بسم الله الرحمن الرحيم

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية KACST

المملكة العربية السعودية

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

إن المشرف العام على مكتب البراءات السعودي، وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/٢٧ وتاريخ ١٤٢٥/٠٥/٢٩هـ، واستناداً لأحكام اللائحة التنفيذية له الصادرة بالقرار الإداري رقم ٣٦٠٧٣٢٩-٢-١٦١ وتاريخ ١٤٣٦/١٢/٣٠ هـ، يقرر منح:

بيير فابر ميديكمينت

PIERRE FABRE MEDICAMENT

براءة اختراع رقم ٦٣٥١

بتاريخ ١٤٤٠/٠٦/٢٢هـ الموافق ٢٠١٩/٠٢/٢٧ م

عن الاختراع المسمى/ مترافق من جسم مضاد- عقار يرتبط بـ IGF-1R واستخدامه لعلاج السرطان

IGF-1R antibody-drug-conjugate and its use for the treatment of cancer

ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق التي يمنحها النظام في المملكة العربية السعودية.

المشرف العام على مكتب البراءات السعودي

م. صقر بن ناصر الفطيماني

[19] **المملكة العربية السعودية** SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] **رقم البراءة:** ٦٣٥١
[45] **تاريخ المنح:** ١٤٤٠/٠٦/٢٢ هـ
الموافـــق: ٢٠١٩/٠٢/٢٧ م

[12] براءة اختراع

[72] **اســم المخــترع:** إيــان ريــلات، ميشــيل بيريــز، لــيلان جوتســتش، مــاثيو بروســاس، شــارلوت بيــو -لارفــور، جان - فرانسوا هايو، تييري تشامبيون، ألاين روبيرت

[73] **مالك البراءة :** بيير فابر ميديكمينت
عنوانه: ٤٥ بلاس ابل جانسي، ٩٢١٠٠ ولونجني بيلانسورت، فرنسا
جنسيته: فرنسية

[74] **الوكيل:** مكتب المحامي سليمان ابراهيم العمار

[21] **رقم الطلب:** ٥١٦٣٨٠١٢٠

[22] **تاريخ دخول المرحلة الوطنية:** ١٤٣٨/٠١/٢٢ هـ
الموافق : ٢٠١٦/١٠/٢٣ م
تاريخ الإيداع للطلب الدولي: ٢٠١٥/٠٤/٢٧ م

[86] **رقم الطلب الدولي:** PCT/EP2015/059045
[87] **رقم النشر الدولي:** WO/2015/162291
تاريخ النشر الدولي: ٢٠١٥/١٠/٢٩ م

[30] **بيانات الأسبقية:**

EP	١٤٣٠٥٦٢٠.٨	٢٠١٤/٠٤/٢٥م

[51] **التصنيف الدولي** (IPC[8]) :
A61K 047/050, A61P 035/000, A61K 047/048

[56] **المراجع:**

1-DORONINA S O ET AL, "Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 21, no. 7, doi:10.1038/NBT832, ISSN 1087-0156, pages 778 - 784, XP002280966

WO	٢٠١٢١٤٢١٦٤	٢٠١٢/١٠/١٨ م

اسم الفاحص: هند مصلح المطيري

[54] **اسم الاختراع:** مترافق من جسم مضاد - عقار يرتبط بـ IGF-1R واستخدامه لعلاج السرطان

IGF-1R antibody-drug-conjugate and its use for the treatment of cancer

[57] **الملخص:** يتعلق الاختراع الحالي بمترافق جسم مضاد عقار قادر على ربط IGF-1R. في أحد الجوانب، يتعلق الاختراع بمترافق جسم مضاد -عقار يشتمل على جسم مضاد قادر على الارتباط بـ IGF-1R، ويترافق الجسم المضاد المذكور مع عقار واحد على الأقل مختار من مشتقات دولاستاتين ١٠ ومركبات أوريستاتين. يشتمل الاختراع أيضًا على طريقة لعلاج واستخدام مترافق الجسم المضاد -العقار المذكور لعلاج السرطان.

عدد عناصر الحماية (٢٥)، عدد الأشكال (٢٩)

مترافق من جسم مضاد- عقار يرتبط بـ IGF-1R واستخدامه لعلاج السرطان

IGF-1R Antibody-Drug-Conjugate and Its Use for the Treatment of Cancer

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

يتعلق الاختراع الحالي بمترافق من جسم مضاد-عقار قادر على الارتباط مع الـ IGF-1R. في أحد جوانبه، يتعلق الاختراع بمترافق من جسم مضاد-عقار يشتمل على جسم مضاد قادر على الارتباط مع IGF-1R، يترافق الجسم المضاد المذكور مع عقار واحد على الأقل يتم اختياره من مشتقات الدولاستاتين ١٠ والأوريستاتين. كما يشتمل الاختراع على طريقة لعلاج واستخدام المترافق المذكور للجسم المضاد- العقار لعلاج السرطان.

مستقبل عامل النمو ١ الذي يشبه الأنسولين المسمى IGF-1R (أو أحيانا IGF1R أو IGF-IR) هو مستقبل له نشاط لكيناز التيروسين وله ٧٠ % تماثل مع مستقبل الأنسولين IR. IGF-1R هو بروتين سكري له وزن جزيئي يبلغ حوالي ٣٥٠٠٠٠. وهو مستقبل رباعي الوحدات يتكون فيه كل نصف مرتبط بجسور ثنائي كبريتيد من وحدة خارج خلوية فرعية α ومن وحدة عبر الغشاء فرعية β. IGF-1R يربط IGF 1 وIGF2 بألفة عالية جدا (Kd #١ نانو مولار) ولكنه قادر على الارتباط بنفس الدرجة مع الأنسولين بألفة ١٠٠ إلى ١٠٠٠ مرة أقل. على العكس من ذلك، يربط IR الأنسولين بألفة عالية جدا بالرغم من أن IGFs يرتبط مع مستقبل الأنسولين بألفة ١٠٠ مرة أقل. مجال كيناز التيروسين لـ IGF-1R وIR لهما تماثل شديد للمتوالية بالغم من أن النطاقات ذات التماثل الأضعف تخص بالترتيب المناطق الغنية بالسيستيين الموجودة على الوحدة الفرعية α وجزء الطرفية C في الوحدة الفرعية β. الفروق في المتوالية التي تتم ملاحظتها في الوحدة الفرعية α توجد في نطاق ربط المجموعات الترابطية وبالتالي في مصدر قيم الألفة النسبية لـ IGF-1R وIR لـ IGFs والأنسولين بالترتيب. الفروق في جزء الطرفية C في الوحدة الفرعية β ينتج عنها تباعد في مسارات التأشير لكلا المستقبلين؛ IGF-1R يتوسط التأثيرات المحدثة للفتائل، وتأثيرات التمايز والموت الخلوي، بينما يتضمن تنشيط IR أساسا تأثيرات عند مستوى المسارات الأيضية.

يتم تنشيط بروتينات كيناز التيروسين السيتوبلازمية بربط المجموعة الترابطية بالمجال خارج الخلوي للمستقبل. يتضمن تنشيط أنواع الكيناز بدوره استثارة ركائز مختلفة داخل الخلية، بما في ذلك IRS-1،IRS-2، Shc و10 Grb. الركيزتين الأساسيتين لـ IGF-1R هما IRS وShc وهما يتوسطان، بتنشيط مؤثرات بعدية عديدة، معظم تأثيرات النمو والتمايز المرتبطة باتصال IGFs بهذا المستقبل. بالتالي، يمكن أن يدل توفر الركائز على التأثير الحيوي النهائي المرتبط بتنشيط الـ IGF-1R. عندما يسود IRS-1، تميل الخلايا إلى التكاثر والتحول. عندما يسود Shc، تميل الخلايا إلى التمايز. يبدو أن الطريق الذي تم اتباعه أساسا لتأثيرات الحماية من الموت الخلوي هو طريق مركبات فوسفاتيديل - إينوسيتول ٣- كيناز (مركبات كيناز PI 3).

خضع دور نظام IGF في التسبب بالسرطان لأبحاث مكثفة في السنوات العشر الماضية. جاء هذا الاهتمام بعد اكتشاف حقيقة أنه بالإضافة إلى خواص تكوين الفتائل والموت الخلوي له، IGF-1R أصبح مطلوبا لإقامة وصيانة نمط ظاهري متحول. في الواقع، أصبح مؤكدا أن التعبير الوراثي الزائد أو التنشيط التأسيسي لـ IGF-1R يؤدي، في العديد من الخلايا، إلى نمو الخلايا غير المعتمدة على الدعم في الأوساط الخالية من مصل جنين العجل، وتكوين أورام في الفئران الحليقة. هذا الأمر في حد ذاته ليس خاصية فريدة لأن هناك العديد من منتجات المورثات ذات التعبير الزائد يمكنها تحويل الخلايا، بما في ذلك عدد كبير من مستقبلات عوامل النمو. مع ذلك، فإن الاكتشاف الحاسم الذي أوضح بصورة كبيرة الدور الكبير الذي يلعبه IGF-1R في التحويل كان توضيح أن خلايا IGR-1R، التي يتم فيها تخميد ترميز المورث IGF-1R، هي مقاومة تماما للتحول بواسطة العوامل المختلفة القادرة عادة على تحويل الخلايا، مثل بروتين E5 لفيروس الورم الحليمي في البقر، التعبير الوراثي الزائد عن EGFR أو PDGFR، مولد الضد T لـ SV40، ras المنشط أو توليفة من العاملين الأخيرين.

يتم العبير الوراثي عن IGF-1R في مجموعة كبيرة من الأورام وسلالات الأورام ويقوم IGFsبتكبير نمو الورم عن طريق ارتباطها بـ IGF-1R. هناك مناقشات عديدة في صالح دور IGF-1R في التسبب في الورم تأتي من دراسات باستخدام أجسام مضادة أحادية النسيلة من الفأر يتم توجيهها إلى المستقبل أو باستخدام حالات الهيمنة السلبية لـ IGF-1R. في الواقع، الأجسام المضادة أحادية النسيلة من الفأر المتجهة إلى IGF-1R تمنع تكاثر العديد من سلالات الخلايا

في المزرعة ونمو خلايا الورم في الجسم الحي. كما تم أيضا توضيح أن المهيمن السلبي لـ IGF-1R قادر على تثبيط تكاثر الورم.

تمت إقامة عدد من المشاريع لاستحداث أجسام مضادة لـ IGF-1R مجردة لعلاج أنواع السرطان. مع ذلك، في هذا الوقت، لم ينجح أي من هذه المشاريع ولا توجد أجسام مضادة لـ IGF-1R في السوق.

علاوة على ذلك، فشلت سلسلة من المحاولات الإكلينيكية التي تتضمن أجساما مضادة لـ IGF-1R مندمجة مع أجسام مضادة لـ EGFR لاستهداف كل من EGFR وIGF-1R، لأن أيا من هذه الأجسام المضادة لم يكن قادرا على علاج المرضى بتحوُّل KRAS.

نتيجة لذلك، لا يعتبر IGF-1R حاليا هدفا رئيسيا، وعند البحث عن أجسام مضادة علاجية محتملة،IGF-1R لا يعتبر حاليا محل الاهتمام.

مع ذلك، يجب أيضا ملاحظة أن المساعي للحصول على الأجسام المضادة لـ IGF-1R قد تركزت على الأجسام المضادة المجردة، أي الأجسام المضادة المفيدة بسبب خواصها الذاتية. بهذا المعنى، IGF-1R يعتبر هدفا غير مناسب للحصول على ADC مثل مترافق من جسم مضاد-عقار (يشار إليه باسم "ADC") لأن IGF-1R المشروح باعتباره هدفا يتم التعبير الوراثي عنه بصورة كبيرة بواسطة الخلايا العادية، بما في ذلك الأوعية الدموية. بهذا المعنى، يمكن ملاحظة أن أحدث جسم مضاد لـ IGF-1R، أي AVE1642، يتم استحداثه في صورة جسم مضاد مجرد غير مسلح بعقار. ينطبق نفس الأمر مع الأجسام المضادة الأخرى IGF-1R قيد الاستحداث حاليا وعلى كل التي فشلت في التجارب الإكلينيكية.

في هذا السياق، يتعلق الاختراع بـ ADC أو مرافق واستخدامه لعلاج السرطان، وبصفة خاصة السرطانات التي تعبر وراثيا عن IGF-1R.

تجمع ADCs بين خصوصية ربط جسم مضاد مع فعالية الأدوية مثل، على سبيل المثال، العوامل السامة للخلايا. التقنية المرتبطة بتطوير الأجسام المضادة وحيدة النسيلة، واستخدام الأدوية الأكثر فعالية وتصميم الروابط الكيميائية للربط التساهمي لهذه المكونات، كلها قد تقدمت سريعا في السنوات الأخيرة.

استخدام ADCs يسمح بالتوصيل المحلي للعقاقير التي، عند إعطائها كعقاقير مترافقة، يمكن أن ينتج عنها مستويات غير مقبولة من السمية للخلايا العادية.

بعبارة أخرى، يتم البحث عن الفعالية القصوى مع الحد الأدنى من السمية. وقد ركزت الجهود المبذولة لتصميم وصقل ADC على انتقائية الجسم المضاد وكذلك آلية تأثير، ربط العقاقير، النسبة بين العقاقير/ الأجسام المضادة (التحميل أو DAR)، وخصائص إطلاق العقاقير. أجزاء العقاقير يمكن أن تضفي آثارها السامة للخلايا والمثبطة للخلايا بواسطة آليات تتضمن ربط التيوبولين، ربط الحمض النووي، جسم بروتيني و، إفساد وظيفة الريبوسوم، تخليق البروتين و/ أو تثبيط التوبو أيزوميراز. بعض العقاقير السامة للخلايا تميل إلى أن تكون غير نشطة أو أقل نشاطا عندما تترافق مع جسم مضاد كبير.

يجب أن يتحدد كل جسم مضاد على حدة، وتصميم رابط ملائم، وتحديد العامل السام للخلايا المناسب الذي يحتفظ بفعاليته عند الوصول إلى الخلايا السرطانية. لا بد من النظر في كثافة مولد الضد على الهدف السرطاني وما إذا كانت الأنسجة الطبيعية تعبر عن مولد الضد المستهدف. تشمل الاعتبارات الأخرى ما إذا كان كل ADC قد استوعب عند ربط الهدف؛ سواء كان دواء تثبيط الخلايا أو السام للخلايا هو الأفضل عند النظر في احتمال تعرض الأنسجة الطبيعية و/ أو نوع ومرحلة السرطان الذي يتم علاجه؛ وما إذا كان الرابط الذي يربط الأجسام المضادة بحمولة العقاقير هو رابط قابل للانقسام أم لا. علاوة على ذلك، يجب أن تكون نسبة اقتران الجسم المضاد بالعقار كافية دون المساس بنشاط ربط الجسم المضاد و/ أو فاعلية الدواء ودون تعديل الخصائص الفيزيائية للـ ADC الناتجة عن التجميع أو الخصائص الضارة المتعلقة بعملية التنمية المستقبلية للمركب.

ADC هو جزيء حيوي معقد وتظل التحديات المتعلقة باستحداث ADC فعال أمرا هاما.

<u>الوصف العام للاختراع</u>

الاختراع الحالي موجه بصفة خاصة إلى هذا الأمر وهو يتعلق بـ ADC له الصيغة التالية (I):

$$Ab-(L-D)_n$$

(I)

أو ملح مقبول صيدلانيا منه،

حيث

Ab هو جسم مضاد، أو شظية رابطة لمولد الضد منه، قادرة على الارتباط مع IGF-1R البشري يتم اختياره من:

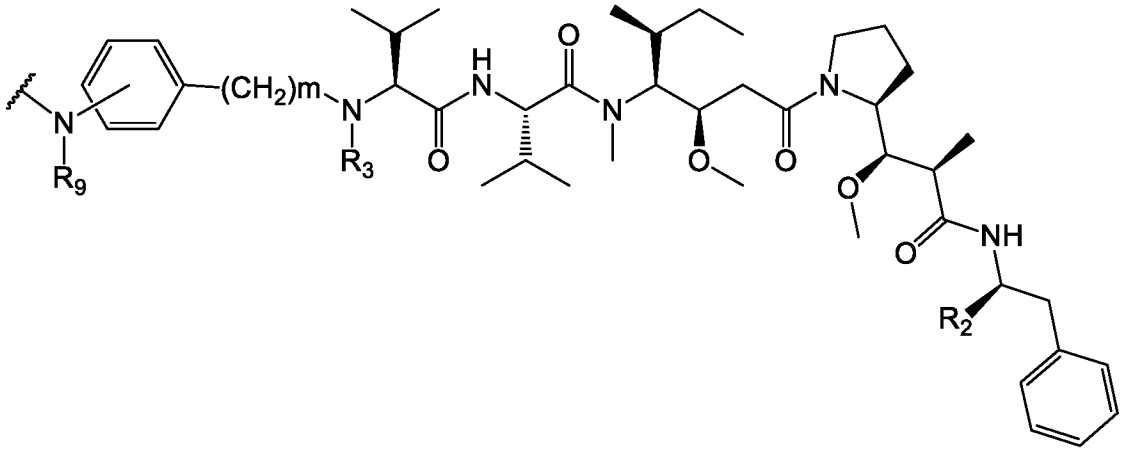
i) جسم مضاد يشتمل على الـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ١، ٢ و: ٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٤، ٥ و: ٦؛

ii) جسم مضاد ينافس للارتباط مع IGF-1R مع الجسم المضاد في i) ؛ و

iii) جسم مضاد يربط نفس القمة اللاصقة لـ IGF-1R باعتباره الجسم المضاد في i) ؛

L هي رابط؛

D هي جزء عقار له الصيغة التالية (II):



(II)

حيث:

R2 هي COOH، COOCH3 أو ثيازوليل؛

R3 هي H أو (C1-C6) ألكيل؛

R9 هي H أو (C1-C6) ألكيل؛

m هي عدد صحيح يتراوح بين ١ و: ٨؛

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع L؛ و

n هي ١ إلى ١٢.

٥ يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث يتم اختيار Ab من:

أ) جسم مضاد يشتمل على الـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و: ٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و: ١١؛

ب) جسم مضاد يشتمل على الـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و: ٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ١٠، ٥ و: ١١؛

١٠ ج) جسم مضاد يشتمل على الـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و: ٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و: ١٢؛ و

د) جسم مضاد يشتمل على الـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٨، ٢ و: ٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و: ١١.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث يتم اختيار Ab من:

١٥ أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و: ١١؛

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٤ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ١٠، ٥ و: ١١؛

ج) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٥ والـ CDRs الثلاثة ٢٠ للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و: ١٢؛

د) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٦ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و: ١١؛ و

هـ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٧ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و: ١٢.

٥ يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث يتم اختيار Ab من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ١٨ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و: ٣؛

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ١٩ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و: ٣؛

١٠ ج) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢٠ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و: ٣؛

د) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢ ١ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٨، ٢ و: ٣؛ و

هـ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢ ٢ والـ CDRs الثلاثة
١٥ للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و: ٣.

في أحد النماذج يتعلق الاختراع بـ ADC حيث يتم اختيار Ab من:

i) الأجسام المضادة 208F2، 212A11، 214F8، 219D6 و: 213B10؛

ii) الأجسام المضادة التي تتنافس للارتباط مع IGF-1R مع الأجسام المضادة المذكورة في i) ؛ و

٢٠ iii) الأجسام المضادة التي تربط نفس القمة اللاصقة لـ IGF-1R مثل الأجسام المضادة المذكورة في i).

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث Ab هو جسم مضاد متوافق مع البشر.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث يتم اختيار Ab من جسم مضاد يشتمل على:

أ) سلسلة ثقيلة بها CDR-H1، CDR-H2 وCDR-H3 للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣، بالترتيب، وFR1، FR2 وFR3 مشتقين من السلالة الجرثومية البشرية IGHV1-46*01 (المتوالية رقم ٤٦)، والـ FR4 المشتقة من السلالة الجرثومية البشرية IGHJ4*01 (المتوالية رقم ٤٨)؛ و

ب) سلسلة خفيفة بها CDR-L1، CDR-L2 وCDR-L3 للمتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١، بالترتيب، وFR1، FR2 وFR3 مشتقين من السلالة الجرثومية البشرية IGKV1-39*01 (المتوالية رقم ٤٧)، والـ FR4 المشتقة من السلالة الجرثومية البشرية IGKJ4*01 (المتوالية رقم ٤٩).

في أحد نماذج الاختراع، يتم اختيار Ab من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٣ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١؛ و

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٤ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٤ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١.

في أحد نماذج الاختراع، يتم اختيار Ab من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٣٥ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣ ٥ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣؛ و

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٦ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٦ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣.

في أحد نماذج الاختراع، يتم اختيار Ab من:

أ) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٧ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٧ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٣٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٩؛ و

ب) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٨ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٨ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٤٠ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٤٠.

في أحد نماذج الاختراع، يتم اختيار Ab من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ و: ٨٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ أو ٨٠؛ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١؛

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٧ و: ٦٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠؛ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣؛ و

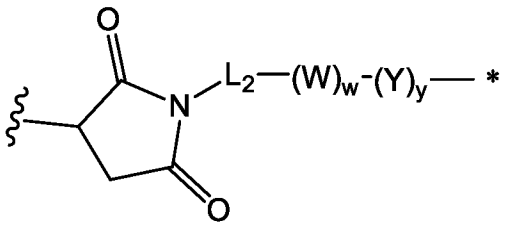
ج) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ و: ٨٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ أو ٨٠؛ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠.

في أحد نماذج الاختراع، يتم اختيار Ab من:

أ) سلسلة ثقيلة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٨، ٦٣، ٦٥، ٦٧، ٦٩، ٧١، ٧٣، ٧٥، ٧٧، ٧٩ و: ١ ٨ أو أي سلسلة بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٨، ٦٣، ٦٥، ٦٧، ٦٩، ٧١، ٧٣، ٧٥، ٧٧، ٧٩ أو ٨١؛ و

ب) سلسلة خفيفة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٩ و: ١ ٦ أو أي سلسلة بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٩ أو ٦١.

في أحد نماذج يتعلق الاختراع بـ ADC حيث L هي رابط له الصيغة التالية (III):



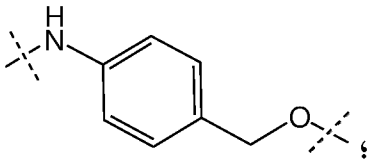
(III)

حيث

L2 هي (C4–C10) سيكلو ألكيل كربونيل، (C2–C6) ألكيل أو (C2–C6) ألكيل –كربونيل؛

W هي وحدة حمض أميني؛ w هي عدد صحيح يتراوح بين ٠ و: ٥

Y هي PAB–كربونيل حيث تكون PAB

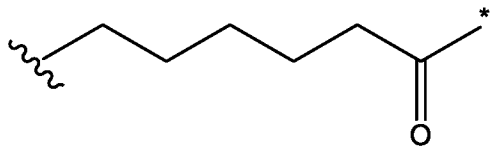


y هي ٠ أو ١؛

تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع D؛ و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع Ab.

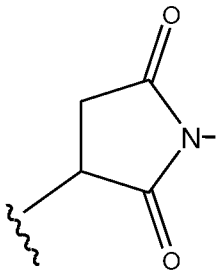
يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث L2 يكون لها الصيغة:



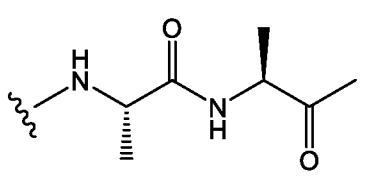
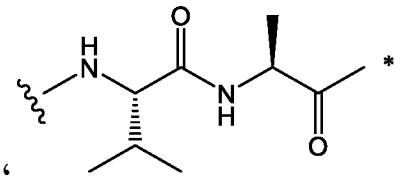
حيث

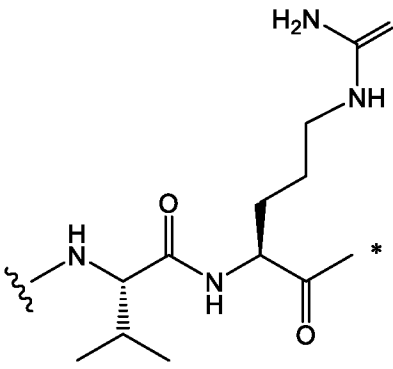
تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع w(W)؛ و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع ذرة النيتروجين في جزء الماليميد من الصورة:



في أحد نماذج الاختراع، w = ٠، أو w= ٢ وعندئذ يتم اختيار w(W) من:


،

،



و

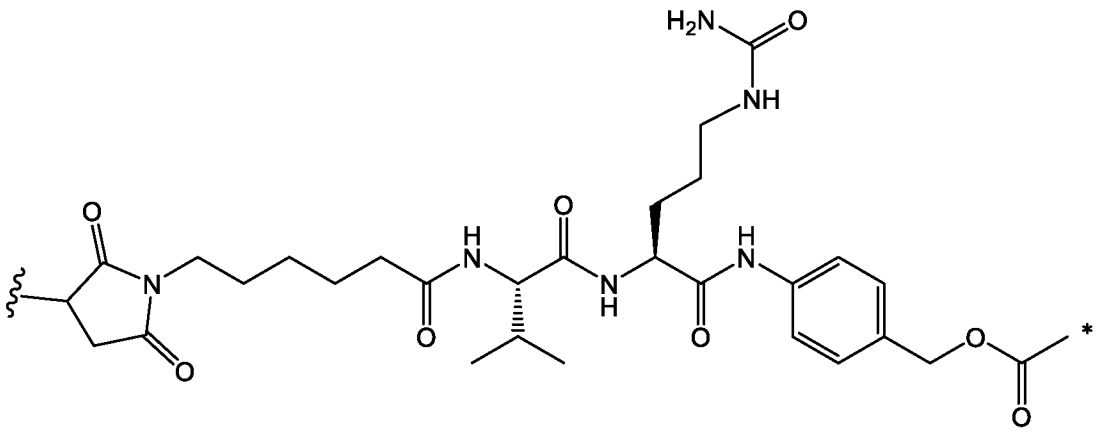
،

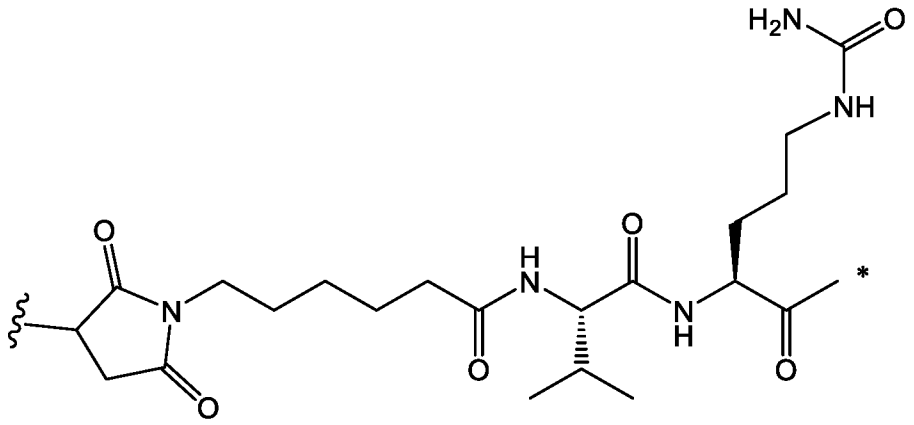
حيث

تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع y (Y)؛ و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع L2.

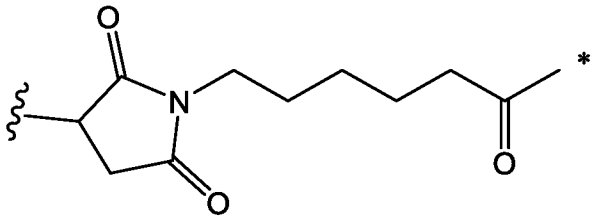
يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث L يتم اختيارها من:





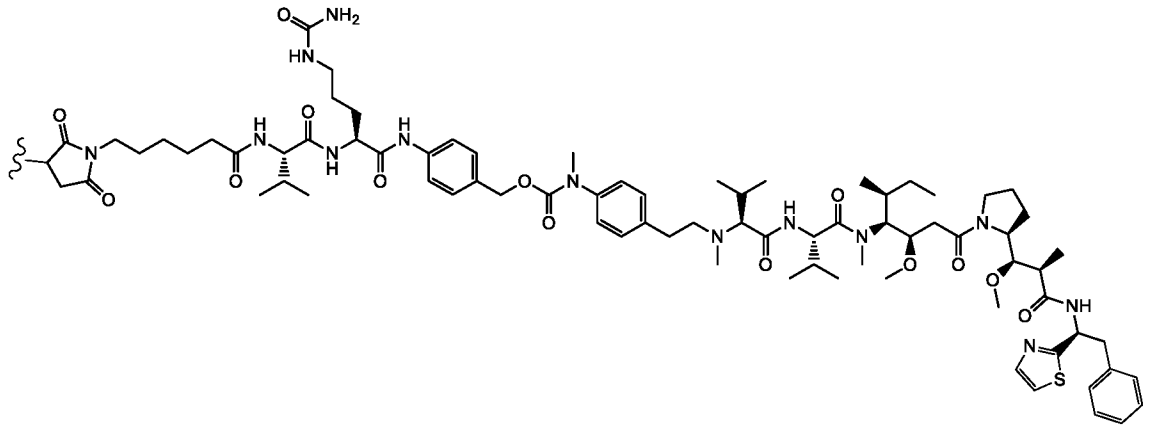
ه

، و

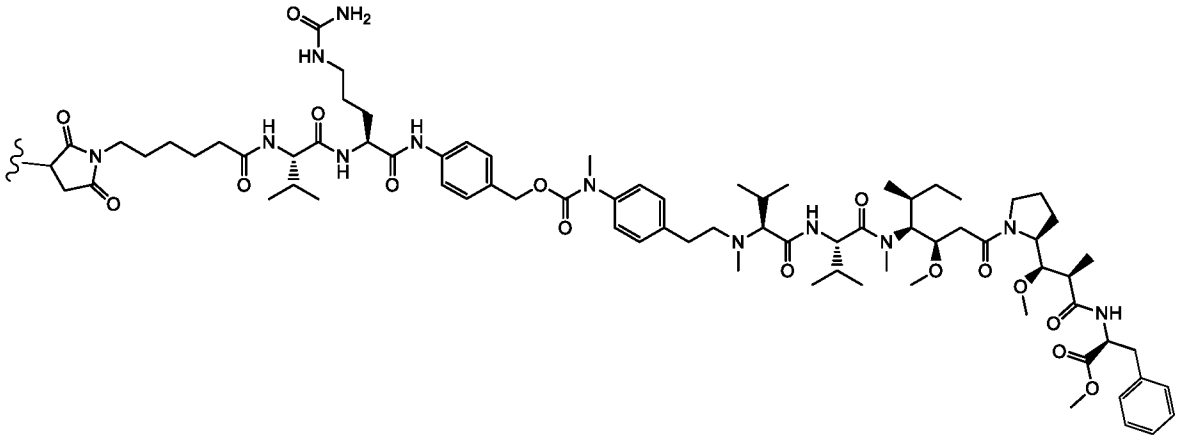


حيث تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع D، والخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع Ab.

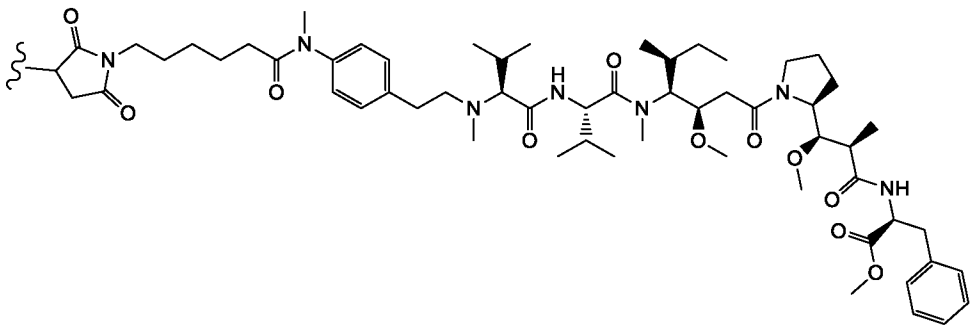
يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث (L–D) يتم اختيارها من:



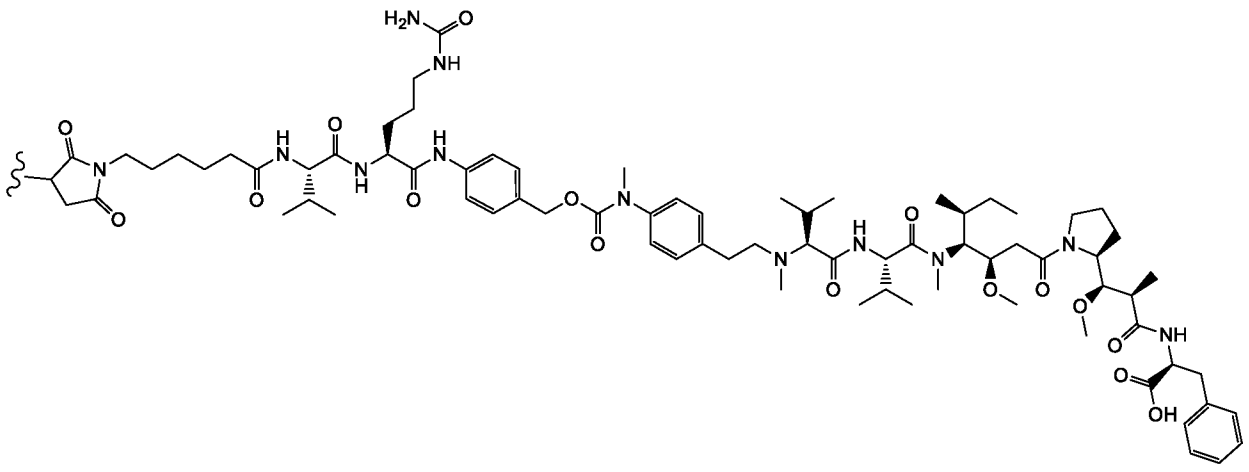
(هـ-١١)



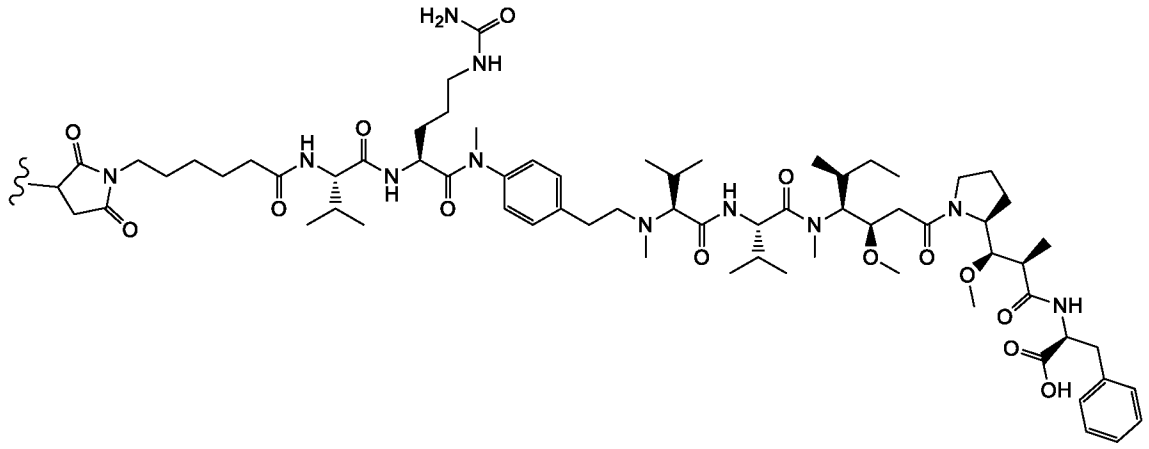
(هـ -١٢)



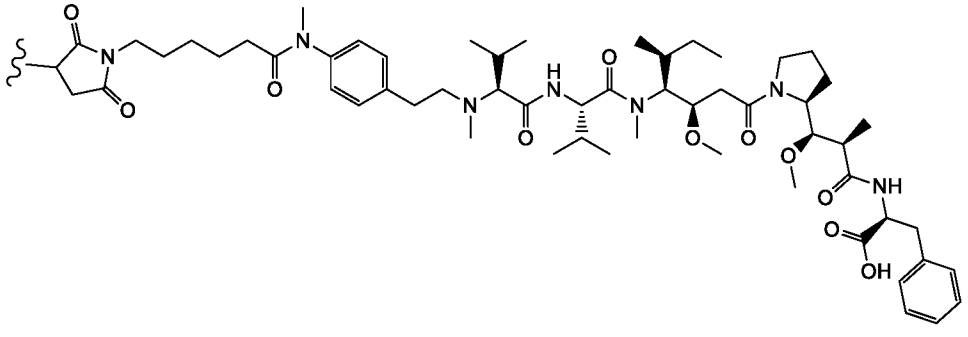
(ز-١٢)



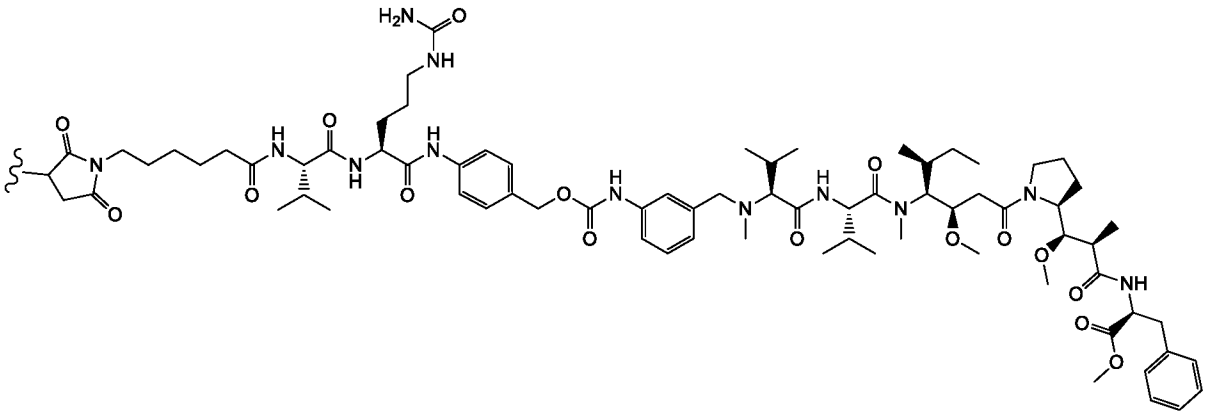
(هـ -١٣)



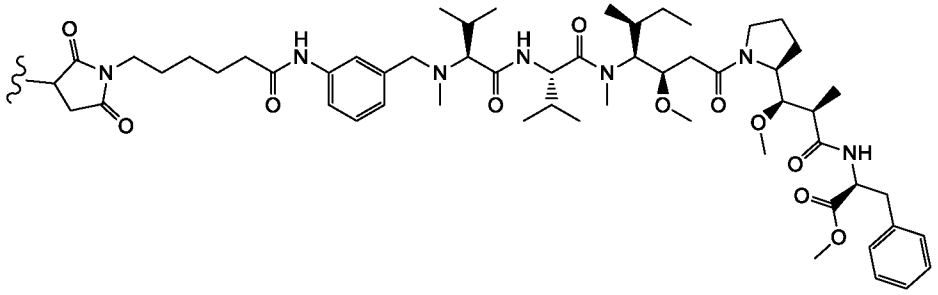
(و -١٣)



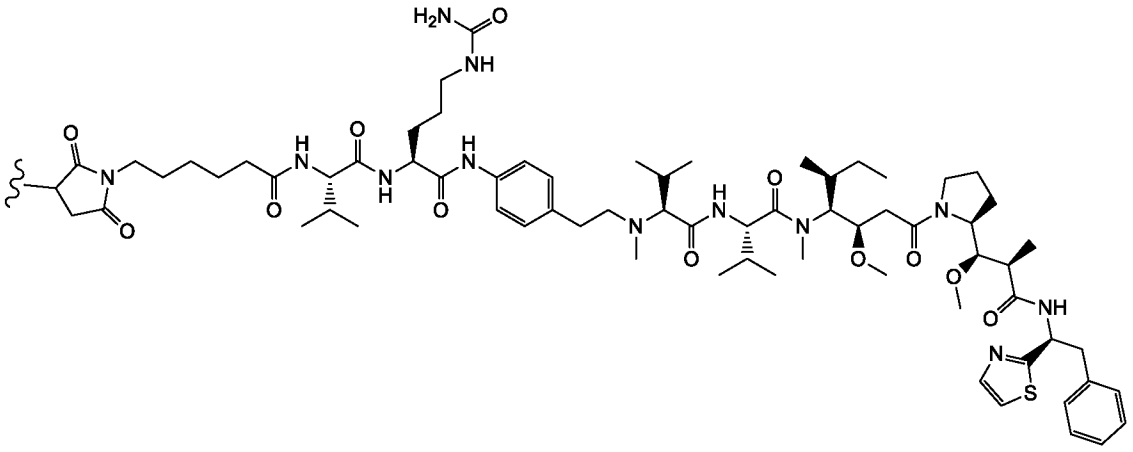
(ز-١٣)



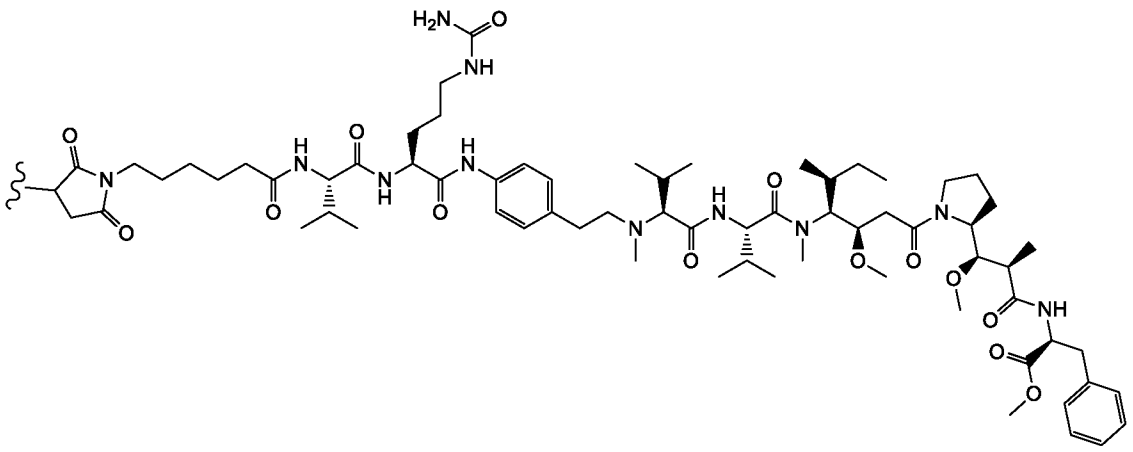
(هـ-١٥)



(ز-١٥)

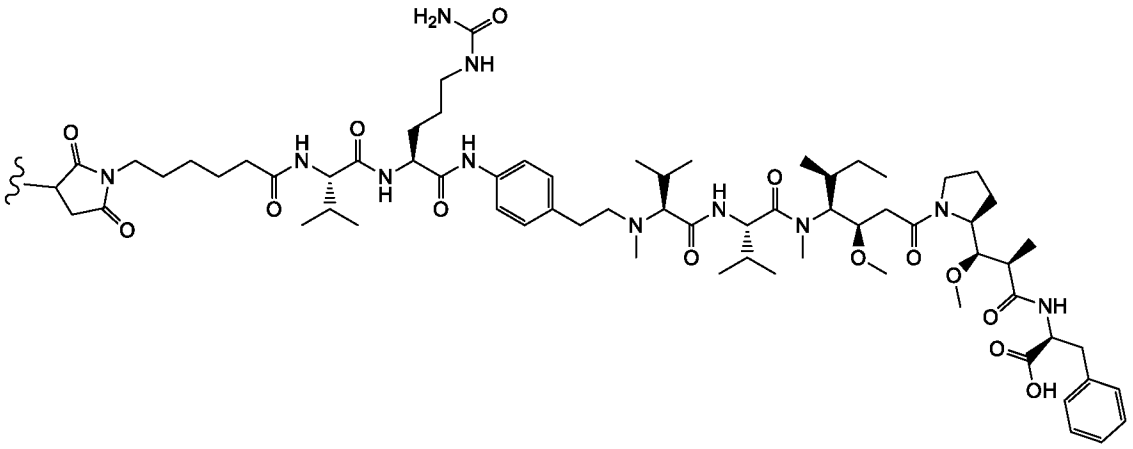


(و-٦١)



(و-٦٢)

و

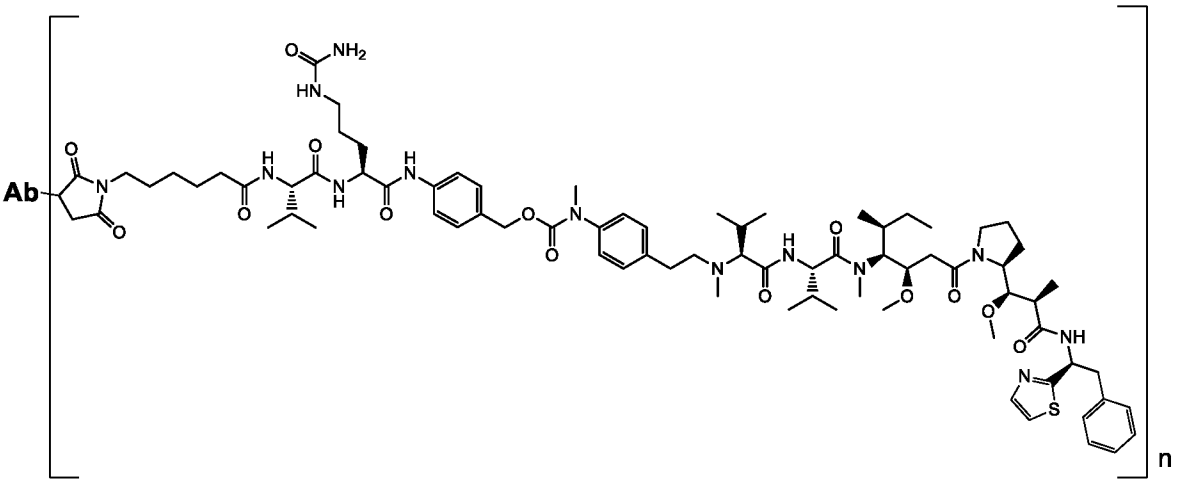


(و -٦٣)

٥

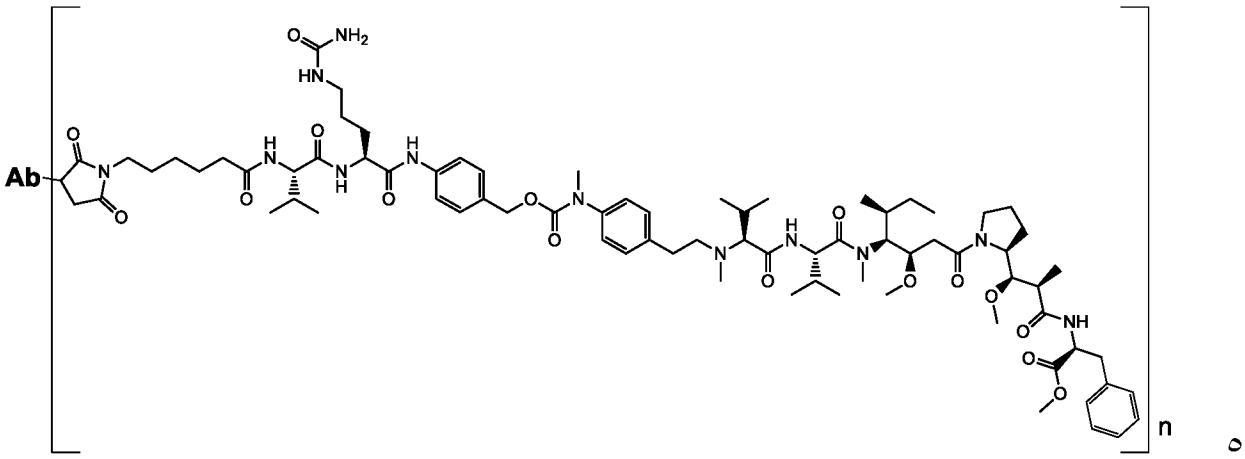
حيث الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع Ab.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC له صيغة يتم اختيارها من:



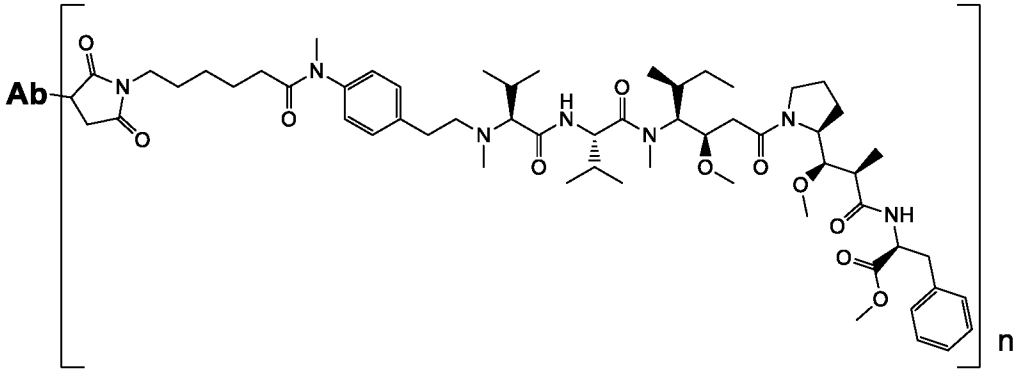
Ab-E-)

(11

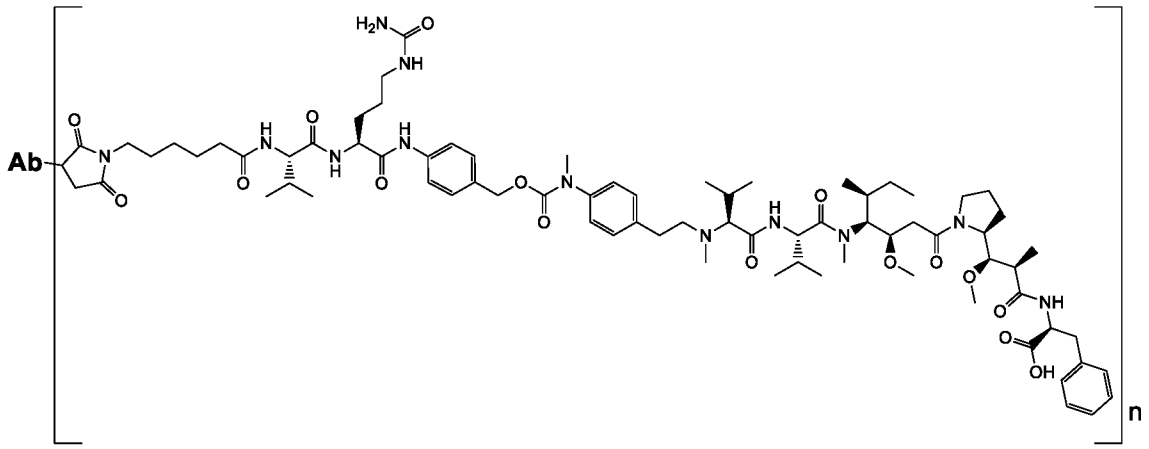


Ab-E-)

(12

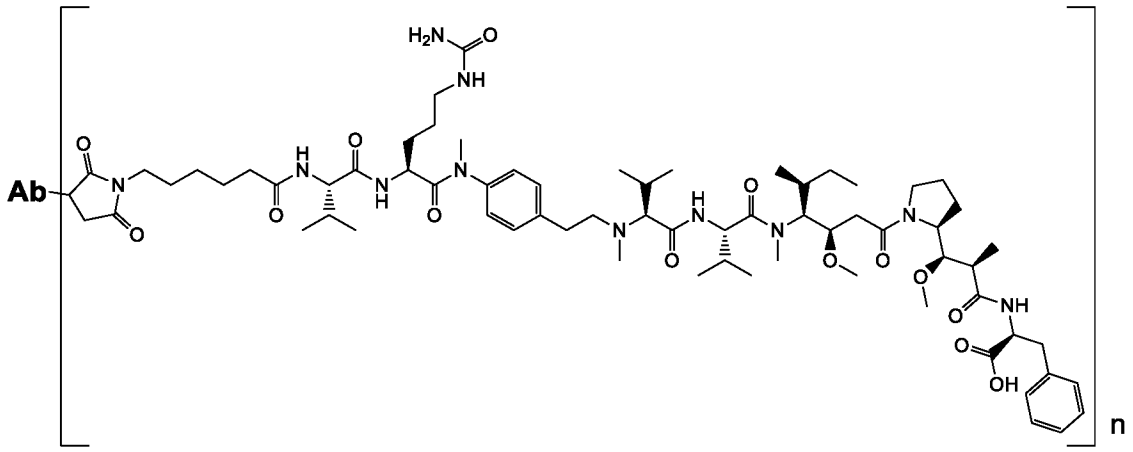


(Ab-G-12)

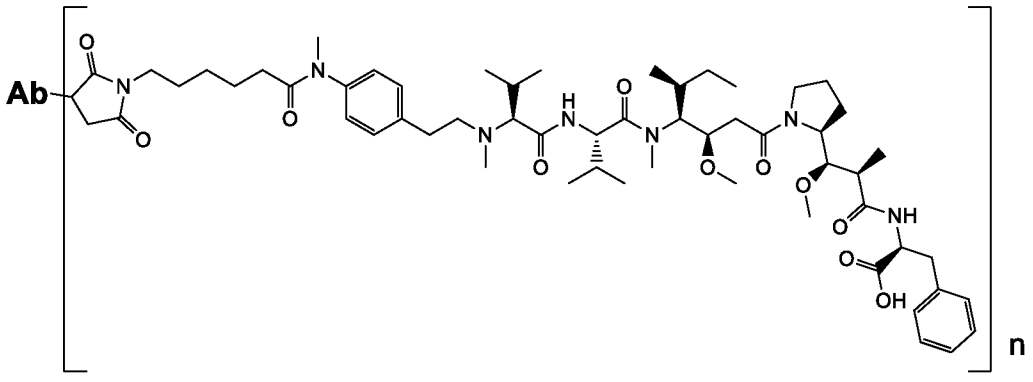


Ab-E-)

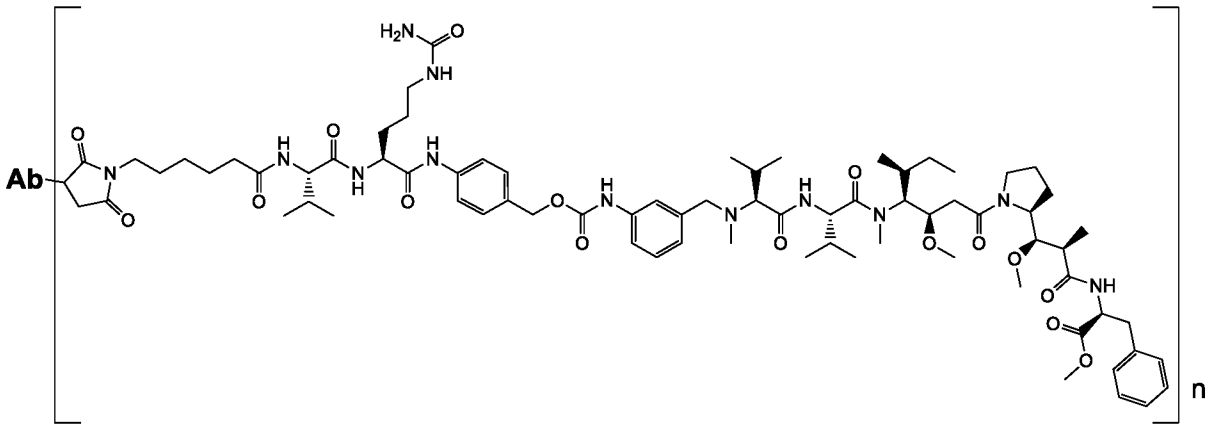
(13 ٥



(Ab-F-13)

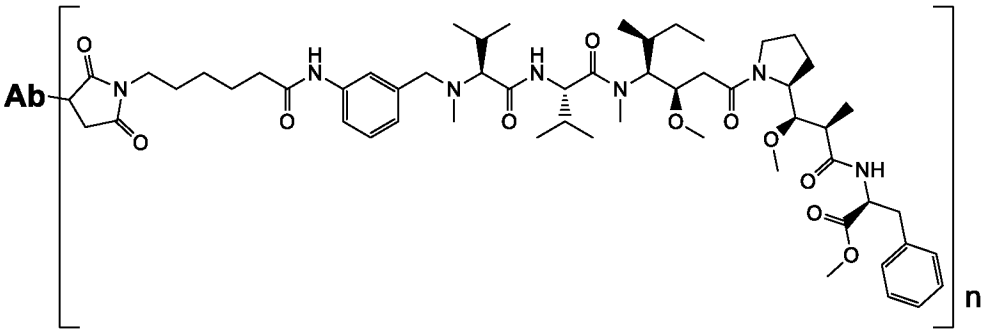


(Ab-G-13)

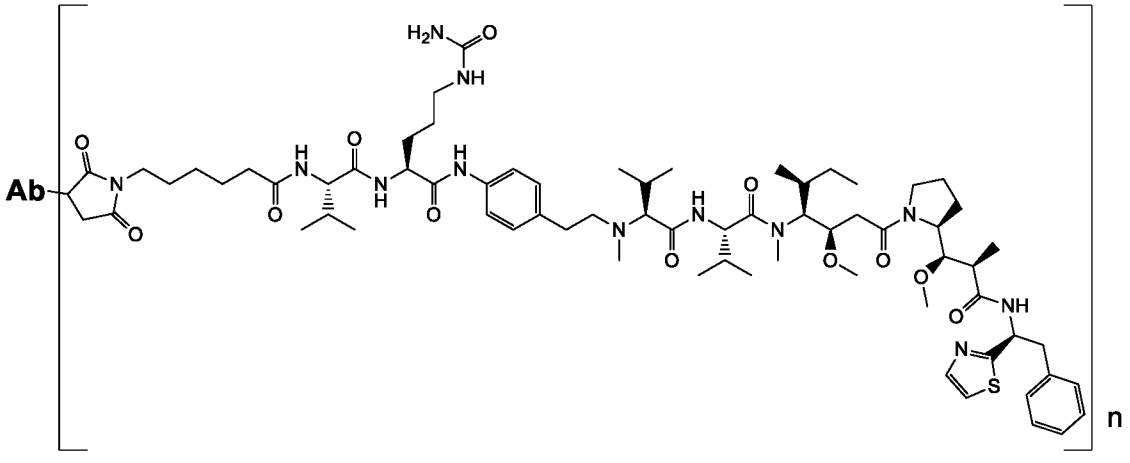


Ab- E-)

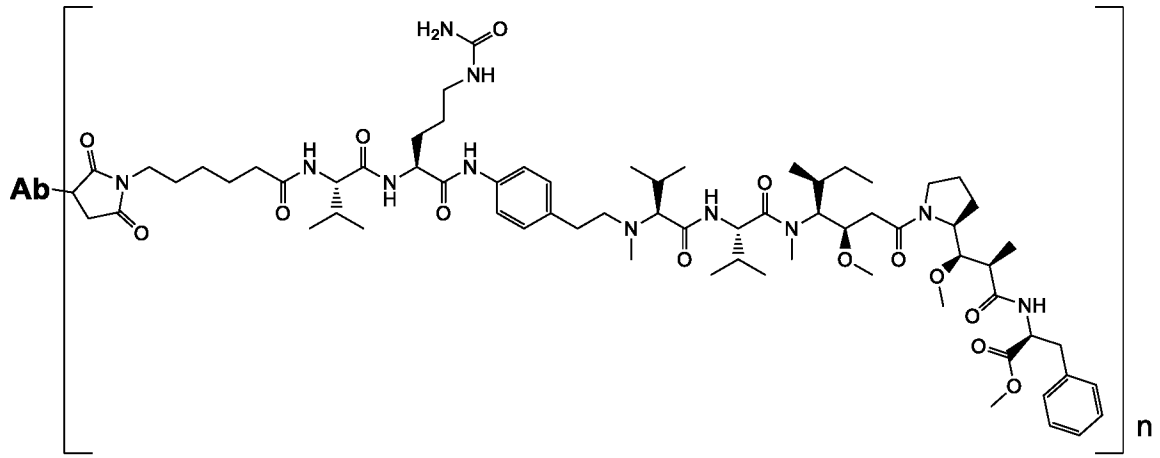
(15 ٥



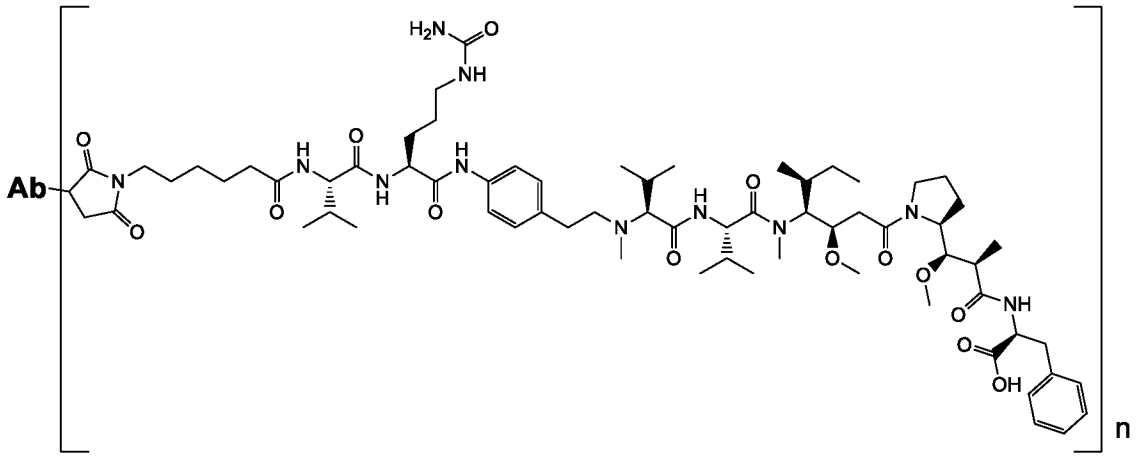
(Ab-G-15)



(Ab-F-61)



(Ab-F-62)



(Ab-F-63)

وأملاح مقبولة صيدلانيا منها،

حيث يتم اختيار Ab من المجموعة التي تتكون من:

i) الأجسام المضادة 208F2، 212A11، 214F8، 219D6 و: 213B10؛

ii) الأجسام المضادة التي تتنافس للارتباط مع IGF-1R مع الأجسام المضادة المذكورة في i) ؛ و

iii) الأجسام المضادة التي تربط نفس القمة اللاصقة لـ IGF-1R مثل الأجسام المضادة المذكورة في i).

٥ يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث n هي ٢.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث n هي ٤.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC للاستخدام كعلاج.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بتركيبة تشتمل على ADCكما سبق شرحه.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بتركيبة تشتمل أيضا على مادة ناقلة مقبولة صيدلانيا.

١٠ يتعلق أحد نماذج الاختراع بتركيبة للاستخدام في علاج سرطان يعبر وراثيا عن IGF-1R، أو السرطانات المتعلقة بـ IGF-1R.

السرطان المتعلق بـ IGF-1R أو السرطانات المتعلقة بـ IGF-1R تحتوي على خلايا ورمية تعبر أو تعبر بطريقة مفرطة عن كل أو جزء من الـ IGF-1R على سطحها.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بتركيبة، حيث السرطان المذكور الذي يعبر عن IGF-1R هو سرطان ١٥ يتم اختياره من سرطان الثدي، القولون، المريء، الكبد، المعدة، الورم، الرئة، الجلد، العظم، المبيض، البروستات، العضلية المخططة، الكلى، الغدة الدرقية، بطانة الرحم، الورم المتوسط، الحرشفية عن طريق الفم، وأي سرطان مقاوم للعقاقير.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بطريقة لعلاج سرطان يعبر وراثيا عن IGF-1R في خاضع بحاجة إلى ذلك، تتضمن إعطاء الخاضع كمية فعالة من على الأقل مترافق جسم مضاد - عقار أو من ٢٠ تركيبة وفقا للاختراع.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بحقيبة طاقم تشتمل على الأقل على i) مترافق من جسم مضاد-عقار و/ أو تركيبة كما سبق شرحه وii) محقنة أو قنينة أو أمبول يوضع بداخلها المترافق المذكور للجسم

المضاد- العقار و/ أو التركيبة.

شرح مختصر للرسومات

الأشكال ١ أ -١ ج: ربط الجسم المضاد مع IGF-1R البشري الأصلي باستخدام تحليلات FACS. شكل رقم ١ أ يمثل منحنى المعايرة، على سلالة الخلية MCF-7. MFI تمثل متوسط شدة التألق. شكل رقم ١ ب يمثل الـ EC50 لكل من الأجسام المضادة من الفأر ومتخالفة الصبغيات لـ IGF-1R على سلالة الخلية MCF-7. شكل رقم ١ ج يمثل قيمة Bmax للأجسام المضادة متخالفة الصبغيات لـ IGF-1R على سلالة الخلية MCF-7.

الأشكال ٢ أ -٢ ب: تقييم التعرف على hIGF-1R باستخدام الخلايا المصابة مقابل الخلايا غير المصابة. شكل رقم ٢ أ) يمثل منحنيات معايرة لمضاد لـ IGF-1R Ab متخالف الصبغيات على IGF-1R+ سلالة خلية. MFI تمثل متوسط شدة التألق. شكل رقم ٢ ب يمثل ربط مضاد لـ IGF-1R Abs متخالف الصبغيات على IGF-1R البشري -سلالة الخلية.

الأشكال ٣ أ -٣ ب: تقييم خصوصية Abs تجاه IGF-1R مقابل Hir باستخدام الخلايا المصابة. شكل رقم ٣ أ يمثل ربط مضاد لـ IGF-1R Ab من الفأر على الـ سلالة خلية المصابة hIR+. شكل رقم ٣ ب يمثل ربط مضاد لـ IGF-1R Ab متخالف الصبغيات على سلالة خلية IR+. MFI تمثل متوسط شدة التألق. تم إدخال GRO5 المضاد لـ - hIR Mab (Calbiochem) كعامل مقارنة موجب.

شكل رقم ٤: ربط مضاد لـ IGF-1R Ab من الفأر على سلالة الخلية IM-9. MFI تمثل متوسط شدة التألق. تم إدخال GRO5 المضاد لـ IGF-1R Ab كعامل مقارنة موجب.

الأشكال ٥ أ -٥ ج: تقييم التعرف على IGF-1R من القرد IGF-1R. شكل رقم ٥ أ يمثل منحنيات المعايرة لمضاد لـ IGF-1R Ab متخالف الصبغيات على سلالة خلية COS-7. MFI تمثل متوسط شدة التألق. شكل رقم ٥ ب يمثل EC50 لكل من الأجسام المضادة من الفأر ومتخالفة الصبغيات لـ IGF-1R على سلالة خلية COS-7. شكل رقم ٥ ج يمثل الـ EC50

للأجسام المضادة متخالفة الصبغيات لـ IGF-1R على كل من خلايا hIGF-1R المصابة بـ NIH 3T3 + وسلالات خلية COS-7.

شكل رقم ٦: منجنيات الاستجابة مقابل الزمن التي يتم الحصول عليها على 100× Biacore المعتمد على تقنية SPR باستخدام استشعار CM5 والمنشط باستخدام واحد أو أكثر من ١١٠٠٠ RUمن الجسم المضاد Tag His من الفأر المطعم كيميائيا في قالب الكربوكسي ميثيل دكستان. تم إجراء التجربة عند معدل تدفق يبلغ ٣٠ ميكرو لتر/ دقيقة عند ٢٥ °م باستخدام HBS-EP+ كمحلول منظم مخفف للعينات. أظهر الشكل تراكب ٤ منجنيات الاستجابة المستقلة مقابل الزمن المتراصة على المحور الأفقي عند بداية الحقن الأول لنواتج التحليل وعلى المحور الرأسي بواسطة خط القاعدة المحدد مباشرة قبل هذا الحقن الأول. منحنيات الاستجابة مقابل الزمن التي تم الحصول عليها بالتقاط المتوالية المعتمدة على البشر لـ IGF1R معاود الارتباط القابل للذوبان موضحة بعلامات تأخذ شكل المعين. The منحنيات الاستجابة مقابل الزمن التي تم الحصول عليها بالتقاط المتوالية المعتمدة على قرد الرباح لـ IGF1R معاود الارتباط القابل للذوبان موضحة بعلامات تأخذ شكل المثلث. الرموز البيضاء تناظر الدورات الخالية (٥ مرات حقن للمحلول المنظم) والرموز السوداء تناظر حقن المدى المتنامي من تركيزات C-208F2 (٥، ١٠، ٢٠، ٤٠ و: ٨٠ نانو مولار).

شكل رقم ٧: تقييم التأثير الأصلي للأجسام المضادة لـ hIGF-1R على فسفرة المستقبل بالمقارنة بـ IGF1.

شكل رقم ٨: تثبيط فسفرة IGF-1R استجابة لـ IGF-1 بواسطة من الفأر مضاد لـ hIGF-1R

شكل رقم ٩: شدة إشارة سطح الخلية في أجسام مضادة لـ IGF-1R تم تقليلها بطريقة متحكم فيها بعد حضانة الخلية عند ٣٧ °م. تمت حضانة خلايا MCF-7 عند ٤ °م أو ٣٧ °م لمدة ٤ ساعات باستخدام Abs تركيز ١٠ ميكرو جرام/ مل. الشكل يمثل ΔMFI.

الأشكال ١٠ أ -١٠ ب: تحلل سطح الجسم المضاد. تم تقييم الجسم المضاد المرتبط بسطح الخلية بعد ١٠، ٢٠، ٣٠، ٦٠ و: ١٢٠ دقيقة عند ٣٧ °م. شكل رقم ١٠ أ يمثل النسبة المئوية لـ IGF-

1R المتبقي بالمقارنة بشدة الإشارة المقاسة عند ٤ °م. شكل رقم ١٠ ب يمثل حسابات نصف العمر باستخدام Prims Software واستخدام مواءمة التحلل المتزايد.

شكل رقم ١١: تم إدخال مضاد hIGF-1R Abs. تمت حضانة الخلايا باستخدام Abs من الفأر بتركيز ١٠ ميكرو جرام/ مل لمدة ٠، ٣٠ أو ٦٠ دقيقة عند ٣٧ °م. تم أو لم يتم جعل الخلايا منفذة وتمت حضانتها مع IgG-Alexa ثانوي مضاد للفأر ٤٨٨. كلمة غشاء تناظر إنفاذ شدة الإشارة w/o. كلمة كلي تناظر شدة الإشارة بعد إنفاذ الخلية وكلمة سيتوبلازمي تناظر Ab الذي تم إدخاله. اسم كل جسم مضاد تم تقييمه موضع فوق كل منحنى.

الأشكال ١٢ أ -١٢ ب: الإدخال بواسطة Imaging Ab. شكل رقم ١٢ أ: خلايا MCF-7 التي تمت حضانتها باستخدام m208F2 لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م وتم غسلها قبل الحضانة (W) عند ٣٧ °م لمدة ١٥ (X)، ٣٠ (Y) و: ٦٠ (Z) دقيقة. تم تثبيت الخلايا وجعلها منفذة. تم كشف m208F2 Abباستخدام IgG Alexa488 مضاد للفأر و Lamp-1 باستخدام جسم مضاد Lamp-1 من الأرنب وباستخدام و IgG Alexa ثانوي مضاد للأرنب ٥٥٥. شكل رقم ١٢ ب: تمت حضانة خلايا MCF-7 لمدة ٣٠ دقيقة عند ٣٧ °م مع الأجسام المضادة من الفأر لـ hIGF-1R وتبقيعها بالطريقة السابق شرحها. تم تحديد التوطين المشترك باستخدام تمييز مساعد التوطين المشترك لـ ImageJ software.

شكل رقم ١٣: تضمين مسار الجسيم الدهني في تحلل الجسم المضاد

شكل رقم ١٤: الرقم الهيدروجيني الحمضي يقلل قدرة الربط للأجسام المضادة من الفأر الخمسة لـ IGF-1R.

الأشكال ١٥ أ -١٥ د: خصائص ربط الصورة الأولى المتوافقة مع البشر من C-208F2 Mab. تم تقييم خصائص ربط الـ hz208F2 VH3/VL3 mAb على سلالة الخلية البشرية MCF-7 (A)، على سلالة خلية IGF-1R من القرد COS-7(B) وعلى سلالة الخلية من الفأر المصابة التي تعبر عن مستقبل الأنسولين في البشر (C). تم تقييم ربط كل من 208F2 mAbs من الفأر ومتخالف الصبغيات في نفس الوقت. تم استخدام مستنسخ GRO5 للجسم المضاد لـ hIR لتحقيق التعبير الوراثي عن الـ hIR على سلالة خلية المصابة (D).

شكل رقم ١٦: تحلل سطح الجسم المضاد hz208F2 VH3/VL3

شكل رقم ١٧: تراكب منحنيين للاستجابة مقابل الزمن تم الحصول عليهما باستخدام جهاز Biacore ×١٠٠ يعتمد على SPR عند درجة حرارة تبلغ ٢٥ °م باستخدام شريحة مستشعر CM5 منشطة على كل من خلايا التدفق بحوالي RU١٢,٠٠٠ من الأجسام المضادة أحادية النسيلة من الفأر المضادة لـ TagHis المطعم كيميائيا في قالب الكربوكسي ميثيل دكستان باستخدام HBS-EP+ باعتباره المحلول المنظم الجاري عند معدل تدفق يبلغ ٣٠ ميكرو لتر/ دقيقة. كل منحنيات الاستجابة مقابل الزمن (الأول موضح بمثلثات والثاني موضح بمعينات) تناظر دورة كاملة:

١- الحقن خلال دقيقة واحدة لمحلول من h-IGF-1R معاود الارتباط (١٠ ميكرو جرام/ مل) على خلية التدفق الثانية.

٢- بالنسبة لمنحنى الاستجابة الأول مقابل الزمن: ٥ مرات حقن بمحلول منظم جاري خلال ٩٠ ثانية لكل منها.

بالنسبة لمنحنى الاستجابة الثاني مقابل الزمن: ٥ مرات حقن في المدى المتنامي من تركيزات محاليل الجسم المضاد المذكور في iGF-1R C208F2 خلال ٩٠ ثانية لكل منها.

٣- تأخير يبلغ ٣٠٠ ثانية لتحديد المعدلات الحركية للتفكك.

٤- تجديد السطح بالحقن خلال ٤٥ ثانية بجليسين ١٠ ملي مولار، محلول منظم لـ HCl رقم هيدروجيني ١,٥.

شكل رقم ١٨: يتم تقديم منحنى الاستجابة مقابل الزمن الذي يناظر طرح المنحنى الخالي للاستجابة مقابل الزمن (٥ مرات حقن بـ HBS-EP+) من منحنى الاستجابة مقابل الزمن الذي يتم الحصول عليه باستخدام المدى المتنامي من تركيزات محاليل C208F2 المضادة لـ IGF-1R باللون الرمادي. منحنى الاستجابة النظري مقابل الزمن يناظر الطراز ١: ١ بالبارامترات التالية: kon= (١,٢٠٦ ± ٠,٠٣٦) × ١٠ ٦ مولار-١. ثانية -١، koff= (٧,٨١ ± ٠,١٨) × ١٠- ٥. ثانية -١، Rmax= ٣٠٧,٦ ± ٠,٣ RU يتم تمثيلها بواسطة خط ثقيل متصل. التركيزات

المحسوبة لـ C208F2 التي تم ذكرها على المنحنى: أعلى تركيزات فقط (٢٤ نانو مولار) تعتبر مقدارا ثابتا.

شكل رقم ١٩: ثوابت التفكك تناظر متوسط التجارب الأربعة التي تم إجراؤها لكل جسم مضاد وتناظر النسبة: koff/kon× ١٠ ١٢ التعبير بوحدة البيكو مولار. الخطأ يناظر الخطأ القياسي (ن=٤).

شكل رقم ٢٠: فترات نصف العمر تناظر متوسط التجارب الأربعة التي تم إجراؤها لكل جسم مضاد وتناظر النسبة: Ln (٢) /koff/٣٦٠٠ التعبير بوحدة الساعة. الخطأ يناظر الخطأ القياسي (ن=٤).

شكل رقم ٢١: السمية الخلوية لمضاد لـ IGF-1R المقترن بثلاثة مركبات مختلفة. تم إقران خمسة من الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات المضادة لـ IGF-1R سواء مع هـ -١٣، ز-١٣ أو و-٦٣. تم أيضا إقران جسم مضاد غير ذي صلة C9G4 بنفس المركبات.

الأشكال ٢٢ أ -C٢٢: تقييم في الجسم الحي لـ c208F2-E-13 (شكل رقم ٢٢ أ)، C208F2-G-13 (شكل رقم ٢٢ ب) وc208F2-F-63 (شكل رقم ٢٢ ج) في نموذج التطعيم الخارجي لـ MCF-7.

الأشكال ٢٣ أ -٢٣ ب: تقييم في الجسم الحي لكل من c208F2-E-13 (شكل رقم ٢٣ أ) وC208F2-G-13 (شكل رقم ٢٣ ب) بالمقارنة بعينة المقارنة ADCs (c9G4-E13 وc9G4- G-13) في نموذج التطعيم الخارجي لـ MCF-7.

الأشكال ٢٤ أ وب: يقلل الرقم الهيدروجيني الحمضي من قدرة ربط الأجسام المضادة لـ IGF-1R المتوافقة مع البشر من نوع hz208F2 H076/L024 (A) و hz208F2(H077/L018 (B).

شكل رقم ٢٥: تقييم سمية C208F2-G-13 على الخلايا الطبيعية.

شكل رقم ٢٦: السمية الخلوية للصور المتوافقة مع البشر من hz208F2 المقترن بـ ز-١٣. تم أيضا إقران جسم مضاد غير ذي صلة C9G4 بنفس المركب.

شكل رقم ٢٧: تقييم في الجسم الحي لـ الصور المتوافقة مع البشر من 208F2- ز-١٣ مقابل C208F2-G-13 في نموذج التطعيم الخارجي لـ MCF-7.

الأشكال ٢٨ أ و: ٢٨ ب: تقييم في الجسم الحي سواء لـ c208F2-G-13 (٢٨ أ) أو hz208F2-4- G-13 (٢٨ ب) المحقون ٤ مرات بالمقارنة بـ مرة حقن واحدة في نموذج التطعيم الخارجي لـ MCF-7.

الأشكال ٢٩ أ و: ٢٩ ب: تقييم في الجسم الحي لـ c208F2-E-13 (٢٩ أ) و-c208F2-G 13 (٢٩ ب) في نموذج التطعيم الخارجي لـ CaOV-3.

<u>الوصف التفصيلي:</u>

- الجسم المضاد (Ab)

التعبيرات "الجسم المضاد"، "الأجسام المضادة" "ab"،"Ab"، "MAb" أو "جلوبيولين مناعي" تستخدم بنفس المعنى من المنظور الواسع وتتضمن الأجسام المضادة أحادية النسيلة، الأجسام المضادة المعزولة، أو المعالجة بالهندسة الوراثية، أو معاودة الارتباط (مثل الأجسام المضادة أحادية النسيلة ذات الطول الكامل أو السليمة)، الأجسام المضادة متعددة النسيلة، والأجسام المضادة متعددة التكافؤ أو الأجسام المضادة متعددة الخصوصية (مثل الأجسام المضادة ثنائية الخصوصية) وأيضا شظية الجسم المضادة، طالما أنها تظهر النشاط الحيوي المطلوب.

في أحد النماذج، الجسم المضاد لـ ADC الخاص بالاختراع يتكون من جسم مضاد معاود الارتباط. التعبير "الجسم المضاد معاود الارتباط" يشير إلى جسم مضاد ينتج من التعبير الوراثي عن DNA معاود الارتباط داخل الخلايا الحية. الجسم المضاد معاود الارتباط لـ ADC والخاص بالاختراع يتم الحصول على باستخدام الطرق المعملية الشائعة لمعاودة الارتباط، المعروفة للفرد المتمرس في هذا المجال، عمل متواليات DNA لا تكون موجودة في الكائنات الحيوية.

في نموذج آخر، الجسم المضاد لـ ADC الخاص بالاختراع يتكون من جسم مضاد مخلق كيميائيا.

بصفة خاصة، هذا الجزيء يتكون من بروتين سكري يشتمل على الأقل على سلسلتين ثقيلتين (H) وسلسلتين خفيفتين (L) متصلتين بينيا بواسطة روابط ثنائي كبريتيد. كل سلسلة ثقيلة تشتمل على

منطقة متغيرة للسلسلة الثقيلة (أو مجال) (يتم اختصارها هنا باسم HCVR أو VH) ومنطقة ثابتة للسلسلة الثقيلة. المنطقة الثابتة للسلسلة الثقيلة تشتمل على ثلاثة مجالات، CH1، CH2 و CH3. كل سلسلة خفيفة تشتمل على منطقة متغيرة للسلسلة الخفيفة (يتم اختصارها هنا باسم LCVR أو VL) ومنطقة ثابتة للسلسلة الخفيفة. المنطقة الثابتة للسلسلة الخفيفة تشتمل على مجال واحد،CL .

مناطق VH و VL يمكن تقسيمها أيضا إلى مناطق ذات درجة إتاحة فائقة، تسمى مناطق تحديد التكميل (CDR)، تتخللها مناطق أكثر محافظة، تسمى مناطق الإطار (FR). كل VH و VL تتكون من ثلاثة CDRs وأربعة FRs، مرتبة من أطراف أمينو إلى أطراف كربوكسي بالترتيب التالي: FR1، CDR1، FR2، CDR2، FR3، CDR3، FR4. المناطق المتغيرة في السلاسل الثقيلة والخفيفة تحتوي على مجال ربط يتداخل مع مولد الضد. المناطق الثابتة في الأجسام المضادة يمكن أن تتوسط ربط الجلوبيولين المناعي بالأنسجة أو العوامل المضيفة، بما في ذلك الخلايا المختلفة للنظام المناعي (مثلا خلايا المؤثر) والمكون الأول (Clq) لنظام التكميل التقليدي.

بواسطة "شظية رابطة لمولد الضد" أو "شظية رابطة لـ IGF-IR" لجسم مضاد للـ ADC وفقا للاختراع، وهو يشير إلى أي ببتيد، بولي ببتيد، أو بروتين يحتفظ بالقدرة على الربط بالهدف (يشار إليها بصفة عامة باسم مولد الضد) في الجسم المضاد.

في أحد النماذج، هذه " الشظايا الرابطة لمولد الضد" يتم اختيار من المجموعة التي تتكون من Fv، scFv (sc تعني سلسلة مفردة)، Fab، F(ab')2، Fab'، شظايا scFv-Fc H، أجسام مضادة ثنائية، أو أي شظية تزداد فترة نصف العمر لها بالتعديل الكيميائي، مثل إضافة بولي (ألكيلين) جليكول مثل بولي (إيثلين) جليكول ("PEGylation") (شظايا محتوية على بولي إيثلين جليكول تسمى Fv-PEG، scFv-PEG، Fab-PEG، F(ab')2-PEG أو (Fab'-PEG) ("PEG" تعني بولي (إيثلين) جليكول)، أو بالتضمين في جسيم دهني، يوجد في هذه الشظايا خاصية واحدة على الأقل CDRs للجسم المضاد وفقا للاختراع. من المفضل، "الشظية المذكورة الرابطة لمولد الضد" سيتم تشكيلها أو سوف تشتمل على متوالية جزئية لسلسلة متغيرة ثقيلة أو خفيفة في الجسم المضاد يتم اشتقاقهم منها، هذه المتوالية الجزئية تكفي للاحتفاظ بنفس خصوصية الربط مثل الجسم المضاد الذي نزلت منه وألفة كافية، يفضل أن تساوي على الأقل ١/١٠٠، بطريقة أكثر تفضيلا على الأقل ١/١٠، من ألفة الجسم المضاد الذي نزلت منه، بالنسبة للهدف.

الأكثر تفضيلا، "الشظايا الرابطة لمولد الضد" سيتم تشكيلها من أو سوف تشتمل على الأقل على ثلاثة CDRs CDR-H1، CDR-H2 وCDR-H3 من السلسلة الثقيلة المتغيرة و CDRs CDR-L1 الثلاثة،2 CDR-L وCDR-L3 في السلسلة الخفيفة المتغيرة في الجسم المضاد الذي تم اشتقاقها منه.

بتعبير "ربط"، "يرتبط"، أو ما شابه، يعني أن الجسم المضاد، أو أي شظية رابطة لمولد الضد منه، يشكل معقدا مع مولد ضد ثابت نسبيا في ظروف فسيولوجية. يمكن أن يتحدد الربط النوعي بثابت التحلل عند الاتزان الذي يبلغ على الأقل ١×١٠-٦ مولار. طرق تحديد ما إذا كان جزيئين سيرتبطان أم لا معروفة في هذا المجال وهي تشمل، على سبيل المثال، الفرز بالانتشار الغشائي عند التوازن، رنين البلازمون السطحي، الاختبارات بالوسم الإشعاعي وما شابه ذلك. لتجنب الشك، وهذا لا يعني ذلك أن الجسم المضاد المذكور لا يمكن أن يرتبط أو يتدخل، عند مستوى منخفض، مع جسم مضاد آخر. مع ذلك، كمثال على ذلك، يرتبط الجسم المضاد المذكور بمولد الضد المذكور فقط.

كما هو مستخدم في المواصفات الحالية، التعبير "جسم مضاد لـ IGF-1R" يجب تفسيره على أنه يشبه "جسم يضاد IGF-1R" ويشير إلى جسم مضاد قادر على الارتباط مع IGF-1R.

في أحد نماذج الاختراع الحالي، القمة اللاصقة للجسم المضاد يفضل أن توجد في المجال خارج الخلوي من IGF-1R البشري (يشار إليه أيضا باسم IGF-1R ECD).

في نموذج خاص، الجسم المضاد، أو أي شظية رابطة لمولد الضد منه، يكون قادرا على الارتباط مع IGF-1R بـ EC50 تكون بين ١٠×١٠-١٠ إلى ١×١٠-١٠، والأفضل بين ٨×١٠-١٠ إلى ٢×١٠-١٠.

التعبير نصف القيمة القصوى للتركيز الفعال (EC50) يناظر تركيز العقار، جسم مضاد أو مادة سامة تحث استجابة منتصف الطريق بين خط الأساس وأقصى قيمة بعد بعض زمن تعرض محدد. ويشيع استخدامه كمقياس لفعالية العقار. لذلك يمثل EC50 الاستجابة لمنحنى جرعة متدرجة تركيز مركب حيث تتم ملاحظة ٥٠ % من أقصى تفسير له. الـ EC50 لمنحنى الاستجابة للجرعة الكمية تمثل تركيز مركب يكون فيه ٥٠ % من المجموعة المختبرة يكون فيها استجابة، بعد

فترة تعرض محددة. قياسات التركيز تتبع نمطيا منحنى سيني، وتتزايد بسرعة خلال تغير بسيط نسبيا في التركيز. يتحدد ذلك رياضيا باشتقاق أفضل خط مواءمة.

كنموذج مفضل، الـ EC50، المحددة في الاختراع الحالي، تحدد فعالية الجسم المضاد عند ارتباطه مع الـ IGF-1R ECD المكشوف على خلايا الورم البشري. بارامتر EC50 يتحدد باستخدام تحليل FACS. بارامتر EC50 يعكس تركيز الجسم المضاد التي يتم عندها الحصول على ٥٠ % من الربط الأقصى على IGF-1R البشري المكشوف على خلايا الورم البشري. تم حساب كل قيمة لـ EC50 باعتبارها النقطة الوسيطة في منحنى الاستجابة للجرعة باستخدام برنامج مواءمة منحنى تراجع له أربع بارامترات (Prism Software). تم اختيار هذا البارامتر باعتباره مثلا للظروف الفسيولوجية/ المرضية.

التعبير "القمة اللاصقة" يشير إلى منطقة في مولد ضد ترتبط بجسم مضاد. القمم اللاصقة يمكن تحديدها باعتبارها بنائية أو وظيفية. القمم اللاصقة الوظيفية هي بصفة عامة مجموعة فرعية من القمم اللاصقة البينية وبها تلك الوحدات البنائية التي تسهم مباشرة في أُلفة التداخل. القمم اللاصقة يمكن أيضا أن تكون تكوينية، أي، تتكون من أحماض أمينية غير خطية. في نماذج معينة، القمم اللاصقة يمكن أن تشتمل على المحددات التي هي كيميائيا تجمعات سطحية نشطة من جزيئات مثل الأحماض الأمينية، والسلاسل الجانبية السكرية، ومجموعات الفسفوريل، أو مجموعات السلفونيل، وفي نماذج معينة، قد يكون لها خصائص هيكلية محددة ثلاثية الأبعاد، و/ أو خصائص شحنة محددة.

يمكن أن يتحدد التنافس في الارتباط مع IGF-1R بأي من الطرق أو التقنيات المعروفة للفرد المتمرس في هذا المجال مثل، على سبيل المثال لا الحصر، النشاط الإشعاعي، Biacore، ELISA، قياس التدفق الخلوي، إلخ. بتعبير "الذي يتنافس في الارتباط مع IGF-1R" يقصد منافسة لا تقل عن ٢٠ %، ويفضل ألا تقل عن ٥٠ % والأفضل ألا تقل عن ٧٠ %.

تحديد الارتباط مع نفس القمة اللاصقة يمكن أن يتم بأي طرق أو تقنيات معروفة للفرد المتمرس في هذا المجال مثل، على سبيل المثال لا الحصر، النشاط الإشعاعي، Biacore، ELISA، العد

الخلوي للتدفق، إلخ. بتعبير "التي تربط نفس القمة اللاصقة لـ IGF-1R"، يقصد التنافس بقيمة لا تقل عن ٢٠ %، ويفضل ألا تقل عن ٥٠ % والأفضل ألا تقل عن ٧٠ %.

كما سبق ذكره، وعلى عكس ما هو شائع، يركز الاختراع الحالي على أجسام مضادة لـ IGF-1R خاصة ذات قدرة عالية على الدخول بعد ربط IGF-1R. كما هو مستخدم هنا، الجسم المضاد الذي "يتم إدخاله" أو الذي "يتم جعله داخليا" (التعبيران لهما نفس المعنى) هو جسم مضاد يتم أخذه (بما يعني "إدخاله") بواسطة الخلية عند الارتباط مع IGF-1R في خلية لكائن ثديي. هذا الجسم المضاد مهم كجزء من ADC، لذلك فهو يحدد أو يوجه العامل المرتبط السام للخلايا إلى الخلايا السرطانية المستهدفة. بمجرد إدخاله، فإن العامل السام للخلايا يعمل على قتل الخلايا السرطانية.

بصورة مدهشة، فإن كل الأجسام المضادة وفقا للاختراع تقدم نفس المتواليات لـ CDR-H2، CDR-H3 وCDR-L2، الـ CDRs الثلاثة الأخرى مختلفة. تبدو هذه الملحوظة منطقية لأنها جزء من المعلومات العامة التي، فيما يتعلق بخصوصية ربط جسم مضاد، تعتبر أن CDR-H3 هو العامل الأهم والأكثر تأثيرا في التعرف على القمة اللاصقة.

يعتقد أن أهم مفاتيح النجاح عند العلاج بـ ADC هي خصوصية مولد الضد المستهدف واستيعاب معقدات مولد الضد – الجسم المضاد في الخلايا السرطانية. من الواضح أن مولدات الضد غير القابلة للاستيعاب، هي أقل فاعلية من مولدات الضد القابلة للاستيعاب عند توفير عوامل سامة للخلايا. عمليات الاستيعاب متغيرة عبر مولدات الضد، وتعتمد على بارامترات متعددة يمكن أن تتأثر بالأجسام المضادة.

في الـ ADC، العوامل السامة للخلايا تمنح النشاط السام للخلايا، وتكون الأجسام المضادة المستخدمة هي المسؤولة عن الخصوصية ضد الخلايا السرطانية، فضلا عن ناقل للدخول داخل الخلايا لتوجيه العامل السام للخلايا بشكل صحيح. وبالتالي لتحسين ADC، الجسم المضاد يمكن أن يظهر قدرة عالية على الدخول إلى الخلايا السرطانية المستهدفة. كفاءة عملية إدخال الجسم المضاد تختلف اختلافا كبير على القمة اللاصقة المستهدفة. اختيار قوية استيعاب الأجسام المضادة لـ IGF-1R يتطلب دراسة مختلف البيانات التجريبية ليس فقط التقليل المتحكم فيه لـ IGF-1R ولكن أيضا بعد إدخال الجسم المضاد المذكور في iGF-1R في الخلايا.

في أحد النماذج، إدخال الجسم المضاد لـ ADC وفقا للاختراع يمكن تقييم بواسطة التألق المناعي أو FACS (العد الخلوي للتدفق) (سيتم تقديم مثال له لاحقا في الطلب الحالي) أو أي طريقة أو عملية معروفة للفرد المتمرس في هذا المجال تكون خاصة بآلية الإدخال. في نموذج مفضل، الجسم المضاد أو الـ ADC وفقا للاختراع يمكن أن يحث الإدخال بعد الارتباط مع IGF-1R على الأقل ٣٠ %، ويفضل ٥٠ % والأفضل ٨٠ %.

يتم إدخال معقد IGF-1R/ الجسم المضاد بعد ربط الجسم المضاد بـ ECD لـ IGF-1R المذكور، ويتم حث تقليل كمية IGF-1R على سطح الخلايا. يمكن تقييم التقليل كميا بأي طريقة معروفة للفرد المتمرس في هذا المجال مثل western-blot، FACS، والتألق المناعي.

في أحد النماذج، هذا التقليل، والذي يعبر عن الإدخال، يمكن قياسه بصورة مفضلة بواسطة FACSوالتعبير عنه في صورة الفرق بين متوسط شدة التألق (MFI) المقاس عند ٤ °م مع الـ MFI المقاس عند ٣٧ °م بعد ٤ ساعات من الحضانة مع الجسم المضاد.

كمثال غير حصري، يتحدد هذا افرق استنادا إلى MF التي يتم الحصول عليها بخلايا غير معالجة وخلايا معالجة بالجسم المضاد باستخدام i) خلايا سرطان ثدي MCF7 بعد ٤ ساعات من الحضانة مع الجسم المضاد المشروح هنا وii) جسم مضاد ثانوي موسوم بـ Alexa488. يتحدد هذا البارامتر عند حسابه بالصيغة التالية: Δ(MFI٤°م - MFI٣٧°م).

هذا الفرق بين MFIs يعكس التقليل المتحكم فيه لـ IGF-1R لأن MFIs تتناسب مع IGF-1R المكشوف على سطح الخلية.

في صورة مفيدة، الأجسام المضادة تتكون من أجسام مضادة تنشط Δ(MFI٤°م - MFI٣٧°م) على MCF-7 بما لا يقل عن ٢٨٠، ويفضل بما لا يقل عن ٤٠٠.

بمزيد من التفصيل، يمكن قياس الفرق المذكور أعلاه وفقا للعملية التالية، والتي يجب اعتبارها مثالا توضيحيا وغير حصري:

أ) معالجة وحضانة خلايا الورم محل الاهتمام مع الجسم المضاد وفقا للاختراع في وسط مزرعة كامل سواء على البارد (٤ °م) أو على الساخن (٣٧ °م)؛

ب) معالجة الخلايا المعالجة في الخطوة أ) و، في نفس الوقت، الخلايا غير المعالجة بجسم مضاد ثانوي؛

ج) قياس الـ MFI (تمثل كمية الـ IGF-1R الموجودة على السطح) للخلايا المعالجة وغير المعالجة بجسم مضاد ثانوي موسوم قادر على الارتباط مع الجسم المضاد وفقا للاختراع؛ و

د) حساب الفرق بطرح قيمة الـ MFI التي تم الحصول عليها باستخدام الخلايا المعالجة من قيمة الـ MFI التي تم الحصول عليها باستخدام الخلايا غير المعالجة.

من هذا الفرق MFI، نسبة مئوية للإدخال يمكن أن تتحدد في صورة:

١٠٠× (MFI٤°م –MFI٣٧°م) / MFI ٤°م.

الأجسام المضادة لـ ADC وفقا للاختراع، تقدم، بصورة مفضلة، على MCF7 نسبة مئوية للإدخال تكون بين ٥٠ % و: ٩٩ %، ٧٠ % و: ٩٠ %، ويفضل بين ٧٥ % و: ٨٧ %.

تعتمد ميزة خاصة للأجسام المضادة المشروحة هنا على معدل إدخالها.

من المعروف بصفة عامة أنه، من ADC، من المرغوب فيه أن الأجسام المضادة المستخدمة تبدي معدلا سريعا للإدخال، ويفضل خلال ٢٤ ساعة من إعطاء الجسم المضاد، والأكثر تفضيلا خلال ١٢ ساعة، والأكثر تفضيلا خلال ٦ ساعات.

في الاختراع الحالي، معدل الإدخال، يشار إليه أيضا باسم تناقص ربط الجسم المضاد بسطح الخلية أو تحلل الجسم المضاد على سطح الخلية، يتم التعبير عنه في صورة t1/2 (نصف العمر) وهو يناظر الوقت اللازم للحصول على نقص قدره ٥٠ % من ΔMFI (سيتم فهم هذه السمة بوضوح في الأمثلة التالية).

تتمثل ميزة خاصة في أن الأجسام المضادة لـ ADC الخاص بالاختراع يكون لها t1/2 بين ٥ و: ٢٥ دقيقة، ويفضل بين ١٠ و: ٢٠ دقيقة.

يتعلق نموذج خاص من نماذج الاختراع بـ ADC حيث يشتمل الجسم المضاد Ab على ثلاثة من CDRs ذات السلسلة الثقيلة مع CDR-H2 للمتوالية رقم ٢ و CDR-H3 للمتوالية رقم ٣، وثلاثة من CDRs ذات السلسلة الخفيفة مع CDR-L2 للمتوالية رقم ٥.

يتعلق نموذج خاص من نماذج الاختراع بـ ADC حيث يشتمل الجسم المضاد Ab على الـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ١، ٢ و: ٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٤، ٥ و: ٦.

يشتمل أحد نماذج ADC على جسم مضاد يشتمل على الـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة والتي تشتمل على أو تتكون من المتواليات أرقام ١، ٢ و: ٣، أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % تطابُق مع المتواليات أرقام ١، ٢ أو ٣؛ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة خفيفة والتي تشتمل على أو تتكون من المتواليات أرقام ٤، ٥ و: ٦، أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٤، ٥ أو ٦.

في نموذج آخر، يشتمل الجسم المضاد، أو أي شظية رابطة لمولد الضد منه، على الـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة التي تتضمن المتواليات أرقام ١، ٢ و: ٣؛ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة خفيفة التي تتضمن المتواليات أرقام ٤، ٥ و: ٦.

الترقيم المتفرد لـ IMGT تحدد لمقارنة المجالات المتغيرة مهما كان مستقبل مولد الضد، نوع السلسلة، أو طبيعتها [/ Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. في الترقيم المتفرد لـ IMGT، الأحماض الأمينية المحافظة دائما ما يكون بها نفس الموضع، مثل سيستيين ٢٣ (1st-CYS)، تريبتوفان ٤١ (CONSERVED-TRP)، حمض أميني غير آلف للماء ٨٩، سيستيين ١٠٤ (nd-CYS٢)، فينيل ألانين أو تريبتوفان ١١٨ (J-PHE أو J-TRP). الترقيم المتفرد لـ IMGT يوفر تحديدا قياسيا لمناطق الإطار (FR1 -

IMGT: الموضع ١ إلى ٢٦، FR2-IMGT: ٣٩ إلى ٥٥، FR3 -IMGT: ٦٦ إلى ١٠٤ وIMGT- FR4: ١١٨ إلى ١٢٨) ومناطق التحديد التكميلية: CDR1-IMGT: ٢٧ إلى ٣٨، CDR2-IMGT: ٥٦ إلى ٦ ٥ وIMGT- CDR3: ١٠٥ إلى ١١٧. كفجوات تقدم مواقع شاغرة، فإن أطوال CDR-IMGT (موضحة بين أقواس ومفصولة بفاصل، مثل [٨-٨-١٣]) تصبح معلومات حاسمة. يتم استخدام الترقيم المتفرد لـ IMGT في التمثيلات البيانية ثنائية الأبعاد، والذي يأخذ الرمز IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)]، وفى البنيات ثلاثية الأبعاد في IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

يجب إدراك أنه، بدون خصائص متعارضة في الوصف الحالي، مناطق التحديد التكميلية أو CDRs، تعني المناطق فائقة الإتاحة في السلاسل الثقيلة والخفيفة في أنواع الجلوبيولين المناعي كما هو معرف وفقا لنظام الترقيم IMGT.

مع ذلك، يمكن أيضا تعريف CDRs وفقا لنظام ترقيم Kabat (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). هناك ثلاثة CDRs لسلاسل ثقيلة وثلاثة CDRs لسلاسل خفيفة. هنا، يتم استخدام التعبيرات "CDR" و"CDRs" لبيان، طبقا للحالة، واحد أو أكثر، أو حتى كل، المناطق التي تحتوي على معظم الوحدات البنائية للحمض الأميني المسؤولة عن ألفة ربط الجسم المضاد لمولد الضد أو القمة اللاصقة التي تتعرف عليها. لتسهيل قراءة الطلب الحالي، فإن الـ CDRs وفقا لـ Kabat غير محددة. مع ذلك، سيكون من الواضح للفرد المتمرس في هذا المجال، باستخدام تعريف الـ CDRsوفقا لـ IMGT، تعريف الـ CDRs وفقا لـ Kabat.

في سياق الاختراع الحالي، "الهوية" أو "نسبة الهوية" بين اثنتين من سلاسل الأحماض النووية أو الأحماض الأمينية تعني نسبة النيوكليوتيدات المطابقة أو الوحدات البنائية للحمض الأميني بين

اثنتين من المتواليات التي يمكن مقارنتها، والتي تم الحصول عليها بعد المواءمة المثلى، هذه النسبة هي إحصائية بحتة والفروق بين المتواليتين يتم توزيعها عشوائيا على طول امتدادها. يتم تقليديا إجراء المقارنة بين اثنين من سلاسل الأحماض أو الأحماض الأمينية النووية بمقارنة المتواليات بعد محاذاتها على النحو الأمثل، يمكن عمل هذه المقارنة بالقطعة أو باستخدام "نافذة محاذاة". المحاذاة المثالية للمتواليات التي تتم مقارنتها يمكن أن تتم، بالإضافة إلى المقارنة اليدوية، عن طريق خوارزمية التناظر المحلية لـ Smith and Waterman (1981) في [Ad. App. Math. 2: 482] ، عن طريق خوارزمية التناظر المحلية لـ Neddleman and Wunsch (1970)في [J. Mol. Biol. 48: 443] ، عن طريق طريقة البحث عن التشابه لـ Pearson and Lipman (1988) في [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444] أو بواسطة برمجيات كمبيوتر باستخدام هذه الخوارزميات (GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, or by the comparison software BLAST NR or BLAST P).

يتم احتساب النسبة المئوية الهوية من خلال تحديد عدد المواضع التي تكون فيها نوكليوتيدات الأحماض الأمينية أو وحداتها البنائية متطابقة بين اثنتين من المتواليات، ويفضل بين اثنتين من المتواليات الكاملة، وقسمة عدد المواضع المتطابقة على عدد المواضع في نافذة المحاذاة وضرب النتيجة في ١٠٠ للحصول على نسبة الهوية بين اثنتين من المتواليات.

على سبيل المثال، يمكن استخدام برنامج BLAST، "متواليات BLAST 2" (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences" , FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174 :247–250) المتوفر في الموقع http:/www./ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bL2.html، مع بارامتراته الطبيعية (بالتحديد البارامترات "عقوبة الفجوة المفتوحة": ٥، و"عقوبة فجوة الامتداد": ٢؛ تكون المصفوفة المختارة على سبيل المثال هي مصفوفة "BLOSUM 62" المقترحة بواسطة البرنامج) ؛ يتم حساب النسبة المئوية لتطابق الهوية بين المتواليتين مباشرة البرنامج.

بالنسبة لمتوالية الحمض الأميني التي تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % تطابُق مع متوالية حمض أميني مرجعية، تشمل الأمثلة المفضلة تلك التي تحتوي على المتوالية المرجعية، بعض التعديلات، لا سيما الحذف، أو الإضافة، أو الاستبدال لما لا يقل عن حمض أميني واحد، أو الاقتطاع أو التمديد. في حالة استبدال واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية المتتالية أو غير المتتالية، يفضل الاستبدال الذي يتم فيه إحلال الأحماض الأمينية "المكافئة" محل الأحماض الأمينية التي يتم استبدالها. هنا، التعبير "الأحماض الأمينية المكافئة" من المفترض أن يشير إلى أي أحماض أمينية من المرجح أن يتم الاستبدال فيها بأحد الأحماض الأمينية الهيكلية ولكن دون تعديل الأنشطة الحيوية للأجسام المضادة المقابلة ولتلك الأمثلة المحددة أدناه.

يمكن تحديد الأحماض الأمينية المكافئة استنادا إلى تماثلها الهيكلي مع الأحماض الأمينية التي يتم استبدالها بها أو إلى نتائج الاختبارات المقارنة للنشاط الحيوي بين الأجسام المضادة المختلفة التي يحتمل عملها.

كمثال غير حصري، يلخص جدول رقم ١ التالي حالات الاستبدال الممكنة التي يحتمل تنفيذها بدون أن ينتج عن ذلك تعديل كبير في للنشاط الحيوي للجسم المضاد المعدل المناظر؛ عمليات الاستبدال العكسية ممكنة بطبيعة الحال في نفس الظروف.

جدول رقم ١

الوحدة البنائية الأصلية	عملية (عمليات) الاستبدال
(A)Ala	Val, Gly, Pro
(R)Arg	Lys, His
(N)Asn	Gln
(D)Asp	Glu
(C)Cys	Ser

(Q)Gln	Asn
(E)Glu	Asp
(G)Gly	Ala
(H)His	Arg
(I)Ile	Leu
(L)Leu	Ile, Val, Met
(K)Lys	Arg
(M)Met	Leu
(F)Phe	Tyr
(P)Pro	Ala
(S)Ser	Thr, Cys
(T)Thr	Ser
(W)Trp	Tyr
(Y)Tyr	Phe, Trp
(V)Val	Leu, Ala

تتمثل سمة خاصة من سمات الاختراع في أن الجسم المضاد للـ ADC، لا يرتبط مع مستقبل الأنسولين (IR). هذه السمة مهمة لأن الجسم المضاد المشروح هنا لن يكون له أي تأثير سلبي على الـ IR، أي أيض الأنسولين.

في نموذج آخر، تتمثل سمة أخرى في أن الجسم المضاد لـ ADC الخاص بالاختراع قادر لعلى الارتباط ليس فقط مع IGF-1R البشري ولكن أيضا مع IGF-1R للقرد، وبصفة خاصة لـ

IGF-1R لقرد الرباح. هذه السمة مهمة أيضا لأنها تسهل اختبار السمية المطلوب من التجارب الإكلينيكية.

في نموذج آخر أيضا، الجسم المضاد لـ ADC الخاص بالاختراع يتكون من جسم مضاد أحادي النسيلة.

التعبير "جسم مضاد أحادي النسيلة" أو "Mab" كما هو مستخدم هنا يشير إلى جسم مضاد يتم الحصول عليه من مجموعة من أجسام مضادة متجانسة بصفة أساسية، أي الأجسام المضادة المنفصلة في المجموعة تكون متطابقة فيما عدا الطفرات الطبيعية المحتملة التي يمكن أن توجد بكميات ضئيلة. الأجسام المضادة أحادية النسيلة عالية الخصوصية، وتتجه إلى قمة لاصقة مفردة. هذا الجسم المضاد أحادي النسيلة يمكن إنتاجه بواسطة نسيلة مفردة في خلايا B أو الورم الهجين. الأجسام المضادة أحادية النسيلة يمكن أن تكون معاودة الارتباط أيضا، أي يمكن إنتاجها بواسطة هندسة البروتين أو التخليق الكيميائي. يمكن أيضا عزل الأجسام المضادة أحادية النسيلة من مكتبات الجسم المضاد الملتهم. بالإضافة إلى ذلك، على عكس مستحضرات الأجسام المضادة أحادية النسيلة والتي تحتوي نمطيا على أجسام مضادة متنوعة تتجه إلى محددات متنوعة، أو قمم لاصقة متنوعة، كل جسم مضاد أحادي النسيلة يتجه إلى قمة لاصقة مفردة في مولد الضد.

الجسم المضاد أحادي النسيلة هنا يحتوي على جسم مضاد من الفأر، متخالف الصبغيات، ومتوافق مع البشر، مثل ما سيتم شرحه لاحقا.

يفضل اشتقاق الجسم المضاد من ورم هجين من أصل من الفأر مودع في المجموعة الفرنسية لمزارع الكائنات الدقيقة (CNCM, Pasteur Institute, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France)، يتم الحصول على هذا الورم الهجين باندماج خلايا الطحال/ اللمفية من الفأر المطعمة بـ Balb/C وخلايا الورم النخاعي لسلالة Sp 2/O-Ag 14.

في أحد النماذج، الـ الجسم المضاد المذكور في iGF-1R لـ ADC الخاص بالاختراع يتكون من جسم مضاد من الفأر، يشار إليه بـ m [اسم الجسم المضاد].

في أحد النماذج، الـ الجسم المضاد المذكور في iGF-1R يتكون من جسم مضاد متخالف الصبغيات، يشار إليه بـ c [اسم الجسم المضاد].

في أحد النماذج، الـ الجسم المضاد المذكور في iGF-1R يتكون من جسم مضاد متوافق مع البشر، يشار إليه بـ hz [اسم الجسم المضاد].

لتجنب اللبس، في المواصفات التالية، التعبيرات "الجسم المضاد المذكور في iGF-1R" و"[اسم الجسم المضاد]" متشابهة وتشمل (بدون مواصفات مضادة) النُسَخ من الفأر، متخالفة الصبغيات، والمتوافقة مع البشر من الجسم المضاد المذكور IGF-1R أو من "[اسم الجسم المضاد] " المذكور. عند الضرورة، يتم استخدام السابقة m- (من الفأر)،c - (متخالف الصبغيات) أو hz- (متوافق مع البشر).

للمزيد من التوضيح، الجدول التالي ٢ يوضح متواليات CDR، المعرفة وفقا لـ IMGT، للأجسام المضادة المفضلة.

جدول رقم ٢

	السلسلة الثقيلة	السلسلة الخفيفة	المتوالية رقم
ذات إجماع	CDR-H1		١
	CDR-H2		٢
	CDR-H3		٣
		CDR-L1	٤
		CDR-L2	٥
		CDR-L3	٦
208F2	CDR-H1		٧
	CDR-H2		٢
	CDR-H3		٣

٩	CDR-L1		
٥	CDR-L2		
١١	CDR-L3		
٧		CDR-H1	212A11
٢		CDR-H2	
٣		CDR-H3	
١٠	CDR-L1		
٥	CDR-L2		
١١	CDR-L3		
٧		CDR-H1	214F8 & 213B10
٢		CDR-H2	
٣		CDR-H3	
٩	CDR-L1		
٥	CDR-L2		
١٢	CDR-L3		
٨		CDR-H1	219D6
٢		CDR-H2	
٣		CDR-H3	

		CDR-L1	٩
		CDR-L2	٥
		CDR-L3	١١

سوف يكون من الواضح للشخص ذي الخبرة في هذا المجال أن أي توليفة من ٦ CDRs كما سبق شرحه يجب اعتبارها جزءا من الاختراع الحالي.

كما يمكن ملاحظته من هذا الجدول ٢، فإن كل الأجسام المضادة المشروح هنا لها نفس المتواليات لـ CDR-H2، CDR-H3 وCDR-L2، لهذه الخاصية أهمية خاصة كما سبق شرحه.

هناك سمة خاصة تتعلق بـ ADC حينما يكون الجسم المضاد هو جسم مضاد من الفأر يتميز بأن الجسم المضاد المذكور يشتمل أيضا على مناطق ثابتة في السلاسل الخفيفة والثقيلة المشتقة من جسم مضاد من نوع يتشابه مع الفأر، وبالتحديد الإنسان.

تتعلق سمة أخرى محددة بـ ADC حيث الجسم المضاد يكون جسم مضاد متخالف الصبغيات (ج) يتميز بأن الجسم المضاد المذكور يشتمل أيضا على مناطق ثابتة في السلاسل الخفيفة والثقيلة مشتقين من جسم مضاد من نوع يتشابه مع الفأر، وبالتحديد الإنسان.

الجسم المضاد متخالف الصبغيات هو جسم مضاد يحتوي على منطقة متغيرة طبيعية (سلسلة خفيفة وسلسلة ثقيلة) مشتقة من جسم مضاد من نوع معين بالاشتراك مع مناطق ثابتة من السلسلة الخفيفة والسلسلة الثقيلة في جسم مضاد من أنواع مماثلة للنوع المطلوب.

يمكن تحضير الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية لمعاودة الارتباط. على سبيل المثال، يمكن إنتاج الجسم المضاد متخالف الصبغيات باستنساخ DNA معاود الارتباط يحتوي على محفز وترميز متوالية للمنطقة المتغيرة في جسم مضاد غير بشري وحيد النسيلة، وبالتحديد من الفأر، وترميز متوالية لمنطقة ثابتة في جسم مضاد من نوع مشابه، ويفضل البشر. جسم مضاد متخالف الصبغيات لـ ADC وفقا للاختراع والمرمز بواسطة أحد هذه المورثات معاودة الارتباط يمكن أن يكون، على سبيل المثال، خليط من الفأر والإنسان، خصوصية هذا

الجسم المضاد تتحدد بواسطة المنطقة المتغيرة المشتقة من DNA من الفأر والنوع الشبيه له الذي يتحدد بواسطة المنطقة الثابتة المشتقة من DNA بشري.

في نموذج مفضل، ولكنه غير حصري، الجسم المضاد لـ ADC الخاص بالاختراع يتم اختياره من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٣ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١؛

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٤ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٤ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ١٠، ٥ و: ١١؛

ج) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٥ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٥ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١٢؛

د) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٦ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٦ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١؛ و

هـ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٧ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٧ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١٢.

بتعبير "أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٣ إلى ١٧"، يكون المقصود هو تخصيص المتواليات التي تعطي الـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة المتواليات أرقام ١، ٢ و: ٣، وبالإضافة إلى ذلك، التي تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ %، كدرجة تطابُق مع كل المتوالية رقم ١٣ إلى ١٧ خارج المتواليات المناظرة لـ CDRs (مثل المتوالية رقم ١، ٢ و: ٣).

في نموذج آخر مفضل، ولكنه غير حصري، الجسم المضاد لـ ADC الخاص بالاختراع يتم اختياره من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ١٨ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٨ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣؛

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ١٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٩ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣؛

ج) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢٠ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢٠ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣؛

د) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢ ١ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢ ١ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٨، ٢ و: ٣؛ و

هـ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢٢ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢٢ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣.

بتعبير "أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٨ إلى ٢٢"، يكون المقصود هو التخصيص بالترتيب للمتواليات التي تعطي السلاسل الثلاثة الخفيفة CDRs المتواليات أرقام ٤، ٥ و: ٦، وبالإضافة إلى ذلك إلى ذلك، التي تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ %، كدرجة تطابُق مع كل المتوالية رقم ١٨ إلى ٢٢ خارج المتواليات المناظرة لـ CDRs (مثل المتوالية رقم ٤، ٥ و: ٦).

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث Ab هو جسم مضاد يتم اختياره من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٣ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٣ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ١٨ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٨؛

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٤ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٤ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ١٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٩؛

ج) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٥ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١ ٥ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢٠ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢٠؛

د) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٦ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٦ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢ ١ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢١؛ و

هـ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٧ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ١٧ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢٢ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢٢.

الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات المشروحة هنا يمكن أن تتحدد بواسطة المجال الثابت، وبصفة خاصة، يمكن اختيار الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات المذكورة أو تصميمها مثل، IgG1، IgG2، IgG3، IgM، IgA،IgD أو IgE وذلك على سبيل المثال لا الحصر. الأكثر تفضيلا، في سياق الاختراع الحالي، الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات المذكورة هي IgG1 أو IgG4.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث يكون Ab عبارة عن جسم مضاد متخالف الصبغيات يشتمل على مجالات متغيرة VH و VL كما سبق شرحه في الصيغة IgG1. الأكثر تفضيلا، أن يشتمل الجسم المضاد متخالف الصبغيات المذكور على مجال ثابت لـ VH للمتوالية رقم ٤٣ ومجال Kappa لـ VL للمتوالية رقم ٤٥.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث يكون Ab عبارة عن جسم مضاد متخالف الصبغيات يشتمل على مجالات متغيرة VH وVL كما سبق شرحه في الصيغة IgG4. الأكثر تفضيلا، الجسم المضاد متخالف الصبغيات المذكور تشتمل على مجال ثابت للـ VH للمتوالية رقم ٤٤ ومجال Kappa للـ VL للمتوالية رقم ٤٥.

في نموذج آخر مفضل، ولكنه غير حصري، الجسم المضاد لـ ADC الخاص بالاختراع يتم اختياره من:

أ) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٢٣ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢٣ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢٨ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢٨؛

ب) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٢٤ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢٤ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢٩؛

ج) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٢٥ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢ ٥ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٣٠ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٠؛

د) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٢٦ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢٦ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٣١ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣١؛ و

هـ) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٢٧ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٢٧ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٣٢ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٢.

للمزيد من التوضيح، الجدول التالي ٣ يوضح متواليات الـ VH وVL، بالترتيب، للأجسام المضادة المفضلة متخالفة الصبغيات.

جدول رقم ٣

	السلسلة الثقيلة	السلسلة الخفيفة	المتوالية رقم
c208F2	المجال المتغير (VH)		١٣
		المجال المتغير (VL)	١٨
	الطول الكامل		٢٣
		الطول الكامل	٢٨
m212A11	المجال المتغير (VH)		١٤
		المجال المتغير (VL)	١٩
	الطول الكامل		٢٤
		الطول الكامل	٢٩
c214F8	المجال المتغير (VH)		١٥
		المجال المتغير (VL)	٢٠
	الطول الكامل		٢٥
		الطول الكامل	٣٠
C219D6	المجال المتغير (VH)		١٦
		المجال المتغير (VL)	٢١
	الطول الكامل		٢٦
		الطول الكامل	٣١

c213B10	المجال المتغير (VH)		١٧
		المجال المتغير (VL)	٢٢
	الطول الكامل		٢٧
		الطول الكامل	٣٢

كما تتعلق سمة أخرى خاصة من سمات الاختراع الحالي بـ ADC حيث "Ab" هو جسم مضاد متوافق مع البشر يتميز بأن المناطق الثابتة في السلسلة الخفيفة والسلسلة الثقيلة المشتقة من جسم مضاد بشري تكون، بالترتيب، منطقة لامدا أو كابا وجاما -١، جاما -٢ أو جاما -٤.

"الأجسام المضادة المتوافقة مع البشر" تشير إلى جسم مضاد يحتوي على مناطق CDR مشتقة من جسم مضاد من أصل غير بشري، الأجزاء الأخرى من جزيء الجسم المضاد تكون مشتقة من واحد من (أو العديد من) الأجسام المضادة البشرية. بالإضافة إلى ذلك، يمكن تعديل بعض الوحدات البنائية لقطعة الهيكل (تسمى FR) للحفاظ على ألفة الربط.

يمكن تحضير الأجسام المضادة المتوافقة مع البشر أو شظايا منها بتقنيات معروفة للفرد ذي الحبرة في هذا المجال. هذه الأجسام المضادة المتوافقة مع البشر مفضلة لاستخدامها في طرق تتضمن التشخيص المعملي أو العلاج الوقائي و/ أو الدوائي في الجسم الحي. التقنيات الأحرى للتوافق مع البشر، والمعروفة أيضا للفرد ذي الحبرة في هذا المجال، مثل، على سبيل المثال، تقنية تطعيم "CDR"المشروحة بواسطة PDL في الطلب الأوروبي رقم ٠٤٥١٢١٦، الطلب الأوروبي رقم ٠٦٨٢٠٤٠، الطلب الأوروبي رقم ٠٩٣٩١٢٧، الطلب الأوروبي رقم ٠٥٦٦٦٤٧ أو البراءة الأمريكية رقم ٥٥٣٠١٠١، البراءة الأمريكية رقم ٦١٨٠٣٧٠، البراءة الأمريكية رقم ٥٥٨٥٠٨٩ والبراءة الأمريكية رقم ٥٦٩٣٧٦١. كما يمكن أيضا ذكر البراءة الأمريكية رقم ٥٦٣٩٦٤١ أو ٦٠٥٤٢٩٧، أو ٥٨٨٦١٥٢ و: ٥٨٧٧٢٩٣.

كنموذج خاص من نماذج الاختراع، وكما سيتم شرحه بمزيد من التفصيل في الأمثلة التالية، يتم هنا شرح جسم مضاد يتكون من الـ hz208F2. يمكن تطبيق هذا التوافق مع البشر على الجزء الآخر من الأجسام المضادة في الاختراع الحالي.

في نموذج مفضل، الجسم المضاد للـ ADC وفقا للاختراع الحالي يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة (VH) به:

i) الـ CDR-H1، CDR-H2 وCDR-H3 للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣، بالترتيب، و

ii) الـ FR1، FR2 وFR3 المشتقين من السلالة الجرثومية البشرية IGHV1-46*01 (المتوالية رقم ٤٦) ، و

iii) الـ F R4 المشتق من السلالة الجرثومية البشرية IGHJ4*01 (المتوالية رقم ٤٨).

في نموذج مفضل، الجسم المضاد للـ ADC وفقا للاختراع الحالي يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة (VL) به:

i) الـ CDR-L1، CDR-L2 وCDR-L3 للمتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١، بالترتيب، و

ii) الـ FR1، FR2 وFR3 المشتقين من السلالة الجرثومية البشرية IGKV1-39*01 (المتوالية رقم ٤٧) ، و

iii) الـ FR4 المشتق من السلالة الجرثومية البشرية IGKJ4*01 (المتوالية رقم ٤٩).

في نموذج مفضل، ولكنه غير حصري للاختراع، يشتمل الجسم المضاد على:

أ) سلسلة ثقيلة بها CDR-H1، CDR-H2 وCDR-H3 للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣، بالترتيب، وFR1، FR 2 وFR3 مشتقين من السلالة الجرثومية البشرية IGHV1-46*01 (المتوالية رقم ٤٦)، والـ FR4 المشتقة من السلالة الجرثومية البشرية IGHJ4*01 (المتوالية رقم ٤٨)؛ و

ب) سلسلة خفيفة بها CDR-L1، CDR-L 2 وCDR-L3 للمتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١، بالترتيب، وFR1، FR2 وFR3 مشتقين من السلالة الجرثومية البشرية IGKV1-39*01 (المتوالية رقم ٤٧)، والـ FR4 المشتقة من السلالة الجرثومية البشرية IGKJ4*01 (المتوالية رقم ٤٩).

في أحد النماذج، الجسم المضاد لـ ADC وفقا للاختراع يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة (VH) للمتوالية رقم ٣٣ ومجال متغير لسلسلة خفيفة (VL) للمتوالية رقم ٣٥. هذا الجسم المضاد المتوافق مع البشر سوف نسميه فيما يلي hz208F2 ("الصورة ١" أو "Var.1").

في نموذج آخر، الجسم المضاد لـ ADC وفقا للاختراع الحالي يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة (VH) للمتوالية رقم ٣٣ حيث هذه المتوالية رقم ٣٣ تشتمل على الأقل على ١ طفرة عكسية يتم اختيارها من الوحدات البنائية ٢٠، ٣٤، ٣٥، ٣٨، ٤٨، ٥٠، ٥٩، ٦١، ٦٢، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٧، ٧٩، ٨ ٢ و: ٩٥.

بالتعبيرات "طفرة عكسية" يقصد تحوُّل أو إحلال الوحدة البنائية البشرية الموجودة في سلالة الخلية بواسطة الوحدة البنائية المناظرة الموجودة أصلا في المتوالية من الفأر.

في نموذج آخر، الجسم المضاد لـ ADC وفقا للاختراع الحالي يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة (VH) للمتوالية رقم ٣٣ حيث هذه المتوالية رقم ٣٣ تشتمل على ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧، ٨، ٩، ١٠، ١١، ١٢، ١٣، ١٤، ١٥، ١٦ أو ١٧ الطفرات العكسية التي يتم اختيارها من الوحدات البنائية ٢٠، ٣٤، ٣٥، ٣٨، ٤٨، ٥٠، ٥٩، ٦١، ٦٢، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٧، ٧٩، ٨ ٢ و: ٩٥.

للمزيد من التوضيح، الجدول التالي ٤ يوضح الطفرات العكسية المفضلة.

جدول رقم ٤

رقم الوحدة البنائية	٢٠	٣٤	٣٥	٣٨	٤٨	٥٠	٥٩	٦١
فأر	M	I	Y	K	L	W	K	N
إنسان	V	M	H	R	M	I	S	A

رقم الوحدة البنائية	٦٢	٧٠	٧٢	٧٤	٧٦	٧٧	٧٩	٨٢	٩٥
فأر	E	L	A	K	S	N	A	F	F

إنسان	Q	M	R	T	T	S	V	E	Y

في أحد النماذج، الجسم المضاد للـ ADC وفقا للاختراع الحالي يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة (VL) للمتوالية رقم ٣٥، حيث هذه المتوالية رقم ٣٥ تشتمل على الأقل على ١ طفرة عكسية يتم اختيارها من الوحدات البنائية ٢٢، ٥٣، ٥٥، ٦٥، ٧١، ٧٢، ٧٧ و: ٨٧.

في أحد النماذج، الجسم المضاد للـ ADC وفقا للاختراع الحالي يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة (VL) للمتوالية رقم ٣٥، حيث هذه المتوالية رقم ٣٥ تشتمل على ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧ أو ٨ الطفرات العكسية الذي يتم اختياره من الوحدات البنائية ٢٢، ٥٣، ٥٥، ٦٥، ٧١، ٧٢، ٧٧ أو ٨٧.

في نموذج آخر، الجسم المضاد للـ ADC وفقا للاختراع الحالي يشتمل على:

أ) مجال متغير لسلسلة ثقيلة (VH) للمتوالية رقم ٣٣ حيث هذه المتوالية رقم ٣٣ تشتمل على الأقل على ١ طفرة عكسية يتم اختيارها من الوحدات البنائية ٢٠، ٣٤، ٣٥، ٣٨، ٤٨، ٥٠، ٥٩، ٦١، ٦٢، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٧، ٧٩، ٨ ٢ و: ٩٥؛ و

ب) مجال متغير لسلسلة خفيفة (VL) للمتوالية رقم ٣٥، حيث هذه المتوالية رقم ٣٥ تشتمل على الأقل على ١ طفرة عكسية يتم اختيارها من الوحدات البنائية ٢٢، ٥٣، ٥٥، ٦٥، ٧١، ٧٢، ٧٧ و: ٨٧.

للمزيد من التوضيح، الجدول التالي ٥ يوضح الطفرات العكسية المفضلة.

جدول رقم ٥

رقم الوحدة البنائية	٢٢	٥٣	٥٥	٦٥	٧١	٧٢	٧٧	٨٧
فأر	S	R	H	R	Y	S	N	F
إنسان	T	S	Q	S	F	T	S	Y

في مثل هذا النموذج، الجسم المضاد لـ ADC وفقا للاختراع يشتمل على كل الطفرات العكسية السابق ذكرها والتي تناظر جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة (VH) للمتوالية رقم ٣٤ ومجال متغير لسلسلة خفيفة (VL) للمتوالية رقم ٣٦. هذا الجسم المضاد المتوافق مع البشر سوف نسميه فيما يلي hz208F2 ("الصورة ٣" أو "Var.3").

في نموذج آخر، كل الصور المتوافقة مع البشر التي تكون بين الصورة ١ والصورة ٣ تقع أيضا في نطاق الاختراع الحالي. بتعبير آخر، الجسم المضاد وفقا للاختراع يناظر جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة (VH) للمتوالية "ذات إجماع " رقم ٤١ ومجال متغير لسلسلة خفيفة (VL) للمتوالية "ذات إجماع" رقم ٤٢. الجسم المضاد المذكور المتوافق مع البشر، ككل، سوف نسميه فيما يلي hz208F2 ("الصورة ٢" أو "Var.2").

في نموذج مفضل، ولكنه غير حصري، الجسم المضاد لـ ADC الخاص بالاختراع يتم اختياره من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٣ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % كتطابُق هوية مع المتوالية رقم ٣٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١؛ و

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٤ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % كتطابُق هوية مع المتوالية رقم ٣٤ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١.

بتعبير "أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٣ أو ٣٤"، يكون المقصود هو تخصيص المتواليات التي تعطي الـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة المتواليات أرقام ١، ٢ و: ٣، وبالإضافة إلى ذلك إلى ذلك، التي تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ %، كدرجة تطابُق مع كل المتوالية رقم ٣٣ أو ٣٤ خارج المتواليات المناظرة لـ CDRs (مثل المتواليات أرقام ١، ٢ و: ٣).

إذا لم يبين في الفقرات الخاصة، في الوصف الحالي، بأي متوالية أو متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع متوالية معينة، يجب إدراك أن المتوالية المذكورة تعطي على الأقل ٨٠ % ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % تطابُق مع المتوالية المرجعية. سواء احتوت هذه المتواليات

على متواليات CDR ، يكون المقصود هو تخصيص أن المتواليات التي تعطي على الأقل هذه الـ CDRs التي تتطابق مع المتوالية المرجعية CDRs، الـ ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ %، كتطابُق هوية مع المتوالية الكاملة يجب حسابه لباقي المتوالية الموجودة خارج المتواليات المناظرة لـ CDRs تلك.

في نموذج مفضل، ولكنه غير حصري، الجسم المضاد وفقا للاختراع يتم اختيارها من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٣٥ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % كتطابُق هوية مع المتوالية رقم ٣ ٥ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣؛ و

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٣٦ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % كتطابُق هوية مع المتوالية رقم ٣٦ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣.

بتعبير "أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٥ أو ٣٦"، يكون المقصود هو تخصيص المتواليات التي تعطي الـ CDRs الثلاثة للمتوالية الخفيفة المتواليات أرقام ٤، ٥ و: ٦، وبالإضافة إلى ذلك إلى ذلك، التي تعطي على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ %، كدرجة تطابُق مع كل المتوالية رقم ٣٥ أو ٣٦ خارج المتواليات المناظرة لـ CDRs (مثل المتواليات أرقام ٤، ٥ و: ٦).

الأجسام المضادة المتوافقة مع البشر المشروحة هنا يمكن أن تتحدد بواسطة المجال الثابت، وبصفة خاصة، يمكن اختيار أو تصميم الأجسام المضادة المذكورة المتوافقة مع البشر مثل، IgG1، IgG2، IgG3، IgM، IgA، IgD أو IgE، وذلك على سبيل المثال لا الحصر. الأكثر تفضيلا، في سياق الاختراع الحالي، الأجسام المضادة المذكورة المتوافقة مع البشر هي IgG1 أو IgG4.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث "Ab" هو جسم مضاد متوافق مع البشر يشتمل على مجالات متغيرة VH و VLكما سبق شرحه في الصيغة IgG1. الأكثر تفضيلا، هذا الجسم

المضاد المتوافق مع البشر يشتمل على مجال ثابت لـ VH للمتوالية رقم ٤٣ ومجال كابا لـ VL للمتوالية رقم ٤٥.

يتعلق أحد نماذج الاختراع بـ ADC حيث "Ab" هو جسم مضاد متوافق مع البشر يشتمل على مجالات متغيرة VH و VLكما سبق شرحه في الصيغة IgG4. الأكثر تفضيلا، أن يشتمل هذا الجسم المضاد المتوافق مع البشر على مجال ثابت لـ VH للمتوالية رقم ٤٤ ومجال كابا لـ VL للمتوالية رقم ٤٥.

يتعلق نموذج آخر من نماذج هذا الاختراع أيضا بـ ADC حيث "Ab" هو جسم مضاد يتم اختياره من:

أ) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٧ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٧ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٣٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٩؛ و

ب) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٨ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٣٨ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٤٠ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٤٠.

للمزيد من التوضيح، الجدول التالي ٦ أ يوضح أمثلة غير حصرية لمتواليات الـ VH وVL للصورة ١ (Var.1) والصورة ٣ (Var.3) للجسم المضاد المتوافق مع البشر hz208F2. وهو يشتمل أيضا على متوالية ذات إجماع للصورة ٢ (Var.2).

جدول رقم ٦ أ

	السلسلة الثقيلة	السلسلة الخفيفة	المتوالية رقم
hz208F2 (var. 1)	المجال المتغير (VH)		٣٣
		المجال المتغير (VL)	٣٥
	الطول الكامل		٣٧

		الطول الكامل	٣٩
hz208F2 (Var. 3)	المجال المتغير (VH)		٣٤
		المجال المتغير (VL)	٣٦
	الطول الكامل		٣٨
		الطول الكامل	٤٠
hz208F2 (Var. 2)	المجال المتغير (VH)		٤١
		المجال المتغير (VL)	٤٢

في نموذج آخر مفضل، ولكنه غير حصري، الجسم المضاد لـ ADC الخاص بالاختراع يتم اختياره من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ و: ٨٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % كتطابُق هوية مع المتوالية رقم ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ و: ٨٠؛ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١؛

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % كتطابُق هوية مع المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠؛ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و: ٣؛ و

ج) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ و: ٨٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % كتطابُق هوية مع المتواليات أرقام ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ و: ٨٠؛ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها متوالية يتم

اختيارها من المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ %، ويفضل ٨٥ %، ٩٠ %، ٩٥ % و: ٩٨ % كتطابُق هوية مع المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠.

يتعلق نموذج آخر من نماذج هذا الاختراع أيضا بـ ADC حيث الجسم المضاد "Ab"يتم اختياره من:

أ) جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتواليات أرقام ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ و: ٨٠ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ أو ٨٠، وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٧؛ و

ب) جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتواليات أرقام ٥٦، ٦٤، ٦٨ و: ٧٨ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٦، ٦٤، ٦٨ أو ٧٨ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦٠، أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦٠.

يتعلق نموذج آخر من نماذج هذا الاختراع أيضا بـ ADC حيث Ab هو جسم مضاد يتم اختياره من:

أ) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٥٨ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٨ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩؛

ب) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٥٨ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٨ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦١ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦١؛

ج) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٣ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦٣ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩؛

د) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٥ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦ ٥ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩؛

هـ) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٥ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦ ٥ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦ ١ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦١؛

و) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٧ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦٧ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩؛

ز) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦٩ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩؛

ح) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦٩ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦ ١ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦١؛

ط) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧ ١ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٧ ١ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩؛

ي) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٣ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٧٣ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩؛

ك) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٥ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٧ ٥ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩؛

ل) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٧ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٧٧ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩؛

م) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٧٩ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩؛

ن) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٧٩ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦ ١ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٦١؛ و

س) جسم مضاد يشتمل على أو يتكون من سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٨ ١ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٨ ١ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩ أو أي متوالية تعطي على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٩.

بتعبير آخر، يتعلق الاختراع بـ ADC حيث Ab هو جسم مضاد يشتمل على:

أ) سلسلة ثقيلة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٨، ٦٣، ٦٥، ٦٧، ٦٩، ٧١، ٧٣، ٧٥، ٧٧، ٧٩ و: ٨ ١ أو أي سلسلة بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٨، ٦٣، ٦٥، ٦٧، ٦٩، ٧١، ٧٣، ٧٥، ٧٧، ٧٩ و: ٨١؛ و

ب) سلسلة خفيفة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٩ و: ٦ ١ أو أي سلسلة بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٩ و: ٦١.

للمزيد من التوضيح، الجدول التالي ٦ ب يوضح أمثلة غير حصرية لمتواليات الـ VH و VL (مجال متغير وطول كامل) لصور مختلفة للجسم المضاد المتوافق مع البشر hz208F2.

جدول رقم ٦ ب

	السلسلة الثقيلة	السلسلة الخفيفة	المتوالية رقم
hz208F2 H037/L018	المجال المتغير (VH)		٥٦
		المجال المتغير (VL)	٥٧
	الطول الكامل		٥٨
		الطول الكامل	٥٩
Hz208F2 H037/L021	المجال المتغير (VH)		٥٦
		المجال المتغير (VL)	٦٠
	الطول الكامل		٥٨
		الطول الكامل	٦١
Hz208F2 H047/L018	المجال المتغير (VH)		٦٢
		المجال المتغير (VL)	٥٧
	الطول الكامل		٦٣
		الطول الكامل	٥٩
Hz208F2 H049/L018	المجال المتغير (VH)		٦٤
		المجال المتغير (VL)	٥٧
	الطول الكامل		٦٥
		الطول الكامل	٥٩

Hz208F2 H049/L021	المجال المتغير (VH) الطول الكامل	المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٦٤ ٦٠ ٦٥ ٦١
Hz208F2 H051/L018	المجال المتغير (VH) الطول الكامل	المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٦٦ ٥٧ ٦٧ ٥٩
Hz208F2 H052/L018	المجال المتغير (VH) الطول الكامل	المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٦٨ ٥٧ ٦٩ ٥٩
Hz208F2 H052/L021	المجال المتغير (VH) الطول الكامل	المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٦٨ ٦٠ ٦٩ ٦١
Hz208F2 H057/L018	المجال المتغير (VH) الطول الكامل	المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٧٠ ٥٧ ٧١

		الطول الكامل	٥٩
Hz208F2 H068/L018	المجال المتغير (VH) الطول الكامل	المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٧٢ ٥٧ ٧٣ ٥٩
Hz208F2 H070/L018	المجال المتغير (VH) الطول الكامل	المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٧٤ ٥٧ ٧٥ ٥٩
Hz208F2 H071/L018	المجال المتغير (VH) الطول الكامل	المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٧٦ ٥٧ ٧٧ ٥٩
Hz208F2 H076/L018	المجال المتغير (VH) الطول الكامل	المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٧٨ ٥٧ ٧٩ ٥٩
	المجال المتغير (VH)		٧٨

Hz208F2 H076/L021		المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٦٠ ٧٩ ٦١
Hz208F2 H077/L018	المجال المتغير (VH) الطول الكامل	المجال المتغير (VL) الطول الكامل	٨٠ ٥٧ ٨١ ٥٩

تتمثل سمة أخرى من سمات الاختراع الحالي في ADC حيث Ab هو جسم مضاد يتم اختياره من i) جسم مضاد يتم إنتاجه بواسطة ورم هجين ا-٤٧٥٧، ا-٤٧٧٣، ا- ٤٧٧٥، ا-٤٧٣٦ أو ا-٤٧٧٤ المودع في الـ CNCM، Institut Pasteur France في ٣٠ مايو ٢٠١٣، ٢٦ يوليو ٢٠١٣، ٢٦ يونيو ٢٠١٣، ٢٤ أبريل ٢٠١٣ و: ٢٦ يونيو ٢٠١٣، بالترتيب، أو ii) جسم مضاد يتنافس للارتباط مع IGF-1R مع الجسم المضاد في i)؛ أو iii) جسم مضاد يرتبط مع نفس القمة اللاصقة لـ IGF-1R مثل الجسم المضاد في i).

بالفعل، تم هنا شرح الورم الهجين في الفأر الذي يتم اختياره من الورم الهجين ا-٤٧٥٧، ا-٤٧٧٣، ا-٤٧٧٥ -ا، ا-٤٧٣٦ وا-٤٧٧٤ المودع في الـ CNCM،Institut Pasteur France في ٣٠ مايو ٢٠١٣، ٢٦ يوليو ٢٠١٣، ٢٦ يونيو ٢٠١٣، ٢٤ أبريل ٢٠١٣ و: ٢٦ يونيو ٢٠١٣، بالترتيب.

كما تم أيضا شرح ترميز الحمض النووي المعزول لجسم مضاد، أو لشظية رابطة لمولد الضد منه، وفقا للاختراع.

التعبيرات "حمض نووي"، "متوالية نووية"، "متوالية حمض نووي"، "عديد نيوكليوتيد"، "قليل نيوكليوتيد"، "متوالية عديد نيوكليوتيد" و"متوالية نيوكليوتيد"، والتي تستخدم للدلالة على نفس المعنى في الوصف الحالي، تعني متوالية دقيقة من النيوكليوتيدات، المعدلة أو غير المعدلة، تحدد شظايا

أو منطقة في حمض نووي، تحتوي على نيكليوتيدات طبيعية أم لا، وسواء كانت DNA مزدوج الجديلة، DNA مفرد الجديلة أو نواتج نسخ من الـ DNAs المذكورة.

تم عزل هذه المتواليات و/ أو تنقيتها، أي تم أخذ عينات منها بطريقة مباشرة أو غير مباشرة، على سبيل المثال بواسطة نسخة، وتم تعديل بيئتها جزئيا على الأقل. الأحماض النووية المعزولة التي يتم الحصول عليها بواسطة عمليات الهندسة الوراثية لمعاودة الارتباط، بواسطة، على سبيل المثال، خلايا مضيفة، أو التي يتم الحصول عليها بالتخليق الكيميائي يجب أيضا ذكرها هنا.

كما تم أيضا شرح ناقل يشتمل على ترميز حمض نووي لجسم مضاد، أو لشظية رابطة لمولد الضد منه، للـ ADC وفقا للاختراع، بصفة خاصة ناقلات النسخ و/ أو التعبير التي تحتوي على متوالية نيوكليوتيد.

يفضل أن تحتوي الناقلات على عناصر تسمح بالتعبير و/ أو الإفراز لمتواليات نيوكليوتيد في خلية مضيفة معينة. بالتالي قد تحتوي الناقلات على معزز، وإشارات بدء وإنهاء الترجمة الوراثية، وكذلك مناطق تنظيم النسخ المناسبة. يجب أن تكون قابلة للحفاظ عليها بصورة ثابتة في الخلية المضيفة وقد يكون بها، اختياريا، إشارات محددة تحدد إفراز البروتين الذي تتم ترجمته وراثيا. يتم اختيار هذه العناصر المختلفة ووضعها في الصورة المثالية بواسطة شخص من ذوي الخبرة في هذا المجال وفقا للخلية المضيفة المستخدمة. لهذا الغرض، متواليات النيوكليوتيد يمكن إدراجها في ناقلات التكرار الذاتي داخل المضيف المختار أو تكون ناقلات تكاملية للمضيف الذي تم اختياره.

تكون الناقلات، على سبيل المثال، ذات أصل بلازميدي أو فيروسي. يتم استخدامها لنقل الخلايا المضيفة لنسخ أو التعبير عن متواليات النيوكليوتيد الخاصة بالاختراع.

يتم تحضير هذه الناقلات بطرق تستخدم على وجه التحديد بواسطة فرد متمرس في هذا المجال ويمكن إدخال المستنسخات الناتجة إلى مضيف مناسب بطرق قياسية مثل الحقن بجسيم دهني، التثقيب الكهربي، الترافق، أو الصدمة الحرارية أو طرق كيميائية.

يتم تحويل هذه الخلايا المضيفة المعزولة بواسطة ناقل، أو تضمينها ناقل كما سبق شرحه.

يمكن اختيار الخلية المضيفة من بين أنظمة بدائية النواة أو حقيقية النواة مثل الخلايا البكتيرية، على سبيل المثال، وأيضا خلايا الخميرة أو الخلايا الحيوانية، وبالذات الخلايا الحيوانية (باستثناء الإنسان). كما يمكن استخدام خلايا الحشرات والنبات.

كما تم أيضا الكشف عن طريقة لإنتاج لجسم مضاد للـ ADC وفقا للاختراع، أو شظية رابطة لمولد الضد منه، حيث تشتمل الطريقة المذكورة على الخطوات التالية:

أ) عمل مزرعة في وسط وظروف مناسبين للخلية العائلة كما سبق الكشف عنه؛ و

ب) استخلاص الجسم المضاد الناتج بهذه الطريقة من وسط المزرعة أو من الخلايا المستزرعة المذكورة.

تستخدم الخلايا المتحولة في طرق تحضير الأجسام المضادة معاودة الارتباط للـ ADC وفقا للاختراع. طرق تحضير الأجسام المضادة في صورة معاودة الارتباط باستخدام ناقل و/ أو خلية محولة بواسطة ناقل كما سبق الكشف عنه، تشملها المواصفات الحالية. من المفضل، أن يتم عمل مزرعة للخلية المتحولة بواسطة ناقل كما سبق شرحه في ظروف تسمح بالتعبير الوراثي عن الجسم المضاد المذكور واستخلاص هذا الجسم المضاد.

كما سبق ذكره بالفعل، يمكن اختيار الخلية المضيفة من بين أنظمة بدائية النواة أو حقيقية النواة. بصفة خاصة، يمكن تحديد متواليات نيوكليوتيد تسهل الإفراز في هذه الأنظمة بدائية النواة أو حقيقية النواة. يمكن استخدام الناقل، كما سبق الكشف عنه، والذي يحمل هذه المتوالية، بصورة مفيدة لإنتاج بروتينات معاودة الارتباط مطلوب إفرازها. بالفعل، تنقية هذه البروتينات معاودة الارتباط محل الاهتمام سوف يصبح أكثر سهولة لأنها توجد في السائل الطافي في المزرعة الخلوية وليس داخل الخلايا المضيفة.

كما يمكن تحضير الجسم المضاد للـ ADC في الاختراع الحالي بواسطة التخليق الكيميائي. تعتبر إحدى طرق التخليق هذه من أهداف الاختراع. الفرد المتمرس في هذا المجال يدرك طرق التخليق الكيميائي، مثل تقنيات الحالة الصلبة أو تقنيات الحالة الصلبة الجزئية، بتكثيف الشظايا أو بالتخليق التقليدي في محلول. يمكن أيضا ذكر عديدات الببتيد التي يتم الحصول عليها بواسطة التخليق الكيميائي والقادرة على احتواء الأحماض الأمينية الطبيعية المناظرة.

الجسم المضاد الذي يمكن الحصول عليه بالطرق السابق شرحها يقع أيضا في نطاق الاختراع الحالي.

وفقا لجانب خاص، يتعلق الاختراع بـ ADC حيث AB هو جسم مضاد، أو شظية رابطة لمولد الضد منه، كما سبق شرحه للاستخدام كناقل تحديد لتوصيل عامل سام للخلايا إلى موقع مستهدف في الخلية المضيفة، هذا الموقع المستهدف في المضيف يتكون من القمة اللاصقة الموجودة في IGF-1R، ويفضل الـ IGF-1R المجال خارج الخلوي، الأكثر تفضيلا IGF-1R البشري (المتوالية رقم ٥٠) والأكثر تفضيلا IGF-1R البشري المجال خارج الخلوي (المتوالية رقم ٥١)، والأكثر تفضيلا أيضا الطرفية N- في IGF-1R البشري المجال خارج الخلوي (المتوالية رقم ٥٢)، أو أي متوالية متغيرة طبيعية منه.

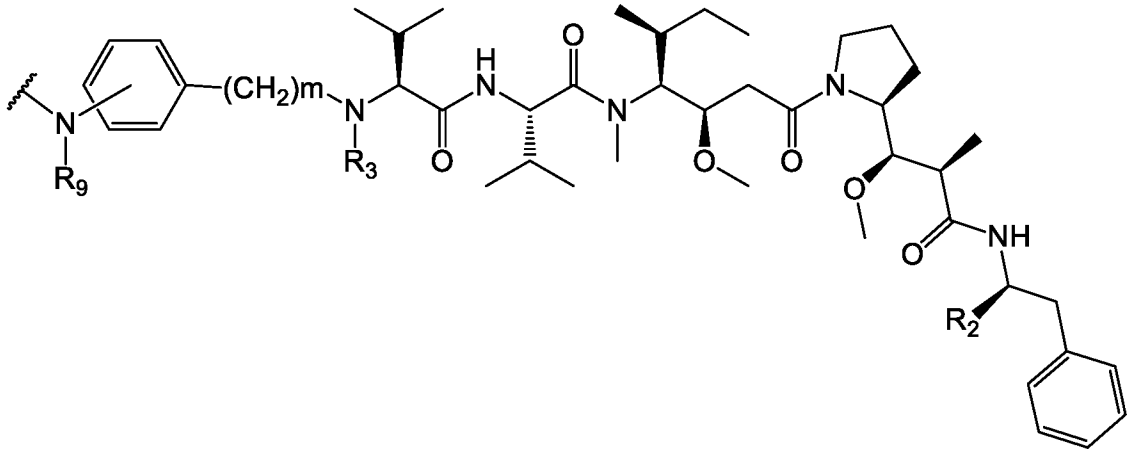
في نموذج مفضل، هذا الموقع المستهدف في الخلية المضيفة هو موقع مستهدف في خلية ثديية، والأكثر تفضيلا في خلية بشرية، والأكثر تفضيلا خلايا تعبر بصورة طبيعية أو بمعاودة الارتباط الجيني عن،IGF-1R .

في نموذج آخر، هذا الموقع المستهدف في الخلية المضيفة هو موقع مستهدف في خلية في مريض، ويفضل البشر، المصابين بالسرطان، ويفضل السرطان الذي يعبر وراثيا عن IGF-1R، أو السرطانات المتعلقة بـ IGF-1R.

السرطانات التي يعبر وراثيا عن IGF-1R أو السرطانات المتعلقة بـ IGF-1R تتضمن بصفة خاصة السرطانات التي تعبر فيها خلايا الورم، أو تعبر بصورة مفرطة، عن كل أو جزء من الـ IGF-1R على سطحها.

II- العقار (D)

جزء العقار وفقا للاختراع له الصيغة التالية (II)



حيث:

- R2 هي COOH، COOCH3 أو ثيازوليل (مثل ثيازول -٢-يل)،

- R3 هي H أو (C1-C6) ألكيل (مثل ميثيل)، خصوصا مجموعة (C1-C6) ألكيل،

- R9 هي H أو (C1-C6) ألكيل (مثل ميثيل)،

- m هي عدد صحيح يتراوح بين ١ و: ٨، و

- الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع L.

بتعبير "ألكيل" في الاختراع الحالي يكون المقصود هو هيدروكربون مشبع ذي سلسلة مستقيمة أو متفرعة. على سبيل المثال، يمكن ذكر مجموعات الميثيل، الايثيل، البروبيل، الأيزوبروبيل، البيوتيل، الأيزوبوتيل، s- بوتيل، t- بوتيل، بنتيل أو هكسيل.

بتعبير "(Cx-Cy) ألكيل" في الاختراع الحالي يكون المقصود هو سلسلة ألكيل مثل السابق تعريفها والتي تشتمل على x إلى y ذرة كربون. لذلك، فإن مجموعة (C1-C6) ألكيل هي سلسلة ألكيل بها ١ إلى ٦ ذرة كربون.

الـ (C1-C6) ألكيل من المفضل أن تكون (C1-C4) ألكيل، والأفضل (C1-C2) ألكيل.

من بين مركبات الاختراع، هناك فئة هامة بصفة خاصة من جزء العقار تناظر أجزاء العقار من الصيغة (ii) والتي تمثل فيها R2 مجموعة COOH.

هناك فئة أخرى هامة بصفة خاصة من جزء العقار تناظر أجزاء العقار من الصيغة (ii) التي فيها R2 هي ثيازول (وخصوصا مجموعة ثيازول -٢-يل).

هناك فئة أخرى هامة بصفة خاصة من جزء العقار تناظر أجزاء العقار من الصيغة (ii) التي فيها R2 هي COOMe.

وفقا لنموذج خاص من نماذج الاختراع الحالي، R2 تكون بصفة خاصة مجموعة COOH، COOMe أو ثيازول -٢-يل.

وفقا لنموذج أول مفضل، R2 هي COOH.

وفقا لنموذج ثان مفضل، R2 هي COOMe.

R3 تمثل بصفة خاصة (C-1-C6) ألكيل، وبصورة مفيدة مجموعة ميثيل.

m هي عدد صحيح يتراوح بين ١ و: ٨، وخصوصا بين ١ و: ٦، وبصورة مفيدة بين ١ و: ٤، ويفضل ١ أو ٢.

في نموذج مفضل، R2 هي COOH، R3 هي مجموعة ميثيل و m هي ١ أو ٢.

من بين أجزاء العقار وفقا للاختراع، هناك فئة أخرى هامة بصفة خاصة من أجزاء العقار تناظر أجزاء العقار من الصيغة (ii) التي فيها R9 هي مجموعة ميثيل أو هيدروجين.

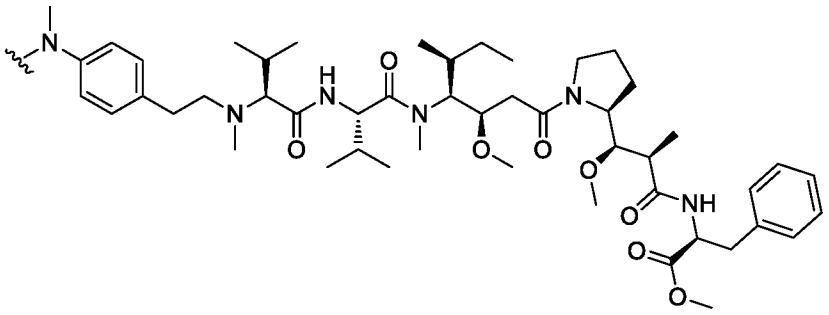
في نموذج مفضل:

- R2 هي COOH، R3 هي مجموعة ميثيل، R9 هي مجموعة ميثيل و m هي ١ أو ٢، أو

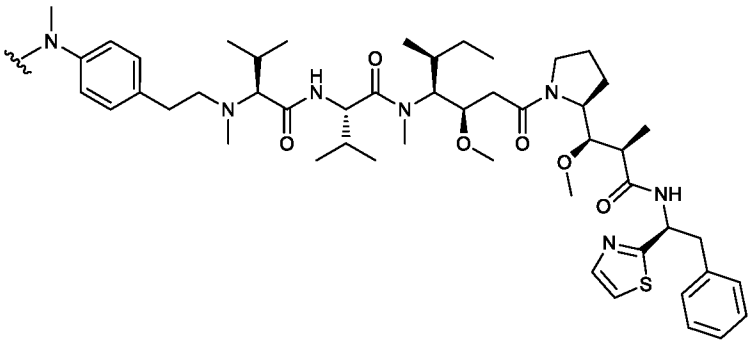
- R2 هي COOH، R3 هي مجموعة ميثيل، R9 هي هيدروجين و m هي ١ أو ٢.

وفقا لنموذج مفضل، توجد مجموعة NR9 على حلقة الفينيل في الموضع بارا بالنسبة لمجموعة m(CH2) .

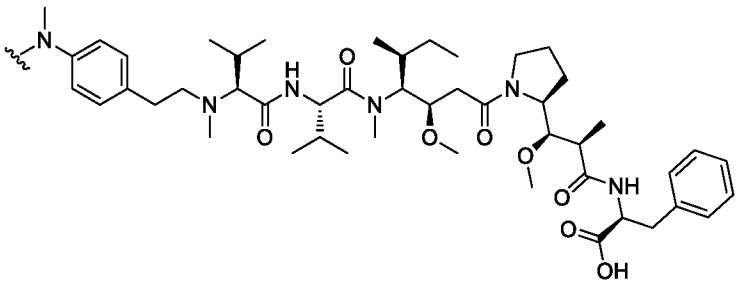
بصورة مفيدة، يتم اختيار جزء العقار من بين الأجزاء التالية:



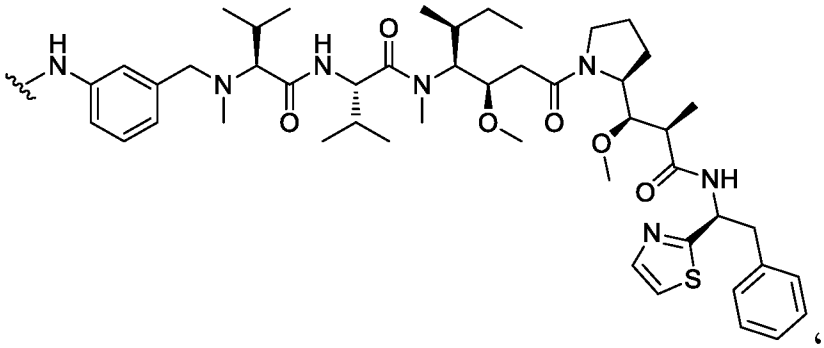
،



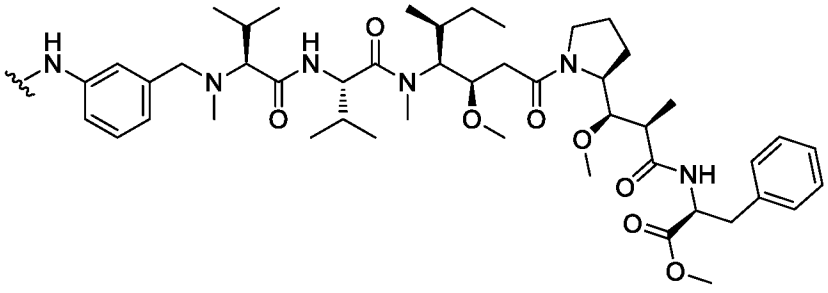
،



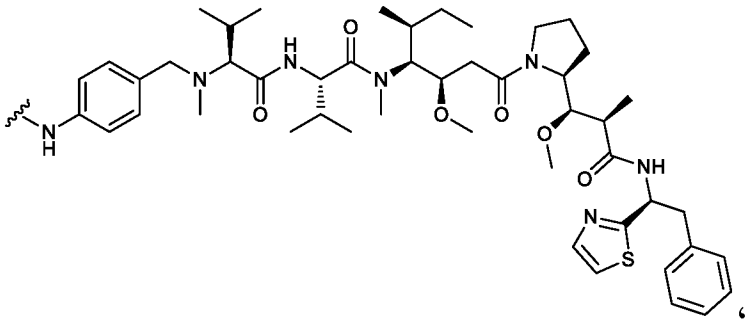
،



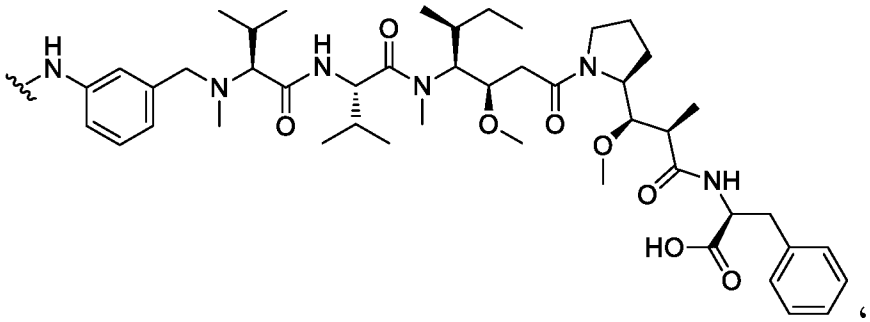
،



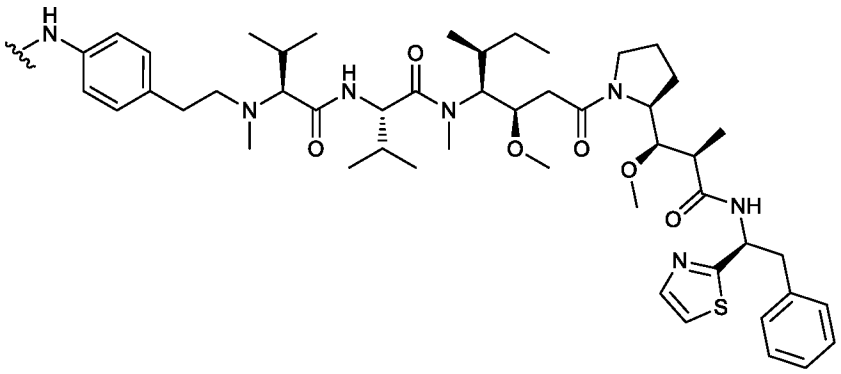
، ٥



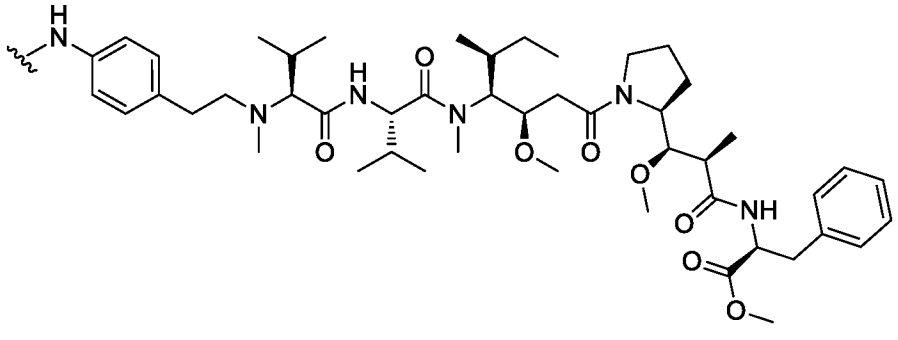
،



،

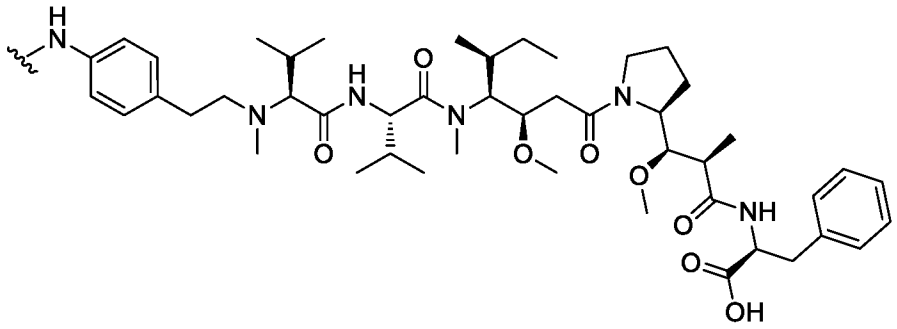


،



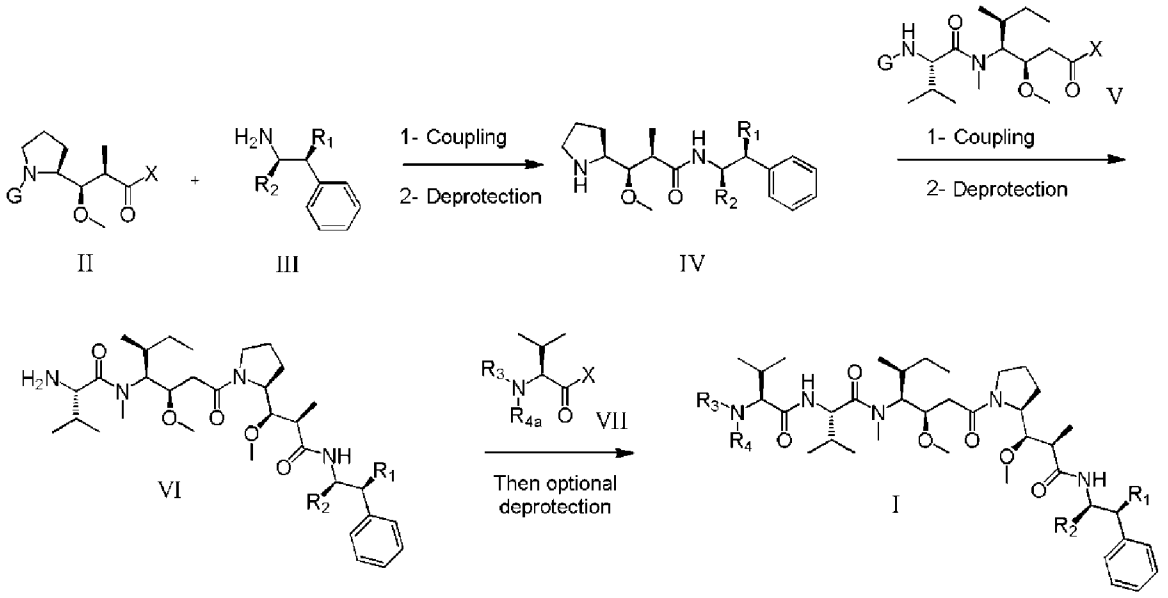
،

و



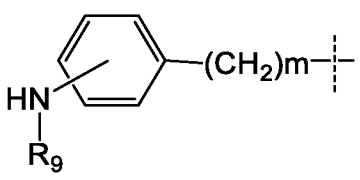
تحضير العقار (من الصيغة DH):

يمكن تحضير العقار باستخدام الطرق العامة الواردة في مخططات التخليق التالية، والتي يتم اختياريا تكميلها بأي عملية قياسية عند الحاجة مثل ما هو موضح في المراجع أو المعروف للأشخاص ذوي الخبرة في هذا المجال، أو ما يتم وصفه في الأمثلة في الجزء التجريبي من هذا القانون.



مخطط رقم ١

مخطط رقم ١ يوضح طريقة عامة أولى يمكن استخدامها لتحضير العقار. في الصيغ العامة السابقة، H= R1 ، R2 و R3 هي كما سبق تعريفها بالنسبة للصيغة II، R4 تمثل،

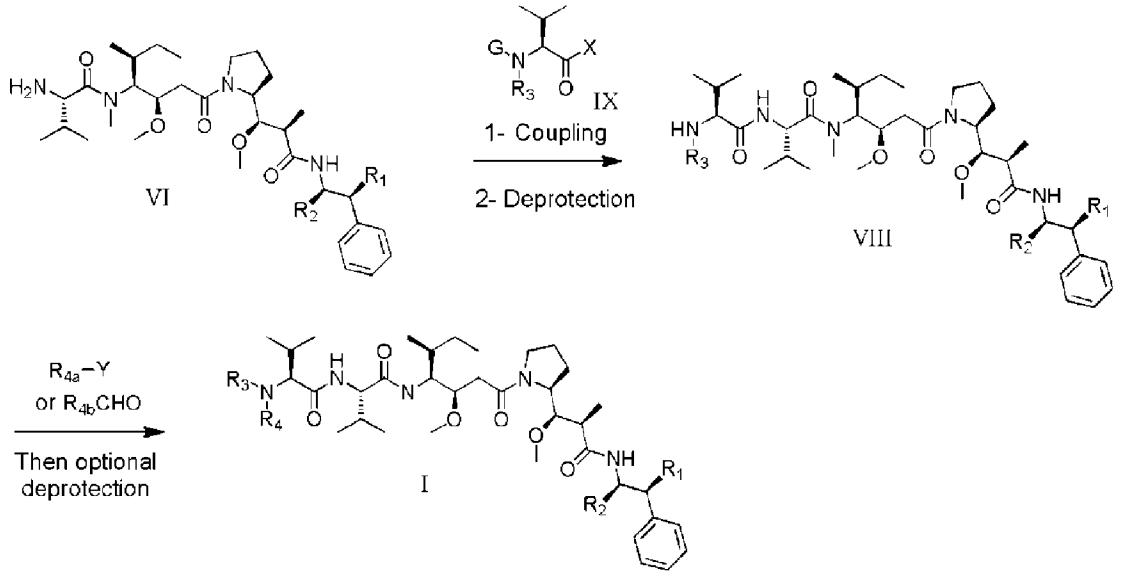


R4 تمثل مجموعة R4 كما سبق تعريفها واختياريا في صورة محمية و G هي مجموعة واقية.

تتكون الخطوة الأولى من تكثيف المركب (II)، المحمي على مجموعة الأمين فيه بواسطة مجموعة واقية G، بالمركب (III). X يمكن أن تمثل مجموعة تاركة مثل الكلور. في هذه الحالة تتكون الخطوة الأولى من التفاعل بين كلوريد حمض وأمين. يمكن إجراء هذا التفاعل باستخدام طرق وتقنيات معروفة جيدا للفرد المتمرس في هذا المجال. في طريقة مفضلة بصفة خاصة، يتم عمل تفاعل بين المركبين في وجود قاعدة عضوية أو غير عضوية مثل Et3N، iPR2NEt، بيريدين، NaH، Cs2CO3، K2CO3 في مذيب مثل THF، داي كلورو ميثان، DMF، DMSO، عند درجة حرارة تتراوح بين −٢٠ °م و: ١٠٠ °م. X يمكن أيضا أن تكون هيدروكسيل (OH). في هذه الحالة، الخطوة الأولى هي تفاعل تكثيف بين الحمض الكربوكسيلي (ii) والأمين (III). يمكن إجراء هذا التفاعل باتباع طرق وتقنيات معروفة جيدا للفرد المتمرس في هذا المجال. في طريقة مفضلة بصفة خاصة، يتم عمل تفاعل بين هذين المركبين في وجود عامل إقران مثل ١− (٣− داي ميثيل أمينو بروبيل) −٣− إيثيل −كربو داي إميد (EDC)، ٣− هيدروكسي −١، ٢، ٣− بنزو ترايازين −٤ (H٣) −أون، أمين ثالثي مثل داي أيزو بروبيل إيثيل أمين، في مذيب قطبي غير مانح للبروتونات مثل داي كلورو ميثان أو DMF، عند درجة حرارة تتراوح بين −١٥ °م و: ٤٠ °م. في طريقة أخرى مفضلة بصفة خاصة، يتم عمل تفاعل بين هذين المركبين في وجود داي إيثيل فوسفورو داي سيانيدات (DEPC)، أمين ثالثي مثل تراي إيثيل أمين، في مذيب قطبي غير مانح للبروتونات مثل داي كلورو ميثان أو DMF، عند درجة حرارة بين −١٥ °م و: ٤٠ °م. هناك طريقة أخرى مفضلة بصفة خاصة تتكون من جعل هذين المركبين يتفاعلان في وجود O− (٧− آزا بنزو ترايازول −١−يل) −١،١،٣،٣− نترا ميثيل − يورانيوم هكسا فلورو فوسفات (HATU)، أمين ثالثي مثل داي أيزو بروبيل إيثيل أمين، في مذيب قطبي غير مانح للبروتونات مثل داي كلورو ميثان أو DMF، عند درجة حرارة بين −١٥ °م و: ١٠٠ °م.

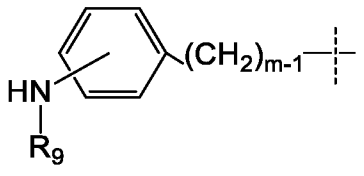
بعد نزع الحماية عن المركب الوسيط باستخدام تقنيات معروفة جيدا للفرد المتمرس في هذا المجال («Protective Groups in Organic Synthesis» , T.W. Greene, John Wiley & Sons, 2006 and « Protecting Groups », P.J. Kocienski, Thieme Verlag, 1994)، يمكن تكثيف المركب (IV) مع المركب (V) باتباع الطرق والتقنيات السابق شرحها

للحصول على المركب (VI) بعد خطوة نزع الحماية. يمكن أن يؤدي هذا المركب، بعد التكثيف مع المركب الوسيط (VII) والنزع الاختياري للحماية، إلى تكوين العقار. يمكن أيضا إقران المركب (VI) مع المركب (VII') الذي فيه R'3 هي المجموعة المنتجة لـ R3، وخصوصا مجموعة R3 المحمية بواسطة مجموعة واقية. يمكن تنفيذ الإقران الذي يليه نزع مجموعة الحماية عن المجموعة R'3 للحصول على R3 باتباع نفس الإجراءات السابق شرحها.



مخطط رقم ٢

مخطط رقم ٢ يوضح الطريقة العامة الثانية التي يمكن استخدامها لتحضير العقار. في الصيغ العامة السابقة،G هي مجموعة واقية، H= R1 ، R2، R3 وR4a كما سبق تعريفهما، وR4b تمثل



في الخطوة الأولى، المركب (IX) المحمي على مجموعة الأمين فيه بواسطة مجموعة واقية Gيتم تكثيف مع المركب (VI). X يمكن ان تمثل مجموعة تاركة مثل كلور. في هذه الحالة، تتكون الخطوة الأولى من التفاعل بين كلوريد حمض وأمين. يمكن إجراء هذا التفاعل باستخدام طرق

وتقنيات معروفة حيدا للفرد المتمرس في هذا المجال. في طريقة مفضلة بصفة خاصة يتم عمل تفاعل بين المركبين في وجود قاعدة عضوية أو غير عضوية مثل Et3N، iPR2NEt، بيريدين، NaH، Cs2CO3،K2CO3 في مذيب مثل THF، داي كلورو ميثان، DMF، DMSO عند درجة حرارة تتراوح بين −٢٠ °م و: ١٠٠ °م. X يمكن أن تمثل أيضا هيدروكسيل. في هذه الحالة، الخطوة الأولى هي تفاعل تكثيف بين الحمض الكربوكسيلي (IX) والأمين (VI). يمكن إجراء هذا التفاعل باتباع طرق وتقنيات معروفة جيدا للفرد المتمرس في هذا المجال. في طريقة مفضلة بصفة خاصة، يتم عمل تفاعل بين المركبين في وجود ١− (٣− داي ميثيل أمينو بروبيل) −٣− إيثيل − كربو داي إميد (EDC)، ٣− هيدروكسي −١،٢،٣− بنزو ترايازين −٤ (H٣) −أون، أمين ثالثي مثل داي أيزو بروبيل إيثيل أمين، في مذيب قطبي غير مانح للبروتونات مثل داي كلورو ميثان أو DMF، عند درجة حرارة تتراوح بين −١٥ °م و: ٤٠ °م. في طريقة أخرى مفضلة بصفة خاصة، يتم عمل تفاعل بين هذين المركبين في وجود داي إيثيل فوسفورو داي سيانيدات (DEPC)، أمين ثالثي مثل تراي إيثيل أمين، في مذيب قطبي غير مانح للبروتونات مثل داي كلورو ميثان أو DMF، عند درجة حرارة تتراوح بين −١٥ °م و: ٤٠ °م.

بعد نزع الحماية عن المركب الوسيط، باستخدام تقنيات معروفة جيدا للفرد المتمرس في هذا المجال، المركب الذي يتم الحصول عليه (VII) يمكن أن يؤدي إلى العقار بعد التفاعل مع R4Y. في هذه الحالة، Y هي مجموعة تاركة مثل Cl، Br، I، OSO2CH3، OSO2CF3 أو−O توسيل. يتم إجراء التفاعل في وجود قاعدة عضوية أو غير عضوية مثل Et3N، iPR2NEt، NaH، Cs2CO3، K2CO3، في مذيب قطبي غير مائي مثل داي كلورو ميثان، THF، DMF، DMSO عند درجة حرارة تتراوح بين −٢٠ °م و: ١٠٠ °م. في طريقة أخرى مفضلة بصفة خاصة، المركب (VIII) يتم عمل تفاعل له مع ألدهيد من الصورة R4b−CHO حيث R4b تناظر المجموعة المنتجة لـ R4. في هذه الحالة، يكون التفاعل عبارة عن أمْينة اختزالية في وجود عامل مختزل مثل NaBH4، NaBH3CN، NaBH (OAc)3، في مذيب قطبي مثل ١، ٢− داي كلورو إيثان، داي كلورو ميثان،THF ، DMF، MeOH، مع الوجود الاختياري لأيزو بروبوكسيد التيتانيوم (IV)، عند رقم هيدروجيني يمكن التحكم فيه بإضافة حمض مثل حمض الأسيتيك عند درجة حرارة تتراوح بين −٢٠ °م و: ١٠٠ °م.

في المخططات السابقة، يمكن أن يؤدي عقار إلى عقار آخر بعد خطوة تفاعل إضافية مثل التصبين على سبيل المثال باستخدام طرق معروفة جيدا للفرد المتمرس في هذا المجال وبها يتم تغيير مجموعة R2 التي تمثل إستر (COOMe)، إلى مجموعة R2 التي تمثل حمض كربوكسيلي (COOH).

إذا كان المطلوب هو عزل عقار يحتوي على مجموعة قاعدية واحدة على الأقل في حالة ملح إضافة حمض، فيمكن عمل ذلك بمعالجة القاعدة الحرة للعقار (التي تحتوي على مجموعة قاعدية واحدة على الأقل) باستخدام حمض مناسب، ويفضل بكمية مكافئة. الحمض المناسب يمكن أن يكون بصفة خاصة هو حمض تراي فلورو أسيتيك.

III- الرابط (L)

"الرابط"، "وحدة الرابط"،"L" أو "الرابطة" تعني، في الاختراع الحالي، جزء كيميائي يشتمل على رابطة تساهمية أو سلسلة من الذرات التي تربط تساهميا جسم مضاد بعقار واحد على الأقل.

يمكن عمل وسائل الربط باستخدام العديد من عوامل إقران البروتين ثنائية المجموعات الوظيفية مثل N- سكسينيميديل -٣- (٢- بيريديل داي ثيو) بروبيونات (SPDP)، سكسينيميديل -٤- (N- مال إميدو ميثيل) سيكلو هكسان -١- كربوكسيلات (SMCC)، إمينو ثيولان (IT)، المشتقات التي بها ٢ مجموعة وظيفية من مركبات الإميدو إستر (مثل داي ميثيل أديبيميدات HCl)، إسترات نشطة (مثل داي سكسينيميديل سوبيرات)، مركبات ألدهيد (مثل جلوتار ألدهيد)، مركبات بس - أزيدو (مثل بس (p- أزيدو بنزويل) هكسان داي أمين)، مشتقات بس- داي آزونيوم (مثل بس- (p- داي آزونيوم بنزويل) - إيثلين داي أمين)، داي أيزو سيانات (مثل تولوين ٢، ٦ - داي أيزو سيانات)، وبس- مركبات كلور نشط (مثل ١،٥- داي فلورو -٢،٤- داي نيترو بنزين). حمض ١- أيزو ثيو سياناتو بنزيل -٣- ميثيل داي إيثلين تراي أمين بنتا الأسيتيك الموسوم بكربون -١٤ (MX-DTPA) هو مثال لعمل مخلبي لإرفاق عوامل سامة للخلايا مع النظام المطلوب. العوامل الأخرى للرابط التقاطعي يمكن أن تكون BMPS، EMCS، GMBS، HBVS، LC-SMCC، MBS، MPBH، SBAP، SIA، SIAB، SMCC، SMPB، SMPH، sulfo-EMCS، sulfo-GMBS، sulfo-KMUS، sulfo-MBS، sulfo-SIAB، sulfo-SMCC، و-sulfo

SMPB، وSVSB (سكسينيميديل - (٤-ڤينيل سلفون) بنزوات) المتوفرة تجاريا (مثل لدى Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Ill., U.S.A).

الرابط يمكن أن يكون "غير قابل للانشطار" أو "قابل للانشطار".

في نموذج مفضل، يكون هناك "رابط قابل للانشطار" يسهل انطلاق العقار في الخلية. على سبيل المثال، يمكن استخدام رابط حمضي غير ثابت، رابط حساس للببتيداز، رابط حساس للضوء، رابط داي ميثيل أو رابط يحتوي على داي كبريتيد. الرابط، في نموذج مفضل، يكون قابلا للانشطار في ظروف بين خلوية، بحيث يطلق انشطار الرابط العقار من الجسم المضاد في الوسط بين الخلوي.

على سبيل المثال، في بعض النماذج، يكون الرابط قابلا للانشطار بواسطة عامل يؤدي إلى الانشطار يوجد في الوسط بين الخلوي (مثل داخل الجسيم الدهني أو الإندوسوم أو كافيولين). الرابط يمكن، على سبيل المثال، أن ينشطر رابط ببتيديل بواسطة ببتيداز أو بروتياز بين خلوي، بما في ذلك، على سبيل المثال لا الحصر، إلى بروتياز الجسيم الحال أو الجسيم الداخلي. على وجه التحديد، رابط الببتيديل يشتمل على الأقل على اثنين من الأحماض الأمينية المتتابعة أو ثلاثة على الأقل من الأحماض الأمينية المتتابعة أو يكون على الأقل بطول اثنين من الأحماض الأمينية أو على الأقل بطول ثلاثة من الأحماض الأمينية. يمكن أن تشمل عوامل الشق على الكاثبسين من نوع B وD وبلازمين، ومن المعروف أن كل منها يحل مشتقات عقاقير ثنائي الببتيد مما يؤدي إلى إطلاق العقاقير تنشط داخل الخلايا المستهدفة. على سبيل المثال، يمكن استخدام رابط ببتيديل قابل للانشطار بواسطة بروتين كاثبسين-B الذي يعتمد على الثيول، وهو ما يعبر عنه بشكل كبير في الأنسجة السرطانية، (مثل رابط يحتوي على أو يكون هو Phe-Leu أو Gly-Phe-Leu-Gly). في نماذج معينة، رابط الببتيديل القابل للانشطار بواسطة بروتياز بين خلوي يشتمل على أو يكون هو Val-Cit Phe-Lys. تتمثل إحدى ميزات استخدام الانطلاق بين الخلوي الحال العقار في أن العقار يتم توهينه نمطيا عندما يترافق وأن ثبات المصل للمترافقات يكون عاليا بصورة نمطية.

في نماذج أخرى، الرابط القابل للانشطار حساس للرقم الهيدروجيني، أي حساس للحل المائي عند رقم هيدروجيني معين. على وجه التحديد، الرابط الحساس للرقم الهيدروجيني قابل للحل المائي في

ظروف حمضية. على سبيل المثال، يمكن استخدام رابط حساس للحمض قابل للحل المائي في الجسيم الحال (مثل هيدرازون، نصف كربازون، ثيو نصف كربازون، سيس أكونيتيك أميد، أورثو إستر، أسيتال، كيتال، أو ما شابه). وسائل الربط هذه ثابتة نسبيا في ظروف الرقم الهيدروجيني المتعادل، مثل تلك التي في الدم، ولكنها غير ثابتة عند رقم هيدروجين أقل من ٥,٥ أو ٥,٠، الرقم الهيدروجيني التقريبي للجسيم الحال. في نماذج معينة، الربط القابل للحل المائي هو رابط ثيو إيثر (مثل، مثل، ثيو إيثر متصل بالعقار عن طريق رابطة أسيل هيدرازون).

في نماذج أخرى أيضا، يكون الرابط قابلا للانشطار في ظروف اختزالية (مثل رابط ثنائي الكبريتيد). هناك العديد من روابط ثنائي الكبريتيد المعروفة في هذا المجال، بما في ذلك، على سبيل المثال، تلك التي يمكن تكوينها باستخدام SATA (N- سكسينيميديل -S-أسيتيل ثيو أسيتات)، SPDP(N- سكسينيميديل -٣- (٢- بيريديل داي ثيو) بروبيونات)، SPDB(N- سكسينيميديل -٣- (٢- بيريديل داي ثيو) بيوتيرات) وSMPT (N- سكسينيميديل - أوكسي كربونيل - ألفا - ميثيل - ألفا - (٢- بيريديل -داي ثيو) تولوين).

في نماذج مفضلة معينة، وحدة الرابط يمكن أن يكون لها الصيغة العامة التالية:

-(T)a-(W)w-(Y)y-

حيث:

T هي وحدة شد؛

a هي ٠ أو ١؛

W هي وحدة حمض أميني؛

w هي عدد صحيح يتراوح بين ٠ و: ١٢؛

Y هي وحدة مباعدة؛

y هي ٠، ١ أو ٢.

وحدة الشد (T)، عند وجودها، تربط الجسم المضاد بوحدة حمض أميني (W) عند وجودها، أو بوحدة المباعدة عند وجودها، أو مباشرة بالعقار. هناك مجموعات وظيفية مفيدة يمكن أن توجد على الجسم المضاد، سواء بصورة طبيعية أو عن طريق معالجة كيميائية، بما في ذلك سلفهيدريل، أمينو، هيدروكسيل، مجموعة المصاوغ الكربونيلي هيدروكسيل للكربوهيدرات، وكربوكسيل.

المجموعات الوظيفية المناسبة هي سلفهيدريل، أمينو. يمكن عمل مجموعات السلفهيدريل باختزال روابط ثنائي كبريتيد بين الخلوية في الجسم المضاد، عند وجوده. بديلا لذلك، يمكن عمل مجموعات السلفهيدريل بتفاعل مجموعات الأمينو لجزء الليسين في الجسم المضاد مع ٢- إمينو ثيولان أو عوامل أخرى تكوّن السلفهيدريل. في نماذج معينة، يتم معالجة الجسم المضاد بالهندسة الوراثية لحمل مجموعة ليسين واحدة أو أكثر. الأكثر تفضيلا، يمكن معالجة الجسم المضاد بالهندسة الوراثية لحمل مجموعة سيستيين واحدة أو أكثر (مثل ThioMabs).

في نماذج معينة، وحدة الشد تكوّن رابطة مع ذرة كبريت في الجسم المضاد. يمكن اشتقاق ذرة الكبريت من مجموعة سلفهيدريل (SH-) لجسم مضاد مختزل.

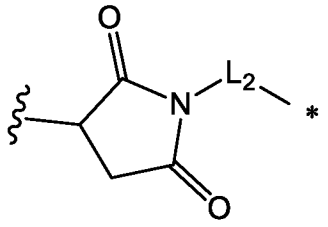
في نماذج أخرى معينة، وحدة الشد ترتبط بالجسم المضاد عن طريق رابطة ثنائي كبريتيد بين ذرة كبريت في الجسم المضاد وذرة كبريت في وحدة الشد.

في نماذج أخرى معينة، المجموعة النشطة في وحدة الشد تحتوي على موقع نشط يمكن أن يكون نشطا تجاه مجموعة الأمينو في الجسم المضاد. مجموعة الأمينو يمكن أن تكون تلك الموجودة في الأرجنين أو الليسين. مواقع الأمين النشطة المناسبة تشمل، على سبيل المثال لا الحصر، إسترات منشطة (مثل إسترات السكسينيميد، ٤- إسترات النيتروفينيل، بنتا إسترات الفلوروفينيل)، مركبات الأنهيدريد، كلوريدات الأحماض، كلوريدات السلفونيل، مركبات الأيزوسيانات ومركبات الأيزوثيو سيانات.

في صورة أخرى أيضا، المجموعة الوظيفية في وحدة الشد تحتوي على موقع نشط تجاه مجموعة الكربوهيدرات المحورة التي يمكن أن تكون موجودة على الجسم المضاد. في نموذج معين، يتم إدخال الجليكوسيل إلى الجسم المضاد بطريقة إنزيمية لتوفير شاردة كربوهيدرات أو أن يتم إدخال الجليكوسيل بشكل طبيعي. الكربوهيدرات يمكن أن تتأكسد بصورة أقل باستخدام عامل مثل فوق

يودات الصوديوم ووحدة الكربونيل الناتجة من الكربوهيدرات المؤكسدة يمكن أن تتكثف وحدة الشط الذي يحتوي على مجموعات وظيفية مثل لهيدرازيد، أوكسيم، أمين نشط، هيدرازين، وثيو نصف كربازيد، والهيدرازين كربوكسيلات، أو أريل هيدرازيد.

وفقا لنموذج خاص، وحدة الشد يكون لها الصيغة التالية:



حيث

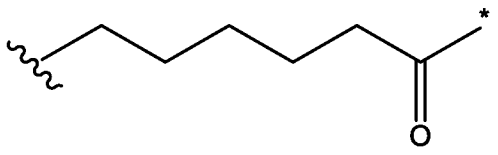
L2 هي (C4-C10) سيكلو ألكيل كربونيل، (C2-C6) ألكيل أو (C2-C6) ألكيل -كربونيل (أجزاء السيكلو ألكيل أو الألكيل التي ترتبط مع ذرة النيتروجين في جزء الماليميد) ،

تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع وحدة الحمض الأميني، عند وجودها، مع وحدة المباعدة، عند وجودها، أو مع العقار D، و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع الجسم المضاد Ab.

بتعبير " (C4-C10) سيكلو ألكيل" في الاختراع الحالي يكون المقصود هو حلقة هيدروكربون بها ٤ إلى ١٠ ذرة كربون بما في ذلك، على سبيل المثال لا الحصر، سيكلو بنتيل، سيكلو هكسيل وما شابه.

L2 يمكن أن تكون بصورة مفيدة (C2-C6) ألكيل -كربونيل مثل بنتيل -كربونيل لها الصيغة التالية:



حيث

تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع وحدة الحمض الأميني، عند وجودها، مع وحدة المباعدة، عند وجودها، أو بالعقار D؛ و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع ذرة النيتروجين في جزء الماليميد.

وحدة الحمض الأميني (W)، عند وجودها، تربط وحدة الشد (T) عند وجودها، أو الجسم المضاد مع وحدة المباعدة (Y) عند وجود وحدة المباعدة، أو بالعقار عند غياب وحدة المباعدة.

كما سبق ذكره، w(W)w يمكن ألا تكون موجودة (w= ٠) أو يمكن أن تكون ثنائي ببتيد، ثلاثي ببتيد، رباعي ببتيد، خماسي ببتيد، سداسي ببتيد، سباعي ببتيد، ثماني ببتيد، تساعي ببتيد، عشاري ببتيد، ببتيد من أحد عشر وحدة، أو ببتيد من اثنتي عشر وحدة حيث الأحماض الأمينية التي تكوّن الببتيدات يمكن أن تختلف عن بعضها.

بذلك، يمكن تمثيل w(W)w بالصيغة التالية: w5(W5)w4(W4)w3(W3)w2(W2)w1(W1)، حيث كل W1 إلى W5 تمثل، بصورة مستقلة عن بعضها البعض، وحدة حمض أميني وكل w1 إلى w5 هي ٠ أو ١.

في بعض النماذج، وحدة الحمض الأميني w(W)w يمكن ظان تشتمل على الوحدات البنائية للحمض الأميني مثل تلك التي تحدث بصورة طبيعية، بالإضافة إلى الأحماض الأمينية الصغيرة وأشباه الحمض الأميني التي لا تحدث بصورة طبيعية، مثل السترولين.

الوحدات البنائية للحمض الأميني في وحدة الحمض الأميني w(W)w تشمل، على سبيل المثال لا الحصر، ألانين، فالين، ليوسين، أيزو ليوسين، ميثيونين، فينيل ألانين، تريبتوفان، برولين، ليسين محمية أو غير محمية ب أسيتيل أو فورميل، أرجينين، أرجينين محمي أو غير محمي بمجموعة توسيل أو نيترو، هستيدين، أورنيثين، أورنيثين محمي بأسيتيل أو فورميل، وسترولين. أمثل مكونات الرابط في الحمض الأميني يفضل أن تشمل ثنائي ببتيد، ثلاثي ببتيد، راعي ببتيد، خماسي ببتيد وبالتحديد ثنائي ببتيد أو ثلاثي ببتيد.

أمثلة ثنائي الببتيد تشمل: Val-Cit، Ala-Val، Ala-Ala، Val-Ala، Lys-Lys، Cit-Cit، Val-Lys، Ala-Phe، Phe-Lys، Ala-Lys، Phe-Cit، Leu-Cit، Ile-Cit، Trp-Cit، Phe-Ala، Phe-N9- tosyl -Arg، Phe-N9-نيترو-Arg.

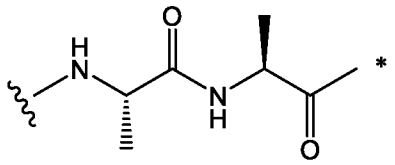
أمثلة ثلاثي الببتيد تشمل: Val-Ala-Val، Ala-Asn-Val، Val-Leu-Lys، Ala-Ala-Asn، Phe-Phe-Lys، Gly-Gly-Gly، D-Phe-Phe-Lys، Gly-Phe-Lys.

أمثلة رباعي الببتيد تشمل: Gly-Phe-Leu-Gly (المتوالية رقم ٥٣)، Ala-Leu-Ala-Leu (المتوالية رقم ٥٤).

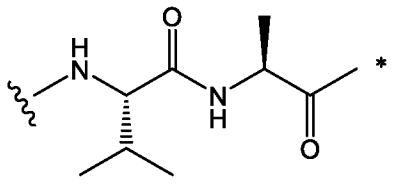
أمثلة خماسي الببتيد تشمل: Pro-Val-Gly-Val-Val (المتوالية رقم ٥٥).

وفقا لنموذج خاص، w(W)w يمكن أن تكون ثنائي ببتيد (أي w= ٢) مثل Val-Cit، أو الرابط تنقصه وحدة الحمض الأميني (w=٠). عندما ينقص الرابط وحدة الحمض الأميني، يفضل أن تنقصه أيضا وحدة المباعدة.

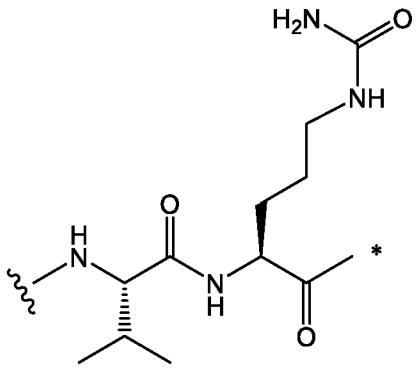
وفقا لنموذج مفضل، w= ٠ (أي w(W)w هي رابطة مفردة) أو w= ٢ (أي w(W)w هي ثنائي ببتيد) وw(W)w يمكن أن يتم اختيارها من:



(Ala-Ala)،



(Val-Ala)، و



(Val-Cit)،

وخصوصا تكون Val-Cit،

حيث

تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع وحدة المباعدة عند وجودها، أو إلى العقار D؛ و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع L2.

يمكن تصميم مكونات رابط الحمض الأميني وجعلها في الحالة المثالية فيما يتعلق بانتقائيتها تجاه الانشطار الإنزيمي بواسطة إنزيم معين، على سبيل المثال، بروتياز مصاحب لورم، كاثبسين B، C وD، أو بروتياز بلازمين.

وحدة الحمض الأميني في الرابط يمكن شطرها إنزيميا بواسطة إنزيم بما في ذلك، على سبيل المثال لا الحصر، بروتياز مصاحب لورم لإطلاق العقار.

يمكن تصميم وحدة الحمض الأميني وجعلها في الحالة المثالية فيما يتعلق بانتقائيتها تجاه الانشطار الإنزيمي بواسطة بروتياز معين مصاحب للورم. الوحدات المناسبة هي تلك التي يتم تحفيز انشطارها بواسطة أنواع البروتياز، كاثبسين B، C وD، وبلازمين.

وحدة المباعدة (Y)، عند وجودها، تربط وحدة الحمض الأميني عند وجودها، أو وحدة الشد عند وجودها، أو الجسم المضاد بالعقار. وحدات المباعدة هي من نوعين بصفة عامة: ذاتية التضحية وغير ذاتية التضحية. وحدة المباعدة غير ذاتية التضحية هي وحدة يظل فيها بعض أو كل وحدة المباعدة مرتبطة بالعقار بعد الانشطار الإنزيمي لوحدة الحمض الأميني من مترافق الجسم المضاد

-العقار. أمثلة الوحدة المباعدة غير ذاتية التضحية تشمل، على سبيل المثال لا الحصر وحدة المباعدة (جليسين-جليسين) ووحدة المباعدة جليسين. لإطلاق العقار، يجب إجراء تفاعل حل مائي مستقل داخل الخلية المستهدفة لشطر رابطة الجليسين- العقار.

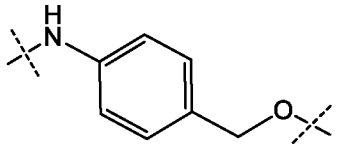
في نموذج خاص، وحدة المباعدة غير ذاتية التضحية (Y) تكون Gly.

بديلا لذلك، مترافق الجسم المضاد -العقار المحتوي على وحدة المباعدة ذاتية التضحية يمكن أن يطلق العقار بدون الحاجة إلى خطوة حل مائي منفصلة. في هذه النماذج، (Y) هي وحدة بنائية في كحول p- أمينو بنزيل (PAB) ترتبط بـ w(W) عن طريق ذرة النيتروجين في مجموعة PAB، وتتصل مباشرة بالعقار عن طريق مجموعة إستر، كربونات، كربامات أو إيثر.

الأمثلة الأخرى على المباعدات ذاتية التضحية تشمل، على سبيل المثال لا الحصر، المركبات العطرية المكافئة إلكترونيا لمجموعة PAB مثل الوحدات البنائية من مشتقات ٢- أمينو إميدازول -٥- ميثانول وأورثو وبارا- أمينو بنزيل أسيتال. يمكن استخدام المباعدات التي تخضع للتحويل إلى حلقة بسهولة عند الحل المائي لرابطة الأميد، مثل مركبات أميد حمض البيوتيريك المستبدلة وغير المستبدلة ٤- أمينو، والنظم الحلقية المستبدلة بصورة مناسبة من باي سيكلو [٢-٢-١] وباي سيكلو [٢-٢-٢] ومركبات أميد حمض ٢- أمينو فينيل بروبيونيك.

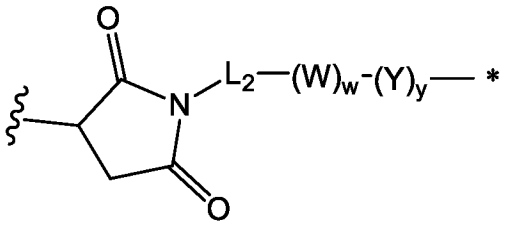
في نموذج بديل، تكون وحدة المباعدة عبارة عن وحدة بس (هيدروكسي ميثيل) ستيرين (BHMS) متفرعة، يمكن استخدامها لتضمين عقارات إضافية.

في نموذج خاص، تكون وحدة المباعدة (Y) هي PAB-كربونيل مع كون PAB هي



(الأكسجين في وحدة PAB يرتبط بالكربونيل)، و y= ١ أو الرابط تنقصه وحدة مباعدة (y=٠).

في نموذج خاص، الرابط تكون له الصيغة التالية (III):



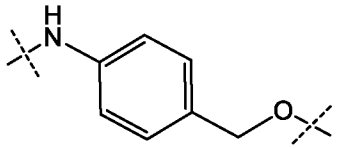
(III)

حيث

L2 هي (C4-C10) سيكلو ألكيل كربونيل، (C2-C6) ألكيل أو (C2-C6) ألكيل -كربونيل (الكربونيل في هذه الأجزاء، عند وجودها، يكون مرتبطا مع w(W)) ،

W تمثل وحدة حمض أميني، وw تمثل عددا صحيحا بين ٠ و: ٥،

Y هي PAB-كربونيل، وPAB تكون

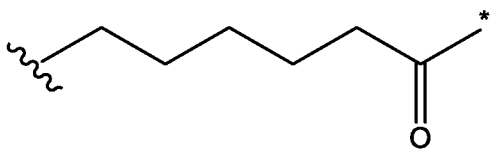


(الأكسجين في وحدة PAB يكون مرتبطا مع الكربونيل)، وy هي ٠ أو ١ (ويفضل أن y تكون ٠ عندما w تكون ٠ وy هي ٠ أو ١ عندما تكون w بين ١ و: ٥)،

تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع العقار D، و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع الجسم المضاد Ab.

بصورة مفيدة، L2 هي (C2-C6) ألكيل -كربونيل مثل بنتيل -كربونيل لها الصيغة التالية:



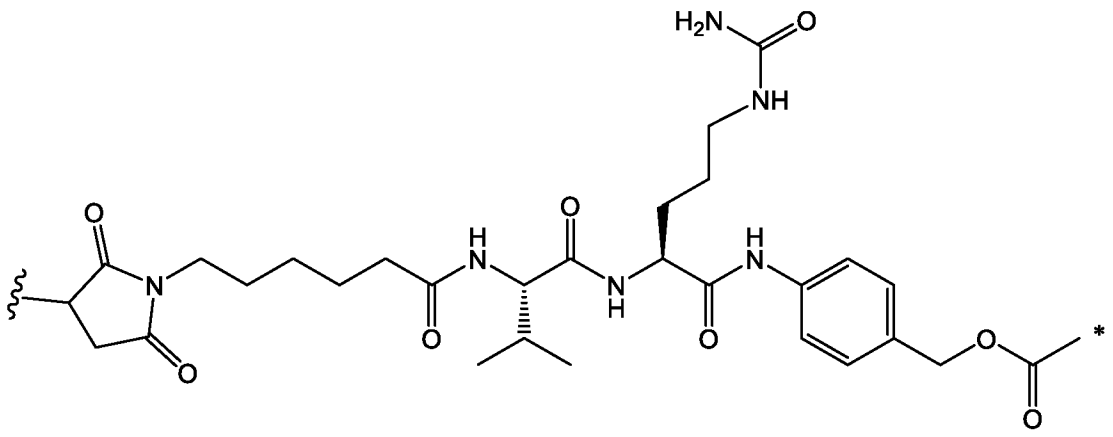
حيث

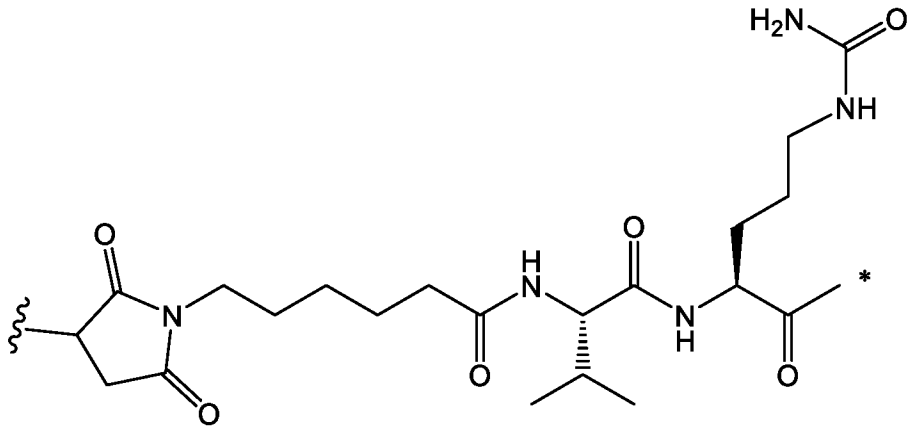
تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع w(W)؛ و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع ذرة النيتروجين في جزء الماليميد.

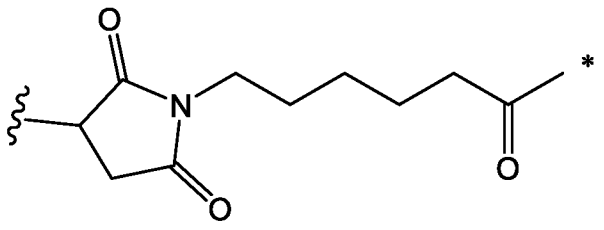
وفقا لنموذج مفضل، الرابط L يتم اختيارها من:

،





،



،

حيث تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع العقار D، والخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع الجسم المضاد Ab.

IV- مترافق الجسم المضاد- العقار (ADC)

في نموذج مفضل، يمكن تحضير مترافق الجسم المضاد -العقار وفقا للاختراع بأي طريقة معروفة للفرد المتمرس في هذا المجال مثل ما يلي، على سبيل المثال لا الحصر، i) تفاعل مجموعة آلفة للنواة في الجسم المضاد مع عامل رابط ثنائي التكافؤ ثم التفاعل مع مجموعة آلفة للنواة في العقار أو ii) تفاعل مجموعة آلفة للنواة في العقار مع عامل رابط ثنائي التكافؤ ثم التفاعل مع مجموعة آلفة للنواة في الجسم المضاد.

المجموعات الآلفة للنواة على الجسم المضاد تشمل، على سبيل المثال لا الحصر، مجموعات الأمين في الطرفية -N، مجموعات الأمين في السلسلة الجانبية (مثلا ليسين)، مجموعات الأمين في السلسلة الجانبية الثيول، والهيدروكسيل السكري أو مجموعات الأمينو عندما يتم إدخال مجموعة جليكوسيل إلى الجسم المضاد.

المجموعات الآلفة للنواة على العقار تشمل، على سبيل المثال لا الحصر، مجموعات أمين، ثيول، وهيدروكسيل، ويفضل مجموعات الأمين.

مجموعات الأمين، والثيول، والهيدروكسيل هي مجموعات آلفة للنواة وقادرة على التفاعل لتكوين روابط تساهمية مع المجموعات الآلفة للإلكترونات أو أجزاء الرابط حيث تشمل أجزاء الرابط، على سبيل المثال لا الحصر، الإسترات النشطة مثل إسترات NHS، إسترات HOBt، مجموعات الهالو فورمات، وهاليدات الأحماض؛ هاليدات الألكيل والبنزيل مثل مركبات الهالو أسيتاميد؛ مركبات الألدهيد؛ الكيتونات؛ مجموعات الكربوكسيل؛ والماليميد. الجسم المضاد يمكن أن يوجد به مركبات ثنائي كبريتيد بين أجزاء السلسة قابلة للاختزال، أي قناطر سيستيين. يمكن جعل الجسم المضاد نشطا تجاه الترافق مع عوامل ربط بالمعالجة بعامل مختزل مثل DTT (داي ثيو ثريتول). بذلك سوف تكوّن كل قنطرة سيستيين، من الناحية النظرية، مجموعتي ثيول آلفتين للنواة. يمكن إدخال المجموعات الإضافية الآلفة للنواة إلى الجسم المضاد بواسطة أي تفاعل معروف للفرد المتمرس في هذا المجال. كمثال غير حصري، يمكن إدخال مجموعات الثيول النشطة إلى الجسم المضاد بإدخال واحدة أو أكثر من الوحدات البنائية للسيستيين.

ويمكن أيضا إنتاج مترافقات الجسم المضاد- العقار عن طريق تعديل الجسم المضاد لتقديم الأجزاء الآلفة للإلكترونات، والتي يمكن أن تتفاعل مع البدائل الآلفة للنواة على العامل الرابط. يمكن أكسدة السكريات من الجسم المضاد الذي تم إدخال مجموعة الجليكوسيل إليه لتكوين مجموعات ألدهيد أو كيتون والتي قد تتفاعل مع مجموعة الأمين في عوامل الربط أو العقار. مجموعات إمين في قاعدة شيف الناتجة قد تشكل رابطا مستقرا، أو قد يتم اختزالها لتكوين روابط أمين مستقرة. في أحد النماذج، تفاعل جزء الكربوهيدرات في الجسم المضاد الذي تم إدخال مجموعة الجليكوسيل إليه مع جالاكتاكوز أوكسيديز أو فوق يودات الصوديوم قد يسفر عن مجموعات كربونيل (ألدهيد وكيتون) في البروتين يمكن أن تتفاعل مع المجموعات المناسبة على العقار. في نموذج آخر، البروتينات التي تحتوي على وحدات بنائية سيرين أو ثريونين في الطرفية N- يمكن أن تتفاعل مع فوق يودات الصوديوم، مما يؤدى إلى إنتاج ألدهيد بدلا من الحمض الأميني الأول.

في نموذج مفضل، يتم تحضير مترافق الجسم المضاد -العقار للاختراع بتحضير جزء الرابط - العقار ويلي ذلك إقران بين مجموعة آلفة للنواة في الجسم المضاد (مثل مجموعة SH في جزء السيستيين) ومجموعة آلفة للإلكترونات في جزء الرابط -العقار (مثل ماليميد).

١. العقار-الرابط

يمكن تحضير جزء العقار -الرابط بإقران:

- الرابط مع العقار،
- جزء من الرابط مع العقار قبل إكمال تخليق الرابط،
- الرابط مع جزء أو مجموعة منتجة للعقار قبل إكمال تخليق العقار، أو
- جزء من الرابط مع جزء أو مجموعة منتجة للعقار قبل إكمال تخليق الرابط والعقار.

تفاعلات الإقران هي تفاعلات معروفة للفرد ذي الخبرة في هذا المجال بين مجموعة آلفة للنواة ومجموعة آلفة للإلكترونات.

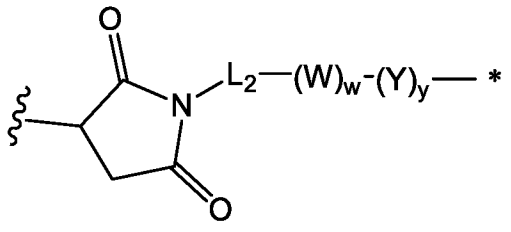
يمكن ان تكون المجموعة الآلفة للنواة بصفة خاصة عبارة عن مجموعة أمين، ثيول أو هيدروكسيل. في نموذج مفضل تكون مجموعة أمين أولي أو ثانوي أو ثالثي.

المجموعة الآلفة للإلكترونات يمكن ان تكون مجوعة حمض كربوكسيلي (COOH) تكون في صورة نشطة اختياريا أو جزء إستر كربونات نشط.

بتعبير "صورة نشطة" لحمض كربوكسيلي يكون المقصود هو حمض كربوكسيلي التي فيها جزء OH في مجموعات COOH قد تم إحلال مجموعة نشطة تاركة بدلا منه (LG) مما يتيح إقران مجموعة الحمض الكربوكسيلي مع مجموعة أمينو لتكوين رابطة أميد وإطلاق المركب LG-H. يمكن أن تكون الصور المنشطة عبارة عن إسترات نشطة، أميدات نشطة، مركبات أنهيدريد أو هاليدات أسيل مثل كلوريدات أسيل. الإسترات المنشطة تشمل المشتقات المتكونة بواسطة تفاعل مجموعة الحمض الكربوكسيلي معN - هيدروكسي بنزو ترايازول أو N- هيدروكسي سكسينيميد.

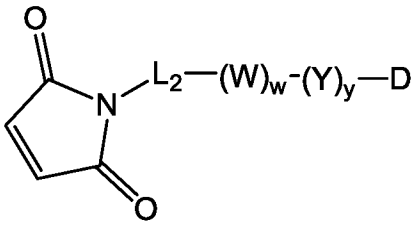
بتعبير "إستر كربونات منشط" يكون المقصود هو إستر كربونات يشتمل على جزء OC(O)OR- الذي تمثل فيه OR مجموعة تاركة جيدة تتيح إقران إستر كربونات منشط مع مجموعة أمينو لتكوين جزء كربامات وإطلاق المركب ROH. مجموعة R في إستر الكربونات المنشط تشتمل، على سبيل المثال لا الحصر، على مجموعات p-نيترو- فينيل، بنتا فلوروفينيل، ٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-١H-بيرول-١-يل وبنزيل، ويفضل مجموعات p-نيترو- فينيل وبنتا فلوروفينيل.

عندما يكون للرابط الصيغة التالية (III):



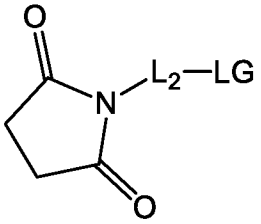
(III)

يكون لجزء العقار -الرابط الصيغة التالية (IV):



(IV)

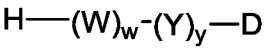
وآخر خطوة في تخليق جزء العقار –الرابط تكون بصفة عامة هي الإقران مع مركب له الصيغة التالية (V):



(V)

حيث L2 هي كما سبق تعريفها وLG تمثل مجموعة تاركة مثل هاليد مثل كلوريد أو مجموعة مشتقة من N– هيدروكسي سكسينيميد،

ومركب له الصيغة التالية (VI):



.(VI)

عندما y= ١ و PAB=Y –كربونيل، يمكن تحضير المركب من الصورة (VI) بالاقتران بين العقار (DH) ومركب له الصيغة التالية (VII)، ويفضل صورة محمية منه:

(VII)

حيث W و wكما سبق تعريفهما وR هي كما سبق تعريفها عند تعريف "إستر كربونات منشط"، وG هي H أو مجموعة واقية.

عندما يكون المركب من الصورة (VII) في صورة محمية، تكون الخطوة النهائية لنزع الحناية ضرورية.

عندما تكون y= ٠، المركب (VI) يكون له الصيغة H- (W)w -D، حيث يفضل أن تتكون (W)w وD من وحدات الحمض الأميني. بالتالي، يمكن تحضير المركب (VI) في هذه الحالة بطريقة تقليدية لتخليق الببتيد معروفة جيدا لذوي الخبرة في هذا المجال.

٢. Ab-الرابط -العقار

نموذج مفضل وفقا للاختراع يتكون من الإقران بين السيستيين الموجودة على الجسم المضاد ومجموعة آلفة للإلكترونات في جزء العقار -الرابط، ويفضل مع جزء الماليميد الموجود على جزء العقار -الرابط.

يمكن تنفيذ إقران الماليميد - سيستيين بطرق معروفة جيدا لذوي الخبرة في هذا المجال.

بصفة عامة، فإن الأجسام المضادة لا تحتوي على الكثير، إن احتوت أصلا، على مجموعات سيستيين ثيول حرة ونشطة يمكن أن ترتبط ب جزء العقار. معظم الوحدات البنائية سيستيين ثيول في الأجسام المضادة توجد في صورة قناطر ثنائي كبريتيد ويجب اختزالها بعامل مختزل مثل داي ثيو ثريتول (DTT) أو TCEP، في ظروف اختزال جزئية أو كلية. الحمل (النسبة بين العقار والجسم المضاد) لـ ADC يمكن التحكم فيه بطرق عديدة مختلفة، تشمل: (i) الحد من الزيادة المولارية من المركب الوسيط العقار - الرابط (D-L) أو العامل الرابط بالنسبة للجسم المضاد، (ii) الحد من زمن تفاعل الترافق أو درجة حرارته، و(iii) ظروف اختزال جزئية أو كلية لتعديل السيستيين ثيول.

تركيب رابطة ثنائي الكبريتيد لـ IgGs البشري معروفة الآن بصورة جيدة (هناك مراجعة لها في Liu وMay, mAbs 4 (2012): 17-23). في الواقع هناك العديد من أوجه التشابه وبعض الفروق فيما يتعلق بتركيب رابطة ثنائي الكبريتيد لفئات IgG الفرعية البشرية الأربعة، وبالتحديد IgG1، IgG2، IgG3 وIgG4. كل الفئات الفرعية لـ IgG تحتوي على ١٢ قنطرة ثنائي كبريتيد داخل السلسلة وتكمن الفروق في روابط ثنائي كبريتيد بين السلاسل المتكونة بين السلاسل الثقيلة والخفيفة. كل رابطة ثنائي كبريتيد داخل السلسلة تكون مصحوبة بمجال مستقل IgG، أي مجالات

متغيرة (VL و VH) وثابتة (CL، CH1، CH2 و CH3). ترتبط السلسلتان الثقيلتان في المنطقة المفصلية بهما بعدد متغير من قناطر ثنائي كبريتيد: ٢ لـ IgG1 و IgG4، ٤ لـ IgG2 و: ١١ لـ IgG3. تتصل السلاسل الثقيلة والخفيفة للـ IgG1 بواسطة رابطة ثنائي كبريتيد بين آخر وحدة بنائية سيستيين للسلسة الخفيفة والوحدة البنائية الخامسة للسلسة الثقيلة، بينما بالنسبة للفئات الفرعية الأخرى، IgG2، IgG3 و IgG4، تتصل السلسة الخفيفة بالسلسة الثقيلة بواسطة رابطة ثنائي كبريتيد بين آخر وحدة بنائية سيستيين للسلسة الخفيفة والوحدة البنائية الثالثة سيستيين للسلسة الثقيلة، والتي توجد عند سطح التقابل بين مجالي VH و CH1. تركيبات روابط ثنائي الكبريتيد غير التركيبات التقليدية تم شرحها بالنسبة لـ IgG2 و IgG4 (تمت مراجعتها في Liu and May, mAbs 4 (2012): 17-23). روابط ثنائي كبريتيد بين السلاسل معرضة بشدة للمذيب وبالتالي فإنها أكثر نشاطا من روابط ثنائي كبريتيد داخل السلسلة، والمدفونة في تركيبات رقيقة بيتا غير المتوازية داخل كل مجال وغير معرضة للمذيب. لهذه الأسباب، مهما كان النوع الشبيه للجسم المضاد، سيحدث الإقران على وحدات السيستيين المكشوفة بين السلاسل بعد اختزال بسيط. كل فنطرة ثنائي كبريتيد بين السلاسل يمكن أن تكوّن، نظريا، موضعين للترافق.

يمكن إدخال المجموعات الإضافية الآلفة للنواة إلى الأجسام المضادة خلال التفاعل بين الليسين و:

٢- إمينو ثيولان (عامل Traut's) الذي ينتج عنه تحوُّل الأمين إلى ثيول. يمكن أيضا إدخال مجموعات الثيول النشطة إلى الجسم المضاد (أو شظية منه) بهندسة وحدة بنائية واحدة، أو اثنتين، أو ثلاثة، أو اربعة، أو أكثر للسيستيين (مثل تحضير أجسام مضادة متحولة تشتمل على واحد أو أكثر من سيستيين غير الأصلية الوحدات البنائية للحمض الأميني). تقدم البراءة الأمريكية رقم ٧٥٢١٥٤١ أجساما مضادة تمت معالجتها بالهندسة الوراثية بإدخال أحماض أمينية نشطة للسيستيين.

يمكن معالجة الأحماض الأمينية للسيستيين بالهندسة الوراثية في المواقع النشطة في جسم مضاد ولا تكوّن روابط ثنائي كبريتيد بين السلاسل أو بين الجزيئات (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؛ البراءة الأمريكية رقم ٧٥٢١٥٤١؛ البراءة الأمريكية رقم ٧٧٢٣٤٨٥؛ الطلب الدولي رقم

٢٠٠٩/٠٥٢٢٤٩). مركبات السيستيين ثيول التي تمت معالجتها بالهندسة الوراثية يمكن أن تتفاعل مع العوامل الرابطة أو العقار – العوامل الرابطة وفقا للاختراع الحالي والتي بها مجموعات نشطة تجاه الثيول، وآلفة للإلكترونات مثل ماليميد أو ألفا هالو أميد لتكوين ADC مع الأجسام المضادة المعالجة بالهندسة الوراثية للسيستيين وأجزاء العقار. بذلك يمكن تصميم موضع جزء العقار، التحكم فيه، ومعرفته. يمكن التحكم في حمل العقار لأن مجموعات السيستيين ثيول المعالجة بالهندسة الوراثية تتفاعل نمطيا مع العوامل الرابطة النشطة تجاه الثيول أو عوامل العقار – الرابط بحصيلة عالية. المعالجة بالهندسة الوراثية لجسم مضاد IgG لإدخال سيستيين الحمض الأميني بالاستبدال عند موقع مفرد على السلسلة الثقيلة أو الخفيفة يعطي مجموعتين جديدتين من السيستيين على الجسم المضاد المتماثل. يمكن تحقيق حمل عقار حوالي ٢ بتجانس يقارب منتج ترافق ADC.

حينما تتفاعل أكثر من مجموعة آلفة للنواة أو الإلكترونات في الجسم المضاد مع المركب الوسيط للعقار– الرابط، أو العامل الرابط ويلي ذلك عامل جزء العقار، عندئذ يكون المنتج الناتج عبارة عن خليط من مركبات ADC مع توزيع أجزاء العقار المتصلة بالجسم المضاد، مثل ١، ٢، ٣، إلخ. طرق الفصل اللوني للسائل مثل طور البوليمر العكسي (PLRP) والتفاعل غير الآلف للماء (HIC) يمكن ان تفصل المركبات في الخليط بقيمة حمل العقار. يمكن عزل مستحضرات ADC التي لها قيمة حمل عقار مفرد (p)، مع ذلك، قيمة حمل عقار مفرد هذه ADCs يمكن أن تظل أخلاط غير متجانسة لأن أجزاء العقار يمكن توصيلها، عن طريق الرابط، عند مواقع مختلفة على الجسم المضاد.

بالنسبة لبعض مترافقات الجسم المضاد– العقار، يمكن الحد من نسبة العقار بواسطة عدد مواقع الاتصال على الجسم المضاد. حمل العقار المرتفع، مثل نسبة عقار أكبر من ٥، يمكن أن تتسبب في التجميع، الذوبان، السمية، أو فقدان النفاذية الخلوية لمترافقات معينة للجسم المضاد– العقار. على وجه التحديد، أجزاء عقار أقل من القيمة النظرية القصوى تترافق مع جسم مضاد أثناء تفاعل الترافق.

حمل العقار يشار إليه أيضا باسم النسبة بين العقار والجسم المضاد (DAR) هو العدد المتوسط للعقاقير لكل عامل رابط للخلية.

في حالة الأنواع الشبيهة للجسم المضاد IgG1 وIgG4، حيث ترتبط العقاقير بمجموعات السيستيين بعد الاختزال الجزئي للجسم المضاد، يمكن أن يتراوح حمل العقار بين ١ إلى ٨ عقاقير (D) لكل جسم مضاد، أي حينما تتصل ١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧، و: ٨ من أجزاء العقار تساهميا مع الجسم المضاد.

في حالة النوع الشبيه للجسم المضاد IgG2، حينما ترتبط العقاقير بمجموعات السيستيين بعد الاختزال الجزئي للجسم المضاد، يمكن أن يتراوح حمل العقار بين ١ إلى ١٢ عقار (D) لكل جسم مضاد، أي حينما تتصل ١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧، ٨، ٩، ١٠، ١ ١ و: ١٢ من أجزاء العقار تساهميا مع الجسم المضاد.

تركيبات ADC تحتوي على تجميعات من عوامل رابطة للخلية، مثل الأجسام المضادة، المترافقة مع عدد من العقاقير، من ١ إلى ٨ أو ١ إلى ١٢.

العدد المتوسط للعقاقير لكل جسم مضاد في مستحضرات ADC من تفاعلات الترافق يمكن أن يتحدد بطرق تقليدية مثل UV، HPLC ذي الطور المعكوس، HIC، القياس الطيفي للكتلة، اختبار ELISA، والاستشراد الكهربي.

كمثال غير حصري، يتم هنا تقديم الترافق مع الجسم المضاد c208F2. في هذه الحالة، يقترن العقار بسيستيين واحد على الأقل يتم اختياره من i) بالنسبة للسلسة الخفيفة للمتوالية رقم ٢٨، الوحدة البنائية Cys في الموضع ٢١٤ وii) بالنسبة للسلسة الثقيلة للمتوالية رقم ٢٣، الوحدات البنائية Cys في الموضع ٢٢٣، ٢٢٩ و: ٢٣٢.

كمثال غير حصري، يتم هنا تقديم الترافق مع الجسم المضاد c208F2. في هذه الحالة، يقترن العقار مع اثنين أو ثلاثة أو أربعة، من وحدات السيستيين التي يتم اختيارها من i) بالنسبة للسلسة الخفيفة للمتوالية رقم ٢٨، الوحدة البنائية Cys. في الموضع ٢١٤ وii) بالنسبة للسلسة الثقيلة للمتوالية رقم ٢٣، الوحدات البنائية Cys. في الموضع ٢٢٣، ٢٢٩ و: ٢٣٢

كمثال غير حصري، يتم هنا تقديم الترافق مع الجسم المضاد hz208F2 (ar.1). في هذه الحالة، يقترن العقار بواحد على الأقل سيستيين الذي يتم اختياره من i) بالنسبة للسلسة الخفيفة للمتوالية رقم

٣٩، الوحدة البنائية Cys. في الموضع ٢١٤ وii) بالنسبة للسلسة الثقيلة للمتوالية رقم ٣٧، الوحدات البنائية Cys. في الموضع ٢٢٣، ٢٢٩ و: ٢٣٢.

كمثال غير حصري، يتم هنا تقديم الترافق مع الجسم المضاد hz208F2 (Var.3). في هذه الحالة، يقترن العقار مع اثنين أو ثلاثة أو أربعة، سيستيين sالذي يتم اختياره من i) بالنسبة للسلسة الخفيفة للمتوالية رقم ٤٠، الوحدة البنائية Cys. في الموضع ٢١٤ وii) بالنسبة للسلسة الثقيلة للمتوالية رقم ٣٨، الوحدات البنائية Cys. في الموضع ٢٢٣، ٢٢٩ و: ٢٣٢

يتكون بديل آخر من إقران الليسين. يمكن أن يحتوي الجسم المضاد، على سبيل المثال، العديد من وحدات الليسين البنائية التي لا تتفاعل مع المركب الوسيط من العقار- الرابط (D-L) أو العامل الرابط. فقط مجموعات الليسين الأكثر نشاطا يمكن أن تتفاعل مع العامل الرابط النشط تجاه الأمين. كذلك، فقط مجموعات الليسين ثيول الأكثر نشاطا يمكن أن تتفاعل مع العامل الرابط النشط تجاه الثيول.

حينما ترتبط مركبات الاختراع بوحدات الليسين، يمكن أن يتراوح حمل العقار بين ١ إلى ٨٠ عقار (D) في كل جسم مضاد في الخلية، بالرغم من أن حد أقصى يبلغ ٤٠، ٢٠، ١٠ أو ٨ يمكن أن يكون مفضلا. تركيبات ADC تحتوي على تجميعات عوامل رابطة للخلية، مثل الأجسام المضادة، المترافقة مع عدد من العقاقير، من ١ إلى ٨٠، ١ إلى ٤٠، ١ إلى ٢٠، ١ إلى ١٠ أو ١ إلى ٨.

الـ ADC من الصورة (i) وفقا للاختراع يمكن أن يكون في صورة ملح مقبول صيدلانيا.

في الاختراع الحالي بتعبير "مقبول صيدلانيا" يكون المقصود هو الذي يمكن استخدامه في تحضير تركيبة صيدلانية تكون بصفة عامة، مأمونة وغير سامة ولا تكون غير مرغوبة من الناحية الحيوية أو لأي سبب آخر، وتكون مقبولة للاستخدام البيطري بالإضافة إلى الاستخدام البشري.

بتعبير "ملح مقبول صيدلانيا" لمركب يكون المقصود هو ملح يكون مقبول صيدلانيا كما هو معرف هنا وله النشاط العلاجي المطلوب للمركب الأصلي.

الأملاح المقبولة صيدلانيا تشتمل بصفة خاصة على:

(١) أملاح الإضافة لحمض مقبول صيدلانيا متكون مع أحماض غير عضوية مقبولة صيدلانيا مثل الهيدروكلوريك، الهيدرو بروميك، الفوسفوريك، والكبريتيك والأحماض المماثلة؛ أو المتكونة مع أحماض عضوية مقبولة صيدلانيا مثل الأسيتيك، التراي فلورو الأسيتيك، البروبيونيك، السكسينيك، الفيوماريك، الماليك، الطرطريك، الستريك، الاسكوربيك، الماليك، الجلوتاميك، البنزويك، ٥ الساليسيليك، التولوين سلفونيك، الميثان سلفونيك، الاستياريك، اللاكتيك والأحماض المماثلة؛ و

(٢) أملاح الإضافة لقاعدة مقبولة صيدلانيا المتكونة عند وجود بروتون حمضي في المركب الأصلي إما يتم إحلالها بواسطة أيون معدني مثل أيون معدن قلوي، أيون معدن قلوي أرضي أو أيون ألومنيوم؛ أو تتناسق مع قاعدة عضوية مقبولة صيدلانيا مثل الليسين، الأرجينين وما شابه؛ أو مع قاعدة غير عضوية مقبولة صيدلانيا مثل هيدروكسيد صوديوم، هيدروكسيد بوتاسيوم، ١٠ هيدروكسيد كالسيوم وما شابه.

يمكن تحضير هذه الأملاح من مركبات الاختراع المحتوية على مجموعة قاعدية أو حمضية، والأحماض أو القواعد المناظرة باستخدام طرق كيميائية تقليدية.

٥ – العلاج

أخيرا، يتعلق الاختراع بـ ADCكما سبق شرحه للاستخدام كعقار، وخصوصا في علاج السرطان.

١٥ يتمثل هدف آخر من أهداف الاختراع الحالي في مركب من الصيغة (i) كما سبق تعريفها للاستخدام كمنتج دوائي، وخصوصا لعلاج السرطان.

كما يتعلق الاختراع الحالي باستخدام مركب من الصيغة (i) كما سبق تعريفها لإنتاج منتج دوائي، مخصص لعلاج السرطان.

كما يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لعلاج السرطان تتضمن إعطاء شخص بحاجة إلى ذلك كمية ٢٠ فعالة من مركب من الصيغة (i) كما سبق تعريفها.

يفضل اختيار أنواع السرطان من أنواع السرطان ذات الصلة بـ IGF-1R بما في ذلك خلايا الورم التي تعبر أو تعبر بطريقة مفرطة عن كل أو جزء من البروتين IGF-1R على سطحها.

بصفة خاصة، تكون هذه السرطانات هي سرطان الثدي، سرطان القولون، سرطان المريء، سرطان الكبد، سرطان المعدة، الورم الدبقي، سرطان الرئة، سرطان الجلد، سرطان العظم، سرطان المبيض، سرطان البروستاتا، الورم العضلي المخطط، سرطان الكلى، سرطان الغدة الدرقية، سرطان بطانة الرحم، ورم غمد العصب، ورم الخلية العصبية الناشئة، أو السرطان الحرشفي في الفم، ورم الظهارة المتوسطة، ساركومة العضلة الملساء وأي ظواهر أو سرطانات مقاومة للعقاقير.

لتجنب اللَّبس، بتعبير أنواع السرطان المقاومة للعقار التي تعبر عن IGF-1R، يكون المقصود هو أنواع السرطان العنيدة التي تعبر أساسا عن IGF-1R وأيضا أنواع السرطان التي لا تعبر أساسا أو تعبر بصورة مفرطة عن IGF-1R ولكنها تعبر عن IGF-1R بمجرد أن تصبح مقاومة لعلاج سابق.

يتمثل هدف آخر من أهداف الاختراع الحالي في تركيبة صيدلانية تشتمل على الـ ADCكما هو مشروح في المواصفات.

بصفة خاصة، يتعلق الاختراع بتركيبة صيدلانية تشتمل على الـ ADC للاختراع مع مادة مسوغة واحدة على الأقل و/ أو مادة ناقلة مقبولة صيدلانيا.

في الوصف الحالي، التعبير "مادة ناقلة مقبولة صيدلانيا" أو "مادة مسوغة" يشير إلى مركب أو توليفة من المركبات التي تدخل في تركيبة صيدلانية لا تؤدي إلى تفاعلات ثانوية والتي تسمح، على سبيل المثال، بتسهيل إعطاء المركب الفعال (المركبات الفعالة)، وزيادة فترة فعاليتها و/ أو شدة تأثيرها على الجسم، زيادة في ذوبانها في محلول أو تحسين في المحافظة عليها. هذه المواد الناقلة والسواغات المقبولة صيدلانيا معروفة جيدا ويستخدمها الفرد المتمرس في هذا المجال طبقا لطبيعة ونوع إعطاء المركب الفعال (المركبات الفعالة) المختارة.

يمكن إعطاء المكون الفعال في صورة وحدات إعطاء، في خليط مع مواد صيدلانية تقليدية حاملة، إلى الحيوانات أو البشر. صور وحدات الإعطاء تتضمن الصور المناسبة عن طريق الفم وصور الإعطاء عن غير طريق المعدة والأمعاء (تحت الجلد، في الأدمة، في العضل أو في الوريد).

كتركيبات صلبة، للإعطاء عن طريق الفم، يمكن أن يتم استخدام الأقراص، والحبوب، والمساحيق (كبسولات جيلاتين صلبة أو رخوة) أو حبيبات. في هذه التركيبات، يتم خلط المكون الفعال وفقا

للاختراع مع واحد أو أكثر المخففات الخاملة مثل النشا، السليلوز، السكروز، اللاكتوز، أو السليكا، في تيار من الأرجون. قد تشمل هذه تركيبات أيضا مواد أخرى غير المخففات، على سبيل المثال واحد أو أكثر من مواد التزليق مثل ستيارات المغنيسيوم أو التلك، عامل التلوين، طلاء (أقراص مغلفة) أو ورنيش.

التركيبات المعقمة للإعطاء عن غير طريق المعدة والأمعاء يفضل أن تكون في صورة المحاليل المائية أو غير المائية، المحاليل أو المستحلبات. كمذيب أو مادة ناقلة، يمكن أن يتم استخدام المياه، وجليكول البروبيلين، جليكول البولي إيثيلين، الزيوت النباتية، وخصوصا زيت الزيتون، الإسترات العضوية القابلة للحقن مثل الإيثيل أوليات أو غيرها من المذيبات العضوية المناسبة. يمكن أن تحتوي هذه التركيبات أيضا على المواد المساعدة، وخصوصا المواد المبللة، متساوية التوتر، المستحلبة، المشتتة والمثبتة. يمكن القيام بالتعقيم بالعديد من الطرق، على سبيل المثال عن طريق التعقيم والترشيح، من خلال دمج عوامل تعقيم في التركيبة، عن طريق الإشعاع أو عن طريق التسخين. يمكن تحضيرها أيضا في صورة تركيبات صلبة معقمة يمكن حلها في وقت استخدامها في الماء المعقم أو أي وسط آخر معقم قابل للحقن.

من المفضل، أن يتم إعطاء ADCs بطريقة تعم الجسم كله، وخصوصا في الوريد، في العضل، في الأدمة، في البريتون أو تحت الجلد، أو عن طريق الفم. بطريقة أكثر تفضيلا، يتم إعطاء التركيبة المشتملة على الـ ADCs وفقا للاختراع عدة مرات، بطريقة متتابعة.

يتعلق الاختراع أيضا بحقيبة طاقم تشتمل على الأقل على i) مترافق من جسم مضاد–عقار وفقا للاختراع و/ أو تركيبة صيدلانية وفقا للاختراع وii) محقنة أو قنينة أو أمبول يوجد بها المترافق المذكور للجسم المضاد– العقار و/ أو التركيبة الصيدلانية.

يمكن أن تتحدد طرق الإعطاء، والجرعة والصور الصيدلانية المناسبة وفقا للمعايير العامة التي تؤخذ في الاعتبار عند علاج المريض مثل، على سبيل المثال، سن المريض ووزن جسمه، خطورة الحالة، تحمل العلاج والتأثيرات الجانبية التي تتم ملاحظتها.

الخصائص والميزات الأخرى للاختراع سوف تكون واضحة من المثلة والأشكال التي سيتم شرحها فيما يلي.

مثال رقم ١: تكوين أجسام مضادة من الفأر تمت تنميتها مقابل IGF-1R ECD

لتكوين أجسام مضادة أحادية النسيلة من الفأر (Mabs) مقابل المجال خارج الخلوي البشري (ECD) للمستقبل البشري IGF-1 (hIGF-1R)، تم تحصين ٥ من فيران BALB/c ٣ مرات تحت الجلد باستخدام ١٠ ميكرو جرام من بروتين rhIGF-1R (R&D Systems, Cat N°391-GR). كبديل لذلك، تم تنفيذ ثلاثة عمليات تطعيم مختلفة باستخدام ١٠ ميكرو جرام من المجال خارج الخلوي من الفأر (ECD) من IGF-1R (R&D Systems, Cat N° 6630-GR/Fc) على بعض الحيوانات. تم تنفيذ التطعيم الأول في وجود مساعد Freund الكامل (Sigma, USA MD, St Louis). مساعد Freund غير الكامل (Sigma) تمت إضافة لتتبع عمليات التطعيم. قبل الاندماج بثلاثة أيام، تم تعزيز الفئران المحصنة باستخدام ١٠ ميكرو جرام من بروتين rhIGF-1R. عندئذ تم تحضير خلايا الطحال والخلايا اللمفية بتشريب الطحال وفرم العقد اللمفية القريبة، بالترتيب، وتجميعها من ١ من الـ ٥ الفئران المحصنة (تم اختيارها بعد معايرة أمصال كل الفئران) وتم دمجها مع SP2/0-Ag14 myeloma cells (ATCC, Rockville, MD, USA). طريقة الدمج مشروحة بواسطة Kohler and Milstein (Nature, 256: 495-497, 1975). يتم عندئذ إخضاع الخلايا المندمجة لاختيار HAT. بصفة عامة، بالنسبة لتحضير الأجسام المضادة أحادية النسيلة أو شظاياه الوظيفية، وخصوصا ذات الأصل من الفأر، يمكن الرجوع إلى التقنيات المشروحة وخصوصا في كتيب "الأجسام المضادة" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988). حوالي ١٠ أيام بعد الاندماج، تم فرز مستعمرات الخلايا الهجين. بالنسبة للفرز الأولي، تم تقييم معلقات الأورام الهجين لفرز Mabs التي تمت تنميتها مقابل بروتين الـ IGF-1R ECD بواسطة تحليل FACS باستخدام خلايا ورم الثدي MCF7 في الإنسان (ATCC) و/ أو خلايا COS7 في القرد (كلية قرد أخضر إفريقي-SV40 متحول) تعبر عن خلايا القرد في سطح خليتها IGF-1R. بمزيد من الدقة، للاختيار بواسطة العد الخلوي للتدفق، تم وضع ١٠ ٥ خلية (سواء MCF7 أوCOS7) في كل عين من طبق به ٩٦ عينا في PBS يحتوي على ١ % BSA و: ٠,٠١ % أزيد الصوديوم (محلول منظم FACS) عند ٤ °م. بعد ٢ دقيقة من الطرد المركزي عند ٢٠٠٠ لفة في الدقيقة، تمت إزالة

المحلول المنظم وتمت إضافة السوائل الطافية للورم الهجين المطلوب اختباره. بعد ٢٠ دقيقة من الحضانة عند ٤ °م، تم غسل الخلايا مرتين وتمت إضافة جسم مضاد Alexa 488 – مترافق من الماعز مضاد للفأر ١/٥٠٠° مخفف في محلول منظم FACS من (#A11017, Molecular Probes Inc., Eugene, USA) وتمت الحضانة لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م. بعد الغسل النهائي باستخدام محلول منظم FACS، تم تحليل الخلايا باستخدام FACS من (Facscalibur, Becton–Dickinson) بعد إضافة يوديد البروبيديوم إلى كل أنبوب بتركيز نهائي يبلغ ٤٠ ميكرو جرام/ مل. العين المحتوية على الخلايا فقط والخلايا التي تمت حضانتها باستخدام الجسم المضاد الثانوي المترافق Alexa 488 تم استخدامها كعينة مقارنة سابلة. تم استخدام عينات مقارنة النوع الشبيه في كل تجربة (Sigma, ref M90351MG). أخيرا تم تقييم ٥٠٠٠ خلية لحساب القيمة المتوسطة لشدة التألُّق (MFI).

بالإضافة إلى ذلك، تم تنفيذ اختبار إدخال لاختيار إدخال الأجسام المضادة فقط. لهذا الاختبار، تم استزراع سلالة خلية ورم MCF7 في RMPI 1640 بدون أحمر الفينول مع ١ % L– جلوتامين و: ١٠ % من FACS لمدة ٣ أيام قبل التجربة. تم عندئذ فصل الخلايا باستخدام التربسين ووضع ١٠٠ ميكرو لتر من معلق الخلية عند ٤,١٠٥ خلية/ مل في أطباق ذات ٩٦ عينا في RPMI1640 بدون أحمر الفينول مع ١ % L– جلوتامين و: ٥ % FBS. بعد ٢ دقيقة من الطرد المركزي عند ٢٠٠٠ لفة في الدقيقة، تمت إعادة تعليق الخلايا في ٥٠ ميكرو لتر من السوائل الطافية للورم الهجين أو محاليل الجسم المضاد المستخدمة في المقارنة (محاليل مقارن إيجابية ومن النوع الشبيه بتركيز ١ ميكرو جرام/ مل). بعد الحضانة لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م، تم عمل طرد مركزي للخلايا لمدة ٢ دقيقة عند ٢٠٠٠ لفة في الدقيقة وتمت إعادة التعليق في وسط مزرعة كامل بارد (٤ °م) أو دافئ (٣٧ °م). تمت عندئذ حضانة الخلايا لمدة ٢ ساعة عند ٣٧ °م أو عند ٤ °م. عندئذ تم غسل الخلايا ثلاث مرات باستخدام محلول منظم FACS. تمت حضانة جسم مضاد IgG موسوم بـ Alexa 488 – من الماعز مضاد للفأر لمدة ٢٠ دقيقة وتم غسل الخلايا ثلاث مرات قبل تحليل FACS على مجموعة الخلايا السلبية ليوديد البروبيديوم.

باتباع تحليل FACS، تم تحديد اثنتين من البارامترات: (i) فرق إشارة التألق التي يتم اكتشافها على أسطح الخلايا المحتضنة عند ٤ °م مع تلك التي يتم الحصول عليها باستخدام الخلايا

المحتضنة عند ٣٧ °م مع سائل طاف للورم الهجين و(ii) النسبة المئوية لـ IGF-1R المتبقي على سطح الخلية.

يتم حساب النسبة المئوية لـ hIGF 1R المتبقي كالتالي: IGF-1R المتبقي % = (MFI Ab ٣٧ °م/ MFI Ab ٤ °م) × ١٠٠.

بالإضافة إلى ذلك تم تنفيذ ثلاثة اختبارات ELISAs (قبل أو بعد الاستنساخ) لدراسة ربط الأجسام المضادة على بروتينات (hIGF-1R) البشرية معاودة الارتباط و(mIGF-1R) من الفأر، وعلى بروتين مستقبل الأنسولين معاود الارتباط في البشر (hIR). تم الاحتفاظ بالورم الهجين الذي يفرز الجسم المضاد يعطي ربطا على -rh و/ أو rm-IGF-1R ولا يعطي ربطا على rhIR.باختصار، تم طلاء أطباق ذات ٩٦ عينا لاختبار ELISA (Costar 3690, Corning, NY, USA) بتركيز ١٠٠ ميكرو لتر/ عين من بروتين rhIGF-1R (R&D Systems, cat N° 391-GR) بتركيز ٠,٦ ميكرو جرام/ مل أو rmIGF-1R protein (R&D Systems, cat N°6630-GR/Fc) بتركيز ١ ميكرو جرام/ مل أو rhIR (R&D Systems, cat N°1544-IR/CF) بتركيز ١ ميكرو جرام/ مل في PBS طول الليل عند ٤ °م. تم عندئذ سد الأطباق باستخدام PBS يحتوي على ٠,٥ % جيلاتين (#22151, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) لمدة ٢ ساعة عند ٣٧ °م. بمجرد إضافة محلول التشبع المنظم المستبعد بنقر الأطباق، تمت إضافة ١٠٠ ميكرو لتر من كل تخفيف لسائل طاف إلى كل عين (سواء كان سائل طاف غير مخفف للورم الهجين أو تخفيفات متسلسلة للسائل الطافي) وتمت الحضانة لمدة ١ ساعة عند ٣٧ °م. بعد ثلاث غسلات، ١٠٠ ميكرو لتر IgG مضاد للفأر من الماعز متعدد النسائل مترافق من بيروكسيداز الجرجار الحار (#115-035-164, Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) تمت إضافة بتخفيف ١/٥٠٠٠ في PBS يحتوي على ٠,١ % جيلاتين و: ٠,٠٥ % Tween 20 (وزن: وزن) لمدة ١ ساعة عند ٣٧ °م. عندئذ، تم غسل أطباق ELISA ٣ مرات وتمت إضافة ركيزة الـ TMB من (#UP664782, Uptima, Interchim, France). بعد الحضانة لمدة ١٠ دقائق عند درجة حرارة الغرفة، تم إيقاف التفاعل باستخدام حمض الكبريتيك ١ مولار وقياس الكثافة الضوئية عند ٤٥٠ نانو متر.

تم تمديد واستنساخ الورم الهجين الذي يفرز الجسم المضاد محل الاهتمام بتخفيف نهائي. بمجرد عمل النوع الشبيه، تم تمديد نسيلة من كل رمز وتجميدها. تم إنتاج كل جسم مضاد محل الاهتمام في أنظمة إنتاج معملية تسمى CellLine من (Integra Biosciences) للمزيد من التحديد.

تم إجراء تحاليل FACS إضافية لتحديد خصوصية الربط على خلايا IM9 (IR بشري يعبر عن أورمات لمفية ناشئة B) بالإضافة إلى الخلايا المصابة hIGF-1R مقابل الخلايا غير المصابة.

كل البيانات التي تناظر الأجسام المضادة المختارة تم تلخيص في جدول رقم ٧ وتوضيح أن الأجسام المضادة الخمسة المختارة تتعرف بشدة على IGF-1R الأصلي البشري الذي يتم التعبير عنه في خلايا سرطان الثدي MCF-7 أو على الخلايا المصابة. كما أنها تتعرف على IGF-1R للقرد على خلايا COS-7 . هذه الأجسام المضادة لا تتفاعل تقاطعيا مع مستقبل الأنسولين في البشر المكشوف بشدة على خلايا IM9. لوحظ أن هذه الأجسام المضادة تتعرف بدرجة قليلة على بروتين rhIGF-1R ECD عند طلائها مباشرة على أطباق ELISA.

جدول رقم ٧

اسم الورم الهجين	تفرع الشبيه	CNCM	ELISA (SVT ضد ٥ ميكرو جرام/ مل) D.O ٤٥٠ نانو متر			FACS (SVT ضد عند ٥ ميكرو جرام/ مل)				MCF-7 (SVT ضد ٥ ميكرو جرام/ مل)			
			rh IGF-1R	rm IGF-1R	rh Insulin R	MFI		MFI		rh IGF1 R بشفي %	بكرك (MFI) MFI-٢ (٢٣٠)		
						٤٠ نانو	٢٧٠ نانو	IM9 (IR)	Con-٢ (بكرك) IGF1 R	TF IGF1 R	TF غير IGF1R)		
306F7	IgG1 K	٤٧٥٧-٤	٠,١٦٢	٠,٠٩٩	٠,١٥٤	٣٥٠٠	٩٤	٤	١٠٨	٢٠٩٧	١٠٩	٢٦٩١	
212A11	IgG1 K	٤٧٧٣-٤	٠,٤٣٢	٠,١٠٣	٠,١٤١	٣٩١٠	١٠٦	٢	١٢٥	٢٠١٩٨	٩٨	٢٨٤١	
313B10	IgG1 K	٤٧٧١-٤	٠,٣٩٩	٠,٠٢٢	٠,١١٠	٣٨٩٦	١٠٥	٢	١٢٢	٢٠٠٥٥	٣٠	٢٨٧٠	
314F8	IgG1 K	٤٧٧٥-٤	٠,٠٤٩	٠,٠١٠٢	٠,٠١٧٥	٣٨٩٦	١٠١	٢	١٣٩	٢١٣٧	٢٨	٢٧٧٥	
219D6	IgG1 K	٤٧٣٦-٤	٠,٣٢٩	٠,٠١٢٢	٠,٠١٠٦	٣٤٤٩	١٠٦	٢	١١٤	٢٢١٠	٣٠	٢٤٣٠	

مثال رقم ٢: ربط الجسم المضاد مع IGF-1R البشري الأصلي باستخدام تحليلات FACS

تم جعل الأجسام المضادة من الفأر الخمسة IGF-1R متخالفة الصبغيات. تم تقييم خصائص ربط كل من الأجسام المضادة من الفأر ومتخالفة الصبغيات IGF-1R باستخدام تحليلات FACS على سلالة الخلية البشرية MCF-7 للأورام الغدية في الثدي (ATCC#HTB-22) باستخدام تركيزات متزايدة للجسم المضاد. لهذا الغرض، الخلايا (١×١٠ ٦ خلية/ مل) تمت

حضانتها باستخدام الأجسام المضادة لـ IGF-1R لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م في محلول منظم FACS (PBS، ٠,١ % BSA، ٠,٠١ % NaN3). تم عندئذ غسلها ٣ مرات وتمت حضانتها باستخدام الجسم المضاد الثانوي المناسب المقترن مع Alexa 488 لمدة ٢٠ دقيقة إضافية عند ٤ °م في الظلام قبل غسلها ٣ مرات في محلول منظم FACS. تم فورا تنفيذ ربط الأجسام المضادة لـ IGF-1R على خلايا قابلة للبقاء تم تحديدها باستخدام يوديد البروبيديوم (الذي يبقع الخلايا الميتة). تم تصميم أقصى شدة للإشارة يتم الحصول عليها باستخدام كل جسم مضاد في صورة Bmax والتعبير عنها في صورة متوسط شدة التألق (MFI). تم حساب قيمة الـ EC50 للربط معبرا عنها بالمولارية (M) باستخدام تحليل التراجع غير الخطي (GraphPad Prims 4.0).

أوضح منحنى المعايرة لكل Ab من الفأر أو متخالف الصبغيات أن كل الأجسام المضادة المتكونة قادرة على التعرف على صورة IGF-1R أصلية ذات مخطط تشبع نمطي (شكل رقم ١ أ). لتصنيف الأجسام المضادة وفقا لرتبتها ولمقارنة خصائص ربط كل من Abs من الفأر أو متخالفة الصبغيات، تم تحديد ربط EC50 لكل مركب باستخدام تحليل تراجع غير خطي. مقارنة الـ EC50 لكل Ab من الفأر مع توضيح صورتها متخالفة الصبغيات المناظرة أوضحت أن الصورتين عرضتا نفس خواص الربط مما يعني أن جعل Ab متخالف الصبغيات لم يؤثر في التعرف على IGF-1R (الأشكال ١ ب -ج). تم تلخيص قيم EC50 وBmax للأجسام المضادة متخالفة الصبغيات في جدول رقم ٨.

جدول رقم ٨

AC	Bmax	EC50
c208F2	٩٨١	٦,٧ ×١٠-١٠
c212A11	٩٩١	٦,٧ ×١٠-١٠
c214F8	١٠٦٩	٥,٠ ×١٠-١٠
c219D6	٩٩٣	٤,٧ ×١٠-١٠

c213B10	١١٠٣	٤,٤ ×١٠-١٠

مثال رقم ٣: تأكيد خصوصية الجسم المضاد باستخدام الخلايا المصابة سواء IGF-1R أو IR أو خلايا IM9 التي تعبر عن مستويات مرتفعة من IR

لتأكيد خصوصية الأجسام المضادة المتكونة لـ IGF-1R مقابل IR، تم تقييم نواقل الإصابة الثابتة التي تعبر عن hIGF-1R أوhIR باستخدام تحليلات FACS.باختصار، زيادة تركيزات mAbs متخالفة الصبغيات التي تمت حضانتها باستخدام الخلايا لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م في محلول منظم FACS (PBS، ٠,١ % BSA، ٠,٠١ % NaN3). تم عندئذ غسل الخلايا ٣ مرات وتمت حضانتها باستخدام الجسم المضاد الثانوي المناسب المقترن مع Alexa 488 قبل الحضانة لمدة ٢٠ دقيقة أخرى عند ٤ °م في الظلام ثم غسلها ٣ مرات في محلول منظم FACS. تم فورا تنفيذ ربط الأجسام المضادة لـ IGF-1R على خلايا قابلة للبقاء تم تحديدها باستخدام يوديد البروبيديوم (الذي يبقع الخلايا الميتة). تم حساب قيمة الربط EC50 معبرا عنها بالمولارية (M) باستخدام تحليل التراجع غير الخطي (GraphPad Prims 4.0).

منحنيات معايرة التي تم الحصول عليها على سلالة خلية المصابة hIGF-1R (شكل رقم ٢ أ) مقابل الخلايا غير المصابة (شكل رقم ٢ ب) أكدت خصوصية ربط Abs متخالف الصبغيات لـ IGF-1R البشري. EC50 وتم تلخيص قيم Bmax في جدول رقم ٩.

جدول رقم ٩

Ac	Bmax	EC50 (مولار)
C208F2	٢٠٠٨	٣,٢ ×١٠-١٠
C212A11	٢٥١٣	٤,٤ ×١٠-١٠
C-214F8	٢٠٩٤	٢,٧ ×١٠-١٠
C-219D6	٢٥٢١	٥,٥ ×١٠-١٠

C-213B10	٢٠٢٩	١٠-١٠× ٣,٣

للتحقق من غياب ربط كل من الأجسام المضادة من الفأر ومتخالفة الصبغيات على hIR، تم استخدام سلالة خلية ثابتة تعبر عن IR البشري (hIR). تم تنفيذ التعرف على hIR على سطح الخلية البشري بواسطة كل من الجسم المضاد من الفأر ومتخالف الصبغيات باستخدام تحليلات FACS. تمت حضانة تركيزات متزايدة من mAbs من الفأر أو متخالفة الصبغيات في سلالة خلية المصابة hIR+ لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م في محلول منظم FACS (PBS، ٠,١ % BSA، ٠,٠١ % NaN3). تم عندئذ غسل الخلايا ٣ مرات وتمت حضانتها باستخدام الجسم المضاد الثانوي المناسب المقترن مع Alexa 488 قبل الحضانة لمدة ٢٠ دقيقة أخرى عند ٤ °م في الظلام ثم غسلها ٣ مرات في محلول منظم FACS. تم فورا تنفيذ ربط الأجسام المضادة لـ IGF-1R على خلايا قابلة للبقاء تم تحديدها باستخدام يوديد البروبيديوم (الذي يبقع الخلايا الميتة). تم حساب قيمة الربط EC50 معبرا عنها بالمولارية (M) باستخدام تحليل التراجع غير الخطي (GraphPad Prims 4.0). تم استخدام مستنسخ GRO5 للجسم المضاد لـ hIR كعينات مقارنة موجبة. تم إدخال الأجسام المضادة 9G4 من الفأر ومتخالفة الصبغيات باعتبارها أجسام مضادة غير ذات صلة.

تم تأكيد المستوى المرتفع من التعبير عن hIR على سطح الخلية في الخلايا المصابة باستخدام الجسم المضاد لـ hIR التجاري GRO5 (شكل رقم ٣ أ و: ٣ ب). حتى مع استخدام تركيزات مرتفعة من hIGF-1R Abs من الفأر (شكل رقم ٣ أ) أو متخالفة الصبغيات (شكل رقم ٣ ب)، لم يحدث ربط على سطح الخلايا المصابة بـ hIR+. أوضحت هذه النتائج أن لا Abs من الفأر ولا متخالفة الصبغيات المضادة لـ hIGF قد تعرفت على hIR.

هذه الخصوصية في التعرف على hIGF-1R مقابل IR تم أيضا توضيحها، باستخدام تحليلات FACS، باستخدام خلايا IM9، سلالة خلية ورم لمفي B تعبر عن hIR (شكل رقم ٤). لتحليلات FACS هذه، تم اتباع نفس البروتوكول مثل السابق شرحه وتم استخدام أجسام مضادة من الفأر لمنع التفاعل المتبادل لـ Ab الثانوي المضاد للبشر (تعبر خلايا IM9 عن Ig البشري على سطح خلاياها). النتائج المقدمة في شكل رقم ٤ أوضحت مرة أخرى أن الإشارة المتوقعة تمت ملاحظتها

باستخدام الجسم المضاد hIR لـ GRO5 بينما لم يظهر جسم مضاد من الفأر تم تقييمه أي إشارة ربط واضحة على سلالة الخلية هذه.

مثال رقم ٤: ربط الجسم المضاد مع IGF-1R الأصلي من القرد بواسطة FACS وتحليلا Biacore

واحد من أول الشروط المسبقة لدراسات علم السموم التنظيمية هو العثور على نوع الحيوانات ذات الصلة من أجل تقييم المركب المختار. لأن سلسلة الأجسام المضادة المذكورة هنا ليست قادرة على التعرف على IGF-1R للفئران، فإن النوع الأكثر احتمالا لتقييم السمية هي الرئيسيات غير البشرية (NHP).

لتقييم ربط الأجسام المضادة لـ IGF-1R في IGF-1R في الفأر، تم أولا تقييم ربط كل من الأجسام المضادة لـ IGF-1R من الفأر ومتخالفة الصبغيات باستخدام تحليلات FACS على سلالة خلية COS-7 باستخدام تركيزات متزايدة من الجسم المضاد. تمت حضانة الخلايا (١×١٠ ٦ خلية/ مل) باستخدام أجسام مضادة لـ IGF-1R لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م في محلول منظم FACS (PBS، ٠,١ %، BSA، ٠,٠١ % NaN3). عندئذ، تم غسل الخلايا ٣ مرات وتمت حضانتها باستخدام الجسم المضاد الثانوي المناسب المقترن مع Alexa 488 قبل الحضانة لمدة ٢٠ دقيقة أخرى عند ٤ °م في الظلام وأخيرا تم غسلها ٣ مرات في محلول منظم FACS. تم فورا تقييم ربط أجسام مضادة لـ IGF-1R على خلايا قابلة للبقاء تم تحديدها باستخدام يوديد البروبيديوم (الذي يبقع الخلايا الميتة). تم حساب قيمة الربط EC50 معبرا عنها بالمولارية (M) باستخدام تحليل التراجع غير الخطي (GraphPad Prims 4.0).

منحنيات المعايرة التي تم الحصول عليها على سلالة خلية من القرد COS-7 أوضحت أن، كل Abs المضادة لـ hIGF تعرفت بصفة خاصة على الـ IGF-1R المكشوف على سطح سلالة خلية IGF-1R من القرد (شكل رقم ٥ أ). تحديد EC50 لكل Abs من الفأر أو متخالفة الصبغيات أوضح أن الصورتين اللتين تمت مقارنتهما تتعلقان بصورة جيدة بخواص الربط لهما على IGF-1R في القرد (شكل رقم ٥ ب). توضح هذه النتائج أن كل مضادات hIGF-1R التي تم تكوينها - قد تعرفت على IGF-1R من القرد.

تم تنفيذ مقارنة لربط EC50 على خلايا COS-7 مقابل خلايا المصابة IGF-1R لتحقيق مقدار التعرف على الجسم المضاد متخالف الصبغيات على IGF-1R البشري مقابل القرد. النتائج الموضحة في شكل رقم ٥ ج أوضحت تعرفا شبيها على IGF-1Rs من البشر والقرد بواسطة كل الأجسام المضادة.

لتأكيد التعرف على نوع آخر من القردة، تمت إصابة الخلايا بصورة الـ IGF-1R لقرد الرباح لإنتاج IGF-1R ECD من الفأر قابل للذوبان وتم تنفيذ تجارب Biacore مع واحد من الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات (c208F2) لمقارنة خواص الربط له سواء مع hIGF-1R أو الـ IGF-1R من قرد الرباح.

تم إجراء تجارب التعرف على جهاز Biacore ×100 باستخدام شريحة مستشعر CM5 منشطة بواسطة جسم مضاد His مضاد لـ Tag (His capture kit GE Healthcare catalogue number 28-9950-56). أكثر من RU١١٠٠٠ من الأجسام المضادة تم تطعيمها كيميائيا على قالب الكربوكسي ميثيل دكستان باستخدام طاقم حقيبة كيمياء الأمين. تم تنفيذ التجارب عند ٢٥ °م بمعدل تدفق يبلغ ٣٠ ميكرو لتر/ دقيقة باستخدام المحلول المنظم HBS- EP (GE Healthcare) باعتباره المحلول الجاري ومحلول منظم لتخفيف العينة. تم استخدام المخطط الحركي ذي الدورة المفردة لتحديد البارمترات الحركية لربط الصورة متخالفة الصبغيات من الجسم المضاد 208F2 أي (C-208F2) على hIGF-1R بالمقارنة بـ Macaca IGF-1R

تم حقن محلول من صورة معاودة الارتباط قابلة للذوبان من الـ IGF-1R رباعي الوحدات غير المتجانس المتكون من سلاسل ٢ α والمجالات الخارج خلوية لسلاسل β٢ المعبر عنها بواسطة طرفية إضافية His tag-١٠، المعتمدة على متوالية بشرية (R&D Systems catalogue number 305-GR-50) أو على واحدة من متواليات قرد الرباح (منتجة محليا) ١ دقيقة على خلية التدفق الثانية بتخفيف محدد لالتقاط حوالي RU١٦٠ من مولد الضد. بعد مرحلة الالتقاط، تم حقن المحلول المنظم الحالي ٥ مرات (٩٠ ثانية لكل مرة حقن) أو مدى منامي من ٥ تركيزات لـ c208F2 (ثانية لكل مرة حقن) على كل من خلايا التدفق. في نهاية المرة الخامسة للحقن تم إمرار المحلول المنظم الحالي لتحديد معدل التفكك.

تم عندئذ تجديد السطح بحقن ١٠ ملي مولار جليسين، محلول منظم HCl رقم هيدروجيني ١,٥ خلال ٣٠ ثانية.

الإشارة المحسوبة تناظر الفرق بين استجابة خلية التدفق ٢ (مع IGF-1R ملتقط) واستجابة خلية التدفق ١ (بدون أي جزيئات IGF-1R) (شكل رقم ٦).

لكل جزيء IGF-1R (بشري أو كلبي)، تم تصحيح الإشارة الناتجة عن الحقن بالمدى المتنامي من تركيزات C-208F2 بطرح الإشارة التي تم الحصول عليها باستخدام ٥ مرات حقن بالمحلول المنظم (مرجع مزدوج). تم تحليل منحنيات الاستجابة الناتجة مقابل الزمن باستخدام برمجيات Biaevaluation مع نموذج ١: ١. يتم تقييم المعدلات الحركية بصورة مستقلة (٢ من المعدلات الحركية لربط c208F2 على كل IGF-1R) أو بصفة عامة (نفس المعدلات الحركية للربط c208F2 على IGF-1R البشري أو من قرد الرباح). تم تقييم جودة المواءمة بواسطة نسبة Chi2/Rmax أقل من RU٠,٠٥ .

المعدلات الحركية للربط (أنظر جدول رقم ١٠) المحددة بصورة منفصلة لكل IGF-1R متقاربة ومواءمة كل من منحنيات الاستجابة مقابل الزمن ذات نفس المعدلات الحركية تكون ذات نوعية جيدة.

الجسم المضاد c208F2 يتعرف أيضا على IGF-1Rs معاودة الارتباط في البشر وقرد الرباح بمعامل تفكك (KD) حوالي ٠,٢ نانو مولار. قيم للألفة المحددة في هذه الدراسة تناظر قيم الألفة الوظيفية (الإضافات) للأجسام المضادة لمستوى IGF-1R الملتقط في البشر وقرد الرباح حوالي RU١٦٠ .

جدول رقم ١٠

IGF1R	Kon [1/M. s]	Koff [١/ث]	Kd[نانو مولار]	Chi2/Rmax
إنسان	١,٥٢ ×١٠+٦	٣,٤٠×١٠-٤	٠,٢٣	٠,٠٤٥
قرد رباح	١,٨٥ ×١٠+٦	٣,١٠×١٠-٤	٠,١٧	٠,٠٣٢

إنسان & قرد رباح	١,٥٢× ١٠ ٦+	٣,٣٣×١٠-٤	٠,٢٢ ٠,٠٣٩

مثال رقم ٥: التأثير الذاتي للأجسام المضادة التي تم تكوينها على فسفرة IGF-1R

من المعروف أن الأجسام المضادة يمكن ان تؤدي إلى تأثير معزز عندما ترتبط مع مستقبلات كيناز التيروسين. لأننا لا نرغب في اختيار هذه الأجسام المضادة المعززة، تمت دراسة تقييم فسفرة hIGF-1R باستخدام الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات.

٥ لهذا السبب، تمت حضانة خلايا MCF-7 في وسط خال من المصل طول الليل. عندئذ، تمت إضافة IGF-1 (١٠٠ نانو مولار) أو Abs (١٠ ميكرو جرام/ مل) المطلوب اختباره لمدة ١٠ دقيقة عند ٣٧ °م. تم استبعاد الوسط وكشط الخلايا في محلول منظم للحل (رقم هيدروجيني ٧,٥) يحتوي على ١٠ ملي مولار محلول Tris HCl منظم (رقم هيدروجيني ٧,٥)، ١٥ % NaCl (١ مولار)، ١٠ % خليط مادة منظفة (١٠ ملي مولار Tris-HCl، ١٠ % محلول Igepal منظم ١٠ للحل) (Sigma Chemical Co.)، ٥ % صوديوم ديوكسي كولات (Sigma Chemical Co.)، ١ قرص TM كامل لخليط مثبت بروتياز (Roche)، ١ % خليط مثبت فوسفاتاز Set II (Calbiochem)، لمدة ٩٠ دقيقة عند ٤ °م. تمت تنقية نواتج الحل بالطرد المركزي عند ٤ °م، وتسخينها لمدة ٥ دقيقة عند ١٠٠ °م والحفاظ عليها عند -٢٠ °م او تحميلها مباشرة على ٤-١٢ % SDS-PAGE gels. تم تنفيذ حضانة الجسم المضاد الأولي لمدة ٢ ساعة عند درجة حرارة ١٥ الغرفة ثم تم تنفيذ الحضانة باستخدام الأجسام المضادة الثانوية المرتبطة بـ HRP لمدة ١ ساعة عند درجة حرارة الغرفة. تم غسل الأغشية في TBST قبل مشاهدة البروتينات باستخدام ECL. تم تقييم البقع باستخدام برمجيات Image J. تمت معايرة قيم الفوسفو-بروتين باستخدام GAPDH. فسفرة hIGF-1R استجابة لـ IGF-1 تم اعتبارها ١٠٠ % استثارة. تم تحديد تأثير مضاد - hIGF-1R Abs على فسفرة hIGF-1R باعتباره % من الفسفرة المستحثة بـ IGF-1.

٢٠ النتائج المشروحة في شكل رقم ٧ تمثل متوسط النسبة المئوية من pIGF-1R استجابة لمضاد لـ IGF-1R Abs متخالف الصبغيات استجابة لثلاثة تجارب مستقلة -/+الخطأ المعياري. بالمقارنة بـ IGF-1. كما هو موضح لم تتم ملاحظة توجد فسفرة واضحة أو قليلة (أقل من ١٠ %) لـ

hIGF-1R عندما تمت حضانة خلايا MCF-7 باستخدام ١٠ ميكرو جرام من مضاد لـ IGF-1R Abs.

مثال رقم ٦: تثبيط فسفرة IGF-1R استجابة لـ IGF-1 بواسطة الأجسام المضادة لـ IGF-1R من الفأر

لتمييز الأجسام المضادة المختارة، تمت دراسة قدرتها على تثبيط الفسفرة المستحثة بـ IGF1. لهذا السبب، تمت حضانة خلايا MCF-7 في وسط خال من المصل طول الليل. عندئذ، تمت حضانة الخلايا لمدة ٥ دقائق مع Abs مضاد لـ hIGF-1R من الفار قبل إضافة IGF-1 لمدة ٢ دقيقة عند ٣٧ °م. تم استبعاد الوسط وكشط الخلايا في محلول منظم للحل (رقم هيدروجيني ٧,٥) يحتوي على ١٠ ملي مولار محلول Tris HCl منظم (رقم هيدروجيني ٧,٥)، ١٥ % NaCl (١ مولار)، ١٠ % خليط مادة منظفة (١٠ ملي مولار Tris-HCl، ١٠ % محلول Igepal منظم للحل) (Sigma Chemical Co.)، ٥ % صوديوم ديوكسي كولات (Sigma Chemical Co.)، ١ قرص TM كامل لخليط مثبت بروتياز (Roche)، ١ % خليط مثبت فوسفاتاز Set II (Calbiochem)، لمدة ٩٠ دقيقة عند ٤ °م. تمت تنقية نواتج الحل بالطرد المركزي عند ٤ °م، وتسخينها لمدة ٥ دقيقة عند ١٠٠ °م والحفاظ عليها عند -٢٠ °م او تحميلها مباشرة على أنواع هلام ٤-١٢ % SDS-PAGE. تم تنفيذ حضانة الجسم المضاد الأولي لمدة ٢ ساعة عند درجة حرارة الغرفة ثم تم تنفيذ الحضانة باستخدام الأجسام المضادة الثانوية المرتبطة بـ HRP لمدة ١ ساعة عند درجة حرارة الغرفة. تم غسل الأغشية في TBST قبل مشاهدة البروتينات باستخدام ECL. تم تقييم البقع باستخدام برمجيات Image J. تمت معايرة قيم الفسفو-بروتين باستخدام GAPDH. فسفرة الـ hIGF-1R استجابة لـ IGF-1 تم اعتبارها ١٠٠ % استثارة. تم تحديد تأثير مضاد -hIGF-1R Abs على فسفرة hIGF-1R باعتباره % من الفسفرة المستحثة بـ IGF-1.

كل Abs مضادة لـ IGF-1R قامت بتثبيط فسفرة hIGF-1R بشدة استجابة لـ IGF-1 (نقص أكبر من ٨٠ %) (شكل رقم ٨). أفضل مثبطات الفسفرة المستحثة بـ IGF1 لـ hIGF-1R هي الـ m208F2، m212A11 و m214F8 Mabs.

مثال رقم ٧: دراسة إدخال IGF-1R بعد ربط IGF-1R المتكون بالأجسام المضادة باستخدام تحليلات FACS

تمت حضانة خلايا MCF-7 باستخدام أجسام مضادة متخالفة الصبغيات بتركيز ١٠ ميكرو جرام/ مل عند ٤ °م لمدة ٢٠ دقيقة عندئذ، تم غسل الخلايا وحضانتها عند ٤ °م أو ٣٧ °م لمدة ٤ ساعات. تم تحديد كمية الجسم المضاد المرتبط بسطح الخلية باستخدام جسم مضاد ثانوي. ΔMFI المعرفة باعتبارها الفرق بين MFI المقاسة عند ٤ °م وMFI المقاسة عند ٣٧ °م بعد فترة حضانة قدرها ٤ ساعات تناظر كمية Ab الذي تم إدخاله. تم تقديم ΔMFI في شكل رقم ٩ وجدول رقم ١١. تم حساب النسبة المئوية للإدخال عند ١٠ ميكرو جرام/ مل من Ab كالتالي ١٠٠ * (MFI عند ٤ °م –MFI عند ٣٧ °م) / MFI عند ٤ °م وتم تقديمها في جدول رقم ١١.

جدول رقم ١١

Abs	الإدخال %	ΔMFI	ΔMFI_ EC50
c208F2	٨٣	٢٨٨	١,٨ ×١٠-١٠
c212A11	٨٠	٣٢٢	٢,٧ ×١٠-١٠
c214F8	٨٧	٤٠٣	٢,٢ ×١٠-١٠
c219D6	٨٠	٣٥٣	٤,٤ ×١٠-١٠
c231B10	٨٥	٣٦٩	٢,٣ ×١٠-١٠

لتحديد ما إذا كانت الأجسام المضادة التي تعرفت أيضا على IGF-1R من القرد IGF-1R قادرة على إدخال هذا المستقبل، تم تنفيذ نفس تجربة الإدخال. النتائج الموضحة في جدول رقم ١٢ تبين أن كل الأجسام المضادة المختبرة قادرة على أن تتوسط إدخال IGF-1R من القرد.

جدول رقم ١٢

	Abs من الفأر		Abs متخالف الصبغيات	
Abs	ΔMFI	% إدخال	ΔMFI	% إدخال
208F2	٥٣	٧٤	٥٢	٦٧
212A11	٨٣	٧٣	٩٨	٧٥
214F8	٧٦	٧١	٩٨	٧٢
219D6	٨٠	٧١	١٠٢	٧٤
213B10	٨٤	٧٤	١٠١	٧٣

تم عمل المزيد من التقييم لحركيات تناقص ربط الجسم المضاد بسطح الخلية. لهذا السبب، تم زرع خلايا MCF-7 في أطباق ذات ٩٦ عينا وتمت حضانتها باستخدام ١٠ ميكرو جرام/ مل من Abs من الفأر لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م. تم عندئذ غسل الخلايا لإزالة الجسم المضاد غير المرتبط وفي أوساط عند ٣٧ °م لمدة ١٠، ٢٠، ٣٠، ٦٠ أو ١٢٠ دقيقة. عند كل نقطة زمنية، تم عمل طرد مركزي للخلايا وتم وسم سطحها على الثلج باستخدام IgG-Alexa488 ثانوي مضاد للفأر لتحديد كمية الجسم المضاد المتبقي على سطح الخلية. شدة التألُّق لكل Abمن الفأر ولكل نقطة زمنية تمت معايرة باستخدام الإشارة عند ٤ °م (النسبة المئوي لـ IGF-1R المتبقي) وتمت مواءمتها مع التحلل المتزايد لتحديد نصف العمر (t1/2). t1/2 تم اعتبارها الزمن المطلوب للحصول على نقص يبلغ ٥٠ % من الإشارة. كما هو موضح في شكل رقم ١٠، تناقص مستوى السطح في كل Abs من الفأر بسرعة خلال أول ٣٠ دقيقة وبلغ التناقص أقصاه بعد ٦٠ دقيقة من

الحضانة (شكل رقم ١٠ أ). كانت فترة نصف العمر المحسوبة بين ١٠ و: ١٨ دقيقة وفقا للـ Ab من الفأر (شكل ١٠ ب).

للتحقق من أن النقص في إشارة سطح الخلية كان بسبب إدخال Ab وليس بسبب فقد المستقبل، تمت حضانة الخلايا باستخدام Abs من الفأر لمدة ٠، ٣٠ و: ٦٠ دقيقة عند ٣٧ °م (شكل رقم ١١). لم يتم تثبيت الخلايا وتم جعلها منفذة أو لم يتم لتحديد الجسم المضاد المرتبط بسطح الخلية (نفاذية w/o) وإشارة جسم مضاد كاملة تناظر ربط سطح الخلية + Ab الذي تم إدخاله (بالنفاذية). تم تحديد كمية Ab الذي تم إدخاله (سيتوبلازمي) كالتالي: MFI بعد النفاذية – نفاذية MFI w/o. أوضحت هذه التجربة أن النقص في Ab المرتبط بسطح الخلية كان بسبب الزيادة في Abs السيتوبلازمي مما يوضح أن Abs قد تم إدخالها (شكل رقم ١١). بالإضافة إلى ذلك، تفكك الـ Abs بدأ بعد ١ ساعة من الحضانة كما هو موضح بواسطة النقص في الإشارة بعد النفاذية (كلي).

مثال رقم ٨: دراسة إدخال IGF-1R بعد ربط IGF-1R المتكون للأجسام المضادة بالتحليلات المجهرية متحدة البؤرة

لتأكيد إدخال الأجسام المضادة، تم إجراء دراسة مجهرية متحدة البؤرة لتقييم التوزيع تحت الخلوي للأجسام المضادة بعد تنظيم المرور الخلوي. تمت حضانة الخلايا مع مضاد hIGF-1R Abs- عند ٣٧ °م، وتثبيتها وتحقيق نفاذيتها. لذلك، تم تبقيع الخلايا باستخدام جسم مضاد ثانوي Alexa-٤٨٨ وجسم مضاد Lamp-1 من الأرنب تم كشفع باستخدام و IgG Alexa ثانوي مضاد للأرنب ٥٥٥. قبل الحضانة عند ٣٧ °م، تم وضع 208F2 Ab من الفأر على غشاء خلايا MCF-7 (شكل رقم ١٢ أ). لم يتم عمل مستعمرة مع مُظهِر الجسيم الدهني، تمت ملاحظة lamp-1 باستخدام مدخل مُظهِر حدوث المستعمرة في برمجيات Image J. تناقص ربط الجسم المضاد بسطح الخلية بشدة بعد ١٥ دقيقة من الحضانة عند ٣٧ °م. في نفس وقت حدوث النقص في الجسم المضاد المرتبط بسطح الخلية، تم اكتشاف جسم مضاد داخل الخلية في الحويصلات. يمكن ملاحظة تكوين ضئيل للمستعمرة مع lamp-1. بعد الحضانة لمدة ٣٠ دقيقة، كان من الصعب اكتشاف الجسم المضاد المرتبط بسطح الخلية. مع ذلك، فقد زاد تجمع Ab على الجسيم الدهني. بعد الحضانة لمدة ١ ساعة، تناقص تبقيع داخل الخلية Ab بالإضافة إلى عدد

المستعمرات مع lamp-1. ارتبطت حركيات الجسم المضاد المرتبط بسطح الخلية وتراكمه داخل الخلية بحركيات تحلل سطح الجسم المضاد المقاسة بواسطة FACS. بالإضافة إلى ذلك، كما سبق شرحه فيما يتعلق بدراسات FACS، فقد بدأ تحلل Abs من الفأر بعد الحضانة لمدة ١ ساعة وفقا للكشف المجهري متحد البؤرة.

تم أيضا تقييم إدخال كل الأجسام المضادة الأخرى hIGF-1R من الفأر وعمل مستعمرة لها مع Lamp-1 (شكل رقم ١٢ ب). بعد ٣٠ دقيقة من الحضانة عند ٣٧ °م، تم اكتشاف الجسم المضاد داخل الخلية وعمل مستعمرة له مع lamp-1 مما يوضح أن كل الأجسام المضادة المختارة لـ IGF-1R قد تم إدخالها بفعالية إلى أجسام الحل.

مثال رقم ٩: تثبيط تحلل Abs باستخدام مثبط الجسيم الحل، بافيلوميسين أ١

لتأكيد أن الأجسام المضادة وصلت الجسيم الدهني حيث تحللت، تمت معالجة الخلايا، أو لم تتم، باستخدام بافيلوميسين أ١، وهو مثبط قوي لوظائف الجسيم الدهني. تمت عندئذ حضانة الخلايا باستخدام ١٠ ميكرو جرام/ مل من Ab المطلوب اختباره عند ٤ °م، وغسلها وتمت حضانتها لمدة ٢ ساعة عند ٣٧ °م. تم اكتشاف الـ Ab الذي تم إدخاله بعد تخلل الخلية باستخدام IgG-Alexa ثانوي مضاد للفأر Ab٤٨٨ . منعت إضافة بافيلوميسين أ١ تحلل Ab داخل الخلية (شكل رقم ١٣) مما يوضح أن Abs تم إدخاله بفعالية وتحلل إلى جسيمات حل.

مثال رقم ١٠: تأثير الرقم الهيدروجيني على ربط الجسم المضاد - IGF-1R

لأن الأجسام المضادة قد تم اختيارها على أساس القدرة على إدخالها والتي اتضح فيما سبق أنها تأخذ نفس الموضع مع الجسيمات الداخلية الباكرة قبل الدخول إلى حجيرة الجسيم الدهني، تم عمل مقاربة هامة تتمثل في اختيار الأجسام المضادة التي تم تعديل ثبات ربط Ab/hIGF-1R لها فيما يتعلق بالرقم الهيدروجيني للوسط ويفضل الأجسام المضادة التي تتحلل من IGF-1R عندما يصبح الرقم الهيدروجيني للوسط حمضيا. في الواقع، الفرق الأولي بين الجسيمات الداخلية الباكرة وجسيمات الحل هو الرقم الهيدروجيني المرتبط باللمعة: في حجيرة الجسيم الدهني يكون الرقم الهيدروجيني حوالي ٦ بينما في حجيرة جسيم الحل يكون الرقم الهيدروجيني حوالي ٤,٥.

من المعروف أن بمجرد الإدخال بعد ربط المجموعة الترابطية (IGF1)، يعود hIGF-1R إلى سطح الخلية خلال مسار إعادة تدوير.

دون الارتباط بنظرية معينة، يفترض هنا أن الأجسام المضادة أكثر عرضة للإطلاق من هدفها في وقت مبكر في رقم هيدروجيني حمضي سوف تساعد بصورة مفضلة في إعادة التدوير المستهدفة إلى الغشاء ويمكن اعتبارها بالتالي كمرشحين أفضل لنهج ADC.

لبحث ما إذا كانت بعض الأجسام المضادة تتمتع بهذه الخاصية ولربط هذه الخاصية بالنشاط السمي الخلوي، تم ربط 1R Mabs المضادة لـ hIGF-1R من الفأر على سلالة الخلية MCF-7 في محاليل منظمة عند أرقام هيدروجينية مختلفة. تمت حضانة تركيزات متزايدة من mAbs من الفأر على سلالة الخلية MCF-7 لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م عند أرقام هيدروجينية مختلفة تتراوح بين ٥ و: ٨. تم عندئذ غسل الخلايا ٣ مرات وتمت حضانتها باستخدام الجسم المضاد الثانوي المناسب المقترن مع Alexa 488 في محلول منظم FACS. تمت حضانة الخلايا لمدة ٢٠ دقيقة أخرى عند ٤ °م في الظلام ثم غسلها ٣ مرات في محلول منظم FACS. تم فورا تنفيذ ربط الأجسام المضادة لـ 1R مع hIGF على خلايا قابلة للبقاء تم تحديدها باستخدام يوديد البروبيديوم الذي يبقع الخلايا الميتة. تم حساب قيمة الربط EC50 معبرا عنها بالمولارية (M) باستخدام تحليل التراجع غير الخطي (GraphPad Prims 4.0). أظهرت كل الأجسام المضادة من الفأر لـ IGF-1R المختارة قدرة ربط أضعف في الرقم الهيدروجيني الحمضي كما هو موضح في شكل رقم ١٤.

تم ربط ربط Mabs مع مضاد لـ IGF-1R المتوافق مع البشر على سلالة الخلية MCF-7 في محاليل منظمة عند أرقام هيدروجينية مختلفة. تمت حضانة تركيزات متزايدة من mAbs المتوافق مع البشر على سلالة الخلية MCF-7 لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م عند أرقام هيدروجينية مختلفة تتراوح بين ٥ و: ٨. تم عندئذ غسل الخلايا ٣ مرات وتمت حضانتها باستخدام الجسم المضاد الثانوي المناسب المقترن مع Alexa 488 في محلول منظم FACS. تمت حضانة الخلايا لمدة ٢٠ دقيقة أخرى عند ٤ °م في الظلام ثم غسلها ٣ مرات في محلول منظم FACS. تم فورا تنفيذ ربط الأجسام المضادة 1R مضاد مع IGF على خلايا قابلة للبقاء تم تحديدها باستخدام يوديد البروبيديوم الذي يبقع الخلايا الميتة. تم حساب قيمة الربط EC50 معبرا عنها بالمولارية (M)

باستخدام تحليل التراجع غير الخطي (GraphPad Prims 4.0). أظهرت كل الأجسام المضادة من الفأر لـ IGF-1R المختارة قدرة ربط أضعف في الرقم الهيدروجيني الحمضي كما هو موضح في شكل رقم ٢٤.

مثال رقم ١٢: تقييم صورة متوافقة مع البشر من 208F2 Mab

١٢-١ تقييم ربط وإدخال الصورة الأولى المتوافقة مع البشر hz208F2 VH3/VL3 (يشار إليه أيضا باسم hz208F2 H026/L024)

تم تقييم ربط الصورة الأولى المتوافقة مع البشر من الـ c208F2 mAb على MCF-7، COS-7 وسلالات خلية NIH 3T3 IR+. تمت إضافة تركيزات متزايدة من m208F2، c208F2 أو hz208F2 VH3VL3 إلى كل سلالة خلية لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م. تم عندئذ غسل الخلايا والكشف عن ربط mAb المختبرة باستخدام الجسم المضاد الثانوي المناظر. للتحقق من التعبير الوراثي عن IR البشري على سلالة خلية المصابة، تم استخدام مستنسخ الجسم المضاد لـ hIR التجاري GRO5 وتم تقديم مثال لمخطط التعرف له في (شكل رقم ١٥ د).

مقارنة الصورة المتوافقة مع البشر مع خلايا الصور من الفأر أو متخالفة الصبغيات على MCF-7 (شكل رقم ١٥ أ) أو القرد COS-7 (شكل رقم ١٥ ب) أظهرت مخططات متقاربة للصور الثلاثة المختبرة. عملية التوافق مع البشر لم تؤد إلى تعديل خصوصية التعرف على الجسم المضاد والتي يفضل أتن تكون قريبة من الصور من الفأر ومتخالفة الصبغيات المرتبطة بغياب النشاط المتبادل لمستقبل الأنسولين في البشر (شكل رقم ١٥ ج).

EC50s المحسوبة للصورة الأولى المتوافقة مع البشر من 208F2 على سلالة الخلية البشرية MCF-7 وسلالة خلية IGF-1R من القرد COS-7 كانت تشبه ذلك الذي يتحدد بالصور من الفأر أو متخالفة الصبغيات من الـ 208F2 mAb.

تم تقييم قدرة الـ hz208F2 VH3/VL3 mAb على أن يصبح داخليا بالعد الخلوي للتدفق. تمت حضانة خلايا MCF-7 باستخدام ١٠ ميكرو جرام/ مل من الأجسام المضادة عند ٤ °م لمدة ٢٠ دقيقة عندئذ، تم غسل الخلايا وحضانتها عند ٤ °م أو ٣٧ °م لمدة ٤ ساعات. كمية الجسم المضاد المرتبط بسطح الخلية تم تحديد باستخدام جسم مضاد ثانوي. ΔMFI المعرفة باعتبارها

الفرق بين MFI المقاسة عند ٤ °م وMFI المقاسة عند ٣٧ °م بعد فترة حضانة قدرها ٤ ساعات تناظر كمية Ab الذي تم إدخاله.ΔMFI تم تقديم في شكل رقم ١٦ وجدول رقم ١٣. تم حساب النسبة المئوية للإدخال عند ١٠ ميكرو جرام/ مل من Ab كالتالي ١٠٠ *(MFI عند ٤ °م – MFI عند ٣٧ °م) /MFI عند ٤ °م وتم تقديمها في جدول رقم ١٣. لذلك، كان لـ hz208F2 VH3/VL3 المتوافق مع البشر خواص ربط وإدخال مثل تلك المقاسة باستخدام الأجسام المضادة المناظرة 208F2 متخالفة الصبغيات ومن الفأر.

جدول رقم ١٣ أ

	ΔMFI	الإدخال %
m208F2	٢٩٤	٨٨
c208F2	٢٧٨	٨٢
Hz208F2VH3/VL3	٣٤٤	٨٧

٢-١٢ تقييم ربط الصور التالية لـ hz208F2 المتوافقة مع البشر

تم جعل mAb 208F2 متوافقا مع البشر وتم تقييم خصائص ربط ١٦ صورة متوافقة مع البشر (بما في ذلك الصورة الأولى المشروحة في ١٢-١). تم تقييم خصائص ربط الصور المتوافقة مع البشر باستخدام تحليلات FACS على سلالة الخلية البشرية MCF-7 للأورام الغدية في الثدي وسلالة خليةCOS-7 من القرد باستخدام تركيزات متزايدة من الجسم المضاد. لهذا السبب، تمت حضانة الخلايا (١×١٠ ٦ خلية/ مل) باستخدام أجسام مضادة لـ IGF-1R لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م في محلول منظم FACS (PBS، ٠,١ % BSA، ٠,٠١ % NaN3). تم عندئذ غسلها ٣ مرات وتمت حضانتها باستخدام الجسم المضاد الثانوي المناسب المقترن مع Alexa 488 لمدة ٢٠ دقيقة أخرى عند ٤ °م في الظلام قبل غسلها ٣ مرات في محلول منظم FACS. تم فورا تنفيذ ربط الأجسام المضادة لـ IGF-1R على خلايا قابلة للبقاء تم تحديدها باستخدام يوديد البروبيديوم (الذي يبقع الخلايا الميتة). قيمة EC50 للربط معبرا عنها بالمولارية (M) تم حساب باستخدام تحليل التراجع غير الخطي (GraphPad Prims 4.0).

أوضحت قيمة EC50 للصور المتوافقة مع البشر أن كل الصور المتوافقة مع البشر أظهرت خواص ربط مكافئة على كل من سلالات الخلية في الإنسان والقرد.

EC50 للأجسام المضادة المتوافقة مع البشر تم تلخيص في جدول رقم ١٣ ب.

جدول رقم ١٣ ب

		EC50 (مولار)	
		MCF-7	Cos-7
الصور المتوافقة مع البشر	Hz208F2 H026/L024	١٠-١٠×٧,٠٩	١٠-١٠×٥,١
	Hz208F2 H037/L018	١٠-١٠×٧,٧	١٠-١٠×٧,٤
	Hz208F2 H047/L018	١٠-١٠×٤,٩	١٠-١٠×٩,٢
	Hz208F2 H049/L018	١٠-١٠×٥,٧	١٠-١٠×٦,٩
	Hz208F2 H051/L018	١٠-١٠×٨,٤	١٠-١٠×٧,٢
	Hz208F2 H052/L018	٩-١٠×١,١	١٠-١٠×٩,٩
	Hz208F2 H057/L018	١٠-١٠×٥,٨	١٠-١٠×٨,٣
	Hz208F2	٩-١٠×١,١	٩-١٠×١,٢

H068/L018		
Hz208F2	١٠-١٠×٤,٦	١٠-١٠×٧,٣
H070/L018		
Hz208F2	١٠-١٠×٥,٥	٩-١٠×١,١
H071/L018		
Hz208F2	١٠-١٠×٦,٥	٩-١٠×١,١
H076/L018		
Hz208F2	١٠-١٠×٧,٧	٩-١٠×١,١
H077/L018		
Hz208F2	١٠-١٠×٤,٨	١٠-١٠×٨,٢
H037/L021		
Hz208F2	١٠-١٠×٦,٦	١٠-١٠×٨,٥
H049/L021		
Hz208F2	١٠-١٠×٥,٧	٩-١٠×١,٢
H052/L021		
Hz208F2	١٠-١٠×٥,٨	٩-١٠×١,١
H076/L021		

٣-١٢ تقييم إدخال صورة أخرى من hz208F2 المتوافق مع البشر

تمت حضانة خلايا MCF-7 باستخدام ١٠ ميكرو جرام/ مل من الأجسام المضادة المتوافقة مع البشر عند ٤ °م لمدة ٢٠ دقيقة عندئذ، تم غسل الخلايا وحضانتها عند ٤ °م أو ٣٧ °م لمدة ٤ ساعات. كمية الجسم المضاد المرتبط بسطح الخلية تم تحديد باستخدام جسم مضاد ثانوي على عداد تدفق خلوي FacsCalibur من (Becton Dickinson). ΔMFI المعرفة باعتبارها الفرق

بين MFI المقاسة عند ٤ °م وMFI المقاسة عند ٣٧ °م بعد فترة حضانة قدرها ٤ ساعات تناظر كمية Ab الذي تم إدخاله. تم تقديم ΔMFI في جدول رقم ١٣ج. تم حساب النسبة المئوية للإدخال عند ١٠ ميكرو جرام/ مل من Ab كالتالي ١٠٠ *(MFI عند ٤ °م -MFI عند ٣٧ °م) /MFI عند ٤ °م. الجسم المضاد c2 المتوافق مع البشر hz208F2 H077/L018 قادر على حث عملية إدخال كبيرة لـ IGF-1R.

جدول رقم ١٣ج

	ΔMFI	الإدخال %
Hz208F2 H077/L018	٤٦٨	٨٨

مثال رقم ١٣: تعريف عامل التفكك (KD) لربط خمسة أجسام مضادة متخالفة الصبغيات لـ IGF-1R (c208F2، c213B10، m212A11، c214F8 وc219D6) وصورة متوافقة مع البشر (VH3/VL3) للجسم المضاد 208F2 على IGF-1R بشري قابل للذوبان معاود الارتباط

تم تحديد ثوابت التفكك (KD) لربط الأجسام المضادة على IGF-1R بشري قابل للذوبان معاود الارتباط بالنسبة بين بين معدل التفكك (koff) ومعدل الاتحاد (kon). تم إجراء التجارب الحركية على جهاز Biacore ×100 باستخدام CM5 شريحة مستشعر منشطة بواسطة جسم مضاد أحادي النسيلة His من الفأر مضاد لـ Tag. حوالي RU١٢٠٠٠ من الأجسام المضادة تم تطعيمها كيميائيا على قالب الكربوكسي ميثيل دكستان باستخدام حقيبة طاقم الأمين.

تم تنفيذ التجارب عند ٢٥ °م بمعدل تدفق يبلغ ٣٠ ميكرو لتر/ دقيقة باستخدام المحلول المنظم HBS-EP+ buffer من (GE Healthcare) باعتباره المحلول المنظم الجاري لتخفيف العينة.

تم استخدام المخطط الحركي ذي الدورة المفردة لتحديد البارمترات الحركية لربط الأجسام المضادة لـ IGF-1R على IGF-1R بشري قابل للذوبان معاود الارتباط ملتقط بواسطة علامتي ١٠ هستيدين على الطرفية C.

تم حقن محلول من صورة معاودة الارتباط قابلة للذوبان من الـ IGF-1R رباعي الوحدات غير المتجانس: سلاسل α٢ والمجالات الخارج خلوية لسلاسل β٢ المعبر عنها بواسطة طرفية

إضافية 10-His tag، المعتمدة على متوالية بشرية (R&D Systems catalogue number 305-GR-50) خلال دقيقة واحدة على خلية التدفق الثانية بتركيز يبلغ ١٠ميكرو جرام/ مل. تم التقاط متوسط لـ RU٥٨٧ (بانحراف معياري RU٢٤) للمستقبل القابل للذوبان عند كل واحدة من الـ ٢٤ دورة التي تم إطلاقها لهذه الدراسة.

بعد طور الإغلاق، تم حقن المحلول المنظم الحالي ٥ مرات (٩٠ ثانية لكل مرة حقن) أو يتم حقن مستوى متزايد يبلغ ٥ تركيزات لواحدة من ٦ من الأجسام المضادة (٩٠ ثانية لكل مرة حقن) على كل من خلايا التدفق. في نهاية المرة الخامسة للحقن تم إمرار المحلول المنظم الحالي خلال ٥ دقائق لتحديد معدل التفكك.

تم عندئذ تكوين السطح بحقن جليسين ١٠ ملي مولار، ومحلول منظم HCl رقم هيدروجيني ١,٥ خلال ٤٥ ثانية.

الإشارة المحسوبة تناظر الفرق بين استجابة خلية التدفق ٢ (مع IGF-1R ملتقط) واستجابة خلية التدفق ١ (بدون أي جزيئات IGF-1R).

لكل IGF-1R الإشارة بسبب عمليات الحقن، تم تصحيح المدى المتنامي من تركيزات لأحد الأجسام المضادة بطرح الإشارة التي يتم الحصول عليها باستخدام الحقن ٥ مرات حقن بالمحلول المنظم (مرجع مزدوج) أنظر شكل رقم ١٧.

تم تحليل منحنيات الاستجابة الناتجة مقابل الزمن باستخدام برمجيات Biaevaluation من الطراز ١: ١.

تم إجراء أربع تجارب لكل جسم مضاد باستخدام قيم تركيز مختلفة للحالتين: ٤٠، ٢٠، ١٠، ٥ و: ٢,٥ نانو مولار لأول تجربتين و: ٢٤، ١٢، ٦، ٣ و: ١,٥ نانو مولار لآخر تجربتين لكل جسم مضاد.

بالنسبة للأجسام المضادة الستة المختبرة في هذه التجربة توافقت البيانات التجريبية بصورة جيدة مع الطراز ١: ١ مع قيم koff مرتفعة عندما تم تعريف التركيزات المرتفعة بأنها ثابتة وتم حساب التركيزات الأربعة الأخرى (أنظر شكل ١٨).

ثوابت التفكك (KD) المحسوبة باعتبارها النسبة: koff/kon وفترة نصف عمر المعقدات المحسوبة باعتبارها النسبة: Ln (٢) / koff ممثلة في الأشكال ١٩ و: ٢٠. هذه النسب تناظر متوسط التجارب الأربعة التي تم إجراؤها لكل الأجسام المضادة. الخطأ يناظر الخطأ القياسي (ن=٤) للقيم.

كانت ثوابت التفكك في المدى من ١٠ إلى ١٠٠ بيكو مولار. يقدم الجسم المضاد C-208F2 أضعف ألفة (أعلى قيمة لعامل التفكك) للـ h-IGF-1R (مع KD حوالي ٧٥ بيكو مولار) والصورة المتوافقة مع البشر منه تكون بجودة الصورة متخالفة الصبغيات على الأقل (مع KD حوالي ٦٠ بيكو مولار). الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات الأربعة الأخرى المضادة لـ IGF-1R تعطي ألفة مشابهة تماما للـ hIGF1-R (مع KD حوالي ٣٠ بيكو مولار). الفرق في قيم الألفة يرتبط أساسا بمعدل التفكك أو فترة نصف العمر للمعقدات الناتجة. مع 208F2 تكون فترة نصف العمر للمعقد بين ٢ و: ٣ ساعة مع الصور متخالفة الصبغيات والمتوافقة مع البشر (VH3/VL3). بالنسبة للأجسام المضادة متخالفة الصبغيات الأربعة الأخرى كان متوسط فترات نصف العمر بين ٧,٠ و: ٩,٤ ساعة.

هذه الحركيات البطيئة جدا للتفكك ترتبط بوضوح بالبنية ثنائية التكافؤ للأجسام المضادة القادرة على الربط في نفس الوقت لكل من ذراعي Fab لها بجزأين مجاورين من h-IGF-1R. في هذه الحالة معدل جزيئات IGF-1R الملتقطة قد يكون له تأثير على معدل التفكك. قيم الألفة المحددة في هذه الدراسة تناظر قيم الألفة الوظيفية (أو القوة الكلية للربط) للأجسام المضادة لمستوى h-IGF-1R الملتقط حوالي RU٦٠٠ . الفرق المضاعف ٣ مرات لـ KD والذي تمت ملاحظته بين البيانات الموضحة بعاليه (جدول ١٠) والقيم المقدمة في المثال ١٣ ترتبط بالتغير في مستوى التقاط hIGF-1R (RU٦٠٠ مقابل RU١٦٠ في مثال ٤).

مثال رقم ١٤: تخليق عقاقير لاختراع

يتم استخدام الاختصارات التالية في الأمثلة:

aq. مائي

ee زيادة تشاكلية

Equiv. مكافئ

ESI تأين برش الإلكترونات

LC/MS كروماتوجرافيا السائل مقترنة مع قياس طيف الكتلة

HPLC كروماتوجرافيا السائل فائقة الأداء

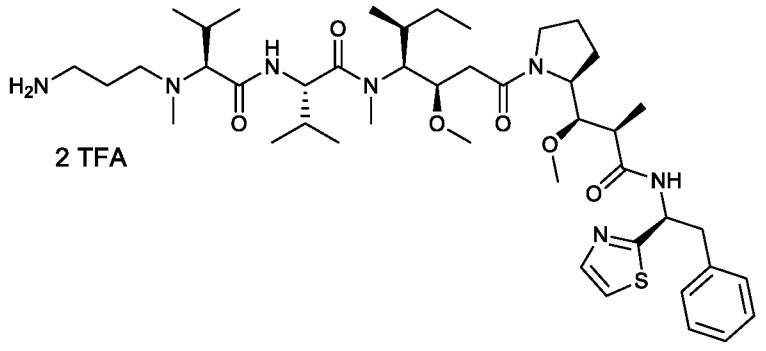
NMR رنين مغناطيسي نووي

Sat. مشبع

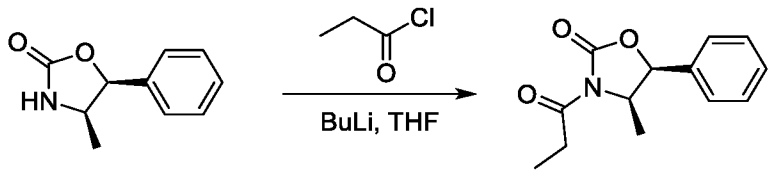
UV فوق بنفسجي

المركب المرجعي رقم ١

حمض (S) -٢- ((S) -٢- ((٣- أمينو بروبيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) - N- ((R٣، S٤، S٥)- ٣- ميثوكسي -١- ((S) -٢- ((R١، R٢)- ١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣ -أوكسو-٣- (((S) -٢- فينيل -١- (ثيازول -٢-يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٥- ميثيل -١- أوكسو هبتان -٤-يل) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميد، بس تراي فلورو أسيتيك

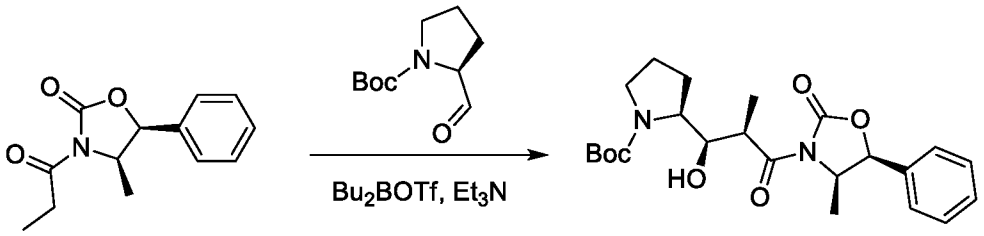


المركب رقم ١ أ: (R٤، S٥)- ٤- ميثيل -٥- فينيل -٣- بروبانويل -١، ٣- أوكسازوليدين -٢-أون



تمت إذابة (R٤، S٥)- ٤- ميثيل -٥- فينيل -١، ٣- أوكسازوليدين -٢-أون (٥,٨ جم، ٣٢,٧ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في تترا هيدروفيوران (THF، ١٢٠ مل) في جو خامل. تم تبريد الخليط إلى -٧٨ °م وتمت إضافة n-بيوتيل ليثيوم (١٤,٤ مل) قطرة- قطرة. بعد التقليب لمدة ٣٠ دقيقة عند -٧٨ °م، تمت إضافة كلوريد البروبانويل (٥,٧ مل). استمر التقليب لمدة ٣٠ دقيقة عند -٧٨ °م ثم طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط. تم تركيز خليط التفاعل وإعادة إذابته في ٢٠٠ مل من الماء. تم ضبط الرقم الهيدروجيني للمحلول ليكون ٧ باستخدام محلول مائي مشبع من بيكربونات الصوديوم. تم استخلاص هذا الطور المائي ٣ مرات باستخدام ١٠٠ مل من أسيتات الإيثيل (EtOAc). تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها للحصول على ٦,٨ جم (٨٩ %) من المركب ١ أ في صورة زيت أصفر.

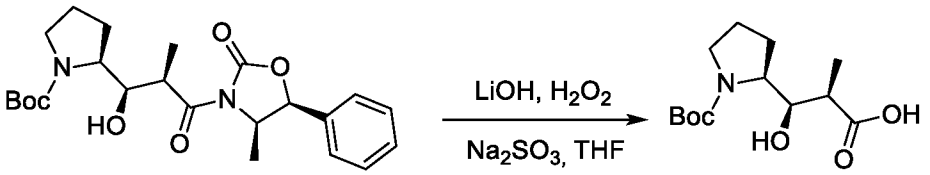
المركب رقم ١ ب: t-بيوتيل (S٢)- ٢- [(R١، R٢)- ١- هيدروكسي -٢- ميثيل -٣- [(R٤، S٥)- ٤- ميثيل -٢ -أوكسو-٥- فينيل -١، ٣- أوكسازوليدين -٣-يل]- ٣-أوكسو بروبيل] بيروليدين-١- كربوكسيلات



تمت إذابة المركب رقم ١ أ (١٧,٦ جم، ٧٥,٤٥ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في داي كلورو ميثان (DCM، ٢٨٦ مل) في جو خامل. تم تبريد هذا المحلول باستخدام حمام ثلجي. تراي إيثيل أمين (TEA، ١٢,١ مل، ١,١٥ مكافئ) وتمت إضافة Bu2BOTf (٧٨,٣ مل، ١,٠٤ مكافئ) قطرة- قطرة مع الاحتفاظ بدرجة حرارة خليط التفاعل أقل من ٢ °م. استمر التقليب عند ٠ °م لمدة ٤٥ دقيقة، وبعدها تم تبريد خليط التفاعل إلى -٧٨ °م. تمت إضافة محلول من t-بيوتيل (S٢)- ٢- فورميل بيروليدين-١- كربوكسيلات (٨,٥ جم، ٤٢,٦٦ ملي مول، ٠,٥٧ مكافئ) في DCM (٤٢

مل) قطرة- قطرة. استمر التقليب لمدة ٢ ساعة عند -٧٨ °م، ثم لمدة ١ ساعة عند ٠ °م وأخيرا ١ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط. تمت معادلة خليط التفاعل باستخدام ٧٢ مل محلول الفوسفات المنظم (رقم هيدروجيني = ٧,٢ - ٧,٤) و: ٢١٤ مل ميثانول، وتبريده إلى ٠ °م. تمت إضافة محلول من ٣٠ % فوق أكسيد الهيدروجين في ميثانول (٢٥٧ مل) قطرة- قطرة مع الحفاظ على درجة الحرارة أقل من ١٠ °م. استمر التقليب لمدة ١ ساعة عند ٠ °م. تمت معادلة خليط التفاعل باستخدام ١٤٢ مل من الماء، ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تم استخلاص المحلول المائي الناتج ٣ مرات باستخدام ٢٠٠ مل EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وإيثر بتولي (EtOAc: PE= ١: ٨) للحصول على ١٣,١٦ جم (٤٠ %) من المركب ١ ب في صورة زيت عديم اللون.

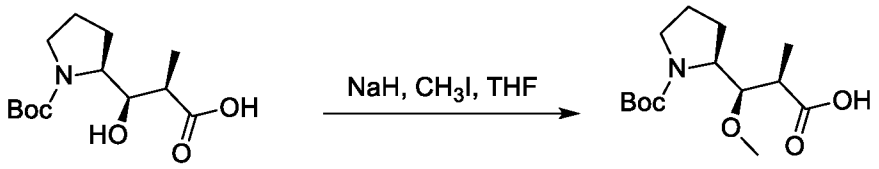
المركب رقم ١ ج: حمض (R٢، R٣)- ٣-[(S٢)- ١-[(t-بيوتوكسي) كربونيل] بيروليدين-٢-يل] -٣- هيدروكسي -٢- ميثيل بروبانويك



تمت إذابة المركب رقم ١ ب (١٣,١٦ جم، ٣٠,٤٣ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في THF (٤٦٠ مل) في وجود فوق أكسيد الهيدروجين (٣٠ % في الماء، ١٥,٧ مل)، ثم تم تبريده باستخدام حمام ثلجي. تمت إضافة محلول مائي من هيدروكسيد الليثيوم (٠,٤ مول/ لتر، ١٥٢,١ مل) قطرة- قطرة مع الاحتفاظ بدرجة حرارة خليط التفاعل أقل من ٤ °م. تم تقليب خليط التفاعل ٢,٥ ساعة عند ٠ °م. تمت إضافة محلول مائي من Na2SO3 (١ مول/ لتر، ١٦٧,٣ مل) قطرة- قطرة مع الحفاظ على درجة الحرارة عند ٠ °م. تم تقليب خليط التفاعل ١٤ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم معادلته باستخدام ١٥٠ مل من محلول مائي مشبع بارد من بيكربونات الصوديوم وغسله ٣ مرات باستخدام ٥٠ مل من DCM. تم ضبط الرقم الهيدروجيني للمحلول المائي ليكون ٢-٣ باستخدام محلول مائي ١ مولار من KHSO4. تم استخلاص هذا المحلول المائي ٣ مرات باستخدام ١٠٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرة واحدة باستخدام محلول

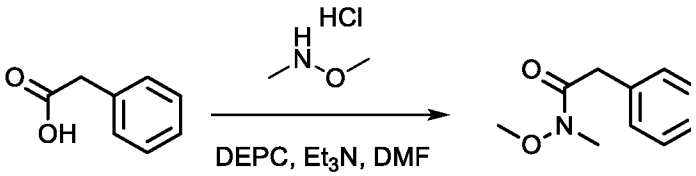
NaCl مشبع، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها للحصول على ٧,٣١ جم (٨٨ %) من المركب ١ ج في صورة زيت عديم اللون.

المركب رقم ١د: حمض (R٢، R٣)- ٣-[(S٢)- ١-[(t-بيوتوكسي) كربونيل] بيروليدين-٢-يل] -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويك



تمت إذابة المركب رقم ١ ج (٧,٣١ جم، ٢٦,٧٤ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في THF (١٣٥ مل) في وجود يودو ميثان (٢٥,٣ مل). تم تبريد وسط التفاعل باستخدام حمام ثلجي وبعد ذلك تمت إضافة NaH (٦٠ % في الزيت، ٤,٢٨ جم) على دفعات. تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب ٣ أيام عند ٠ °م ثم تمت معادلته باستخدام ١٠٠ مل محلول مائي مشبع من بيكربونات الصوديوم وغسله ٣ مرات باستخدام ٥٠ مل إيثر. تم ضبط الرقم الهيدروجيني للمحلول المائي ليكون ٣ باستخدام محلول مائي KHSO4 ١ مولار. تم استخلاص هذا المحلول المائي ٣ مرات باستخدام ١٠٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرة واحدة باستخدام ١٠٠ مل من Na2S2O3 (٥ % في الماء)، ومرة باستخدام محلول مشبع من NaCl، ثم تم تجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها للحصول على ٥,٥ جم (٧٢ %) من المركب ١د في صورة زيت عديم اللون.

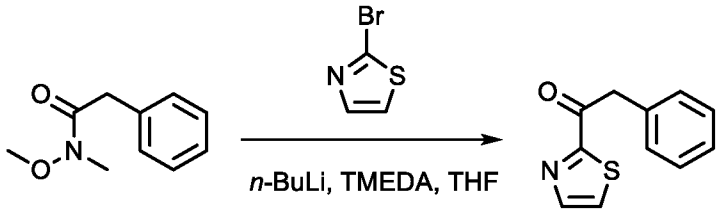
المركب رقم ١ هـ: N- ميثوكسي -N- ميثيل -٢- فينيل أسيتاميد



تمت إذابة ٢- فينيل حمض الأسيتيك (١٦,٢ جم، ١١٨,٩٩ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في داي ميثيل فورماميد (DMF، ١٣٠ مل) ثم تم التبريد إلى -١٠ °م. تمت إضافة داي إيثيل فوسفورو داي سيانيدات (DEPC، ١٩,٢ مل)، ميثوكسي (ميثيل) أمين هيدروكلوريد (١٢,٩٢ جم،

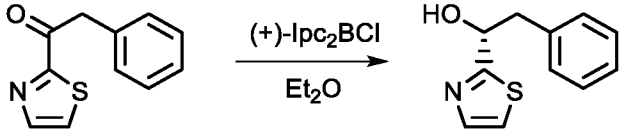
١٣٣,٢٠ ملي مول، ١,١٢ مكافئ) وتراي إيثيل أمين (٣٣,٦ مل). تم تقليب خليط التفاعل ٣٠ دقيقة عند -١٠ °م ثم ٢,٥ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط. تم عندئذ استخلاصه مرتين باستخدام ١ لتر من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرتين باستخدام ٥٠٠ مل من NaHCO3 (مشبع)، مرة واحدة باستخدام ٤٠٠ مل من الماء، ثم تم تجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ١٠٠ إلى ١: ٣) للحصول على ٢٠,٢ جم (٩٥ %) من المركب ١هـ في صورة زيت أصفر.

المركب رقم ١و: ٢- فينيل -١- (١، ٣-ثيازول -٢-يل) إيثان-١-أون

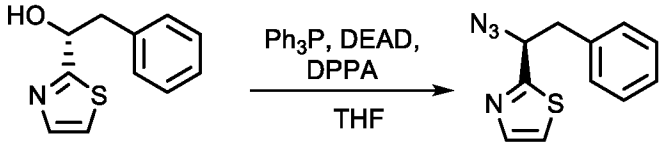


تمت إذابة تترا ميثيل إيثلين داي أمين (TMEDA، ٢٧,٢ مل) في THF (٣٠٠ مل) في جو خامل، ثم تم التبريد إلى -٧٨ °م قبل الإضافة قطرة- قطرة لـ n-BuLi (٦٧,٦ مل، ٢,٥ مولار). تمت إضافة ٢- برومو -١، ٣-ثيازول (١٥,٢ مل) قطرة- قطرة واستمر التقليب ٣٠ دقيقة عند -٧٨ °م. تمت إضافة المركب رقم ١هـ (٢٥ جم، ١٣٩,٥٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في THF (١٠٠ مل) قطرة- قطرة. استمر التقليب لمدة ٣٠ دقيقة عند -٧٨ °م ثم ٢ ساعة عند -١٠ °م. تمت معادلة خليط التفاعل باستخدام ٥٠٠ مل في KHSO4 (مشبع)، ثم استخلاصه ٣ مرات باستخدام ١ لتر من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرتين باستخدام ٤٠٠ مل ماء ومرتين باستخدام ٧٠٠ مل من NaCl (مشبع)، ثم تم تجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ١٠٠ إلى ١: ١٠) للحصول على ٢٥ جم (٨٨ %) من المركب ١ وفي صورة زيت أصفر.

المركب رقم ١ ز: (R١)- ٢- فينيل -١- (١، ٣-ثيازول -٢-يل) إيثان-١-أول



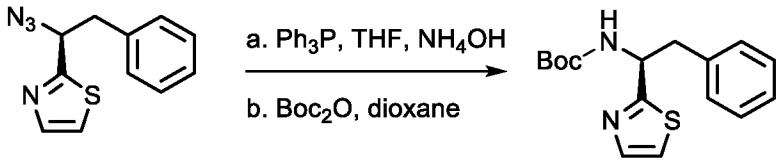
في جو خامل، تمت إضافة محلول من المركب ١ و(١٥ جم، ٧٣,٨ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في إيثر (٣٠٠ مل) قطرة- قطرة إلى (+)-B- كلورو داي أيزو بينوكامثيل بوران Ipc2BCl- (+))، ١١٠,٨ مل). تم تقليب خليط التفاعل ٢٤ ساعة عند ٠ °م، ثم معادلته باستخدام ٣٠٠ مل من خليط (١: ١) من NaOH (١٠ % في الماء) وH2O2 (٣٠ % في الماء)، وأخيرا تم استخلاصه ثلاث مرات باستخدام ٥٠٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرتين باستخدام ٣٠٠ مل من K2CO3 (مشبع) ومرة واحدة باستخدام ٥٠٠ مل من NaCl (مشبع)، ثم تم تجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ٢٠ إلى ١: ٢) للحصول على ٦,٣ جم (٤٢ %) من المركب ١ ز في صورة مادة صلبة بيضاء.



المركب رقم ١ ح: ٢-[(S١)- ١-أزيدو-٢- فينيل إيثيل]- ١، ٣-ثيازول

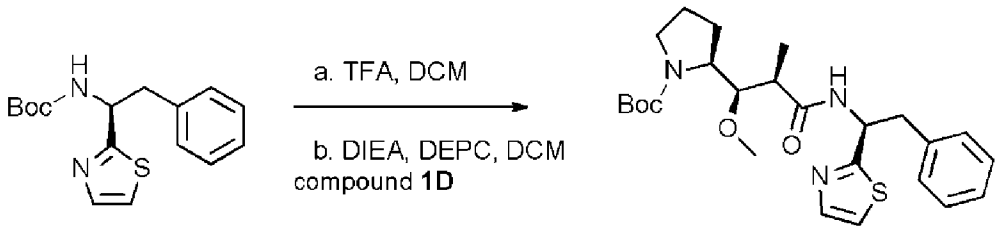
تمت إذابة المركب رقم ١ ز (٦ جم، ٢٩,٢٣ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ.) في جو خامل في THF (١٥٠ مل) في وجود تراي فينيل فوسفين (١٣ جم، ٤٩,٥٦ ملي مول، ١,٧٠ مكافئ.)، ثم تم التبريد إلى ٠ °م. تمت إضافة داي إيثيل آزو داي كربوكسيلات (DEAD، ٧,٦ مل) قطرة- قطرة، ويلي ذلك داي فينيل فوسفوريل أزيد (DPPA، ١١ مل)، تمت عندئذ إزالة الحمام البارد وتم ترك المحلول تحت التقليب ٤٨ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط. تم تركيز الوسط تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ١٠٠ إلى ١: ٣٠) للحصول على ٨ جم من مركب نقي جزئيا ١ ح في صورة زيت أصفر. تم استخدام المركب رقم ١ ح كما هو في الخطوة التالية.

المركب رقم ١ ط: t-بيوتيل -N[(S١)- ٢- فينيل -١- (١، ٣-ثيازول -٢-يل) إيثيل] كربامات.



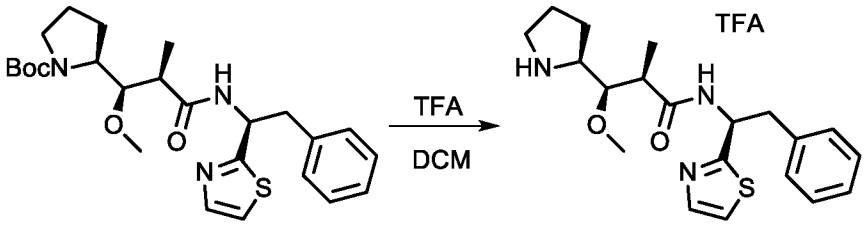
تمت إذابة المركب رقم ١ ح (٦,٥ جم، ٢٨,٢ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في THF (١٠٠ مل) في وجود تراي فينيل فوسفين (٦,٥ جم، ٣٣,٩ ملي مول، ١,٢٠ مكافئ)، وتسخينه إلى ٥٠ °م لمدة ٢ ساعة. تمت عندئذ إضافة الأمونيا (٧٠ مل) واستمر التسخين لمدة ٣ ساعات. تم تبريد خليط التفاعل، ومعادلته باستخدام ٥٠٠ مل من الماء، ثم استخلاصه ٣ مرات باستخدام ٥٠٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية واستخلاصها مرتين باستخدام ٥٠٠ مل من HCl ١ ع. تم دمج الأطوار المائية، وجعلها عند رقم هيدروجيني ٨–٩ بإضافة محلول هيدروكسيد صوديوم (١٠ % في الماء)، ثم استخلاصه ٣ مرات باستخدام ٥٠٠ مل من DCM. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها للحصول على ٤,٨ جم (٨٣ %) من (S١)– ٢– فينيل –١– (١، ٣–ثيازول –٢–يل) إيثان–١– أمين في صورة زيت أصفر. تمت عندئذ حماية هذا المركب باستخدام مجموعة Boc ((t–بيوتوكسي) كربونيل) بحيث يمكن تنقيته. تمت إذابة هذا المركب في جو خامل في ١، ٤– دايوكسان (٤٠ مل)، ثم تم التبريد إلى ٠ °م. تمت إضافة (Boc)2O (١٠,٢٦ جم، ٤٧,٠١ ملي مول، ٢,٠٠ مكافئ) المخفف في ٢٠ مل من ١، ٤– دايوكسان قطرة– قطرة. تمت إزالة الحمام البارد مع ترك المحلول تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط قبل معادلته باستخدام ٣٠٠ مل من الماء واستخلاصها مرتين باستخدام ٥٠٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ١٠٠ إلى ١: ٢٠، زيادة تشاكلية = ٩٣ %). تم عندئذ عمل إعادة تبلر في خليط الهكسان/ الأسيتون (~٥–١٠/ ١، ١جم/ ١٠ مل) للحصول على ٦ جم (٨٤ %) من المركب ١ ط في صورة مادة صلبة بيضاء (زيادة تشاكلية أكبر من ٩٩ %).

المركب رقم ١ ي: t–بيوتيل (S٢)– ٢– [(R١، R٢)– ١– ميثوكسي –٢– ميثيل –٢–[[(S١)– ٢– فينيل –١– (١، ٣–ثيازول –٢–يل) إيثيل] كربامويل] إيثيل] بيروليدين–١– كربوكسيلات



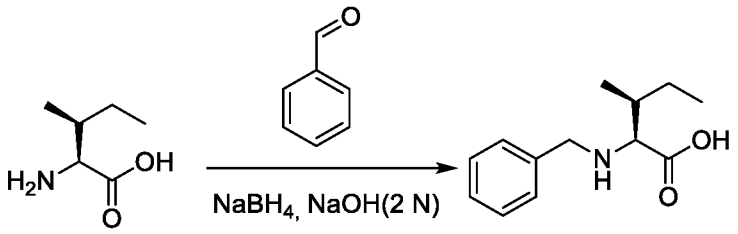
تمت إذابة المركب رقم ١ ط (٣ جم، ٩,٨٦ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في ١٠ مل DCM. تمت إضافة حمض تراي فلورو أسيتيك (TFA، ١٠ مل) مع ترك المحلول تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض للحصول على ٢,٠ جم (٦٤ %) من (S١)- ٢- فينيل -١- (١، ٣-ثيازول -٢-يل) إيثان-١- أمين؛ حمض تراي فلورو أسيتيك في صورة زيت أصفر. تمت إعادة إذابة هذا المركب الوسيط في ٢٠ مل من DCM وبعد ذلك تمت إضافة المركب ١ د (١,٨ جم، ٦,٢٦ ملي مول، ١,٠٥ مكافئ)، DEPC (١,١ جم، ٦,٧٥ ملي مول، ١,١٣ مكافئ) وداي أيزو بروبيل إيثيل أمين (DIEA، ١,٦٤ جم، ١٢,٧١ ملي مول، ٢,١٣ مكافئ). تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ١٠٠ إلى ١: ٣) للحصول على ٢,٣ جم (٨١ %) من المركب ١ ي في صورة مادة صلبة ذات لون أصفر باهت.

المركب رقم ١ك: حمض (R٢، R٣)- ٣- ميثوكسي -٢- ميثيل -N-[(S١)- ٢- فينيل -١- (١، ٣-ثيازول -٢-يل) إيثيل]- ٣-[(S٢)- بيروليدين-٢-يل] بروبان أميد؛ تراي فلورو أسيتيك



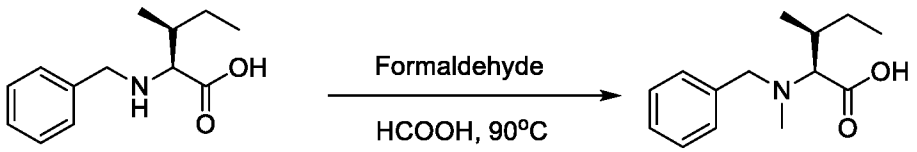
تمت إذابة المركب رقم ١ ي (٢,٢٥ جم، ٤,٧٥ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في ١٠ مل من DCM. تمت إضافة TFA (١٠ مل) مع ترك المحلول تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض للحصول على ٢,١٨ جم (٩٤ %) من المركب ١ ك في صورة زيت أصفر.

المركب رقم ١ ل: حمض (S٢، S٣)- ٢- (بنزيل أمينو) -٣- ميثيل بنتانويك



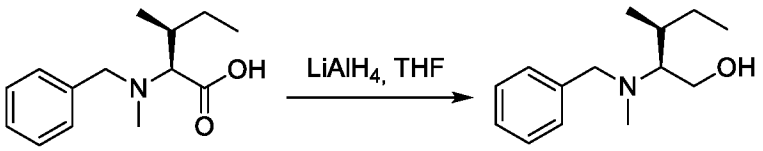
تمت إضافة حمض (S٢، S٣)- ٢- أمينو -٣- ميثيل بنتانويك (٩٨,٤ جم، ٧٥٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) عند درجة حرارة الوسط المحيط وعلى دفعات إلى محلول هيدروكسيد صوديوم ٢ ع (٣٧٥ مل). تمت بسرعة إضافة بنزالدهيد (٧٩,٧ جم، ٧٥١,٠٢ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) وتم تقليب المحلول الناتج ٣٠ دقيقة. تمت إضافة هيدرو بوريد الصوديوم (١٠,٩ جم، ٢٨٨,١٧ ملي مول، ٠,٣٨ مكافئ) بجرعات صغيرة، مع الحفاظ على درجة الحرارة بين ٥ و: ١٥ °م. استمر التقليب لمدة ٤ ساعات عند درجة حرارة الوسط المحيط. تم تخفيف خليط التفاعل باستخدام ٢٠٠ مل من الماء، ثم تم غسله مرتين باستخدام ٢٠٠ مل من EtOAc. تم ضبط الرقم الهيدروجيني للمحلول المائي ليكون ٧ باستخدام محلول حمض هيدروكلوريك ٢ ع. تم تجميع الراسب المتكون بالترشيح فتم الحصول على ١٤٩,٢ جم (٩٠ %) من المركب ١ ل في صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم ١ م: حمض (S٢، S٣)- ٢- [بنزيل (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثيل بنتانويك



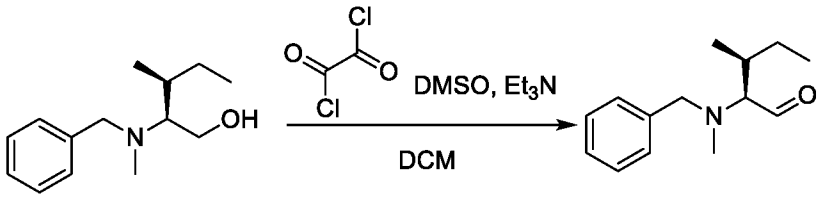
تمت إذابة المركب رقم ١ ل (٢٥ جم، ١١٢,٩٧ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في حمض الفورميك (٣١,٢ جم) في وجود الفورمالدهيد (٣٦,٥ % في الماء، ٢٢,٣ جم). تم تقليب المحلول لمدة ٣ ساعة عند ٩٠ °م ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تم سحن المتبقي في ٢٥٠ مل من الأسيتون، ثم تم تركيزه. تم تكرار عملية السحن/ التبخير هذه مرتين باستخدام ٥٠٠ مل من الأسيتون للحصول على ٢١,٦ جم (٨١ %) من المركب ١ م في صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم ١ ن: (S٢، S٣)- ٢- [بنزيل (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثيل بنتان -١-أول



تم تعليق LiAlH4 (٠,٣٦ جم) في ١٠ مل من THF في جو خامل عند ٠ °م. تمت إضافة المركب رقم ١ م (١,٥ جم، ٦,٣٧ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) بجرعات صغيرة مع الحفاظ على درجة الحرارة بين ٠ و: ١٠ °م. تم تقليب خليط التفاعل ٢ ساعة عند ٦٥ °م، ثم تم تبريده مرة أخرى إلى ٠ °م قبل معادلته باستخدام تخفيفات متتابعة من ٣٦٠ ميكرو لتر من الماء، ١ مل من ١٥ % هيدروكسيد صوديوم و: ٣٦٠ ميكرو لتر من الماء. أملاح الألومنيوم التي ترسبت تمت إزالة بالترشيح. تم تجفيف ناتج الترشيح باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ٥٠) للحصول على ٨٢٠ مجم (٥٨ %) من المركب ١ ع في صورة مادة صلبة ذات لون أصفر باهت.

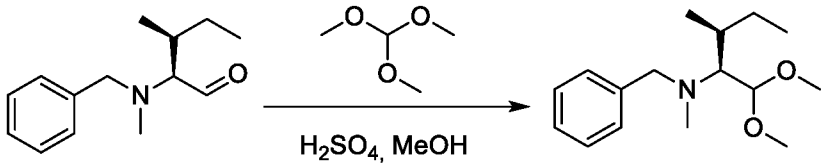
المركب رقم ١ س: (S٢، S٣)- ٢- [بنزيل (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثيل بنتانال



تمت إذابة كلوريد الأوكزاليل (٠,٤ مل) في DCM (١٥ مل) في جو خامل. تم تبريد المحلول إلى -٧٠ °م وتمت إضافة محلول من داي ميثيل سلفوكسيد (DMSO) (٠,٥ مل) في DCM (١٠ مل) قطرة- قطرة لمدة ١٥ دقيقة. تم تقليب خليط التفاعل ٣٠ دقيقة وبعد ذلك محلول من المركب ١ ن (٨٢٠ مجم، ٣,٧٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في DCM (١٠ مل) تمت إضافة قطرة- قطرة لمدة ١٥ دقيقة. تم تقليب خليط التفاعل لمدة ٣٠ دقيقة أخرى عند درجة حرارة أقل، ثم تمت إضافة تراي إيثيل أمين (٢,٥ مل) ببطء. تم تقليب خليط التفاعل ١ ساعة عند -٥٠ °م، تمت عندئذ إزالة الحمام البارد وتمت معادلة خليط التفاعل باستخدام ٢٥ مل من الماء مع السماح بعودة درجة الحرارة إلى طبيعتها. تم غسل المحلول مرة واحدة باستخدام ٣٠ مل من محلول مائي مشبع من NaCl، ثم تم تجفيفه باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحه وتركيزه. تمت تنقية المتبقي على

عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ٢٠٠) للحصول على ٠,٤٢ جم (٥٢ %) من المركب ١ س في صورة زيت أصفر.

المركب رقم ١ ع: (S٢، S٣)-N- بنزيل -١، ١-داي ميثوكسي -N، ٣- داي ميثيل بنتان -٢- أمين



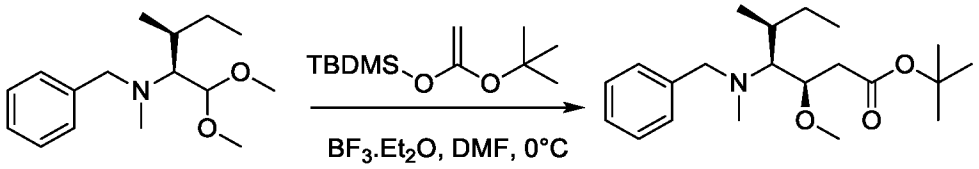
تمت إذابة المركب رقم ١ س (٤,٧ جم، ٢١,٤٣ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٢٠ مل من ميثانول عند ٠ °م. تمت إضافة حمض الكبريتيك المركز (٤,٣ مل) قطرة- قطرة واستمر التقليب لمدة ٣٠ دقيقة عند ٠ °م. تمت إضافة تراي ميثيل أورثو فورمات (٢١,٤ مل)، تمت إزالة الحمام البارد وتم ترك وسط التفاعل تحت التقليب لمدة ٣ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط. تم تخفيف وسط التفاعل باستخدام ٢٠٠ مل من EtOAc، وغسله بالتتابع بـ ١٠٠ مل في ١٠ % Na2CO3 و: ٢٠٠ مل من NaCl مشبع، ثم تم تجفيفه باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحه وتركيزه تحت ضغط منخفض للحصول على ٣,٤ جم (٦٠ %) من المركب ١ ع في صورة مادة صلبة ذات لون أصفر باهت.

المركب رقم ١ ف: [[١ -(t-بيوتوكسي) إيثنيل] أوكسي] (t-بيوتيل) داي ميثيل سيلان

تمت إذابة داي أيزو بروبيل أمين (٢٠ جم، ١٨٦,٧١ ملي مول، ١,٠٨ مكافئ) في ١٧٠ مل من THF في جو خامل وتبريده إلى -٧٨ °م. تمت إضافة nBuLi (٢,٤ مولار، ٧٨,٨ مل) قطرة- قطرة وتم تقليب المحلول ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة أقل (للحصول على LDA- ليثيوم داي أيزو بروبيل أميد) قبل إضافة t-بيوتيل أسيتات (٢٠ جم، ١٧٢,١٨ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ). تم تقليب خليط التفاعل ٢٠ دقيقة عند -٧٨ °م قبل إضافة هكسا ميثيل فوسفوراميد (HMPA، ٢٥,٨ مل) ومحلول من t-بيوتيل داي ميثيل كلورو سيلان (TBDMSCl، ٢٨ جم، ١٨٥,٨٠ ملي مول،

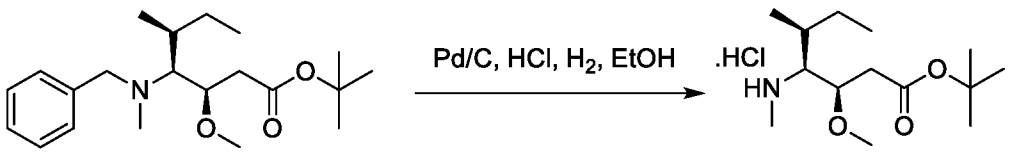
١,٠٨ مكافئ) في ٣٥ مل من THF. استمر التقليب لمدة ٢٠ دقيقة أخرى عند درجة حرارة أقل، وتمت عندئذ إزالة الحمام البارد. تم تركيز المحلول تحت ضغط منخفض. تمت إعادة إذابة المتبقي في ١٠٠ مل من الماء واستخلاصه ٣ مرات باستخدام ١٠٠ مل من PE. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرة واحدة باستخدام ٥٠٠ مل من محلول مائي مشبع من NaCl، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي بالتقطير للحصول على ١٦,٦ جم (٨٣ %) من المركب ١ ف في صورة زيت عديم اللون.

المركب رقم ١ ص: t-بيوتيل (R٣، S٤، S٥)- ٤- [بنزيل (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانوات



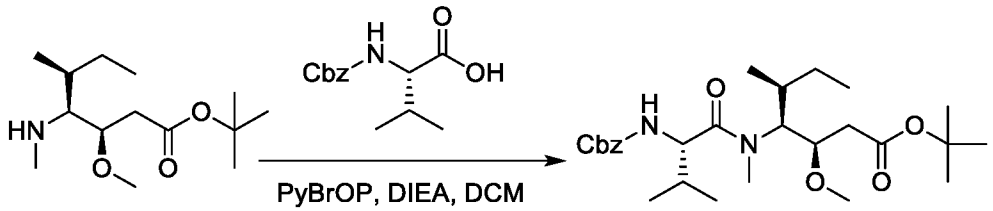
تمت إذابة المركب رقم ١ع (٢,٠ جم، ٧,٥٤ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) والمركب ١ ف (٢,٦ جم، ١١,٢٨ ملي مول، ١,٥٠ مكافئ) في ٣٣ مل من DCM في جو خامل. تم تبريد المحلول إلى ٠ °م.DMF (١,٢ جم) تمت إضافة قطرة- قطرة مع محلول من BF3Et2O (٢,١ جم) في ٧,٥ مل من DCM. استمر التقليب لمدة ٢٤ ساعة عند ٠ °م. تم غسل وسط التفاعل مرة واحدة باستخدام ٣٠ مل من كربونات الصوديوم (١٠ %) ومرتين باستخدام ٥٠ مل من محلول مائي مشبع من NaCl، ثم تم تجفيفه باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحه وتركيزه. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ١٠٠) للحصول على ١,٨٢ جم (٩١ %) من المركب ١ ص في صورة زيت أصفر.

المركب رقم ١ ق: (R٣، S٤، S٥)- ٣- ميثوكسي -٥- ميثيل -٤- (ميثيل أمينو) هبتانوات هيدروكلوريد



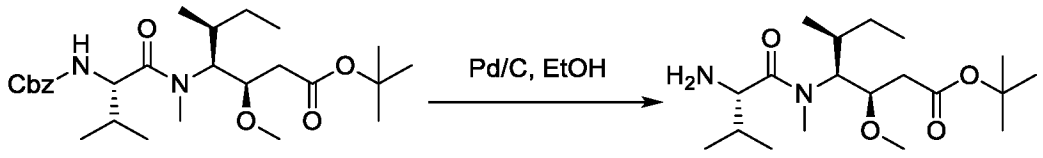
تمت إذابة المركب رقم ١ ف (٢,٤ جم، ٦,٨٧ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في ٣٥ مل من الإيثانول في وجود Pd/C (٠,١٢ جم) وحمض هيدروكلوريك مركز (٠,٦٣ مل). تم إحلال جو النيتروجين بواسطة جو هيدروجين وتم ترك وسط التفاعل تحت التقليب ١٨ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط. تم ترشيح وسط التفاعل وتركيزه تحت ضغط منخفض. تم سحن المتبقي أعطى ١,٦٦ جم (٨٢ %) من المركب ١ ق في صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم ١ ر: t-بيوتيل (R٣، S٤، S٥)- ٤-[(S٢)- ٢- [[(بنزيل أوكسي) كربونيل] أمينو] N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو]- ٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانوات



تمت إذابة حمض (S٢)- ٢- [[(بنزيل أوكسي) كربونيل] أمينو]- ٣- ميثيل بيوتانويك (١٥ جم، ٠,٤٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٣٠٠ مل من DCM في وجود DIEA (٣٨,٣ مل) وبرومو تراي بيروليدينو فوسفونيوم هكسا فلورو فوسفات (PyBrOP، ٣٢,٣ جم). تم تقليب المحلول لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة الوسط المحيط قبل إضافة المركب ١ ق (١٥,٩٩ جم، ٠,٤٢ ملي مول، ١,٠٧ مكافئ). تم تقليب وسط التفاعل ٢ ساعة ثم تم تركيزه. تمت تنقية المتبقي في الطور المعكوس (C18) باستخدام خليط من الأسيتو نيتريل (ACN) والماء (٣٠: ٧٠ إلى ١٠٠: ٠ خلال ٤٠ دقيقة) للحصول على ١٧ جم (٥٨ %) من المركب ١ ر في صورة زيت عديم اللون.

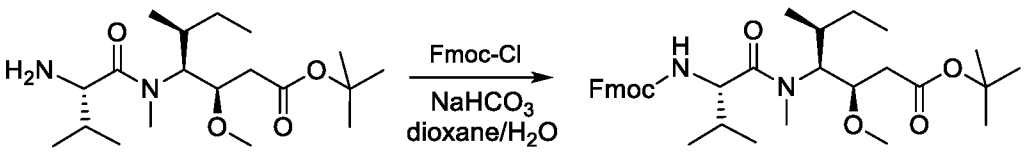
المركب رقم ١ ش: t-بيوتيل (R٣، S٤، S٥)- ٤-[(S٢)- ٢- أمينو N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو]- ٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانوات



تمت إذابة المركب رقم ١ ر (٧٦ مجم، ٠,١٥ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في ١٠ مل من الإيثانول في وجود Pd/C (٠,٠٥ جم). جو النيتروجين تم إحلال بواسطة جو هيدروجين

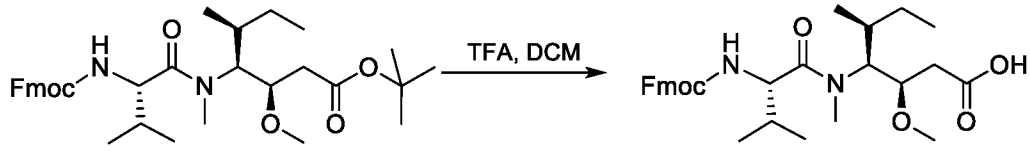
وتم تقليب خليط التفاعل ٢ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط. تم ترشيح وسط التفاعل وتركيزه تحت ضغط منخفض للحصول على ٦٤ مجم من المركب ١ش في صورة زيت عديم اللون.

المركب رقم ١ت: (R٣، S٤، S٥)- ٤-[(S٢)- ٢- [[(H٩-فلورن -٩-يل ميثوكسي) كربونيل] أمينو]N- ، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو]- ٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانوات



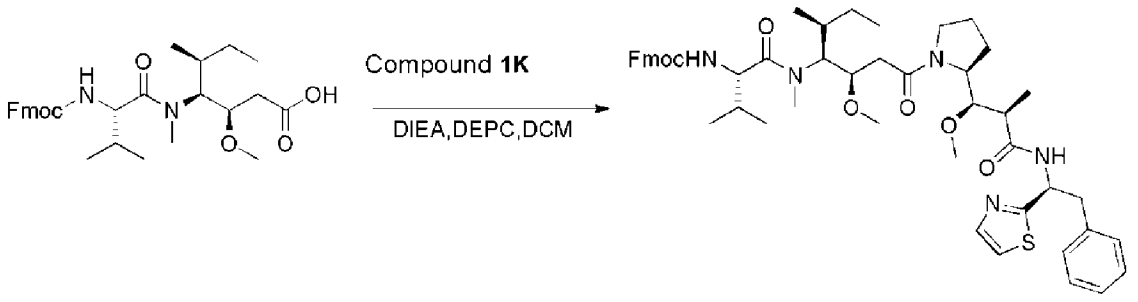
تمت إذابة المركب رقم ١ ش (١٨,١٩ جم، ٥٠,٧٤ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٤٠٠ مل في خليط ١، ٤- دايوكسان/ ماء (١: ١) في وجود بيكربونات الصوديوم (١٢,٧٨ جم، ١٥٢ ملي مول، ٣,٠٠ مكافئ) و: H٩-فلورن -٩-يل ميثيل كلوروفورمات (Fmoc-Cl، ١٩,٦٩ جم، ٧٦ ملي مول، ١,٥٠ مكافئ)، ثم تم التقليب لمدة ٢ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط. تم عندئذ تخفيف وسط التفاعل باستخدام ٥٠٠ مل من الماء واستخلاصها ٣ مرات باستخدام ٢٠٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرة واحدة باستخدام ٢٠٠ مل من محلول مائي مشبع من NaCl، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها للحصول على ٤٠ جم من مركب نقي جزئيا ١ ت في صورة مادة صلبة ذات لون أصفر باهت.

المركب رقم ١ ث: حمض (R٣، S٤، S٥)- ٤-[(S٢)- ٢- [[(H٩-فلورن -٩-يل ميثوكسي) كربونيل] أمينو]N- ، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو]- ٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويك



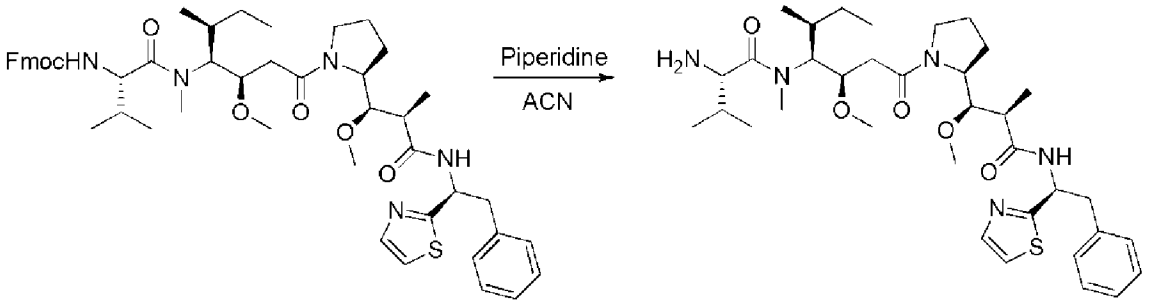
تمت إذابة المركب رقم ١ ت (٤٠ جم، ٦٨,٨٨ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو متعادل في ٦٠٠ مل من DCM. تمت إضافة TFA (٣٠٠ مل). تم تقليب المحلول لمدة ٢ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من ميثانول وDCM (١: ١٠) للحصول على ٢٣,٦ جم (٦٥ %) من المركب ١ ث في صورة زيت عديم اللون.

المركب رقم ١ خ: H٩-فلورن -٩-يل ميثيل -N[(S١)- ١- [[(R٣، S٤، S٥)- ٣- ميثوكسي -١-[(S٢)- ٢- [(R١، R٢)- ١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٢-[[(S١)- ٢- فينيل -١- (١، ٣-ثيازول -٢-يل) إيثيل] كربامويل] إيثيل] بيروليدين-١-يل]- ٥- ميثيل -١- أوكسو هبتان -٤-يل] (ميثيل) كربامويل]- ٢- ميثيل بروبيل] كربامات



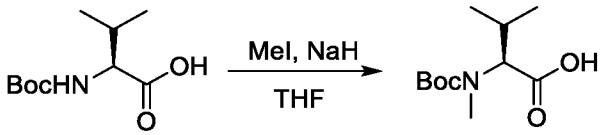
تمت إذابة المركب رقم ١ ث (٢,٥٣ جم، ٤,٨٢ ملي مول، ١,٠٨ مكافئ) في ٢٠ مل من DCM في وجود المركب ١ ك (٢,١٨ جم، ٤,٤٧ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ)، DEPC (٨٧٥ مجم، ٥,٣٧ ملي مول، ١,٢٠ مكافئ) وDIEA (١,٢٥ جم، ٩,٦٧ ملي مول، ٢,١٦ مكافئ). تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط، وتم غسله بالتتابع بـ ٥٠ مل من KHSO4 المشبع و: ١٠٠ مل من الماء، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من ميثانول وDCM (١: ٢٠٠ إلى ١: ٤٠) للحصول على ٢,٨ جم (٧١ %) من المركب ١ خ في صورة مادة صلبة ذات لون أصفر باهت.

المركب رقم ١ ذ: (S٢)- ٢- أمينو -N- [(R٣، S٥)- ٣- ميثوكسي -١-[(S٢)- ٢- [(R١، R٢)- ١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٢-[[(S١)- ٢- فينيل -١- (١، ٣-ثيازول -٢-يل) إيثيل] كربامويل] إيثيل] بيروليدين-١-يل]- ٥- ميثيل -١- أوكسو هبتان -٤-يل]N- ، ٣- داي ميثيل بيوتان أميد



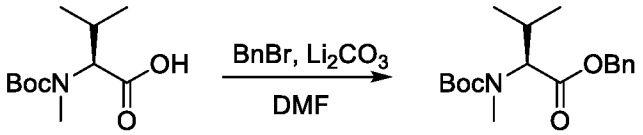
المركب رقم ١ خ (٢,٨ جم، ٣,١٨ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) تمت إذابة في الأسيتو نيتريل (ACN، ١٢ مل) في وجود الببريدين (٣ مل) وتم تركه تحت التقليب ١٨ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط. تمت معادلة خليط التفاعل باستخدام ٥٠ مل من الماء، ثم استخلاصه مرتين باستخدام ١٠٠ مل من DCM. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من ميثانول وDCM (١: ١٠٠ إلى ١: ٤٠) للحصول على ١,٢ جم (٥٧ %) من المركب ١ ذ في صورة مادة صلبة صفراء.

المركب رقم ١ ض أ: حمض (S٢)- ٢-[[(t-بيوتوكسي) كربونيل] (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثيل بيوتانويك



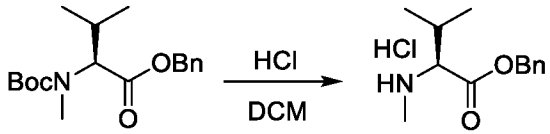
تمت إذابة حمض (S٢)- ٢-[[(t-بيوتوكسي) كربونيل] أمينو]- ٣- ميثيل بيوتانويك (٦٣ جم، ٢٨٩,٩٧ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في THF (١٠٠٠ مل) في وجود يودو ميثان (١٨١ مل). تم تبريد المحلول إلى ٠ °م قبل إضافة هيدريد الصوديوم (١١٦ جم، ٤,٨٣ مول، ١٦,٦٧ مكافئ) بجرعات صغيرة. تم تقليب خليط التفاعل لمدة ١,٥ ساعة عند ٠ °م، تمت عندئذ إزالة الحمام البارد واستمر التقليب لمدة ١٨ ساعة. تمت معادلة خليط التفاعل باستخدام ٢٠٠ مل من الماء ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تم تخفيف الطور المائي المتبقي باستخدام ٤ لترات من الماء، وغسله مرة واحدة باستخدام ٢٠٠ مل من EtOAc وتم ضبط رقمه الهيدروجيني ليكون بين ٣ و: ٤ باستخدام محلول ١ ع من حمض هيدروكلوريك. تم استخلاص الخليط الذي تم الحصول عليه ٣ مرات باستخدام ١,٢ لتر من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها للحصول على ٦٠ جم (٨٩ %) من المركب ١ ض أ في صورة زيت أصفر.

المركب رقم ١ ض ب: بنزيل (S٢)- ٢-[[(t-بيوتوكسي) كربونيل] (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثيل بيوتانوات



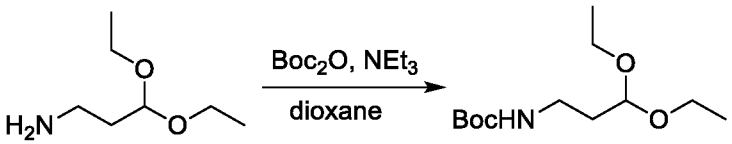
تمت إذابة المركب رقم ١ ض أ (٤٧ جم، ٢٠٣,٢١ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في DMF (٦٠٠ مل) في وجود Li2CO3 (١٥,٨ جم، ٢١٣,٨٣ ملي مول، ١,٠٥ مكافئ). تم تبريد المحلول إلى ٠ °م ثم تمت إضافة بروميد البنزيل (BnBr ٥٧,٩ جم، ٣٣٨,٥٣ ملي مول، ١,٦٧ مكافئ) قطرة- قطرة. تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل قبل معادلته باستخدام ٤٠٠ مل من الماء وترشيحه. تم استخلاص المحلول الذي تم الحصول عليه مرتين باستخدام ٥٠٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ١٠٠ إلى ١: ٢٠) للحصول على ٢٢,٥ جم (٣٤ %) من المركب ١ ض ب في صورة زيت أصفر.

المركب رقم ١ ض ج: بنزيل (S٢)- ٣- ميثيل -٢- (ميثيل أمينو) بيوتانوات هيدروكلوريد



تمت إذابة المركب رقم ١ ض ب (٢٢,٥ جم، ٧٠,٠٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ١٥٠ مل من DCM. تم نفث حمض هيدروكلوريك الغازي. تم تقليب خليط التفاعل ١ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض للحصول على ١٧ جم (٩٤ %) من المركب ١ ض ج في صورة مادة صلبة صفراء.

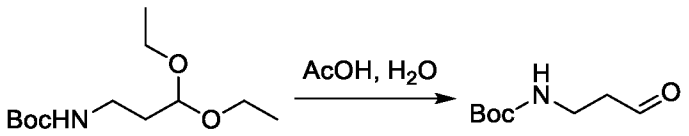
المركب رقم ١ ض د: t-بيوتيل -N (٣، ٣- داي إيثوكسي بروبيل) كربامات



تمت إذابة ٣، ٣- داي إيثوكسي بروبان -١- أمين (٦ جم، ٤٠,٧٦ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) تمت إذابة في ١، ٤- دايوكسان (٣٠ مل) في وجود TEA (٤,٤٥ جم، ٤٣,٩٨ ملي مول، ١,٠٨ مكافئ)، ثم تم التبريد إلى ٠ °م. تمت إضافة (Boc)2O (٩,٦ جم، ٤٣,٩٩ ملي مول،

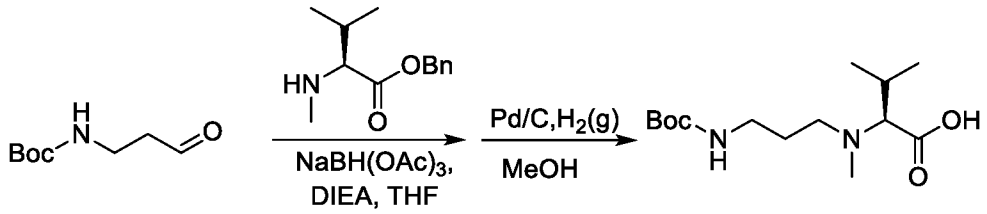
١,٠٨ مكافئ) المخفف في ٢٠ مل من ١، ٤- دايوكسان قطرة- قطرة. تم تقليب المحلول لمدة ٢ ساعة عند ٠ °م ثم طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط قبل معادلته باستخدام ١٠ مل من الماء. تم ضبط الرقم الهيدروجيني ليكون ٥ باستخدام HCl (١ %). تم استخلاص المحلول ٣ مرات باستخدام ٥٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها للحصول على ٨,٢١ جم (٨١ %) من المركب ١ض د في صورة مادة صلبة ذات لون أصفر باهت.

المركب رقم ١ ض هـ: t-بيوتيل -N (٣-أوكسو بروبيل) كربامات



تمت إذابة المركب رقم ١ ض د (٨,٢٠ جم، ٣٣,١٥ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ١٨,٧٥ مل من حمض الأسيتيك وتم تركه تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط. ثم تم استخلاص وسط التفاعل ٣ مرات باستخدام ٣٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها ٣ مرات باستخدام ٣٠ مل من محلول NaCl مشبع، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها للحصول على ٥ جم (٨٧ %) من المركب ١ ض هـ في صورة زيت أحمر داكن.

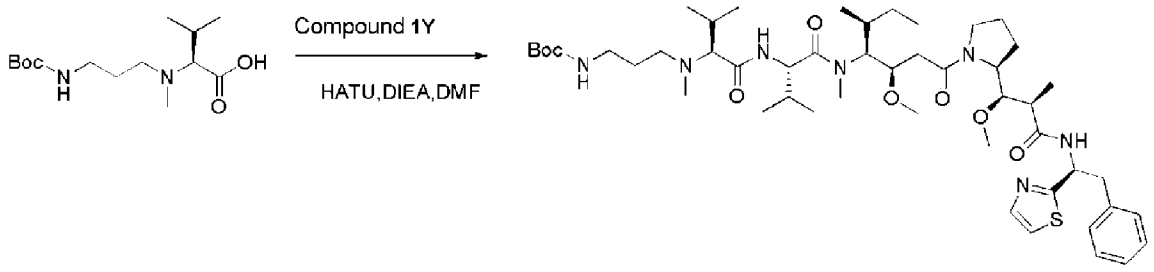
المركب رقم ١ ض و: حمض (S٢)- ٢-[(٣-[[(t-بيوتوكسي) كربونيل] أمينو] بروبيل) (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثيل بيوتانويك



تمت إذابة المركب رقم ١ ض هـ (٢,٤ جم، ١٣,٨٦ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٥٠ مل من THF في وجود المركب ١ ض ج (٣,٥٦ جم، ١٣,٨١ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) وDIEA (٩,١٦ مل، ٤,٠٠ مكافئ). تم تقليب خليط التفاعل ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة الوسط المحيط قبل

إضافة صوديوم تراي أسيتوكسي هيدروكلوريد (٥,٨٧ جم، ٢٧,٧٠ ملي مول، ٢,٠٠ مكافئ). استمر التقليب طول الليل، ثم تمت معادلة خليط التفاعل باستخدام ١٠٠ مل من الماء واستخلاصها ٣ مرات باستخدام ٥٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي جزئيا على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ٤). تمت إعادة إذابة المنتج الخام الذي تم الحصول عليه في ٢٠ مل من ميثانول في وجود Pd/C (١,٢ جم) وتمت هدرجته لمدة ٢٠ دقيقة عند في ظروف درجة الحرارة والضغط الطبيعيين. تم ترشيح وسط التفاعل وتركيزه تحت ضغط منخفض للحصول على ٢٠٠ مجم (٥ %) من المركب ١ ض وفي صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم ١ ض ز: t-بيوتيل N- (٣-[[(S١)- ١-[[(S١)- ١- [[(R٣، S٤، S٥)- ٣- ميثوكسي -١-[(S٢)- ٢- [(R١، R٢)- ١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٢-[[(S١)- ٢- فينيل - ١- (١، ٣-ثيازول -٢-يل) إيثيل] كربامويل] إيثيل] بيروليدين-١-يل]- ٥- ميثيل -١- أوكسو هبتان - ٤ يل] (ميثيل) كربامويل]- ٢- ميثيل بروبيل] كربامويل]- ٢- ميثيل بروبيل] (ميثيل) أمينو] بروبيل) كربامات



تمت إذابة المركب رقم ١ ذ (٥٠ مجم، ٠,٠٨ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٢ مل من DMF في وجود المركب ١ ض و(٢٦,٢ مجم، ٠,٠٩ ملي مول، ١,٢٠ مكافئ)، DIEA (٣٧,٧ مل) و-O (٧- آزا بنزو ترايازول -١-يل) -N، N، N'، N' - تترا ميثيل يورونيوم هكسا فلورو فوسفات (HATU، ٤٣,٣ مجم، ٠,١١ ملي مول، ١,٥٠ مكافئ). تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم تم تخفيفه باستخدام ١٠ مل من الماء واستخلاصها ٣ مرات باستخدام ٥ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها للحصول على ١٠٠ مجم من المركب ١ ض ز في صورة زيت عديم اللون نقي جزئيا.

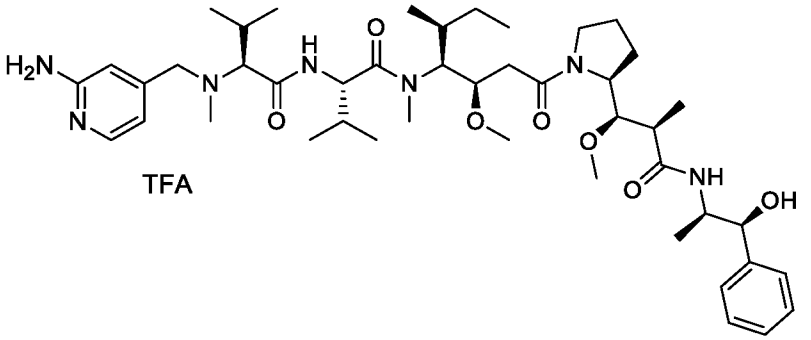
تمت إذابة المركب رقم ١ ض ز (٩٠ مجم، ٠,١٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو متعادل في ٢ مل من DCM وتم تبريد المحلول باستخدام حمام ثلجي. تمت إضافة TFA (١ مل) وتم تقليب خليط التفاعل لمدة ٢ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي بواسطة HPLC تحضيري (SHIMADZU Pre-HPLC-001، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ × ١٥٠ مم؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ % من TFA؛ تدريج من ١٨ % إلى ٣١ % ACN في ٧ دقيقة ثم ٣١ % إلى ١٠٠ % ACN في ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2489 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر). تم الحصول على بحصيلة تبلغ ٢٥ % (٢٣ مجم) في صورة مادة صلبة بيضاء.

LC/MS/UV (عمود Atlantis T3، ٣ ميكرو متر، ٤,٦ × ١٠٠ مم؛ ٣٥ °م؛ ١ مل/ دقيقة، ٣٠ % إلى ٦٠ % ACN في الماء (٢٠ ملي مولار أسيتات أمونيوم خلال ٦ دقيقة) ؛ ESI (C44H73N7O6S، الكتلة المضبوطة ٨٢٧,٥٣) m/z: ٨٢٩ (MH+) ، ٥,٨٤ دقيقة (٩٣,٧ %، ٢٥٤ نانو متر).

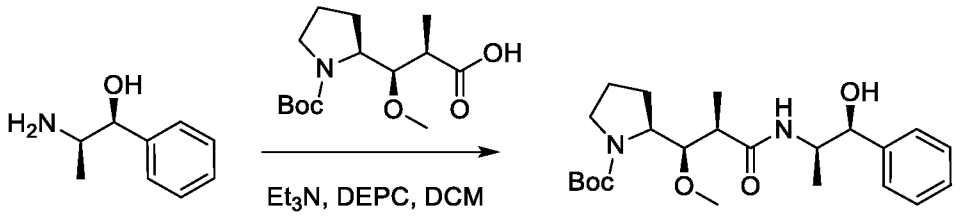
1H NMR (300MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 7.85 - 7.80 (m, 1H); 7.69 - 7.66 (m, 1H), 7.40 - 7.10 (m, 5H), 5.80 - 5.63 (m, 1H), 4.80 - 4.65 (m, 2H), 4.22 -4.00 (m, 1H), 3.89 - 0.74 (m, 58H).

المركب المرجعي رقم ٢

حمض (S) -٢- ((S) -٢- (((٢- أمينو بيريدين-٤-يل) ميثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N- ((R٣، S٤، S٥)- ١- ((S) -٢- ((R١، R٢)- ٣- (((S١، R٢)- ١- هيدروكسي -١- فينيل بروبان -٢-يل) أمينو) -١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣-أوكسو بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل -١- أوكسو هبتان -٤-يل) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميد، تراي فلورو أسيتيك

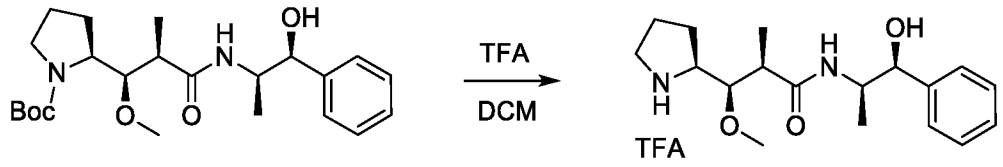


المركب رقم ٢ أ: t-بيوتيل (S) -٢- ((R١، R٢)- ٣- (((S١، R٢)- ١- هيدروكسي -١- فينيل بروبان -٢-يل) أمينو) -١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣-أوكسو بروبيل) بيروليدين-١- كربوكسيلات



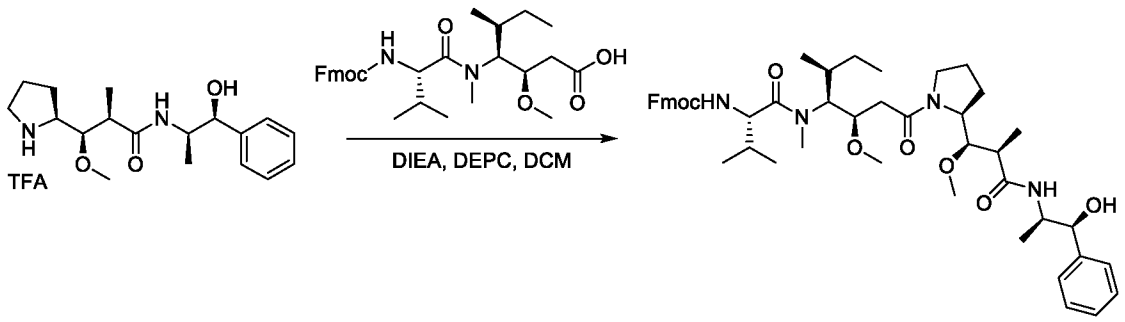
تمت إذابة المركب رقم ١ د (٢,٥ جم، ٨,٧٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) و(S١، R٢)- ٢- أمينو -١- فينيل بروبان -١-أول (١,٣١٥ جم، ٨,٧٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في DMF (٣٥ مل). تم تبريد المحلول إلى ٠ °م ثم تمت إضافة DEPC (١,٣٩ مل) وTEA (١,٨٢ مل) قطرة- قطرة. تم تقليب خليط التفاعل ٢ ساعة عند ٠ °م ثم ٤ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط. تم تخفيف خليط التفاعل باستخدام ٢٠٠ مل من الماء واستخلاصها ثلاث مرات باستخدام ٥٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرة واحدة باستخدام ٥٠ مل من KHSO4 (١ مول/ لتر)، مرة واحدة باستخدام ٥٠ مل من NaHCO3 (مشبع)، مرة واحدة باستخدام ٥٠ مل من NaCl (مشبع)، ثم تم تجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها تحت ضغط منخفض للحصول على ٣,٦ جم (٩٨ %) من المركب ٢ أ في صورة مادة صلبة صفراء.

المركب رقم ٢ ب: (R٢، R٣)-N- ((S١، R٢)- ١- هيدروكسي -١- فينيل بروبان -٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣- ((S) -بيروليدين-٢-يل) بروبان أميد ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



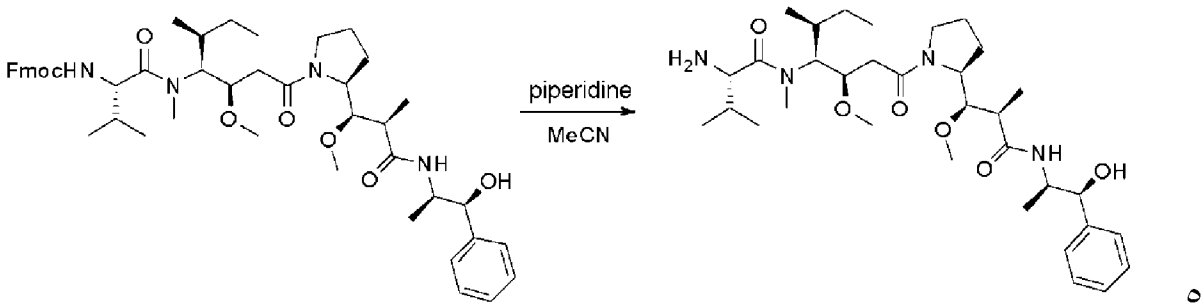
تمت إذابة المركب رقم ٢ أ (٢,٧ جم، ٦,٤٢ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في DCM (٤٠ مل) ثم تم التبريد إلى ٠ °م. تمت إضافة TFA (٢٥ مل) وتم تقليب المحلول لمدة ٢ ساعة عند ٠ °م. تم تركيز خليط التفاعل تحت ضغط منخفض للحصول على ٤,٤ جم من المركب ٢ ب في صورة زيت أصفر.

المركب رقم ٢ ج: (٩H–فلورن –٩–يل) ميثيل ((S) –١– (((R٣)، S٤، S٥)– ١– ((S) –٢– ((R١، R٢)– ٣– (((S١)، R٢)– ١– هيدروكسي –١– فينيل بروبان –٢–يل) أمينو) –١– ميثوكسي –٢– ميثيل –٣–أوكسو بروبيل) بيروليدين–١–يل) –٣– ميثوكسي –٥– ميثيل –١– أوكسو هبتان –٤–يل) (ميثيل) أمينو) –٣– ميثيل –١– أوكسو بيوتان –٢–يل) كربامات



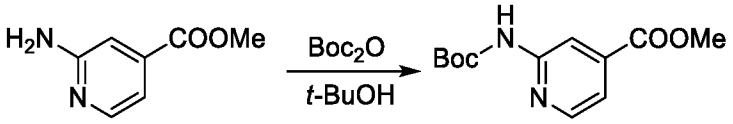
تمت إذابة المركبات ٢ ب (٤,٤ جم، ١٠,١٣ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) و: ١ ث (٥,٣١ جم، ١٠,١٢ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في DCM (٤٥ مل). تم تبريد المحلول إلى ٠ °م ثم تمت إضافة DEPC (١,٦٢ مل) وDIEA (٨,٤ مل) قطرة– قطرة. تم تقليب خليط التفاعل لمدة ٢ ساعة عند ٠ °م ثم عند درجة حرارة الوسط المحيط طول الليل. تم تخفيف خليط التفاعل باستخدام ١٠٠ مل من الماء واستخلاصها ثلاث مرات باستخدام ٥٠ مل من DCM. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرة واحدة باستخدام ٥٠ مل من KHSO4 (١ مول/ لتر)، مرة واحدة باستخدام ٥٠ مل من NaHCO3 (مشبع)، مرة واحدة باستخدام ٥٠ مل من NaCl (مشبع)، ثم تم تجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها تحت ضغط للحصول على ٣,٣ جم (٣٩ %) من المركب ٢ ج في صورة مادة صلبة صفراء.

المركب رقم ٢ د: (S) -٢- أمينو -N- ((R٣، S٤، S٥)- ١- ((S) -٢- ((R١، R٢)- ٣- (((S١، R٢)- ١- هيدروكسي -١- فينيل بروبان -٢-يل) أمينو) -١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣-أوكسو بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل -١- أوكسو هبتان -٤-يل) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميد



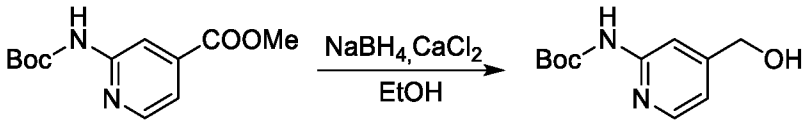
المركب رقم ٢ ج (٣٠٠ مجم، ٠,٣٦ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) تمت إذابة في جو خامل في ACN (٢ مل) والبيريدين (٠,٥ مل). تم ترك المحلول تحت التقليب عند درجة حرارة الوسط المحيط طول الليل ثم تبخيره حتى الجفاف تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من DCM وMeOH (١: ١٠٠) للحصول على ١٥٠ مجم (٦٨ %) من المركب ٢ د في صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم ٢ هـ: ميثيل ٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) أيزو نيكوتينوات



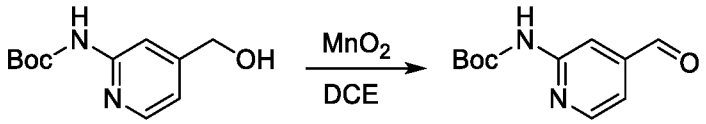
تمت إذابة ميثيل ٢- أمينو بيريدين-٤- كربوكسيلات (٢ جم، ١٣,١٤ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في t-بيوتانول (٢٠ مل) وبعد ذلك تمت إضافة داي-t -بيوتيل داي كربونات (٤,٠٢ جم، ١٨,٤٢ ملي مول، ١,٤٠ مكافئ). تم تقليب خليط التفاعل عند ٦٠ °م طول الليل ثم تم إيقاف التفاعل بإضافة محلول NaHCO3 مائي ١ مولار (٥٠ مل). تم استخلاص المادة الصلبة بالترشيح، وغسلها بـ ٥٠ مل من EtOH ثم تم تجفيفها في الفراغ للحصول على ٢,٥ جم (٧٥ %) من المركب ٢ هـ في صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم ٢ و: t-بيوتيل (٤- (هيدروكسي ميثيل) بيريدين-٢-يل) كربامات



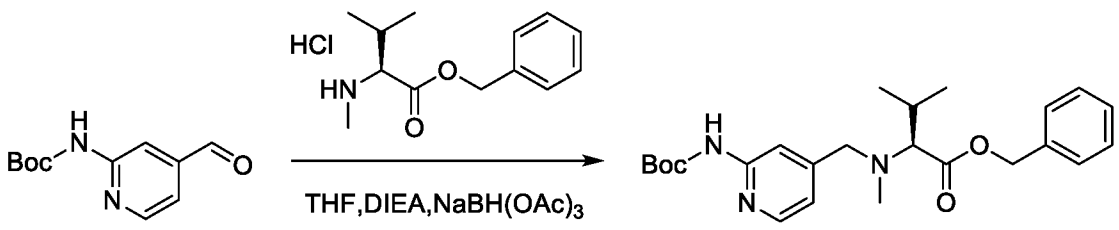
تمت إذابة المركب رقم ٢ هـ (٢,٥ جم، ٩,٩١ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) وCaCl2 (١,٦٥ جم) في EtOH (٣٠ مل). تم تبريد المحلول إلى ٠ °م ثم تمت بالتدريج إضافة NaBH4 (١,١٣ جم، ٢٩,٨٧ ملي مول، ٣,٠١ مكافئ). تم ترك المحلول تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط ثم تم إيقاف التفاعل بإضافة الماء (٥٠ مل). تم استخلاص الخليط ثلاث مرات باستخدام ٢٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرتين باستخدام ٢٠ مل من NaCl (مشبع) ثم تم تجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها تحت ضغط منخفض للحصول على ٢,٠ جم (٩٠ %) من المركب ٢ وفي صورة مادة صلبة عديمة اللون.

المركب رقم ٢ ز: t-بيوتيل (٤- فورميل بيريدين-٢-يل) كربامات



تمت إذابة المركب رقم ٢ و(٢,٥ جم، ١١,١٥ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في DCE (٢٥ مل) ثم تمت إضافة ١٩,٤ جم (٢٢٣,١٤ ملي مول، ٢٠,٠٢ مكافئ) من MnO2. تم ترك الخليط تحت التقليب طول الليل عند ٧٠ °م ثم تمت إزالة المواد الصلبة بالترشيح. تم تجفيف ناتج الترشيح حتى الجفاف للحصول على ١,٤ جم (٥٧ %) من المركب ٢ ز في صورة مادة صلبة بيضاء.

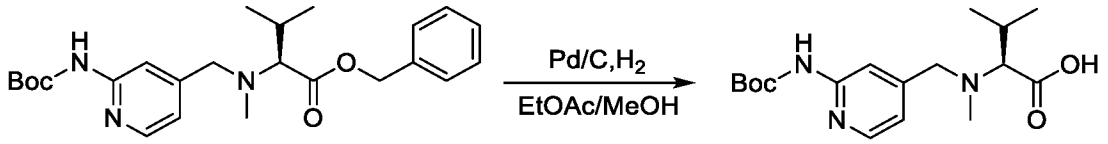
المركب رقم ٢ ح: بنزيل (S) -٢- (((٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) بيريدين-٤-يل) ميثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتانوات



تمت إذابة المركب رقم ٢ جم (٢,٣ جم، ١٠,٣٥ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٢٥ مل من THF في وجود المركب ١ ض ج (٢,٩٣ جم، ١١,٣٧ ملي مول، ١,١٠ مكافئ)، DIEA (٥,٣٩ جم،

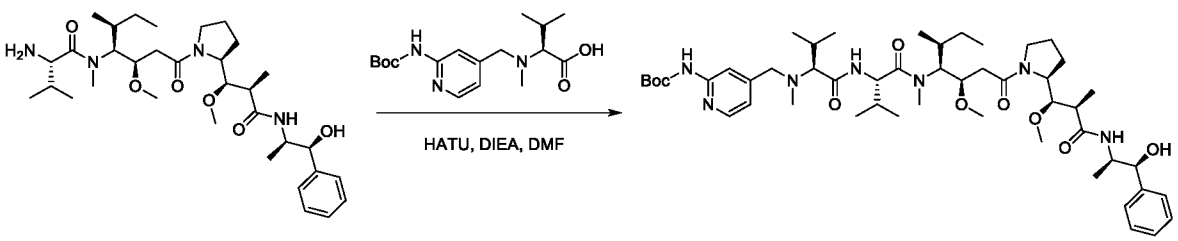
٤١,٧١ ملي مول، ٤,٠٣ مكافئ) و$NaBH(OAc)_3$ (٤,٣٩ جم، ٢٠,٧١ ملي مول، ٢,٠٠ مكافئ). تم تقليب خليط التفاعل لمدة ٦ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط ثم معادلته باستخدام ٦٠ مل من$NaHCO_3$ (مشبع) واستخلاصه ٣ مرات باستخدام ٢٠ مل من AcOEt. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرتين باستخدام ٢٠ مل من NaCl (مشبع)، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc من PE (١: ١٥) للحصول على ٢,٧ جم (٦١ %) من المركب ٢ ح في صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم ٢ ط: حمض (S) -٢- (((٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) بيريدين-٤-يل) ميثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتانويك



تمت إذابة المركب رقم ٢ ح (٥٠٠ مجم، ١,١٧ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ١٠ مل من AcOEt و: ٢ مل من ميثانول في وجود Pd/C (٢٥٠ مجم)، وتمت هدرجته لمدة ٣ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط وتحت الضغط الجوي. تم ترشيح وسط التفاعل وتركيزه تحت ضغط منخفض للحصول على ٢٥٤ مجم (٦٤ %) من المركب ٢ ط في صورة مادة صلبة عديمة اللون

المركب رقم ٢ ي: t-بيوتيل (٤- ((S٣، S٦، S٩، R١٠)- ٩- ((s(S)- -بيوتيل) -١٠- (٢- (S)) -٢- ((R١، R٢)- ٣- (((S١، R٢)- ١- هيدروكسي -١- فينيل بروبان -٢-يل) أمينو) -١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣-أوكسو بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٢-أوكسو إيثيل) -٣، ٦- داي أيزو بروبيل -٢، ٨- داي ميثيل -٤، ٧-داي أوكسو -١١-أوكسا -٢، ٥، ٨- ثيا آزو دودسيل) بيريدين-٢-يل) كربامات



تم تحضير المركب رقم ٢ ي بطريقة تشبه المركب ١ ض ز من الأمين ٢ د (٨٥,٢ مجم، ٠,١٤ ملي مول، ١,٥٠ مكافئ)، الحمض ٢ ط (٣١,٧ مجم، ٠,٠٩ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ)، HATU (٤٢,٩ مجم، ٠,١١ ملي مول، ١,٢٠ مكافئ) وDIEA (٣٦,٧ مجم، ٠,٢٨ ملي مول، ٣,٠٢ مكافئ) في DMF (٣ مل). بعد التبخير حتى الجفاف، تم الحصول على ١٠٠ مجم من المنتج الخام في صورة مادة صلبة بيضاء.

تمت إذابة المركب رقم ٢ ي (١٠٠ مجم، ٠,١١ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٢ مل من DCM و: ١ مل من TFA. تم تقليب خليط التفاعل لمدة ١ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي (٨٠ مجم) باستخدام HPLC تحضيري (Pre–HPLC–001 SHIMADZU، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ × ١٥٠ مم؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ % TFA؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ % ACN خلال ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2489 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر). تم الحصول على المركب رقم ٢ بحصيلة تبلغ ٦ % (٦,٣ مجم) في صورة مادة صلبة بيضاء.

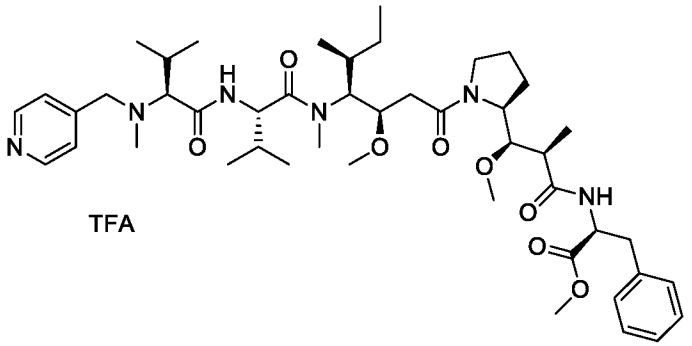
LC/MS/UV (عمود Ascentis Express C18، ٢,٧ ميكرو متر، ٤,٦ × ١٠٠ ملي متر؛ ٤٠ °م؛ ١,٨ مل/ دقيقة، من ١٠ % إلى ٩٥ % ACN في الماء (٠,٠٥ % TFA) خلال ٦ دقيقة) ؛ ESI (C45H73N7O7، الكتلة الدقيقة ٨٢٣,٥٦) m/z: ٨٢٤,٥ (MH+) و: ٤١٢,٩ (M.2H+/2، ١٠٠ %)، ٣,٢١ دقيقة (٩٩,٢ %، ٢١٠ نانو متر)

1H NMR (400MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 7.81 – 7.79 (m, 1H); 7.39 – 7.29 (m, 5H); 6.61 – 6.59 (m, 2H); 4.84 – 4.52 (m, 1H); 4.32 – 4.02 (m, 1H); 3.90 – 2.98 (m, 10H); 2.90 – 2.78 (m, 1H); 2.55 – 0.81 (m, 39H).

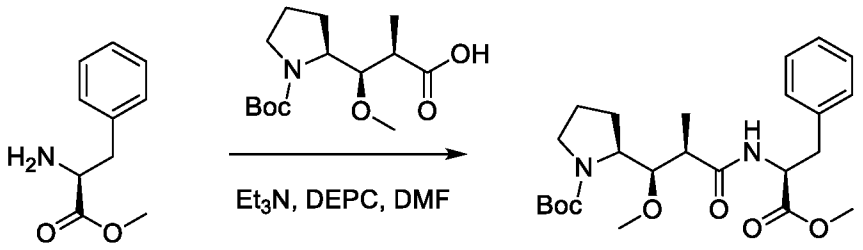
المركب المرجعي رقم ٣

ميثيل ((S) –٢– ((R٢، R٣)– ٣– ((S) –١– ((R٣، S٤، S٥)– ٤– ((S) –N، ٣– داي ميثيل –٢– ((S) –٣– ميثيل –٢– (ميثيل (بيريدين–٤–يل ميثيل) أمينو) بيوتان أميدو) بيوتان

أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبان أميدو) -٣- فينيل بروبانوات، حمض تراي فلورو أسيتيك

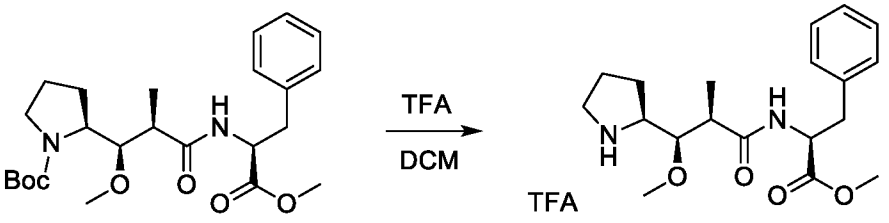


المركب رقم ٣ أ: t-بيوتيل (S) -٢- ((R١، R٢)- ١- ميثوكسي -٣- (((S) -١- ميثوكسي -١ -أوكسو-٣- فينيل بروبان -٢-يل) أمينو) -٢- ميثيل -٣-أوكسو بروبيل) بيروليدين-١- كربوكسيلات



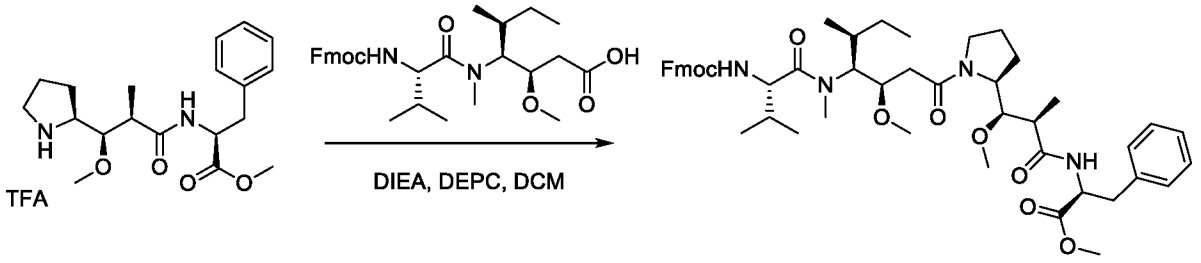
تمت إذابة المركب رقم ١ د (٣ جم، ١٠,٤٤ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) وميثيل (S) -٢- أمينو -٣- فينيل بروبانوات (٢,٢٥ جم، ١٢,٥٥ ملي مول، ١,٢٠ مكافئ) في جو خامل في DMF (٤٠ مل). تم تبريد المحلول إلى ٠ °م ثم DEPC (١,٦٧ مل، ١,٠٥ مكافئ) وتمت إضافة TEA (٣,٦٤ مل، ٢,٥٠ مكافئ) قطرة- قطرة. تم تقليب خليط التفاعل ٢ ساعة عند ٠ °م ثم عند درجة حرارة الوسط المحيط طول الليل. تم تخفيف خليط التفاعل باستخدام ١٠٠ مل من الماء واستخلاصها ثلاث مرات باستخدام ٥٠ مل EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرة واحدة باستخدام ١٠٠ مل من KHSO4 (١ مول/ لتر)، مرة واحدة باستخدام ١٠٠ مل من NaHCO3 (مشبع)، مرة واحدة باستخدام ١٠٠ مل من NaCl (مشبع)، ثم تم تجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها تحت ضغط للحصول على ٤ جم (٨٥ %) من المركب ٣ أ في صورة زيت عديم اللون.

المركب رقم ٣ ب: ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات لـ ميثيل (S) -٢- ((R٢، R٣)- ٣- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣- ((S) -بيروليدين-٢-يل) بروبان أميدو) -٣- فينيل بروبانوات



تمت إذابة المركب رقم ٣ أ (٥ جم، ١١,١٥ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في DCM (٤٠ مل). تمت إضافة TFA (٢٥ مل) وتم تقليب المحلول لمدة ٢ ساعة. تم تركيز خليط التفاعل تحت ضغط منخفض للحصول على ٨ جم من المركب ٣ ب في صورة زيت أصفر.

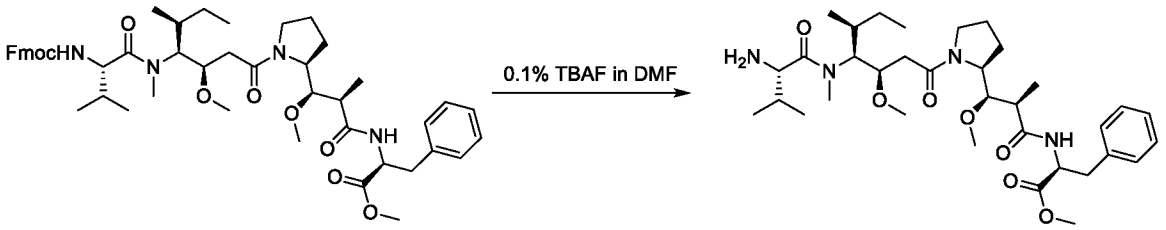
المركب رقم ٣ ج: ميثيل (S) -٢- ((R٢، R٣)- ٣- ((S) -١- ((R٣، S٤، S٥)- ٤- ((S) -٢- ((((H٩-فلورن -٩-يل) ميثوكسي) كربونيل) أمينو) N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبان أميدو) -٣- فينيل بروبانوات



تمت إذابة المركبات ٣ ب (٨,٠٣ جم، ١٧,٣٦ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) و: ١ خ (٩,١ جم، ١٧,٣٤ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في DCM (٨٠ مل). تم تبريد المحلول إلى ٠ °م ثم تمت إضافة DEPC (٢,٨ مل) وDIEA (١٢ مل) قطرة- قطرة. تم تقليب خليط التفاعل لمدة ٢ ساعة عند ٠ °م ثم عند درجة حرارة الوسط المحيط طول الليل. تم تخفيف خليط التفاعل باستخدام ٢٠٠ مل من الماء واستخلاصها ثلاث مرات باستخدام ٥٠ مل من DCM. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرة واحدة باستخدام ٥٠ مل من KHSO4 (١ مول/ لتر)، مرة واحدة باستخدام ٥٠ مل من NaHCO3 (مشبع)، مرة واحدة باستخدام ٥٠ مل من NaCl (مشبع)، ثم

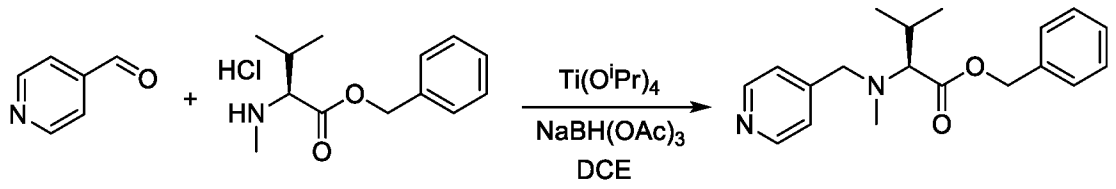
تم تجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها تحت ضغط منخفض للحصول على ٥ جم (٣٤ %) من المركب ٣ ج في صورة مادة صلبة صفراء.

المركب رقم ٣ د: ميثيل (S) -٢- ((R٢، R٣)- ٣- ((S) -١- ((R٣، S٤، S٥)- ٤- ((S) -٢- أمينو N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبان أميدو) -٣- فينيل بروبانوات



تمت إذابة المركب رقم ٣ ج (٥,٥ جم، ٦,٤٣ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في محلول من تترا بيوتيل أمونيوم فلوريد (TBAF، ٢,٦١ جم، ٩,٩٨ ملي مول، ١,٥٥ مكافئ) في DMF (١٠٠ مل). تم تقليب المحلول لمدة عند درجة حرارة الوسط المحيط لمدة ٢ ساعة ثم تم تخفيفه باستخدام ١٠٠ مل من الماء واستخلاصها ثلاث مرات باستخدام ٥٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية ثم تم تجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها تحت ضغط منخفض للحصول على ٣,٣ جم (٨١ %) من المركب ٣ د في صورة مادة صلبة صفراء.

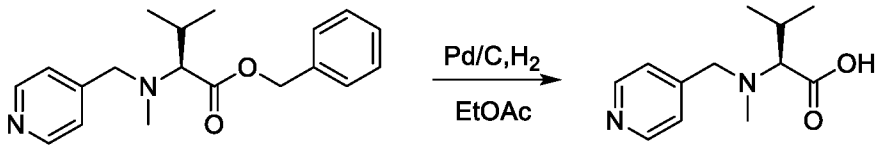
المركب رقم ٣ هـ: بنزيل (S) -٣- ميثيل -٢- (ميثيل (بيريدين-٤-يل ميثيل) أمينو) بيوتانوات



تمت إذابة بيريدين-٤- كربالدهيد (١ جم، ٩,٣٤ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ١٠ مل من ١، ٢- داي كلورو إيثان (DCE) في وجود المركب ١ ض ج (٢,٩ جم، ١١,٢٥ ملي مول، ١,٢١ مكافئ) وأيزوبروبوكسيد التيتانيوم (IV) (٤,١٩ مل، ١,٤٠ مكافئ). تم تقليب الخليط عند درجة حرارة الوسط المحيط لمدة ٣٠ دقيقة ثم تمت إضافة ٢,٧٧ جم من NaBH (OAc)3 (١٣,٠٧ ملي مول، ١,٤٠ مكافئ). تم ترك وسط التفاعل تحت التقليب طول الليل ثم معادلته باستخدام

١٠٠ مل من الماء واستخلاص الخليط ٣ مرات باستخدام ٥٠ مل من AcOEt. تم دمج الأطوار العضوية وتبخيرها حتى الجفاف. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ٢٠) للحصول على ١,٣ جم (٤٥ %) من المركب ٣ هـ في صورة زيت عديم اللون.

المركب رقم ٣ و: حمض (S) -٣- ميثيل -٢- (ميثيل (بيريدين-٤-يل ميثيل) أمينو) بيوتانويك



تمت إذابة المركب رقم ٣ هـ (٨٠٠ مجم، ٢,٥٦ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٣٠ مل من AcOEt في وجود Pd/C (٣٠٠ مجم) وتمت هدرجته لمدة ٣ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط وتحت الضغط الجوي. تم ترشيح وسط التفاعل وتركيزه تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من DCM وMeOH (١٠٠: ١ إلى ٥: ١) للحصول على ١٠٠ مجم (١٨ %) من المركب ٣ وفي صورة مادة صلبة بيضاء.

تمت إذابة المركبات ٣ د (٥٠ مجم، ٠,٠٨ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) و: ٣ و(٢٦,٣٤ مجم، ٠,١٢ ملي مول، ١,٥٠ مكافئ) في ٣ مل من DCM. تم تبريد المحلول إلى ٠ °م ثم تمت إضافة ٠,٠١٨ مل من DEPC و: ٠,٠٣٩٢ مل من DIEA. تم تقليب خليط التفاعل عند ٠ °م لمدة ٢ ساعة ثم عند درجة حرارة الوسط المحيط طول الليل. وسط التفاعل تم تركيب تحت ضغط منخفض وتمت تنقية المتبقي (٧٠ مجم) باستخدام HPLC تحضيري (Pre-HPLC-001 SHIMADZU، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ × ١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ % من TFA؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ %ACN خلال ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2545 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر). تم الحصول على المركب رقم ٣ بحصيلة تبلغ ٢٧ % (٢٠ مجم) في صورة مادة صلبة بيضاء.

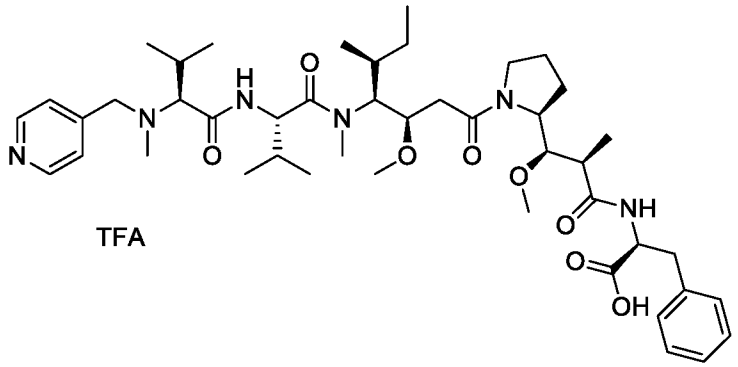
LC/MS/UV (عمود Ascentis Express C18، ٢,٧ ميكرو متر، ٤,٦ × ١٠٠ ملي متر؛ ٤٠ °م؛ ١,٥ مل/ دقيقة، ١٠ % إلى ٩٥ %ACN في الماء (٠,٠٥ %TFA) في ٨ دقيقة) ؛

ESI(C46H72N6O8، الكتلة الدقيقة ٨٣٦,٥) m/z: ٨٣٧,٥ (MH+) و: ٤١٩,٤ (M.2H+/2) (١٠٠ %)، ٧,٠٤ دقيقة (٩٠,٠ %، ٢١٠ نانو متر)

1H NMR (400MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 8.76 - 8.74 (m, 2H); 8.53 - 8.48 (m, 0.4H, NHCO incomplete exchange); 8.29 - 8.15 (m, 0.8H, NHCO incomplete exchange); 8.01 (s, 2H), 7.31 - 7.22 (m, 5H), 4.88 - 4.68 (m, 3H); 4.31 - 4.07 (m, 2H); 3.94 - 2.90 (m, 18H); 2.55 - 0.86 (m, 38H).

المركب المرجعي رقم ٤

حمض (S) -٢- ((R٢، R٣)- ٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥)- ٤- ((S)) -N-، ٣- داي ميثيل -٢- ((S)) -٣- ميثيل -٢- (ميثيل (بيريدين-٤-يل ميثيل) أمينو) بيوتان أميدو) بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبان أميدو) -٣- فينيل بروبانويك، حمض تراي فلورو أسيتيك



تمت إذابة المركب رقم ٣ (١٠٠ مجم، ٠,١١ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في خليط من الماء (٥ مل)، ACN (٥ مل) والبيريدين (٢,٥ مل). تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (Pre-HPLC- SHIMADZU 001، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ × ١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ TFA% ؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ % ACN خلال ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية

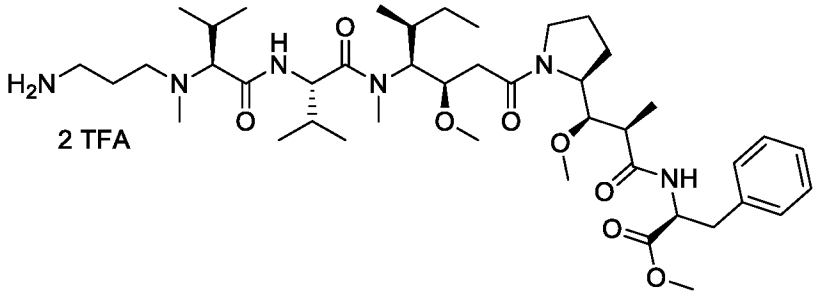
Waters 2545 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر)، للحصول على ٢٠ مجم (٢٠ %) من المركب ٤ في صورة مادة صلبة بيضاء.

LC/MS/UV (عمود Ascentis Express C18، ٢,٧ ميكرو متر، ٤,٦ × ١٠٠ ملي متر؛ ٤٠ °م؛ ١,٥ مل/ دقيقة، ١٠ % إلى ٩٥ % ACN في الماء (٠,٠٥ %TFA) في ٨ دقيقة) ؛ ESI(C45H70N6O8، الكتلة الدقيقة ٨٢٢,٥) m/z: ٨٢٣,٥ (MH+) و: ٤١٢,٤ (M.2H+/2، ١٠٠ %)، ٦,٨٤ دقيقة (٨٩,١ %، ٢١٠ نانو متر).

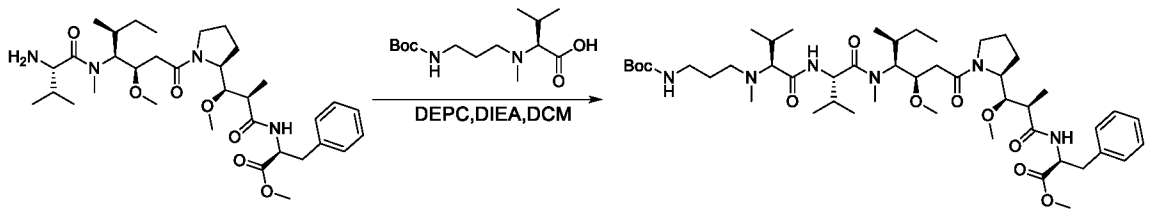
1H NMR (400MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 8.79 - 8.78 (m, 2H); 8.09 (m, 2H); 7.30 - 7.21 (m, 5H); 4.80 - 4.80 (m, 1H), 4.36 - 0.87 (m, 58H).

المركب المرجعي رقم ٦

حمض ميثيل (S) -٢- ((R٢، R٣)- ٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥)- ٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٣- أمينو بروبيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبان أميدو) -٣- فينيل بروبانوات، بس تراي فلورو أسيتيك



المركب رقم ٦ أ: ميثيل (S٢)- ٢-[(R٢)- ٢-[(R)]- [(S٢)- ١- [(R٣، S٤، S٥)- ٤- [(S٢)- ٢-[(S٢)- ٢-[(٣-[[(t-بيوتوكسي) كربونيل] أمينو] بروبيل) (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثيل بيوتان أميدو]N- ، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو]- ٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل] بيروليدين-٢-يل] (ميثوكسي) ميثيل] بروبان أميدو]- ٣- فينيل بروبانوات



تمت إذابة المركب رقم ٣ د (١٥٧,٥ مجم، ٠,٢٥ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) عند ٠ °م في جو خامل في ٣ مل من DCM في وجود الحمض الكربوكسيلي ١ ض و(٧٨,٧ مجم، ٠,٢٧ ملي مول، ١,١٠ مكافئ)، DEPC (٤٦ ميكرو لتر) وDIEA (١٢٤ ميكرو لتر). تم تقليب خليط التفاعل ٢ ساعة عند درجة حرارة أقل وتمت عندئذ إزالة الحمام البارد واستمر التقليب لمدة ٤ ساعات. تم التركيز تحت ضغط منخفض للحصول على ٢٠٠ مجم من المركب ٦ أ في صورة زيت أصفر خام، تم استخدامه كما هو في الخطوة التالية.

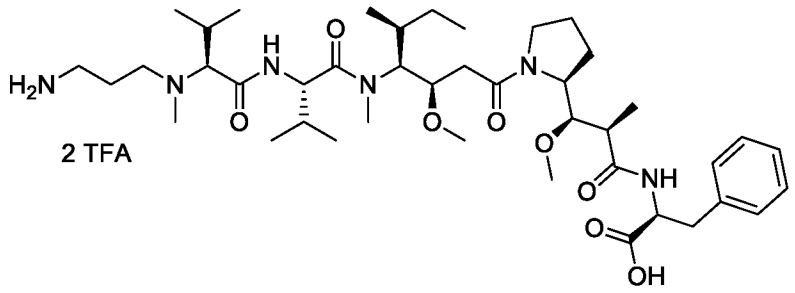
تمت إذابة المركب رقم ٦ أ (٢٠٠ مجم، ٠,٢٢ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل عند ٠ °م في ٢ مل من DCM. تمت إضافة TFA (١ مل) قطرة- قطرة وتمت إزالة الحمام البارد. تم تقليب خليط التفاعل ١ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (Pre-HPLC-001 SHIMADZU، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ %TFA ؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ % ACN خلال ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2489 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر)، للحصول على ٦٠ مجم (٢٦ %، حصيلة في خطوتين) من المركب ٦ في صورة مادة صلبة بيضاء.

LC/MS/UV(Zorbax Eclipse Plus C8، ٣,٥ ميكرو متر، ٤,٦ × ١٥٠ ملي متر؛ ١ مل/ دقيقة، ٤٠ °م، ٣٠ إلى ٨٠ % ميثانول في الماء (٠,١ % H3PO4) خلال ١٨ دقيقة) ؛ ESI(C43H74N6O8، الكتلة الدقيقة ٨٠٢,٥٦) m/z: ٨٠٤ (MH+) ؛ ١١,٥٠ دقيقة (٩١,٥ %، ٢١٠ نانو متر).

1H NMR (300MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 8.52 (d, 0.3H, NHCO incomplete exchange); 8.25 (d, 0.5H, NHCO incomplete exchange); 7.30–7.22 (m, 5H); 4.9–4.6 (m, 3H); 4.2–4.0 (m, 1H); 4.0–0.86 (m, 61H).

المركب المرجعي رقم ٧

حمض (S) -٢- ((R٢، R٣)- ٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥)- ٤- ((S)) -٢- (S)) - ٢- ((٣- أمينو بروبيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبان أميدو) -٣- فينيل حمض بروبانويك، بس تراي فلورو أسيتيك



تمت إذابة المركب رقم ٦ (٧٠ مجم، ٠,٠٨ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في خليط من الماء (٥ مل)، ACN (٢,٥ مل) والبيريدين (٥ مل). تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (Pre-HPLC-001 SHIMADZU، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ % TFA؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ % ACN خلال ٢ دقيقة؛ UV كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2489 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر)، للحصول على ١٤,٦ مجم (٢١ %) من المركب ٧ في صورة مادة صلبة بيضاء.

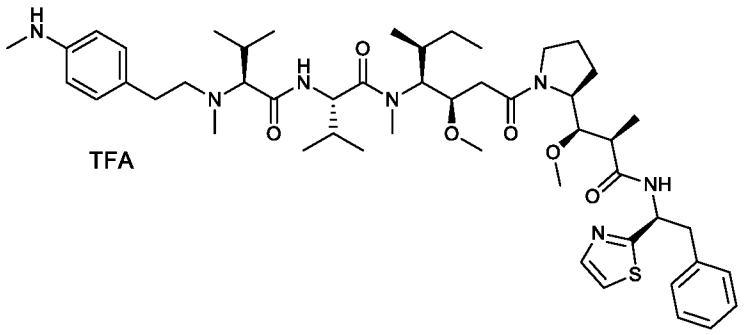
LC/MS/UV (Ascentis Express C18، ٢,٧ ميكرو متر، ٤,٦ × ١٠٠ ملي متر؛ ١,٥ مل/ دقيقة، ٤٠ °م، ٠ إلى ٨٠ % ميثانول في الماء (٠,٠٥ %TFA) في ٨ دقيقة) ؛ ESI

(C42H72N6O8، الكتلة الدقيقة ٧٨٨,٥٤) m/z: ٧٩٠ (MH+) ، ٥,٧١ دقيقة (٩٦,٨٣ %، ٢١٠ نانو متر).

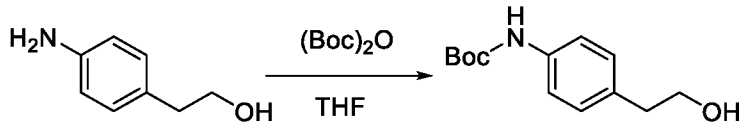
1H NMR (300MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 8.42 (d, 0.3H, NHCO incomplete exchange); 8.15 (d, 0.2H, NHCO incomplete exchange); 7.31–7.21 (m, 5H); 4.9–4.6 (m, 3H); 4.25–4.0 (m, 1H); 4.0–0.86 (m, 59H).

المركب رقم ١١

حمض (S) —N ((R٣، S٤، S٥)- ٣- ميثوكسي -١- ((S) -٢- ((R١، R٢)- ١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣ -أوكسو-٣- (((S) -٢- فينيل -١- (ثيازول -٢-يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٥- ميثيل -١- أوكسو هبتان -٤-يل) N-، ٣- داي ميثيل -٢- ((S) -٣- ميثيل -٢- (ميثيل (٤- (ميثيل أمينو) فينيثيل) أمينو) بيوتان أميدو) بيوتان أميد، تراي فلورو أسيتيك



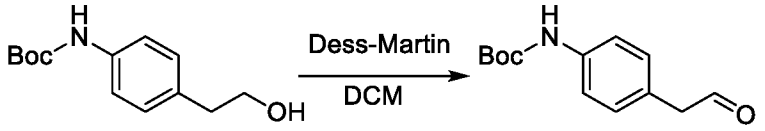
المركب رقم ١١ أ: t-بيوتيل -N [٤- (٢- هيدروكسي إيثيل) فينيل] كربامات



تمت إضافة داي t-بيوتيل داي كربونات (١٦,٧ جم، ٧٧ ملي مول، ١,٠٥ مكافئ) إلى محلول من ٢- (٤- أمينو فينيل) الإيثانول (١٠ جم، ٧٢,٩ ملي مول، ١ مكافئ) في THF (٢٠٠ مل)، وتم تقليب خليط التفاعل طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط. تم تخفيف الخليط باستخدام

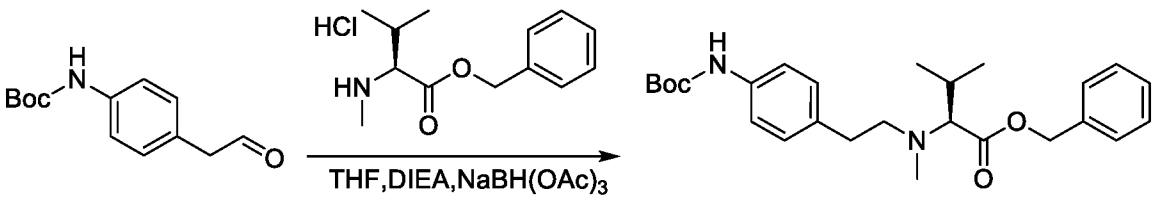
EtOAc (٢٠٠ مل)، وغسله بالماء (٢٠٠ مل)، ثم HCl ١ مولار (١٠٠ مل)، ثم محلول NaHCO3 مائي مشبع (١٠٠ مل) ثم محلول ملحي مركز (١٠٠ مل). تم تجفيف الطور العضوي باستخدام MgSO4 ثم تبخيره حتى الجفاف تحت ضغط منخفض. تم سحن المنتج الخام مرتين باستخدام الهبتان (١٥٠ مل) وتجفيفه في الفراغ للحصول على المركب ١١ أ في صورة مادة صلبة بيضاء (١٤,٧ جم، ٨٤ %).

المركب رقم ١١ ب: t-بيوتيل -N [٤- (٢- أوكسو إيثيل) فينيل] كربامات



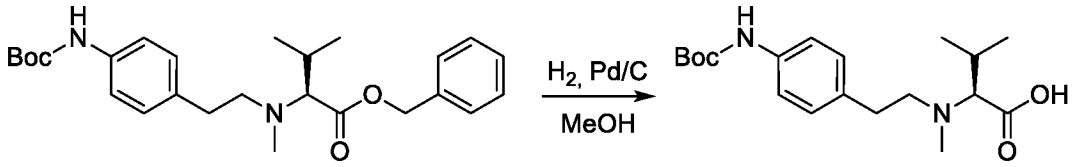
تمت إذابة المركب رقم ١١ أ (٢,٥ جم، ١٠,٥ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٢٥ مل من DCM ثم تم التبريد إلى -٧٨ °م. تمت إضافة محلول Dess-Martin فوق يوديان (DMP، ٦,٧١ جم، ١٥,٨ ملي مول، ١,٥ مكافئ) في DCM (١٠ مل) قطرة- قطرة. تمت إزالة الحمام البارد واستمر التقليب لمدة ١ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط. تمت معادلة خليط التفاعل باستخدام ٦٠ مل من خليط ٥٠/٥٠ من محلول مائي مشبع من بيكربونات الصوديوم ومحلول مائي مشبع من Na2S2O3. تم استخلاص المحلول الناتج ٣ مرات باستخدام ٣٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرتين باستخدام محلول مائي مشبع من NaCl، وتجفيفها باستخدام كبريتات صوديوم لا مائية، وترشيحها وتركيزها تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي على هلام السليكا (EtOAc/PE 1/15) للحصول على ١,٠ جم (٤٠ %) من المركب ١١ ب في صورة مادة صلبة ذات لون أصفر باهت.

المركب رقم ١١ ج: بنزيل (S٢)- ٢- [[٢- (٤-[[(t-بيوتوكسي) كربونيل] أمينو] فينيل) إيثيل] (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثيل بيوتانوات.



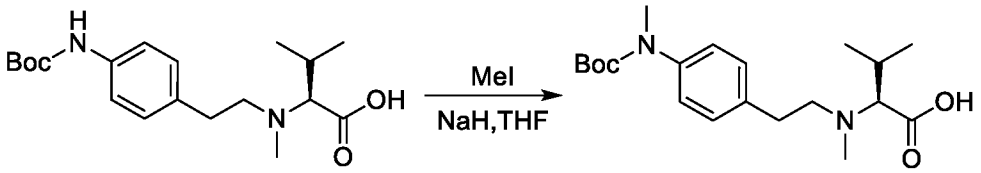
تمت إذابة المركب رقم ١ ض ج (٣,٥ جم، ١٣,٦ ملي مول، ١,١ مكافئ) في THF (٣٠ مل) في وجود DIEA (٦,٤ جم، ٤٩,٧ ملي مول، ٤,٠ مكافئ)، ألدهيد ١١ ب (٢,٩ جم، ١٢,٣ ملي مول، ١,٠ مكافئ) وصوديوم تراي أسيتوكسي هيدروكلوريد (٥,٢٣ جم، ٤٩,٧ ملي مول، ٢,٠ مكافئ). تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم معادلته باستخدام ٦٠ مل من محلول مشبع من بيكربونات الصوديوم. تم استخلاص المحلول الناتج ٣ مرات باستخدام ٣٠ مل EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وغسلها مرتين باستخدام محلول مائي مشبع من NaCl، وتجفيفها باستخدام كبريتات صوديوم لا مائية، وترشيحها وتركيزها تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي على هلام السليكا (EtOAc/PE١: ٢٠) للحصول على ٣,٧ جم (٦٨ %) من المركب ١١ ج في صورة زيت أصفر.

المركب رقم ١١ د: حمض (S٢)- ٢- [[٢- (٤-[[(t-بيوتوكسي) كربونيل] أمينو] فينيل) إيثيل] (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثيل بيوتانويك



تمت إذابة المركب رقم ١١ ج (٢ جم، ٤,٥ ملي مول، ١ مكافئ) في ١٠ مل من ميثانول في وجود Pd/C (٢ جم) وهدرجته لمدة ٢ ساعة عند في ظروف درجة الحرارة والضغط الطبيعيين. تم ترشيح وسط التفاعل وتركيزه تحت ضغط منخفض للحصول على ١,٢ جم (٧٥ %) من المركب ١١ د في صورة زيت أصفر.

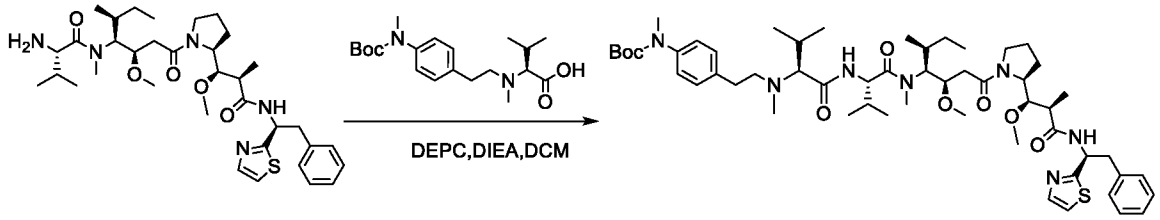
المركب رقم ١١هـ: حمض (S٢)- ٢- [[٢- (٤-[[(t-بيوتوكسي) كربونيل] (ميثيل) أمينو] فينيل) إيثيل] (ميثيل) أمينو]- ٣- ميثيل بيوتانويك



تمت إذابة المركب رقم ١١ د (١,٢ جم، ٣,٤ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في جو خامل في THF (٢٠ مل). تم تبريد وسط التفاعل باستخدام حمام ثلجي وبعد ذلك تمت إضافة NaH (٦٠ % في

الزيت، ٥٤٩ مجم، ١٣,٧ ملي مول، ٤,٠ مكافئ) على دفعات، ويلي ذلك يودو ميثان (٤,٩ جم، ٣٤ ملي مول، ١٠ مكافئ). تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم معادلته باستخدام الماء وغسله بـ ١٠٠ مل من EtOAc. تم ضبط الرقم الهيدروجيني للمحلول المائي ليكون ٦–٧ باستخدام HCl ١ ع. تم استخلاص هذا المحلول المائي ٣ مرات باستخدام ١٠٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها للحصول على ٨٠٠ مجم (٦٤ %) من المركب ١١ هـ في صورة مادة صلبة صفراء.

المركب رقم ١١ و: t–بيوتيل –N [٤– (٢–[[(S١)]– ١–[[(S١)]– ١– [[(R٣، S٤، S٥)– ٣– ميثوكسي –١–[(S٢)]– ٢– [(R١، R٢)]– ١– ميثوكسي –٢– ميثيل –٢–[[(S١)]– ٢– فينيل – ١– (١، ٣–ثيازول –٢–يل) إيثيل] كرباميل] إيثيل] بيروليدين–١–يل]– ٥– ميثيل –١– أوكسو هبتان –٤yl] (ميثيل) كرباميل]– ٢– ميثيل بروبيل] كرباميل]– ٢– ميثيل بروبيل] (ميثيل) أمينو] إيثيل) فينيل]N– – ميثيل كربامات



تم تحضير المركب رقم ١١ وبطريقة تشبه المركب ٦ أ من الأمين ١ ذ (١٥٠ مجم، ٠,٢٢ ملي مول، ١,٢ مكافئ) والحمض ١١ هـ (٧٠ مجم، ٠,١٩ ملي مول، ١,٠ مكافئ). بعد التنقية على هلام السليكا (EtOAc/PE١: ١) تم الحصول على ١٠٠ مجم (٥٢ %) من المنتج المطلوب في صورة مادة صلبة ذات لون أصفر باهت.

تم تحضير المركب رقم ١١ بنفس الطريقة المتبعة في تحضير المركب رقم ١ من المركب الوسيط ١١ و(١٠٠ مجم، ٠,١ ملي مول). تمت تنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (Pre– HPLC–001 SHIMADZU، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ % TFA؛ تدريج يبلغ ٢٠ %

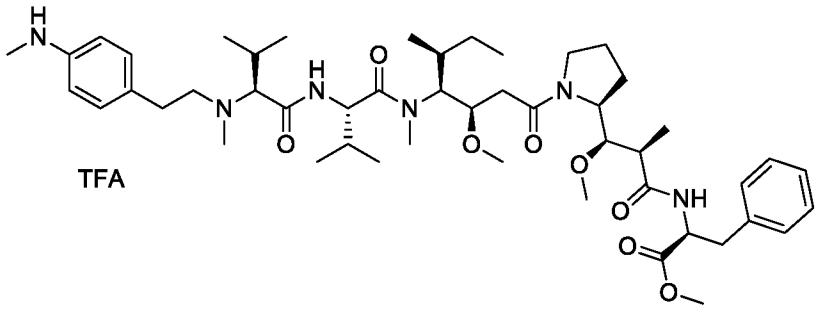
إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ % ACN خلال ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2489 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر). تم الحصول على المركب رقم ١١ بحصيلة تبلغ ٣٩ % (٣٩,٧ مجم) في صورة مادة صلبة بيضاء.

LC/MS/UV(Eclipse Plus C8، ٣,٥ ميكرو متر، ٤,٦ ×١٥٠ ملي متر؛ ١ مل/ دقيقة، ٤٠ °م، ٥٠ إلى ٩٥ % ميثانول في الماء (٠,٠٥ % TFA) في ١٨ دقيقة) ؛ ESI (C50H77N7O6S، الكتلة الدقيقة ٩٠٣,٥٧) m/z: ٩٠٤,٥ (MH+) ، ٧,٥٣ دقيقة (٩٣,٦٨ %، ٢٥٤ نانو متر).

1H NMR (300MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 8.84 (d, 0.5H, NHCO incomplete exchange); 8.7–8.5 (m, 0.9H, NHCO incomplete exchange); 7.76–7.73 (m, 1H); 7.55 - 7.4 (m, 1H); 7.28–7.22 (m, 7H); 7.08–7.05 (m, 2H); 5.51–5.72 (m, 1H); 4.9–4.80 (m, 2H); 4.3–0.7 (m, 60H).

المركب رقم ١٢

حمض ميثيل (S) -٢- ((R٢، R٣)- ٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥)- ٤- ((S)) -N، ٣- داي ميثيل -٢- ((S)) -٣- ميثيل -٢- (ميثيل (٤- (ميثيل أمينو) فينيثيل) أمينو) بيوتان أميدو) بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبان أميدو) -٣- فينيل بروبانوات، تراي فلورو أسيتيك



بنفس الطريقة المتبعة في الطور النهائي في تخليق المركب ١، تم تحضير المركب ١٢ في خطوتين من الأمين ٣ د (١١٨ مجم، ٠,١٩ ملي مول) والحمض ١١ هـ (٨٢ مجم، ٠,٢٢ ملي

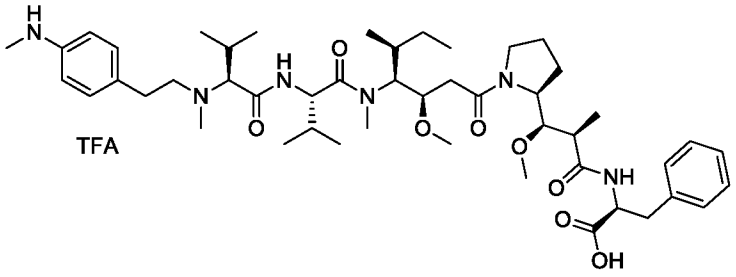
مول). تمت تنقية الكمية المتبقية النهائية باستخدام HPLC تحضيري (Pre–HPLC–001 SHIMADZU، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ % TFA؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ % ACN خلال ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2489 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر). المركب رقم ١٢ تم الحصول على بحصيلة تبلغ ٧ % (١٣,٧ مجم) في صورة مادة صلبة بيضاء.

LC/MS/UV (Eclipse Plus C8، ٣,٥ ميكرو متر، ٤,٦ ×١٥٠ ملي متر؛ ١ مل/ دقيقة، ٤٠ °م، ٤٠ إلى ٩٥ % ميثانول في الماء (٠,٠٥ % TFA) في ١٨ دقيقة) ؛ ESI (C49H78N6O8، الكتلة الدقيقة ٨٧٨,٥٩) m/z: ٨٧٩,٧ (MH+) ، ١٠,٠٧ دقيقة (٩٠,٦ %، ٢٥٤ نانو متر).

1H: NMR (300MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 7.40 (se, 2H); 7.38–7.22 (m, 7H); 4.95–4.7 (m, 3H); 4.2–4.0 (m, 1H); 3.9–0.86 (m, 62H).

المركب رقم ١٣

حمض (S) –٢– ((R٢، R٣)– ٣– ((S)) –١– ((R٣، S٤، S٥)– ٤– ((S)) –N، ٣– داي ميثيل –٢– ((S)) –٣– ميثيل –٢– (ميثيل (٤– (ميثيل أمينو) فينيثيل) أمينو) بيوتان أميدو) بيوتان أميدو) –٣– ميثوكسي –٥– ميثيل هبتانويل) بيروليدين–٢–يل) –٣– ميثوكسي –٢– ميثيل بروبان أميدو) –٣– فينيل حمض بروبانويك، تراي فلورو أسيتيك



تم تحضير المركب رقم ١٣ بنفس الطريقة المتبعة في تحضير المركب رقم ٧ من المركب ١٢ (١٠٠ مجم، ٠,١٠ ملي مول). تمت تنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (–Pre–HPLC

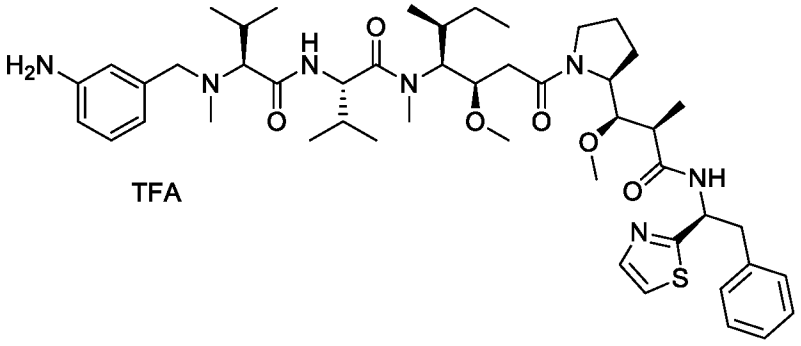
SHIMADZU 001، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ % TFA؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ % ACN خلال ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2489 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر). تم الحصول على المركب رقم ١٣ بحصيلة تبلغ ٢٠ % (٢٠ مجم) في صورة مادة صلبة بيضاء.

LC/MS/UV (Ascentis Express C18، ٢,٧ ميكرو متر، ٤,٦ ×١٠٠ ملي متر؛ ١,٥ مل/ دقيقة، ٤٠ °م، ١٠ إلى ٩٥ % ميثانول في الماء (٠,٠٥ % TFA) خلال ٨ دقيقة) ؛ ESI (C48H76N6O8، الكتلة الدقيقة ٨٦٤,٥٧) m/z: ٨٦٥,٦ (MH+) ، ٦,٠٥ دقيقة (٩٠,٩ %، ٢١٠ نانو متر).

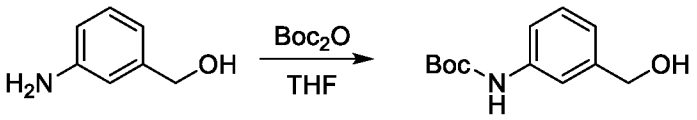
1H NMR: (300MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 7.32–7.19 (m, 9H); 4.9–4.65 (m, 3H); 4.2–4.0 (m, 1H); 3.9–0.86 (m, 59H).

المركب رقم ١٤

حمض (S) -٢- ((S) -٢- ((٣- أمينو بنزيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N- ((R٣، S٤، S٥)- ٣- ميثوكسي -١- ((S) -٢- ((R١، R٢)- ١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣ -أوكسو-٣- (((S) -٢- فينيل -١- (ثيازول -٢-يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين-١- يل) -٥- ميثيل -١- أوكسو هبتان -٤-يل) N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميد، تراي فلورو أسيتيك

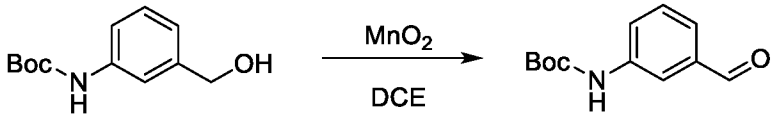


المركب رقم ١٤أ: t-بيوتيل (٣- (هيدروكسي ميثيل) فينيل) كربامات



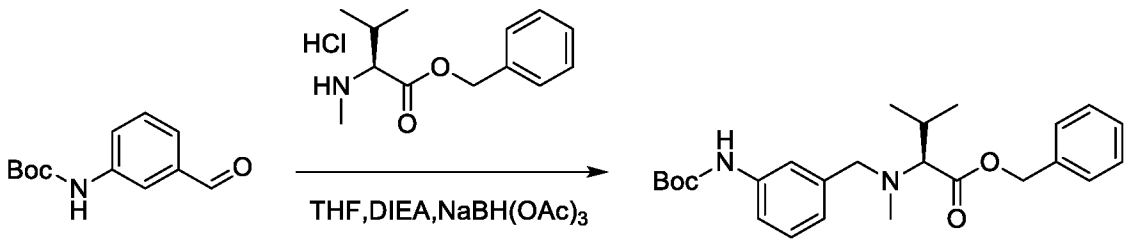
تمت إذابة (٣- أمينو فينيل) ميثانول (٣ جم، ٢٤,٣٦ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في THF (٦٠ مل) وبعد ذلك تمت عندئذ إضافة داي-t-بيوتيل داي كربونات (٦,٣٨ جم، ٢٩,٢٣ ملي مول، ١,٢٠ مكافئ). تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط وتم عندئذ تخفيف التفاعل بإضافة ٢٠٠ مل من الماء. تم استخلاص المنتج ٣ مرات باستخدام ١٠٠ مل من AcOEt وتمت إعادة دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها تحت ضغط منخفض للحصول على المنتج الخام (١٣,٨٥ جم من المركب ١٤ أ) في صورة زيت أصفر.

المركب رقم ١٤ب: t-بيوتيل (٣- فورميل فينيل) كربامات



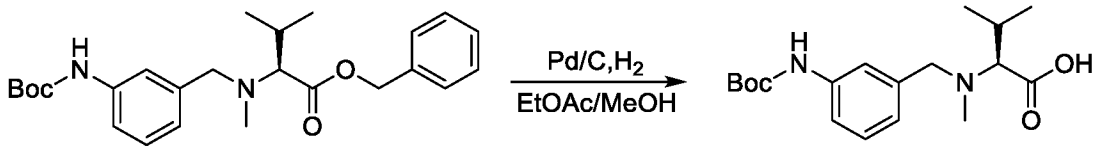
تمت إذابة المركب رقم ١٤ أ (١٣,٨ جم، ٦١,٨١ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في DCE (٤٠٠ مل) وتمت عندئذ إضافة MnO2 (٥٤ جم، ٦٢١,١٤ ملي مول، ١٠,٠٥ مكافئ). تم ترك الخليط تحت التقليب عند درجة حرارة الوسط المحيط لمدة ٣ أيام وبعد ذلك تمت إزالة المواد الصلبة بالترشيح. تم تجفيف ناتج الترشيح حتى الجفاف وتمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ٣٠) للحصول على ٣ جم (٢٢ %) من المركب ١٤ ب في صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم ١٤ ج: بنزيل (S) -٢- ((٣- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) بنزيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتانوات



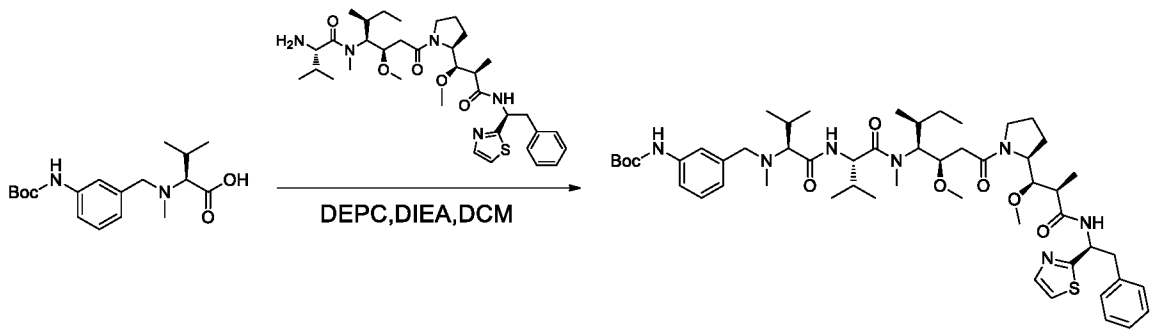
تمت إذابة المركب رقم ١٤ ب (١ جم، ٤,٥٢ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٢٠ مل من THF في وجود المركب ١ ض ج (١,١٦ جم، ٤,٥٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ)، DIEA (٣ مل) و NaBH 3(OAc) (١,٩٢ جم، ٩,٠٦ ملي مول، ٢,٠١ مكافئ). تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط ثم معادلته باستخدام ١٠٠ مل من الماء واستخلاصها ٣ مرات باستخدام ٥٠ مل من AcOEt. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات الصوديوم، وترشيحها وتركيزها. تمت تنقية المتبقي على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ٥٠) للحصول على ١,٩ جم (٩٩ %) من المركب ١٤ ج في صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم ١٤ د: حمض (S) -٢- ((٣- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) بنزيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتانويك



تمت إذابة المركب رقم ١٤ ج (١ جم، ٢,٣٤ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في ٣٠ مل من AcOEt و: ٤ مل من ميثانول في وجود Pd/C (٤٠٠ مجم) وتمت هدرجته لمدة ١ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط وتحت الضغط الجوي. تم ترشيح وسط التفاعل وتركيزه تحت ضغط منخفض للحصول على ٦٨٠ مجم (٨٦ %) من المركب ١٤ د في صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم ١٤ هـ: t-بيوتيل (٣- ((S٣، S٦، S٩، R١٠)- ٩- ((S) -s-بيوتيل) -٣، ٦- داي أيزو بروبيل -١٠- (٢- ((S) -٢- ((R١، R٢)- ١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣ - أوكسو-٣- (((S) -٢- فينيل -١- (ثيازول -٢-يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين-١-يل) - ٢- أوكسو إيثيل) -٢، ٨- داي ميثيل -٤، ٧-داي أوكسو -١١-أوكسا -٢، ٥، ٨- ثيا آزو دودسيل) فينيل) كربامات



تم تخليق المركب رقم ١٤ هـ بنفس الطريقة المتبعة في المركب ٣ من الأمين ١ ذ (١٠٠ مجم، ٠,١٥ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ)، الحمض ١٤ د (١٠٢,٢٧ مجم، ٠,٣٠ ملي مول، ٢,٠٠ مكافئ)، DEPC (٠,٠٥٣ مل) وDIEA (٠,٠٤٦ مل) في DCM (٣ مل). تمت تنقية المنتج الخام (٨٠ مجم) على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ١) للحصول على ١٠٠ مجم (٦٧ %) من المركب ١٤ هـ في صورة مادة صلبة ذات لون أصفر باهت.

تم تخليق المركب رقم ١٤ بنفس الطريقة المتبعة في المركب ٢ من المركب الوسيط ١٤ هـ (١٠٠ مجم، ٠,١٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ). تمت تنقية المنتج الخام (٨٠ مجم) باستخدام HPLC تحضيري (Pre–HPLC–001 SHIMADZU، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ % TFA؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ % ACN خلال ٢ دقيقة؛ Waters 2545 UV Detecctorعند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر). تم الحصول على المركب رقم ١٤ بحصيلة تبلغ ١٠ % (١٠ مجم) في صورة مادة صلبة بيضاء.

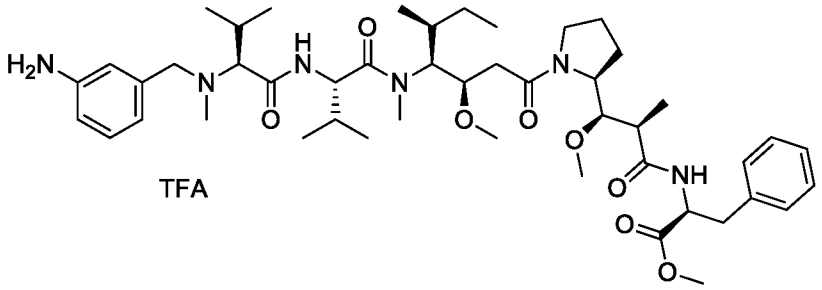
LC/MS/UV (عمود Eclipse Plus C8، ٣,٥ ميكرو متر، ٤,٦ ×١٥٠ ملي متر؛ ٤٠ °م؛ ١,٠ مل/ دقيقة، ٤٠ % إلى ٩٥ % MeOH في الماء (٠,٠٥ %TFA) خلال ١٨ دقيقة) ؛ ESI(C48H73N7O6S، الكتلة الدقيقة ٨٧٥,٥) m/z: ٨٧٦,٥ (MH+) و: ٤٣٨,٩ (M.2H+/2، ١٠٠ %)، ١١,٣٥ دقيقة (٩٥,٦ %، ٢١٠ نانو متر).

1H NMR (400MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 8.92 – 8.86 (m, 0.4H, NH incomplete exchange); 8.70 – 8.54 (m, 0.6H, NH incomplete exchange); 7.88 – 7.78 (m, 1H); 7.60 – 7.50 (m, 1H); 7.45 –

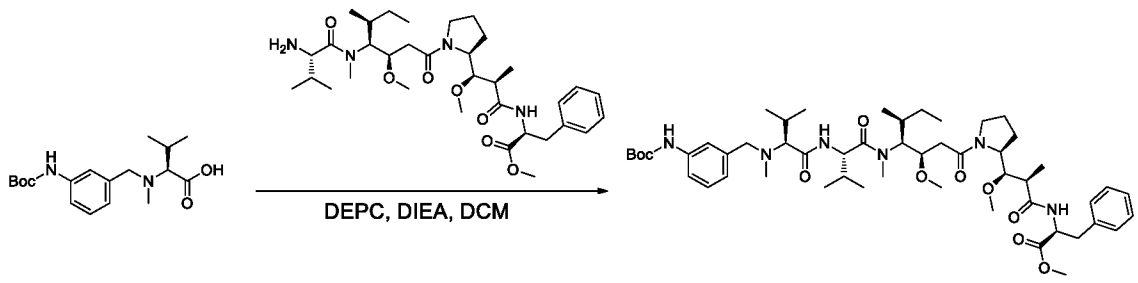
6.97 (m, 9H); 5.80 - 5.65 (m, 1H); 4.85 - 4.70 (m, 1H); 4.40 - 0.80 (m, 56H).

المركب رقم ١٥

حمض ميثيل (S) -٢- ((R٢، R٣)- ٣- ((S) -١- ((R٣، S٤، S٥)- ٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((٣- أمينو بنزيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبان أميدو) -٣- فينيل بروبانوات، تراي فلورو أسيتيك



المركب رقم ١٥ أ: ميثيل (S) -٢- ((R٢، R٣)- ٣- ((S) -١- ((R٣، S٤، S٥)- ٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((٣- (t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) بنزيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبان أميدو) -٣- فينيل بروبانوات



تم تخليق المركب رقم ١٥ أ بنفس الطريقة المتبعة في المركب ٣ من الأمين ٣ د (٢٠٠ مجم، ٠,٣٢ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ)، الحمض ١٤ د (٢١٢,٦ مجم، ٠,٦٣ ملي مول، ٢,٠٠ مكافئ)، DEPC (٠,١١٠٣ مل) وDIEA (٠,١٥٧ مل، ٣,٠٠ مكافئ) في DCM (٥ مل).

المنتج الخام تمت تنقية على عمود سليكا باستخدام خليط من EtOAc وPE (١: ١) للحصول على ٢٠٠ مجم (٦٧ %) من المركب ١٥ أ في صورة مادة صلبة صفراء.

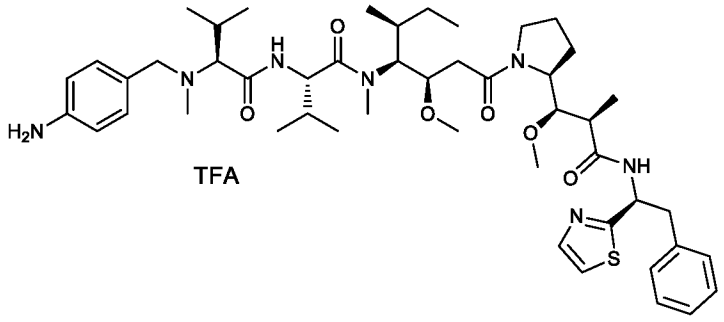
المركب رقم ١٥: تم تخليق المركب رقم ١٥ بنفس الطريقة المتبعة في المركب ٢ من المركب الوسيط ١٥ أ (٢٠٠ مجم، ٠,٢١ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ). تمت تنقية المنتج الخام باستخدام HPLC تحضيري (SHIMADZU Pre–HPLC–001، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ % TFA؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ %ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ % ACN خلال ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2545 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر). تم الحصول على المركب رقم ١٥ بحصيلة تبلغ ١٩ % (٣٨,٦ مجم) في صورة مادة صلبة بيضاء.

LC/MS/UV (عمود Ascentis Express C18، ٢,٧ ميكرو متر، ٤,٦ ×١٠٠ ملي متر؛ ٤٠ °م؛ ١,٥ مل/ دقيقة، ١٠ % إلى ٩٥ % MeOH في الماء (٠,٠٥ % TFA) في ٨ دقيقة) ؛ ESI (C47H74N6O8، الكتلة الدقيقة ٨٥٠,٥) m/z: ٨٥١,٥ (MH+) و: ٤٢٦,٤ (M.2H+/2، ١٠٠ %)، ٦,٦١ دقيقة (٩١,١ %، ٢١٠ نانو متر).

1H NMR (400MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 7.53 – 7.42 (m, 1H); 7.35 – 7.18 (m, 8H); 4.88 – 4.79 (m, 2H); 4.42 – 4.00 (m, 3H); 3.93 – 2.71 (m, 22H); 2.61 – 0.81 (m, 33H).

المركب رقم ٢٠

حمض (S) –٢– ((S) –٢– ((٤– أمينو بنزيل) (ميثيل) أمينو) –٣– ميثيل بيوتان أميدو) –N– ((R٣، S٤، S٥)– ٣– ميثوكسي –١– ((S) –٢– ((R١، R٢)– ١– ميثوكسي –٢– ميثيل – ٣ –أوكسو–٣– (((S) –٢–فينيل–١– (ثيازول –٢–يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين–١–يل) –٥– ميثيل –١– أوكسو هبتان –٤–يل) N–، ٣– داي ميثيل بيوتان أميد، تراي فلورو أسيتيك



تم تحضير المركب رقم ٢٠ بنفس الطريقة المتبعة في تحضير المركب رقم ١، من الأمين ١ ض ج والألدهيد المناظر.

كان مركب ٤- نيترو بنزالدهيد المستخدم في تحضير المركب ٢٠ عبارة عن مركب تجاري.

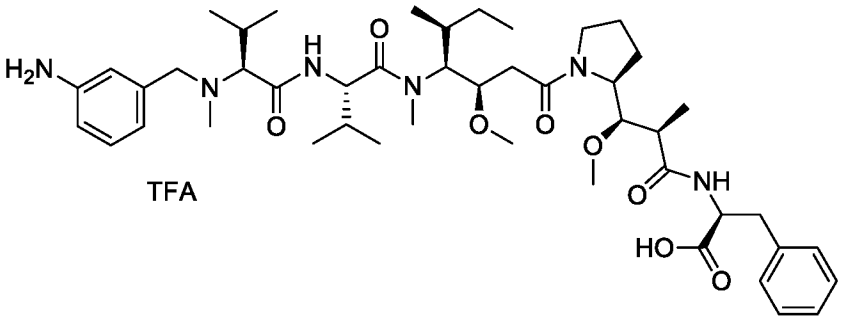
اكتمل تخليق المركب ٢٠ باختزال مجموعة النيترو. تم تنفيذ ذلك كالتالي: تمت إذابة (S٢)-N-[(R٣، S٤، S٥)- ١-[(S٢)- ٢- [(R١، R٢)- ٢- [[(S١، R٢)- ١- هيدروكسي -١-فينيل بروبان -٢-يل] كربامويل]- ١- ميثوكسي -٢- ميثيل إيثيل] بيروليدين-١-يل]- ٣-ميثوكسي -٥- ميثيل -١- أوكسو هبتان -٤-يل]N- ، ٣- داي ميثيل -٢-[(S٢)- ٣- ميثيل -٢- [ميثيل [(٤- نيتروفينيل) ميثيل] أمينو] بيوتان أميدو] بيوتان أميد (٤٠ مجم، ٠,٠٥ ملي مول، ١,٠ مكافئ) في ١٥ مل من الإيثانول. تمت إضافة كلوريد القصدير ثنائي الهيدرات (ii) (٣١٧ مجم، ١,٤ ملي مول، ٣٠ مكافئ) مع ترك المحلول تحت التقليب لمدة ٣ أيام عند درجة حرارة الوسط المحيط. تمت معادلة خليط التفاعل باستخدام ٥٠ مل من الماء، ثم استخلاصه ثلاث مرات باستخدام ٥٠ مل من EtOAc. تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام كبريتات صوديوم لا مائية، وترشيحها وتركيزها تحت ضغط منخفض للحصول على المركب ٢٠ في الحالة الخام (درجة النقاء: ٩٣,٢ %؛ الكمية: ٢١,٦ مجم).

تمت تنقية المركب باستخدام HPLC تحضيري (Pre-HPLC-001 SHIMADZU، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ %TFA ؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ %ACN خلال ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2489 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر)، للحصول على أملاح TFA المناظرة في صورة مواد صلبة بيضاء.

1H NMR: (400MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 7.85–7.80 (m, 1H); 7.6–7.5 (m, 1H); 7.4–7.15 (m, 5H); 7.1–7.05 (m, 2H); 6.73–6.70 (m, 2H); 5.8–5.55 (m, 1H); 5.0–4.7 (m, 2H); 4.25–4.05 (m, 1H); 4.0–0.8 (m, 54H). LC/MS/UV ESI: (C48H73N7O7S, exact mass 875.53) m/z 876 (MH+), 439 [75 %, (M.2H+)/2]; UV: RT = 4.83 min (96.8 %, 254 nm). 1H NMR (400MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 7.85–7.80 (m, 1H); 7.6–7.5 (m, 1H); 7.4–7.1 (m, 7H); 6.76–6.72 (m, 2H); 5.8–5.55 (m, 1H); 4.9–4.65 (m, 2H); 4.25–4.05 (m, 1H); 4.0–0.8 (m, 54H).

المركب رقم ٢٩

حمض (S) -٢- ((R٢، R٣)- ٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥)- ٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٣- أمينو بنزيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبان أميدو) -٣- فينيل بروبانويك، حمض تراي فلورو أسيتيك



تمت إذابة المركب رقم ١٥ (١٠٠ مجم، ٠,١٠ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) في خليط من الماء (٥ مل)، ACN (٥ مل) والبيريدين (٢,٥ مل). تم ترك خليط التفاعل تحت التقليب طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط ثم تم تركيزه تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (Pre-HPLC-001 SHIMADZU، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٥٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ ACN منظم باستخدام ٠,٠٥ % TFA؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % ACN خلال ١٠ دقيقة ثم ٤٠ % إلى ١٠٠ % ACN

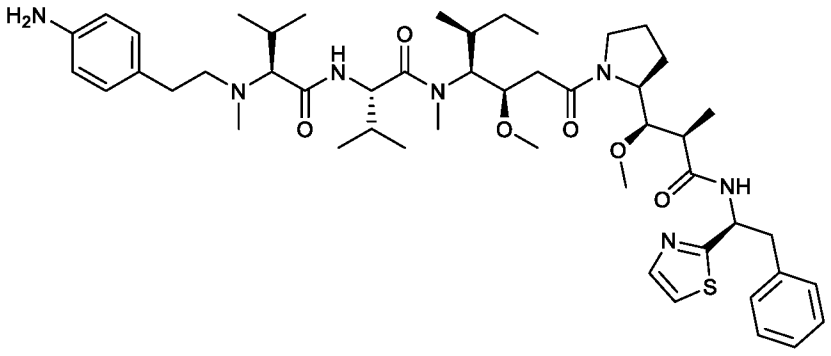
خلال ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2545 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر)، للحصول على ٢٠ مجم (٢٠ %) من المركب ٢٩ في صورة مادة صلبة بيضاء.

LC/MS/UV (عمود Eclipse Plus C8، ٣,٥ ميكرو متر، ٤,٦ ×١٥٠ ملي متر؛ ٤٠ °م؛ ١,٠ مل/ دقيقة، ٤٠ % إلى ٩٥ % MeOH في الماء (٠,٠٥ %TFA) خلال ١٨ دقيقة) ؛ ESI(C46H72N6O8، الكتلة الدقيقة ٨٣٦,٥٤) m/z: ٨٣٧,٥ (MH+) و: ٤١٩,٤ (M.2H+/2، ١٠٠ %)، ١٠,٦١ دقيقة (٩٢,٥ %، ٢١٠ نانو متر).

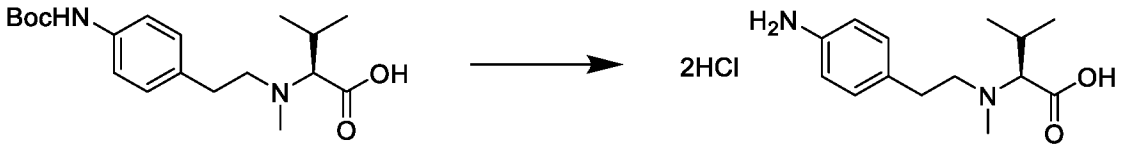
1H NMR: (400MHz, CD3OD, ppm): δ (Presence of rotamers) 7.38 – 7.15 (m, 6H); 7.00 – 6.99 (m, 3H); 4.85 – 4.68 (m, 2H); 4.37 – 3.38 (m, 11H); 3.31 – 2.70 (m, 8H); 2.60 – 0.82 (m, 35H).

المركب رقم ٦١

(S) -٢- ((S) -٢- ((٤- أمينو فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N- ((R٣، S٤، S٥) -٣- ميثوكسي -١- ((S) -٢- ((R١، R٢) -١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣- أوكسو -٣- (((S) -٢- فينيل -١- (ثيازول -٢-يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٥- ميثيل -١- أوكسو هبتان -٤-يل) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميد



المركب رقم ٦١ أ: N- (٤- أمينو فينيثيل) -N- ميثيل -L-فالين داي هيدروكلوريد



تمت إذابة المركب رقم ١١ د (٩٦٢ مجم، ٢,٧٥ ملي مول) في ١٠ مل من محلول متوفر تجاريا من HCl في بروبان -٢-أول (٥ - ٦ مولار)، وتقليبه عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٢ ساعة. أوضحت تحليلات TLC الاستهلاك الكامل للمادة البادئة. تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض، وتم سحن المادة الصلبة الصفراء الناتجة باستخدام Et2O (٢ × ١٠ مل). تم تجفيف المنتج في الفراغ للحصول على المركب ٦١ أ في صورة مادة صلبة صفراء (٣٢٢ مجم، ٤٧ %).

المركب رقم ٦١: تمت إذابة الحمض الكربوكسيلي ٦١ أ (٧٣ مجم، ٠,٢٣ ملي مول، ١ مكافئ) وأمين Y1 (١٥٠ مجم، ٠,٢٣ ملي مول، ١ مكافئ) في DMF جاف (٢ مل). تمت إضافة DIEA (١٥٨ ميكرو لتر، ٠,٩٠ ملي مول، ٤ مكافئ) وDECP (يسمى أيضا DEPC) (٥١ ميكرو لتر، ٠,٣٤ ملي مول، ١,٥ مكافئ) وتم تقليب خليط التفاعل لمدة ٤ ساعات عند درجة حرارة الغرفة. أوضحت التحليلات بواسطة LC-MS اكتمال استهلاك المادة البادئة. تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض، وتنقية المتبقي بكروماتوجراف الوميض على هلام السليكا (DCM/MeOH) للحصول على المركب ٦١ في صورة مادة صلبة ذات لون أصفر خفيف (٨٣ مجم، ٤٠ %).

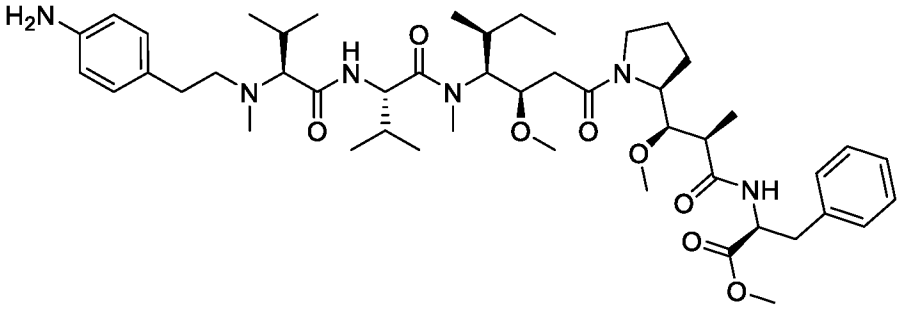
1H NMR: (500MHz, DMSO-d6, ppm): δ (Presence of rotamers), 8.86 (d, 0.5H, NHCO); 8.65 (d, 0.5H, NHCO), 8.11-8.05 (m, 1H, NHCO), 7.80 (d, 0.5H, thiazole), 7.78 (d, 0.5H, thiazole), 7.65 (d, 0.5H, thiazole), 7.63 (d, 0.5H, thiazole), 7.32 – 7.12 (m, 5H), 6.83 (d, J=8.3 Hz, 2H), 6.45 (d, J=8.3 Hz, 2H), 5.56 – 5.49 (m, 0.5 H), 5.42 – 5.35 (m, 0.5H), 4.78 (s, 2H, NH2), 4.74 – 4.46 (m, 2H), 4.01 – 0.66 (m, 57H).

HPLC (Xbridge Shield C18، ٣,٥ ميكرو متر، ٤,٦ ×٥٠ ملي متر؛ ٣,٥ مل/ دقيقة، ٤٠ °م، ٠ إلى ٩٥ % MeCN في الماء (٠,١ % TFA) في ٢,٢٥ دقيقة ثم ٩٥ % MeCN لمدة ٠,٥ دقيقة، Tr= ١,٣١ دقيقة (٩٦,٥ %، ٢٢٠ نانو متر).

m/z (Q-TOF ESI+) ٨٩٠,٥٥٥٨ (٢ %، +MH، C49H76N7O6S يتطلب ٨٩٠,٥٥٧٢) ، ٤٤٥,٧٨٣٤ (١٠٠ %، +2(MH2)، C49H77N7O6S يتطلب ٤٤٥,٧٨٢٣).

المركب رقم ٦٢

٥ ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤-أمينو فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣-ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانينات



١٠ تم تحضير المركب رقم ٦٢ بنفس الطريقة المتبعة في تحضير المركب رقم ٦١، باستخدام الحمض الكربوكسيلي ٦١ أ (٦٩ مجم، ٠,٢١ ملي مول، ١ مكافئ)، أمين ٣ د (١٣٥ مجم، ٠,٢١ ملي مول، ١ مكافئ)، DIEA (٧٥ ميكرو لتر، ٠,٤٣ ملي مول، ٢ مكافئ) وDECP (٤٩ ميكرو لتر، ٠,٣٢ ملي مول، ١,٥ مكافئ). تمت تنقية المنتج الخام باستخدام كروماتوجرافيا الوميض على هلام السليكا (DCM/MeOH) للحصول على المركب ٦٢ في صورة مادة صلبة ذات لون ١٥ يميل إلى الأصفر (٨٢ مجم، ٤٥ %).

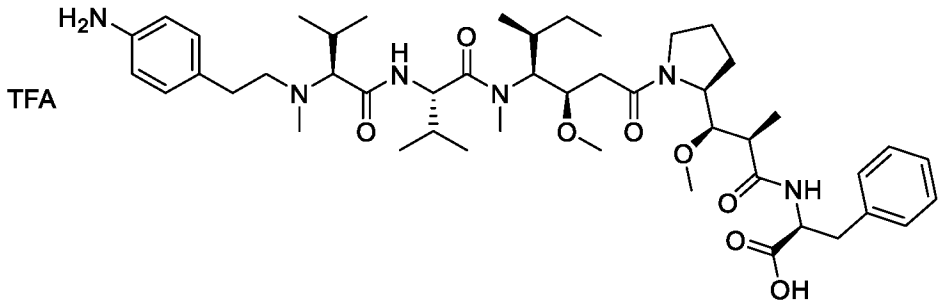
1H NMR: (500MHz, DMSO-d6, ppm): δ (Presence of rotamers), 8.50 (d, J=8.3, 0.5H, NHCO); 8.27 (d, J=8.0, 0.5H, NHCO), 8.15-8.04 (m, 1H, NHCO), 7.27 – 7.13 (m, 5H), 6.86 – 6.79 (m, 2H), 6.48 – 6.42 (m, 2H), 4.78 (s, 2H, NH2), 4.74 – 4.44 (m, 3H), 4.01 – 3.72 (m, 1.5H), 3.66 (s, 1.5H, CO2Me), 3.63 (s, 1.5H, CO2Me), 3.57 – 0.65 (m, 55.5H). ٢٠

HPLC (Xbridge Shield C18، ٣,٥ ميكرو متر، ٤,٦ ×٥٠ ملي متر؛ ٣,٥ مل/ دقيقة، ٤٠ °م، إلى ٩٥ % MeCN في الماء (٠,١ % TFA) في ٢,٢٥ دقيقة ثم ٩٥ % MeCN لمدة ٠,٥ دقيقة، Tr= ١,٢٩ دقيقة (٩٥,٣ %، ٢٢٠ نانو متر).

m/z (Q-TOF ESI+) ٨٦٥,٥٨٠٠ (٢ %، +MH، C48H77N6O8 يتطلب ٨٦٥,٥٧٩٧) ، ٤٣٣,٢٩٣٧ (١٠٠ %، +2 (MH2) ، C48H78N6O8 يتطلب ٤٣٣,٢٩٣٥).

المركب رقم ٦٣

((R٢، R٣) -٣- (S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- (S)) -٢- ((S) -٢- ((٤- أمينو فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانين ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



تمت إذابة المركب رقم ٦٢ (٢٣ مجم، ٠,٠٣ ملي مول) في خليط من الماء (١ مل) والأسيتو نيتريل (١ مل). تمت إضافة البيريدين (٠,٧٥ مل) وتقليب الخليط عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ ساعات. أوضحت تحليلات TLC اكتمال استهلاك المادة البادئة. تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض، وتنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (SunFire Prep column C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٥٠ ملي متر؛ الطور المتحرك: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٢٠ % إلى ٤٠ % MeCN في ١٠ دقيقة، ثم من ٤٠ % إلى ١٠٠ % MeCN في ٢ دقيقة؛ كاشف أشعة فوق بنفسجية Waters 2545 عند ٢٥٤ نانو متر و: ٢٢٠ نانو متر). تم الحصول على المركب رقم ٦٣ في صورة مادة صلبة بيضاء (١٤ مجم، ٦٦ %).

1H NMR: (500MHz, DMSO-d6, ppm): δ (Presence of rotamers), 12.7 (s(br), 1H, CO2H), 9.58 (m(br), 1H); 9.04 – 8.89 (m, 1H), 8.41 (d, 0.6H, NHCO), 8.15 (d, 0.4H, NHCO), 7.27 – 7.13 (m, 5H), 7.13 – 6.99 (m(br), 2H), 6.90 – 6.64 (s(br), 2H), 4.77 – 3.40 (m, 10H), 3.34 – 2.75 (m, 20H), 2.34 – 1.94 (m, 4H), 1.90 – 0.7 (m, 25H).

HPLC (Xbridge Shield C18، ٣,٥ ميكرو متر، ٤,٦ ×٥٠ ملي متر؛ ٣,٥ مل/ دقيقة، ٤٠ °م، ٠ إلى ٩٥ % MeCN في الماء (٠,١ % TFA) في ٢,٢٥ دقيقة ثم ٩٥ % MeCN لمدة ٠,٥ دقيقة، Tr= ١,٢٤ دقيقة (١٠٠ %، ٢٢٠ نانو متر).

m/z (Q-TOF ESI+) ٨٥١,٥٦٤١ (٦ %، +MH، C47H75N6O8 يتطلب ٨٥١,٥٦٤١) ، ٤٢٦,٢٨٥٤ (١٠٠ %، +2(MH2)، C47H76N6O8 يتطلب ٤٢٦,٢٨٥٧).

مثال رقم ١٥: النشاط المضاد للتكاثر الخلوي للعقاقير

الطريقة:

مزرعة الخلية. تم استزراع خلايا A549 (Non Small Cell Lung Cancer - ATCC CCL-185) و MDA-MB-231 (ورم غدي في الثدي -ATCC HTB-26) في Minimum Essential Medium Eagle(MEM) مع ٥ % مصل جنين العجل (FCS) و Dulbecco's modified Eagle Medium(DMEM) مع ١٠ % FCS بالترتيب. تم الحفاظ على خلايا MCF7 (سرطان القنوات الثديية ATCC HTB-22) و SN-12C (الورم السرطاني في الكلية- ATCC) في وسط RPMI1640 (بدون أحمر الفينول لخلايا MCF7) يحتوي على ١٠ % FCS. تم تكميل كل الأوساط بالفنجيزون (١,٢٥ ميكرو جرام/ مل) وبنسلين-ستربتوميسين (١٠٠ وحدة/ ١٠٠ ميكرو جرام/ مل). تم استزراع الخلايا في ظروف قياسية في حضَّانة عند ٣٧ °م، ٥ % CO2 و: ٩٥ % رطوبة.

النشاط المضاد للتكاثر الخلوي في ٤ من سلالات خلية الورم. تمت دراسة العقاقير المختارة للوقوف على النشاط المضاد للتكاثر الخلوي باستخدام اختبار تكاثر ATPlite(Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France) على لوحة شاملة لـ ٤ سلالات خلية. تم زرع الخلايا في

أطباق ذات ٩٦ عينا (١٠ ٣ خلية/ عين لـ A549، ٢,١٠٣ لـ MCF7، MDA-MB-231 وSN12C) في اليوم ٠ بتركيز يضمن أن الخلايا تظل في طور نمو لوغاريتمي خلال ٧٢ ساعة من العلاج بالعقار. بعد الحضانة لمدة ٢٤ ساعة، تمت معالجة كل الخلايا بتخفيفات متتالية من المركبات المختبرة (١١ ميكرو لتر من محلول ١٠× في ١ % DMSO- ٦ عين/ حالة). لتجنب التصاق المركبات على الأطراف، تم تغيير الأطراف بين كل تخفيفين. تم عندئذ وضع الخلايا في ٣٧ °م، حضانة ٥ % CO2. في اليوم ٤، تم تقييم قدرة الخلايا على البقاء بتقييم جرعة ATP المنطلقة بواسطة الخلايا القادرة على البقاء. تم تحليل عدد الخلايا القادرة على البقاء بالمقارنة مع عدد الخلايا التي تمت معالجتها بالمذيب. تم تحديد قيم EC50 بتحليل مواءمة المنحنى (نموذج التراجع غير الخطي مع استجابة على شكل حرف S للجرعة، معامل ميل متغير)، تم تنفيذها باستخدام خوارزمية يتم تقديمها بواسطة برمجيات GraphPad (GraphPad Software Inc., CA, USA).

النتائج:

العقاقير المختلفة:

تم اختبار عقاقير مختلفة لتحديد النشاط المضاد للتكاثر الخلوي لها على سلالة خلية الـ MDA-MB-231 باتباع الطريقة السابق ذكرها. أعطت الأنشطة المقاسة قيما لـ EC50 أصغر من ٠,١ ميكرو مولار.

الأمثلة القليلة التالية المختارة من أمثلة العقاقير السابقة توضح خواصها الجيدة المضادة للتكاثر الخلوي:

مثال رقم ١٢: EC50 = ٥,٨٠×١٠-١٠ مولار؛ مثال رقم ١٣: EC50 = ٧,٩٥×١٠-٨ مولار؛ مثال رقم ١٥: EC50 = ١,٧٠×١٠-١٠ مولار؛ مثال رقم ٢٧: EC50 = ١,٢٠×١٠-١٠ مولار.

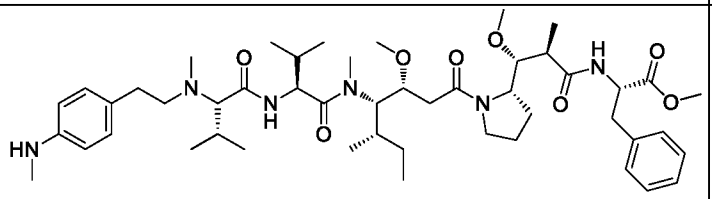
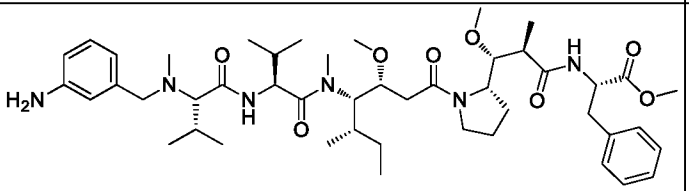
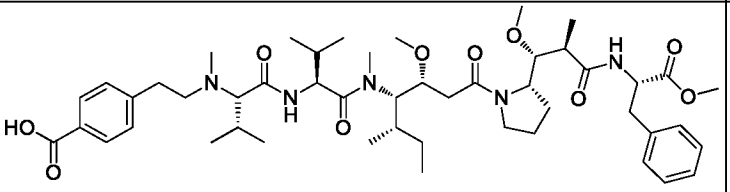
سلالات خلية مختلفة:

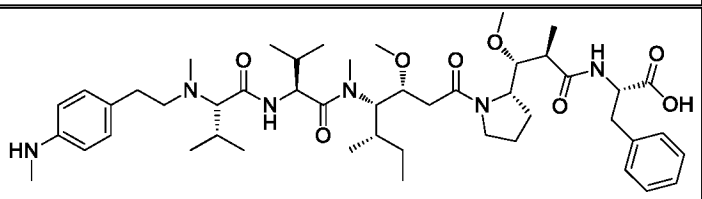
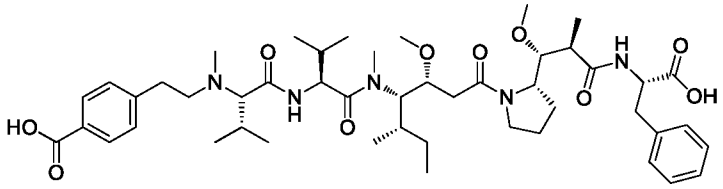
تم اختبار المركب رقم ١٥ على سلالات خلية مختلفة (A549، MDA-MB-231، MCF-7، SN12C) باتباع الطريقة السابق ذكرها. أعطت الأنشطة المقاسة قيما لـ EC50 أصغر من ٠,١ ميكرو مولار على كل سلالات الخلية المختبرة.

(M)EC50	A549	MDA-MB-231	MCF-7	SN12C
المركب رقم ١٥	١٠-١٠×١,٤٥	١٠-١٠×١,٧٠	١٠-١٠×٧,١٥	١٠-١٠×٢,١٨

أمثلة مقارنة:

٥ تمت دراسة الاستبدال على حلقة الفينيل (أمينو ٥ كربوكسيل) في الأمثلة المقارنة التالية توضح النشاط المحسن المضاد للتكاثر الخلوي للعقاقير وفقا للاختراع التي تشتمل على مجموعات استبدال أمينو.

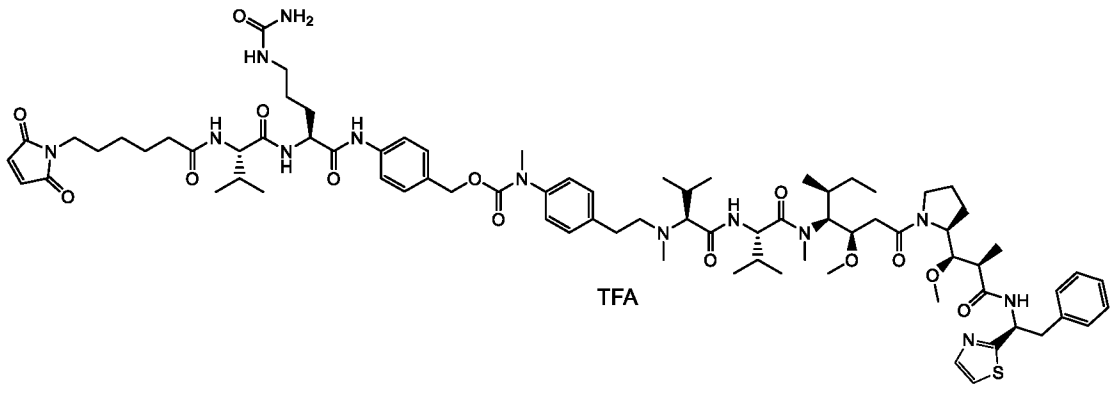
رقم	التركيب	(M)EC50	
		A549	A549
١٢		١٠-١٠×١,٤٨ ١٠	١٠-١٠×٥,٨٠ ١٠
١٥		١٠-١٠×١,٤٥ ١٠	١٠-١٠×١,٧٠ ١٠
المثال المقارن رقم ١		١٠-١٠×٣,٧٦ ٩	١٠-١٠×٢,٢٩ ٩

رقم	التركيب	(M)EC50	
		A549	A549
١٣		-١٠×٢,٧١ ٨	-١٠×٧,٩٥ ٨
المثال المقارن رقم ٢		-١٠×٤,٠٣ ٧	-١٠×٩,٧٥ ٧

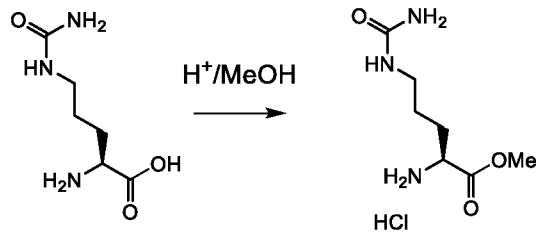
مثال رقم ١٦: تخليق جزء العقار -الرابط

المركب رقم هـ-١١

٤- ((S) -٢- ((S) -٢- (٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسان أميدو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل (٤- ((R٣، S٤، S٧، S١٠) -٤- ((s(S)- -بيوتيل) -٧، ١٠- داي أيزو بروبيل -٣- (٢- ((S) -٢- ((R١، R٢) -١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣- أوكسو -٣- (((S) -٢- فينيل -١- (ثيازول -٢-يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٢- أوكسو إيثيل) -٥، ١١- داي ميثيل -٦، ٩-دايوكسو-٢-أوكسا -٥، ٨، ١١-تراي آزا تراي ديكان -١٣-يل) فينيل) (ميثيل) كربامات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات

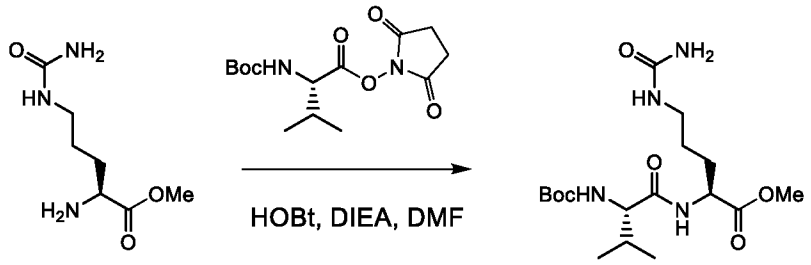


المركب رقم هـ-١١ -١: ميثيل (S) -٢- أمينو -٥- يوريدو بنتانوات هيدروكلوريد



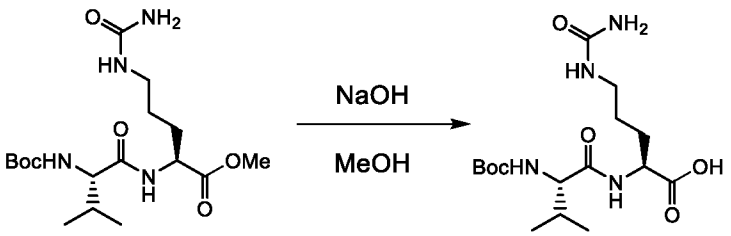
تمت إضافة كلوريد الأسيتيل (١٠ مل) قطرة- قطرة إلى MeOH (١٢٠ مل) بتركيز ٠ °م مع التقليب. بعد ٢٠ دقيقة، تمت إضافة L- سترولين (١٠ جم، ٥٧ ملي مول، ١,٠٠ مكافئ) وتم تسخين الخليط مع الإرجاع طول الليل. تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض للحصول على ١٥ جم (١١٦ %) من المركب هـ-١١ -١ في صورة مادة صلبة بيضاء. تم استخدام المنتج في الخطوة التالية بدون المزيد من التجفيف.

المركب رقم هـ-١١ -٢: ميثيل (S) -٢- ((S) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتانوات



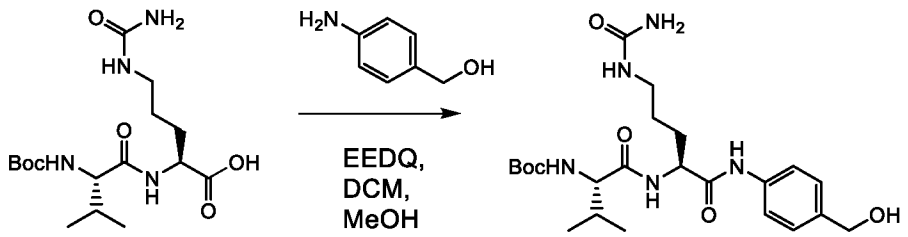
تمت إذابة المركب رقم هـ-١١ -١ (١٣ جم، ٥٧,٦ ملي مول، ١,١ مكافئ) في DMF (١٤٠ مل) بتركيز ٠ °م في جو خامل. تمت إضافة DIEA (٣٠ مل، ١٧٣ ملي مول، ٣,٠ مكافئ)، هيدروكسي بنزو ترايازول (HOBt- ١٠,٥٩ جم، ٦٩,١ ملي مول، ١,٢ مكافئ) وL-Boc- فالين هيدروكسي سكسينيميد إستر (Boc-Val-OSu- ١٨,١ جم، ٥٧,٦ ملي مول، ١,٠ مكافئ). تم تقليب خليط التفاعل طول الليل عند درجة حرارة الوسط المحيط، ثم تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض. تمت إذابة في المتبقي في الماء (١٠٠ مل) واستخلاصه مرتين باستخدام DCM (١٥٠ مل). تم دمج الأطوار العضوية، وتجفيفها باستخدام Na2SO4 وتركيزها تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي على هلام السليكا (DCM/MeOH) للحصول على ١٨,٨ جم (٨٤ %) من المركب هـ-١١ -٢ في صورة مادة صلبة بيضاء.

المركب رقم هـ-١١ -٣: حمض (S) -٢- ((S) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتانويك



تمت إذابة المركب رقم هـ-١١ -٢ (١٨,٨ جم، ٤٨,٤ ملي مول، ١ مكافئ) في MeOH (٢٠٠ مل) بتركيز ٠ °م. تمت إضافة محلول من NaOH ١ مولار (٧٢ مل، ٧٢ ملي مول، ١,٥ مكافئ) وتقليب الخليط لمدة ٢ ساعة عند درجة حرارة الغرفة. تمت إزالة MeOH تحت ضغط منخفض وتحميض المحلول المائي المتبقي بـ HCl١ مولار. تم تبخير الطور المائي حتى الجفاف وتنقية المتبقي على هلام السليكا (DCM/MeOH) للحصول على ١٨ جم (٩٩ %) من المركب هـ-١١ -٣ في صورة مادة صلبة بيضاء.

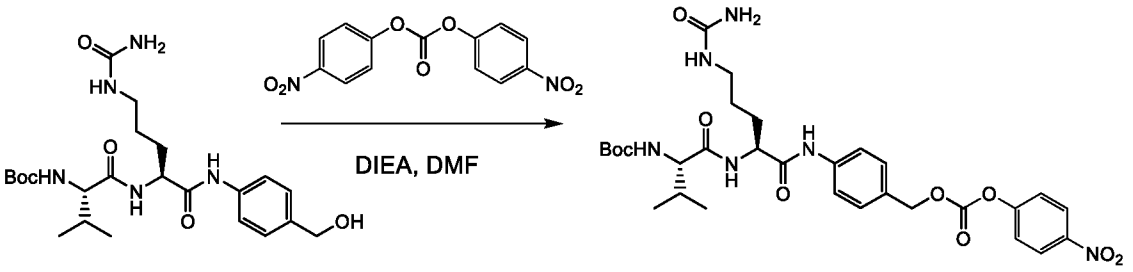
المركب رقم هـ-١١ -٤: t-بيوتيل ((S) -١- (((S) -١- ((٤- (هيدروكسي ميثيل) فينيل) أمينو) -١- أوكسو -٥- يوريدو بنتان -٢-يل) أمينو) -٣- ميثيل -١- أوكسو بيوتان -٢-يل) كربامات



تمت إذابة المركب رقم هـ-١١ -٣ (٥ جم، ١٣,٤ ملي مول، ١ مكافئ) في خليط من DCM الجاف (٦٥ مل) MeOH الجاف (٣٥ مل). تمت إضافة (٤- أمينو فينيل) ميثانول (١,٨١ جم، ١٤,٧ ملي مول، ١,١ مكافئ) وN-إيثوكسي كربونيل -٢-إيثوكسي -١، ٢-داي هيدرو كينولين (EEDQ- ٦,٦٠ جم، ٢٦,٧ ملي مول، ٢ مكافئ) وتقليب الخليط في الظلام طول الليل. تم تبخير المذيبات تحت ضغط منخفض، وتنقية المتبقي على هلام السليكا (DCM/MeOH)

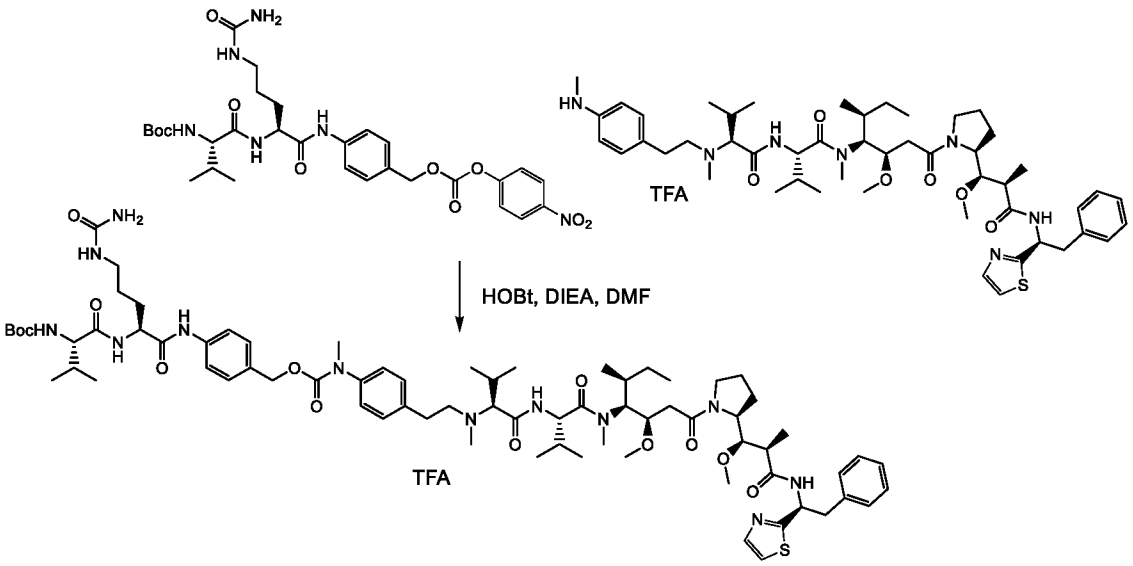
للحصول على ٥,٢ جم (٧٣ %) من المركب هـ-١١ -٤ في صورة مادة صلبة ذات لون أبيض ضارب إلى الصفرة.

المركب رقم هـ-١١ -٥: t-بيوتيل ((S) -٣- ميثيل -١- (((S)) -١- ((٤- ((((٤- نيترو فينوكسي) كربونيل) أوكسي) ميثيل) فينيل) أمينو) -١- أوكسو -٥- يوريدو بنتان -٢-يل) أمينو) -١- أوكسو بيوتان -٢-يل) كربامات



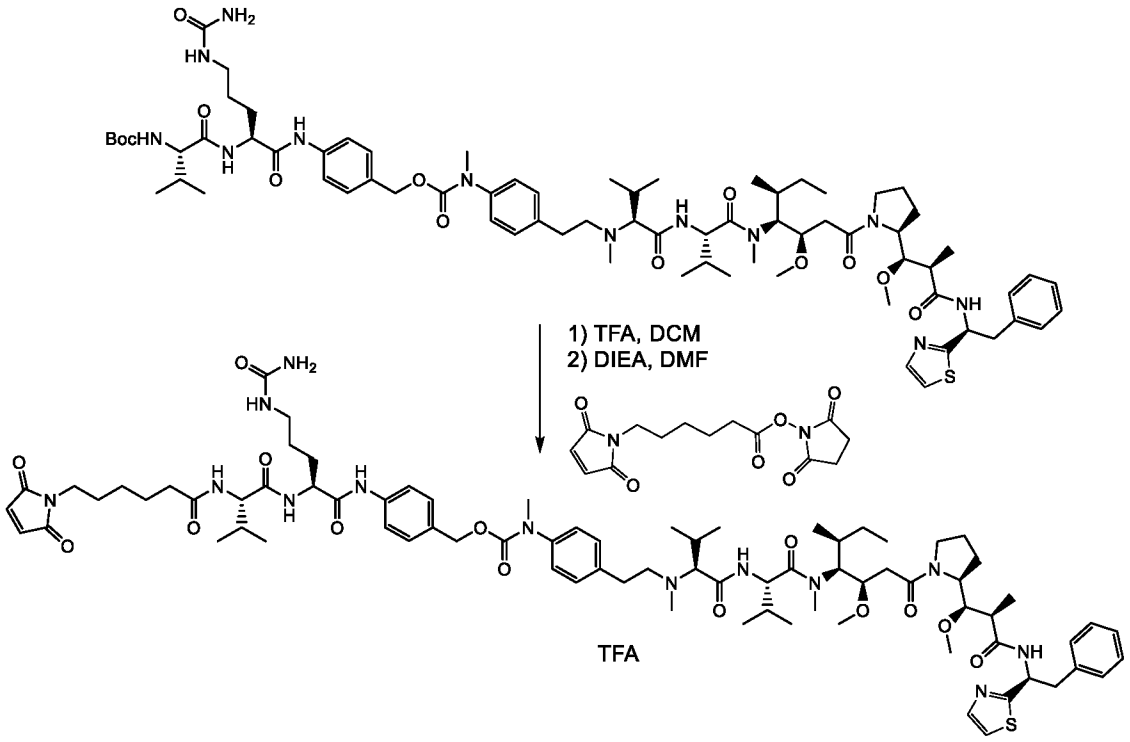
تمت إذابة المركب رقم هـ-١١ -٤ (١,١ جم، ٢,٢٩ ملي مول، ١ مكافئ) في DMF جاف (٥ مل) عند درجة حرارة الوسط المحيط في جو خامل. تمت إضافة بس (٤- نيتروفينيل) كربونات (١,٤٠ جم، ٤,٥٩ ملي مول، ٢ مكافئ)، ويلي ذلك DIEA (٦٠٠ ميكرو لتر، ٣,٤٤ ملي مول، ١,٥ مكافئ)، وتم تقليب المحلول الأصفر الناتج طول الليل. تم تبخير DMF تحت ضغط منخفض، وتنقية المتبقي على هلام السليكا (DCM/MeOH) للحصول على ١,٢٧ جم (٨٤ %) من المركب هـ-١١ -٥ في صورة مادة صلبة ذات لون أبيض ضارب إلى الصفرة.

المركب رقم هـ-١١ -٦: ٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل (٤- ((R٣، S٤، S٧، S١٠) -٤- ((S) -s- بيوتيل) -٧، ١٠- داي أيزو بروبيل -٣- (٢- ((S) -٢- ((R١، R٢) -١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣- أوكسو -٣- (((S) -٢- فينيل -١- (ثيازول -٢-يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٢- أوكسو إيثيل) -٥، ١١- داي ميثيل -٦، ٩-دايوكسو-٢-أوكسا -٥، ٨، ١١-تراي آزا تراي ديكان -١٣-يل) فينيل) (ميثيل) كربامات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



تمت إذابة كربونات هـ-١١ -٥ (١١٤ مجم، ٠,١٧٧ ملي مول، ١,٢ مكافئ) وأنيلين ١١ و(١٥٠ مجم، ٠,١٤٧ ملي مول، ١ مكافئ) في DMF جاف (٤ مل). تمت إضافة HOBt (٣٨ مجم، ٠,٢٩٥ ملي مول، ٢ مكافئ) وDIEA (٥٤ ميكرو لتر، ٠,٢٩٥ ملي مول، ٢ مكافئ) وتقليب الخليط خلال عطلة نهاية الأسبوع عند درجة حرارة الغرفة. تم تبخير DMF تحت ضغط منخفض وتنقية المتبقي بواسطة كروماتوجرافيا الوميض على السليكا، مع الشطف بـ DCM. تمت إعادة تنقية المنتج باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ TFA% ؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ MeCN% خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب هـ-١١ -٦ في صورة مادة صلبة بيضاء (٨٩ مجم، ٣٩ %).

المركب رقم هـ-١١:

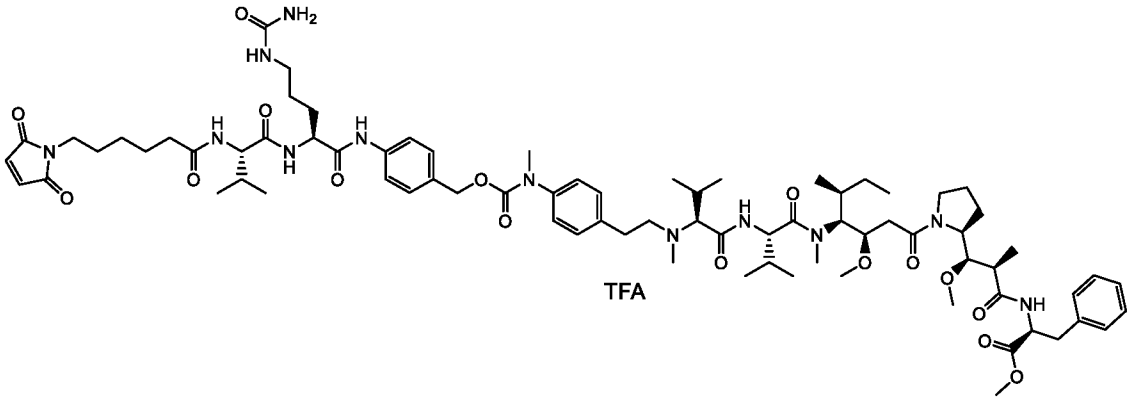


تمت إذابة المركب رقم هـ-١١ -٦ (٢١ مجم، ٠,٠١٤ ملي مول، ١,٠ مكافئ) في DCM (٠,٢٥ مل) وتمت إضافة TFA (٤٠ ميكرو لتر). تم تقليب المحلول لمدة ٢ ساعة عند درجة حرارة الغرفة، وبعد ذلك، أوضح تحليل LC-MS الاستهلاك الكامل للمادة البادئة. تم تبريد الخليط (حمام من نيتروجين سائل) مع الإضافة في نفس الوقت لـ DMF (٠,٥ مل) ثم DIEA (١٠٠ ميكرو لتر) لمعادلة الـ TFA. تمت عندئذ إزالة حمام التبريد وتمت إضافة ٢، ٥-داي أوكسو بيرولبيدين-١-يل ٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسانوات (٤ مجم، ٠,٠١٢ ملي مول، ١ مكافئ). تم تقليب الخليط عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٤٨ ساعة وتمت تنقية المنتج باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب هـ-١١ في صورة مادة صلبة بيضاء (١١ مجم، ٥٤ %).

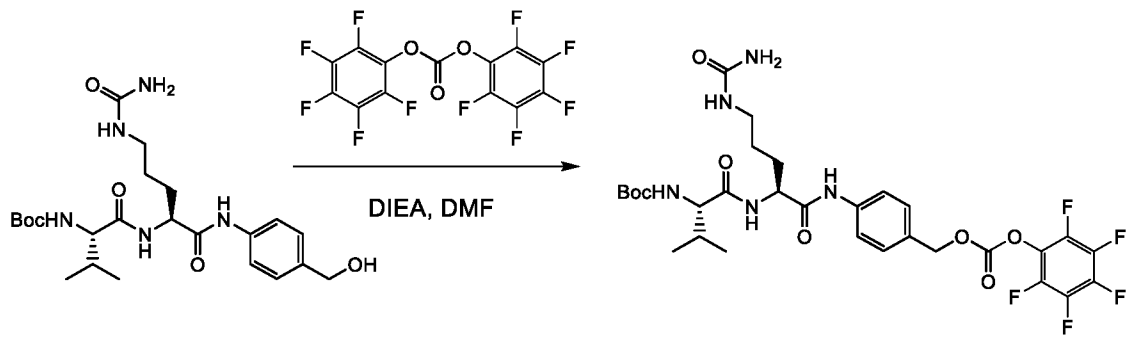
C79H115N13NaO14S،MNa+ ،% ٢) ١٥٢٤,٨٢٨٢ (Q-TOF MS ESI+) m/z
يتطلب ١٥٢٤,٨٢٩٩) ، ٧٥١,٩٢٨٣ (١٠٠ %، +(MH2)2 ، C79H117N13O14S
يتطلب ٧٥١,٩٢٧٦).

المركب رقم هـ -١٢

ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤-((((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- (٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسان أميدو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل) أوكسي) كربونيل) (ميثيل) أمينو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



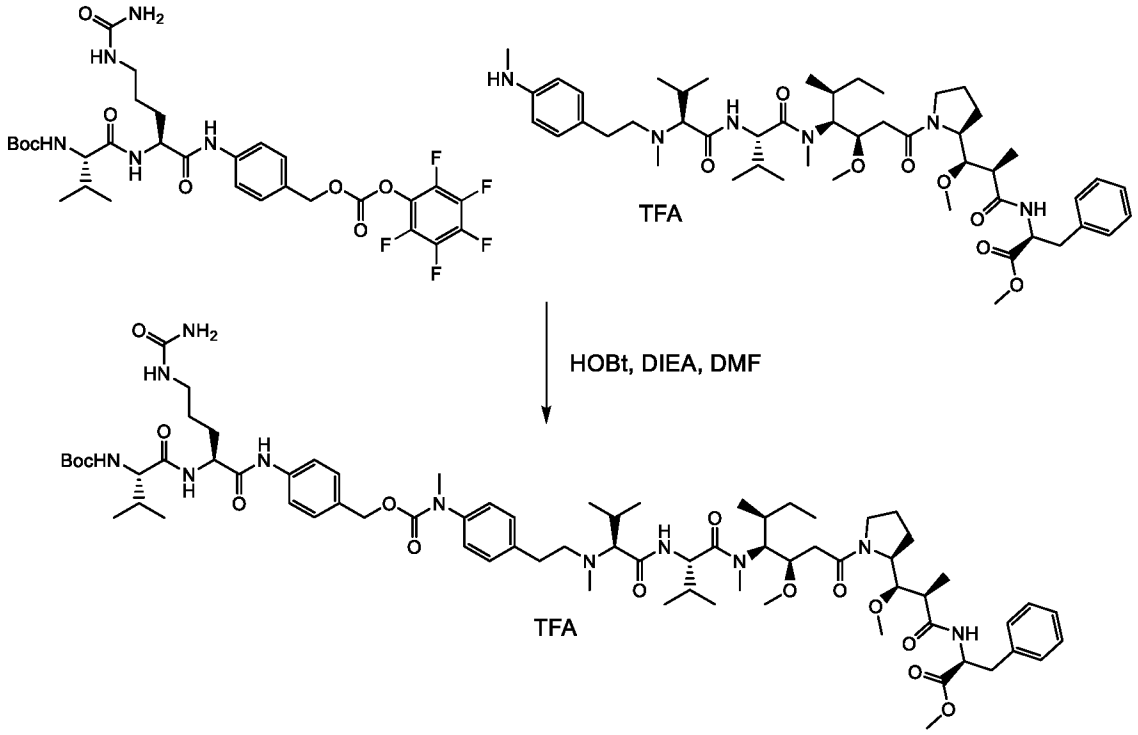
المركب رقم هـ -١٢ -١: t-بيوتيل ((S) -٣- ميثيل -١- أوكسو -١- (((S)) -١- أوكسو -١- ((٤- ((((بير فلورو فينوكسي) كربونيل) أوكسي) ميثيل) فينيل) أمينو) -٥- يوريدو بنتان -٢-يل) أمينو) بيوتان -٢-يل) كربامات



تمت إذابة المركب رقم هـ-١١ -٤ (٦٧٠ مجم، ١,٢٦ ملي مول، ١ مكافئ) في DMF جاف (٦ مل) بتركيز ٠ °م في جو خامل. تمت إضافة بس (فوق فلوروفينيل) كربونات (٩٩١ مجم، ٢,٥١ ملي مول، ٢ مكافئ)، ويلي ذلك DIEA (٣٢٩ ميكرو لتر، ١,٨٩ ملي مول، ١,٥ مكافئ)، وتم

تقليب المحلول الناتج عديم اللون لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة. تم تبخير DMF تحت ضغط منخفض، وتنقية المتبقي على هلام السليكا (DCM/MeOH) للحصول على ٨٣٦ مجم (٩٦ %) من المركب هـ -١٢ -١ في صورة مادة صلبة ذات لون أبيض ضارب إلى الصفرة.

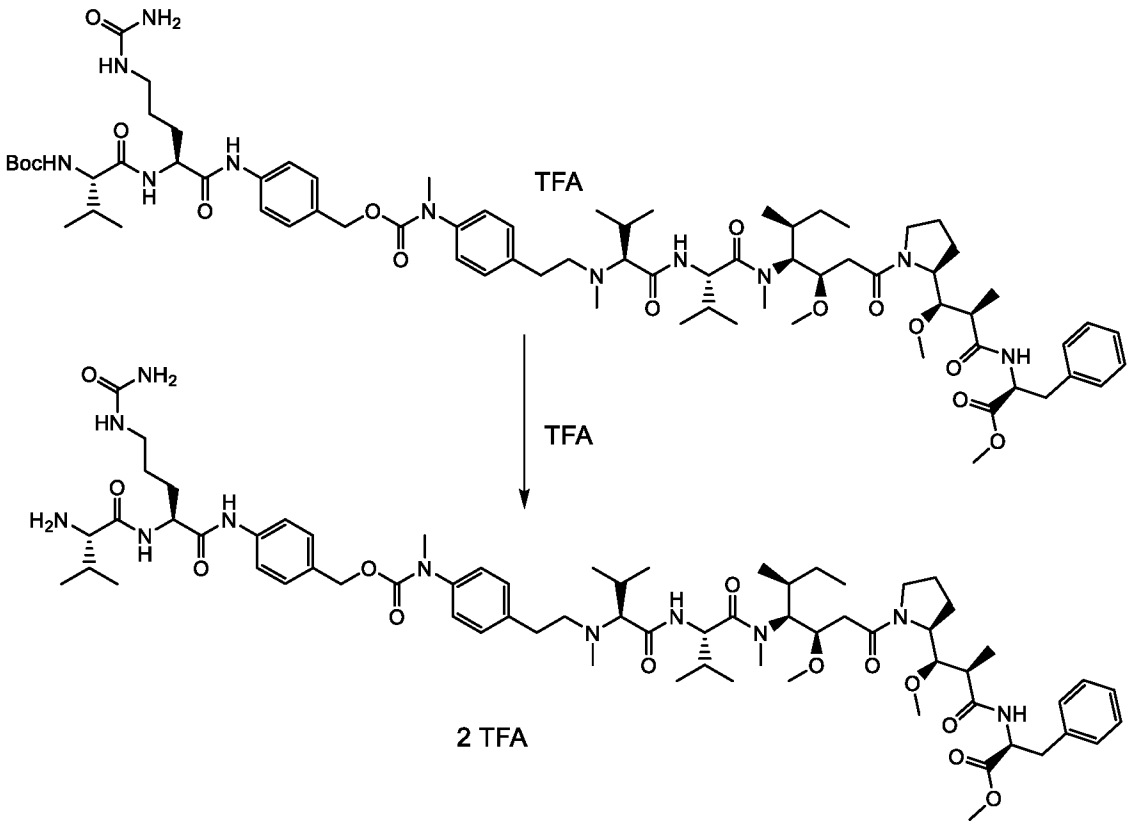
المركب رقم هـ -١٢ -٢: ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((٤- ((((٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل) أوكسي) كربونيل) (ميثيل) أمينو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



تمت إذابة أنيلين ١٢ (١٦٥ مجم، ٠,١٨٩ ملي مول، ١,٠ مكافئ) في DMF (٥ مل) بتركيز ٠ °م في جو خامل. تمت إضافة كربونات هـ -١٢ -١ (١٩٤ مجم، ٠,٢٨٢ ملي مول، ١,٥ مكافئ)، HOBt (٥١ مجم، ٠,٣٧٥ ملي مول، ٢ مكافئ) وDIEA (٦٦ ميكرو لتر، ٠,٣٧٥ ملي مول، ٢ مكافئ) وتقليب الخليط عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٨ ساعات. تم تبخير المذيب

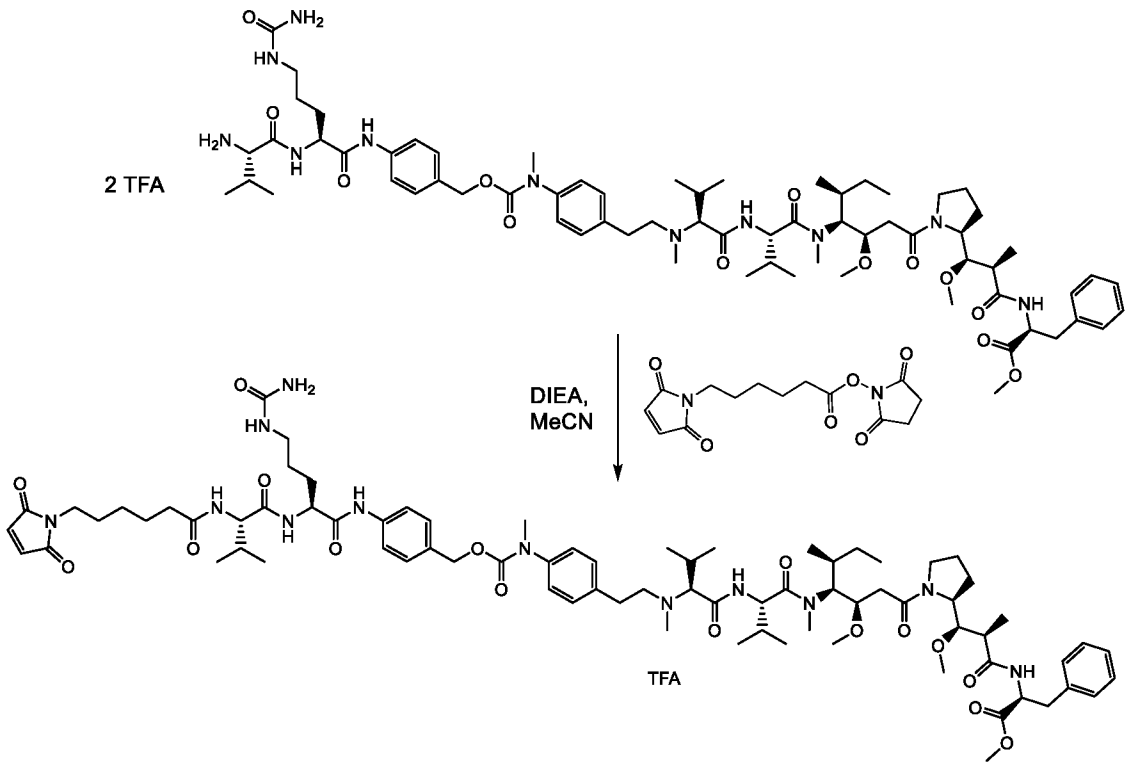
تحت ضغط منخفض وتنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب هـ ١٢-٧ في صورة مادة صلبة بيضاء (٢٤٧ مجم، ٧٧ %).

المركب رقم هـ ١٢-٣: ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤- ((((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- أمينو -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل) أوكسي) كربونيل) (ميثيل) أمينو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات بس (٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات)



تمت إذابة المركب رقم هـ -١٢ -٢ (٥,٦ مجم، ٤,٠٤ ميكرو مول، ١,٠ مكافئ) TFA (١٠٠ ميكرو لتر). بعد ٥ دقيقة، الماء تمت إضافة ٢ مل من وتجفيف الخليط بالتجميد طول الليل للحصول على المركب هـ -١٢ -٣ في صورة مادة صلبة ذات لون أبيض ضارب إلى الصفرة (٥,٦ مجم، ٩٨ %).

المركب رقم هـ -١٢:



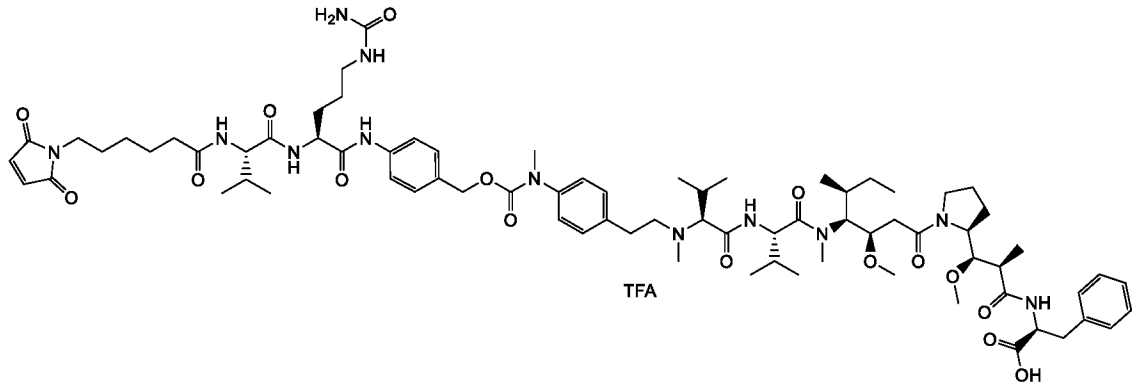
تمت إذابة المركب رقم هـ -١٢ -٣ (٥,٦ مجم، ٤ ميكرو مول، ١,٠ مكافئ) في الأسيتو نيتريل (٠,٥ مل)، وتمت إضافة DIEA (٥ ميكرو لتر، ٧ مكافئ)، ويلي ذلك ٢، ٥-داي أوكسو بيروليدين-١-يل ٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسانوات (٢,٥ مجم، ٨ ميكرو مول، ٢ مكافئ). تم تقليب الخليط لمدة ٦ ساعات عند درجة حرارة الغرفة. بعد التحكم في التفاعل بواسطة LC-MS، تمت إضافة ٢٠٠ ميكرو لتر من الماء، وتنقية المحلول الناتج باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية

Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب هـ -١٢ في صورة مادة صلبة بيضاء (٤,٦ مجم، ٧٠ %).

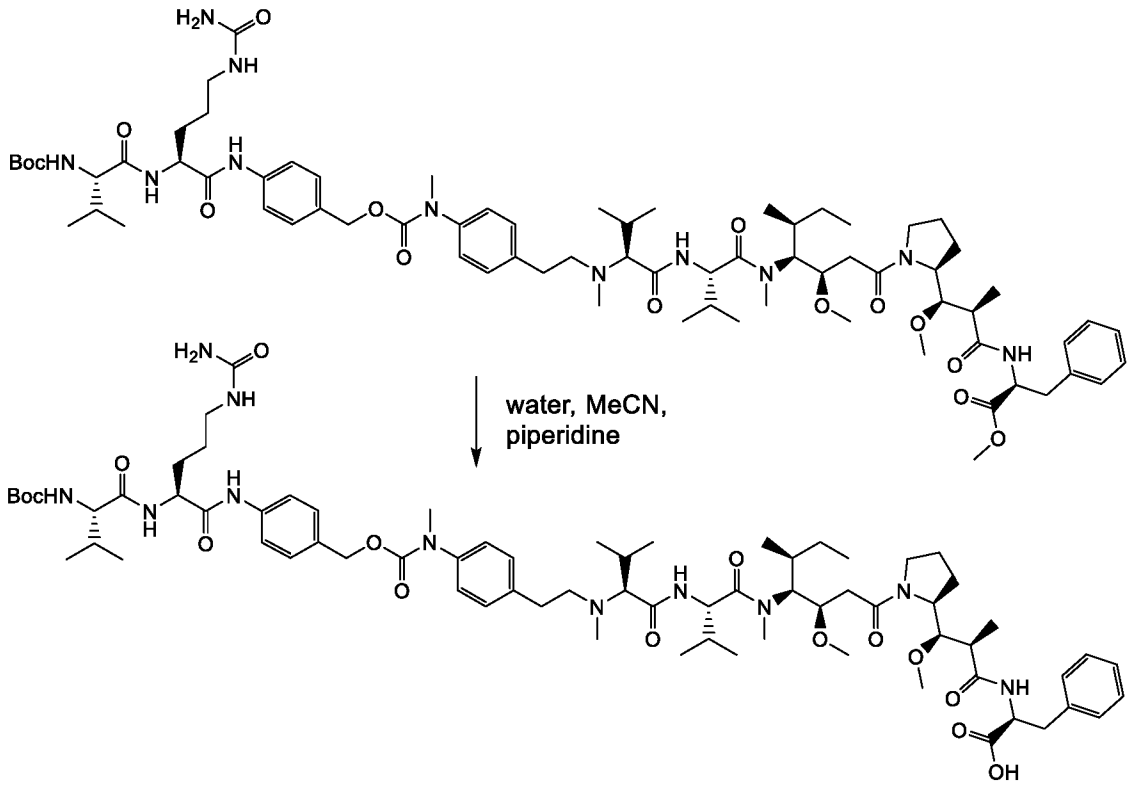
(Q-TOF MS ESI+) m/z ٧٣٩,٤٣٨٩ (١٠٠ %، +(MH2)2 ، C78H118N12O16 يتطلب ٧٣٩,٤٣٨٩).

المركب رقم هـ -١٣

((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤- ((((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- (٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسان أميدو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل) أوكسي) كربونيل) (ميثيل) أمينو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانين ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات

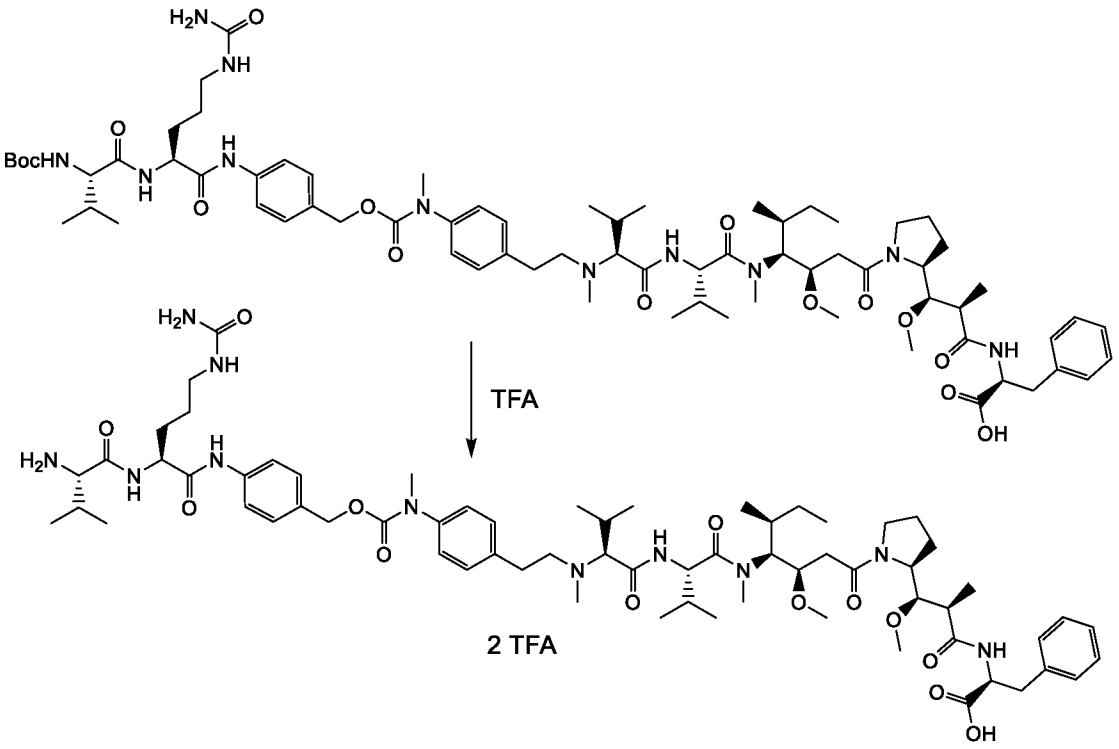


المركب رقم هـ -١٣ -١: ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤- ((((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل) أوكسي) كربونيل) (ميثيل) أمينو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانين



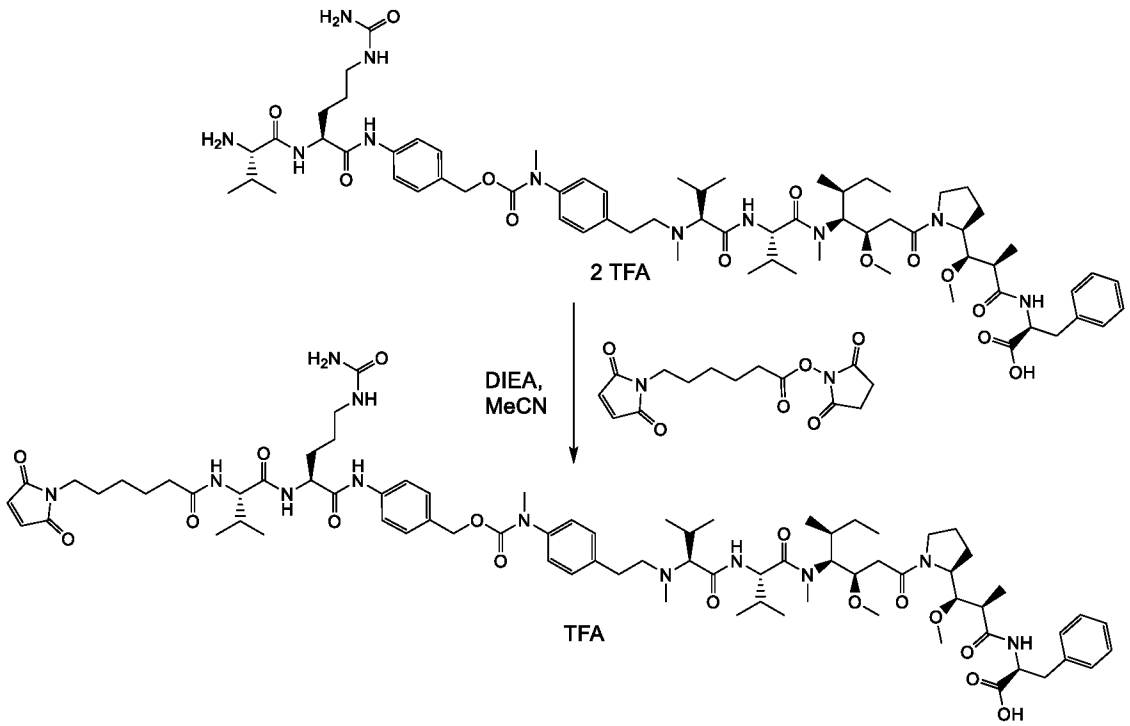
المركب رقم هـ -١٢ -٢ تمت إذابة (١٨٥ مجم، ٠,١٢٣ ملي مول، ١,٠ مكافئ) في خليط من الماء (٥ مل) والأسيتو نيتريل (٥ مل) عند درجة حرارة الغرفة. تمت إضافة البيريدين (٣,٦٧ مل، ٣٠٠ مكافئ) وتقليب الخليط لمدة ٦ ساعات عند درجة حرارة الغرفة. تم تبخير المذيبات حتى الجفاف تحت ضغط منخفض، وسحن المتبقي باستخدام Et2O (٦٠ مل). تم شطف المادة الصلبة مرتين باستخدام Et2O (٢٠ مل) وتجفيفه في الفراغ للحصول على المركب هـ -١٣ -١ في صورة مادة صلبة ذات لون أبيض ضارب إلى الصفرة (١٧٥ مجم، ٩٥ %).

المركب رقم هـ -١٣ -٢: ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤- ((((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- أمينو -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل) أوكسي) كربونيل) (ميثيل) أمينو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢- يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانين بس (٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات)



تمت إذابة المركب رقم هـ -١٣ -١ (١٧٥ مجم، ٠,١٢٨ ملي مول، ١,٠ مكافئ) TFA (٢٠٠ ميكرو لتر). بعد ٥ دقيقة، تمت إضافة الماء (١ مل) والأسيتو نيتريل (١ مل) وتجفيف المحلول بالتجميد طول الليل للحصول على المركب هـ -١٣ -٢ في صورة مادة صلبة ذات لون أبيض ضارب إلى الصفرة (١٨٠ مجم، ٨٧ %).

المركب رقم هـ -١٣: ((R٢، R٣) -٣- (S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- (S)) -٢- ((S) -٢- ((٤- ((((٤- (S)) -٢- (S)) -٢- (٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسان أميدو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل) أوكسي) كربونيل) (ميثيل) أمينو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣-داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانين، ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات

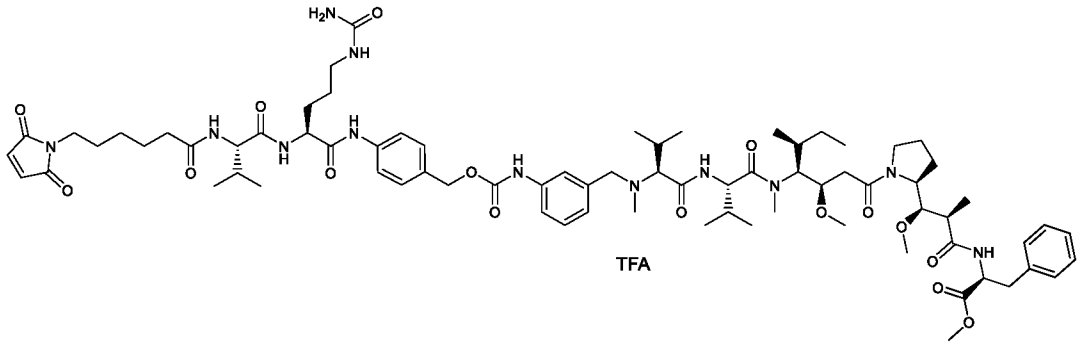


المركب رقم هـ -١٣ -٢ تمت إذابة (٨٠ مجم، ٠,٠٥٨ ملي مول، ١,٠ مكافئ) في خليط من الأسيتو نيتريل (١,٥ مل) وتمت إضافة DMF (٠,٤ مل). تمت إضافة DIEA (٥٠ ميكرو لتر، ٠,٢٨٩ ملي مول، ٥ مكافئ)، ويلي ذلك ٢، ٥-داي أوكسو بيروليدين-١-يل ٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسانوات (٣٦ مجم، ٠,١١٦ ملي مول، ٢ مكافئ). تم تقليب الخليط لمدة ٣ ساعات عند درجة حرارة الغرفة. بعد التحكم في التفاعل بواسطة LC-MS، تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض وتنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب هـ -١٣ في صورة مادة صلبة بيضاء (٣٢ مجم، ٣٥ %).

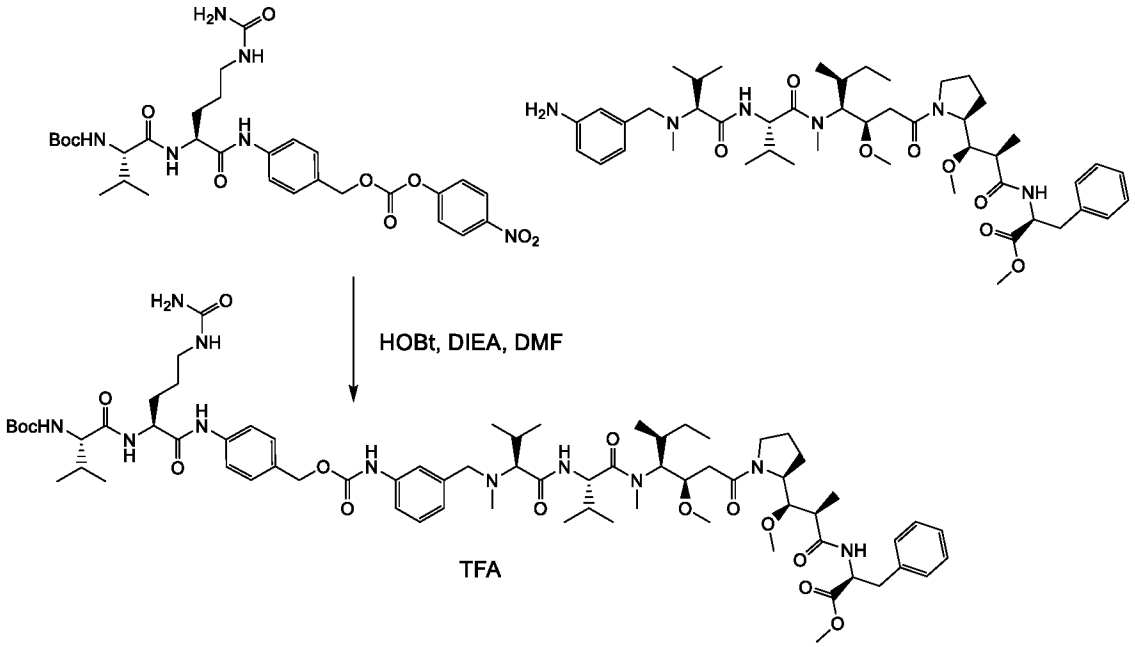
m/z (-Q-TOF MS ESI) ١٤٦١,٨٣٣٦ (١٠٠ %، (M-H)-، C77H113N12O16 يتطلب ١٤٦١,٨٤٠٣). m/z (Q-TOF MS ESI+) ١٤٦٣,٨٥٦٥ (٢ %، MH+، C77H115N12O16 يتطلب ١٤٦٣,٨٥٤٩) ، ٧٣٢,٤٣١٧ (١٠٠ %، (MH2)2+، C77H116N12O16 يتطلب ٧٣٢,٤٣١١).

المركب رقم هـ-١٥

ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٣-((((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- (٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسان أميدو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل) أوكسي) كربونيل) أمينو) بنزيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات

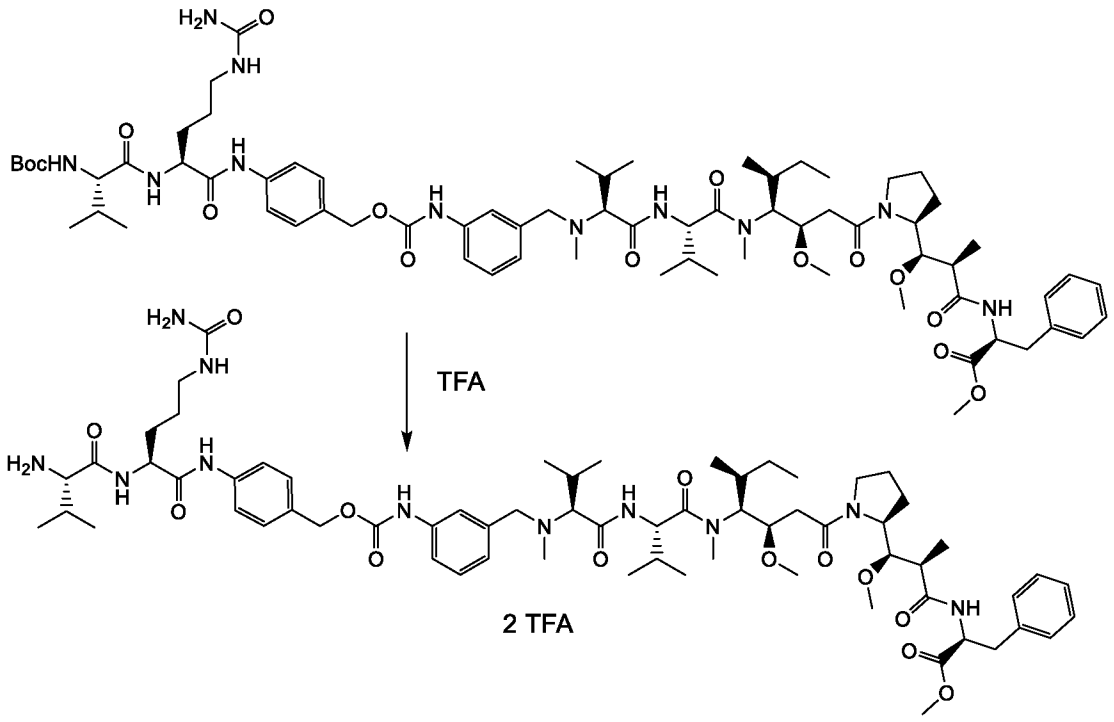


المركب رقم هـ-١٥ -١: ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٣- ((((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل) أوكسي) كربونيل) أمينو) بنزيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



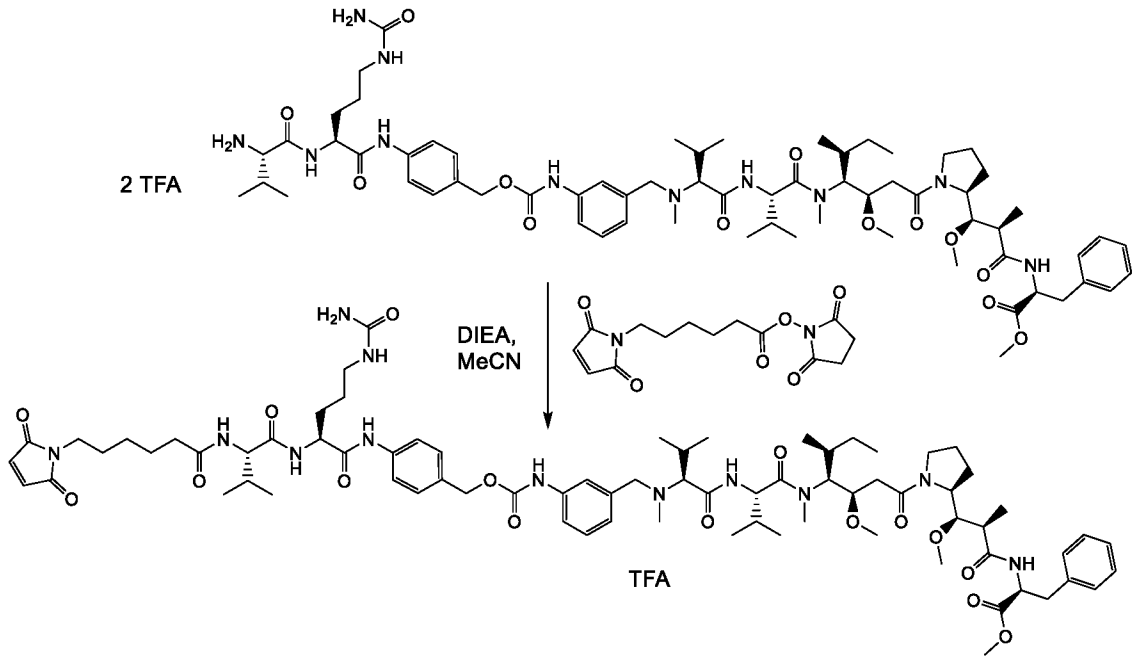
تم تحضير المركب رقم هـ-١٥ -١ بنفس الطريقة السابق اتباعها بالنسبة للمركب هـ-١١ -٦، باستخدام كربونات هـ-١١ -٥ (٢٨ مجم، ٠,٠٤٤ ملي مول، ١ مكافئ)، أنيلين ١٥ (٤٢ مجم، ٠,٠٤٤ ملي مول، ١ مكافئ)، HOBt (٣ مجم، ٠,٠٢٢ ملي مول، ٠,٥ مكافئ)، وDIEA (١٥ ميكرو لتر، ٠,٠٨٧ ملي مول، ٢ مكافئ) في DMF (٢ مل). المركب رقم هـ-١٥ -١ تم عزل في صورة مادة صلبة بيضاء (٨,٢ مجم، ١٣ %).

المركب رقم هـ-١٥ -٢: ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S))-٢- ((٣- ((((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- أمينو -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) بنزيل) أوكسي) كربونيل) أمينو) بنزيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات بس (٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات)



تمت إذابة المركب رقم هـ-١٥ -١ (٨,٢ مجم، ٥,٥٨ ميكرو مول، ١,٠ مكافئ) في TFA (٢٠٠ ميكرو لتر). بعد ٥ دقيقة، تمت إضافة الماء (١ مل) وتجفيف المحلول بالتجميد طول الليل للحصول على المركب هـ-١٥ -٨ في صورة مادة صلبة بيضاء (٧,٦ مجم، ٩٩ %).

٥ المركب رقم هـ-١٥:

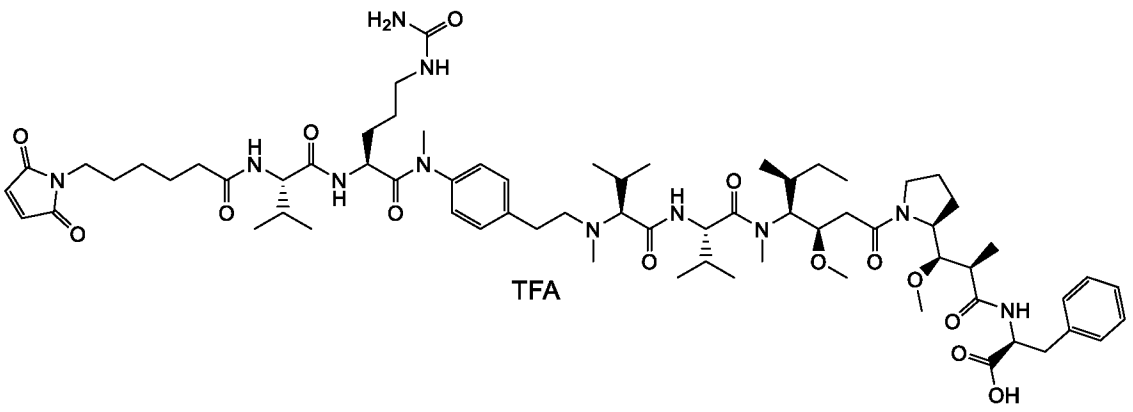


تم تحضير المركب رقم هـ-١٥ بنفس الطريقة السابق اتباعها بالنسبة للمركب هـ -١٢، باستخدام أمين هـ-١٥ -٢ (٧,٦ مجم، ٥,٥٥ ميكرو مول، ١ مكافئ)، ٢، ٥-داي أوكسو بيروليدين-١-يل ٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسانوات (٢ مجم، ٦,٦٥ ميكرو مول، ١,٢ مكافئ) وDIEA (٥ ميكرو لتر، ٠,٠٢٨ ملي مول، ٥ مكافئ) في الأسيتو نيتريل (٠,٥ مل). المركب رقم هـ-١٥ تم عزل في صورة مادة صلبة بيضاء (٤,٢ مجم، ٤٨ %).

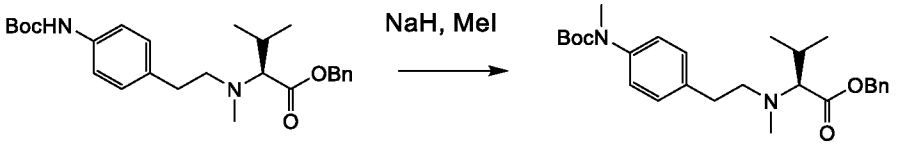
m/z (Q-TOF MS ESI+) ١٤٧١,٨١٦٩ (٢ %، +MNa، C76H112N12NaO16 يتطلب ١٤٧١,٨٢١١) ، ٧٢٥,٤٢٢٣ (١٠٠ %، +2(MH2) ، C76H114N12O16 يتطلب ٧٢٥,٤٢٣٢) ، ٤٨٣,٩٤٨٢ (١٠ %، +3(MH3)، C76H115N12O16 يتطلب ٤٨٣,٩٥١٣).

المركب رقم و-١٣

((R٢، R٣)) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥)) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤- (S)) -٢- ((S)) -٢- (٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسان أميدو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N- ميثيل -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانين ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات

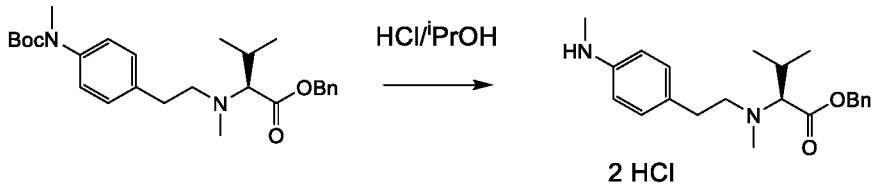


المركب رقم و-١٣ -١: بنزيل N- (٤- ((t-بيوتوكسي كربونيل) (ميثيل) أمينو) فينيثيل) -N- ميثيل -L- ڤالينات



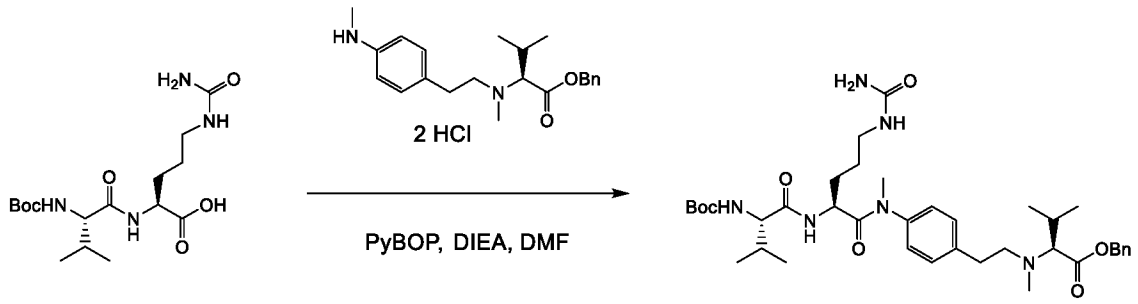
تمت إذابة المركب رقم ١١ ج (٢٥٠ مجم، ٠,٥٦٧ ملي مول، ١ مكافئ) في THF (١٠ مل) وتلَى ذلك إضافة NaH (٦٠ % معلق في زيت معدني، ٦٨ مجم، ١,٧٠٢ ملي مول، ٣ مكافئ). تم تقليب الخليط لمدة ٥ دقيقة قبل إضافة يودو ميثان (١٠٦ ميكرو لتر، ١,٧٠٢ ملي مول، ٣ مكافئ). تم تقليب خليط التفاعل لمدة ٢ ساعة عند درجة حرارة الغرفة قبل إخماده بالماء وفصله بين EtOAc (١٠٠ مل) والماء (٥٠ مل). تم تجفيف الطور العضوي باستخدام MgSO4 وتبخيره حتى الجفاف للحصول على المركب و-١٣ -١ في صورة زيت أصفر (٢٥٠ مجم، ٩٧ %)، والذي تم استخدامه بدون تنقية أخرى.

المركب رقم و-١٣ -٢: بنزيل N- ميثيل -N- (٤- (ميثيل أمينو) فينيثيل) -L- ڤالينات



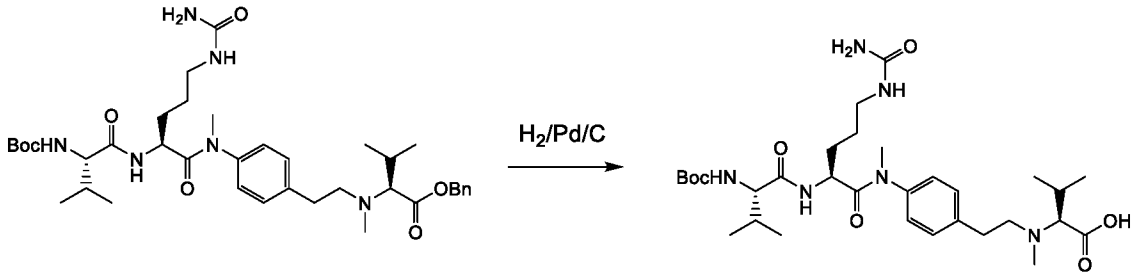
تمت إذابة أنيلين محمي بواسطة Boc و-١٣ -١ (٢٥٠ مجم، ٠,٥٥٠ ملي مول، ١ مكافئ) في MeOH (٥ مل) وتلَى ذلك إضافة ١ مل من محلول متوفر تجاريا من HCl في iPrOH (٥ – ٦ مولار). تم تقليب المحلول عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٢ ساعة قبل التبخير حتى الجفاف تحت ضغط منخفض. تم سحن الزيت الأصفر الناتج باستخدام Et2O للحصول على المركب و-١٣ - ٢ في صورة مادة صلبة صفراء (٢٠٢ مجم، ٩٤ %).

المركب رقم و-١٣ -٣: بنزيل N- (٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N- ميثيل -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) -N- ميثيل -L- ڤالينات



تمت إذابة الحمض هـ-١١ -٣ (١٩٠ مجم، ٠,٥٠٨ ملي مول، ١,٥ مكافئ) في DMF جاف (١ مل)، وتلَى ذلك إضافة DIEA (١١٨ ميكرو لتر، ٠,٦٧٧ ملي مول، ٢ مكافئ)، بنزو ترايازول -١-يل- أوكسي تراي بيروليدينو فوسفونيوم هكسا فلورو فوسفات (PyBOP- ٢٦٤ مجم، ٠,٥٠٨ ملي مول، ١,٥ مكافئ) وأنيلين و-١٣ -٢ (١٢٠ مجم، ٠,٣٣٩ ملي مول، ١ مكافئ). تم تقليب الخليط عند درجة حرارة الغرفة طول الليل وتبخير المذيبات تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب و-١٣ -٣ في صورة مادة صلبة بيضاء (١٤٠ مجم، ٤٥ %).

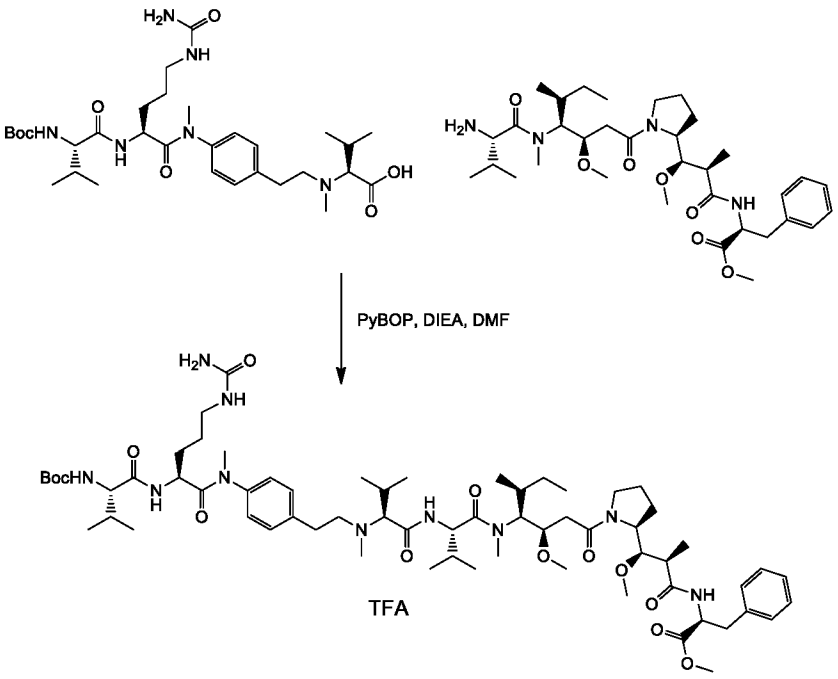
المركب رقم و-١٣ -٤: N- (٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N- ميثيل -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) -N- ميثيل -L-فالين



تمت إذابة المركب رقم و-١٣ -٣ (١١٦ مجم، ٠,١٦٣ ملي مول، ١ مكافئ) في MeOH (٥ مل) في وجود ١٠Pd/C % (٣٠ مجم) وهدرجته لمدة ٢ ساعة عند درجة حرارة الوسط المحيط

وتحت الضغط الجوي. تم ترشيح وسط التفاعل وتركيزه تحت ضغط منخفض للحصول على ١١٠ مجم (٩٩ %) من المركب و-١٣ -٤ في صورة مادة صلبة ذات لون بيج.

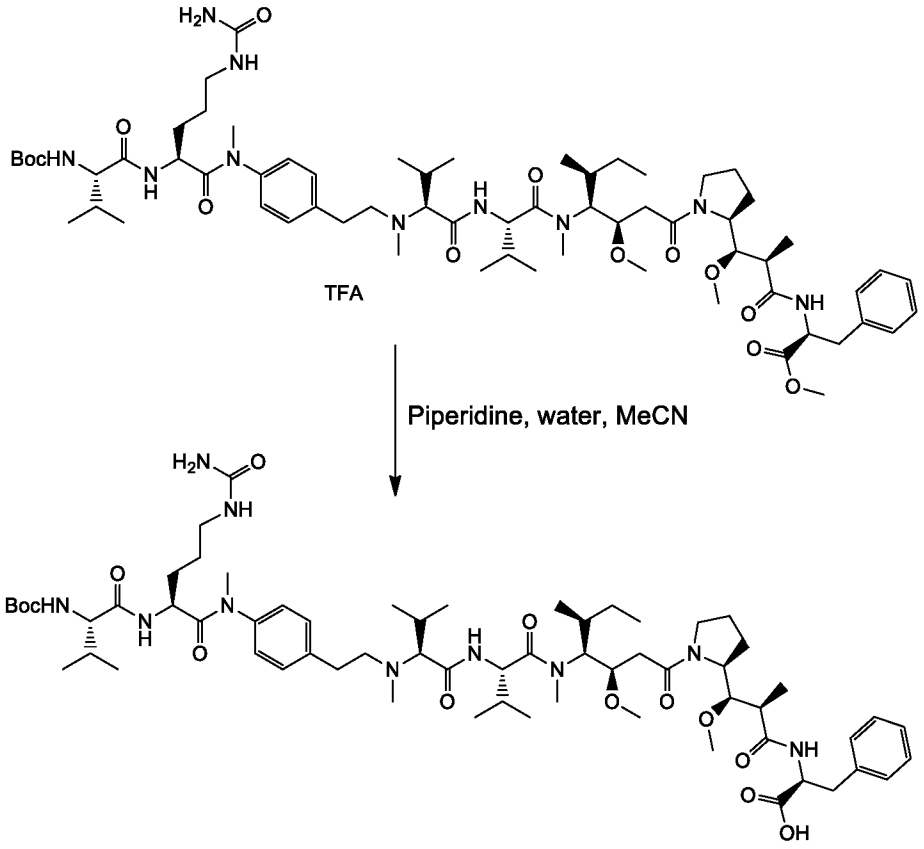
المركب رقم و-١٣ -٥: ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N- ميثيل -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



تمت إذابة الأمين ٣ د (٨٩ مجم، ٠,١٤٠ ملي مول، ١ مكافئ) والحمض و-١٣ -٤ (١٤٥ مجم، ٠,٢١٠ ملي مول، ١,٥ مكافئ) في DMF جاف (٤ مل)، وPyBOP (١٠٩ مجم، ٠,٢١٠ ملي مول، ١,٥ مكافئ) وتمت إضافة DIEA (٧٣ ميكرو لتر، ٠,٤٢٠ ملي مول، ٣ مكافئ). تم تقليب الخليط لمدة ١ ساعة عند درجة حرارة الغرفة وتبخير المذيب. تم فصل المتبقي بين EtOAc والماء، وتم تجفيف الطور العضوي باستخدام MgSO4، وترشيحه وتبخيره تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المنتج الخام باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ TFA% ؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥

دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب و-١٣ -٥ في صورة مادة صلبة بيضاء (١٤٠ مجم، ٧٣ %).

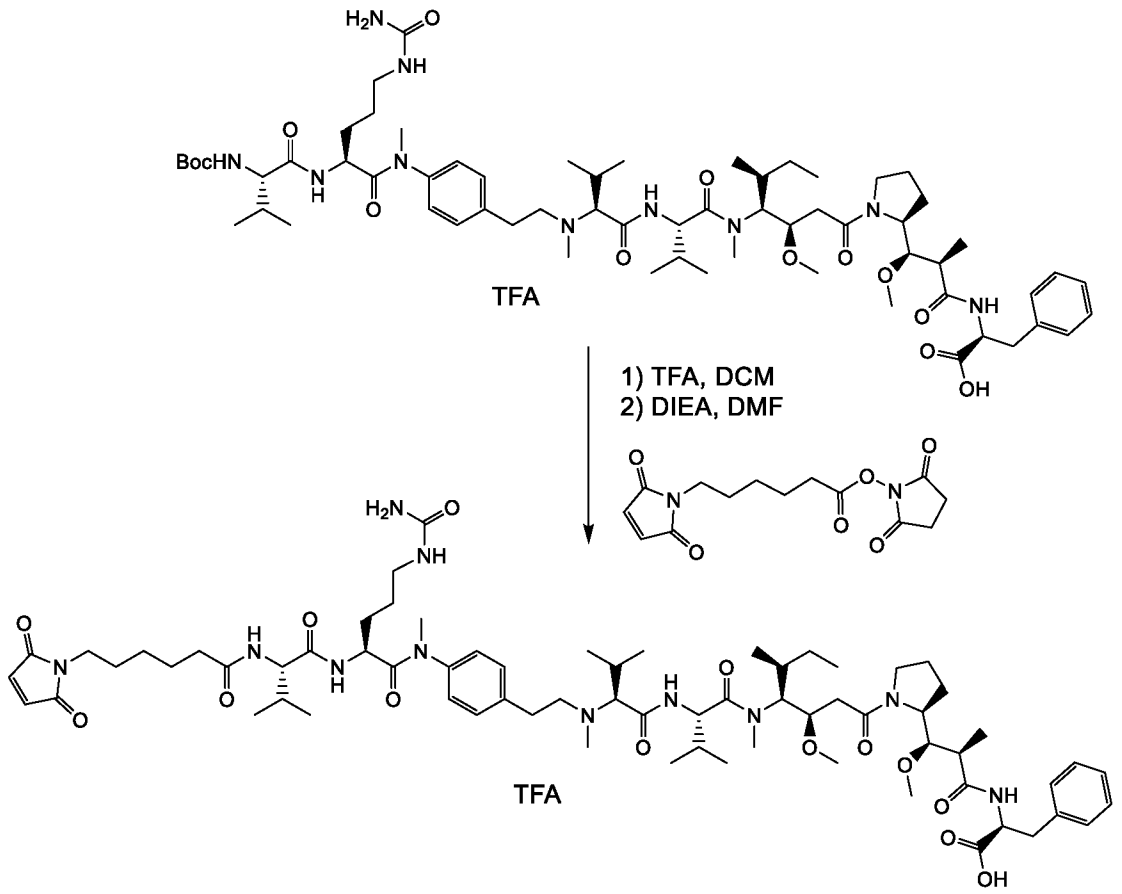
المركب رقم و-١٣ -٦: ((R٢، R٣) -٣- ((S) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S) -٢- ((٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N- ميثيل -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N-، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانين ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



تمت إذابة المركب رقم و-١٣ -٥ (١٤٠ مجم، ٠,١٠٤ ملي مول، ١ مكافئ) في خليط من الماء (٤ مل)، الأسيتو نيتريل (٤ مل) والبيريدين (٢ مل) وتقليبه عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٤ ساعات. تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض وتنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ %

MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب و-١٣ -٦ في صورة مادة صلبة بيضاء (١١٥ مجم، ٨٣ %).

المركب رقم و-١٣:

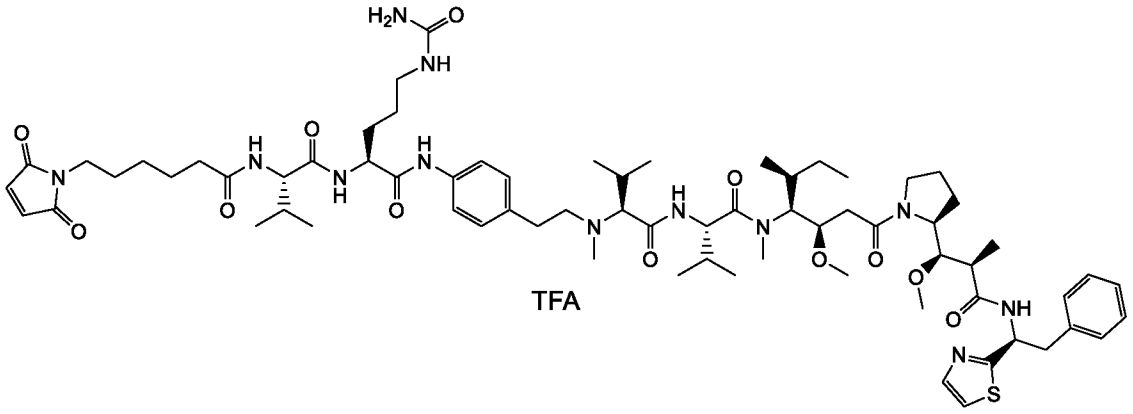


تم تحضير المركب رقم و-١٣ بنفس الطريقة السابق اتباعها بالنسبة للمركب هـ-١١، باستخدام أمين محمي بـ Boc و-١٣ -٦ (٥٥ مجم، ٠,٠٤١ ملي مول، ١,٠ مكافئ) في DCM (٠,٥ مل) وTFA (١٠٠ ميكرو لتر، ٣٠ مكافئ)، ويلي ذلك التخفيف بـ DMF (١ مل)، والإخماد بـ DIEA (٣٢٠ ميكرو لتر، ٤٥ مكافئ) ثم التفاعل مع ٢، ٥-داي أوكسو بيروليدين-١-يل ٦-(٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسانوات (١٥ مجم، ٠,٠٤٩ ملي مول، ١,٢ مكافئ). بعد التنقية باستخدام HPLC تحضيري والتجفيف بالتجميد، تم الحصول على المركب و-١٣ في صورة مادة صلبة بيضاء (١٤ مجم، ٢٤ %).

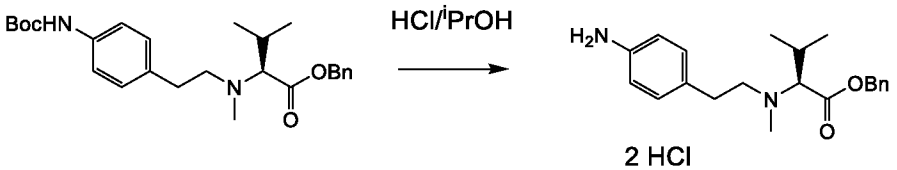
(Q-TOF MS ESI+) m/z ١٣١٤,٨٠٦٧ (٢ %، +MH، C69H108N11O14 يتطلب ١٣١٤,٨٠٧٢) ، ٦٥٧,٩٠٦٧ (١٠٠ %، +(MH2)2 ، C69H109N11O14 يتطلب ٦٥٧,٩٠٧٢).

المركب رقم و-٦١

٥ N- ((S)) -١- (((S)) -١- ((٤- ((R٣، S٤، S٧، S١٠) -٤- ((s(S)- -بيوتيل) -٧، ١٠- داي أيزو بروبيل -٣- (٢- ((S)) -٢- ((R١، R٢) -١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣- أوكسو -٣- (((S)) -٢- فينيل -١- (ثيازول -٢-يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٢- أوكسو إيثيل) -٥، ١١- داي ميثيل -٦، ٩-دايوكسو-٢-أوكسا -٥، ٨، ١١-تراي آزا تراي ديكان -١٣-يل) فينيل) أمينو) -١- أوكسو -٥- يوريدو بنتان -٢-يل) أمينو) -٣- ميثيل ١٠ -١- أوكسو بيوتان -٢-يل) -٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسان أميد ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



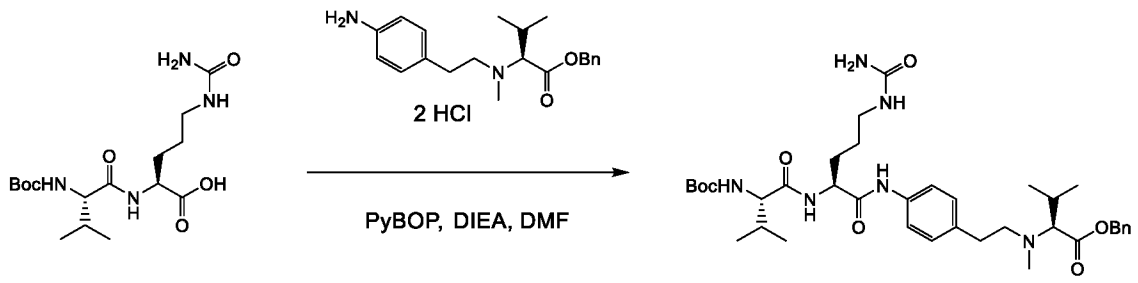
المركب رقم و-٦١ -١: بنزيل N- (٤- أمينو فينيثيل) -N- ميثيل -L- ڤالينات داي هيدروكلوريد



١٥ تمت إذابة المركب رقم ١١ ج (١,٠ جم، ٢,٢٧ ملي مول، ١ مكافئ) في ٨ مل من محلول متوفر تجاريا من HCl في iPrOH (٥ – ٦ مولار). تم تقليب الخليط لمدة ٢ ساعة عند درجة

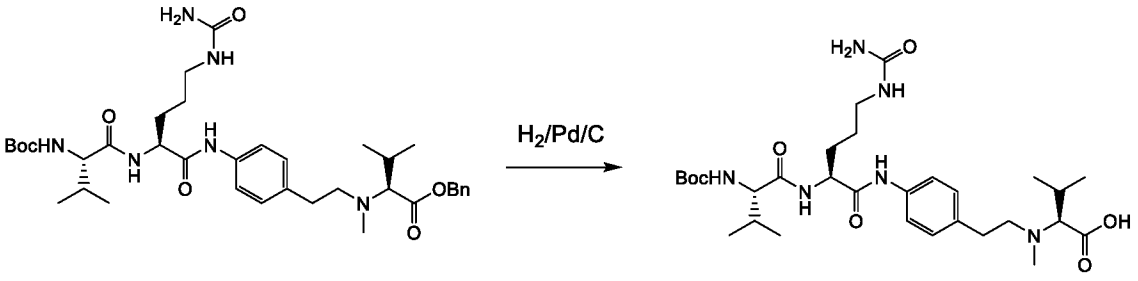
حرارة الغرفة قبل التبخير حتى الجفاف تحت ضغط منخفض. تم سحن المتبقي مرتين باستخدام Et2O (٣٠ مل) وتجفيفه في الفراغ للحصول على المركب و-٦١ -١ في صورة مادة صلبة بيضاء (٩١٦ مجم، ٩٨ %).

المركب رقم و-٦١ -٢: بنزيل N- (٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) -N- ميثيل -L- ڤالينات



تمت إذابة الحمض هـ-١١ -٣ (٧٦٩ مجم، ٢,٠٥ ملي مول، ١,٥ مكافئ) في DMF جاف (٢,٥ مل) وتلَى ذلك إضافة DIEA (٩٥٧ ميكرو لتر، ٥,٤٨ ملي مول، ٤ مكافئ) وPyBOP (١,٠٧ جم، ٢,٠٥ ملي مول، ١,٥ مكافئ). تمت إضافة أنيلين و-٦١ -١ (٥٦٦ مجم، ١,٣٦٩ ملي مول، ١ مكافئ) وتقليب الخليط عند درجة حرارة الغرفة طول الليل. تم تبخير المذيبات تحت ضغط منخفض، وتنقية المتبقي على هلام السليكا (DCM/MeOH) للحصول على ٩٦٩ مجم (١٠٢ %) من المركب و-٦١ -٢ في صورة مادة صلبة بيضاء.

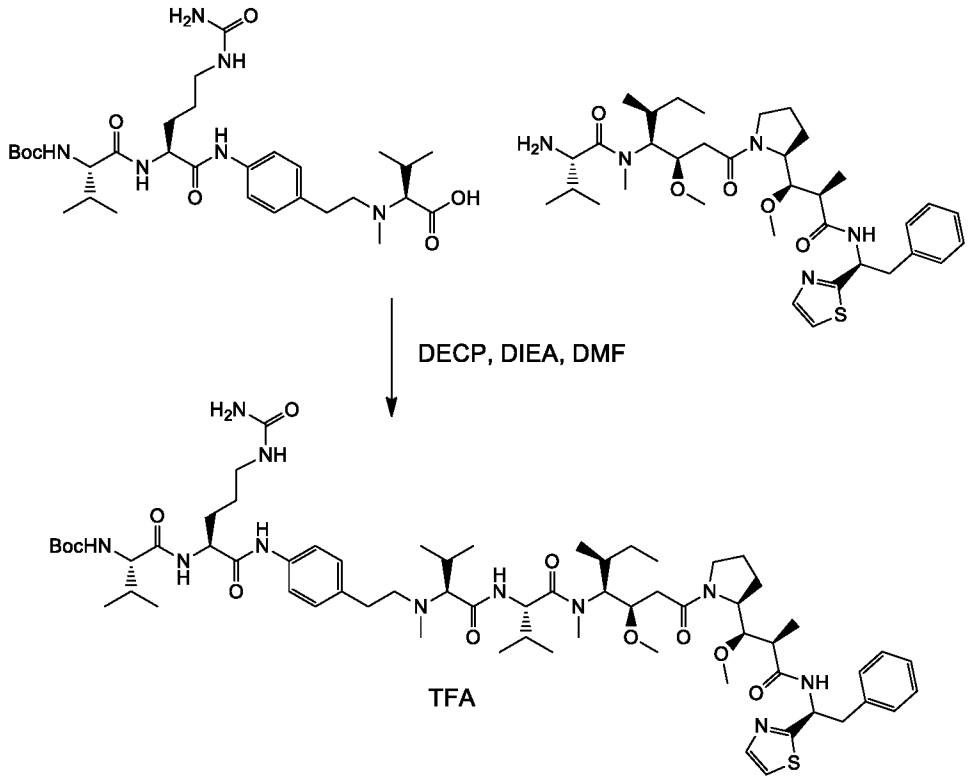
المركب رقم و-٦١ -٣: N- (٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) -N- ميثيل -L-فالين



تمت إذابة المركب رقم و-٦١ -٢ (٩٦٩ مجم، ١,٢٨ ملي مول، ١ مكافئ) في MeOH (٢٠ مل) في وجود ١٠Pd/C % (٢٧٠ مجم) وتمت هدرجته لمدة ٣ ساعة عند درجة حرارة الوسط

المحيط وتحت الضغط الجوي. تم ترشيح وسط التفاعل وتركيزه تحت ضغط منخفض، وتنقية المتبقي على هلام السليكا (DCM/MeOH/AcOH) للحصول على ٥٢٠ مجم (٦٧ %) من المركب و-٦١ -٣ في صورة مادة صلبة بيضاء.

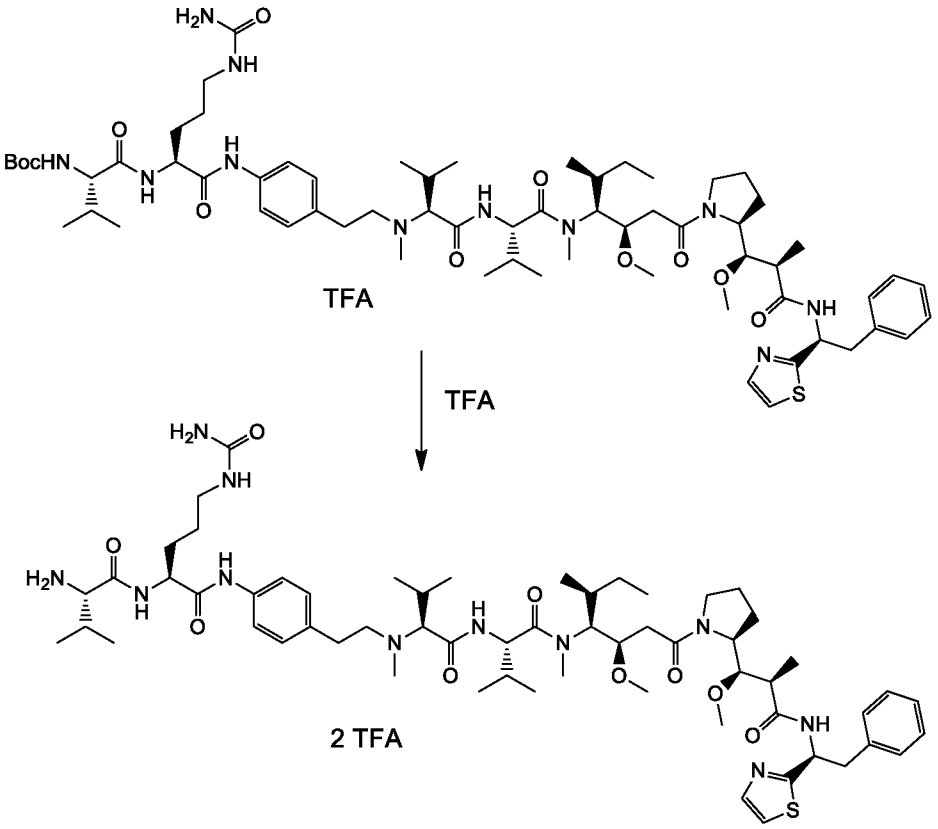
المركب رقم و-٦١ -٤: t-بيوتيل ((S) -١- (((S) -١- ((٤- ((R٣، S٤، S٧، S١٠) -٤- ((S)s- -بيوتيل) -٧، ١٠- داي أيزو بروبيل -٣- (٢- ((S) -٢- ((R١، R٢) -١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣- أوكسو -٣- (((S) -٢- فينيل -١- (ثيازول -٢-يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٢- أوكسو إيثيل) -٥، ١١- داي ميثيل -٦، ٩-دايوكسو-٢-أوكسا -٥، ٨، ١١-تراي آزا تراي ديكان -١٣-يل) فينيل) أمينو) -١- أوكسو -٥- يوريدو بنتان -٢- يل) أمينو) -٣- ميثيل -١- أوكسو بيوتان -٢-يل) كربامات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



تمت إذابة الحمض و-٦١ -٣ (٦٧,٥ مجم، ٠,١١١ ملي مول، ١,٥ مكافئ) في DMF جاف (٢ مل) وDECP (١٧ ميكرو لتر، ٠,١١١ ملي مول، ١,٥ مكافئ) وتمت إضافة DIEA (٣٩ ميكرو لتر، ٠,٢٢٣ ملي مول، ٣ مكافئ). بعد التقليب لمدة ١٥ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة، تمت إضافة الأمين ١ ذ (٥٠ مجم، ٠,٠٧٤ ملي مول، ١ مكافئ) وتم تقليب المحلول طول الليل. تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض، وتنقية المتبقي باستخدام HPLC تحضيري (Waters

600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب ٦١F-٤ في صورة مادة صلبة بيضاء (٢٨ مجم، ٢٨ %).

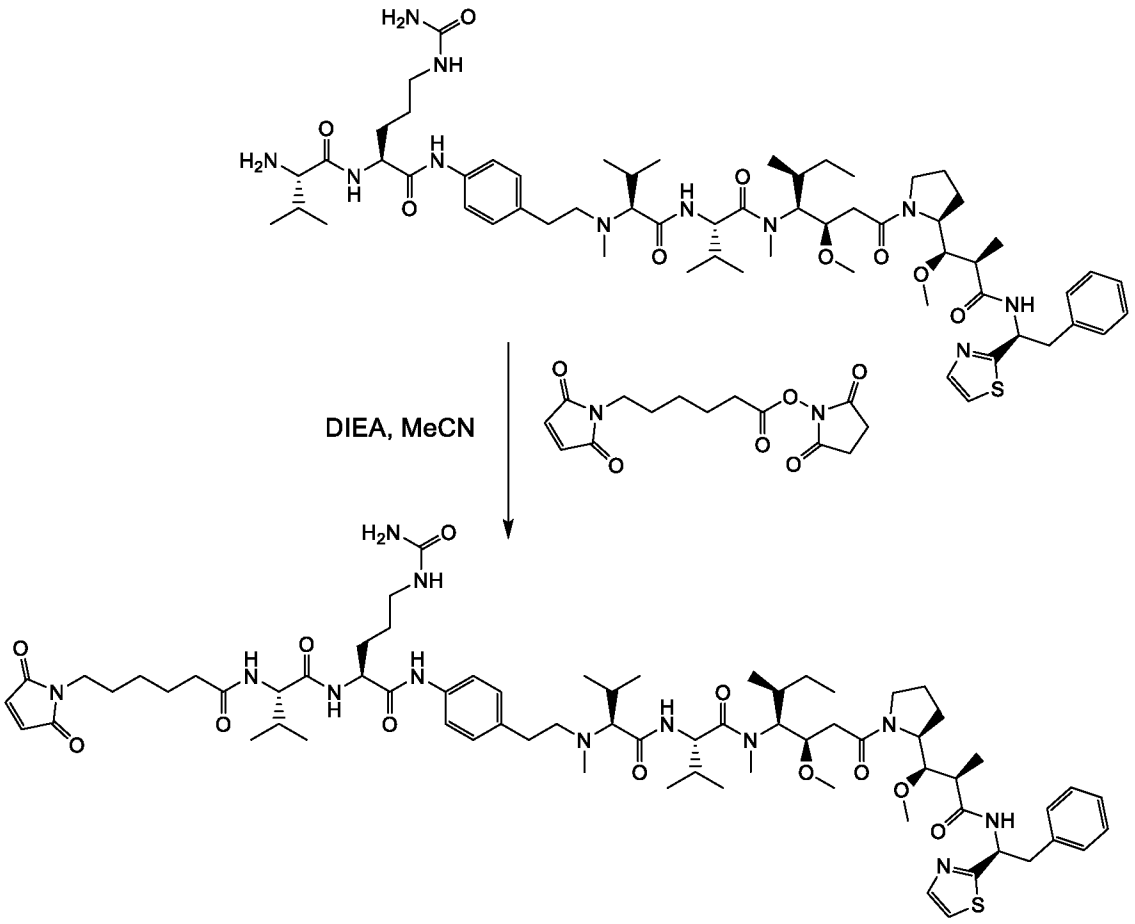
المركب رقم و-٦١ -٥: (S) -٢- ((S) -٢- أمينو -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N- (٤- ((R٣، S٤، S٧، S١٠) -٤- ((s(S)- -بيوتيل) -٧، ١٠- داي أيزو بروبيل -٣- (٢- ((S) -٢- ((R١، R٢) -١- ميثوكسي -٢- ميثيل -٣- أوكسو -٣- (((S) -٢- فينيل -١- (ثيازول -٢-يل) إيثيل) أمينو) بروبيل) بيروليدين-١-يل) -٢- أوكسو إيثيل) -٥، ١١- داي ميثيل -٦، ٩-دايوكسو-٢-أوكسا -٥، ٨، ١١-تراي آزا تراي ديكان -١٣-يل) فينيل) -٥- يوريدو بنتان أميد بس (٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات)



المركب رقم و-٦١ -٤ (٢٨ مجم، ٠,٠٢١ ملي مول، ١,٠ مكافئ) تمت إذابة في TFA (٢٠٠ ميكرو لتر). بعد ٥ دقيقة، تمت إضافة الماء (٢ مل) والأسيتو نيتريل (٠,٥ مل) وتجفيف المحلول

بالتجميد طول الليل للحصول على المركب و-٦١ -٥ في صورة زيت عديم اللون (٣٨ مجم، ١٣٤ %).

المركب رقم و-٦١:



٥

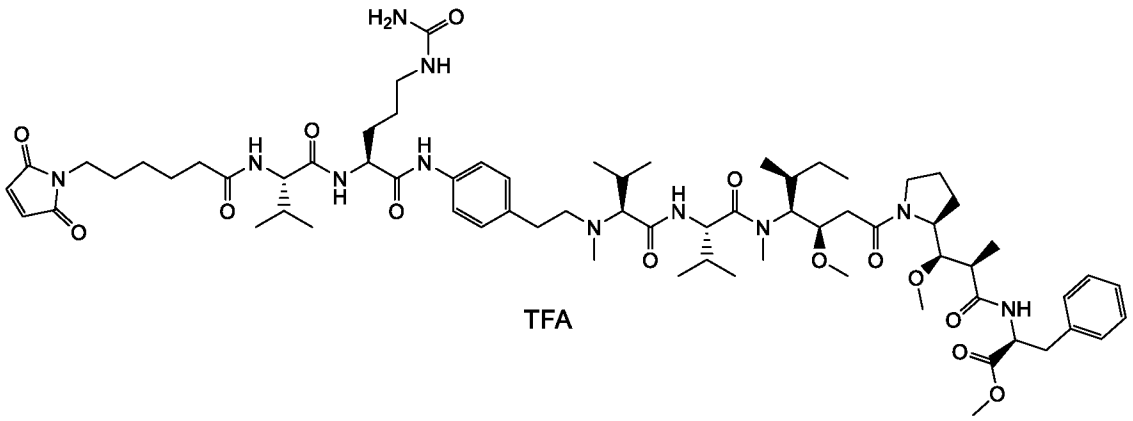
تمت إذابة المركب رقم و-٦١ -٥ (٢٨,٣ مجم، ٠,٠٢٠ ملي مول، ١ مكافئ) في الأسيتو نيتريل (٠,٥ مل)، ويلي ذلك ٢، ٥-داي أوكسو بيروليدين-١-يل ٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسانوات (٩ مجم، ٠,٠٢٩ ميكرو مول، ١,٤ مكافئ) وDIEA (٢٥ ميكرو لتر، ٠,١٤٣ ملي مول، ٧ مكافئ). تم تقليب الخليط لمدة ٤,٥ ساعة، وبعد ذلك أظهر تحليل HPLC وجود مادة بادئة مع الاستهلاك الكامل للسكسينيميد. لذلك تمت إضافة كمية إضافية من ٢، ٥-داي أوكسو بيروليدين-١-يل ٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسانوات (٣ مجم، ٠,٠١ ميكرو مول، ٠,٥ مكافئ) وتم تقليب خليط التفاعل لمدة ١,٥ ساعة. أظهر تحليل HPLC اكتمال استهلاك المادة البادئة. تم تبخير المذيب حتى الجفاف

وتم سحن المتبقي مرتين باستخدام خليط من EtOAc/Et2O (٢٠/٨٠) للحصول على المركب و-٦١ في صورة مادة صلبة ذات لون أبيض ضارب إلى الصفرة (١٩,٤ مجم، ٧٠ %).

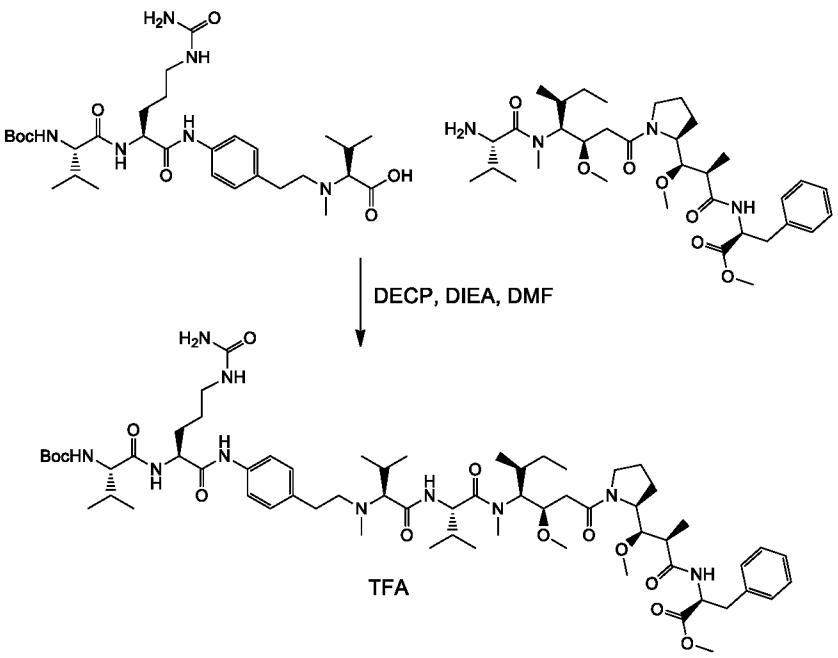
m/z (Q-TOF MS ESI+) ١٣٦١,٧٧٢٥ (٢ %، +MNa، C70H106N12NaO12S يتطلب ١٣٦١,٧٦٦٦) ، ٦٧٠,٣٩٦١ (١٠٠ %، +(MH2)2، C70H108N12O12S ، يتطلب ٦٧٠,٣٩٦٠).

المركب رقم و-٦٢:

ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤-((S)) -٢- ((S)) -٢- (٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسان أميدو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات

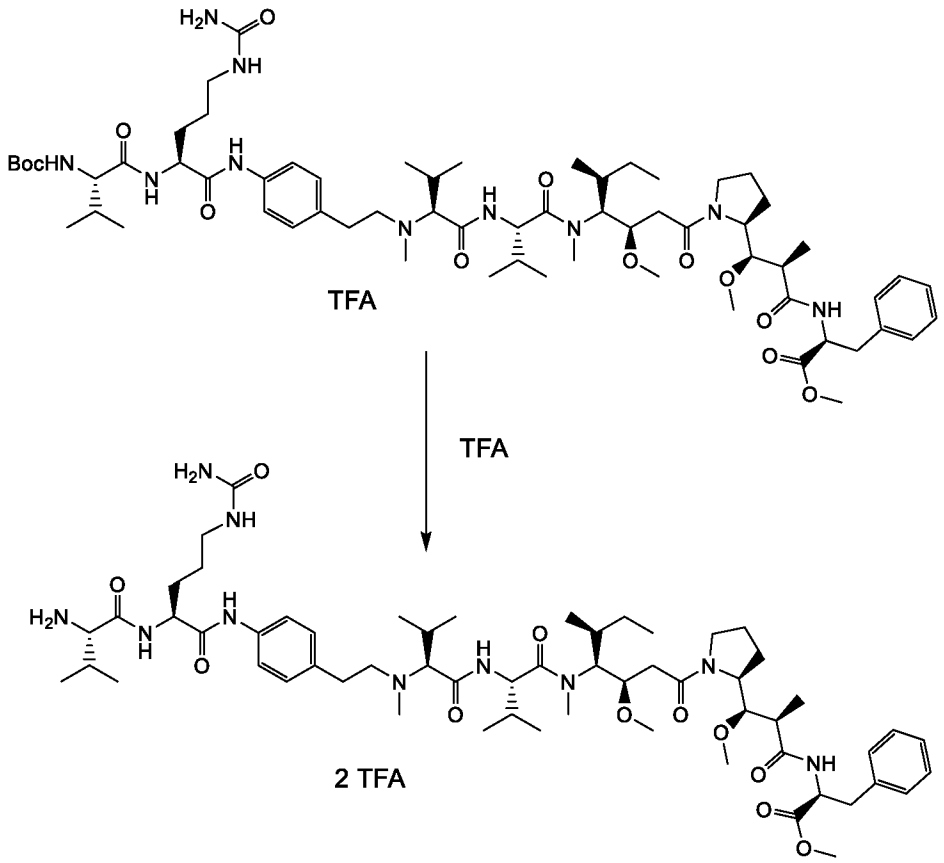


المركب رقم و-٦٢ -١: ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



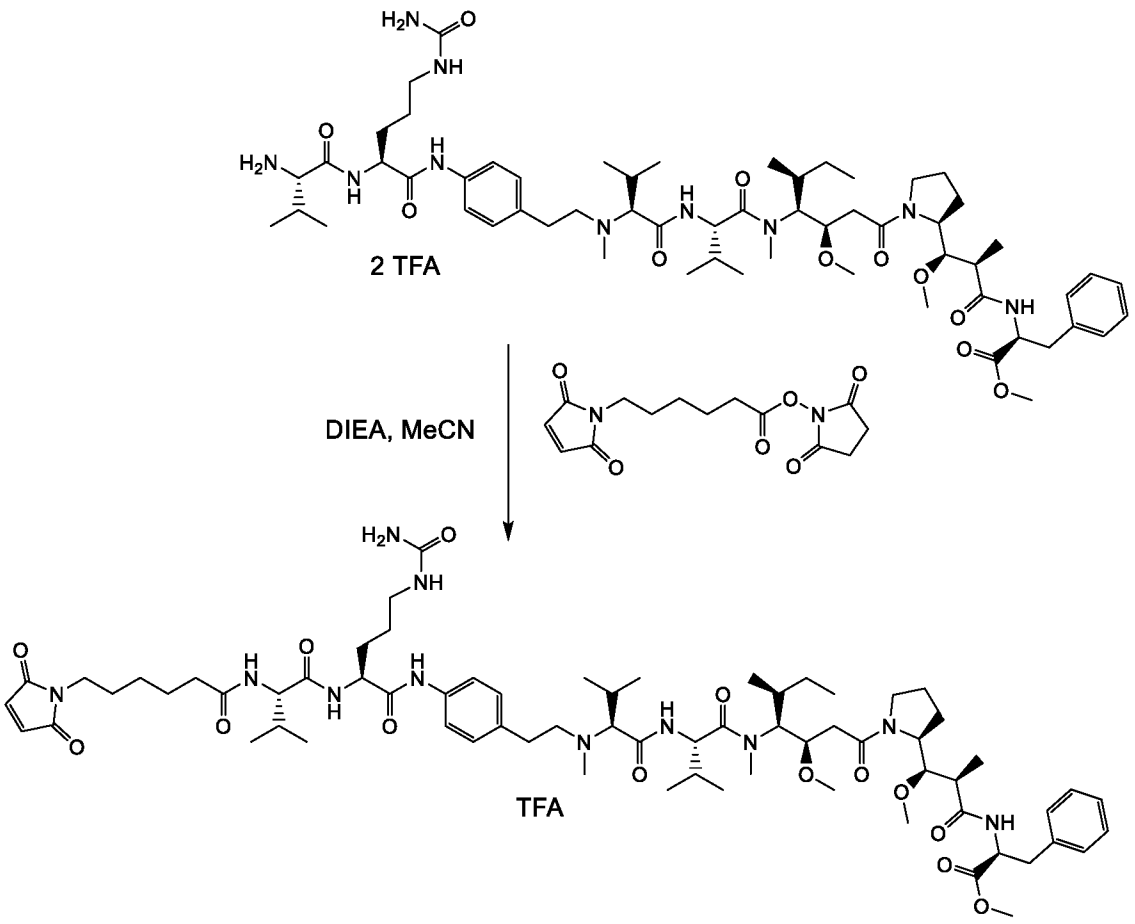
تم تحضير المركب رقم و-٦٢ -١ بطريقة تشبه المركب و-٦١ -٤ من أمين ٣ د (١٠٠ مجم، ٠,١٥٨ ملي مول، ٠,٩ مكافئ)، الحمض و-٦١ -٣ (١٠٨ مجم، ٠,١٧٨ ملي مول، ١ مكافئ)، DECP (٤١ ميكرو لتر، ٠,٢٦٧ ملي مول، ١,٥ مكافئ) وDIEA (٩٣ ميكرو لتر، ٠,٥٣٤ ملي مول، ٣ مكافئ) في DMF (٢ مل). بعد التنقية باستخدام HPLC تحضيري، تم الحصول على المركب و-٦٢ -١ في صورة مادة صلبة بيضاء (٩٣ مجم، ٣٩ %).

المركب رقم و-٦٢ -٢: ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S) -٢- ((S) -٢- ((٤- ((S) -٢- ((S) -٢- أمينو -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات بس (٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات)



تمت إذابة المركب رقم و-٦٢ -١ (٣٥ مجم، ٠,٠٢٦ ملي مول، ١,٠ مكافئ) في TFA (٢٠٠ ميكرو لتر). بعد ١٠ دقيقة، تمت إضافة الماء (٢ مل) والأسيتو نيتريل (٠,٥ مل) وتجفيف المحلول بالتجميد طول الليل للحصول على المركب و-٦٢ -٢ في صورة مادة صلبة بيضاء (٣٤ مجم، ١٠٥ %).

المركب رقم و-٦٢:

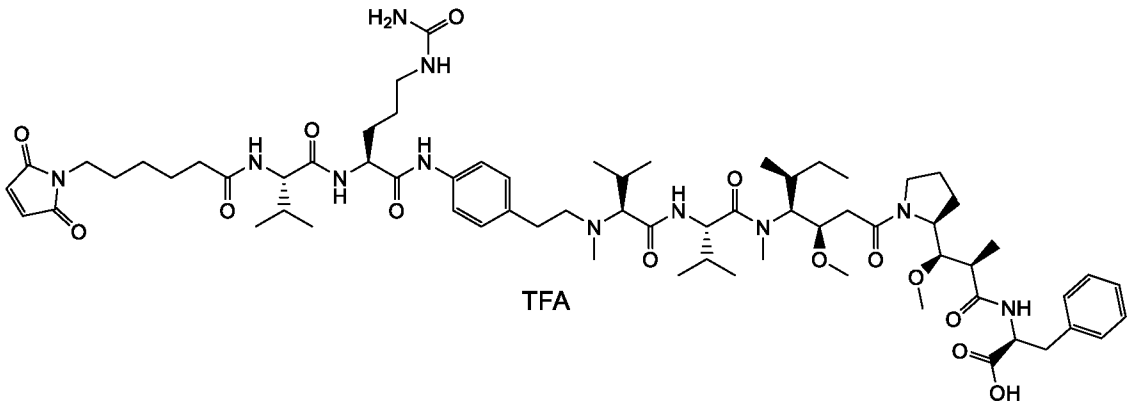


تمت إذابة أمين و-٦٢ -٢ (٣٤ مجم، ٥,٥٥ ميكرو مول، ١ مكافئ) في الأسيتو نيتريل (٣ مل).DIEA (٥ ميكرو لتر، ٠,٠٢٨ ملي مول، ٥ مكافئ) وتمت إضافة ٢، ٥-داي أوكسو بيروليدين-١-يل ٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسانوات (٢ مجم، ٦,٦٥ ميكرو مول، ١,٢ مكافئ). أظهر تحليل HPLC اكتمال استهلاك المادة البادئة. تم تبخير المذيب حتى الجفاف وسحن المتبقي باستخدام خليط من EtOAc/Et2O (٢٠/٨٠). تمت تنقية المنتج الخام باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ TFA% ؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ MeCN% خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب و-٦٢ في صورة مادة صلبة بيضاء (٥,٥ مجم، ١٣ %).

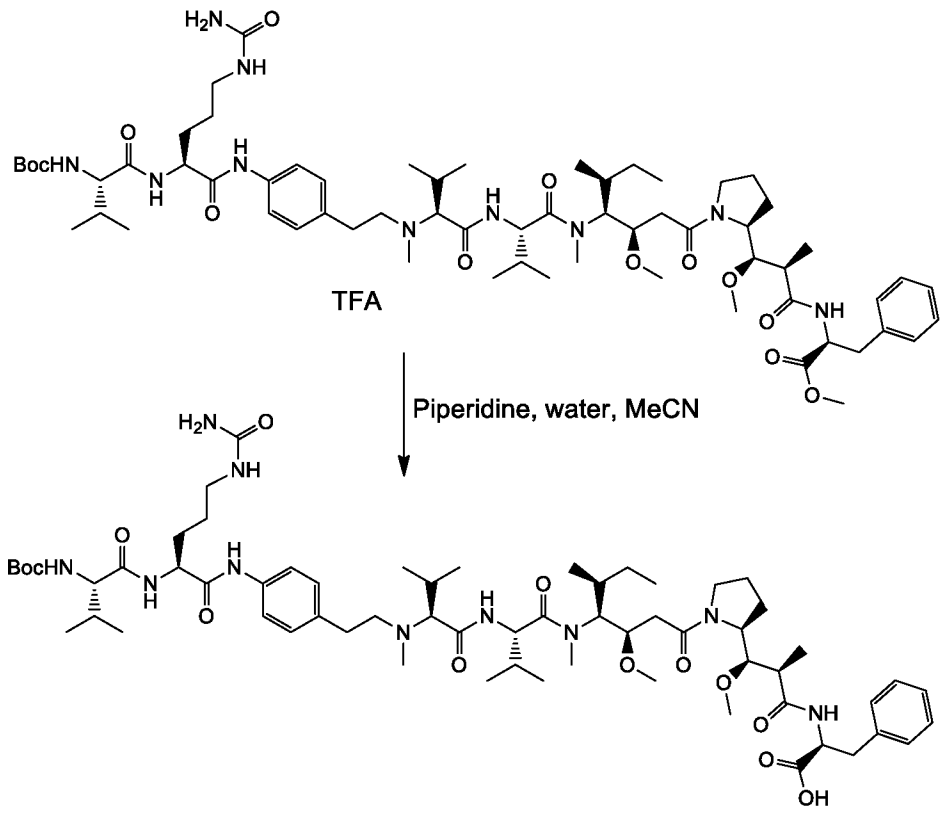
(Q-TOF MS ESI+) m/z ١٣٣٦,٧٨٥٩ (٢ %، +MNa، C69H107N11NaO14 يتطلب ١٣٣٦,٧٨٩١) ، ٦٥٧,٩٠٧٣ (١٠٠ %، +2(MH2) ، C69H109N11O14 يتطلب ٦٥٧,٩٠٧٢).

المركب رقم و-٦٣:

((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- (٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسان أميدو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانين ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات

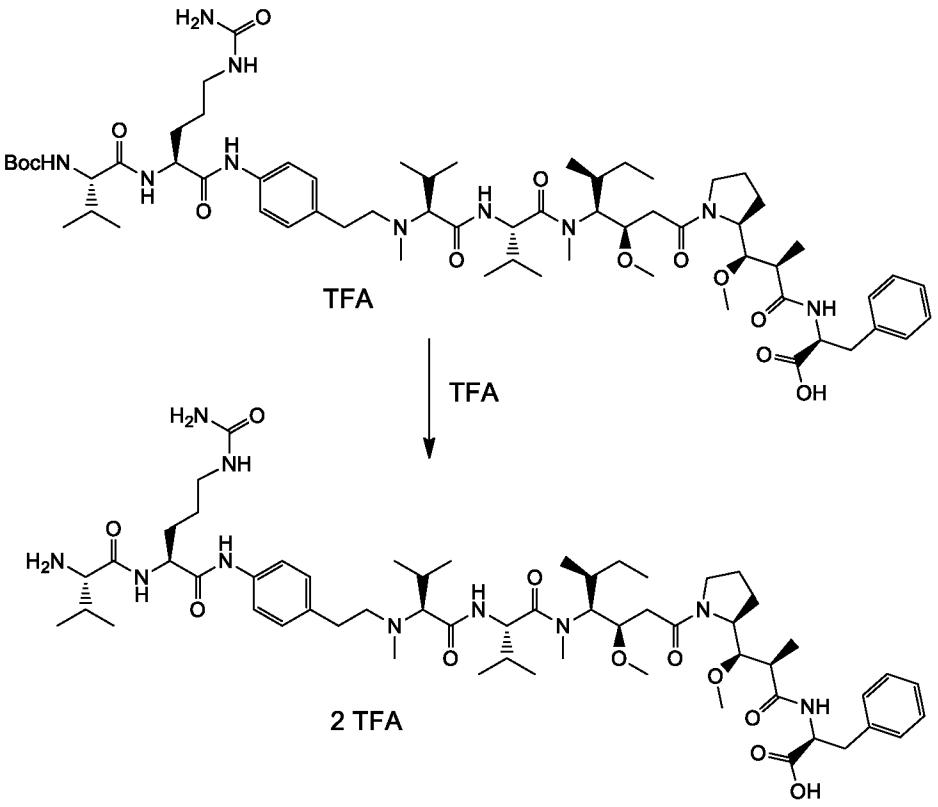


المركب رقم و-٦٣ -١: ((R٢، R٣) -٣- ((S) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S) -٢- ((S)) -٢- ((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((t-بيوتوكسي كربونيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانين



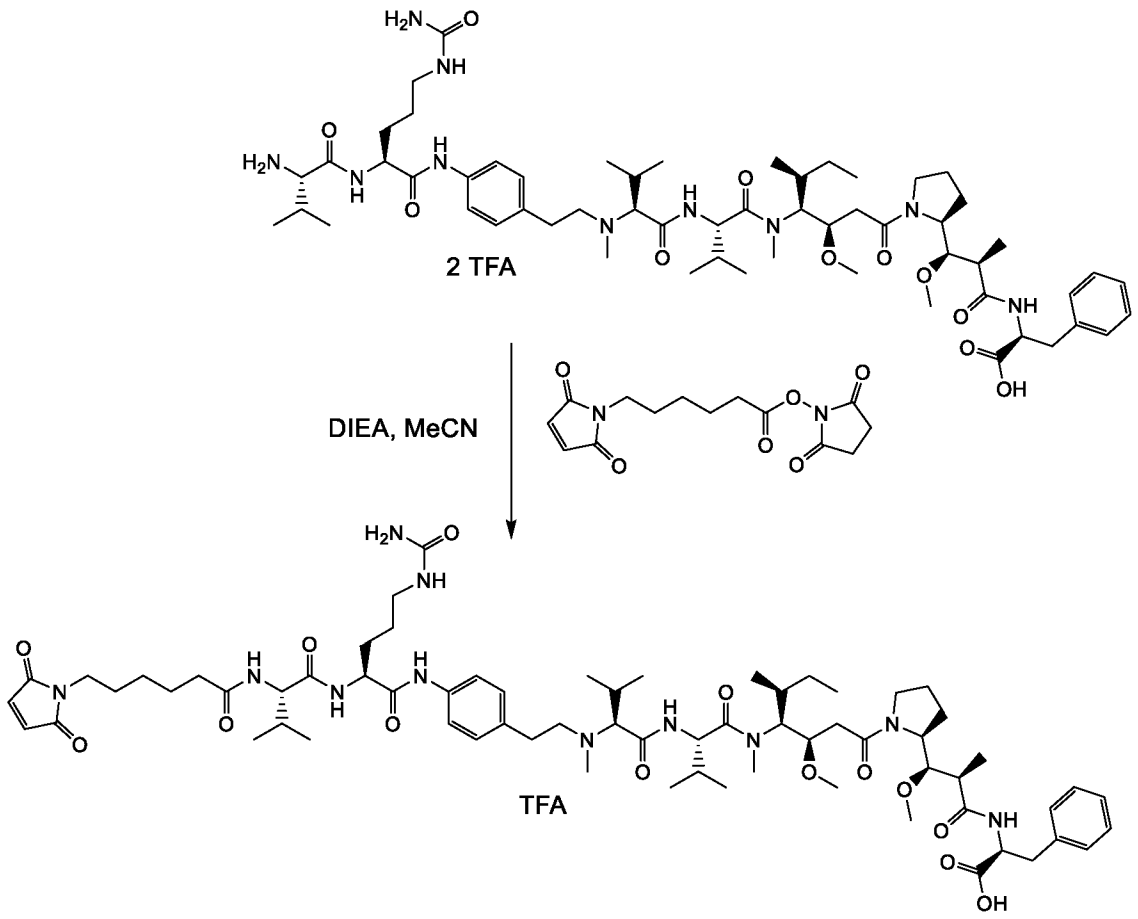
تمت إذابة المركب رقم و-٦٢ -١ (١٥٧ مجم، ٠,١١٨ ملي مول، ١ مكافئ) في خليط من الماء (٤,٥ مل)، الأسيتو نيتريل (٤,٥ مل) والبيريدين (٣,٥ مل) وتقليبه عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ ساعات. تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض وسحن المتبقي Et2O (٦٠ مل). تم تجميع المادة الصلبة بالترشيح وشطفها مرتين باستخدام Et2O (١٠ مل) للحصول على المركب و-٦٣ -١ في صورة مادة صلبة ذات لون أبيض ضارب إلى الصفرة (١٥٣ مجم، ١٠٠ %).

المركب رقم و-٦٣ -٢: ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- أمينو -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -٥- يوريدو بنتان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) - ٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) - L-فينيل ألانين بس ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



تمت إذابة المركب رقم و-٦٣ -١ (١٥٣ مجم، ٠,١٢٧ ملي مول، ١,٠ مكافئ) في TFA (٢٠٠ ميكرو لتر). بعد ١٠ دقيقة، تمت إضافة الماء (٢ مل) والأسيتو نيتريل (٠,٥ مل) وتجفيف المحلول بالتجميد طول الليل للحصول على المركب و-٦٣ -٢ في صورة مادة صلبة بيضاء (٣٤ مجم، ١٠٥ %).

المركب رقم و-٦٣:

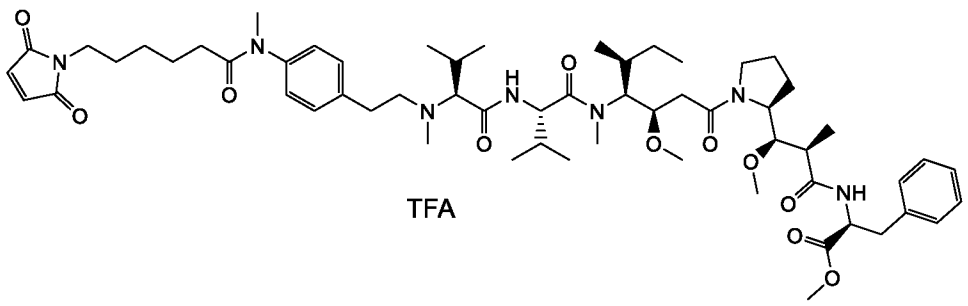


تمت إذابة أمين و-٦٣ -٢ (١٠٠ مجم، ٠,٠٨٢ ملي مول، ١ مكافئ) في خليط من الأسيتو نيتريل (٢ مل) وDMF (٠,٥ مل)، و: ٢، ٥-داي أوكسو بيروليدين-١-يل ٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسانوات (٤٥ مجم، ٠,١٤٧ ملي مول، ١,٨ مكافئ) وتمت إضافة DIEA (٧١ ميكرو لتر، ٠,٤٠٩ ملي مول، ٥ مكافئ). بعد التقليب عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٤,٥ ساعة، تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض. تمت تنقية المنتج الخام باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب و-٦٣ في صورة مادة صلبة بيضاء بعد (٤٢ مجم، ٣٦ %).

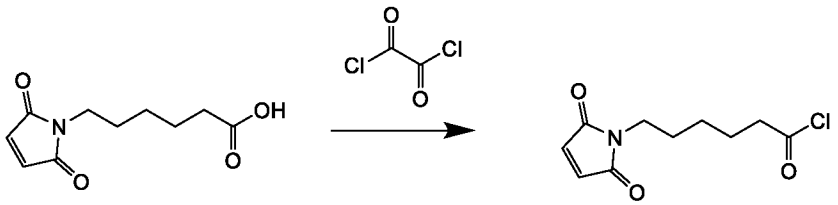
(Q-TOF MS ESI+) m/z ١٣٠٠,٧٩٠١ (٢ %، +MH، C68H106N11O14 يتطلب ١٣٠٠,٧٩١٥) ، ٦٥٠,٨٩٩٠ (١٠٠ %، +(MH2)2 ، C68H107N11O14 يتطلب ٦٥٠,٨٩٩٤).

المركب رقم ز-١٢

ميثيل ((R٢، R٣) -٣- ((S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- ((S)) -٢- ((S)) -٢- ((٤-(٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) -N- ميثيل هكسان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣-ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانينات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات

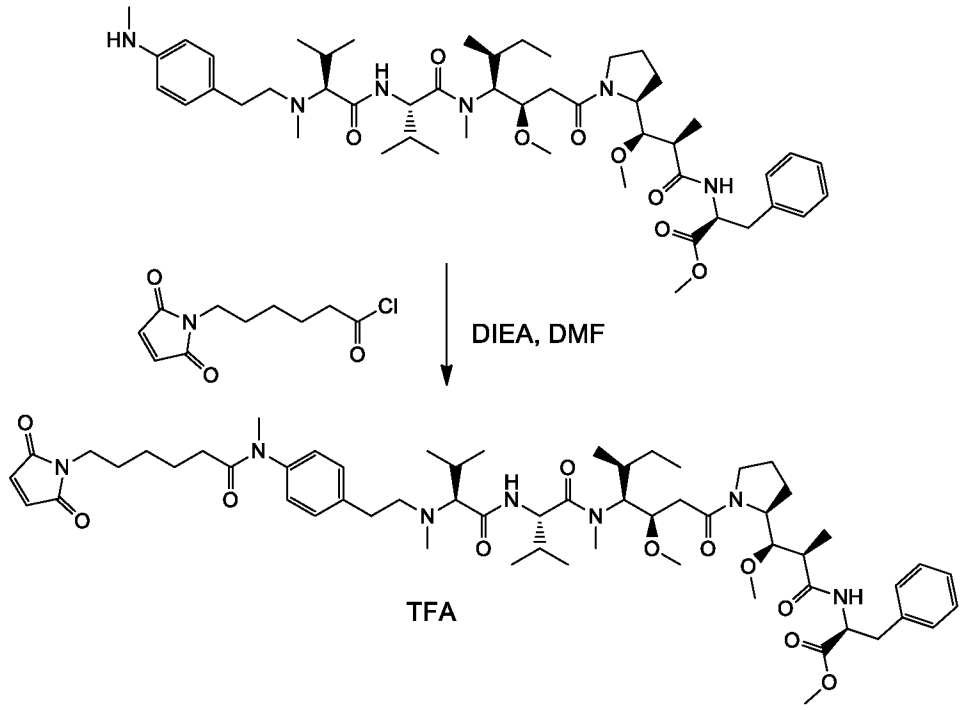


المركب رقم ز-١٢ -١: بنزيل N- (٤- أمينو فينيثيل) -N- ميثيل -L- ڤالينات داي هيدروكلوريد



إلى كلوريد الأوكزاليل (٣ مل) تمت إذابة ٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) حمض الهكسانويك (٢٠٠ مجم، ٠,٩٤٧ ملي مول، ١ مكافئ). تم تقليب المحلول عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٥ ساعات قبل التبخير حتى الجفاف تحت ضغط منخفض. تم الحصول على المركب رقم ز-١٢ -١ في صورة مادة صلبة ذات لون بيج (٢١٧ مجم، ١٠٠ %) وتم استخدامه في الخطوة التالية بدون تنقية.

المركب رقم ز-١٢:

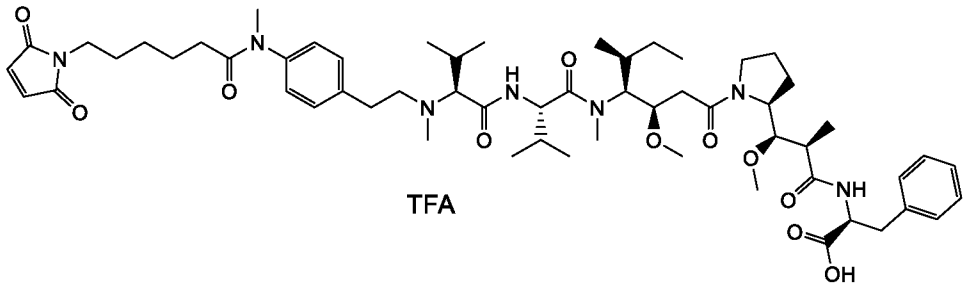


تمت إذابة أنيلين ١٢ (٤٠ مجم، ٠,٠٤٥ ملي مول، ١ مكافئ) في DCM جاف (١ مل) بتركيز ٠ °م وتمت إضافة DIEA (٨ ميكرو لتر، ٠,٠٤٥ ملي مول، ١ مكافئ). بعد التقليب لمدة ٣٠ دقيقة، محلول من المركب ز-١٢ -١ (١٠ مجم، ٠,٤٥ ملي مول، ١ مكافئ) في DCM جاف (١ مل) تم إدخال وتم تقليب خليط التفاعل لمدة ١ ساعة عند ٠ °م. تم تخفيف الخليط باستخدام DCM (٢٥ مل) وغسله مرتين باستخدام الماء (٢٠ مل)، مرة واحدة باستخدام محلول ملحي مركز (١٠ مل). تم تجفيف الطور العضوي باستخدام Na2SO4، وترشيحه وتبخيره تحت ضغط منخفض للحصول على المنتج الخام في صورة مادة صلبة ذات لون بني خفيف (٥٤ مجم). تمت تنقية هذه المادة باستخدام كروماتوجرافيا الوميض على هلام السليكا (DCM/MeOH) ويلي ذلك HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم تجفيف المنتج المعزول بالتجميد للحصول على مادة صلبة بيضاء (٢٣ محم)، تمت تنقيتها باستخدام HPLC تحضيري وتم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب ز-١٢ في صورة مادة صلبة بيضاء (٩ مجم، ١٦ %).

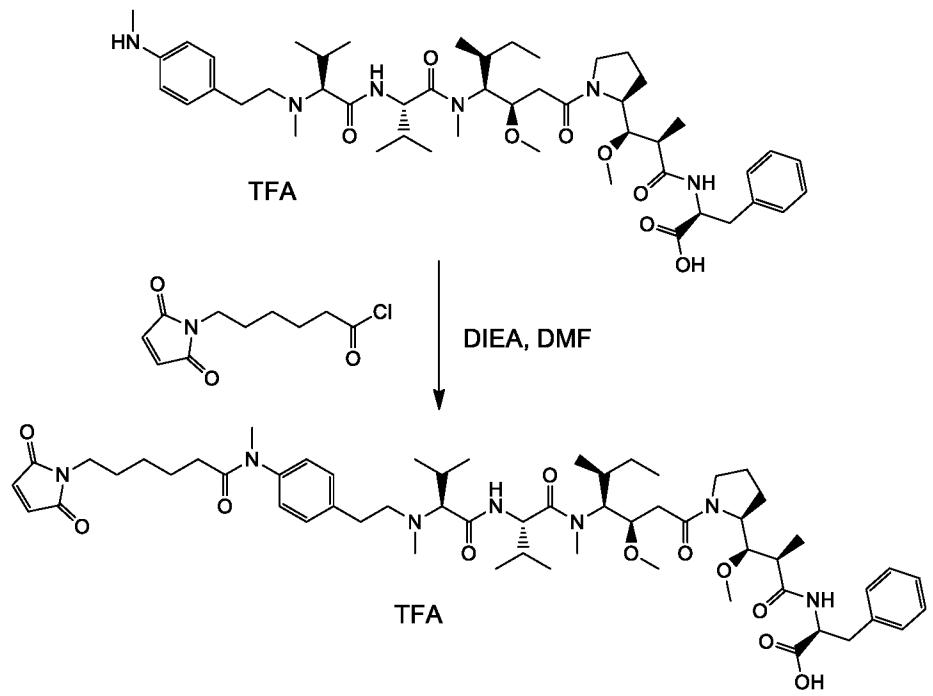
C59H89N7NaO11 ،MNa+ ،% ٢٠) ١٠٩٤,٦٥٤٣ (Q-TOF MS ESI+) m/z يتطلب ١٠٩٤,٦٥١٢) ، ١٠٧٢,٦٧٢٢ (١٦ %، +MH، C59H90N7O11 يتطلب ١٠٧٢,٦٦٩٣) ، ٥٣٦,٨٣٥٨ (١٠٠ %، +(MH2)2، C59H91N7O11 يتطلب ٥٣٦,٨٣٨٣).

المركب رقم ز-١٣

((R٢، R٣) -٣- (S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- (S)) -٢- (S)) -٢- ((٤- (٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) -N- ميثيل هكسان أميدو) فينيثيل) (ميثيل) أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L-فينيل ألانين ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



المركب رقم ز-١٣:



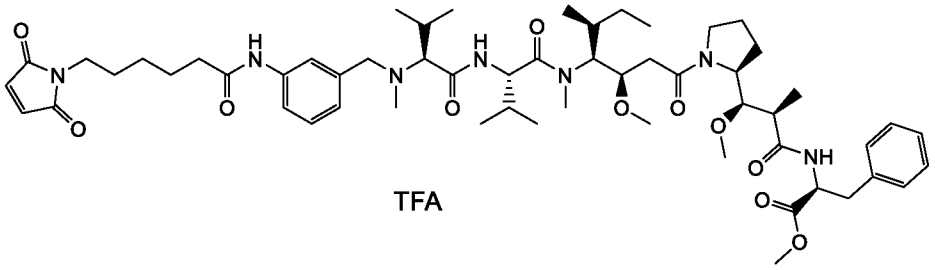
تمت إذابة أنيلين ١٣ (١٥ مجم، ٠,٠١٥ ملي مول، ١ مكافئ) في DCM جاف (١,٥ مل) بتركيز ٠ °م وتمت إضافة DIEA (٨ ميكرو لتر، ٠,٠٤٦ ملي مول، ٣ مكافئ). تم إدخال محلول من المركب ز-١٢ -١ (٣,٥ مجم، ٠,٠٤٦ ملي مول، ١ مكافئ) في DCM جاف (٠,٥ مل) وتم تقليب خليط التفاعل لمدة ١,٥ ساعة عند ٠ °م. تم تبخير المذيب تحت ضغط منخفض وتمت تنقية المنتج الخام باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب ز-١٣ في صورة مادة صلبة بيضاء (١١,٤ مجم، ٦٢ %).

m/z (Q-TOF MS ESI+) ١٠٥٨,٦٥١٠ (٣٠ %، +MH، C58H88N7O11 يتطلب ١٠٥٨,٦٥٣٦) ، ٥٢٩,٨٢٨٥ (١٠٠ %، +(MH2)2 ، C58H89N7O11 يتطلب ٥٢٩,٨٣٠٥).

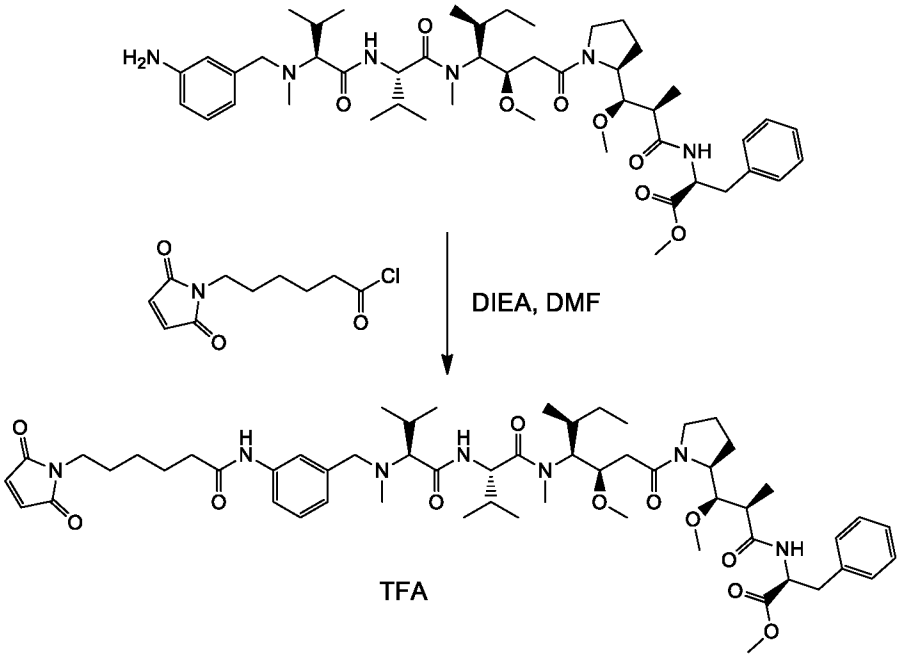
المركب رقم ز-١٥

ميثيل ((R٢، R٣) -٣- (S)) -١- ((R٣، S٤، S٥) -٤- (S)) -٢- (S)) -٢- ((٣-(٦- (٢، ٥-دايوكسو-٢، ٥-داي هيدرو-H١-بيرول-١-يل) هكسان أميدو) بنزيل) (ميثيل)

أمينو) -٣- ميثيل بيوتان أميدو) -N، ٣- داي ميثيل بيوتان أميدو) -٣- ميثوكسي -٥- ميثيل هبتانويل) بيروليدين-٢-يل) -٣- ميثوكسي -٢- ميثيل بروبانويل) -L- فينيل ألانينات ٢، ٢، ٢- تراي فلورو أسيتات



المركب رقم ز-١٥:



تمت إذابة أنيلين ١٥ (٤٠ مجم، ٠,٠٤٧ ملي مول، ١ مكافئ) في DCM جاف (٢ مل) بتركيز ٠ °م وتمت إضافة DIEA (١٠ ميكرو لتر، ٠,٠٥٦ ملي مول، ١,٢ مكافئ). تم إدخال محلول من المركب ز-١٢ -١ (١٠٨ مجم، ٠,٤٧ ملي مول، ١٠ مكافئ) في DCM جاف (١ مل) وتم تقليب خليط التفاعل لمدة ١,٥ ساعة عند ٠ °م. تم تخفيف الخليط باستخدام DCM (١٠ مل) وغسله مرتين باستخدام الماء (٥ مل). تم تجفيف الطور العضوي باستخدام MgSO4، وترشيحه وتبخيره تحت ضغط منخفض للحصول على المنتج الخام في صورة مادة صلبة ذات لون بيج. تمت تنقية هذا المركب باستخدام HPLC تحضيري (Waters 600E، عمود SunFire Prep

C18 OBD، ٥ ميكرو متر، ١٩ ×١٠٠ ملي متر؛ طور الشطف: ماء/ MeCN منظم باستخدام ٠,١ % TFA؛ تدريج يبلغ ٥ % إلى ١٠٠ % MeCN خلال ١٥ دقيقة؛ كاشف عن الأشعة فوق البنفسجية Waters 2487 عند ٢٢٠ نانو متر). تم دمج الأجزاء المختارة وتجفيفها بالتجميد للحصول على المركب ز١٥ في صورة مادة صلبة بيضاء (٢٧ مجم، ٥٠ %).

m/z (Q-TOF MS ESI+) ١٠٦٦,٦٥١٧ (٢ %، +MNa، C57H85N7NaO11 يتطلب ١٠٦٦,٦١٩٩) ، ٥٢٢,٨٢٢٤ (١٠٠ %، +(MH2)2 ، C57H87N7O11 يتطلب ٥٢٢,٨٢٢٦).

مثال رقم ١٧: تخليق ADC، وتنقيته وتحديده

ينطبق الإجراء الذي سيتم شرحه على الصور متخالفة الصبغيات والمتوافقة مع البشر من IgG1يجب إدراك أنه بالنسبة لأي أي صور أخرى، مثل IgG2، IgG4، إلخ، سوف يكون الفرد المتمرس في هذا المجال قادرا على اتباع هذا الإجراء باستخدام المعلومات العامة.

تم اختزال الأجسام المضادة (١-٥ مجم/ مل) جزئيا باستخدام Tris (٢- كربوكسي إيثيل) فوسفين هيدروكلوريد (TCEP) في ١٠ ملي مولار محلول بورات منظم عند رقم هيدروجيني ٨,٤ يحتوي على ١٥٠ ملي مولار NaCl و: ٢ ملي مولار EDTA لمدة ٢ ساعة عند ٣٧ °م. على وجه التحديد، تم استخدام ٢,٥-٣ مولار مكافئ من TCEP لاستهداف نسب بين العقار والجسم المضاد (DAR) في حدود ٤، بالترتيب. تم تأكيد الاختزال الجزئي للجسم المضاد بواسطة تحليل SDS-PAGE في ظروف غير اختزالية. قبل إقران الرابط -العقار بالوحدات البنائية للسيستيين المنطلقة بين السلاسل، سمح لخليط الاختزال بأن يبرد إلى درجة حرارة الغرفة. تم عندئذ ضبط تركيز الجسم المضاد ليكون ١ مجم/ مل باستخدام ١٠ ملي مولار من محلول البورات المنظم عند رقم هيدروجيني ٨,٤ المحتوي على ١٥٠ ملي مولار NaCl و: ٢ ملي مولار EDTA، وتمت إضافة زيادة مولارية من العقار بين العقار والجسم المضاد تبلغ ٥ من محلول ١٠ ملي مولار في داي ميثيل سلفوكسيد (DMSO). تم ضبط التركيز النهائي ليكون ١٠ % للحفاظ على ذوبانية العقار في الوسط المائي أثناء الإقران. تم تنفيذ التفاعل لمدة ١ ساعة عند درجة حرارة الغرفة. تم إخماد الزيادة في العقار بإضافة ١,٥ مول من N- أسيتيل سيستيين لكل مول من العقار والحضانة لمدة

١ ساعة عند درجة حرارة الغرفة. بعد الفرز الغشائي مقابل محلول منظم His ٢٥ ملي مولار عند رقم هيدروجيني ٦,٥ يحتوي على ١٥٠ ملي مولار NaCl طول الليل عند ٤ °م، تمت تنقية مترافق الجسم المضاد- العقاقير باستخدام طرق معروفة للفرد التمرس في هذا المجال تعتمد على أعمدة كروماتوجراف متوفرة تجاريا ووحدات ترشيح فائق. أولا، تمت إزالة العقار غير المرتبط وتكتلات ADC بواسطة كروماتوجرافيا استبعاد الحجم (SEC) على عمود S200 من (GE Life Sciences) أو TSK G3000 SW من (Tosoh). تم عندئذ تركيز مونومرات ADC النقية إلى ٢-٣ مجم/ مل بالترشيح الفائق باستخدام وحدات ترشيح MWCO ٣٠ أو ٥٠ كيلو دالتون أو بواسطة كروماتوجرافيا الألفة على Protein A. تم تخزين ADCs النقية عند ٤ °م بعد الترشيح والتعقيم على مرشح ٠,٢ ميكرو متر. تم عمل المزيد من التحليل لهم باستخدام SDS-PAGE في ظروف اختزالية وغير اختزالية لتأكيد ترافق العقار وبواسطة SEC على أعمدة S200 أو TSK G3000 SWXL لتحديد محتوى المونومرات والصور المتكتلة. تم تحديد تركيزات البروتين باستخدام اختبار حمض البيكينكونينيك (BCA) مع IgG كمستوى قياسي. تم تقييم DAR لكل ADC نقي بواسطة HIC وLC-MS. على وجه التحديد، كانت كمية الصور المتكتلة أقل من ٥ % وكانت DAR بين ٣,٥ و: ٥.

مثال رقم ١٨: تقييم السمية الخلوية للأجسام المضادة لـ IGF-1R المقترنة مع عقاقير مختلفة

١٨-١ تقييم الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات على خلايا MCF-7

اتضح أن الأجسام المضادة الخمسة لـ IGF-1R يتم إدخالها بسرعة إلى جسيمات الحل وأن لها قدرة ربط منخفضة في الأوساط الحمضية. في هذا الصدد، يوجد في Abs هذه كل البروتينات المطلوب استخدامها باعتبارها ADCs. بذلك، تم إقران الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات الخمسة لـ IGF-1R بثلاثة مركبات مختلفة (ز-١٣؛ هـ -١٣ و: -٦٣). كانت النسبة بين العقار والجسم المضاد في هذه الـ ADCs حوالي ٤. لتقييم السمية الخلوية غير النوعية، تم أيضا إقران جسم مضاد متخالف الصبغيات غير ذي صلة C9G4 مع تلك المركبات بنفس DAR. تمت حضانة خلايا MCF-7 باستخدام تركيزات متزايدة من كل ADCs عند ٣٧ °م لمدة ٦ أيام في وسط مزرعة كامل. تم تقييم قدرة الخلايا على البقاء باستخدام اختبار قدرة الخلية المضيئة على البقاء (CellTiter-Glo, Promega). تمت قراءة الإشارة الضوئية باستخدام قارئ الأطباق

Mithras من (Berthold Technologies). أظهر الجسم المضاد متخالف الصبغيات غير ذي الصلة C9G4 المقترن مع هـ -١٣، ز-١٣ أو و-٦٣ سمية خلوية ضعيفة أو منعدمة على خلايا MCF-7 (شكل رقم ٢١). على العكس من ذلك، فإن إضافة كل ADCsالأخرى التي تم الحصول عليها بعد إقران الأجسام المضادة لـ IGF-1R مع هـ -١٣، ز-١٣ أو و-٦٣ قد قلل بدرجة كبيرة من قدرة خلايا MCF-7 على البقاء.

٢-١٨ تقييم الأجسام المضادة متخالفة الصبغيات على الخلايا الطبيعية

مستويات التعبير لـ IGF-1R تم تقييم على خلايا طبيعية أولية (PromoCell GmbH) باستخدام c208F2 mAb. لهذا السبب، تمت حضانة الخلايا (٠,٥×١٠٦ خلية/ مل) باستخدام ١٠ ميكرو جرام/ مل من الجسم المضاد c208F2 لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤ °م في محلول منظم FACS (PBS، ٠,١ % BSA، ٠,٠١ % NaN3). تم عندئذ غسلها ٣ مرات وتمت حضانتها باستخدام الجسم المضاد الثانوي المناسب المقترن مع Alexa 488 لمدة ٢٠ دقيقة أخرى عند ٤ °م في الظلام قبل غسلها ٣ مرات في محلول منظم FACS. تم فورا تنفيذ ربط الجسم المضاد المذكور في iGF-1R على خلايا قابلة للبقاء تم تحديدها باستخدام يوديد البروبيديوم (الذي يبقع الخلايا الميتة). كان مستوى التعبير (Bmax) منخفضا على الخلايا الطبيعية (جدول رقم ١٤) بالمقارنة بالتعبير عن IGF-1R على خلايا MCF-7 (أنظر المثال ٢، جدول ٨).

جدول رقم ١٤

الخلايا الطبيعية	Bmax
خلايا بطانية من الأورطي البشري (HAoEC)	٢١
خلايا بطانية من الأوعية الرئوية الدقيقة في البشر (HPMEC)	٣٣
خلايا العضلة الملساء في الشعب في البشر (HBSMC)	٢٦
خلايا بطانية من الكلية البشرية (HREpC)	١١٠
خلايا الظهارة البولية في البشر (HUC)	١٨١

تم تقييم السمية الخلوية لـ ADC c208F2-G-13 على الخلايا الطبيعية. تمت حضانة الخلايا بتركيزات متزايدة c208F2-G-13 عند ٣٧ °م لمدة ٦ أيام في وسط مزرعة كامل. تم تقييم قدرة الخلايا على البقاء باستخدام اختبار قدرة الخلية المضيئة على البقاء (CellTiter-Glo, Promega). تمت قراءة الإشارة الضوئية باستخدام قارئ أطباق Mithras من (Berthold Technologies). لم تتم ملاحظة سمية خلوية كبيرة على HBSMC، HPMEC، HAoEC وHREpC (شكل رقم ٢٥). تم قياس سمية خلوية منخفضة على HUC عند تركيزات مرتفعة فقط من c208F2-G-13.

٣-١٨ تقييم الصور المتوافقة مع البشر من hz208F2

الصور الستة عشرة المتوافقة مع البشر من 208F2 تم إقرانها مع المركب ز-١٣. النسبة بين العقار والجسم المضاد لهذه الـ ADCs كانت حوالي ٤. لتقييم السمية الخلوية غير النوعية، تم أيضا إقران الجسم المضاد متخالف الصبغيات غير ذي الصلة C9G4 مع تلك المركبات بنفس الـ DAR. تم أيضا إقران الجسم المضاد متخالف الصبغيات مع MCF-7 .G-13. تمت حضانة خلايا MCF-7 باستخدام تركيزات متزايدة من كل ADCs عند ٣٧ °م لمدة ٦ أيام في وسط مزرعة كامل. تم تقييم قدرة الخلايا على البقاء باستخدام اختبار قدرة الخلية المضيئة على البقاء (CellTiter-Glo, Promega). تمت قراءة الإشارة الضوئية باستخدام قارئ الأطباق Mithras من (Berthold Technologies). أظهر الجسم المضاد متخالف الصبغيات غير ذي الصلة C9G4 المقترن مع ز-١٣ سمية خلوية ضعيفة أو منعدمة على خلايا MCF-7 (شكل رقم ٢٦). على العكس من ذلك، فإن إضافة كل ADCsالأخرى التي تم الحصول عليها بعد إقران الأجسام المضادة لـ IGF-1R مع ز-١٣ قد قلل بدرجة كبيرة من قدرة خلايا MCF-7 على البقاء. قدرة الصور الستة عشرة المتوافقة مع البشر على حث السمية الخلوية كانت على الأقل مكافئة بصورة أفضل من تلك المقاسة بواسطة الصورة متخالفة الصبغيات c208F2-G-13كما هو مبين في جدول رقم ١٥ والموضح لصورة واحدة متوافقة مع البشر في شكل ٢٦.

جدول رقم ١٥

EC50

MAb متخالف الصبغيات	c208F-G-13	١١-١٠×٩,٠
الصور المتوافقة مع البشر	Hz208F2 (H026/L024) -G-13	١٠-١٠×١,١
	Hz208F2 (H037/L018) -G-13	١١-١٠×٣,٧
	Hz208F2 (H047/L018) -G-13	١١-١٠×٤,٤
	Hz208F2 (H049/L018) -G-13	١١-١٠×٦,٦
	Hz208F2 (H051/L018) -G-13	١١-١٠×٣,٦
	Hz208F2 (H052/L018) -G-13	١١-١٠×٣,٤
	Hz208F2 (H057/L018) -G-13	١١-١٠×٥,٢
	Hz208F2 (H068/L018) -G-13	١١-١٠×٦,٢
	Hz208F2 (H070/L018) -G-13	١١-١٠×٥,٧
	Hz208F2 (H071/L018) -G-13	١١-١٠×٨,٥

Hz208F2 (H076/L018) -G-13	٥,٣×١٠-١١
Hz208F2 (H077/L018) -G-13	٣,٠×١٠-١١
Hz208F2 (H037/L021) -G-13	٣,٩×١٠-١١
Hz208F2 (H049/L021) -G-13	٥,٢×١٠-١١
Hz208F2 (H052/L021) -G-13	٣,٧×١٠-١١
Hz208F2 (H076/L021) -G-13	٤,٥×١٠-١١

مثال رقم ١٩: النشاط في الجسم الحي للحسم المضاد c208F2 المترافق مع مركبات هـ -١٣، ز-١٣ أو و-٦٣ في نموذج التطعيم الخارجي لـ MCF-7.

لتأكيد الفعالية في الجسم الحي لـ c208F2 المقترن بمركبات ز-١٣، هـ -١٣ أو و-٦٣ يمكن الترجمة الوراثية عنها في الجسم الحي، تم اختبارها في نموذج التطعيم الخارجي لـ MCF-7.

٥ تم تنفيذ كل الإجراءات الخاصة بالحيوان وفقا لإرشادات دليل 2010/63/UE بخصوص حماية الحيوانات المستخدمة للأغراض العلمية. البروتوكول مصدق عليه بواسطة Animal Ethical Committee في Pierre Fabre Institute. تم حقن خمسة مليون خلية MCF-7 تحت الجلد في ٧ فئران سن ٥ أسابيع من نوع Swiss/Nude. قبل الحقن بالخلايا، تم غرس حبيبات الأويستروجين (Innovative Research of America) في الجهة اليسرى في الفئران لإطلاق ١٠ الأويستروجين اللازم لنمو أورام MCF-7 في الجسم الحي.

بعد عشرين يوما من استزراع خلايا MCF-7، عندما وصلت الأورام إلى حجم متوسط يبلغ ١٢٠-١٥٠ مم٣، تم تقسيم الحيوانات إلى مجموعات كل منها ٥ فئران وفقا لحجم الورم ومظهره. تم تلقيح العلاجات المختلفة بالحقن في البريتون. تمت مراقبة الحالة الصحية للحيوانات يوميا. تم قياس حجم الورم مرتين أسبوعيا باستخدام وسيلة إلكترونية حتى انتهاء الدراسة. يتم حساب حجم الورم بالصيغة التالية: π/٦ × طول× عرض × ارتفاع. تم تقيم السمية بوزن الحيوانات ثلاث مرات في الأسبوع. تم تنفيذ التحليلات الإحصائية عند كل قياس باستخدام اختبار Mann-Whitney. تم حقن كل المركبات في البريتون. في هذا المثال، تم تقييم النشاط المضاد للبشر لـ c208F2 mAb المقترن مع هـ -١٣، و-١٣ أو و-٦٣ عند حوالي ٤DAR بعد الحقن مرتين لـ ٧ مجم/ كجم جرعة عند اليوم ٢٠ واليوم ٢٧ (شكل رقم ٢٢ أ، ٢٢ ب و: ٢٢ ج). في نفس الوقت تم حقن الأجزاء المغطاة بالعقاقير هـ -١٣، و-١٣ و: و -٦٣ بجرعة مكافئة من المركب الذي يناظر ٧ مجم/ كجم من c208F2-E-13، c208F2-F-13، c208F2-F-63 DAR حوالي ٤.

الحقن بـ c208-E-13 (شكل رقم ٢٢ أ)، c208F2-G-13 (شكل رقم ٢٢ ب) أو c208F2-F-63 (شكل رقم ٢٢ ج) ثبط بصورة كبيرة بل وحث على تراجع كامل للورم (p أصغر من ٠,٠٥ مقابل العقار المغطى المناظر). لم تتم ملاحظة فرق إحصائي كبير بين c208-E-13،c208F2-G-13 ، c208F2-F-63. لم يكن للعقاقير المغطاة أي تأثير على نمو ورم MCF-7 (p أكبر من ٠,٠٥ مقابل عينة المقارنة).

تم تنفيذ مجموعة ثانية من التجارب باستخدام c208F2 المقترن مع هـ -١٣ أو ز-١٣ ومع الجسم المضاد غير ذي الصلة C9G4 المقترن مع هـ -١٣ أو ز-١٣ في نماذج التطعيم الخارجي لـ MCF-7 كما سبق شرحه. تم حقن الفئران في البريتون بـ ٧ مجم/ كجم من كل ADCs عند اليوم ٢٠ واليوم ٢٧ (الأشكال ٢٣ أ و: ٢٣ ب).

حقن كل من C9G4-E-13 وC9G4-F-13 أثر بصورة متوسطة ومؤقتة في أورام الطعم الخارجي MCF-7. مع ذلك، أكدت هذه التجربة الثانية أن عمليات الحقن بـ c208-E-13 أو c208F2-G-13 قد حثت حدوث تراجع كبير للورم منذ اليوم ٤٣ مما يوضح النشاط الكبير المضاد للورم لـ ADCs.

مثال رقم ٢٠: النشاط في الجسم الحي للجسم المضاد hz208F2 المترافق مع مركب ز-١٣ في نموذج الطعم الخارجي MCF-7 +3.

تم تقييم الصور المتوافقة مع البشر من 208F2 المقترنة بمركب ز-١٣ في الجسم الحي، في نموذج التطعيم الخارجي لـ MCF-7.

تم تنفيذ كل الإجراءات الخاصة بالحيوان وفقا لإرشادات دليل 2010/63/UE بخصوص حماية الحيوانات المستخدمة للأغراض العلمية. البروتوكول مصدق عليه بواسطة Animal Ethical Committee في Pierre Fabre Institute. تم حقن خمسة مليون خلية MCF-7 تحت الجلد في ٧ فئران سن ٥ أسابيع من نوع Swiss/Nude. قبل الحقن بالخلايا، تم غرس حبيبات الأويستروجين (Innovative Research of America) في الجهة اليسرى في الفئران لإطلاق الأويستروجين اللازم لنمو أورام MCF-7 في الجسم الحي.

بعد عشرين يوما من استزراع خلايا MCF-7، عندما وصلت الأورام إلى حجم متوسط يبلغ ١٢٠-١٥٠ مم٣، تم تقسيم الحيوانات إلى مجموعات كل منها ٦ فئران وفقا لحجم الورم ومظهره. تم تلقيح العلاجات المختلفة بالحقن في البريتون ببروتوكول من ٤ مرات حقن، مرة واحدة كل ٤ أيام. تمت مراقبة الحالة الصحية للحيوانات يوميا. تم قياس حجم الورم مرتين أسبوعيا باستخدام وسيلة إلكترونية حتى انتهاء الدراسة. يتم حساب حجم الورم بالصيغة التالية: $\pi/٦ \times$ طول$\times$ عرض $\times$ ارتفاع. تم تقيم السمية بوزن الحيوانات ثلاث مرات في الأسبوع. تم تنفيذ التحليلات الإحصائية عند كل قياس باستخدام اختبار Mann-Whitney. تم حقن كل المركبات في البريتون. في هذا المثال، تم تقييم النشاط المضاد للبشر لـ C-208F2 mAb المقترن مع ز -١٣ مع الصور المختلفة المتوافقة مع البشر المقترنة أيضا بـ ز ١٣ (شكل رقم ٢٧). تم شرح الصور المتوافقة مع البشر التي تم اختبارها في جدول رقم ١٦ التالي:

جدول رقم ١٦

الصور المتوافقة مع البشر	VH/VL المناظرة	الاسم لصورة hz	الآخر	ADC المناظرة

208F2_085hz0107 (G1)	H057/L018	لا ينطبق	Hz208F2 (H057/L018) -G-13
208F2_085hz0119 (G1)	H070/L018	لا ينطبق	Hz208F2 (H070/L018) -G-13
208F2_085hz0126 (G1)	H077/L018	Hz208F2-4	Hz208F2 (H077/L018) -G-13
208F2 (VH3VL3)	H026/L024	لا ينطبق	Hz208F2 (H026/L024)-G-13

الحقن بـ c208-G-13، أو 208F2 ثبط بصورة كبيرة بل وحث على تراجع كامل للورم (p أصغر من ٠,٠٥ مقابل العقار المستخدم في المقارنة). لم تتم ملاحظة فرق إحصائي كبير بين C-208-F2-G-13، والصور المتوافقة مع البشر.

تم تنفيذ مجموعة ثانية من التجارب باستخدام c208F2 أو hz208F2-4 المقترن مع ز-١٣ في نماذج التطعيم الخارجي لـ MCF-7 كما سبق شرحه. (الأشكال ٢٨ أ و: ٢٨ ب بالترتيب). تم حقن الفئران في البريتون بـ ٣ مجم/ كجم من كل ADCs، كل أربع أيام بأربع مرات حقن أو مرة واحدة فقط.

تمت ملاحظة نفس التأثير القور المضاد للورم عند حقن ADC أربع مرات أو مرة واحدة فقط في نموذج التطعيم الخارجي لـ MCF.

مثال رقم ٢١: النشاط في الجسم الحي للجسم المضاد 208F2 المترافق مع مركبات ز-١٣ أو هـ -١٣ في نموذج التطعيم الخارجي لـ CaOV-3 +2.

تمت أيضا دراسة النشاط المضاد للورم في ٢+ من الأورام المعبرة، وهو نموذج تطعيم خارجي CaOV-3 عبارة عن سلالة خلية ورم سرطاني في المبيض. لهذا الغرض، تم حقن الفئران تحت الجلد في اليوم ٠ بـ ٧×١٠ ٦ خلية. عندما تصل الأورام إلى حوالي ١٢٠ مم٣ (١٩ يوما بعد لحقن بخلايا الورم)، تم تقسيم الحيوانات إلى ٥ مجموعات من ٥ فئران ذات حجم متقارب للورم

ومعالجتها في البريتون بـ c208F2 المقترن مع هـ -١٣ أو ز-١٣ ومع الجسم المضاد غير ذي الصلة C9G4 المقترن مع هـ -١٣ أو ز-١٣. تم حقن الفئران في البريتون بـ ٣ مجم/ كجم من كل ADCs بـ ٦ دورات حقن؛ مرة واحدة في اليوم. تمت متابعة الفئران لملاحظة معدل نمو الطعم الخارجي. تم حساب حجم الورم بالصيغة: π/٦ × الطول × العرض × الارتفاع.

٥ بالمقارنة بـ C9G4-E-13 التي حثت بصورة متوسطة أو مؤقتة إبطاء نمو الورم، فإن الحقن بـ C9G4-G-13 لم يؤثر في نمو أورام الطعم الخارجي CaOV-3. في نفس الوقت، فإن عمليات الحقن بـ c208F2-E-13 أو c208F2-G-13 قد حثت ٩٥ % و: ٧٧ % بالترتيب في تثبيط نمو الورم في اليوم ٥٠ (الأشكال ٢٩ أ و: ٢٩ ب).

عناصر الحماية

١. مترافق من جسم مضاد-عقار له الصيغة التالية (I):

Ab- (L-D) n

(I)

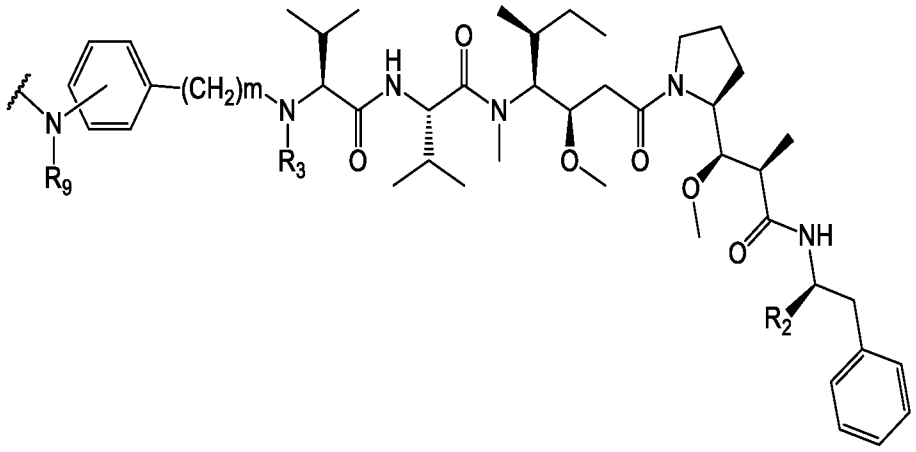
أو ملح مقبول صيدلانيا منه،

حيث

Ab هو جسم مضاد، أو شظية رابطة لمولد الضد منه، قادرة على الارتباط مع IGF-1R البشري حيث يشتمل الجسم المضاد المذكور على الـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ١، ٢ و ٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٤، ٥ و ٦؛

L هي رابط؛

D هي جزء عقار له الصيغة التالية (II):



(II)

حيث:

R2 هي COOH، COOCH3 أو ثيازوليل؛

R3 هي H أو (C1-C6) ألكيل؛

R9 هي H أو (C1-C6) ألكيل؛

m هي عدد صحيح يتراوح بين ١ و ٨؛

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع L؛ و

n هي ١ إلى ١٢.

٢. مترافق الجسم المضاد– العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١، حيث يتم اختيار Ab من:

أ) جسم مضاد يشتمل على الـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و ٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و ١١؛

ب) جسم مضاد يشتمل على الـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ١٠، ٥ و ١١؛

ج) جسم مضاد يشتمل على الـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و ١٢؛ و

د) جسم مضاد يشتمل على الـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٨، ٢ و ٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و ١١.

٣. مترافق الجسم المضاد– العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١ أو ٢، حيث يتم اختيار Ab من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٣ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و ١١؛

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٤ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ١٠، ٥ و ١١؛

ج) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٥ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و ١٢؛

د) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٦ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و ١١؛ و

هـ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ١٧ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي لها المتوالية رقم ٩، ٥ و ١٢.

٤. مترافق الجسم المضاد– العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١ أو ٢، حيث يتم اختيار Ab من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ١٨ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و ٣؛

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ١٩ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و ٣؛

ج) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢٠ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و٣؛

د) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢١ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٨، ٢ و ٣؛ و

هـ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٢ ٢ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الثقيلة التي لها المتوالية رقم ٧، ٢ و ٣.

٥. مترافق الجسم المضاد– العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١، حيث يتم اختيار Ab من الأجسام المضادة 208F2، 212A11، 214F8، 219D6 و 213B10.

٦. مترافق الجسم المضاد– العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١، حيث يشتمل Ab على:

أ) مجال متغير لسلسلة ثقيلة (VH) للمتوالية رقم ٣٣ حيث تشتمل هذه المتوالية رقم ٣٣ على الأقل على ١ طفرة عكسية يتم اختيارها من الوحدات البنائية ٢٠، ٣٤، ٣٥، ٣٨، ٤٨، ٥٠، ٥٩، ٦١، ٦٢، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٧، ٧٩، ٨٢و ٩٥؛ و

ب) مجال متغير لسلسلة خفيفة (VL) للمتوالية رقم ٣٥، حيث تشتمل هذه المتوالية رقم ٣٥ على الأقل على ١ طفرة عكسية يتم اختيارها من الوحدات البنائية ٢٢، ٥٣، ٥٥، ٦٥، ٧١، ٧٢، ٧٧ أو ٨٧.

٧. مترافق الجسم المضاد– العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١، حيث يتم اختيار Ab من:

أ) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ و: ٨٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتوالية رقم ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ أو ٨٠؛ والـ CDRs الثلاثة للسلسلة الخفيفة التي بها المتواليات أرقام ٩، ٥ و: ١١؛

ب) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة خفيفة بها متوالية التي يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠؛ والـ CDRs الثلاثة التي لها سلسلة ثقيلة للمتواليات أرقام ٧، ٢ و ٣؛ و

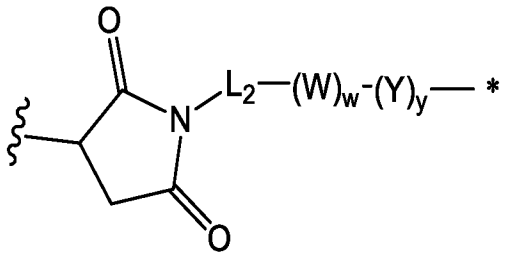
ج) جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ و: ٨٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٦، ٦٢، ٦٤، ٦٦، ٦٨، ٧٠، ٧٢، ٧٤، ٧٦، ٧٨ أو ٨٠؛ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠ أو أي متوالية بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٧ أو ٦٠.

٨. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١، حيث يشتمل Ab على:

أ) سلسلة ثقيلة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٨، ٦٣، ٦٥، ٦٧، ٦٩، ٧١، ٧٣، ٧٥، ٧٧، ٧٩ و: ٨١ أو أي سلسلة بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٨، ٦٣، ٦٥، ٦٧، ٦٩، ٧١، ٧٣، ٧٥، ٧٧، ٧٩ أو ٨١.

ب) سلسلة خفيفة بها متوالية يتم اختيارها من المتواليات أرقام ٥٩ و ٦١ أو أي سلسلة بها على الأقل ٨٠ % تطابُق مع المتواليات أرقام ٥٩ أو ٦١.

٩. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقا لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث تكون L هي رابط له الصيغة التالية (III):



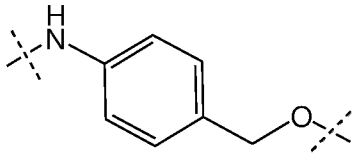
(III)

حيث

L2 هي (C4-C10) سيكلو ألكيل كربونيل، (C2-C6) ألكيل، (C2-C6) ألكيل -كربونيل،

W هي وحدة حمض أميني؛ w هي عدد صحيح يتراوح بين ٠ و ٥؛

Yهي PAB-كربونيل حيث تكون PAB؛



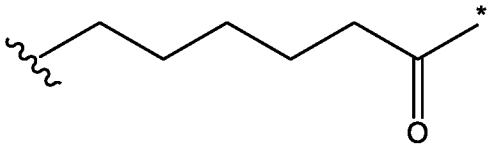
y هي ٠ أو ١؛

تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع D؛ و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع Ab.

٥

١٠. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ٩، حيث يكون لـ L2 الصيغة:

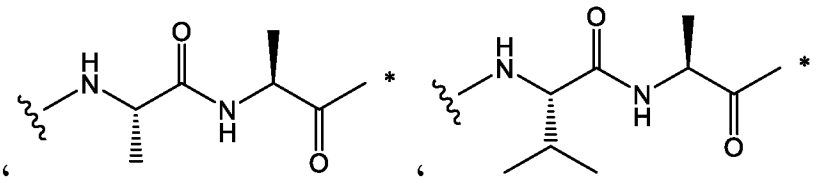


حيث

تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع w(W)؛ و

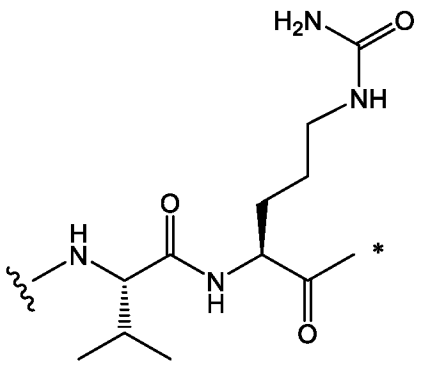
١٠ الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع ذرة النيتروجين في جزء الماليميد malemimid moiety.

١١. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ٩، حيث w(W) يتم اختيارها من:



رابطة مفردة،

و،



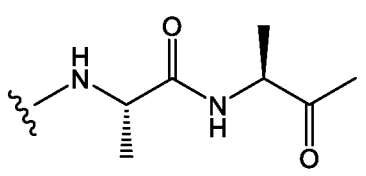
١٥

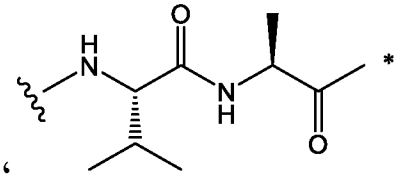
حيث

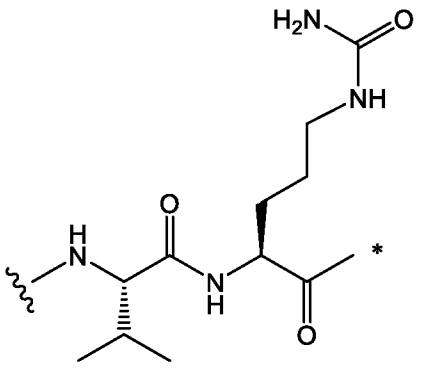
تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع y (Y)؛ و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع L2.

١٢. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ٩، حيث w= ٠؛ أو w= ٢ و(W)w يتم اختيارها من:







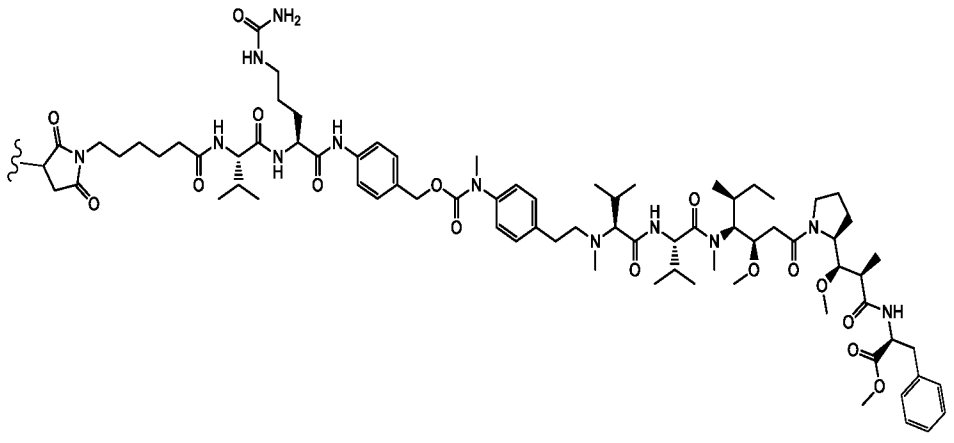
و

حيث

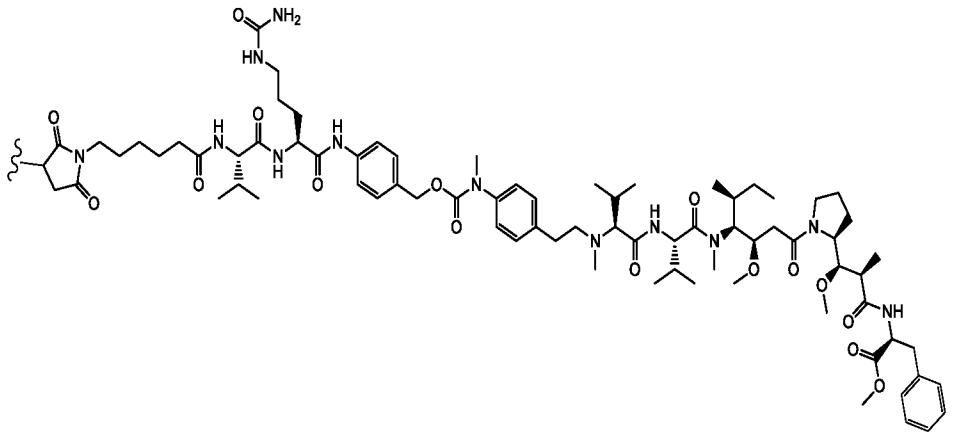
تشير النجمة إلى نقطة الاتصال مع y(Y)؛ و

الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع L2.

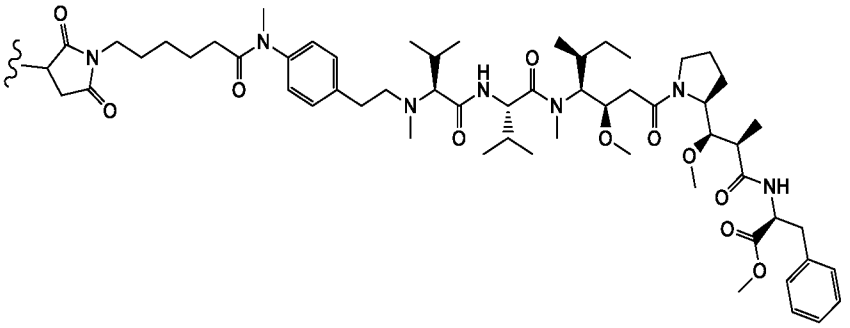
١٣. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقا لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث (L-D) يتم اختيارها من:



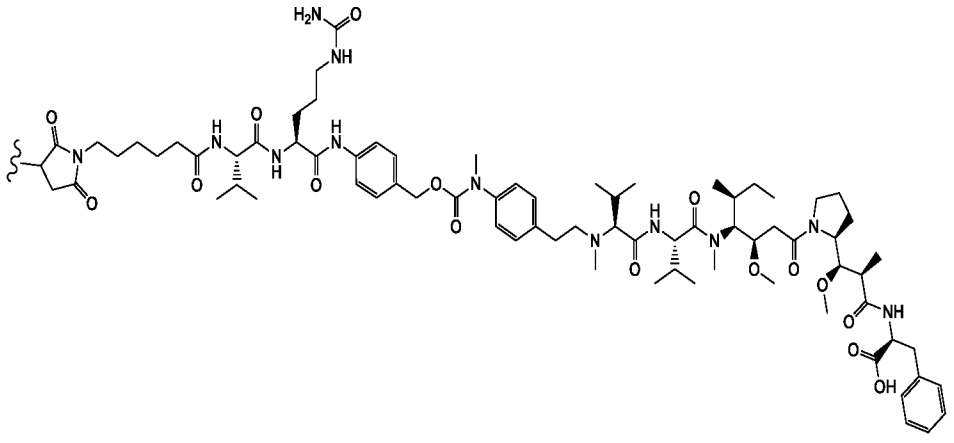
(هـ-١١)



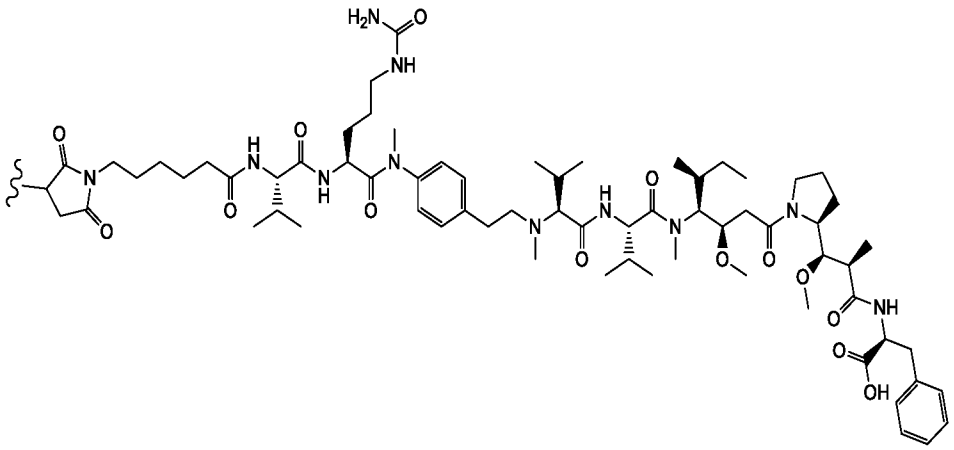
(هـ-١٢)



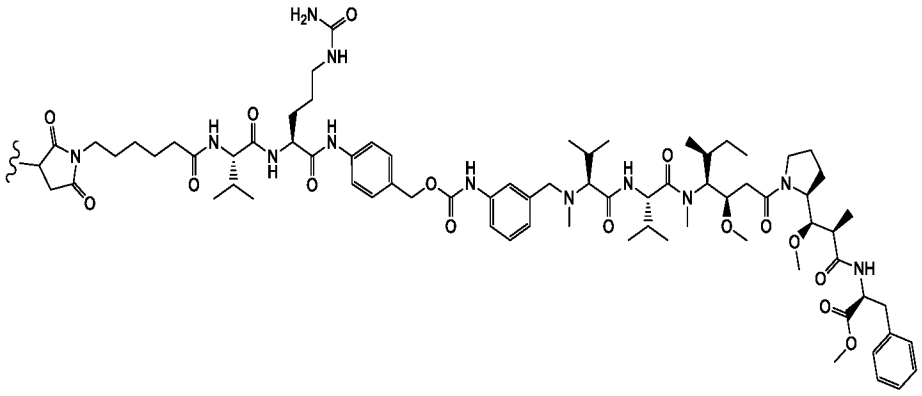
(ز-١٢)



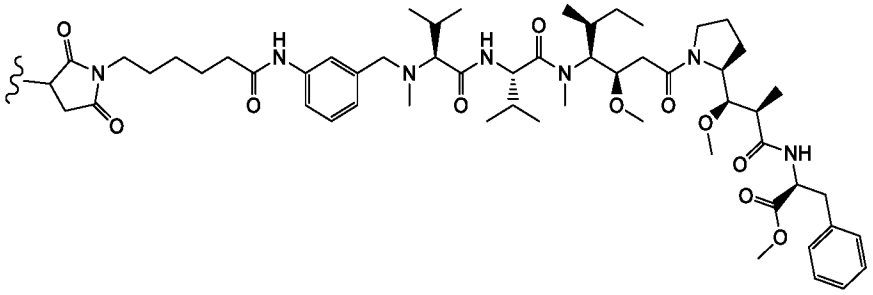
(هـ-١٣)



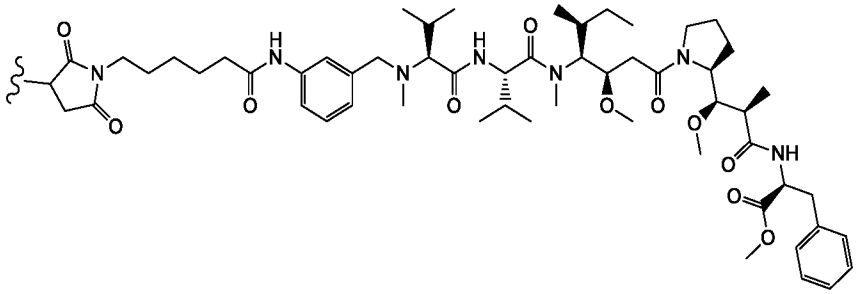
(و -١٣)



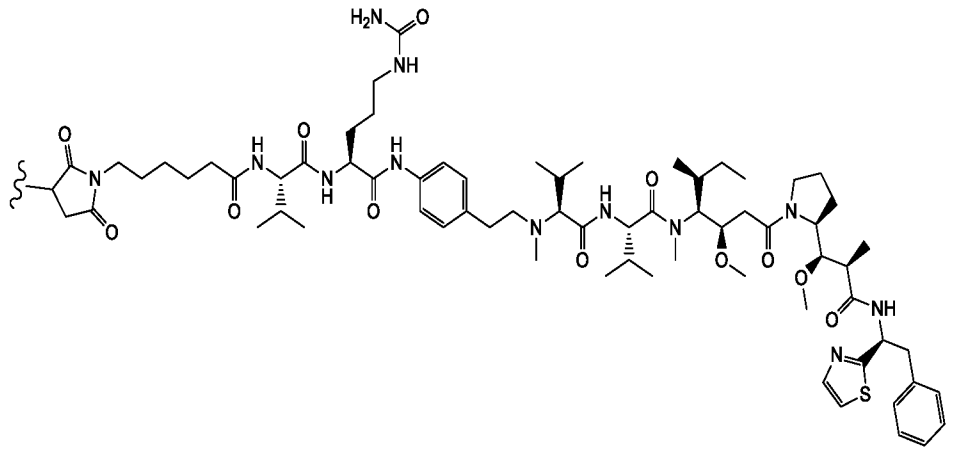
(ز-١٣)



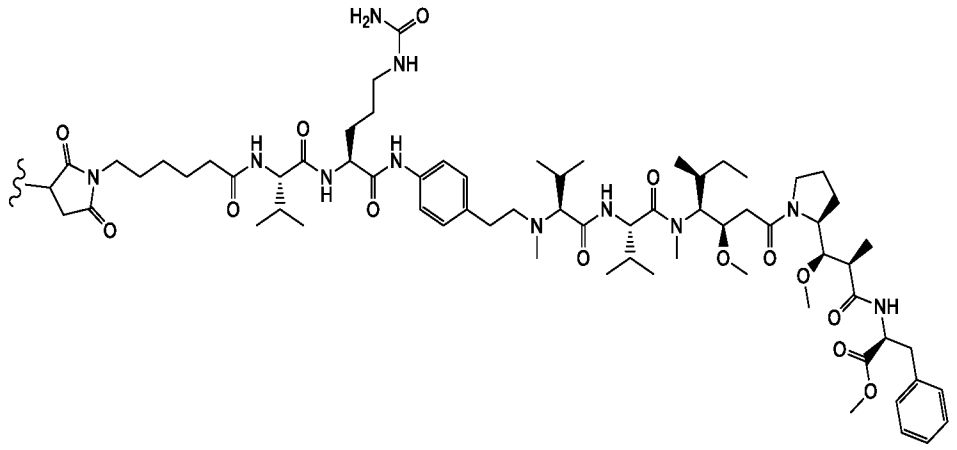
(هـ-١٥)



(ز-١٥)

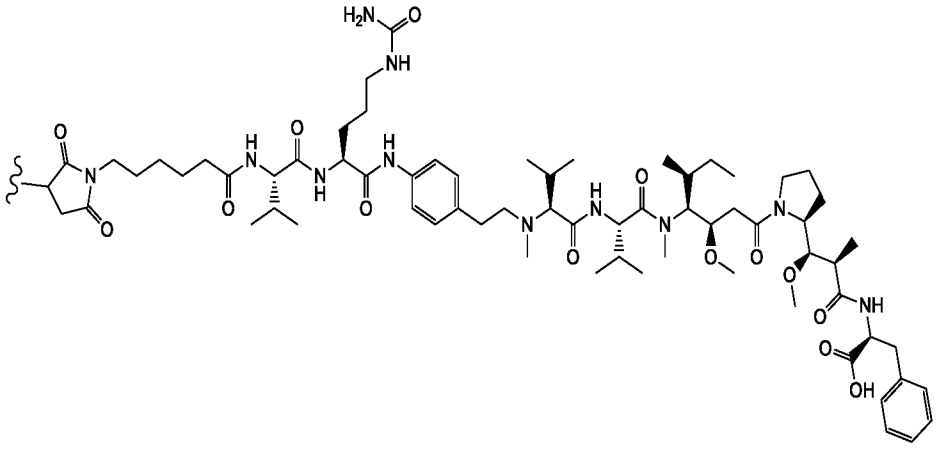


(و-٦١)



(و-٦٢)

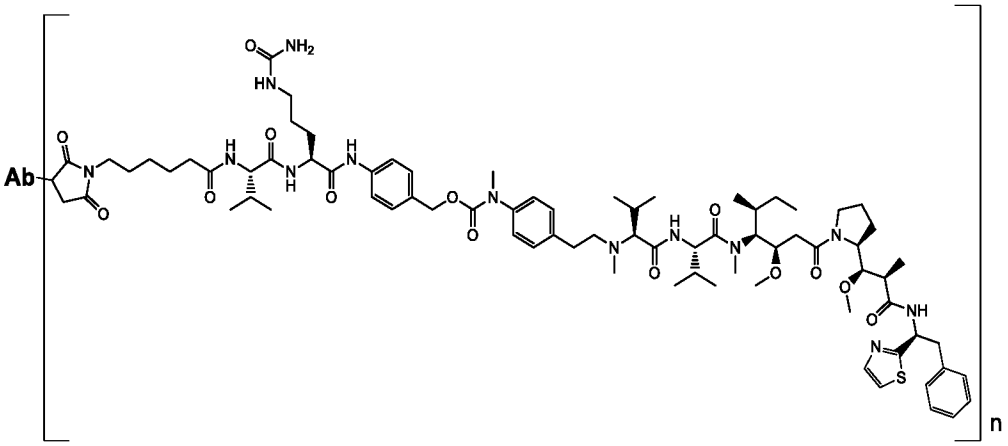
٥ و



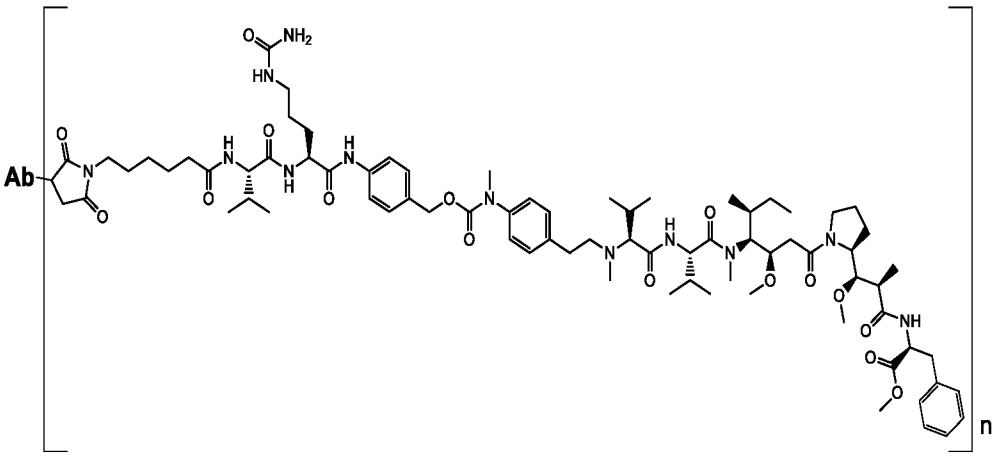
(و -٦٣)

حيث الخط المتموج يوضح نقطة الاتصال مع Ab.

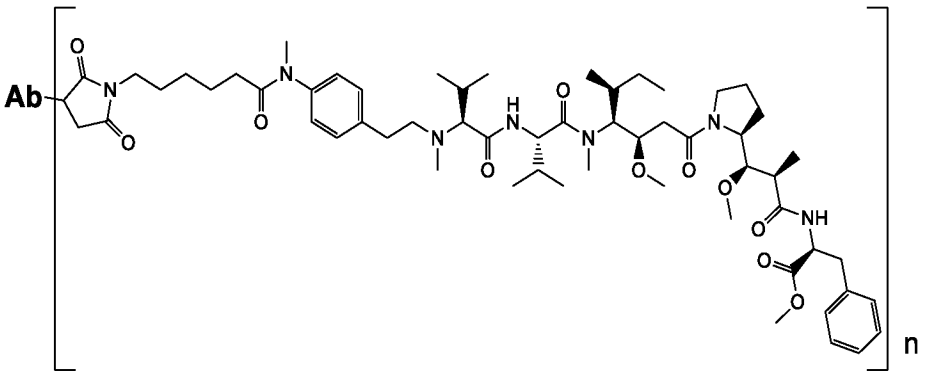
١٠ ١٤. مترافق من جسم مضاد-عقار وفقا لعنصر الحماية رقم ١ له صيغة يتم اختيارها من:



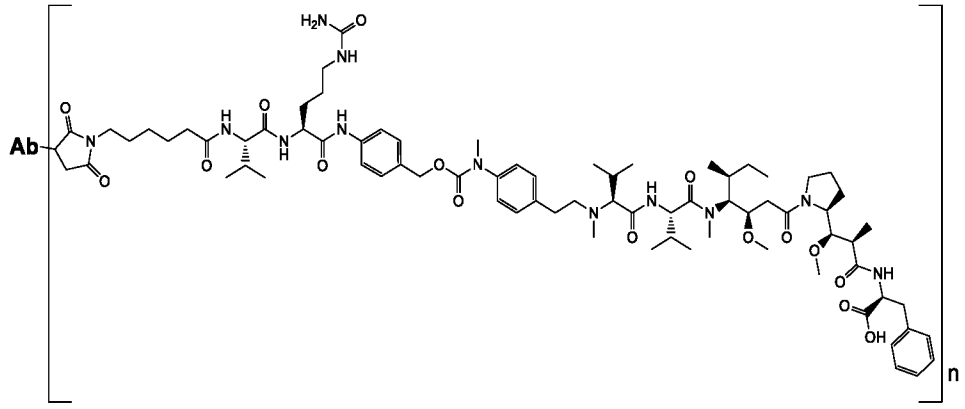
(Ab-E-11)



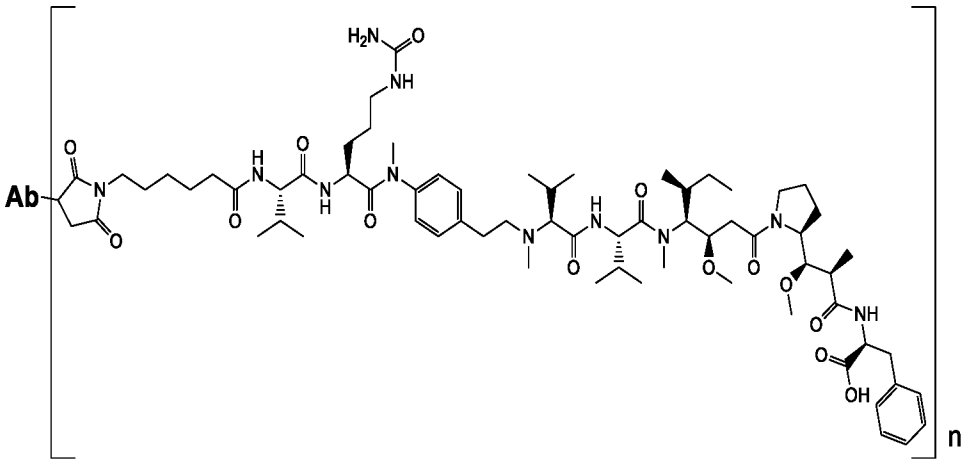
(Ab-E-12)



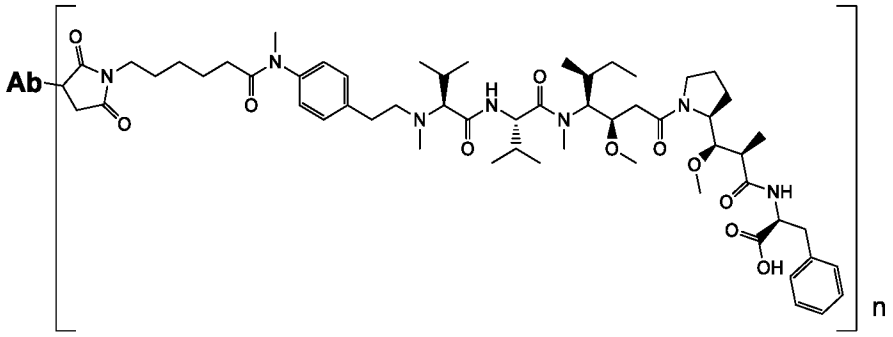
(Ab-G-12)



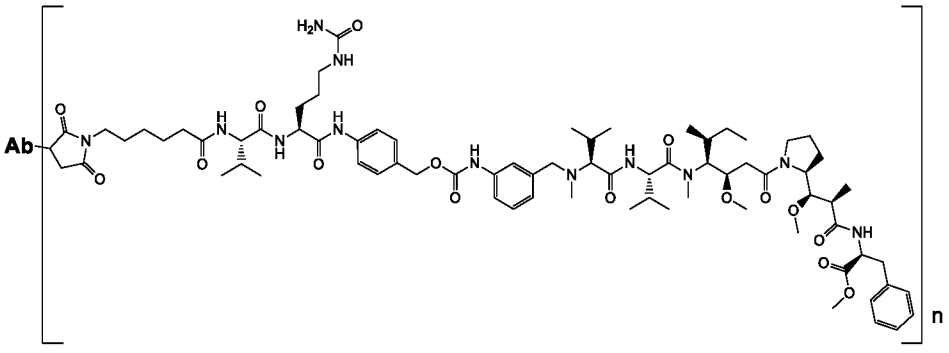
(Ab-E-13)



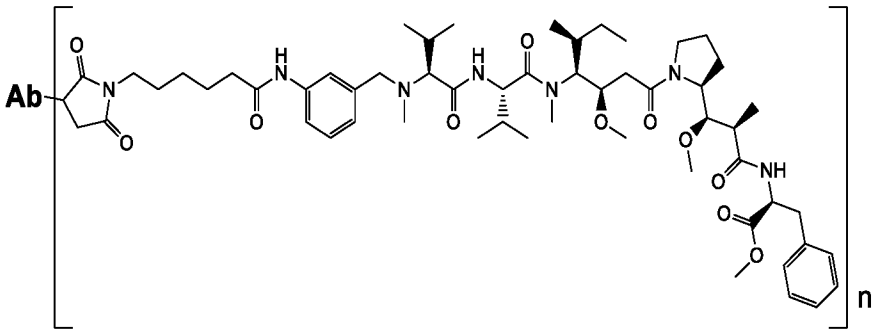
(Ab-F-13)



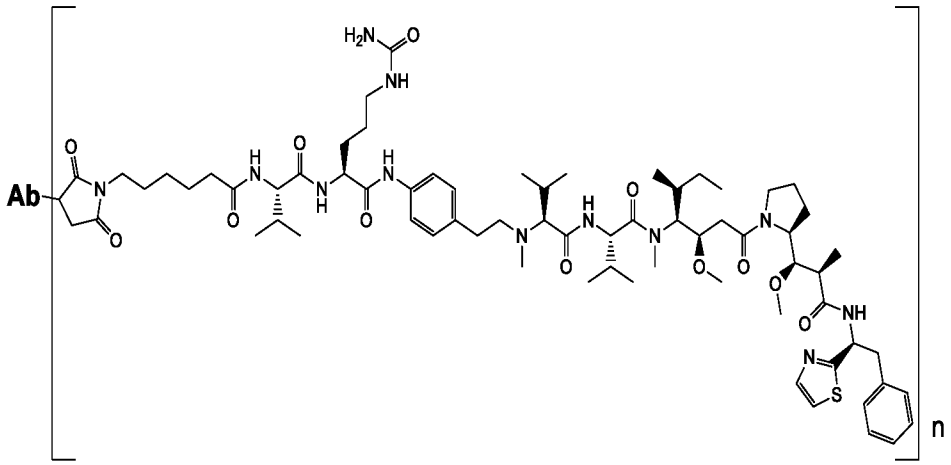
(Ab-G-13)



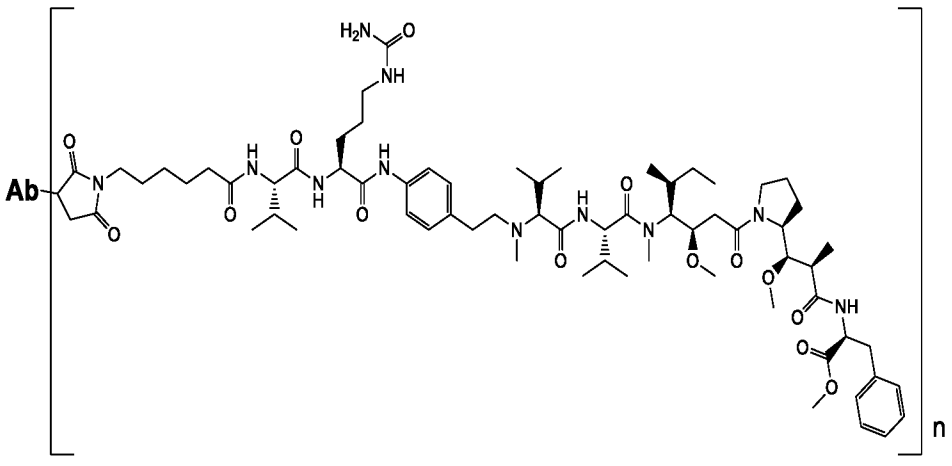
(Ab- E-15)



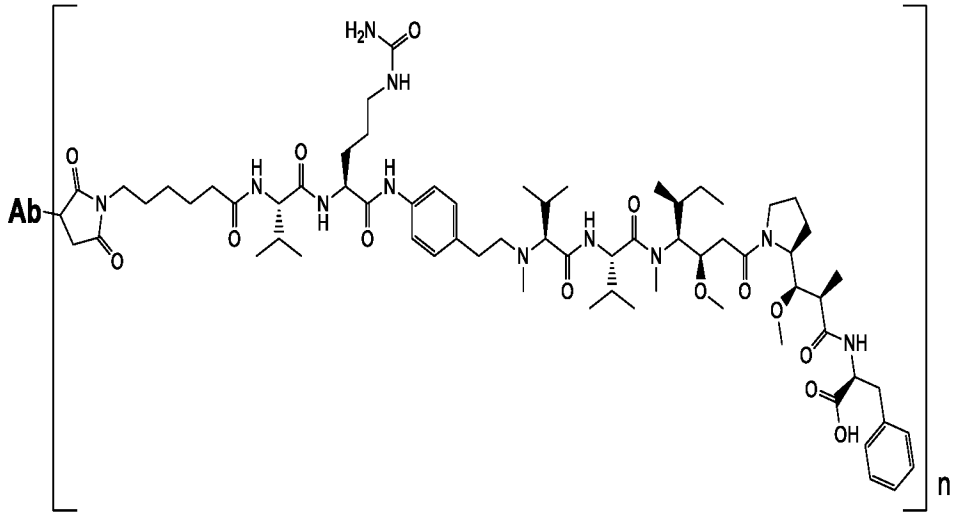
(Ab-G-15)



(Ab-F-61)



(Ab-F-62)



(Ab-F-63)

وأملاح مقبولة صيدلانيا منها،

حيث Ab يتم اختيارها من المجموعة التي تتكون من الأجسام المضادة 208F2، 212A11، 214F8، 219D6 و 213B10.

١٥. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١٤، حيث يتم اختيار Ab من المجموعة التي تتألف من:

- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٥٦ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٥٦ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦٠؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٢ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٤ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٤ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦٠؛

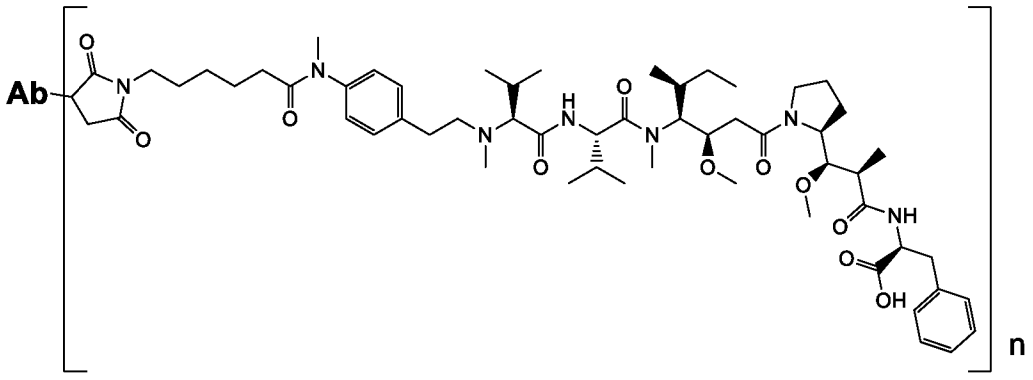
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٦ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٨ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٨ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦٠؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٠ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٢ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٤ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٦ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٨ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٨ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦٠؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٨٠ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧.

١٦. مترافق الجسم المضاد– العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١٥، حيث يتم اختيار Ab من المجموعة التي تتألف من:

- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٥٨ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٥٨ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦١؛

- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٣ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٥ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٥ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦١؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٧ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٩ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٦٩ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦١؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧١ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٣ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٥ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٧ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٩ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٩ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٦١؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٨١ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩.

١٧. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١٤ والذي يكون له الصيغة التالي:



(Ab-G-13)

حيث يتم اختيار Ab من المجموعة التي تتألف من:

- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٠ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٤ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٨٠ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٧؛ و
- جسم مضاد يشتمل على مجال متغير لسلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٤ ومجال متغير لسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٣٦.

١٨. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١٧، حيث يتم اختيار Ab من المجموعة التي تتألف من:

- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧١ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٧٥ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛

- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٨١ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٥٩؛ و
- جسم مضاد يشتمل على سلسلة ثقيلة بها المتوالية رقم ٣٨ وسلسلة خفيفة بها المتوالية رقم ٤٠.

٥

١٩. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١، حيث n هي ٢.

٢٠. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقًا لعنصر الحماية رقم ١، حيث n هي ٤.

١٠ ٢١. مترافق الجسم المضاد- العقار وفقا لأي من عناصر الحماية السابقة للاستخدام كعلاج.

٢٢. تركيبة تشتمل على الأقل على مترافق جسم مضاد - عقار وفقا لأي من عناصر الحماية السابقة.

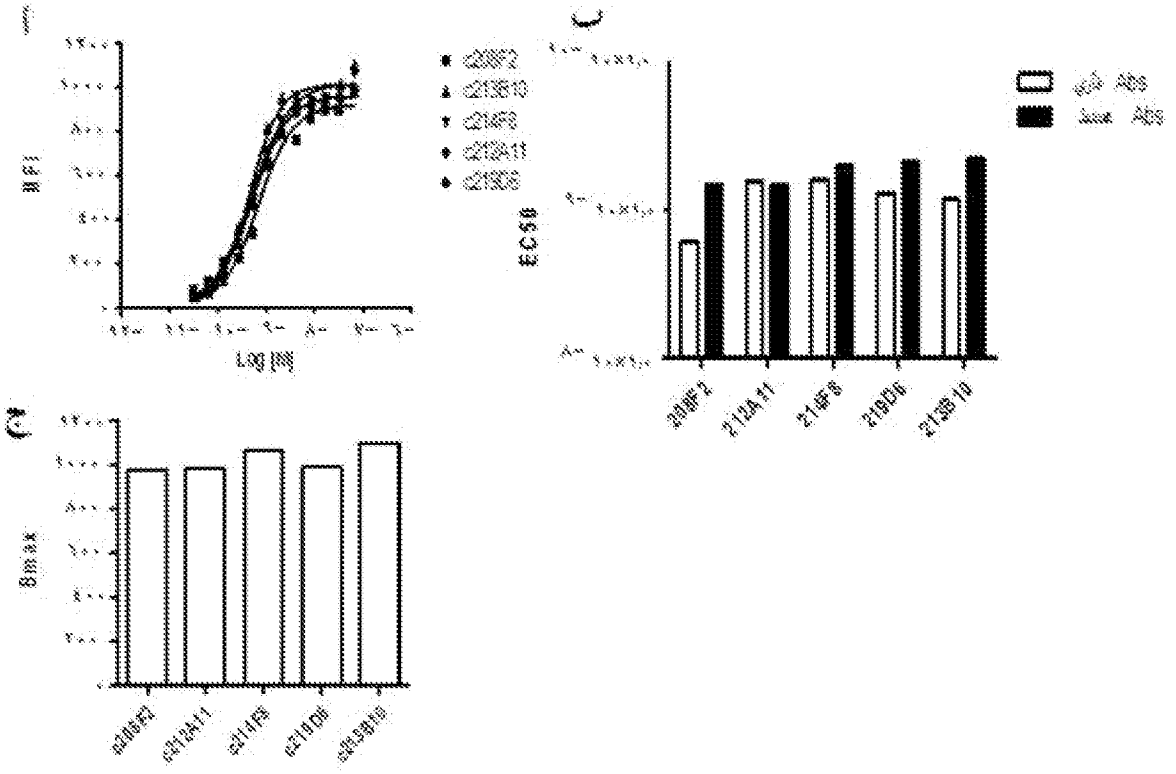
١٥ ٢٣. التركيبة المذكورة في عنصر الحماية رقم ٢٢ والتي تشتمل أيضا على مادة ناقلة مقبولة صيدلانيا.

٢٤. التركيبة المذكورة في عنصر الحماية رقم ٢٢ أو ٢٣ للاستخدام في علاج سرطان يعبر وراثيا عن IGF-1R.

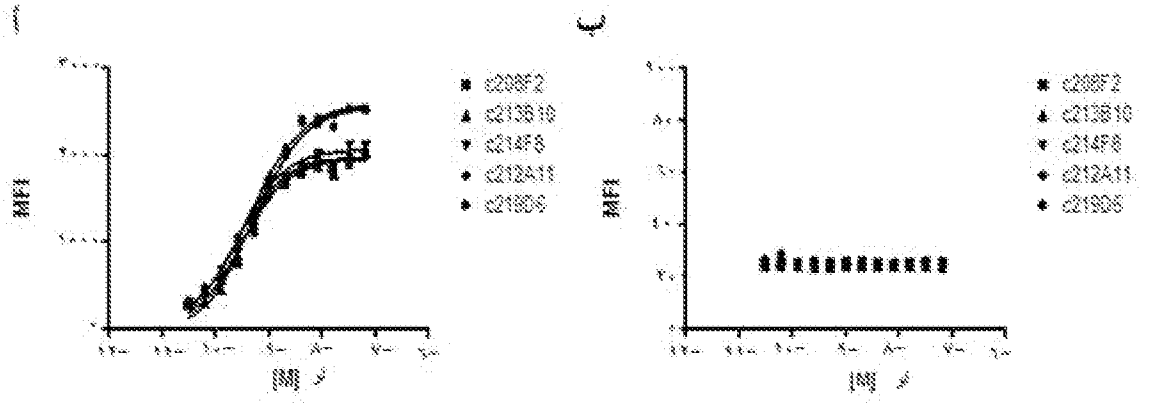
٢٠

٢٥. التركيبة المذكورة في عنصر الحماية رقم ٢٤، حيث يكون السرطان المذكور الذي يعبر عن IGF-1R هو سرطان يتم اختياره من سرطان الثدي، القولون، المريء، الكبد، المعدة، الورم، الرئة، الجلد، العظم، المبيض، البروستات، العضلية المخططة، الكلى، الغدة الدرقية، بطانة الرحم، الورم المتوسط، حرشفية الفم، وأي سرطان مقاوم للعقاقير.

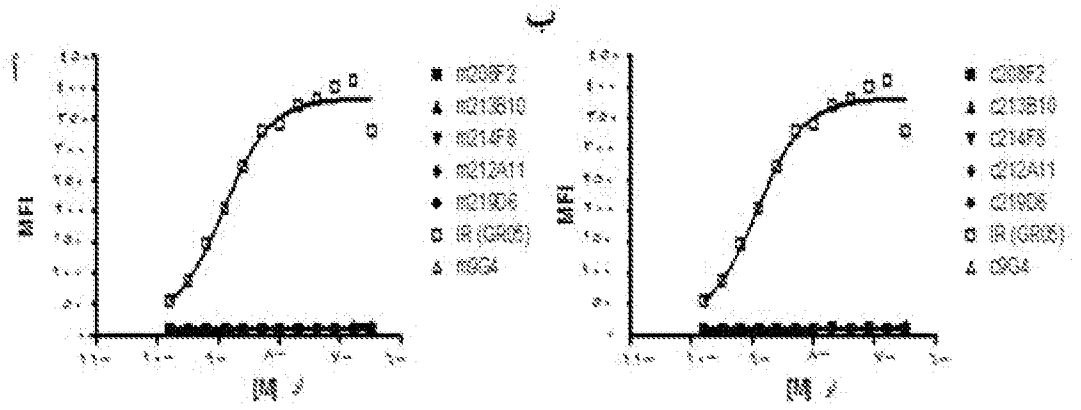
٢٥



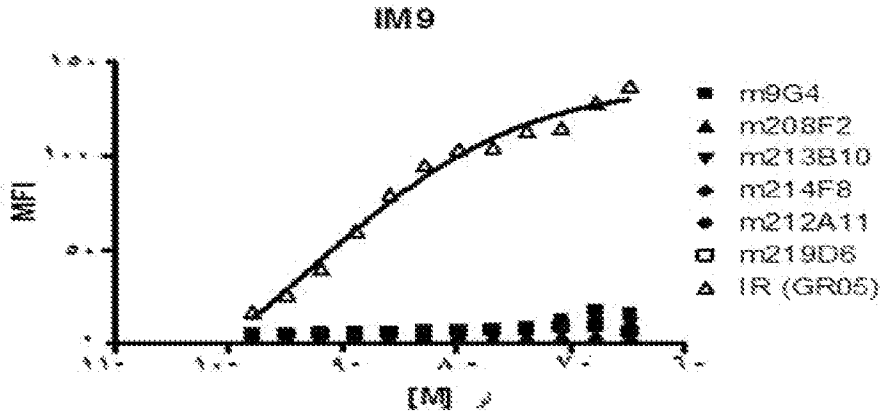
شكل ١


ب
MFI
c208F2
c213B10
c214F8
c212A11
c219D6

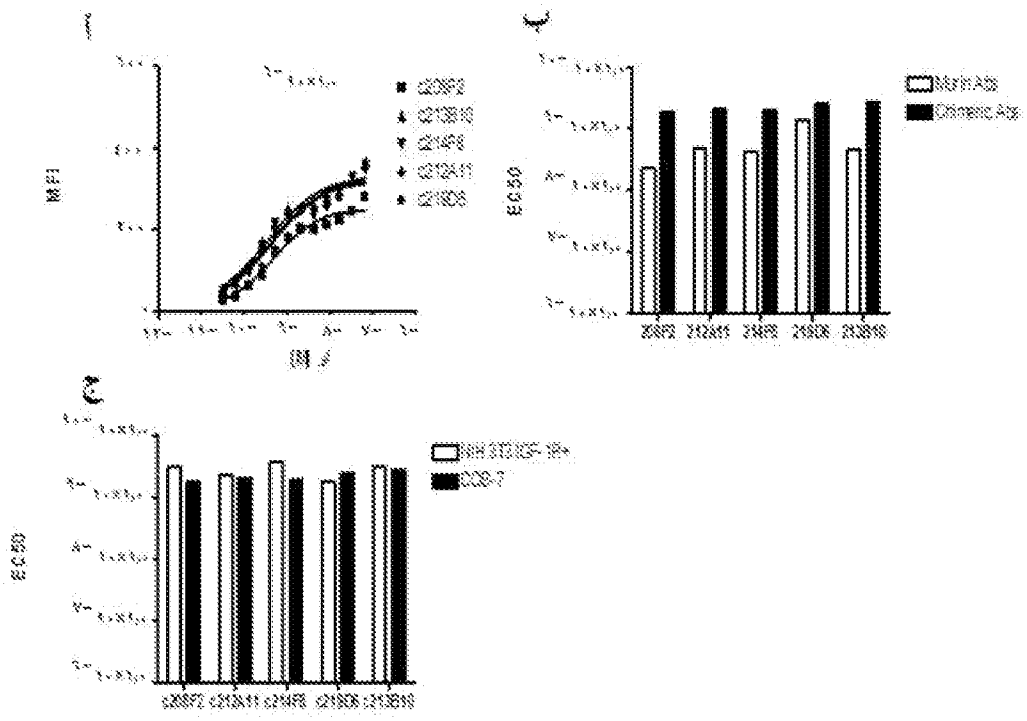
شكل ٢


ب
MFI
m208F2
m213B10
m214F8
m212A11
m219D6
IR (GR05)
mIgG4

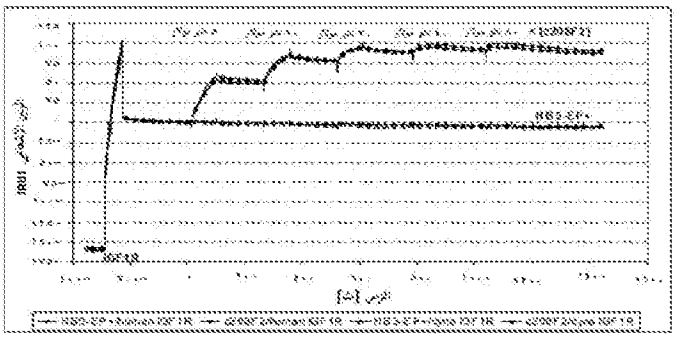
شكل ٣


IM9
MFI
[M]
m9G4
m208F2
m213B10
m214F8
m212A11
m219D6
IR (GR05)

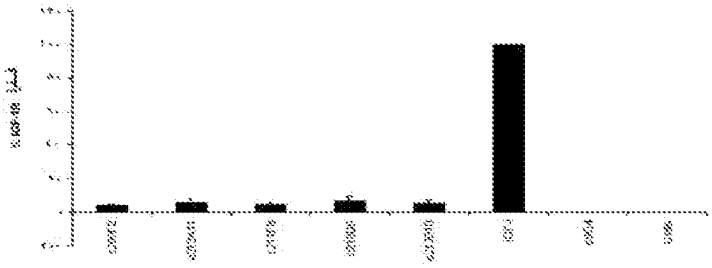
شكل ٤


أ
MFI
[M]
ب
EC50
ج
EC50

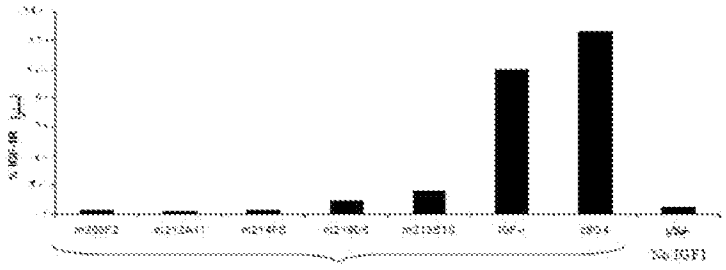
شكل ٥



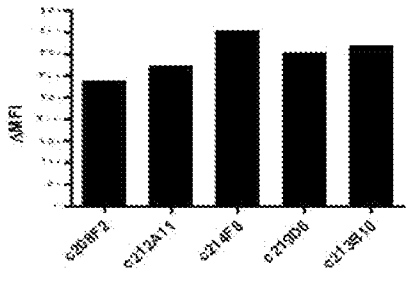
شكل ٦



شكل ٧

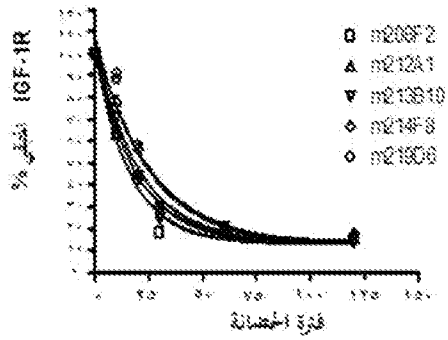


شكل ٨



شكل ٩

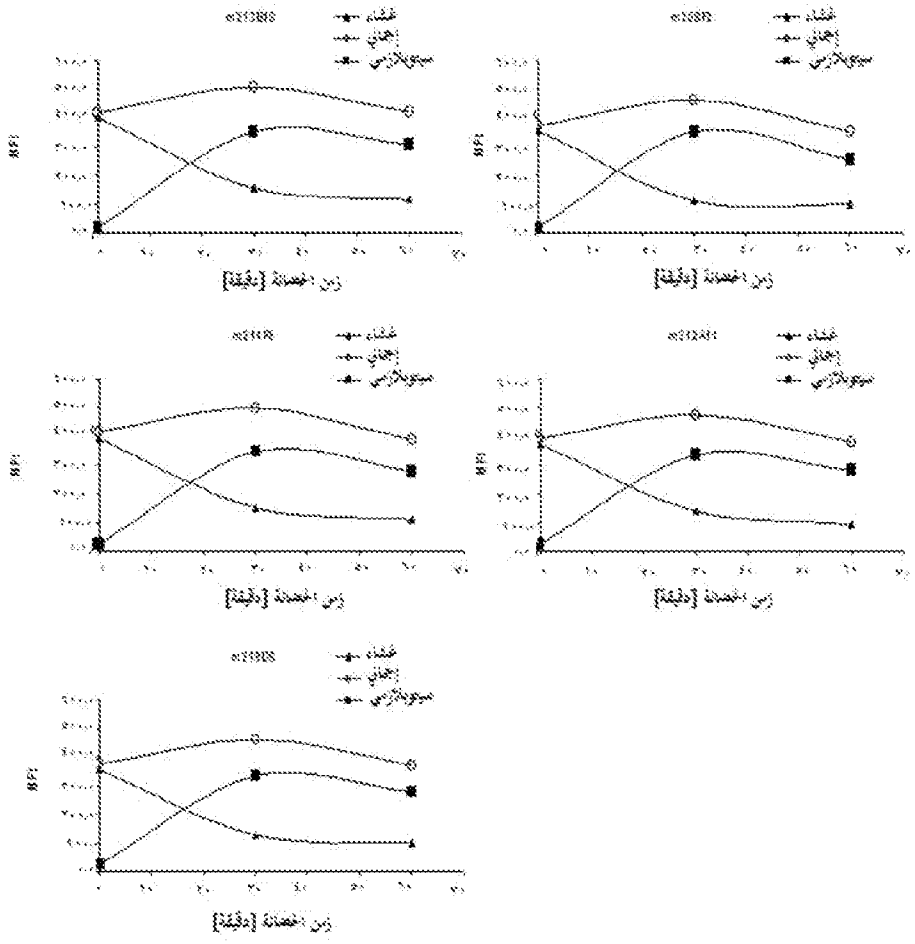
أ



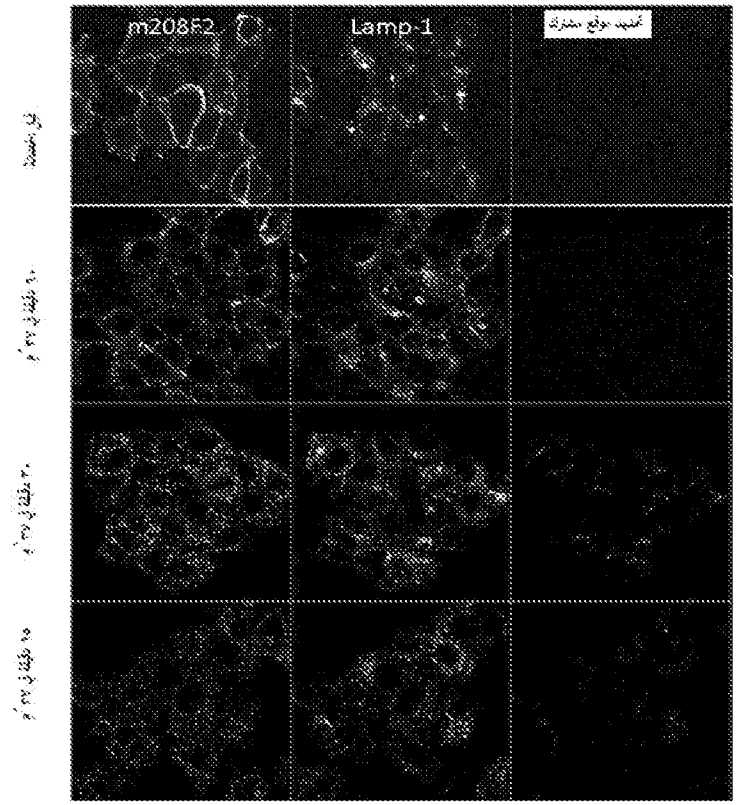
ب

Abs	فترة نصف العمر (t1/2)
m208F2	١١,١١
m212A11	١٤,٣٠
m214F8	١٦,٨١
m219D6	١٧,٨٥
m213B10	١٢,٨٣

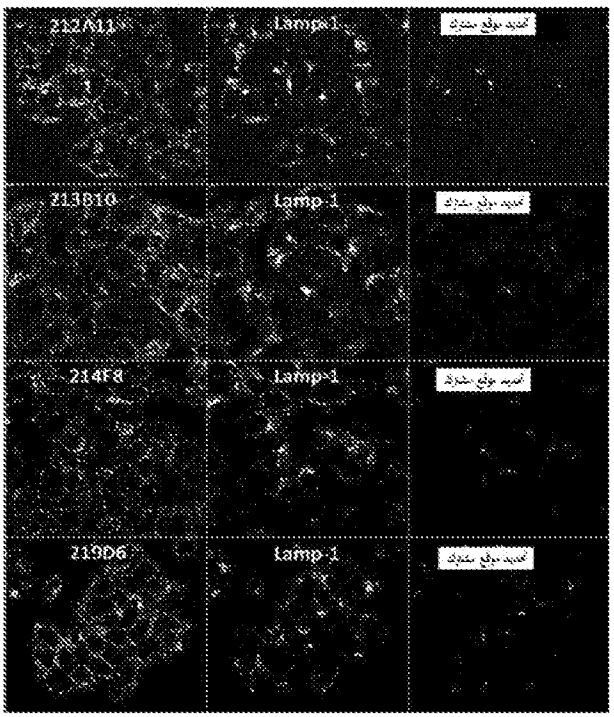
شكل ١٠



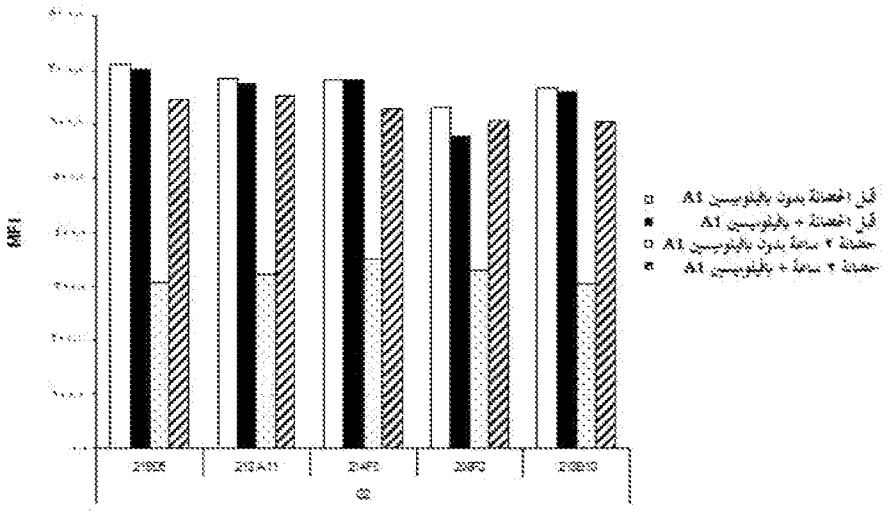
شكل ١١



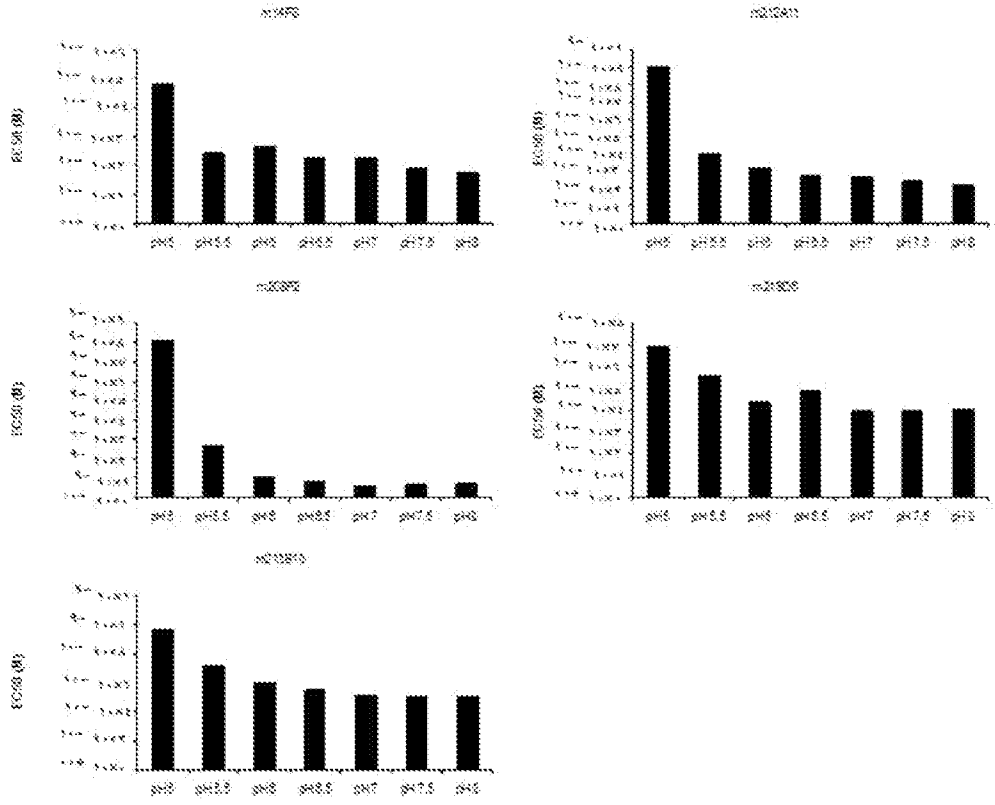
شكل ١٢أ



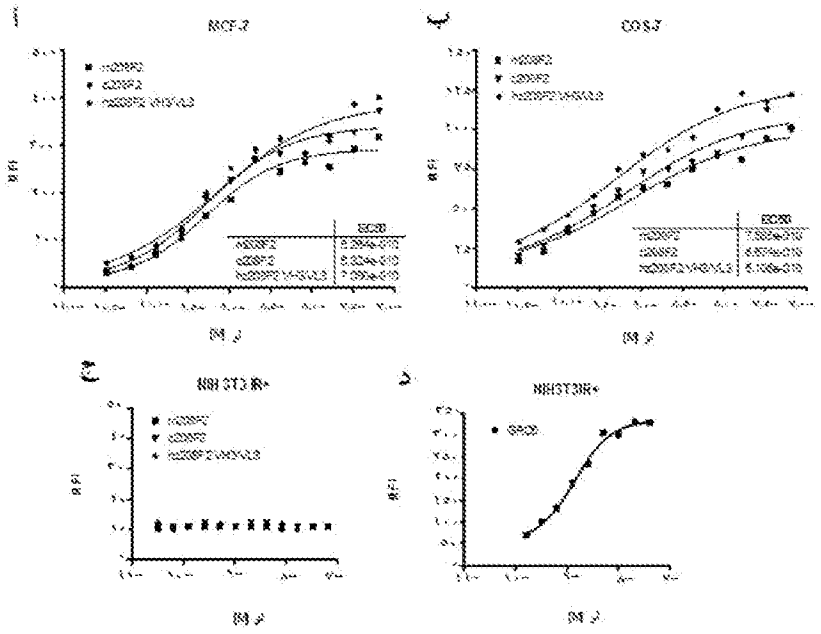
شكل ١٢ب



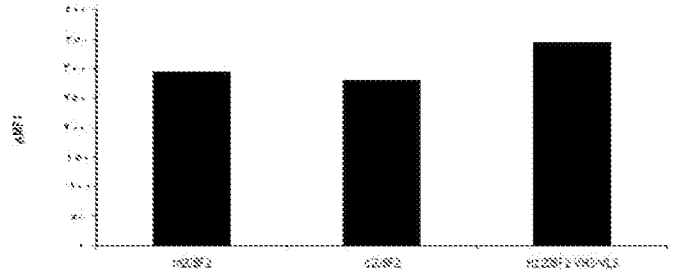
شكل ١٣



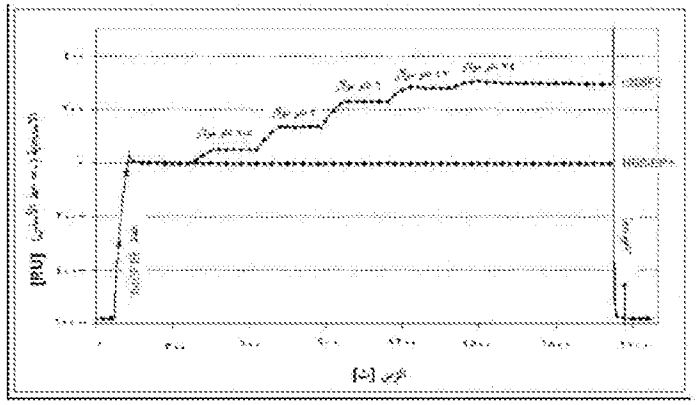
شكل ١٤



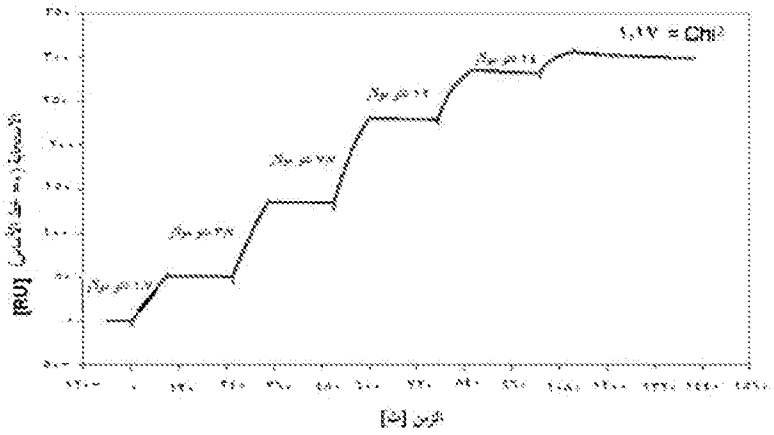
شکل ۱۵



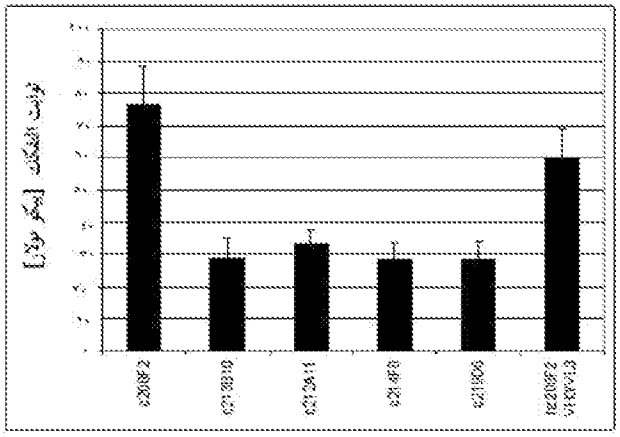
شکل ۱۶



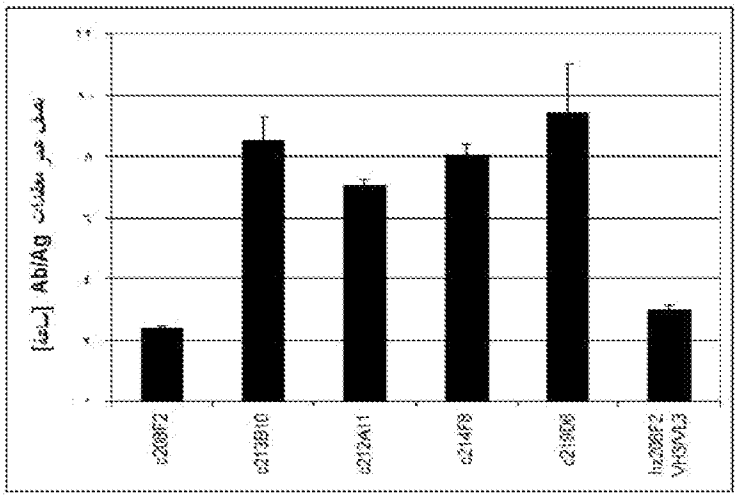
شکل ۱۷



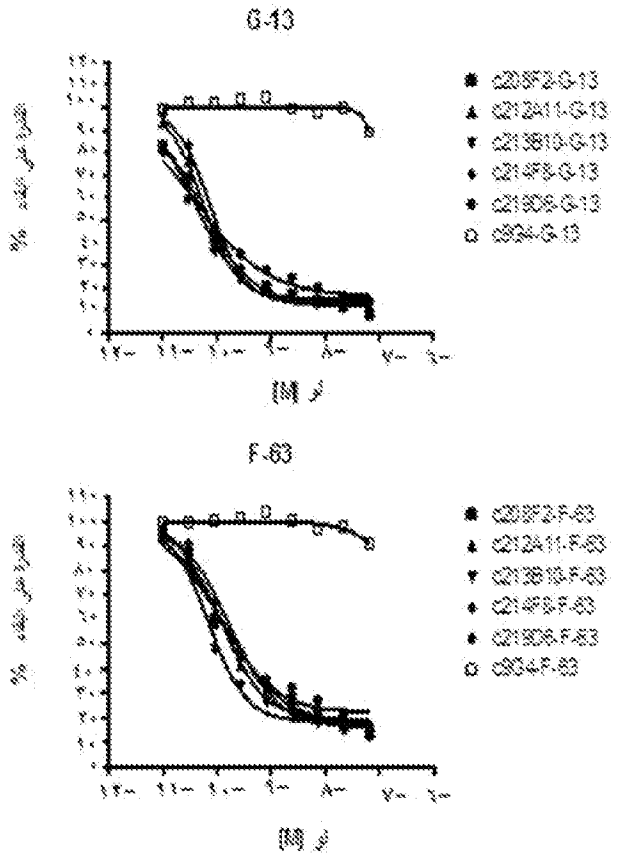
شكل ١٨



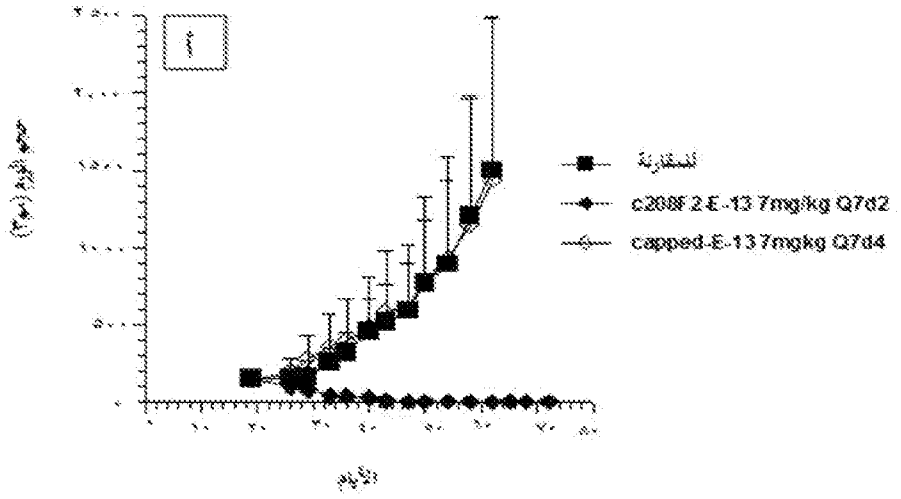
شكل ١٩



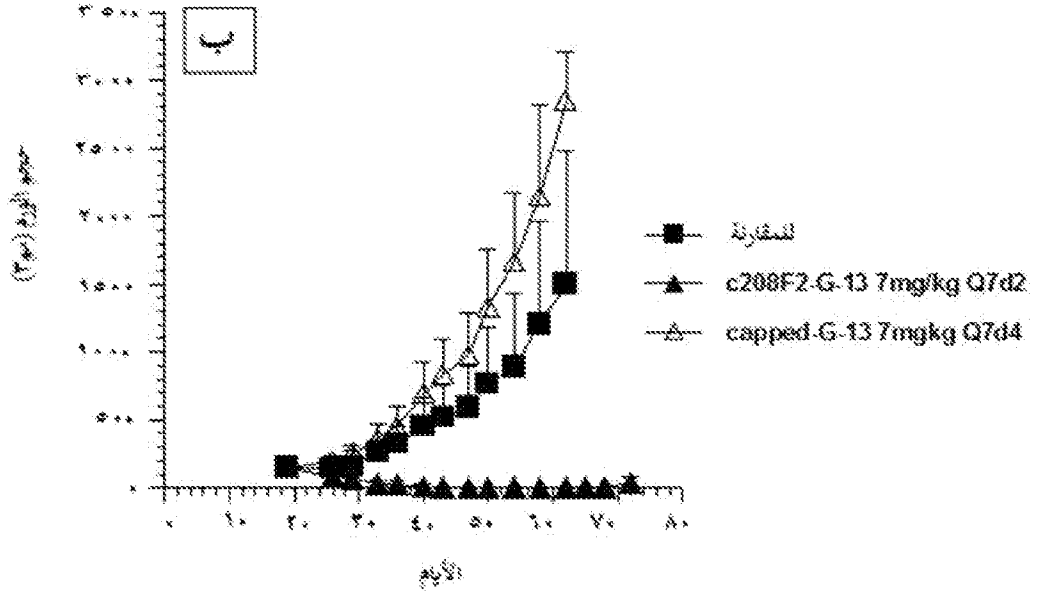
شكل ٢٠



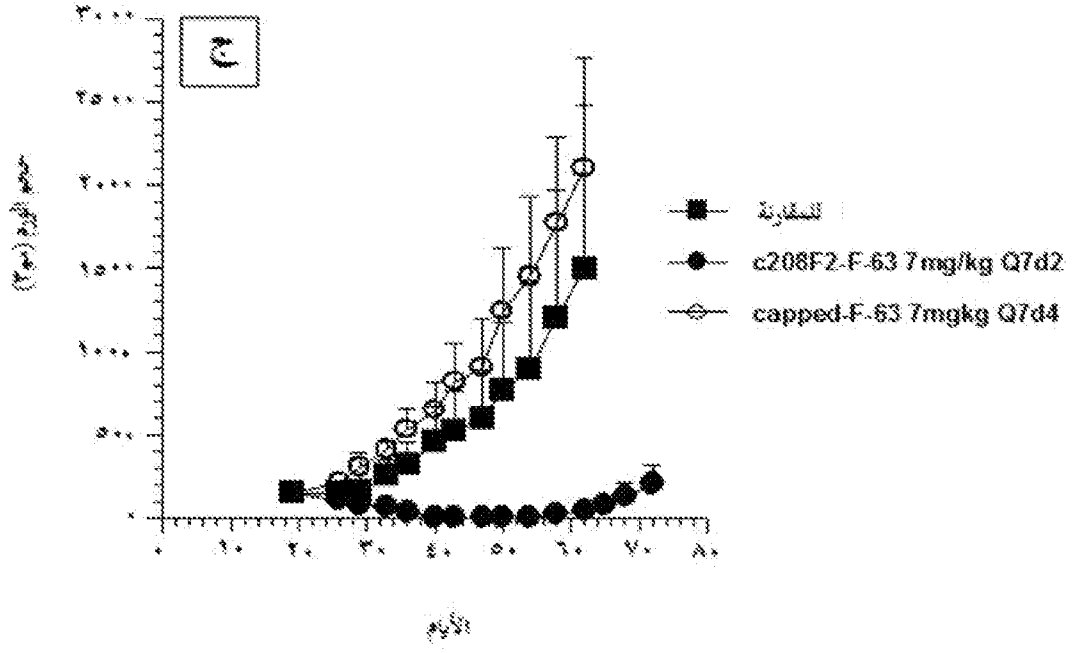
شكل ٢١



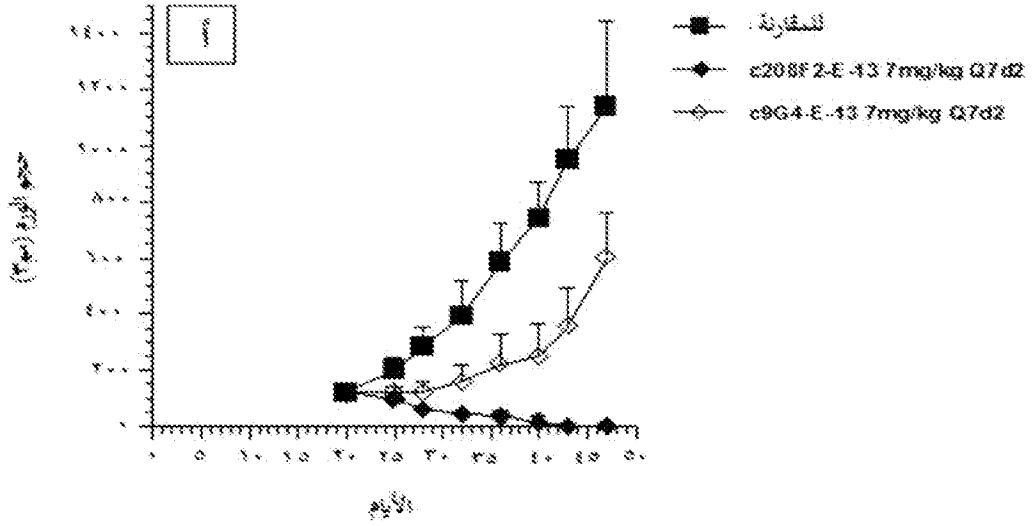
شكل ٢٢أ



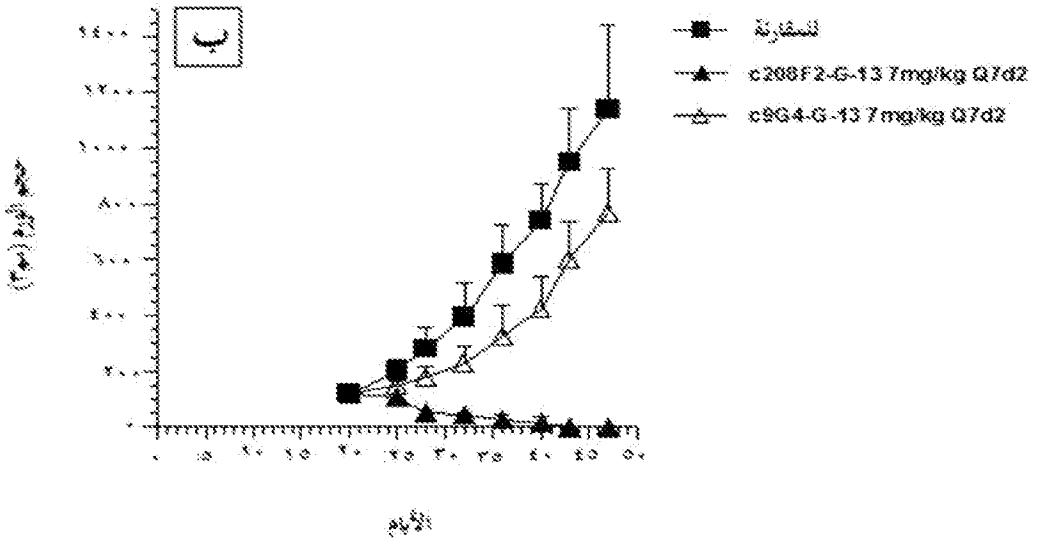
شكل ٢٢ ب



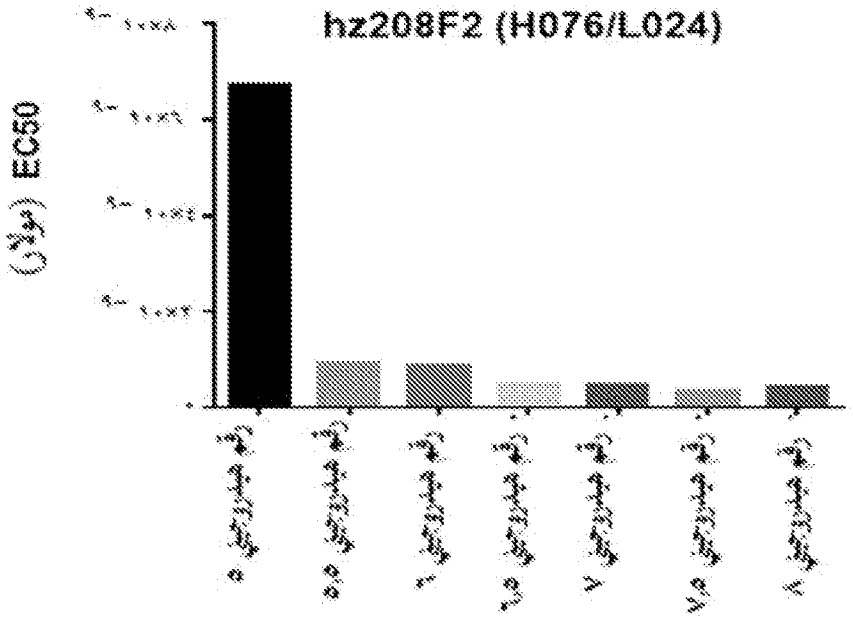
شكل ٢٢ ج



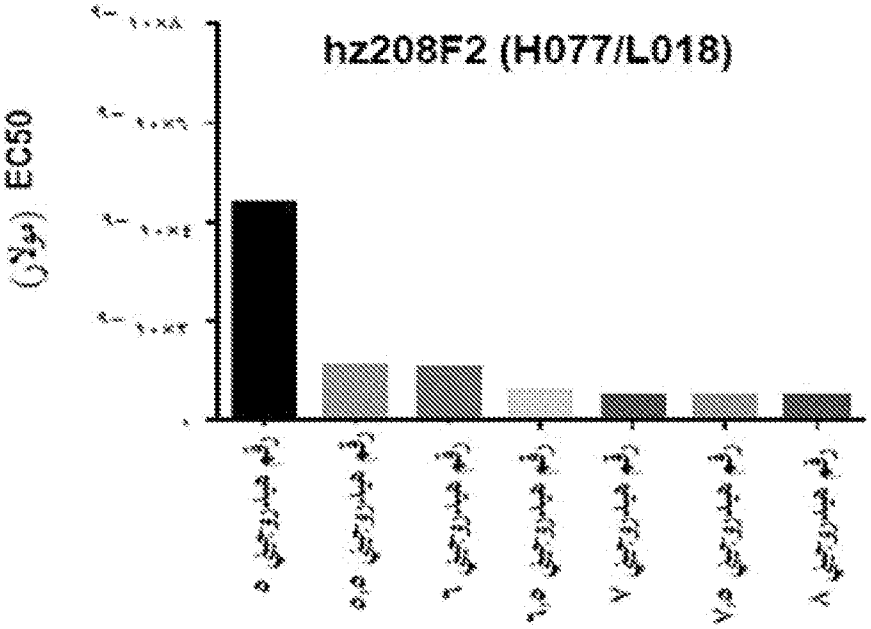
شكل ٢٣ أ



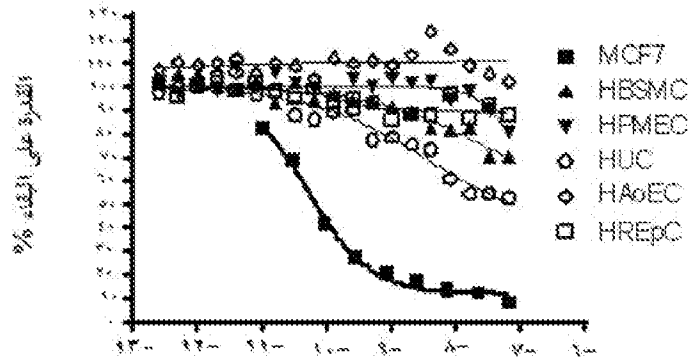
شكل ٢٣ ب



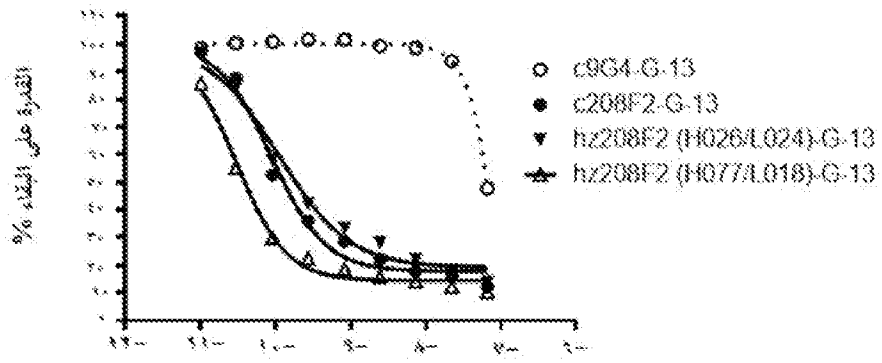
شكل ٢٤ أ



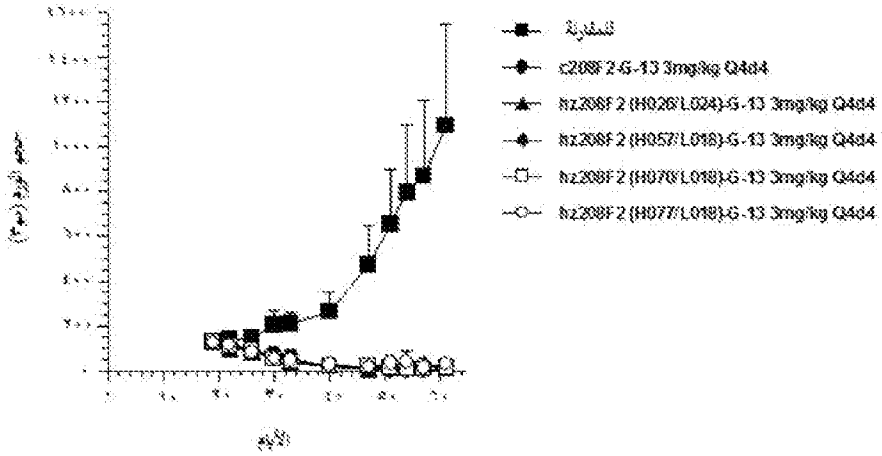
شكل ٢٤ ب



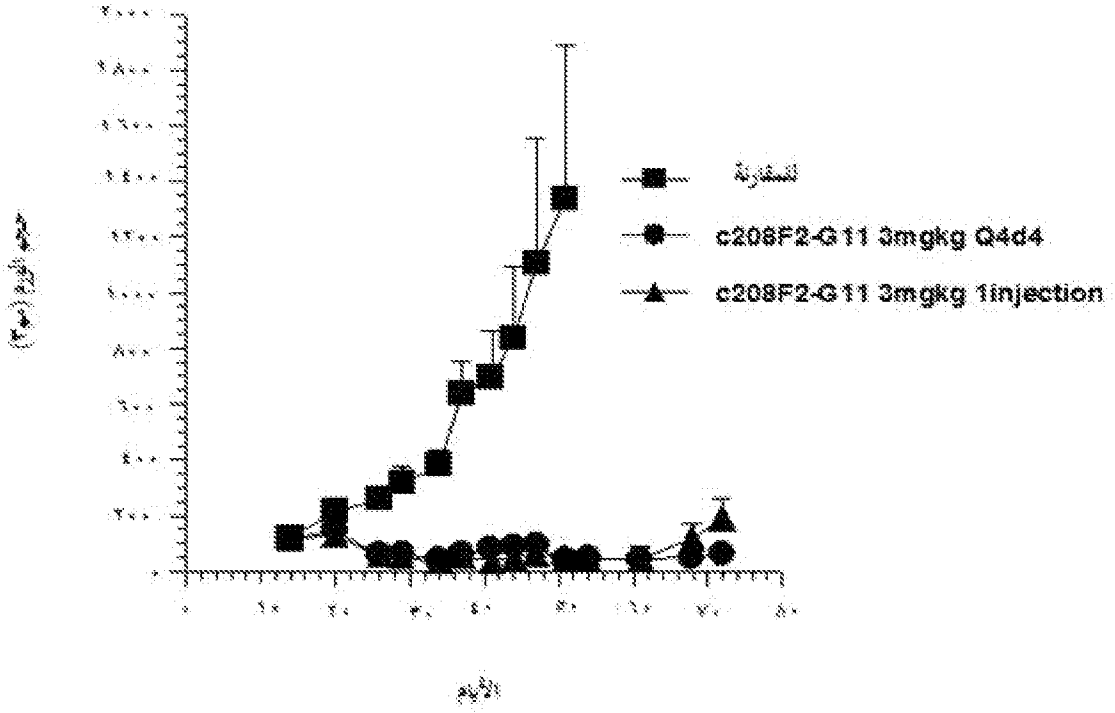
شكل ٢٥



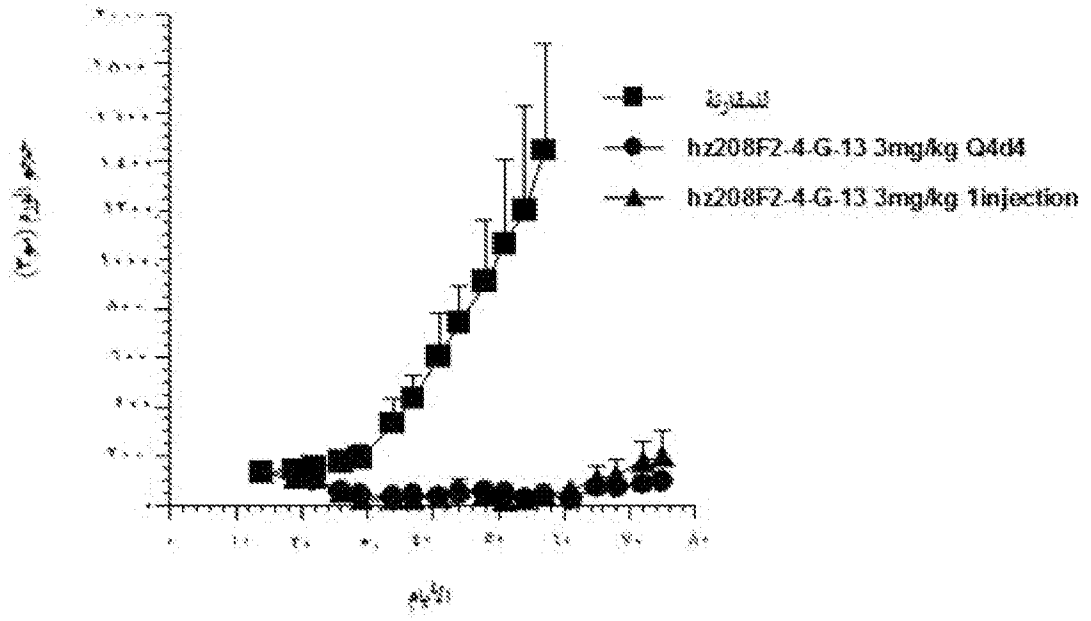
شكل ٢٦



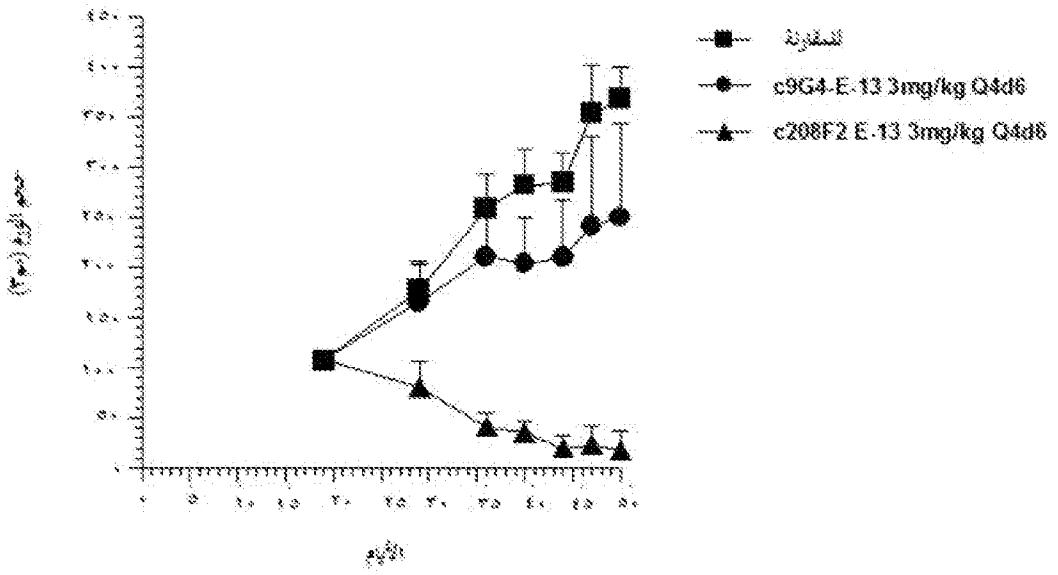
شكل ٢٧



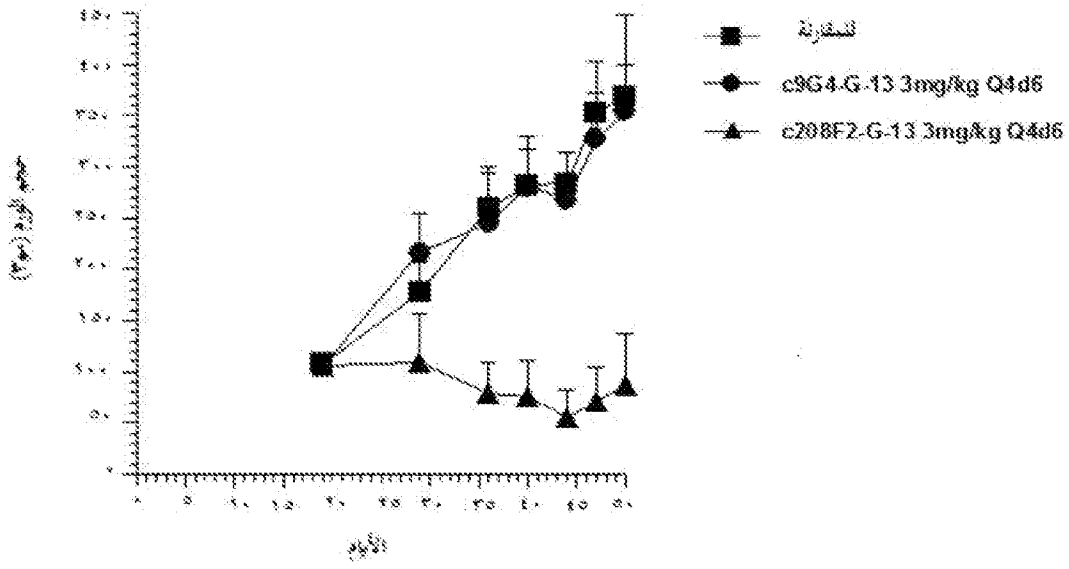
شكل ٢٨ أ



شكل ٢٨ ب



شكل ٢٩ أ



شكل ٢٩ ب

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشرط تسديد المقابل المالي السنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية

صادرة عن
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية ، مكتب البراءات السعودي
ص ب ٦٠٨٦ ، الرياض ١١٤٤٢ ، المملكة العربية السعودية
بريد الكتروني: patents@kacst.edu.sa