0,023						-	-
T-28 AB2. 1	SA210 7 A121C	Q-dPBD	2,00	-	0,011	0,025	0,178	0,398	0,143	0,660	0,069	0,142
T-20 AB2. 1	SA210 7 A121C	Q-dTBD	1,98	-	0,011	0,008	0,039	0,107	-	-	0,021	0,018
T-23 AB2. 1	SA210 7 A121C	Q-dThBD	1,99	-	0,011	0,010	0,055	0,074	-	-	0,034	0,025
T-25 AB2. 1	SA210 7 A121C	dThBD	1,03	-	0,043	-	-	-	-	-	-	-
T-24 AB2. 1	SA210 7 A121C	dThBD	0,50	-	0,047	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 15G

Но мер	Антиг ело	Активн ая часть	m DA R	HEK29 3/B7-H3 ($1,2 \times 10^7$)	JMT1 ($6,7 \times 10^5$)	Calu-6 ($4,6 \times 10^5$)	H460 ($3,0 \times 10^5$)	A549 ($2,3 \times 10^5$)	HCT- 116 ($2,1 \times 10^5$)	DU- 145 ($1,5 \times 10^5$)	NCI- H23 ($8,2 \times 10^4$)
T- 57 AB 2.1	SA210 7 A121C	Q- ауристан ин F	1,7 3	-	0,040	-	-	-	-	-	-
T- 13 AB 2.1	SA210 7 A121C	adTBD	0,6 9	-	0,015	-	-	-	-	-	-
T- 19 AB 2.1	SA210 7 A121C	dTBD, алкилам ин	1,1 0	-	0,604	-	-	-	-	-	-
T- 31 AB 2.1	SA210 7 A121C	ImBD- TBD	1,4 0	-	0,278	-	-	-	-	-	-
T- 15 AB 2.1	SA210 7 A121C	adTBD, DMBA	0,8 2	-	0,044	-	-	-	-	-	-
T- 17 AB 2.1	SA210 7 A121C	adTBD, DMBA	0,5 6	-	0,126	0,143	0,513	-	-	0,256	0,780
T-	SA256	dPBD	1,1	-	0,219	0,801	2~20	2~20	3,374	2,0	3,521

21 AB 2.1	6 A121C		2									
T- 55 AB 2.1	m8524 A121C	MMAF	0,9 8	0,103	-	0,589	-	-	-	-	-	-
T- 45R O AB 2.1	SA210 7 A121C	Q- dThBD_ SO ₃	1,9 8									0,011
T-6 AB 2.1	m8524 S442C	dPBD	1,0 1	-	-	-	1~10	-	3,373	-	3,327	
T- 21 AB 2.1	m8524 S442C	dPBD	1,9 4	-	0,007-	-	-	-	0,599	-	-	

Таблица 15H

CO DE	Анти тело	Акти вная часть	m D A R	HEK29 3/B7- H3 (1,2X1 0 ⁷)	JMT 1 (6,7X1 0 ⁵)	Calu- 6 (4,6X1 0 ⁵)	H460 (3,0X1 0 ⁵)	A549 (2,3X1 0 ⁵)	HCT- 116 (2,1X1 0 ⁵)	NCI- N87 (1,5X1 0 ⁵)	DU- 145 (1,5X1 0 ⁵)	NCI- H23 (8,2X1 0 ⁴)
T- Int- 102 - D3- 1 AB 2.1	SA21 07 A121 C	Q- dTBD	0,2 6	-	-	-	-	-	-	0,045	-	-
Q-7 AB 2.1	SA21 07 A121 C	Q- PNU	0,4 3	0,191	-	-	-	-	-	3,626	-	-
T- Int- 102 - D1- 5 AB 2.1	SA21 07 A121 C	Q- dTBD	1,5 2	-	-	-	0,103	-	0,023	-	-	0,039
T- Int- 113 AB 2.1	SA21 07 A121 C	Q- dTBD	1,4 0	-	-	-	0,046	-	0,012	-	-	0,020
T- Int-	SA21 07	Q- dTBD	1,9 9		0,020		0,094	0,474	-	-		0,043

102 - D1- 5 AB 2.1	A121 C											
T- Int- 113 AB 2.1	SA21 07 A121 C	Q- dThBD	1,9 4		-		0,042	-	0,020	-		0,010
T- Int- 112 AB 2.1	SA21 07 A121 C	Q- dThB D	1,9 6		0,018		0,041	0,483	-	0,031		0,042

Таблица 15I

CODE	Антитело	Активная часть	DA R	JIMT1 ($6,7 \times 10^5$)	Calu-6 ($4,6 \times 10^5$)
T-101 AB2.1	SA2107 A121C	QdThBD	2,0	0,023±0,013	0,038±0,004
T-102 AB2.1	SA2107 A121C	Q dThBD	2,0	0,066±0,019	0,066±0,010
T-103 AB2.1	SA2107 A121C	Q dThBD	2,0	0,016±0,003	0,024±0,004
T-104 AB2.1	SA2107 A121C	dThBD	2,0	0,023±0,006	0,044±0,006
T-105 AB2.1	SA2107 A121C	Q dThBD	2,0	0,029±0,023	0,093±0,018
T-106 AB2.1	SA2107 A121C	Q dThBD	2,0	0,019±0,004	0,066±0,005
T-107 AB2.1	SA2107 A121C	Q dTBD	2,0	0,042±0,004	0,027±0,001
T-108 AB2.1	SA2107 A121C	Q PBD	2,0	0,072±0,016	0,291±0,033
T-109 AB2.1	SA2107 A121C	Q ThBD-TBD	2,0	0,029±0,023	0,093±0,018
T-110 AB2.1	SA2107 A121C	Q dThBD	2,0	0,036±0,002	0,044±0,003
T-111 AB2.1	SA2107 A121C	Q dThBD	2,0	0,020±0,009	0,066±0,007

Таблица 15J

CODE	Антитело	Активная часть	DA R	JIMT1 ($6,7 \times 10^5$)	Calu-6 ($4,6 \times 10^5$)
T-201 AB2.1	SA2107 A121C	seco DUBA	2,0	0,337±0,036	0,075±0,001
T-203 AB2.1	SA2107 A121C	seco MCBI DEI	2,0	0,016±0,010	
T-207 AB2.1	SA2107 A121C	seco MCBI 6H7AI	2,0	0,070±0,003	0,265±0,011
T-208	SA2107	seco MCBI 6HI	2,0	0,081±0,002	0,053±0,005

AB2.1	A121C				
T-209 AB2.1	SA2107 A121C	seco MCBI 5HI	2,0	0,086±0,005	0,045±0,002
T-210 AB2.1	SA2107 A121C	seco MCBI 6H- bGal7AI	2,0	0,500±0,045	0,167±0,015
T-211 AB2.1	SA2107 A121C	seco MCBI 6HIbGal	2,0	0,085±0,006	0,415±0,024
T-212 AB2.1	SA2107 A121C	seco MCBI 5HIbGal	2,0	0,101±0,009	0,061±0,001
T-213 AB2.1	SA2107 A121C	seco MCBI	2,0	0,114±0,008	0,092±0,009
T-214 AB2.1	SA2107 A121C	seco DUBA	2,0		1,275±0,195
T-215 AB2.1	SA2107 A121C	seco DUBA	2,0		2,351±0,670

Таблица 16. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (КАЛС): см. Таблицу 12 или Таблицу 15.

КАЛС	DAR	Способ конъюгации	Линкер-токсин
(Пожалуйста, обратитесь к Таблице 12 или Таблице 15, в которых показаны производные токсина для получения КАЛС)			
T-11-AB2.1	0,62	2	T-11,
T-1-AB2.1	0,78	2	T-1,
T-47-AB2.1	1,43	1	T-47
T-6-AB2.1	1,08	2	T-6
T-55-AB2.1	1,62	1	T-55
T-70-AB2.1	0,88	1	T-70
T-71-AB2.1	0,90	1	T-71
T-82-AB2.1	1,67	1	T-82
T-2-AB2.1	1,36	2	T-2
T-4-AB2.1	0,62	2	T-4
T-30-AB2.1	0,39	2	T-30
T-32-AB2.1	0,16	2	T-32
T-33-AB2.1	0,24	2	T-33
T-34-AB2.1	0,08	2	T-34
T-21-AB2.1	1,12	2	T-21
T-22-AB2.1	1,33	2	T-22
T-28-AB2.1	1,45	2	T-28
T-20-AB2.1	0,97	2	T-20
T-23-AB2.1	0,95	2	T-23

T-25-AB2.1	1,03	2	T-25
T-24-AB2.1	0,50	2	T-24
T-8-AB2.1	0,95	2	T-8
T-26-AB2.1	0,40	2	T-26
T-57-AB2.1	1,73	1	T-57
T-13-AB2.1	0,69	2	T-13
T-19-AB2.1	1,10	2	T-19
T-31-AB2.1	1,40	2	T-31
T-15-AB2.1	0,82	2	T-15
T-17-AB2.1	0,56	2	T-17
T-48-AB2.1	1,54	3	T-48
T-51-AB2.1	1,84	3	T-51
T-52-AB2.1	0,38	3	T-52
T-77-AB2.1	1,41	3	T-77
T-78-AB2.1	1,65	3	T-78
T-59-AB2.1	1,84	3	T-59
T-43-AB2.1	1,81	3	T-43
T-45-AB2.1	1,88	3, 4	T-45
T-45RO-AB2.1	1,88	4	T-45
T-60-AB2.1	1,88	3	T-60
T-88-AB2.1	1,83	3	T-88
T-21-AB6.1	1,12	2	T-21
T-20-AB6.1	0,44	2	T-20
T-55-AB9.1	0,98	1	T-55
T-55-AB9.2	1,71	1	T-55
T-6-AB9.2	1,01	2	T-6
T-21-AB9.2	1,03	2	T-21
T-1-AB1.1	1,20	2	T-1
T-1-AB3.1	-	2	T-1
T-8-AB1.1	1,20	2	T-8
T-11-AB9.1	0,66	2	T-11
T-11-AB1.2	0,54	2	T-11
T-21-AB7.1	0,40	2	T-21
T-21-AB8.1	-	2	T-21

T-21-AB4.1	0,31	2	T-21
T-21-AB5.1	-	2	T-11
T-55-AB1.1	1,79	1	T-55
T-55-AB1.2	1,69	1	T-55
T-89-AB2.1	2,0	3, 4	T-89
T-101 AB2.1	2,0	3, 4	T-101
T-102 AB2.1	2,0	3, 4	T-102
T-103 AB2.1	2,0	3, 4	T-103
T-104 AB2.1	2,0	3, 4	T-104
T-105 AB2.1	2,0	3, 4	T-105
T-106 AB2.1	2,0	3, 4	T-106
T-107 AB2.1	2,0	3, 4	T-107
T-108 AB2.1	2,0	3, 4	T-108
T-109 AB2.1	2,0	3, 4	T-109
T-110 AB2.1	2,0	3, 4	T-110
T-111 AB2.1	2,0	3, 4	T-111
T-Int-102-D3-1 AB2.1	0,62	5	MPS-D3-1, Пример 2 T-Int-102, Пример 4.10.3
Q-7 AB2.1	0,43	6	MPS-D1-10, Пример 1.9 Q-7, Пример 4.6
T-Int-1 AB2.1	0,56	6	MPS-D1-10, Пример 1.9 T-Int-1, Пример 4.10.1
T-Int-102-D1-7 AB2.1	1,15	5	MPS-D1-7, Пример 2 T-Int-102, Пример 4.10.3
T-Int-102-D1-11 AB2.1	0,56	5	MPS-D1-11, Пример 2 T-Int-102, Пример 4.10.3
T-Int-102-D1-5 AB2.1	1,52	5	MPS-D1-5, Пример 2 T-Int-102, Пример 4.10.3
T-Int-113 AB2.1	1,40	5	MPS-D1-5, Пример 2 T-Int-113, Пример 4.10.1
T-Int-112 AB2.1	1,15	5	MPS-D1-5, Пример 2 T-Int-112, Пример 4.10.3
T-200 AB2.1	2	3, 4	T-200
T-201 AB2.1	2	3, 4	T-201

T-202 AB2.1	2	3, 4	T-202
T-203 AB2.1	2	3, 4	T-203
T-204 AB2.1	2	3, 4	T-204
T-205 AB2.1	2	3, 4	T-205
T-206 AB2.1	2	3, 4	T-206
T-207 AB2.1	2	3, 4	T-207
T-208 AB2.1	2	3, 4	T-208
T-209 AB2.1	2	3, 4	T-209
T-210 AB2.1	2	3, 4	T-210
T-211 AB2.1	2	3, 4	T-211
T-212 AB2.1	2	3, 4	T-212
T-213 AB2.1	2	3, 4	T-213
T-214 AB2.1	2	3, 4	T-214
T-215 AB2.1	2	3, 4	T-215
T-216 AB2.1	2	3, 4	T-216
T-217 AB2.1	2	3, 4	T-217
T-218 AB2.1	2	3, 4	T-218

Пример 8. Очистка конъюгата антитело-лекарственное средство

Смесь концентрировали с помощью центрифужной ультрафильтрации, конъюгат очищали на колонке НИС NPR (TOSOH #0007656 TSKgel Phenyl-5PW, 21,5×150 мм, 13 мкм) и элюировали линейным градиентом от 40 до 100% В со скоростью 0,8 мл/мин (А буфер 1,5 М сульфата аммония в 50 мМ фосфата натрия (рН 7,0); буфер В 20% ацетонитрила в 50 мМ фосфата натрия (рН 7,0)). DAR (отношение лекарственного средства к антителу) конъюгированного антитела анализировали с помощью ИГХ.

Пример 9. Анализ конъюгатов белок-лекарственное средство *in vitro*

Клетки НЕК293 (сверхэкспрессия В7-Н3), раковые клетки NCI-N87, JIMT-1, Calu-6, NCI-N460, A549, HCT-116, DU-145, NCI-N23 и NCI-N358 высевали в 96-луночные планшеты при плотности от 2000 до 8000 клеток на лунку в 100 мкл среды и культивировали в течение 24 часов. КАЛС обрабатывали серийными разведениями 1:4 от 50 нМ до 0,0003 нМ, а конъюгат антитело-лекарственное средство T-DM1 обрабатывали серийными разведениями 1:4 от 50 нМ до 0,0007 нМ. Серию разведений соединения в ДМСО добавляли в три лунки 24-луночных планшетов по 5 мкл на лунку. В три лунки на каждом отдельном планшете в качестве контроля добавляли 5 мкл ДМСО без соединения. Конечная концентрация ДМСО на лунку составляла 0,5%. Планшеты инкубировали в течение 6 дней при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в воздухе. Жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа МТТ. В каждую лунку планшета добавляли по 0,2 мл красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ),

растворенного в буферном растворе ФСБ (5 мг/мл). Формазаны, образованные восстановлением красителя МТТ митохондриальными оксидоредуктазами в живых клетках, растворяли в ДМСО и измеряли по поглощению при 550 нм. IC₅₀ рассчитывали с использованием сигмоидальной кривой нелинейной регрессии доза-реакция (GraphPad software Inc.), и результаты показаны на Фиг. 1-9 и Таблицах 17-27 ниже.

Таблица 17. Клеточная цитотоксичность конъюгатов антитело-лекарственное средство (НЕК293 со сверхэкспрессией В7-Н3)

КАЛС	DAR	НЕК293/В7-Н3 (IC ₅₀ нМ)
T-11-AB2.1	0,62	0,002
T-1-AB2.1	0,78	0,055
T-47-AB2.1	1,43	0,059
T-6-AB2.1	1,08	0,011
T-30-AB2.1	0,39	0,043
T-55-AB9.1	0,98	0,103
T-11-AB9.2	0,58	0,015
T-11-AB1.2	0,54	0,008
T-55-AB1.1	1,79	0,346
Q-7-AB2.1	0,43	0,191

Таблица 18. Клеточная цитотоксичность конъюгатов антитело-лекарственное средство (Calu-6)

КАЛС	DAR	Calu-6 (IC ₅₀ нМ)
T-21-AB2.1	1,12	0,111
T-17-AB2.1	0,56	0,143
T-21-AB6.1	1,12	0,801
T-55-AB9.1	0,98	0,589
T-1-AB1.1	1,20	>100
T-8-AB1.1	1,20	8,384
T-11-AB9.1	0,66	0,009
T-11-AB1.1	1,58	0,005
T-11-AB9.2	0,58	0,012

Таблица 19. Клеточная цитотоксичность конъюгатов антитело-лекарственное средство (JIMT-1)

КАЛС	DAR	JIMT-1 (IC ₅₀ нМ)
T-11-AB2.1	0,62	0,063
T-1-AB2.1	0,78	>100
T-47-AB2.1	1,43	0,1~1,0
T-6-AB2.1	1,08	0,079
T-71-AB2.1	0,90	0,001
T-2-AB2.1	1,36	0,009
T-30-AB2.1	0,39	>100
T-21-AB2.1	1,12	0,095
T-22-AB2.1	1,33	0,023
T-28-AB2.1	1,45	0,020
T-20-AB2.1	0,97	0,002
T-23-AB2.1	0,95	0,011

T-25-AB2.1	1,03	0,043
T-24-AB2.1	0,50	0,047
T-57-AB2.1	1,73	0,040
T-13-AB2.1	0,69	0,015
T-19-AB2.1	1,10	0,604
T-31-AB2.1	1,40	0,278
T-15-AB2.1	0,82	0,044
T-17-AB2.1	0,56	0,126
T-21-AB6.1	1,12	0,219

Таблица 20. Клеточная цитотоксичность конъюгатов антитело-лекарственное средство (NCI-H23)

КАЛС	DAR	NCI-H23 (IC ₅₀ нМ)
T-21-AB2.1	1,12	5,203
T-17-AB2.1	0,56	0,780
T-21-AB6.1	1,12	3,521
T-Int-102-D1-5 AB2.1	1,52	0,039
T-Int-113 AB2.1	1,40	0,020

Таблица 21. Клеточная цитотоксичность конъюгатов антитело-лекарственное средство (HCT-116)

КАЛС	DAR	HCT-116 (IC ₅₀ нМ)
T-11-AB2.1	0,62	0,052
T-1-AB2.1	0,78	>100
T-47-AB2.1	1,43	>100
T-6-AB2.1	1,08	0,557
T-2-AB2.1	1,36	0,014
T-30-AB2.1	0,39	>100
T-21-AB2.1	1,12	0,264
T-23-AB2.1	0,95	0,048
T-21-AB6.1	1,12	3,374
T-6-AB9.2	1,01	4,865
T-21-AB9.2	1,03	0,599
T-Int-102-D1-5 AB2.1	1,52	0,023
T-Int-113 AB2.1	1,40	0,012

Таблица 22. Клеточная цитотоксичность конъюгатов антитело-лекарственное средство (NCI-H460)

КАЛС	DAR	NCI-H460 (IC ₅₀ нМ)
T-11-AB2.1	0,62	0,268
T-21-AB2.1	1,12	0,2~2,0
T-23-AB2.1	0,95	0,157
T-17-AB2.1	0,56	0,513
T-21-AB6.1	1,12	2~20
T-6-AB9.2	1,01	1~10
T-Int-102-D1-5 AB2.1	1,52	0,103

T-Int-113 AB2.1	1,40	0,046
-----------------	------	-------

Таблица 23. Клеточная цитотоксичность конъюгатов антитело-лекарственное средство (NCI-N87)

КАЛС	DAR	NCI-N87 (IC ₅₀ нМ)
T-11-AB2.1	0,62	0,222
T-1-AB2.1	0,78	>100
T-47-AB2.1	1,43	>100
T-6-AB2.1	1,08	4,641
T-2-AB2.1	1,36	0,014
T-30-AB2.1	0,39	>100
T-8-AB1.1	1,20	0,567
T-11-AB9.1	0,66	0,760
T-11-AB9.2	0,58	0,116
T-Int-102-D3-2 AB2.1	0,26	0,045
Q-7-AB2.1	0,43	3,626

Таблица 24. Клеточная цитотоксичность очищенных конъюгатов антитело-лекарственное средство (IC₅₀, нМ)

КАЛС	JMТ-1	NCI-N87	HCT-116	NCI-H23	NCI-H460
T-47-AB2.1	0,315	-	-	-	0,612
T-6-AB2.1	-	-	0,313	7,896	10
T-71-AB2.1	0,019	-	-	0,46	0,014
T-2-AB2.1	0,012	0,098	0,004	-	-
T-21-AB2.1	0,034	0,494	0,200	3,727	0,120
T-28-AB2.1	0,011	0,660	0,143	0,142	0,178
T-20-AB2.1	0,011	-	-	0,018	0,039
T-23-AB2.1	0,011	-	-	0,025	0,055
T-57-AB2.1	0,142	-	>100	>100	>100
T-21-AB9.2	-	-	3,373	3,327	10
T-43-AB2.1	-	0,015	-	-	-
T-45-AB2.1	-	0,026	-	-	-
T-45RO-AB2.1	0,007	0,063	-	0,011	-
T-Int-102-D1-5 AB2.1	0,020	-	0,029	0,043	0,094
T-Int-113 AB2.1	-	-	0,020	0,010	0,042
T-Int-112 AB2.1	0,018	0,031	0,026	0,042	0,041
D-101	0,016	0,026	0,007	0,010	0,015

Таблица 25. Клеточная цитотоксичность конъюгатов антитело-лекарственное средство (CCRF-CEM)

КАЛС	DAR	CCRF-CEM (IC ₅₀ нМ)
T-101 AB2.1	2,0	2,837±0,115
T-102 AB2.1	2,0	32,35±0,520
T-103 AB2.1	2,0	1,759±0,381
T-104 AB2.1	2,0	11,42±1,978

T-105 AB2.1	2,0	4,563±0,707
T-106 AB2.1	2,0	45,05±3,124
T-107 AB2.1	2,0	7,610±0,512
T-108 AB2.1	2,0	197,2±41,11
T-109 AB2.1	2,0	8,932±1,144
T-110 AB2.1	2,0	76,31±10,95
T-111 AB2.1	2,0	62,09±0,430
T-201 AB2.1	2,0	5,848±0,520
T-207 AB2.1	2,0	3,726±0,072
T-208 AB2.1	2,0	3,356±0,057
T-209 AB2.1	2,0	3,497±0,101
T-210 AB2.1	2,0	24,45±2,639
T-211 AB2.1	2,0	3,688±0,065
T-212 AB2.1	2,0	1,200±0,239
T-213 AB2.1	2,0	3,457±0,030
T-214 AB2.1	2,0	333,4±80,82
T-215 AB2.1	2,0	1013±43,49

Таблица 26. Клеточная цитотоксичность конъюгатов антитело-лекарственное средство (Раджи)

КАЛС	DAR	Раджи (IC ₅₀ нМ)
T-101 AB2.1	2,0	8,540±1,188
T-103 AB2.1	2,0	2,670±0,317
T-104 AB2.1	2,0	10,94±1,837
T-105 AB2.1	2,0	3,075±0,605
T-106 AB2.1	2,0	211,1±34,95
T-107 AB2.1	2,0	5,467
T-108 AB2.1	2,0	500~1000
T-109 AB2.1	2,0	5,253±0,453
T-110 AB2.1	2,0	254,8
T-111 AB2.1	2,0	272,2±17,64
T-201 AB2.1	2,0	3,187±1,902
T-210 AB2.1	2,0	10,99±2,846
T-214 AB2.1	2,0	175,4
T-215 AB2.1	2,0	3018

Таблица 27. Клеточная цитотоксичность конъюгатов антитело-лекарственное средство (CHO-K1)

КАЛС	DAR	CHO-K1 (IC ₅₀ нМ)
T-101 AB2.1	2,0	34,1±7,37
T-102 AB2.1	2,0	150~500
T-103 AB2.1	2,0	9,47±0,61
T-104 AB2.1	2,0	100~500
T-207 AB2.1	2,0	14,49±0,11
T-208 AB2.1	2,0	8,935±0,683
T-209 AB2.1	2,0	12,09±0,176
T-210 AB2.1	2,0	51,36±1,08
T-211 AB2.1	2,0	15,72±0,29
T-212 AB2.1	2,0	6,293±0,566
T-213 AB2.1	2,0	16,95±0,685

Пример 10. Эффективность *in vivo*

T-20-AB2.1, T-23-AB2.1, T-Int-102-D1-5 AB2.1 и T-Int0112-AB2.1 были приготовлены с реакцией в масштабе 20 мг. После очистки на колонке НИС конечные образцы концентрировали до 5~10 мг/мл белка.

Эффективность T-20-AB2.1 и T-23-AB2.1 *in vivo* измеряли в исследованиях ксенотрансплантата опухоли у мышей. Самкам BALB/c nu/nu подкожно в правый бок вводили суспензии 5×10^6 клеток JMT-1 соответственно в ФСБ. Мыши были рандомизированы в группы исследования, когда опухоли достигли примерно 150 мм³. Конъюгаты T-DM1 (5 мг/кг) и T-20-AB2.1 и T-23-AB2.1 (0,3 мг/кг, QW X4) вводили внутривенно. Все лечебные группы состояли из 6-10 животных на группу, и размер опухоли контролировали два раза в неделю с помощью штангенциркуля. Массу опухоли рассчитывали, как объем=(ширина X ширина X длина)/2. Конъюгаты согласно данному изобретению приводили к регрессии опухоли в течение периода наблюдения, т.е. через 80 дней от начала эксперимента. Контрольный конъюгат T-DM1 был менее активен, чем конъюгаты по данному изобретению. Эти результаты показаны на Фиг. 10 и Фиг. 11. Модели NCT-116, NCI-H23 и NCI-H460 были усовершенствованы аналогичным методом для T-Int-102-D1-5 AB2.1 и T-Int-112-AB2.1.

Конъюгаты вызывали регрессию опухоли в течение 60-90 дней от начала эксперимента. Эти результаты показаны на Фиг. 12-17.

Эти эксперименты *in vivo* были проведены САСТ (центр передовых методов лечения онкологических заболеваний, Медицинский центр Асан, код проекта: H115C0972) и Biotoxtech

Пример 11. Получение моноклонального антитела к В7-Н3

Специфические антитела В7-Н3 были обнаружены библиотекой Ymax-ABL (Y-

Biologics Inc.) посредством трех последовательных процессов биопэннинга и дополнительной технологии созревания аффинности.

После скрининга около 140 попаданий антител scFv с различными последовательностями оснований, а также специфичных к В7-Н3, они были преобразованы в полную форму IgG человека и получены с использованием системы Ymax-tEXPRESS (Y-Biologics Inc.).

Специфические антитела В7-Н3 отбирали с помощью анализа последовательности ДНК и анализа характеристик *in vitro* и получали в форме тиомаба IgG (IgG_A1C) (таблицы 28, 29, 30 и 31).

Таблица 28: Список антител к В7-Н3, созданных с использованием технологии фаговой библиотеки полностью антител человека

ИН клона	SID	Название клона	Изотип	GERM VH	HOMOV H	GERM VL	HOMOV L
AB1	SA1319	CD276-033E03	IgG1 человека, Каппа-T2S	IGHV3- 23*04	95,9% (93/97)	IGLV2- 14*01	93,8% (91/97)
AB2	SA2107	CD276-040F10	IgG1 человека, Каппа-T2S	IGHV1- 3*01	85,4% (82/96)	IGKV1- 12*01	91,6% (87/95)
AB3	SA2103	CD276-039C05	IgG1 человека, Каппа-T2S	IGHV1- 69*04	99,0% (96/97)	IGKV1- 5*03	89,4% (84/94)
AB4	SA2545	CD276- 039C05_LS_001E10	IgG1 человека, Каппа-T2S	IGHV1- 69*04	99,0% (96/97)	IGKV1- 5*03	92,6% (88/95)
AB5	SA2563	CD276- 039C05_LS_002A11	IgG1 человека, Каппа-T2S	IGHV1- 69*04	99,0% (96/97)	IGKV1- 5*03	90,3% (84/93)
AB6	SA2566	CD276- 039C05_LS_002B07	IgG1 человека, Каппа-T2S	IGHV1- 69*04	99,0% (96/97)	IGKV1- 16*01	93,7% (89/95)
AB7	SA2571	CD276- 039C05_LS_002D03	IgG1 человека, Каппа-T2S	IGHV1- 69*04	99,0% (96/97)	IGKV1- 5*03	95,7% (90/94)
AB8	SA2579	CD276- 039C05_LS_002H07	IgG1 человека,	IGHV1- 69*04	99,0% (96/97)	IGKV1- 5*03	94,6% (88/93)

			Каппа-T2S				
--	--	--	-----------	--	--	--	--

Антитела, включающие последовательности CDR тяжелой и легкой цепи выбранных антител, и переменные области тяжелой цепи, и переменные области легкой цепи, включающие их, показаны в Таблицах 29 и 30.

Таблица 29: Последовательности CDR антител к B7-H3

ИИ клона	Название клона	CDR	Последовательность
AB1	CD276-033E03	CDRH1	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1)
		CDRH2	ISGSGGSR (SEQ ID NO: 2)
		CDRH3	ASHTIPGAWDV (SEQ ID NO: 3)
		CDRL1	TRDVGGYNY (SEQ ID NO: 4)
		CDRL2	DVN (SEQ ID NO: 5)
		CDRL3	SSYTTSSRRV (SEQ ID NO: 6)
AB2	CD276-040F10	CDRH1	GYTFSSYW (SEQ ID NO: 7)
		CDRH2	INPGNGHT (SEQ ID NO: 8)
		CDRH3	VADPRRPKVPTALFVY (SEQ ID NO: 9)
		CDRL1	QGIGTW (SEQ ID NO: 10)
		CDRL2	AAS (SEQ ID NO: 11)
		CDRL3	QQAINFPIT (SEQ ID NO: 12)
AB3	CD276-039C05	CDRH1	GGTFSSYA (SEQ ID NO: 13)
		CDRH2	IPILGIA (SEQ ID NO: 14)
		CDRH3	ANGGDSSSWYTFDY (SEQ ID NO: 15)
		CDRL1	QSIKRW (SEQ ID NO: 16)
		CDRL2	KAS (SEQ ID NO: 17)
		CDRL3	QQYNTFPLT (SEQ ID NO: 18)
AB4	CD276-039C05_LS_001E10	CDRH1	GGTFSSYA (SEQ ID NO: 19)
		CDRH2	IPILGIA (SEQ ID NO: 20)
		CDRH3	ANGGDSSSWYTFDY (SEQ ID NO: 21)
		CDRL1	QTINSW (SEQ ID NO: 22)
		CDRL2	KAS (SEQ ID NO: 23)
		CDRL3	QQYNSYSLT (SEQ ID NO: 24)
AB5	CD276-039C05_LS_002A11	CDRH1	GGTFSSYA (SEQ ID NO: 25)

		CDRH2	IIPILGIA (SEQ ID NO: 26)
		CDRH3	ANGGDSSSWYTFDY (SEQ ID NO: 27)
		CDRL1	QNINSW (SEQ ID NO: 28)
		CDRL2	KAS (SEQ ID NO: 29)
		CDRL3	QQYDSNPLT (SEQ ID NO: 30)
AB6	CD276- 039C05_LS_002B07	CDRH1	GGTFSSYA (SEQ ID NO: 31)
		CDRH2	IIPILGIA (SEQ ID NO: 32)
		CDRH3	ANGGDSSSWYTFDY (SEQ ID NO: 33)
		CDRL1	QGISSY (SEQ ID NO: 34)
		CDRL2	AAS (SEQ ID NO: 35)
		CDRL3	QQYYSFPLT (SEQ ID NO: 36)
AB7	CD276- 039C05_LS_002D03	CDRH1	GGTFSSYA (SEQ ID NO: 37)
		CDRH2	IIPILGIA (SEQ ID NO: 38)
		CDRH3	ANGGDSSSWYTFDY (SEQ ID NO: 39)
		CDRL1	ETISSW (SEQ ID NO: 40)
		CDRL2	KAS (SEQ ID NO: 41)
		CDRL3	QQYYSPIT (SEQ ID NO: 42)
AB8	CD276- 039C05_LS_002H07	CDRH1	GGTFSSYA (SEQ ID NO: 43)
		CDRH2	IIPILGIA (SEQ ID NO: 44)
		CDRH3	ANGGDSSSWYTFDY (SEQ ID NO: 45)
		CDRL1	QSIDNW (SEQ ID NO: 46)
		CDRL2	KAS (SEQ ID NO: 47)
		CDRL3	QQYDSNPLT (SEQ ID NO: 48)

Таблица 30: Вариабельные последовательности антител к B7-H3

ИН клона	Название клона	Вариабельная	Последовательность
AB1	CD276- 033E03	Тяжелая	QVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSVISGSGGSRYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCASHTIPGAWDVGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 49)

		Легкая	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTTRDVGGINVYVSWYQQHP GKAPKLMYDVNNRPSGVSYRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCSSYTTSSRRVFGTGTKVTVL (SEQ ID NO: 50)
AB2	CD276-040F10	Тяжелая	QVQLVESGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQ APGQRLEWMGEINPGNGHTNYNEKFKSRVTITVDKSASTAY MELSSLRSEDVAVYYCVADPRRPKVPTALFVYWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO: 51)
		Легкая	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTISCRASQGIGTWLAWYQQKPG KAPRLLIYAASSLDGVPSPRFSASGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQAINFPIFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 52)
AB3	CD276-039C05	Тяжелая	QVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDVAVYYCANGGSSSWYTFDYWGQGLITVSS (SEQ ID NO: 53)
		Легкая	DIQMTQSPSTLSASVGDKLTLTCRASQSISRWLAWYQQKPG KAPKLLIYKASYLQTGVPSRFSGSGTGTEFTLTISSLQPDFA TYYCQQYNTFPLTFAGGTKVEIK (SEQ ID NO: 54)
AB4	CD276-039C05_L S_001E10	Тяжелая	QVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDVAVYYCANGGSSSWYTFDYWGQGLITVSS (SEQ ID NO: 55)
		Легкая	DIQMTQSPSTLSASVGDRVNITCRASQTINSWLAWYQQKPG KAPKLLIYKASYLQTGVPSRFSGSGAGTEFTLTISSLQPDFA TYYCQQYNSYSLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 56)
AB5	CD276-039C05_L S_002A11	Тяжелая	QVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDVAVYYCANGGSSSWYTFDYWGQGLITVSS (SEQ ID NO: 57)
		Легкая	DIQMTQSPSTLSASVGDRLTITCRASQNINSWLAWYQQKPG KAPKLLIYKASYLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFA SYCQYDSNPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 58)
AB6	CD276-039C05_L S_002B07	Тяжелая	QVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDVAVYYCANGGSSSWYTFDYWGQGLITVSS

			(SEQ ID NO: 59)
		Легкая	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSYLAWYQQKPGK APKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYSFPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 60)
AB7	CD276- 039C05_L S_002D03	Тяжелая	QVQLVESGAEVKPKGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDVAVYYCANGGSSSWYTFDYWGQGLITVSS (SEQ ID NO: 61)
		Легкая	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASETISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDEFATY YCQQYYSPITFGQGRLEIK (SEQ ID NO: 62)
AB8	CD276- 039C05_L S_002H07	Тяжелая	QVQLVESGAEVKPKGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDVAVYYCANGGSSSWYTFDYWGQGLITVSS (SEQ ID NO: 63)
		Легкая	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSIDNWLAWYQQKPG KAPKLLIYKASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDEFAS YYCQQYDSNPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 64)

Способ: Биопэннинг с использованием библиотеки Ymax-ABL

Клетки E.coli инфицировали фаговой библиотекой scFv человека (Y-Biologics Inc.), имеющей разнообразие около 3×10^{10} , а затем культивировали при 30°C в течение 16 часов. После культивирования культуральный раствор центрифугировали, и полученный супернатант концентрировали с помощью ПЭГ, а затем растворяли в ФСБ буфере для получения фагового дисплея scFv человека. Фаги из библиотеки помещали в иммунологическую пробирку, покрытую белком B7-H3 человека (SinobiologyInc.biologyInc. или Y-BiologicsInc.), с последующей реакцией при комнатной температуре в течение 2 часов. После промывки 1 X ФСБ/Т и 1 X ФСБ элюировались только scFv-фаги, специфически связанные с антигеном.

Элюированные фаги снова инфицировали в клетки E. coli и амплифицировали (процесс пэннинга) для получения пула положительных фагов. Второй и третий процессы пэннинга проводили с использованием фагов, амплифицированных в первом процессе пэннинга, таким же образом, как описано, за исключением того, что только количество раз на этапе промывки PBST увеличивали до 25 раз. Количество фагов, связанных с антигеном (выход), увеличивалось во время третьего процесса пэннинга.

Полифаговый ELISA (иммуноферментный анализ) был проведен для исследования антигенной специфичности пула положительных поли scFv-фаговых антител, полученных соответственно в каждом раунде процесса пэннинга. Клеточный материал, замороженный

после первого-третьего процессов пэннинга, добавляли в среду, содержащую 5 мл 2 х УТСМ, 2% глюкозы и 5 мМ MgCl₂, до OD₆₀₀, равной 0,1, а затем культивировали при 37°C в течение 2-3 часов (OD₆₀₀=от 0,5 до 0,7). Клетки инфицировали фагами-хелперами М1 и культивировали в среде, содержащей 2×УТСМК, 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ IPTG, при 30 °С в течение 16 часов. Полученную культуру клеток центрифугировали (4500 об/мин, 15 мин, 4 °С) и переносили супернатант в новую пробирку (с первого по третий пэннированные поли-scFv-фаги). Антиген наносили с плотностью 100 нг/лунку на 96-луночные иммунопланшеты (NUNC 439454) с буфером для покрытия при 4°C в течение 16 часов, и каждую лунку блокировали с помощью 4% обезжиренного молока, растворенного в ФСБ. Каждую лунку промывали 0,2 мл ФСБ/Т и в каждую лунку добавляли по 100 мкл поли scFv-фага с первого по третий с последующей реакцией при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем каждую лунку промывали 4 раза 0,2 мл PBS/Т и вторичное антитело, анти-M13-HRP (Amersham 27-9421-01), разбавленное 4% обезжиренным молоком/ФСБ в соотношении 1:2000 (об./об.) добавляли в каждую лунку и реагировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывания ФСБ/Т раствор таблетки OPD (Sigma. 8787-TAB), растворенный в буфере РС, добавляли в лунки в концентрации 100 мкл/лунку для индуцирования развития окраски в течение 10 минут. Затем измеряли оптическую плотность при 490 нм с помощью спектрофотометра (Molecular Device). ELISA показал, что аффинность связывания с антигенами В7-Н3 была выше у третьих, панорамированных поли scFv-фагов.

Колонии, полученные из группы поликлональных фаговых антител (третий пэннинг) с высокой аффинностью связывания, культивировали в 1 мл 96-луночном планшете (Bioneer 90030) при 37°C в течение 16 часов. От 100 до 200 мкл выращенных таким образом клеток добавляли к среде, содержащей 2 х УТСМ, 2% глюкозы и 5 мМ MgCl₂, до OD₆₀₀, равной 0,1, и добавляли к среде, содержащей 1 мл 2 х УТСМ, 2% глюкозы и 5 мМ MgCl₂, а затем культивировали в 96-луночном планшете при 37°C в течение 2-3 часов до OD₆₀₀ от 0,5 до 0,7. Клетки инфицировали фагами-хелперами М1 при множественности заражения 1:20 и культивировали в среде, содержащей 2×УТСМК, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ IPTG, при 30 °С в течение 16 часов. Антиген В7-Н3 наносили с плотностью 100 нг/лунку на 96-луночный иммунопланшет при 4°C в течение 16 часов, и каждую лунку блокировали с помощью 4% обезжиренного молока, растворенного в ФСБ. Каждый моноклональный scFv-фаг (100 мкл scFv-фага), промытый 0,2 мл ФСБ/Т и культивированный в течение 16 часов, добавляли по 100 мкл в каждую лунку и реагировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем каждую лунку промывали 4 раза 0,2 мл PBS/Т, вторичное антитело, анти-M13-HRP, разбавляли 4% обезжиренным молоком/ФСБ до 1/2000 (об./об.) и приводили в контакт при комнатной температуре в течение 1 час. После промывки 0,2 мл ФСБ/Т проводили проявление окраски и измеряли оптическую плотность при 490 нм. Всего было получено несколько десятков однофаговых клонов для В7-Н3 в виде однофаговых клонов, обладающих высокой аффинностью связывания с каждым антигеном.

Способ: Отбор с помощью анализа последовательности ДНК

Отобранные отдельные клоны подвергали подготовке ДНК с использованием набора для очистки ДНК (Qiagen, Германия) для получения ДНК, а анализ последовательности ДНК проводили с помощью (Solgent). Области CDR VH и VL выбранных антител идентифицировали на основании результатов анализа последовательности, а сходство (идентичность) между этими антителами и группами антител зародышевой линии исследовали с помощью программы Ig BLAST (Nucleic Acids Res., **2013**, 41, W34-40). Были получены девять видов фаговых антител, специфичных к B7-H3, которые суммированы в таблицах 18, 19 и 20.

Способ: Конструирование и производство специфических антител B7-H3

ПЦР (iCycler iQ, BIO-RAD) проводили на тяжелых и легких цепях выбранных клонов антител. В результате были получены тяжелые и легкие цепи, а векторы (pNATVH и pNATVL) и две цепи были разрезаны (расщеплены) ферментами рестрикции. ДНК элюировали с помощью набора для выделения ДНК из геля (Qiagen). Лигирование проводили путем смешивания 1 мкл (10 нг) векторов, 15 мкл (100-200 нг) тяжелой или легкой цепи, 2 мкл 10-кратного буфера для лигирования, 1 мкл лигазы (1 ЕД/мкл) и дистиллированной воды, позволяя смеси стоять при комнатной температуре в течение 1-2 часов, вводя полученную смесь в компетентные клетки (XL1-синий), помещая клетки на лед на 5 минут и подвергая клетки тепловому шоку при 42°C в течение 90 секунд. После теплового шока к клеткам добавляли 1 мл среды, затем клетки выращивали при 37 °C в течение 1 часа, распределяли на планшете LB-Amp и инкубировали при 37 °C в течение 16 часов. Полученную колонию инокулировали в 5 мл среды LB-Amp, культивировали при 37 °C в течение 16 часов и подвергали ДНК-препарации с использованием набора ДНК-препарации (Nuclogen). Анализ последовательности полученных ДНК проводили с помощью (Solgent). Каждый тиомаб IgG из клонов антител seletect был сконструирован методом сайт-мутагенеза. Конвертированные конструкции цельного клона IgG, включающие тиомабы, соответствующие последовательностям фаговых антител выбранных клонов, подтверждали анализом последовательности (таблицы 21 и 22). Для трансфекции в клетки НЕК 293F тяжелые (pNATVH) и легкие цепи (pNATVL) соответствующих клонов, преобразованных в цельные IgG или тиомабные IgG, выращивали в 100 мл среды LB-Amp, а ДНК получали с использованием набора Midi-преп (QIAGEN).

Клонированные векторы pNATVH и pNATVL совместно трансфицировали в соотношении 6:4 в клетки НЕК293F, супернатант собирали на 7-й день, клетки и дебрис удаляли центрифугированием с верхним фильтром 0,22 мкм, супернатант собирали и подвергали аффинной хроматографии с белком А для очистки антитела IgG. В процессе очистки антитело отделяли с использованием глицинового буфера, и буфер заменяли таким образом, чтобы конечным буфером для ресуспендирования был ФСБ. Очищенные антитела количественно определяли с помощью ВСА и нанокапель, и каждое антитело загружали в гель в дозе 5 мкг в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и

анализировали с помощью SDS-PAGE для определения чистоты и подвижности очищенного белка. Все выбранные антитела были обнаружены с молекулярной массой 150 кДа или более в невосстанавливающих условиях, и SC0041 или SC0041.01 были получены в качестве контрольного антитела (таблицы 33 и 34).

Таблица 31: Последовательности тяжелых цепей тиомаба антител к B7-H3, полученные с использованием системы Ymax-tEXPRESS

ИН клона	SID	Название клона	Изо- тяжелая цепь	VH	CH
AB1.1	SA1319.01	CD276-033E03_IgG1_A1C	IgG1-A1C человека	QVQLVESGGGLVQSGG SLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWV SVISGSGGSRYYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAS HTIPGAWDVGQGTLV TVSS (SEQ ID NO: 65)	CSTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGFSF FLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)
AB1.2	SA1319.02	CD276-033E03_IgG1_S325C	IgG1-S325C человека	QVQLVESGGGLVQSGG SLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWV SVISGSGGSRYYADSV KGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYC ASHTIPGAWDVGQG	ASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPS SNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPCPAPELLGGPSVF

				TLVTVSS (SEQ ID NO: 67)	LFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLCLSPGK (SEQ ID NO: 68)
AB2.1	SA2107.01	CD276-040F10_IgG1_A1C	IgG1- A1C человека	QVQLVESGAEVKKPGA SVKLSCKASGYTFSSY WMHWVRQAPGQRLE WMGEINPGNGHTNYN EKFKSRVTITVDKSAST AYMELSSLRSEDNAVY YCVADPRRPKVPTALF VYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 69)	CSTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 70)
AB3.1	SA2103.	CD276-	IgG1-	QVQLVESGAEVKKPGS	CSTKGPSVFPLAPSSKSTS

	01	039C05 _IgG1_ A1C	A1C человека	SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEW MGRIIPILGIANYAQKF QGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSED TAVYYCAN GGDSSSWYTFDYWGQ GTLITVSS (SEQ ID NO: 71)	GGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGFSF FLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 72)
AB4.1	SA2545. 01	CD276- 039C05 _LS_00 1E10_Ig G1_A1 C	IgG1- A1C человека	QVQLVESGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEW MGRIIPILGIANYAQKF QGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSED TAVYYCAN GGDSSSWYTFDYWGQ GTLITVSS (SEQ ID NO: 73)	CSTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQ

					<p>PENNYKTTPVLDSGGSF FLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74)</p>
AB5.1	SA2563.01	CD276-039C05_LS_00_2A11_IgG1_A1C	IgG1- A1C человека	<p>QVQLVESGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEW MGRIIPILGIANYAQKF QGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSED TAVYYCAN GGDSSSWYTFDYWGQ GTLITVSS (SEQ ID NO: 75)</p>	<p>CSTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFIYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPVLDSGGSF FLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 76)</p>
AB6.1	SA2566.01	CD276-039C05_LS_00_2B07_IgG1_A1C	IgG1- A1C человека	<p>QVQLVESGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEW MGRIIPILGIANYAQKF QGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSED TAVYYCAN GGDSSSWYTFDYWGQ GTLITVSS (SEQ ID NO: 77)</p>	<p>CSTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD</p>

					GVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGSF FLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 78)
AB7.1	SA2571. 01	CD276- 039C05 _LS_00 2D03_Ig G1_A1 C	IgG1- A1C человека	QVQLVESGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEW MGRIPILGIANYAQKF QGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSED TAVYYCAN GGDSSSWYTFDYWGQ GTLITVSS (SEQ ID NO: 79)	CSTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGSF FLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 80)
AB8.1	SA2579. 01	CD276- 039C05 _LS_00	IgG1- A1C человека	QVQLVESGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEW	CSTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKVHTFPA

		2H07_Ig G1_A1 C	MGRIIPILGIANYAQKF QGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDVAVYYCAN GGDSSSWYTFDYWGQ GTLITVSS (SEQ ID NO: 81)	VLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKHTHC PPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFIYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)
--	--	-----------------------	---	--

Таблица 32: Последовательности легкой цепи тиомаба антител к B7-H3, полученные с использованием системы Ymax-tEXPRESS

ИН клона	SID	Назван ие клона	Изолегка я	VL	CL
AB1.1 AB1.2	SA1319 .01	CD276- 033E03 _IgG1_ A1C	Каппа человека -T2S	QSALTQPASVSGSPGQ SITISCTGTRDVGGY NYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVNNRPSGVS YRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSY TTSSRRVFGTGTKVTV L (SEQ ID NO: 83)	RSVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 84)
AB2.1	SA2107 .01	CD276- 040F10 _IgG1_ A1C	Каппа человека -T2S	DIQMTQSPSSVSASVG DRVTISCRASQGIGTW LAWYQQKPGKAPRL IYAASSLDSGVPSRFS ASGSGTDFTLTISSLQP	RSVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLS

				EDFATYYCQQAINFPI TFGQGTRLEIK ID NO: 85)	SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 86)
AB3.1	SA2103 .01	CD276- 039C05 _IgG1_ A1C	Каппа человека -T2S	DIQMTQSPSTLSASVG DKLTLTCRASQSISRW LAWYQQKPGKAPKLL IYKASYLQTGVPSRFS GSGTGTEFTLTISLQP DDFATYYCQQYNTFP LTFAGGTKVEIK (SEQ ID NO: 87)	RSVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 88)
AB4.1	SA2545 .01	CD276- 039C05 _LS_00 1E10_I gG1_A 1C	Каппа человека -T2S	DIQMTQSPSTLSASVG DRVNITCRASQTINSW LAWYQQKPGKAPKLL IYKASYLQTGVPSRFS GSGAGTEFTLTISLQP DDFATYYCQQYNSYS LTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 89)	RSVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
AB5.1	SA2563 .01	CD276- 039C05 _LS_00 2A11_I gG1_A 1C	Каппа человека -T2S	DIQMTQSPSTLSASVG DRLTITCRASQNINSW LAWYQQKPGKAPKLL IYKASYLQTGVPSRFS GSGSGTEFTLTITSLQP DDFASYCQQYDSNP LTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 91)	RSVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 92)
AB6.1	SA2566 .01	CD276- 039C05 _LS_00 2B07_I gG1_A 1C	Каппа человека -T2S	DIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQGISSYL AWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQYYSFPLT FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 94)	RSVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 94)

				NO: 93)	
AB7.1	SA2571 .01	CD276- 039C05 _LS_00 2D03_I gG1_A 1C	Каппа человека -T2S	DIQMTQSPSTLSASVG DRVTITCRASETISSWL AWYQQKPGKAPKLLI YKASSLQSGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPD DFATYYCQQYYSPIT FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 95)	RSVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 96)
AB8.1	SA2579 .01	CD276- 039C05 _LS_00 2H07_I gG1_A 1C	Каппа человека -T2S	DIQMTQSPSTLSASVG DRVTITCRASQSIDNW LAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQPD DDFASYCQQYDSNP LTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 97)	RSVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 98)

Таблица 33: Последовательности тяжелой цепи контрольного антитела к B7-H3

ИН клона	SID	Назван ие клона	Изотяже лый	VH	CH
AB9	SC0041	CD276- m8524	IgG1 человека	QVQLQQSGAEVKKPG SSVKVSKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLE WMGGIIPILGIANYAQ KFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDYAV YYCARGGSGSYHMD VWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO: 99)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTC

					LVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 100)
AB9.1	SC0041 .01	CD276- m8524_ IgG1_A 1C	IgG1- A1C человека	QVQLQQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLE WMGGIIPILGIANYAQ KFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDYAV YYCARGGSGSYHMD VWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO: 101)	CSTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 102)
AB9.2	SC0041 .02	CD276- m8524_ IgG1_S 325C	IgG1- S325C человека	QVQLQQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLE WMGGIIPILGIANYAQ KFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDYAV YYCARGGSGSYHMD VWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO: 103)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAL

					PAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDGFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLC LSPGK (SEQ ID NO: 104)
--	--	--	--	--	--

Таблица 34: Последовательности легкой цепи контрольного антитела к В7-Н3

ИН клона	SID	Назван ие клона	ИЗОЛЕГ КАЯ ЦЕПЬ	VL	CL
AB9	SC0041	CD276- m8524	Каппа человека -T2S	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLI YDASN RATGIPARFSG SSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQRSNWPP RITFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 105)	RSVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 106)
AB9.1 AB9.2	SC0041 .01	CD276- m8524_ IgG1_A 1C	Каппа человека -T2S	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLI YDASN RATGIPARFSG SSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQRSNWPP RITFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 107)	RSVAAPS VFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 108)

Таблица 35. Резюме антител к В7-Н3 и тиомабов

ИН клона	SID	Искусственный цистеин	Название клона
AB1	SA1319	-	CD276-033E03
AB1.1	SA1319.01	A1C	CD276-033E03_IgG1_A1C
AB1.2	SA1319.02	S325C	CD276-033E03_IgG1_S325C
AB2	SA2107	-	CD276-040F10

ИН клона	SID	Искусственный цистеин	Название клона
AB2.1	SA2107.01	A1C	CD276-040F10_IgG1_A1C
AB3	SA2103	-	CD276-039C05
AB3.1	SA2103.01	A1C	CD276-039C05_IgG1_A1C
AB4	SA2545	-	CD276-39C05-LS-001E10
AB4.1	SA2545.01	A1C	CD276-39C05-LS- 001E10_IgG1_A1C
AB5	SA2563	-	CD276-39C05-LS-002A11
AB5.1	SA2563.01	A1C	CD276-39C05-LS- 002A11_IgG1_A1C
AB6	SA2566	-	CD276-39C05-LS-002B07
AB6.1	SA2566.01	A1C	CD276-39C05-LS- 002B07_IgG1_A1C
AB7	SA2571	-	CD276-39C05-LS-002D03
AB7.1	SA2571.01	A1C	CD276-39C05-LS- 002D03_IgG1_A1C
AB8	SA2579	-	CD276-39C05-LS-002H07
AB8.1	SA2579.01	A1C	CD276-39C05-LS- 002H07_IgG1_A1C
AB9	SC0041	-	CD276-m8524
AB9.1	SC0041.01	A1C	CD276-m8524_IgG1_A1C
AB9.2	SC0041,02	S325C	CD276-m8524_IgG1_S325C

Пример 12: Аффинность связывания *in vitro* моноклонального антитела к В7-НЗ

Аффинность связывания очищенных моноклональных антител к В7-НЗ определяли с помощью ОСТЕТ на основе ВLI или Вiасоге на основе SPR. Кинетика связывания выбранных mAb к В7-НЗ с помощью ОСТЕТ показана в Таблице 36. Кроме того, кинетика связывания антител, связывающихся с антигеном В7-НЗ человека, яванского макака и мыши, показана в Таблице 37.

Таблица 36: Кинетика ОСТЕТ антител к В7-НЗ

ИН клона	SID	Название клона	K_D (M)	K_{on} (1/Mc)	K_{off} (1/c)
AB1	SA1319	CD276-033E03	2×10^{-9}	1×10^6	2×10^{-4}
AB2	SA2107	CD276-040F10	5×10^{-11}	7×10^5	4×10^{-5}
AB2.1	SA2107.0	CD276-040F10_IgG1_A1C	5×10^{-11}	5×10^5	2×10^{-5}

	1				
AB3	SA2103	CD276-039C05	4 X 10E-11	6 X 10E+5	3 X 10E-5
AB4	SA2545	CD276-39C05-LS-001E10	6 X 10E-11	1 X 10E+6	7 X 10E-5
AB5	SA2563	CD276-39C05_LS_002A11	1 X 10E-10	1 X 10E+6	2 X 10E-4
AB6	SA2566	CD276-39C05-LS-002B07	2 X 10E-10	3 X 10E+6	6 X 10E-4
AB7	SA2571	CD276-39C05_LS_002D03	3 X 10E-10	2 X 10E+6	5 X 10E-4
AB8	SA2579	CD276-39C05-LS-002H07	3 X 10E-10	9 X 10E+5	3 X 10E-4
AB9	SC0041	CD276-m8524	3 X 10E-10	5 X 10E+5	2 X 10E-4

Способ: Кинетика связывания ОСТЕТ

Прибор ForteBio Octet QKe использовали для измерения кинетики связывания В7-Н3 человека с антителами к В7-Н3. Система Octet QKe основана на BLI (биослойной интерферометрии), биосенсорной технологии без использования меток, которая измеряет молекулярные взаимодействия в режиме реального времени для целей кинетического анализа.

Биосенсоры АНС (анти-hIgG-захват) (ForteBio Inc., 18-5060) уравнивали в 1X Kinetic Buffer (ForteBio Inc.) в течение 10 минут, и В7-Н3 человека (Y-Biologics Inc.) готовили в виде двукратного серийного разведения (0,94 нМ ~ 30 нМ) в 1X кинетическом буфере. Лиганды антител В7-Н3 наносили на биосенсоры АНС в концентрации 10 мкг/мл до тех пор, пока не был достигнут оптический сдвиг 1,5 нанометра. После загрузки биосенсоры устанавливали на базовый уровень и связывали в определенных концентрациях с В7-Н3 человека в течение 10 минут, а затем диссоциировали в буфере в течение 10 минут. Весь эксперимент проводили при 30°C с 96-луночным черным плоскодонным полипропиленовым микропланшетом (Greiner Bio-One, номер по каталогу 655209), встряхивая со скоростью 1000 об/мин. Конечный объем всех растворов составлял 200 мкл на лунку.

Все измерения были скорректированы на дрейф базовой линии путем вычитания контрольного датчика, подвергавшегося воздействию только рабочего буфера. Тест на неспецифическое связывание проводили с использованием холостого сенсора для проверки наличия связывания антитела к В7-Н3 с сенсорной поверхностью.

Анализ данных и построение кривой проводили с использованием программного обеспечения для анализа данных Octet 9.0. Полученные данные были обработаны для определения наложенных подгонок и значений K_D , K_{on} и K_{off} . Эталонная лунка была вычтена из лунок с аналитом для артефактов буфера. Затем к данным также применялись выравнивание по оси Y, межшаговая коррекция и фильтрация Савицкого-Голея. Затем обработанным данным давали возможность соответствовать кривой ассоциации и диссоциации с использованием модели 1:1 с глобальной подгонкой. Кривые связывания с поправкой на исходный уровень анализировали с помощью GraphPad Prism 8.

Таблица 37: Кинетика Вiascore связывания антител к В7-Н3 с В7-Н3 человека,

яванского макака и мыши.

Иммобилизованный лиганд	Аналит	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)
SC0041	4IgB7-N3 человека	1,19E+06	6,17E-04	5,18E-10
	2IgB7-N3 человека	5,15E+05	1,07E-01	2,08E-07
	B7-N3 яванского макака	8,71E+05	2,42E-04	2,78E-10
SA2107	B7-N3 мыши	6,00E+05	2,94E-02	4,90E-08
	4IgB7-N3 человека	4,46E+05	1,99E-04	4,46E-10
	2IgB7-N3 человека	2,06E+05	5,15E-03	2,50E-08
	B7-N3 яванского макака	4,81E+05	4,42E-04	9,19E-10
SA2107.01	B7-N3 мыши	4,08E+05	1,93E-02	4,73E-08
	4IgB7-N3 человека	4,42E+05	4,70E-04	1,06E-09
	2IgB7-N3 человека	2,17E+05	4,69E-03	2,16E-08
	B7-N3 яванского макака	4,80E+05	5,04E-04	1,05E-09
	B7-N3 мыши	4,20E+05	1,78E-02	4,24E-08

Способ: Кинетика связывания Biacore

Прибор Biacore 8K (GE Life science) использовали для измерения кинетики связывания нескольких вариантов B7-N3 (аналит), связывающихся с различными mAb (лигандами). Антитела связывали с иммобилизованным антителом к Fc человека (GE Life science). Антитела к Fc были иммобилизованы до около 7000 RU на сенсорном чипе CM5 с использованием стандартного способа связывания с амином как на активной лунке, так и на контрольной лунке. Для кинетических измерений связывания HBS-EP+ использовали для рабочего буфера (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% полисорбата20). Антитела к B7-N3 разбавляли до 0,5 мкг/мл в рабочем буфере и инъецировали в течение 110 с только в активные лунки. После захвата лиганда различные антигены B7-N3 анализировали в течение 120 с и отслеживали диссоциацию в течение 600 с при скорости потока 30 мкл/мин. 3M раствор $MgCl_2$ вводили как в активную ячейку, так и в эталонную ячейку в течение 30 с при скорости 30 мкл/мин для регенерации. Для кинетического анализа над захваченным лигандом пролетали 5 точек 2-кратно разведенных аналитов в диапазоне от 20 нМ человеческого 4Ig B7-N3 (Y-Biologics Inc.), 320 нМ человеческого 2Ig B7-N3 (Acrobiosystems), 40 нМ яванского макака B7-N3 (Sinobiology Inc.) и 160 нМ мышинового B7-N3 (Sinobiology Inc.). Кинетическая информация была рассчитана путем подгонки данных к модели связывания 1:1 с использованием

программного обеспечения Biacore Insight Evaluation (GE Life Science) для определения k_a (константа ассоциации), k_d (константа диссоциации) и KD (константа равновесной диссоциации).

Включение в данный документ посредством ссылки

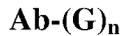
Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, настоящим полностью включены посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и отдельно указаны для включения посредством ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая любые приведенные в данном документе определения, будет иметь преимущественную силу.

Эквиваленты

Хотя обсуждались конкретные варианты реализации данного изобретения, приведенное выше описание является иллюстративным, а не ограничительным. Многие варианты реализации данного изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники после ознакомления с этим описанием и формулой изобретения, приведенной ниже. Полный объем данного изобретения должен быть определен ссылкой на пункты формулы изобретения вместе с их полным объемом эквивалентов и спецификацией вместе с такими вариантами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитела, представленный формулой I, или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват:



Формула I

где:

Ab представляет собой антитело к B7-H3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2) и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3); причем

CDRH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 7, 13, 19, 25, 31, 37 или 43;

CDRH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 8, 14, 20, 26, 32, 38 или 44;

CDRH3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 9, 15, 21, 27, 33, 39 или 45;

CDRL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40 или 46,

CDRL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41 или 47;

CDRL3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 или 48;

каждый G независимо представляет собой химическую группу, содержащую один или более активных агентов и линкер, причем линкер связывает Ab с активным(и) агентом(ами); и

n равно целому числу от 1 до 20.

2. Конъюгат антитела по п. 1, отличающийся тем, что Ab дополнительно содержит комбинацию варибельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 или 81, и варибельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95 или 97.

3. Конъюгат антитела по п. 1, отличающийся тем, что Ab дополнительно содержит комбинацию последовательности варибельной тяжелой цепи и последовательности варибельной легкой цепи, выбранной из:

(а) варибельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и варибельной легкой цепи, содержащей аминокислотную

(о) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93;

(р) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; и

(q) вариабельной тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и вариабельной легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97.

4. Конъюгат антитела по п. 1, отличающийся тем, что антитело к В7-Н3 представляет собой АВ1, АВ2, АВ3, АВ4, АВ5, АВ6, АВ7 или АВ8.

5. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что В7-Н3 представляет собой В7-Н3 человека.

6. Конъюгат антитела по п. 1, отличающийся тем, что Ab представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело (dAb), одноцепочечное антитело (scAb), Fab-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), scFv-Fc-фрагмент, однодоменное антитело с тяжелой цепью, однодоменное антитело с легкой цепью, вариант антитела или мультимерное антитело.

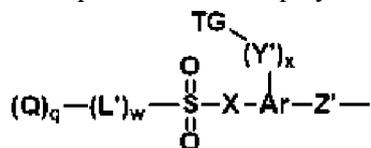
7. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что Ab представляет собой кроличье, мышинное, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

8. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что Ab представляет собой изотип IgG.

9. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что Ab представляет собой изотип IgG1.

10. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что связь между Ab и активным агентом является расщепляемой.

11. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что G представлен Формулой II:



(II),

где:

каждый Q независимо представляет собой активный агент, связанный с L' гетероатомом, предпочтительно O или N;

Z' представляет собой линкерную группу;

L' представляет собой спейсерный фрагмент, присоединенный к SO₂ через гетероатом, выбранный из O, S и N, предпочтительно O или N, и выбран таким образом,

что разрыв связи между L' и SO₂ способствует разрыву связи между L' и Q для высвобождения активного агента;

X представляет собой -O-, -C(R^b)₂- или -N(R^c)-, предпочтительно -O-;

Ar представляет собой кольцо, такое как арил, гетероарил, циклоалкил или гетероциклоалкил, предпочтительно арил или гетероарил;

Y' представляет собой -(CR^b)_yN(R^a)-, -(CR^b)_yO- или -(CR^b)_yS-, расположенные таким образом, что атом N, O или S присоединен к TG, если у равно 1;

X и Y' расположены на соседних атомах Ar;

TG представляет собой триггерную группу, которая при активации генерирует атом N, O или S, способный реагировать с SO₂ с замещением (Q)_q-(L')_w и образованием 5-6-членного кольца, включающего X-SO₂ и промежуточные атомы Ar;

q равен целому числу, имеющему значение от 1 до около 20, предпочтительно от 1 до около 10;

каждый из w, x и y независимо равен целому числу, имеющему значение 0 или 1;

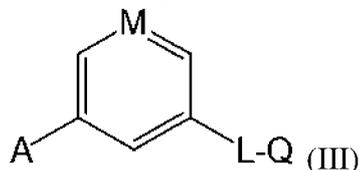
каждый R^a и R^c независимо представляет собой водород или низший алкил; и

каждый R^b независимо представляет собой водород или низший алкил; или

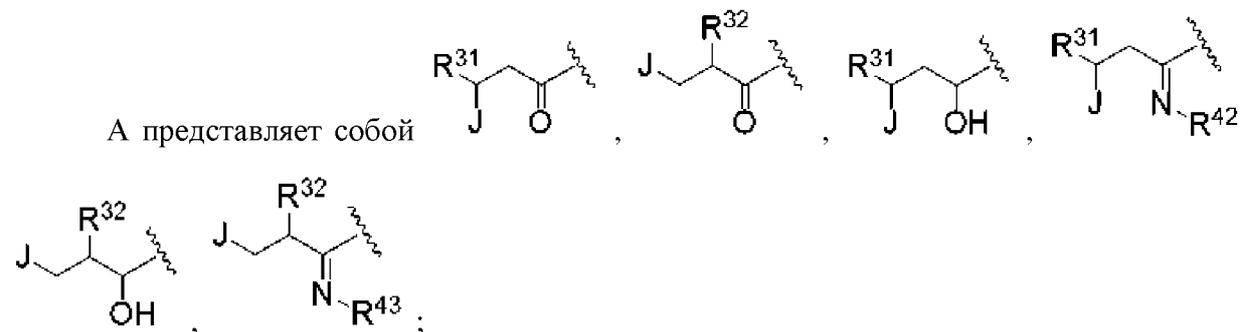
два R^b вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют 3-5-членное кольцо, предпочтительно 3-4-членное кольцо,

при условии, что если w равен 0, то q равен 1.

12. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что Ab-(G)_n представлен соединением формулы (III):



или его соли, где:



M представляет собой N, CR³⁰ или C(-L-Q);

каждый L независимо выбран из спейсерного фрагмента;

каждый Q представляет собой активный агент;

X выбран из -Cl, -Br и -I;

J представляет собой Ab;

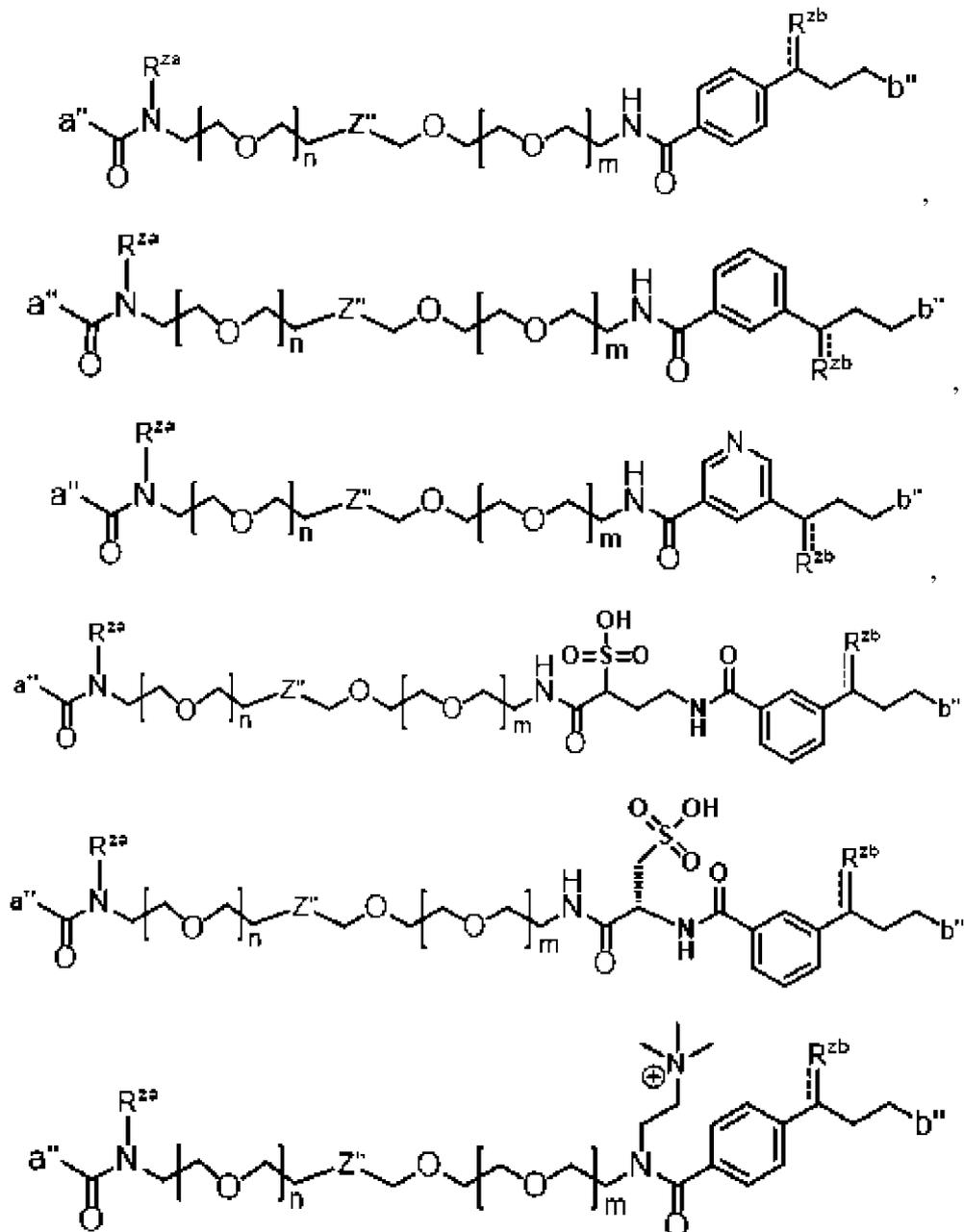
каждый из R³⁰ и R³¹ независимо выбран из электроноакцепторной группы,

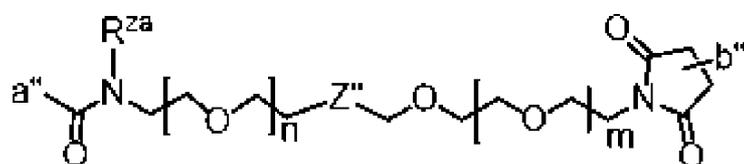
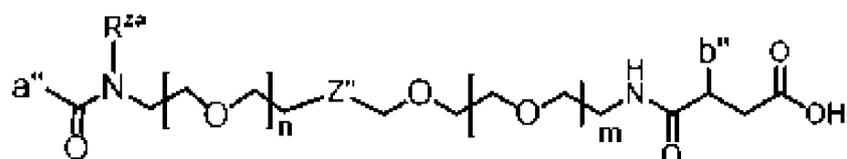
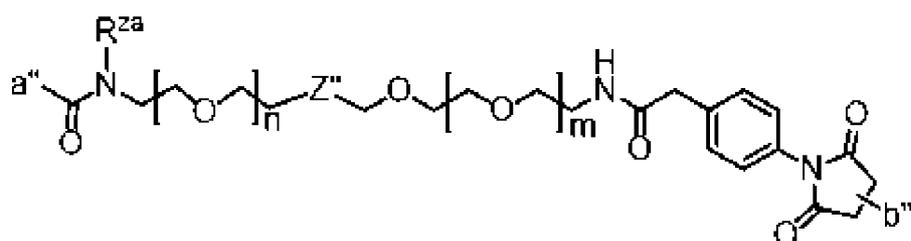
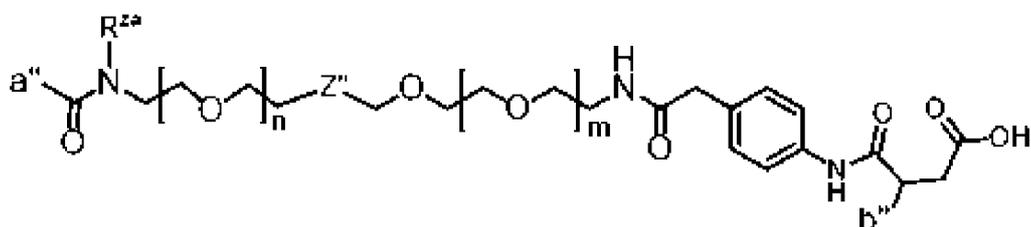
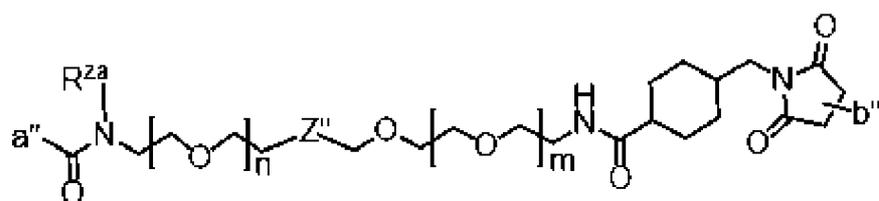
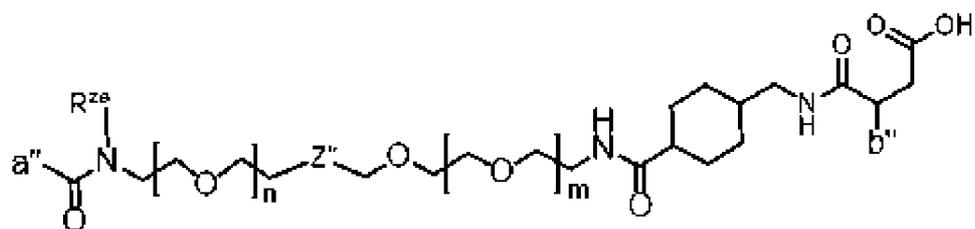
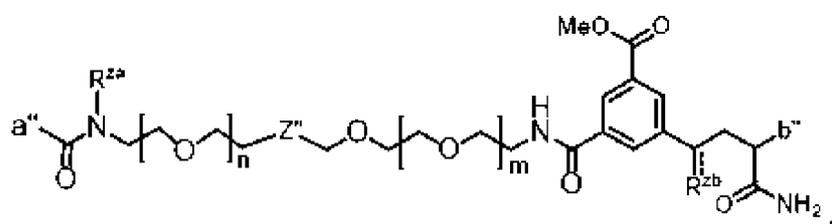
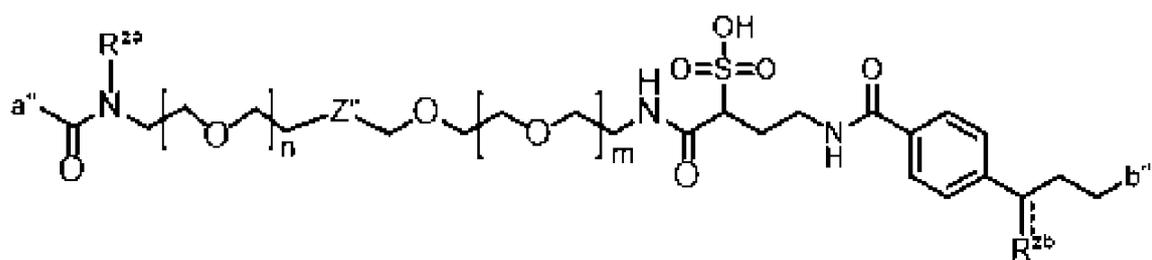
водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила;

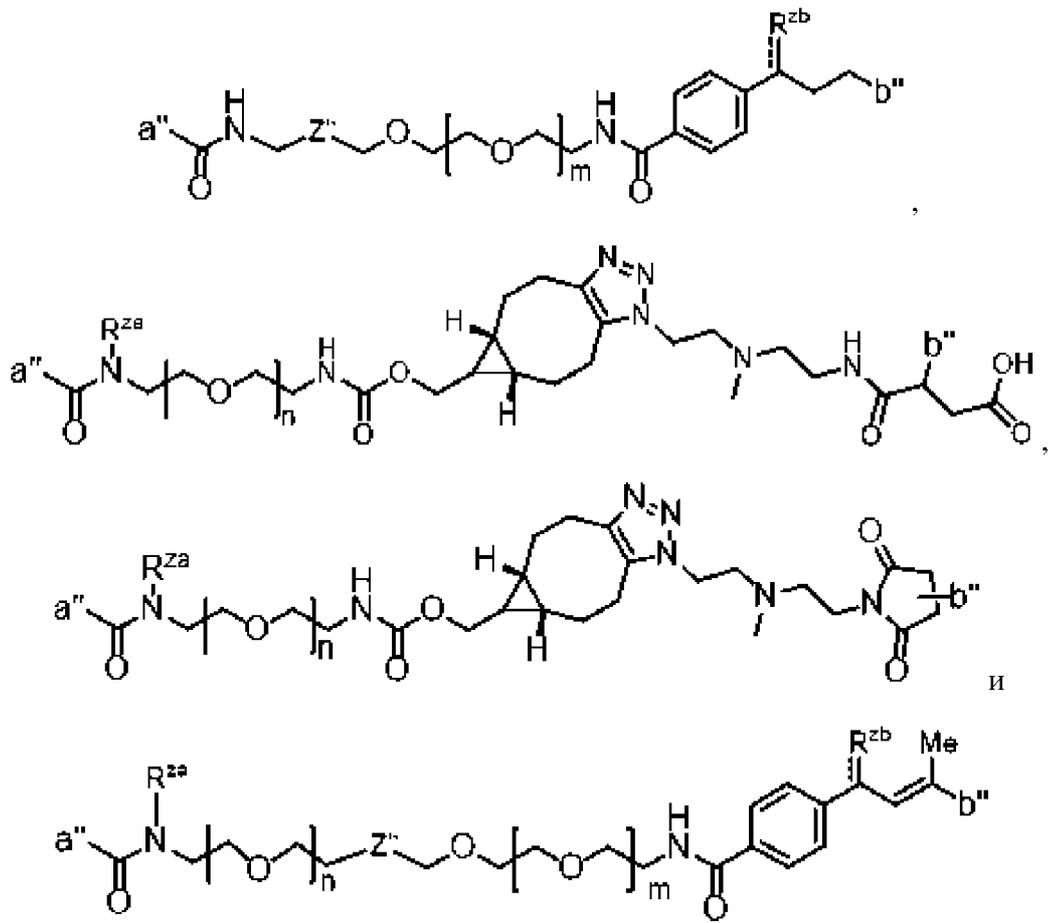
каждый из R^{42} и R^{43} независимо выбран из $-OH$, алкокси, $-NR^{44}R^{45}$, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила и гетероциклила, где R^{44} и R^{45} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, могут образовывать 5-8-членный цикл, необязательно конденсированный с арильным или гетероарильным кольцом;

каждый из R^{32} , R^{44} и R^{45} независимо выбран из водорода, алкила, алкенила, алкинила, арила, гетероарила, карбоциклила, гетероциклила и галогеналкила; и n равен от 1 до 4.

13. Конъюгат антитела по п. 11 или 12, где Z' выбран из







где

R^{za} представляет собой H или метил;

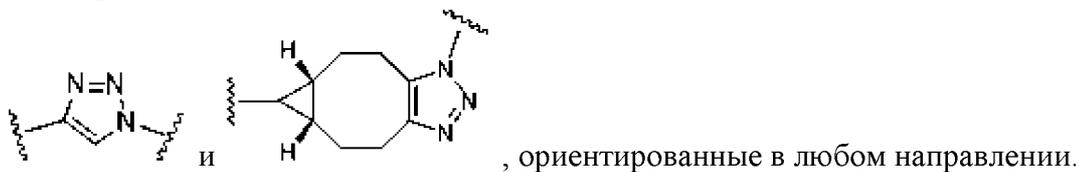
R^{zb} представляет собой $-OH$, $=O$ или $=NHOH$;

..... представляет собой одинарную связь или двойную связь;

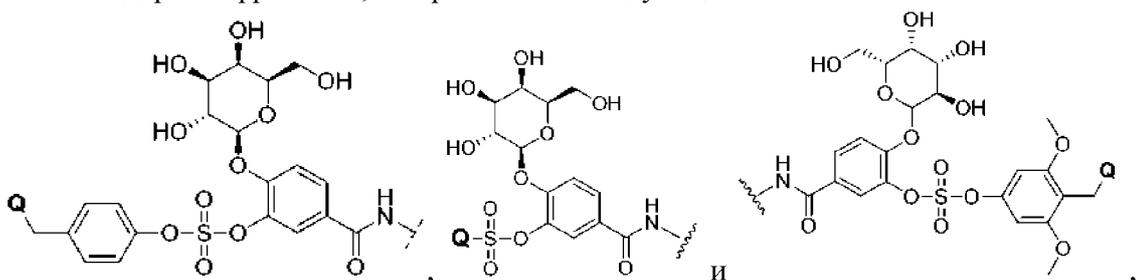
a'' представляет собой связь между Z' и Ag Формулы (II);

b'' представляет собой связь между Z' и Ab; и

Z' выбран из

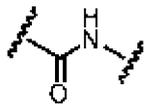


14. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что G содержит фрагмент, выбранный из следующего:



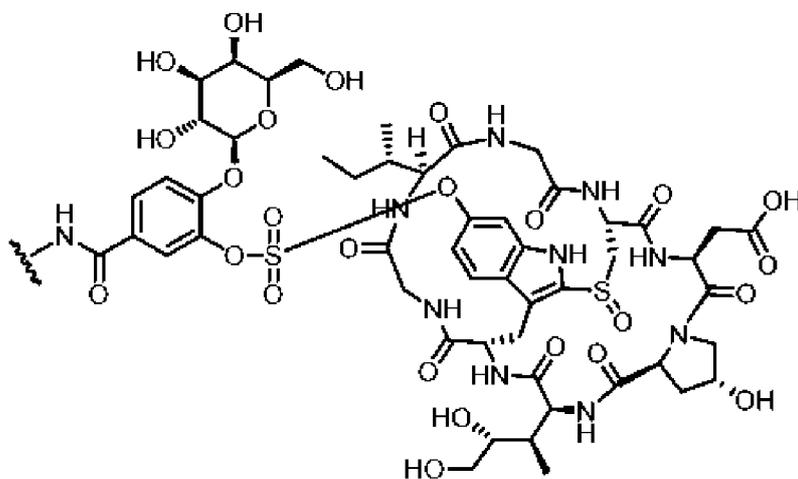
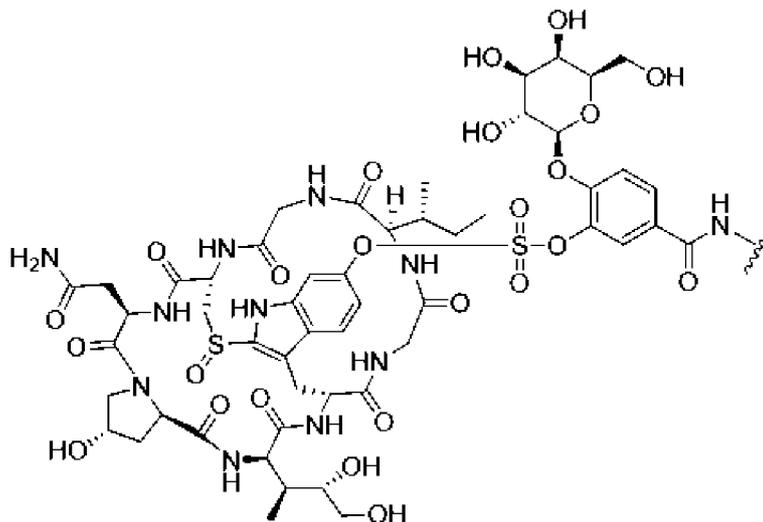
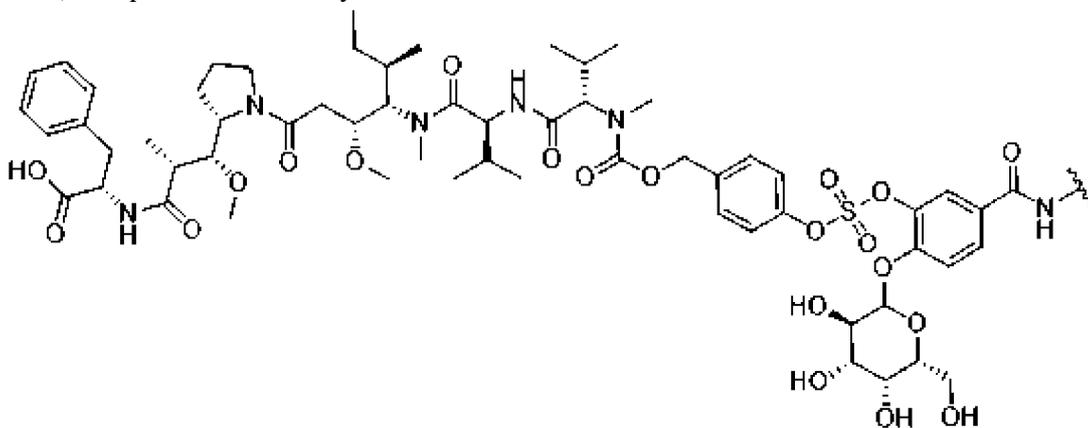
где

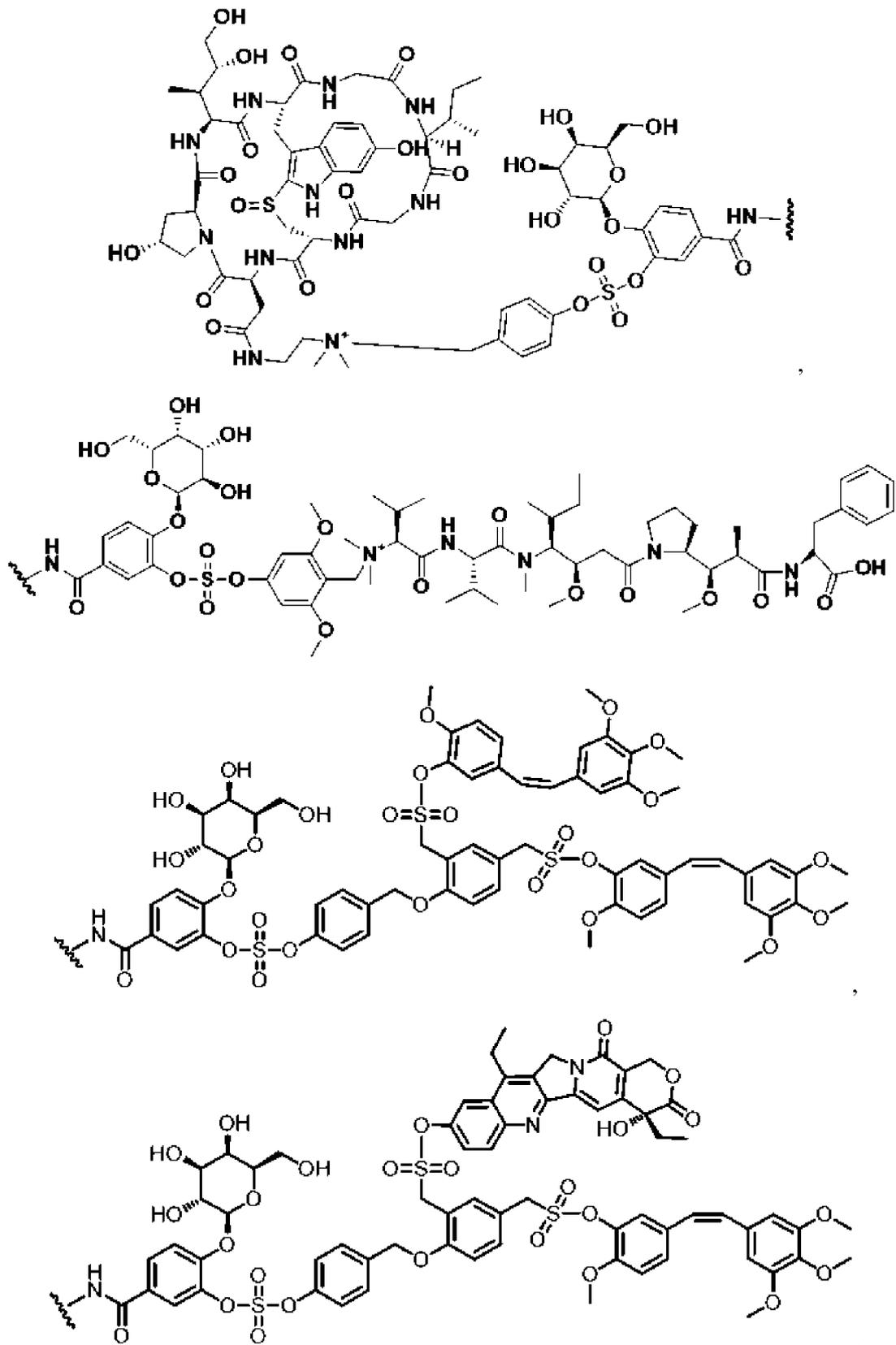
Q представляет собой активный агент, и

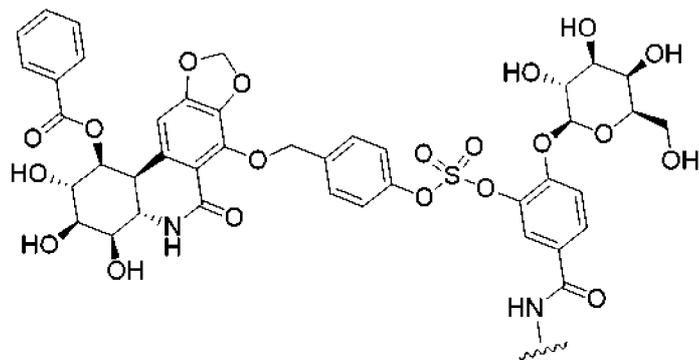
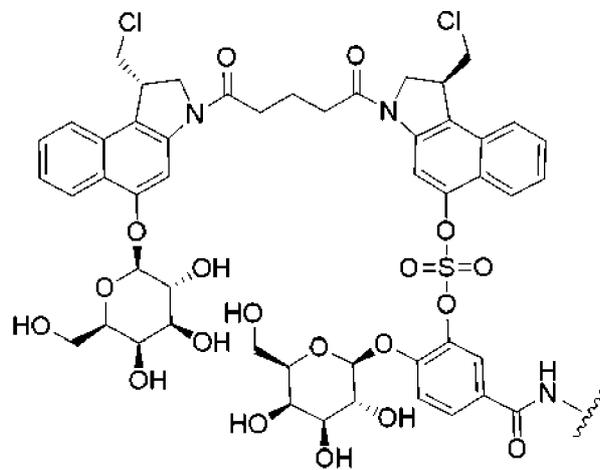
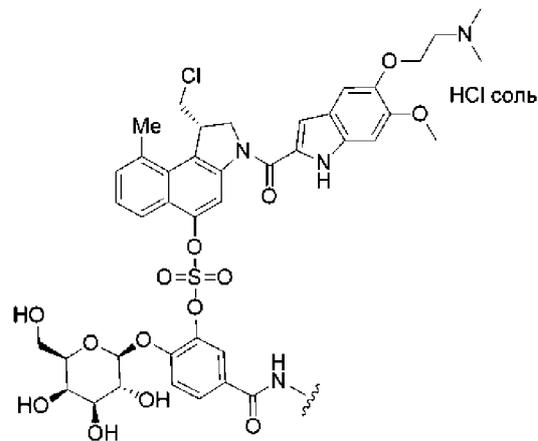
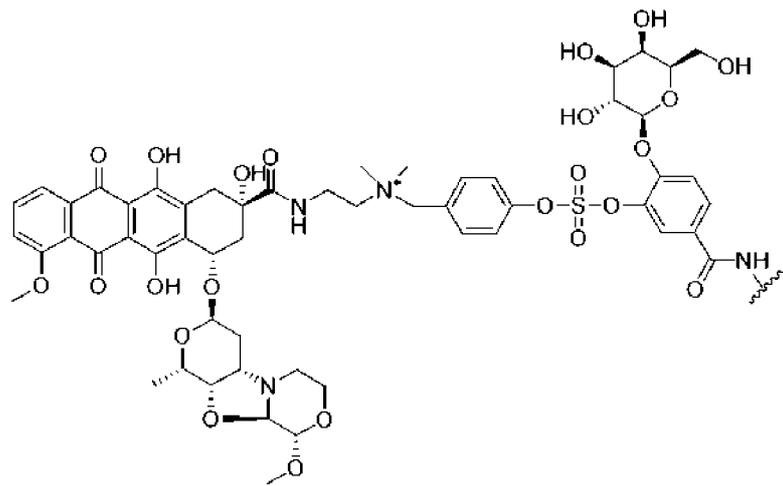


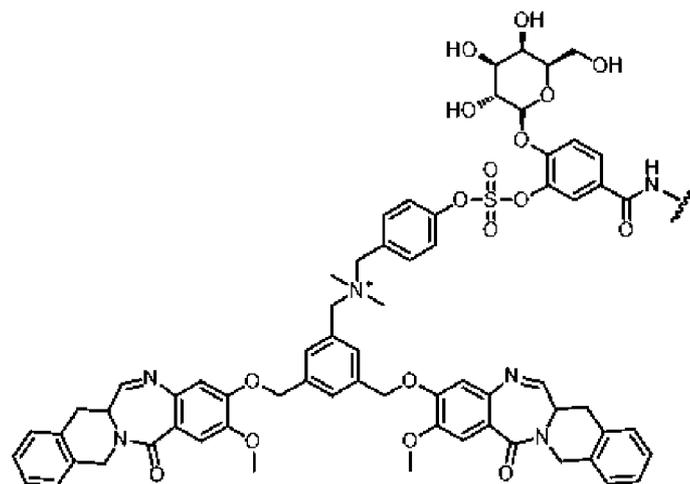
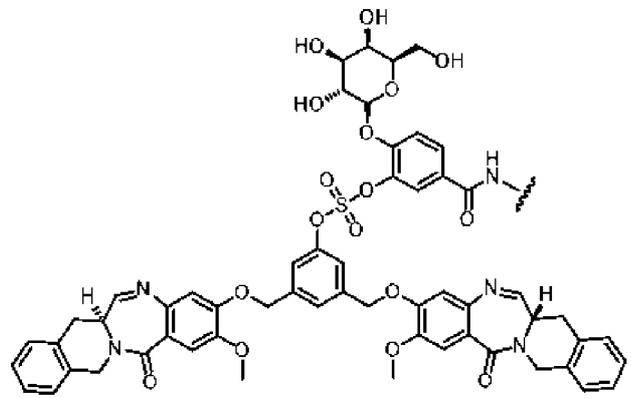
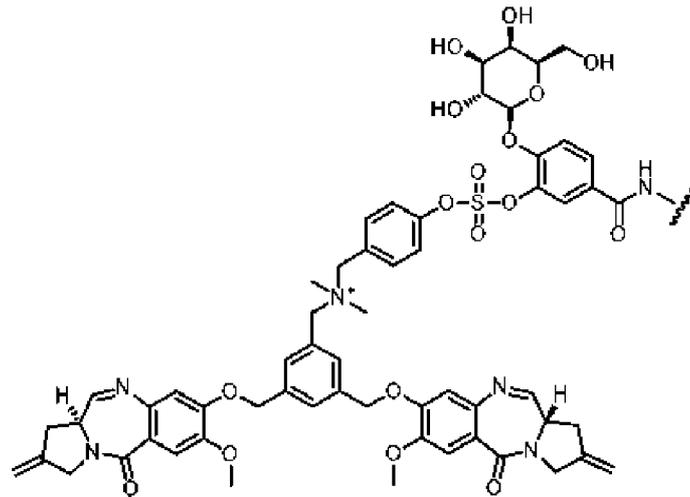
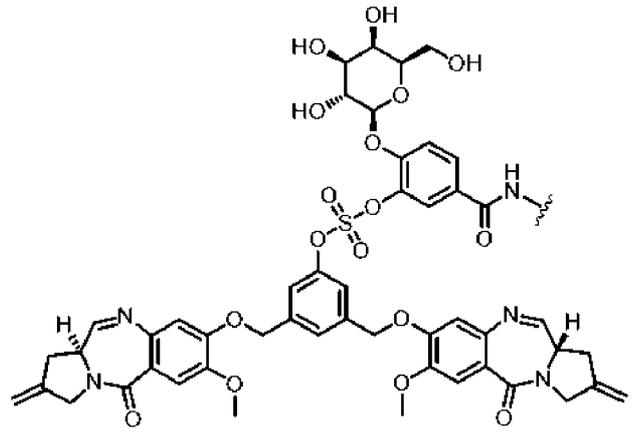
является фрагментом Z', соединяющим Z' с Ag.

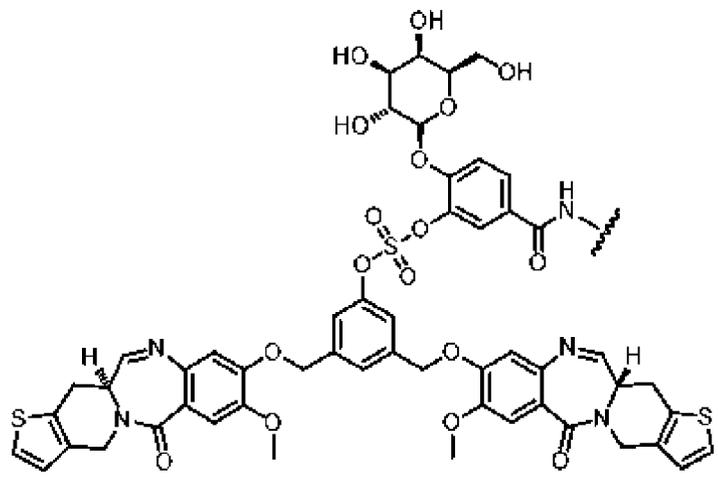
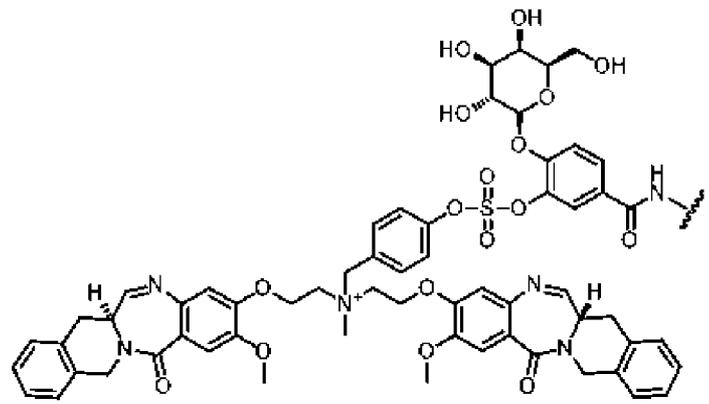
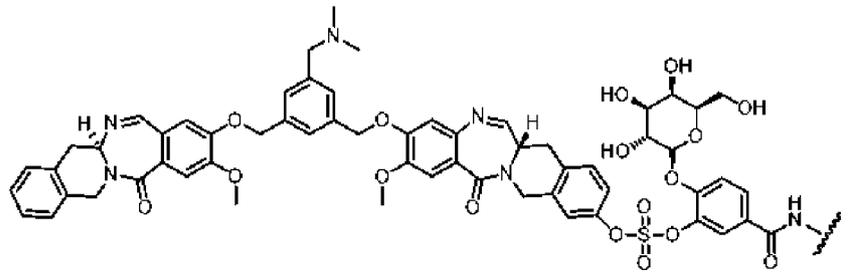
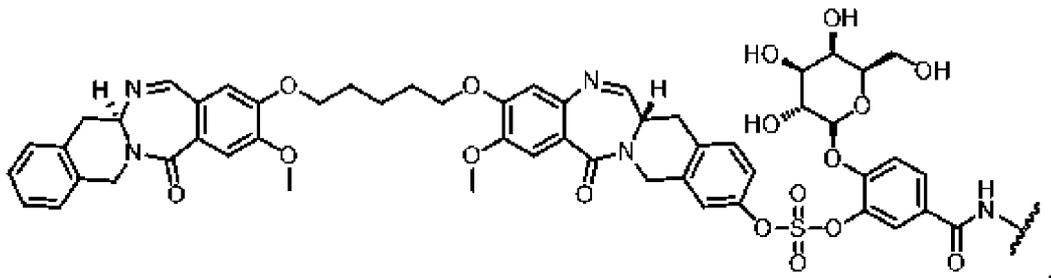
15. Конъюгат антитела по любому из пп. 11-14, отличающийся тем, что G содержит фрагмент, выбранный из следующего:

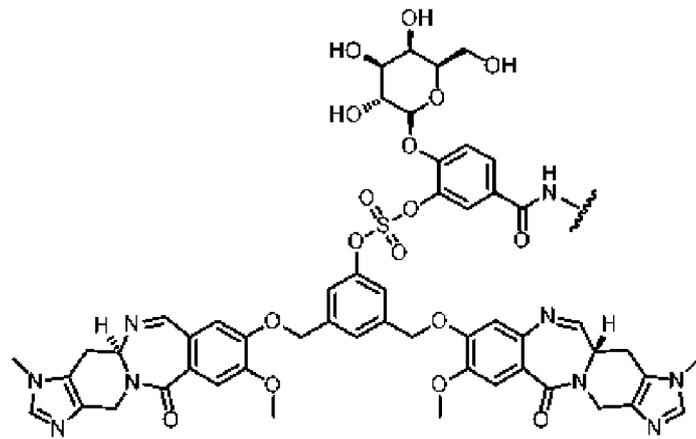
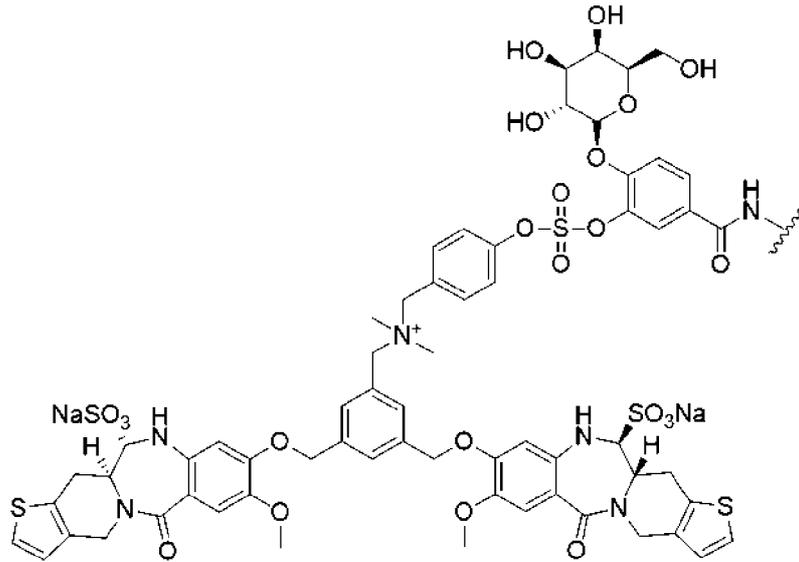
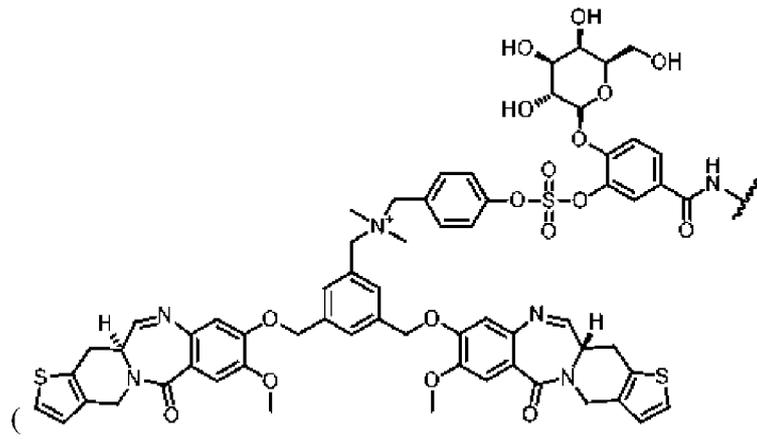


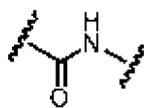
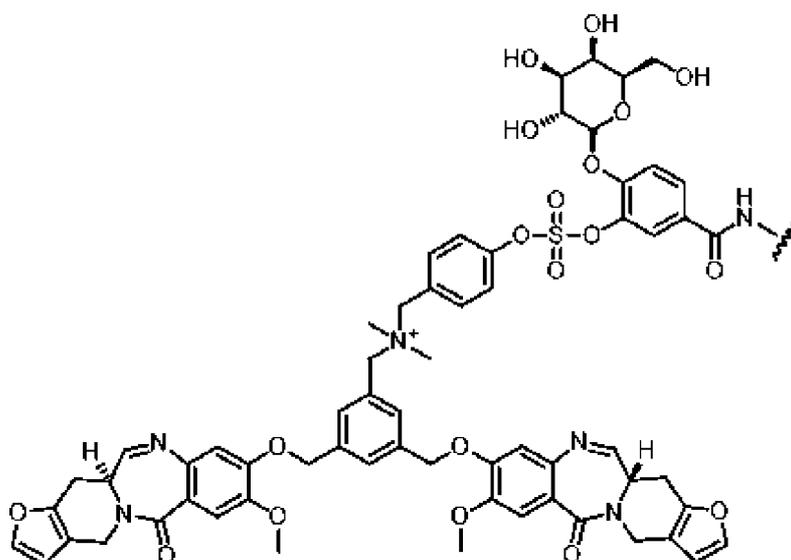
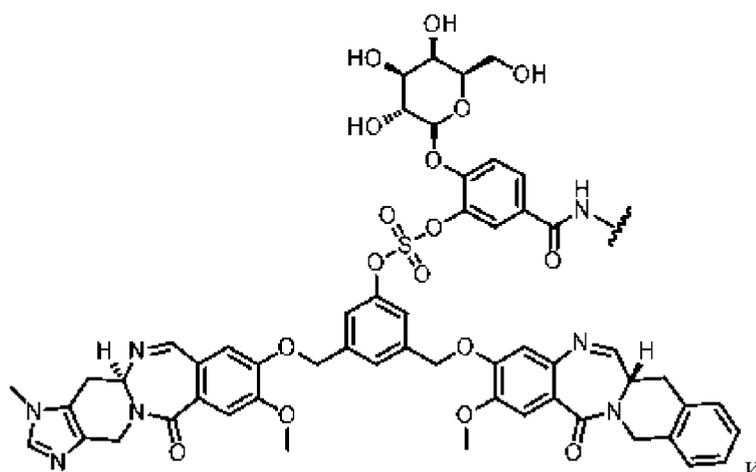


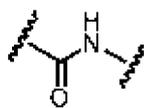










где  представляет собой фрагмент Z', соединяющий Z' с Ag.

16. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что активный агент выбран из химиотерапевтических агентов и токсинов.

17. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что активный агент представляет собой химиотерапевтическое средство.

18. Конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что активный агент представляет собой иммуномодулирующее соединение, противораковое средство, противовирусное средство, антибактериальное средство, противогрибковое средство, противопаразитарное средство или их комбинацию.

19. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что активный агент выбран из:

(а) эрлотиниба, бортезомиба, фулвестранта, сутента, летрозолола, мезилата иматиниба, РТК787/ЗК 222584, оксалиплатина, 5-фторурацила, лейковорина, рапамицина, лапатиниба, лонафарниба, сорафениба, гефитиниба, AG1478, AG1571, тиотепы, циклофосфамида, бусульфана, импросульфана, пипосульфана, бензодопы, карбоквона, метуредопы, уредопы, этиленимина, альтретамина, триэтиленмеламина,

триэтиленфосформид, триэтилентиофосфорамида, триметилломеламина, буллатацина, буллатацинона, камптотецина, топотекана, бриостатина, каллистатина, СС-1065, адозелезина, карзелезина, бизелезина, криптофицина 1, криптофицина 8, доластатина, дуокармицина, KW-2189, СВ1-ТМ1, элеутеробина, панкреатистатина, саркодиктиина, спонгистатина, хлорамбуцила, хлорнафазина, холофосфамида, эстрамустина, ифосфамида, мехлорэтамина, мелфалана, новембихина, фенестерина, преднимустина, трофосфамида, урацилового иприта, кармустина, хлорозотоцина, фоемустина, ломустина, нимустина, ранимнустина, калихимицина, калихимицина гамма 1, калихимицина омега 1, динемиицина, динемиицина А, клодроната, эсперамицина, неокарзинонстатина хромофора, аклациномицинов, актиномицина, антрмицина, азасерина, блеомицинов, кактиномицина, карабицина, карниномицина, карцинофиллина, хромомицинов, дактиномицина, даунорубицина, деторубуцина, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцина, доксорубицина, морфолино-доксорубицина, цианоморфолино-доксорубицина, 2-пирролино-доксорубицина, липосомального доксорубицина, дезоксидоксорубицина, эпирубицина, эзорубицина, марцелломицина, митомицина С, микофеноловой кислоты, ногаламицина, оливомицина, пепломицина, потфиروмицина, пуромицина, келомицина, родорубицина, стрептомигрин, стрептозоцина, туберцидина, убенимекса, зиностатина, зорубицина, 5-фторурацила, деноптерина, метотрексата, птероптерина, триметрексата, флударабина, 6-меркаптопурина, тиамиприна, тигуанина, анцитабина, азациитидина, 6-азауридина, кармофура, цитарабина, дидезоксиуридина, доксифлуридина, эноцитабина, флоксуридина, калустерона, дромостанолон пропионата, эпитиостанола, мепитиостана, тестолактона, аминоклутетимида, митогана, трилостана, фолиновой кислоты, ацеглатона, гликозида альдофосфамида, аминоклевулиновой кислоты, энилурацила, амсакрина, бестрабуцила, бисантрена, эдатраксата, дефофамина, демеколцина, диазиквона, элфорнитина, эллиптиниума ацетат, этоглюцида, нитрата галлия, гидроксимочевины, лентинана, лонидаинина, майтанцина, ансамитоцина, митогуазона, митоксантрона, мопиданмола, нитраэрина, пентостатина, фенамета, пирарубицина, лосоксантрона, 2-этилгидразида, прокарбазина, полисахарида-к, разоксана, ризоксина, сизофирана, спирогермания, тенуазоновой кислоты, триазиквона, 2,2',2''-трихлортриэтиламина, токсина Т-2, верракурина А, роридина А и ангицина, уретана, виндезина, дакарбазина, манномустина, митобронитола, митолактола, пипобромана, гацитозина, арабинозида, циклофосфамида, тиотепы, паклитаксела, наночастиц паклитаксела, созданных с помощью альбумина, доксетаксела, хлорамбуцила, гемцитабина, 6-тиогуанина, меркаптопурина, цисплатина, карбоплатина, винбластина, платины, этопозиды, ифосфамида, митоксантрона, винкристина, винорелбина, новантрона, тенипозиды, эдатрексата, дауномицина, аминоклутетерина, кселоды, ибандроната, СРТ-11, ингибитора топоизомеразы RFS 2000, дифторметилорнитина, ретиноевой кислоты, капецитабина или фармацевтически приемлемых солей, сольватов или кислот любого из вышеперечисленных;

(b) монокина, лимфокина, традиционного полипептидного гормона, паратгормона,

тироксина, релаксина, прорелаксина, гликопротеинового гормона, фолликулостимулирующего гормона, тиреотропного гормона, лютеинизирующего гормона, фактора роста печени, фактор роста фибробластов, пролактина, плацентарного лактогена, фактора некроза опухоли- α , фактора некроза опухоли- β , мюллериан-ингибирующего вещества, гонадотропин-ассоциированного пептида мыши, ингибина, активина, фактора роста эндотелия сосудов, тромбopoэтина, эритропоэтина, остеоиндуктивного фактора, интерферона, интерферона- α , интерферона- β , интерферона- γ , колониестимулирующего фактора («КСФ»), макрофагального-КСФ, гранулоцитарно-макрофагального-КСФ, гранулоцитарного-КСФ, интерлейкина («IL»), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, фактора некроза опухоли, ФНО- α , ФНО- β , полипептидного фактора, LIF, набора лиганда или комбинации любого из вышеперечисленного;

(с) дифтерийного токсина, ботулотоксина, столбнячного токсина, дизентерийного токсина, холерного токсина, аманитина, производных аманитина, α -аманитина, пирролобензодиазепина, производных пирролобензодиазепина, тетродотоксина, бреветоксина, цигуатоксина, рицина, АМ-токсина, ауристати́на, тубулизина, гелданамицина, майтанданамицина, калихеамицина, дауномицина, доксорубицина, метотрексата, производных экзатекана, виндезина, SG2285, доластатина, аналогов доластатина, криптофицина, камптотецина, производных и метаболитов камптотецина, ризоксина, производных ризоксина, CC-1065, аналогов или производных CC-1065, дуокармицина, энедиинового антибиотика, эсперамицина, эпотилона, азонатида, аплидина, анатоксина или комбинации любого из вышеперечисленного;

(d) аффинного лиганда, причем аффинный лиганд представляет собой субстрат, ингибитор, стимулирующий агент, нейротрансмиттер, радиоизотоп или комбинацию любого из вышеперечисленного;

(e) радиоактивной метки, ^{32}P , ^{35}S , флуоресцентного красителя, электронно-плотного реагента, фермента, биотина, стрептавидина, диоксигенина, гаптена, иммуногенного белка, молекулы нуклеиновой кислоты с последовательностью, комплементарной мишени, или комбинации любого из вышеперечисленного;

(f) иммуномодулирующего соединения, противоракового средства, противовирусного средства, антибактериального средства, противогрибкового средства и противопаразитарного средства или комбинации любого из вышеперечисленного;

(g) тамоксифена, ралоксифена, дролоксифена, 4-гидрокситамоксифена, триоксифена, кеоксифена, LY117018, онапристона или торемифена;

(h) 4(5)-имидазолов, аминоклоротетимида, мегестрола ацетата, экземестана, летрозолола или анастрозолола;

(i) флутамида, нилутамида, бикалутамида, лейпролида, гозерелина или троксацитабина;

(j) ингибитора ароматазы;

(k) ингибитора протеинкиназы;

- (l) ингибитора липидкиназы;
- (m) антисмыслового олигонуклеотида;
- (n) рибозима;
- (o) вакцины; и
- (p) антиангиогенного агента.

20. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что активный агент выбран из соединений, перечисленных в Таблицах 3-5, ауристати́на F, PNU, α -аманитина, Q- α -аманитина, β -аманитина, индола CBI, димера CBI, (CA4-CA4), (CA4-SN38), фенпанстати́на, эксатекана, dPBD, Q-dPBD, dTBD, Q-dTBD, adTBD, adTBD DMBA, алкиламина dTBD, dThBD, dThBD, Q-dThBD NaSO₃, dImBD, Q-dFuBD и ImBD-TBD.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитела по любому из предшествующих пунктов.

22. Фармацевтическая композиция по п. 21, дополнительно содержащая терапевтически эффективное количество химиотерапевтического агента.

23. Способ лечения онкологического заболевания, включающий введение конъюгата антитела по любому из пп. 1-20 или фармацевтической композиции по п. 21 или 22 субъекту, нуждающемуся в этом.

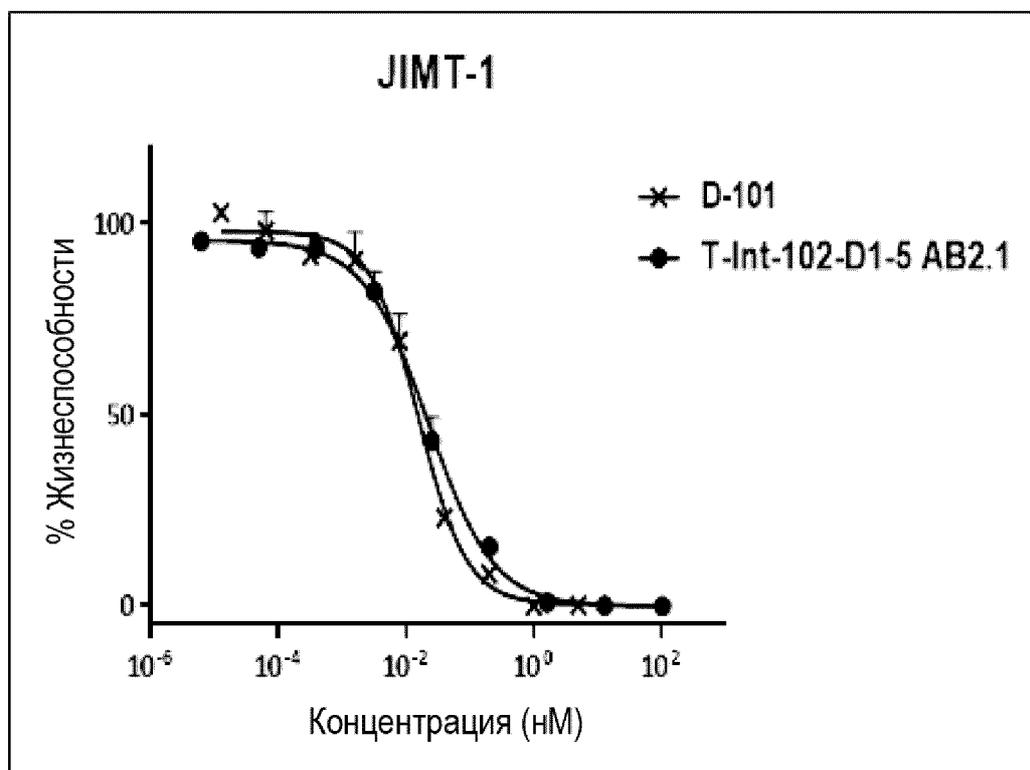
24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что онкологическое заболевание выбрано из лейкоза, лимфомы, онкологического заболевания молочной железы, онкологического заболевания толстой кишки, онкологического заболевания яичников, онкологического заболевания мочевого пузыря, онкологического заболевания предстательной железы, глиомы, онкологического заболевания легких, онкологического заболевания бронхов, колоректального онкологического заболевания, онкологического заболевания поджелудочной железы, онкологического заболевания пищевода, онкологического заболевания печени, онкологического заболевания мочевого пузыря, онкологического заболевания почки, онкологического заболевания почечной лоханки, онкологического заболевания полости рта, онкологического заболевания глотки, онкологического заболевания тела матки и меланомы.

25. Способ лечения аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания, включающий введение конъюгата антитела по любому из пп. 1-20 или фармацевтической композиции по п. 21 или 22 субъекту, нуждающемуся в этом.

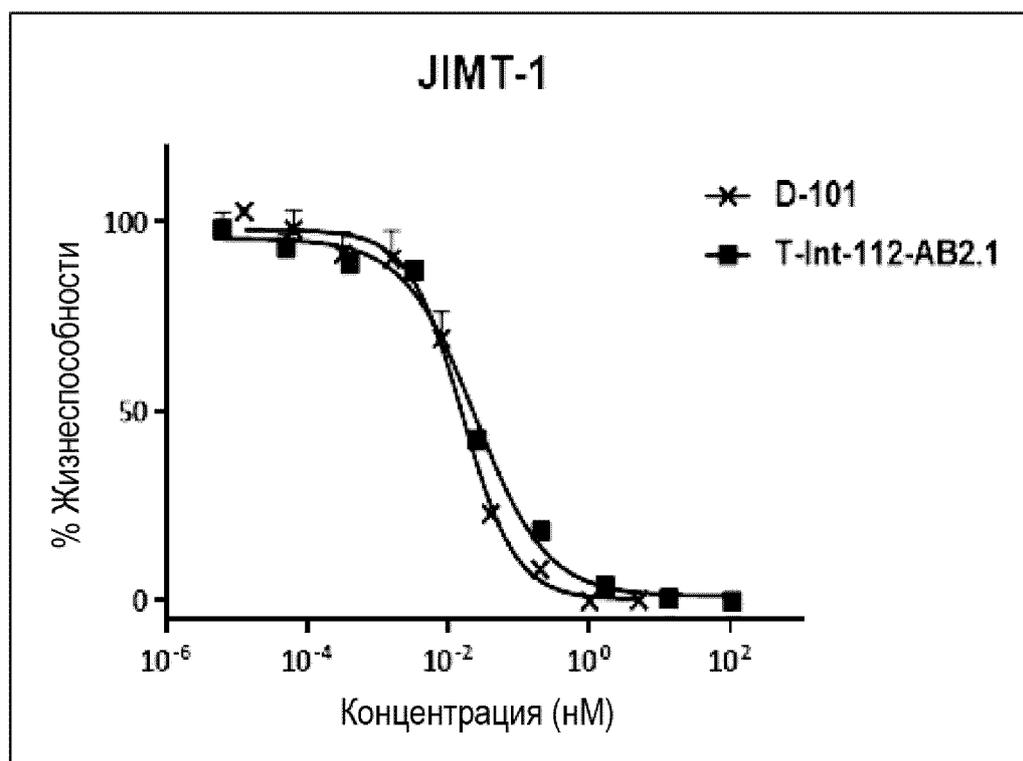
26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что аутоиммунные заболевания или воспалительное заболевание выбраны из аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, опосредованных В-клетками, например, системной красной волчанки (СКВ), ревматоидного артрита (РА), идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), гипергаммаглобулинемии Вальденстрема, синдрома Шегрена, рассеянного склероза (РС) или волчаночного нефрита.

По доверенности

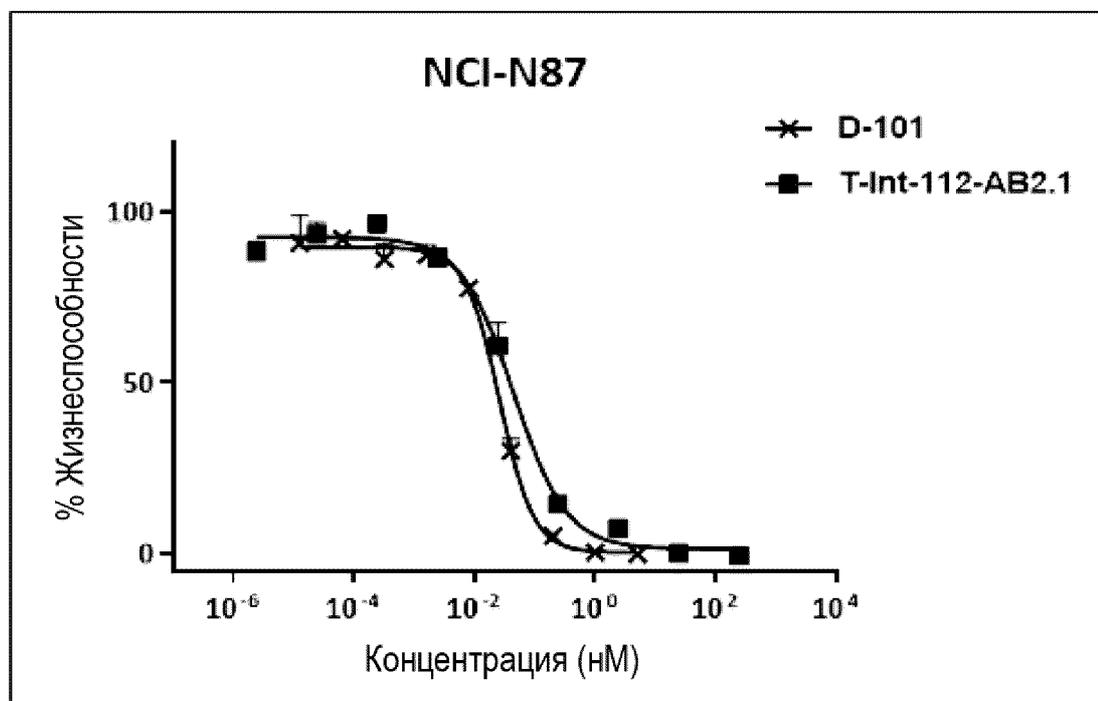
Фиг. 1



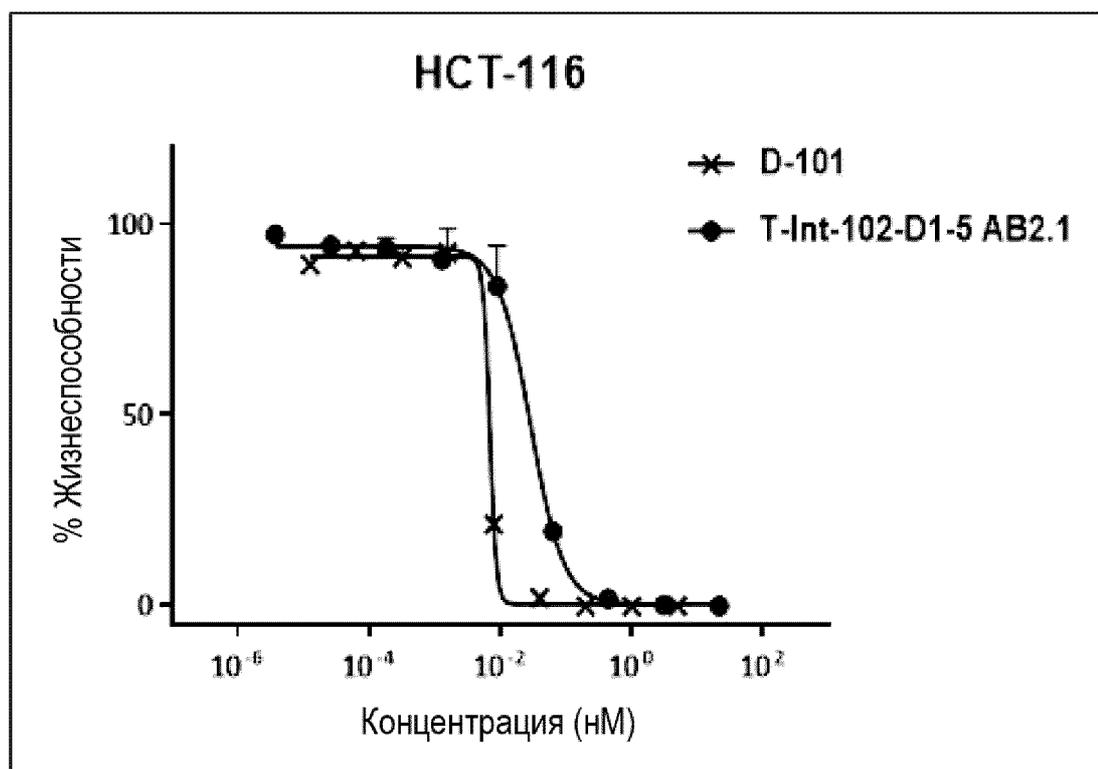
Фиг. 2



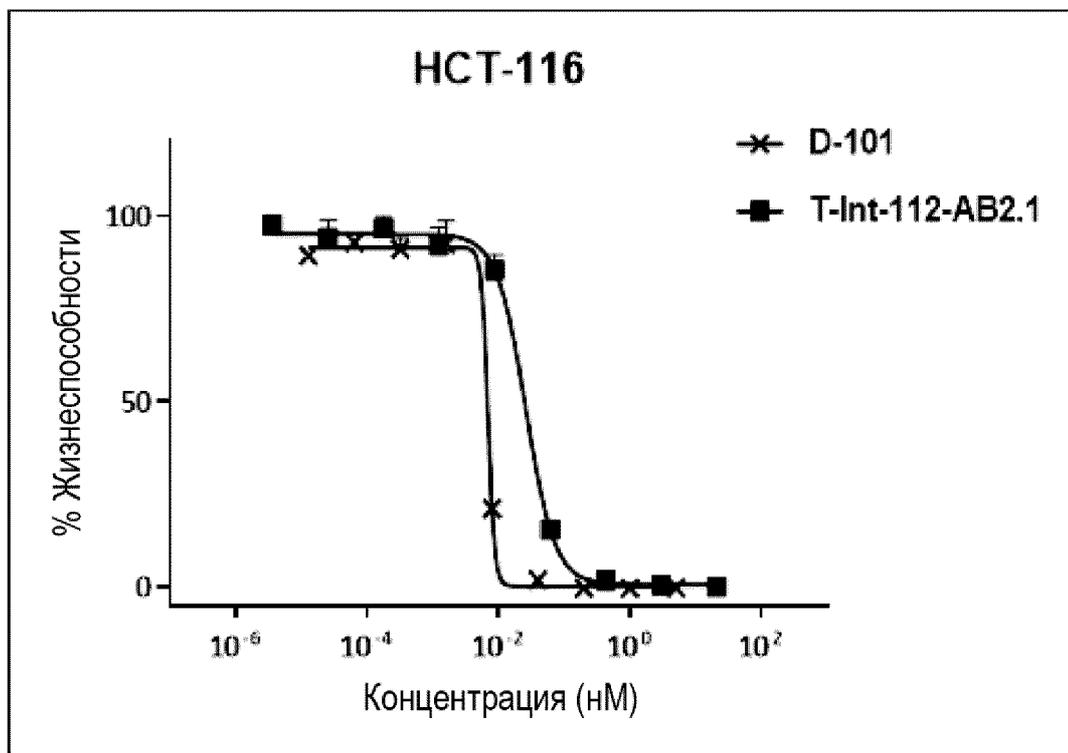
Фиг. 3



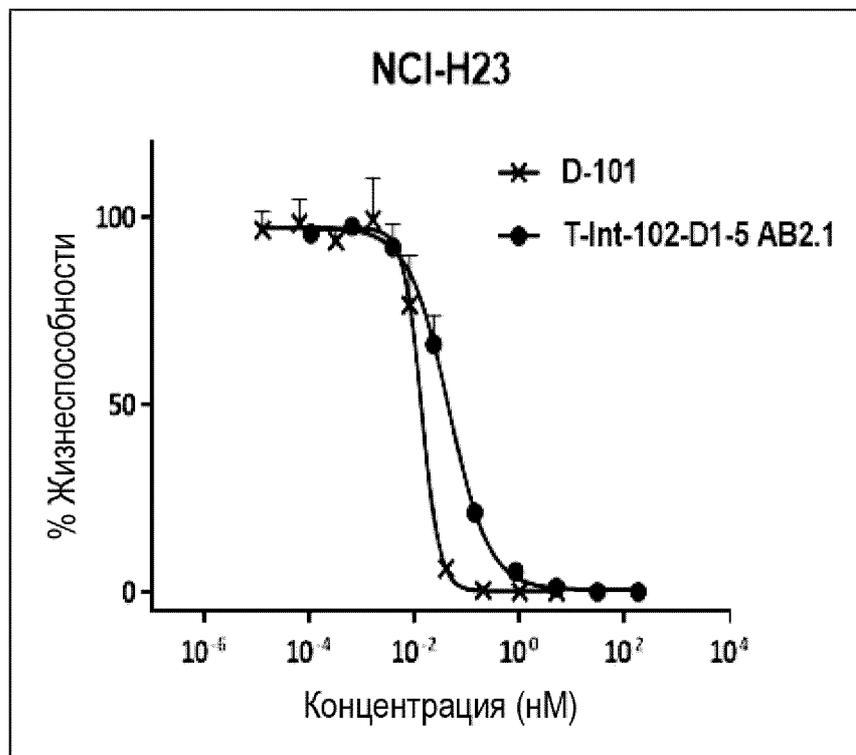
Фиг. 4



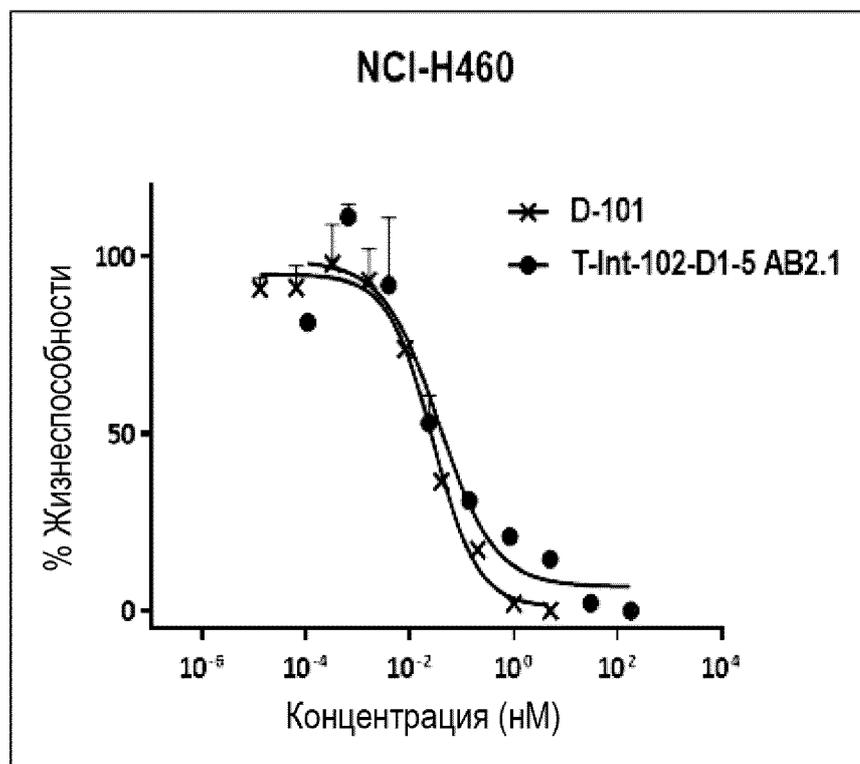
Фиг. 5



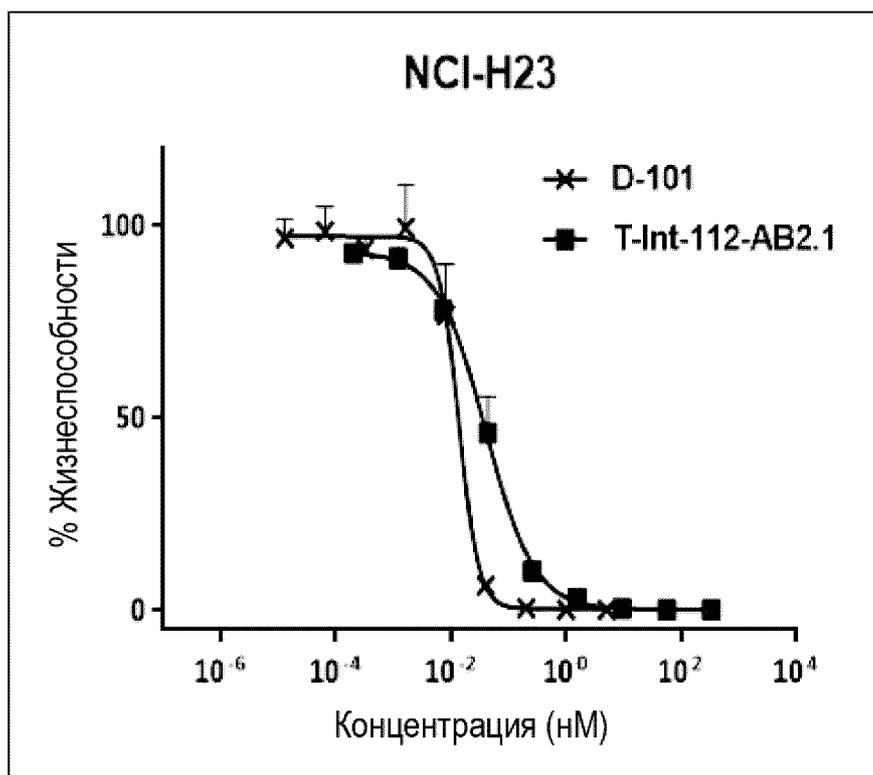
Фиг. 6



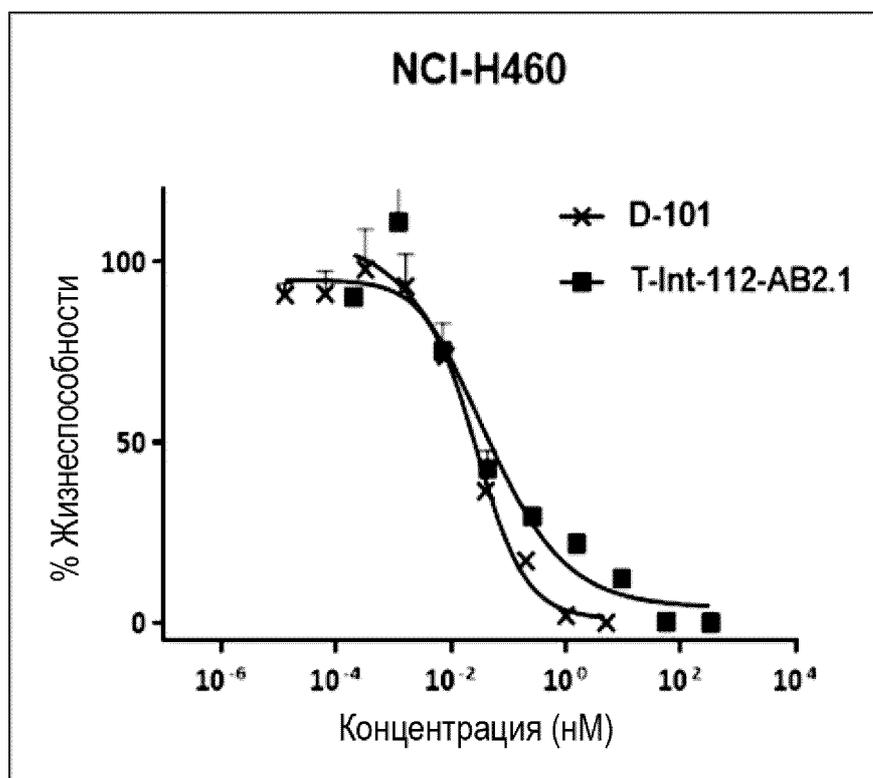
Фиг. 7



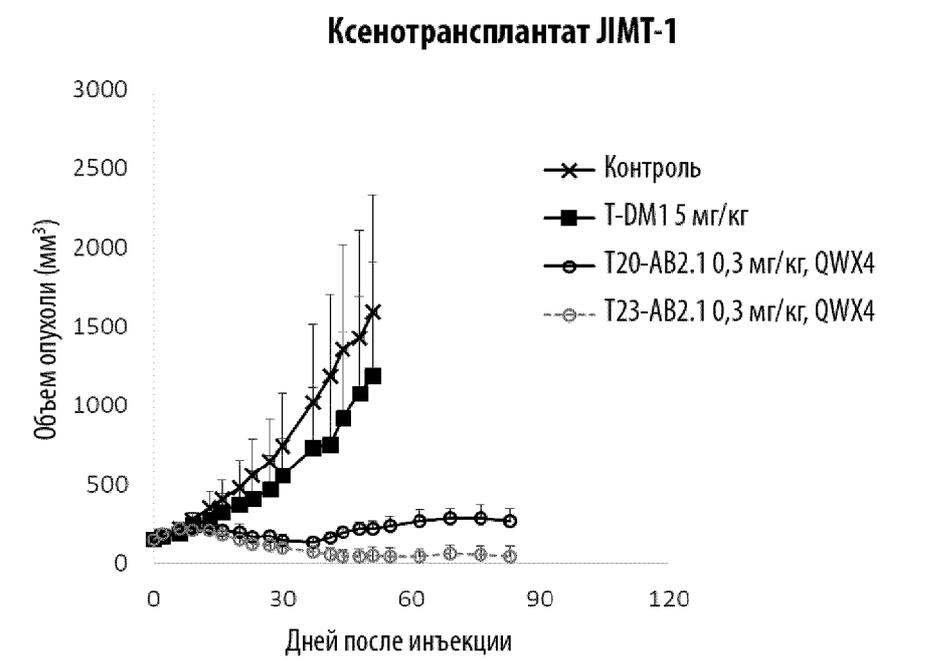
Фиг. 8



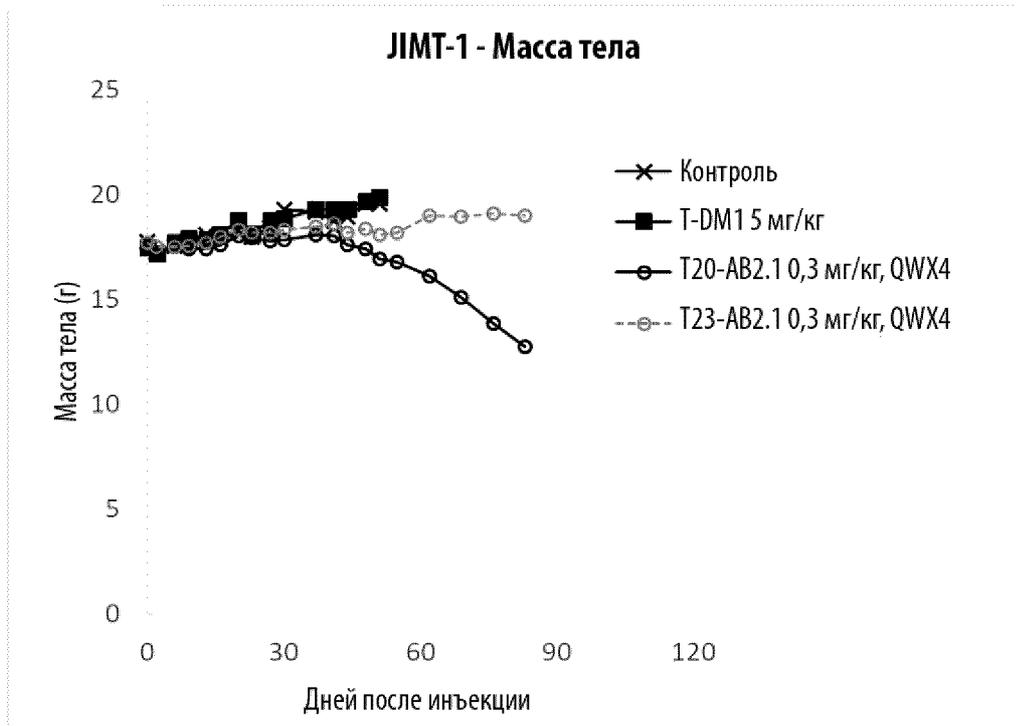
Фиг. 9



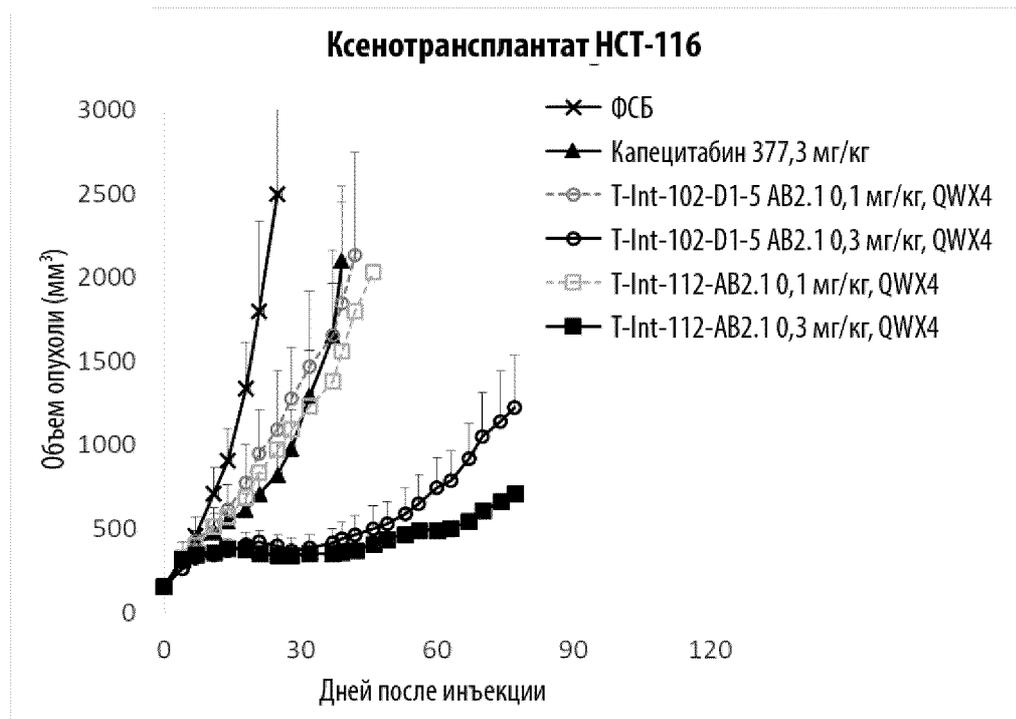
Фиг. 10



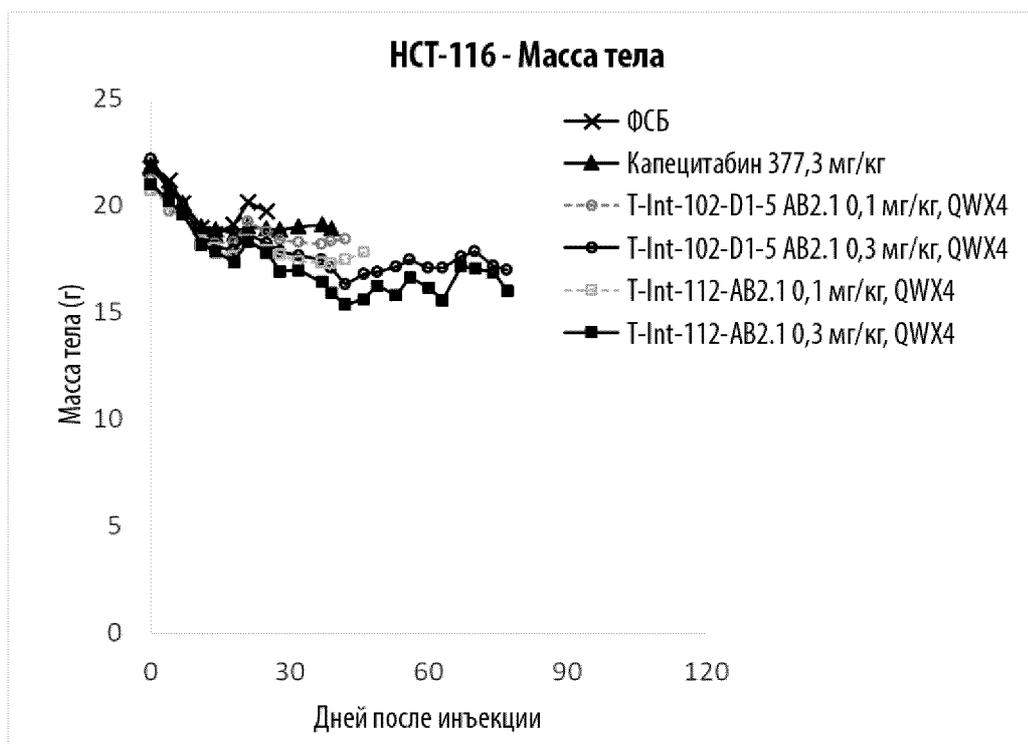
Фиг. 11



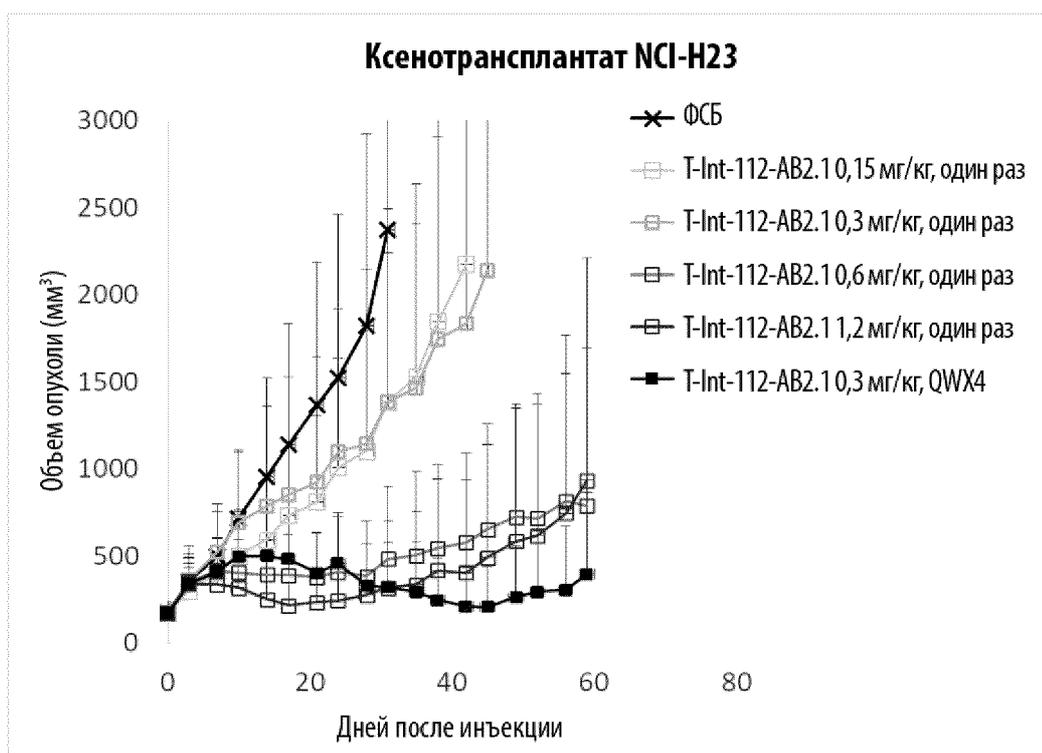
Фиг. 12



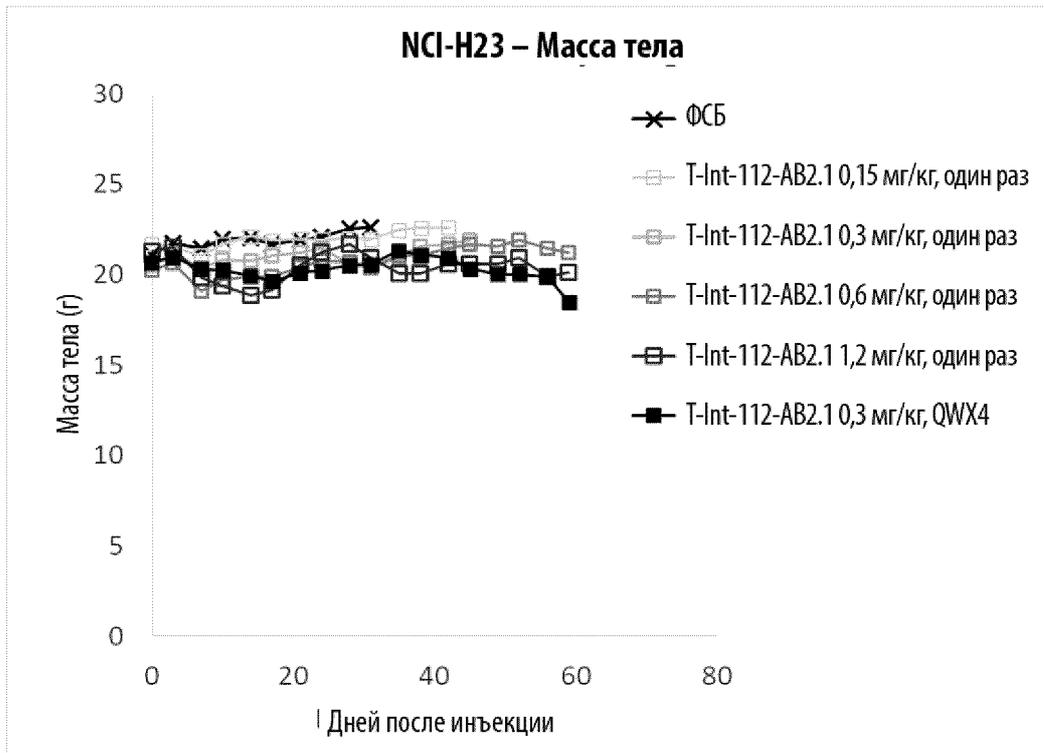
Фиг. 13



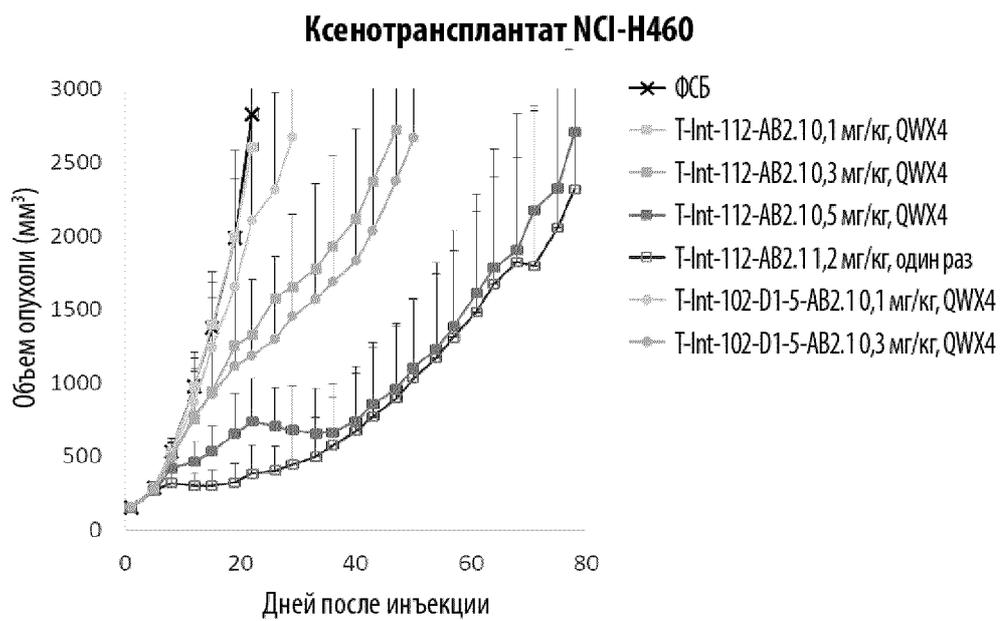
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

