

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090410 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.06

(51) Int. Cl. C07D 473/18 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.16

(54) АГОНИСТЫ Толл-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 7 (TLR7), ИМЕЮЩИЕ ПИРИДИНОВЫЙ ИЛИ ПИРАЗИНОВЫЙ ФРАГМЕНТ, ИХ КОНЪЮГАТЫ, ПРИМЕНЕНИЯ И СПОСОБЫ С НИМИ

(31) 62/546,195

(72) Изобретатель:

(32) 2017.08.16

Поудел Ям Б., Хе Лики, Гангвар

(33) US

Санджеев, Поузи Шошана Л.,

(86) PCT/US2018/000243

Сивапракасам Прасанна (US)

(87) WO 2019/035968 2019.02.21

(74) Представитель:

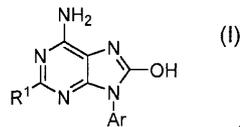
(71) Заявитель:

Глухарёва А.О., Гизатуллин Ш.Ф.,

БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)

Угрюмов В.М., Строкова О.В. (RU)

(57) Соединения, имеющие структуру в соответствии с формулой (I)



где R¹ и Ar, как определено в описании, являются агонистами для Toll-подобного рецептора 7 (TLR7) и могут применяться в качестве адъювантов для стимуляции иммунной системы. Некоторые из таких соединений могут быть использованы в конъюгатах для нацеленной доставки в орган или ткань предполагаемого действия.

A1

202090410

202090410

A1

АГОНИСТЫ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 7 (TLR7), ИМЕЮЩИЕ ПИРИДИНОВЫЙ ИЛИ ПИРАЗИНОВЫЙ ФРАГМЕНТ, ИХ КОНЬЮГАТЫ, И ПРИМЕНЕНИЯ И СПОСОБЫ С НИМИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет в соответствии с 35 U.S.C. §119(e) по Предварительной Заявке США с Сер. № 62/546,195, поданной 16 августа 2017 года; содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

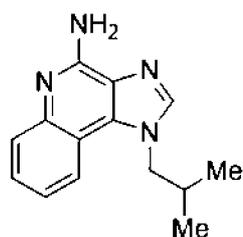
Это изобретение относится к агонистам Toll-подобного рецептора 7 («TLR7») и их конъюгатам, а также способам получения и применения таких агонистов и их конъюгатов.

Toll-подобные рецепторы («TLR») представляют собой рецепторы клеточной поверхности, которые распознают ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны («PAMP»). Активация TLR путем связывания соответствующего PAMP сигнализирует о потенциальной инфекции патогеном и стимулирует иммунную систему для борьбы с инфекцией. У людей есть 11 TLR, названных от TLR1 до TLR11.

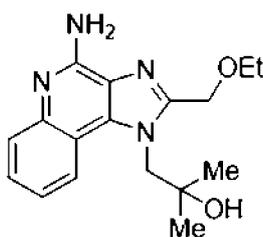
Активация TLR - причем TLR7 является наиболее изученным - агонистом может оказывать адьювантный эффект на действие вакцин и иммунотерапевтических агентов при лечении различных состояний, отличных от собственно патогенной инфекции, путем стимуляции иммунного ответа.

TLR7 распознает PAMP, ассоциированные с одноцепочечными РНК-вирусами. Его активация индуцирует секрецию интерферонов Типа I, таких как IFN α и IFN β (Lund *et al.* 2004). Он имеет два сайта связывания, один для лигандов одноцепочечной РНК, таких как ssRNA40 (Berghöfer *et al.* 2007), и один для гуанозина (Zhang *et al.* 2016).

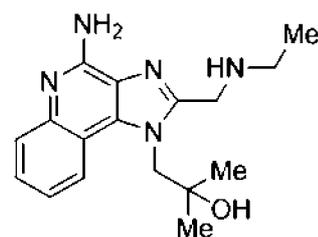
TLR7 может связываться и активироваться гуанозиноподобными синтетическими агонистами, такими как имиквимод, резиквимод и гардиквимод, которые основаны на 1*H*-имидазо[4,5-*c*]хинолиновом каркасе.



Имиквимод



Резиквимод

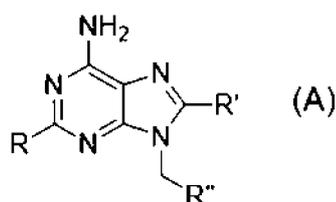


Гардиквимод

Также известны синтетические агонисты TLR7, основанные на птеридиноновом молекулярном каркасе, как пример везатолиמוד (Desai *et al.* 2015), который находился в Фазе 2 клинических испытаний. Сообщается, что эффективность везатолимода в 100 раз меньше, чем у соответствующего пурин-8-онового соединения, как измерено индукцией IFN- α (Roethle *et al.* 2013).



Другие синтетические агонисты TLR7 основаны на пуриноподобном каркасе, часто в соответствии с формулой (A):

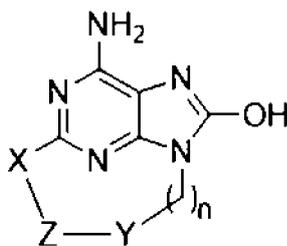


где R, R' и R'' представляют собой структурные переменные, причем R'' обычно содержит незамещенное или замещенное ароматическое или гетероароматическое кольцо.

Раскрытия биологически активных молекул, обладающих пуриноподобным действием, и их применение в лечении таких состояний, как фиброз, воспалительные заболевания, рак или патогенные инфекции, включают: Akinbobuyi *et al.* 2015b и 2016; Barberis *et al.* 2012; Carson *et al.* 2014; Ding *et al.* 2016, 2017a и 2017b; Graupe *et al.* 2015; Hashimoto *et al.* 2009; Holldack *et al.* 2012; Isobe *et al.* 2009a и 2012; Jin *et al.* 2017a и 2017b; Peterson 2014; Pryde 2010; и Seifert 2015.

Группа R'' может быть пиридиллом: Bonfanti *et al.* 2015a и 2015b; Halcomb *et al.* 2015; Hirota *et al.* 2000; Isobe *et al.* 2000, 2002, 2004, 2006, 2009a, 2011 и 2012; Kasibhatla *et al.* 2007; Koga-Yamakawa *et al.* 2013; Musmuca *et al.* 2009; Nakamura 2012; Ogita *et al.* 2007; и Yu *et al.* 2013.

В Bonfanti *et al.* 2015b раскрываются модуляторы TLR7, в которых два кольца пуринового фрагмента охватываются макроциклом:



Агонист TLR7 может быть конъюгирован с молекулой-партнером, которая может быть, например, фосфолипидом, поли(этиленгликолем) («ПЭГ») или другим TLR (обычно TLR2). Типичные раскрытия включают: Carson *et al.* 2013, 2015 и 2016, Chan *et al.* 2009 и 2011, Lioux *et al.* 2016, Maj *et al.* 2015, Ban *et al.* 2017; Vernejoul *et al.* 2014 и Zurawski *et al.* 2012. Конъюгация с антителом также была раскрыта: Akinbobuyi *et al.* 2013 и 2015a и Gadd *et al.* 2015. Частым сайтом конъюгирования является группа R¹ формулы (A).

Также были раскрыты агонисты TLR7 на основе 5H-пирроло[3,2-d]пиримидинового каркаса. См. Cortez *et al.* 2017a и 2017b, McGowan *et al.* 2017, и Li *et al.* 2018.

В Jensen *et al.* 2015 раскрывается применение катионных липидных носителей для доставки агонистов TLR7.

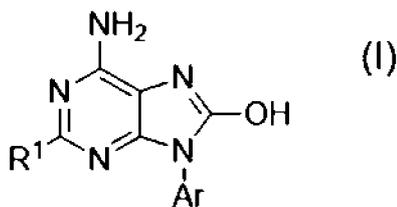
Некоторые агонисты TLR7, включая резиквимод, являются двойными агонистами TLR7/TLR8. См., например, Beesu *et al.* 2017; Lioux *et al.* 2016; и Vernejoul *et al.* 2014.

Также были раскрыты агонисты TLR7 на основе 5H-пирроло[3,2-d]пиримидинового каркаса. См. Cortez *et al.* 2017a и 2017b, McGowan *et al.* 2017, и Li *et al.* 2018.

Полные цитирования документов, приведенных здесь по первому автору или изобретателю и году, перечислены в конце этого описания.

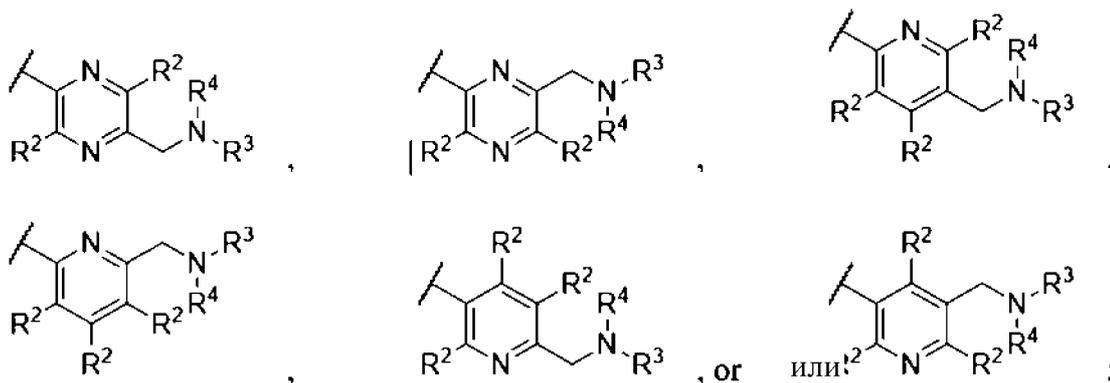
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте это описание относится к соединениям, имеющим структуру в соответствии с формулой (I)



где

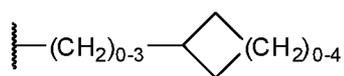
Ag представляет собой



R^1 представляет собой $(C_1-C_5$ алкил)O, $(C_1-C_2$ алкил)O(CH₂)₂₋₃O, $(C_1-C_5$ алкил)C(=O)O, $(C_1-C_5$ алкил)NH, $(C_1-C_2$ алкил)O(CH₂)₂₋₃NH или $(C_1-C_5$ алкил)C(=O)NH;

R^2 представляет собой независимо для каждого случая H, C_1-C_3 алкил, галоген, O(C_1-C_3 алкил), CN или NO₂; и

R^3 и R^4 независимо представляют собой H; C_1-C_6 алкил, (CH₂)₂₋₄OH; (CH₂)₂₋₄O(C_1-C_3 алкил); (CH₂)₂₋₄NH₂; (CH₂)₂₋₄NH(C_1-C_3 алкил); (CH₂)₂₋₄N(C_1-C_3 алкил)₂; (CH₂)₁₋₃(арил); (CH₂)₁₋₃(гетероарил); (CH₂)₂₋₄(OCH₂CH₂)₂₋₈(CH₂)₂₋₄NHВос;



, где группа CH₂ в циклоалифатическом кольце может быть заменена O, S, NH или N(C_1-C_3 алкил) и циклоалифатическое кольцо может быть замещено C_1-C_3 алкилом, OH, O(C_1-C_3 алкилом), галогеном, (CH₂)₀₋₃NH₂ или (CH₂)₀₋₃NH(C_1-C_3 алкилом);

или R^3 и R^4 соединяются с азотом, с которым они связаны, образуя циклический амин структуры



, где группа CH₂ в циклоалифатическом кольце, которая отделена от азота амина по меньшей мере двумя группами CH₂, может быть заменена O, S, NH или N(C_1-C_3 алкилом) и циклический амин может быть замещен C_1-C_3 алкилом, OH, O(C_1-C_3 алкилом), галогеном, (CH₂)₀₋₃NH₂ или (CH₂)₀₋₃NH(C_1-C_3 алкилом).

Соединения в соответствии с формулой (I) обладают активностью в качестве агонистов TLR7, и некоторые из них могут быть конъюгированы для нацеленной доставки к целевой ткани или органу предполагаемого действия.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖА(ЕЙ)

На **ФИГ. 1** показана схема получения соединений по этому изобретению.

На **ФИГ. 2** и **ФИГ. 3** показаны схемы получения еще других соединений по этому изобретению.

На **ФИГ. 4** и **ФИГ. 5** показаны схемы получения соединений агонист-линкер.

ФИГ. 6 является репрезентативным графиком, показывающим агонистическую TLR7 активность соединения по этому изобретению.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

«Антитело» означает целые антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент (*m.e.* «антигенсвязывающую часть») или их одноцепочечные варианты. Целое антитело представляет собой белок, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (V_H) и константную область тяжелой цепи, содержащую три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (V_L или V_K) и константную область легкой цепи, содержащую один единственный домен, C_L . Области V_H и V_L могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, называемыми определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L содержит три CDR и четыре FR, расположенные от амино- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Переменные области содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области могут опосредовать связывание антитела с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (напр., эффекторные клетки) и первый компонент (Clq) классической системы комплемента. Антитело считается «специфически связывающимся» с антигеном X, если антитело связывается с антигеном X с K_D 5×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 6×10^{-9} М или менее, более предпочтительно 3×10^{-9} М или менее, даже более предпочтительно 2×10^{-9} М или менее. Антитело может быть химерным, гуманизированным или предпочтительно человеческим. Константная область тяжелой цепи могут быть сконструирована таким образом, чтобы влиять на тип или степень гликозилирования, продлевать период полужизни антител, усиливать или уменьшать взаимодействия с эффекторными клетками или системой комплемента или модулировать некоторые другие свойства. Инжиниринг может быть осуществлен путем замены, добавления или делеции одной или нескольких аминокислот или путем замены домена на домен из другого типа иммуноглобулина, или комбинацией вышеизложенного.

«Антигенсвязывающий фрагмент» и «антигенсвязывающая часть» антитела (или просто «часть антитела» или «фрагмент антитела») означают один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела, такими как (i) фрагментом Fab, моновалентным фрагментом, состоящим из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) фрагментом $F(ab')_2$, двухвалентным фрагментом, состоящим из двух фрагментов Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагментом Fab', который по существу является Fab с частью шарнирной области (см., например, Abbas *et al.*, *Cellular and Molecular Immunology*, 6th Ed., Saunders Elsevier 2007); (iv) фрагментом Fd, состоящим из доменов V_H и C_{H1} ; (v) фрагментом Fv, состоящим из доменов V_L и V_H единственного плеча антитела, (vi) фрагментом dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из домена V_H ; (vii) выделенной определяющей комплементарность областью (CDR); и (viii) нанотелом, варибельной областью тяжелой цепи, содержащей единственный варибельный домен и два константных домена. Предпочтительными антигенсвязывающими фрагментами являются фрагменты Fab, $F(ab')_2$, Fab', Fv и Fd. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с помощью рекомбинантных способов, синтетическим линкером, который позволяет им образовывать единую белковую цепь, в которой области V_L и V_H спариваются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv, или scFv); см., напр., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; и Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающая часть» антитела.

Если не указано иное - например, путем ссылки на линейную нумерацию в перечне SEQ ID NO: - ссылки на нумерацию аминокислотных позиций в варибельной области тяжелой или легкой цепи антитела (V_H или V_L) соответствуют системе Kabat (Kabat *et al.*, «Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., Pub. No. 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991, далее «Kabat») и ссылки на нумерацию аминокислотных положений в константной области тяжелой или легкой цепи антитела (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} или C_L) соответствуют индексу EU, как изложено в Kabat. См. Lazar *et al.*, US 2008/0248028 A1, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки для примеров такого использования. Кроме того, ImMunoGeneTics Information System (IMGT) предоставляет на своем веб-сайте таблицу, озаглавленную «IMGT Scientific Chart: Соответствие между Нумерациями C»

показывают соответствие между своей системой нумерации, нумерацией EU и нумерацией Kabat для константной области тяжелой цепи.

«Выделенное антитело» означает антитело, которое по существу свободно от других антител, имеющих различные антигенные особенности (*напр.*, выделенное антитело, которое специфически связывает антиген X, по существу свободно от антител, которые специфически связывают антигены, отличающиеся от антигена X). Выделенное антитело, которое специфически связывает антиген X, может, однако, иметь перекрестную реактивность к другим антигенам, таким как молекулы антигена X из других видов. В определенных вариантах выполнения изобретения выделенное антитело специфически связывается с человеческим антигеном X и не вступает в перекрестную реакцию с другими (нечеловеческими) антигенами X. Более того, выделенное антитело может быть по существу свободным от других клеточных материалов и/или химических веществ.

«Моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» означает препарат молекул антител одного молекулярного состава, который проявляет единую специфичность связывания и аффинность к определенному эпитопу.

«Человеческое антитело» означает антитело, имеющее переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-области (и константная область, если таковая имеется) получены из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие антитела могут включать более поздние модификации, в том числе природные или синтетические модификации. Человеческие антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (*напр.*, мутации, внесенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако «человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к человеческим каркасным последовательностям.

«Человеческое моноклональное антитело» означает антитело, показывающее единственную специфичность связывания которое имеет переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В одном варианте выполнения изобретения человеческие моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, не являющегося человеком, *напр.*, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, слитый с иммортализованной клеткой.

«Алифатический» означает прямой или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный, неароматический углеводородный фрагмент, имеющий указанное число атомов углерода (*напр.*, как в «С₃ алифатический», «С₁₋₅ алифатический», «С_{1-С₅} алифатический» или «от С₁ до С₅ алифатический», где последние три фразы являются синонимами для алифатического фрагмента, имеющего от 1 до 5 атомов углерода) или где количество атомов углерода не указано явно, от 1 до 4 атомов углерода (от 2 до 4 атомов углерода в случае ненасыщенных алифатических фрагментов). Аналогичное понимание применяется к числу углеродов в других типах, как в С₂₋₄ алкене, С_{4-С₇} циклоалифатическом и т.д. Аналогичным образом, термин «(СН₂)₁₋₃» следует понимать как сокращение для подстрочного индекса 1, 2 или 3, так что такой термин представляет собой СН₂, СН₂СН₂ и СН₂СН₂СН₂.

«Алкил» означает насыщенный алифатический фрагмент с применением того же указания для обозначения числа атомов углерода. В качестве иллюстрации, С_{1-С₄} алкильные фрагменты включают, но без ограничения, метил, этил, пропил, изопропил, изобутил, *трет*-бутил, 1-бутил, 2-бутил и тому подобные. «Алкилен» означает двухвалентный аналог алкильной группы, такой как СН₂СН₂, СН₂СН₂СН₂ и СН₂СН₂СН₂СН₂.

«Алкенил» означает алифатический фрагмент, имеющий по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод, причем применяется то же указание для обозначения числа атомов углерода. В качестве иллюстрации, С_{2-С₄} алкенильные фрагменты включают, но без ограничения, этенил (винил), 2-пропенил (аллил или проп-2-енил), *цис*-1-пропенил, *транс*-1-пропенил, *E*- (или *Z*-) 2-бутенил, 3-бутенил, 1,3-бутадиенил (*бут*-1,3-диенил) и тому подобные.

«Алкинил» означает алифатический фрагмент, имеющий по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод, причем применяется то же указание для обозначения числа атомов углерода. В качестве иллюстрации, С_{2-С₄} алкинильные группы включают этинил (ацетиленил), пропаргил (проп-2-инил), 1-пропинил, *бут*-2-инил и тому подобные.

«Циклоалифатический» означает насыщенный или ненасыщенный, неароматический углеводородный фрагмент, имеющий от 1 до 3 колец, причем каждое кольцо имеет от 3 до 8 (предпочтительно от 3 до 6) атомов углерода. «Циклоалкил» означает циклоалифатический фрагмент, в котором каждое кольцо является насыщенным. «Циклоалкенил» означает циклоалифатический фрагмент, в котором по меньшей мере одно кольцо имеет по меньшей мере одну двойную углерод-углеродную связь. «Циклоалкинил» означает циклоалифатический фрагмент, в котором по меньшей

мере одно кольцо имеет по меньшей мере одну тройную углерод-углеродную связь. В качестве иллюстрации, циклоалифатические фрагменты включают, но без ограничения, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил, циклооктил и адамантил. Предпочтительные циклоалифатические фрагменты представляют собой циклоалкильные фрагменты, особенно циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил. «Циклоалкилен» означает двухвалентный аналог циклоалкильной группы.

«Гетероциклоалифатический» означает циклоалифатический фрагмент, в котором по меньшей мере в одном его кольце вплоть до трех (предпочтительно от 1 до 2) атомов углерода были заменены гетероатомом, независимо выбранным из N, O или S, где N и S необязательно могут быть окислены, и N необязательно может быть кватернизирован. Предпочтительные циклоалифатические фрагменты состоят из одного кольца, размером от 5 до 6 членов. Аналогично, «гетероциклоалкил», «гетероциклоалкенил» и «гетероциклоалкинил» означает циклоалкильный, циклоалкенильный или циклоалкинильный фрагмент, соответственно, в котором по меньшей мере одно его кольцо было так модифицировано. Типичные гетероциклоалифатические фрагменты включают азиридирил, азетидинил, 1,3-диоксанил, оксетанил, тетрагидрофурил, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, тетрагидропиранил, тетрагидротииопиранил, тетрагидротииопиранилсульфон, морфолинил, тиоморфолинил, тиоморфолинила сульфоксид, тиоморфолинила сульфон, 1,3-диоксоланил, тетрагидро-1,1-диоксоиенил, 1,4-диоксанил, тиетанил и тому подобное. «Гетероциклоалкилен» означает двухвалентный аналог гетероциклоалкильной группы.

«Алкокси», «арилокси», «алкилтио» и «арилтио» означают -O(алкил), -O(арил), -S(алкил) и -S(арил), соответственно. Примерами являются метокси, фенокси, метилтио и фенилтио, соответственно.

«Галоген» или «гало» означает фтор, хлор, бром или йод, если не указано более узкое значение.

«Арил» означает углеводородный фрагмент, имеющий моно-, би- или трициклическую кольцевую систему (предпочтительно моноциклическую), в которой каждое кольцо имеет от 3 до 7 атомов углерода и по меньшей мере одно кольцо является ароматическим. Кольца в кольцевой системе могут быть конденсированы друг с другом (как в нафтиле) или связаны друг с другом (как в бифениле) и могут быть конденсированы или связаны с неароматическими кольцами (как в инданиле или циклогексилфениле). В качестве дополнительной иллюстрации, арильные фрагменты

включают, но без ограничения, фенил, нафтил, тетрагидронафтил, инданил, бифенил, фенантринил, антраценил и аценафтил. «Арилен» означает двухвалентный аналог арильной группы, например, 1,2-фенилен, 1,3-фенилен или 1,4-фенилен.

«Гетероарил» означает фрагмент, имеющий моно-, би- или трициклическую кольцевую систему (предпочтительно от 5 до 7-членную моноциклическую), где каждое кольцо имеет от 3 до 7 атомов углерода и по меньшей мере одно кольцо является ароматическим кольцом, содержащим от 1 до 4 гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S, где N и S необязательно могут быть окислены и N необязательно может быть кватернизован. Такое ароматическое кольцо, содержащее по меньшей мере один гетероатом, может быть конденсировано с другими типами колец (как в бензофураниле или тетрагидроизохинолиле) или непосредственно связано с другими типами колец (как в фенилпиридиле или 2-циклопентилпиридиле). В качестве дополнительной иллюстрации, гетероарильные фрагменты включают пирролил, фуранил, тиофенил (тиенил), имидазолил, пиразолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, триазолил, тетразолил, пиридил, N-оксопиридил, пиридазинил, пиримидинил, пиразинил, хинолинил, изохинолинил, хиназолинил, циннолинил, хинозалинил, нафтиридинил, бензофуранил, индолил, бензотиофенил, оксадиазолил, тиадиазолил, фенотиазолил, бензимидазолил, бензтриазолил, дибензофуранил, карбазолил, дибензотиофенил, акридинил и тому подобное. «Гетероарилен» означает двухвалентный аналог гетероарильной группы.

Если указано, что фрагмент может быть замещен, например, с помощью формулировки «незамещенный или замещенный» или «необязательно замещенный», как в «незамещенный или замещенный C₁-C₅ алкил» или «необязательно замещенный гетероарил», такой фрагмент может иметь один или более независимо выбранных заместителей, предпочтительно в количестве от одного до пяти, более предпочтительно в количестве от одного до двух. Заместители и паттерны замещения могут быть выбраны средним специалистом в данной области техники с учетом того, к какому фрагменту присоединен заместитель, чтобы обеспечить соединения, которые являются химически стабильными и которые могут быть синтезированы методиками, известными в данной области, а также способами, изложенными в настоящем документе. Если какой-либо фрагмент идентифицируется как «незамещенный или замещенный» или «необязательно замещенный», то в предпочтительном варианте выполнения такой фрагмент не замещен.

«Арилалкил», (гетероциклоалифатический)алкил», «арилалкенил», «арилалкинил», «биарилалкил» и тому подобное означает алкильный, алкенильный или алкинильный фрагмент, в зависимости от случая, замещенный арильным,

гетероциклоалифатическим, биарильным и т.д. фрагментом, в зависимости от случая может быть с открытой (ненасыщенной) валентностью на алкильном, алкенильном или алкинильном фрагменте, например, как бензил, фенэтил, N-имидазоилэтил, N-морфолиноэтил и тому подобное. И наоборот, «алкиларил», «алкенилциклоалкил» и тому подобное означает арильный, циклоалкильный и т.д. фрагмент, в зависимости от случая заменяется алкильным, алкенильным и т.д. фрагментом, в зависимости от случая, например, как в метилфениле (толиле) или аллилциклогексиле. «Гидроксиалкил», «галогеналкил», «алкиларил», «цианоарил» и тому подобное означают алкильный, арильный и т.д. фрагмент, в зависимости от случая, может быть замещен одним или несколькими идентифицированными заместителями (гидроксил, галоген и т.д., в зависимости от случая).

Например, допустимые заместители включают, но без ограничения, алкил (особенно метил или этил), алкенил (особенно аллил), алкинил, арил, гетероарил, циклоалифатический, гетероциклоалифатический, галоген (особенно фтор), галогеналкил (особенно трифторметил), гидроксил, гидроксиалкил (особенно гидроксиэтил), циано, нитро, алкокси, -O(гидроксиалкил), -O(галогеналкил) (особенно -OCF₃), -O(циклоалкил), -O(гетероциклоалкил), -O(арил), алкилтио, арилтио, =O, =NH, =N(алкил), =NOH, =NO(алкил), -C(=O)(алкил), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(алкил), -C(=O)O(гидроксиалкил), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(алкил), -C(=O)N(алкил)₂, -OC(=O)(алкил), -OC(=O)(гидроксиалкил), -OC(=O)O(алкил), -OC(=O)O(гидроксиалкил), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(алкил), -OC(=O)N(алкил)₂, азидо, -NH₂, -NH(алкил), -N(алкил)₂, -NH(арил), -NH(гидроксиалкил), -NHC(=O)(алкил), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(алкил), -NHC(=O)N(алкил)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(алкил), -SH, -S(алкил), -S(арил), -S(циклоалкил), -S(=O)алкил, -SO₂(алкил), -SO₂NH₂, -SO₂NH(алкил), -SO₂N(алкил)₂ и тому подобное.

Где фрагмент, будучи замещенным, представляет собой алифатический фрагмент, предпочтительные заместители представляют собой арил, гетероарил, циклоалифатический, гетероциклоалифатический, галоген, гидроксил, циано, нитро, алкокси, -O(гидроксиалкил), -O(галогеналкил), -O(циклоалкил), -O(гетероциклоалкил), -O(арил), алкилтио, арилтио, =O, =NH, =N(алкил), =NOH, =NO(алкил), -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(алкил), -C(=O)O(гидроксиалкил), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(алкил), -C(=O)N(алкил)₂, -OC(=O)(алкил), -OC(=O)(гидроксиалкил), -OC(=O)O(алкил), -OC(=O)O(гидроксиалкил), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(алкил), -OC(=O)N(алкил)₂, азидо, -NH₂, -NH(алкил), -N(алкил)₂, -NH(арил), -NH(гидроксиалкил), -NHC(=O)(алкил), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(алкил), -NHC(=O)N(алкил)₂, -NHC(=NH)NH₂,

-OSO₂(алкил), -SH, -S(алкил), -S(арил), -S(=O)алкил, -S(циклоалкил), -SO₂(алкил), -SO₂NH₂, -SO₂NH(алкил) и -SO₂N(алкил)₂. Более предпочтительно заместители представляют собой галоген, гидроксил, циано, нитро, алкокси, -O(арил), =O, =NOH, =NO(алкил), -OC(=O)(алкил), -OC(=O)O(алкил), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(алкил), -OC(=O)N(алкил)₂, азидо, -NH₂, -NH(алкил), -N(алкил)₂, -NH(арил), -NHC(=O)(алкил), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(алкил), -NHC(=O)N(алкил)₂ и -NHC(=NH)NH₂. Особенно предпочтительными являются фенил, циано, галоген, гидроксил, нитро, C₁-C₄алкиокси, -O(C₂-C₄ алкилен)ОН и -O(C₂-C₄ алкилен)галоген.

Где фрагмент, будучи замещенным, представляет собой циклоалифатический, гетероциклоалифатический, арильный или гетероарильный фрагмент, предпочтительными заместителями являются алкил, алкенил, алкинил, галоген, галогеналкил, гидроксил, гидроксиалкил, циано, нитро, алкокси, -O(гидроксиалкил), -O(галогеналкил), -O(арил), -O(циклоалкил), -O(гетероциклоалкил), алкилтио, арилтио, -C(=O)(алкил), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(алкил), -C(=O)O(гидроксиалкил), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(алкил), -C(=O)N(алкил)₂, -OC(=O)(алкил), -OC(=O)(гидроксиалкил), -OC(=O)O(алкил), -OC(=O)O(гидроксиалкил), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(алкил), -OC(=O)N(алкил)₂, азидо, -NH₂, -NH(алкил), -N(алкил)₂, -NH(арил), -NH(гидроксиалкил), -NHC(=O)(алкил), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(алкил), -NHC(=O)N(алкил)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(алкил), -SH, -S(алкил), -S(арил), -S(циклоалкил), -S(=O)алкил, -SO₂(алкил), -SO₂NH₂, -SO₂NH(алкил) и -SO₂N(алкил)₂. Более предпочтительными заместителями являются алкил, алкенил, галоген, галогеналкил, гидроксил, гидроксиалкил, циано, нитро, алкокси, -O(гидроксиалкил), -C(=O)(алкил), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(алкил), -C(=O)O(гидроксиалкил), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(алкил), -C(=O)N(алкил)₂, -OC(=O)(алкил), -OC(=O)(гидроксиалкил), -OC(=O)O(алкил), -OC(=O)O(гидроксиалкил), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(алкил), -OC(=O)N(алкил)₂, -NH₂, -NH(алкил), -N(алкил)₂, -NH(арил), -NH(гидроксиалкил), -NHC(=O)(алкил), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(алкил), -NHC(=O)N(алкил)₂ и -NHC(=NH)NH₂. Особенно предпочтительными являются C₁-C₄ алкил, циано, нитро, галоген и C₁-C₄алкокси.

Если указан диапазон, как «C₁-C₅ алкил» или «от 5 до 10%», то такой диапазон включает конечные точки диапазона, как C₁ и C₅ в первом случае и 5% и 10% во втором случае.

Если конкретные стереоизомеры специально не указаны (напр., жирной или пунктирной связью в соответствующем стереоцентре в структурной формуле, описанием двойной связи как имеющей конфигурацию E или Z в структурной формуле

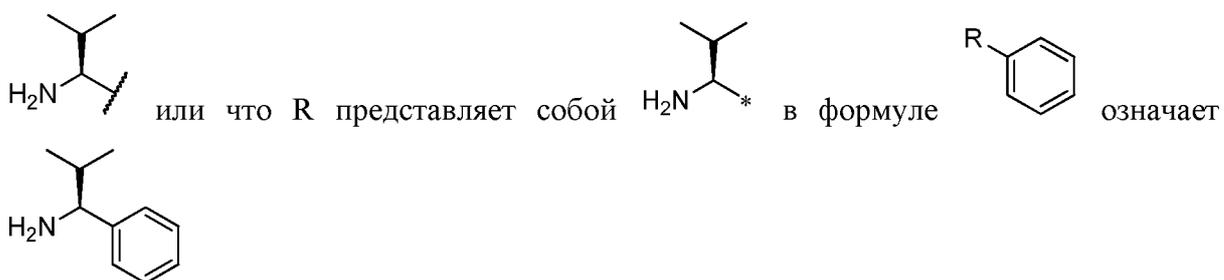
или использованием номенклатуры, обозначающей стереохимию), то все стереоизомеры включены в объем изобретения, также как и чистые соединения и их смеси. Если не указано иное, в настоящее изобретение включены индивидуальные энантимеры, диастереомеры, геометрические изомеры, а также их комбинации и смеси.

Специалисты в данной области техники должны понимать, что соединения могут иметь таутомерные формы (напр., кето и енольные формы), резонансные формы и цвиттерионные формы, которые эквивалентны тем, которые изображены в структурных формулах, используемых в настоящем документе, и что структурные формулы охватывают такие таутомерные, резонансные или цвиттерионные формы.

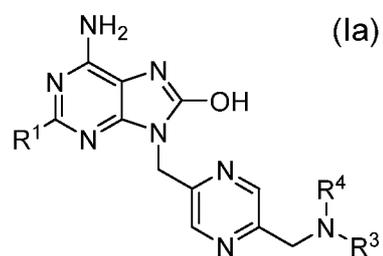
«Фармацевтически приемлемый сложный эфир» означает сложный эфир, который гидролизуется *in vivo* (например, в организме человека) с образованием исходного соединения или его соли или обладает активностью *per se*, сходной с активностью исходного соединения. Подходящие сложные эфиры включают C₁-C₅ алкиловые, C₂-C₅ алкениловые или C₂-C₅ алкиниловые сложные эфиры, особенно метил, этил или н-пропил.

«Фармацевтически приемлемая соль» означает соль соединения, пригодная для фармацевтического состава. Если соединение имеет одну или несколько основных групп, то соль может быть солью присоединения кислоты, такой как сульфат, гидробромид, тартрат, мезилат, малеат, цитрат, фосфат, ацетат, памоат (эмбонат), гидроидрид, нитрат, гидрохлорид, лактат, метилсульфат, фумарат, бензоат, сукцинат, мезилат, лактобионат, суберат, тозилат и тому подобной. Если соединение имеет одну или несколько кислотных групп, то соль может быть такой солью, как кальциевая соль, калиевая соль, магниевая соль, меглуминовая соль, аммониевая соль, цинковая соль, пиперазиновая соль, трометаминовая соль, литиевая соль, холиновая соль, диэтиламинавая соль, 4-фенилциклогексиламинавая соль, бензатиновая соль, натриевая соль, тетраметиламмониевая соль и тому подобной. Полиморфные кристаллические формы и сольваты также охвачены объемом настоящего изобретения.

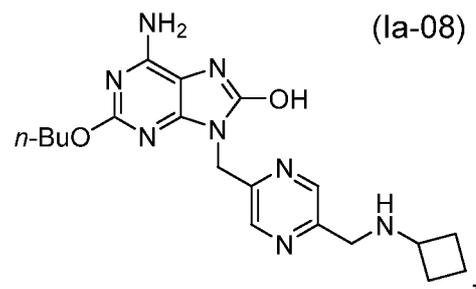
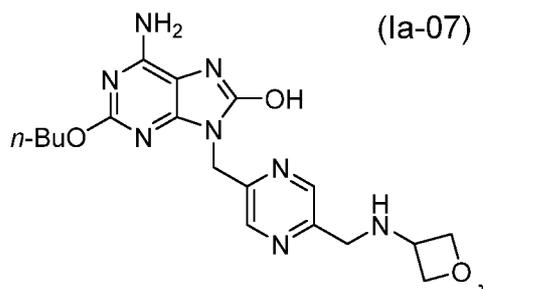
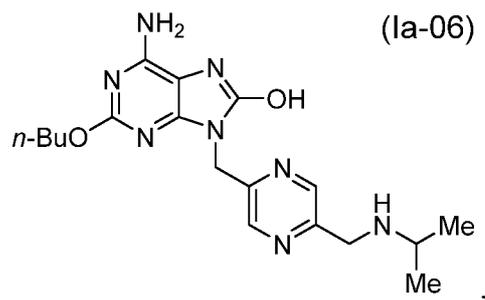
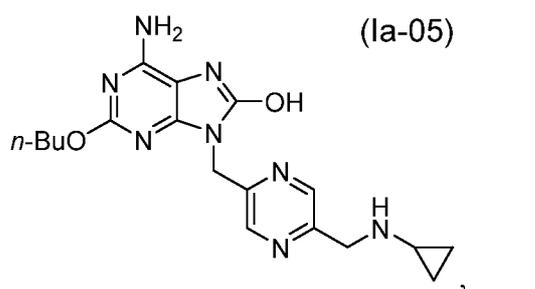
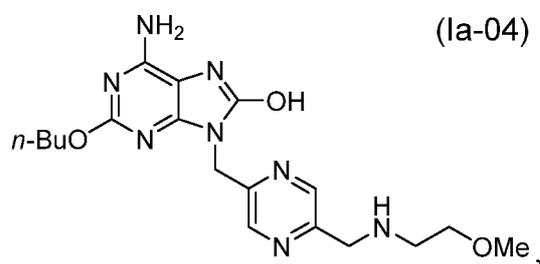
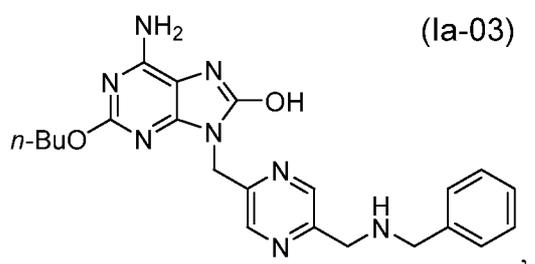
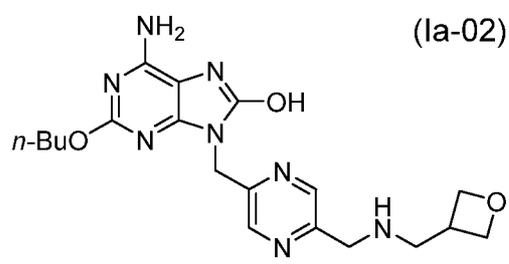
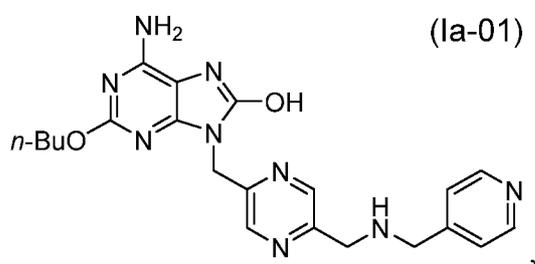
В формулах этого описания волнистая линия (~~~~~) поперек связи или звездочка (*) в конце связи обозначает место ковалентного присоединения. Например, утверждение, что R представляет собой

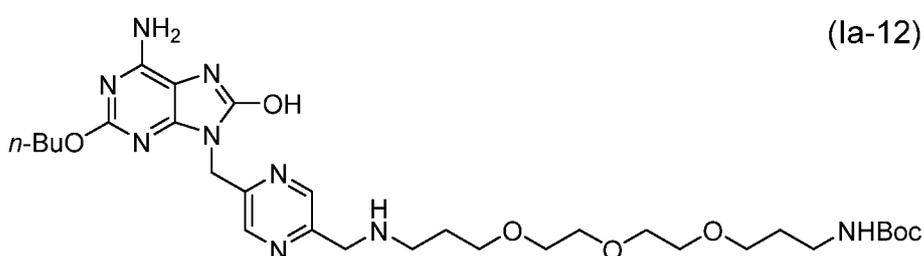
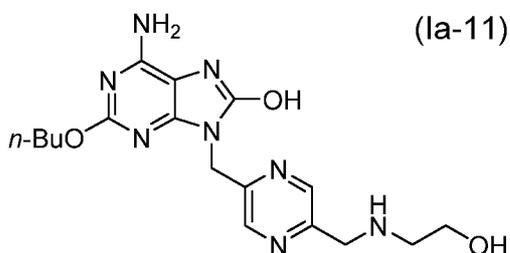
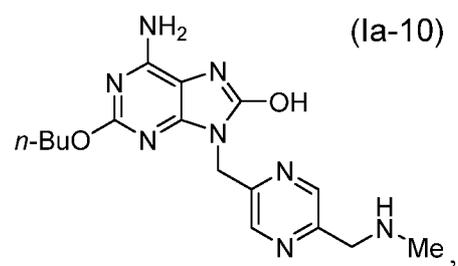
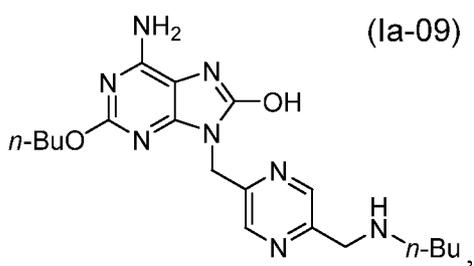


В одном варианте выполнения соединение в соответствии с формулой I представлено формулой (Ia), где R¹ представляет собой *n*-BuO или MeOCH₂CH₂O, предпочтительно *n*-BuO:



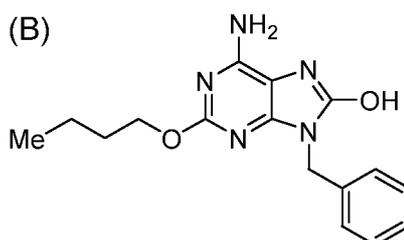
Примеры соединений в соответствии с формулой (Ia) включают:





и

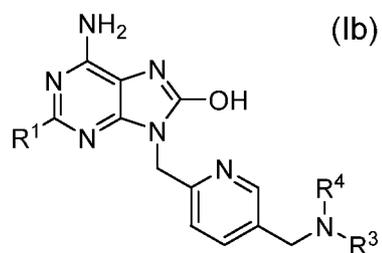
В Таблице А представлены данные о биологической активности соединений (Ia), раскрытых в настоящем документе. Один набор данных относится к активности агонизма TLR7 с использованием репортерного анализа HEK-Blue™ TLR7, как описано ниже. Другой набор данных относится к индукции интерлейкина 6 (IL-6), цитокина, который играет важную роль в пути TLR7. Для сравнения также представлены активности резиквимода, везатолимода, гардиквимода и Соединения В (CAS Reg. No. 226906-84-9).



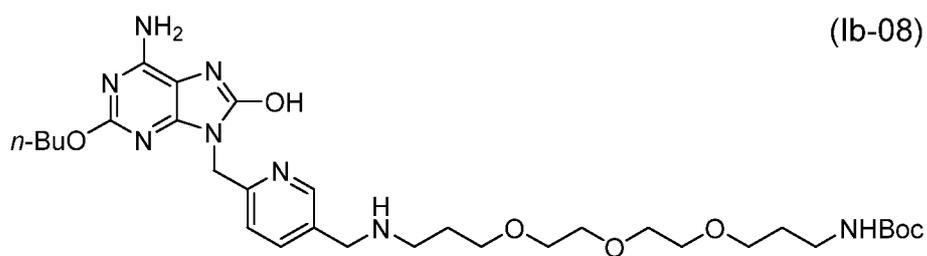
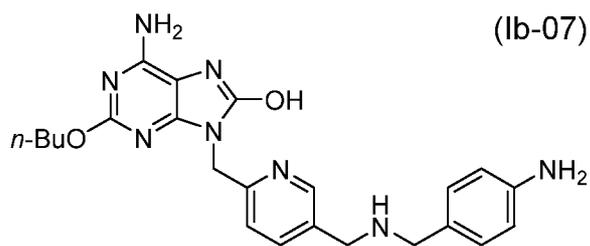
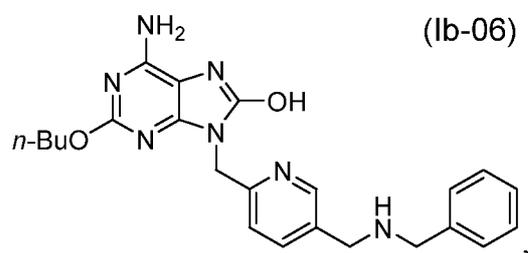
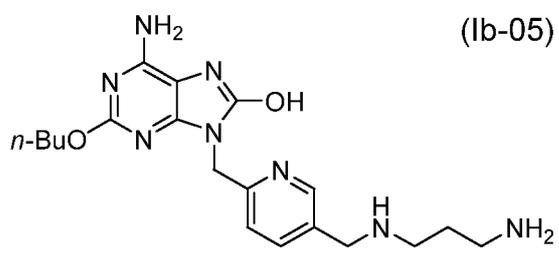
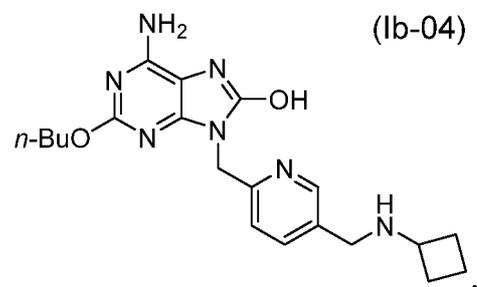
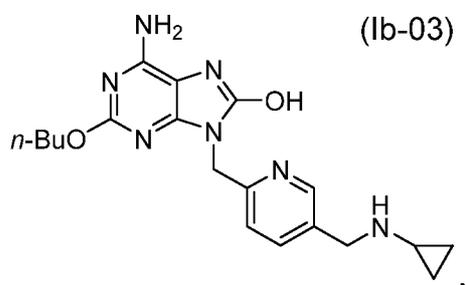
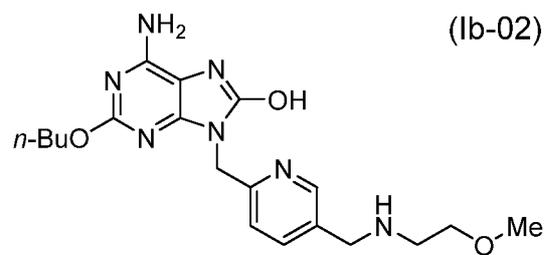
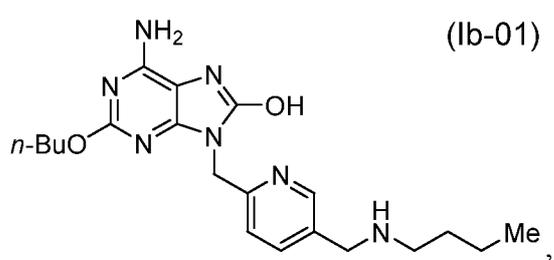
Соединение	Агонизм TLR7 (EC ₅₀ , нМ)	Индукция IL-6 (EC ₅₀ , мкМ)
Резиквимод	~ 230-430	—
Везатолиמוד	1200	—
Гардиквимод	3340	—
Соединение В	470	—

Соединение	Агонизм TLR7 (EC ₅₀ , нМ)	Индукция ИЛ-6 (EC ₅₀ , мкМ)
Ia-01	330	1,0
Ia-02	11200	—
Ia-03	180	1,0
Ia-04	310	0,60
Ia-05	140	0,36
Ia-06	83	0,21
Ia-07	490	1,0
Ia-08	24	0,22
Ia-09	89	0,42
Ia-10	290	0,57
Ia-11	770	—
Ia-12	300	—

В другом варианте выполнения изобретения соединение в соответствии с формулой I представлено формулой (Ib), где R¹ представляет собой *n*-BuO или MeOCH₂CH₂O, предпочтительно *n*-BuO:



Примеры соединений в соответствии с формулой (Ib) включают:



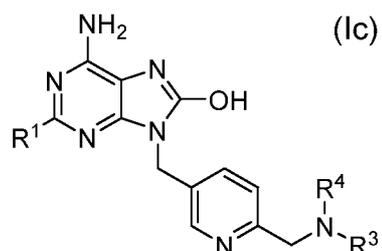
и

В Таблице В представлены данные о биологической активности соединений (Ib), раскрытых в настоящем документе.

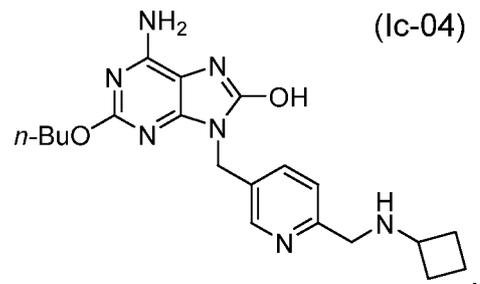
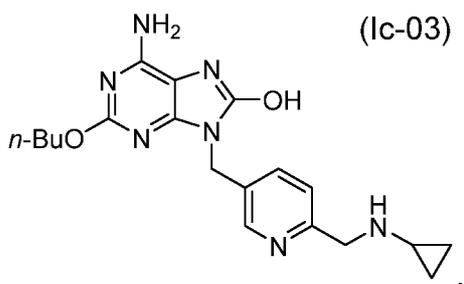
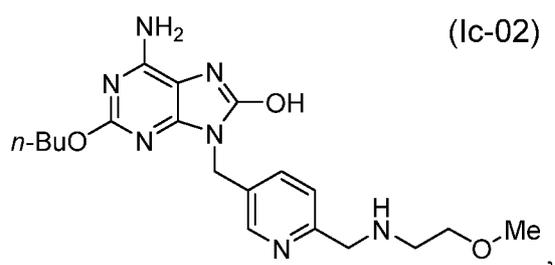
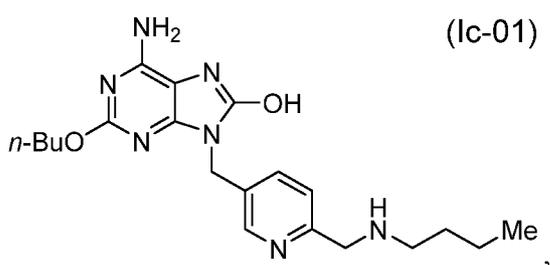
Таблица В - Биологическая Активность Соединений (Ib)		
Соединение	Агонизм TLR7 (EC ₅₀ , нМ)	Индукция IL-6 (EC ₅₀ , мкМ)
Ib-01	15	0,077
Ib-02	28	0,11

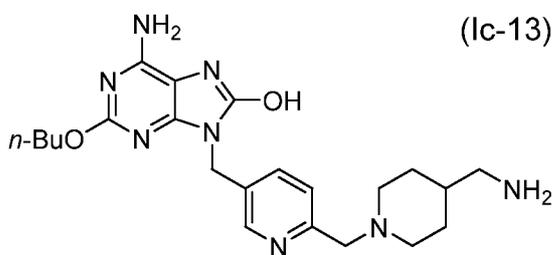
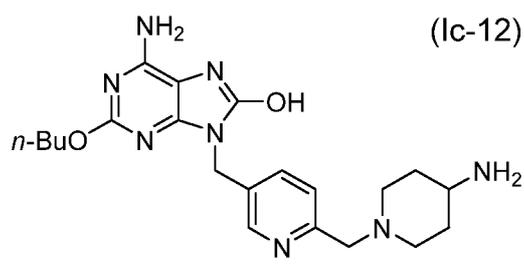
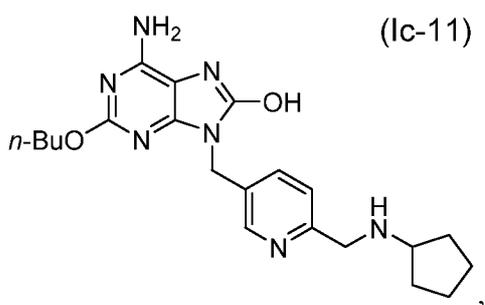
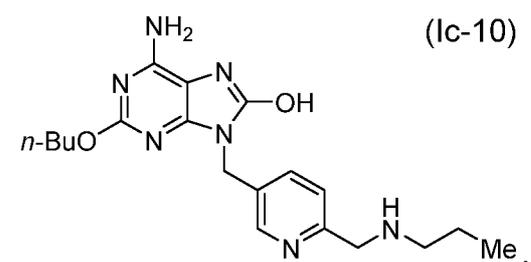
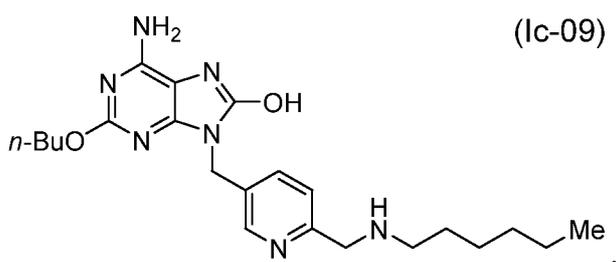
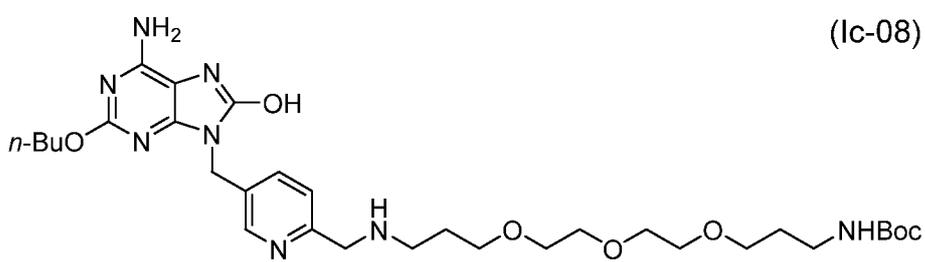
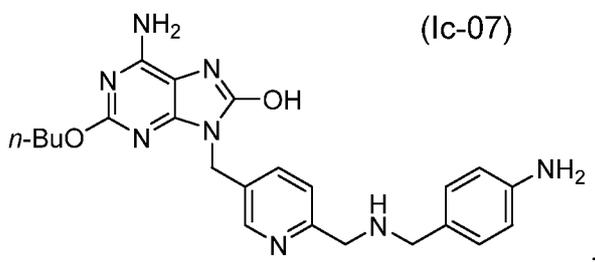
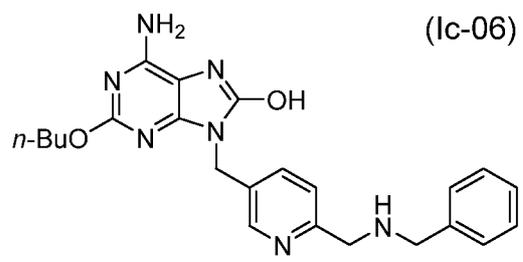
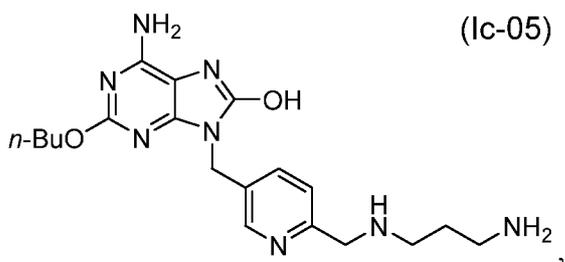
Таблица В - Биологическая Активность Соединений (Ib)		
Соединение	Агонизм TLR7 (EC ₅₀ , нМ)	Индукция IL-6 (EC ₅₀ , мкМ)
Ib-03	18	0,062
Ib-04	12	0,078
Ib-05	62	0,26
Ib-06	22	0,19
Ib-07	41	0,10
Ib-08	47	0,33

В другом варианте выполнения соединение в соответствии с формулой I представлено формулой (Ib), где R¹ представляет собой *n*-BuO или MeOCH₂CH₂O, предпочтительно *n*-BuO:



Примеры соединений в соответствии с формулой (Ic) включают:



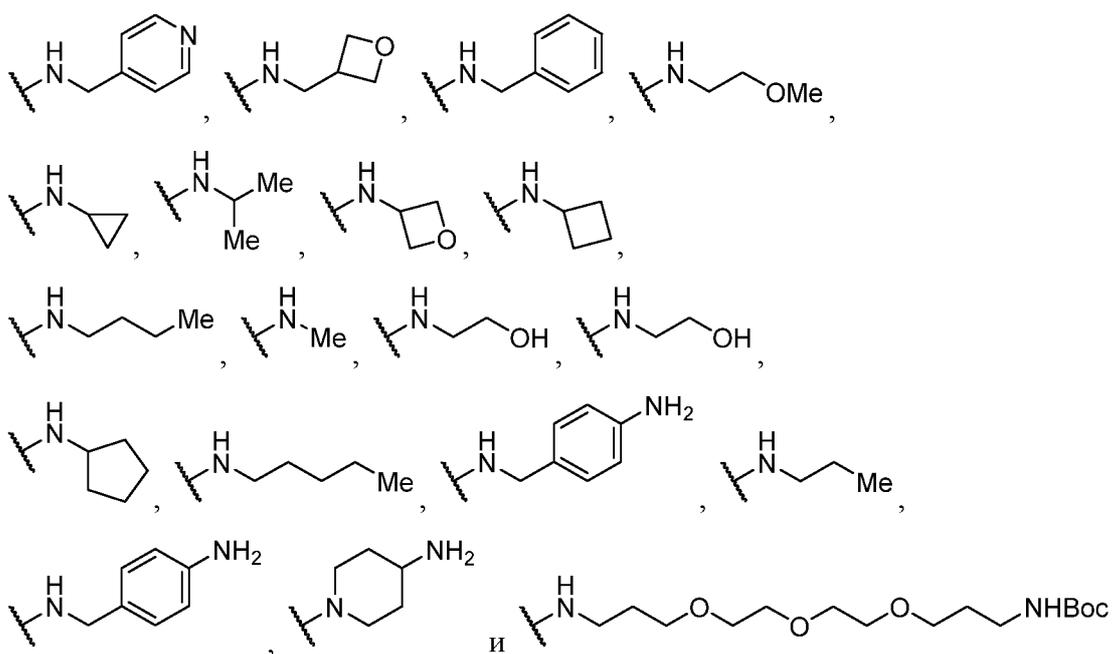


В Таблице С представлены данные о биологической активности соединений (Ic).

Таблица С - Биологическая Активность Соединений (Ic)		
Соединение	Агонизм TLR7 (EC ₅₀ , нМ)	Индукция IL-6 (EC ₅₀ , мкМ)
Ic-01	4,8	0,026
Ic-02	9	—
Ic-03	5,3	0,014
Ic-04	3,6	0,022
Ic-05	14	0,028
Ic-06	110	0,18
Ic-07	11	0,020
Ic-08	23	0,15
Ic-09	11	0,037
Ic-10	6,1	0,027
Ic-11	2,9	0,023
Ic-12	3,1	0,013
Ic-13	4,9	0,011

В формулах (I), (Ia), (Ib) и (Ic) предпочтительно R⁴ представляет собой H, а R³ не представляет собой H.

Конкретные примеры -N(R³)(R⁴), которые могут быть использованы в соединениях формулы (I), (Ia), (Ib) и (Ic) включают:

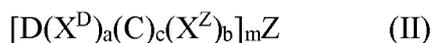


КОНЬЮГАТЫ

Общее

Агонисты TLR7, раскрытые в настоящем документе, могут быть доставлены в место предполагаемого действия путем локализированного введения или путем нацеленной доставки в конъюгате с нацеливающим фрагментом. Предпочтительно, нацеливающий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, и его антиген обнаруживается в месте предполагаемого действия, например, ассоциированный с опухолью антиген, если предполагаемое место действия находится в опухоли (раке). Предпочтительно, ассоциированный с опухолью антиген однозначно экспрессируется или сверхэкспрессируется раковой клеткой по сравнению с нормальной клеткой. Ассоциированный с опухолью антиген может располагаться на поверхности раковой клетки или секретироваться раковой клеткой в ее окружение.

В одном аспекте изобретение относится к конъюгату, содержащему соединение по этому изобретению и лиганд, представленный формулой (II)



где Z представляет собой нацеливающий фрагмент, D представляет собой агонист по этому изобретению, и $-(X^D)_aC(X^Z)_b-$ совместно именуется «линкерный фрагмент» или «линкер», потому что они связывают Z и D . В пределах линкера C представляет собой расщепляемую группу, разработанную для расщепления на месте или рядом с местом предполагаемого биологического действия D ; X^D и X^Z представляют собой спейсерные фрагменты (или «спейсеры»), которые обеспечивают расстояние между D и C и C и Z соответственно; нижние индексы a , b и c независимо представляют собой 0 или 1 (то есть, наличие X^D , X^Z и C не обязательно). Индекс m представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 (предпочтительно 1, 2, 3 или 4). D , X^D , C , X^Z и Z более полно описаны ниже.

Связываясь с целевой тканью или клеткой, где находится ее антиген или рецептор, Z направляет конъюгат туда. Расщепление группы C в целевой ткани или клетке высвобождает D , чтобы вызвать его действие локально. Таким образом, точная доставка D достигается в месте предполагаемого действия, уменьшая необходимую дозировку. Кроме того, D обычно биологически неактивен (или значительно менее активен) в своем конъюгированном состоянии, тем самым уменьшая побочные эффекты.

Как видно из нижнего индекса m , каждый Z может конъюгироваться с более чем одним D в зависимости от количества доступных для конъюгации участков Z и используемых условий эксперимента. Специалисты в данной области техники поймут,

что, хотя каждый отдельный Z конъюгирован с целым количеством D, получение конъюгата может анализировать нецелочисленное соотношение D к Z, отражающее статистическое среднее. Это соотношение называется соотношением замещения («SR») или соотношением лекарственное средство-антитело («DAR»).

Нацеливающий фрагмент Z

Предпочтительно, нацеливающий фрагмент Z представляет собой антитело. Для удобства и краткости, но не для ограничения, подробное обсуждение в этом документе Z и его конъюгатов написано в контексте того, что он является антителом, но специалисты в данной области техники поймут, что другие типы Z могут быть конъюгированы *mutatis mutandis*. Например, конъюгаты с фолиевой кислотой в качестве нацеливающего фрагмента могут нацеливаться на клетки, имеющие фолатный рецептор на своей поверхности (Leamon *et al.*, Cancer Res. **2008**, 68 (23), 9839). По тем же причинам подробное обсуждение в этом документе, в основном, написано в терминах соотношения Z к D ($m = 1$) 1:1.

Антитела, которые могут быть использованы в конъюгатах этого изобретения, включают антитела, распознающие следующие антигены: мезотелин, простатоспецифический мембранный антиген (PSMA), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H3, B7H4 (также известный как O8E), белковая тирозинкиназа 7 (PTK7), глипикан-3, RG1, фукозил-GM1, CTLA-4 и CD44. Антитело может быть от животного (*напр.*, мышинным), химерным, гуманизированным или предпочтительно человеческим. Антитело предпочтительно является моноклональным, особенно моноклональным человеческим антителом. Получение моноклональных антител человека к некоторым из вышеупомянутых антигенов раскрыто в работе Korman *et al.*, US 8,609,816 B2 (2013; B7H4, также известное как O8E; в частности антитела 2A7, 1G11 и 2F9); Rao-Naik *et al.*, 8,097,703 B2 (2012; CD19; в частности, антитела 5G7, 13F1, 46E8, 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3 и 3C10); King *et al.*, US 8,481,683 B2 (2013; CD22; в частности, антитела 12C5, 19A3, 16F7 и 23C6); Keler *et al.*, US 7,387,776 B2 (2008; CD30; в частности, антитела 5F11, 2H9 и 17G1); Terrett *et al.*, US 8,124,738 B2 (2012; CD70; в частности, антитела 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 и 69A7); Korman *et al.*, US 6,984,720 B1 (2006; CTLA-4; в частности, антитела 10D1, 4B6 и 1E2); Korman *et al.*, US 8,008,449 B2 (2011; PD-1; в частности, антитела 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 и 5F4); Huang *et al.*, US 2009/0297438 A1 (2009; PSMA. в частности, антитела 1C3, 2A10, 2F5, 2C6); Cardarelli *et al.*, US 7,875,278 B2 (2011; PSMA; в частности антитела 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 и 1C3); Terrett *et al.*, US 8,222,375 B2 (2012; PTK7; в частности, антитела 3G8, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8);

Harkins *et al.*, US 7,335,748 B2(2008; RG1; в частности, антитела А, В, С и D); Terrett *et al.*, US 8,268,970 B2 (2012; мезотелин; в частности, антитела 3C10, 6A4 и 7B1); Xu *et al.*, US 2010/0092484 A1 (2010; CD44; в частности, антитела 14G9.B8.B4, 2D1.A3.D12 и 1A9.A6.B9); Deshpande *et al.*, US 8,258,266 B2 (2012; IP10; в частности, антитела 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S и 13C4); Kuhne *et al.*, US 8,450,464 B2 (2013; CXCR4; в частности, антитела F7, F9, D1 и E2); и Korman *et al.*, US 7,943,743 B2 (2011; PD-L1; в частности, антитела 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4); раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Предпочтительно, антитело является антителом к мезотелину.

В дополнение к антителу Z может быть фрагментом антитела (таким как Fab, Fab', F(ab')₂, Fd или Fv) или антителом-миметиком, таким как аффитело, доменное антитело (dAb), нанотело, унитело, DARPin, антикалин, версатело, дуокалин, липокалин или авимер.

Любая из нескольких различных реактивных групп на Z может быть сайтом конъюгирования, включая ε-амино группы в остатках лизина, подвешенные углеводные фрагменты, карбоксильные кислотные группы на боковых цепях аспарагиновой или глутаминовой кислот, цистеин-цистеиновые дисульфидные группы и цистеин-тиоловые группы. Обзоры реактивных групп антител, пригодных для конъюгации, см., *напр.*, в Garnett, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 53, 171-216 и Dubowchik and Walker, *Pharmacology & Therapeutics* **1999**, 83, 67-123, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Большинство антител имеют множественные остатки лизина, которые могут быть конъюгированы посредством их ε-амино групп через амидные, мочевиные, тиомочевинные или карбаматные связи.

Тиольная (-SH) группа в боковой цепи цистеина может быть использована для образования конъюгата несколькими способами. Ее можно использовать для образования дисульфидной связи между ним и тиольной группой на линкере. Другой способ заключается в реакции присоединения Михаэля с малеимидной группой на линкере.

Как правило, хотя антитела имеют остатки цистеина, им не хватает свободных тиольных групп, поскольку все их цистеины вовлечены во внутри- или межцепочечные дисульфидные связи. Для того чтобы создать свободную тиольную группу, можно восстановить нативную дисульфидную группу. См., *напр.*, Packard *et al.*, *Biochemistry* **1986**, 25, 3548; King *et al.*, *Cancer Res.* **1994**, 54, 6176; и Doronina *et al.*, *Nature Biotechnol.* **2003**, 21, 778. Альтернативно, цистеин, имеющий свободную группу -SH, может быть

введен путем мутации антитела, замены цистеина на другую аминокислоту или введения его в полипептидную цепь. См., например, Eigenbrot *et al.*, US 7,521,541 B2 (2009); Chilkoti *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 504; Urnovitz *et al.*, US 4,698,420 (1987); Stimmel *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 30445; Bam *et al.*, US 7,311,902 B2 (2007); Kuan *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 7610; Poon *et al.*, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 8571; Junutula *et al.*, *Nature Biotechnology* **2008**, 26, 925 и Rajpal *et al.*, Предварительную Заявку США No. 62/270245, поданную 21 декабря 2015. В еще одном подходе цистеин добавляется к С-концу тяжелой или легкой цепи. См., напр., Liu *et al.*, US 8,865,875 B2 (2014); Cumber *et al.*, *J. Immunol.* **1992**, 149, 120; King *et al.*, *Cancer Res.* **1994**, 54, 6176; Li *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 985; Yang *et al.*, *Protein Engineering* **2003**, 16, 761; и Olafson *et al.*, *Protein Engineering Design & Selection* **2004**, 17, 21. Раскрытия документов, упомянутых в настоящем параграфе, включено в настоящий документ посредством ссылки.

Линкеры и Их Компоненты

Как отмечалось выше, линкер содержит вплоть до трех элементов: расщепляемую группу С и необязательно спейсеры X^Z и X^D.

Группа С является расщепляемой и расщепляется в физиологических условиях. Предпочтительно, она относительно стабильна, пока конъюгат циркулирует в крови, но легко расщепляется, как только конъюгат достигает места предполагаемого действия.

Предпочтительной группой С является пептид, который селективно расщепляется протеазой внутри клетки-мишени, в отличие от протеазы в сыворотке крови. Как правило, пептид содержит от 1 до 20 аминокислот, предпочтительно от 1 до 6 аминокислот, более предпочтительно от 2 до 3 аминокислот. Кислота(ы) может быть природной и/или не встречающейся в природе α -кислотой. Природные аминокислоты представляют собой те, которые кодируются генетическим кодом, а также аминокислоты, полученные из них, *напр.*, гидроксипролин, γ -карбокsigлутамат, цитруллин и О-фосфосерин. В этом описании термин «аминокислота» также включает аналоги и миметики аминокислот. Аналогами являются соединения, имеющие ту же общую структуру H₂N(R)CHCO₂H природной аминокислоты за исключением того, что группа R не является одной из обнаруженных среди природных аминокислот. Примеры аналогов включают гомосерин, норлейцин, метионин-сульфоксид и метионин метилсульфоний. Миметик аминокислоты представляет собой соединение, которое имеет структуру, отличающуюся от общей химической структуры α -аминокислоты, но функционирующее аналогично ей. Аминокислота может быть стереохимии «L», генетически закодированных аминокислот, а также энантиомерной стереохимии «D».

Предпочтительно, С содержит аминокислотную последовательность, которая является последовательностью распознавания расщепления для протеазы. В этой области техники известно много последовательностей распознавания расщепления. См., *напр.*, Matayoshi *et al. Science* 247: 954 (1990); Dunn *et al. Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah *et al. Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber *et al. Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith *et al. Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); и Bouvier *et al. Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995); раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Группа С может быть выбрана таким образом, что она расщепляется протеазой, присутствующей во внеклеточном матриксе в окрестностях рака, *напр.*, протеазой, высвобождаемой вблизи умирающих раковых клеток, или ассоциированной с опухолью протеазой, секретлируемой раковыми клетками. Типичными внеклеточными ассоциированными с опухолью протеазами являются плазмин, матриксные металлопротеазы (ММР), тимет-олигопептидаза (ТОР) и CD10. См., *напр.*, Trouet *et al.*, US 7,402,556 B2 (2008); Dubois *et al.*, US 7,425,541 B2 (2008); и Bebbington *et al.*, US 6,897,034 B2 (2005). Катепсин D, обычно лизосомальный фермент, находящийся внутри клеток, иногда обнаруживается в окружении опухоли, возможно, высвобождается умирающими раковыми клетками.

Для конъюгатов, предназначенных для фермента, С предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, выбранную для расщепления протеазами, такими как катепсины В, С, D, H, L и S, особенно катепсином В. Типичные расщепляемые катепсином В пептиды включают Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit, Ala-Val-Cit, Val-Gly, Val-Gln и Asp-Val-Cit. (Здесь аминокислотные последовательности записываются в направлении от N к C, как в H₂N-AA²-AA¹-CO₂H, если контекст явно не указывает на иное.) См. Dubowchik *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3341; Dubowchik *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3347; и Dubowchik *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 855; раскрытие которых включено посредством ссылки.

Другим ферментом, который может быть использован для расщепления пептидных линкеров, является легумаин, лизосомальная цистеиновая протеаза, которая преимущественно расщепляется в Ala-Ala-Asn.

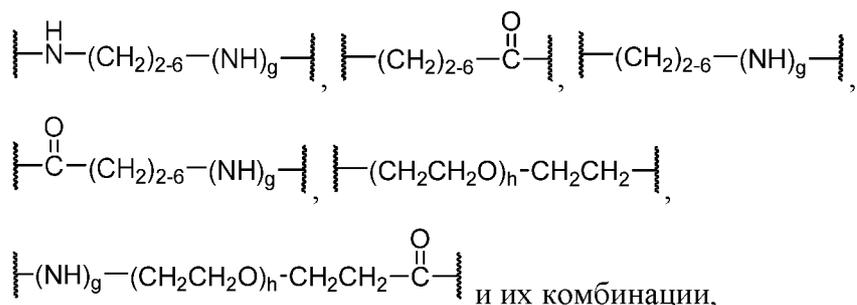
В одном варианте выполнения изобретения Группа С представляет собой пептид, содержащий последовательность двух аминокислот -AA²-AA¹-, где AA¹ представляет собой лизин, аргинин или цитруллин, а AA² представляет собой фенилаланин, валин, аланин, лейцин или изолейцин. В другом варианте выполнения изобретения С состоит из последовательности от одной до трех аминокислот, выбранных из группы, состоящей

из Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Ala-Asn, Lys, Cit, Ser и Glu. Более предпочтительно, она является пептидом с от одной до трех аминокислотами из вышеупомянутой группы.

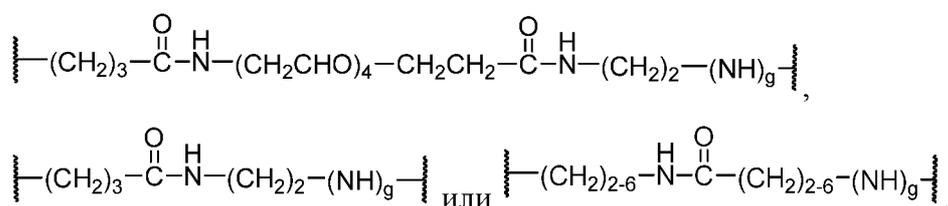
Получение и конструкция расщепляемых групп С, состоящих из одной аминокислоты, раскрыты в Chen *et al.*, US 8,664,407 В2 (2014), раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Группа С может быть связана непосредственно с Z или D; *m.e.*, спейсеры X^Z или X^D, в зависимости от случая, могут отсутствовать.

При наличии, спейсер X^Z обеспечивает пространственное разделение между С и Z, чтобы первый стерически не мешал связыванию антигена последним или последний стерически не мешал расщеплению первого. Кроме того, спейсер X^Z может использоваться для придания конъюгатам повышенной растворимости или пониженных агрегационных свойств. Спейсер X^Z может состоять из одного или нескольких модульных сегментов, которые могут быть собраны в любом количестве комбинаций. Примерами подходящих сегментов для спейсера X^Z являются:



где нижний индекс g представляет собой 0 или 1, а нижний индекс h представляет собой от 1 до 24, предпочтительно от 2 до 4. Эти сегменты можно комбинировать, как показано ниже:



Спейсер X^D, если присутствует, обеспечивает пространственное разделение между С и D, чтобы последний не мешал стерически или электронно расщеплению первого. Спейсер X^D также может служить для введения дополнительной молекулярной массы и химической функциональности в конъюгат. Как правило, дополнительная масса и функциональность будут влиять на период полужизни в сыворотке и другие свойства

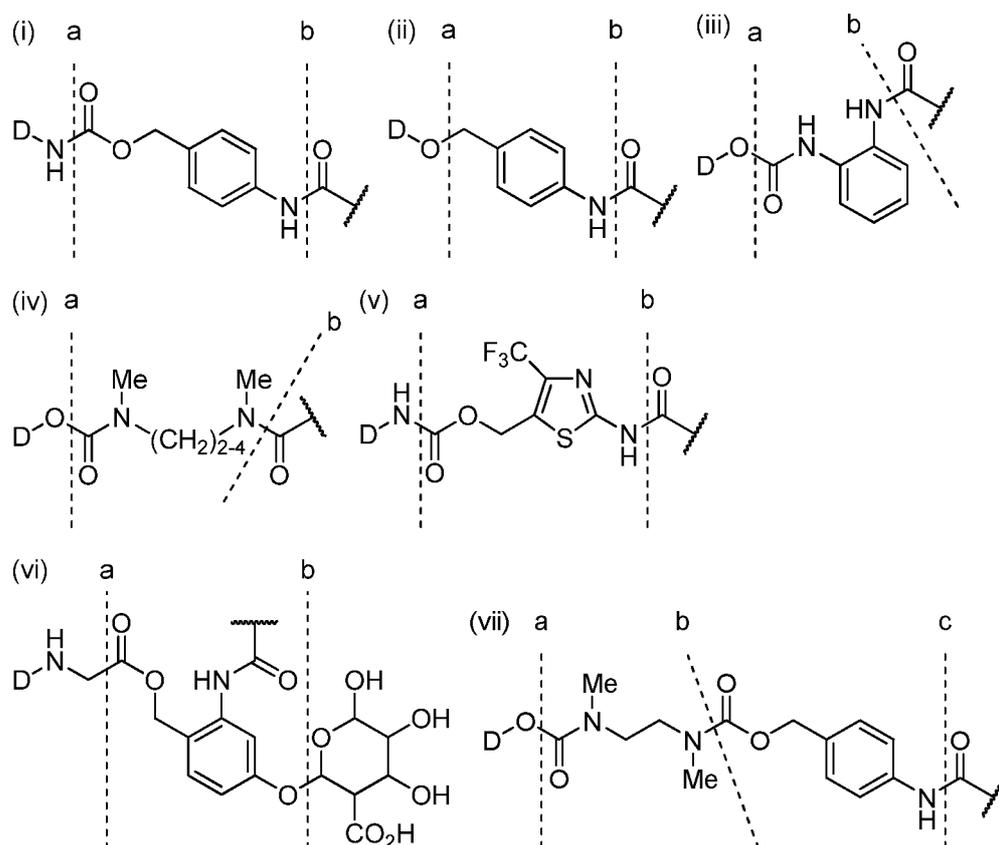
конъюгата. Таким образом, благодаря разумному выбору спейсерных групп можно модулировать период полужизни конъюгата в сыворотке крови. Спейсер X^D также может быть собран из модульных сегментов, аналогично описанию выше для спейсера X^Z .

Спейсеры X^Z и/или X^D , где они присутствуют, предпочтительно обеспечивают линейное разделение от 4 до 25 атомов, более предпочтительно от 4 до 20 атомов, между Z и C или D и C соответственно.

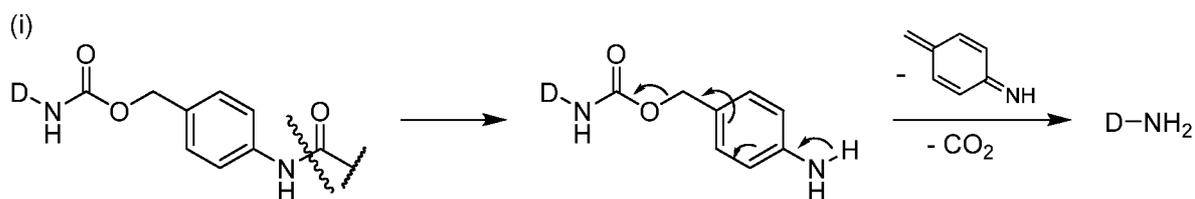
Линкер может выполнять другие функции в дополнение к ковалентному связыванию антитела и лекарственного средства. Например, линкер может содержать группу поли(этиленгликоля) («ПЭГ»). Поскольку стадия конъюгации обычно включает связывание лекарственного средства-линкера с антителом в водной среде, группа ПЭГ намного повышает растворимость в воде лекарственного средства-линкера. Кроме того, группа ПЭГ может повысить растворимость или уменьшить агрегацию полученного ADC. Там, где присутствует группа ПЭГ, она может быть введена либо в спейсер X^Z , либо в X^D , либо в оба. Число повторяющихся единиц в группе ПЭГ может быть от 2 до 20, предпочтительно от 4 до 10.

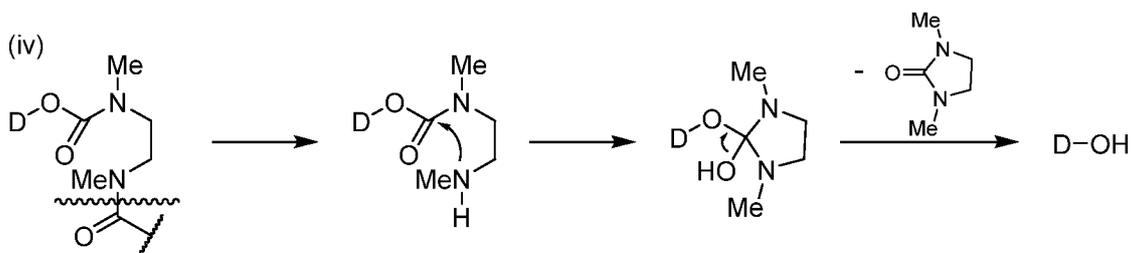
Либо спейсер X^Z , либо X^D , либо оба может содержать саморазрушающуюся часть. Саморазрушающийся фрагмент представляет собой фрагмент, который (1) связан с C и либо Z, либо D и (2) имеет такую структуру, что отщепление от группы C инициирует последовательность реакций, в результате чего саморазрушающийся фрагмент рвет связь с Z или D в зависимости от случая. Другими словами, реакция по месту, удаленному от Z или D (отщепление от группы C), также приводит к разрыву связи X^Z -Z или X^D -D. В случае спейсера X^D желательна наличие саморазрушающегося фрагмента, поскольку, если после расщепления конъюгата спейсер X^D или его часть останутся присоединенными к D, биологическая активность D может быть нарушена. Использование саморазрушающегося фрагмента особенно желательно там, где расщепляемая группа C представляет собой полипептид, в котором саморазрушающийся фрагмент обычно расположен рядом с ней, чтобы предотвратить D от стерического или электронного вмешательства в расщепление пептида.

Типичные саморазрушаемые фрагменты (i)-(v), связанные с гидроксильной или аминогруппой D, показаны ниже:



Саморазрушающийся фрагмент представляет собой структуру между пунктирными линиями а и b (или пунктирными линиями b и c), с соседними структурными элементами, показанными для обеспечения контекста. Саморазрушающиеся фрагменты (i) и (v) связаны с D-NH₂ (*m.e.*, конъюгирование имеет место через аминогруппу), в то время как саморазрушающиеся фрагменты (ii), (iii) и (iv) связаны с D-OH (*t.e.*, конъюгирование имеет место через гидроксильную или карбоксильную группу). Расщепление связи на пунктирной линии b ферментом-пептидазой в случае структур (i)-(v) и β-глюкуронидазой в случае структуры (vi) - инициирует последовательность саморазрушающих реакций, которая приводит к расщеплению связи на пунктирной линии а и последующему высвобождению D-OH или D-NH₂ в зависимости от случая. В качестве иллюстрации ниже показаны механизмы саморазрушения структур (i) и (iv):





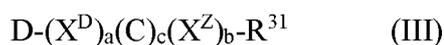
Другими словами, расщепление первой химической связи в одной части саморазрушающейся группы инициирует последовательность шагов, которая приводит к расщеплению второй химической связи - той, которая соединяет саморазрушающуюся группу с лекарственным средством - в другой части саморазрушающейся группы, тем самым высвобождая лекарственное средство.

В некоторых случаях саморазрушающиеся группы могут использоваться в тандеме, как показывает структура (vii). В таком случае расщепление по пунктирной линии с запускает саморазрушение фрагмента между пунктирными линиями b и c путем реакции 1,6-элиминирования, с последующим саморазрушением фрагмента между пунктирными линиями a и b путем реакции циклизации-элиминирования. Дополнительные сведения о саморазрушающихся группах см. в Carl *et al.*, *J. Med. Chem.* **1981**, 24, 479; Carl *et al.*, WO 81/01145 (1981); Dubowchik *et al.*, *Pharmacology & Therapeutics* **1999**, 83, 67; Firestone *et al.*, US 6,214,345 B1 (2001); Toki *et al.*, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 1866; Doronina *et al.*, *Nature Biotechnology* **2003**, 21, 778 (*erratum*, p. 941); Boyd *et al.*, US 7,691,962 B2; Boyd *et al.*, US 2008/0279868 A1; Sufi *et al.*, WO 2008/083312 A2; Feng, US 7,375,078 B2; Jeffrey *et al.*, US 8,039,273; и Senter *et al.*, US 2003/0096743 A1; раскрытие которых включено посредством ссылки.

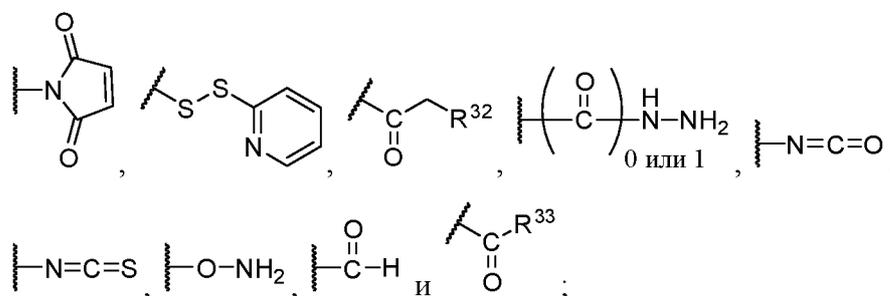
В другом варианте выполнения Z и D связаны нерасщепляемым линкером, *m.e.*, C отсутствует. Метаболизм D в конечном итоге сводит линкер к небольшому добавленному фрагменту, который не мешает биологической активности D.

Методики Конъюгирования

Конъюгаты агонистов TLR7, раскрытых в настоящем документе, предпочтительно получают путем предварительного получения соединения, содержащего D и линкер $(X^D)_a(C)_c(X^Z)_b$ (где X^D , C, X^Z , a, b и c определены для формулы (II)), с образованием соединения лекарственное средство-линкер, представленного формулой (III):

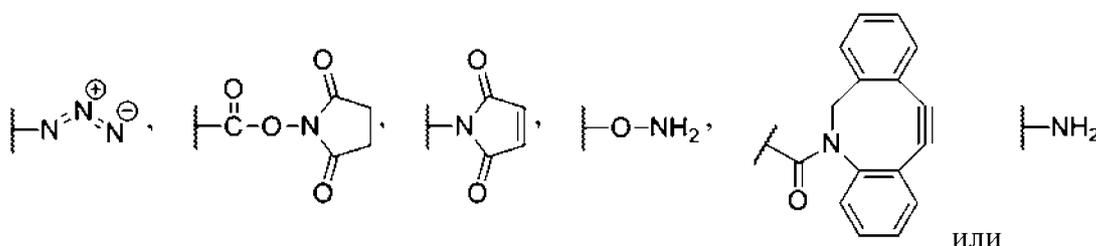


где R^{31} представляет собой функциональную группу, пригодную для взаимодействия с комплементарной функциональной группой на Z с образованием конъюгата. Примеры подходящих групп R^{31} включают amino, азид, тиол, циклооктин,



где R^{32} представляет собой Cl, Br, F, мезилат или тозилат, и R^{33} представляет собой Cl, Br, I, F, OH, -O-N-сукцинимидил, -O-(4-нитрофенил), -O-пентафторфенил или -O-тетрафторфенил. Химические процессы, обычно используемые для получения подходящих фрагментов $D-(X^D)_aC(X^Z)_b R^{31}$, раскрыты в Ng *et al.*, US 7,087,600 B2 (2006); Ng *et al.*, US 6,989,452 B2 (2006); Ng *et al.*, US 7,129,261 B2 (2006); Ng *et al.*, WO 02/096910 A1; Boyd *et al.*, US 7,691,962 B2; Chen *et al.*, US 7,517,903 B2 (2009); Gangwar *et al.*, US 7,714,016 B2 (2010); Boyd *et al.*, US 2008/0279868 A1; Gangwar *et al.*, US 7,847,105 B2 (2010); Gangwar *et al.*, US 7,968,586 B2 (2011); Sufi *et al.*, US 8,461,117 B2 (2013); и Chen *et al.*, US 8,664,407 B2 (2014); раскрытия которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предпочтительно, реактивная функциональная группа R^{31} представляет собой -NH₂, -OH, -CO₂H, -SH, малеимино, циклооктин, азидо (-N₃), гидроксиламино (-ONH₂) или N-гидроксисукцинимидо. Особенно предпочтительными функциональными группами R^{31} являются:



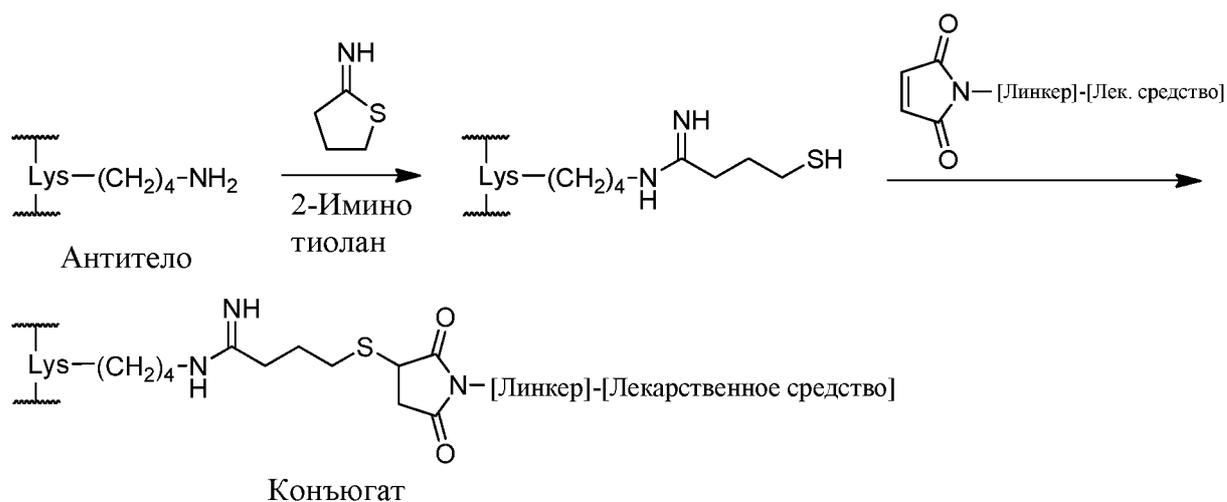
Группа -OH может быть этерифицирована с помощью карбокси группы на антители, например, на боковой цепи аспарагиновой или глутаминовой кислоты.

Группа $-CO_2H$ может быть этерифицирована с помощью группы $-OH$ или амидирована с помощью аминогруппы (например, на боковой цепи лизина) на антителе.

N-гидроксисукцинимидная группа является функционально активированной карбоксильной группой и может быть легко амидирована по реакции с аминогруппой (*напр.*, из лизина).

Малеимидная группа может быть конъюгирована с группой SH на антителе (*напр.*, из цистеина или из химической модификации антитела для введения сульфгидрильной функциональности) по реакции присоединения Михаэля.

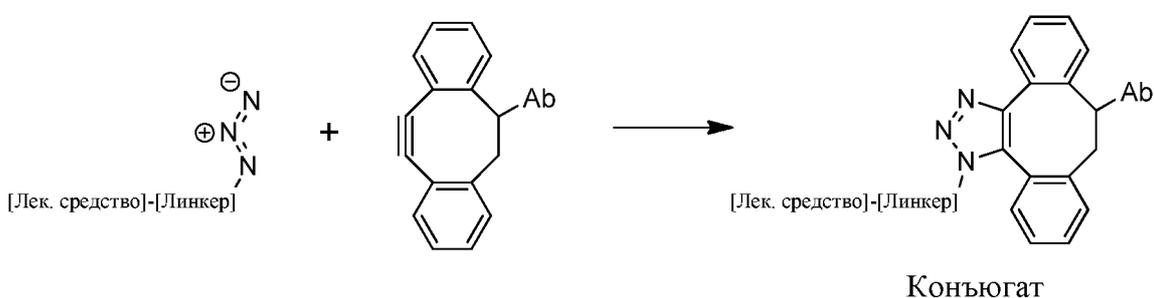
Там, где антитело не имеет цистеин $-SH$, доступной для конъюгации, ϵ -аминогруппа в боковой цепи остатка лизина может реагировать с 2-иминотиолоном или N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдидитио)пропионатом («SPDP») для введения свободной тиольной ($-SH$) группы - создавая, так сказать, суррогат цистеина. Тиольная может вступать в реакцию с малеимидной или другой нуклеофильной акцепторной группой для осуществления конъюгации. Механизм проиллюстрирован ниже с 2-иминотиолоном.



Как правило, достигается уровень тиолирования от двух до трех тиолов на антитело. Для репрезентативной процедуры см. Cong *et al.*, US 8,980,824 B2 (2015), раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В обратном расположении антитело Z может быть модифицировано N-сукцинимидил 4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилатом («SMCC») или его сульфонируемым вариантом сульфо-SMCC, оба из которых доступны от Sigma-Aldrich, для введения в него малеимидной группы. Затем конъюгация может быть осуществлена с соединением лекарственное средство-линкер, имеющим группу $-SH$ на линкере.

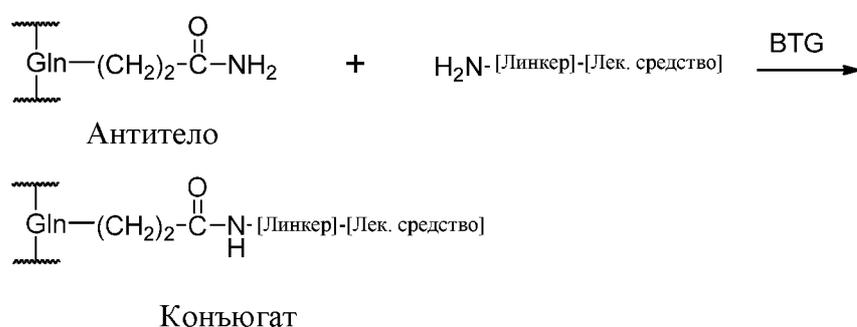
В альтернативном способе конъюгации используется свободная от меди «клик-химия», где добавляется азидная группа через напряженный циклооктин с формированием 1,2,3-триазольного кольца. См. *nanpr.*, Agard *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046; Best, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571, содержания которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Азид может располагаться на антителе, а циклооктин - на фрагменте лекарственное средство-линкер, или наоборот. Предпочтительной циклооктиновой группой является дибензоциклооктин (DIBO). Различные реагенты, имеющие группу DIBO, доступны от Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, Oregon. Реакция ниже иллюстрирует конъюгацию клик-химии для случая, когда группа DIBO присоединена к антителу (Ab):



Еще одна методика конъюгации включает введение не встречающейся в природе аминокислоты в антитело, причем не встречающаяся в природе аминокислота обеспечивает функциональность для конъюгации с реактивной функциональной группой в фрагменте лекарственного средства. Например, не встречающаяся в природе аминокислота п-ацетилфенилаланин может быть включена в антитело или другой полипептид, как раскрыто в Tian *et al.*, WO 2008/030612 A2 (2008). Кето-группа в п-ацетилфенилаланине может быть местом конъюгации через образование оксима с гидроксиламиновой группой на фрагменте линкер- лекарственное средство. Альтернативно, не встречающаяся в природе аминокислота п-азидофенилаланин может быть включена в антитело, чтобы обеспечить азидную функциональную группу для конъюгации с помощью клик-химии, как описано выше. Не встречающиеся в природе аминокислоты могут также быть включены в антитело или другой полипептид при использовании бесклеточных способов, как раскрыто в Goerke *et al.*, US 2010/0093024 A1 (2010) и Goerke *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102* (2), 400-416. Вышеуказанные раскрытия включены в настоящий документ посредством ссылки. Таким образом, в одном варианте выполнения изобретения антитело, которое применяется для приготовления конъюгата, имеет одну или несколько аминокислот, замененную

невстречающейся в природе аминокислотой, которой предпочтительно является п-ацетилфенилаланин или п-азидофенилаланин, более предпочтительно п-ацетилфенилаланин.

В еще одной методике конъюгации используется фермент трансглутаминаза (предпочтительно, бактериальная трансглутаминаза из *Streptomyces mobaraensis* или BTG), по Jeger *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9995. BTG образует амидную связь между карбоксамидом боковой цепи глутамина (акцептор амина) и алкиленаминогруппой (донор амина), которая может быть, например, ε-аминогруппой лизина или 5-амино-н-пентильной группой. В типичной реакции конъюгации остаток глутамина находится на антителе, в то время как алкиленаминогруппа расположена на фрагменте линкер-лекарственное средство, как показано ниже:



Расположение остатка глутамина на полипептидной цепи оказывает большое влияние на ее восприимчивость к трансамидированию, опосредованному BTG. Ни один из остатков глутамина на антителе обычно не является субстратами BTG. Однако если антитело дегликозилировано - местом гликозилирования является аспарагин 297 (N297; нумерация по индексу ЕС, как указано в Kabat *et al.*, «Sequences of proteins of immunological interest», 5th ed., Pub. No. 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991; далее «Kabat») тяжелой цепи - близлежащий глутамин 295 (Q295) оказывается восприимчивым к BTG. Антитело может быть ферментативно дегликозилировано путем обработки PNGase F (Пептид-N-Глюкозидазой F). Альтернативно, антитело может быть синтезировано без гликозида путем введения мутации N297A в константную область для того, чтобы убрать сайт гликозилирования N297. Кроме того, было показано, что замену N297Q не только устраняет гликозилирование, но и вводит второй остаток глутамина (в положение 297), который также является акцептором амина. Таким образом, в одном варианте выполнения изобретения антитело дегликозилировано. В другом варианте выполнения изобретения антитело имеет замещение N297Q. Специалистам в данной области техники понятно, что

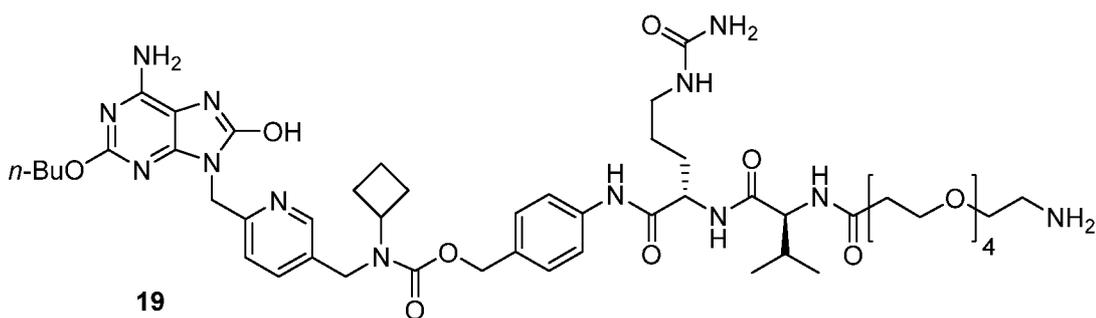
дегликозилирование путем постсинтезной модификации или включения мутации N297A генерирует два VTG-реактивных остатка глутамина на антитело (один на тяжелую цепь, в положении 295), в то время как антитело с заменой N297Q будет иметь четыре VTG-реактивных остатка глутамина (два на тяжелую цепь, в положениях 295 и 297).

Антитело также может быть восприимчиво к конъюгации, опосредованной VTG, путем введения в него содержащего глутамин пептида, или «метки», как раскрыто, например, в Pons *et al.*, US 2013/0230543 A1 (2013) и Rao-Naik *et al.*, WO 2016/144608 A1.

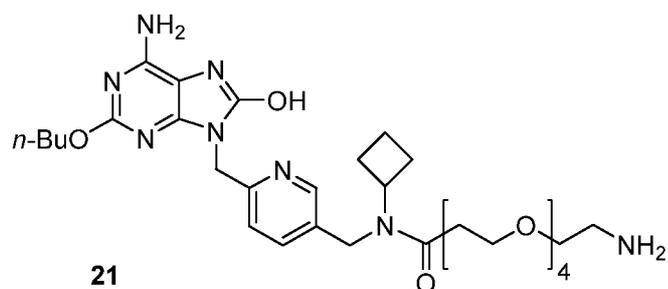
В комплементарном подходе субстратная специфичность VTG может быть изменена путем изменения его аминокислотной последовательности, так что он становится способным реагировать с глутамином 295 в немодифицированном антителе, как это показано в Rao-Naik *et al.*, WO 2017/059158 A1 (2017).

В то время как наиболее распространенной бактериальной трансглутаминазой является полученная из *S. mobaraensis*, можно рассматривать трансглутаминазу из других бактерий, имеющих несколько иные субстратные особенности, такие как трансглутаминаза из *Streptovercillium ladakamum* (Hu *et al.*, US 2009/0318349 A1 (2009), US 2010/0099610 A1 (2010) и US 2010/0087371 A1 (2010)).

Агонисты TLR7 по настоящему описанию, имеющие первичный или вторичный алкиламин, особенно пригодны для применения в конъюгатах, поскольку вторичный амин обеспечивает функциональную группу для присоединения линкера. Примером такого соединения агонист TLR7-линкер является соединение **19**, которое содержит ферментативно расщепляемый линкер. На **ФИГ. 4** показана схема, по которой может быть получено соединение **19**.



Примером соединения агонист TLR7-линкер, которое содержит неферментативно расщепляемый линкер, является соединение **21**. На **ФИГ. 5** показана схема синтеза соединения **21**.

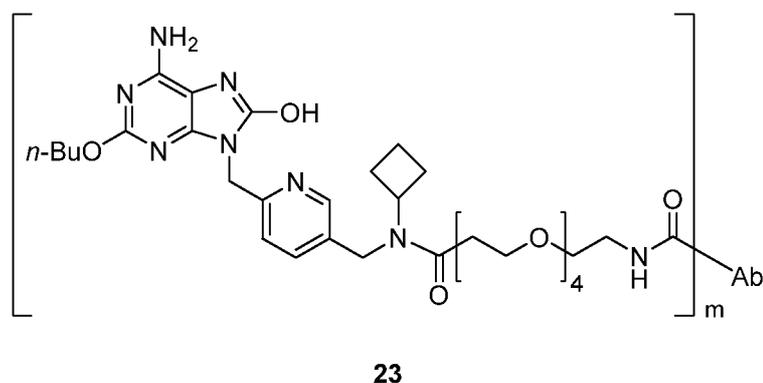
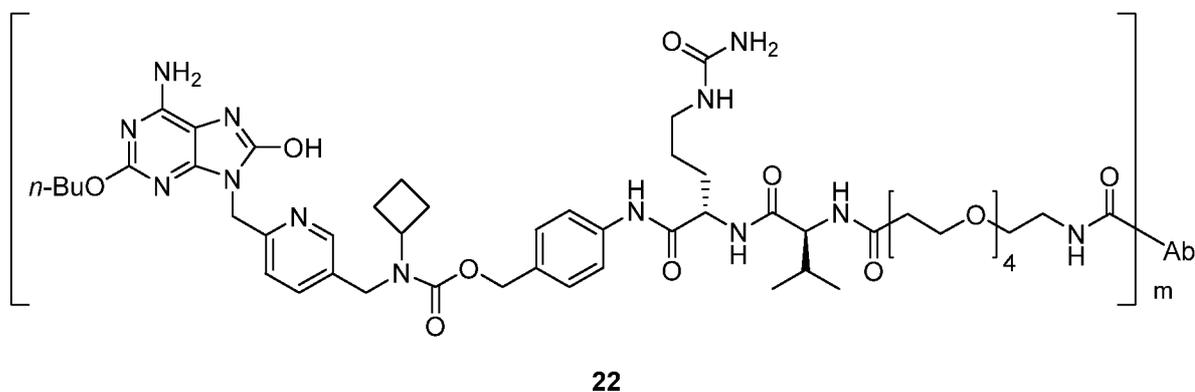


Оба соединения **19** и **21** содержат первичную алкиламиногруппу, что делает их пригодными для конъюгации с транскламиназой. Подходящая процедура конъюгирования описана в приведенных ниже Примерах.

Конъюгирование также может быть осуществлено с помощью фермента Sortase A, как раскрыто в Levary *et al.*, *PLoS One* 2011, 6(4), e18342; Proft, *Biotechnol. Lett.* **2010**, 32, 1-10; Ploegh *et al.*, WO 2010/087994 A2 (2010); и Mao *et al.*, WO 2005/051976 A2 (2005). Мотив распознавания Sortase A (обычно LPXTG, где X является любой встречающейся в природе аминокислотой) может быть расположен на лиганде Z, а нуклеофильный акцепторный мотив (обычно GGG) может быть группой R³¹ в формуле (III) или наоборот.

Конъюгаты Агонистов TLR7

Применяя описанные ранее методики, можно получить конъюгаты агонистов TLR7, такие как показанные ниже:



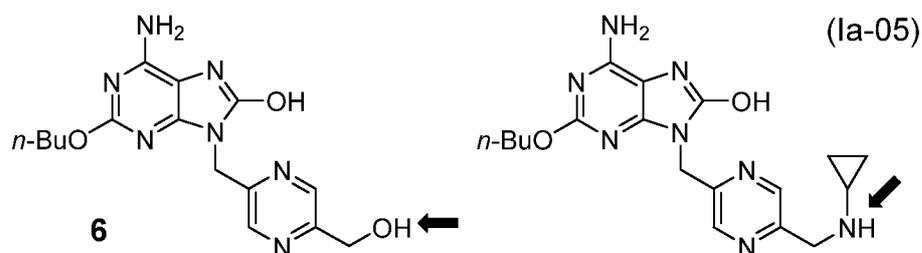
где m представляет собой 1, 2, 3 или 4, а Ab представляет собой антитело.

ПЭГИЛИРОВАНИЕ

Присоединение цепи поли(этиленгликоля) (ПЭГ) к лекарственному средству («ПЭГилирование») может улучшить фармакокинетические свойства последнего. Период циркуляционной полужизни лекарственного средства увеличивается, иногда более чем на порядок, и одновременно уменьшается дозировка, необходимая для достижения желаемого терапевтического эффекта. ПЭГилирование может также уменьшить метаболическую деградацию лекарственного средства и снизить его иммуногенность. Обзор см. в Kolate et al., *J. Controlled Release* 2014, 192, 167.

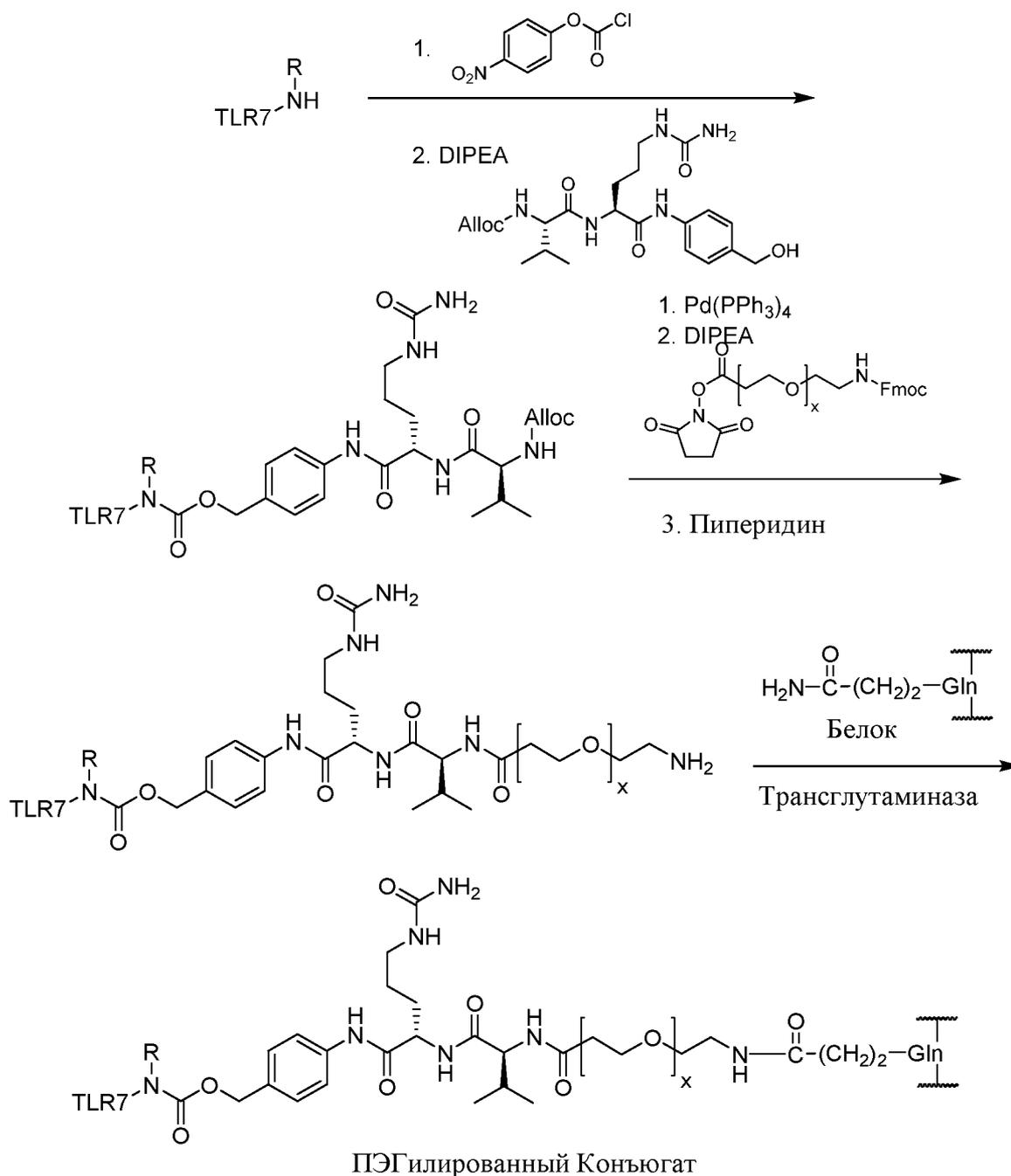
Первоначально, ПЭГилирование применялось к биологическим лекарственным средствам. По состоянию на 2016 год было одобрено более десяти ПЭГилированных биологических лекарственных средств. Turecek et al., *J. Pharmaceutical Sci.* 2016, 105, 460. В последнее время стимулируемое успешным применением этой концепции к биологическим лекарственным средствам внимание переключилось на его применение к низкомолекулярным лекарственным средствам. В дополнение к вышеупомянутым преимуществам ПЭГилированные низкомолекулярные лекарственные средства могут иметь повышенную растворимость и вызывать меньше токсических эффектов. Li et al. *Prog. Polymer Sci.* 2013, 38, 421.

Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть ПЭГилированы. Где соединение имеет алифатический гидроксил или алифатический первичный или вторичный амин, как в случае соединения 6 (ФИГ. 1) или Ia-05 (стрелки), он может быть ПЭГилирован через сложноэфирные, амидные, карбонатные или карбаматные группы с содержащей карбокси молекулой ПЭГ с использованием обычных методик, таких как дициклогексилкарбодиимидный, HATU, N-гидроксисукцинимидный сложные эфиры и тому подобное. Различные другие способы ПЭГилирования фармацевтических молекул описаны в Alconcel et al., *Polymer Chem.* 2011, 2, 1442, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.



При желании агонист TLR7, раскрытый в настоящем документе, может быть ПЭГилирован с помощью ферментативно расщепляемого линкера, содержащего

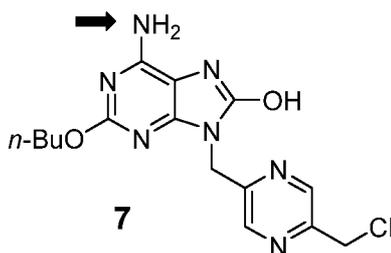
саморазрушающийся фрагмент, чтобы обеспечить высвобождение не-ПЭГилированного агониста разработанным способом. Кроме того, ПЭГилирование может быть объединено с конъюгацией с белком, таким как антитело, если содержащая ПЭГ молекула имеет подходящую функциональную группу, такую как амин, для присоединения к белку. Белок может обеспечить дополнительную терапевтическую функцию или, в случае антитела, может обеспечить нацеливающую функцию. Эти концепции иллюстрируются в следующей последовательности реакций, где TLR7-NH-R, в общем случае, представляет собой агонист TLR7:



В приведенной выше последовательности реакции дипептид валин-цитруллин (Val-Cit) расщепляется ферментом катепсином В, причем *p*-аминобензилоксикарбонильная (РАВС) группа служит в качестве саморазрушающегося спейсера. Функциональной группой для конъюгации является аминогруппа, которая временно защищена группой Fmoc. Конъюгация осуществляется ферментом трансклутаминазой, где боковая цепь глутамина (Gln) действует в качестве акцептора ацила. Подстрочный индекс *x*, обозначающий количество повторяющихся единиц ПЭГ, может варьироваться в широких пределах в зависимости от цели ПЭГилирования, как описано ниже. Для некоторых целей *x* может быть относительно небольшим, таким как 2, 4, 8, 12 или 24. Для других целей *x* является большим, например, между около 45 и около 910.

Специалисты в данной области техники поймут, что последовательность является иллюстративной и что другие элементы - пептид, саморазрушающаяся группа, способ конъюгации, длина ПЭГ и т.д. - могут быть использованы, как это хорошо известно в данной области. Они также поймут, что, хотя вышеуказанная последовательность сочетает в себе ПЭГилирование и конъюгацию, для ПЭГилирования не требуется конъюгация, и наоборот.

Там где соединению не хватает алифатического гидроксила или алифатического первичного или вторичного амина, как в случае соединения 7 (ФИГ. 1), его все еще можно ПЭГилировать на ароматическом амине (стрелка). Способ ПЭГилирования на этой позиции раскрыт в *Zargaga, US 2017/0166384 A1 (2007)*, содержание которого включено посредством ссылки.



В некоторых вариантах выполнения изобретения может быть желательно иметь несколько ПЭГилированных агонистов, связанных в одну молекулу. Например, четыре ПЭГилированных плеча могут быть сконструированы на пентаэритрите (C(CH₂OH)₄), и агонист TLR7 может быть прикреплен к каждому ПЭГилированному плечу. См. *Gao et al., US 2013/0028857 A1 (2013)*, раскрытие которой включено посредством ссылки.

Для модулирования фармакокинетики обычно предпочтительно, чтобы фрагмент ПЭГ имел массу формулы между около 2 кДа (что соответствует около 45 повторяющимся единицам (CH₂CH₂O)) и около 40 кДа (что соответствует около 910 повторяющимся единицам (CH₂CH₂O)), более предпочтительно между около 5 кДа и около 20 кДа. То есть, диапазон подстрочного индекса x в приведенных выше формулах составляет от около 45 до около 910. Следует понимать, что композиции ПЭГ не являются на 100% однородными, а, скорее, демонстрируют распределение молекулярных масс. Таким образом, ссылка на, например, «20 кДа ПЭГ» означает ПЭГ, имеющий среднюю молекулярную массу 20 кДа.

ПЭГилирование также может быть использовано для улучшения растворимости агониста. В таких случаях можно использовать более короткую цепь ПЭГ, например, содержащую 2, 4, 8, 12 или 24 повторяющихся единиц.

ПРИМЕРЫ

Практическое применение этого изобретения может быть дополнительно понято путем ссылки на следующие примеры, которые приведены в качестве иллюстрации, но не ограничения.

Пример 1 - Синтез соединений формулы (Ia)

Этот пример и **ФИГ. 1** относится к синтезу соединений в соответствии с формулой (Ia).

Суспензию пиразин-2,5-дикарбоновой кислоты **1** (5 г, 29,7 ммоль) и HCl (1,25 M в MeOH, 50 мл, 62,5 ммоль) перемешивали при 60°C в течение 20 ч, после чего реакция завершалась. Реакционную смесь концентрировали на роторном испарителе. Неочищенный продукт суспендировали в насыщенном NaHCO₃, экстрагировали 10% MeOH в дихлорметане (DCM, 3x150 мл). Объединенные органические экстракты высушивали с Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением диметилпиразин-2,5-дикарбоксилата (4,37 г, 22,28 ммоль, выход 74,9%). LCMS ESI: рассчитанная для C₈H₈N₂O₄ = 197.0 (M+H⁺), найденная - 197.0 (M+H⁺).

Перемешанную суспензию диметилпиразин-2,5-дикарбоксилата (4,32 г, 22,02 ммоль) в MeOH (103 мл) и DCM (44,0 мл) обрабатывали NaBH₄ (0,833 г, 22,02 ммоль) при 0°C. Спустя 1 ч LCMS показала 70% конверсию с присутствием в основном моно-спиртового продукта и незначительного количества бис-спиртового продукта. Добавляли еще NaBH₄ (100 мг, 4,34 ммоль) при 0°C и продолжали перемешивание в течении еще 45 мин. Никакой другой исходный материал не был обнаружен с помощью

LCMS. Реакционную смесь гасили путем медленного добавления полунасыщенного NH_4Cl и экстрагировали EtOAc (3x100 мл). Объединенные органические экстракты высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали на 24-граммовой кварцевой колонке, элюировали 20% MeOH в DCM . Нужные фракции концентрировали с получением метил 5-(гидроксиметил)пиразин-2-карбоксилата (2,43 г, 14,45 г, выход 65,6%). LCMS ESI: рассчитанная для $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 = 169.1$ ($\text{M}+\text{H}^+$), найденная - 169.0 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Раствор метил 5-(гидроксиметил)пиразин-2-карбоксилата (1,65 г, 9,81 ммоль) в тетрагидрофуране (THF, 49,1 мл) обрабатывали трифенилфосфином (3,09 г, 11,78 ммоль), а затем N-бромсукцинимидом (NBS 2,096 г, 11,78 ммоль) при комнатной температуре (КТ). После перемешивания в течение 90 мин реакция завершилась. После гашения водой и экстракции EtOAc (3x50 мл) объединенные органические экстракты высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали на 40 кремнеземной колонке, элюировали EtOAc :Гексаном (градиент 0-100%). Нужные фракции концентрировали и получали соединение **2** (1,28 г, 5,54 ммоль, выход 56,5%). LCMS ESI: рассчитанная для $\text{C}_7\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}_2 = 230.0, 232.0$ ($\text{M}+\text{H}^+$), найденная - 230.9, 232.9 ($\text{M}+\text{H}^+$).

К суспензии соединения **3** в трифторуксусной кислоте (TFA, CAS Reg. No. 866268-31-7, полученной согласно WO 2011/049815 A1, 1,824 г, 5,19 ммоль) и карбоната цезия (5,42 г, 16,62 ммоль) в DMF (20 мл) добавляли соединение **2** (1,2 г, 5,19 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 1 ч, после чего реакция завершалась. После гашения водой полученное твердое вещество собирали фильтрованием, промывали водой и сушили воздухом в вакууме с получением соединения **4** (1,67 г, 4,31 ммоль, выход 83%), которое переносили на следующую стадию без дальнейшей очистки. LCMS ESI: рассчитанная для $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_7\text{O}_4 = 388.2$ ($\text{M}+\text{H}^+$), найденная - 388.1 ($\text{M}+\text{H}^+$). ^1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ 9.20 (d, $J=1.3$ Гц, 1H), 8.68 (s, 1H), 5.36 (s, 2H), 4.33 - 4.27 (m, 2H), 4.11 (s, 3H), 4.04 (s, 2H), 1.77 - 1.70 (m, 2H), 1.46 (br d, $J=7.7$ Гц, 2H), 0.93 (t, $J=7.5$ Гц, 3H).

Перемешанный раствор соединения **4** (1,06 г, 2,64 ммоль) в THF (10 мл) обрабатывали по каплям алюмогидридом лития (1,0 М в THF, 3,96 мл, 3,96 ммоль) при 0°C. После перемешивания в течение 3 ч, LCMS показала, что реакция завершилась. Добавляли $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при КТ. Твердое вещество отфильтровывали и промывали MeOH , а фильтрат концентрировали. Неочищенный продукт очищали на 40 г кварцевой колонке, элюировали 20% MeOH в DCM (градиент 0-40%). Нужные фракции концентрировали с получением соединения **5**

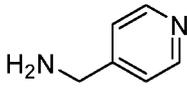
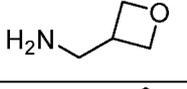
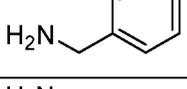
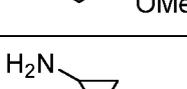
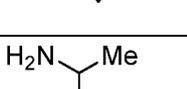
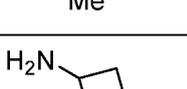
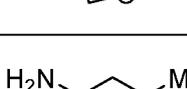
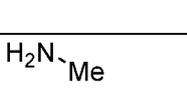
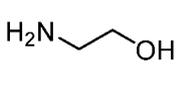
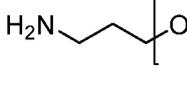
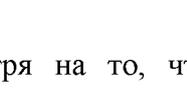
(487 мг, 1,355 ммоль, выход 51,3%). LCMS ESI: рассчитанная для $C_{16}H_{21}N_7O_3 = 359.2$ ($M+H^+$), найденная - 360.1 ($M+H^+$). 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 9.91 (s, 1H), 8.48 (d, $J=5.5$ Гц, 2H), 6.68 - 6.00 (m, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 4.01 (t, $J=6.6$ Гц, 2H), 1.58 - 1.42 (m, 2H), 1.32 - 1.19 (m, 2H), 0.80 (t, $J=7.4$ Гц, 3H).

Соединение **5** (12,7 мг, 0,035 ммоль) растворили в 0,5 мл THF и 1,0 М HCl (1,0 мл). После перемешивания при 60°C в течение 3 ч реакция завершилась. Реакционную смесь концентрировали. Неочищенный продукт очищали на колонке 15,5 г C18 Aq, элюировали 0,05% TFA в ацетонитриле: 0,05% TFA в H_2O (градиент 0-50%) с получением соединения **6** (4,0 мг, 10,89 мкмоль, выход 10,54%). LCMS ESI: рассчитанная для $C_{15}H_{19}N_7O_3 = 346.2$ ($M+H^+$), найденная - 346.1 ($M+H^+$). 1H ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 9.91 (s, 1H), 8.48 (d, $J=5.5$ Гц, 2H), 6.68 - 6.00 (m, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 4.01 (t, $J=6.6$ Гц, 2H), 1.58 - 1.42 (m, 2H), 1.32 - 1.19 (m, 2H), 0.80 (t, $J=7.4$ Гц, 3H).

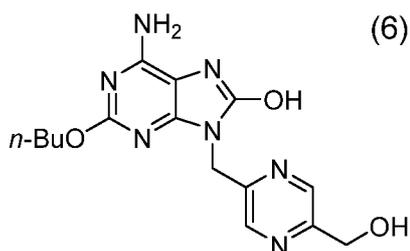
Суспензию соединения **6** (120 мг, 0,347 ммоль) в THF (2 мл) обрабатывали тионилхлоридом (0,254 мл, 3,47 ммоль) при КТ. После перемешивания в течение 45 мин реакция завершилась. Тионилхлорид азеотропно удаляли с помощью DCM (трижды). Неочищенное хлорметилловое соединение **7** было перенесено на следующую стадию как есть. LCMS ESI: рассчитанная для $C_{15}H_{18}ClN_7O_2 = 363.1$ ($M+H^+$), найденная - 364.0 ($M+H^+$).

Раствор соединения **7** (10 мг, 0,027 ммоль) в N,N-Диметилформамиде (DMF, 1 мл) обрабатывали циклобутанамином (0,012 мл, 0,137 ммоль) и затем перемешивали при 60°C в течение 1 ч. LCMS показала, что реакция завершилась. Реакционную смесь затем очищали на колонке 15,5 г C18 Aq, элюировали 0,05% TFA в ацетонитриле: 0,05% TFA в H_2O (градиент 0-50%) с получением соединения **Ia-08** (3,7 мг, 9,10 мкмоль, выход 33,1%). LCMS ESI: рассчитанная для $C_{19}H_{26}N_8O_2 = 397.2$ ($M-H^+$), найденная - 397.2 ($M-H^+$). 1H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ- d_4) δ 8.65 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 5.21 (s, 2H), 4.22 (t, $J=6.5$ Гц, 2H), 3.99 (s, 2H), 3.54 - 3.42 (m, 2H), 2.28 - 2.18 (m, 2H), 2.00 - 1.89 (m, 2H), 1.84 - 1.65 (m, 4H), 1.53 - 1.41 (m, 3H), 0.97 (t, $J=7.4$ Гц, 4H).

В целом, следуя вышеуказанной процедуре и используя альтернативные по отношению к циклобутанамины амины, были получены дополнительные соединения в соответствии с формулой (Ia), перечисленные в Таблице D ниже.

Таблица D – Дополнительные соединения (Ia)			
Номер Соединения	Амин	Масс-Спектр	
		Ожидаемая масса (M+H)	Наблюдаемая Масса (M+H)
Ia-01		436.2	436.1
Ia-02		415.2	415.1
Ia-03		435.2	435.1
Ia-04		403.2	403.2
Ia-05		383.2 (M-H)	383.0 (M-H)
Ia-06		385.2 (M-H)	385.2 (M-H)
Ia-07		399.2 (M-H)	399.2 (M-H)
Ia-09		399.2 (M-H)	399.1 (M-H)
Ia-10		359.2	359.1
Ia-11		388.1 (M-H)	387.2 (M-H)
Ia-12		646.4	646.4

Даже несмотря на то, что оно было использовано в схеме **ФИГ. 1** как синтетическое промежуточное соединение, соединение **6** также обладает активностью агониста TLR7, с EC₅₀ 288 нМ.



Пример 2 - Синтез соединений формулы (Ic)

Этот пример и **ФИГ. 2** относится к синтезу соединений в соответствии с формулой (Ic).

К раствору диметил пиридин-2,5-дикарбоксилата **8** (CAS Reg. No. 881-86-7, 5 г, 25,6 ммоль) в THF (50 мл)/MeOH (100 мл) добавляли хлорид кальция (11,37 г, 102 ммоль). Реакционную смесь обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин и охлаждали до 0°C. Порошок боргидрида натрия (2,423 г, 64,0 ммоль) добавляли медленно (выделение газа). Смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч, после чего LCMS показала завершение реакции. Реакцию гасили добавлением льда, и экстрагировали CHCl₃, и сушили над Na₂SO₄ с получением соединения **9** в виде грязно-белого твердого вещества (выход 93%). LCMS ESI: рассчитанная для C₈H₉NO₃ = 167.05 (M+H⁺), найденная - 168.0 (M+H⁺).

Раствор соединения **9** (2,5 г, 14,96 ммоль) в DMF (10 мл) обрабатывали имидазолом (1,527 г, 22,43 ммоль) и *m*-бутилдиметилсилил хлоридом (TBS-Cl, 2,480 г, 16,45 ммоль). Через 2 часа LCMS показала завершение реакции. Реакционную смесь промывали насыщ. водн. NaHCO₃ и рассолом, а органический слой высушивали над Na₂SO₄. Неочищенный метил 6-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)никотинат (выход 93%) брали на следующий этап без дальнейшей очистки.

Раствор неочищенного метил 6-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)никотината (3,9 г, 13,86 ммоль) в THF (50 мл) охлаждали до 0°C и обрабатывали по каплям раствором Red-Al™ (раствор бис(2-метоксиэтокси)алюмогидрида натрия, 10,37 мл, 31,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, после чего LCMS показала завершение реакции. Реакцию гасили добавлением по каплям MeOH (10 мл) с последующим добавлением 1 М раствора NaOH (20 мл). Смесь перемешивали в течение 20 мин. Слои разделяли и водный слой экстрагировали EtOAc 3 раза. Концентрирование органических фаз обеспечивало получение желаемого (6-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)пиридин-3-ил)метанола в виде желтоватой жидкости (выход 97%).

Смесь предыдущего продукта (3,4 г, 13,42 ммоль) и трифенилфосфина (3,87 г, 14,76 ммоль) в DCM (50 мл) медленно обрабатывали N-бромсукцинимидом (NBS, 2,63 г, 14,76 ммоль) и перемешивали в течение 30 мин. LCMS показала завершение реакции. Растворитель выпаривали, а неочищенный продукт очищали на 80 г силикагеля с золотом, элюировали 0-50% EtOAc/гексаном с получением соединения **10** в виде белого твердого вещества (выход 75%). LCMS ESI, рассчитанная для C₁₃H₂₂BrNOSi = 315.06 (M+H⁺), найденная - 318.0 (M+H⁺).

Смесь соединения **11** (CAS Reg. No. 473930-51-7, 1,906 г, 9,20 ммоль), соединения **10** (3,2 г, 10,12 ммоль) и карбоната цезия (3,30 г, 10,12 ммоль) в DMF (20 мл) нагревали при 70°C в течение 5 ч, после чего LCMS показала завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали для удаления карбоната цезия, а фильтрат разбавляли EtOAc (50 мл). Органический слой промывали водой (2x50 мл) и рассолом (2x50 мл). Растворитель выпаривали, а неочищенный продукт очищали на колонке с 80 г силикагеля с золотого, элюировали 0-50% MeOH/DCM с получением соединения **12** в виде белого твердого вещества (выход 56%). ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 8.45 (d, J = 2.2 Гц, 1H), 7.55 (dd, J = 8.1, 2.3 Гц, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 5.50 (s, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.71 (s, 2H), 4.24 (t, J = 6.6 Гц, 2H), 1.74 - 1.63 (m, 2H), 1.47 - 1.33 (m, 2H), 0.85 (d, J = 12.3 Гц, 12H), 0.00 (s, 6H). LCMS ESI: рассчитанная для C₂₂H₃₄N₆O₂Si = 442.2 (M+H⁺), найденная - 443.2 (M+H⁺).

Раствор соединения **12** (2,0 г, 4,52 ммоль) и ацетата натрия (1,853 г, 22,59 ммоль) в CHCl₃ (20 мл)/THF (10 мл) при 0°C обрабатывали по каплям бромом (0,466 мл, 9,04 ммоль). Через 30 мин LCMS показала завершение реакции. Реакцию гасили 10%-ным водн. раствором тиосульфата натрия и экстрагировали DCM. Растворитель выпаривали с получением желаемого бромированного промежуточного продукта в виде белого твердого вещества.

Раствор предыдущего бромированного промежуточного продукта (1,7 г, 3,26 ммоль) в MeOH (20 мл) обрабатывали метанолатом лития (1,238 г, 32,6 ммоль) и нагревали при 60°C в течение ночи. LCMS показала вытеснение бромида и удаление группы TBS. Растворитель выпаривали, и неочищенный продукт переносили на следующую стадию без дальнейшей очистки.

Раствор продукта предыдущей реакции (1,168 г, 3,26 ммоль) в MeOH (5 мл) обрабатывали HCl в воде (8,15 мл, 48,9 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение ночи. LCMS показала завершение реакции. Растворитель выпаривали, а остаток обрабатывали HCl в воде (8,15 мл, 48,9 ммоль). Смесь нагревали при 60°C в течение 2 ч и нейтрализовали 10 М водным NaOH. Продукт осаждали, и промывали водой, и сушили под высоким вакуумом с получением соединения **13** в виде белого твердого вещества (выход 47% за 3 стадии). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 10.04 (s, 1H), 8.39 (d, J = 2.2 Гц, 2H), 7.62 (dd, J = 8.0, 2.3 Гц, 2H), 7.35 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 6.42 (s, 3H), 5.30 (s, 2H), 4.80 (s, 4H), 4.45 (d, J = 4.3 Гц, 4H), 4.07 (t, J = 6.6 Гц, 4H), 1.62 - 1.49 (m, 4H), 1.38 - 1.24 (m, 4H), 0.84 (t, J = 7.4 Гц, 6H). LCMS ESI: рассчитанная для C₁₆H₂₀N₆O₃ = 344.06 (M+H⁺), найденная - 34.1 (M+H⁺).

Раствор соединения **13** (240 мг, 0,697 ммоль) в THF (1 мл) обрабатывали тионилхлоридом (0,127 мл, 1,742 ммоль). Суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин. LCMS показала завершение реакции. Растворитель выпаривали, и неочищенный продукт **14** (количественный выход) брали на следующую стадию.

Раствор неочищенного продукта **14** (10 мг, 0,028 ммоль) в DMF (0,5 мл) обрабатывали циклобутанамином (9,80 мг, 0,138 ммоль) в герметичной пробирке, которую затем нагревали при 70°C в течение 30 мин. LCMS показала завершение реакции. Неочищенный продукт непосредственно вводили в преп ВЭЖХ Shimadzu с колонкой xBridge PrepC18 5 19x150 мм и элюировали 0-95% MeCN/H₂O (0,1% FA), а продукт, содержащий фракции, лиофилизировали для получения соединения **Ic-04** (выход 30%, 4,5 мг, 10,76 мкмоль, выход 39,0%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8.38 (d, J = 2.2 Гц, 1H), 7.57 (dd, J = 8.0, 2.3 Гц, 1H), 7.29 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.50 (s, 2H), 4.79 (s, 2H), 4.07 (t, J = 6.6 Гц, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.06 (p, J = 7.5 Гц, 1H), 1.96 (ddt, J = 10.6, 8.3, 4.4 Гц, 2H), 1.65 - 1.37 (m, 6H), 1.37 - 1.24 (m, 2H), 0.84 (t, J = 7.4 Гц, 3H). LCMS ESI: рассчитанная для C₂₀H₂₇N₇O₂ = 397.2 (M+H⁺), найденная - 398.1 (M+H⁺).

В целом, следуя вышеуказанной процедуре и используя альтернативные по отношению к циклобутанамины амины, были получены дополнительные соединения в соответствии с формулой (Ic), как указано в Таблице E ниже.

Таблица E – Дополнительные Соединения (Ic)			
Номер Соединения	Амин	Масс-Спектр	
		Ожидаемая масса (M+H)	Наблюдаемая масса (M+H)
Ic-01		400.2	400.1
Ic-02		402.2	402.1
Ic-03		384.2	384.1
Ic-04		398.2	398.1
Ic-05		401.2	401.1
Ic-06		434.2	434.1
Ic-07		449.5	449.2

Таблица Е – Дополнительные Соединения (Ic)			
Номер Соединения	Амин	Масс-Спектр	
		Ожидаемая масса (M+H)	Наблюдаемая масса (M+H)
Ic-08		647.7	647.3
Ic-09		428.2	428.2
Ic-10		386.2	386.2
Ic-11		412.2	412.2
Ic-12		427.2	427.2
Ic-13		441.2	441.2

Пример 3 - Синтез соединений формулы (Ib)

Соединения в соответствии с формулой (Ib) получали аналогично способам получения соединений (Ic), но с использованием в качестве промежуточного соединения хлорида **17**. Синтез хлорида **17** схематически показан на **ФИГ. 3**, начиная с коммерчески доступного соединения **15** (CAS Reg. No. 49668-90-8), действуя аналогично предыдущему примеру, но *mutatis mutandis*.

Аналитические данные для соединений в соответствии с формулой (Ib) приведены в Таблице F ниже.

Таблица F – Соединения (Ib)			
Номер Соединения	Амин	Масс-Спектр	
		Ожидаемая масса (M+H)	Наблюдаемая масса (M+H)
Ib-01		400.2	400.2
Ib-02		402.2	402.1
Ib-03		384.2	384.1
Ib-04		398.2	398.1

Таблица F – Соединения (Ib)			
Номер Соединения	Амин	Масс-Спектр	
		Ожидаемая масса (M+H)	Наблюдаемая масса (M+H)
Ib-05	<chem>NCCCN</chem>	401.2	401.1
Ib-06	<chem>NCC1=CC=CC=C1</chem>	434.2	434.1
Ib-07	<chem>NCC1=CC=C(N)C=C1</chem>	449.2	449.2
Ib-08	<chem>NCCCOCCOCCOCCOCCN(C)C(=O)OC(C)(C)C</chem>	647.3	647.3

Пример 4 - Анализ активности агониста TLR7

В этом примере описан способ определения агонистической активности TLR7 соединений, раскрытых в этом описании.

Сконструированные человеческие эмбриональные синие клетки почки (клетки TLR HEK-Blue™; Invivogen), обладающие трансгеном репортера секретируемой TLR7 эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP) человека, были суспендированы в неселективной культуральной среде (DMEM высокоглюкозная (Invitrogen), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Sigma)). Клетки TLR7 HEK-Blue™ добавляли в каждую лунку 384-луночной культуральной пластины (15000 клеток на лунку) и инкубировали 16-18 ч при 37°C, 5% CO₂. Соединения (100 нл) распределяли в лунки, содержащие клетки TLR HEK-Blue™, и обработанные клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂. После 18 ч обработки в каждую лунку добавляли по 10 микролитров свежеприготовленного реагента Quanti-Blue™ (Invivogen), инкубировали в течение 30 мин (37°C, 5% CO₂) и измеряли уровни SEAP с помощью планшетного ридера Envision (OD = 620 нм). Были рассчитаны полумаксимальные значения эффективной концентрации (EC₅₀; концентрация соединения, которая индуцировала реакцию на полпути между исходным уровнем и максимумом анализа).

Репрезентативная кривая анализа EC₅₀ для соединения (Ia-09) показана на **ФИГ. 6**.

Пример 5 - Индукция IL-6

В этом примере описан способ определения индукции интерлейкина 6 соединениями, раскрытыми в этом описании.

Соединения, разбавленные в DMSO, переносили в отдельные лунки чистого 384-луночного планшета Matrix Technologies с V-образным дном с использованием технологии акустической жидкостной обработки ECHO (25 нл на лунку). Образцы цельной крови человека (25 мкл) добавляли в каждую лунку с помощью прибора CyBio FeliX для жидкостной обработки. Пластины встряхивали на пластинчатом шейкере в течение трех мин перед инкубацией реакционных смесей при 37°C в течение 20 ч. Затем в каждую лунку добавляли среду Basel RPMI 1640 (дополненную L-глутамином) (25 мкл на лунку) перед выделением плазмы из каждого образца путем центрифугирования (450 x g, 5 мин, температура окружающей среды). Обработанные образцы плазмы (3 мкл) затем переносили в отдельные лунки белого, мелкого, 384-луночного ProxiPlate (Perkin Elmer) с помощью прибора FeliX для жидкостной обработки и измеряли их уровень интерлейкина 6 по технологии AlphaLISA, описанной производителем PerkinElmer. Программное обеспечение для анализа данных использовалось для определения значений EC₅₀ соединений, где базовая линия устанавливалась с использованием средних значений DMSO и 100% индукции, установленной с использованием эталонных значений соединения при самой высокой испытанной концентрации. EC₅₀ можно определить с помощью программного обеспечения, такого как Graphpad Prism™.

Пример 6 - Опосредованная Трансглутаминазой Конъюгация

Следующая процедура может быть использована для опосредованной трансглутаминазой конъюгации соединений агонист-линкер, где линкер имеет аминокгруппу, которая может выступать в качестве донора амина. Антитело может быть таким, которое имеет реактивный по трансглутаминазе глутамин, например, таким как с заменой N297A или N297Q. Конъюгация осуществляется рекомбинантной бактериальной трансглутаминазой с молярным соотношением антитело:фермент 5:1. Конъюгация осуществляется по стандартным протоколам в 50 mM буфере Tris, pH 8,0, при выдерживании в течение ночи при 37°C. Полученный конъюгат очищают на колонке Protein A, предварительно уравновешенной 50 mM Tris, pH 8,0. Конъюгат элюируют 0,1 M буфером цитрата натрия, pH 3,5. Элюированные фракции нейтрализуют 1M Tris pH 9,0. Конъюгат может быть составлен в 20 мг/мл Сорбита, 10 мг/мл Глицина, pH 5,0.

Приведенное выше подробное описание изобретения включает отрывки, которые главным образом или исключительно касаются конкретных частей или аспектов изобретения. Следует понимать, что это делается для ясности и удобства, что конкретный признак может быть релевантным не только в том отрывке, в котором он был раскрыт, и что раскрытие настоящего документа включает все соответствующие

комбинации информации, найденной в различных отрывках. Аналогичным образом, хотя различные фигуры и описания в настоящем документе относятся к конкретным вариантам выполнения изобретения, следует понимать, что в тех случаях, когда конкретный признак раскрывается в контексте конкретной фигуры или варианта выполнения изобретения, такой признак может также использоваться, в соответствующей степени, в контексте другой фигуры или варианта выполнения изобретения в сочетании с другим признаком или в изобретении в целом.

Кроме того, хотя настоящее изобретение было конкретно описано в терминах определенных предпочтительных вариантов выполнения, изобретение не ограничивается такими предпочтительными вариантами выполнения. В значительной степени объем изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения.

ССЫЛКИ

Ниже приведены полные цитирования для следующих ссылок, цитированных в сокращенном виде по первому автору (или изобретателю) и датированных ранее в этом описании. Каждая из этих ссылок включена в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Akinbobuyi *et al.*, ACS 2013 69th Southwest Regional Meeting, Abstract SWRM-70, “Synthesis and evaluation of purine-based toll-like receptor 7 agonists and their antibody conjugates.”

Akinbobuyi *et al.*, ACS 2015 Joint Southeastern/Southwest Regional Meeting, Abstract 392, “Synthesis of functionalized purine analogs for antibody conjugation” [2015a].

Akinbobuyi *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56, 458, “Facile syntheses of functionalized toll-like receptor 7 agonists” [2015b].

Akinbobuyi *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 4246, “Synthesis and immunostimulatory activity of substituted TLR7 agonists.”

Barberis *et al.*, US 2012/0003298 A1 (2012).

Beesu *et al.*, *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 2084, “Identification of High-Potency Human TLR8 and Dual TLR7/TLR8 Agonists in Pyrimidine-2,4-diamines.”

Berghöfer *et al.*, *J. Immunol.* **2007**, 178, 4072, “Natural and Synthetic TLR7 Ligands Inhibit CpG-A- and CpG-C-Oligodeoxynucleotide-Induced IFN- α Production.”

Bonfanti *et al.*, US 2014/0323441 A1 (2015) [2015a].

Bonfanti *et al.*, US 2015/0299221 A1 (2015) [2015b].

Carson *et al.*, US 2013/0202629 A1 (2013).

Carson *et al.*, US 8,729,088 B2 (2014).

Carson *et al.*, US 9,050,376 B2 (2015).

Carson *et al.*, US 2016/0199499 A1 (2016).

Chan *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 1194, “Synthesis and Immunological Characterization of Toll-Like Receptor 7 Agonistic Conjugates.”

Chan *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 445, “Synthesis and Characterization of PEGylated Toll Like Receptor 7 Ligands.”

Cortez *et al.*, US 2017/0044168 A1 (2017). [2017a].

Cortez *et al.*, US 2017/0121421 A1 (2017). [2017b].

Desai *et al.*, US 9,127,006 B2 (2015).

Ding *et al.*, WO 2016/107536 A1 (2016).

Ding *et al.*, US 2017/0273983 A1 (2017) [2017a].

Ding *et al.*, WO 2017/076346 A1 (2017) [2017b].

Gadd *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2015**, 26, 1743, “Targeted Activation of Toll-Like Receptors: Conjugation of a Toll-Like Receptor 7 Agonist to a Monoclonal Antibody Maintains Antigen Binding and Specificity.”

Graupe *et al.*, US 8,993,755 B2 (2015).

Halcomb *et al.*, US 9,161,934 B2 (2015).

Hashimoto *et al.*, US 2009/0118263 A1 (2009).

Hirota *et al.*, US 6,028,076 (2000).

Hollmack *et al.*, US 2012/0083473 A1 (2012).

Isobe *et al.*, US 6,376,501 B1 (2002).

Isobe *et al.*, JP 2004137157 (2004).

Isobe *et al.*, *J. Med. Chem.* **2006**, 49 (6), 2088, “Synthesis and Biological Evaluation of Novel 9-Substituted-8-Hydroxyadenine Derivatives as Potent Interferon Inducers.”

Isobe *et al.*, US 7,521,454 B2 (2009) [2009a].

Isobe *et al.*, US 2009/0105212 A1 (2009) [2009b].

Isobe *et al.*, US 2011/0028715 A1 (2011).

Isobe *et al.*, US 8,148,371 B2 (2012).

Jensen *et al.*, WO 2015/036044 A1 (2015).

Kasibhatla *et al.*, US 7,241,890 B2 (2007).

Koga-Yamakawa *et al.*, *Int. J. Cancer* **2013**, 132 (3), 580, “Intratracheal and oral administration of SM-276001: A selective TLR7 agonist, leads to antitumor efficacy in primary and metastatic models of cancer.”

Li *et al.*, US 9,902,730 B2 (2018).

Lioux *et al.*, US 9,295,732 B2 (2016).

Lund *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci (USA)* **2004**, 101 (15), 5598, “Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7.”

Maj *et al.*, US 9,173,935 B2 (2015).

McGowan *et al.*, *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 6137, “Identification and Optimization of Pyrrolo[3,2-d]pyrimidine Toll-like Receptor 7 (TLR7) Selective Agonists for the Treatment of Hepatitis B.”

Musmuca *et al.*, *J. Chem. Information & Modeling* **2009**, 49 (7), 1777, “Small-Molecule Interferon Inducers. Toward the Comprehension of the Molecular Determinants through Ligand-Based Approaches.”

Ogita *et al.*, US 2007/0225303 A1 (2007).

Peterson, Rachel; Honor Program Thesis, “Synthesis of Sulfur and Amino-8-Substituted Adenine Derivatives as TLR7 Agonists,” Baylor University (2014).

Pryde, US 7,642,350 B2 (2010).

Roethle *et al.*, *J. Med. Chem* **2013**, 56, 7324, “Identification and Optimization of Pteridinone Toll-like Receptor 7 (TLR7) Agonists for the Oral Treatment of Viral Hepatitis.”

Seifert, Zacharie; Master of Science Thesis, “Synthesis and Evaluation of 8-Substituted Adenine Derivatives as Toll-like Receptor 7 Agonists,” Baylor University (2015).

Vernejoul *et al.*, US 2014/0141033 A1 (2014).

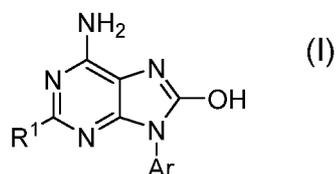
Yu *et al.*, *PLoS One* **2013**, 8 (3), e56514, “Toll-Like Receptor 7 Agonists: Chemical Feature Based Pharmacophore Identification and Molecular Docking Studies.”

Zhang *et al.*, *Immunity* **2016**, 45, 737, “Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA.”

Zurawski *et al.*, US 2012/0231023 A1 (2012).

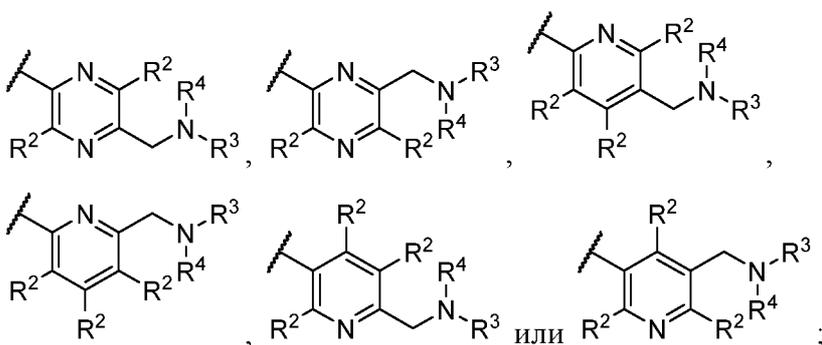
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой (I)



где

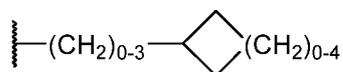
Ar представляет собой



R^1 представляет собой $(C_1-C_5 \text{ алкил})O$, $(C_1-C_2 \text{ алкил})O(CH_2)_{2-3}O$, $(C_1-C_5 \text{ алкил})C(=O)O$, $(C_1-C_5 \text{ алкил})NH$, $(C_1-C_2 \text{ алкил})O(CH_2)_{2-3}NH$ или $(C_1-C_5 \text{ алкил})C(=O)NH$;

R^2 представляет собой независимо для каждого случая H, C_1-C_3 алкил, галоген, $O(C_1-C_3 \text{ алкил})$, CN или NO_2 ; и

R^3 и R^4 независимо представляют собой H; C_1-C_6 алкил; $(CH_2)_{2-4}OH$; $(CH_2)_{2-4}O(C_1-C_3 \text{ алкил})$; $(CH_2)_{2-4}NH_2$; $(CH_2)_{2-4}NH(C_1-C_3 \text{ алкил})$; $(CH_2)_{2-4}N(C_1-C_3 \text{ алкил})_2$; $(CH_2)_{1-3}(\text{арил})$; $(CH_2)_{1-3}(\text{гетероарил})$; $(CH_2)_{2-4}(OCH_2CH_2)_{2-8}(CH_2)_{2-4}NH\text{Вос}$;



, где группа CH_2 в циклоалифатическом кольце может быть заменена O, S, NH или $N(C_1-C_3 \text{ алкилом})$ и циклоалифатическое кольцо может быть замещено C_1-C_3 алкилом, OH, $O(C_1-C_3 \text{ алкилом})$, галогеном, $(CH_2)_{0-3}NH_2$, или $(CH_2)_{0-3}NH(C_1-C_3 \text{ алкилом})$;

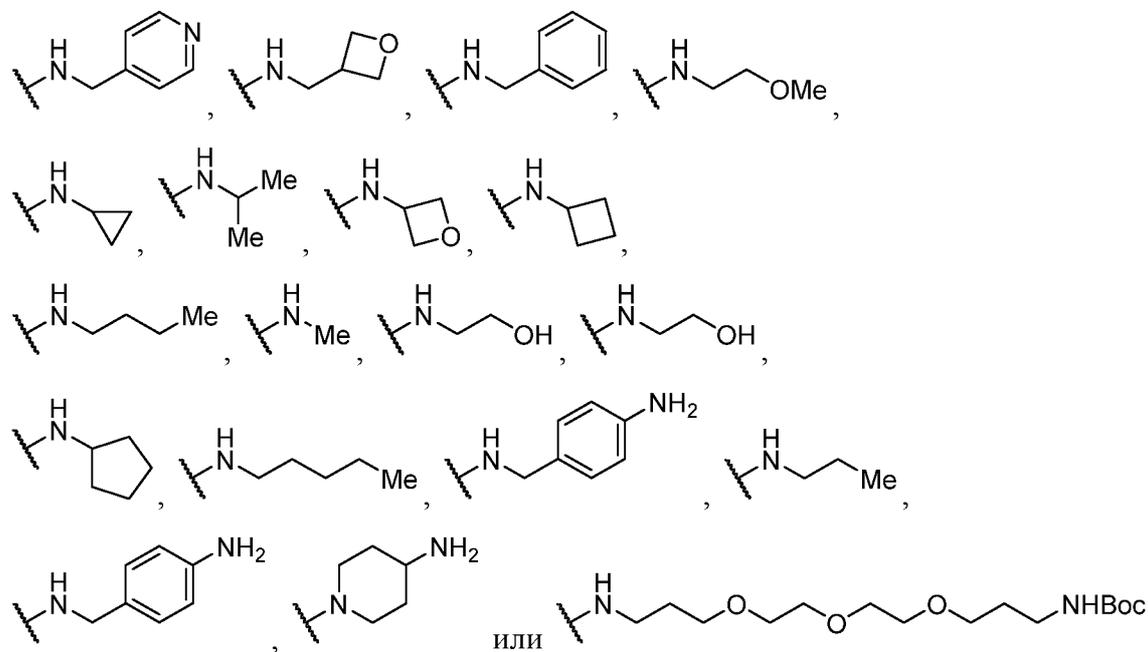
или R^3 и R^4 соединяются с азотом, с которым они связаны, образуя циклический амин структуры



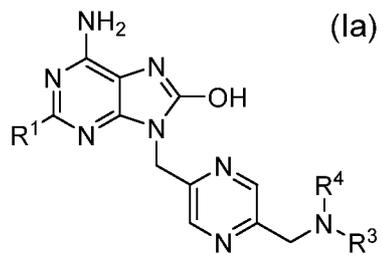
, где группа CH_2 в циклоалифатическом кольце, которая отделена от азота амина по меньшей мере двумя группами CH_2 , может быть заменена O, S, NH или $N(C_1-$

C₃ алкилом) и циклический амин может быть замещен C₁-C₃ алкилом, OH, O(C₁-C₃ алкилом), галогеном, (CH₂)₀₋₃NH₂ или (CH₂)₀₋₃NH(C₁-C₃ алкилом).

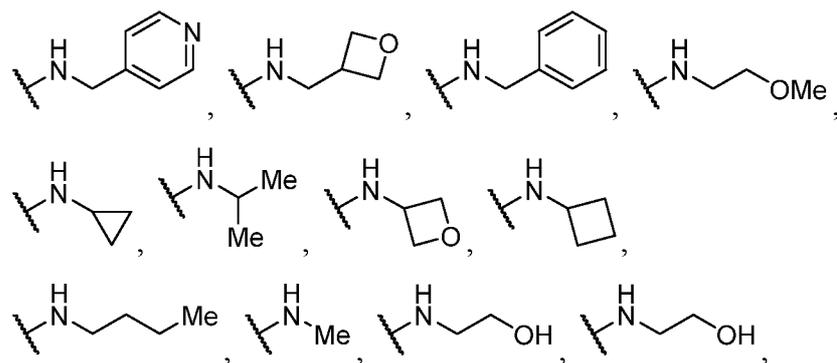
2. Соединение по п. 1, где -N(R³)(R⁴) представляет собой

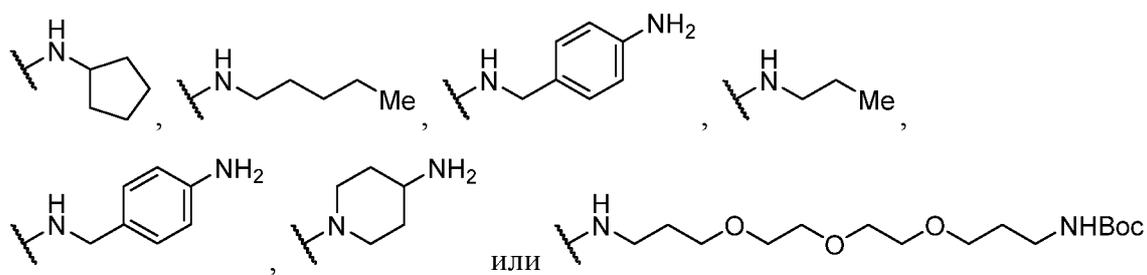


3. Соединение по п. 1, имеющее структуру, представленную формулой (Ia):



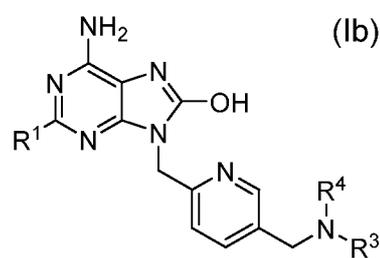
4. Соединение по п. 3, где -N(R³)(R⁴) представляет собой



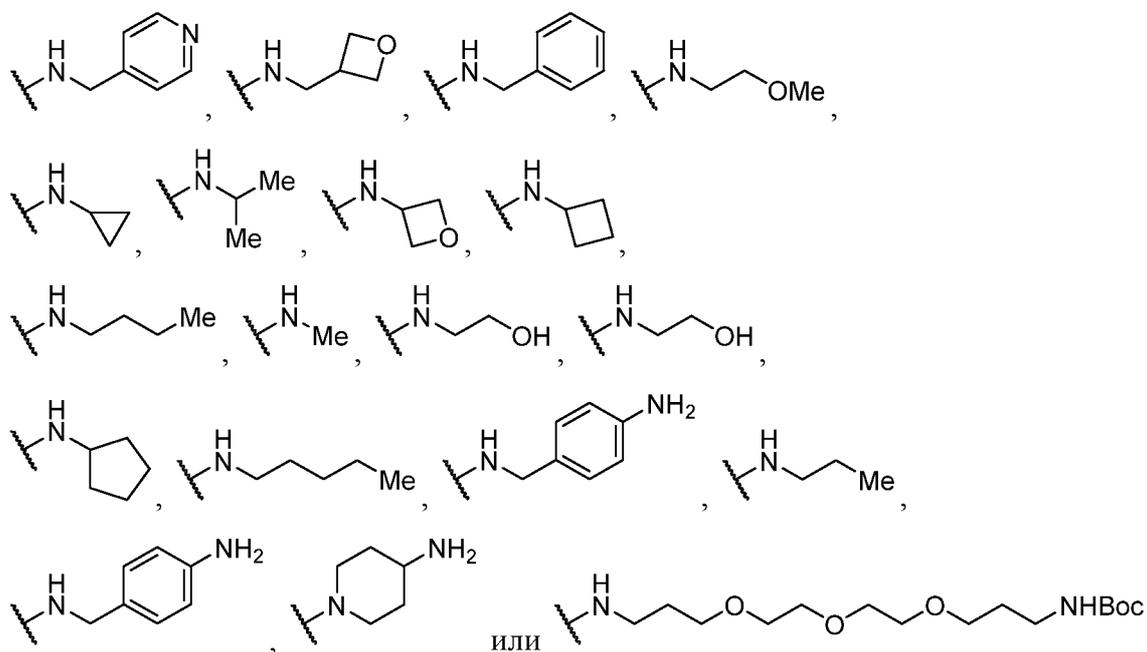


5. Соединение по п. 4, где в формуле (Ia) R^1 представляет собой *n*-BuO.

6. Соединение по п. 1, имеющее структуру, представленную формулой (Ib):

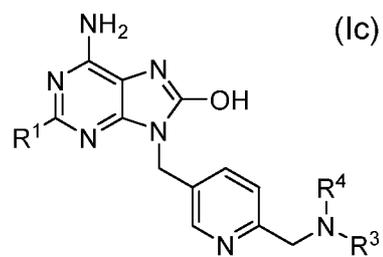


7. Соединение по п. 6, где $-\text{N}(\text{R}^3)(\text{R}^4)$ представляет собой

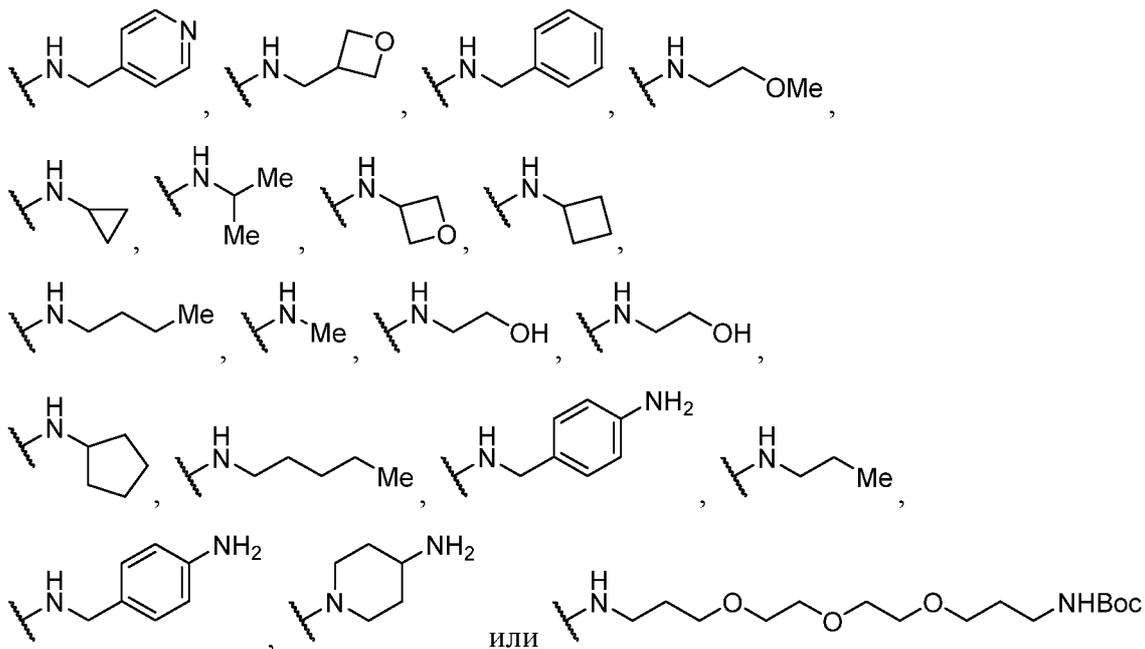


8. Соединение по п. 7, где в формуле (Ib) R^1 представляет собой *n*-BuO.

9. Соединение по п. 1, имеющее структуру, представленную формулой (Ic):

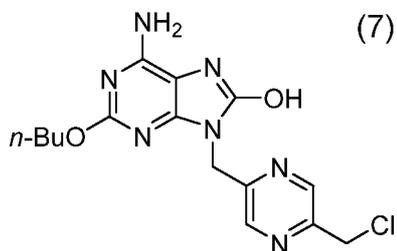


10. Соединение по п. 9, где $-N(R^3)(R^4)$ представляет собой

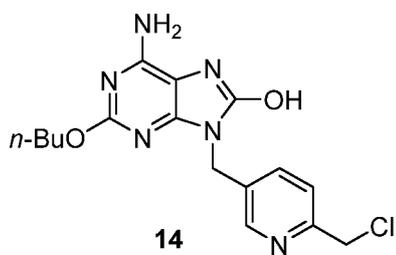


11. Соединение по п. 10, где в формуле (Ic) R^1 представляет собой *n*-BuO.

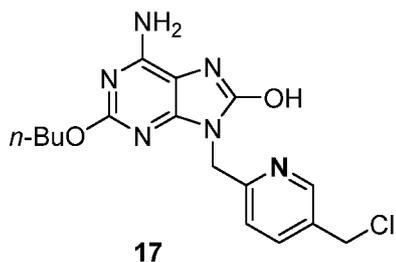
12. Соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой (7):



13. Соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой 14:



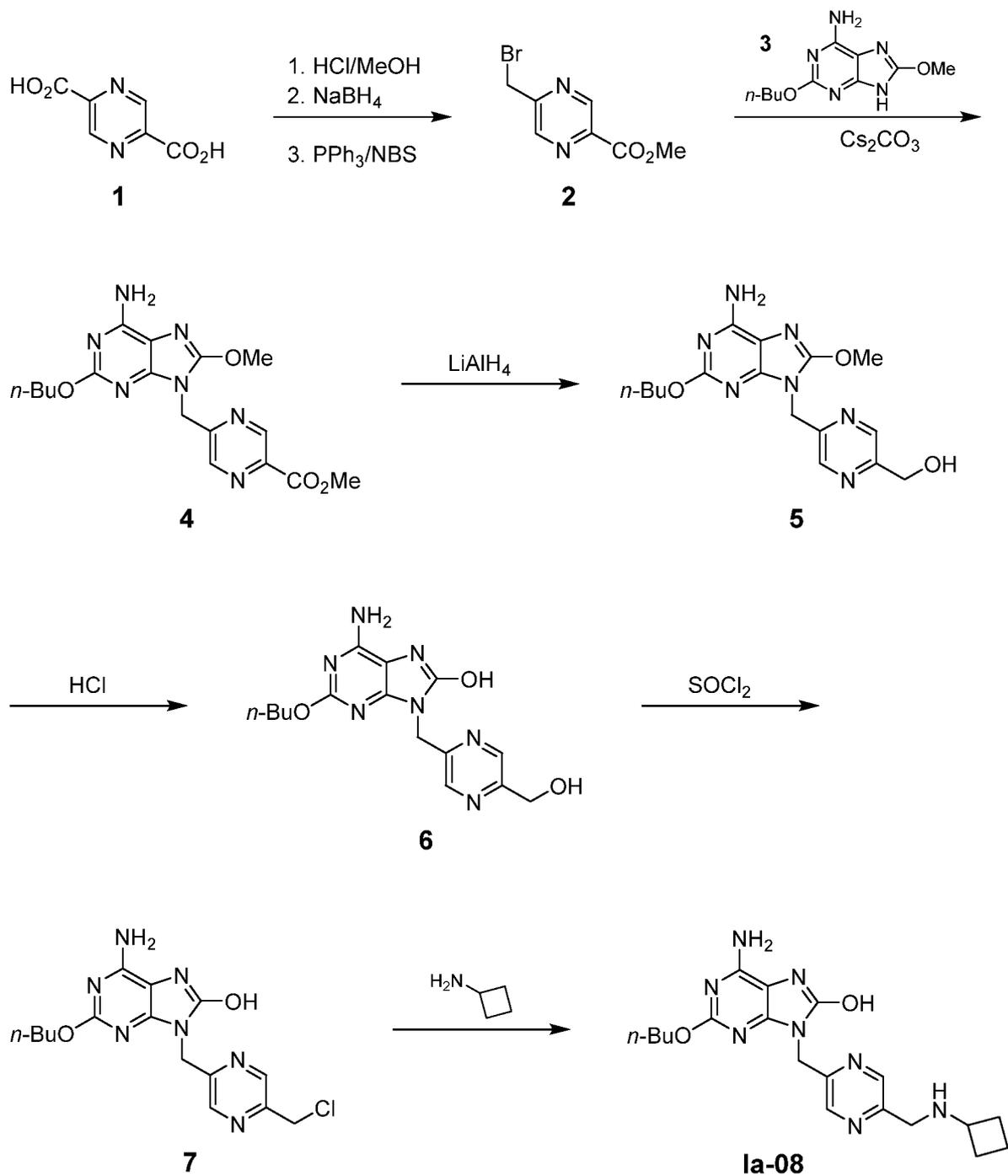
14. Соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой 17:



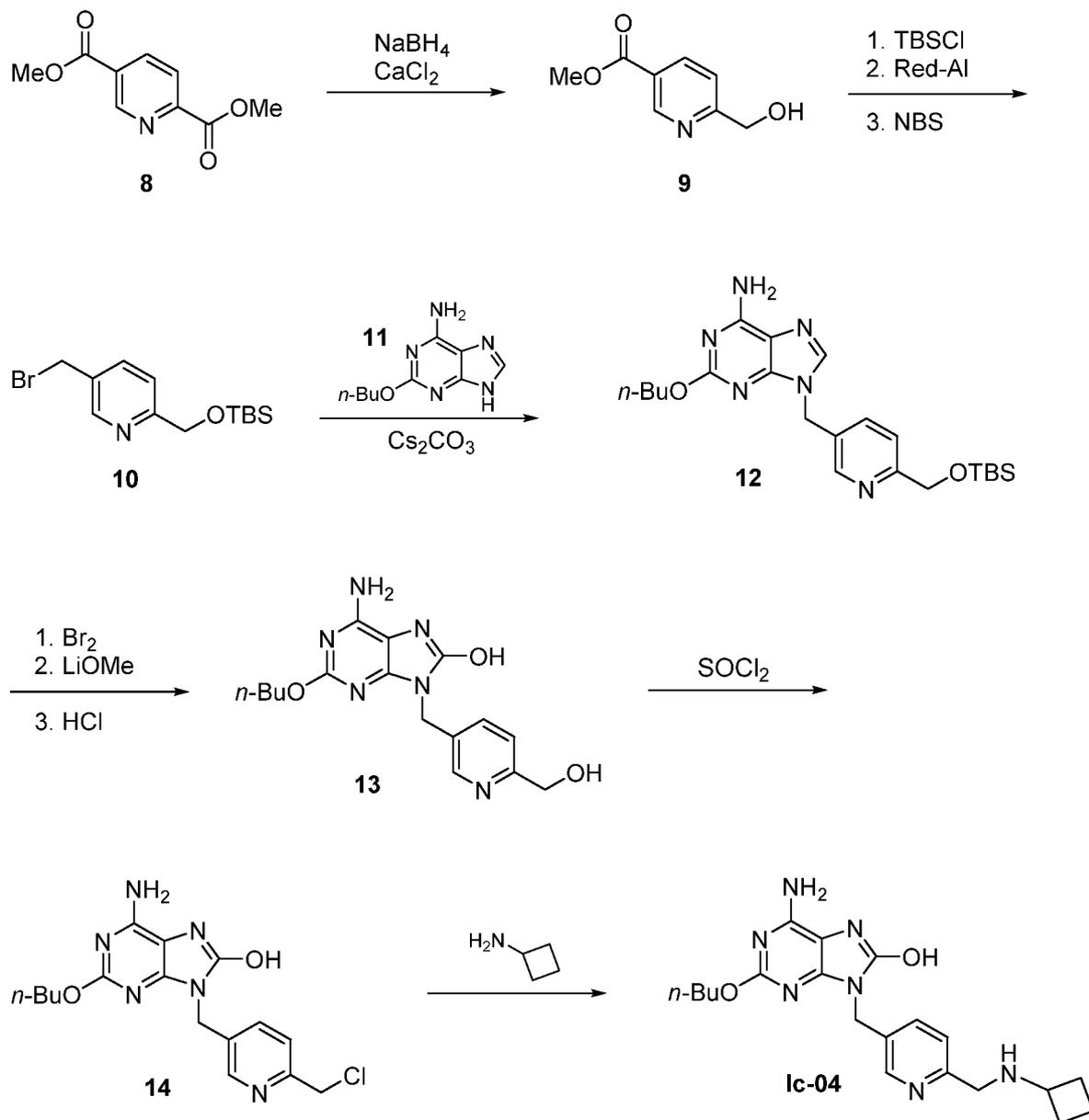
15. Соединение по п. 1, конъюгированное с антителом.

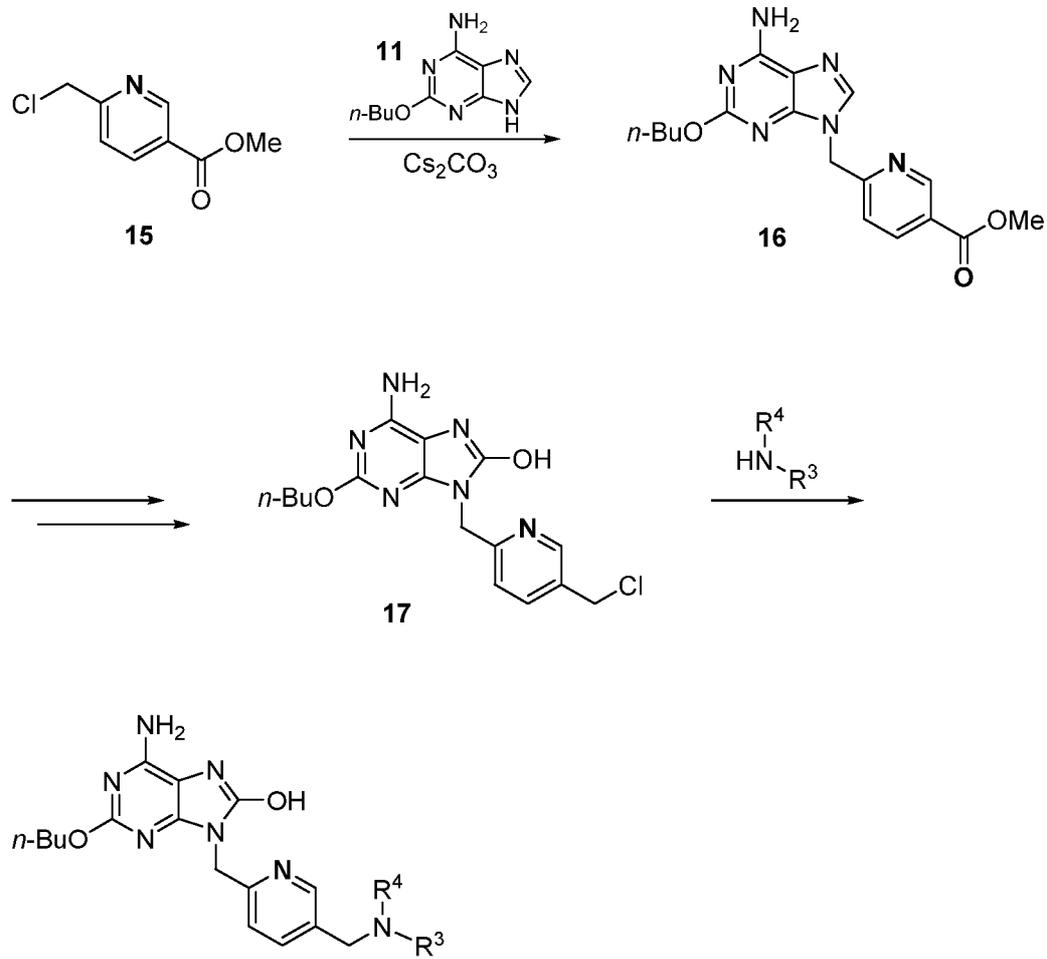
16. Соединение по п. 1, которое ковалентно связано с фрагментом поли(этиленгликоля) размером от 2 кДа до 40 кДа.

17. Соединение по п. 1 для лечения состояния, поддающегося лечению активацией Toll-подобного Рецептора 7.

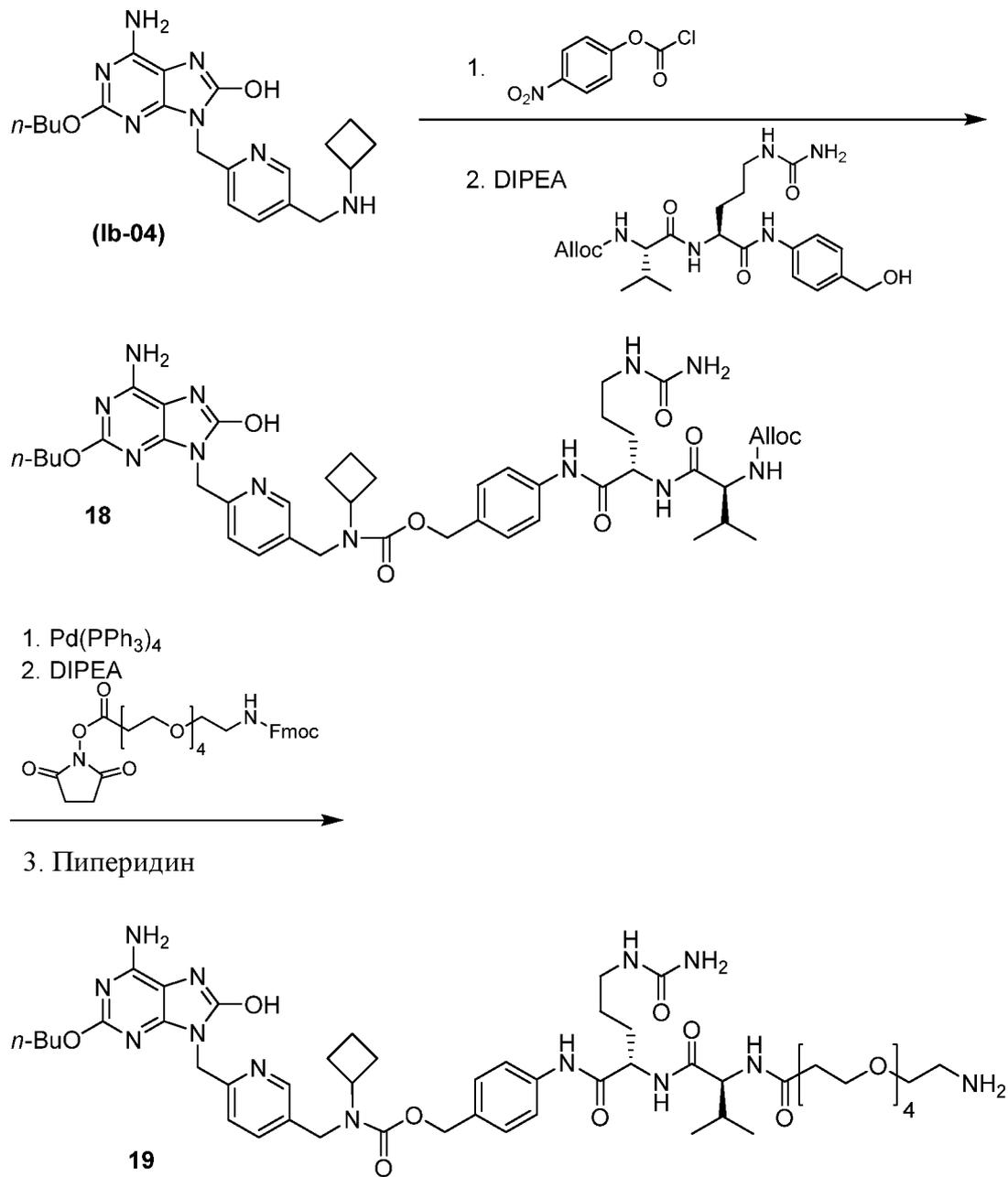
ФИГ. 1

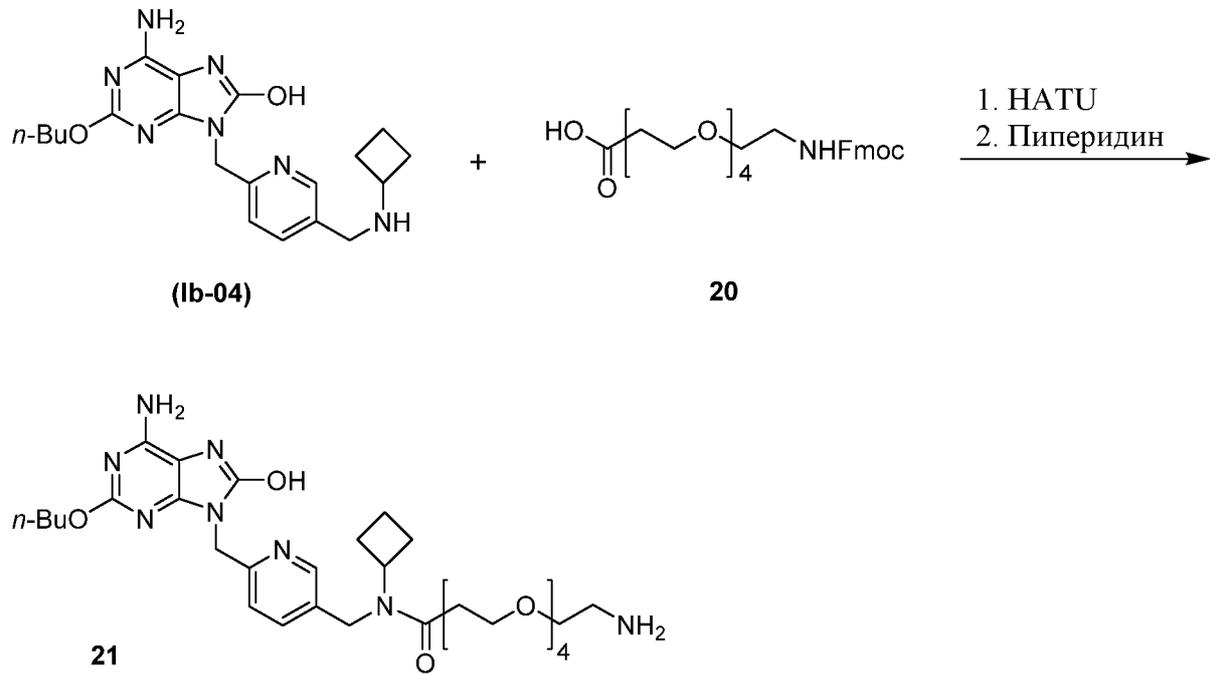
ФИГ. 2



ФИГ. 3**Соединения формулы Ib**

ФИГ. 4



ФИГ. 5

ФИГ. 6**Агонизм TLR7 - Соединение Ia-09**