

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3 612 537

“Coniugati di pirrolobenzodiazepina”

Medimmune Limited,

con sede a Cambridge, Cambridgeshire (Regno Unito)

* * * * *

DESCRIZIONE

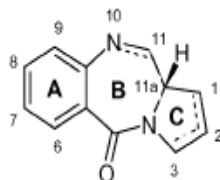
La presente invenzione riguarda coniugati comprendenti pirrolobenzodiazepine e relativi dimeri (PBD), e linker precursori di farmaco usati per produrre tali coniugati.

Contesto dell'invenzione

Alcune pirrolobenzodiazepine (PBD) hanno la capacità di riconoscere e legarsi a specifiche sequenze di DNA; la sequenza preferita è PuGPu. Il primo antibiotico antitumorale PBD, antramicina, è stato scoperto nel 1965 (Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965)). Da allora sono stati segnalate numerose PBD presenti in natura e sono state sviluppate oltre 10 vie sintetiche per una varietà di analoghi (Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994)). Gli elementi della famiglia includono abbeimicina (Hochlowski, et al., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), chicamicina (Konishi, et al., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (Brevetto giapponese 58-180 487; Thurston, et al., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)), mazetramicina (Kuminoto, et al., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), neotramicine A e B (Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93-96

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

(1976)), porotramicina (Tsunakawa, et al., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu, et al., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley e Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara, et al., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh, et al., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) e tomamicina (Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)). Le PBD sono della struttura generale:

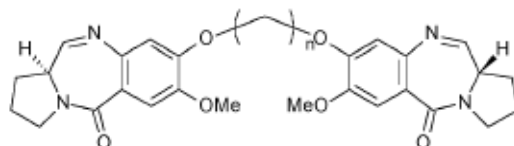


Differiscono nel numero, nel tipo e nella posizione dei sostituenti, sia negli anelli A aromatici sia negli anelli C di pirrolo, e nel grado di saturazione dell'anello C. Nell'Anello B vi è un'immina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)) o una carbinolammina metil etere (NH-CH(OMe))ram in corrispondenza della posizione N10-C11 che è il centro elettrofilo responsabile dell'alchilazione del DNA. Tutti i prodotti naturali noti hanno una configurazione (S) in corrispondenza della posizione chirale C11a che fornisce loro una rotazione destrosa quando osservati dall'Anello C verso l'Anello A. Ciò conferisce loro la forma tridimensionale appropriata per isoelicità con il solco minore del DNA di forma B, portando a una perfetta aderenza in corrispondenza del sito di legame (Kohn, In Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley e Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). La loro

capacità di formare un addotto nel solco minore, consente loro di interferire con il processamento del DNA, quindi il loro uso come agenti antitumorali.

È stato precedentemente divulgato che l'attività biologica di queste molecole può essere potenziata unendo due unità PBD insieme attraverso le loro funzionalità C8/C'-idrossile tramite un linker alchilene flessibile (Bose, D.S., et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 4939-4941 (1992); Thurston, D.E., et al., J. Org. Chem., 61, 8141-8147 (1996)). Si ritiene che i dimeri di PBD formino lesioni del DNA selettive per sequenza come la reticolazione palindromica inter-filamento 5'-Pu-GATC-Py-3' (Smellie, M., et al., Biochemistry, 42, 8232-8239 (2003); Martin, C., et al., Biochemistry, 44, 4135-4147) che si ritiene sia principalmente responsabile della loro attività biologica.

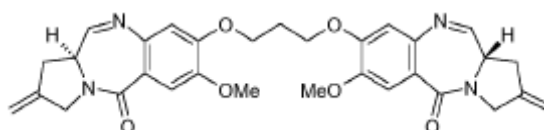
I primi dimeri (Bose, D.S., et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 4939-4941 (1992)) erano della formula generale:



in cui n è da 3 a 6. I composti in cui n erano 3 e 5 hanno mostrato una promettente citotossicità in vitro. Tuttavia, quando è stata studiata l'attività antitumorale del composto n=3 (DSB-120) (Walton, M., et al., Cancer Chemother Pharmacol (1996) 38: 431. doi:10.1007/s002800050507), questo non è risultato altrettanto promettente. Si è pensato che questa mancanza di promesse fosse "una conseguenza di basse selettività tumorale e captazione di farmaco a

causa dell'elevato legame con le proteine e/o dell'esteso metabolismo del farmaco in vivo".

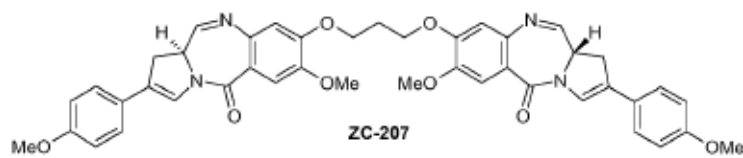
Al fine di migliorare questi composti, sono stati studiati composti (Gregson, S.J., et al., Chem. Commun., 1999, 797-798. doi: 10.1039/A809791G) con l'"inclusione dei sostituenti C2/C2' che devono seguire il contorno del solco minore ospite". Questo composto SG2000 (SJG-136):



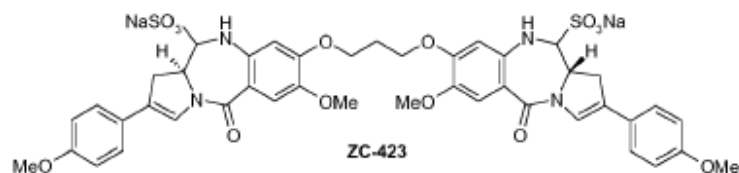
è stato riscontrato che ha "una citotossicità eccellente nella regione picomolare ... circa 9000 volte più potente di DSB-120".

Questo composto (discusso anche in Gregson, S., et al., J. Med. Chem., 44, 737-748 (2001); Alley, M.C., et al., Cancer Research, 64, 6700-6706 (2004); Hartley, J.A., et al., Cancer Research, 64, 6693-6699 (2004)) che è stato coinvolto in studi clinici come agente singolo, per esempio NCT02034227, studiando il suo uso nel trattamento della leucemia mieloide acuta e della leucemia linfocitica cronica (si veda: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02034227>).

I composti PBD dimerici recanti sostituenti arile C2 insieme a endo-insaturazione, come SG2202 (ZC-207), sono divulgati in WO 2005/085251:



e in WO2006/111759, bisolfiti di tali composti di PBD, per esempio SG2285 (ZC-423):



Questi composti hanno mostrato di essere agenti citotossici altamente utili (Howard, P.W., et al., *Bioorg. Med. Chem.* (2009), doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.012).

In un riesame di PBD contenenti ADC (Mantaj, J., et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* (2016), 55, 2-29; DOI: 10.1002/anie.201510610), viene discusso la SAR dei dimeri di PBD. Il riepilogo della SAR è presentato nella Figura 3 - B "L'insaturazione di C2-eso e C1-C2/C2-C3 migliora l'attività". Una discussione più dettagliata si trova nella sezione 2.4 che afferma:

"DSB-120 ha una scarsa attività in vivo, attribuita in parte alla sua elevata reattività con molecole contenenti tioli cellulari come il glutatione. Tuttavia, l'introduzione dell'insaturazione C2/C2'-eso come in SJG-136 ha portato a un aumento generale dell'affinità di legame del DNA e della citotossicità e una minore reattività verso i nucleofili cellulari con una maggiore quantità di agente che potenzialmente raggiunge il suo DNA target."

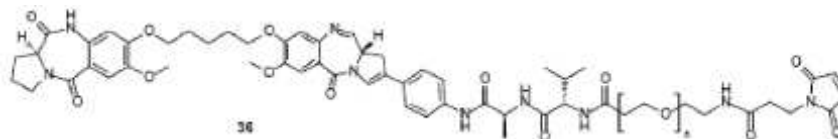
WO 2007/085930 descrive la preparazione di composti PBD dimeri aventi gruppi linker per la connessione a un agente legante cellule, come un anticorpo. Il linker è presente nel ponte che collega le unità PBD monomeriche del dimero.

I composti PBD dimerici aventi gruppi linker per la connessione a un agente legante cellule, come un anticorpo, sono descritti in WO

2011/130598. Il linker in questi composti è fissato a una delle posizioni N10 disponibili ed essi sono generalmente clivati dall'azione di un enzima sul gruppo linker. I composti di PBD dimerici hanno insaturazione endo o eso nell'Anello C.

WO 2014/057074 e WO 2015/052322 descrive specifici coniugati di PBD dimerici legati tramite la posizione N10 su un monomero e tutti questi composti hanno insaturazione endo nell'Anello C.

WO2014/096365 divulga il composto:



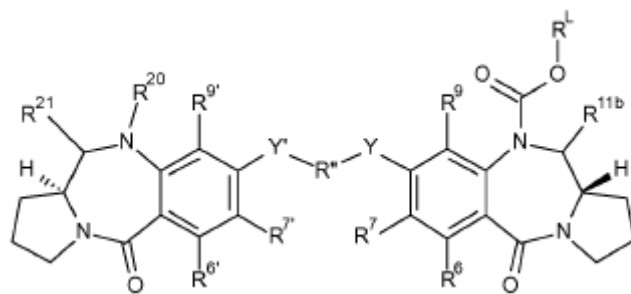
laddove la mancanza di insaturazione nell'Anello C è accoppiata con l'Anello B che è un dilattame e quindi non ha la capacità di legare covalentemente il DNA.

WO 2016/044560 si riferisce a PBD, in particolare pirrolobenzodiazepine aventi un gruppo protettivo N10 labile, atte a formare un linker a un agente legante cellule e ad alcuni coniugati costituiti da queste PBD.

Divulgazione dell'invenzione

La presente invenzione fornisce linker di farmaco PBD dimerica e coniugati in cui nessuno dei due Anelli C ha un'insaturazione endo o eso.

Un primo aspetto della presente invenzione comprende un composto con la formula I:



e relativi sali e solvati, in cui:

R^6 e R^9 sono selezionati indipendentemente tra H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR' , nitro, Me_3Sn e alo;

in cui R e R' sono selezionati indipendentemente tra gruppi C_{1-12} alchile, C_{3-20} eterociclicile e C_{5-20} arile facoltativamente sostituiti;

R^7 è selezionato tra H, R, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR' , nitro, Me_3Sn e alo;

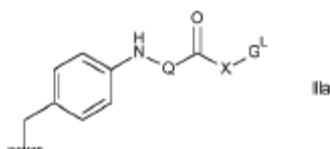
R'' è un gruppo C_{3-12} alchilene, la cui catena può essere interrotta da uno o più eteroatomi, per esempio O, S, NR^{N2} (in cui R^{N2} è H o C_{1-4} alchile), e/o anelli aromatici, per esempio, benzene o piridina;

Y e Y' sono selezionati tra O, S o NH;

$R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$ sono selezionati dagli stessi gruppi rispettivamente di R^6 , R^7 e R^9 ;

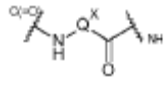
R^{11b} è selezionato da OH, OR^A , in cui R^A è C_{1-4} alchile; e

R^L è un linker per la connessione a un agente legante cellule, selezionato tra: (iia):



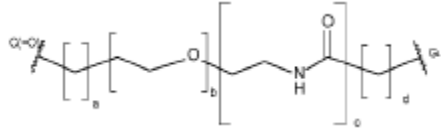
in cui

Q è:

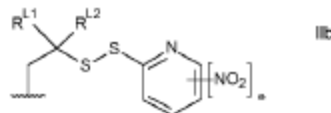


in cui Q^X è tale che Q è un residuo amminoacidico, un residuo dipeptidico o un residuo tripeptidico;

X è:

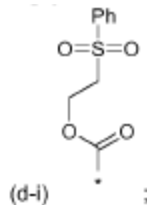


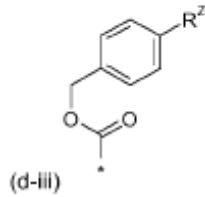
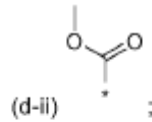
in cui a = da 0 a 5, b = da 0 a 16, c = 0 o 1, d = da 0 a 5; G^L è un linker per la connessione a un'unità Ligando; e (iii b):



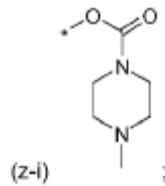
in cui R^{L1} e R^{L2} sono selezionati indipendentemente tra H e metile, oppure insieme all'atomo di carbonio a cui sono legati formano un gruppo ciclopropilene o ciclobutilene; ed e è 0 o 1; o

- (a) R^{20} è H e R^{21} è OH o OR^A , in cui R^A è C_{1-4} alchile; o
- (b) R^{20} e R^{21} formano un doppio legame azoto-carbonio tra l'azoto e gli atomi di carbonio a cui sono legati; o
- (c) R^{20} è H e R^{21} è SO_2M , in cui z è 2 o 3 e M è un catione monovalente farmaceuticamente accettabile; o
- (d) R^{20} è H e R^{21} è H; o
- (e) R^{21} è OH o OR^A , in cui R^A è C_{1-4} alchile e R^{20} è selezionato tra:





, in cui R^z è selezionato tra:



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

(z-iii) NO_2 ;

(z-iv) OMe ;

(z-v) glucoronide;

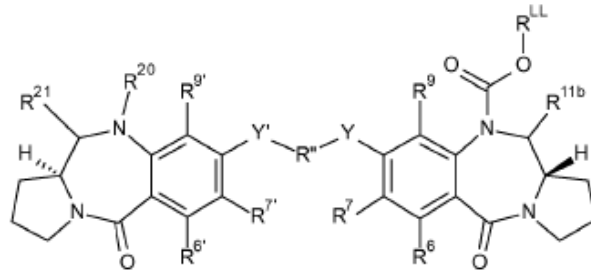
(z-vi) $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-R^{ZC}$, in cui $-C(=O)-X_1-NH-$ e $-C(=O)-X_2-NH-$ rappresentano residui di amminoacidi naturali e R^{ZC} è selezionato tra Me , OMe , OCH_2CH_2OMe .

È stato riscontrato che tali linker di farmaco subiscono una pronta coniugazione con unità Ligando come gli anticorpi.

Un secondo aspetto della presente invenzione fornisce Coniugati di formula II:

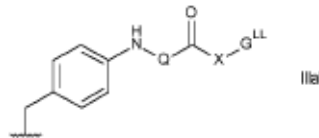


in cui L è un'unità Ligando (vale a dire un agente di bersagliamento), D^L è un'unità Linker di farmaco di formula I':



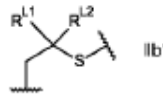
in cui R^6 , R^7 , R^9 , R^{11b} , Y , R'' , Y' , $R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$, R^{20} e R^{21} sono come definito nel primo aspetto dell'invenzione;

R^{LL} è un linker per la connessione a un agente legante cellule, selezionato tra: (iiia):



in cui Q e X sono come definito nel primo aspetto e G^{LL} è un linker connesso a un'unità Ligando; e

(iiib):



in cui R^{L1} e R^{L2} sono come definito nel primo aspetto;

in cui p è un numero intero da 1 a 20.

L'unità Ligando, descritta più dettagliatamente di seguito, è un agente di bersagliamento che si lega a una frazione bersaglio. L'unità Ligando, per esempio, può legarsi in modo specifico a un componente cellulare (un agente legante cellule) o ad altre molecole bersaglio di interesse. L'unità Ligando può essere, per esempio, una proteina, un polipeptide o un peptide, come un anticorpo, un frammento legante l'antigene di un anticorpo o un altro agente legante, come una proteina di fusione Fc.

È stato riscontrato che questi coniugati possiedono un'elevata tollerabilità che porta a un alto indice terapeutico, rendendoli così candidati promettenti per lo sviluppo clinico.

Un terzo aspetto fornisce un coniugato del secondo aspetto dell'invenzione per l'uso nel trattamento di una malattia proliferativa.

Uno esperto del settore è in grado di determinare facilmente se un coniugato candidato tratta o meno una condizione proliferativa per un particolare tipo di cellula. Per esempio, negli esempi che seguono sono descritti saggi che possono essere convenientemente usati per valutare l'attività offerta da un particolare composto.

Definizioni

Sostituenti

La locuzione "facoltativamente sostituito" come usata nella presente, riguarda un gruppo parente che può essere non sostituito o che può essere sostituito.

Se non diversamente specificato, il termine "sostituito" come usato nella presente, riguarda a un gruppo parente che reca uno o più sostituenti. Il termine "sostituente" viene usato nella presente nel senso convenzionale e si riferisce a una frazione chimica che è fissata in modo covalente, o se appropriato, fusa a, un gruppo parente. È ben nota un'ampia gamma di sostituenti e i metodi per la loro formazione e introduzione in una varietà di gruppi parenti sono anch'essi ben noti.

Esempi di sostituenti sono descritti più dettagliatamente di seguito.

C_{1-12} alchile: Il termine " C_{1-12} alchile" come usato nella presente, si riferisce a una frazione monovalente ottenuta rimuovendo un atomo di idrogeno da un atomo di carbonio di un composto idrocarburico avente da 1 a 12 atomi di carbonio, che può essere alifatico o aliciclico, e che può essere saturo o insaturo (per esempio, parzialmente insaturo, completamente insaturo). Il termine " C_{1-4} alchile" come usato nella presente, si riferisce a una frazione monovalente ottenuta rimuovendo un atomo di idrogeno da un atomo di carbonio di un composto idrocarburico avente da 1 a 4 atomi di carbonio, che può essere alifatico o aliciclico, e che può essere saturo o insaturo (per esempio, parzialmente insaturo, completamente insaturo). Pertanto, il termine "alchile" include le sottoclassi alchenile, alchinile, cicloalchile, eccetera, discusse in seguito.

Esempi di gruppi alchile saturi includono, in via non limitativa, metile (C_1), etile (C_2), propile (C_3), butile (C_4), pentile (C_5), esile (C_6) ed eptile (C_7).

Esempi di gruppi alchile lineari saturi includono, in via non limitativa, metile (C_1), etile (C_2), n-propile (C_3), n-butile (C_4), n-pentile (amile) (C_5), n-esile (C_6) e n-eptile (C_7).

Esempi di gruppi alchile ramificati saturi includono iso-propile (C_3), iso-butile (C_4), sec-butile (C_4), terz-butile (C_4), iso-pentile (C_5) e neo-pentile (C_5).

C_{2-12} Alchenile: Il termine " C_{2-12} alchenile" come usato nella presente, si riferisce a un gruppo alchile avente uno o più doppi legami carbonio-carbonio.

Esempi di gruppi alchenile insaturi includono, in via non limitativa, etenile (vinile, $-CH=CH_2$), 1-propenile ($-CH=CH-CH_3$), 2-propenile (allile, $-CH-CH=CH_2$), isopropenile (1-metilvinile, $-C(CH_3)=CH_2$), butenile (C_4), pentenile (C_5) ed esenile (C_6).

C_{2-12} alchinile: Il termine " C_{2-12} alchinile" come usato nella presente, si riferisce a un gruppo alchile avente uno o più tripli legami carbonio-carbonio.

Esempi di gruppi alchinile insaturi includono, in via non limitativa, etinile ($-C\equiv CH$) e 2-propinile (propargile, $-CH_2-C\equiv CH$).

C_{3-12} cicloalchile: Il termine " C_{3-12} cicloalchile" come usato nella presente, riguarda un gruppo alchile che è anche un gruppo ciclile; ossia, una frazione monovalente ottenuta rimuovendo un atomo di idrogeno da un atomo d'anello aliciclico di un composto idrocarburico ciclico (carbociclico), la quale frazione ha da 3 a 7 atomi di carbonio, incluso da 3 a 7 atomi d'anello.

Esempi di gruppi cicloalchile includono, in via non limitativa, quelli derivati da:

composti saturi di idrocarburi monociclici:

ciclopropano (C_3), ciclobutano (C_4), ciclopentano (C_5), cicloesano (C_6), cicloeptano (C_7), metilciclopropano (C_4), dimetilciclopropano (C_5), metilciclobutano (C_5), dimetilciclobutano

(C₆), metilciclopentano (C₆), dimetilciclopentano (C₇) e metilcicloesano (C₇);

composti di idrocarburi monociclici insaturi:

ciclopropene (C₃), ciclobutene (C₄), ciclopentene (C₅), cicloesene (C₆), metilciclopropene (C₄), dimetilciclopropene (C₅), metilciclobutene (C₅), dimetilciclobutene (C₆), metilciclopentene (C₆), dimetilciclopentene (C₇) e metilcicloesene (C₇); e

composti saturi di idrocarburi policiclici:

norcarano (C₇), norpinano (C₇), norbornano (C₇).

C₃₋₂₀ eterocicliche: Il termine "C₃₋₂₀ eterocicliche" come usato nella presente, si riferisce a una frazione monovalente ottenuta rimuovendo un atomo di idrogeno da un atomo di anello di un composto eterociclico, la cui frazione ha da 3 a 20 atomi d'anello, di cui da 1 a 10 sono eteroatomi d'anello. Preferibilmente, ciascun anello ha da 3 a 7 atomi d'anello, dei quali da 1 a 4 sono eteroatomi d'anello.

In questo contesto, i prefissi (per esempio, C₃₋₂₀, C₃₋₇, C₅₋₆, eccetera) denotano il numero di atomi d'anello, o l'intervallo del numero di atomi d'anello, siano essi atomi di carbonio o eteroatomi. Per esempio, il termine "C₅₋₆eterocicliche", come usato nella presente, riguarda un gruppo eterocicliche avente 5 o 6 atomi d'anello.

Esempi di gruppi eterocicliche monociclici includono, in via non limitativa, quelli derivati da:

N₁: aziridina (C₃), azetidina (C₄), pirrolidina (tetraidropirrolo) (C₅), pirrolina (per esempio 3-pirrolina, 2,5-diidropirrolo) (C₅), 2H-pirrolo o 3H-pirrolo (isopirrolo, isoazolo)

(C₅), piperidina (C₆), diidropiridina (C₆), tetraidropiridina (C₆), azepina (C₇);

O₁: ossirano (C₃), ossetano (C₄), ossolano (tetraidrofurano) (C₅), ossolo (diidrofurano) (C₅), ossano (tetraidropirano) (C₆), diidropirano (C₆), pirano (C₆), ossepina (C₇);

S₁: tiirano (C₃), tietano (C₄), tiolano (tetraidrotiofene) (C₅), tiano (tetraidrotiopirano) (C₆), tiepano (C₇);

O₂: diossolano (C₅), diossano (C₆) e diossano (C₇);

O₃: triossano (C₆);

N₂: imidazolidina (C₅), pirazolidina (diazolidina) (C₅), imidazolina (C₅), pirazolina (diidropirazolo) (C₅), piperazina (C₆);

N₁O₁: tetraidroossazolo (C₅), diidroossazolo (C₅), tetraidroisossazolo (C₅), diidroisossazolo (C₅), morfolina (C₆), tetraidroossazina (C₆), diidroossazina (C₆), ossazina (C₆);

N₁S₁: tiazolidina (C₅), tiatzolidina (C₅), tiomorfolina (C₆);

N₂O₁: ossadiazina (C₆);

O₁S₁: ossatiolo (C₅) e ossatiano (tiossano) (C₆); e,

N₁O₁S₁: ossatiazina (C₆).

Esempi di gruppi eterociclici monociclici sostituiti includono quelli derivati da saccaridi, in forma ciclica, per esempio, furanosi (C₅), come arabinofuranosio, lisofuranosio, ribofuranosio e xilofuranosio, e piranosi (C₆), come allopiranosio, altropiranosio, glucopiranosio, mannopiranosio, gulopiranosio, idopiranosio, galattopiranosio e talopiranosio.

C₅₋₂₀ arile: Il termine "C₅₋₂₀ arile", come usato nella presente, riguarda una frazione monovalente ottenuta rimuovendo un atomo di idrogeno da un anello aromatico atomo di un composto aromatico, la quale frazione ha da 3 a 20 atomi d'anello. Il termine "C₅₋₇ arile", come usato nella presente, si riferisce a una frazione monovalente ottenuta rimuovendo un atomo di idrogeno da un atomo di anello aromatico di un composto aromatico, la cui frazione ha da 5 a 7 atomi d'anello e il termine "C₅₋₁₀ arile", come usato nella presente, riguarda una porzione monovalente ottenuta rimuovendo un atomo di idrogeno da un atomo di anello aromatico di un composto aromatico, la cui frazione ha da 5 a 10 atomi d'anello. Preferibilmente, ciascun anello ha da 5 a 7 atomi d'anello.

In questo contesto, i prefissi (per esempio, C₃₋₂₀, C₅₋₇, C₅₋₆, C₅₋₁₀, eccetera) denotano il numero di atomi d'anello, o l'intervallo del numero di atomi d'anello, siano essi atomi di carbonio o eteroatomi. Per esempio, il termine "C₅₋₆ arile" come usato nella presente, si riferisce a un gruppo arile avente 5 o 6 atomi d'anello.

Gli atomi d'anello possono essere tutti atomi di carbonio, come nei "gruppi carboarile".

Esempi di gruppi carboarile includono, in via non limitativa, quelli derivati da benzene (vale a dire fenile) (C₆), naftalene (C₁₀), azulene (C₁₀), antracene (C₁₄), fenantrene (C₁₄), naftacene (C₁₈), e pirene (C₁₆).

Esempi di gruppi arile che comprendono anelli fusi, almeno uno dei quali è un anello aromatico, includono, in via non limitativa,

gruppi derivati da indano (per esempio 2,3-diidro-1H-indene) (C₉), indene (C₉), isoindene (C₉), tetralina (1,2,3,4-tetraidronaftalene (C₁₀), acenaftene (C₁₂), fluorene (C₁₃), fenalene (C₁₃), acefenantrene (C₁₅), e aceantrene (C₁₆).

In alternativa, gli atomi d'anello possono includere uno o più eteroatomi, come nei "gruppi eteroarile". Esempi di gruppi eteroarile monociclici includono, in via non limitativa, quelli derivati da:

N₁: pirrolo (azolo) (C₅), piridina (azina) (C₆);

O₁: furano (ossolo) (C₅);

S₁: tiofene (tiolo) (C₅);

N₁O₁: ossazolo (C₅), isossazolo (C₅), isossazina (C₆);

N₂O₁: ossadiazolo (furazano) (C₅);

N₃O₁: ossatriazolo (C₅);

N₁S₁: tiazolo (C₅), isotiazolo (C₅);

N₂: imidazolo (1,3-diazolo) (C₅), pirazolo (1,2-diazolo) (C₅), piridazina (1,2-diazina) (C₆), pirimidina (1,3-diazina) (C₆) (per esempio citosina, timina, uracile), pirazina (1,4-diazina) (C₆); N₃: triazolo (C₅), triazina (C₆); e,

N₄: tetrazolo (C₅).

Esempi di eteroarile che comprendono anelli fusi includono, in via non limitativa:

C₉ (con 2 anelli fusi) derivato da benzofurano (O₁), isobenzofurano (O₁), indolo (N₁), isoindolo (N₁), indolizina (N₁), indolina (N₁), isoindolina (N₁), purine (N₄) (per esempio adenina, guanina), benzimidazolo (N₂), indazolo (N₂), benzossazolo (N₁O₁),

benzisossazolo (N₁O₁), benzodiossolo (O₂), benzofurazano (N₂O₁),
benzotriazolo (N₃), benzotiofurano (S₁), benzotiazolo (N₁S₁),
benzotiadiazolo (N₂S);

C₁₀ (con 2 anelli fusi) derivato da cromene (O₁), isocromene (O₁), croman (O₁), isocromo (O₁), benzodiossano (O₂), chinolina (N₁), isochinolina (N₁), chinolizina (N₁), benzossazina (N₁O₁), benzodiazina (N₂), piridopiridina (N₂), chinossalina (N₂), chinazolina (N₂), cinnolina (N₂), ftalazina (N₂), naftiridina (N₂), pteridina (N₄);

C₁₁ (con 2 anelli fusi) derivato da benzodiazepina (N₂);

C₁₃ (a 3 anelli fusi) derivato da carbazolo (N₁), dibenzofurano (O₁), dibenzotiofene (S₁), carbolina (N₂), perimidina (N₂), piridoindolo (N₂); e,

C₁₄ (con 3 anelli fusi) derivato da acridina (N₁), xantene (O₁), tiossantene (S₁), ossantrene (O₂), fenossatiina (O₁S₁), fenazina (N₂), fenossazina (N₁O₁), fenotiazina (N₁S₁), tiantrene (S₂), fenantridina (N₁), fenantrolina (N₂), fenazina (N₂).

I gruppi di cui sopra, sia singolarmente sia come parte di un altro sostituente, possono essi stessi essere facoltativamente sostituiti con uno o più gruppi selezionati tra loro stessi e i sostituenti aggiuntivi elencati di seguito.

Alo: -F, -Cl, -Br, e -I.

Idrossi: -OH.

Etere: -OR, in cui R è un sostituente etere, per esempio, un gruppo C₁₋₇ alchile (indicato anche come gruppo C₁₋₇ alcossi, discusso di seguito), un gruppo C₃₋₂₀ eterociclicile (indicato anche come gruppo

eterocicclilossi C₃₋₂₀), o un gruppo C₅₋₂₀ arile (indicato anche come gruppo C₅₋₂₀ arilossi), preferibilmente un gruppo C₁₋₇ alchile.

Alcossi: -OR, in cui R è un gruppo alchile, per esempio un gruppo C₁₋₇ alchile. Esempi di gruppi C₁₋₇ alcossi includono, in via non limitativa, -Ome (metossi), -OEt (etossi), -O(nPr) (n-propossi), -O(iPr) (isopropossi), -O(nBu) (n-butossi), -O(sBu) (sec-butossi), -O(iBu) (isobutossi) e -O(tBu) (terz-butossi).

Acetale: -CH(OR¹)(OR²), in cui R¹ e R² sono sostituenti acetale indipendentemente, per esempio un gruppo C₁₋₇ alchile, un gruppo C₃₋₂₀ eterocicclile o un gruppo C₅₋₂₀ arile, preferibilmente un gruppo C₁₋₇ alchile, o, nel caso di un gruppo acetale "ciclico", R¹ e R², presi insieme ai due atomi di ossigeno a cui sono fissati, e agli atomi di carbonio a cui sono fissati, formano un anello eterociclico avente da 4 a 8 atomi d'anello. Esempi dei gruppi acetale includono, in via non limitativa, -CH(OMe)₂, -CH(OEt)₂, e -CH(OMe)(OEt).

Emiacetale: -CH(OH)(OR¹), in cui R¹ è un sostituyente emiacetale, per esempio un gruppo C₁₋₇ alchile, un gruppo C₃₋₂₀ eterocicclile o un gruppo C₅₋₂₀ arile, preferibilmente un gruppo C₁₋₇ alchile. Esempi di gruppi emiacetale includono, in via non limitativa, -CH(OH)(OMe) e -CH(OH)(OEt).

Chetale: -CR(OR¹)(OR²), in cui R¹ e R² sono definiti per gli acetali ed R è un sostituyente chetale differente dall'idrogeno, per esempio un gruppo C₁₋₇ alchile, un gruppo C₃₋₂₀ eterocicclile, o un gruppo C₅₋₂₀ arile, preferibilmente un gruppo C₁₋₇ alchile. Esempi di gruppi chetali includono, in via non limitativa, -C(Me)(OMe)₂, -

$C(Me)(OEt)_2$, $-C(Me)(OMe)(OEt)$, $-C(Et)(OMe)_2$, $-C(Et)(OEt)_2$, e $-C(Et)(OMe)(OEt)$.

Emichetale: $-CR(OH)(OR^1)$, in cui R^1 è definito per gli emiacetali e R è un sostituente emichetale differente dall'idrogeno, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclico, o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi emiacetale includono, in via non limitativa, $-C(Me)(OH)(OMe)$, $-C(Et)(OH)(OMe)$, $-C(Me)(OH)(OEt)$, e $-C(Et)(OH)(OEt)$.

Osso (cheto, -one): $=O$.

Tione (tiochetone): $=S$.

Immino (immina): $=NR$, in cui R è un sostituente immino, per esempio idrogeno, un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclico o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente idrogeno o un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi estere includono, in via non limitativa, $=NH$, $=NMe$, $=NEt$ e $=NPh$.

Formile (carbaldeide, carbossaldeide): $-C(=O)H$.

Acile (cheto): $-C(=O)R$, in cui R è un sostituente acile, per esempio, un gruppo C_{1-7} alchile (indicato anche come C_{1-7} alchilacile o C_{1-7} alcanoile), un gruppo C_{3-20} eterociclico (indicato anche come C_{3-20} eterocicclilacile), o un gruppo C_{5-20} arile (indicato anche come C_{5-20} arilacile), preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi acilici includono, in via non limitativa, $-C(=O)CH_3$ (acetile), $-C(=O)CH_2CH_3$ (propionile), $-C(=O)C(CH_3)_3$ (t-butirile) e $-C(=O)Ph$ (benzoile, fenone).

Carbossi (acido carbossilico): $-C(=O)OH$.

Tiocarbossi (acido tiocarbossilico): $-C(=S)SH$.

Tiolocarbossi (acido tiolocarbossilico): $-C(=O)SH$.

Tionocarbossi (acido tionocarbossilico): $-C(=S)OH$.

Acido immidico: $-C(=NH)OH$.

Acido idrossamico: $-C(=NOH)OH$.

Estere (carbossilato, estere di acido carbossilico, ossicarbonile): $-C(=O)OR$, in cui R è un sostituito estere, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclice o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi estere includono, in via non limitativa, $-C(=O)OCH_3$, $-C(=O)OCH_2CH_3$, $-C(=O)OC(CH_3)_3$ e $-C(=O)OPh$.

Acilossi (estere inverso): $-OC(=O)R$, in cui R è un sostituito acilossile, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclice o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi acilossi includono, in via non limitativa, $-OC(=O)CH_3$ (acetossi), $-OC(=O)CH_2CH_3$, $-OC(=O)C(CH_3)_3$, $-OC(=O)Ph$, e $-OC(=O)CH_2Ph$.

Ossicarboilossi: $-OC(=O)OR$, in cui R è un sostituito estere, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclice o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi estere includono, in via non limitativa, $-OC(=O)OCH_3$, $-OC(=O)OCH_2CH_3$, $-OC(=O)OC(CH_3)_3$ e $-OC(=O)OPh$.

Ammino: $-NR^1R^2$, in cui R^1 e R^2 sono sostituenti ammino indipendentemente, per esempio idrogeno, un gruppo C_{1-7} alchile (indicato anche come C_{1-7} alchilammino o di- C_{1-7} alchilammino), un

gruppo C₃₋₂₀ eterocicliche, oppure un gruppo C₅₋₂₀ arile, preferibilmente H o un gruppo C₁₋₇ alchile, oppure, nel caso di un gruppo amminico "ciclico", R¹ e R², presi insieme all'atomo di azoto a cui sono associati fissati, formano un anello eterociclico avente da 4 a 8 atomi d'anello. I gruppi ammino possono essere primari (-NH₂), secondari (-NHR¹) o terziari (-NHR¹R²) e in forma cationica possono essere quaternari (-⁺NR¹R²R³). Esempi di gruppi ammino includono, in via non limitativa, -NH₂, -NHCH₃, -NHC(CH₃)₂, -N(CH₃)₂, -N(CH₂CH₃)₂, e -NHPH. Esempi di gruppi ammino ciclici includono, in via non limitativa, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino e tiomorfolino.

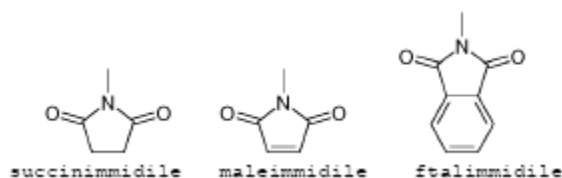
Ammido (carbamoile, carbammile, amminocarbonile, carbossamide):- C(=O)NR¹R², in cui R¹ e R² sono sostituenti amminici indipendentemente, come definito per gruppi ammino. Esempi di gruppo ammido includono, in via non limitativa, -C(=O)NH₂, -C(=O)NHCH₃, -C(=O)N(CH₃)₂, -C(=O)NHCH₂CH₃, e -C(=O)N(CH₂CH₃)₂, nonché gruppi ammido in cui R¹ e R², insieme all'atomo di azoto a cui sono fissati, formano una struttura eterociclica come, per esempio, piperidinocarbonile, morfolino-carbonile, tiomorfolinocarbonile, e piperazinocarbonile.

Tioamido (tiocarbamile): -C(=S)NR¹R², in cui R¹ e R² sono sostituenti amminici indipendentemente, come definito per gruppi ammino. Esempi di gruppi ammido includono, in via non limitativa, -C(=S)NH₂, -C(=S)NHCH₃, -C(=S)N(CH₃)₂, e -C(=S)NHCH₂CH₃.

Acilammido (acilammino): -NR¹C(=O)R², in cui R¹ è un sostituente ammidico, per esempio idrogeno, un gruppo C₁₋₇ alchile, un gruppo C₃₋₂₀

eterociclile o un gruppo C₅₋₂₀ arile, preferibilmente idrogeno o un gruppo C₁₋₇ alchile, e R² è un sostituito acile, per esempio un gruppo C₁₋₇ alchile, un gruppo C₃₋₂₀ eterociclile o un gruppo C₅₋₂₀ arile, preferibilmente idrogeno o un gruppo C₁₋₇ alchile.

Esempi di gruppi acilammido includono, in via non limitativa, -NHC(=O)CH₃, -NHC(=O)CH₂CH₃ e -NHC(=O)Ph. R¹ e R² possono formare insieme una struttura ciclica, come per esempio succinimidile, maleimidile e ftalimidile:

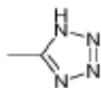


Amminocarbonilossi: -OC(=O)NR¹R², in cui R¹ e R² sono sostituenti amminici indipendentemente, come definito per gruppi ammino. Esempi di gruppi amminocarbonilossi includono, in via non limitativa, -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NHMe, -OC(=O)NMe₂, e -OC(=O)NEt₂.

Ureido: -N(R¹)CONR²R³ in cui R² e R³ sono sostituenti ammino indipendentemente, come definito per gruppi ammino, e R¹ è un sostituito ureido, per esempio idrogeno, un gruppo C₁₋₇ alchile, un gruppo C₃₋₂₀ eterociclile o un gruppo C₅₋₂₀ arile, preferibilmente idrogeno o un gruppo C₁₋₇ alchile. Esempi di gruppi di ureido includono, in via non limitativa, -NHCONH₂, -NHCONHMe, -NHCONHET, -NHCONMe₂, -NHCONEt₂, -NMeCONH₂, -NMeCONHMe, -NMeCONHET, -NMeCONMe₂, e -NMeCONEt₂.

Guanidino: -NH-C(=NH)NH₂.

Tetrazolile: Un anello aromatico a cinque elementi avente quattro atomi di azoto e un atomo di carbonio,



Immino: =NR, in cui R è un sostituyente imminico, per esempio, idrogeno, un gruppo C₁₋₇ alchile, un gruppo C₃₋₂₀ eterociclicile o un gruppo C₅₋₂₀ arile, preferibilmente H o un gruppo C₁₋₇ alchile. Esempi di gruppi immino includono, in via non limitativa, =NH, =NMe e =NEt.

Amidina (ammidino): -C(=NR)NR₂, in cui ciascun R è un sostituyente ammidino, per esempio idrogeno, un gruppo C₁₋₇ alchile, un gruppo C₃₋₂₀ eterociclicile o un gruppo C₅₋₂₀ arile, preferibilmente H o un gruppo C₁₋₇ alchile. Esempi di gruppi aloalchile includono, in via non limitativa:

-C(=NH)NH₂, -C(=NH)NMe₂, e -C(=NMe)NMe₂.

Nitro: -NO₂.

Nitroso: -NO.

Azido: -N₃.

Ciano (nitrile, carbonitrile): -CN.

Isociano: -NC.

Cianato: -OCN.

Isocianato: -NCO.

Tiociano (tiocianato): -SCN.

Isotiociano (isotiocianato): -NCS.

Solfidrile (tiolo, mercapto): -SH.

Tioetere (solfo): $-SR$, in cui R è un sostituente tioetere, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile (indicato anche come gruppo C_{1-7} alchiltio), un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi C_{1-7} alchiltio includono, in via non limitativa, $-SCH_3$ e $-SCH_2CH_3$.

Disolfuro: $-SS-R$, in cui R è un sostituente disolfuro, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile (nella presente indicato anche come C_{1-7} alchil disolfuro). Esempi di gruppi C_{1-7} alchil disolfuro includono, in via non limitativa, $-SSCH_3$ e $-SSCH_2CH_3$.

Solfino (solfinile, solfossido): $-S(=O)R$, in cui R è un sostituente solfino, per esempio, un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi solfino includono, in via non limitativa, $-S(=O)CH_3$ e $-S(=O)CH_2CH_3$.

Solfone (solfonile): $-S(=O)_2R$, in cui R è un sostituente solfone, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile, incluso, per esempio, un gruppo C_{1-7} alchile fluorurato o perfluorurato. Esempi di gruppi solfone includono, in via non limitativa, $-S(=O)_2CH_3$ (metansolfonile, mesile), $-S(=O)_2CF_3$ (triflile), $-S(=O)_2CH_2CH_3$ (esile), $-S(=O)_2C_4F_9$ (nonafile), $-S(=O)_2CH_2CF_3$ (tresile), $-S(=O)_2CH_2CH_2NH_2$ (taurile), $-S(=O)_2Ph$ (fenilsolfonile, besile), 4-metilfenilsolfonile (tosile), 4-clorofenilsolfonile (closile), 4-bromofenilsolfonile (brosile), 4-nitrofenile (nosile), 2-

naftalensolfonato (napsile) e 5-dimetilammino-naftalene-1-ilsolfonato (dansile).

Acido solfinico (solfino): $-S(=O)OH$, $-SO_2H$.

Acido solfonico (solfonico): $-S(=O)_2OH$, $-SO_3H$.

Solfinato (acido solfinico estere): $-S(=O)OR$; in cui R è un sostituente solfinato, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi solfinato includono, in via non limitativa, $-S(=O)OCH_3$ (metossisolfinile; metil solfinato) e $-S(=O)OCH_2CH_3$ (etossisolfinile; etil solfinato).

Solfonato (acido solfonico estere): $-S(=O)_2OR$, in cui R è un sostituente solfonato, per esempio, un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi solfonato includono, in via non limitativa, $-S(=O)_2OCH_3$ (metossisolfonile; metil solfonato) e $-S(=O)_2OCH_2CH_3$ (etossisolfonile; etil solfonato).

Solfinilossi: $-OS(=O)R$, in cui R è un sostituente solfinilossi, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi solfinilossi includono, in via non limitativa, $-OS(=O)CH_3$ e $-OS(=O)CH_2CH_3$.

Solfonilossi: $-OS(=O)_2R$, in cui R è un sostituente solfonilossi, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di

gruppi solfonilossi includono, in via non limitativa, $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ (mesilato) e $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (esilato).

Solfato: $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OR}$; in cui R è un sostituito solfato, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclice o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi solfato includono, in via non limitativa, $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OCH}_3$ e $-\text{SO}(=\text{O})_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$.

Solfamide (solfamoile; acido solfinico amide; solfinamide): $-\text{S}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$, in cui R^1 e R^2 sono sostituenti amminici indipendentemente, come definito per gruppi ammino. Esempi di gruppi solfamido includono, in via non limitativa, $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, e $-\text{S}(=\text{O})\text{NHPh}$.

Solfonamido (solfinamoile; acido solfonico amide: solfamido): $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^1\text{R}^2$, in cui R^1 e R^2 sono sostituenti amminici indipendentemente, come definito per gruppi ammino. Esempi di gruppi solfonamido includono, in via non limitativa, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}_2$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, e $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NHPh}$. Solfammino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$, in cui R^1 è un sostituito ammino, come definito per gruppi ammino. Esempi di gruppi solfamido includono, in via non limitativa, $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{OH}$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$.

Solfonammino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$, in cui R^1 è un sostituito ammino, come definito per gruppi ammino, e R è un sostituito solfonammino, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclice o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di

gruppi solfonammino includono, in via non limitativa, $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$.

Solfinammino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})\text{R}$, in cui R^1 è un sostituito ammino, come definito per gruppi ammino, e R è un sostituito solfinammino, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclice o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile. Esempi di gruppi solfinammino includono, in via non limitativa, $-\text{NHS}(=\text{O})\text{CH}_3$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$.

Fosfino (fosfina): $-\text{PR}_2$, in cui R è un sostituito fosfino, per esempio, $-\text{H}$, un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclice o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente $-\text{H}$, un gruppo C_{1-7} alchile, o un gruppo C_{5-20} arile. Esempi di gruppi fosfino includono, in via non limitativa, $-\text{PH}_2$, $-\text{P}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{t-Bu})_2$, e $-\text{P}(\text{Ph})_2$.

Fosfo: $-\text{P}(=\text{O})_2$.

Fosfinile (ossido di fosfina): $-\text{P}(=\text{O})\text{R}_2$, in cui R è un sostituito fosfinile, per esempio un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclice o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente un gruppo C_{1-7} alchile o un gruppo C_{5-20} arile. Esempi di gruppi fosfinile includono, in via non limitativa, $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{t-BU})_2$, e $-\text{P}(=\text{O})(\text{Ph})_2$.

Acido fosfonico (fosfono): $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$.

Fosfonato (estere fosfono): $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$, in cui R è un sostituito fosfonato, per esempio $-\text{H}$, un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclice o un C_{5-20} gruppo arile, preferibilmente $-\text{H}$, un gruppo C_{1-7} alchile o un gruppo C_{5-20} arile. Esempi di gruppi

fosfonato includono, in via non limitativa, $-P(=O)(OCH_3)_2$, $-P(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-P(=O)(O-t-Bu)_2$, e $-P(=O)(OPh)_2$.

Acido fosforico (fosfonoossi): $-OP(=O)(OH)_2$.

Fosfato (estere fosfonoossi): $-OP(=O)(OR)_2$, in cui R è un sostituente fosfato, per esempio -H, un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un C_{5-20} gruppo arile, preferibilmente -H, un gruppo C_{1-7} alchile o un gruppo C_{5-20} arile. Esempi di gruppi fosfato includono, in via non limitativa, $-OP(=O)(OCH_3)_2$, $-OP(=O)(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(=O)(O-t-Bu)_2$, e $-OP(=O)(OPh)_2$.

Acido fosforoso: $-OP(OH)_2$.

Fosfito: $-OP(OR)_2$, in cui R è un sostituente fosfito, per esempio -H, un gruppo C_{1-7} alchile, un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente -H, un gruppo C_{1-7} alchile o un gruppo C_{5-20} arile. Esempi di gruppi fosfiti includono, in via non limitativa, $-OP(OCH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)_2$, $-OP(O-t-Bu)_2$, e $-OP(OPh)_2$.

Fosforamidito: $-OP(OR^1)-NR^2_2$, in cui R^1 e R^2 sono sostituenti fosforamidito, per esempio -H, un gruppo C_{1-7} alchile (facoltativamente sostituito), un gruppo C_{3-20} eterociclicile o un gruppo C_{5-20} arile, preferibilmente -H, un gruppo C_{1-7} alchile o un gruppo C_{5-20} arile. Esempi di gruppi di fosforamidito includono, in via non limitativa, $-OP(OCH_2CH_3)-N(CH_3)_2$, $-OP(OCH_2CH_3)-N(i-Pr)_2$, e $-OP(OCH_2CH_2CN)-N(i-Pr)_2$.

Fosforamidato: $-OP(=O)(OR^1)-NR^2_2$, in cui R^1 e R^2 sono sostituenti fosforamidato, per esempio -H, un gruppo C_{1-7} alchile (facoltativamente sostituito), un C_{3-20} gruppo eterociclicile, o un

gruppo C₅₋₂₀ arile, preferibilmente -H, un gruppo C₁₋₇ alchile o un gruppo C₅₋₂₀ arile. Esempi di gruppi fosforamidato includono, in via non limitativa, -OP(=O)(OCH₂CH₃)-N(CH₃)₂, -OP(=O)(OCH₂CH₃)-N(i-Pr)₂, e -OP(=O)(OCH₂CH₂CN)-N(i-Pr)₂.

Alchilene

C₃₋₁₂ alchilene: Il termine "C₃₋₁₂ alchilene", come usato nella presente, si riferisce a una frazione bidentata ottenuta rimuovendo due atomi di idrogeno, entrambi dallo stesso atomo di carbonio, o uno da ciascuno di due differenti atomi di carbonio, di un composto idrocarburico avente da 3 a 12 atomi di carbonio (se non diversamente specificato), che può essere alifatico o aliciclico e che può essere saturo, parzialmente insaturo o completamente insaturo. Pertanto, il termine "alchilene" include le sottoclassi alchenilene, alchinilene, cicloalchilene, eccetera, discusse in seguito.

Esempi di gruppi C₃₋₁₂ alchilene saturi lineari includono, in via non limitativa, -(CH₂)_n- in cui n è un numero intero da 3 a 12, per esempio -CH₂CH₂CH₂- (propilene), -CH₂CH₂CH₂CH₂- (butilene), -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- (pentilene) e -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- (eptilene).

Esempi di gruppi C₃₋₁₂ alchilene saturi ramificati includono, in via non limitativa, -CH(CH₃)CH₂-, -CH(CH₃)CH₂CH₂-, -CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH(CH₃)CH₂-, -CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂-, -CH(CH₂CH₃)-, -CH(CH₂CH₃)CH₂-, e -CH₂CH(CH₂CH₃)CH₂-.

Esempi di gruppi C₃₋₁₂ alchilene lineari parzialmente insaturi (gruppi C₃₋₁₂ alchenilene e alchinilene) includono, in via non limitativa, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-

CH_2- , $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, e $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-$.

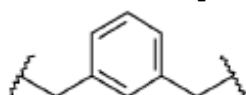
Esempi di gruppi C_{3-12} alchilene ramificati parzialmente insaturi (gruppi C_{3-12} alchenilene e alchinilene) includono, in via non limitativa, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-$, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ e $-\text{C}=\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$.

Esempi di gruppi C_{3-12} alchilene aliciclici saturi (C_{3-12} cicloalchileni) includono, in via non limitativa, ciclopentilene (per esempio ciclopent-1,3-ilene) e cicloesilene (per esempio cicloes-1,4-ilene).

Esempi di gruppi C_{3-12} alchilene aliciclici parzialmente insaturi (C_{3-12} cicloalchileni) includono, in via non limitativa, ciclopentenilene (per esempio 4-ciclopenten-1,3-ilene), cicloesenilene (per esempio 2-cicloesene-1,4-ilene; 3-cicloesene-1,2-ilene; 2,5-cicloesadiene-1,4-ilene).

Laddove il gruppo C_{3-12} alchilene è interrotto da un eteroatomo, il pedice si riferisce al numero di atomi nella catena inclusi gli eteroatomi. Per esempio, la catena $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4-$ potrà essere un gruppo C_5 .

Laddove il gruppo C_{3-12} alchilene è interrotto da un eteroatomo, il pedice si riferisce al numero di atomi direttamente nella catena includente l'anello aromatico. Per esempio, la catena



potrà essere un gruppo C_5 .

Unità Ligando

L'unità Ligando può essere di qualsiasi tipo e includere una proteina, un polipeptide, un peptide e un agente non peptidico che si lega specificamente a una molecola bersaglio. In alcune forme di realizzazione, l'unità Ligando può essere una proteina, un polipeptide o un peptide. In alcune forme di realizzazione, l'unità Ligando può essere un polipeptide ciclico. Queste unità Ligando possono includere anticorpi o un frammento di un anticorpo che contiene almeno un sito di legame molecolare bersaglio, linfocchine, ormoni, fattori di crescita o qualsiasi altra molecola o sostanza legante cellule che può legarsi specificamente a un bersaglio.

I termini "si lega specificamente" e "legame specifico" si riferiscono al legame di un anticorpo o altra proteina, polipeptide o peptide a una molecola predeterminata (per esempio un antigene). Tipicamente, l'anticorpo o altra molecola si lega con un'affinità di almeno circa $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, e si lega alla molecola predeterminata con un'affinità che è almeno due volte maggiore della sua affinità per il legame a una molecola aspecifica (per esempio, BSA, caseina) differente dalla molecola predeterminata o da una molecola strettamente correlata.

Esempi di unità Ligando includono tali agenti descritti per l'uso in WO 2007/085930.

In alcune forme di realizzazione, l'unità Ligando è un agente legante cellule che si lega a un target extracellulare su una cellula. Tale agente legante cellulare può essere una proteina, un

polipeptide, un peptide o un agente non peptidico. In alcune forme di realizzazione, l'agente legante cellule può essere una proteina, un polipeptide o un peptide. In alcune forme di realizzazione, l'agente legante cellule può essere un polipeptide ciclico. L'agente legante cellule può anche essere un anticorpo o un frammento legante l'antigene di un anticorpo. Pertanto, in una forma di realizzazione, la presente invenzione fornisce un coniugato farmaco-anticorpo (ADC).

Agente legante cellule

Un agente legante cellule può essere di qualsiasi tipo e includere peptidi e non peptidi. Questi possono includere anticorpi o un frammento di un anticorpo che contiene almeno un sito di legame, linfocine, ormoni, mimetici ormonali, vitamine, fattori di crescita, molecole di trasporto di nutrienti o qualsiasi altra molecola o sostanza di legante cellule.

Peptidi

In una forma di realizzazione, l'agente legante cellule è un peptide lineare o ciclico comprendente 4-30, preferibilmente 6-20, residui di amminoacidi contigui. In questa forma di realizzazione, è preferito che un agente legante cellule sia collegato a un composto di pirrolobenzodiazepina monomero o dimerico.

In una forma di realizzazione, l'agente legante cellule comprende un peptide che lega l'integrina $\alpha_v\beta_6$. Il peptide può essere selettivo per $\alpha_v\beta_6$ rispetto a XYS.

In una forma di realizzazione, l'agente legante cellule comprende il polipeptide A20FMDV-Cys. L'A20FMDV-Cys ha la sequenza:

NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. In alternativa, può essere usata una variante della sequenza A20FMDV-Cys in cui uno, due, tre, quattro, cinque, sei, sette, otto, nove o dieci residui amminoacidici sono sostituiti con un altro residuo amminoacidico. Inoltre, il polipeptide può avere la sequenza NAVXXXXXXXXXXXXXXXXXRTC.

Anticorpi

Il termine "anticorpo" nel presente contesto è usato nel senso più ampio e copre specificamente gli anticorpi monoclonali, gli anticorpi policlonali, i dimeri, i multimeri, gli anticorpi multispecifici (per esempio, gli anticorpi bispecifici) e i frammenti anticorpali, a condizione che esibiscano l'attività biologica desiderata (Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Gli anticorpi possono essere murini, umani, umanizzati, chimerici o derivati da altre specie. Un anticorpo è una proteina generata dal sistema immunitario in grado di riconoscere e legarsi a un antigene specifico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Un antigene target ha generalmente numerosi siti di legame, chiamati anche epitopi, riconosciuti dai CDR su molteplici anticorpi. Ciascun anticorpo che si lega specificamente a un epitopo differente ha una struttura differente. Pertanto, un antigene può avere più di un anticorpo corrispondente. Un anticorpo include una molecola di immunoglobulina a lunghezza intera o una porzione immunologicamente attiva di una molecola di immunoglobulina a lunghezza intera, vale a dire, una molecola che contiene un sito di legame dell'antigene che

lega immunospecificamente un antigene di un bersaglio di interesse o una relativa parte, tali bersagli includendo, in via non limitativa, cellule di cancro o cellule che producono anticorpi autoimmuni associati a una malattia autoimmune. L'immunoglobulina può essere di qualsiasi tipo (per esempio IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), classe (per esempio IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o sottoclasse di molecola di immunoglobulina. Le immunoglobuline possono essere derivate da qualsiasi specie, incluso di origine umana, murina o di coniglio.

I "frammenti di anticorpo" comprendono una porzione di un anticorpo a tutta lunghezza, generalmente il dominio di legame all'antigene o la relativa regione variabile. Esempi di frammenti anticorpali includono frammenti Fab, Fab', F(ab')₂ e scFv; diabody; anticorpi lineari; frammenti prodotti da una libreria di espressione Fab, anticorpi anti-idiotipo (anti-Id), CDR (regione determinante la complementarità) e frammenti leganti l'epitopo di uno qualsiasi dei precedenti che si legano immunospecificamente agli antigeni delle cellule cancerose, antigeni virali o antigeni microbici, molecole anticorpali a catena singola; e anticorpi multispecifici formati da frammenti di anticorpo.

Il termine "anticorpo monoclonale" come usato nella presente, si riferisce a un anticorpo ottenuto da una popolazione di anticorpi sostanzialmente omogenei, vale a dire, i singoli anticorpi costituenti la popolazione sono identici tranne che per possibili mutazioni presenti in natura, che possono essere presenti in quantità

minori. Gli anticorpi monoclonali sono altamente specifici, essendo diretti contro un singolo sito antigenico. Inoltre, a differenza delle preparazioni di anticorpo policlonale che includono anticorpi differenti diretti contro determinanti (epitopi) differenti, ciascun anticorpo monoclonale è diretto contro un singolo determinante sull'antigene. Oltre alla loro specificità, gli anticorpi monoclonali sono vantaggiosi in quanto possono essere sintetizzati non contaminati da altri anticorpi. Il modificatore "monoclonale" indica che il carattere dell'anticorpo appartiene a una popolazione sostanzialmente omogenea di anticorpi, e non deve essere interpretato come la necessità di produrre un anticorpo mediante un qualsiasi metodo specifico. Per esempio, gli anticorpi monoclonali da usare secondo la presente invenzione possono essere prodotti con il metodo dell'ibridoma descritto per la prima volta da Kohler et al (1975) Nature 256:495 o può essere prodotto con metodi del DNA ricombinante (si veda, US 4816567). Gli anticorpi monoclonali possono anche essere isolati da librerie fagiche anticorpali usando, per esempio, le tecniche descritte in Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597 o da topi transgenici recanti un sistema immunoglobulinico completamente umano (Lonberg (2008) Curr. Opinion 20(4):450-459).

Gli anticorpi monoclonali nel presente documento includono specificamente anticorpi "chimerici" in cui una porzione della catena pesante e/o leggera è identica o omologa a sequenze corrispondenti in anticorpi derivati da una specie specifica o appartenenti a una

classe o sottoclasse anticorpale specifica, mentre il rimanente dell'una o più catene è identico o omologo a sequenze corrispondenti in anticorpi derivati da un'altra specie o appartenenti a un'altra classe o sottoclasse anticorpale, nonché frammenti di tali anticorpi, a condizione che essi presentino l'attività biologica desiderata (US 4816567; e Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Gli anticorpi chimerici includono anticorpi "primatizzati" comprendenti sequenze leganti l'antigene a dominio variabile derivate da un primate non umano (per esempio scimmia del vecchio continente o gorilla) e sequenze di regioni costanti umane.

Un "anticorpo intatto" nella presente è uno che comprende un dominio VL e VH, nonché un dominio costante di catena leggera (CL) e domini costanti di catena pesante, CH1, CH2 e CH3. I domini costanti possono essere domini costanti di sequenza nativa (per esempio, domini costanti di sequenza nativa umana) o una relativa variante di sequenza amminoacidica. L'anticorpo intatto può avere una o più "funzioni effettrici", che si riferiscono a quelle attività biologiche attribuibili alla regione Fc (una regione Fc di sequenza nativa o una regione Fc variante della sequenza amminoacidica) di un anticorpo. Esempi di funzioni effettrici di anticorpi includono il legame a Clq; citotossicità dipendente da complemento; legame del recettore Fc; citotossicità cellulo-mediata dipendente da anticorpo (ADCC); fagocitosi; e giù la regolazione dei recettori della superficie cellulare come recettore delle cellule B e BCR.

In funzione della sequenza amminoacidica del dominio costante delle loro catene pesanti, gli anticorpi intatti possono essere assegnati a differenti "classi". Esistono cinque classi principali di anticorpi intatti: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e molte di queste possono essere ulteriormente suddivise in "sottoclassi" (isotipi), per esempio, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. I domini costanti di catena pesante che corrispondono alle differenti classi di anticorpi sono chiamati rispettivamente, α , δ , ϵ , γ , e μ . Le strutture di subunità e le configurazioni tridimensionali delle differenti classi di immunoglobuline sono ben note.

Umanizzazione

Tecniche per ridurre l'immunogenicità in vivo di un anticorpo non umano o di un frammento anticorpale includono quelle chiamate "umanizzazione".

Un "anticorpo umanizzato" si riferisce a un polipeptide comprendente almeno una porzione di una regione variabile modificata di un anticorpo umano in cui una porzione della regione variabile, preferibilmente una porzione sostanzialmente inferiore al dominio variabile umano intatto, è stata sostituita dalla sequenza corrispondente di una specie non umana e in cui la regione variabile modificata è legata ad almeno un'altra parte di un'altra proteina, preferibilmente la regione costante di un anticorpo umano. L'espressione "anticorpi umanizzati" include anticorpi umani in cui uno o più residui amminoacidici nella regione che determinano la

complementarità ("CDR") e/o uno o più residui amminoacidici nella regione della struttura ("FW" o "FR") sono sostituiti con amminoacidi residui di siti analoghi nei roditori o altri anticorpi non umani. L'espressione "anticorpo umanizzato" include anche una variante di sequenza amminoacidica immunoglobulinica o un relativo frammento che include una FR avente sostanzialmente la sequenza amminoacidica di un'immunoglobulina umana e una CDR avente sostanzialmente la sequenza amminoacidica di un'immunoglobulina non umana.

Le forme "umanizzate" di anticorpi non umani (per esempio, murine) sono anticorpi chimerici che contengono una sequenza minima derivata da immunoglobuline non umane. Oppure, considerato in un altro modo, un anticorpo umanizzato è un anticorpo umano che contiene anche sequenze selezionate di anticorpi non umani (per esempio murini) in sostituzione delle sequenze umane. Un anticorpo umanizzato può includere sostituzioni conservative di amminoacidi o residui non naturali della stessa specie o di specie differenti che non alterano in modo significativo il suo legame e/o l'attività biologica. Tali anticorpi sono anticorpi chimerici che contengono una sequenza minima derivata da immunoglobuline non umane.

Esistono una serie di tecniche di umanizzazione, tra cui "innesto di CDR", "selezione guidata", "deimmunizzazione", "resurfacing" (noto anche come "veneering"), "anticorpi compositi", "ottimizzazione del contenuto di stringhe umane" e shuffling di cornice.

Innesto di CDR

In questa tecnica, gli anticorpi umanizzati sono immunoglobuline umane (anticorpo ricevente) in cui i residui di una regione determinante la complementarità (CDR) dell'anticorpo ricevente sono sostituiti con residui di una CDR di una specie non umana (anticorpo donatore) come topo, ratto, cammello, bovino, capra o coniglio avente le proprietà desiderate (in effetti, le CDR non umane vengono "innestati" sulla cornice umana). In alcuni casi, i residui di regione cornice (FR) dell'immunoglobulina umana sono sostituiti con corrispondenti residui non umani (ciò può accadere quando, per esempio, un particolare residuo FR ha un effetto significativo sul legame dell'antigene).

Inoltre, gli anticorpi umanizzati possono comprendere residui che non si trovano né nell'anticorpo destinatario né nelle CDR o nelle sequenze di cornice importate. Queste modifiche sono realizzate per perfezionare e massimizzare ulteriormente la prestazione dell'anticorpo. Pertanto, in generale, l'anticorpo umanizzato comprenderà tutto il dominio di almeno uno, e in un aspetto, due, domini variabili, in cui tutte le anse ipervariabili corrispondono a quelle di un'immunoglobulina non umana e tutte o sostanzialmente tutte le regioni FR sono quelle di una sequenza di un'immunoglobulina umana. Facoltativamente l'anticorpo umanizzato comprenderà anche almeno una porzione di una regione costante di immunoglobulina (Fc), quella di un'immunoglobulina umana.

Selezione guidata

Il metodo consiste nel combinare il dominio V_H o V_L di un dato anticorpo non umano specifico per un particolare epitopo con una libreria di V_H o V_L umana e i domini V umani specifici sono selezionati contro l'antigene di interesse. Questa V_H umana selezionata viene quindi combinato con una libreria V_L per generare una combinazione $V_H \times V_L$ completamente umana. Il metodo è descritto in Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994) 899-903.

Anticorpi compositi

In questo metodo, due o più segmenti della sequenza amminoacidica di un anticorpo umano sono combinati all'interno della molecola anticorpale finale. Sono costruiti combinando molteplici segmenti di sequenza V_H e V_L umani in combinazioni che limitano o evitano gli epitopi delle cellule T umane nelle regioni V dell'anticorpo composito finale. Laddove richiesto, gli epitopi di cellula T sono limitati o evitati, scambiando segmenti di regione V che contribuiscono o codificano un epitopo di cellule T con segmenti alternativi che evitano gli epitopi di cellule T. Questo metodo è descritto in US 2008/0206239 A1.

Deimmunizzazione

Questo metodo prevede la rimozione di epitopi di cellule T umane (o di altre specie secondarie) dalle regioni V dell'anticorpo terapeutico (o altra molecola). La sequenza della regione V degli anticorpi terapeutici viene analizzata per la presenza di motivi

leganti MHC di classe II mediante, per esempio, il confronto con database di motivi leganti MHC (come il database "motivi" ospitato su www.wehi.edu.au). In alternativa, i motivi leganti MHC di classe II possono essere identificati usando metodi di threading computazionale come quelli ideati da Altuvia et al. (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)); in questi metodi, i peptidi sovrapposti consecutivi dalle sequenze della regione V stanno testando le loro energie di legame alle proteine di classe II MHC. Questi dati possono quindi essere combinati con informazioni su altre caratteristiche di sequenza che si riferiscono a peptidi presentati con successo, come anfipatia, motivi di Rothbard e siti di clivaggio per la catepsina B e altri enzimi di processamento.

Una volta identificati potenziali epitopi di cellule T di seconda specie (per esempio Umani), questi vengono eliminati dall'alterazione di uno o più amminoacidi. Gli amminoacidi modificati si trovano generalmente all'interno dell'epitopo a cellule T stesso, ma possono anche essere adiacenti all'epitopo in termini di struttura primaria o secondaria della proteina (e quindi potrebbero non essere adiacenti nella struttura primaria). Più tipicamente, l'alterazione avviene mediante sostituzione ma, in alcune circostanze, l'aggiunta o la delezione di amminoacidi sarà più appropriata.

Tutte le alterazioni possono essere realizzate con la tecnologia del DNA ricombinante, in modo che la molecola finale possa essere preparata mediante espressione da un ospite ricombinante usando metodi ben consolidati come la mutagenesi diretta del sito. Tuttavia,

è anche possibile l'uso della chimica proteica o di qualsiasi altro mezzo di alterazione molecolare.

Resurfacing

Questo metodo include:

- (a) determinare la struttura conformazionale della regione variabile dell'anticorpo non umano (per esempio roditore) (o di un relativo frammento) costruendo un modello tridimensionale della regione variabile dell'anticorpo non umano;
- (b) generare allineamenti di sequenza usando distribuzioni di accessibilità relativa da strutture cristallografiche a raggi X di un numero sufficiente di catene pesanti e leggere di regioni variabili di anticorpi non umani e umani per fornire una serie di posizioni della struttura di catene pesanti e leggere in cui le posizioni di allineamento sono identiche per il 98% al numero sufficiente di catene leggere e pesanti di anticorpi non umani;
- (c) definire per l'anticorpo non umano da umanizzare, un insieme di residui amminoacidici esposti a superficie della catena pesante e leggera usando l'insieme delle posizioni della struttura generate nella fase (b);
- (d) identificare da sequenze amminoacidiche anticorpali umani un insieme di residui amminoacidici esposti a superficie a catena pesante e leggera che è il più strettamente identico all'insieme di residui amminoacidici esposti a superficie definiti nella fase (c), in cui la catena pesante e leggera dell'anticorpo umano è o non è naturalmente accoppiata;

- (e) sostituire, nella sequenza amminoacidica dell'anticorpo non umano da umanizzare, l'insieme dei residui amminoacidici esposti alla superficie della catena pesante e leggera definiti nella fase (c) con l'insieme della superficie della catena pesante e leggera esposta residui amminoacidici identificati nella fase (d);
- (f) costruire un modello tridimensionale della regione variabile dell'anticorpo non umano risultante dalla sostituzione specificata nella fase (e);
- (g) identificare, confrontando i modelli tridimensionali costruiti nelle fasi (a) e (f), eventuali residui amminoacidici dagli insiemi identificati nelle fasi (c) o (d), che si trovano entro 5 Angstrom da qualsiasi atomo di qualsiasi residuo delle regioni determinanti la complementarità dell'anticorpo non umano da umanizzare; e
- (h) cambiare eventuali residui identificati nella fase (g) dal residuo amminoacidico umano non originale per definire in tal modo un insieme umanizzante anticorpi non umani di residui amminoacidici esposti in superficie; a condizione che la fase (a) non debba essere condotta per prima, ma debba essere condotta prima della fase (g).

Superumanizzazione

Il metodo confronta la sequenza non umana con il repertorio genico funzionale della linea germinale umana. Sono selezionati quei geni umani che codificano strutture canoniche identiche o

strettamente correlate alle sequenze non umane. Quei geni umani selezionati con la più alta omologia all'interno delle CDR sono selezionati come donatori di FR. Infine, le CDR non umane vengono innestate su queste FR umane. Questo metodo è descritto in WO 2005/079479 A2.

Ottimizzazione del contenuto di stringhe umane

Questo metodo confronta la sequenza non umana (per esempio il topo) con il repertorio di geni germinali umani e le differenze sono classificate come contenuto di stringhe umane (HSC, Human String Content) che quantifica una sequenza a livello di potenziali epitopi delle cellule MHC/T. La sequenza target viene quindi umanizzata massimizzando le sue HSC anziché usare una misura di identità globale per generare molteplici varianti umanizzate (descritto in Molecular Immunology, 44, (2007) 1986-1998).

Shuffling di cornice

Le CDR dell'anticorpo non umano sono fuse in cornice con pool di cDNA che racchiudono tutte le cornici di geni germinali umani di catena leggera e pesante noti. Gli anticorpi umanizzati vengono quindi selezionati, per esempio, dalla panoramica della libreria anticorpale di esposizione su fago. Ciò è descritto in Methods 36, 43-60 (2005).

Esempi di agenti leganti cellule includono quegli agenti descritti per l'uso in WO 2007/085930.

Di seguito sono elencati gli antigeni associati a tumore e anticorpi affini da usare nelle forme di realizzazione della presente invenzione.

ANTIGENI ASSOCIATI A TUMORE E ANTICORPI AFFINI

(1) BMPR1B (recettore di proteina morfogenetica ossea-tipo IB)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_001203

Genbank versione n. NM_001203.2 GI: 169790809

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 23, 2012 02:06 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_001194

Genbank versione n. NP_001194.1 GI:4502431

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 23, 2012 02:06 PM

Riferimenti incrociati

ten Dijke, P., et al Science 264 (5155): 101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997)); WO2004/063362 (Rivendicazione 2); WO2003/042661 (Rivendicazione 12);

US2003/134790-A1 (Pagina 38-39); WO2002/102235 (Rivendicazione 13; Pagina 296);

WO2003/055443

(Pagina 91-92); WO2002/99122 (Esempio 2; Pagina 528-530); WO2003/029421 (Rivendicazione 6); WO2003/024392 (Rivendicazione 2; Figura 112); WO2002/98358 (Rivendicazione 1; Pagina 183); WO2002/54940 (Pagina 100-101); WO2002/59377 (Pagina 349-350); WO2002/30268 (Rivendicazione 27; Pagina 376); WO2001/48204 (Esempio;

Marco Giovanni Mari
USBM-CPI-090

Figura 4); NP_001194 Recettore della proteina ossea morfogenetica, tipo IB/pid=NP_001194.1.; MIM:603248; AY065994

(2) E16 (LAT1, SLC7A5)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_003486

Genbank versione n. NM_003486.5 GI: 71979931

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 27, 2012 12:06 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_003477

Genbank versione n. NP_003477.4 GI: 71979932

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 27, 2012 12:06 PM

Riferimenti incrociati

Biochem. Biophys. Res.

Commun. 255 (2), 283-288 (1999), *Nature* 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (16):11267-11273); WO2004/048938 (Esempio 2); WO2004/032842 (Esempio IV); WO2003/042661 (Rivendicazione 12); WO2003/016475 (Rivendicazione 1); WO2002/78524 (Esempio 2); WO2002/99074 (Rivendicazione 19; Pagina 127-129); WO2002/86443 (Rivendicazione 27; Pagine 222, 393); WO2003/003906 (Rivendicazione 10; Pagina 293); WO2002/64798 (Rivendicazione 33; Pagina 93-95); WO2000/14228 (Rivendicazione 5; Pagina 133-136); US2003/224454 (Figura 3); WO2003/025138 (Rivendicazione 12; Pagina 150); NP_003477 famiglia di carrier di soluto 7 (trasportatore di amminoacidi cationici, sistema y), elemento 5 /pid=NP_003477.3 - Homo sapiens;

MIM:600182;; NM_015923.

(3) STEAP1 (antigene epiteliale transmembrana sei prostatico)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_012449

Genbank versione n. NM_012449.2 GI: 22027487

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 9, 2012 02:57 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_036581

Genbank versione n. NP_036581.1 GI: 9558759

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 9, 2012 02:57 PM

Riferimenti incrociati

Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523-14528); WO2004/065577 (Rivendicazione 6); WO2004/027049 (Figura 1L); EP1394274 (Esempio 11); WO2004/016225 (Rivendicazione 2); WO2003/042661 (Rivendicazione 12); US2003/157089 (Esempio 5); US2003/185830 (Esempio 5); US2003/064397 (Figura 2); WO2002/89747 (Esempio 5; Pagina 618-619); WO2003/022995 (Esempio 9; Figura 13A, Esempio 53; Pagina 173, Esempio 2; Figura 2A); antigene epiteliale transmembrana prostatico sei; MIM:604415.

(4) 0772P (CA125, MUC16)

Nucleotide

Accesso Genbank n. AF361486

Genbank versione n. AF361486.3 GI: 34501466

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 07:56 AM

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAK74120

Genbank versione n. AAK74120.3 GI: 34501467

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 07:56 AM

Riferimenti incrociati

J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); WO2004/045553
(Rivendicazione 14); WO2002/92836 (Rivendicazione 6; figura 12);
WO2002/83866 (Rivendicazione 15; Pagina 116-121); US2003/124140
(Esempio 16); GI:34501467;

(5) *MPF (MPF, MSLN, SMR, fattore di potenziamento dei megacariociti, mesotelina)*

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_005823

Genbank versione n. NM_005823.5 GI: 293651528

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 2, 2012 01:47 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_005814

Genbank versione n. NP_005814.2 GI: 53988378

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 2, 2012 01:47 PM

Riferimenti incrociati

Yamaguchi, N., et al Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc.
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-
21990 (1995)); WO2003/101283 (Rivendicazione 14); (WO2002/102235

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

(Rivendicazione 13; Pagina 287-288); WO2002/101075 (Rivendicazione 4; Pagina 308-309); WO2002/71928 (Pagina 320-321); WO94/10312 (Pagina 52-57); IM:601051.

(6) *Napi3b* (*NAPI-3B*, *NPTIIb*, *SLC34A2*, famiglia di carrier di soluti 34 (fosfato di sodio), elemento 2, carrier di fosfato di sodio di tipo II 3b)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_006424

Genbank versione n. NM_006424.2 GI: 110611905

Data di aggiornamento record Genbank: Lug 22, 2012 03:39 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_006415

Genbank versione n. NP_006415.2 GI: 110611906

Data di aggiornamento record Genbank: Lug 22, 2012 03:39 PM

Riferimenti incrociati

J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582); WO2004/022778 (Rivendicazione 2); EP1394274 (Esempio 11); WO2002/102235 (Rivendicazione 13; Pagina 326); EP0875569 (Rivendicazione 1; Pagina 17-19); WO2001/57188 (Rivendicazione 20; Pagina 329); WO2004/032842 (Esempio IV); WO2001/75177 (Rivendicazione 24; Pagina 139-140); MIM:604217.

(7) *Sema 5b* (*FLJ10372*, *KIAA1445*, *Mm.42015*, *SEMA5B*, *SEMAG*, *Semaforina 5b Hlog*, dominio sema, sette ripetizioni di trombospondina (tipo 1 e

simil tipo 1), dominio transmembrana (TM) e dominio citoplasmatico corto (semaforina) 5B)

Nucleotide

Accesso Genbank n. AB040878

Genbank versione n. AB040878.1 GI: 7959148

Data di aggiornamento record Genbank: Ago 2, 2006 05:40 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. BAA95969

Genbank versione n. BAA95969.1 GI: 7959149

Data di aggiornamento record Genbank: Ago 2, 2006 05:40 PM

Riferimenti incrociati

Nagase T., et al (2000) DNA Res. 7 (2):143-150); WO2004/000997 (Rivendicazione 1); WO2003/003984 (Rivendicazione 1); WO2002/06339 (Rivendicazione 1; Pagina 50); WO2001/88133 (Rivendicazione 1; Pagina 41-43, 48-58); WO2003/054152 (Rivendicazione 20); WO2003/101400 (Rivendicazione 11); Accesso: Q9P283; Genew; HGNC:10737 (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, RIKEN cDNA 2700050C12 gene)

Nucleotide

Accesso GeneBank n AY358628

Genbank versione n. AY358628.1 GI:37182377

Data di aggiornamento record Genbank: Dic 1, 2009 04:15 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAQ88991

Genbank versione n. AAQ88991.1 GI: 37182378

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Data di aggiornamento record Genbank: Dic 1, 2009 04:15 AM

Riferimenti incrociati

Ross et al (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; US2003/129192
(Rivendicazione 2); US2004/044180 (Rivendicazione 12); US2004/044179
(Rivendicazione 11); US2003/096961 (Rivendicazione 11); US2003/232056
(Esempio 5); WO2003/105758 16 (Rivendicazione 12); US2003/206918
(Esempio 5); EP1347046 (Rivendicazione 1); WO2003/025148
(Rivendicazione 20); GI:37182378.

(9) *ETBR (recettore dell'endotelina di tipo B)*

Nucleotide

Accesso Genbank n. AY275463

Genbank versione n. AY275463.1 GI: 30526094

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 02:26 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAP32295

Genbank versione n. AAP32295.1 GI: 30526095

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 02:26 AM

Riferimenti incrociati

Nakamuta M., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39,
1991; Ogawa Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255,
1991; Arai H., et al Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et
al J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M.,
et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy
N.A., et al J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al
J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al Gene

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., et al J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., et al Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., et al Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al, *Hum. Mol. Genet.* 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et al *Hum. Mol. Genet.* 5:351-354, 1996; Amiel J., et al *Hum. Mol. Genet.* 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et al *Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al *Hum. Genet.* 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al *Mol. Med.* 7, 115-124, 2001; Pingault V., et al (2002) *Hum. Genet.* 111, 198-206; WO2004/045516 (Rivendicazione 1); WO2004/048938 (Esempio 2); WO2004/040000 (Rivendicazione 151); WO2003/087768 (Rivendicazione 1); WO2003/016475 (Rivendicazione 1); WO2003/016475 (Rivendicazione 1); WO2002/61087 (Figura 1); WO2003/016494 (Figura 6); WO2003/025138 (Rivendicazione 12; Pagina 144); WO2001/98351 (Rivendicazione 1;

Pagina 124-125); EP0522868 (Rivendicazione 8; Figura 2); WO2001/77172 (Rivendicazione 1; Pagina 297-299); US2003/109676; US6518404 (Figura 3); US5773223 (Rivendicazione 1a; Col 31-34); WO2004/001004.

(10) MSG783 (RNF124, proteina ipotetica FLJ20315)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_017763

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Genbank versione n. NM_017763.4 GI: 167830482

Data di aggiornamento record Genbank: Lug 22, 2012 12:34 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_060233

Genbank versione n. NP_060233.3 GI: 56711322

Data di aggiornamento record Genbank: Lug 22, 2012 12:34 AM

Riferimenti incrociati

WO2003/104275 (Rivendicazione 1); WO2004/046342 (Esempio 2);
WO2003/042661 (Rivendicazione 12); WO2003/083074 (Rivendicazione 14;
Pagina 61); WO2003/018621 (Rivendicazione 1); WO2003/024392
(Rivendicazione 2; Figura 93); WO2001/66689 (Esempio 6);
LocusID:54894.

*(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gene 1
associato a cancro alla prostata, proteina 1 associata al cancro alla
prostata, antigene epiteliale transmembrana prostatico sei 2,
proteina transmembrana prostatica sei)*

Nucleotide

Accesso Genbank n. AF455138

Genbank versione n. AF455138.1 GI: 22655487

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 01:54 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAN04080

Genbank versione n. AAN04080.1 GI: 22655488

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 01:54 AM

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Riferimenti incrociati

Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002)); WO2003/087306;
US2003/064397 (Rivendicazione 1; Figura 1); WO2002/72596
(Rivendicazione 13; Pagina 54-55); WO2001/72962 (Rivendicazione 1;
Figura 4B); WO2003/104270 (Rivendicazione 11); WO2003/104270
(Rivendicazione 16); US2004/005598 (Rivendicazione 22); WO2003/042661
(Rivendicazione 12); US2003/060612 (Rivendicazione 12; Figura 10);
WO2002/26822 (Rivendicazione 23; Figura 2); WO2002/16429
(Rivendicazione 12; Figura 10); GI:22655488.

*(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canale cationico di
potenziale recettoriale transitorio, sottofamiglia M, elemento 4)*

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_017636

Genbank versione n. NM_017636.3 GI: 304766649

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 29, 2012 11:27 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_060106

Genbank versione n. NP_060106.2 GI: 21314671

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 29, 2012 11:27 AM

Riferimenti incrociati

Xu, X.Z., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-
10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278
(33):30813-30820 (2003)); US2003/143557 (Rivendicazione 4);
WO2000/40614 (Rivendicazione 14; Pagina 100-103); WO2002/10382
(Rivendicazione 1; figura 9A); WO2003/042661 (Rivendicazione 12);

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

WO2002/30268 (Rivendicazione 27; Pagina 391); US2003/219806 (Rivendicazione 4); WO2001/62794 (Rivendicazione 14; Figura 1A-D); MIM:606936.

(13) *CRIPTO* (*CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, fattore di crescita derivato da teratocarcinoma*)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_003212

Genbank versione n. NM_003212.3 GI: 292494881

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 23, 2012 02:27 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_003203

Genbank versione n. NP_003203.1 GI: 4507425

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 23, 2012 02:27 PM

Riferimenti incrociati

Ciccodicola, A., et al EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)); US2003/224411 (Rivendicazione 1); WO2003/083041 (Esempio 1); WO2003/034984 (Rivendicazione 12); WO2002/88170 (Rivendicazione 2; Pagina 52-53); WO2003/024392 (Rivendicazione 2; Figura 58); WO2002/16413 (Rivendicazione 1; Pagina 94-95, 105); WO2002/22808 (Rivendicazione 2; Figura 1); US5854399 (Esempio 2; Col 17-18); US5792616 (Figura 2); MIM:187395.

(14) CD21 (CR2 (recettore del complemento 2) o C3DR (recettore C3d/virus di Epstein Barr) o Hs. 73792)

Nucleotide

Accesso GeneBank n M26004

Marco Giovanni Mari
USBM-EP1-090

Genbank versione n. M26004.1 GI: 181939

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA35786

Genbank versione n. AAA35786.1 GI: 181940

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 AM

Riferimenti incrociati

Fujisaku et al (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125; Weis J.J., et al J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; WO2004/045520 (Esempio 4); US2004/005538 (Esempio 1); WO2003/062401 (Rivendicazione 9); WO2004/045520 (Esempio 4); WO91/02536 (Figura 9.1-9.9); WO2004/020595 (Rivendicazione 1); Accesso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

(15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (beta associata a immunoglobuline), B29)

Nucleotide

Accesso GeneBank n NM_000626

Genbank versione n. NM_000626.2 GI:90193589

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 26, 2012 01:53 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_000617

Genbank versione n. NP_000617.1 GI:11038674

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 26, 2012 01:53 PM

Riferimenti incrociati

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625); WO2004/016225 (Rivendicazione 2, figura 140); WO2003/087768, US2004/101874 (Rivendicazione 1, Pagina 102); WO2003/062401 (Rivendicazione 9); WO2002/78524 (Esempio 2); US2002/150573 (Rivendicazione 5, Pagina 15); US5644033; WO2003/048202 (Rivendicazione 1, pages 306 e 309); WO 99/58658, US6534482 (Rivendicazione 13, figura 17A/B); WO2000/55351 (Rivendicazione 11, pagine 1145-1146); MIM:147245 (16) *FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 contenente una proteina di ancoraggio di fosfatasi 1a), SPAP18, SPAP1C)*

Nucleotide

Accesso GeneBank n NM_030764

Genbank versione n. NM_030764.3 GI:227430280

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 30, 2012 12:30 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_110391

Genbank versione n. NP_110391.2 GI:19923629

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 30, 2012 12:30 AM

Riferimenti incrociati

AY358130); Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad.

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775;

WO2004/016225 (Rivendicazione 2); WO2003/077836; WO2001/38490 (Rivendicazione 5; Figura 18D-1-18D-2);

WO2003/097803 (Rivendicazione 12); WO2003/089624 (Rivendicazione 25);: MIM:606509.

(17) *HER2 (ErbB2)*

Nucleotide

Accesso GeneBank n M11730

Genbank versione n. M11730.1 GI:183986

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA75493

Genbank versione n. AAA75493.1 GI:306840

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 AM

Riferimenti incrociati

Coussens L., et al Science (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T., et al Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et al J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et al (1993) Genomics 15, 426-429; WO2004/048938 (Esempio 2); WO2004/027049 (Figura 11) WO2004/009622; WO2003/081210;

WO2003/089904 (Rivendicazione 9); WO2003/016475 (Rivendicazione 1); US2003/118592; WO2003/008537 (Rivendicazione 1); WO2003/055439

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

(Rivendicazione 29; Figura 1A-B); WO2003/025228 (Rivendicazione 37; figura 5C); WO2002/22636 (Esempio 13; Pagina 95-107); WO2002/12341 (Rivendicazione 68; figura 7); WO2002/13847 (Pagina 71-74); WO2002/14503 (Pagina 114-117); WO2001/53463 (Rivendicazione 2; Pagina 41-46); WO2001/41787 (Pagina 15); WO2000/44899 (Rivendicazione 52; figura 7); WO2000/20579

(Rivendicazione 3; Figura 2); US5869445 (Rivendicazione 3; Col 31-38); WO9630514 (Rivendicazione 2; Pagina 56-61); EP1439393 (Rivendicazione 7); WO2004/043361 (Rivendicazione 7); WO2004/022709; WO2001/00244 (Esempio 3; Figura 4); Accesso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1

ANTICORPI

Abbott: US20110177095

Per esempio, un anticorpo comprendente CDR aventi complessivamente almeno l'80% di identità di sequenza rispetto a CDR aventi sequenze amminoacidiche di SEQ ID NO:3 (CDR-H1), SEQ ID NO:4 (CDR-H2), SEQ ID NO:5 (CDR-H3), SEQ ID NO:104 e/o SEQ ID NO:6 (CDR-L1), SEQ ID NO:7 (CDR-L2), e SEQ ID NO:8 (CDR-L3), in cui l'anticorpo anti-HER2 o il frammento di legame anti-HER2 ha un'immunogenicità ridotta rispetto a un anticorpo avente una VH di SEQ ID NO:1 e una VL di SEQ ID NO:2.

Biogen: US20100119511

Per esempio, i numeri di accesso ATCC: PTA-10355, PTA-10356, PTA-10357, PTA-10358

Marco Giovanni Mari
USBM-EP1-090

Per esempio, una molecola anticorpale purificata che si lega a HER2 comprendente tutte e sei le CDR di un anticorpo selezionato dal gruppo costituito da BIIB71 F10 (SEQ ID NO:11, 13), BIIB69A09 (SEQ ID NO:15, 17); BIIB67F10 (SEQ ID NO:19, 21); BIIB67F11 (SEQ ID NO:23, 25), BIIB66A12 (SEQ ID NO:27, 29), BIIB66C01 (SEQ ID NO:31, 33), BIIB65C10 (SEQ ID NO:35, 37), BIIB65H09 (SEQ ID NO:39, 41) e BIIB65B03 (SEQ ID NO:43, 45), o CDR che sono identici o che non hanno più di due alterazioni da dette CDR.

Herceptin (Genentech) - US6.054.297; accesso ATCC n. CRL-10463 (Genentech)

Pertuzumab (Genentech)

US20110117097

per esempio, si veda SEQ ID n. 15 e 16, SEQ ID n. 17 e 18, SEQ ID n. 23 e 24 e numeri di accesso ATCC HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12697.

US20090285837

US20090202546

per esempio, numeri di accesso ATCC: HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12698.

US20060088523

- per esempio, numeri di accesso ATCC: HB-12215, HB-12216
- per esempio, un anticorpo comprendente sequenze amminoacidiche leggera variabile e pesante variabile rispettivamente in SEQ ID No. 3 e 4.

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

- per esempio, un anticorpo comprendente una sequenza amminoacidica di catena leggera selezionata tra SEQ ID No. 15 e 23 e una sequenza amminoacidica di catena pesante selezionata tra SEQ ID No. 16 e 24

US20060018899

- per esempio, numeri di accesso ATCC: (7C2) HB-12215, (7F3) HB-12216, (4D5) CRL-10463, (2C4) HB-12697.

- per esempio, un anticorpo comprendente la sequenza amminoacidica in SEQ ID No. 23, o una relativa variante deamidata e/o ossidata.

US2011/0159014

- per esempio, un anticorpo avente un dominio variabile di catena leggera comprendente le regioni ipervariabili di SEQ ID NO: 1".
- per esempio, un anticorpo avente un dominio variabile di catena leggera comprendente le regioni ipervariabili di SEQ ID NO: 2.

US20090187007

Glycotope: Anticorpo TrasGEX <http://www.glycotope.com/pipeline>

Per esempio, si veda International Joint Cancer Institute e Changhai Hospital Cancer Cent: HMTI-Fc Ab - Gao J., et al BMB Rep. 2009 Oct 31;42(10):636-41.

Symphogen: US20110217305

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

(18) NCA (CEACAM6)

Nucleotide

Marco Giovanni Mari
USBM-EP1-090

Accesso GeneBank n M18728

Genbank versione n. M18728.1 GI:189084

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:48 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA59907

Genbank versione n. AAA59907.1 GI:189085

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:48 AM

Riferimenti incrociati

Barnett T., et al Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002; WO2004/063709; EP1439393 (Rivendicazione 7); WO2004/044178 (Esempio 4); WO2004/031238; WO2003/042661 (Rivendicazione 12); WO2002/78524 (Esempio 2); WO2002/86443 (Rivendicazione 27; Pagina 427); WO2002/60317 (Rivendicazione 2); Accesso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1.

EMBL; M18728.

(19) MDP (DPEP1)

Nucleotide

Accesso GeneBank n. BC017023

Genbank versione n. BC017023.1 GI:16877538

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 6, 2012 01:00 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAH17023

Genbank versione n. AAH17023.1 GI:16877539

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 6, 2012 01:00 PM

Riferimenti incrociati

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002));
WO2003/016475 (Rivendicazione 1); WO2002/64798 (Rivendicazione 33;
Pagina 85-87); JP05003790 (Figura 6-8); WO99/46284 (Figura 9);
MIM:179780.

(20) *IL20R-alfa (IL20Ra, ZCYTOR7)*

Nucleotide

Accesso GeneBank n AF184971

Genbank versione n. AF184971.1 GI:6013324

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 10, 2010 10:00 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAF01320

Genbank versione n. AAF01320.1 GI:6013325

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 10, 2010 10:00 PM

Riferimenti incrociati

Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J.,
et al Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et al Cell 104, 9-19,
2001; Dumoutier L., et al J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-
Novak J., et al J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et
al (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., et al (2004) J.
Immunol. 172, 2006-2010; EP1394274 (Esempio 11); US2004/005320
(Esempio 5); WO2003/029262 (Pagina 74-75); WO2003/002717
(Rivendicazione 2; Pagina 63); WO2002/22153 (Pagina 45-47);
US2002/042366 (Pagina 20-21); WO2001/46261 (Pagina 57-59);

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

WO2001/46232 (Pagina 63-65); WO98/37193 (Rivendicazione 1; Pagina 55-59); Accesso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

(21) *Brevican* (BCAN, BEHAB)

Nucleotide

Accesso GeneBank n AF229053

Genbank versione n. AF229053.1 GI:10798902

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 12:58 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAG23135

Genbank versione n. AAG23135.1 GI:10798903

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 12:58 AM

Riferimenti incrociati

Gary S.C., et al Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; US2003/186372 (Rivendicazione 11); US2003/186373 (Rivendicazione 11); US2003/119131 (Rivendicazione 1; figura 52); US2003/119122 (Rivendicazione 1; figura 52); US2003/119126 (Rivendicazione 1); US2003/119121 (Rivendicazione 1; figura 52); US2003/119129 (Rivendicazione 1); US2003/119130 (Rivendicazione 1); US2003/119128 (Rivendicazione 1; figura 52); US2003/119125 (Rivendicazione 1); WO2003/016475 (Rivendicazione 1); WO2002/02634 (Rivendicazione 1)

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

Nucleotide

Accesso GeneBank n NM_004442

Marco Giovanni Mari
USBM-EPF-090

Genbank versione n. NM_004442.6 GI:111118979

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 8, 2012 04:43 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_004433

Genbank versione n. NP_004433.2 GI:21396504

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 8, 2012 04:43 PM

Riferimenti incrociati

Chan, J. e Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)); WO2003042661 (Rivendicazione 12); WO200053216 (Rivendicazione 1; Pagina 41); WO2004065576 (Rivendicazione 1); WO2004020583 (Rivendicazione 9); WO2003004529 (Pagina 128-132); WO200053216 (Rivendicazione 1; Pagina 42); MIM:600997.

(23) ASLG659 (B7h)

Nucleotide

Accesso Genbank n. AX092328

Genbank versione n. AX092328.1 GI:13444478

Data di aggiornamento record Genbank: Gen 26, 2011 07:37 AM

Riferimenti incrociati

US2004/0101899 (Rivendicazione 2); WO2003104399 (Rivendicazione 11); WO2004000221 (Figura 3); US2003/165504 (Rivendicazione 1); US2003/124140 (Esempio 2); US2003/065143 (figura 60); WO2002/102235 (Rivendicazione 13; Pagina 299); US2003/091580 (Esempio 2);

Marco Giovanni Mari
USBM-SP1-090

WO2002/10187 (Rivendicazione 6; Figura 10); WO2001/94641 (Rivendicazione 12; figura 7b); WO2002/02624 (Rivendicazione 13; Figura 1A-1B); US2002/034749 (Rivendicazione 54; Pagina 45-46); WO2002/06317 (Esempio 2; Pagina 320-321, Rivendicazione 34; Pagina 321-322); WO2002/71928 (Pagina 468-469); WO2002/02587 (Esempio 1; Figura 1); WO2001/40269 (Esempio 3; Pagine 190-192); WO2000/36107 (Esempio 2; Pagina 205-207); WO2004/053079 (Rivendicazione 12); WO2003/004989 (Rivendicazione 1); WO2002/71928 (Pagina 233-234, 452-453); WO 01/16318.

(24) PSCA (precursore dell'antigene di cellula staminale prostatica)

Nucleotide

Accesso GeneBank n. AJ297436

Genbank versione n. AJ297436.1 GI:9367211

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 1, 2011 11:25 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. CAB97347

Genbank versione n. CAB97347.1 GI:9367212

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 1, 2011 11:25 AM

Riferimenti incrociati

Reiter R.E., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; WO2004/022709; EP1394274 (Esempio 11); US2004/018553 (Rivendicazione 17); WO2003/008537 (Rivendicazione 1); WO2002/81646 (Rivendicazione 1; Pagina 164); WO2003/003906 (Rivendicazione 10; Pagina 288); WO2001/40309 (Esempio 1; figura 17);

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

US2001/055751 (Esempio 1; figura 1b); WO2000/32752 (Rivendicazione 18; Figura 1); WO98/51805 (Rivendicazione 17; Pagina 97); WO98/51824 (Rivendicazione 10; Pagina 94); WO98/40403 (Rivendicazione 2; figura 1B); Accesso: O43653; EMBL; AF043498; AAC39607.1

(25) *GEDA*

Nucleotide

Accesso GeneBank n. AY260763

Genbank versione n. AY260763.1 GI:30102448

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 02:24 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAP14954

Genbank versione n. AAP14954.1 GI:30102449

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 02:24 AM

Riferimenti incrociati

AP14954 proteina simil partner di fusione HMGIC di lipoma /pid=AAP14954.1 - Homo sapiens (umana); WO2003/054152 (Rivendicazione 20); WO2003/000842 (Rivendicazione 1); WO2003/023013 (Esempio 3, Rivendicazione 20); US2003/194704 (Rivendicazione 45); GI:30102449;

(26) *BAFF-R* (recettore del fattore di attivazione delle cellule B, recettore B_{LyS} 3, BR3)

Nucleotide

Accesso Genbank n. AF116456

Genbank versione n. AF116456.1 GI:4585274

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 10, 2010 09:44 PM

Marco Giovanni Mari
USBM-EP1-090

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAD25356

Genbank versione n. AAD25356.1 GI:4585275

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 10, 2010 09:44 PM

Riferimenti incrociati

Recettore BAFF /pid=NP_443177.1 - Homo sapiens: Thompson, J.S., et al Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO2004/058309; WO2004/011611; WO2003/045422 (Esempio; Pagina 32-33); WO2003/014294 (Rivendicazione 35; figura 6B); WO2003/035846 (Rivendicazione 70; Pagina 615-616); WO2002/94852 (Col 136-137); WO2002/38766 (Rivendicazione 3; Pagina 133); WO2002/24909 (Esempio 3; Figura 3); MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600

(27) CD22 (isoforma CD22-B del recettore delle cellule B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814)

Nucleotide

Accesso GeneBank n. AK026467

Genbank versione n. AK026467.1 GI:10439337

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 11, 2006 11:24 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. BAB15489

Genbank versione n. BAB15489.1 GI:10439338

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 11, 2006 11:24 PM

Riferimenti incrociati

Wilson et al (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; WO2003/072036 (Rivendicazione 1; Figura 1); IM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1.

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

(27a) CD22 (Molecola CD22)

Nucleotide

Accesso GeneBank n. X52785

Genbank versione n. X52785.1 GI:29778

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 2, 2011 10:09 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. CAA36988

Genbank versione n. CAA36988.1 GI:29779

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 2, 2011 10:09 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: CD22

Altri alias: SIGLEC-2, SIGLEC2

Altre designazioni: Recettore delle cellule B CD22; Molecola di adesione delle cellule dei linfociti B; BL-CAM; Antigene CD22; Antigene di superficie delle cellule T Leu-14; lectina simil Ig legante acido sialico 2; lectina simil Ig legante acido sialico 2

ANTICORPI

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

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

(28) CD79a (CD79A, CD79alpha), alfa associata a immunoglobuline, proteina specifica delle cellule B che interagisce covalentemente con

Ig beta (CD79B) e forma un complesso in superficie con molecole di Ig M, trasduce un segnale coinvolto nella differenziazione delle cellule B.), pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2

[P] Cromosoma genico: 19q13.2).

Nucleotide

Accesso GeneBank n NM_001783

Genbank versione n. NM_001783.3 GI:90193587

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 26, 2012 01:48 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_001774

Genbank versione n. NP_001774.1 GI:4502685

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 26, 2012 01:48 PM

Riferimenti incrociati

WO2003/088808, US2003/0228319; WO2003/062401 (Rivendicazione 9); US2002/150573 (Rivendicazione 4, pagine 13-14); WO99/58658 (Rivendicazione 13, figura 16); WO92/07574 (Figura 1); US5644033; Ha et al (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Muller et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:1621-1625; Hashimoto et al (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi et al (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464

(29) CXCR5 (il recettore del linfoma 1 di Burkitt, un recettore accoppiato con proteine G attivato dalla chemochina CXCL13, funziona nella migrazione dei linfociti e nella difesa umorale, svolge un ruolo nell'infezione da HIV-2 e probabilmente nello sviluppo di AIDS,

linfoma, mieloma e leucemia); 372 aa, pI: 8,54 MW: 41959 TM: 7 [P]

Cromosoma genico: 11q23.3,

Nucleotide

Accesso GeneBank n. NM_001716

Genbank versione n. NM_001716.4 GI:342307092

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:49 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_001707

Genbank versione n. NP_001707.1 GI:4502415

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:49 PM

Riferimenti incrociati

WO2004/040000; WO2004/015426; US2003/105292 (Esempio 2);
US6555339 (Esempio 2); WO2002/61087 (Figura 1); WO2001/57188
(Rivendicazione 20, Pagina 269); WO2001/72830 (pagine 12-13);
WO2000/22129 (Esempio 1, pagine 152-153, Esempio 2, pagine 254-256);
WO99/28468 (Rivendicazione 1, Pagina 38); US5440021 (Esempio 2, col
49-52); WO94/28931 (pagine 56-58); WO92/17497 (Rivendicazione 7,
figura 5); Dobner et al (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella
et al (1995) Biochem. J. 309:773-779

(30) HLA-DOB (subunità beta della molecola MHC di classe II (antigene Ia) che lega i peptidi e li presenta ai linfociti CD4+); 273 aa, pI: 6.56, MW: 30820. TM: 1 [P] Cromosoma genico: 6p21.3)

Nucleotide

Accesso GeneBank n. NM_002120

Genbank versione n. NM_002120.3 GI:118402587

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 8, 2012 04:46 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_002111

Genbank versione n. NP_002111.1 GI:4504403

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 8, 2012 04:46 PM

Riferimenti incrociati

Tonnelle et al (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson et al (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck et al (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Servenius et al (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck et al (1996) J. Mol. Biol. 255:1-13; Naruse et al (2002) Tissue Antigens 59:512-519; WO99/58658 (Rivendicazione 13, figura 15); US6153408 (Col 35-38); US5976551 (Col 168-170); US6011146 (Col 145-146); Kasahara et al (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar et al (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119

(31) P2X5 (canale ionico aperto da ligando del recettore P2X purinergico 5, un canale ionico controllato da ATP extracellulare, può essere coinvolto nella trasmissione sinaptica e nella neurogenesi, la carenza può contribuire alla fisiopatologia dell'instabilità idiopatica del detrusore); 422 aa), pl: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] Cromosoma genico: 17p13.3).

Nucleotide

Accesso GeneBank n NM_002561

Genbank versione n. NM_002561.3 GI:325197202

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 27, 2012 12:41 AM

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_002552

Genbank versione n. NP_002552.2 GI:28416933

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 27, 2012 12:41 AM

Riferimenti incrociati

Le et al (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; WO2004/047749; WO2003/072035 (rivendicazione 10); Touchman et al (2000) Genome Res. 10:165-173; WO2002/22660 (Rivendicazione 20); WO2003/093444 (Rivendicazione 1); WO2003/087768 (Rivendicazione 1); WO2003/029277 (pagina 82)
(32) CD72 (antigene di differenziazione delle cellule B CD72, Lyb-2); 359 aa, pI: 8.66, MW: 40225, TM: 1 [P] Cromosoma genico: 9p13.3).

Nucleotide

Accesso GeneBank n. NM_001782

Genbank versione n. NM_001782.2 GI:194018444

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 26, 2012 01:43 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_001773

Genbank versione n. NP_001773.1 GI:4502683

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 26, 2012 01:43 PM

Riferimenti incrociati

WO2004042346 (Rivendicazione 65); WO2003/026493 (pagine 51-52, 57-58). WO2000/75655 (pagine 105-106); Von Hoegen et al (1990) J.

Marco Giovanni Mari
USBM-SP1-090

Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et al (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903.

(33) *LY64 (Antigene linfocitario 64 (RP105), proteina di membrana di tipo I della famiglia delle ripetizioni ricche di leucina (LRR), regola l'attivazione delle cellule B e l'apoptosi, la perdita di funzione è associata all'aumentata attività della malattia nei pazienti con eritematosi sistemica del lupus); 661 aa, pI: 6.20, MW: 74147 TM: 1 [P] Cromosoma genico: 5q12).*

Nucleotide

Accesso GeneBank n. NM_005582

Genbank versione n. NM_005582.2 GI:167555126

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 2, 2012 01:50 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_005573

Genbank versione n. NP_005573.2 GI:167555127

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 2, 2012 01:50 PM

Riferimenti incrociati

US2002/193567; WO97/07198 (Rivendicazione 11, pagine 39-42); Miura et al (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura et al (1998) Blood 92:2815-2822; WO2003/083047; WO97/44452 (Rivendicazione 8, pagine 57-61); WO2000/12130 (pagine 24-26).

(34) *FcRH1 (proteina 1 simil recettore Fc, un recettore putativo per il dominio Fc delle immunoglobuline che contiene domini di tipo C2 simili a Ig e ITAM, può avere un ruolo nella differenziazione dei*

linfociti B); 429 aa, pI: 5.28, MW: 46925 TM: 1 [P] Cromosoma genico: 1q21-1q22)

Nucleotide

Accesso GeneBank n. NM_052938

Genbank versione n. NM_052938.4 GI:226958543

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 2, 2012 01:43 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_443170

Genbank versione n. NP_443170.1 GI:16418419

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 2, 2012 01:43 PM

Riferimenti incrociati

WO2003/077836; WO2001/38490 (rivendicazione 6, Figura 18E-1-18-E-2); Davis et al (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; WO2003/089624 (Rivendicazione 8); EP1347046 (Rivendicazione 1); WO2003/089624 (Rivendicazione 7).

(35) IRTA2 (recettore della superfamiglia delle immunoglobuline associato a traslocazione 2, un immunorecettore putativo con possibili ruoli nello sviluppo delle cellule B e nella linfomagenesi; la deregolamentazione del gene per traslocazione si verifica in alcune neoplasie a cellule B); 977 aa, pI: 6.88, MW: 106468, TM: 1 [P] Cromosoma genico: 1q21)

Nucleotide

Accesso GeneBank n. AF343662

Genbank versione n. AF343662.1 GI:13591709

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 01:16 AM

Marco Giovanni Mari
USBM-CP1-090

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAK31325

Genbank versione n. AAK31325.1 GI:13591710

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 01:16 AM

Riferimenti incrociati

AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Topo:AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1; WO2003/024392 (Rivendicazione 2, figura 97); Nakayama et al (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; WO2003/077836; WO2001/38490 (rivendicazione 3, Figura 18B-1-18B-2).
(36) *TENB2 (TMEFF2, tomoregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano transmembrana putativo, correlato alla famiglia di fattori di crescita EGF/eregulina e follistatina); 374 aa)*

Nucleotide

Accesso GeneBank n. AF179274

Genbank versione n. AF179274.2 GI:12280939

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 01:05 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAD55776

Genbank versione n. AAD55776.2 GI:12280940

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 11, 2010 01:05 AM

Riferimenti incrociati

Accesso NCBI AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; Gene NCBI 23671; OMIM 605734; SwissProt Q9UIK5; AY358907, CAF85723, CQ782436; WO2004/074320; JP2004113151; WO2003/042661;

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

WO2003/009814; EP1295944 (pagine 69-70); WO2002/30268 (pagina 329);
WO2001/90304; US2004/249130; US2004/022727; WO2004/063355;
US2004/197325; US2003/232350; US2004/005563; US2003/124579; Horie et
al (2000) Genomics 67:146-152; Uchida et al (1999) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 266:593-602; Liang et al (2000) Cancer Res. 60:4907-12;
Glynn-Jones et al (2001) Int J Cancer. Ott 15; 94(2):178-84.

*(37) PSMA - FOLH1 (folato idrolasi (antigene di membrana specifico
per la prostata) 1)*

Nucleotide

Accesso GeneBank n. M99487

Genbank versione n. M99487.1 GI:190663

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:48 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA60209

Genbank versione n. AAA60209.1 GI:190664

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:48 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: FOLH1

Altri alias: GIG27, FGCP, FOLH, GCP2, GCPII, NAALAD1, NAALAdasi,
PSM, PSMA, mGCP

Altre designazioni: Dipeptidasi 1 acida legata all'alfa N-
acetilata; Dipeptidasi acida N-acetilata collegata ad alfa; NAALADasi
I; proteina del gene 27 che inibisce la crescita cellulare;

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

folilpoli-gamma-glutammato carbossipeptidasi; glutammato carbossilasi II; glutammato carbossipeptidasi 2; glutammato carbossipeptidasi II; glutammato carbossipeptidasi di membrana; variante F dell'antigene di membrana specifico per la prostata; pteroilpoli-gamma-glutammato carbossipeptidasi;

ANTICORPI

US 7.666.425:

Anticorpi prodotti da Ibridomi aventi i seguenti riferimenti ATCC: accesso ATCC n. HB-12101, accesso ATCC n. HB-12109, accesso ATCC n. HB-12127 e accesso ATCC n. HB-12126.

Proscan: un anticorpo monoclonale selezionato dal gruppo costituito da 8H12, 3E11, 17G1, 29B4, 30C1 e 20F2 (US 7.811.564; Moffett S., et al Hybridoma (Larchmt). 2007 Dec;26(6):363-72).

Cytogen: anticorpi monoclonali 7E11-C5 (accesso ATCC n. HB 10494) e 9H10-A4 (accesso ATCC n. HB11430) - US 5.763.202

GlycoMimetic: NUH2 - accesso ATCC n. HB 9762 (US 7.135.301)

Human Genome Science: HPRAJ70 - accesso ATCC n. 97131 (US 6.824.993); Sequenza amminoacidica codificata dal clone di cDNA (HPRAJ70) depositato come American Type Culture Collection ("ATCC") n. di deposito 97131

Medarex: Anticorpi anti-PSMA privi di residui di fucosile - US 7.875.278

Gli anticorpi anti-PSMA di topo includono 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9 e anticorpi monoclonali. Ibridomi secernenti 3F5.4G6,

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6 o 4C8B9 sono stati depositati pubblicamente e sono descritti in U.S. Pat. No. 6.159.508. Gli ibridomi rilevanti sono stati depositati pubblicamente e sono descritti in U.S. Pat. No. 6.107.090. Inoltre, gli anticorpi anti-PSMA umanizzati, inclusa una versione umanizzata di J591, sono descritti in dettaglio nella pubblicazione PCT WO 02/098897.

Nel ramo sono stati descritti altri anticorpi murini anti-PSMA umani, come mAb 107-1A4 (Wang, S. et al. (2001) Int. J. Cancer 92:871-876) e mAb 2C9 (Kato, K. et al. (2003) Int. J. Urol. 10:439-444).

Esempi di anticorpi monoclonali umani anti-PSMA includono gli anticorpi 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 e 1C3, isolati e strutturalmente caratterizzati come originariamente descritto in PCT Publications WO 01/09192 e in WO 03/064606. Domanda provvisoria statunitense n. Ser. 60/654.125, intitolata "Human Monoclonal Antibodies to Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA)", depositata il 18 feb 2005. Le sequenze amminoacidiche V_H di 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 e 1C3 sono mostrate rispettivamente in SEQ ID NO: 1-9. Le sequenze amminoacidiche V_L di 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 e 1C3 sono mostrate rispettivamente in SEQ ID NO: 10-18.

Altri anticorpi umani anti-PSMA includono gli anticorpi descritti nella pubblicazione PCT WO 03/034903 e domanda statunitense n. 2004/0033229.

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

NW Biotherapeutics: Una linea cellulare di ibridoma selezionata dal gruppo costituito da 3F5.4G6 con numero di accesso ATCC HB12060, 3D7-1.I. con numero di accesso ATCC HB12309, 4E10-1.14 con numero di accesso ATCC HB12310, 3E11 (ATCC HB12488), 4D8 (ATCC HB12487), 3E6 (ATCC HB12486), 3C9 (ATCC HB12484), 2C7 (ATCC HB12490), 1G3 (ATCC HB12489), 3C4 (ATCC HB12494), 3C6 (ATCC HB12491), 4D4 (ATCC HB12493), 1G9 (ATCC HB12495), 5C8B9 (ATCC HB12492) e 3G6 (ATCC HB12485) - si veda US 6.150.508

PSMA Development Company/Progenics/Cytogen - Seattle Genetics: mAb 3.9, prodotto dall'ibridoma depositato sotto accesso ATCC n. PTA-3258 o mAb 10.3, prodotto dall'ibridoma depositato sotto accesso ATCC n. PTA-3347 - US 7.850.971

PSMA Development Company- Composizioni di anticorpi PSMA (US 20080286284, Tabella 1)

Questa domanda è un divisionale della domanda provvisoria statunitense n. ser. 10/395,894, depositata il 21 mar 2003 (US 7.850.971)

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

(38) SST (Recettore della somatostatina; si noti che vi sono 5 sottotipi) (38.1) SSTR2 (recettore 2 della somatostatina)

Nucleotide

Accesso GeneBank n. NM_001050

Genbank versione n. NM_001050.2 GI:44890054

Data di aggiornamento record Genbank: Ago 19, 2012 01:37 PM

Marco Giovanni Mari
USBM-EP1-090

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_001041

Genbank versione n. NP_001041.1 GI:4557859

Data di aggiornamento record Genbank: Ago 19, 2012 01:37 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: SSTR2

Altre designazioni: SRIF-1; SS2R; recettore della somatostatina
tipo 2

(38.2) SSTR5 (recettore della somatostatina 5)

Nucleotide

Accesso GeneBank n. D16827

Genbank versione n. D16827.1 GI:487683

Data di aggiornamento record Genbank: Ago 1, 2006 12:45 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. BAA04107

Genbank versione n. BAA04107.1 GI:487684

Data di aggiornamento record Genbank: Ago 1, 2006 12:45 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: SSTR5

Altri alias: SS-5-R

Altre designazioni: Sottotipo 5 del recettore della somatostatina; tipo 5 del recettore della somatostatina

(38.3) SSTR1

(38.4) SSTR3

(38.5) SSTR4

AvB6 - Entrambe le subunità (39+40)

(39) *ITGAV* (*Integrina, alfa V*;

Nucleotide

Accesso GeneBank n. M14648 J02826 M18365

Genbank versione n. M14648.1 GI:340306

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:56 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA36808

Genbank versione n. AAA36808.1 GI:340307

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:56 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: ITGAV

Altri alias: CD51, MSK8, VNRA, VTNR

Altre designazioni: antigene identificato dall'anticorpo monoclonale L230 integrina alfa-V; integrina alphaVbeta3; integrina,

alfa V (recettore della vitronectina, alfa polipeptide, antigene CD51) subunità alfa del recettore della vitronectina

(40) *ITGB6 (Integrina, beta 6)*

Nucleotide

Accesso GeneBank n. NM_000888

Genbank versione n. NM_000888.3 GI:9966771

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 27, 2012 12:46 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_000879

Genbank versione n. NP_000879.2 GI:9625002

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 27, 2012 12:46 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: ITGB6

Altre designazioni: integrina beta-6

ANTICORPI

Biogen: US 7.943.742 - I cloni di ibridoma 6.3G9 e 6.8G6 sono stati depositati presso l'ATCC, rispettivamente con numeri di accesso ATCC PTA-3649 e -3645.

Biogen: US7.465.449 - In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende le stesse sequenze polipeptidiche di catena pesante e leggera di un anticorpo prodotto dall'ibridoma 6.1A8, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2B10, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 o 7.1C5.

Centocor (J&J): US7.550.142; US7.163.681

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Per esempio in US 7.550.142 - un anticorpo avente regioni variabili di catena pesante umana e catena leggera umana comprendente le sequenze amminoacidiche mostrate in SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8. Seattle Genetics: 15H3 (Ryan MC., et al Cancer Res 15 aprile 2012; 72(8 Supplemento): 4630)

(41) *CEACAM5 (Molecole di adesione cellulare correlate all'antigene carcinoembrionario 5)*

Nucleotide

Accesso GeneBank n. M17303

Genbank versione n. M17303.1 GI:178676

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAB59513

Genbank versione n. AAB59513.1 GI:178677

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: CEACAM5

Altri alias: CD66e, CEA

Altre designazioni: antigene meconio 100

ANTICORPI

AstraZeneca-MedImmune:US 20100330103; US20080057063;

US20020 142359

- per esempio un anticorpo avente regioni determinanti la complementarità (CDR) con le seguenti sequenze: catena pesante; CDR1 - DNYMH, CDR2 - WIDPENGDT E YAPKFRG, CDR3 - LIYAGYLAMD Y; e catena leggera CDR1 - SASSSVTYMH, CDR2 - STSNLAS, CDR3 - QQRSTYPL T.
- Ibridoma 806.077 depositato come deposito ECACC (European Collection of Cell Cultures) n. 96022936.

Research Corporation Technologies, Inc.: US5.047.507

Bayer Corporation: US6.013.772

BioAlliance: US7.982.017; US7.674.605

- US 7.674.605
 - un anticorpo comprendente la sequenza di regione variabile di catena pesante dalla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1 e la sequenza di regione variabile di catena leggera dalla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2.
 - un anticorpo comprendente la sequenza di regione variabile di catena pesante dalla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:5, e la sequenza di regione variabile di catena leggera dalla sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:6.

Celltech Therapeutics Limited: US5.877.293

The Dow Chemical Company: US5.472.693; US6.417.337; US6.333.405

US5.472.693 - per esempio, ATCC n. CRL-11215

US6.417.337 - per esempio, ATCC CRL-12208

US6.333.405 - per esempio, ATCC CRL-12208

Marco Giovanni Mari
USBM-SP1-090

Immunomedics, Inc: US7.534.431; US7.230.084; US7.300.644;
US6.730.300;

US20110189085

- un anticorpo avente CDR di regione variabile di catena leggera comprende: CDR1 comprende KASQDVGTSVA (SEQ ID NO: 20); CDR2 comprende WTSTRHT (SEQ ID NO: 21); e CDR3 comprende QQYSLYRS (SEQ ID NO: 22); e le CDR di regione variabile di catena pesante di detto anticorpo anti-CEA comprendono: CDR1 comprende TYWMS (SEQ ID NO: 23); CDR2 comprende EIHPDSSTINYAPSLKD (SEQ ID NO: 24); e CDR3 comprende LYFGFPWFAY (SEQ ID NO: 25).

US20100221175; US20090092598; US20070202044; US20110064653;

US20090185974; US20080069775.

(42) MET (proto-oncogene met; recettore del fattore di crescita degli epatociti)

Nucleotide

Accesso GeneBank n. M35073

Genbank versione n. M35073.1 GI:187553

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 6, 2012 11:12 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA59589

Genbank versione n. AAA59589.1 GI:553531

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 6, 2012 11:12 AM

Riferimenti incrociati

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

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: MET

Altri alias: AUTS9, HGFR, RCCP2, c-Met

Altre designazioni: recettore di HGF; recettore di HGF/SF; recettore di SF; recettore del fattore di crescita degli epatociti; proto-oncogene tirosina chinasi met; proto-oncogene c-Met; recettore del fattore di scattering; proteina tirosina chinasi Met

ANTICORPI

Abgenix/Pfizer: US20100040629

per esempio, l'anticorpo prodotto dall'ibridoma 13.3.2 avente il numero di accesso PTA-5026 dell'American Type Culture Collection (ATCC); l'anticorpo prodotto dall'ibridoma 9.1.2 avente numero di accesso ATCC PTA-5027; l'anticorpo prodotto dall'ibridoma 8.70.2 avente numero di accesso ATCC PTA-5028; o l'anticorpo prodotto dall'ibridoma 6.90.3 avente numero di accesso ATCC PTA-5029.

Amgen/Pfizer: US20050054019

per esempio, un anticorpo comprendente una catena pesante avente le sequenze amminoacidiche esposte in SEQ ID NO: 2 in cui X2 è glutammato e X4 è serina e una catena leggera avente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 4 in cui X8 è alanina, senza le sequenze del segnale; un anticorpo comprendente una catena pesante avente le sequenze amminoacidiche esposte in SEQ ID NO: 6 e una catena leggera avente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 8, senza le sequenze segnale; un anticorpo comprendente una catena pesante avente le sequenze amminoacidiche esposte in SEQ ID NO: 10 e

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

una catena leggera avente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 12, senza le sequenze segnale; o un anticorpo comprendente una catena pesante avente le sequenze amminoacidiche esposte in SEQ ID NO: 14 e una catena leggera avente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 16, senza le sequenze segnale.

Agouron Pharmaceuticals (ora Pfizer): US20060035907

Eli Lilly: US20100129369

Genentech: US5.686.292; US20100028337; US20100016241;
US20070129301; US20070098707; US20070092520, US20060270594;
US20060134104; US20060035278; US20050233960; US20050037431

US 5.686.292 - per esempio, ATCC HB-11894 e ATCC HB-11895

US 20100016241 - per esempio, ATCC HB-11894 (ibridoma 1A3.3.13)
o HB-11895 (ibridoma 5D5.11.6)

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

Novartis: US20090175860

- per esempio, un anticorpo comprendente le sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 di catena pesante 4687, in cui le sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 di catena pesante 4687 sono i residui 26-35, 50-65 e 98-102, rispettivamente, di SEQ ID NO: 58; e le sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 di catena leggera 5097, in cui le sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 di catena leggera 5097 sono residui 24-39, 55-61 e 94-100 di SEQ ID NO: 37.

Pharmacia Corporation: US20040166544

Pierre Fabre: US20110239316, US20110097262, US20100115639

Marco Giovanni Mari
USBM-EP1-090

Samsung: US 20110129481 - per esempio un anticorpo monoclonale prodotto da una cellula di ibridoma avente il numero di accesso KCLRF-BP-00219 o il numero di accesso di KCLRF-BP-00223.

Samsung: US 20110104176 - per esempio un anticorpo prodotto da una cellula di ibridoma avente numero di accesso: KCLRF-BP-00220.

Facoltà di Medicina dell'Università di Torino: DN-30 Pacchiana G., et al J Biol Chem. 2010 Nov 12;285(46):36149-57

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

(43) MUC1 (Mucina 1, associata a superficie cellulare)

Nucleotide

Accesso GenBank n. J05581

Genbank versione n. J05581.1 GI:188869

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:48 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA59876

Genbank versione n. AAA59876.1 GI:188870

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:48 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: MUC1

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

Altre designazioni: antigene DF3; antigene H23; DF3 antigene associato a carcinoma mammario; Mucina associata a carcinoma; episialina; krebs von den Lungen-6; mucina 1, transmembrana; mucina-1; mucina urinaria reattiva alle arachidi; mucina epiteliale polimorfica; mucina epiteliale associata a tumore; antigene della membrana epiteliale associato a tumore; mucina associata a tumore

ANTICORPI

AltaRex- Quest Pharma Tech: US 6.716.966 - per esempio un anticorpo Alt-1 prodotto dall'ibridoma ATCC No PTA-975.

AltaRex- Quest Pharma Tech: US7.147.850

CRT: 5E5 - Sorensen AL., et al Glycobiology vol. 16 no. 2 pp. 96-107, 2006; HMFG2-Burchell J., et al Cancer Res., 47, 5476-5482 (1987); si veda WO2015/159076

Glycotope GT-MAB: GT-MAB 2.5-GEX (sito web:

<http://www.glycotope.com/pipeline/pankomab-gex>)

Immunogen: US7.202.346

- per esempio, anticorpo MJ-170: linea cellulare di ibridoma MJ-170 accesso ATCC n. PTA-5286 Anticorpo monoclonale MJ-171: linea cellulare di ibridoma MJ-171 accesso ATCC n. PTA-5287; anticorpo monoclonale MJ-172: linea cellulare di ibridoma MJ-172 accesso ATCC n. PTA-5288; o anticorpo monoclonale MJ-173: linea cellulare di ibridoma MJ-173 accesso ATCC n. PTA-5302

Immunomedics: US 6.653.104

Ramot Tel Aviv Uni: US7.897.351

Regents Uni. CA: US 7.183.388; US20040005647; US20030077676.

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

Roche GlycArt: US8.021.856

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

Technische Univ Braunschweig: (IIB6, HT186-B7, HT186-D11, HT186-
G2, HT200-3A-C1, HT220-M-D1, HT220-M-G8) - Thie H., et al PLoS One.
2011 Jan 14;6(1):e15921

(44) CA9 (*anidrase carbonica IX*)

Nucleotide

Accesso Genbank n. X66839

Genbank versione n. X66839.1 GI:1000701

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 2, 2011 10:15 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. CAA47315

Genbank versione n. CAA47315.1 GI:1000702

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 2, 2011 10:15 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: CA9

Altri alias: CAIX, MN

Altre designazioni: CA-IX; P54/58N; Antigene G250 associato a
RCC; proteina G250 associata a RCC; carbonato deidratasi IX; anidrase
carbonica 9; disidratasi carbonica; antigene di membrana MN; pMW1;
antigene G250 associato al carcinoma a cellule renali

ANTICORPI

Abgenix/Amgen: US20040018198

Affibody: Molecole Affibody anti-CAIX

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

Bayer: US7.462.696

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

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

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences (Bayer)-
US5.955.075

- per esempio, M75- accesso ATCC n. HB 11128 o MN12 - accesso ATCC
n. HB 11647

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences: US7.816.493

- per esempio l'anticorpo monoclonale M75 che viene secreto
dall'ibridoma VU-M75, che è stato depositato presso l'American
Type Culture Collection con il codice ATCC HB 11128; o
l'anticorpo monoclonale V/10 secreto dall'ibridoma V/10-VU, che
è stato depositato presso l'Autorità di deposito internazionale
della raccolta coordinata belga di microrganismi (BCCM) presso
il Laboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie
(LMBP) presso l'Universeit Gent a Gand, in Belgio, con l'accesso
n. LMBP 6009CB.

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

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

Novartis: US20090252738

Wilex: US7.691.375 - per esempio l'anticorpo prodotto dalla
linea cellulare di ibridoma DSM ASC 2526.

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

Xencor: US20090162382

(45) *EGFRvIII (recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR),
variante di trascritto 3,*

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_201283

Genbank versione n. NM_201283.1 GI:41327733

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:47 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_958440

Genbank versione n. NP_958440.1 GI:41327734

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:47 PM

Riferimenti incrociati

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

ANTICORPI:

US 7.628.986 e US7.736.644 (Amgen)

Per esempio, una sequenza amminoacidica di regione variabile di
catena pesante selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NO: 142 e
varianti e una sequenza amminoacidica di regione variabile di catena

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

leggera selezionata dal gruppo costituito da: SEQ ID NO: 144 e varianti.

US20100111979 (Amgen)

Per esempio, un anticorpo comprendente una sequenza amminoacidica di catena pesante comprendente:

CDR1 costituita da una sequenza selezionata dal gruppo costituito dalle sequenze amminoacidiche per la regione CDR1 degli anticorpi 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO : 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) e 333 (SEQ ID NO: 17); CDR2 costituita da una sequenza selezionata dal gruppo costituito dalle sequenze amminoacidiche per la regione CDR2 degli anticorpi 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) e 333 (SEQ ID NO: 17); e

CDR3 costituita da una sequenza selezionata dal gruppo costituito dalle sequenze amminoacidiche per la regione CDR3 degli anticorpi 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) e 333 (SEQ ID NO: 17);

US20090240038 (Amgen)

Marco Giovanni Mari
USBM-EP1-090

Per esempio, un anticorpo avente almeno uno dei polipeptidi a catena pesante o leggera comprende una sequenza amminoacidica che è almeno il 90% identica alla sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, e una qualsiasi relativa combinazione.

US20090175887 (Amgen)

Per esempio, un anticorpo avente una sequenza amminoacidica di catena pesante selezionata dal gruppo costituito dalla sequenza amminoacidica di catena pesante dell'anticorpo 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) e 333 (SEQ ID NO: 17).

US20090156790 (Amgen)

Per esempio, anticorpo avente un polipeptide a catena pesante e un polipeptide a catena leggera, in cui almeno uno dei polipeptidi a catena pesante o leggera comprende una sequenza amminoacidica che è almeno il 90% identica alla sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, e una qualsiasi relativa combinazione.

US20090155282, US20050059087 e US20050053608 (Amgen)

Per esempio, una sequenza amminoacidica di catena pesante anticorpale selezionata dal gruppo costituito dalla sequenza amminoacidica di catena pesante di anticorpo 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) e 333 (SEQ ID NO: 17).

MR1-1 (US7.129.332; Duke)

Per esempio, un anticorpo variante avente la sequenza di SEQ ID NO.18 con le sostituzioni S98P-T99Y nella VH di CDR3 e F92W nella VL di CDR3.

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

US20090311803 (Harvard University)

Per esempio, SEQ ID NO: 9 per la regione variabile di catena pesante anticorpale e SEQ ID NO: 3 per sequenze amminoacidiche di regione variabile di catena leggera

US20070274991 (EMD72000, noto anche come matuzumab; Harvard University)

Si veda, per esempio, SEQ ID NO: 3 e 9 rispettivamente per catena leggera e catena pesante

US6.129.915 (Schering)

Per esempio, SEQ. ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

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

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

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

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

(46) CD33 (molecola CD33)

Nucleotide

Accesso Genbank n. M_23197

Genbank versione n. NM_23197.1 GI:180097

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA51948

Genbank versione n. AAA51948.1 GI:188098

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: CD33

Altri alias: SIGLEC-3, SIGLEC3, p67

Altre designazioni: Antigene CD33 (gp67); gp67; antigene di superficie cellulare mieloide CD33; lectina simil Ig legante acido sialico 3; lectina simil Ig legante acido sialico

ANTICORPI

H195 (Lintuzumab)- Raza A., et al Leuk Lymphoma. 2009 Aug;50(8):1336-44; US6.759.045 (Seattle Genetics/Immunomedics)

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

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

US6.590.088 (Human Genome Sciences)

Si veda, per esempio, SEQ ID NO: 1 e 2 e accesso ATCC n. 97521

US7.557.189 (Immunogen)

Per esempio, un anticorpo o un relativo frammento comprendente una regione variabile di catena pesante che comprende tre CDR aventi le sequenze amminoacidiche di SEQ ID NO:1-3 e una regione variabile di catena leggera comprendente tre CDR che hanno le sequenze amminoacidiche di SEQ ID NO:4-6.

(47) *CD19 (molecola CD19)*

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_001178098

Genbank versione n. NM_001178098.1 GI:296010920

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 10, 2012 12:43 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_001171569

Genbank versione n. NP_001171569.1 GI:296010921

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 10, 2012 12:43 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: CD19

Altri alias: B4, CVID3

Altre designazioni: Antigene di linfociti B CD19; Antigene di superficie dei linfociti B B4; Antigene di superficie di cellule T Leu-12; antigene di differenziazione CD19

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

ANTICORPI

Immunogen: HuB4 - Al-Katib AM., et al Clin Cancer Res. 2009 Jun 15;15(12):4038-45.

4G7: Kügler M., et al *Protein Eng Des Sel.* 2009 Mar;22(3):135-47

Per esempio, le sequenze nella figura 3 di Knappik, A. et al. J Mol Biol 2000 Feb;296(1):57-86

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

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

US 7.109.304 (Immunomedics)

Per esempio, un anticorpo comprendente la sequenza di hA19Vk (SEQ ID NO:7) e la sequenza di hA19VH (SEQ ID NO:10)

US 7.902.338 (Immunomedics)

Per esempio, un anticorpo o relativo frammento legante l'antigene che comprende la regione determinante sequenze di complementarietà di complementarietà di catena leggera CDR CDR1 di SEQ ID NO: 16 (KASQSVVDYDGDSILN); CDR2 di SEQ ID NO: 17 (DASNLVS); e CDR3 di SEQ ID NO: 18 (QQSTEDPWT) e le sequenze CDR di catena pesante CDR1 di SEQ ID NO: 19 (SYWMN); CDR2 di SEQ ID NO: 20 (QIWPGDGDTNYNGKFKG) e CDR3 di SEQ ID NO: 21 (RETTTVGRYYYAMDY) e comprende anche la cornice anticorpale umana (FR) e le sequenze di regione costante con uno o più residui amminoacidici della regione cornice sostituiti dalle corrispondenti sequenze di regione cornice dell'anticorpo murino parente, e in cui detti residui FR sostituiti

comprendono la sostituzione di serina al posto di fenilalanina in corrispondenza del residuo Kabat 91 della regione variabile di catena pesante.

Medarex: MDX-1342 - Cardarelli PM., et al Cancer Immunol Immunother. 2010 Feb;59(2):257 -65.

MorphoSys/Xencor: MOR-208/XmAb-5574 - Zalevsky J., et al Blood. 2009 Apr 16;113(16):3735-43

US7.968.687 (Seattle Genetics)

Un anticorpo o frammento legante l'antigene comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:9, e un dominio variabile di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 24.

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

Per esempio, la figura 6 e SEQ ID No: 80 of US20120082664 Zhejiang University School of Medicine: 2E8 - Zhang J., et al J Drug Target. 2010 Nov;18(9):675-8

(48) *IL2RA* (recettore dell'interleuchina 2, alfa); Sequenza di riferimento NCBI: NM_000417.2);

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_000417

Genbank versione n. NM_000417.2 GI:269973860

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 09, 2012 04:59 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_000408

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Genbank versione n. NP_000408.1 GI:4557667

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 09, 2012 04:59 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: IL2RA

Altri alias: RP11-536K7.1, CD25, IDDM10, IL2R, TCGFR

Altre designazioni: Subunità alfa del recettore FIL-2; IL-2-RA;
Subunità alfa di IL-2R; IL2-RA; Antigene TAC; subunità alfa del
recettore dell'interleukina 2; p55

ANTICORPI

US 6.383.487 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect])

US 6.521.230 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect])

Per esempio, un anticorpo avente un sito legante l'antigene
comprende almeno un dominio che comprende CDR1 avente la sequenza
amminoacidica in SEQ. ID. NO: 7, CDR2 avente la sequenza
amminoacidica in SEQ. ID. NO: 8 e CDR3 avente la sequenza
amminoacidica in SEQ. ID. NO: 9; o delle CDR1, CDR2 e CDR3 prese in
sequenza nel loro insieme comprendono una sequenza amminoacidica che
è almeno il 90% identica a SEQ. ID. NO: 7, 8 e 9 prese in sequenza
nel loro insieme.

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

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

(49) AXL (recettore tirosin chinasi AXL)

Nucleotide

Accesso Genbank n. M76125

Genbank versione n. M76125.1 GI:292869

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:53 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA61243

Genbank versione n. AAA61243.1 GI:29870

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:53 AM

Riferimenti incrociati

O'Bryan J.P., et al Mol. Cell. Biol. 11 (10), 5016-5031 (1991);

Bergsagel P.L., et al J. Immunol. 148 (2), 590-596 (1992)

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: AXL

Altri alias: JTK11, UFO

Altre designazioni: oncogene AXL; Sequenza/gene di trasformazione AXL; oncogene AXL; recettore tirosin-proteina chinasi UFO

ANTICORPI

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

(Genentech)

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

(50) CD30 - TNFRSF8 (superfamiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale, elemento 8)

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Nucleotide

Accesso Genbank n. M83554

Genbank versione n. M83554.1 GI:180095

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:53 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA51947

Genbank versione n. AAA51947.1 GI:180096

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:53 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: TNFRSF8

Altri alias: CD30, D1S166E, Ki-1

Altre designazioni: recettore di CD30L; Antigene Ki-1; recettore delle citochine CD30; antigene di attivazione dei linfociti CD30; superfamiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale 8

(51) BCMA (antigene di maturazione delle cellule B) - TNFRSF17 (superfamiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale, elemento 17)

Nucleotide

Accesso Genbank n. Z29574

Genbank versione n. Z29574.1 GI:471244

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 02, 2011 10:40 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. CAA82690

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Genbank versione n. CAA82690.1 GI:471245

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 02, 2011 10:40 AM

Riferimenti incrociati

Laabi Y., et al Nucleic Acids Res. 22 (7), 1147-1154 (1994)

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: TNFRSF17

Altri alias: BCM, BCMA, CD269

Altre designazioni: antigene di maturazione delle cellule B; Fattore di maturazione delle cellule B; Proteina di maturazione delle cellule B; superfamiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale 17

(52) Ag CT - CTA (*Antigeni di cancro ai testicoli*)

Riferimenti incrociati

Frattra E., et al. Mol Oncol. 2011 Apr;5(2):164-82; Lim SH., et al Am J Blood Res. 2012;2(1):29-35.

(53) CD174 (Lewis Y)- FUT3 (fucosiltransferasi 3 (galattoside 3 (4)-L-fucosiltransferasi, gruppo sanguigno di Lewis)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM000149

Genbank versione n. NM000149.3 GI:148277008

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 26, 2012 04:49 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_000140

Genbank versione n. NP_000140.1 GI:4503809

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 26, 2012 04:49 PM

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Riferimenti incrociati

Kukowska-Latallo, J.F., et al Genes Dev. 4 (8), 1288-1303 (1990)

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: FUT3

Altri alias: CD174, FT3B, FucT-III, LE, Les

Altre designazioni: Lewis FT; alfa-(1,3/1,4)-fucosiltransferasi; alfa-4-fucosiltransferasi del gruppo sanguigno Lewis; fucosiltransferasi III; galattoside 3(4)-L-fucosiltransferasi

(54) *CLEC14A* (famiglia di dominio lectina di tipo C 14, elemento A; accesso Genbank n. NM175060)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM175060

Genbank versione n. NM175060.2 GI:371123930

Data di aggiornamento record Genbank: Apr 01, 2012 03:34 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_778230

Genbank versione n. NP_778230.1 GI:28269707

Data di aggiornamento record Genbank: Apr 01, 2012 03:34 PM

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: CLEC14A

Altri alias: UNQ236/PRO269, C14orf27, CEG1, EGFR-5

Altre designazioni: famiglia di dominio lectina di tipo C 14, elemento A; CIECT e proteina contenente un dominio simil EGF; recettore del fattore di crescita epidermica 5

(55) GRP78 - HSPA5 (proteina da shock termico da 70 kDa 5 (proteina regolata dal glucosio, 78kDa)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM005347

Genbank versione n. NM005347.4 GI:305855105

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:42 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_005338

Genbank versione n. NP_005338.1 GI:16507237

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:42 PM

Riferimenti incrociati

Ting J., et al DNA 7 (4), 275-286 (1988)

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: HSPA5

Altri alias: BIP, GRP78, MIF2

Altre designazioni: proteina regolate dal glucosio da 78 kDa; proteina legante il Ca(2+) del reticolo endoplasmatico lumenale grp78; proteina legante la catena pesante di immunoglobulina

(56) CD70 (molecola CD70) L08096

Nucleotide

Accesso Genbank n. L08096

Genbank versione n. L08096.1 GI:307127

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2012 08:54 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA36175

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Genbank versione n. AAA36175.1 GI:307128

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2012 08:54 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: CD70

Altri alias: CD27L, CD27LG, TNFSF7

Altre designazioni: ligando di CD27; CD27-L; antigene CD70; antigene Ki-24; antigene di superficie CD70; superfamiglia del (ligando) fattore di necrosi tumorale 7; superfamiglia del ligando del fattore di necrosi tumorale 7

ANTICORPI

MDX-1411 contro CD70 (Medarex)

h1F6 (Oflazoglu, E., et al, Clin Cancer Res. 1 ott 2008;14(19):6171-80; Seattle Genetics)

Per esempio, si veda US20060083736 SEQ ID NO: 1, 2, 11 e 12 e Figura 1.

(57) Antigeni specifici per cellule staminali; Per esempio:

- 5T4 (si veda la voce (63) di seguito)
- CD25 (si veda la voce (48) di cui sopra)
- CD32

◦ Polipeptide

- Accesso Genbank n. ABK42161
- Genbank versione n. ABK42161.1 GI:117616286
- Data di aggiornamento record Genbank: Lug 25, 2007 03:00 PM

Marco Giovanni Mari
USBM-CP1-090

- LGR5/GPR49

◦ Nucleotide

- Accesso Genbank n. NM_003667
- Genbank versione n. NM_003667.2 GI:24475886
- Data di aggiornamento record Genbank: Lug 22, 2012 03:38 PM

◦ Polipeptide

- Accesso Genbank n. NP_003658
- Genbank versione n. NP_003658.1 GI:4504379
- Data di aggiornamento record Genbank: Lug 22, 2012 03:38 PM

- Prominina/CD133

◦ Nucleotide

- Accesso Genbank n. NM_006017
- Genbank versione n. NM_006017.2 GI:224994187
- Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:47 PM

◦ Polipeptide

- Accesso Genbank n. NP_006008
- Genbank versione n. NP_006008.1 GI:5174387
- Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:47 PM

(58) ASG-5

Riferimenti incrociati

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

ANTICORPI

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

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

(59) ENPP3 (Ectonucleotide pirofosfatasi/fofodiesterasi 3)

Nucleotide

Accesso Genbank n. AF005632

Genbank versione n. AF005632.2 GI:4432589

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 10, 2010 09:41 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAC51813

Genbank versione n. AAC51813.1 GI:2465540

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 10, 2010 09:41 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: ENPP3

Altri alias: RP5-988G15.3, B10, CD203c, NPP3, PD-IBETA, PDNP3

Altre designazioni: E-NPP 3; dJ1005H11.3 (fosfodiesterasi I/nucleotide pirofosfatasi 3); dJ914N13.3 (fosfodiesterasi I/nucleotide pirofosfatasi 3); elemento della famiglia di ectonucleotide pirofosfatasi/fofodiesterasi 3; gp130RB13-6; fosfodiesterasi I beta; fosfodiesterasi I/nucleotide pirofosfatasi 3; fosfodiesterasi-I beta

(60) PRR4 (ricca in prolina 4 (lacrimale))

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_007244

Genbank versione n. NM_007244.2 GI:154448885

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 28, 2012 12:39 PM

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_009175

Genbank versione n. NP_009175.2 GI:154448886

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 28, 2012 12:39 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: PRR4

Altri alias: LPRP, PROL4

Altre designazioni: proteina lacrimale ricca di prolina;
proteina ricca di prolina associata a carcinoma nasofaringeo 4;
polipeptide ricco in prolina 4; proteine ricche in prolina 4
(61) GCC - GUCY2C (guanilato ciclasi 2C (recettore dell'enterotossina
stabile al calore)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_004963

Genbank versione n. NM_004963.3 GI:222080082

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 02, 2012 01:50 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_004954

Genbank versione n. NP_004954.2 GI:222080083

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 02, 2012 01:50 PM

Riferimenti incrociati

De Sauvage F.J., et al J. Biol. Chem. 266 (27), 17912-17918 (1991); Singh S., et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 179 (3), 1455-1463 (1991)

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: GUCY2C

Altri alias: DIAR6, GUC2C, MUCILE, STAR

Altre designazioni: GC-C; Recettore STA; guanil ciclasi C; hSTAR; recettore dell'enterotossina termostabile; guanilato ciclasi intestinale

(62) *Liv-1* - *SLC39A6* (famiglia di carrier di soluti 39 (trasportatore di zinco), elemento 6)

Nucleotide

Accesso Genbank n. U41060

Genbank versione n. U41060.2 GI:12711792

Data di aggiornamento record Genbank: Nov 30, 2009 04:35 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA96258

Genbank versione n. AAA96258.2 GI:12711793

Data di aggiornamento record Genbank: Nov 30, 2009 04:35 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: SLC39A6

Altri alias: LIV-1

Altre designazioni: Proteina LIV-1, regolata dagli estrogeni; CAP-6; proteina LIV-1 regolata dagli estrogeni; famiglia di carrier di soluto 39 (trasportatore di ioni metallici), elemento 6; famiglia di carrier di soluto 39 elemento 6; trasportatore di zinco ZIP6; zrt- e proteine simil Irt 6

(63) 5T4, glicoproteina trofoblastica, TPBG - TPBG (glicoproteina trofoblastica)

Nucleotide

Accesso Genbank n. AJ012159

Genbank versione n. AJ012159.1 GI:3805946

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 01, 2011 10:27 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. CAA09930

Genbank versione n. CAA09930.1 GI:3805947

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 01, 2011 10:27 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

- Simbolo ufficiale: TPBG
- Altri alias: 5T4, 5T4AG, M6P1
- Altre designazioni: antigene oncofetale 5T4; glicoproteina trofoblastica oncofetale 5T4; glicoproteina oncotrofoblastica 5T4
- Si veda W02015/155345

(64) CD56 - NCMA 1 (Molecola di adesione cellulare neurale 1)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_000615

Genbank versione n. NM_000615.6 GI:336285433

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 23, 2012 02:32 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_000606

Genbank versione n. NP_000606.3 GI:94420689

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 23, 2012 02:32 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: NCAM1

Altri alias: CD56, MSK39, NCAM

Altre designazioni: Antigene riconosciuto dall'anticorpo monoclonale 5.1H11; molecola di adesione delle cellule neurali, NCAM

ANTICORPI

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

Per esempio, si veda l'umanizzato dall'anticorpo murino N901. Si vedano le Figure 1b e 1e di Roguska, M.A., et al. *Proc Natl Acad Sci USA* Feb 1994;91:969-973.

(65) CanAg (antigene associato a tumore CA242)

Riferimenti incrociati

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

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

ANTICORPI

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

Per esempio, si veda US20080138898A1 SEQ ID NO: 1 e 2

(66) *FOLR1* (Recettore dei folati 1)

Nucleotide

Accesso Genbank n. J05013

Genbank versione n. J05013.1 GI:182417

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA35823

Genbank versione n. AAA35823.1 GI:182418

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: FOLR1

Altri alias: FBP, FOLR

Altre designazioni: FR-alfa; Cellule KB FBP; proteine leganti i
folati dell'adulto; proteina legante i folati; recettore del folato
alfa recettore dei folati, adulto; antigene ovarico associato al
tumore MOv18

ANTICORPI

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

(67) *GPNMB* (glicoproteina (transmembrana) nmb)

Nucleotide

Accesso Genbank n. X76534

Genbank versione n. X76534.1 GI:666042

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 02, 2011 10:10 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. CAA54044

Genbank versione n. CAA54044.1 GI:666043

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 02, 2011 10:10 AM

Riferimenti incrociati

Weterman M.A., et al *Int. J. Cancer* 60 (1), 73-81 (1995)

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: GPNMB

Altri alias: UNQ1725/PRO9925, HGFIN, NMB

Altre designazioni: glicoproteina NMB; glicoproteina proteina simil nmb; osteoactivina; glicoproteina transmembrana HGFIN; glicoproteina transmembrana NMB

ANTICORPI

Celldex Therapeutics: CR011 (Tse KF., et al *Clin Cancer Res.* 15 febbraio 2006;12(4):1373-82)

Per esempio, si veda EP1827492B1 SEQ ID NO: 22, 24, 26, 31, 33 e

(68) *TIM-1 - HA VCR 1 (recettore cellulare 1 del virus dell'epatite A)*

Nucleotide

Accesso Genbank n. AF043724

Genbank versione n. AF043724.1 GI:2827453

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 10, 2010 06:24 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAC39862

Genbank versione n. AAC39862.1 GI:2827454

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 10, 2010 06:24 PM

Riferimenti incrociati

Feigelstock D., et al J. Virol. 72 (8), 6621-6628 (1998)

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: HAVCR1

Altri alias: HAVCR, HAVCR-1, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1

Altre designazioni: Dominio dell'immunoglobina delle cellule T e proteina 1 del dominio delle mucine; Proteina 1 della membrana delle cellule T; molecola di danno renale 1

(69) *RG-1/Bersaglio di tumore della prostata Mindin - Mindin/RG-1*

Riferimenti incrociati

Parry R., et al Cancer Res. 2005 Sep 15;65(18):8397-405

(70) *B7-H4 - VTCN1 (dominio V-set contenente inibitore di attivazione delle cellule T 1*

Nucleotide

Accesso Genbank n. BX648021

Genbank versione n. BX648021.1 GI:34367180

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 02, 2011 08:40 AM

Riferimenti incrociati

Sica GL., et al Immunity. 2003 Jun;18(6):849-61

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: VTCN1

Altri alias: RP11-229A19.4, B7-H4, B7H4, B7S1, B7X, B7h.5, PRO1291, VCTN1 Altre designazioni: Elemento della famiglia B7, H4; Elemento della superfamiglia B7 1; Molecola co-stimolatoria di cellule T B7x; Molecola co-stimolatoria di cellule T B7x; Inibitore dell'attivazione dei linfociti T contenente il dominio V-set 1; proteina immunostimolante B7-H4

(71) *PTK7 (proteina tirosin chinasi PTK7 7)*

Nucleotide

Accesso Genbank n. AF447176

Genbank versione n. AF447176.1 GI:17432420

Data di aggiornamento record Genbank: Nov 28, 2008 01:51 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAL39062

Genbank versione n. AAL39062.1 GI:17432421

Data di aggiornamento record Genbank: Nov 28, 2008 01:51 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: PTK7

Altri alias: CCK-4, CCK4

Altre designazioni: carcinoma del colon chinasi 4; tirosin-proteina chinasi inattiva 7; recettore pseudo tirosin chinamico 7; simil proteina tirosin-chinasi 7

(72) CD37 (molecola CD37)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_001040031

Genbank versione n. NM_001040031.1 GI:91807109

Data di aggiornamento record Genbank: Lug 29, 2012 02:08 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_001035120

Genbank versione n. NP_001035120.1 GI:91807110

Data di aggiornamento record Genbank: Lug 29, 2012 02:08 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: CD37

Altri alias: GP52-40, TSPAN26

Altre designazioni: antigene CD37; antigene di differenziazione cellulare 37; antigene leucocitario CD37; antigene di superficie dei leucociti CD37; tetraspanina-26; tspan-26

ANTICORPI

Boehringer Ingelheim: mAb 37.1 (Heider KH., et al Blood. 2011 Oct 13;118(15):4159-68)

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

Per esempio, si veda US20110171208A1 SEQ ID NO: 253

Immunogen: K7153A (Deckert J., et al Cancer Res 15 aprile 2012; 72(8 Supplemento): 4625)

(73) *CD138- SDC1 (syndecan 1)*

Nucleotide

Accesso Genbank n. AJ551176

Genbank versione n. AJ551176.1 GI:29243141

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 01, 2011 12:09 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. CAD80245

Genbank versione n. CAD80245.1 GI:29243142

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 01, 2011 12:09 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: SDC1

Altri alias: CD138, SDC, SYND1, syndecan

Altre designazioni: antigene CD138; recettore del fattore di crescita dei fibroblasti proteoglicani eparan solfato; proteoglicano syndecan 1; syndecan-1

ANTICORPI

Biotest: MAb chimerizzato (nBT062) - (Jagannath S., et al Poster ASH #3060, 2010; WIPO

Domanda di brevetto WO/2010/128087)

Per esempio, si veda US20090232810 SEQ ID NO: 1 e 2

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

Per esempio, si veda US20090175863A1 SEQ ID NO: 1 e 2

(74) CD74 (molecola CD74, complesso maggiore di istocompatibilità, catena invariante di classe II)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_004355

Genbank versione n. NM_004355.1 GI:343403784

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 23, 2012 02:30 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_004346

Genbank versione n. NP_004346.1 GI:10835071

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 23, 2012 02:30 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: CD74

Altri alias: DHLAG, HLADG, II, Ia - GAMMA

Altre designazioni: Antigene CD74 (polipeptide invariante del complesso maggiore di istocompatibilità, associato all'antigene di classe II); Catena gamma dell'antigene di istocompatibilità HLA

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

classe II; Catena invariante associata agli antigeni HLA-DR; HLA-DR-gamma; catena invariante associata a Ia; catena gamma MHC HLA-DR; catena gamma di antigeni di classe II; p33

ANTICORPI

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

Per esempio, si veda US20040115193 SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 e 24

Genmab: HuMax-CD74 (si veda sito Web)

(75) Claudine - CL (Claudine)

Riferimenti incrociati

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

Nell'uomo sono stati descritti 24 elementi della famiglia - si veda riferimento di letteratura.

(76) *EGFR (recettore del fattore di crescita epidermico)*

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_005228

Genbank versione n. NM_005228.3 GI:41927737

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:47 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_005219

Genbank versione n. NP_005219.2 GI:29725609

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:47 PM

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: EGFR

Altri alias: ERBB, ERBB1, HER1, PIG61, mENA

Altre designazioni: omologo dell'oncogene virale della leucemia eritroblastica aviaria (v-erb-b); proteina 40 inibitrice della crescita cellulare; proteina 61 che induce proliferazione cellulare; proto-oncogene c-ErbB-1; recettore tirosina-proteina chinasi erbB-1

ANTICORPI

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

Per esempio, si veda US6217866 - deposito ATTC n. 9764.

Amgen: Panitumumab (Vectibix) - Argiles G., et al *Future Oncol.* 2012 aprile;8(4):373-89

Per esempio, si veda US6235883 SEQ ID NO: 23-38.

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

YM Biosciences: Nimotuzumab - Ramakrishnan MS., et al *MAbs.* 2009 gennaio-febbraio;1(1):41-8.

Per esempio, si veda US5891996 SEQ ID NO.: 27-34.

(77) *Her3 (ErbB3) - ERBB3 (v-erb-b2 leucemia eritroblastica oncogene virale, omologo 3 (aviaria))*

Nucleotide

Accesso Genbank n. M34309

Genbank versione n. M34309.1 GI:183990

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA35979

Genbank versione n. AAA35979.1 GI:306841

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:47 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: ERBB3

Altri alias: ErbB-3, HER3, LCCS2, MDA-BF-1, c-erbB-3, c-erbB3,
erbB3-S, p180-ErbB3, p45-sErbB3, p85-sErbB3

Altre designazioni: proteina simil proto-oncogene c-ErbB-3;
recettore tirosina-proteina chinasi erbB-3 recettore di superficie
cellulare di tipo tirosin-chinasi HER3

ANTICORPI

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

Per esempio, si veda US2011028129 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
e 8.

(78) RON - MST1R (recettore 1 stimolante i macrofagi (tirosina
chinasi correlata a c-met))

Nucleotide

Accesso Genbank n. X70040

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Genbank versione n. X70040.1 GI:36109

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 02, 2011 10:17 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. CCA49634

Genbank versione n. CCA49634.1 GI:36110

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 02, 2011 10:17 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: MST1R

Altri alias: CD136, CDw136, PTK8, RON

Altre designazioni: recettore MSP; variante MST1R RON30; variante MST1R RON62; Tirosina chinasi 8 della proteina PTK8; Variante RON E2E3; tirosina chinasi correlata a c-met; recettore della proteina stimolante i macrofagi; p185-Ron; variante RON solubile 1; variante RON solubile 2; variante RON solubile 3; variante RON solubile 4

(79) *EPHA2* (recettore *EPH A2*)

Nucleotide

Accesso Genbank n. BC037166

Genbank versione n. BC037166.2 GI:33879863

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 06, 2012 01:59 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAH37166

Genbank versione n. AAH37166.1 GI:22713539

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 06, 2012 01:59 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: EFA2

Altri alias: ARCC2, CTPA, CTPP1, ECK

Altre designazioni: recettore 2 dell'efrina di tipo A; recettore
di proteina tirosin-chinasi delle cellule epiteliali; variante 1
EPHA2 solubile; recettore proteina tirosin-chinasi ECK

ANTICORPI

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

Per esempio, si veda US20090304721A1 Figura 7 e 8.

(80) CD20 - MS4A1 (domini di attraversamento della membrana 4,
sottofamiglia A, elemento 1)

Nucleotide

Accesso Genbank n. M27394

Genbank versione n. M27394.1 GI:179307

Data di aggiornamento record Genbank: Nov 30, 2009 11:16 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA35581

Genbank versione n. AAA35581.1 GI:179308

Data di aggiornamento record Genbank: Nov 30, 2009 11:16 AM

Riferimenti incrociati

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: MS4A1

Altri alias: B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7

Altre designazioni: Antigene linfocitario B CD20; Antigene B1 di superficie cellulare dei linfociti B; antigene CD20; recettore di CD20; antigene di superficie dei leucociti Leu-16

ANTICORPI

Genentech/Roche: Rituximab - Abdulla NE., et al *BioDrugs*. 1
aprile 2012;26(2):71-82.

Per esempio, si veda US5736137, deposito ATCC n. HB-69119.

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

Per esempio, si veda US20090169550A1 SEQ ID NO: 2, 4 e 5.

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

Per esempio, si veda US7919273B2 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

(81) Tenascina C - TNC (Tenascina C)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_002160

Genbank versione n. NM_002160.3 GI:340745336

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 23, 2012 02:33 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_002151

Genbank versione n. NP_002151.2 GI:153946395

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 23, 2012 02:33 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: TNC

Altri alias: 150-225, GMEM, GP, HXB, JI, TN, TN-C

Altre designazioni: GP 150-225; citotactina; antigene della matrice extracellulare associato a glioma; hexabrachion (tenascina); antigene miotendineo; neuronectina; tenascina tenascin-C isoforma 14/AD1/16

ANTICORPI

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

Per esempio, si veda US7968685 SEQ ID NO: 29, 35, 45 e 47.

(82) *FAP (proteina di attivazione dei fibroblasti, alfa)*

Nucleotide

Accesso Genbank n. U09278

Genbank versione n. U09278.1 GI:1888315

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 09:22 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAB49652

Genbank versione n. AAB49652.1 GI:1888316

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 09:22 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: FAP

Altri alias: DPPIV, FAPA

Altre designazioni: gelatinasi legata alla membrana di melanoma
da 170 kDa; serina proteasi di membrana integrale; seprase
(83) *DKK-1* (omologo *Dickkopf 1* (*Xenopus laevis*))

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_012242

Genbank versione n. NM_012242.2 GI:61676924

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:48 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_036374

Genbank versione n. NP_036374.1 GI:7110719

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:48 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: DKK1

Altri alias: UNQ492/PRO1008, DKK-1, SK

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Altre designazioni: proteina-1 correlata a dickkopf; simil dickkopf-1; proteina 1 simil dickkopf; proteina correlata a dickkopf 1 hDkk-1

ANTICORPI

Novartis: BHQ880 (Fulciniti M., et al *Blood*. 9 luglio 2009; 114 (2): 371-379)

Per esempio, si veda US20120052070A1 SEQ ID NO: 100 e 108.

(84) CD52 (molecola CD52)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_001803

Genbank versione n. NM_001803.2 GI:68342029

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:48 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_001794

Genbank versione n. NP_001794.2 GI:68342030

Data di aggiornamento record Genbank: Sett 30, 2012 01:48 PM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: CD52

Altri alias: CDW52

Altre designazioni: Antigene CAMPATH-1; Antigene CD52 (antigene CAMPATH-1); Antigene CDW52 (antigene CAMPATH-1); antigene della patologia cambridge 1; proteina secretoria epididimiale E5; he5; proteina specifica epididimiale umana 5

ANTICORPI

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

Per esempio, si veda Drugbank Acc. No. DB00087 (BIOD00109, BTD00109)

(85) CS1 - SLAMF7 (elemento della famiglia SLAM 7)

Nucleotide

Accesso Genbank n. NM_021181

Genbank versione n. NM_021181.3 GI:1993571

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 29, 2012 11:24 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. NP_067004

Genbank versione n. NP_067004.3 GI:19923572

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 29, 2012 11:24 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: SLAMF7

Altri alias: UNQ576/PRO1138, 19A, CD319, CRACC, CS1

Altre designazioni: proteina 19A24; sottoinsieme CD2 1; cellule citotossiche che attivano il recettore simil CD2; cellule citotossiche che attivano il recettore simil CD2; proteina di membrana FOAP-12; proteina simil nuovo LY9 (antigene linfocitario 9); proteina 19A

ANTICORPI

BMS: elotuzumab/HuLuc63 (Benson DM., et al *J Clin Oncol.* 1 giugno 2012;30(16):2013-2015)

Per esempio, si veda US20110206701 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16.

(86) Endogлина - ENG (Endogлина)

Nucleotide

Accesso Genbank n. AF035753

Genbank versione n. AF035753.1 GI:3452260

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 10, 2010 06:36 PM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAC32802

Genbank versione n. AAC32802.1 GI:3452261

Data di aggiornamento record Genbank: Mar 10, 2010 06:36 PM

Riferimenti incrociati

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

Simbolo ufficiale: ENG

Altre informazioni

Altri alias: RP11-228B15.2, CD105, END, HHT1, ORW, ORW1

Altre designazioni: antigene CD105

(87) *Annessina A1* - ANXA1 (*Annessina A1*)

Nucleotide

Accesso Genbank n. X05908

Genbank versione n. X05908.1 GI:34387

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 02, 2011 10:02 AM

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Polipeptide

Accesso Genbank n. CCA29338

Genbank versione n. CCA29338.1 GI:34388

Data di aggiornamento record Genbank: Feb 02, 2011 10:02 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale: ANXA1

Altri alias: RP11-71A24.1, ANX1, LPC1

Altre designazioni: annessina I (lipocortina I); annessina 1; calpactina II; calpactina 2; cromobindina 9; lipocortina I; p35; proteina inibitoria la fosfolipasi A2

(88) V-CAM (CD106) - VCAM1 (molecola di adesione delle cellule vascolari 1)

Nucleotide

Accesso Genbank n. M60335

Genbank versione n. M60335.1 GI:340193

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:56 AM

Polipeptide

Accesso Genbank n. AAA61269

Genbank versione n. AAA61269.1 GI:340194

Data di aggiornamento record Genbank: Giu 23, 2010 08:56 AM

Riferimenti incrociati

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

Altre informazioni

Simbolo ufficiale VCAM1

Altri alias: CD106, INCAM-100

Altre designazioni: antigene CD106; proteina di adesione delle cellule vascolari 1

Sequenze di anticorpi

Anti-Integrina $\alpha\beta 6$

RHAB6.2

QVQLVQSGSELKKPGASVKISKASGFAFTDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRFVSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVA
GPYPFDYWGQGLTVTVSS

RHCB6.2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRVTITDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTPTAVPNLRGDLQVLAQKV
AGPYPFDYWGQGLTVTVSS

RHF

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGD
TEYAPKFQGRVFTTDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPGYPYFDYWGQGLTV
TVSS

RHFB6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWVRQAPGQRLEWMGWIDPENGD
TEYAPKFQGRVFTTDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPAVPNLRGDLQVLAQK
VAGPYFDYWGQGLTVTVSS

RHAY100bP

QVQLVQSGSELKKPGASVKISKASGFAFTDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRFVSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTGPYPFDYWGQGLTVTV
SS

RKF

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDR
FSGSGSGDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIK

RKFL36L50

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWLQKPGQAPRLLIYLTSNLASGIPDR
FSGSGSGDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIK

RKC

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

Anti-CD33

CD33 Hum195 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYNMHWVRQAPGGLEWIGYIYPYNGGT
GYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGLTVTVSS

CD33 Hum195 VK

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFFATYYCQQSKEVPWTFGGGKVEIK

Anti-CD19

CD19 B4 con resurfacing VH

QVQLVQPGAIEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTSNWMHWVKQRPGGLEWIGEIDPSDSYT
NYNQNFKFKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNPYYYAMDYWGQGTSV
TVSS

CD19 B4 con resurfacing VH

EIVLTQSPAIMASAPGERVTMTCSASSGVNYMHWYQQKPGTSPRRWIYDTSKLAGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISSMEPEDAATYYCHQRGSYTFGGGKLEIK

Anti-Her2

Catena VH di Herceptin

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVT
VSS

Catena VL di Herceptin

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGKVEIK

Anti-CD25

Simulect VK (noto anche come Basiliximab)

QIVSTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSRSYMQWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLAGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYTFGGGKLEIK

Simulect VH

QLQQSGTVLARGASVKMSCKASGYSFTRYWMHWIKQRPGGLEWIGAIYPGNSDTSY
NQKFEKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSAVYYCSRDIYGYFDYDFWGQGTLLTVSS

Anti-PSMA

VH `1 deimmunizzata

EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWWKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTY
NQKFEDKATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGGTLLTVSS

VK `1 deimmunizzata

DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGSPKLLIYWASTRHTGIPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGPGTKVDIK

VH1 `5 deimmunizzata

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNN
FATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTGYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VH2 `5 deimmunizzata

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VH3 `5 deimmunizzata

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VH4 `5 deimmunizzata

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VK1 `5 deimmunizzata

NIVMTQFPSSMSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFTGSGSATDFTLTISSLQTEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEMK

VK2 `5 deimmunizzata

NIVMTQFPSSMSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK3 `5 deimmunizzata

NIQMTQFPSAMSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK4 `5 deimmunizzata

NIQMTQFPSAMSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK DI `5 deimmunizzata

NIVMTQFPKMSASAGERMTLTKASENVGTYVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFILTISVQAEDLDVYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK

VK DI `5 deimmunizzata

EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMNLSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHA `5 umanizzato

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVGEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHB `5 umanizzato

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHC `5 umanizzato

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHD `5 umanizzato

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVGEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHE `5 umanizzato

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHF `5 umanizzato

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHG `5 umanizzato

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RKA `5 umanizzato

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKB `5 umanizzato

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKC `5 umanizzato

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKD `5 umanizzato

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKE `5 umanizzato

NIVMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPD
RFTGSGSATDFILTINLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKF `5 umanizzato

NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFGSGSATDFILTINNLPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKG `5 umanizzato

NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPD
RFTGSGSATDFLTINNLPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

L'anticorpo parente può anche essere una proteina di fusione comprendente una sequenza di peptidi che legano l'albumina (ABP) (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Gli anticorpi dell'invenzione includono proteine di fusione con sequenze ABP insegnate da: (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 alle Tabelle III e IV, pagina 35038; (ii) US 2004/0001827 a [0076]; e (iii) WO 01/45746 alle pagine 12-13.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo è stato elevato al bersaglio specifico per antigene correlato a tumore $\alpha_v\beta_6$.

L'agente legante cellule può essere etichettato, per esempio per aiutare il rilevamento o la purificazione dell'agente prima dell'incorporazione come coniugato o come parte del coniugato. L'etichetta può essere un'etichetta di biotina. In un'altra forma di realizzazione, l'agente legante cellule può essere etichettato con un radioisotopo.

Collegamento dell'unità Linker all'unità Ligando

L'unità Ligando può essere connessa all'unità Linker tramite un legame disolfuro.

In una forma di realizzazione, la connessione tra l'unità Ligando e il Farmaco-Linker è formata tra un gruppo tiolo di un

residuo di cisteina dell'unità Ligando e un gruppo maleimmide dell'unità Farmaco-Linker.

I residui di cisteina dell'unità Ligando possono essere disponibili per reazione con il gruppo funzionale dell'unità Linker per formare una connessione. In altre forme di realizzazione, per esempio dove l'unità Ligando è un anticorpo, i gruppi tiolici dell'anticorpo possono partecipare ai legami disolfuro intercatena. Questi legami intercatena possono essere convertiti in gruppi tiolici liberi, per esempio mediante trattamento dell'anticorpo con DTT prima della reazione con il gruppo funzionale dell'unità Linker.

In alcune forme di realizzazione, il residuo di cisteina viene introdotto nella catena pesante o leggera di un anticorpo. Le posizioni per l'inserimento della cisteina per sostituzione nelle catene pesanti o leggere di anticorpi includono quelle descritte in Domanda statunitense n. 2007-0092940 pubblicata e Pubblicazione di brevetto internazionale WO2008070593.

Metodi di trattamento

I composti della presente invenzione possono essere usati in terapia. Una quantità terapeuticamente efficace di un coniugato di formula II può essere usata in terapia. Il termine "quantità terapeuticamente efficace" è una quantità sufficiente per mostrare il beneficio per un paziente. Tale beneficio può essere almeno il miglioramento di almeno un sintomo. L'effettiva quantità somministrata, e la velocità e l'andamento temporale di somministrazione, dipenderanno dalla natura e dalla gravità di ciò

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

che viene trattato. La prescrizione del trattamento, per esempio le decisioni sul dosaggio, è di responsabilità dei medici di medicina generale e di altri medici.

Un coniugato può essere somministrato da solo o in combinazione con altri trattamenti, simultaneamente o sequenzialmente dipendenti dalla condizione da trattare. Esempi di trattamenti e terapie includono, in via non limitativa, chemioterapia (la somministrazione di principi attivi, inclusi, per esempio, farmaci, anticorpi per esempio, farmaci; intervento chirurgico; e terapia radiante.

Le composizioni farmaceutiche secondo la presente invenzione, e per l'uso secondo la presente invenzione, possono comprendere, oltre al principio attivo, vale a dire un coniugato di formula I, un eccipiente farmaceuticamente accettabile, un carrier, un tampone, uno stabilizzatore o altri materiali ben noti agli esperti del ramo. Tali materiali devono essere atossici e non devono interferire con l'efficacia del principio attivo. L'esatta natura del carrier o altro materiale dipenderà dalla via di somministrazione, che può essere orale, o mediante iniezione, per esempio cutanea, sottocutanea o endovenosa.

Le composizioni farmaceutiche per la somministrazione orale possono essere sotto forma di compresse, capsule, polveri o liquidi. Una compressa può comprendere un carrier solido o un adiuvante. Le composizioni farmaceutiche liquide comprendono generalmente un veicolo liquido come acqua, petrolio, oli animali o vegetali, olio minerale o olio sintetico. Possono essere inclusi soluzione salina

fisiologica, destrosio o un'altra soluzione saccaridica o glicoli come etilen glicole, propilen glicole o polietilen glicole. Una capsula può comprendere un veicolo solido come una gelatina.

Per l'iniezione cutanea, sottocutanea o endovenosa, o per l'iniezione in corrispondenza del sito di afflizione, il principio attivo sarà sotto forma di una soluzione acquosa accettabile per via parenterale che è priva di pirogeni e ha un pH, un'isotonicità e una stabilità idonei. Le persone debitamente esperte nel ramo sono in grado di per preparare soluzioni idonee usando, per esempio, veicoli isotonici come cloruro di sodio per Iniezione, Ringer per iniezione, Ringer lattato per iniezione. È possibile includere conservanti, stabilizzanti, tamponi, antiossidanti e/o altri additivi, come richiesto.

I coniugati possono essere usati per trattare la malattia proliferativa e la malattia autoimmune. Il termine "malattia proliferativa" si riferisce a una proliferazione cellulare indesiderata o incontrollata di cellule eccessive o anormali indesiderate, come la crescita neoplastica o iperplastica, sia *in vitro* sia *in vivo*.

Esempi di condizioni proliferative includono, in via non limitativa, proliferazione cellulare benigna, premaligna e maligna, inclusi in via non limitativa neoplasie e tumori (per esempio, istocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), tumori (per esempio cancro del polmone, cancro del polmone a piccole cellule, cancro gastrointestinale, cancro dell'intestino, cancro del colon, carinoma

mammario, carcinoma ovarico, cancro alla prostata, cancro ai testicoli, cancro al fegato, cancro ai reni, cancro alla vescica, cancro al pancreas, cancro al cervello, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma di Kaposi, melanoma), leucemie, psoriasi, malattie ossee, disturbi fibroproliferativi (per esempiodei tessuti connettivi) e aterosclerosi. Altri tumori di interesse includono, in via non limitativa, ematologici; tumori maligni come leucemie e linfomi, come linfoma non Hodgkin e sottotipi come DLBCL, zona marginale, zona del mantello e linfoma follicolare, Hodgkin, LMA e altri tumori di origine delle cellule B o T.

Esempi di malattie autoimmuni includono i seguenti: artrite reumatoide, malattie demielinizzanti autoimmuni (per esempio, sclerosi multipla, encefalomielite allergica), artrite psoriatca, oftalmopatia endocrina, uveoretinite, lupus eritematoso sistemico, miastenia grave, morbo di Grave, glomerulonefrite, malattia epatologica autoimmune, malattia infiammatoria intestinale (per esempio, morbo di Crohn), anafilassi, reazione allergica, sindrome di Sjogren, diabete mellito di tipo I, cirrosi biliare primitiva, granulomatosi di Wegener, fibromialgia, polimiosite, dermatomiosite, insufficienza endocrina multipla, sindrome di Schmidt, uveite autoimmune, morbo di Addison, adrenalite, tiroidite, tiroidite di Hashimoto, malattia tiroidea autoimmune, anemia perniziosa, atrofia gastrica, epatite cronica, epatite lupoide, aterosclerosi, lupus eritematoso cutaneo subacuto, ipoparatiroidismo, sindrome di Dressler, trombocitopenia autoimmune, porpora trombocitopenica

idiopatica, anemia emolitica, pemfigo volgare, pemfigo, dermatitis herpetiformis, alopecia arcata, pemfigoide, scleroderma, sclerosi sistemica progressiva, sindrome CREST (calcinosi, fenomeno di Raynaud, dismotilità esofagea, sclerodattilia e telangiectasia), infertilità autoimmune maschile e femminile, spondilite anchilosante, colite ulcerosa, malattia del tessuto connettivo misto, poliarite nodosa, vasculite necrotizzante sistemica, dermatite atopica, rinite atopica, sindrome di Goodpasture, malattia di Chagas, sarcoidosi, febbre reumatica, asma, aborto ricorrente, sindrome anti-fosfolipidi, polmone del contadino, eritema multiforme, sindrome post cardiectomia, sindrome di Cushing, epatite autoimmune cronica attiva, polmone dell'avicoltore, necrolisi epidermica tossica, sindrome di Alport, alveolite, alveolite allergica, alveolite fibrosa, malattia polmonare interstiziale, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, reazione trasfusionale, arterite di Takayasu, polimialgia reumatica, arterite temporale, schistosomiasi, arterite a cellule giganti, ascariasi, aspergilloso, sindrome di Sampter, eczema, granulomatosi linfomatoide, morbo di Behcet, sindrome di Caplan, morbo di Kawasaki, dengue, encefalomyelite, endocardite, fibrosi endomiocardica, endoftalmite, eritema elevatum et diutinum, psoriasi, eritroblastosi fetale, fasciite eosinofila, sindrome di Shulman, sindrome di Felty, filariosi, ciclite, ciclite cronica, ciclite eterocronica, ciclite di Fuch, nefropatia da IgA, porpora di Henoch-Schonlein, malattia da trapianto contro ospite, rigetto di trapianto, cardiomiopatia, sindrome di Eaton-Lambert, policondrite recidivante,

crioglobulinemia, macroglobulemia di Waldenstrom, sindrome di Evan e insufficienza gonadica autoimmune.

Una malattia autoimmune è un disturbo dei linfociti B (per esempio, Lupus eritematoso sistemico, sindrome di Goodpasture, artrite reumatoide e diabete di tipo I), linfociti Th1 (per esempio, artrite reumatoide, sclerosi multipla, psoriasi, sindrome di Sjögren, tiroidite di Hashimoto, morbo di Graves, cirrosi biliare primaria, granulomatosi di Wegener, tubercolosi o malattia da trapianto contro l'ospite) o linfociti Th2 (per esempio, dermatite atopica, lupus eritematoso sistemico, asma atopico, rinocongiuntivite, rinite allergica, sistema di rinite allergica, rinite allergica, sistema di rinite, o malattia da trapianto contro ospite cronica). In generale, i disturbi che coinvolgono le cellule dendritiche comportano disturbi dei linfociti Th1 o dei linfociti Th2. In alcune forme di realizzazione, il disturbo autoimmunitario è un disturbo immunologico mediato dalle cellule T.

In alcune forme di realizzazione, la quantità del coniugato somministrato varia da circa 0,01 a circa 10 mg/kg per dose. In alcune forme di realizzazione, la quantità del coniugato somministrato varia da circa 0,01 a circa 5 mg/kg per dose. In alcune forme di realizzazione, la quantità del Coniugato somministrato varia da circa 0,05 a circa 5 mg/kg per dose. In alcune forme di realizzazione, la quantità del coniugato somministrato varia da circa 0,1 a circa 5 mg/kg per dose. In alcune forme di realizzazione, la quantità del coniugato somministrato varia da circa 0,1 a circa 4

mg/kg per dose. In alcune forme di realizzazione, la quantità del coniugato somministrato varia da circa 0,05 a circa 3 mg/kg per dose. In alcune forme di realizzazione, la quantità del coniugato somministrato varia da circa 0,1 a circa 3 mg/kg per dose. In alcune forme di realizzazione, la quantità del coniugato somministrato varia da circa 0,1 a circa 2 mg/kg per dose.

Caricamento di farmaco

Il caricamento di farmaco (p) è il numero medio di farmaci PBD per agente legante cellule, per esempio un anticorpo. Laddove i composti dell'invenzione sono legati alle cisteine, il carico di farmaci può variare da 1 a 8 farmaci (D) per agente legante cellule, vale a dire dove 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 frazioni di farmaco sono covalentemente fissato al legante cellulare. Le composizioni di coniugati includono raccolte di agenti leganti cellule, per esempio anticorpi, coniugati con una gamma di farmaci, da 1 a 8. Laddove i composti dell'invenzione sono legati alla lisina, il carico di farmaci può variare da 1 a 80 farmaci (D) per agente legante cellule, sebbene possa essere preferito un limite superiore di 40, 20, 10 o 8. Le composizioni di coniugati includono raccolte di agenti leganti cellule, per esempio anticorpi, coniugati con una gamma di farmaci, da 1 a 80, da 1 a 40, da 1 a 20, da 1 a 10 o da 1 a 8.

Il numero medio di farmaci per anticorpo nelle preparazioni di ADC derivanti dalle reazioni di coniugazione può essere caratterizzato da mezzi convenzionali come UV, HPLC a fase inversa, HIC, spettroscopia di massa, saggio ELISA ed elettroforesi. La

distribuzione quantitativa degli ADC in termini di p può anch'essa essere determinata. Mediante ELISA può essere determinato il valore medio di p in una particolare preparazione ADC (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Tuttavia, la distribuzione dei valori di p (farmaco) non è distinguibile dal legame anticorpo-antigene e dalla limitazione del rilevamento di ELISA. Inoltre, il saggio ELISA per il rilevamento di coniugati farmaco-anticorpo non determina la posizione in cui le frazioni di farmaco sono fissate all'anticorpo, come la catena pesante o i frammenti di catena leggera o i particolari residui amminoacidici. In alcuni casi, la separazione, la purificazione e la caratterizzazione di ADC omogenei in cui p è un certo valore da ADC con altri carichi di farmaci possono essere ottenute mediante mezzi come HPLC a fase inversa o elettroforesi. Tali tecniche sono applicabili anche ad altri tipi di coniugati.

Per alcuni coniugati di farmaco-anticorpo, p può essere limitato dal numero di siti di fissaggio sull'anticorpo. Per esempio, un anticorpo può avere soltanto uno o vari gruppi tiolici cisteinici, oppure può avere soltanto uno o vari gruppi tiolici sufficientemente reattivi attraverso i quali può essere fissato un linker. Un caricamento di farmaco superiore, per esempio $p > 5$, può causare aggregazione, insolubilità, tossicità o perdita di permeabilità cellulare di determinati coniugati di farmaco-anticorpo.

Tipicamente, durante una reazione di coniugazione viene coniugato meno del massimo teorico di frazioni di farmaco a un

anticorpo. Un anticorpo può contenere, per esempio, molti residui di lisina che non reagiscono con il Farmaco-Linker. Soltanto i gruppi lisina più reattivi possono reagire con un reagente linker ammino-reattivo. Inoltre, soltanto i gruppi tiolo della cisteina più reattivi possono reagire con un reagente di linker reattivo ai tioli. Generalmente, gli anticorpi non contengono molti gruppi tiolici cisteinici liberi e reattivi, ammesso che ne contengano, che possono essere legati a un farmaco tramite una frazione di farmaco. La maggior parte dei residui di tiolo di cisteina negli anticorpi dei composti esistono come ponti disolfuro e devono essere ridotti con un agente riducente come il ditiotreitolo (DTT) o TCEP, in condizioni riducente parziale o totale. Il carico (rapporto farmaco/anticorpo) di un ADC può essere controllato in differenti modi, tra cui: (i) limitare l'eccesso molare di Drug Linker rispetto all'anticorpo, (ii) limitare il tempo o la temperatura di reazione di coniugazione e (iii) condizioni riduzioni parziali o limitanti per la modifica del tiolo della cisteina.

Determinati anticorpi hanno disolfuri intercatena riducibili, vale a dire ponti di cisteine. Gli anticorpi possono essere resi reattivi per coniugazione con reagenti linker mediante trattamento con un agente riducente come il DTT (ditiotreitolo). Pertanto ciascun ponte di cisteina formerà, teoricamente, due nucleofili reattivi con tiolo. Negli anticorpi è possibile introdurre gruppi nucleofili aggiuntivi tramite la reazione di lisine con 2-imminotiolano (reagente di Traut) avendo come risultato la conversione di un'ammina

in un tiolo. I gruppi tiolo reattivi possono essere introdotti nell'anticorpo (in un relativo frammento) ingegnerizzando uno, due, tre, quattro, o più residui di cisteina (per esempio, preparando anticorpi mutanti comprendenti uno o più residui amminoacidici di cisteina non nativi). US 7521541 insegna ingegneria degli anticorpi mediante l'introduzione di amminoacidi reattivi a cisteina.

Gli amminoacidi cisteinici possono essere ingegnerizzati in corrispondenza di siti reattivi in un anticorpo e che non formano legami disolfuro intercatena o intermolecolari (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). I tioli di cisteina ingegnerizzati possono reagire con i reagenti linker o i reagenti linker-farmaco della presente invenzione che hanno gruppi elettrofili reattivi al tiolo come maleimmide o alfa-alo ammidi per formare ADC con anticorpi ingegnerizzati con cisteina e frazioni farmaco PBD. La posizione della frazione di farmaco può quindi essere progettata, controllata e conosciuta. Il caricamento di farmaco può essere controllato poiché i gruppi tiolici di cisteina ingegnerizzati generalmente reagiscono con reagenti di linker reattivi ai tioli o reagenti linker-farmaco in resa elevata. L'ingegnerizzazione di un anticorpo IgG per introdurre un amminoacido cisteinico mediante sostituzione in corrispondenza di un singolo sito sulla catena pesante o leggera fornisce due nuove cisteine sull'anticorpo simmetrico. Un carico di farmaco vicino a 2 può essere ottenuto con quasi omogeneità del prodotto di coniugazione ADC.

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

Laddove più di un gruppo nucleofilo o elettrofilo dell'anticorpo reagisce con un intermedio farmaco-linker o reagente linker seguito da un reagente di frazione di farmaco, il prodotto risultante è una miscela di composti ADC con una distribuzione di gruppi di farmaci fissati a un anticorpo, per esempio 1, 2, 3, ecc. I metodi di cromatografia liquida come fase polimerica inversa (PLRP) e interazione idrofobica (HIC) possono separare i composti nella miscela in base al valore di caricamento del farmaco. Le preparazioni di ADC con un singolo valore di caricamento di farmaco (p) possono essere isolati, tuttavia, questi ADC con un singolo valore di caricamento possono ancora essere miscele eterogenee poiché le frazioni di farmaco possono essere fissate, tramite il linker, in corrispondenza di differenti siti sull'anticorpo.

Pertanto, le composizioni coniugate farmaco-anticorpo dell'invenzione includono miscele di composti coniugati farmaco-anticorpo in cui l'anticorpo ha una o più frazioni di farmaco PBD e in cui le frazioni di farmaco possono essere fissate all'anticorpo in corrispondenza di vari residui amminoacidici.

In una forma di realizzazione, il numero medio di gruppi dimero di pirrolobenzodiazepina per agente legante cellule è compreso tra 1 e 20. In alcune forme di realizzazione, l'intervallo è selezionato tra 1 a 8, da 2 a 8, da 2 a 6, da 2 a 4 e da 4 a 8.

In alcune forme di realizzazione, esiste un gruppo dimero di pirrolobenzodiazepina per agente legante cellule.

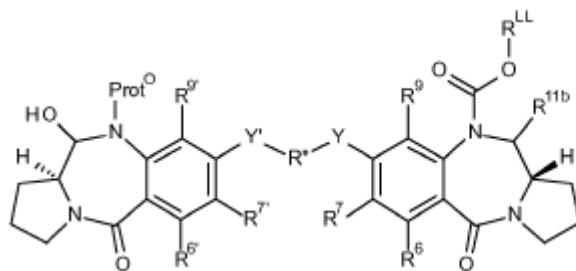
Vie sintetiche generali

La sintesi dei composti PBD è ampiamente discussa nei seguenti riferimenti:

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

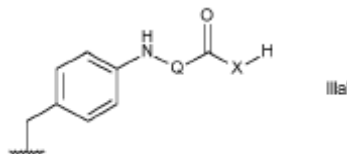
Via di sintesi

I composti della presente invenzione di formula I in cui R^{20} e R^{21} formano un doppio legame azoto-carbonio tra l'azoto e gli atomi di carbonio a cui sono legati possono essere sintetizzati da un composto di Formula II:



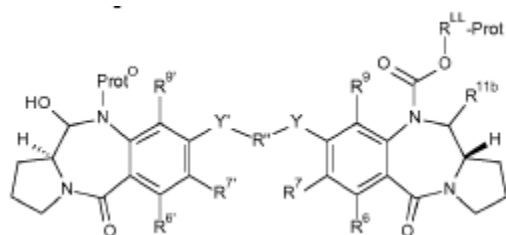
Formula 2

in cui R^6 , R^7 , R^9 , $R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$, R^{11b} , Y , Y' e R'' sono definiti per i composti di formula I, e R^{LL} è un precursore di R^L - questo metodo è particolarmente applicabile ai composti di formula I in cui R^L è di formula IIIa. Per questi composti, R^{LL} sarà tipicamente una porzione di R^L , come un gruppo di formula IIIa':



In tal caso, la reazione prevede l'aggiunta del gruppo G^L . Il secondo passaggio richiesto è la rimozione del gruppo $Prot^O$.

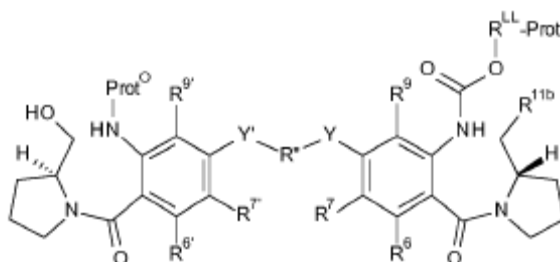
I composti di Formula 2 possono essere realizzati deproteggendo il gruppo R^{LL} di composti di Formula 3:



Formula 3

in cui R^6 , R^7 , R^9 , $R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$, R^{11b} , Y , Y' e R'' sono definiti per i composti di formula I, $R^{LL-Prot}$ è una versione protetta di R^{LL} e il $Prot^N$ rappresenta un semplice gruppo protettivo dell'azoto (per esempio, Fmoc, Boc) che è ortogonale al gruppo protettivo R^{LL} .

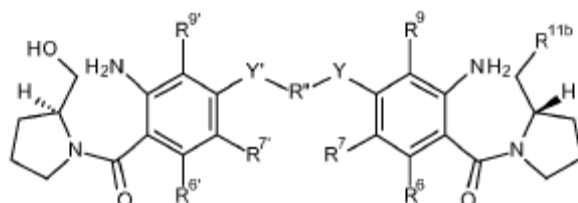
I composti di formula 3 possono essere prodotti mediante chiusura d'anello di composti di formula 4:



Formula 4

laddove la chiusura dell'anello avviene per ossidazione, per esempio Swern.

I composti di formula 4 possono essere sintetizzati dai composti di formula 5:



Formula 5

mediante un'addizione in fasi di due gruppi protettivi. Ciò può essere ottenuto mediante una semplice protezione del gruppo ammino che risulterà nel legame imminico nel composto finale (per esempio da

Fmoc, Boc), proseguendo con l'installazione di un gruppo protettivo desiderato nell'altro gruppo ammino.

I composti di formula I in cui R^L è di formula IIIb, possono essere sintetizzati in modo simile, sebbene il gruppo R^L completo possa essere installato a partire da un composto di Formula 5, piuttosto che con l'uso di un precursore protetto.

I composti di Formula 5 possono essere sintetizzati con metodi noti, come quelli descritti in WO 2011/130598.

In alternativa, i composti di Formula 4 possono essere sintetizzati per via monomerica, come mostrato nell'esempio 3.

I composti della presente invenzione di formula I in cui R²⁰ e R²¹ non formano un doppio legame azoto-carbonio tra gli atomi di azoto e di carbonio a cui sono legati possono essere apportati mediante modifiche alle vie di cui sopra.

Sintesi di coniugati di farmaco

I coniugati possono essere preparati come precedentemente descritto. Gli anticorpi possono essere coniugati ai composti Farmaco-Linker come descritto in Doronina et al., Nature Biotechnology, 2003, 21, 778-784). In breve, gli anticorpi (4-5 mg/ml) in PBS contenenti borato di sodio 50 mM a pH 7,4 vengono ridotti con tris(carbossietil)fosfina cloridrato (TCEP) a 37°C. L'andamento della reazione, che riduce i disolfuri intercatena, viene monitorato mediante reazione con acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) e lasciato procedere fino al raggiungimento del livello desiderato di tioli/mAb. L'anticorpo ridotto viene quindi raffreddato a 0°C e

alchilato con 1,5 equivalenti di farmaco-linker maleimmidico per tiolo di anticorpo. Dopo 1 ora, la reazione viene estinta mediante l'aggiunta di 5 equivalenti di N-acetil cisteina. Il Farmaco-Linker estinto viene rimosso mediante filtrazione su gel su una colonna PD-10. L'ADC viene quindi filtrato sterile attraverso un filtro per siringa da 0,22 μm . La concentrazione proteica può essere determinata mediante analisi spettrale a 280 nm e 329 nm, rispettivamente, con correzione per il contributo dell'assorbanza del farmaco a 280 nm. La cromatografia di esclusione dimensionale può essere usata per determinare l'estensione dell'aggregazione di anticorpi, e RP-HPLC può essere usato per determinare i livelli di rimanente Farmaco-Linker estinto-NAC.

Ulteriori preferenze

Le seguenti preferenze possono applicarsi a tutti gli aspetti dell'invenzione come sopra descritto o possono riguardare un singolo aspetto. Le preferenze possono essere combinate insieme in qualsiasi combinazione.

In alcune forme di realizzazione, $R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$ e Y' sono selezionati dagli stessi gruppi rispettivamente di R^6 , R^7 , R^9 e Y . In alcune di queste forme di realizzazione, $R^{6'}$, $R^{7'}$, $R^{9'}$ e Y' sono rispettivamente identici a R^6 , R^7 , R^9 e Y .

N10'-C11'

In alcune forme di realizzazione, R^{20} è H e R^{21} è OH, OR^A, in cui R^A è C₁₋₄ alchile. In alcune di queste forme di realizzazione R^{21} è H.

Marco Giovanni Mari
USBM-EP-090

In altre di queste forme di realizzazione, R^{21} è OR^A , in cui R^A è C_{1-4} alchile. In alcune di queste forme di realizzazione, R^A è metile.

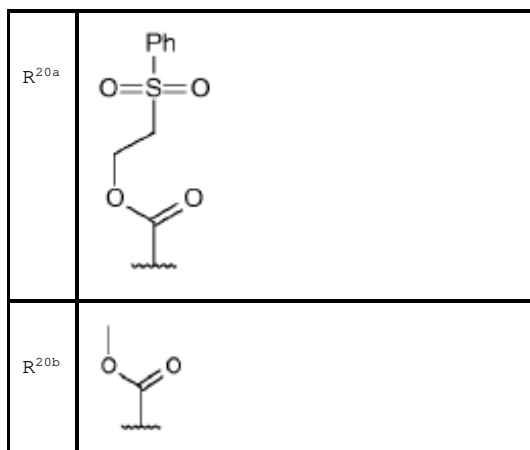
In alcune forme di realizzazione, R^{20} e R^{21} formano un doppio legame azoto-carbonio tra l'azoto e gli atomi di carbonio a cui sono legati.

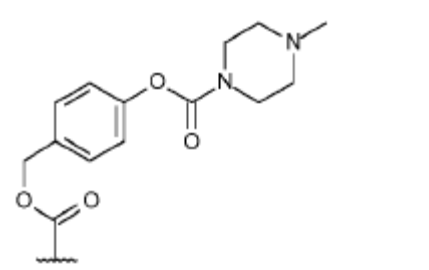
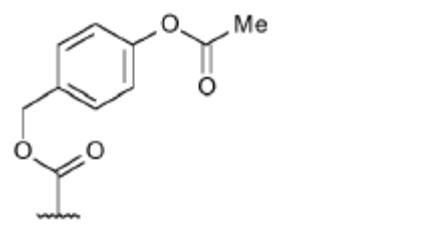
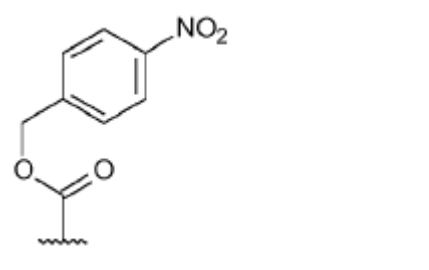
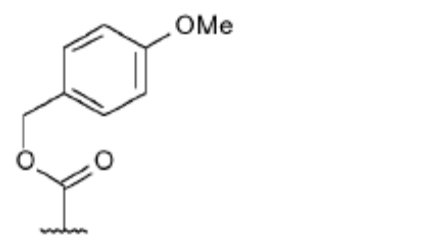
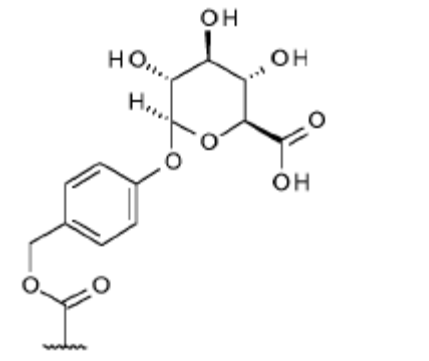
In alcune forme di realizzazione, R^{20} è H e R^{21} è SO_zM , in cui z è 2 o 3 e M è un catione monovalente farmaceuticamente accettabile. In alcune di queste forme di realizzazione, M è un catione monovalente farmaceuticamente accettabile e può essere Na^+ . Inoltre, in alcune forme di realizzazione, z è 3.

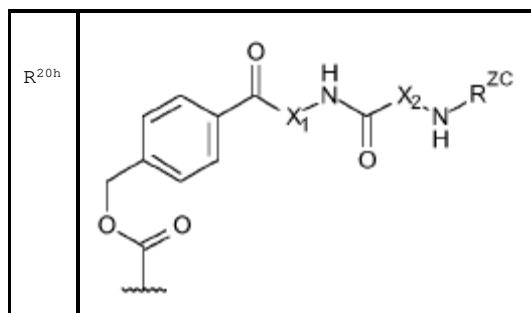
In alcune forme di realizzazione, R^{20} è H e R^{21} è H.

In alcune forme di realizzazione in cui R^{20} è (d-iii), può esserci un gruppo nitro aggiuntivo sull'anello benzenico, per esempio orto rispetto a R^Z .

In alcune forme di realizzazione, R^{21} è OH o OR^A , in cui R^A è C_{1-4} alchile e R^{20} è selezionato tra:



R ^{20c}	
R ^{20d}	
R ^{20e}	
R ^{20f}	
R ^{20g}	



$-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-$ rappresenta un dipeptide. Gli amminoacidi nel dipeptide possono essere qualsiasi combinazione di amminoacidi naturali e amminoacidi non naturali. Il dipeptide può essere il sito d'azione per il clivaggio mediato da catepsina.

In una forma di realizzazione, il dipeptide, $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-$, è selezionato tra:

- Phe-Lys-,
- Val-Ala-,
- Val-Lys-,
- Ala-Lys-,
- Val-Cit-,
- Phe-Cit-,
- Leu-Cit-,
- Ile-Cit-,
- Phe-Arg-,
- Trp-Cit-

in cui Cit è citrullina.

Preferibilmente, il dipeptide, $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-$, è selezionato tra:

- Phe-Lys-,
- Val-Ala-,
- Val-Lys-,
- Ala-Lys-,
- Val-Cit-.

Più preferibilmente, il dipeptide, $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-$, è - Phe-Lys- o -Val-Ala-.

Possono essere usate altre combinazioni dipeptidi, incluse quelle descritte da Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869.

In una forma di realizzazione, la catena laterale amminoacidica è derivatizzata, laddove appropriato. Per esempio, un gruppo ammino o un gruppo carbossilico di una catena laterale di un amminoacido può essere derivatizzato.

In una forma di realizzazione, un gruppo ammino NH_2 di un amminoacido a catena laterale, come la lisina, è una forma derivatizzata selezionata dal gruppo costituito da NHR e NRR' .

In una forma di realizzazione, un gruppo carbossilico $COOH$ di un amminoacido a catena laterale, come l'acido aspartico, è una forma derivatizzata selezionata dal gruppo costituito da $COOR$, $CONH_2$, $CONHR$ e $CONRR'$.

In una forma di realizzazione, la catena laterale dell'amminoacido è protetta chimicamente, laddove appropriato. Il gruppo protettivo della catena laterale può essere un gruppo come discusso sopra. I presenti inventori hanno stabilito che le sequenze

amminoacidiche protette sono clivabili da enzimi. Per esempio, è stato stabilito che una sequenza dipeptidica comprendente un residuo di Lys protetto dalla catena laterale di Boc è scindibile dalla catepsina.

I gruppi protettivi per le catene laterali degli amminoacidi sono ben noti nel ramo e sono descritti nel catalogo Novabiochem. Ulteriori strategie di gruppo protettivo sono esposte in *Protective Groups in Organic Synthesis*, Greene e Wuts.

I possibili gruppi protettivi di catena laterale sono mostrati di seguito per quegli amminoacidi che hanno funzionalità di catena laterale reattiva:

Arg: Z, Mtr, Tos;

Asn: Trt, Xan;

Asp: Bzl, t-Bu;

Cys: Acn, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;

Glu: Bzl, t-Bu;

Gln: Trt, Xan;

His: Boc, Dnp, Tos, Trt;

Lys: Boc, Z-CI, Fmoc, Z, Alloc;

Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;

Thr: Bz;

Trp: Boc;

Tyr: Bzl, Z, Z-Br.

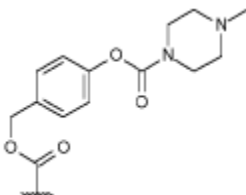
In una forma di realizzazione, la protezione laterale della catena è selezionata per essere ortogonale a un gruppo previsto come,

o come parte di, un gruppo di incappucciamento, laddove presente. Pertanto, la rimozione del gruppo di protezione della catena laterale non rimuove il gruppo di incappucciamento o qualsiasi funzionalità del gruppo di protezione che fa parte del gruppo di incappucciamento.

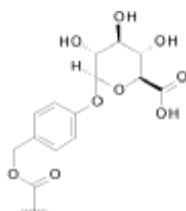
In altre forme di realizzazione dell'invenzione, gli amminoacidi selezionati sono quelli che non hanno funzionalità di catena laterale reattiva. Per esempio, gli amminoacidi possono essere selezionati tra: Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro e Val.

È particolarmente preferito nella presente invenzione che se L^1 comprende un dipeptide, allora $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-$ sia lo stesso dipeptide.

Altri gruppi R^{20} preferiti includono:



e



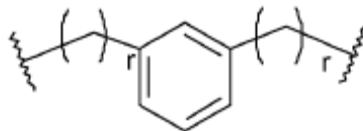
Collegamento dimerico

In alcune forme di realizzazione, Y e Y' sono entrambi O.

In alcune forme di realizzazione, R'' è un gruppo C₃₋₇ alchilene senza sostituenti. In alcune di queste forme di realizzazione, R'' è

un C₃, C₅ o C₇ alchilene. In particolare, R'' può essere un C₃ o C₅ alchilene.

In altre forme di realizzazione, R'' è un gruppo di formula:



in cui r è 1 o 2;

Il gruppo fenilene può essere sostituito da un gruppo piridilene.

Da R⁶ a R⁹

In alcune forme di realizzazione, R⁹ è H.

In alcune forme di realizzazione, R⁶ è selezionato tra H, OH, OR, SH, NH₂, nitro e alo e può essere selezionato tra H o alo. In alcune di queste forme di realizzazione R⁶ è H.

In alcune forme di realizzazione, R⁷ è selezionato tra H, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR' e alo. In alcune di queste forme di realizzazione R⁷ è selezionato tra H, OH e OR, in cui R è selezionato tra gruppi C₁₋₇ alchile, C₃₋₁₀ eterociclile e C₅₋₁₀ arile facoltativamente sostituiti. R può essere più preferibilmente un gruppo C₁₋₄ alchile, che può essere sostituito o meno. Un sostituito di interesse è un gruppo C₅₋₆ arile (per esempio, fenile). Sostituiti particolarmente preferiti nelle posizioni 7 sono OMe e OCH₂Ph. Altri sostituiti di particolare interesse sono dimetilammino (vale a dire -NMe₂); -(OC₂H₄)_qOMe, in cui q è da 0 a 2; C₆ eterociclici contenenti azoto, inclusi morfolino, piperidinile e N-metil-piperazinile.

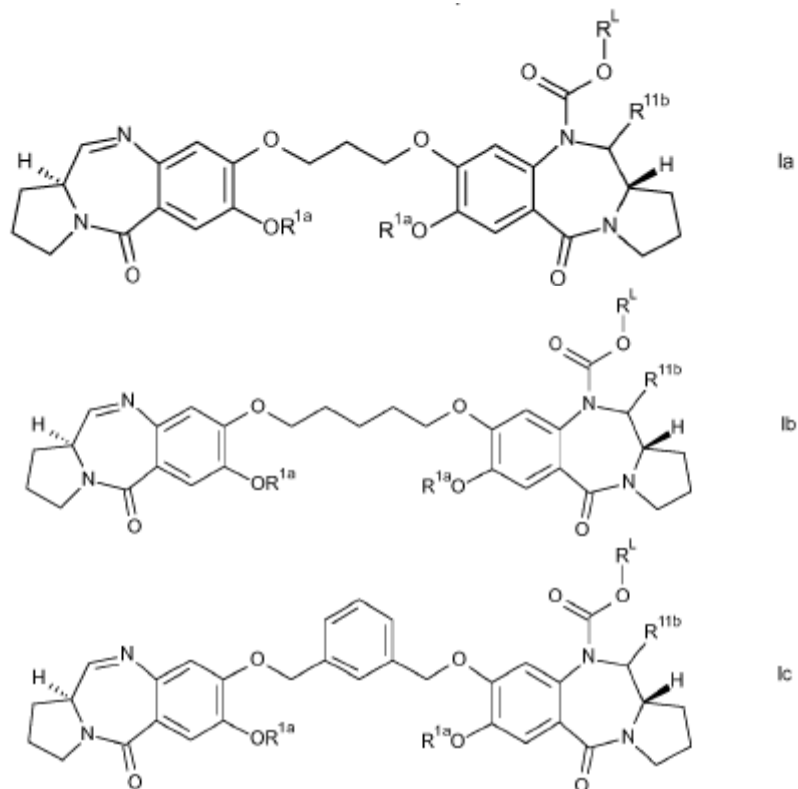
Queste forme di realizzazione e preferenze si applicano rispettivamente a R^{9'}, R^{6'} e R^{7'}.

R^{11b}

In alcune forme di realizzazione, R^{11b} è OH.

In alcune forme di realizzazione, R^{11b} è OR^A, in cui R^A è C₁₋₄ alchile. In alcune di queste forme di realizzazione, R^A è metile.

In alcune forme di realizzazione del primo aspetto della presente invenzione sono di formula Ia, Ib o Ic:



in cui R^{1a} è selezionato tra metile e benzile;

R^L e R^{11b} sono come definito sopra.

Queste forme di realizzazione e preferenze si applicano anche al secondo aspetto dell'invenzione.

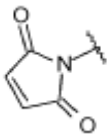
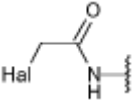
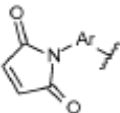
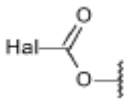
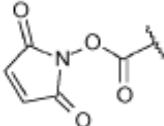
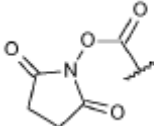
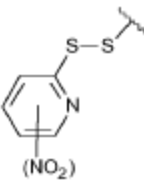

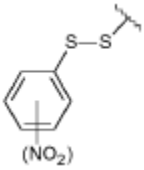

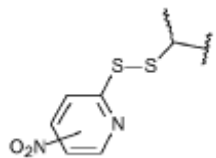

Linker (R^L)

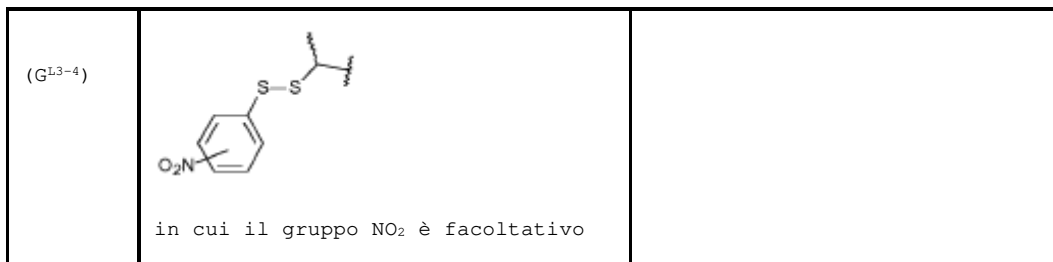
In alcune forme di realizzazione, R^L è di formula IIIa.

In alcune forme di realizzazione, R^{LL} è di formula IIIa'.

G^L

G^L può essere selezionato tra

(G ^{L1-1})		(G ^{L4})	 In cui Hal = I, Br, Cl
(G ^{L1-2})		(G ^{L5})	
(G ^{L2})		(G ^{L6})	
(G ^{L3-1})	 in cui il gruppo NO ₂ è facoltativo	(G ^{L7})	
(G ^{L3-2})	 in cui il gruppo NO ₂ è facoltativo	(G ^{L8})	
(G ^{L3-3})	 in cui il gruppo NO ₂ è facoltativo	(G ^{L9})	

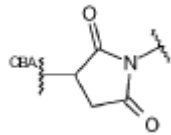
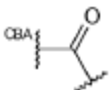
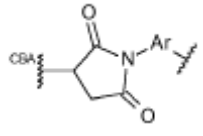
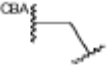
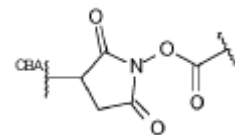
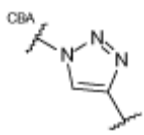
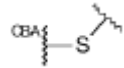
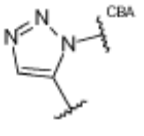
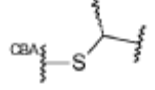
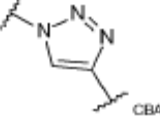
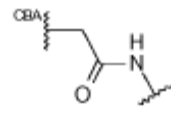
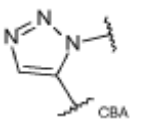
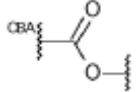


in cui Ar rappresenta un gruppo C₅₋₆ arilene, per esempio fenilene.

In alcune forme di realizzazione, G^L è selezionato tra G^{L1-1} e G^{L1-2}. In alcune di queste forme di realizzazione, G^L è G^{L1-1}.

G^{LL}

G^{LL} può essere selezionato tra:

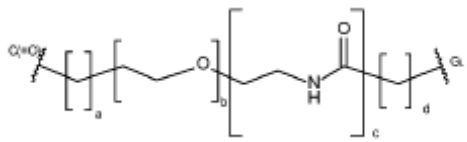
(G ^{LL1-1})		(G ^{LL6})	
(G ^{LL1-2})		(G ^{LL7})	
(G ^{LL2})		(G ^{LL8-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL4})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL5})			

in cui Ar rappresenta un gruppo C₅₋₆ arilene, per esempio fenilene.

In alcune forme di realizzazione, G^{LL} è selezionato tra G^{LL1-1} e G^{LL1-2}. In alcune di queste forme di realizzazione, G^{LL} è G^{LL1-1}.

X

X è:



in cui a = da 0 a 5, b = da 0 a 16, c = 0 o 1, d = da 0 a 5.

a può essere 0, 1, 2, 3, 4 o 5. In alcune forme di realizzazione, a è da 0 a 3. In alcune di queste forme di realizzazione, a è 0 o 1. In ulteriori forme di realizzazione, a è 0.

b può essere 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. In alcune forme di realizzazione, b è da 0 a 12. In alcune di queste forme di realizzazione, b è da 0 a 8 e può essere 0, 2, 4 o 8.

c può essere 0 o 1.

d può essere 0, 1, 2, 3, 4 o 5. In alcune forme di realizzazione, d è da 0 a 3. In alcune di queste forme di realizzazione, d è 1 o 2. In ulteriori forme di realizzazione, d è 2.

In alcune forme di realizzazione di X, a è 0, c è 1 e d è 2 e b può essere compreso tra 0 e 8. In alcune di queste forme di realizzazione, b è 0, 4 o 8.

Q

In una forma di realizzazione, Q è un residuo amminoacidico. L'amminoacido può essere un amminoacido naturale o un amminoacido non naturale.

In una forma di realizzazione, Q è selezionato tra: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg e Trp, in cui Cit è citrullina.

In una forma di realizzazione, Q comprende un residuo dipeptidico. Gli amminoacidi nel dipeptide possono essere qualsiasi combinazione di amminoacidi naturali e amminoacidi non naturali. In alcune forme di realizzazione, il dipeptide comprende amminoacidi naturali. Laddove il linker è un linker labile della catepsina, il dipeptide è il sito d'azione per il clivaggio mediato da catepsina. Il dipeptide è quindi un sito di riconoscimento per la catepsina.

In una forma di realizzazione, Q è selezionato tra:

CO-Phe-Lys-NH,

CO-Val-Ala-NH,

CO-Val-Lys-NH,

CO-Ala-Lys-NH,

CO-Val-Cit-NH,

CO-Phe-Cit-NH,

CO-Leu-Cit-NH,

CO-Ile-Cit-NH,

CO-Phe-Arg-NH, e

CO-Trp-Cit-NH;

in cui Cit è citrullina.

Preferibilmente, Q è selezionato tra:

$^{\text{co}}\text{-Phe-Lys-NH}$,

$^{\text{co}}\text{-Val-Ala-NH}$,

$^{\text{co}}\text{-Val-Lys-NH}$,

$^{\text{co}}\text{-Ala-Lys-NH}$,

$^{\text{co}}\text{-Val-Cit-NH}$.

Più preferibilmente, Q è selezionato tra $^{\text{co}}\text{-Phe-Lys-NH}$, $^{\text{co}}\text{-Val-Cit-NH}$ e $^{\text{co}}\text{-Val-Ala-NH}$.

Altre combinazioni dipeptidi di interesse includono:

$^{\text{co}}\text{-Gly-Gly-NH}$,

$^{\text{co}}\text{-Pro-Pro-NH}$, e

$^{\text{co}}\text{-Val-Glu-NH}$.

Possono essere usate altre combinazioni dipeptidi, incluse quelle descritte da Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869.

In alcune forme di realizzazione, Q^x è un residuo di tripeptide. Gli amminoacidi nel tripeptide possono essere qualsiasi combinazione di amminoacidi naturali e amminoacidi non naturali. In alcune forme di realizzazione, il tripeptide comprende amminoacidi naturali. Laddove il linker è un linker labile della catepsina, il tripeptide è il sito d'azione per il clivaggio mediato da catepsina. Il tripeptide è quindi un sito di riconoscimento per la catepsina.

In una forma di realizzazione, la catena laterale dell'amminoacido è protetta chimicamente, laddove appropriato. Il gruppo protettivo della catena laterale può essere un gruppo come discusso di seguito. Le sequenze amminoacidiche protette sono

clivabili da enzimi. Per esempio, una sequenza dipeptidica comprendente un residuo di Lys protetto dalla catena laterale di Boc è clivabile da catepsina.

I gruppi protettivi per le catene laterali degli amminoacidi sono ben noti nel ramo e sono descritti nel catalogo Novabiochem, e come descritto sopra.

In alcune forme di realizzazione, R^L è di formula IIIb.

In alcune forme di realizzazione, R^{LL} è formula IIIb'.

R^{L1} e R^{L2} sono selezionati indipendentemente tra H e metile, oppure insieme all'atomo di carbonio a cui sono legati formano un gruppo ciclopropilene o ciclobutilene.

In alcune forme di realizzazione, R^{L1} e R^{L2} sono H.

In alcune forme di realizzazione, R^{L1} è H e R^{L2} è metile.

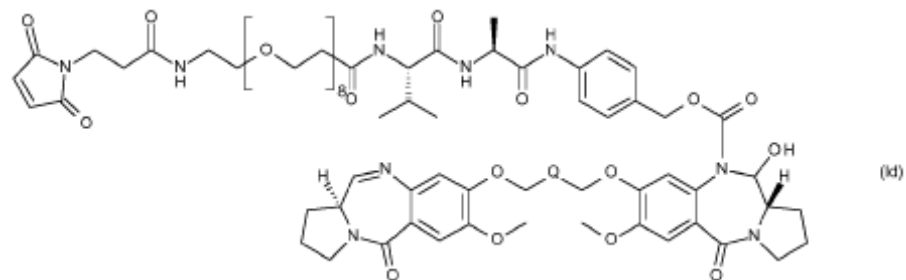
In alcune forme di realizzazione, sia R^{L1} che R^{L2} sono metile.

In alcune forme di realizzazione, R^{L1} e R^{L2} insieme all'atomo di carbonio a cui sono legati formano un gruppo ciclopropilene.

In alcune forme di realizzazione, R^{L1} e R^{L2} insieme all'atomo di carbonio a cui sono legati formano un gruppo ciclobutilene.

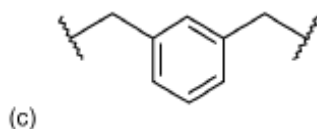
Nel gruppo IIIb, in alcune forme di realizzazione, e è 0. In altre forme di realizzazione, e è 1 e il gruppo nitro può trovarsi in qualsiasi posizione disponibile dell'anello. In alcune di queste incarnazioni, è in posizione orto. In altre di queste forme di realizzazione, è nella posizione para.

In una forma di realizzazione particolare, il primo aspetto dell'invenzione comprende un coniugato di formula Id:

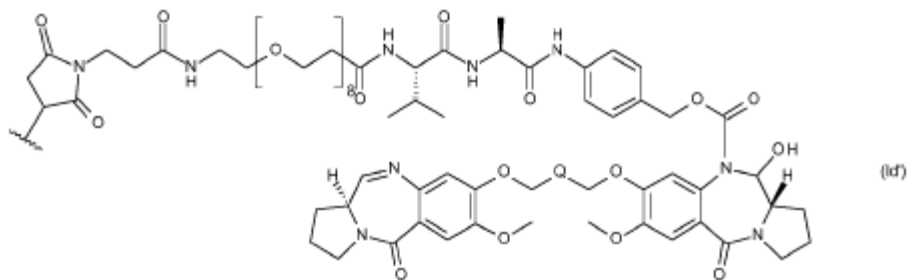


in cui Q è selezionato tra:

- (a) $-\text{CH}_2-$;
- (b) $-\text{C}_3\text{H}_6-$; e

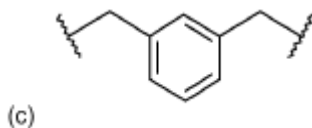


In una forma di realizzazione particolare, il secondo aspetto dell'invenzione, il linker farmaco (D^{L}) è di formula (Id'):

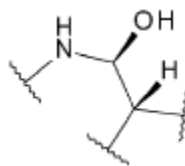


in cui Q è selezionato tra:

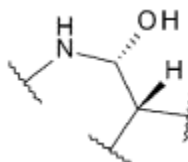
- (a) $-\text{CH}_2-$;
- (b) $-\text{C}_3\text{H}_6-$; e



In alcune forme di realizzazione della presente invenzione, il sostituente C11 può essere nella seguente disposizione stereochimica relativa ai gruppi vicini:



In altre forme di realizzazione, il sostituente C11 può essere nella seguente disposizione stereochimica relativa ai gruppi vicini:



Esempi

Informazione generali

La cromatografia flash è stata eseguita usando un Biotage Isolera 1^m usando un'eluizione in gradiente a partire dall'88% di esano/EtOAc o dal 99,9% di DCM/MeOH fino a quando tutti i componenti attivi UV (rilevamento a 214 e 254 nm) non venivano eluiti dalla colonna. Il gradiente è stato mantenuto manualmente ogni volta che è stata osservata una sostanziale eluizione di materiale attivo UV. La purezza delle frazioni è stata verificata mediante cromatografia su strato sottile (TLC) usando il gel di silice Merck Kieselgel 60 F254, con indicatore fluorescente su lastre di alluminio. La visualizzazione della TLC è stata ottenuta con luce UV o vapore di iodio, se non diversamente indicato. I solventi per estrazione e cromatografia sono stati acquistati e usati senza ulteriore purificazione da VWR UK. Tutti i prodotti della chimica fine sono stati acquistati da Sigma-Aldrich o TCI Europe, salvo differente

indicazione. I reagenti pegilati sono stati ottenuti da Quanta biodesign US tramite Stratech UK.

Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati ottenuti su uno spettrometro Bruker Avance® 400. Le costanti di accoppiamento sono espresse in hertz (Hz). Gli spostamenti chimici sono registrati in parti per milione (ppm) a valle dal tetrametilsilano. Le molteplicità di spin sono descritte come s (singoletto), bs (singoletto allargato), d (doppietto), t (tripletto), e m (multipletto).

Le condizioni analitiche LC/MS (per il monitoraggio della reazione e la determinazione della purezza) erano le seguenti: La spettrometria di massa con elettrospray in modalità positiva è stata eseguita usando Shimadzu Nexera®/Prominence® LCMS-2020. Le fasi mobili usate erano solvente A (H_2O con acido formico 0,1%) e solvente B (CH_3CN con acido formico 0,1%). Gradiente per l'eluizione di routine di 3 minuti: Composizione iniziale 5% di B mantenuta per 25 secondi, quindi aumentata dal 5% di B al 100% di B in un periodo di 1 minuto e 35 secondi. La composizione è stata mantenuta per 50 secondi al 100% di B, quindi viene riportata al 5% di B in 5 secondi e mantenuta lì per 5 secondi. La durata totale dell'eluizione a gradiente è stata di 3,0 minuti. Gradiente per un'eluizione di 15 minuti: Composizione iniziale 5% di B mantenuta per 1 minuto, quindi aumentata dal 5% di B al 100% di B in un periodo di 9 minuti. La composizione è stata mantenuta per 2 minuti al 100% di B, quindi veniva riportata al 5% di B in 10 secondi e mantenuta lì per 2 minuti e 50 secondi. La durata totale dell'eluizione a gradiente è stata di 15,0 minuti. La portata

era di 0,8 ml/minuto (per 3 minuti) e 0,6 ml/minuto (per 15 minuti). Il rilevamento era a 254 nm. Colonne: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1,7 µm 2,1 x 50 mma 50°C dotata di precolonna Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130 A, 1,7 µm, 2,1 mm x 5 mm (eluizione di routine di 3 minuti); e ACE Excel 2 C18-AR, 2 µ, 3,0 x 100 mm dotata di precolonna Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130 A, 1,7 µm, 2,1 mmx 5 mm (eluizione di 15 minuti).

Le condizioni di HPLC preparative erano le seguenti: La cromatografia liquida ultraveloce ad alte prestazioni (UFLC) in fase inversa è stata eseguita su una macchina Shimadzu Prominence® usando una colonna Phenomenex® Gemini NX 5µ C18 (a 50°C) 150 x 21,2 mm. Gli eluenti usati erano solvente A (H₂O con acido formico 0,1%) e solvente B (CH₃CN con acido formico 0,1%). Tutti gli esperimenti UFLC sono stati eseguiti con condizioni di gradiente:

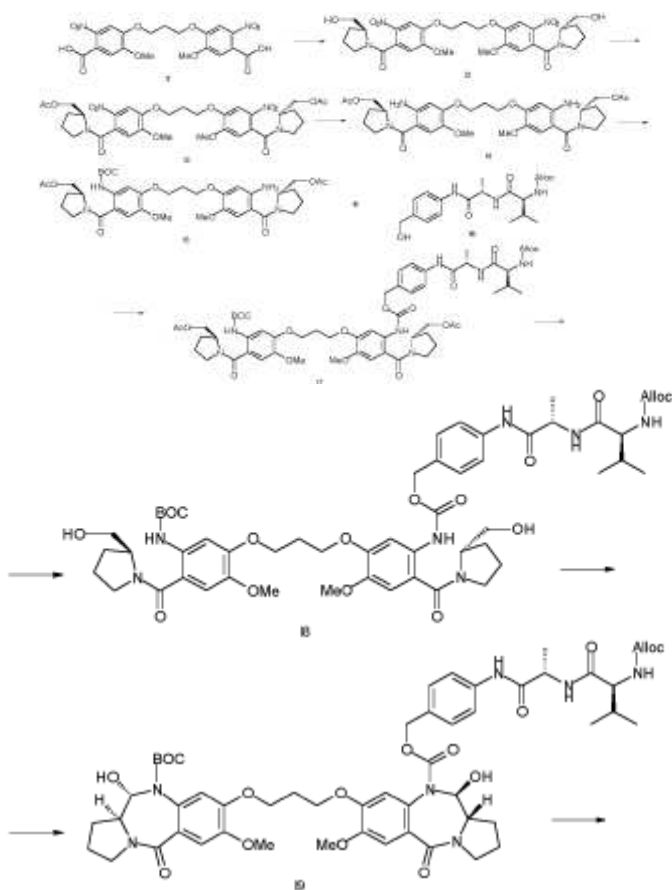
Metodo A: Composizione iniziale 13% di B aumentata al 60% di B in un periodo di 15 minuti, quindi aumentata al 100% di B in 2 minuti. La composizione è stata mantenuta per 1 minuto al 100% di B, quindi veniva riportata al 13% di B in 0,1 minuti e mantenuta lì per 1,9 minuti. La durata totale dell'eluizione a gradiente è stata di 20,0 minuti. Il flusso era di 20,0 ml/minuto e il rilevamento era a 254 e 280 nm.

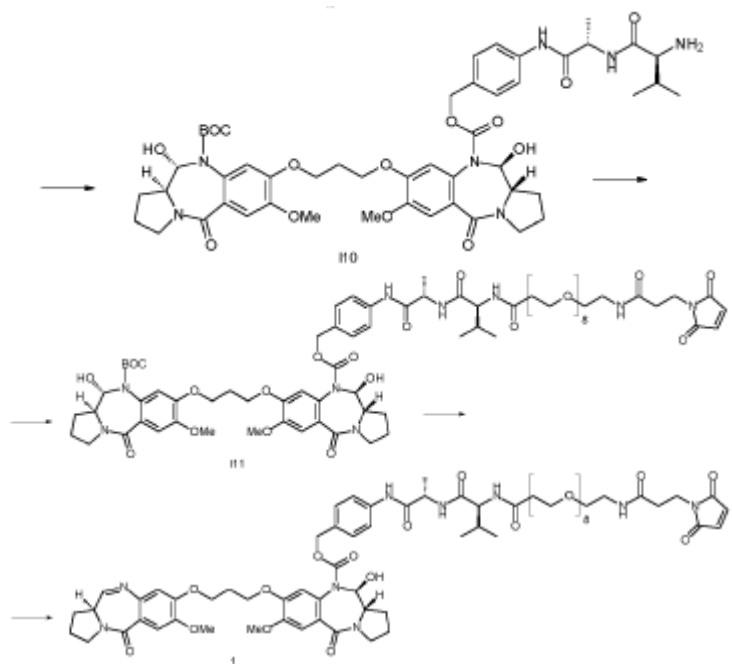
Metodo B: La composizione iniziale 13% di B viene aumentata al 70% di B in un periodo di 17 minuti e mantenuta per 2 minuti, quindi viene riportata al 13% di B in 0,1 minuti e mantenuta lì per 1,9 minuti. La durata totale dell'eluizione a gradiente è

stata di 20,0 minuti. Il flusso era di 20,0 ml/minuto e il rilevamento era a 223 nm.

Metodo C: La composizione iniziale 13% di B viene aumentata al 75% di B in un periodo di 15 minuti, quindi viene aumentata al 100% di B in 2 minuti. La composizione è stata mantenuta per 1 minuto al 100% di B, quindi veniva riportata al 13% di B in 0,1 minuti e mantenuta lì per 1,9 minuti. La durata totale dell'eluizione a gradiente è stata di 20,0 minuti. La portata era di 20,0 ml/minuto e il rilevamento era a 254 e 280 nm.

Esempio 1





(a) ((Propan-1,3-diilbis(ossi))bis(5-metossi-2-nitro-4,1-fenilene))-bis((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-il)metanone (I2)

DMF (12 gocce) è stato aggiunto a una sospensione agitata di acido *bis*-nitrobenzoico **11** (10 g, 21,5 mmoli) e ossalil cloruro (5,6 ml, 8,2 g, 64,5 mmoli) in DCM anidro (150 ml). Dopo l'effervescenza iniziale la sospensione di reazione è diventata una soluzione e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. La maggior parte del solvente è stata rimossa mediante evaporazione *sottovuoto* e la soluzione concentrata risultante è stata ridisciolta in una quantità minima di DCM secco e triturata con etere dietilico. Il precipitato giallo risultante è stato raccolto mediante filtrazione *sottovuoto*, lavato con etere dietilico freddo ed essiccato per 1 ora in un forno *sottovuoto* a 40°C. Il cloruro acido solido è stato aggiunto in porzioni a una sospensione agitata di (S)-(+)-2-pirrolidinemetanolo (5,0 g, 4,9 ml, 49,5 mmoli) e TEA (15,0 ml,

10,9 g, 108 mmoli) in DCM (100ml) a -40°C (ghiaccio secco/CH₃CN). Dopo 1 ora di agitazione, la reazione era completa come giudicato da LC/MS con il prodotto desiderato in modo esclusivo con tempo di ritenzione 1,33 minuti, ES+ *m/z* 655 [M+Na]⁺, 633 [M+H]⁺. La miscela è stata diluita con DCM (100 ml) e lavata con HCl 1 N (2 x 50 ml), NaHCO₃ saturo (3 x 40 ml), una soluzione salina (50 ml), essiccata (MgSO₄), filtrata e il solvente evaporato *sottovuoto* per dare il prodotto puro **I2** come solido di colore giallo (13,6 g, 100% di resa).

(b) ((2S,2'S)-(4,4'-(propan-1,3-diilbis(ossi))bis(5-metossi-2-nitrobenzoil))bis(pirrolidin-1,2-diil))bis(metilene) diacetato (I3)

Una soluzione di Ac₂O (4,47 ml, 4,83 g, 47,3 mmoli) in DCM anidro (25 ml) è stata aggiunta goccia a goccia a una soluzione agitata del *bis*-alcol **I2** (13,6 g, 21,5 mmoli), DMAP (263 mg, 2,15 mmoli) e piridina (4,17 ml, 4,08 g, 51,6 mmoli) in DCM secco (125 ml) a 0°C (ghiaccio/acetone) in atmosfera di argon. La miscela di reazione è stata lasciata riscaldare e dopo 1 ora a temperatura ambiente l'analisi mediante LC/MS ha rivelato il completamento della reazione e la conversione pulita nel prodotto desiderato a un tempo di ritenzione di 1,55 minuti, ES+ *m/z* 740 [M+ Na]⁺, 717 [M + H]⁺. La miscela è stata diluita con DCM (20 ml) e lavata con HCl 1 N (2 x 100 ml), H₂O (25 ml), una soluzione salina (50 ml), essiccata (MgSO₄), filtrata e il solvente è stato fatto evaporare *sottovuoto* fino a fornire il *bis*-acetato **I3** grezzo come solido di colore giallo (14,4 g, resa del 94%) che era di purezza soddisfacente per essere portato alla fase successiva senza ulteriore purificazione.

(c) ((2S,2'S)-(4,4'-(propan-1,3-diilbis(ossi))bis(2-amino-5-metossi-benzoil))bis(pirrolidin-1,2-diil))bis(metilene) diacetato (I4)

Un campione di Pd-C al 10% (132 mg) è stato trattato accuratamente con EtOAc (10 ml) per ottenere una sospensione che è stata aggiunta a una soluzione del composto nitro **I3** (1,32 g, 1,84 mmol) in EtOAc (20 ml) e EtOH (30 ml) in un recipiente di idrogenazione. Usando l'apparecchiatura Parr®, la miscela è stata trattata con idrogeno gassoso a 10 psi e agitata a temperatura ambiente, quindi degassata *sottovuoto*, questo processo è stato ripetuto altre due volte. Il recipiente è stato riempito con idrogeno gassoso a 45 psi, agitato e la pressione mantenuta al consumo di idrogeno. L'analisi mediante LC/MS ha mostrato che la reazione era incompleta dopo 3 ore ed è stata lasciata in agitazione a 45 psi per 3 giorni (il fine settimana), dopodiché è stata ottenuta una conversione soddisfacente in prodotto, tempo di ritenzione = 1,32 minuti, ES+ m/z 657 [M + H]⁺. La miscela di reazione è stata degassata *sottovuoto* e quindi filtrata attraverso un tampone di celite®. Il filtrato è stato fatto evaporare *sottovuoto*, il residuo risultante ridisciolto in DCM (30 ml), essiccato (MgSO₄), filtrato e il solvente è stato fatto evaporato *sottovuoto* per dare la *bis*-anilina **I4** grezza come schiuma di colore giallastro (1,1 g, 91% di resa) che conteneva un'impurità dell'8% ma è stata portata alla fase successiva senza ulteriore purificazione.

(d) ((S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(acetossimetil)pirrolidin-1-carbonil)-5-((terz-butossicarbonil)amino)-2-metossifenossi)propossi)-2-amino-5-metossibenzoil)pirrolidin-2-il)metil acetato (I5)

Boc₂O (330 mg, 1,51 mmoli) è stato aggiunto a una soluzione agitata della *bis*-anilina **I4** (1,1 g, 1,68 mmoli) in THF anidro (10 ml). La miscela di reazione è stata riscaldata e agitata a 75°C per 16 ore. L'analisi mediante LC/MS ha rivelato il prodotto mono Boc desiderato **I5** a un tempo di ritenzione di 1,58 minuti, I% = 50, ES+ *m/z* 779 [M+ Na]⁺, 757 [M + H]⁺ insieme al materiale di partenza non reagito al tempo di ritenzione 1,32 minuti, I% = 30 e al materiale *bis*-Boc al tempo di ritenzione 1,81 minuti, I% = 21, ES+ *m/z* 879 [M+ Na]⁺, 857 [M+O]⁺. La miscela di reazione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e il THF è stato rimosso mediante evaporazione sottovuoto. La purificazione mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 50 g, 100 ml al minuto) ha fornito il prodotto mono Boc **I5** come schiuma di colore arancione (519 mg, resa del 46% in base a Boc₂O, eluendo al 97% di DCM/MeOH), *bis*-anilina **I4** non reagita (285 mg, eluendo al 95% di DCM/MeOH) e *bis*-Boc (248 mg, eluendo al 98% di DCM/MeOH).

(e) ((S)-1-(4-(3-(4-((S)-2-(acetossimetil)pirrolidin-1-carbonil)-5-(((4-((S)-2-((S)-2-((allilossi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-propanamido)benzil)ossi)carbonil)amino)-2-metossifenossi)propossi)-2-((terz-butossicarbonil)amino)-5-metossibenzoil)pirrolidin-2-il)-metil acetato (I7)

Trifosgene (380 mg, 1,28 mmol) è stato aggiunto a una soluzione agitata del prodotto mono Boc **I5** (2,69 g, 3,56 mmol) e TEA (1,09 ml, 791 mg, 7,83 mmol) in DCM anidro (30 ml) a temperatura ambiente. Dopo agitazione per 10 minuti sotto argon, l'analisi mediante LC/MS ha rivelato la completa conversione in isocianato (campionato in MeOH per dare metil carbammato, tempo di ritenzione 1,66 minuti, ES+ m/z 837 $[M + Na]^+$, 815 $[M + H]^+$). La miscela è stata trattata con TEA aggiuntiva (740 μ L, 539 mg, 5,34 mmol) proseguendo con l'aggiunta di linker **I6** (1,34 g, 3,56 mmol). Dopo 2 ore di agitazione sotto argon, LC/MS ha rivelato una conversione soddisfacente in carbammato **I7** (tempo di ritenzione 1,74 minuti, (ES+) m/z 1182 $[M + Na]^+$, 1160 $[M + H]^+$). La miscela è stata diluita con DCM (80 ml) e lavata con NH_4Cl saturo (2 x 30 ml), H_2O (30 ml), una soluzione salina (50 ml), essiccata ($MgSO_4$), filtrata e fatta evaporare sottovuoto fino a dare il prodotto grezzo. La purificazione mediante Isolera™ (esano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml al minuto) ha fornito il carbammato **I7** puro (eluendo al 65% di esano/EtOAc) come schiuma di colore giallo (2,95 g, 71% di resa).

(f) Terz-butil (5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-((allilossi) carbonil)-ammino)-3-metilbutanammido)propanammido)benzil)ossi) carbonil) ammino)-4-((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-carbonil)-2-metossifenossi)-propossi)-2-((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-carbonil)-4-metossi-fenil) carbammato (I8)

K_2CO_3 solido (1,75 g, 12,7 mmol) è stato aggiunto a una soluzione agitata del composto **I7** protetto da acetato (2,93 g, 2,53 mmol) in

MeOH (60 ml) e H₂O (12 ml). Dopo 1 ora di agitazione a temperatura ambiente la reazione è stata considerata completa secondo LC/MS con il prodotto desiderato a tempo di ritenzione 1,57 minuti, ES+ *m/z* 1098 [*M* + Na]⁺, 1076 [*M* + H]⁺. MeOH è stato rimosso mediante evaporazione *sottovuoto* e il residuo risultante è stato ripartito tra acqua (75 ml) e DCM (75 ml). Le fasi sono state separate e la fase acquosa è stata estratta con DCM (3 x 25 ml). Gli strati organici combinati sono stati lavati con acqua (3 x 50 ml), una soluzione salina (60 ml), essiccati (MgSO₄), filtrati e fatti evaporare *sottovuoto* per fornire il prodotto grezzo. Purificazione mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 100 g, 100 ml al minuto) il *bis*-alcol **I8** (eluendo al 97% di DCM/MeOH) come schiuma di colore bianco (2,44 g, 90% di resa).

(g) 4-((S)-2-((S)-2-(((allilossi)carbonil)ammino)-3-metilbutanammido)-propanammido)benzil (11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(terz-butossi-carbonil)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)ossi)propossi)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzo-diazepin-10(5H)-carbossilato (I9)

Una soluzione di DMSO anidro (710 µL, 780 mg, 9,99 mmol) in DCM anidro (20 ml) è stata aggiunta goccia a goccia a una soluzione agitata di cloruro di ossalile (2,72 ml di una soluzione 2,0 M in DCM, 5,44 mmol) in ambiente secco DCM (20 ml) a -45°C (ghiaccio secco/CH₃CN) in atmosfera di argon. Dopo 15 minuti di agitazione a -45°C, la miscela di reazione è stata trattata goccia a goccia con una

soluzione del *bis*-alcol **I8** (2,44 g, 2,27 mmol) in DCM anidro (30 ml). Dopo aver agitato a -45°C per un'altra 1 ora, la miscela di reazione è stata trattata goccia a goccia con una soluzione di TEA (3,16 ml, 2,29 g, 22,7 mmol) in DCM anidro (20 ml). La miscela di reazione è stata lasciata riscaldare a temperatura ambiente per un periodo di 1,5 ore e diluita con DCM (100 ml), quindi lavata con NH₄Cl saturo (2 x 50 ml), NaHCO₃ saturo (50 ml), acqua (30 ml), una soluzione salina (50 ml), essiccata (MgSO₄), filtrata e fatta evaporare *sottovuoto* per dare il prodotto grezzo. La purificazione mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 100 g, 100 ml al minuto) ha dato il composto ciclizzato **I9** (eluendo al 95,7% di DCM/MeOH) come schiuma di colore giallastro (1,61 g, 66% di resa): LC/MS **I9** al tempo di ritenzione 1,46 minuti, ES+ *m/z* 1072 [*M* + H]⁺, 1094 [*M* + Na]⁺.

(h) 4-((S)-2-((S)-2-ammino-3-metilbutanammido)propanammido)benzil-(11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(terz-butossicarbonil)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-pirrolo[2,1-c[1,4]benzodiazepin-8-il)ossi)propossi)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carbossilato (I10)

Pd(PPh₃)₄ (6,47 mg, 5,6 μmol) è stato aggiunto a una soluzione agitata di pirrolidina (29 μL, 25 mg, 0,35 mmol) e il composto Alloc **I9** (300 mg, 0,28 mmol) in DCM anidro (10 ml). Dopo agitazione per 4 ore sotto argon a temperatura ambiente, l'analisi mediante LC/MS ha rivelato il completamento della reazione con il prodotto desiderato osservato al tempo di ritenzione 1,10 minuti, ES+, *m/z* 1010 [*M*+ Na]⁺,

988 [M+O]⁺. La miscela di reazione è stata diluita con DCM (30 ml) quindi lavata con NH₄Cl saturo (2 x 20 ml), una soluzione salina (30 ml), essiccata (MgSO₄), filtrata e fatta evaporare *sottovuoto* per dare il prodotto grezzo. La triturazione con dietiletere seguita da evaporazione *sottovuoto* ha dato l'ammina grezza **I10** (261 mg, 95% di resa) che è stata portata alla fase successiva senza ulteriore purificazione o analisi.

(i) Terz-butil(11S,11aS)-8-(3-((11S,11aS)-10-((4-((2S,5S)-37-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-triosso-10,13,16,19,22,25,28,31-octaossa-3,6,34-triazaeptatriacontanammido)-benzil)ossi)carbonil)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)ossi)propossi)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-10(5H)-carbossilato (I11)

EDCI (56 mg, 0,29 mmol) è stato aggiunto a una soluzione agitata di MAL-dPEG₈-acido (172 mg, 0,29 mmol, Stratech Scientific Limited) e l'ammina **I10** (261 mg, 0,26 mmol) in DCM secco (10 ml) a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata agitata sotto un'atmosfera di argon per 2,5 ore, a quel punto l'analisi mediante LC/MS ha mostrato una conversione completa nel prodotto desiderato a un tempo di ritenzione di 1,38 minuti, ES⁺ m/z 1585 [M + Na]⁺, 1563 [M + H]⁺. La miscela di reazione è stata diluita con DCM (30 ml) e lavata con H₂O (20 ml), una soluzione salina (2 x 20 ml), essiccata (MgSO₄), filtrata e fatta evaporare *sottovuoto* per fornire il prodotto grezzo. La purificazione mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 25 g, 75 ml

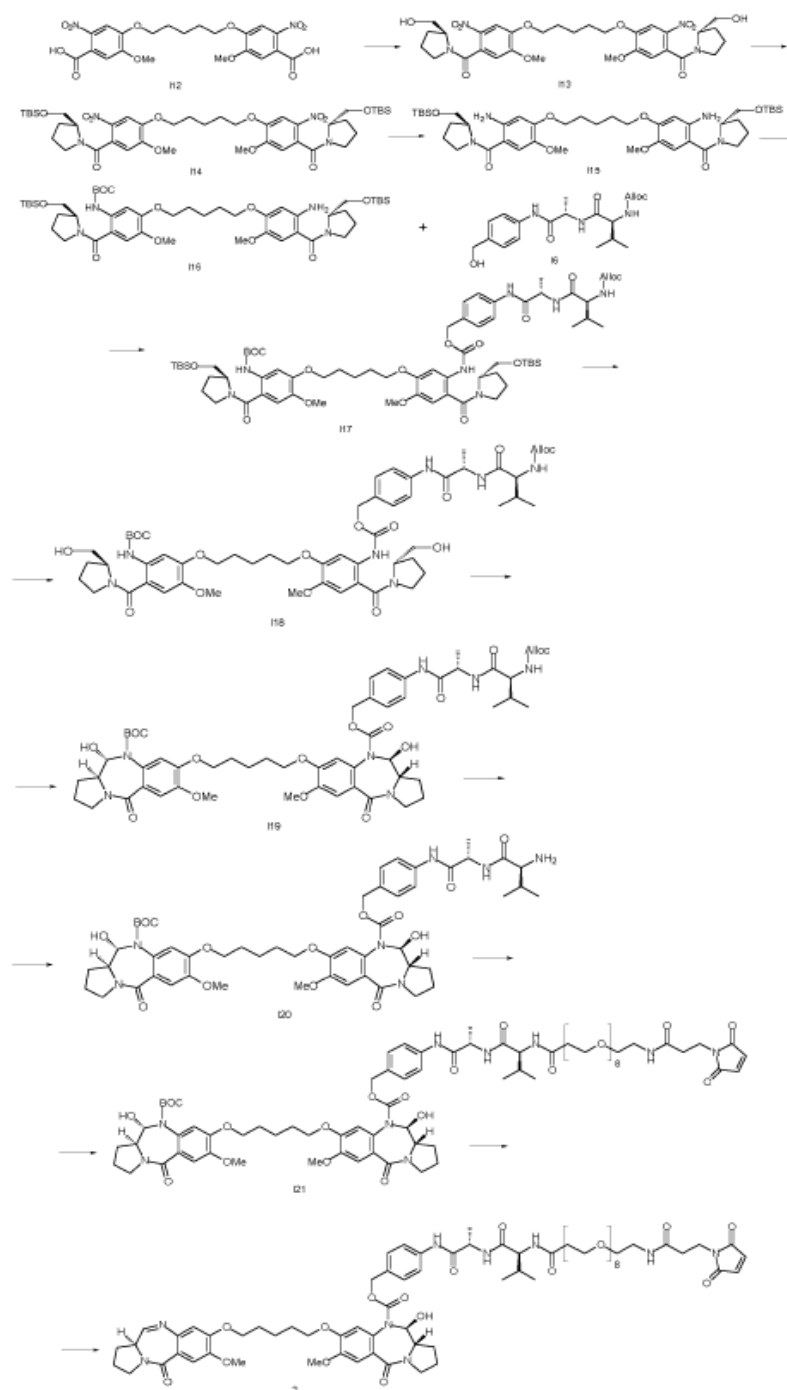
al minuto) ha dato l'ammide **I11** (eluendo al 91% di DCM/MeOH) come schiuma di colore bianco (277 mg, 67% di resa).

(j) 4-((2S,5S)-37-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-triosso-10,13,16,19,22,25,28,31-octaossa-3,6,34-triazaeptatriacontanammido)benzil(11S,11aS)-11-idrossi-7-metossi-8-(3-(((S)-7-metossi-5-osso-2,3,5,11a-tetraidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-8-il)ossi)propossi)-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carbossilato (1)

Una soluzione di 95:5 v/v TFA/H₂O (2 ml) è stata aggiunta a un campione grezzo del composto **I11** protetto da Boc (262 mg, 0,17 mmol) a 0°C (ghiaccio/acetone). Dopo agitazione a 0°C per 3 ore la reazione è stata considerata completa secondo LC/MS, picco di prodotto desiderato al tempo di ritenzione 1,30 minuti, ES+ *m/z* 1445 [*M* + H]⁺. La miscela di reazione è stata mantenuta fredda e aggiunta goccia a goccia a una soluzione acquosa satura raffreddata di NaHCO₃ (100 ml). La miscela è stata estratta con DCM (3 x 30 ml) e gli strati organici combinati sono stati lavati con una soluzione salina (30 ml), essiccati (MgSO₄), filtrati e fatti evaporare *sottovuoto* per fornire il prodotto grezzo. La purificazione mediante Isolera™ (CHCl₃/MeOH, SNAP Ultra 25 g, 25 ml al minuto) ha dato **1** (eluendo all'89,6% di CHCl₃/MeOH) come schiuma di colore giallo (170 mg, 70% di resa). L'ulteriore purificazione mediante HPLC preparativa (metodo A) ha dato **1** come schiuma di colore giallo chiaro (105 mg, resa 43%): LC/MS (eluizione di 15 minuti), tempo di ritenzione 5,25 minuti, ES+ *m/z*

1445 $[M+H]^+$; ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 9.92 (s, 1H), 8.16 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 7.99 (t, 1H, $J = 5.7$ Hz), 7.86 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.80 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz), 7.64-7.50 (m, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.24-7.13 (m, 2H), 7.06 (s, 1H), 7.00 (s, 2H), 6.88 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.53-6.41 (m, 1H), 5.52-5.41 (m, 1H), 5.13 (d, 1H, $J = 12.2$ Hz), 4.93-4.77 (m, 1H), 4.42-4.34 (m, 1H), 4.30-3.90 (m, 6H), 3.80-3.60 (m, 4H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.60 (t, 4H, $J = 7.3$ Hz), 3.53-3.46 (m, 28H), 3.41-3.33 (m, 1H), 3.32-3.29 (m, 2H, oscurato da H_2O), 3.19-3.12 (m, 2H), 2.48-1.60, m, 15H), 1.35-1.20 (m, 3H), 0.87 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz), 0.83 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz).

Esempio 2



(a) ((pentan-1,5-diilbis(ossi))bis(5-metossi-2-nitro-4,1-fenilene))-bis((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-il)metanone (I13)

DMF (5 gocce) è stato aggiunto a una sospensione agitata di acido *bis*-nitrobenzoico **I12** (4,05 g, 8,192 mmol, 1,0 eq.) e ossalil cloruro (12,3 ml di soluzione 2M, 24,57 mmol, 3,0 eq.) in CH₂Cl₂

anidro (65 ml). Dopo l'effervescenza iniziale la sospensione di reazione è diventata una soluzione e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. La miscela di reazione è stata concentrata *sottovuoto* ed il solido risultante è stato triturato con Et₂O ed essiccato in stufa sottovuoto a 40°C per 3 ore. Il cloruro acido solido è stato aggiunto in porzioni a una sospensione agitata di (S)-(+)-2-pirrolidinemetanolo (1,78 ml, 18,02 mmol, 2,2 eq.) e *i*-Pr₂NEt (7,13 ml, 40,96 mmol, 5,0 eq.) in CH₂Cl₂ (65ml) a -40°C (ghiaccio secco/CH₃CN). Dopo 1 ora di agitazione, la temperatura di reazione aveva raggiunto 0°C, ed era completa come giudicato da LC/MS con il prodotto esclusivamente desiderato al tempo di ritenzione 1,44 minuti, ES+ *m/z* 661 [M + H]⁺, 683 [M + Na]⁺. La miscela è stata diluita con CH₂Cl₂ (100 ml) e lavata in successione con H₂O, NaOH 1 N e HCl 1 M (50 ml), essiccata (MgSO₄), filtrata e il solvente è stato fatto evaporare *sottovuoto* per dare il prodotto puro **I13** come schiuma di colore giallo (4,44 g, resa 82%), che è stata usata senza ulteriore purificazione.

(b) ((pentan-1,5-diilbis(ossi))bis(5-metossi-2-nitro-4,1-fenilene))-bis(((S)-2-(((terzbutildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-il)-metanone) (I14)

Imidazolo (2,74 g, 40,32 mmol, 6,0 eq.) quindi TBSCI (3,04 g, 20,16 mmol, 3,0 eq.) sono stati aggiunti porzioni a una soluzione agitata di *bis*-alcol **I13** (4,44 g, 6,720 mmol, 1,0 eq.) in atmosfera di argon. Dopo 90 minuti, la miscela di reazione è stata filtrata e il filtrato lavato con H₂O, essiccato su MgSO₄ e concentrato

sottovuoto. La cromatografia flash su colonna (50-80% di EtOAc in esano) ha fornito il prodotto **I14** come schiuma di colore giallo (4,84 g, 5,443 mmol, 81% di resa). Tempo di ritenzione LC/MS = 2,18 min, ES+ m/z 889 $[M + H]^+$, 911 $[M + Na]^+$.

(c) ((pentan-1,5-diilbis(ossi))bis(2-ammino-5-metossi-4,1-fenilene))-bis(((S)-2-(((terzbutildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-il)-metanone) (I15)

Polvere di Zn è stata aggiunta a una soluzione di agitazione del composto bis-nitro **I14** (1,32 g, 1,84 mmol) in MeOH (40 ml) a 0°C. È stato aggiunto goccia a goccia a 0°C il 5% di HCO₂H in MeOH e la miscela è stata agitata per 2 ore. La miscela di reazione è stata diluita con EtOAc e lavata con una soluzione sat. di NaHCO₃, la fase organica è stata essiccata su MgSO₄ e concentrata sottovuoto. La cromatografia su colonna flash (0-2% di MeOH in CHCl₃) ha fornito il prodotto **I15** come schiuma di colore giallo pallido (3,098 mmol, 3,736 mmol, 69% di resa). Tempo di ritenzione LC/MS = 2,09 min, ES+ m/z 415 $[M + 2H]^{2+}$, 829 $[M + H]^+$, 851 $[M + Na]^+$.

(d) Terz-butil (5-((5-(5-ammino-4-((S)-2-(((terz-butildimetilsilil)-ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-2-metossifenossi)pentil)ossi)-2-((S)-2-(((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-4-metossifenil)carbammato (I16)

Boc₂O (734 mg, 3,362 mmol) è stato aggiunto a una soluzione agitata della bis-anilina **I15** (3,098 g, 3,736 mmol) in THF anidro (20 ml). La miscela di reazione è stata agitata per 16 ore e è stata concentrata sottovuoto. La cromatografia su colonna flash (30-50% di

EtOAc in esano) ha fornito il prodotto mono Boc **I16** come schiuma di colore giallo (1,474 g, resa del 47% in base a Boc₂O), bis-anilina **I15** non reagita (1,043 g, resa del 30%) e bis-Boc (419 mg, 15% di resa, tempo di ritenzione LC/MS = 2,37 min). Tempo di ritenzione LC/MS di **I16** = 2,25 min, ES⁺ m/z 929 [M + H]⁺, 951 [M + Na]⁺.

(e) Terz-butyl (5-((5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((allilossi)carbonil)-ammino)-3-metilbutanammido)propanammido)benzil)ossi)carbonil)ammino)-4-((S)-2-(((terzbutildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-2-idrossifenossi)pentil)ossi)-2-((S)-2-(((terz-butildimetilsilil)-ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-4-metossifenil)carbammato (I17)

Trifosgene (169 mg, 0,5710 mmol, 0,36 eq.) è stato aggiunto a una soluzione agitata del prodotto mono Boc **I16** (1,474 g, 1,586 mmol, 1,0 eq.) e Et₃N (486 µl, 3,489 mmol, 2,2 eq.) in CH₂Cl₂ secco (9 ml) a -10°C. Dopo aver agitato per 10 minuti sotto argon, l'analisi mediante LC/MS ha rivelato la completa conversione in isocianato (campionato in MeOH per dare metil carbammato, tempo di ritenzione 2,30 minuti, ES⁺ m/z 1009 [M+ Na]⁺, 987 [M+ H]⁺). È stata aggiunta una soluzione di **I6** (898 mg, 2,379 mmol, 1,5 eq.) ed Et₃N (332 µl, 2,379 mmol, 1,5 eq.) in CH₂Cl₂ anidro (14 ml). La reazione è stata gradualmente riscaldata a temperatura ambiente e agitata per 16 ore. L'analisi LC/MS di 15 minuti ha rivelato che il materiale di partenza era stato consumato. La miscela di reazione è stata filtrata attraverso un tampone di SiO₂ (eluizione 5% di MeOH in CH₂Cl₂) per rimuovere l'eccesso di **I6**. La cromatografia flash su colonna (20-80% di EtOAc in esano) ha fornito **I17** come schiuma di colore giallo

(1,439 g, resa del 68%). Tempo di ritenzione LC/MS = 2,26 min (3 minuti di eluizione) e 10,43 min (15 minuti di eluizione) ES⁺ m/z 1355 [M + Na]⁺, 1333 [M + H]⁺. È stata osservata una quantità trascurabile di dimero di urea (tempo di ritenzione LC/MS = 12,11 min, ES⁺ m/z 1906 [M + Na]⁺) che è stata rimossa nelle successive fasi di purificazione.

(f) Terz-butyl (5-((5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((allilossi)carbonil)-ammino)-3-metilbutanammido)propanammido)benzil)ossi)carbonil)ammino)-2-idrossi-4-((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-carbonil)fenossi)-pentil)ossi)-2-((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-carbonil)-4-metossi-fenil)carbammato (I18)

Acido acetico (124 µl, 2.160 mmol, 2.0 eq.) è stato aggiunto a una soluzione 1 M di TBAF (3.2 ml, 3.200 mmol, 3.0 eq.) e successivamente aggiunto a una soluzione di agitazione di **I17b** in THF (67 ml) a 0°C. La miscela di reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per 16 ore. La LC/MS ha indicato che la reazione era incompleta. È stato aggiunto TBAF (1,00 ml di soluzione 1M, 1 mmol, 1,0 eq.) e la miscela di reazione è stata agitata per altre 24 ore. La miscela di reazione è stata concentrata *sottovuoto* e purificata mediante Isolera™ (0-5% MeOH in CH₂Cl₂) per fornire il prodotto **I18** come schiuma di colore giallo pallido (916 mg, 77% di resa). Tempo di ritenzione LC/MS = 1,62 min, ES⁺ m/z 1126 [M + Na]⁺, 1104 [M + H]⁺.

(g) 4-((S)-2-((S)-2-(((allilossi)carbonil)ammino)-3-metilbutanammido)-propanammido)benzil (11S, 11aS)-8-((5-(((11S, 11aS)-10-(terz-butossi-carbonil)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-

2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)ossi)pentil)ossi)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (I19)

IBX (1,14 g, 1,825 mmol, 2,2 eq.) è stato aggiunto a una soluzione di agitazione di diolo **I18** (916 mg, 0,8296 mmol, 1,0 eq.) in DMSO. La miscela di reazione è stata riscaldata a 35°C e agitata per 60 ore. È stata aggiunta H₂O e l'acqua è stata estratta svariate volte con CHCl₃. Gli estratti organici sono stati uniti, lavati con NaHCO₃ sat. ed essiccati su MgSO₄. La purificazione mediante Isolera™ (1-8% MeOH in CH₂Cl₂) ha fornito **I19** come schiuma di colore arancione (908 mg, 99% di resa): Tempo di ritenzione LC/MS = 1,50 minuti, ES+ *m/z* 1122 [M+ Na]⁺, 1100 [M + H]⁺.

(h) 4-((S)-2-((S)-2-ammino-3-metilbutanamide)propanammido)benzile-(11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(terz-butossicarbonile)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)ossi)pentil)ossi)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (I20)

Pd(PPh₃)₄ (15,8 mg, 13,64 μmol, 0,050 eq.) è stato aggiunto a una soluzione di agitazione di pirrolidina (56 μl, 0,6818 mmol, 2,5 eq.) e **I19** (300 mg, 0,2727 mmol) in CH₂Cl₂ (10 ml) sotto argon. Dopo 30 minuti, è stata aggiunta una soluzione sat. di NH₄Cl e la miscela è stata agitata vigorosamente e trasferita in un separatore di fase Isolute®. La fase organica raccolta è stata concentrata *sottovuoto* per

fornire una schiuma arancione **I20** che è stata usata senza ulteriore purificazione.

(i) Terz-butil (11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-((4-((2S,5S)-37-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrolo-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,1,35-triosso-10,13,16,19,22,25,28,31-octaossa-3,6,34-triazaepta-triacontanammido)benzil)ossi)carbonil)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)-ossi)pentil)ossi)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (I21)

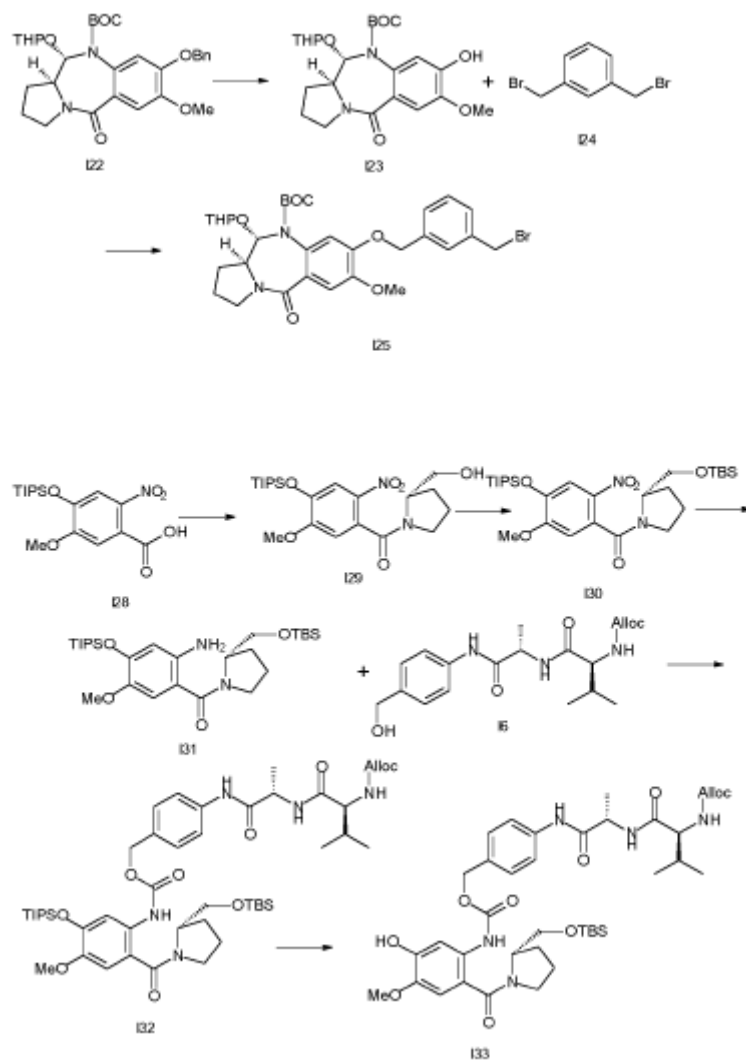
EDCl.HCl (117 mg, 0,29 mmol) è stato aggiunto a una soluzione agitata di MAL-dPEG[®]₈-acido (360 mg, 0,6079 mmol, Stratech Scientific Limited) e ammina **I20** (608 mg, 0,5526 mmol) in CH₂Cl₂ (15 ml) a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata agitata sotto un'atmosfera di argon per 24 ore, a quel punto l'analisi mediante LC/MS ha mostrato un consumo completo di **I20**. La miscela di reazione è stata diluita con CH₂Cl₂ e lavata successivamente con NH₄Cl sat. e NaHCO₃ sat., essiccato su MgSO₄ e concentrata sottovuoto per fornire il prodotto grezzo. La purificazione mediante Isolera™ (4-16% MeOH in CH₂Cl₂) ha dato l'ammide **I21** come solido di colore bianco (77 mg, purezza del 79% (integrazione UV @ 223 nm) resa grezza dell'8,8%; 107 mg, purezza 88%, resa grezza 12%; 224 mg, purezza 86%, resa grezza 25%).

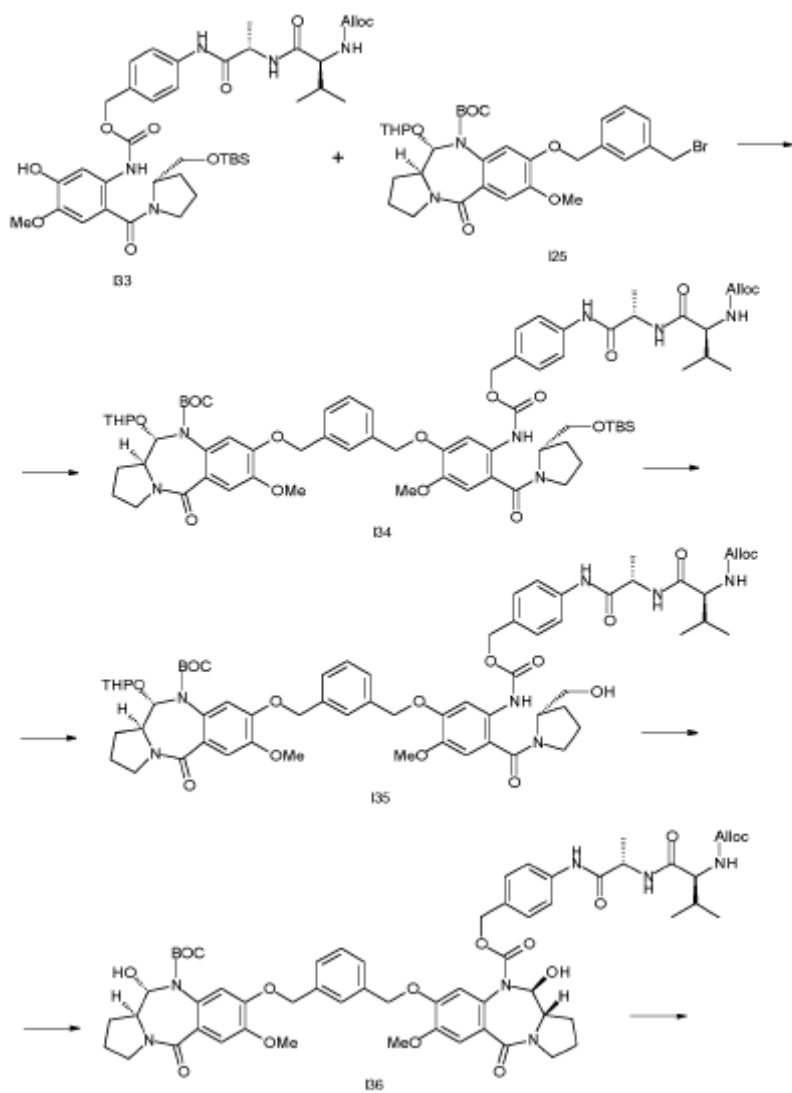
(j) 4-((2S,5S)-37-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrolo-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-triosso-10,13,16,19,22,25,28,31-ottaossa-3,6,34-tri-azaeptatriacontanamide)benzil(11S,11aS)-11-idrossi-7-

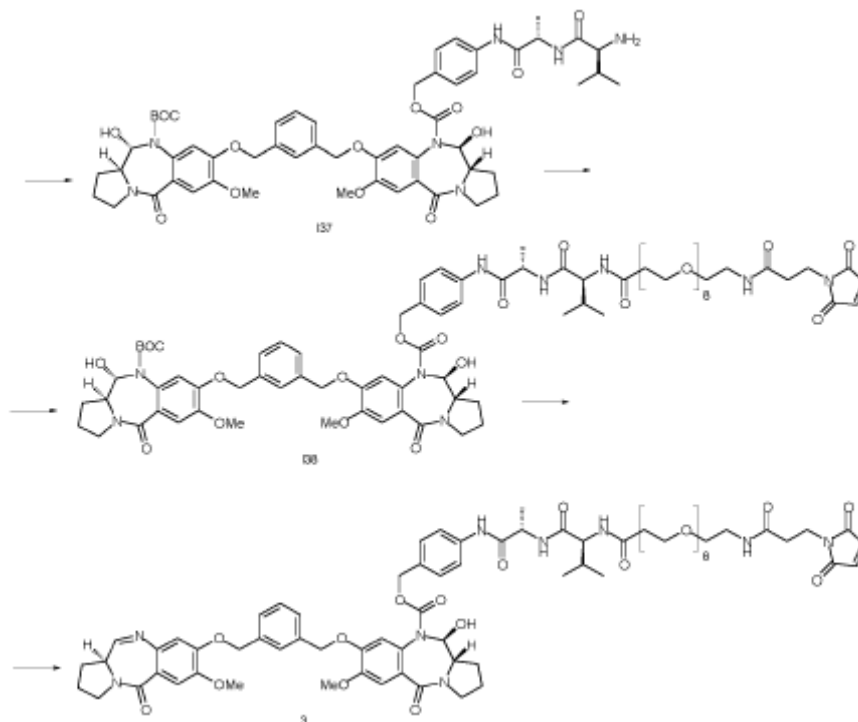
metossi-8-(3-((S)-7-metossi-5-osso-2,3,5,11a-tetraidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepin-8-il)ossi)propossi)-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-10(5H)-carbossilato (2)

Una soluzione ghiacciata di 95:5 v/v TFA/H₂O (3 ml) è stata aggiunta a un campione grezzo del composto **I21** protetto da Boc (107 mg, 67,51 µmol) a 0°C (ghiaccio/una soluzione salina). Dopo agitazione a 0°C per 30 min, la reazione è stata considerata completa secondo LC/MS, picco di prodotto desiderato al tempo di ritenzione 1,38 minuti, ES+ m/z 737 $[M+ 2H]^{2+}$, 748 $[M + H + Na]^{2+}$; 1472 $[M + H]^+$. La miscela di reazione è stata mantenuta fredda e aggiunta goccia a goccia a una soluzione acquosa satura raffreddata di NaHCO₃. La miscela è stata estratta con CH₂Cl₂, quindi MeOH al 10% in CH₂Cl₂, gli strati organici combinati essiccati su MgSO₄ e concentrati sottovuoto per fornire il prodotto grezzo. Questo processo è stato ripetuto per gli altri lotti di **121**, i prodotti grezzi combinati e purificati mediante HPLC preparativa (Metodo B) per ottenere **2** come solido di colore bianco dopo la liofilizzazione (126 mg, 33% di resa, 96% di purezza tramite UV @ 223 nm): LC/MS (eluizione di 30 minuti), tempo di ritenzione = 10,96 minuti, ES+ m/z 1472 $[M+ H]^+$.

Esempio 3







(a) I23

Questa fase può essere eseguita come in letteratura (si veda, per esempio, WO2005085259A2; o Wells, et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18 (2008) 2147-2151). Il metodo prevede un'idrogenazione Parr a temperatura ambiente con il 10% di Pd/C in EtOH. La resa è quantitativa. Etanolo viene rimosso mediante due evaporazioni (EtOAc, seguito da DCM).

(b) Terz-butil (11S, 11aS)-8-((3-(bromometil)benzil)ossi)-7-metossi-5-osso-11-((tetraidro-2H-piran-2-il)ossi)-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (I25)

Una miscela di fenolo **I23** (4 g, 8,91 mmol, 1 eq), 1,3-bis(bromometil)benzene **I24** (9,42 g, 35,7 mmol, 4 eq), carbonato di potassio (1,23 g, 8,91 mmol, 1 eq), e acetone (40 ml) sono stati riscaldati a 60°C per 5 ore. Dopo che il completamento è stato

osservato mediante LC/MS, i solidi sono stati rimossi mediante filtrazione e il filtrato è stato concentrato a secco sottovuoto. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia (Biotage Isolera, 100 g Ultra, gradiente EtOAc/esano 30/70 fino a 80/20 in 12 VC). Resa 4,25 g (75%). LC/MS, metodo 3 min, 1,82 min (ES+) m/z (intensità relativa) 631,15 ($[M + H]^+$, 100), picco suddiviso: diastereoisomeri THP. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.67 - 7.27 (m, 4H), 7.20 - 6.57 (m, 2H), 5.72 - 5.57 (m, 1H), 5.24 - 4.84 (m, 3H), 4.72 (s, 2H), 3.91 - 3.73 (m, 4H), 3.61 - 3.33 (m, 4H), 2.20 - 1.75 (m, 4H), 1.74 - 1.57 (m, 2H), 1.55 - 1.01 (m, 13H).

128 è noto in letteratura (rif WO2013053872A1, Composto 2, pagina 60)

(c) (S)-(2-(idrossimetil)pirrolidin-1-il) (5-metossi-2-nitro-4-((triisopropilsilil)ossi)fenil)metanone (I29)

EDCI (12,4 g, 65 mmol, 1,2 eq) è stato aggiunto a una soluzione di acido **I28** (20 g, 54,1 mmol, 1eq) e idrossibenzotriazolo idrato (8,05 g, 59,5 mmol, 1,1 eq) in diclorometano (200 ml) a 0°C. Il bagno freddo è stato rimosso e la reazione è stata lasciata procedere per 30 minuti a temperatura ambiente, momento in cui una soluzione di (S)-pirrolidin-2-ilmetanolo (5,87 ml, 59,5 mmol, 1,1 eq) e trietilammia (11,32 ml, 81,1 mmol, 1,5 eq) in diclorometano (100 ml) sono stati aggiunti rapidamente a -10°C sotto argon. La miscela di reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per 40 minuti fino a 1 ora e monitorata mediante LC/MS e TLC (EtOAc). I solidi sono stati rimossi mediante filtrazione su celite e la fase

organica è stata lavata con HCl 0,1 M acquoso freddo fino a quando il pH è stato misurato a 4 o 5. La fase organica è stata quindi lavata con acqua, seguita da bicarbonato di sodio acquoso saturo e una soluzione salina. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di magnesio, filtrato e il solvente in eccesso è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta. Il residuo è stato sottoposto a cromatografia flash su colonna (IsoleraBiotage, 340 g Ultra; gradiente 25/75 acetato di etile/esano a 100/0 acetato di etile/esano in 6 VC). Il solvente in eccesso è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta, ottenendo il prodotto puro **I29** come schiuma di colore giallo pallido (15,7 g, 64%). LC/MS 1,92 min (ES+) m/z (intensità relativa) 453,15 ($[M + H]^+$, 30%; 328.15, 100%); 1H NMR (400 MHz, Cloroformio- d) δ 7.70 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.57 - 4.24 (m, 2H), 4.01 - 3.69 (m, 5H), 3.25-3.06 (m, 2H), 2.18 (dt, $J = 7.5, 5.6$ Hz, 1H), 1.96 - 1.62 (m, 3H), 1.42 - 1.18 (m, 3H), 1.10 (d, $J = 7.4$ Hz, 18H).

(d) (S)-(2-(((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-il) (5-metossi-2-nitro-4-((triisopropilsilil)ossi)fenil)metanone (I30)

t-Butildimetilsilil cloruro (10,39 g, 68,9 mmol, 2 eq) è stato aggiunto a una soluzione di alcol **I29** (15,6 g, 34,5 mmol, 1 eq) e imidazolo (5,87 g, 86,2 mmol, 2,5 eq) in DCM (100 ml). La miscela di reazione è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata lavata in sequenza con acqua (300 ml), acido citrico 0,5 M (200 ml), una soluzione salina (100 ml) ed essiccata ($MgSO_4$). La filtrazione e la rimozione del solvente in

eccesso hanno fornito il prodotto grezzo, che è stato sottoposto a cromatografia su colonna flash (Biotage Isolera, KP-Sil 340g; 10/90 v/v acetato di etile/esano fino a 30/70 v/v acetato di etile/esano) per isolare l'etere di silile **I30** come olio di colore giallo denso. Resa: 18.9 g, 97%. LC/MS 2,32 min (ES+) m/z (intensità relativa) 567,55 ($[M + H]^+$, 100%)

(e) (S)-(2-ammino-5-metossi-4-((triisopropilsilil)ossi)fenil)(2-((terzbutildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-il)metanone (I31)

Una soluzione di composto nitro **I30** (18,9 g, 33,3 mmol, 1eq) in acetato di etile (200 ml) oltre il 10% di Pd/C (10% p/p, 1,89 g) è stata idrogenata sotto pressione (45 psi) su un apparecchio Parr per 6 ore. La miscela di reazione è stata filtrata attraverso celite per rimuovere Pd/C, e il tampone filtrante è stato risciacquato con acetato di etile. Il solvente in eccesso è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta, seguita da essiccamento sotto alto vuoto per dare l'ammina **I31** come olio denso. LC/MS, metodo 3 min, 2,28 min (ES+) m/z (intensità relativa) 537,30 ($[M + H]^+$, 100); 1H NMR (400 MHz, Cloroformio-d) δ 6.73 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 4.54-4.13 (m, 3H), 4.07-3.80 (m, 1H), 3.79 - 3.61 (m, 4H), 3.50 (dd, $J = 9.2, 4.2$ Hz, 2H), 2.10 - 1.97 (m, 2H), 1.92 (dt, $J = 11.7, 6.2$ Hz, 1H), 1.80 - 1.65 (m, 1H), 1.24 (ddt, $J = 13.7, 9.9, 6.4$ Hz, 3H), 1.09 (d, $J = 7.3$ Hz, 18H), 0.90 (s, 9H), 0.04 (d, $J = 2.8$ Hz, 6H).

(f) Allil ((S)-1-(((S)-1-(4-(((2-((S)-2-2-((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-4-metossi-5-(triisopropil-

silil)ossi)fenil)carbamoil)ossi)metil)fenil)ammino)-1-ossopropan-2-il)ammino)-3-metil-1-ossobutan-2-il)carbammato (I32)

Trietilammina (10,1 ml, 72,4 mmol, 2,2 eq) è stata aggiunta a una soluzione agitata dell'ammina **I31** (17,68 g, 32,9 mmol, 1eq) e trifosgene (3,51 g, 11,8 mmol, 0,36 eq) in tetraidrofurano secco (180 ml) a 5°C (bagno di ghiaccio). L'andamento della reazione di isocianato è stato monitorato rimuovendo periodicamente aliquote dalla miscela di reazione e spegnendo con metanolo ed eseguendo analisi LC/MS. Una volta completata la formazione dell'isocianato, una sospensione di alloc-Val-Ala-PABOH **I6** (18,6 g, 49,4 mmol, 1,5 eq) e trietilammina (6,88 ml, 49,4 mmol, 1,5 eq) in tetraidrofurano secco (70 ml) è stata aggiunta rapidamente all'isocianato preparato al momento. La miscela di reazione è stata lasciata agitare a 40°C per 4 ore. I solidi sono stati rimossi mediante filtrazione. Il solvente in eccesso è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta. Il residuo risultante è stato caricato a secco su gel di silice e sottoposto a cromatografia su colonna flash manuale; 40/60 v/v acetato di etile/esano fino a 70/30 v/v acetato di etile/esano. Le frazioni pure sono state raccolte e combinate e l'eluente in eccesso è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta per dare il prodotto **I32** 8,17 g (26,4%). LC/MS, metodo 3 min, 2,29 min (ES+) m/z (intensità relativa) 962,45 ($[M + Na]^+$, 100; 940.40 ($[M+H]^+$, 30); 1H NMR (400 MHz, Cloroformio-d) δ 8.95 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.80 (s, 1H), 6.71 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.89 (tt, $J =$

10.8, 5.3 Hz, 1H), 5.44 - 5.15 (m, 3H), 5.10 (s, 2H), 4.66 (p, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.62 - 4.53 (m, 2H), 4.32 (s, 1H), 4.08 - 3.86 (m, 2H), 3.74 (s, 4H), 3.52 (dd, $J = 27.4, 7.6$ Hz, 2H), 2.15 (h, $J = 6.8$ Hz, 1H), 2.09 - 1.85 (m, 3H), 1.71 (s, 1H), 1.46 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.29 (dq, $J = 15.0, 7.4$ Hz, 3H), 1.11 (d, $J = 7.4$ Hz, 18H), 0.95 (dd, $J = 14.1, 6.8$ Hz, 6H), 0.89 (s, 9H), 0.02 (d, $J = 13.1$ Hz, 6H).

(g) Allil ((S)-1-(((S)-1-(4-(((2-((S)-2-((terz-butildimetilsilil)-ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-5-idrossi-4-metossifenil)-carbamoil)ossi)metil)fenil)ammino)-1-ossopropan-2-il)ammino)-3-metil-1-ossobutan-2-il)carbammato (I33)

Acetato di litio (50 mg, 0,49 mmol) è stato aggiunto a una soluzione del composto **I32** (7 g, 7,44 mmol, 1 eq) in dimetilformammide umida (61,2 ml, 50:1 DMF/acqua). Dopo 4 ore, la reazione era completa. DMF in eccesso è stato rimosso sottovuoto e il residuo è stato diluito con acetato di etile (300 ml) e lavato con acido citrico acquoso 0,5 M (100 ml), acqua (300 ml) e una soluzione salina (100 ml). Lo strato organico è stato essiccato su solfato di magnesio filtrato e acetato di etile in eccesso è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta. Il residuo risultante è stato sottoposto a cromatografia flash su colonna (Biotage Isolera 100 g Ultra; gradiente, da 40/60 a 80/20 v/v acetato di etile/esano in 8 VC). Le frazioni pure sono state raccolte e combinate e l'eluente in eccesso è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta per dare il prodotto **I33** (5,13 g, 88%). LC/MS, metodo 3 min, 1,82 min (ES+) m/z (intensità

relativa) 784,40 ([M+H]⁺, 100). ¹H NMR (400 MHz, Cloroformio-d) δ 9.06 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.45 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.35 - 7.18 (m, 2H), 6.92 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.89 (ddd, J = 16.2, 10.7, 5.4 Hz, 1H), 5.44 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.37 - 5.15 (m, 2H), 5.14 - 5.01 (m, 2H), 4.67 (p, J = 7.1 Hz, 1H), 4.63-4.50 (m, 2H), 4.33 (s, 1H), 4.13-3.89 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.74-3.33 (m, 3H), 2.24 - 1.84 (m, 4H), 1.69 (d, J = 21.2 Hz, 1H), 1.43 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.07 - 0.71 (m, 15H), 0.23 - -0.20 (m, 6H).

(h) Terz-butil(11S,11aS)-8-((3-((5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((allilossi)-carbonil)ammino)-3-metilbutanamido)propanamido)benzil)ossi)-carbonil)ammino)-4-((S)-2-(((terzbutildimetilsilil)ossi)metil)-pirrolidin-1-carbonil)-2-metossifenossi)metil)benzil)ossi)-7-metossi-5-osso-11-((tetraidro-2H-piran-2-il)ossi)-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (I34)

Carbonato di potassio (582 mg, 4,21 mmol, 1,1 eq) è stato aggiunto a una soluzione di **I25** (2,66 g, 4,21 mmol, 1,1 eq) e fenolo **I33** (3 g, 3,82 mmol, 1 eq) in acetone (18 ml). La reazione è stata agitata per 4 ore a 63°C. I solidi sono stati rimossi mediante filtrazione su cotone idrofilo. L'acetone è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta. Il residuo risultante è stato sottoposto a cromatografia flash su colonna (Biotage isolera, 100 g Ultra, gel di silice; gradiente, da 50/50 a 100/0 v/v acetato di etile/esano in 8 VC, eluizione dall'83%). Le frazioni pure sono state raccolte e combinate e l'eluente in eccesso è stato rimosso

mediante evaporazione rotante a pressione ridotta per dare il prodotto **I34** (4,71 g, 92%). LC/MS, metodo 3 min, 2,08 min (ES+) m/z (intensità relativa) 1335,15 ($[M+H]^+$, 50). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.98 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.13 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.68-7.50 (m, 3H), 7.50 - 7.37 (m, 3H), 7.32 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.28 - 7.01 (m, 2H), 6.86 (s, 2H), 5.90 (ddd, $J=16.0, 10.7, 5.2$ Hz, 1H), 5.64 (t, $J=9.8$ Hz, 1H), 5.30 (d, $J=17.2$ Hz, 1H), 5.23-4.84 (m, 8H), 4.57-4.36 (m, 3H), 4.11 (s, 1H), 3.95-3.59 (m, 9H), 3.56-3.34 (m, 4H), 1.94 (d, $J=34.0$ Hz, 10H), 1.74-1.06 (m, 21H), 1.01-0.59 (m, 15H), 0.03 (s, 6H).

(i) Terz-butyl(11S,11aS)-8-((3-((5-(((4-((S)-2-((S)-2-((allilossi)-carbonil)ammino)-3-metilbutanammido)propanammido)benzil)ossi)-carbonil)ammino)-4-((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-carbonil)-2-metossifenossi)metil)benzil)ossi)-7-metossi-5-osso-11-((tetraidro-2H-piran-2-il)ossi)-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]-diazepin-10(5H)-carbossilato (I35)

Fluoruro di tetra-n-butylammonio (1M, 6,94 ml, 6,94 mmol, 2 eq) è stato aggiunto a una soluzione di **I34** (4,63 g, 3,47 mmol, 1 eq) in tetraidrofurano (28 ml). Il materiale di partenza è stato completamente consumato dopo 1 h. La miscela di reazione è stata diluita con acetato di etile (30 ml) e lavata in sequenza con acqua e una soluzione salina. La fase organica è stata essiccata su solfato di magnesio filtrato e l'eccesso di acetato di etile è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta. Il residuo risultante è stato sottoposto a cromatografia flash su colonna

(Biotage Isolera 50 g Ultra; gradiente, da 98/2 a 90/10 v/v acetato di etile/metanolo in 4 VC, eluizione dal 10% di metanolo). Le frazioni pure sono state raccolte e combinate e l'eluente in eccesso è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta per dare il prodotto **I35** (4,23 g, quantitativo). LC/MS, 3 min, 1,75 min (ES+) m/z (intensità relativa) 1220,30 ($[M+H]^+$, 100). 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.98 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 8.13 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.70 - 7.49 (m, 3H), 7.51 - 7.27 (m, 6H), 7.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.15 - 6.58 (m, 3H), 5.90 (dt, $J = 10.9, 5.5$ Hz, 1H), 5.66 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 5.38 - 4.82 (m, 9H), 4.73 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 4.59 - 4.34 (m, 3H), 4.05 (dd, $J = 15.4, 8.3$ Hz, 1H), 3.96 - 3.68 (m, 8H), 3.66 - 3.32 (m, 6H), 2.16 - 1.72 (m, 8H), 1.63 (d, $J = 9.8$ Hz, 3H), 1.54 - 1.02 (m, 18H), 0.86 (dd, $J = 18.2, 6.7$ Hz, 6H).

(j) 4-((S)-2-((S)-2-((allilossi)carbonil)ammino)-3-metilbutanammido)-propanammido)benzil(11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(terz-butossi-carbonil)-7-metossi-5-osso-11-(tetraidro-2H-piran-2-il)ossi)-2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)-ossi)metil)benzil)ossi)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (I36)

IBX stabilizzato al 45% (2,72 g, 4,36 mmol, 1,2 eq) è stato aggiunto a una soluzione di **I35** (4,44 g, 3,64 mmol, 1 eq) in DMSO (2,6 ml). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione per una notte. Sono stati aggiunti altri 0,2 eq di IBX (450 mg, 0,73 mmol, 0,2 eq) e la soluzione è stata lasciata agitare per altre 18

ore fino a quando non è stato osservato il completamento della reazione mediante LC/MS. La soluzione è stata fatta precipitare in acqua (250 ml) e filtrata. Il prodotto è stato sciolto in DCM e il solido di colore bianco residuo è stato rimosso mediante filtrazione. La fase organica è stata lavata con NaHCO₃ acquoso, acqua, una soluzione salina ed essiccata su solfato di magnesio. Il diclorometano è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta. Il residuo risultante è stato sottoposto a cromatografia flash su colonna (Biotage Isolera 100 g Ultra; gradiente, da 99/1 a 92/8 v/v DCM/metanolo in 10 VC). Le frazioni pure sono state raccolte e combinate e la rimozione dell'eluente in eccesso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta ha fornito il prodotto **I36** (3,04 g, 69%). LC/MS, metodo 15 min Ace Excel 2, 7,89 e 7,97 min (diastereoisomeri THP) (ES+) *m/z* (intensità relativa) 1218,30 ([M]⁺, 100). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.93 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.68 - 7.27 (m, 6H), 7.27 - 7.01 (m, 4H), 7.01 - 6.32 (m, 3H), 6.02 - 5.81 (m, 1H), 5.71 - 5.57 (m, 1H), 5.57 - 5.40 (m, 1H), 5.29 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 5.21 - 4.78 (m, 8H), 4.58-4.32 (m, 3H), 3.99 - 3.68 (m, 8H), 3.58-3.31 (m, 8H), 2.23-1.72 (m, 9H), 1.72- 1.04 (m, 18H), 0.85 (dd, *J*= 18.0, 6.7 Hz, 6H).

(k) 4-((S)-2-((S)-2-ammino-3-metilbutanammido)propanammido)benzil-(11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(terz-butossicarbonil)-7-metossi-5-osso-11-((tetraidro-2H-piran-2-il)ossi)-2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)ossi)metil)benzil)ossi)-11-

idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (I37)

Tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) (11 mg, 0,01 mmol, 0,02 eq) è stato aggiunto a una soluzione di **I36** (600 mg, 0,49 mmol, 1 eq) e pirrolidina (51 µl, 0,62 mmol, 1,25 eq) in diclorometano anidro (10 ml). La reazione è stata lavata tre volte con argon e agitata per 20 minuti a temperatura ambiente. Quindi la reazione è stata diluita con diclorometano (50 ml) e lavata in sequenza con cloruro di ammonio acquoso saturo (50 ml) e una soluzione salina (30 ml). La fase organica è stata essiccata su solfato di magnesio filtrato e l'eccesso di diclorometano è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta. Il residuo risultante **I37** è stato usato come miscela grezza per la reazione successiva. LC/MS, metodo 3 min, 1,29 min (ES+) *m/z* (intensità relativa) 1134,35 ([M+H]⁺, 80).

(I) Terz-butil (11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-((4-(2S,5S)-37-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-triosso-10,13,16,19,22,25,28,31-octaossa-3,6,34-triazaeptatriacontanammido)benzil)ossi)carbonil)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)ossi)metil)benzil)ossi)-7-metossi-5-osso-11-((tetraidro-2H-piran-2-il)ossi)-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]-diazepin-10(5H)-carbossilato (I38)

1-etil-3-(3'-dimetilamminopropil)carbodiimmide (94 mg, 0,79 mmol, 1 eq) è stata aggiunta a una soluzione di **I37** grezzo (558 mg, 0,49 mmol, 1 eq) e Mal-(PEG)₈-acido (292 mg, 0,49 mmol, 1 eq) in

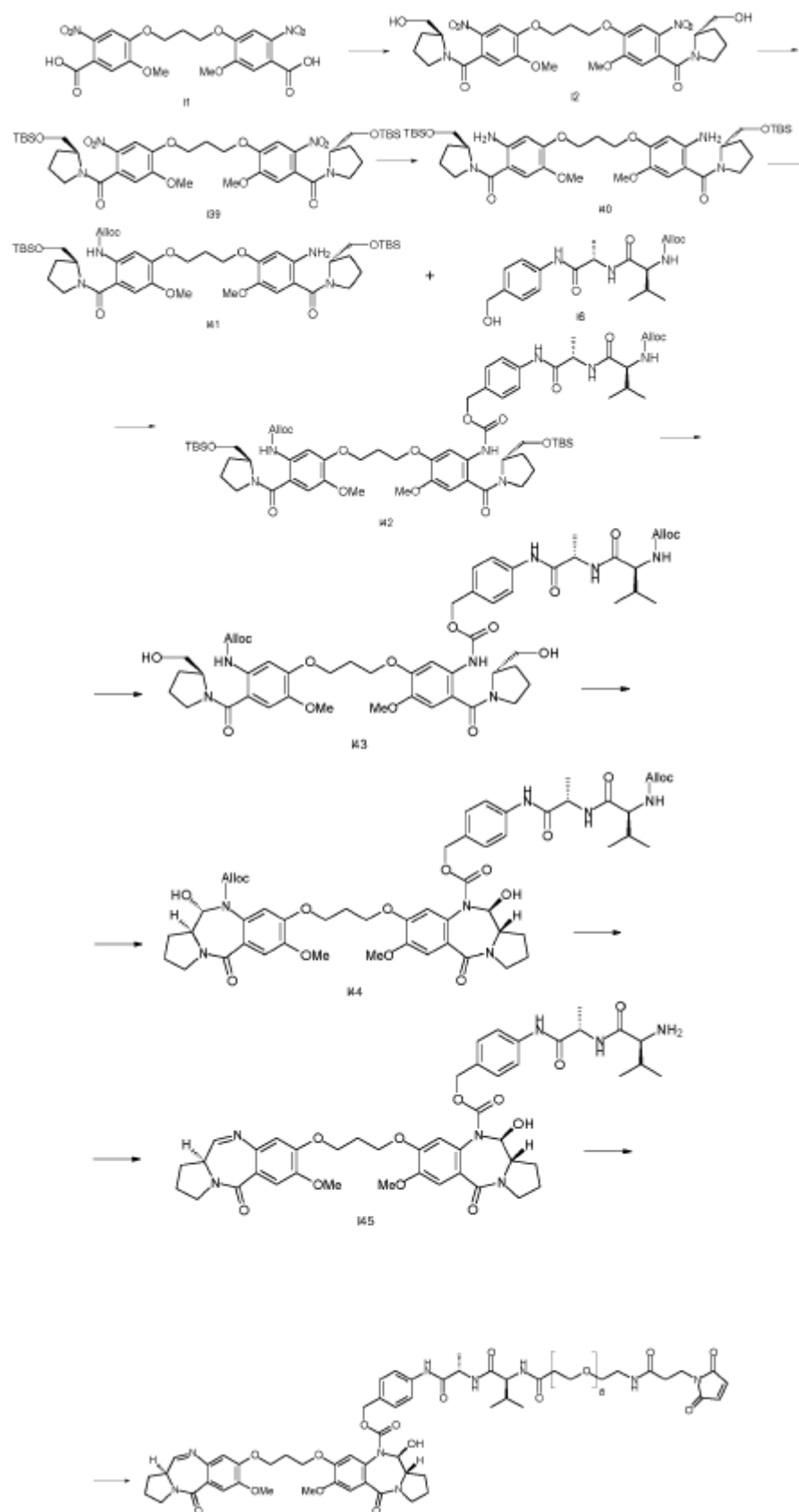
cloroformio (12 ml). La reazione è stata degassata tre volte con Argon e agitata per 2 ore e la presenza del materiale di partenza non è stata più osservata mediante LC/MS. La reazione è stata diluita con diclorometano e lavata in sequenza con acqua e una soluzione salina. La fase organica è stata essiccata su solfato di magnesio filtrato e l'eccesso di diclorometano è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta. Il residuo risultante è stato sottoposto a cromatografia flash su colonna (Biotage Isolera 50g Ultra; da 98/2 a 90/10 v/v DCM/metanolo in 10 VC). Le frazioni pure sono state raccolte e combinate e l'eluente in eccesso è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta per dare **I38** (485 mg, 58%).
LC/MS, metodo 3 min, 1,58 min (ES+) m/z (intensità relativa) 1709,30 ([M+H]⁺, 100). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.88 (s, 1H), 8.13 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 8.06-7.92 (m, 1H), 7.85 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.68 - 7.04 (m, 9H), 6.99 (s, 2H), 6.89 (d, $J=15.0$ Hz, 2H), 6.52 (s, 1H), 5.66 (d, $J=9.4$ Hz, 1H), 5.47 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.26 - 4.75 (m, 6H), 4.49 - 4.31 (m, 1H), 4.20 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 3.80 (d, $J=11.9$ Hz, 6H), 3.59 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 3.55 - 3.41 (m, 32H), 3.41 - 3.30 (m, 11H), 3.21 - 3.09 (m, 3H), 2.48- 2.28 (m, 4H), 2.18 - 1.08 (m, 24H), 0.84 (dd, $J=15.0, 6.7$ Hz, 5H).

(m) 4-((2S,5S)-37-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-triosso-10,13,16,19,22,25,28,31-octaossa-3,6,34-triaza-eptatriacontanammido)benzil(11S,11aS)-11-idrossi-7-metossi-8-((3-(((S)-7-metossi-5-osso-2,3,5,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)ossi)metil)benzil)ossi)-5-

**osso-2,3,11,11a-tetra-idro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-
10(5H)-carbossilato (3)**

Una miscela fredda di TFA/acqua (6 ml) è stata aggiunta a **I38** (460 mg, 0,27 mmol, 1 eq) e la soluzione risultante è stata lasciata sotto agitazione a 0°C per 2 ore. La reazione è stata neutralizzata con NaHCO₃ acquoso saturo (200 ml) e diclorometano (50 ml). Lo strato di DCM è stato lavato in sequenza con acqua e una soluzione salina. La fase organica è stata essiccata su solfato di magnesio filtrato e l'eccesso di diclorometano è stato rimosso mediante evaporazione rotante a pressione ridotta. Il residuo risultante è stato sottoposto a cromatografia flash su colonna (Biotage Isolera 50g Ultra; da 98/2 a 88/12 v/v DCM/metanolo in 10 VC). Le frazioni pure sono state raccolte, combinate (154 mg, 38%) e ulteriormente purificate mediante HPLC preparativa in fase inversa (Metodo C) (gradiente fino a 75/25 acetonitrile/acqua, 0,02% formico) per dare **3** puro (78 mg, 19%). LC/MS, metodo 15 min, Ace-Excel2, 6,18 min (ES+) m/z (intensità relativa) 1506,70 ([M+H]⁺, 100). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.07 - 9.79 (m, 1H), 8.14 (d, J= 7.2 Hz, 1H), 7.98 (t, J= 5.6 Hz, 1H), 7.85 (d, J= 8.6 Hz, 1H), 7.78 (d, J= 4.4 Hz, 1H), 7.67 - 7.30 (m, 7H), 7.28 - 7.05 (m, 3H), 6.99 (s, 2H), 6.98 - 6.85 (m, 2H), 6.58 - 6.47 (m, 1H), 5.59 - 5.34 (m, 1H), 5.32 - 4.77 (m, 6H), 4.48 - 4.30 (m, 1H), 4.28 - 4.08 (m, 1H), 3.88 - 3.75 (m, 5H), 3.75 - 3.55 (m, 6H), 3.55 - 3.42 (m, 28H), 3.42 - 3.32 (m, 6H), 3.14 (q, J= 5.8 Hz, 2H), 2.48-2.16 (m, 6H), 2.08-1.77 (m, 6H), 1.36 - 1.17 (m, 4H), 0.84 (dd, J = 15.4, 6.7 Hz, 6H).

Esempio 4



**(a) ((Propan-1,3-diilbis(ossi))bis(5-metossi-2-nitro-4,1-fenilene))-
bis((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-il)metanone) (I2)**

DMF (12 gocce) è stata aggiunta a una sospensione agitata di **I1** (10 g, 21,5 mmol) e ossalil cloruro (5,6 ml, 8,2 g, 64,5 mmol) in DCM anidro (150 ml). Dopo l'effervescenza iniziale la sospensione di reazione è diventata una soluzione e la miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 h. La maggior parte del solvente è stata rimossa mediante evaporazione a pressione ridotta. La soluzione concentrata risultante è stata ridisciolta in una quantità minima di DCM secco e triturrata con etere dietilico. Il precipitato di colore giallo è stato raccolto mediante filtrazione sottovuoto, lavato con etere dietilico freddo ed essiccato per 1 ora in un forno sottovuoto a 40°C. Il cloruro acido è stato aggiunto, in porzioni, a una sospensione agitata di (S)-(+)-2-pirrolidinemetanolo (5,0 g, 4,9 ml, 49,5 mmol) e TEA (15,0 ml, 10,9 g, 108 mmol) in DCM anidro (100 ml) a -40°C (ghiaccio secco/CH₃CN). La soluzione risultante è stata agitata per altri 60 minuti, diluita con DCM (100 ml) e lavata con HCl 1 N (2 × 50 ml), NaHCO₃ saturo (3 × 40 ml), una soluzione salina (50 ml), essiccata (MgSO₄) ed il solvente è stato fatto evaporare sottovuoto per dare il prodotto puro **I2** come solido di colore giallo (13,6 g, resa 100%). LC/MS (metodo A): tempo di ritenzione 1,33 min (ES+) *m/z* 655 [*M* + Na]⁺, 633 [*M* + H]⁺ (si veda appendice). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.68 - 1.80 (m, 2H), 1.80 - 2.00 (m, 6H), 2.27 (d, 2H), 3.05 - 3.25 (m, 4H), 3.37 - 3.48 (m, 2H),

3.56 - 3.76 (m, 2H), 3.92 (s, 6H), 4.09 (dd, 2H), 4.25 - 4.31 (m, 4H), 4.82 (t, 2H), 7.08 (s, 2H), 7.73 (s, 2H).

(b) ((propan-1,3-diilbis(ossi))bis(5-metossi-2-nitro-4,1-fenilene))-bis((S)-2-(((terzbutildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-il)-metanone) (I39)

TBS-Cl (8,12 g, 53,90 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di **I2** (15,5 g, 24,50 mmol) e imidazolo (4,17 g, 61,25 mmol) in DCM (300 ml) a temperatura ambiente sotto azoto. La miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 12 ore. È stata aggiunta acqua (200 ml), lo strato organico è stato rimosso e la fase acquosa è stata estratta con DCM (2 × 300 ml). Le fasi organiche combinate sono state essiccate (Na₂SO₄) e fatte evaporare sottovuoto per ottenere un residuo scuro che è stato purificato mediante cromatografia su colonna (da 0 a 2% di metanolo/DCM). Le frazioni pure sono state fatte evaporare sottovuoto per fornire **I39** come solido di colore marrone (17,0 g, 81% di resa). LC/MS (metodo A): tempo di ritenzione 1,83 min (ES+) *m/z* 861 [M + H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.09 (s, 12H), 0.91 (s, 18H), 1.70 - 1.81 (m, 2H), 1.87 - 1.99 (m, 6H), 2.22 - 2.30 (m, 2H), 3.10 (t, 4H), 3.40 - 3.51 (m, 2H), 3.59 - 3.67 (m, 2H), 3.88-3.95 (m, 2H), 3.91 (s, 6H), 4.28 (t, 6H), 6.96 (s, 2H), 7.72 (s, 2H).

(c) ((propan-1,3-diilbis(ossi))bis(2-ammino-5-metossi-4,1-fenilene))-bis((S)-2-(((tertbutildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-il)-metanone) (I40)

Zinco (25,8 g, 394,8 mmol) e NH₄Cl saturo (150 ml) sono stati aggiunti a una soluzione di **I39** (17 g, 19,74 mmol) in EtOH (300 ml) a temperatura ambiente. La miscela risultante è stata agitata a 50°C per 3 ore, raffreddata e filtrata attraverso un letto di celite che è stata quindi lavata con EtOAc (300 ml) e acqua (300 ml). Lo strato organico è stato rimosso e lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc (3 × 400 ml). Le fasi organiche combinate sono state essiccate (MgSO₄) e fatte evaporare sottovuoto per fornire un residuo di colore giallo che è stato purificato mediante cromatografia su colonna (da 0 a 5% di metanolo/DCM). Le frazioni pure sono state fatte evaporare a secchezza per dare **I40** come solido di colore giallo (13,00 g, 82% di resa). LC/MS (metodo A): tempo di ritenzione 2,30 min (ES+) *m/z* 802,2 [M + H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.06 (s, 12H), 0.85 (s, 18H), 1.52 - 1.78 (m, 2H), 1.81 - 2.00 (m, 6H), 2.14 - 2.22 (m, 2H), 3.41 (d, 4H), 3.61-3.75 (m, 4H), 3.63 (s, 6H), 4.01 - 4.16 (m, 6H), 4.98 - 5.22 (m, 4H), 6.40 (s, 2H), 6.66 (s, 2H).

(d) allil (5-(3-(5-ammino-4-((S)-2-((t-butildimetilsilil)ossi)metil)-pirrolidin-1-carbonil)-2-metossifenossi)propossi)-2-((S)-2-((t-butildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-4-metossifenil)carbammato (I41)

Allil cloroformiato (784 µl, 0,9 g, 7,36 mmol) è stato aggiunto goccia a goccia a una soluzione di **I40** (5,9 g, 7,36 mmol) e piridina (715 µl, 0,7 g, 8,84 mmol) in DCM (100 ml) a 0°C. La miscela di reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per

altre 2 ore. La miscela di reazione è stata lavata con HCl 0,5 M (50 ml), carbonato acido di sodio saturo (50 ml) e una soluzione salina (50 ml). Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta e l'olio risultante è stato purificato mediante cromatografia su colonna; (l'eluizione iniziale con acetato di etile al 50%/eptano ha rimosso l'ammina protetta da bis-alloc, proseguendo con un'eluizione con acetato di etile per rimuovere il prodotto protetto mono-alloc desiderato (**141**). Infine, tutto il materiale di partenza non reagito è stato rimosso con 5% di metanolo/DCM). Le frazioni pure sono state fatte evaporare a pressione ridotta per lasciare **I41** come solido di colore giallo (3,5 g, resa del 54%). LC/MS (metodo B): tempo di ritenzione 2,41 min (ES+) m/z 886,5 $[M + H]^+$

(e) allil (5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-((allilossi) carbonil) ammino)-3-metilbutanammido)propanammido)benzil)ossi) carbonil) ammino)-4-((S)-2-((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-2-metossifenossi)propossi)-2-((S)-2-((terz-butildimetilsilil)ossi)-metil)pirrolidin-1-carbonil)-4-metossifenil) carbammato (I42)

Trifosgene (0,41 g, 1,4 mmol) è stato aggiunto a una soluzione agitata di **I41** (3,5 g, 3,95 mmol) in THF anidro (70 ml) a temperatura ambiente sotto Argon. È stata aggiunta trietilammina (1,2 ml, 0,87 g, 8,6 mmol) e la miscela risultante è stata agitata per 10 minuti. L'analisi mediante LC/MS ha rivelato la conversione completa in isocianato (campionato in MeOH per dare carbammato di metile, tempo di ritenzione 2,48 minuti, (ES+) m/z 944,4 $[M+ H]^+$). È stata aggiunta una miscela di **I6** (1,64 g, 4,35 mmol) e trietilammina (0,83 ml, 0,6

g, 5,9 mmol) in THF anidro (30 ml). La miscela di reazione è stata agitata sotto argon per 2 ore a 40°C. Il solvente è stato rimosso sottovuoto e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna (da 0,5 a 2,5% di metanolo/DCM) per lasciare **I42** come solido di colore bianco (3,58 g, 70% di resa). LC/MS (metodo B): tempo di ritenzione 2,45 min, (ES+) m/z 1290,0 $[M + H]^+$.

(f) allil (5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((allilossi) carbonil) ammino)-3-metilbutanammido)propanammido)benzil)ossi) carbonil) ammino)-4-((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-carbonil)-2-metossifenossi)propossi)-2-((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-carbonil)-4-metossifenil) carbammato (I43)

Fluoruro di tetrabutylammonio 1 M (6,1 ml, 6,1 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di **I42** (3,58 g, 2,78 mmol) in THF (35 ml) a temperatura ambiente. La soluzione risultante è stata agitata per 60 minuti, quindi evaporata a secchezza a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna (dal 2 al 5% di metanolo/DCM) per lasciare **I43** come schiuma di colore bianco (2,95 g, resa del 98%). LC/MS (metodo B): tempo di ritenzione 1,70 min, (ES+) m/z 1061,3 $[M+ H]^+$

(g) allil (11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((allilossi) carbonil) ammino)-3-metilbutanammido)propanammido)-benzil)ossi) carbonil)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)ossi)propossi)-11-idrossi-7-metossi-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo-[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (I44)

Una soluzione di TEMPO di ossidazione aerobica Stahl 0,2 M in MeCN (5,47 ml, 1,1 mmol) seguita da rame tetrakisacetoneitrile (I) triflato (0,41 g, 1,1 mmol) è stata aggiunta a una soluzione di **I43** (2,9 g, 2,74 mmol) in DCM (30 ml) e acetonitrile (6 ml) e agitata a 35°C per 36 ore in atmosfera di aria. La miscela di reazione è stata lavata con acqua (25 ml), essiccata (separatore di fase Biotage) e fatta evaporare a secchezza a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna (dal 3 al 6% di metanolo/DCM) per lasciare il prodotto ossidato **I44** come solido di colore bianco (2,46 g, 85% di resa). LC/MS (metodo B): tempo di ritenzione 1,60 min, (ES+) m/z 1057,1 $[M+H]^+$.

(h) 4-((S)-2-((S)-2-ammino-3-metilbutanamido)propanamido)benzil-(11S,11aS)-11-idrossi-7-metossi-8-(3-(((S)-7-metossi-5-osso-2,3,5,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)-ossi)propossi)-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (I45)

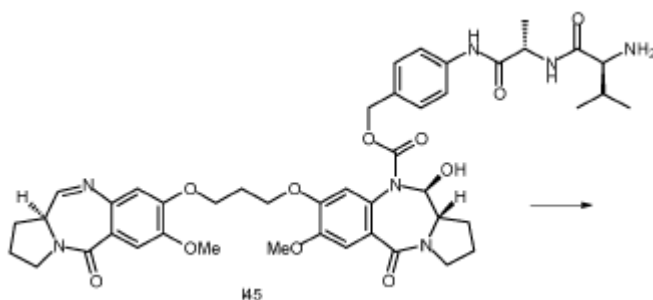
$Pd(Ph_3P)_4$ (10 mg, 5 % in mol) è stato aggiunto a una soluzione di **I44** (200 mg, 0,19 mmol) e pirrolidina (40 μ l, 0,34 g, 0,48 mmol) in DCM (10 ml) a temperatura ambiente. La soluzione risultante è stata agitata per 30 minuti. La miscela di reazione è stata lavata con cloruro di ammonio saturo (10 ml), essiccata (separatore di fase di Biotage) e fatta evaporare a secchezza a pressione ridotta. Il residuo è stato quindi posto su una linea ad alto vuoto per 4 ore per rimuovere tracce di pirrolidina. Il solido di colore bianco sporco risultante è stato usato nella fase successiva senza ulteriore

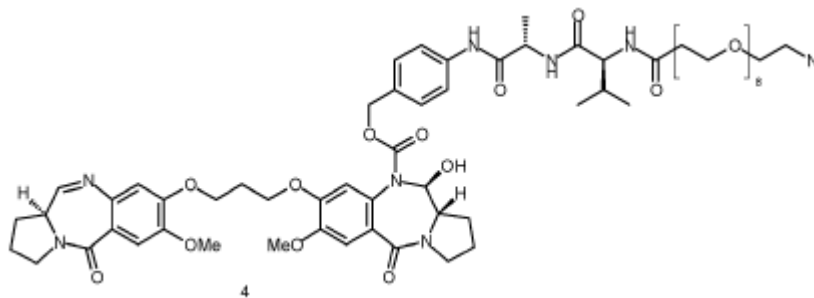
purificazione (160 mg, resa del 97%). LC/MS (metodo B): tempo di ritenzione 1,17 min, (ES+) m/z 871,1 $[M+H]^+$.

(i) 4-((2S,5S)-37-(2,5-diosso-2,5-diidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-triosso-10,13,16,19,22,25,28,31-octaossa-3,6,34-triazaeptatriacontanammido)benzil(11S,11aS)-11-idrossi-7-metossi-8-(3-((S)-7-metossi-5-osso-2,3,5,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)ossi)propossi)-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (1)

EDCl.HCl (46 mg, 0,24 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di **I45** e Mal-PEG₈ acido (130 mg, 0,22 mmol) in CHCl₃ (10 ml) agitato a temperatura ambiente per 2 ore. LC/MS mostra il 78% di materiale di partenza presente. Altri 2 eq di EDCl.HCl sono stati aggiunti in porzioni per portare la reazione al completamento. La miscela di reazione è stata lavata con acqua (10 ml), essiccata (Biotage PS) e fatta evaporare a secchezza, a pressione ridotta, per lasciare un solido di colore giallo che è stato purificato mediante HPLC di preparazione per lasciare il prodotto **1** come solido di colore biancastro (90 mg, resa del 34%). LC/MS (metodo B): tempo di ritenzione 1,47 min, (ES+) m/z 1445,9 $[M+H]^+$.

Esempio 5

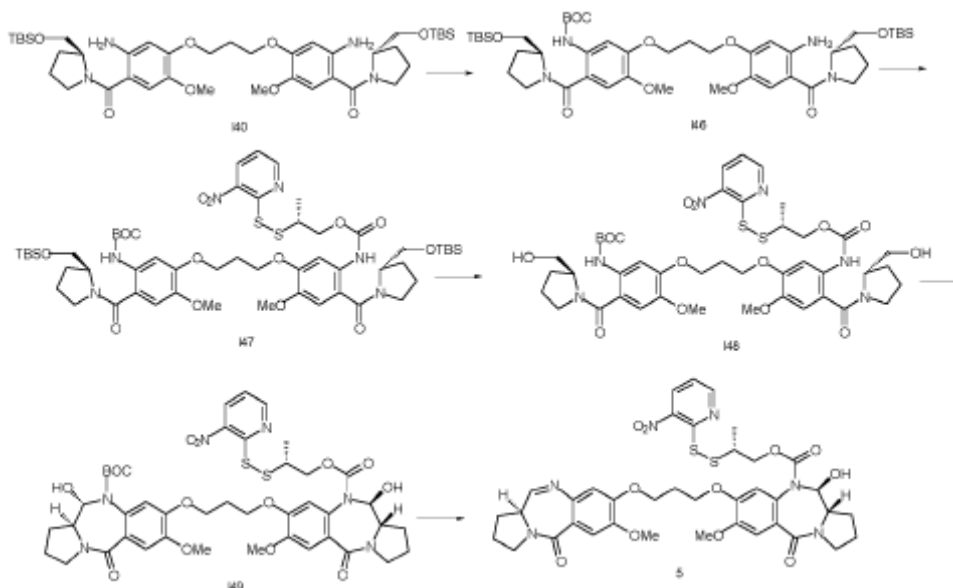




(i) 4-((29S,32S)-1-azido-29-isopropil-32-metil-27,30-diosso-3,6,9,12,15,18,21,24-octaossa-28,31-diazatritriacontan-33-ammido)-benzil (11S,11aS)-11-idrossi-7-metossi-8-(3-((S)-7-metossi-5-osso-2,3,5,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)-ossi)propossi)-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (4)

EDCl.HCl (27 mg, 0,14 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di **I45** e acido Azido-PEGs (49 mg, 0,10 mmol) in $CHCl_3$ (6 ml) e agitato a temperatura ambiente per 1 ora. Il solvente è stato fatto evaporare a pressione ridotta, per lasciare una schiuma di colore giallo. La purificazione mediante HPLC di preparazione ha dato al prodotto **4** un solido di colore biancastro (20 mg, resa del 17%). LC/MS (metodo B): tempo di ritenzione 6,01 min, (ES+) m/z 1320 $[M+H]^+$.

(ii) (R)-2-((3-nitropiridin-2-il)disolfanil)propil (11S,11aS)-11-idrossi-7-metossi-8-(3-((S)-7-metossi-5-osso-2,3,5,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)ossi)propossi)-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (5)



(a) terz-butil (5-(3-(5-ammino-4-((S)-2-(((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-2-metossifenossi)propossi)-2-((S)-2-(((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-4-metossifenil)carbammato (I46)

Boc anidride (0,5 g, 2,3 mmol, 1,0 eq) è stata aggiunta a una soluzione di **I40** (1,9 g, 2,3 mmol, 1,0 eq) in THF (50 mL) e agitato a 55°C per 5 h. Il solvente è stato rimosso mediante evaporazione a pressione ridotta e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna (50-100% acetato di etile/esano) per lasciare il prodotto come solido di colore giallo, 1,7 g (80%). LC/MS (metodo 1): rt 2,48 min, *m/z* (902,5) M+H.

(b) terz-butil (2-((S)-2-(((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)-pirrolidin-1-carbonil)-5-(3-(4-((S)-2-(((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)pirrolidin-1-carbonil)-2-metossi-5-(((R)-2-((3-nitropiridin-2-il)disulfaneil)propossi)carbonil)ammino)fenossi)propossi)-4-metossifenil)carbammato (I47)

Trifosgene (0,135 g, 0,455 mmol, 0,35 eq) è stato aggiunto a una soluzione di (2R)-2-[(3-nitro-2-piridil)disolfanil]propan-1-olo (0,316 g, 1,28 mmol, 1,05 eq) e piridina (111 mg, 1,4 mmol, 1,15 eq) in diclorometano anidro (5 ml) e agitato a temperatura ambiente per 30 min. La soluzione risultante è stata quindi aggiunta a una soluzione di **I46** (1,10 g, 1,22 mmol, 1,0 eq) e piridina (106 mg, 1,34 mmol, 1,1 eq) in diclorometano anidro (10 ml) e agitata a temperatura ambiente per 60 min. Il solvente è stato rimosso mediante evaporazione a pressione ridotta e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna (40-50% acetato di etile/esano) per lasciare il prodotto come schiuma di colore giallo, 1,21 g (85%).
LC/MS (metodo 1): rt 2,53 min, *m/z* (1174,5) M+H.

(c) terz-butil (2-((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-carbonil)-5-(3-(4-((S)-2-(idrossimetil)pirrolidin-1-carbonil)-2-metossi-5-(((R)-2-((3-nitropiridin-2-il)disolfanil)propossi)carbonil)ammino)fenossi)-propossi)-4-metossifenil)carbammato (I48)

I47 (1,21 g, 1,03 mmol) è stato sciolto in una miscela di acido acetico (5 ml), THF (1 ml), metanolo (1 ml) e acqua (2 ml). La soluzione risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 90 minuti, quindi fatta evaporare a secco. Il residuo è stato ripreso in acetato di etile (50 ml), lavato con acqua (50 ml), quindi sat NaHCO₃ (50 ml), essiccato (MgSO₄) e fatto evaporare a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante colonna (4% di metanolo/DCM) per lasciare il prodotto come solido di colore giallo, 0,97 g (100%).
LC/MS (metodo 1): rt 1,87 min, *m/z* (946,0) M+H.

(d) terz-butil (11S, 11aS)-11-idrossi-8-(3-(((11S,11aS)-11-idrossi-7-metossi-10-((R)-2-(3-nitropiridin-2-il)disolfanil)propossi)carbonil)-5-osso-2,3,5,10,11,11a-esaidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]-diazepin-8-il)ossi)propossi)-7-metossi-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (I49)

Una soluzione di TEMPO di ossidazione aerobica Stahl (2,05 ml, 0,4 mmol, 0,2 mol/L) seguita da tetrakisacetoneitrile rame(I) triflato (0,15 g, 0,40 mmol) è stata aggiunta a una soluzione di **I48** (0,97 g, 1,0 mmol) in DCM (20 ml, 312,0 mmol). La miscela risultante è stata riscaldata a 35°C per 15 ore. La fase organica è stata lavata con acqua (25 ml), essiccata (Biotage) e fatta evaporare a secchezza a pressione ridotta e purificata mediante cromatografia su colonna (3-6% di metanolo/DCM) per lasciare il prodotto come solido di colore bianco, 0,77 g (79 %). LC/MS (metodo 1): rt 1,70 min, m/z (941,9) M+H.

(e) (R)-2-(3-nitropiridin-2-il)disolfanil)propil (11S,11aS)-11-idrossi-7-metossi-8-(3-(((S)-7-metossi-5-osso-2,3,5,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)ossi)propossi)-5-osso-2,3,11,11a-tetraidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carbossilato (5)

Acido trifluoroacetico (4,5 ml) è stato aggiunto all'acqua (0,5 ml) e raffreddato a 0°C. Questa soluzione è stata quindi aggiunta a **I49** (0,75 g, 0,80 mmol) e la miscela risultante è stata agitata a 0°C per 2 ore. Il solvente è stato rimosso a pressione ridotta, il

residuo ripreso in DCM (10 ml) e la miscela di reazione neutralizzata mediante aggiunta di NaHCO₃ sat. Dopo l'essiccamento (Biotage) e l'evaporazione a pressione ridotta, il residuo è stato purificato mediante colonna (4-6% di metanolo/DCM) per lasciare il prodotto come solido di colore giallo brillante, 0,6 g (91%). LC/MS (metodo 2): rt 6,04 min, *m/z* (824,0) M+H.

Condizioni analitiche LC/MS per l'Esempio 5(ii)

La spettrometria di massa con elettrospray in modalità positiva è stata eseguita usando un SQD2 di classe H di Waters Acquity. Le fasi mobili usate erano solvente A (acqua con acido formico 0,1%) e solvente B (acetonitrile con acido formico 0,1%).

Metodo 1: Gradiente per l'eluizione di routine di 3 minuti: Composizione iniziale 5% di B mantenuta per 25 secondi, quindi aumentata dal 5% di B al 100% di B in un periodo di 1 minuto e 35 secondi. La composizione è stata mantenuta per 50 secondi al 100% di B, quindi viene riportata al 5% di B in 5 secondi e mantenuta lì per 5 secondi. La durata totale dell'eluizione a gradiente è stata di 3,0 minuti. La portata era di 0,8 ml/minuto. Il rilevamento era a 254 nm. Colonna: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1,7 µm 2,1 × 50 mm a 50°C dotata di precolonna Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130 A, 1,7 µm, 2,1 mm × 5 mm.

Metodo 2: Gradiente per un'eluizione di 15 minuti: Composizione iniziale 5% di B mantenuta per 1 minuto, quindi aumentata dal 5% di B al 100% di B in un periodo di 9 minuti. La composizione è stata mantenuta per 2 minuti al 100% di B, quindi veniva riportata al 5% di

B in 10 secondi e mantenuta lì per 2 minuti e 50 secondi. La durata totale dell'eluizione a gradiente è stata di 15,0 minuti. La portata era di 0,8 ml/minuto (per 3 minuti) e 0,6 ml/minuto (per 15 minuti). Il rilevamento era a 254 nm. Colonna: ACE Excel 2 C18-AR, 2 μ , 3,0 \times 100 mm dotata di precolonna Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130 A, 1,7 μ m, 2,1 mm \times 5 mm.

Esempio 6 - Coniugazione

Conj-HER-1

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 16 micromoli, 0,32 ml a 50 mM) di una soluzione 12 ml di Erceptina (30 mg, 0,2 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 2,5 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 4 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso centrifugazione con filtro da centrifuga vivaspin MWCO 50 KDa, in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'eccesso di agente riducente. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 15 molare equivalente/anticorpo, 3 micromoli, 0,08 μ l a 50 nM) in DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una

concentrazione di anticorpi di 1,5 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µM. Il composto 1 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 1,0 micromoli, in 1,5 ml di DMSO) a 13,5 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (15 mg, 0,1 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 3 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (15 micromoli, 0,150 ml a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso tramite un filtro di rotazione usando vivaspin MWCO 50 kDa in un tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a +4°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Conj-HER-1 a 214 nm e 330 nm (specifico per composto 1) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 1, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,74 molecole del Composto 1 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μ m 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 μ m 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di Conj-HER-1 a 280 nm mostra una purezza superiore al 99%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di ADC finale a 1,39 mg/ml in 7,8 ml, la massa ottenuta di ADC è di 10,8 mg (resa del 72%).

Conj-HER-2

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 55,5 micromoli, 1,11 ml a 50 mM) di una soluzione 11,8 ml di Erceptina (104 mg, 0,69 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 4,0 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 3,5 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso centrifugazione con filtro da centrifuga vivaspin MWCO 50 KDa, in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'eccesso di agente riducente. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 20 molare equivalente/anticorpo, 12,4 micromoli, 0,25 μ l a 50 nM) in

DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di ~ 2,4 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µM. Il composto **2** è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 1,03 micromoli, in 1,40 ml di DMSO) a 14 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (15.5 mg, 0,103 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 1,5 ore a +25° C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (5,15 micromoli, 0,051 ml a 100 mM).

Il farmaco in eccesso libero è stato rimosso attraverso unità di filtrazione a flusso tangenziale (TFF) usando mPES, filtro in fibra MidiKros® 30 kDa con superficie di 115 cm², in tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a +4°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Conj-HER-2 a 214 nm e 330 nm (specifico per composto **2**) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto **2**,

coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,85 molecole del Composto 2 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μ m 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 μ m 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di Conj-HER-2 a 280 nm mostra una purezza superiore al 98%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di ADC finale a 0,88 mg/ml in 8,5 ml, la massa ottenuta di ADC è di 7,5 mg (resa del 48%).

Conj-HER-3

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di tris(2-carbossietil)fosfina (TCEP) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (40 equivalente molare/anticorpo, 40 micromoli, 0,08 ml a 50 mM) di una soluzione 1,39 ml di Erceptina (15 mg, 0,1 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 4,0 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +37°C per 2 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato scambiato con tampone, tramite dialisi usando una cassetta MWCO da 50 KDa, in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'agente riducente in eccesso per 16 ore a

temperatura ambiente. È stata aggiunta una soluzione 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 25 equivalenti molar/anticorpo, 2,5 micromoli, 0,04 ml a 50 mM) in DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 2 ore a temperatura ambiente con agitazione delicata (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di ~ 1,5 mg/ml. A causa dell'ossidazione incompleta, sono stati aggiunti altri 0,04 ml di DHAA 50 mM agitando ulteriormente a temperatura ambiente per 2 h. Dopo ciò, la completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena viene osservata mediante UHPLC. La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µm. Il composto 3 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 0,8 micromoli, in 1,1 ml di DMSO) a 11 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (12 mg, 0,08 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 1 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (3,2 micromoli, 0,032 ml a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso tramite un filtro di rotazione usando vivaspin MWCO 50 kDa in un tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a +4°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Conj-HER-3 a 214 nm e 330 nm (specifico per composto 3) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 3, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,78 molecole del Composto 3 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 µm 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di Conj-HER-3 a 280 nm mostra una purezza superiore al 94%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di ADC finale a 1,14 mg/ml in 8,2 ml, la massa ottenuta di ADC è di 9,3 mg (resa del 62%).

Conj-R347-1

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 697 micromoli, 13,87 ml a 50 mM) di una soluzione 44,36 ml di anticorpo R347 (1300 mg, 8,67 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 5,0 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 3,5 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso un'unità di filtrazione a flusso tangenziale (TFF) usando mPES, filtro in fibra MidiKros® 30 kDa con area superficiale di 235 cm², in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'agente riducente in eccesso. L'anticorpo ridotto è stato centrifugato per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrato usando un filtro a membrana da 0,22 µm. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 15 molare equivalente/anticorpo, 130 micromoli, 2,6 µl a 50 nM) in DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di 5,0 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µm. Il composto 1 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 86,7 micromoli, in 23,4 ml di DMSO) a 330 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (1300 mg, 8,67 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 3 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (433 micromoli, 4,33 ml a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso attraverso unità di filtrazione a flusso tangenziale (TFF) usando mPES, filtro in fibra

MidiKros® 30 kDa con superficie di 235 cm², in tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato formulato su istidina 25 mM, saccarosio 200 mM, pH 6,0. L'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a -78°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 1.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Conj-R347-1 a 214 nm e 330 nm (specifico per composto 1) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 1, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,82 molecole del Composto 1 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 µm 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di ADC a 280 nm mostra una purezza superiore al 99%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di Conj-R347-1 finale a 10,11 mg/ml in 113 ml, la massa ottenuta di ADC è di 1141 mg (resa del 88%).

Conj-R347-2

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 213 micromoli, 4,3 ml a 50 mM) di una soluzione 13,7 ml di anticorpo R347 (400 mg, 2,67 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 5,0 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 3,5 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso un'unità di filtrazione a flusso tangenziale (TFF) usando mPES, filtro in fibra MidiKros® 30 kDa con area superficiale di 115 cm², in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'agente riducente in eccesso. L'anticorpo ridotto è stato centrifugato per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrato usando un filtro a membrana da 0,22 µM. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 15 molare equivalente/anticorpo, 40 micromoli, 0.8 µl a 50 nM) in DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di 3,0 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µM. Il composto

2 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 26,7 micromoli, in 15,5 ml di DMSO) a 330 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (400 mg, 2,67 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 1,5 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (125 micromoli, 1,25 ml a 100 mM).

Il farmaco in eccesso libero è stato rimosso attraverso unità di filtrazione a flusso tangenziale (TFF) usando mPES, filtro in fibra MidiKros® 30 kDa con superficie di 115 cm², in tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato formulato su istidina 25 mM, saccarosio 200 mM, pH 6,0. L'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a -78°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 2.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Conj-R347-2 a 214 nm e 330 nm (specifico per composto 2) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 2, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,8 molecole del Composto 2 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 µm 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di Conj-R347-2 a 280 nm mostra una purezza superiore al 99%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di ADC finale a 3,06 mg/ml in 93 ml, la massa ottenuta di ADC è di 284 mg (resa del 71%).

Conj-R347-3

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 240 micromoli, 4,8 ml a 50 mM) di una soluzione 15,36 ml di anticorpo R347 (450 mg, 3,0 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 5,0 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 3,5 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso un'unità di filtrazione a flusso tangenziale (TFF) usando mPES, filtro in fibra MidiKros® 30 kDa con area superficiale di 235 cm², in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'agente riducente in eccesso. L'anticorpo ridotto è stato centrifugato per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrato usando un filtro a membrana da 0,22 µm. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 15 molare equivalente/anticorpo, 45 micromoli, 0,9 µl a 50 nM) in DMSO e

la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di ~ 3,5 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µM. Il composto 3 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 30,0 micromoli, in 13,0 ml di DMSO) a 330 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (450 mg, 3,0 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 3 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (150 micromoli, 1,5 ml a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso attraverso unità di filtrazione a flusso tangenziale (TFF) usando mPES, filtro in fibra MidiKros® 30 kDa con superficie di 235 cm², in tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato formulato su istidina 25 mM, saccarosio 200 mM, pH 6,0. L'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a -78°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Coniugato

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

a 214 nm e 330 nm (specifico per composto 3) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 3, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,82 molecole del Composto 2 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μ m 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 μ m 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di Conj-R347-3 a 280 nm mostra una purezza superiore al 99%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di Conj-R347-3 finale a 2,35 mg/ml in 174 ml, la massa ottenuta di ADC è di 409 mg (resa del 91%).

Conj-HLL2-1

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 53,3 micromoli, 1,07 ml a 50 mM) di una soluzione 11,8 ml di anticorpo HLL2 (100 mg, 0,6 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 5,0 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 3,5 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso centrifugazione con filtro da centrifuga vivaspin

MWCO 50 KDa, in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'eccesso di agente riducente. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 15 molare equivalente/anticorpo, 9 micromoli, 0,18 µl a 50 nM) in DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di ~ 3,0 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µM. Il composto 1 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 1,2 micromoli, in 0,58 ml di DMSO) a 7 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (18 mg, 0,12 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 3 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (6 micromoli, 0,06 ml a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso tramite un filtro di rotazione usando vivaspin MWCO 50 kDa in un tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a +4°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 2.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un

gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Conj-HLL2-1 a 214 nm e 330 nm (specifico per composto 1) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 1, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,74 molecole del Composto 2 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 µm 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di Conj-HLL2-1 a 280 nm mostra una purezza superiore al 98%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di ADC finale a 1,6 mg/ml in 7,5 ml, la massa ottenuta di ADC è di 12 mg (resa del 67%).

Conj-HLL2-2

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 53,3 micromoli, 1,07 ml a 50 mM) di una soluzione 11,8 ml di anticorpo HLL2 (100 mg, 0,6 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 5,0 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 3,5 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un

tampone, attraverso centrifugazione con filtro da centrifuga vivaspin MWCO 50 KDa, in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'eccesso di agente riducente. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 15 molare equivalente/anticorpo, 9 micromoli, 0,18 µl a 50 nM) in DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di ~ 3,0 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µM. Il composto 2 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 1,2 micromoli, in 0,58 ml di DMSO) a 7 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (18 mg, 0,12 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 3 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (6 micromoli, 0,06 ml a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso tramite un filtro di rotazione usando vivaspin MWCO 50 kDa in un tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a +4°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 3,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Coniugato a 214 nm e 330 nm (specifico per composto 2) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 2, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,78 molecole del Composto 2 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 µm 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di Conj-HLL2-2 a 280 nm mostra una purezza superiore al 98%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di Conj-HLL2-2 finale a 1,56 mg/ml in 8,0 ml, la massa ottenuta di ADC è di 12,5 mg (resa del 69%).

Conj-HLL2-3

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 53,3 micromoli, 1,07 ml a 50 mM) di una soluzione 11,8 ml di anticorpo HLL2 (100 mg, 0,6 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 5,0 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 3,5 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore

orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso centrifugazione con filtro da centrifuga vivaspin MWCO 50 KDa, in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'eccesso di agente riducente. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 15 molare equivalente/anticorpo, 9 micromoli, 0,18 µl a 50 nM) in DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di ~ 3,0 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µM. Il composto 3 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 1,2 micromoli, in 0,58 ml di DMSO) a 7 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (18 mg, 0,12 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 3 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (6 micromoli, 0,06 ml a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso tramite un filtro di rotazione usando vivaspin MWCO 50 kDa in un tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa

rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a +4°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Coniugato a 214 nm e 330 nm (specifico del composto 3) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 3, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,79 molecole del Composto 3 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 µm 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di Conj-HLL2-3 a 280 nm mostra una purezza superiore al 98%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di Conj-HLL2-3 finale a 1,73 mg/ml in 8,2 ml, la massa ottenuta di ADC è di 14,2 mg (resa del 79%).

Conj-CD79b-1

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 53,6 micromoli, 1,07 ml a 50 mM) di una soluzione 13,9 ml di anticorpo CD79b (100 mg, 0,67 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 4,0 mg/ml. La

miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 4 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso centrifugazione con filtro da centrifuga vivaspin MWCO 50 KDa, in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'eccesso di agente riducente. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 15 molare equivalente/anticorpo, 9 micromoli, 0,18 µl a 50 nM) in DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di ~ 2,0 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µM. Il composto 1 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 1,2 micromoli, in 1,0 ml di DMSO) a 9,0 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (18 mg, 0,12 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 2 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (4,8 micromoli, 0,048 ml a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso tramite un filtro di rotazione usando vivaspin MWCO 50 kDa in un tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato

mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 μm in atmosfera sterile e quindi conservato a +4°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Coniugato a 214 nm e 1 nm (specifico per composto 1) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 1, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,90 molecole del Composto 1 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μm 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 μm 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di Conj-CD79b-1 a 280 nm mostra una purezza superiore al 98%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di Conj-CD79b-1 finale a 2,00 mg/ml in 7,85 ml, la massa ottenuta di ADC è di 15,7 mg (resa del 79%).

Conj-CD79b-2

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 53,6 micromoli, 1,07 ml a 50 mM) di una soluzione 13,9 ml di anticorpo CD79b (100 mg, 0,67 micromoli) in tampone riducente contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM

(EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 4,0 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 4 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso centrifugazione con filtro da centrifuga vivaspin MWCO 50 KDa, in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'eccesso di agente riducente. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 15 molare equivalente/anticorpo, 9 micromoli, 0,18 µl a 50 nM) in DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di ~ 2,0 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µM. Il composto 2 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 1,2 micromoli, in 1,0 ml di DMSO) a 9,0 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (18 mg, 0,12 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 2 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (4,8 micromoli, 0,048 ml a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso tramite un filtro di rotazione usando vivaspin MWCO 50 kDa in un tampone contenente PBS

pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a +4°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Coniugato a 214 nm e 2 nm (specifico per composto 2) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 2, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,87 molecole del Composto 2 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 µm 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di Conj-CD79b-2 a 280 nm mostra una purezza superiore al 98%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di Conj-CD79b-2 finale a 2,25 mg/ml in 5,9 ml, la massa ottenuta di ADC è di 13,3 mg (resa del 66%).

Conj-1C1-1

È stata aggiunta una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (80 equivalente molare/anticorpo, 75 micromoli, 1,5 ml a 50 mM) di una soluzione 26,4 ml di anticorpo 1C1 (140 mg, 0,93 micromoli) in tampone riducente

Marco Giovanni Mari
USBM-SP1-090

contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico 1 mM (EDTA) e una concentrazione finale di anticorpo di 5,0 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +25°C per 3,5 ore (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con un leggero scuotimento (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso centrifugazione con filtro da centrifuga vivaspin MWCO 50 KDa, in un tampone di riossidazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'eccesso di agente riducente. È stata aggiunta una soluzione da 50 mM di acido deidroascorbico (DHAA, 15 molare equivalente/anticorpo, 14 micromoli, 0,28 µl a 50 nM) in DMSO e la miscela di riossidazione è stata lasciata reagire per 16 ore a temperatura ambiente agitando delicatamente (60 rpm) a una concentrazione di anticorpi di ~ 3,0 mg/ml (o fino a quando l'UHPLC osserva una completa riossidazione dei tioli di cisteina per riformare i disolfuri di cisteina inter-catena). La miscela di riossidazione è stata centrifugata per 3 minuti a 4000 rpm e quindi filtrata sterile usando un filtro a membrana da 0,22 µM. Il composto 1 è stato aggiunto come soluzione DMSO (equivalente molare 10/anticorpo, 1,3 micromoli, in 0,6 ml di DMSO) a 6 ml di questa soluzione di anticorpo riossidato (20 mg, 0,133 micromoli) per una concentrazione finale DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 4 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil-cisteina (6,65 micromoli, 0,067 ml a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso tramite un filtro di rotazione usando vivaspin MWCO 50 kDa in un tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, il tampone è stato scambiato su istidina 25 mM, saccarosio 200 mM, pH 6,0. L'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a -78°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Coniugato a 214 nm e 1 nm (specifico per composto 1) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 1, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 1,86 molecole del Composto 1 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 µm 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di ADC a 280 nm mostra una purezza superiore al 98%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di ADC finale a 1,49 mg/ml in 8,0 ml, la massa ottenuta di ADC è di 11,9 mg (resa del 60%).

Conj-HER-1++ (DAR alto)

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Una soluzione 50 mM di ditiotreitolo (DTT) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) è stata aggiunta (100 equivalenti molari/anticorpo, 6,7 micromoli, 0,13 ml a 50 mM) a una soluzione da 5 ml di anticorpo (10 mg, 67 nanomoli) in tampone di riduzione contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 1 mM e una concentrazione di anticorpo finale di 2,0 mg/ml. La miscela risultante è stata incubata a +25°C per una notte (o fino alla completa riduzione osservata mediante UHPLC) in un agitatore orbitale con agitazione delicata (60 rpm). Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, l'anticorpo ridotto è stato sostituito con un tampone, attraverso centrifugazione con filtro da centrifuga vivaspin MWCO 50 KDa, in un tampone di coniugazione contenente PBS pH 7,4 e EDTA 1 mM per rimuovere tutto l'eccesso di agente riducente. Il composto 1 è stato aggiunto come soluzione di DMSO (20 equivalenti molari/anticorpo, 1,34 micromoli, in 0,4 ml di DMSO) a 4,0 ml di questa soluzione anticorpale ridotta (10 mg, 67 nanomoli) per una concentrazione finale di DMSO del 10% (v/v). La soluzione è stata agitata per 1 ora a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con un eccesso di N-acetil cisteina (6,7 micromoli, 67 µl a 100 mM).

L'ADC risultante è stato purificato *tramite* una colonna di esclusione dimensionale preparativa (GE Sephadex 26/60) montata su uno strumento AKTA Start usando tampone PBS, pH 7,4. Le frazioni sono state raccolte e analizzate per il contenuto monomero usando il sistema Shimadzu Prominence usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 × 150 mm (con una colonna di guardia

da 4 μm 3,0 x 20 mm) eluendo con 0,3 ml/minuto di tampone SEC filtrato a sterilità contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) a 280 nm. Le frazioni con contenuto di monomero >92% sono state raggruppate e quindi concentrate usando vivaspin MWCO 50 kDa in un tampone contenente PBS pH 7,4. L'entità della rimozione del farmaco libero è stata monitorata mediante UHPLC-RP usando coniugato puro e dopo la rimozione completa del farmaco libero, l'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 μm in atmosfera sterile e quindi conservato a +4°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Coniugato a 214 nm e 1 nm (specifico per composto 1) mostra una miscela di catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 1, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 7,41 molecole del Composto 1 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μm 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 μm 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di ADC a 280 nm mostra una purezza del 95%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di

ADC finale a 1,44 mg/ml in 4,5 ml, la massa ottenuta di ADC è di 6,5 mg (resa del 65%).

Conj-HER-1+ (DAR medio)

È stata aggiunta una soluzione 10 mM di tris(2-carbossietil)-fosfina (TCEP) in soluzione salina tamponata con fosfato pH 7,4 (PBS) (2 molar equivalenti/anticorpo, 0,134 micromoli, 13,3 µl a 10 mM) a una soluzione di 4 ml di anticorpo (10 mg, 67 nanomoli) in tampone di riduzione contenente PBS e acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 1 mM e una concentrazione di anticorpo finale di 2,5 mg/ml. La miscela di riduzione è stata riscaldata a +37°C per 2 ore in un agitatore orbitale con agitazione delicata (60 rpm). Il composto 1 è stato aggiunto come soluzione di DMSO (15 equivalenti molar/anticorpo, 1,0 micromoli, 0,1 ml di 10 mM in 0,3 ml di DMSO) e la miscela risultante è stata agitata per 1,5 ore a +25°C e quindi la coniugazione è stata estinta con N-acetil cisteina (5 micromoli, 50 µl a 100 mM).

Il farmaco libero in eccesso è stato rimosso tramite un filtro di rotazione usando vivaspin MWCO 50 kDa in un tampone contenente PBS pH 7,4. Il grado di rimozione di farmaco libero è stato monitorato mediante UHPLC-RP usando un coniugato pulito. Dopo la completa rimozione del farmaco libero, l'ADC è stato filtrato usando un filtro Mustang da 0,22 µm in atmosfera sterile e quindi conservato a +4°C.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Phenomenex Aeris 3.6u XB-C18 150 x 2,1 mm eluendo con un gradiente di acqua e acetonitrile su un campione ridotto di Coniugato a 214 nm e 330 nm (specifico per composto 1) mostra una miscela di

catene leggere e pesanti fissate a svariate molecole del Composto 1, coerente con un rapporto farmaco-anticorpo (DAR) di 4,2 molecole del Composto 1 per anticorpo.

L'analisi UHPLC su un sistema di Prominence Shimadzu usando una colonna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μ m 4,6 x 150 mm (con una colonna di protezione 4 μ m 3,0 x 20 mm) eluendo con tampone SEC sterilizzato mediante filtrazione 0,3 ml/minuto contenente fosfato di potassio 200 mM pH 6,95, cloruro di potassio 250 mM e 10% di isopropanolo (v/v) su un campione di ADC a 280 nm mostra una purezza superiore al 99%. L'analisi SEC UHPLC fornisce una concentrazione di ADC finale a 2,05 mg/ml in 3,6 ml, la massa ottenuta di ADC è di 7,36 mg (resa del 74%).

Esempio 7 - Analisi in vitro

Metodo di citotossicità MTS

La concentrazione e la vitalità delle cellule da una fiasca T75 sub-confluente (80-90% di confluenza) sono misurate mediante colorazione con tripan blu e contate usando il contatore di cellule automatizzato LUNA-II™. Le cellule sono state diluite a 2×10^5 /ml, dispensate (50 μ l per pozzetto) in piastre a fondo piatto da 96 pozzetti.

Una soluzione stock (1 ml) di coniugato farmaco-anticorpo (ADC) (20 μ g/ml) da testare è stata preparata diluendo l'ADC sterilizzato con filtro in terreno di coltura cellulare. Un insieme di 8x diluizioni di 10 volte di ADC di insieme è stata realizzata in una piastra da 24 pozzetti mediante trasferimento seriale di 100 μ l in

900 μ l di terreno di coltura cellulare. La diluizione dell'ADC è stata distribuita (50 μ l per pozzetto) in 4 pozzetti replicati della piastra a 96 pozzetti, contenente 50 μ l di sospensione cellulare seminata in precedenza. I pozzetti di controllo hanno ricevuto 50 μ l di terreno di coltura cellulare. La piastra da 96 pozzetti contenente cellule e ADC è stata incubata a 37°C in un'incubatrice gassata con CO₂ per il tempo di esposizione.

Alla fine del periodo di incubazione, la vitalità cellulare è stata misurata mediante saggio MTS. MTS (Promega) è stato distribuito (20 μ l per pozzetto) in ciascun pozzetto e incubato per 4 ore a 37°C nell'incubatore gassato con CO₂. L'assorbanza di pozzetto è stata misurata a 490 nm. La sopravvivenza percentuale delle cellule è stata calcolata dall'assorbanza media nei 4 pozzetti trattati con ADC rispetto all'assorbanza media nei 4 pozzetti non trattati (100%). IC₅₀ è stata determinata dai dati dose-risposta usando GraphPad Prism usando l'algoritmo di adattamento della curva non lineare: curva dose-risposta sigmoidale con pendenza variabile.

I tempi di incubazione dell'ADC erano di 4 giorni con SK-BR-3, MDA-MB-468, WSU-DLCL2 e SU-DHL-4, 5 giorni per Granta-519, 6 giorni per BJAB e 7 giorni per NCI-N87. MDA-MB-468, NCI-N87, WSU-DLCL2 e SU-DHL-4 sono state coltivate in RPMI 1640 con Glutamax + 10% (v/v) di siero fetale bovino HyClone™, Granta-519 in DMEM + Glutamax con 10% (v/v) di siero fetale bovino HyClone™, SK-BR-3 in McCoys 5A con 10% (v/v) di siero fetale bovino HyClone™ e BJAB in RPMI 1640 + Glutamax con 20% (v/v) di siero fetale bovino HyClone™.

Metodo di citotossicità CellTiter-Glo

La concentrazione e la vitalità delle cellule da una fiasca T75 sub-confluente (80-90% di confluenza) sono misurate mediante colorazione con tripan blu e contate usando il contatore di cellule automatizzato LUNA-II™. Le cellule sono state diluite e piastrate a 1500 cellule per pozzetto (50 µl di sospensione per pozzetto) in piastre bianche a fondo piatto da 96 pozzetti.

Una soluzione stock (1 ml) di coniugato farmaco anticorpo (ADC) da testare (20 µg per ml) è stata preparata mediante diluizione di ADC sterilizzato con filtro in un terreno di coltura cellulare. Un insieme di 8x diluizioni di 10 volte di ADC di insieme è stata realizzata in una piastra da 24 pozzetti mediante trasferimento seriale di 100 µl in 900 µl di terreno di coltura cellulare. La diluizione dell'ADC è stata distribuita (50 µl per pozzetto) in 4 pozzetti replicati della piastra a 96 pozzetti, contenente 50 µl di sospensione cellulare seminata in precedenza. I pozzetti di controllo hanno ricevuto 50 µl di terreno di coltura cellulare. La piastra da 96 pozzetti contenente cellule e ADC è stata incubata a 37°C in un'incubatrice gassata con CO₂ per il tempo di esposizione.

Alla fine del periodo di incubazione, la vitalità cellulare è stata misurata mediante saggio CellTiter-Glo. CellTiter-Glo (Promega) è stato dispensato a 100 µl per pozzetto e agitato per 2 minuti prima della stabilizzazione di 10 minuti a temperatura ambiente. È stata letta la luminescenza di ciascun pozzetto. La sopravvivenza percentuale delle cellule è stata calcolata dall'assorbanza media nei

4 pozzetti trattati con ADC rispetto all'assorbanza media nei 4 pozzetti non trattati (100%). IC₅₀ è stata determinata dai dati dose-risposta usando GraphPad Prism usando l'algoritmo di adattamento della curva non lineare: curva dose-risposta sigmoidale con pendenza variabile.

Il tempo di incubazione dell'ADC per PC-3 è di 6 giorni. PC-3 sono state coltivate in RPMI 1640 con Glutamax + 10% (v/v) di siero fetale bovino HyClone™.

Risultati

EC ₅₀ (µg/mL)	SU-DHL-4	GRANTA-519	BJAB	WSU-DLCL2
Conj-CD79b-1	1.216	49.69	0.2211	>100
Conj-CD79b-2	0.4781	0.1124	0.005712	0.7559
Conj-R347-2	>10			

Le linee cellulari SU-DHL-4, GRANTA519, BJAB e WSU-DL-CL2 esprimono tutte CD79b.

EC ₅₀ (µg/mL)	SK-BR-3	NCI-N87	MDA-MB-468
Conj-Her-1	0.06953	0.9677	3.492
Conj-Her-3	0.0175	0.02502	2.322
Conj-HER-2	0.07427	0.08078	0.9533
Conj-HER-1++		0,1108	12.18
Conj-HER-1+		0.3226	>10

Le linee cellulari SK-BR-3 e NCI-N87 esprimono Her2. La linea cellulare MDA-MB-468 non esprime HER2.

EC ₅₀ (µg/mL)	PC-3
Conj-1C1-1	0.5408
Conj-R347-1	>100

Esempio 8 - Saggi in vivo

(i) Daudi

Coniugati testati: Conj-HLL2-1; Conj-HLL2-2; Conj-HLL2-3

A topi femmine CB.17 SCID, di età di dieci settimane, sono stati iniettati 0,1 ml di 1×10^7 cellule Daudi per via sottocutanea nel fianco destro. Quando i tumori hanno raggiunto una dimensione media

di 100-150 mm³, il trattamento iniziava. Gli animali venivano pesati due volte a settimana. La dimensione del tumore è stata misurata due volte a settimana. Gli animali sono stati monitorati individualmente. Il punto finale dell'esperimento era un volume tumorale di 1500 mm³ o 60 giorni, a seconda dell'evento che si è verificato per primo.

A gruppi di 10 topi xenotrapianti sono stati iniettati iv 0,2 ml per 20 g di peso corporeo di coniugato farmaco-anticorpo (ADC) in soluzione salina tamponata con fosfato (veicolo) o 0,2 ml per 20 g di peso corporeo del solo veicolo.

La concentrazione di ADC è stata aggiustata per fornire le seguenti dosi:

Coniugato	Dosi (mg ADC/kg peso corporeo)
Conj-HLL2-1	0.6 o 1.8
Conj-HLL2-2	0.3 o 1
Conj-HLL2-3	0.1 o 0.3

Tutti i regimi sono stati tollerati in modo accettabile con una piccola perdita di peso corporeo.

Conj-HLL2-1: Il tempo mediano al punto finale (TTE) per i controlli trattati con veicolo era di 27,8 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 32,2 giorni (116%) per lo studio di 60 giorni. Un decesso non correlato al trattamento è stato registrato al giorno 28 e questo animale è stato escluso dall'analisi.

Il regime di 0,6 mg/kg ha determinato un TGD di 48,1 giorni (73%), che era statisticamente significativo dai controlli ($p < 0,001$). Inoltre, questo regime ha avuto cinque delle nove risposte di regressione 59 costituite da due regressioni parziali e tre complete.

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Sei animali hanno raggiunto il punto finale di 1500 mm³, lasciando 3 sopravvissuti dopo 60 giorni. I tre sopravvissuti avevano un volume tumorale medio di 221 mm³. Si è verificato un decesso non correlato al trattamento e questo animale è stato escluso dall'analisi.

Il regime di 1,8 mg/kg ha prodotto il TGD massimo possibile e significativo (rispetto ai controlli, $p < 0,001$), ha avuto otto su dieci sopravvissuti a 60 giorni e ha prodotto un beneficio in termini di sopravvivenza che era statisticamente significativamente differente dai controlli trattati con veicolo ($p < 0,001$). Otto animali hanno mostrato risposte di regressione completa. Cinque di questi animali erano liberi da tumore dopo 60 giorni.

Entrambi i regimi di trattamento hanno prodotto benefici di sopravvivenza statisticamente significativi rispetto al controllo ($p < 0,001$ sia per 0,6 sia per 1,8 mg/ml).

Conj-HLL2-2: Il tempo mediano al punto finale (TTE) per i controlli trattati con veicolo era di 27,8 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 32,2 giorni (116%) per lo studio di 60 giorni.

I regimi di 0,3 e 1 mg/kg hanno entrambi portato a TGD massimi ottenibili (32,2 giorni, 116%). Entrambi questi risultati erano statisticamente significativi dai controlli ($p < 0,001$ per ciascun regime).

L'ottanta per cento degli animali trattati con 0,3 mg/kg ha mostrato risposte di regressione costituite da due risposte parziali e sei risposte complete, quattro delle quali sono rimaste libere da

tumore alla fine dello studio. Quattro animali trattati con 0,3 mg/kg hanno raggiunto il punto finale di volume tumorale lasciando sei sopravvissuti allo studio liberi da tumore alla fine dello studio.

Il cento per cento degli animali trattati con 1 mg/kg ha mostrato risposte di regressione e tutti gli animali erano privi di tumore al giorno 60.

Entrambi i regimi di trattamento hanno determinato differenze significative di sopravvivenza globale rispetto ai controlli (controlli rispetto a 0,3 o 1 mg/kg, $p < 0,0001$).

Conj-HLL2-3: Il tempo mediano al punto finale (TTE) per i controlli trattati con veicolo era di 27,8 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 32,2 giorni (116%) per lo studio di 60 giorni.

I regimi da 0,1 e 0,3 mg/kg hanno determinato TGD di 12,9 giorni (46%) e 24,6 giorni (88%). Entrambi questi risultati erano statisticamente significativi dai controlli ($p < 0,001$ per ciascun regime).

Sono state osservate risposte di regressione del trenta per cento negli animali trattati con il regime di 0,1 mg/ml con tre risposte parziali. Tutti gli animali di questo gruppo hanno raggiunto il punto finale del volume tumorale entro il giorno 60.

Il settanta per cento degli animali trattati con 0,3 mg/kg ha mostrato risposte di regressione costituite da tre risposte parziali e quattro risposte complete, una delle quali è rimasta esente da tumore alla fine dello studio. Quattro animali trattati con 0,3 mg/kg

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

hanno raggiunto il punto finale di volume tumorale lasciando sei sopravvissuti allo studio liberi da tumore alla fine dello studio. Sette animali in questo gruppo hanno raggiunto il punto finale del volume tumorale lasciando tre sopravvissuti a 60 giorni con un MTV di 750 mm³ alla fine dello studio.

Entrambi i regimi di trattamento hanno determinato differenze significative di sopravvivenza globale rispetto ai controlli (controlli rispetto a 0,1 o 0,13 mg/kg, $p < 0,0001$).

(ii) JIMT-1

Coniugato testato: Conj-Her-3

A topi SCID femmina CB.17, di età compresa tra 10 settimane, sono stati iniettati 0,1 ml di 1×10^7 cellule JIMT-1 in Matrigel al 50% per via sottocutanea nel fianco destro. Quando i tumori hanno raggiunto una dimensione media di 100-150 mm³, il trattamento iniziava. Gli animali venivano pesati due volte a settimana. La dimensione del tumore è stata misurata due volte a settimana. Gli animali sono stati monitorati individualmente. Il punto finale dell'esperimento era un volume tumorale di 1000 mm³ o 59 giorni, a seconda dell'evento che si è verificato per primo.

A gruppi di 10 topi xenotrapianti sono stati iniettati iv 0,2 ml per 20 g di peso corporeo di coniugato farmaco-anticorpo (ADC) in soluzione salina tamponata con fosfato (veicolo) o 0,2 ml per 20 g di peso corporeo del solo veicolo. La concentrazione di ADC è stata regolata per dare 1 o 3 mg di ADC/kg di peso corporeo in una singola dose.

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

Tutti i regimi sono stati tollerati in modo accettabile con una piccola perdita di peso corporeo. Il tempo mediano al punto finale (TTE) per i controlli trattati con veicolo è stato di 48,4 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 10,6 giorni (22%) per lo studio di 59 giorni.

È stato osservato un effetto dipendente dalla dose in cui negli animali che hanno ricevuto la dose di 1 mg/kg il volume tumorale mediano è rimasto statico fino al giorno 34, per quindi progredire successivamente, mentre per gli animali trattati con 3 mg/kg si è verificata una piccola riduzione della dimensione tumorale a un MTV di 81 mm³. Entrambi i regimi di dosaggio hanno determinato un TGD massimo di 10,6 giorni (22%) rispetto al gruppo di controllo ($p < 0,001$ per entrambi i gruppi trattati).

Il regime di 1 mg/kg ha portato a nove sopravvissuti allo studio con un MTV di 650 mm³ e nessuna risposta obiettiva di regressione.

Il regime di 3 mg/kg ha portato a nove sopravvissuti allo studio con il 20% di risposte obiettive di regressione costituite da due risposte parziali. L'MTV dei sopravvissuti allo studio era di 108 mm³. I regimi di trattamento non erano significativamente differenti l'uno dall'altro ($p > 0,05$).

Entrambi i regimi di trattamento hanno determinato differenze significative di sopravvivenza globale rispetto ai controlli (controlli rispetto a 1 o 3 mg/kg, $p < 0,0001$).

(iii) NCI-N87

Coniugato testato: Conj-Her-3

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

A topi femmine CB.17 SCID, di età di dieci settimane, sono stati iniettati 0,1 ml di 1×10^7 cellule NCI-N87 in 50% di Matrigel per via sottocutanea nel fianco destro. Quando i tumori hanno raggiunto una dimensione media di 100-150 mm³, il trattamento iniziava. Gli animali venivano pesati due volte a settimana. La dimensione del tumore è stata misurata due volte a settimana. Gli animali sono stati monitorati individualmente. Il punto finale dell'esperimento era un volume tumorale di 800 mm³ o 81 giorni, a seconda dell'evento che si è verificato per primo.

A gruppi di 10 topi xenotrapianti sono stati iniettati iv 0,2 ml per 20 g di peso corporeo di coniugato farmaco-anticorpo (ADC) in soluzione salina tamponata con fosfato (veicolo) o 0,2 ml per 20 g di peso corporeo del solo veicolo. La concentrazione di ADC è stata regolata per dare 0,3 o 1 mg di ADC/kg di peso corporeo in una singola dose.

Tutti i regimi sono stati tollerati in modo accettabile con una piccola perdita di peso corporeo. Sei su dieci tumori di controllo hanno raggiunto 800 mm³, con un tempo ai punti finali (TTE) compreso tra 36,8 e 81,0 giorni. Il tempo al punto finale (TTE) mediano per i controlli trattati con il veicolo era di 77 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 4 giorni (5%) per lo studio di 81 giorni. Quattro animali di controllo sono sopravvissuti con un volume tumorale mediano (MTV) di 696 mm³.

I regimi di 0,3 e 1 mg/kg hanno portato a TGD rispettivamente di 0,5 (1%) e 4,0 giorni (5%). Entrambi questi risultati non erano

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

statisticamente significativi dai controlli, non l'uno con l'altro ($p > 0,05$). Non sono state registrate regressioni oggettive in nessuno dei due gruppi. Cinque animali trattati con 0,3 mg/kg e sette animali trattati con 1 mg/kg sono sopravvissuti con MTV di 550 mm³ in entrambi i gruppi.

Nessuno dei due regimi di trattamento ha comportato benefici di sopravvivenza statisticamente significativi rispetto al controllo ($p > 0,05$ per entrambi i gruppi di trattamento) e non vi era alcuna differenza significativa tra i gruppi di trattamento ($p > 0,05$).

(iv) NCI-N87

Coniugati testati: Conj-Her-1, Conj-Her-3

A topi SCID femmina CB.17, di età compresa tra otto settimane, sono stati iniettati 0,1 ml di 1×10^7 cellule NCI-N87 in Matrigel al 50% per via sottocutanea nel fianco destro. Quando i tumori hanno raggiunto una dimensione media di 100-150 mm³, il trattamento iniziava. Gli animali venivano pesati due volte a settimana. La dimensione del tumore è stata misurata due volte a settimana. Gli animali sono stati monitorati individualmente. Il punto finale dell'esperimento era un volume tumorale di 800 mm³ o 78 giorni, a seconda dell'evento che si è verificato per primo.

A gruppi di 10 topi xenotrapianti sono stati iniettati iv 0,2 ml per 20 g di peso corporeo di coniugato farmaco-anticorpo (ADC) in soluzione salina tamponata con fosfato (veicolo) o 0,2 ml per 20 g di peso corporeo del solo veicolo.

La concentrazione di ADC è stata aggiustata per fornire le seguenti dosi:

Coniugato	Dosi (mg ADC/kg peso corporeo)
Conj-Her-1	1, 3 o 6
Conj-Her-3	0,3, 1 e 3.

Tutti i regimi sono stati tollerati in modo accettabile con una piccola perdita di peso corporeo.

Conj-Her-1: Il tempo al punto finale (TTE) mediano per i controlli trattati con il veicolo era di 42 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 36 giorni (86%) per lo studio di 60 giorni.

I regimi di 0,6 e 1 mg/kg hanno portato a TGD rispettivamente di 9,9 (24%) e 11,6 giorni (28%). Nessuno di questi risultati era statisticamente significativo dai controlli ($p > 0,05$). Tutti gli animali in entrambi i gruppi hanno raggiunto il punto finale di 800 mm³.

Il regime di 6 mg/kg ha prodotto il TGD massimo possibile e significativo (rispetto ai controlli, $p < 0,001$), ha avuto otto su dieci sopravvissuti a 60 giorni e ha prodotto un beneficio in termini di sopravvivenza che era statisticamente significativamente differente dai controlli trattati con veicolo ($p < 0,0001$). Un animale ha raggiunto il punto finale di 800 mm³ al giorno 78, lasciando nove sopravvissuti con volumi tumorali medi di 550 mm³.

Non sono state osservate risposte di regressione con regimi di 1, 3 o 6 mg/kg.

Conj-Her-3 Il tempo mediano al punto finale (TTE) per i controlli trattati con veicolo è stato di 42,0 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 36,0 giorni (86%) per lo studio di 78 giorni.

I TGD per 0,3, 1 e 3 mg/kg erano rispettivamente di 15,1 (36%), 30,6 (73%) e 36,0 (86%) giorni. Vi erano differenze significative per 1 e 3 mg/kg rispetto ai controlli ($p < 0,001$ per entrambi i gruppi di trattamento, ma non 0,3 mg/kg ($p > 0,05$)). Non sono state osservate risposte di regressione negli animali trattati con 0,3 e 1 mg/kg di ADC. Sono state osservate risposte di regressione del novanta per cento negli animali trattati con 3 mg/kg. Ciò consisteva in otto risposte parziali e una risposta completa, che è rimasta libera da tumore alla fine dello studio. Tutti gli animali trattati con 0,3 mg/kg hanno raggiunto il punto finale di 800 mm³. Cinque animali trattati con 1 mg/kg hanno raggiunto il punto finale lasciando cinque sopravvissuti a 78 giorni. Questi avevano un MTV di 486 mm³. Tutti i dieci animali trattati con 3 mg/kg sono sopravvissuti allo studio con un MTV di 63 mm³.

I regimi da 1 e 3 mg/kg hanno determinato differenze di sopravvivenza significative rispetto ai controlli ($p < 0,001$ per entrambi i gruppi di trattamento). Il gruppo di trattamento con 0,3 mg/kg non era statisticamente significativo dal controllo ($p > 0,05$). Sia il trattamento con 1 che 3 mg/kg erano significativamente differenti dal gruppo con 0,3 mg/kg ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$ rispettivamente).

(v) NCI-N87

Coniugato testato: Conj-Her-2

A topi femmine CB.17 SCID, di età di otto settimane, sono stati iniettati 0,1 ml di 1×10^7 cellule NCI-N87 in 50% di Matrigel per via sottocutanea nel fianco destro. Quando i tumori hanno raggiunto una dimensione media di 100-150 mm³, il trattamento iniziava. Gli animali venivano pesati due volte a settimana. La dimensione del tumore è stata misurata due volte a settimana. Gli animali sono stati monitorati individualmente. Il punto finale dell'esperimento era un volume tumorale di 800 mm³ o 79 giorni, a seconda dell'evento che si è verificato per primo.

A gruppi di 10 topi xenotrapianti sono stati iniettati iv 0,2 ml per 20 g di peso corporeo di coniugato farmaco-anticorpo (ADC) in soluzione salina tamponata con fosfato (veicolo) o 0,2 ml per 20 g di peso corporeo del solo veicolo. La concentrazione di ADC è stata regolata per dare 1 o 2 mg di ADC/kg di peso corporeo in una singola dose.

Tutti i regimi sono stati tollerati in modo accettabile con una piccola perdita di peso corporeo. Il tempo mediano al punto finale (TTE) per i controlli trattati con veicolo è stato di 49,6 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 29,4 giorni (59%) per lo studio di 79 giorni.

I regimi da 1 e 2 mg/kg hanno portato a TGD rispettivamente di 7,6 (15%) e 23,6 giorni (48%). Entrambi questi risultati erano

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

statisticamente significativi dai controlli ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ rispettivamente).

Otto animali trattati con il regime di 1 mg/kg hanno raggiunto il punto finale di 800 mm³ lasciando due sopravvissuti a 79 giorni con un MTV di 694 mm³. Sette animali nel gruppo trattato con 2 mg/ml hanno raggiunto il punto finale del volume tumorale entro il giorno 79, lasciando tre sopravvissuti alla fine dello studio con un MTV di 600 mm³.

Entrambi i regimi di trattamento hanno determinato differenze significative di sopravvivenza globale rispetto ai controlli (controlli rispetto a 1 mg/kg, $p < 0,05$; controlli rispetto a 2 mg/kg, $p < 0,001$).

Le risposte di regressione non sono state registrate con nessuno dei due regimi.

(vi) NCI-N87

Coniugati testati: Conj-Her-1, Conj-Her-1++

A topi SCID femmina CB.17, di età compresa tra otto settimane, sono stati iniettati 0,1 ml di 1×10^7 cellule NCI-N87 in Matrigel al 50% per via sottocutanea nel fianco destro. Quando i tumori hanno raggiunto una dimensione media di 100-150 mm³, il trattamento iniziava. Gli animali venivano pesati due volte a settimana. La dimensione del tumore è stata misurata due volte a settimana. Gli animali sono stati monitorati individualmente. Il punto finale dell'esperimento era un volume tumorale di 800 mm³ o 81 giorni, a seconda dell'evento che si è verificato per primo.

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

A gruppi di 10 topi xenotrapianti sono stati iniettati iv 0,2 ml per 20 g di peso corporeo di coniugato farmaco-anticorpo (ADC) in soluzione salina tamponata con fosfato (veicolo) o 0,2 ml per 20 g di peso corporeo del solo veicolo.

La concentrazione di ADC è stata aggiustata per fornire le seguenti dosi:

Coniugato	Dosi (mg ADC/kg di peso corporeo)
Conj-Her-1	6, 18, 6 (qwk × 3), 8 (qwk × 3)
Conj-Her-1++	6

Tutti i regimi sono stati tollerati in modo accettabile con una piccola perdita di peso corporeo.

Il tempo mediano al punto finale (TTE) per i controlli trattati con veicolo è stato di 40,2 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 40 giorni (86%) per lo studio di 80 giorni.

Conj-Her-1: I regimi a dose singola da 6 e 18 mg/kg hanno determinato i massimi ritardi di crescita tumorale possibili. Nel regime a dose singola di 6 mg/kg il volume tumorale medio per 5 topi era di 600 mm³, senza risposte di regressione osservabili. Nel regime a dose singola da 18 mg/kg vi erano dieci sopravvissuti con un volume tumorale medio di 36 mm³. Vi sono state 4 regressioni parziali e 6 regressioni complete.

I regimi di dosaggio tre settimanali di 6 e 8 mg/kg hanno anche determinato il massimo ritardo possibile nella crescita tumorale. Nel regime di tre dosi settimanali di 6 mg/kg, il volume tumorale medio per 9 topi alla fine dello studio era di 245 mm³, con due regressioni

parziali. Nel regime a tre dosi settimanali di 8 mg/kg vi erano dieci sopravvissuti con un volume tumorale medio di 92 mm³. Vi sono state 7 regressioni parziali, 3 regressioni complete e 2 sopravvissuti senza tumore.

Conj-Her-1++: Il regime a dose singola di 6 mg/kg ha determinato i massimi ritardi di crescita tumorale possibili. Vi erano dieci sopravvissuti con un volume tumorale medio di 161 mm³. Vi sono state 5 regressioni parziali, 5 regressioni complete e 2 sopravvissuti senza tumore.

(vii) NCI-N87

Coniugati testati: Coni-Her-1, Coni-Her1+, Coni-Her-1++

A topi SCID femmina CB.17, di età compresa tra otto settimane, sono stati iniettati 0,1 ml di 1×10^7 cellule NCI-N87 in Matrigel al 50% per via sottocutanea nel fianco destro. Quando i tumori hanno raggiunto una dimensione media di 100-150 mm³, il trattamento iniziava. Gli animali venivano pesati due volte a settimana. La dimensione del tumore è stata misurata due volte a settimana. Gli animali sono stati monitorati individualmente. Il punto finale dell'esperimento era un volume tumorale di 800 mm³ o 83 giorni, a seconda dell'evento che si è verificato per primo.

A gruppi di 10 topi xenotrapianti sono stati iniettati iv 0,2 ml per 20 g di peso corporeo di coniugato farmaco-anticorpo (ADC) in soluzione salina tamponata con fosfato (veicolo) o 0,2 ml per 20 g di peso corporeo del solo veicolo.

Marco Giovanni Mari
USBM-GPI-090

La concentrazione di ADC è stata aggiustata per fornire le seguenti dosi:

Coniugato	Dosi (mg ADC/kg di peso corporeo)
Conj-Her-1	6, 18
Conj-Her-1+	3, 6
Conj-Her-1++	1.5, 3

Tutti i regimi sono stati tollerati in modo accettabile con una piccola perdita di peso corporeo.

Il tempo mediano al punto finale (TTE) per i controlli trattati con veicolo è stato di 36,8 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 46,2 giorni (126%) per lo studio di 80 giorni.

Conj-Her-1: I regimi da 6 e 18 mg/kg hanno determinato ritardi nella crescita tumorale di 45,9 giorni (125%) e 46,2 giorni (126%). Nel regime di 6 mg/kg il volume tumorale medio per 4 topi era 564 mm³, senza risposte di regressione osservabili. Nel regime di 18 mg/kg vi erano nove sopravvissuti con un volume tumorale medio di 108 mm³. Vi sono state 9 regressioni parziali e 1 regressione completa.

Conj-Her-1++: Il regime di 1,5 e 3 mg/kg ha comportato ritardi nella crescita tumorale di 45,9 giorni (125%) e 46,2 giorni (126%). Nel regime di 1,5 mg/kg vi erano due sopravvissuti con un volume tumorale medio di 634 mm³. Nel regime di 3 mg/kg vi erano dieci sopravvissuti con un volume tumorale medio di 451 mm³.

Conj-Her-1+: I regimi di 3 e 6 mg/kg hanno determinato ritardi di crescita tumorale massimi di 46,2 giorni (126%). Nel regime di 3 mg/kg vi erano sette sopravvissuti con un volume tumorale medio di

600 mm³. Nel regime di 6 mg/kg vi erano dieci sopravvissuti con un volume tumorale medio di 256 mm³. Vi sono state due regressioni parziali.

(viii) JIMT1

Coniugati testati: Conj-Her-1, Conj-Her-1++

A topi SCID femmina CB.17, di età compresa tra otto settimane, sono stati iniettati 0,1 ml di 1×10^7 cellule JIMT1 in Matrigel al 50% per via sottocutanea nel fianco destro. Quando i tumori hanno raggiunto una dimensione media di 100-150 mm³, il trattamento iniziava. Gli animali venivano pesati due volte a settimana. La dimensione del tumore è stata misurata due volte a settimana. Gli animali sono stati monitorati individualmente. Il punto finale dell'esperimento era un volume tumorale di 1000 mm³ o 60 giorni, a seconda dell'evento che si è verificato per primo.

A gruppi di 10 topi xenotrapianti sono stati iniettati iv 0,2 ml per 20 g di peso corporeo di coniugato farmaco-anticorpo (ADC) in soluzione salina tamponata con fosfato (veicolo) o 0,2 ml per 20 g di peso corporeo del solo veicolo.

La concentrazione di ADC è stata aggiustata per fornire le seguenti dosi:

Coniugato	Dosi (mg ADC/kg di peso corporeo)
Conj-Her-1	18, 24
Conj-Her-1++	4, 6, 8

Tutti i regimi sono stati tollerati in modo accettabile con una piccola perdita di peso corporeo.

Il tempo mediano al punto finale (TTE) per i controlli trattati con veicolo era di 37,5 giorni, stabilendo un ritardo di crescita tumorale (TGD) massimo possibile di 22,5 giorni (60%) per lo studio di 60 giorni.

Conj-Her-1: I regimi da 18 e 24 mg/kg hanno determinato ritardi nella crescita tumorale di 5,3 giorni (14%) e 3,2 giorni (9%). Nel regime di 18 mg/kg tutti gli animali hanno raggiunto il punto finale di 1000 mm³. Nel regime di 24 mg/kg vi era un solo sopravvissuto con un volume tumorale di 968 mm³. Entrambi i regimi hanno determinato una differenza significativa di sopravvivenza globale rispetto ai controlli (P < 0,01).

Conj-Her-1++: Il regime di 4, 6 e 8 mg/kg ha comportato un ritardo della crescita tumorale di 4,4 giorni (12%), 6,9 giorni (18%) e 17,7 giorni (47%). Nel regime di 4 mg/kg tutti gli animali hanno raggiunto il punto finale di 1000 mm³. Nel regime di 6 mg/kg vi era un solo sopravvissuto con un volume tumorale di 650 mm³. Nel regime di 8 mg/kg vi era un solo sopravvissuto con un volume tumorale di 847 mm³. Tutti i regimi hanno determinato una differenza significativa di sopravvivenza globale rispetto ai controlli (P < 0,01).

Esempio 9 - Test tossicologico

È stato usato uno studio di tossicità non GLP a dose singola per determinare la dose massima tollerata (MTD) e il profilo di sicurezza degli ADC testati, che erano: Conj-R347-1; Conj-R347-2; Conj-R347-3.

Ratti maschi Sprague Dawley (Envigo, Inc) sono stati dosati una volta mediante iniezione endovenosa in bolo lenta attraverso la vena

della coda con ADC. Il veicolo per la diluizione usato era istidina-HCl 25 mM, 7% di saccarosio, 0,02% di polisorbato 80, pH 6,0. I parametri valutati durante lo studio includevano mortalità, esami fisici, osservazioni sulla gabbia, pesi corporei, variazioni del peso corporeo, patologia clinica (chimica clinica, ematologia e coagulazione) e risultati di patologia grossolana. Tutti gli animali sono stati uccisi il giorno di studio (SD) 29.

Conj-R347-1

Gruppo	Dose (mg/kg)	N
2	5	5
4	7	5
6	10	5
8	16	5
10	20	5
12	25	5

La tollerabilità è stata determinata in base ai punti finali di tossicità, incluse lievi diminuzioni dei parametri ematologici, valutazioni microscopiche e soppressione del midollo osseo. Sulla base dei cambiamenti microscopici negli animali che hanno ricevuto la dose più alta, la dose massima tollerata (MTD) nel ratto dopo una singola dose è stata determinata come 25 mg/kg.

Conj-R347-2

Gruppo	Dose (mg/kg)	N
2	2	5
3	5	5
4	8	5

La tollerabilità è stata determinata in base ai punti finali di tossicità. L'ADC è stato tollerato fino a 8 mg/kg nel ratto dopo una singola dose. I risultati includevano una diminuzione del peso corporeo dipendente dalla dose e la soppressione del midollo osseo.

Conj-R347-3

Gruppo	Dose (mg/kg)	N
5	1	5
9	2.5	5
11	4	5

La tollerabilità è stata determinata in base ai punti finali di tossicità. L'ADC è stato tollerato fino a 4 mg/kg nel ratto dopo una singola dose. I risultati includevano la perdita di peso corporeo dipendente dalla dose e la soppressione del midollo osseo.

Indice terapeutico

L'indice terapeutico di ciascun linker ADC/farmaco è stato calcolato usando la seguente equazione:

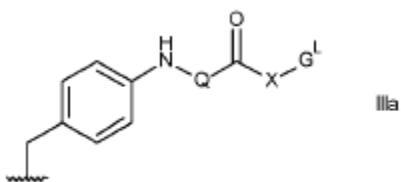
TI = MTD nel ratto (mg/kg)/MED nel modello di efficacia del topo (mg/kg)

Linker Farmaco	MTD (mg/kg)	NCI-N87 MED (mg/kg)	TI
1	25	6	4.2
2	8	2	4
3	4	1	4

* * * * *

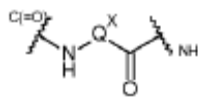
Marco Giovanni Mari
USBM-CP1-090

(iiia):



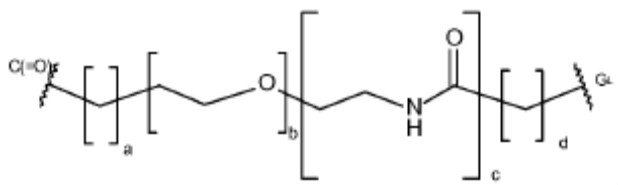
in cui

Q è:

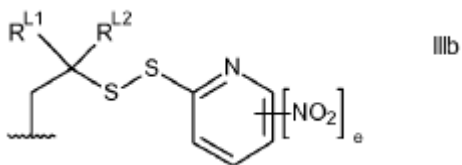


in cui Q^X è tale che Q è un residuo amminoacidico, un residuo dipeptidico o un residuo tripeptidico;

X è:



in cui $a =$ da 0 a 5, $b =$ da 0 a 16, $c = 0$ o 1, $d =$ da 0 a 5; G^L è un linker per la connessione a un'unità Ligando; e (iiib):



, in cui R^{L1} e R^{L2} sono selezionati indipendentemente da H e metile, oppure insieme all'atomo di carbonio a cui sono legati formano un gruppo ciclopropilene o ciclobutilene; ed e è 0 o 1;

o

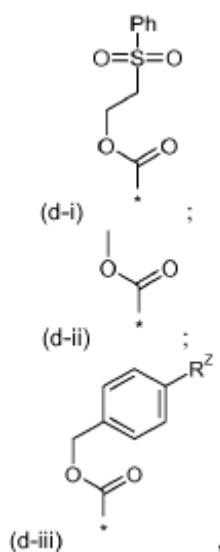
(a) R^{20} è H e R^{21} è OH o OR^A , in cui R^A è C_{1-4} alchile; o

(b) R^{20} e R^{21} formano un doppio legame azoto-carbonio tra l'azoto e gli atomi di carbonio a cui sono legati; o

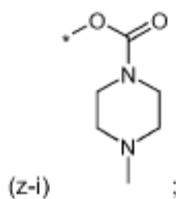
(c) R^{20} è H e R^{21} è SO_2M , in cui z è 2 o 3 e M è un catione monovalente farmaceuticamente accettabile; o

(d) R^{20} è H e R^{21} è H; o

(e) R^{21} è OH o OR^A , in cui R^A è C_{1-4} alchile e R^{20} è selezionato da:



in cui R^z è selezionato da:



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

(z-iii) NO_2 ;

(z-iv) OMe ;

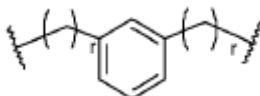
(z-v) glucoronide;

(z-vi) $-C(=O)-X_1-NHC(=O)X_2-NH-R^{ZC}$, in cui $-C(=O)-X_1-NH-$ e $-C(=O)-X_2-NH-$ rappresentano residui di amminoacidi naturali e R^{ZC} è selezionato da Me, OMe, OCH_2CH_2OMe .

2. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui sia Y sia Y' sono O e R'' è:

(a) C_{3-7} alchilene; o

(b) un gruppo di formula



in cui r è 1 o 2.

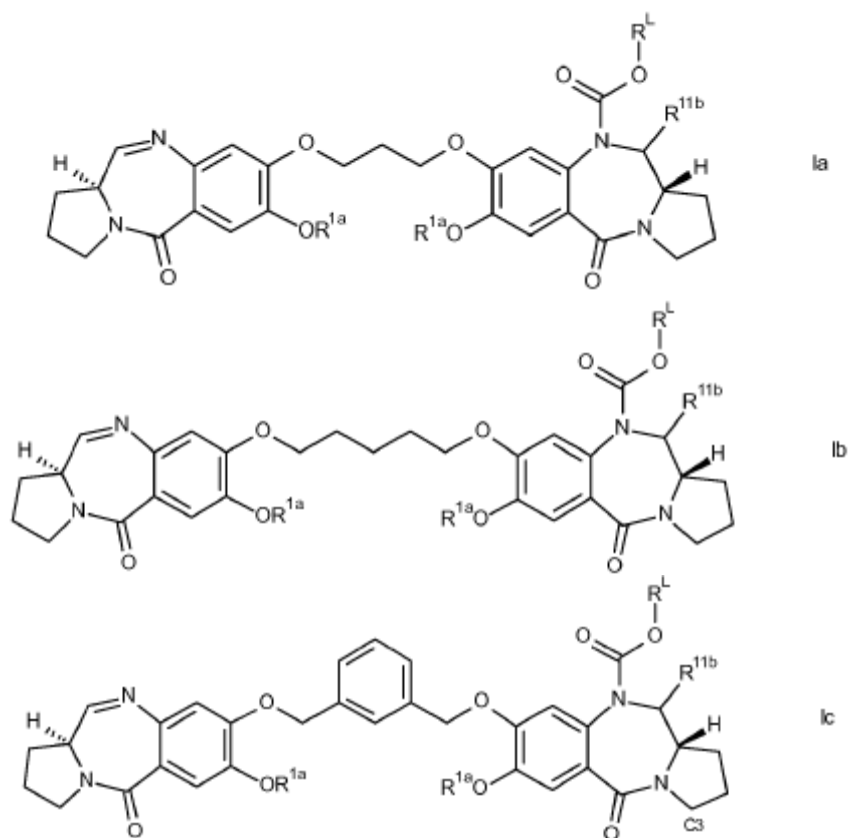
3. Composto secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui R^9 è H e R^6 è H.

4. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui R^7 è un gruppo C_{1-4} alchilossi.

5. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui $R^{6'}$ è lo stessogruppo di R^6 , $R^{7'}$ è lo stesso gruppo di R^7 , $R^{9'}$ è lo stesso gruppo di R^9 e Y' è lo stesso gruppo di Y.

6. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui R^{20} e R^{21} formano un doppio legame azoto-carbonio tra gli atomi di azoto e carbonio a cui sono legati.

7. Composto secondo la rivendicazione 1, che è di formula Ia, Ib o Ic:



in cui R^{1a} è selezionato da metile e benzile;

R^L e R^{11b} sono secondo la rivendicazione 1.

8. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui R^{11b} è OH.

9. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui R^L è di formula IIIa e Q è un residuo dipeptidico selezionato da:

CO-Phe-Lys-NH,

CO-Val-Ala-NH,

CO-Val-Lys-NH,

CO-Ala-Lys-NH,

CO-Val-Cit-NH,

CO-Phe-Cit-NH,

CO-Leu-Cit-NH,

CO-Ile-Cit-NH,

CO-Phe-Arg-NH, e

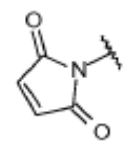
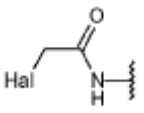
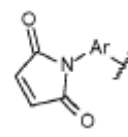
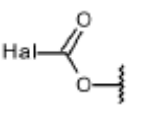
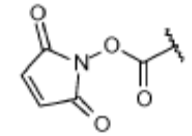
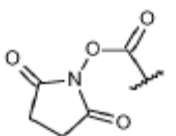
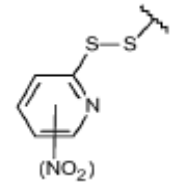

CO-Trp-Cit-NH.

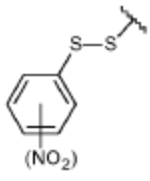

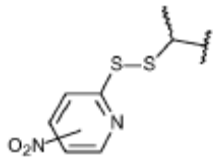

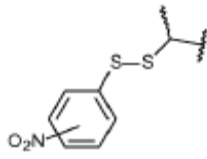
10. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui R^L è di formula IIIa e a è 0.

11. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui R^L è di formula IIIa e b è da 0 a 8.

12. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11, in cui R^L è di formula IIIa e d è 2.

13. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, in cui R^L è di formula IIIa e G^L è selezionato da:

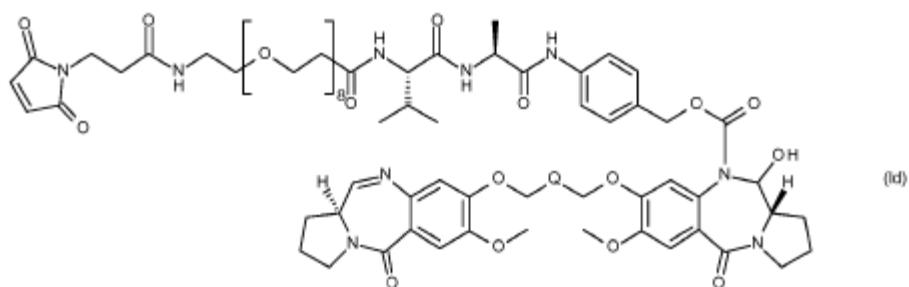
(G ^{L1-1})		(G ^{L4})	 In cui Hal = I, Br, Cl
(G ^{L1-2})		(G ^{L5})	
(G ^{L2})		(G ^{L6})	
(G ^{L3-1})	 in cui il gruppo NO ₂ è facoltativo	(G ^{L7})	

(G ^{L3-2})	 <p>in cui il gruppo NO₂ è facoltativo</p>	(G ^{L8})	
(G ^{L3-3})	 <p>in cui il gruppo NO₂ è facoltativo</p>	(G ^{L9})	
(G ^{L3-4})	 <p>in cui il gruppo NO₂ è facoltativo</p>		

in cui Ar rappresenta un gruppo C₅₋₆ arilene.

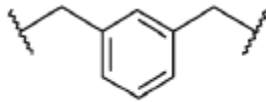
14. Composto secondo la rivendicazione 13, in cui G^L è G^{L1-1}.

15. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui il composto è di formula Id:



in cui Q è selezionato da:

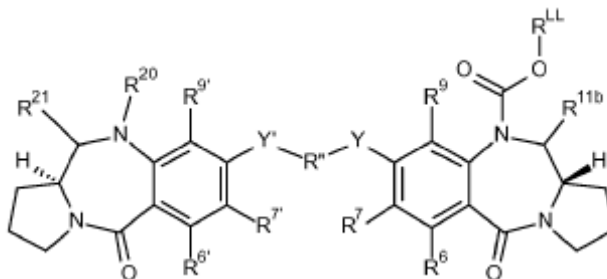
- (a) -CH₂-;
- (b) -C₃H₆-; e
- (c)



16. Coniugato di formula II:



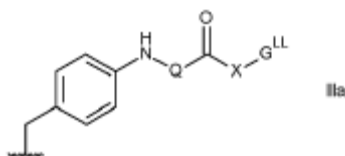
in cui L è un'unità Ligando, D^L è un'unità Linker di farmaco di formula I' :



in cui R^6 , R^7 , R^9 , R^{11b} , Y, R'' , Y' , $R^{6'}$, R^7 , $R^{9'}$, R^{20} e R^{21} , secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8;

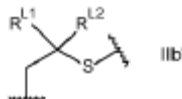
R^{LL} è un linker per la connessione a un agente legante cellule, selezionato tra:

(iiia):



in cui Q e X sono secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 e da 9 a 12 e G^{LL} è un linker connesso a un'unità Ligando; e

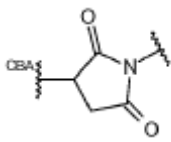
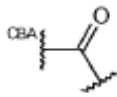
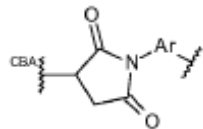
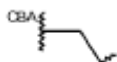
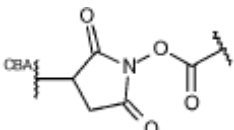
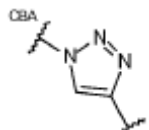
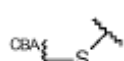
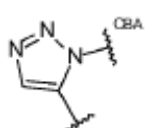
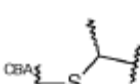
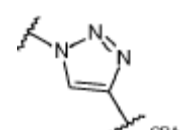
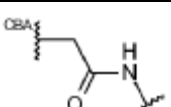
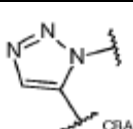
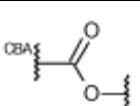
(iiib):



in cui R^{L1} e R^{L2} sono secondo la rivendicazione 1;

in cui p è un numero intero da 1 a 20.

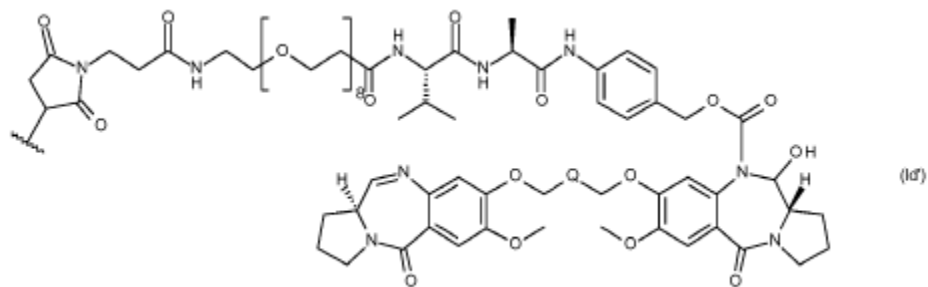
17. Coniugato secondo la rivendicazione 16, in cui G^{LL} è selezionato da:

(G^{LL1-1})		(G^{LL6})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL7})	
(G^{LL2})		(G^{LL8-1})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL8-2})	
(G^{LL3-2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL4})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL5})			

in cui Ar rappresenta un gruppo C_{5-6} arilene.

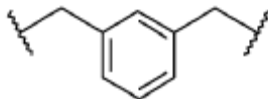
18. Coniugato secondo la rivendicazione 17, in cui G^{LL} è G^{LL1-1} .

19. Coniugato secondo la rivendicazione 16, in cui D^L è di formula (Id'):



in cui Q è selezionato da:

- (a) $-\text{CH}_2-$;
- (b) $-\text{C}_3\text{H}_6-$; e
- (c)



20. Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 16 a 19, in cui l'Unità Ligando è un anticorpo o un suo frammento attivo che si lega a uno o più antigeni associati a tumore o recettori della superficie cellulare selezionati da (1) fino a (88):

- (1) BMPR1B;
- (2) E16;
- (3) STEAP1;
- (4) 0772P;
- (5) MPF;
- (6) Napi3b;
- (7) Sema 5b;
- (8) PSCA hlg;
- (9) ETBR;
- (10) MSG783;
- (11) STEAP2;

- (12) TrpM4;
- (13) CRIPTO;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;
- (16) FcRH2;
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20R-alfa;
- (21) Brevican;
- (22) Efb2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R;
- (27) CD22;
- (28) CD79a;
- (29) CXCR5;
- (30) HLA-DOB;
- (31) P2X5;
- (32) CD72;
- (33) LY64;
- (34) FcRH1;
- (35) IRTA2;
- (36) TENB2;

- (37) PSMA - FOLH1;
- (38) SST;
- (38.1) SSTR2;
- (38.2) SSTR5;
- (38.3) SSTR1;
- (38.4) SSTR3;
- (38.5) SSTR4;
- (39) ITGAV;
- (40) ITGB6;
- (41) CEACAM5;
- (42) MET;
- (43) MUC1;
- (44) CA9;
- (45) EGFRvIII;
- (46) CD33;
- (47) CD19;
- (48) IL2RA;
- (49) AXL;
- (50) CD30 - TNFRSF8;
- (51) BCMA - TNFRSF17;
- (52) CT Ags - CTA;
- (53) CD174 (Lewis Y) - FUT3;
- (54) CLEC14A;
- (55) GRP78 - HSPA5;
- (56) CD70;

- (57) Antigeni specifici per cellule staminali;
- (58) ASG-5;
- (59) ENPP3;
- (60) PRR4;
- (61) GCC - GUCY2C;
- (62) Liv-1 - SLC39A6;
- (63) 5T4;
- (64) CD56 - NCMA1;
- (65) CanAg;
- (66) FOLR1;
- (67) GPNMB;
- (68) TIM-1 - HAVCR1;
- (69) RG-1/bersaglio di tumore alla prostata Mindin - Mindin/RG-
1;
- (70) B7-H4 - VTCN1;
- (71) PTK7;
- (72) CD37;
- (73) CD138 - SDC1;
- (74) CD74;
- (75) Claudine - CL;
- (76) EGFR;
- (77) Her3;
- (78) RON - MST1R;
- (79) EFA2;
- (80) CD20 - MS4A1;

(81) Tenascina C - TNC;

(82) FAP;

(83) DKK-1;

(84) CD52;

(85) CS1 - SLAMF7;

(86) Endogлина - ENG;

(87) Annessina A1 - ANXA1;

(88) V-CAM (CD106) - VCAM1.

21. Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 16 a 20, in cui p è un numero intero da 1 a 8.

22. Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 16 a 21, per l'uso in terapia.

23. Composizione farmaceutica comprendente il coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 16 a 21, e un diluente, carrier o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

24. Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 16 a 21 o la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 23, per l'uso nel trattamento di una malattia proliferativa in un soggetto.

25. Coniugato per l'uso secondo la rivendicazione 24, in cui la malattia trattata è un cancro.

Si certifica la conformità della traduzione.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090