

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290043 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.11(22) Дата подачи заявки
2020.06.12

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 223/16 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
C07H 15/00 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ АМИНОБЕНЗАЗЕПИНА, ИММУНОКОНЬЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/861,139; 62/963,884

(32) 2019.06.13; 2020.01.21

(33) US

(86) PCT/US2020/037477

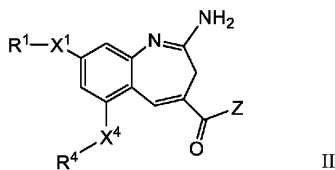
(87) WO 2020/252294 2020.12.17

(71) Заявитель:
БОЛТ БАЙОТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Акерман Шелли Эрин, Алонсо
Майкл Н., Кудирка Ромас, Ли Артур,
Сафина Брайан, Чжоу Мэттью (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к иммуноконъюгатам формулы I, содержащим антитело, связанное конъюгацией с одним или несколькими производными аминокбензазепина. В изобретении также предложены промежуточные композиции производных аминокбензазепина формулы II, содержащие реакционноспособную функциональную группу. Такие промежуточные композиции представляют собой подходящие субстраты для образования иммуноконъюгатов с помощью линкера или связывающего фрагмента. В настоящей заявке дополнительно предложены вышеуказанные иммуноконъюгаты для применения в способах лечения рака.



A1

202290043

202290043

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572270EA/019

СОЕДИНЕНИЯ АМИНОБЕНЗАЗЕПИНА, ИММУНОКОНЬЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная непредварительная заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительной заявке США № 62/963,884, поданной 21 января 2020 года, и предварительной заявке США № 62/861,139, поданной 13 июня 2019 года, каждая из которых включена в нее посредством ссылки во всей своей полноте.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная 2 июня 2020 года, называется 17019_002WO1_SL.txt и имеет размер 299 523 байта

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение в целом относится к иммуноконъюгату, содержащему антитело, конъюгированное с одной или более молекулами аминокбензазепина.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Новые композиции и способы доставки антител и иммунных адъювантов необходимы для достижения недоступных опухолей и/или для расширения возможностей лечения онкологических пациентов и других субъектов. В изобретении представлены такие композиции и способы.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение в целом относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, связанное конъюгацией с одним или более производными аминокбензазепина. Изобретение также относится к промежуточным композициям производного аминокбензазепина, содержащим реакционноспособную функциональную группу. Такие промежуточные композиции являются подходящими субстратами для образования иммуноконъюгатов, где антитело может быть ковалентно связано с одним или более производными аминокбензазепина через линкер или связывающий фрагмент. Изобретение также относится к использованию таких иммуноконъюгатов в лечении заболевания, в частности рака.

Аспектом изобретения является иммуноконъюгат, содержащий антитело, ковалентно присоединенное к линкеру, который ковалентно присоединен к одному или более фрагментам аминокбензазепина.

Другим аспектом изобретения является аминокбензазепин-линкерное соединение.

Другим аспектом изобретения является способ лечения рака, включающий введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата, содержащего антитело, связанное конъюгацией с одним или более фрагментами аминокбензазепина.

Другим аспектом изобретения является применение иммуноконъюгата,

включающего антитело, связанное конъюгацией с одним или более фрагментами аминокислоты, для лечения рака.

Другой аспект изобретения представляет собой способ получения иммуноконъюгата путем конъюгации одного или более фрагментов аминокислоты с антителом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигурах 1A-D показаны CDR тяжелой и легкой цепей PD-L1-связывающих агентов 1-42 типа A.

На фигурах 2A-D показаны первый (HFW1), второй (HFW2), третий (HFW3) и четвертый (HFW4) полипептиды каркасной области тяжелой цепи PD-L1-связывающих агентов 1-42 типа A.

На фигурах 3A-D показаны первый (LFW1), второй (LFW2), третий (LFW3) и четвертый (LFW4) полипептиды каркасной области легкой цепи PD-L1 связывающих агентов 1-42 типа A.

На фигурах 4 A-D показана переменная область тяжелой цепи (VH) PD-L1 связывающих агентов 1-42 типа A.

На фигурах 4E-G показана переменная область легкой цепи (VL) PD-L1 связывающих агентов 1-42 типа A.

На фигурах 5A-B показаны CDR тяжелой и легкой цепей PD-L1 связывающих агентов 1-21 типа B.

На фигурах 6A-B показаны первый (HFW1), второй (HFW2), третий (HFW3) и четвертый (HFW4) полипептиды каркасной области тяжелой цепи PD-L1 связывающих агентов 1-21 типа B.

На фигурах 7A-B показаны первый (LFW1), второй (LFW2), третий (LFW3) и четвертый (LFW4) полипептиды каркасной области легкой цепи PD-L1 связывающих агентов 1-21 типа B.

На фигурах 8A-B показана переменная область тяжелой цепи (VH) PD-L1 связывающих агентов 1-21 типа B.

На фигурах 8C-D показана переменная область легкой цепи (VL) PD-L1 связывающих агентов 1-21 типа B.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее будут подробно рассмотрены некоторые варианты осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы в прилагаемых структурах и формулах. Хотя изобретение будет описано в связи с пронумерованными вариантами осуществления, следует понимать, что они не предназначены для ограничения изобретения этими вариантами осуществления. Напротив, изобретение предназначено для охвата всех альтернативных вариантов, модификаций и эквивалентов, которые могут быть включены в объем изобретения, определяемый формулой изобретения.

Специалист в данной области распознает множество способов и материалов, подобных или эквивалентных описанным в данном документе, которые могут быть

использованы в практике настоящего изобретения. Изобретение никоим образом не ограничивается описанными методами и материалами.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термин «иммуноконъюгат» относится к конструкции антитела, которая ковалентно связана с адъювантным фрагментом через линкер. термин «адъювант» относится к веществу, способному вызывать иммунный ответ у субъекта, подвергшегося воздействию адъюванта. Фраза «адъювантный фрагмент» относится к адъюванту, который ковалентно связан с конструкцией антитела, например, через линкер, как описано в данном документе. Адъювантный фрагмент может вызывать иммунный ответ, будучи связанным с конструкцией антитела или после расщепления (например, ферментативного расщепления) от конструкции антитела после введения иммуноконъюгата субъекту.

«Адъювант» относится к веществу, способному вызывать иммунный ответ у субъекта, подвергшегося воздействию адъюванта. Фраза «адъювантный фрагмент» относится к адъюванту, который ковалентно связан с конструкцией антитела, например, через линкер, как описано в данном документе. Адъювантный фрагмент может вызывать иммунный ответ, будучи связанным с конструкцией антитела или после расщепления (например, ферментативного расщепления) от конструкции антитела после введения иммуноконъюгата субъекту.

Термины «Толл-подобный рецептор» и «TLR» относятся к любому члену семейства высококонсервативных белков млекопитающих, которые распознают патоген-ассоциированные молекулярные фрагменты и действуют как ключевые сигнальные элементы врожденного иммунитета. Полипептиды TLR имеют характерную структуру, которая включает внеклеточный домен, имеющий богатые лейцином повторы, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, который участвует в передаче сигналов TLR.

Термины «Toll-подобный рецептор 7» и «TLR7» относятся к нуклеиновым кислотам или полипептидам, имеющим последовательность, по меньшей мере на около 70%, около 80%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более идентичную общедоступной последовательности TLR7, например, с номером доступа в GenBank AAZ99026 для полипептида TLR7 человека или номером доступа в GenBank AAK62676 для полипептида TLR7 мыши.

Термины «Toll-подобный рецептор 8» и «TLR8» относятся к нуклеиновым кислотам или полипептидам, имеющим последовательность, по меньшей мере на около 70%, около 80%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более идентичную общедоступной последовательности TLR7, например, с номером доступа в GenBank AAZ95441 для полипептида TLR8 человека или номером доступа в GenBank AAK62677 для полипептида TLR8 мыши.

«Агонист TLR» представляет собой вещество, которое прямо или косвенно связывается с TLR (например, TLR7 и/или TLR8), чтобы индуцировать передачу сигналов TLR. Любое обнаруживаемое различие в передаче сигналов TLR может указывать на то,

что агонист стимулирует или активирует TLR. Различия в передаче сигналов могут проявляться, например, в изменениях экспрессии генов-мишеней, в фосфорилировании компонентов сигнальной трансдукции, во внутриклеточной локализации нижестоящих элементов, таких как ядерный фактор- κB (NF- κB), в ассоциации определенных компонентов (таких как киназа, связанная с рецептором IL-1 (IRAK)) с другими белками или внутриклеточными структурами, или в биохимической активности компонентов, таких как киназы (например, митоген-активированная протеинкиназа (MAPK)).

«Антитело» относится к полипептиду, содержащему антигенсвязывающую область (включая определяющие комплементарность области (CDR)) из гена иммуноглобулина или его фрагментов. Термин «антитело» конкретно охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, которые проявляют желаемую биологическую активность. Типичная структурная единица иммуноглобулина (антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа), соединенных дисульфидными связями. Каждая цепь состоит из структурных доменов, которые называются иммуноглобулиновыми доменами. Эти домены подразделяются на различные категории по размеру и функции, например, вариабельные домены или области на легкой и тяжелой цепях (V_L и V_H , соответственно) и константные домены или области на легкой и тяжелой цепях (C_L и C_H , соответственно). N-конец каждой цепи определяет вариабельную область от около 100 до 110 или более аминокислот, называемую паратопом, которая в основном отвечает за распознавание антигена, т.е. антигенсвязывающий домен. Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Антитела IgG представляют собой большие молекулы около 150 кДа, состоящие из четырех пептидных цепей. Антитела IgG содержат две идентичные тяжелые цепи класса γ около 50 кДа и две идентичные легкие цепи около 25 кДа, таким образом, тетрамерную четвертичную структуру. Две тяжелые цепи связаны друг с другом и с легкой цепью каждая дисульфидными связями. Образующийся тетрамер имеет две идентичные половинки, которые вместе образуют Y-образную форму. Каждый конец вилки содержит идентичный антигенсвязывающий домен. У человека существует четыре подкласса IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), названных в порядке возрастания их содержания в сыворотке (т.е. IgG1 является наиболее многочисленным). Как правило, антигенсвязывающий домен антитела имеет наибольшее значение для специфичности и аффинности связывания с раковыми клетками.

«Конструкция антитела» относится к антителу или слитому белку, содержащему (i) антигенсвязывающий домен и (ii) домен Fc.

В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет собой

антигенсвязывающий «фрагмент» антитела, который представляет собой конструкцию, которая содержит по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, отдельно или с другими компонентами, которые вместе составляют антигенсвязывающую конструкцию. В данной области известно много различных типов «фрагментов» антител, включая, например, (i) фрагмент Fab, который представляет собой моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и CH_1 , (ii) фрагмент $F(ab')_2$, который представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, (iii) фрагмент F_v , состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (iv) фрагмент Fab' , который образуется в результате разрушения дисульфидного мостика фрагмента $F(ab')_2$ в мягких восстанавливающих условиях, (v) стабилизированный дисульфидом фрагмент F_v (dsF_v) и (vi) одноцепочечный F_v (scF_v), который представляет собой моновалентную молекулу, состоящую из двух доменов фрагмента F_v (т.е. V_L и V_H), соединенных синтетическим линкером, который позволяет синтезировать два домена в виде единой полипептидной цепи.

Антитело или фрагменты антитела могут быть частью более крупной конструкции, например, конъюгата или слитой конструкции фрагмента антитела с дополнительными областями. Например, в некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела может быть слит с областью F_c , как описано в данном документе. В других вариантах осуществления фрагмент антитела (например, Fab или scF_v) может быть частью химерного антигенного рецептора или химерного Т-клеточного рецептора, например, путем слияния с трансмембранным доменом (необязательно с промежуточным линкером или «стеблем» (например, шарнирная область)) и необязательно межклеточным сигнальным доменом. Например, фрагмент антитела может быть слит с гамма- и/или дельта-цепями Т-клеточного рецептора, чтобы получить конструкцию, подобную Т-клеточному рецептору, которая связывает PD-L1. В еще одном варианте осуществления фрагмент антитела представляет собой часть привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTEs), содержащего CD1 или CD3 связывающий домен и линкер.

«Эпитоп» означает любую антигенную детерминанту или эпитопную детерминанту антигена, с которой связывается антигенсвязывающий домен (т.е. в паратопе антигенсвязывающего домена). Антигенные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахара, и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда.

Термины « F_c -рецептор» или « F_cR » относятся к рецептору, который связывается с F_c -областью антитела. Существует три основных класса рецепторов F_c : (1) $Fc\gamma R$, который связывается с IgG, (2) $Fc\alpha R$, который связывается с IgA, и (3) $Fc\epsilon R$, который связывается с IgE. Семейство $Fc\gamma R$ включает несколько членов, таких как $Fc\gamma I$ (CD64), $Fc\gamma RIIA$ (CD32A), $Fc\gamma RIIB$ (CD32B), $Fc\gamma RIIIA$ (CD16A) и $Fc\gamma RIIB$ (CD16B). Рецепторы $Fc\gamma$ различаются по своему родству к IgG, а также по разному родству к подклассам IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4).

«Идентичность» последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислоты, как указано в данном документе, может быть определена путем сравнения интересующей последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислоты с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислоты. Процент идентичности представляет собой число нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми (т.е. идентичными) как между оптимально выровненной последовательностью, представляющей интерес, так и эталонной последовательностью, деленное на длину самой длинной последовательности (т.е. длину либо интересующей последовательности, либо эталонной последовательности, в зависимости от того, какая из них длиннее). Выравнивание последовательностей и вычисление процента идентичности можно выполнить с помощью доступных программ. Примеры таких программ включают CLUSTAL-W, T-Coffee и ALIGN (для выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислот), программы BLAST (например, BLAST 2.1, BL2SEQ, BLASTp, BLASTn и т.п.) и программы FASTA (например, FASTA3x, FASTM и SSEARCH) (для выравнивания последовательностей и поиска сходства последовательностей). Алгоритмы выравнивания последовательностей также раскрыты, например, Altschul et al., *J. Molecular Biol.*, 215(3): 403-410 (1990), Beigert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(10): 3770-3775 (2009), Durbin et al., eds., *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2009), Soding, *Bioinformatics*, 21(7): 951-960 (2005), Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25(17): 3389-3402 (1997), and Gusfield, *Algorithms on Strings, Trees and Sequences*, Cambridge University Press, Cambridge UK (1997)). Процент (%) идентичности последовательностей также можно рассчитать, например, как $100 \times [(\text{идентичные положения}) / \min (TG_A, TG_B)]$, где TG_A и TG_B представляют собой сумму количества остатков и положений внутреннего разрыва в пептидных последовательностях A и B в выравнивании, которое минимизирует TG_A и TG_B . См., например, Russell et al., *J. Mol Biol.*, 244: 332-350 (1994).

Связывающий агент включает полипептиды варибельной области тяжелой и легкой цепи Ig, которые вместе образуют сайт связывания антигена. Каждая из варибельных областей тяжелой и легкой цепи представляет собой полипептиды, содержащие три определяющие комплементарность области (CDR1, CDR2 и CDR3), соединенные каркасными областями. Связывающий агент может быть любым из множества типов связывающих агентов, известных в данной области, которые содержат тяжелую и легкую цепи Ig. Например, связывающий агент может быть антителом, антигенсвязывающим «фрагментом» антитела или рецептором Т-клетки.

«Биосимиляр» относится к одобренной конструкции антитела, которая имеет активные свойства, аналогичные, например, ранее одобренной конструкции антитела, нацеленной на PD-L1, такой как атезолизумаб (TECENTRIQ™, Genentech, Inc.), дурвалумаб (IMFINZI™, AstraZeneca), и авелумаб (BAVENCIO™, EMD Serono, Pfizer); ранее одобренной конструкции антитела, нацеленной на HER2, такой как трастузумаб (HERCEPTIN™, Genentech, Inc.) и пертузумаб (PERJETA™, Genentech, Inc.); или

антителу, нацеленному на CEA , такому как лабетузумаб (CEA-CIDETM, MN-14, hMN14, Immunomedics) CAS Reg. No. 219649-07-7).

«Биобеттер» относится к одобренной конструкции антитела, которая является улучшением ранее одобренной конструкции антитела, такой как атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, трастузумаб, пертузумаб и лабетузумаб. Биобеттер может иметь одну или более модификаций (например, измененный гликановый профиль или уникальный эпитоп) по сравнению с ранее одобренной конструкцией антитела.

«Аминокислота» относится к любой мономерной единице, которая может быть включена в пептид, полипептид или белок. Аминокислоты включают встречающиеся в природе α -аминокислоты и их стереоизомеры, а также не природного происхождения (не встречающиеся в природе) аминокислоты и их стереоизомеры. «Сtereoизомеры» данной аминокислоты относятся к изомерам, имеющим одинаковую молекулярную формулу и внутримолекулярные связи, но различное трехмерное расположение связей и атомов (например, L-аминокислота и соответствующая D-аминокислота). Аминокислоты могут быть гликозилированными (например, N-связанные гликаны, O-связанные гликаны, фосфогликаны, C-связанные гликаны или глипикация) или дегликозилированными. Аминокислоты могут обозначаться в данном документе либо общеизвестными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой те, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые впоследствии модифицируются, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Встречающиеся в природе α -аминокислоты включают, без ограничения, D и L стереоизомеры аланина (Ala), если они существуют, цистеин (Cys), аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu), фенилаланин (Phe), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ile), аргинин (Arg), лизин (Lys), лейцин (Leu), метионин (Met), аспарагин (Asn), пролин (Pro), глутамин (Gln), серин (Ser), треонин (Thr), валин (Val), триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и их комбинации. Стереоизомеры встречающихся в природе α -аминокислот включают, без ограничения, D-аланин (D-Ala), D-цистеин (D-Cys), D-аспарагиновую кислоту (D-Asp), D-глутаминовую кислоту (D-Glu), D-фенилаланин (D-Phe), D-гистидин (D-His), D-изолейцин (D-Ile), D-аргинин (D-Arg), D-лизин (D-Lys), D-лейцин (D-Leu), D-метионин (D-Met), D-аспарагин (D-Asn), D-пролин (D-Pro), D-глутамин (D-Gln), D-серин (D-Ser), D-треонин (D-Thr), D-валин (D-Val), D-триптофан (D-Trp), D-тирозин (D-Tyr) и их комбинации.

Встречающиеся в природе аминокислоты включают те, которые образуются в белках в результате посттрансляционной модификации, такие как цитруллин (Cit).

Неприродные (не встречающиеся в природе) аминокислоты включают, без ограничения, аналоги аминокислот, миметики аминокислот, синтетические аминокислоты, N-замещенные глицины и N-метиламинокислоты в L- или D-конфигурации, которые действуют аналогично природным аминокислотам. Например,

«аналоги аминокислот» могут быть неприродными аминокислотами, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и встречающиеся в природе аминокислоты (т.е. углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой), но имеют модифицированные группы боковых цепей или модифицированные пептидные скелеты, например, гомосерин, норлейцин, метионин сульфоксид и метилсульфоний. «Аминокислотные миметики» относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которая функционирует подобно встречающейся в природе аминокислоте.

«Линкер» относится к функциональной группе, которая ковалентно связывает два или более фрагмента в соединении или материале. Например, связывающий фрагмент может служить для ковалентного связывания адъювантного фрагмента с конструкцией антитела в иммуноконъюгате.

«Связывающий фрагмент» относится к функциональной группе, которая ковалентно связывает два или более фрагментов в соединении или материале. Например, связывающий фрагмент может служить для ковалентного связывания адъювантного фрагмента с антителом в иммуноконъюгате. Пригодные связи для соединения связывающих фрагментов с белками и другими материалами включают, но не ограничиваются ими, амиды, амины, сложные эфиры, карбаматы, мочевины, тиоэфиры, тиокарбаматы, тиокарбонаты и тиомочевинны.

«Двухвалентный» относится к химическому фрагменту, который содержит две точки присоединения для связывания двух функциональных групп; поливалентные связывающие фрагменты могут иметь дополнительные точки присоединения для связывания дополнительных функциональных групп. Двухвалентные радикалы могут обозначаться суффиксом «диил». Например, двухвалентные связывающие фрагменты включают двухвалентные полимерные фрагменты, такие как двухвалентный поли(этиленгликоль), двухвалентный циклоалкил, двухвалентный гетероциклоалкил, двухвалентный арил и двухвалентная гетероарильная группа. «Двухвалентная циклоалкильная, гетероциклоалкильная, арильная или гетероарильная группа» относится к циклоалкильной, гетероциклоалкильной, арильной или гетероарильной группе, имеющей две точки присоединения для ковалентного связывания двух фрагментов в молекуле или материале. Циклоалкильные, гетероциклоалкильные, арильные или гетероарильные группы могут быть замещенными или незамещенными. Циклоалкильные, гетероциклоалкильные, арильные или гетероарильные группы могут быть замещены одной или более группами, выбранными из галогена, гидроксид, амин, алкиламин, амид, ацил, нитро, циано и алкокси.

Волнистая линия () или звездочка (*) представляет собой точку присоединения указанного химического фрагмента. Если указанный химический фрагмент имеет две волнистые линии (), следует понимать, что двухвалентный химический фрагмент можно использовать двусторонне, то есть при чтении слева направо или справа налево. В

некоторых вариантах осуществления указанный фрагмент, имеющий две волнистые линии (), считается используемым при чтении слева направо.

«Алкил» относится к линейному или разветвленному, насыщенному алифатическому радикалу, содержащему указанное число атомов углерода. Алкил может включать любое число атомов углерода. Например, C₁-C₄ алкил включает, но не ограничивается ими, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, *втор*-бутил и *трет*-бутил. Алкил также может относиться к алкильным группам, имеющим до 30 атомов углерода, таким как, но не ограничивается ими, гептил, октил, нонил, децил и т. д. Алкильные группы могут быть замещенными или незамещенными. «Замещенные алкильные» группы могут быть замещены одной или более группами, выбранными из галогена, гидроксигруппы, аминогруппы, оксо (= O), алкиламино, амидо, ацила, нитро, циано и алкокси.

Термин «алкилдиил» относится к двухвалентному алкильному радикалу.

«Циклоалкил» относится к насыщенной или частично ненасыщенной, моноциклической, конденсированной бициклической или мостиковой полициклической кольцевой структуре, содержащей от 3 до 12 кольцевых атомов или указанное число атомов. Насыщенные моноциклические карбоциклические кольца включают, например, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и циклооктил. Насыщенные бициклические и полициклические карбоциклические кольца включают, например, норборнан, [2.2.2] бициклооктан, декагидронафталин и адамантан. Карбоциклические группы также могут быть частично ненасыщенными, имея одну или более двойных или тройных связей в кольце. Типичные карбоциклические группы, которые являются частично ненасыщенными, включают, но не ограничиваются ими, циклобутен, циклопентен, циклогексен, циклогексадиен (1,3- и 1,4-изомеры), циклогептен, циклогептадиен, циклооктен, циклооктадиен (1,3-, 1,4- и 1,5-изомеры), норборнадиен и норборнадиен.

Термин «циклоалкилдиил» относится к двухвалентному циклоалкильному радикалу.

«Арил» относится к ароматической кольцевой системе, имеющей любое подходящее число кольцевых атомов и любое подходящее число колец. Арильные группы могут быть моноциклическими, конденсированными с образованием бициклических или трициклических групп или связанными с образованием биарильной группы. Типичные арильные группы включают фенил, нафтил и бифенил. Другие арильные группы включают бензил, имеющий метиленовую связывающую группу. Некоторые арильные группы имеют от 6 до 12 членов в кольце, такие как фенил, нафтил или бифенил. Другие арильные группы имеют от 6 до 10 членов в кольце, такие как фенил или нафтил.

«Гетероциклоалкил» и «гетероарил» относятся к «циклоалкильной» или «арильной» группе, как описано в данном документе, где один или более атомов углерода необязательно и независимо заменены гетероатомом, выбранным из N, O и S. «Гетероарил» сам по себе или как часть другого заместителя, относится к моноциклическому или конденсированному бициклическому или трициклическому

ароматическому кольцу, содержащему в структуре от 5 до 16 кольцевых атомов, где от 1 до 5 кольцевых атомов представляют собой гетероатом, такой как N, O или S. Дополнительные гетероатомы также могут быть приемлемыми, включая, но не ограничиваясь ими, B, Al, Si и P. Гетероатомы могут быть окислены с образованием фрагментов, таких как $-S(O)$ - и $-S(O)_2$ -, но не ограничиваясь ими. В гетероарильные группы может быть включено любое подходящее число гетероатомов, такое как 1, 2, 3, 4 или 5, или от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 3, от 2 до 4, от 2 до 5, от 3 до 4 или от 3 до 5. Гетероарильная группа может включать такие группы, как пиррол, пиридин, имидазол, пиразол, триазол, тетразол, пиразин, пиримидин, пиридазин, триазин (1,2,3-, 1,2,4- и 1,3,5-изомеры), тиофен, фуран, тиазол, изотиазол, оксазол и изоксазол. Гетероарильные группы также могут быть конденсированы с ароматическими кольцевыми системами, такими как фенильное кольцо, с образованием членов, включая, но не ограничиваясь ими, бензопирролы, такие как индол и изоиндол, бензопиридины, такие как хинолин и изохинолин, бензопиразин (хиноксалин), бензопиримидин (хиназолин), бензопиридазины, такие как фталазин и циннолин, бензотиофен и бензофуран. Другие гетероарильные группы включают гетероарильные кольца, связанные связью, такие как бипиридин. Гетероарильные группы могут быть замещенными или незамещенными. «Замещенные гетероарильные» группы могут быть замещены одной или более группами, выбранными из галогена, гидроксигруппы, амино, оксо ($=O$), алкиламино, амидо, ацила, нитро, циано и алкокси.

Термин «гетероциклоалкилдиил» относится к двухвалентному гетероциклоалкильному радикалу.

Гетероарильные группы могут быть связаны через любое положение в кольце. Например, пиррол включает 1-, 2- и 3-пиррол, пиридин включает 2-, 3- и 4-пиридин, имидазол включает 1-, 2-, 4- и 5-имидазол, пиразол включает 1-, 3-, 4- и 5-пиразол, триазол включает 1-, 4- и 5-триазол, тетразол включает 1- и 5-тетразол, пиримидин включает 2-, 4-, 5- и 6-пиримидин, пиридазин включает 3- и 4-пиридазин, 1,2,3-триазин включает 4- и 5-триазин, 1,2,4-триазин включает 3-, 5- и 6-триазин, 1,3,5-триазин включает 2-триазин, тиофен включает 2- и 3-тиофен, фуран включает 2- и 3-фуран, тиазол включает 2-, 4- и 5-тиазол, изотиазол включает 3-, 4- и 5-изотиазол, оксазол включает 2-, 4- и 5-оксазол, изоксазол включает 3-, 4- и 5-изоксазол, индол включает 1-, 2- и 3-индол, изоиндол включает 1- и 2-изоиндол, хинолин включает 2-, 3- и 4-хинолин, изохинолин включает 1-, 3- и 4-изохинолин, хиназолин включает 2- и 4-хиназолин, циннолин включает 3- и 4-циннолин, бензотиофен включает 2- и 3-бензотиофен, а бензофуран включает 2- и 3-бензофуран.

Термин «гетероарилдиил» относится к двухвалентному гетероарильному радикалу.

«Гетероциклоалкил» сам по себе или как часть другого заместителя относится к насыщенной кольцевой системе, имеющей от 3 до 12 членов в кольце и от 1 до 4 гетероатомов N, O и S. Также могут быть приемлемы дополнительные гетероатомы, включая, но не ограничиваясь ими, B, Al, Si и P. Гетероатомы могут быть окислены с

образованием фрагментов, таких как, но не ограничиваясь ими, $-S(O)$ - и $-S(O)_2$ -. Гетероциклоалкильные группы могут включать любое число кольцевых атомов, например, от 3 до 6, от 4 до 6, от 5 до 6, от 3 до 8, от 4 до 8, от 5 до 8, от 6 до 8, от 3 до 9, от 3 до 10, 3 до 11 или от 3 до 12 звеньев кольца. В гетероциклоалкильные группы может быть включено любое подходящее число гетероатомов, такое как 1, 2, 3 или 4, или от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 2 до 3, от 2 до 4 или от 3 до 4. Гетероциклоалкильная группа может включать такие группы, как азиридин, азетидин, пирролидин, пиперидин, азапан, азокан, хинуклидин, пиразолидин, имидазолидин, пиперазин (1,2-, 1,3- и 1,4-изомеры), оксиран, оксетан, тетрагидрофуран, оксан (тетрагидропиран), оксепан, тиран, титан, тиолан (тетрагидротиофен), тиан (тетрагидротиопиран), оксазолидин, изоксазолидин, тиазолидин, изотиазолидин, диоксолан, дитиолан, морфолин, тиоморфолин, диоксан или дитиан. Гетероциклоалкильные группы также могут быть конденсированы с ароматическими или неароматическими кольцевыми системами с образованием членов, включая, но не ограничиваясь, индолин. Гетероциклоалкильные группы могут быть незамещенными или замещенными.

Гетероциклоалкильные группы могут быть связаны через любое положение в кольце. Например, азиридин может быть 1- или 2-азиридином, азетидин может быть 1- или 2-азетидином, пирролидин может быть 1-, 2- или 3-пирролидином, пиперидин может быть 1-, 2-, 3- или 4- пиперидином, пиразолидин может быть 1-, 2-, 3- или 4-пиразолидином, имидазолидин может быть 1-, 2-, 3- или 4-имидазолидином, пиперазин может быть 1-, 2-, 3- или 4-пиперазином, тетрагидрофуран может быть 1- или 2-тетрагидрофураном, оксазолидин может быть 2-, 3-, 4- или 5-оксазолидином, изоксазолидин может быть 2-, 3-, 4- или 5-изоксазолидином, тиазолидин может быть 2-, 3-, 4- или 5-тиазолидин, изотиазолидин может быть 2-, 3-, 4- или 5-изотиазолидином, а морфолин может быть 2-, 3- или 4-морфолином.

Термин «гетероциклоалкилдиил» относится к двухвалентному гетероциклоалкильному радикалу.

Термины «галоген» и «галоген», сами по себе или как часть другого заместителя относятся к атому фтора, хлора, брома или йода.

Термин «карбонил» сам по себе или как часть другого заместителя относится к $C(=O)$ или $-C(=O)-$, то есть к атому углерода, связанному двойной связью с кислородом и связанному с двумя другими группами в фрагменте, имеющем карбонил.

В контексте данного документа фраза «четвертичная аммониевая соль» относится к третичному амину, кватернизованному алкильным заместителем (например, C_1 - C_4 алкилом, таким как метил, этил, пропил или бутил).

Термины «лечить», «лечение» и «лечить» относятся к любым признакам успеха в лечении или облегчении нарушения, патологии, состояния (например, рака) или симптома (например, когнитивного нарушения), включая любые объективный или субъективный параметр, такой как облегчение; ремиссия; уменьшение симптомов или повышение переносимости симптома, травмы, патологии или состояния для пациента; снижение

скорости прогрессирования симптомов; уменьшение частоты или продолжительности симптома или состояния; или, в некоторых ситуациях, предотвращение появления симптома. Лечение или облегчение симптомов может быть основано на любом объективном или субъективном параметре, включая, например, результат физического обследования.

Термины «рак», «новообразование» и «опухоль» используются в данном документе для обозначения клеток, которые демонстрируют автономный, нерегулируемый рост, так что клетки проявляют фенотип аберрантного роста, характеризующийся значительной потерей контроля над пролиферацией клеток. Клетки, представляющие интерес для обнаружения, анализа и/или лечения в контексте изобретения, включают раковые клетки (например, раковые клетки от индивидуума с раком), злокачественные раковые клетки, диметастатические раковые клетки, метастатические раковые клетки и неметастатические раковые клетки. Известны раковые заболевания практически любой ткани. Фраза «опухолевая нагрузка» относится к количеству раковых клеток или объему рака у субъекта. Соответственно, уменьшение опухолевой нагрузки означает уменьшение числа раковых клеток или объема раковых клеток у субъекта. В контексте данного документа термин «раковая клетка» относится к любой клетке, которая является раковой клеткой (например, из любого из видов рака, от которого можно лечить индивидуума, например, выделенной от индивидуума, страдающего раком) или полученной из раковой клетки, например, клон раковой клетки. Например, раковая клетка может происходить из установленной линии раковых клеток, может быть первичной клеткой, выделенной от индивидуума с раком, может быть клеткой-потомком первичной клетки, выделенной от индивидуума с раком, и т.п. В некоторых вариантах осуществления термин может также относиться к части раковой клетки, например, субклеточной, части клеточной мембраны или клеточному лизату раковой клетки. Многие типы рака известны специалистам в данной области, включая солидные опухоли, такие как карциномы, саркомы, глиобластомы, меланомы, лимфомы и миеломы, а также циркулирующие раковые образования, такие как лейкомии.

В контексте данного документа термин «рак» включает любую форму рака, включая, но не ограничиваясь ими, солидные опухоли (например, рак кожи, легких, простаты, груди, желудка, мочевого пузыря, толстой кишки, яичников, поджелудочной железы, почки, печени, глиобластома, медуллобластома, лейомиосаркома, плоскоклеточные карциномы головы и шеи, меланомы и нейроэндокринные опухоли) и жидкостные виды рака (например, гемобластоз); карциномы; опухоли мягких тканей; саркомы; тератомы; меланомы; лейкомии; лимфомы; и рак головного мозга, включая минимальную остаточную болезнь, и включая как первичные, так и метастатические опухоли.

«Экспрессия PD-L1» относится к клетке, которая имеет рецептор PD-L1 на поверхности клетки. В контексте данного документа термин «сверхэкспрессия PD-L1» относится к клетке, которая имеет больше рецепторов PD-L1 по сравнению с

соответствующей нераковой клеткой.

«HER2» относится к белку рецептора эпидермального фактора роста человека 2 типа.

«Экспрессия HER2» относится к клетке, которая имеет рецептор HER2 на поверхности клетки. Например, клетка может иметь от около 20000 до около 50000 рецепторов HER2 на поверхности клетки. В контексте данного документа термин «сверхэкспрессия HER2» относится к клетке, которая имеет более чем около 50000 рецепторов HER2. Например, клетка имеет в 2, 5, 10, 100, 1000, 10000, 100000 или 1000000 раз больше рецепторов HER2 по сравнению с соответствующей здоровой клеткой (например, около 1 или 2 миллионов рецепторов HER2). Подсчитано, что сверхэкспрессия HER2 наблюдается в около 25-30% случаев рака молочной железы.

«Патология» рака включает в себя все явления, которые ставят под угрозу самочувствие пациента. Это включает, без ограничения, аномальный или неконтролируемый рост клеток, метастазирование, вмешательство в нормальное функционирование соседних клеток, высвобождение цитокинов или других секреторных продуктов на аномальных уровнях, подавление или усиление воспалительного или иммунологического ответа, неоплазию, предопухолевое состояние, злокачественное новообразование и вторжение в окружающие или отдаленные ткани или органы, такие как лимфатические узлы.

В контексте данного документа фразы «рецидив рака» и «рецидив опухоли» и их грамматические варианты относятся к дальнейшему росту неопластических или раковых клеток после диагностики рака. В частности, рецидив может произойти, когда в раковой ткани происходит дальнейший рост раковых клеток. «Распространение опухоли» аналогичным образом происходит, когда клетки опухоли распространяются в местные или отдаленные ткани и органы, следовательно, распространение опухоли включает метастазы опухоли. «Инвазия опухоли» происходит, когда опухоль распространяется локально, нарушая функцию вовлеченных тканей путем сдавливания, разрушения или предотвращения нормального функционирования органа.

В контексте данного документа термин «метастаз» относится к росту раковой опухоли в органе или части тела, которая не связана напрямую с органом первичной раковой опухоли. Под метастазом следует понимать микрометастаз, который представляет собой присутствие неопределяемого количества раковых клеток в органе или части тела, которая не связана напрямую с органом первичной раковой опухоли. Метастазирование также можно определить как несколько этапов процесса, таких как уход раковых клеток из исходного участка опухоли и миграция и/или вторжение раковых клеток в другие части тела.

Фразы «эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» относятся к дозе или количеству вещества, такого как иммуноконъюгат, которое оказывает терапевтическое действие, для которого его вводят. Точная доза зависит от цели лечения и может быть определена специалистом в данной области с помощью

известных методик (см, например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th Edition (McGraw-Hill, 2006); and Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd Edition, (Pharmaceutical Press, London, 2012)). В случае рака терапевтически эффективное количество иммуноконъюгата может уменьшать число раковых клеток; уменьшить размер опухоли; подавлять (т.е, замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; подавлять до некоторой степени рост опухоли; и/или облегчать до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком. В зависимости от степени, в которой иммуноконъюгат может предотвращать рост и/или убивать существующие раковые клетки, он может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Для лечения рака эффективность можно, например, измерить путем оценки времени до прогрессирования заболевания (TTP) и/или определения частоты ответа (RR)

«Реципиент», «индивидуум», «субъект», «хозяин» и «пациент» используются взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, для которого желателен диагноз, лечение или терапия (например, люди). «Млекопитающее» для целей лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных зоопарков, спортивных животных или домашних питомцев, таких как собаки, лошади, кошки, коровы, овцы, козы, свиньи, верблюды. и т.д. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является человеком.

В контексте данного изобретения фраза «синергетический адъювант» или «синергетическая комбинация» включает комбинацию двух иммуномодуляторов, таких как агонист рецептора, цитокин и адъювантный полипептид, которые в комбинации вызывают синергетическое эффект на иммунитет по сравнению с каждым из них, вводимым отдельно. В частности, описанные в данном документе иммуноконъюгаты содержат синергические комбинации заявленного адъюванта и конструкции антитела. Данные синергические комбинации при введении вызывают больший эффект на иммунитет, например, по сравнению с тем, когда конструкцию антитела или адъювант вводят в отсутствие другого фрагмента. Кроме того, можно вводить меньшее количество иммуноконъюгата (измеренное по общему количеству конструкций антител или общему количеству адъювантов, вводимых как часть иммуноконъюгата) по сравнению с тем, когда либо конструкцию антитела, либо адъювант вводят отдельно.

В контексте данного документа термин «введение» относится к парентеральному, внутривенному, внутрибрюшному, внутримышечному, внутриопухолевому, внутриочаговому, интраназальному или подкожному введению, пероральному введению, введению в виде суппозитория, местному контакту, интратекальному введению или имплантации медленно высвобождающего устройства, например миниосмотического

насоса, субъекту.

В контексте данного документа термины «около» и «приблизительно», используются для изменения числового значения, указывают близкий диапазон, окружающий числовое значение. Таким образом, если «X» является значением, «около X» или «приблизительно X» указывает значение от 0,9X до 1,1X, например, от 0,95X до 1,05X или от 0,99X до 1,01X. Ссылка на «около X» или «приблизительно X» конкретно указывает, по меньшей мере, на значения X, 0,95X, 0,96X, 0,97X, 0,98X, 0,99X, 1,01X, 1,02X, 1,03X, 1,04X и 1,05X. Соответственно, «около X» и «приблизительно X» предназначены для обозначения и обеспечения письменного описания, подтверждающего ограничение формулы изобретения, например, «0,98X.»

АНТИТЕЛА

Иммуноконъюгат по изобретению содержит антитело. В объем вариантов осуществления изобретения входят функциональные варианты описанных здесь конструкций антител или антигенсвязывающего домена. В контексте данного документа термин «функциональный вариант» относится к конструкции антитела, имеющей антигенсвязывающий домен с существенной или значительной идентичностью последовательности или сходством с конструкцией родительского антитела или антигенсвязывающим доменом, причем этот функциональный вариант сохраняет биологическую активность конструкции антитела или антигенсвязывающего домена, вариантом которого он является. Функциональные варианты включают, например, те варианты конструкций антител или антигенсвязывающего домена, описанные в данном документе (конструкция родительского антитела или антигенсвязывающий домен), которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени, экспрессирующие PD-L1, HER2 или CEA в аналогичной степени, в той же или в большей степени, что и конструкция родительского антитела или антигенсвязывающий домен.

Что касается конструкции антитела или антигенсвязывающего домена, функциональный вариант может, например, составлять по меньшей мере около 30%, около 50%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более идентичности по аминокислотной последовательности конструкции антитела или антигенсвязывающего домена.

Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность конструкции родительского антитела или антигенсвязывающего домена по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой. Альтернативно или дополнительно функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность конструкции родительского антитела или антигенсвязывающего домена с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В этом случае предпочтительно, чтобы неконсервативная аминокислотная замена не мешала или не подавляла биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может усиливать

биологическую активность функционального варианта, так что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с конструкцией родительского антитела или антигенсвязывающим доменом.

Антитела, содержащие иммуноконъюгаты по изобретению, включают варианты, сконструированные с Fc. В некоторых вариантах осуществления мутации в области Fc, которые приводят к модулированному связыванию с одним или более рецепторами Fc, могут включать одну или более из следующих мутаций: SD (S239D), SDIE (S239D/I332E), SE (S267E), SELF (S267E/L328F), SDIE (S239D/I332E), SDIEAL (S239D/I332E/A330L), GA (G236A), ALIE (A330L/I332E), GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E), V9 (G237D/P238D/P271G/A330R) и V11 (G237D/P238D/H268D/P271G/A330R), и/или одну или более мутаций в следующих аминокислотах: E345R, E233, G237, P238, H268, P271, L328 и A330. Дополнительные модификации области Fc для модулирования связывания рецептора Fc описаны, например, в публикации заявки на патент США 2016/0145350 и патентах США 7,416,726 и 5,624,821, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Антитела, содержащие иммуноконъюгаты по изобретению, включают варианты гликанов, такие как афукозилирование. В некоторых вариантах реализации Fc-область связывающих агентов модифицирована, чтобы иметь измененный профиль гликозилирования Fc-области по сравнению с нативной немодифицированной Fc-областью.

Аминокислотные замены конструкций антител по изобретению или антигенсвязывающих доменов предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены. Консервативные аминокислотные замены известны в данной области и включают аминокислотные замены, при которых одна аминокислота, имеющая определенные физические и/или химические свойства, заменяется другой аминокислотой, которая имеет такие же или подобные химические или физические свойства. Например, консервативная замена аминокислоты может представлять собой кислую/отрицательно заряженную полярную аминокислоту, замененную на другую кислую/отрицательно заряженную полярную аминокислоту (например, Asp или Glu), аминокислоту с неполярной боковой цепью, замененную на другую аминокислоту с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val, и т.д.), основную/положительно заряженную полярную аминокислоту, замененную на другую основную/положительно заряженную полярную аминокислоту (например, Lys, His, Arg, etc.), незаряженную аминокислоту с полярной боковой цепью, замененную на другую незаряженную аминокислоту с полярной боковой цепью (например, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr и т. д.), аминокислоту с бета-разветвленной боковой цепью, замененную на другую аминокислоту с бета-разветвленной боковой цепью (например, Ile, Thr и Val), аминокислоту с ароматической боковой цепью, замененную на другую аминокислоту с ароматической боковой цепью (например, His, Phe, Trp и Tyr) и т. д.

Конструкция антитела или антигенсвязывающий домен может состоять по

существо из указанной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, так что другие компоненты, например, другие аминокислоты, существенно не изменяют биологическую активность конструкции антитела или функционального варианта антигенсвязывающего домена.

Способы получения антител описаны, например, в Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5: 511-519 (1976); Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988); and Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 9th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2017). В некоторых вариантах реализации человеческое или химерное антитело или фрагмент антитела можно получить с использованием трансгенного животного (например, мыши), в котором один или более генов эндогенного иммуноглобулина заменены одним или более генами иммуноглобулина человека. Примеры трансгенных мышей, у которых гены эндогенных антител эффективно заменены генами человеческих антител, включают, но не ограничиваются ими, Medarex HUMAB-MOUSE™, Kirin TC MOUSE™ и Kyowa Kirin KM-MOUSE™. (см., например, Lonberg, *Nat. Biotechnol.*, 23(9): 1117-25 (2005), и Lonberg, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 181: 69-97 (2008)). Гуманизированное антитело можно получить с использованием любого подходящего метода, известного в данной области (см., например, An, Z. (ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey (2009)), включая, например, трансплантацию нечеловеческих CDR на каркас человеческого антитела (см., например, Kashmiri et al., *Methods*, 36(1): 25-34 (2005); и Hou и др., *J. Biochem.*, 144(1): 115-120 (2008) и использование фагового дисплея (см., например, Fellouse, и др., *Journal of Molecular Biology*, 373(4): 924-940 (2007) и Glanville, и др., *PNAS*, 106(48): 20216-20221 (2009)).

В иллюстративном варианте осуществления иммуноконъюгаты по изобретению содержат конструкцию антитела, которая включает антигенсвязывающий домен, который специфически распознает и связывает PD-L1.

Лиганд запрограммированной смерти клетки 1 (PD-L1, кластер дифференцировки 274, CD274, B7-гомолог 1 или B7-H1) принадлежит к суперсемейству белков B7 и представляет собой лиганд белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1, PDCD1, кластер дифференцировки 279 или CD279). PD-L1 может также взаимодействовать с B7.1 (CD80), и считается, что такое взаимодействие ингибирует праймирование Т-клеток. Ось PD-L1/PD-1 играет большую роль в подавлении адаптивного иммунного ответа. Более конкретно, считается, что взаимодействие PD-L1 с его рецептором PD-1 доставляет сигнал, который ингибирует активацию и пролиферацию Т-клеток. Агенты, которые связываются с PD-L1 и препятствуют связыванию лиганда с рецептором PD-1, предотвращают эту иммуносупрессию и, следовательно, могут, при желании, усиливать иммунный ответ, например, для лечения рака или инфекций. Путь PD-L1/PD-1 также способствует предотвращению аутоиммунитета, и поэтому агонистические агенты против PD-L1 или агенты, доставляющие подавляющие иммунитет полезные нагрузки, могут помочь в лечении аутоиммунных нарушений.

Несколько антител, нацеленных на PD-L1, были разработаны для лечения рака,

включая атезолизумаб (TECENTRIQ™), дурвалумаб (IMFINZI™) и авелумаб (BAVENCIO™). Тем не менее, по-прежнему существует потребность в новых связывающих PD-L1 агентах, включая агенты, которые связывают PD-L1 с высоким сродством и эффективно предотвращают передачу сигналов PD-L1/PD-1, и агенты, которые могут доставлять терапевтические полезные нагрузки к PD-L1 экспрессирующим клеткам. Кроме того, существует потребность в новых агентах, связывающих PD-L1, для лечения аутоиммунных заболеваний и инфекций.

Предложен способ доставки полезной нагрузки производного аминокензазепина в клетку, экспрессирующую PD-L1, включающий введение в клетку или млекопитающее, содержащее клетку, иммуноконъюгата, содержащего антитело против PD-L1, ковалентно присоединенное к линкеру, который ковалентно присоединен к одному или более фрагментам аминокензазепина.

Также предложен способ усиления, снижения или ингибирования иммунного ответа у млекопитающего и способ лечения заболевания, расстройства или состояния у млекопитающего, которое реагирует на ингибирование PD-L1, причем способы включают введение млекопитающему иммуноконъюгата PD-L1.

В изобретении предложен PD-L1-связывающий агент, содержащий полипептид вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина.

PD-L1-связывающий агент специфически связывает PD-L1. Специфичность связывания агента позволяет нацеливаться на клетки, экспрессирующие PD-L1, например, для доставки терапевтических нагрузок к таким клеткам.

В некоторых вариантах осуществления PD-L1-связывающий агент (тип А или тип В), связывается с человеческим PD-L1, например, с белком, содержащим SEQ ID NO: 307. Однако связывающие агенты, которые связываются с любым гомологом или паралогом PD-L1, также охватываются. В некоторых вариантах осуществления белок PD-L1 имеет по меньшей мере около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 307. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент связывает PD-L1 человека и PD-L1 яванского макака; или PD-L1 человека, яванского макака и мыши.

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALI
VYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKQDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVY
RCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSD
HQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPPLA
HPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
SEQ ID NO: 307

В некоторых вариантах осуществления PD-L1-связывающий агент связывает PD-L1 без существенного ингибирования или предотвращения связывания PD-L1 с его рецептором PD-1. Однако в других вариантах осуществления PD-L1-связывающий агент

может полностью или частично блокировать (ингибировать или предотвращать) связывание PD-L1 с его рецептором, PD-1, так что антитело можно использовать для ингибирования PD-L1/PD-1 сигнального пути (например, в терапевтических целях).

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть моноспецифичным в отношении PD-L1 или может быть биспецифическим или мультиспецифическим. Например, в бивалентных или мультивалентных антителах или фрагментах антител связывающие домены могут быть разными, нацеленными на разные эпитопы одного и того же антигена или на разные антигены. Способы конструирования мультивалентных связывающих конструкций известны в данной области. Биспецифические и мультиспецифические антитела известны в данной области. Кроме того, может быть предложено диатело, триатело или тетратело, которое представляет собой димер, тример или тетрамер полипептидных цепей, каждая из которых содержит V_H , соединенную с V_L пептидным линкером, который слишком короткий для образования пары между V_H и V_L на одной и той же полипептидной цепи, тем самым управляя спариванием между комплементарными доменами на разных полипептидных цепях V_H - V_L с образованием мультимерной молекулы, имеющей два, три или четыре функциональных антигенсвязывающих сайта. Также могут быть созданы бис-фрагменты scFv, которые представляют собой небольшие фрагменты scFv с двумя различными переменными доменами для получения биспецифических фрагментов bis-scFv, способных связывать два различных эпитопа. Димеры Fab (Fab2) и тримеры Fab (Fab3) могут быть получены с использованием методов генной инженерии для создания мультиспецифических конструкций на основе фрагментов Fab.

PD-L1-связывающий агент также может быть конъюгатом антитела. При этом PD-L1-связывающий агент, может быть конъюгатом (1) антитела, альтернативного каркаса или его фрагментов и (2) белкового или небелкового фрагмента. Например, PD-L1-связывающий агент может быть конъюгирован с пептидом, флуоресцентной молекулой, химиотерапевтической или другой цитотоксической полезной нагрузкой, иммуноактивирующим или иммуносупрессивным агентом.

PD-L1-связывающий агент может быть или может быть получен из человеческого антитела, нечеловеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела или соответствующих фрагментов антитела. «Химерное» антитело представляет собой антитело или его фрагмент, обычно содержащие человеческие константные области и нечеловеческие переменные области. «Гуманизированное» антитело представляет собой моноклональное антитело, обычно содержащее каркас человеческого антитела, но с аминокислотами или последовательностями не человеческого происхождения по меньшей мере в одной CDR (например, 1, 2, 3, 4, 5 или всех шести CDR).

PD-L1-связывающие агенты - Тип А

В данном документе представлены PD-L1-связывающие агенты, включающие полипептид переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид переменной области легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах

осуществления изобретения PD-L1-связывающие агенты (тип А) включают переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 223-264 или, по меньшей мере их CDR; и переменную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 265-306 или, по меньшей мере их CDR. В других вариантах осуществления PD-L1-связывающие агенты (Тип А), содержат полипептид переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO: 223-264, и полипептид переменной области легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO: 265-306. В других вариантах осуществления PD-L1-связывающий агент (тип А), полипептид переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина содержит определяющую комплементарность область 1 (HCDR1), содержащую любую из SEQ ID NO: 1-23, определяющую комплементарность область 2 (HCDR2), содержащую любую из SEQ ID NO: 24-57, и определяющую комплементарность область 3 (HCDR3), содержащую любую из SEQ ID NO: 58-95; и/или полипептид переменной области легкой цепи иммуноглобулина включает определяющую комплементарность область 1 (LCDR1), содержащую любую из SEQ ID NO: 96-128, определяющую комплементарность область 2 (LCDR2), содержащую любую из SEQ ID NO: 129-151 и определяющую комплементарность область 3 (LCDR3), содержащую любую из SEQ ID NO: 152-155. Также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие PD-L1-связывающие агенты или их отдельные тяжелые и легкие цепи; векторы и клетки, содержащие нуклеиновые кислоты; и композиции, содержащие связывающие агенты или нуклеиновые кислоты.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления PD-L1-связывающие агенты (Тип А), представленные в данном документе, вызывают клеточную интернализацию PD-L1 или комплекса PD-L1/PD-L1-связывающий агент после связывания с PD-L1 на поверхности клетки. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, считается, что PD-L1-связывающие агенты согласно данному варианту осуществления вызывают интернализацию PD-L1 при связывании и остаются связанными с PD-L1 во время интернализации, что приводит к интернализации связывающего агента вместе с PD-L1. Клеточная интернализация PD-L1 и связанного PD-L1-связывающего агента может быть определена любым подходящим методом, таким как анализ на персистенцию на поверхности клетки и/или обнаружение интернализированных антител. В некоторых вариантах осуществления PD-L1-связывающий агент интернализируется достаточно сильно, так, что по меньшей мере около 25% (например, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 75% или по меньшей мере около 90%) PD-L1-связывающего агента, который связывает PD-L1 на поверхности клетки, интернализуется (например, при использовании анализа поверхностной персистенции около 75% или менее, около 65% или менее, около 50% или менее, около 25% или менее или около 10% или менее молекул PD-L1-связывающего агента, связанных с PD-L1 на поверхности клетки в начале анализа, остаются связанными

в конце анализа).

В одном из вариантов осуществления PD-L1-связывающий агент (тип А) включает переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 223-264, последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99% идентична SEQ ID NO: 223-264 или по меньшей мере их CDR; и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 265-306, последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99% идентична SEQ ID NO: 265-306 или по меньшей мере их CDR.

В качестве дополнительного примера PD-L1-связывающий агент (Тип А) может включать:

(1) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 223 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 265 или по меньшей мере ее CDR;

(2) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 224 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 266 или по меньшей мере ее CDR;

(3) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 225 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 267 или по меньшей мере ее CDR;

(4) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 226 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 268 или по меньшей мере ее CDR;

(5) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 227 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 269 или по меньшей мере ее CDR;

(6) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 228 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 270 или по меньшей мере ее CDR;

(7) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 229 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 271 или по меньшей мере ее CDR;

(8) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 230 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 272 или по меньшей мере ее CDR;

NO: 299 или по меньшей мере ее CDR;

(36) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 258 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 300 или по меньшей мере ее CDR;

(37) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 259 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 301 или по меньшей мере ее CDR;

(38) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 260 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 302 или по меньшей мере ее CDR;

(39) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 261 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 303 или по меньшей мере ее CDR;

(40) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 262 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 304 или по меньшей мере ее CDR;

(41) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 263 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 305 или по меньшей мере ее CDR;

(42) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 164 или по меньшей мере их CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 306 или по меньшей мере их CDR; и/или

(43) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, представленную на фиг. 4A-D и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина, представленную на фиг. 4E-G или по меньшей мере их CDR.

CDR данной последовательности тяжелой или легкой цепи Ig можно определить в соответствии с любой из различных известных схем нумерации Ig (например, Kabat, Chothia, Martin (Enhanced Chothia), IGMT, AbM). В некоторых вариантах осуществления PD-L1-связывающий агент(тип A), содержит одну или более из следующих CDR:

HCDR1, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 1-23 или последовательности, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 1-23;

HCDR2, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 24-57 или последовательности, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%,

идентична SEQ ID NO: 24-57; и

HCDR3, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 58-95 или последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 58-95; и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит

LCDR1, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 96-128 или последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 96-128;

LCDR2, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 129-151 или последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 129-151; и

LCDR3, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 152-155 или последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 152-155.

В конкретных вариантах осуществления связывающий агент (Тип А) содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид легкой цепи иммуноглобулина, где:

(1) полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина включает HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 24, и HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 58; и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина включает LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 96, LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 129, и LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 152;

(2) полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина включает HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2, HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 25, и HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 59; и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина включает LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 97, LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 129, и LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 153;

(43) полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи иммуноглобулина включают любую комбинацию CDR, перечисленных на фигурах 1A-D PD-L1-связывающих агентов 1-42 типа A

В конкретных вариантах осуществления связывающий агент содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид легкой цепи иммуноглобулина, где полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит первую каркасную область, вторую каркасную область, третью каркасную область и/или четвертую каркасную область; и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит первую каркасную область, вторую каркасную область, третью каркасную область и/или четвертую каркасную область; и/или полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит любую комбинацию каркасных областей, перечисленных на фигурах 2A-D и фигурах 3A-D, соответственно.

PD-L1-связывающие агенты - Тип B

В данном документе представлены PD-L1-связывающие агенты (Тип B) содержащие полипептид вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления PD-L1-связывающие агенты (тип B) содержат вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 430-450 или, по меньшей мере их CDR; и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 451-471 или по меньшей мере их CDR. В других вариантах осуществления PD-L1-связывающие агенты содержат полипептид вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO: 430-450, и полипептид вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO: 451-471. В других вариантах осуществления PD-L1-связывающий агент, полипептид вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина содержит определяющую комплементарность область 1 (HCDR1), содержащую любую из SEQ ID NO: 308-321, определяющую комплементарность область 2 (HCDR2), содержащую любую из SEQ ID NO: 322-338, и определяющую комплементарность область 3 (HCDR3), содержащую любую из SEQ ID NO: 339-359; и/или полипептид вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина содержит определяющую комплементарность область 1 (LCDR1), содержащую любую из SEQ ID NO: 360-374, определяющую комплементарность область 2 (LCDR2), содержащую любую из SEQ ID NO: 131 и 375-386 и определяющую комплементарность область 3 (LCDR3), содержащую любую из SEQ ID NO: 387-398. Также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие PD-L1-связывающие агенты или их отдельные тяжелые и легкие цепи; векторы и клетки, содержащие нуклеиновые кислоты; и композиции, содержащие связывающие агенты или нуклеиновые кислоты.

В одном из вариантов осуществления PD-L1-связывающий агент (тип B) включает вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 430-450,

последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99% идентична SEQ ID NO: 430-450 или по меньшей мере их CDR; и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 451-471, последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99% идентична SEQ ID NO: 451-471 или по меньшей мере их CDR.

В качестве дополнительного примера PD-L1-связывающий агент (тип B) может включать:

(1) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 429 или по меньшей мере ее CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 450 или по меньшей мере ее CDR;

(2) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 430 или по меньшей мере ее CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 451 или по меньшей мере ее CDR;

(3) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 431 или по меньшей мере ее CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 452 или по меньшей мере ее CDR;

(4) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 432 или по меньшей мере ее CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 453 или по меньшей мере ее CDR;

(5) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 433 или по меньшей мере ее CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 454 или по меньшей мере ее CDR;

(6) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 434 или по меньшей мере ее CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 455 или по меньшей мере ее CDR;

(7) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 435 или по меньшей мере ее CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 456 или по меньшей мере ее CDR;

(8) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 436 или по меньшей мере ее CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 457 или по меньшей мере ее CDR;

(9) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 437 или по меньшей мере ее CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 458 или по меньшей мере ее CDR;

(10) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 438 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 459 или по меньшей мере ее CDR;

(11) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 439 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 460 или по меньшей мере ее CDR;

(12) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 440 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 461 или по меньшей мере ее CDR;

(13) варибельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 441 или по меньшей мере ее CDR и/или варибельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 462 или по меньшей мере ее CDR;

(14) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 442 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 463 или по меньшей мере ее CDR;

(15) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 443 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 464 или по меньшей мере ее CDR;

(16) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 444 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 465 или по меньшей мере ее CDR;

(17) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 445 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 466 или по меньшей мере ее CDR;

(18) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 446 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 467 или по меньшей мере ее CDR;

(19) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 447 или по меньшей мере ее CDR и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 468 или по меньшей мере ее CDR;

(20) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 448 или по меньшей мере их CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 469 или по меньшей мере их CDR; и/или

(21) вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 449 или по меньшей мере их CDR и/или вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 470 или по меньшей мере их CDR; и/или

(22) переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, представленную на фигурах 8А-В и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина, представленную на фигурах 8С-Д или по меньшей мере их CDR.

CDR данной последовательности тяжелой или легкой цепи Ig можно определить в

соответствии с любой из различных известных схем нумерации Ig (например, Kabat, Chothia, Martin (Enhanced Chothia), IGMT, AbM). В некоторых вариантах осуществления PD-L1-связывающий агент включает одну или более из следующих CDR:

HCDR1, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 308-321 или последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94% , по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 308-321;

HCDR2, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 322-338 или последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94% , по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 322-338; и

HCDR3, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 339-359 или последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94% , по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 339-359; и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит

LCDR1, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 360-374 или последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94% , по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 360-374;

LCDR2, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 375-386 или последовательность, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94% , по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 375-386; и

LCDR3, содержащую или состоящую из любой из SEQ ID NO: 387-398 или последовательности, которая по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 91%, по меньшей мере на около 92%, по меньшей мере на около 93%, по меньшей мере на около 94% , по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99%, идентична SEQ ID NO: 387-398.

373, LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 379, и LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 398;

(21) полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина включает HCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 321, HCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 338, и HCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 359; и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина включает LCDR1, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 374, LCDR2, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 379, и LCDR3, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 389; и/или

(22) полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи иммуноглобулина включают любую комбинацию CDR, перечисленных на фигурах 5A-B (тип B).

В конкретных вариантах осуществления связывающий агент содержит полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид легкой цепи иммуноглобулина, где полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина содержит первую каркасную область, вторую каркасную область, третью каркасную область и/или четвертую каркасную область; и/или полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержит первую каркасную область, вторую каркасную область, третью каркасную область и/или четвертую каркасную область; и/или полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи иммуноглобулина содержат любую комбинацию каркасных областей, перечисленных на фигурах 6A-B и/или фигурах 7A-B (Type B), соответственно.

В иллюстративном варианте осуществления иммуноконъюгаты по изобретению содержат конструкцию антитела, которая включает антигенсвязывающий домен, который специфически распознает и связывает HER2.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгаты по изобретению содержат антитела против HER2. В одном из вариантов осуществления антитело против HER2 иммуноконъюгата по изобретению включает гуманизированное антитело против HER2, например, huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 и huMAb4D5-8, как описано в Таблице 3 патента США 5821337, который специально включен в данный документ в качестве ссылки. Эти антитела содержат человеческие каркасные области с определяющими комплементарность областями мышиного антитела (4D5), которое связывается с HER2. Гуманизированное антитело huMAb4D5-8, также называемое трастузумабом, коммерчески доступно под торговой маркой HERCEPTIN™ (Genentech, Inc.).

Трастузумаб (CAS 180288-69-1, HERCEPTIN®, huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Genentech) представляет собой рекомбинантное ДНК-производное моноклональное антитело IgG1 каппа, которое представляет собой гуманизированную версию мышиного антитела против HER2 (4D5), которое избирательно связывается с высокой аффинностью с внеклеточным доменом HER2 в клеточном анализе ($K_d=5$ нМ) (US 5677171; US 5821337; US 6054297; US 6165464; US 6339142; US 6407213; US 6639055; US 6719971; US 6800738; US 7074404; Coussens et al (1985) Science 230:1132-9; Slamon и др. (1989) Science 244:707-12; Slamon и др. (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792).

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела или антигенсвязывающий домен содержит CDR области трастузумаба. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против HER2 дополнительно содержит каркасные области трастузумаба. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против HER2 дополнительно содержит одну или обе переменные области трастузумаба.

В другом варианте осуществления изобретения антитело против HER2 иммуноконъюгата по изобретению включает гуманизированное антитело против HER2, например, гуманизированное антитело 2C4, как описано в US 7862817. Примером гуманизированного антитела 2C4 является пертузумаб (CAS Reg. No. 380610-27-5), PERJETA™ (Genentech, Inc.). Пертузумаб является ингибитором димеризации HER (HDI) и подавляет способность HER2 образовывать активные гетеродимеры или гомодимеры с другими рецепторами HER (такими как EGFR/HER1, HER2, HER3 и HER4). См, например, Harari and Yarden, *Oncogene* 19:6102-14 (2000); Yarden and Slwkowski. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-37 (2001); Slwkowski *Nat Struct Biol* 10:158-9 (2003); Cho и др. *Nature* 421:756-60 (2003); и Malik и др. *Pro Am Soc Cancer Res* 44:176-7 (2003). PERJETA™ одобрен для лечения рака молочной железы.

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела или антигенсвязывающий домен содержит области CDR пертузумаба. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против HER2 дополнительно содержит каркасные области пертузумаба. В одном из вариантов осуществления изобретения антитело против HER2 дополнительно содержит одну или обе переменные области пертузумаба.

В иллюстративном варианте осуществления иммуноконъюгаты по изобретению содержат конструкцию антитела, которая включает антигенсвязывающий домен, который специфически распознает и связывает Каприн-1. (Ellis JA, Luzio JP (1995) *J Biol Chem.* 270(35):20717-23; Wang B, и др. (2005) *J Immunol.* 175 (7):4274-82; Solomon S, и др. (2007) *Mol Cell Biol.* 27(6):2324-42). *Каприн-1 также известен как GPIAP1, GPIP137, GRIP137, M11S1, RNG105, p137GPI и белок 1, связанный с клеточным циклом.*

Цитоплазматический белок-1, связанный с активацией/пролиферацией (каприн-1), представляет собой РНК-связывающий белок, который участвует в регуляции генов, связанных с контролем клеточного цикла. Каприн-1 избирательно связывается с мРНК с-Мус и циклина D2, что ускоряет продвижение клеток через фазу G₁ в фазу S, увеличивает жизнеспособность клеток и способствует росту клеток, что указывает на то, что он может играть важную роль в онкогенезе (Wang B, и др. (2005) *J Immunol.* 175: 4274-4282). Каприн-1 действует как монопрепарат или в комбинации с другими РНК-связывающими белками, такими как RasGAP SH3-домен-связывающий белок 1 и белок хрупкой Х-хромосомы. В процессе онкогенеза каприн-1 в первую очередь функционирует путем активации пролиферации клеток и усиления экспрессии белков иммунных контрольных точек. За счет образования стрессовых гранул каприн-1 также участвует в процессе адаптации опухолевых клеток к неблагоприятным условиям, что способствует устойчивости к лучевой и химиотерапии. Учитывая его роль в различных клинических

злокачественных новообразованиях, каприн-1 имеет потенциал для использования в качестве биомаркера и мишени для разработки новых терапевтических средств (Yang, Z-S, и др. (2019) *Oncology Letters* 18: 15-21).

Описаны антитела, нацеленные на каприн-1 для лечения и обнаружения (WO 2011/096519; WO 2013/125654; WO 2013/125636; WO 2013/125640; WO 2013/125630; WO 2013/018889; WO 2013/018891; WO 2013/018883; WO 2013/018892; WO 2014/014082; WO 2014/014086; WO 2015/020212; WO 2018/079740).

В иллюстративном варианте осуществления иммуноконъюгаты по изобретению содержат конструкцию антитела, которая включает антигенсвязывающий домен, который специфически распознает и связывает CEA.

Повышенная экспрессия карциноэмбрионального антигена (CEA, CD66e, CEACAM5) вовлечена в различные биологические аспекты неоплазии, особенно в адгезию опухолевых клеток, метастазирование, блокирование механизмов клеточного иммунитета и выполнение антиапоптозных функций. CEA также используется в качестве маркера крови для многих карцином. Лабетузумаб (CEA-CIDE™, Immunomedics, CAS Reg. No. 219649-07-7), также известный как MN-14 и hMN14, представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1, которое изучается для лечения колоректального рака (Blumenthal, R. et al (2005) *Cancer Immunology Immunotherapy* 54(4):315-327). Лабетузумаб, конъюгированный с аналогом камптотецина (лабетузумаб говитекан, IMMU-130), нацелен на связанную с карциноэмбриональным антигеном клеточную адгезию мол. 5 (CEACAM5) и изучается у пациентов с рецидивом или рефрактерным метастатическим колоректальным раком (Sharkey, R. и др., (2018), *Molecular Cancer Therapeutics* 17(1):196-203; Cardillo, T. и др. (2018) *Molecular Cancer Therapeutics* 17(1):150-160).

В одном из вариантов изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA, или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную легкую цепь (VL каппа) hMN-14/лабетузумаба SEQ ID NO. 472 (US 6676924).

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWTSTRH
TGVPSRFSGSGSGTDFFTISLQPEDATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIK SEQ ID NO.
472

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA, или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или последовательности каркасной области легкой цепи (LFR) hMN-14/лабетузумаба SEQ ID NO. 473-479 (US 6676924).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	1-23	23	473
CDR-L1	KASQDVGTSVA	24-34	11	474
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	35-49	15	475

CDR-L2	WTSTRHT	50-56	7	476
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDAT YYC	57-88	32	477
CDR-L3	QQYSLYRS	89-96	8	478
LFR4	FGQGTKVEIK	97-106	10	479

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит переменную тяжелую цепь (VH) hMN-14/лабетозумаба SEQ ID NO. 480 (US 6676924).

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWVAEHP
DSSTINYAPSLKDRFTISRDNKNTLFLQMDSLRLPEDTG VYFCASLYFGFPWFAYWGQG
TPVTVSS SEQ ID NO. 480

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или последовательности каркасной области тяжелой цепи (HFR) hMN-14/лабетозумаба SEQ ID NO. 481-487 (US 6676924).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGF DFT	1-30	30	481
CDR-H1	TYWMS	31-35	5	482
HFR2	WVRQAPGKGLEWVA	36-49	14	483
CDR-H2	EHPDSSTINYAPSLKD	50-66	17	484
HFR3	RFTISRDNKNTLFLQMDSLRLPEDTG VYFCAS	67-98	32	485
CDR-H3	LYFGFPWFAY	99-108	10	486
HFR4	WGQGSTPVTVSS	109-119	11	487

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит переменную легкую цепь (VL каппа) hPR1A3 SEQ ID NO. 488 (US 8642742).

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASR
KRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIK SEQ ID
NO. 488

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или последовательности каркасной области легкой цепи (LFR) hPR1A3 SEQ ID NO. 489-495 (US 8642742).

Область	Фрагмент последовательности	Остатк и	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	1-23	23	489
CDR-L1	KASAAVGTYYVA	24-34	11	490
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	35-49	15	491
CDR-L2	SASYRKR	50-56	7	492
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFA TYYC	57-88	32	493
CDR-L3	HQYYTYPLFT	89-98	10	494
LFR4	FGQGTKLEIK	99-108	10	495

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или последовательности каркасной области тяжелой цепи (HFR) hPR1A3 SEQ ID NO. 496-502 (US 8642742).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFT	1-30	30	496
CDR-H1	EFGMN	31-35	5	497
HFR2	WVRQAPGQGLEWMG	36-49	14	498
CDR-H2	WINTKTGEATYVEEFKG	50-66	17	499
HFR3	RVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCAR	67-98	32	500
CDR-H3	WDFAYYVEAMDY	99-110	12	501
HFR4	WGQGTTTVTVSS	111-121	11	502

В одном из вариантов изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную легкую цепь (VL каппа) hMFE-23 SEQ ID NO. 503 (US 723288).

ENVLTQSPSSMSASVGDRVNIACSASSSVSYMHWFQQKPGKSPKLWIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDYSLTISMQPEDAATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK SEQ ID NO.
503

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или последовательности каркасной области легкой цепи (LFR) hMFE-23 SEQ ID NO. 504-510 (US 723288).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	ENVLTQSPSSMSASVGDRVNIAC	1-23	23	504
CDR-L1	SASSSVSYM	24-33	10	505
LFR2	WFQQKPGKSPKLWIY	34-48	15	506
CDR-L2	STSNLAS	49-55	7	507
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISSMQPEDA ATYYC	56-87	32	508
CDR-L3	QQRSSYPLT	88-96	9	509
LFR4	FGGGTKLEIK	97-106	10	510

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную тяжелую цепь (VH) hMFE-23 SEQ ID NO. 511 (US 723288).

QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDSYMHWLRQGPGRLEWIGWIDP
ENGDTHEYAPKFQGKATFTTDT SANTAYLGLSSLRPEDTAVYYCNEGTPPTGPYYFDYWG
QGTLVTVSS SEQ ID NO. 511

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или последовательности каркасной области тяжелой цепи (HFR) hMFE-23 SEQ ID NO. 512-518 (US 723288).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASG FNIK	1-30	30	512
CDR-H1	DSYMH	31-35	5	513
HFR2	WLRQGPGRLEWIG	36-49	14	514
CDR-H2	WIDPENGDTHEYAPKFQG	50-66	17	515
HFR3	KATFTTDT SANTAYLGLSSLRPEDTAV YYCNE	67-98	32	516
CDR-H3	GTPTGPYYFDY	99-109	11	517
HFR4	WGQGTLLVTVSS	110-120	11	518

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную легкую цепь (VL каппа) SM3E SEQ ID NO. 519 (US 723288).

ENVLTQSPSSMSVSVGDRVTIACSAASSVPYMHWLQQKPGKSPKLLIYLTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDYSLTISSVQPEDAATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK SEQ ID NO.

519

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или последовательности каркасной области легкой цепи (LFR) SM3E SEQ ID NO. 520-526 (US 723288).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	ENVLTQSPSSMSVSVGDRVTIAC	1-23	23	520
CDR-L1	SASSSVPYMH	24-33	10	521
LFR2	WLQKQPGKSPKLLIY	34-48	15	522
CDR-L2	LTSNLAS	49-55	7	523
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISVQPEDAA TYYC	56-87	32	524
CDR-L3	QQRSSYPLT	88-96	9	525
LFR4	FGGGTKLEIK	97-106	10	526

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную тяжелую цепь (VH) SM3E SEQ ID NO. 527 (US 723288).

QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDSYMHWLRQGPQQRLEWIGWIDP
ENGDTHEYAPKFQGKATFTTDT SANTAYLGLSSLRPEDTAVYYCNEGTPTPGYFDYWG
QGTLVTVSS SEQ ID NO. 527

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или последовательности каркасной области тяжелой цепи (HFR) SM3E SEQ ID NO. 528-534 (US 723288).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASG FNIK	1-30	30	528
CDR-H1	DSYMH	31-35	5	529
HFR2	WLRQGPQQRLEWIG	36-49	14	530
CDR-H2	WIDPENGDTHEYAPKFQG	50-66	17	531
HFR3	KATFTTDT SANTAYLGLSSLRPEDTAV YYCNE	67-98	32	532
CDR-H3	GTPTGPYYFDY	99-109	11	533
HFR4	WGQGTLLVTVSS	110-120	11	534

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или последовательности каркасной области легкой цепи (LFR) NP-4/арцитумомаба SEQ ID NO. 535-541.

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	QTVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	1-23	23	535
CDR-L1	RASSSVTYIH	24-33	10	536
LFR2	WYQQKPGSSPKSWIY	34-48	15	537
CDR-L2	ATSNLAS	49-55	7	538
LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYC	56-87	32	539
CDR-L3	QHWSSKPPT	88-96	9	540
LFR4	FGGGTKLEIK	97-106	10	541

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную тяжелую цепь (VH) NP-4/арцитумомаба SEQ ID NO. 542.

EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDYYMNWVRQPPGKALEWLGFIGN
KANGYTTEYSASVKGRFTISRDKSQSILYLQMNTLRAEDSATYYCTRDRGLRFYFDYW
GQGTTTLTVSS SEQ ID NO. 542.

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или последовательности каркасной области тяжелой цепи (HFR) NP-4 SEQ ID NO. 543-549.

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSG FTFT	1-30	30	543
CDR-H1	DYYMN	31-35	5	544
HFR2	WVRQPPGKALEWLG	36-49	14	545
CDR-H2	FIGNKANGYTTEYSASVKG	50-68	19	546
HFR3	RFTISRDKSQSILYLQMNTLRAEDSAT YYCTR	69-100	32	547
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101-110	10	548
HFR4	WGQGTTTLTVSS	111-121	11	549

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела,

нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит переменную легкую цепь (VL каппа) M5A/hT84.66 SEQ ID NO. 550 (US 7776330).

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGKAPKLLIYRAS
NLESGVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNEPDYTFGQGTKVEIK SEQ ID
NO. 550

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или последовательности каркасной области легкой цепи (LFR) M5A/hT84.66 SEQ ID NO. 551-557 (US 7776330).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	1-23	23	551
CDR-L1	RAGESVDIFGVGFLH	24-38	15	552
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	39-53	15	553
CDR-L2	RASNLES	54-60	7	554
LFR3	GVPSRFSGSGSRTDFTLTISLQPEDFA TYYC	61-92	32	555
CDR-L3	QQTNEPDYT	93-101	9	556
LFR4	FGQGTKVEIK	102-111	10	557

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит переменную тяжелую цепь (VH) M5A/hT84.66 SEQ ID NO. 558 (US 7776330).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIDKTYMHWRQAPGKGLEWVARIDP
ANGNSKYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAY
WGQGTLVTVSS SEQ ID NO. 558

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или последовательности каркасной области тяжелой цепи (HFR) M5A/hT84.66 SEQ ID NO. 559-565 (US 7776330).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FNIDK	1-30	30	559
CDR-H1	DTYMH	31-35	5	560
HFR2	WVRQAPGKGLEWVA	36-49	14	561
CDR-H2	RIDPANGNSKYADSVKG	50-66	17	562
HFR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA	67-98	32	563

	VYYCAP			
CDR-H3	FGYYVSDYAMAY	99-110	12	564
HFR4	WGQGTLVTVSS	111-121	11	565

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную легкую цепь (VL каппа) hAb2-3 SEQ ID NO. 566 (US 9617345).

DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLA
EGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQHNYGTPFTFGSGTKLEIK SEQ ID NO. 566

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или последовательности каркасной области легкой цепи (LFR) hAb2-3 SEQ ID NO. 567-573 (US 9617345).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITC	1-23	23	567
CDR-L1	RASENIFSYLA	24-34	11	568
LFR2	WYQQKPGKSPKLLVY	35-49	15	569
CDR-L2	NTRTLAE	50-56	7	570
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFA TYYC	57-88	32	571
CDR-L3	QHNYGTPFT	89-97	9	572
LFR4	FGSGTKLEIK	98-107	10	573

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную тяжелую цепь (VH) SEQ ID NO. 574 (US 9617345).

EVQLQESGPGGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSG
GGITYAPSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDVAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQ
GTLVTVSS SEQ ID NO. 574

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или последовательности каркасной области тяжелой цепи (HFR) hAb2-3 SEQ ID NO. 575-581.

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLQESGPGGLVKPGGSLSLSCAASGF VFS	1-30	30	575

CDR-H1	SYDMS	31-35	5	576
HFR2	WVRQTPERGLEWVA	36-49	14	577
CDR-H2	YISSGGGITYAPSTVKG	50-66	17	578
HFR3	RFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTA VYYCAA	67-98	32	579
CDR-H3	HYFGSSGPFAY	99-109	11	580
HFR4	WGQGTLVTVSS	110-120	11	581

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную легкую цепь (VL каппа) A240VL-B9VH/AMG-211_SEQ ID NO. 582 (US 9982063).

QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRGINVGAYSIYWYQQKPGSPQYLLRYKSD
SDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHS GASAVFGGGTKLT
VL SEQ ID NO. 582

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или последовательности каркасной области легкой цепи (LFR) A240VL-B9VH/AMG-211 SEQ ID NO. 583-589 (US 9982063).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	QAVLTQPASLSASPGASASLTC	1-22	22	583
CDR-L1	TLRRGINVGAYSIY	23-36	14	584
LFR2	WYQQKPGSPQYLLR	37-51	15	585
CDR-L2	YKSDSDKQQGS	52-62	11	586
LFR3	GVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSE DEADYYC	63-96	34	587
CDR-L3	MIWHS GASAV	97-106	10	588
LFR4	FGGGTKLTVL	107-116	10	589

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную тяжелую цепь (VH) B9VH SEQ ID NO. 590 (US 9982063).

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFIRN
KANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLRFYFDY
WGQGTTTVTVSS SEQ ID NO. 590

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA , или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или последовательности каркасной

области тяжелой цепи (HFR) SEQ ID NO. 591-598 (US 9982063). Вариант осуществления включает два варианта CDR-H2, SEQ ID NO: 594 и SEQ ID NO: 595.

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVS	1-30	30	591
CDR-H1	SYWMH	31-35	5	592
HFR2	WVRQAPGKGGLEWVG	36-49	14	593
CDR-H2	FIRNKANGGTTEYAASVKG	50-68	19	594
CDR-H2	FIRNKANS GTTEYAASVKG	50-68	19	595
HFR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	69-100	32	596
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101-110	10	597
HFR4	WGQGTTTVTVSS	111-121	11	598

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA, или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную тяжелую цепь (VH) E12VH SEQ ID NO. 599 (US 9982063).

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGGLEWVG FILNKANGGTTEYAASVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD RGLRFYFDY WGQGTTTVTVSS SEQ ID NO. 599

В одном из вариантов осуществления изобретения конструкция антитела, нацеленного на CEA, или антигенсвязывающий домен содержит CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или последовательности каркасной области тяжелой цепи (HFR) SEQ ID NO. 600-606 (US 9982063).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVS	1-30	30	600
CDR-H1	SYWMH	31-35	5	601
HFR2	WVRQAPGKGGLEWVG	36-49	14	602
CDR-H2	FILNKANGGTTEYAASVKG	50-68	19	603
HFR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	69-100	32	604
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101-110	10	605
HFR4	WGQGTTTVTVSS	111-121	11	606

В некоторых вариантах осуществления конструкция антитела дополнительно

содержит Fc-домен. В определенных вариантах осуществления конструкция антитела представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления конструкция антитела представляет собой слитый белок. Антигенсвязывающий домен может представлять собой одноцепочечный фрагмент переменной области (scFv). Одноцепочечный фрагмент переменной области (scFv), который представляет собой усеченный Fab-фрагмент, включающий переменный (V) домен тяжелой цепи антитела, связанный с V-доменом легкой цепи антитела через синтетический пептид, может быть получен с использованием обычных способов технологии рекомбинантных ДНК. Аналогичным образом стабилизированные дисульфидом фрагменты переменной области (dsFv) могут быть получены с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Конструкция антитела или антигенсвязывающий домен может содержать одну или более переменных областей (например, две переменные области) антигенсвязывающего домена антитела к PD-L1, антитела к HER2 или антитела к CEA, каждая переменная область содержит CDR1, CDR2 и CDR3.

В некоторых вариантах осуществления антитела в иммуноконъюгатах содержат модифицированную область Fc, причем модификация модулирует связывание области Fc с одним или более рецепторами Fc.

В некоторых вариантах осуществления область Fc модифицирована путем включения рецептора трансформирующего фактора роста бета 1 (TGFβ1) или его фрагмента, который способен связывать TGFβ1. Например, рецептором может быть рецептор II TGFβ (TGFβRII). В некоторых вариантах осуществления рецептор TGFβ представляет собой рецептор TGFβ человека. В некоторых вариантах осуществления IgG имеет C-концевое слияние с внеклеточным доменом TGFβRII (ECD), как описано в US 9676863, включенном в настоящий документ. Для присоединения IgG к внеклеточному домену TGFβRII может использоваться «линкер Fc», например, линкер Fc G₄S₄G (SEQ ID NO: 608). Линкер Fc может быть коротким гибким пептидом, который обеспечивает правильную трехмерную укладку молекулы при сохранении специфичности связывания с мишенями. В некоторых вариантах реализации N-конец рецептора TGFβ слит с Fc конструкции антитела (с линкером Fc или без него). В некоторых вариантах осуществления C-конец тяжелой цепи конструкции антитела слит с рецептором TGFβ (с линкером Fc или без него). В некоторых вариантах осуществления C-концевой остаток лизина тяжелой цепи конструкции антитела мутирован на аланин.

В некоторых вариантах осуществления антитела в иммуноконъюгатах гликозилированы.

В некоторых вариантах осуществления антитела в иммуноконъюгатах представляют собой сконструированные с цистеином антитела, которые обеспечивают сайт-специфическую конъюгацию адъюванта, метки или лекарственного вещества с антителом посредством замен цистеина в тех участках, где сконструированные цистеины доступны для конъюгации, но не нарушают укладку и сборку иммуноглобулина или не изменяют связывание антигена и эффекторных функции (Junutula, и др., 2008b Nature

Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al. (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; US 2012/0121615; WO 2009/052249). «Сконструированное с цистеином антитело» или «вариант сконструированного с цистеином антитела» представляет собой антитело, в котором один или более остатков антитела заменены цистеиновыми остатками. Сконструированные с цистеином антитела могут быть конъюгированы с адъювантным фрагментом аминокбензазепина в виде аминокбензазепин-линкерного соединения с однородной стехиометрией (например, до 2 фрагментов аминокбензазепина на антитело в антителе, которое имеет единственный сайт сконструированного цистеина).

В некоторых вариантах осуществления сконструированные с цистеином антитела, используемые для получения иммуноконъюгатов, указанных в таблице 3, содержат цистеиновый остаток, введенный в 149-лизиновый сайт легкой цепи (LC K149C). В других вариантах осуществления сконструированные с цистеином антитела содержат цистеиновый остаток, введенный в 118-аланиновый сайт (нумерация ЕС) тяжелой цепи (HC A118C). Этот сайт альтернативно пронумерован 121 по Последовательной нумерации или 114 по нумерации Кабата. В других вариантах осуществления сконструированные с цистеином антитела содержат цистеиновый остаток, введенный в легкую цепь в позиции G64C или R142C в соответствии с нумерацией Кабата или в тяжелую цепь в позиции D101C, V184C или T205C в соответствии с нумерацией Кабата.

АМИНОБЕНЗАЗЕПИНОВЫЕ АДЬЮВАНТНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

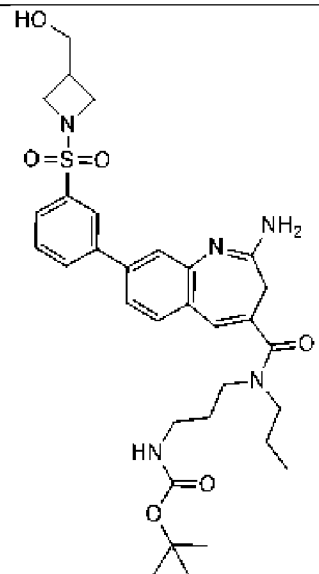
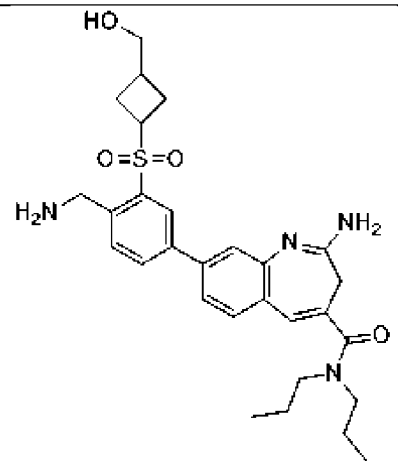
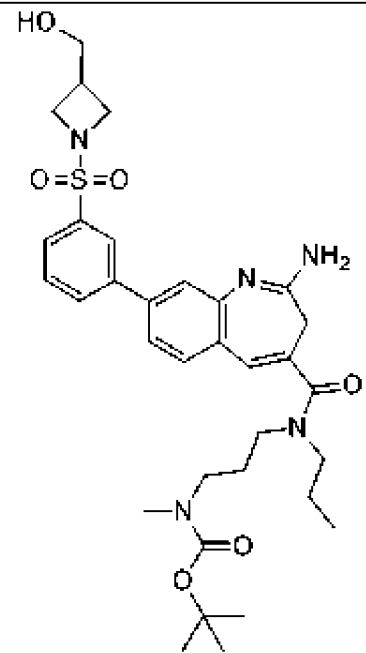
Имуноконъюгат по изобретению содержит аминокбензазепиновый адъювантный фрагмент. Описанный в данном документе адъювантный фрагмент представляет собой соединение, которое вызывает иммунный ответ (т.е. иммуностимулирующее средство). Как правило, описанный в данном документе адъювантный фрагмент представляет собой агонист TLR. TLR представляют собой трансмембранные белки типа I, которые отвечают за инициирование врожденных иммунных ответов у позвоночных. TLR распознают множество ассоциированных с патогенами молекулярных паттернов бактерий, вирусов и грибов и действуют как первая линия защиты от вторжения патогенов. TLR вызывают перекрывающиеся, и в то же время различные биологические ответы из-за различий в клеточной экспрессии и в сигнальных путях, которые они иницируют. Будучи вовлеченными (например, естественным стимулом или синтетическим агонистом TLR), TLR иницируют каскад передачи сигнала, ведущий к активации ядерного фактора-κB (NF-κB) через ген 88 первичного ответа миелоидной дифференцировки адаптивного белка (MyD88) и рекрутирование киназы, связанной с рецептором IL-1 (IRAK). Затем фосфорилирование IRAK приводит к привлечению фактора 6, ассоциированного с TNF-рецептором (TRAF6), что приводит к фосфорилированию ингибитора NF-κB I-κB. В результате NF-κB проникает в ядро клетки и иницирует транскрипцию генов, промоторы которых содержат сайты связывания NF-κB, такие как цитокины. Дополнительные способы регуляции передачи сигналов TLR включают в себя TIR-домен-содержащий адаптер-индуцирующий интерферон-β (TRIF)-зависимую индукцию фактора 6, связанного с рецептором TNF (TRAF6), и активацию независимых путей MyD88 через TRIF и TRAF3,

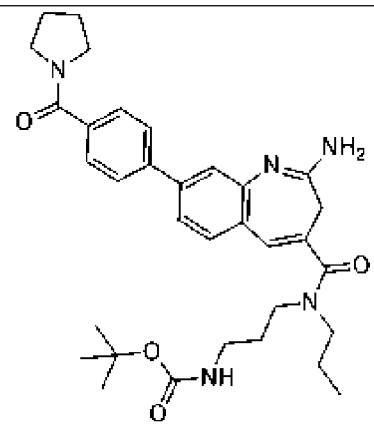
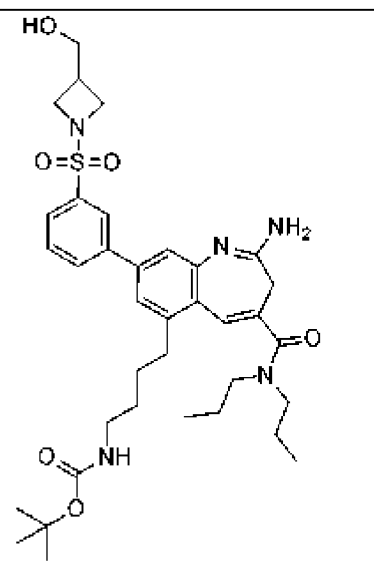
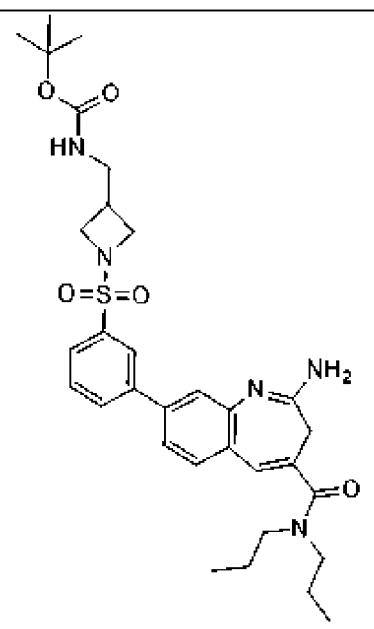
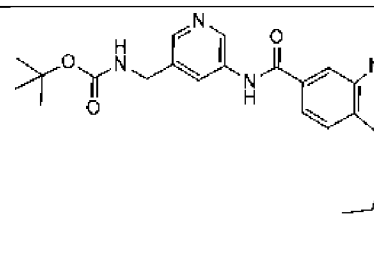
что приводит к фосфорилированию третьего фактора ответа на интерферон (IRF3). Аналогично MyD88-зависимый путь также активирует несколько членов семейства IRF, включая IRF5 и IRF7, тогда как TRIF-зависимый путь также активирует путь NF-κB.

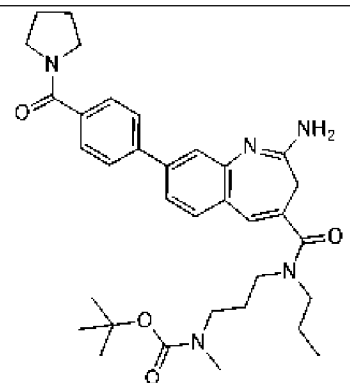
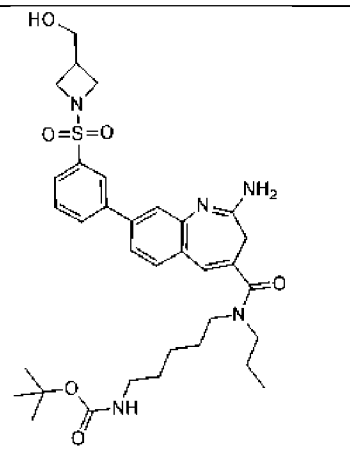
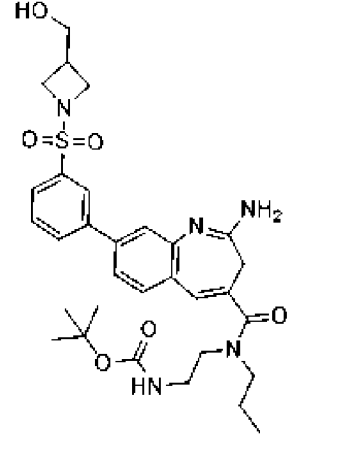
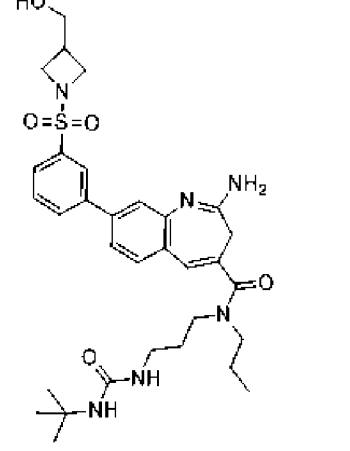
Как правило, описанный в данном документе адъювантный фрагмент представляет собой агонист TLR7 и/или TLR8. TLR7 и TLR8 оба экспрессируются в клетках миелоидного происхождения (например, в моноцитах и дендритных клетках). У человека TLR7 также экспрессируется в плазмоцитоидных дендритных клетках (pDC) и В-клетках. TLR8 экспрессируется в основном в клетках миелоидного происхождения, то есть моноцитах, гранулоцитах и миелоидных дендритных клетках. TLR7 и TLR8 способны обнаруживать присутствие «чужеродной» одноцепочечной РНК в клетке как средство ответа на вирусную инвазию. Обработка TLR8-экспрессирующих клеток агонистами TLR8 может привести к выработке высоких уровней IL-12, IFN-γ, IL-1, TNF-α, IL-6 и других воспалительных цитокинов. Аналогично, стимуляция TLR7-экспрессирующих клеток, таких как pDC, агонистами TLR7 может привести к выработке высоких уровней IFN-α и других воспалительных цитокинов. Включение TLR7/TLR8 и результирующая выработка цитокинов могут активировать дендритные клетки и другие антигенпрезентирующие клетки, управляя различными механизмами врожденного и приобретенного иммунного ответа, ведущими к разрушению опухоли.

Иллюстративные соединения аминокбензазепина (Bz) по изобретению показаны в таблицах 1a, 1b и 1c. Каждое соединение было синтезировано и очищено способами, описанными в примерах, приведенных в данном документе, охарактеризовано масс-спектрометрией и показано, что оно имеет указанную массу. Активность против репортерных клеток HEK293 NFκB, экспрессирующих человеческий TLR7 или человеческий TLR8, измеряли в соответствии с примером 68. Соединения аминокбензазепина из таблиц 1a, 1b и 1c демонстрируют удивительное и неожиданное свойство избирательности агонистов TLR8, которое может предсказывать полезную терапевтическую активность для лечения рака и другие расстройства.

Таблица 1a: Соединения аминокбензазепина (Bz)

Bz №	Структура	Молекулярная масса	HEK293 hTLR7 EC50 (нМ)	HEK293 hTLR8 EC50 (нМ)
Bz-1		625,8	571	106
Bz-2		538,7	> 9000	9760
Bz-3		639,8	545,2	4306

Bz-4		573,7	1484	1681
Bz-5		681,9	155,2	255,5
Bz-6		609,8	> 9000	264,7
Bz-7		534,7	> 9000	4,283

Bz-8		587,8	3367	> 9000
Bz-9		653,8	8647	629,1
Bz-10		611,8	> 9000	> 9000
Bz-11		624,8	7843	1387

Bz-12		669,8	2487	2375
Bz-13		597,7	1371	134
Bz-14		581,8	> 9000	1700

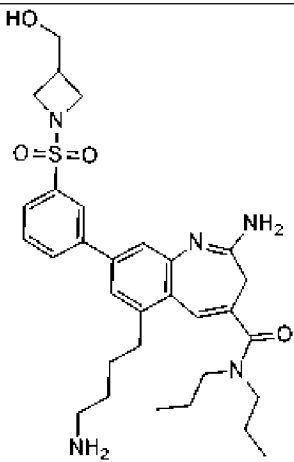
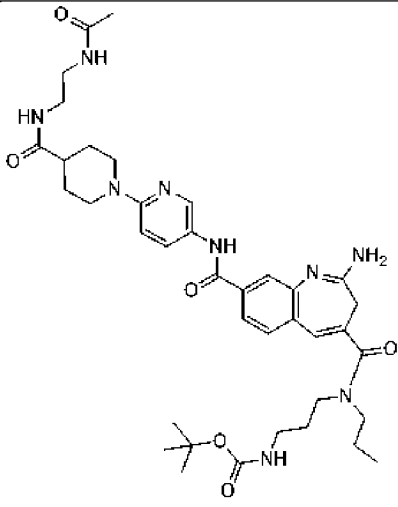
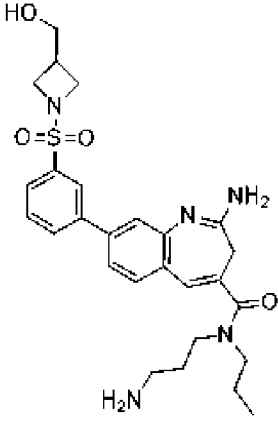
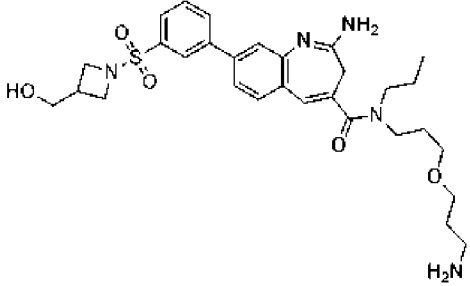
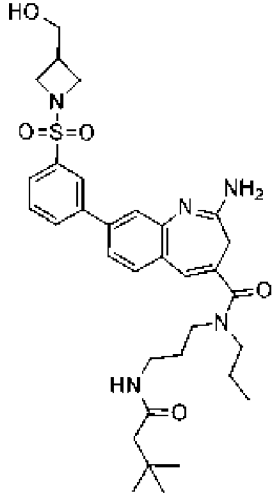
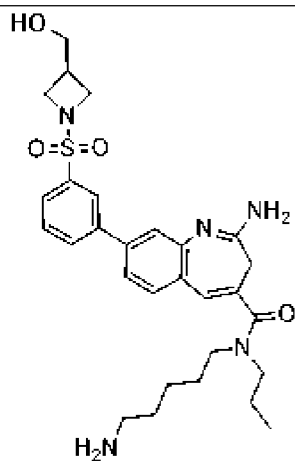
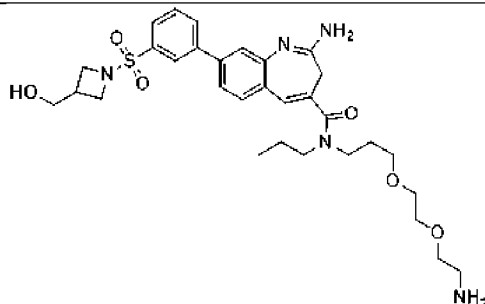
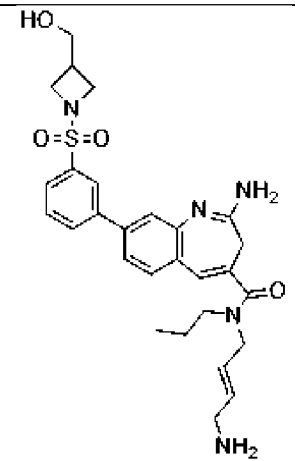
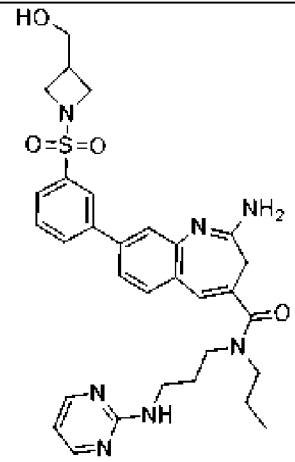
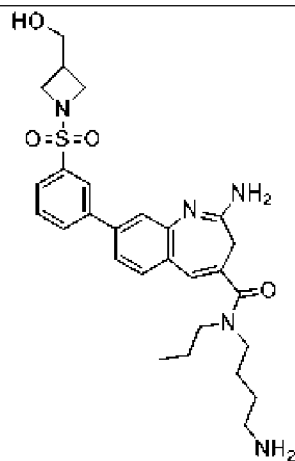
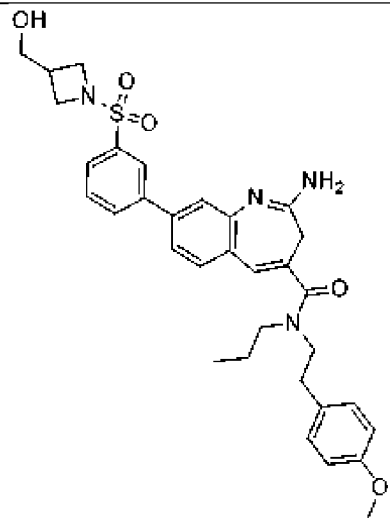
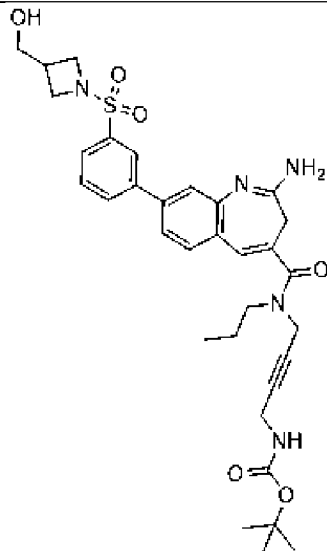
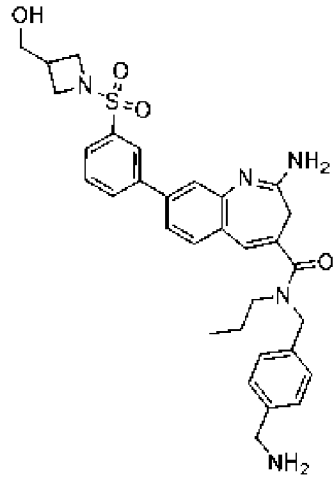
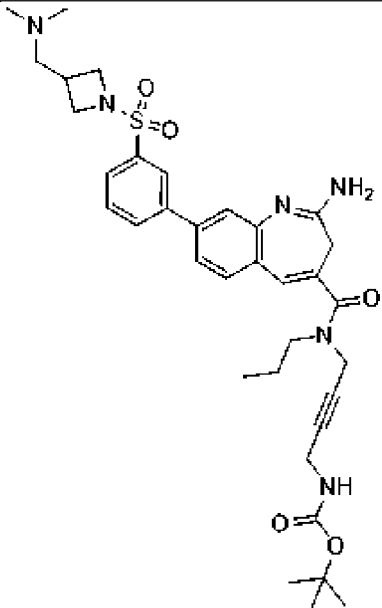
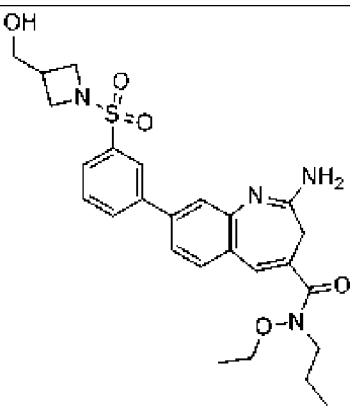
Bz-15		509,7	> 9000	103
Bz-16		731,9	> 9000	1047

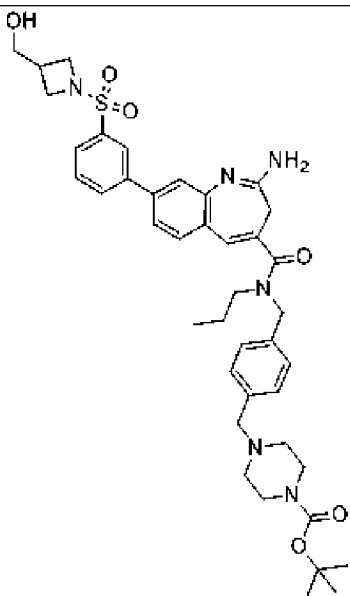
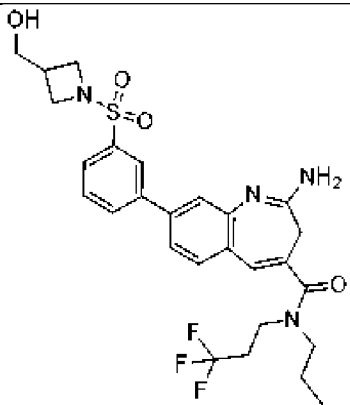
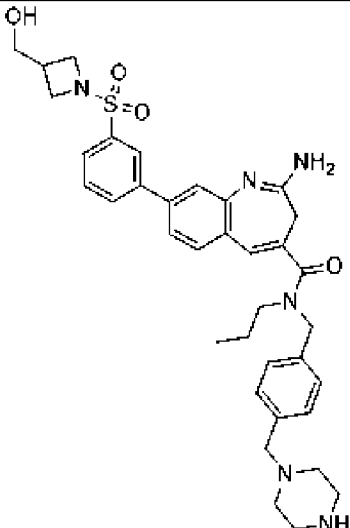
Таблица 1b: Соединения аминобензазепина (Bz)

Bz №	Структура	Молекулярная масса	HEK293 hTLR7 EC50 (нМ)	HEK293 hTLR8 EC50 (нМ)
Bz-17		525,7	> 9000	> 9000
Bz-18		583,7	1994	3403
Bz-19		623,8	1067	3168

Bz-20		553,7	> 9000	> 9000
Bz-21		613,8	> 9000	> 9000
Bz-22		537,7	> 9000	> 9000
Bz-23		603,7	2427	1162

Bz-24		539,7	> 9000	> 9000
Bz-25		602,8	> 9000	1403
Bz-26		635,8	> 9000	318

Bz-27		587,7	> 9000	138
Bz-28		662,9	4253,9	42,8
Bz-29		512,6	> 9000	32

Bz-30		757,0	> 9000	1022,3
Bz-31		564,6	> 9000	341
Bz-32		656,8	> 9000	> 9000

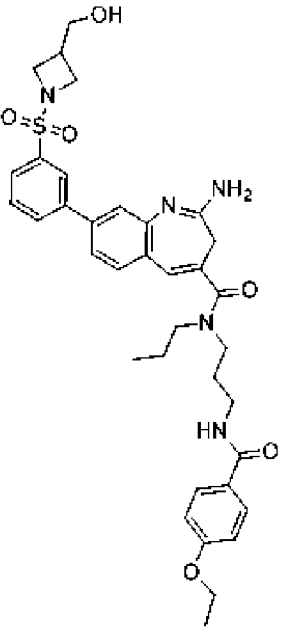
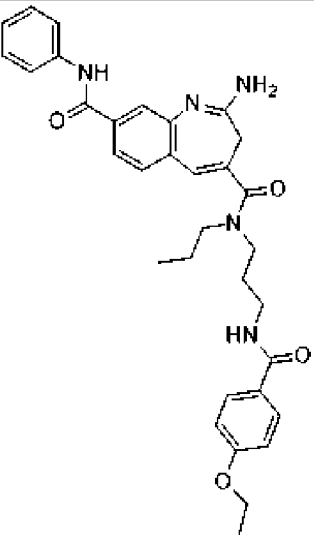
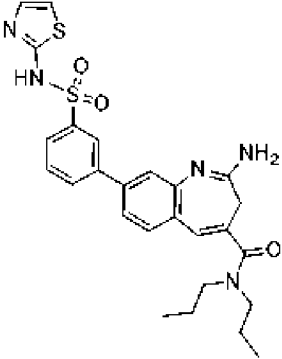
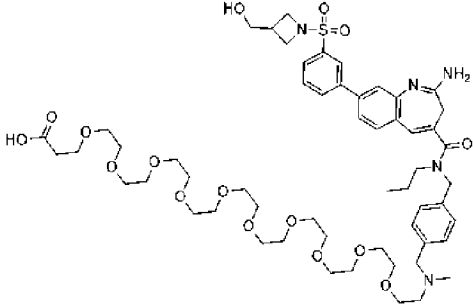
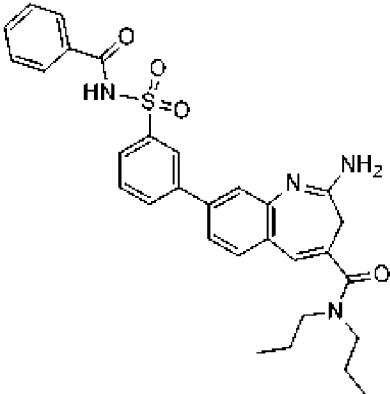
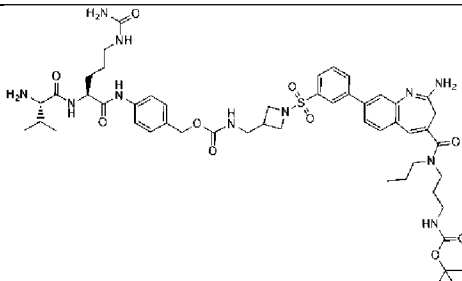
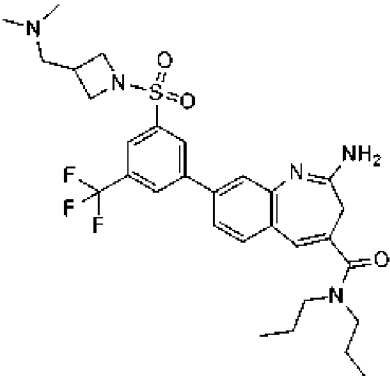
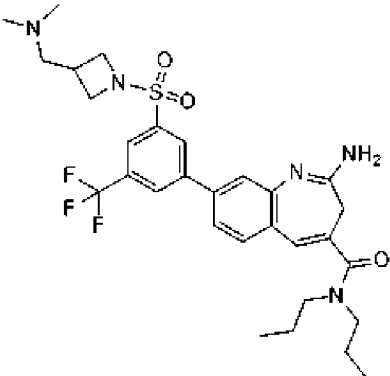
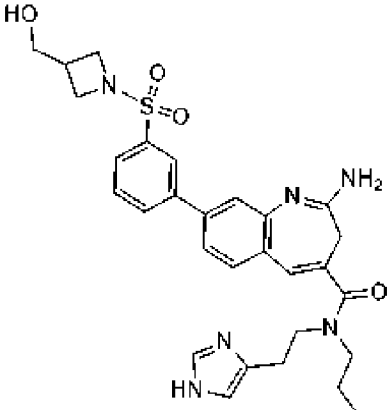
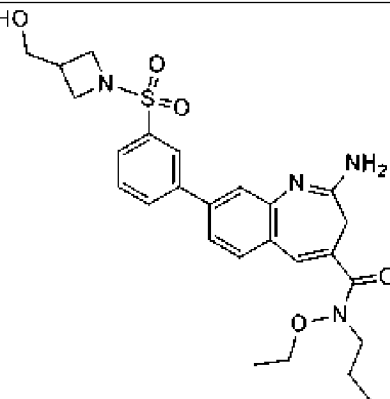
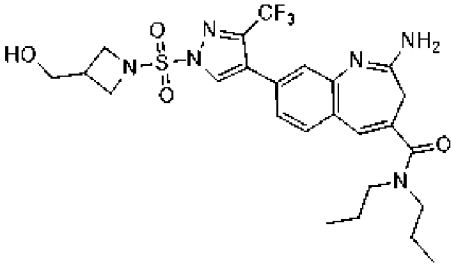
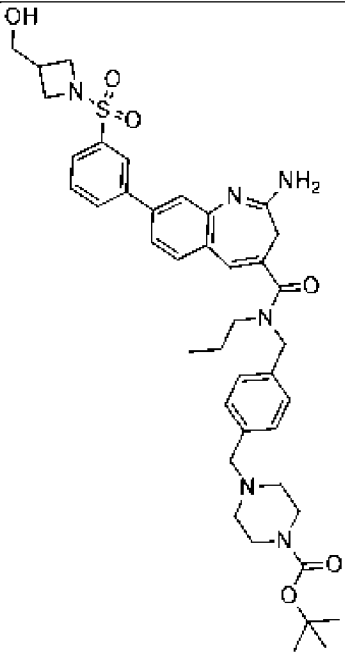
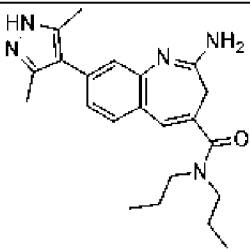
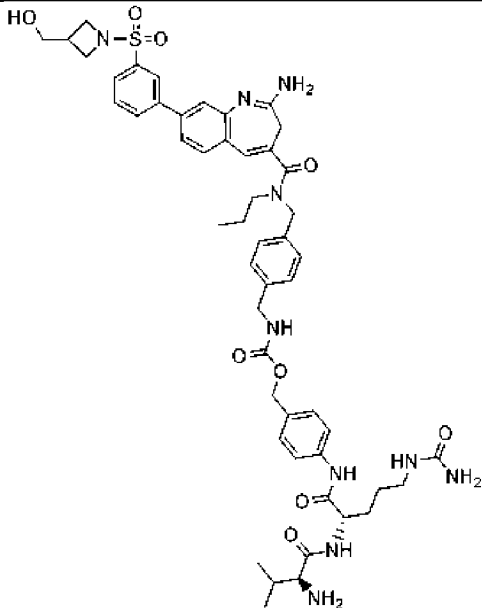
Bz-33		673,8	1428	1919
Bz-34		567,7	> 9000	1040

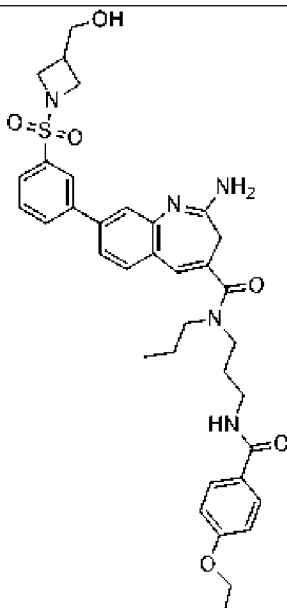
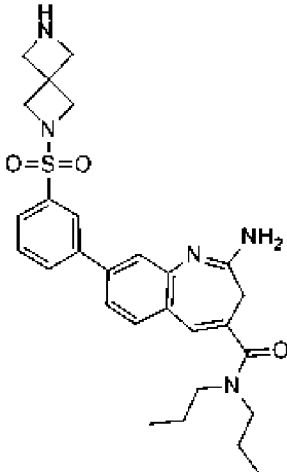
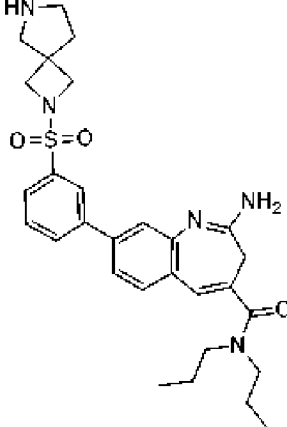
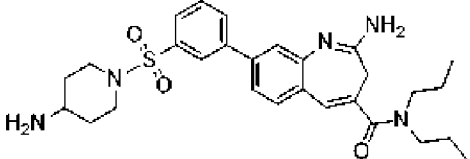
Таблица 1с: Соединения аминобензазепина (Bz)

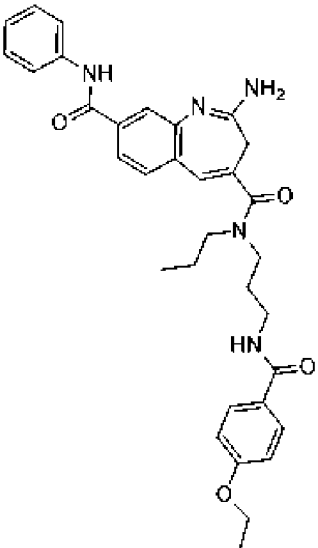
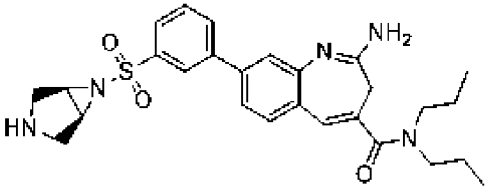
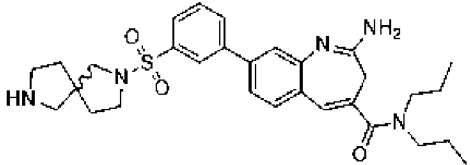
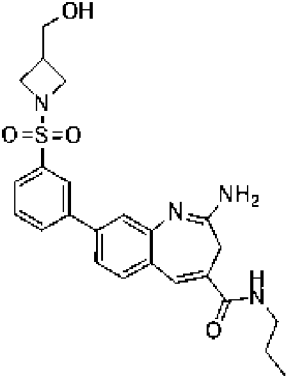
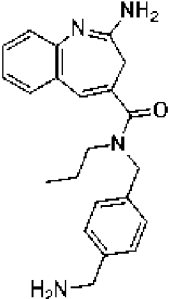
Bz №	Структура	Молекулярная масса	HEK293 hTLR7 EC50 (нМ)	HEK293 hTLR8 EC50 (нМ)
Bz-35		523,7	9000	9000
Bz-36		1114,4	H/O	H/O
Bz-37		544,7	9000	9000
Bz-38		1030,2	H/O	H/O

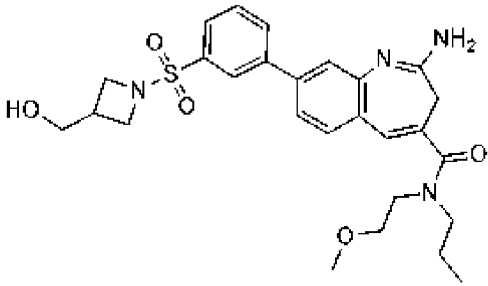
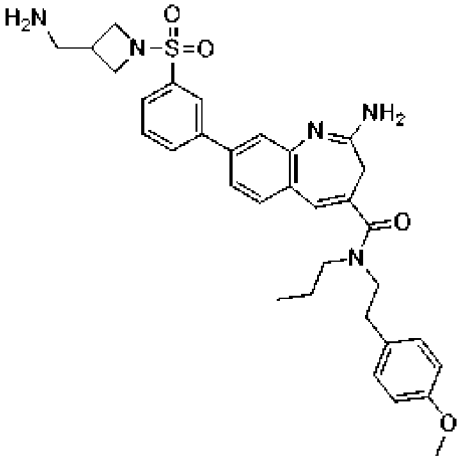
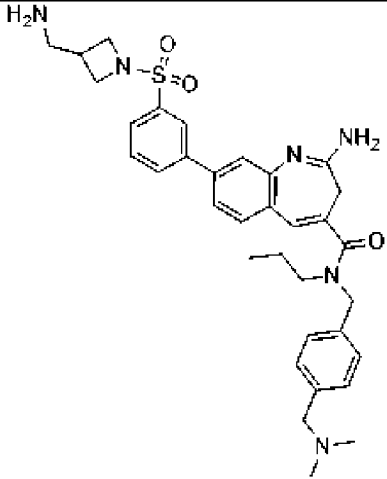
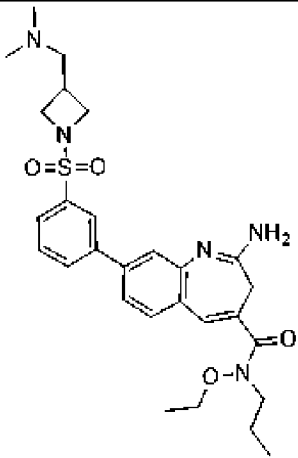
Bz-39		605,7	42	728
Bz-40		509,8	332	9000
Bz-41		562,7	9000	9000
Bz-42		512,6	9000	49

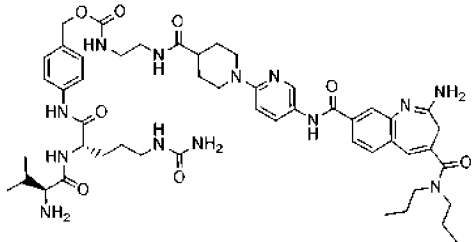
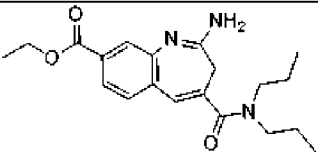
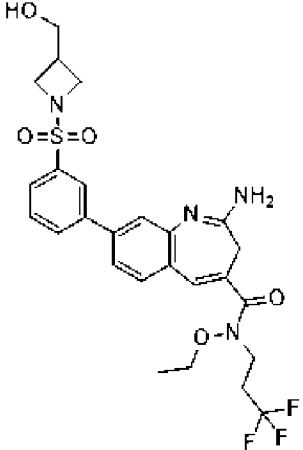
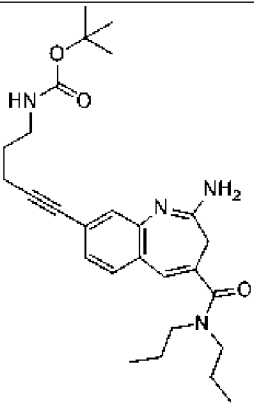
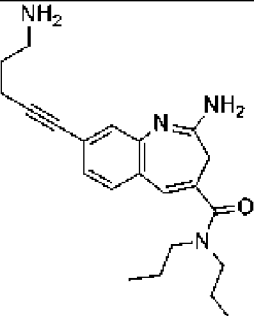
Bz-43		568,6	9000	7005
Bz-44		757,0	9000	1022
Bz-45		379,5	9000	345
Bz-46		993,2	H/O	H/O

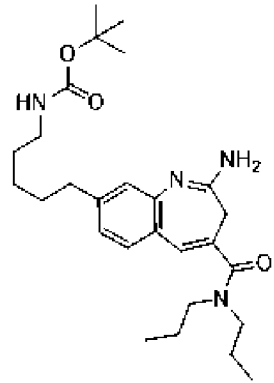
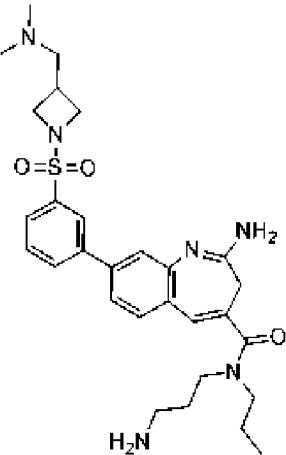
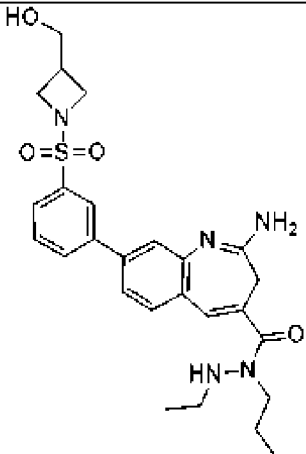
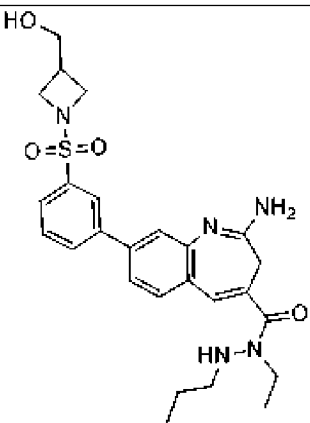
Bz-47		564,6	9000	341
Bz-48		528,7	H/O	499
Bz-49		656,8	9000	9000
Bz-50		482,6	H/O	9000

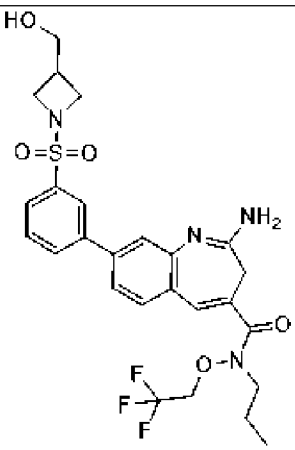
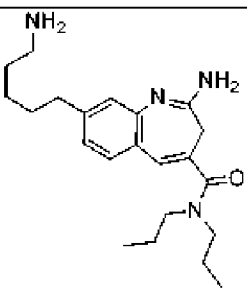
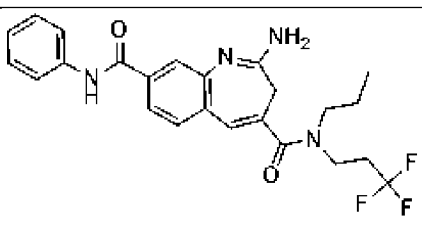
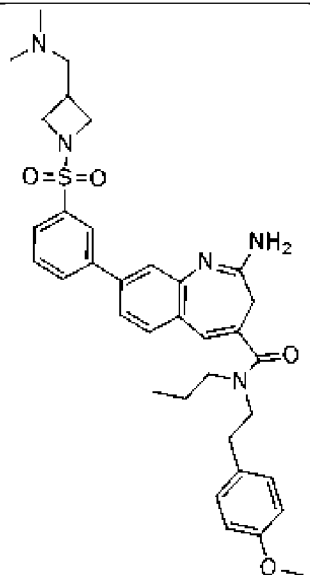
Bz-51		673,8	1428	1919
Bz-52		521,7	H/O	1320
Bz-53		535,7	H/O	249
Bz-54		523,7	H/O	198

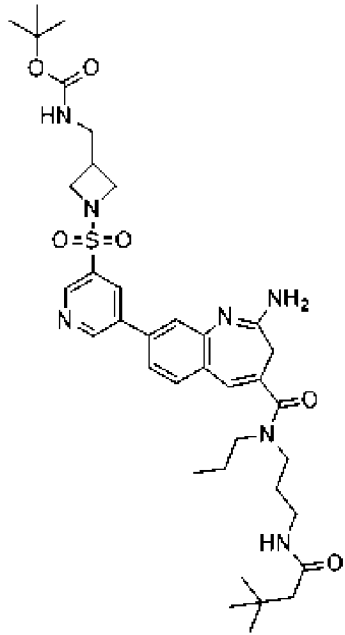
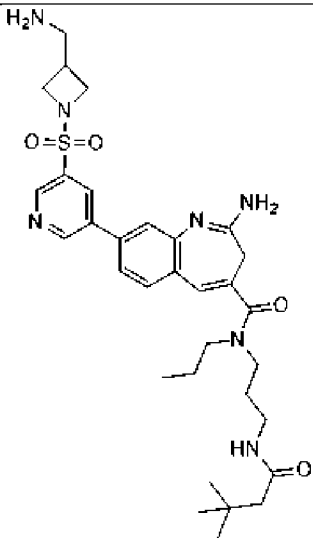
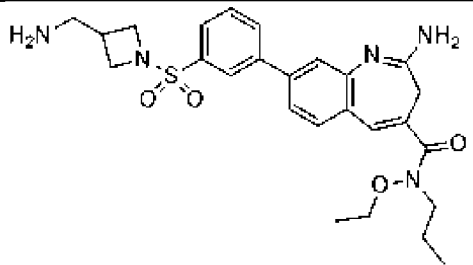
Bz-55		567,7	9000	1040
Bz-56		507,7	H/O	111
Bz-57		549,7	H/O	741
Bz-58		468,6	9000	9000
Bz-59		362,5	9000	870

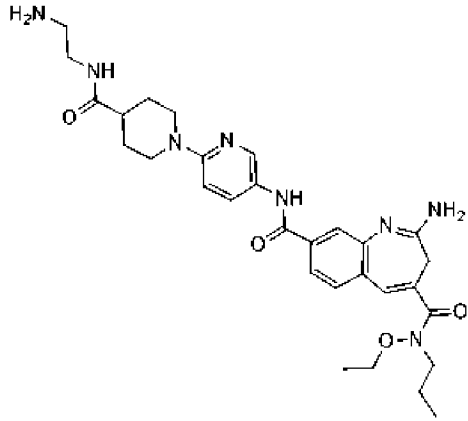
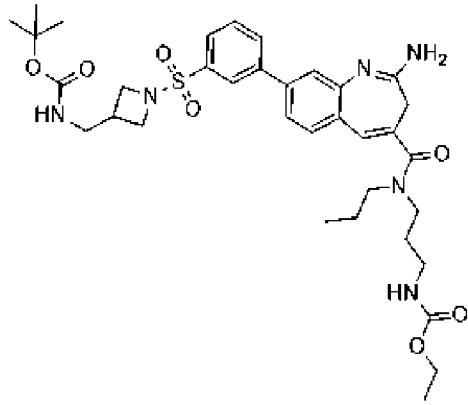
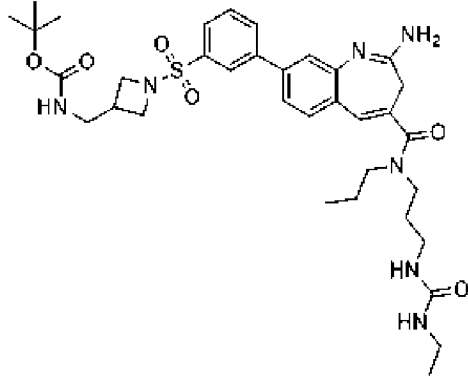
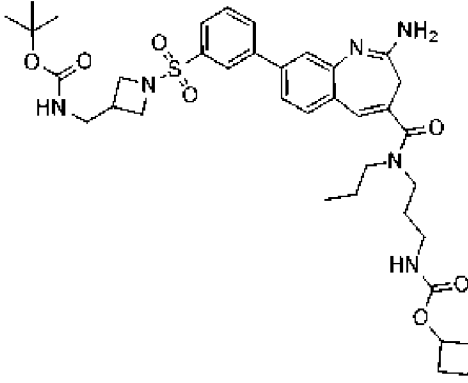
Bz-60		562,7	9000	288
Bz-61		601,8	9000	5846
Bz-62		614,8	9000	9000
Bz-63		539,7	1270	8

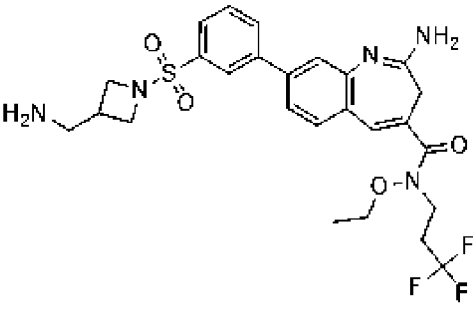
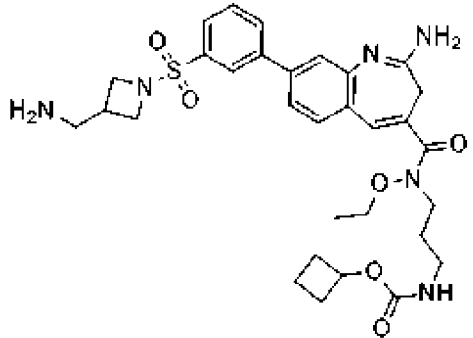
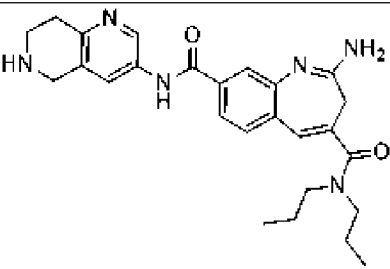
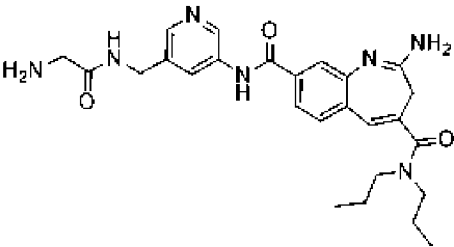
Bz-64		980,2	H/O	H/O
Bz-65		357,5	3929	5902
Bz-66		566,6	4614	26
Bz-67		466,6	3926	2053
Bz-68		366,5	4595	3070

Bz-69		470,7	3205	6670
Bz-70		552,7	H/O	H/O
Bz-71		511,6	9000	2752
Bz-72		511,6	H/O	4253

Bz-73		566,6	4478	120
Bz-74		370,5	9000	2555
Bz-75		458,5	9000	246
Bz-76		629,8	969	786

Bz-77		723,9	H/O	H/O
Bz-78		623,8	H/O	H/O
Bz-79		511,6	H/O	H/O

Bz-80		576,7	H/O	H/O
Bz-81		696,9	H/O	H/O
Bz-82		695,9	H/O	H/O
Bz-83		722,9	H/O	H/O

Bz-84		565,6	H/O	H/O
Bz-85		624,8	H/O	H/O
Bz-86		460,6	H/O	H/O
Bz-87		491,6	H/O	H/O

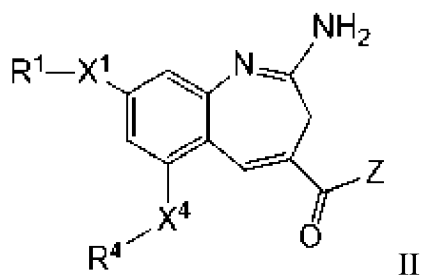
АМИНОБЕНЗАЗЕПИН-ЛИНКЕРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Иммуноконъюгаты по изобретению получают конъюгацией антитела с аминокбензазепин-линкерным соединением. Аминокбензазепин-линкерные соединения содержат фрагмент аминокбензазепина, ковалентно связанный с линкерным звеном. Линкерные звенья содержат функциональные группы и субъединицы, которые влияют на стабильность, проницаемость, растворимость и другие фармакокинетические свойства, безопасность и эффективность иммуноконъюгатов. Линкерное звено включает реакционноспособную функциональную группу, которая взаимодействует, то есть конъюгирует, с реакционноспособной функциональной группой антитела. Например, нуклеофильная группа, такая как аминокгруппа боковой цепи лизина антитела, вступает в реакцию с электрофильной реакционной функциональной группой аминокбензазепин-линкерного соединения с образованием иммуноконъюгата. Также, например, тиол цистеина антитела вступает в реакцию с малеимидной или бромацетамидной группой аминокбензазепин-линкерного соединения с образованием иммуноконъюгата.

Электрофильная реакционноспособная функциональная группа, подходящая для аминокбензазепин-линкерных соединений, включает, но не ограничивается ими, N-гидроксисукцинимидиловые (NHS) сложные эфиры и N-гидроксисульфосукцинимидиловые (сульфо-NHS) сложные эфиры (реагирующие с амином); карбодиимиды (реагирующие с амином и карбоксилком); гидроксиметилфосфины (реагирующие с амином); малеимиды (реагирующие с тиолом); галогенированные ацетамиды, такие как N-иодацетамиды (реагирующие с тиолом); арилазиды (реагирующие с первичными аминами); фторированные арилазиды (реагирующие путем введения углерод-водородной связи (C-H)); пентафторфениловые (PFP) сложные эфиры (реагирующие с амином); сложные эфиры тетрафторфенила (TFP) (реагирующие с амином); сложные имидоэфиры (реагирующие с амином); изоцианаты (реагирующие с гидроксилком); винилсульфоны (реагирующие с тиолом, амином и гидроксилком); пиридилдисульфиды (реагирующие с тиолами); и производные бензофенона (реагирующие путем введения связи C-H). Дополнительные реагенты включают, но не ограничиваются ими, те, что описаны в Hermanson, *Bioconjugate Techniques* 2nd Edition, Academic Press, 2008.

Изобретение предлагает решения ограничений и проблем, связанных с конструированием, получением и использованием иммуноконъюгатов. Некоторые линкеры могут быть лабильными в кровотоке, высвобождая тем самым нежелательные количества адъюванта/лекарства до интернализации в клетки-мишени (Khot, A. et al (2015) *Bioanalysis* 7 (13): 1633-1648). Другие линкеры могут обеспечивать стабильность в кровотоке, но на эффективность внутриклеточного высвобождения могут влиять отрицательно. Линкеры, которые обеспечивают желаемое внутриклеточное высвобождение, обычно имеют плохую стабильность в кровотоке. Иначе говоря, стабильность в кровотоке и внутриклеточное высвобождение обычно находятся в обратной зависимости. Кроме того, в стандартных процессах конъюгации количество адъюванта/лекарственного соединения, загруженного в антитело, т.е. содержание лекарственного вещества, количество агрегата, образующегося в реакции конъюгации, и выход конечного очищенного конъюгата, который может быть получен, взаимосвязаны. Например, образование агрегатов обычно положительно коррелирует с количеством эквивалентов адъювант/лекарственное средство и их производных, конъюгированных с антителом. При высокой нагрузке лекарственного средства образовавшиеся агрегаты необходимо удалять для терапевтического применения. В результате опосредованное лекарственной нагрузкой образование агрегатов снижает выход иммуноконъюгатов и может затруднить масштабирование процесса.

Иллюстративные варианты осуществления включают аминокбензазепин-линкерное соединение формулы II:



где

Z выбран из H, —O(C₁-C₈ алкил), и N(X²R²)(X³R³);

R¹, R², R³, и R⁴ независимо выбраны из группы, состоящей из H, C₁-C₁₂ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₂-C₆ алкинила, C₃-C₁₂ карбоциклила, C₆-C₂₀ арила, C₂-C₉ гетероциклила и C₁-C₂₀ гетероарила, где алкил, алкенил, алкинил, карбоциклил, арил, гетероциклил и гетероарил независимо и необязательно замещены одной или более группами, выбранными из:

- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил);
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—*;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—NR⁵—C(=NR⁵)NR⁵—*;
- (C₆-C₂₀ арил);
- (C₆-C₂₀ арил)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—C(=NR^{5a})N(R⁵)—*;
- (C₂-C₂₀ гетероциклил);
- (C₂-C₂₀ гетероциклил)—*;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—NR⁵—C(=NR^{5a})NR⁵—*;
- (C₁-C₂₀ гетероарил);
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—*;
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—NR⁵—C(=NR^{5a})N(R⁵)—*;
- C(=O)—*;
- C(=O)—(C₂-C₂₀ гетероциклилдиил)—*;
- C(=O)N(R⁵)₂;
- C(=O)N(R⁵)—*;

$\text{—C(=O)N(R}^5\text{)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)C(=O)R}^5\text{;}$
 $\text{—C(=O)N(R}^5\text{)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)C(=O)N(R}^5\text{)}_2\text{;}$
 $\text{—C(=O)NR}^5\text{—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)CO}_2\text{R}^5\text{;}$
 $\text{—C(=O)NR}^5\text{—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)C(=NR}^{5a}\text{)N(R}^5\text{)}_2\text{;}$
 $\text{—C(=O)NR}^5\text{—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—NR}^5\text{C(=NR}^{5a}\text{)R}^5\text{;}$
 $\text{—C(=O)NR}^5\text{—(C}_1\text{—C}_8\text{ алкилдиил)—NR}^5\text{(C}_2\text{—C}_5\text{ гетероарил);}$
 $\text{—C(=O)NR}^5\text{—(C}_1\text{—C}_{20}\text{ гетероарилдиил)—N(R}^5\text{)—*};$
 $\text{—C(=O)NR}^5\text{—(C}_1\text{—C}_{20}\text{ гетероарилдиил)—*};$
 $\text{—C(=O)NR}^5\text{—(C}_1\text{—C}_{20}\text{ гетероарилдиил)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)}_2\text{;}$
 $\text{—C(=O)NR}^5\text{—(C}_1\text{—C}_{20}\text{ гетероарилдиил)—(C}_2\text{—C}_{20}\text{ гетероциклдиил)—C(=O)NR}^5\text{—}$
 $\text{(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—NR}^5\text{—*};$
 $\text{—N(R}^5\text{)}_2\text{;}$
 $\text{—N(R}^5\text{)—*};$
 $\text{—N(R}^5\text{)C(=O)R}^5\text{;}$
 $\text{—N(R}^5\text{)C(=O)—*};$
 $\text{—N(R}^5\text{)C(=O)N(R}^5\text{)}_2\text{;}$
 $\text{—N(R}^5\text{)C(=O)N(R}^5\text{)—*};$
 $\text{—N(R}^5\text{)CO}_2\text{R}^5\text{;}$
 $\text{—NR}^5\text{C(=NR}^{5a}\text{)N(R}^5\text{)}_2\text{;}$
 $\text{—NR}^5\text{C(=NR}^{5a}\text{)N(R}^5\text{)—*};$
 $\text{—NR}^5\text{C(=NR}^{5a}\text{)R}^5\text{;}$
 $\text{—N(R}^5\text{)—(C}_2\text{—C}_5\text{ гетероарил);}$
 $\text{—O—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкил);}$
 $\text{—O—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)}_2\text{;}$
 $\text{—O—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)—*};$
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{ гетероциклдиил)—*};$
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{ гетероциклдиил)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)}_2\text{;}$
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{ гетероциклдиил)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—NR}^5\text{—*};$ и
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{ гетероциклдиил)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—OH;}$
 или R^2 и R^3 вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;
 X^1 , X^2 , X^3 , и X^4 независимо выбраны из группы, состоящей из связи, $C(=O)$, $C(=O)N(R^5)$, O , $N(R^5)$, S , $S(O)_2$ и $S(O)_2N(R^5)$;

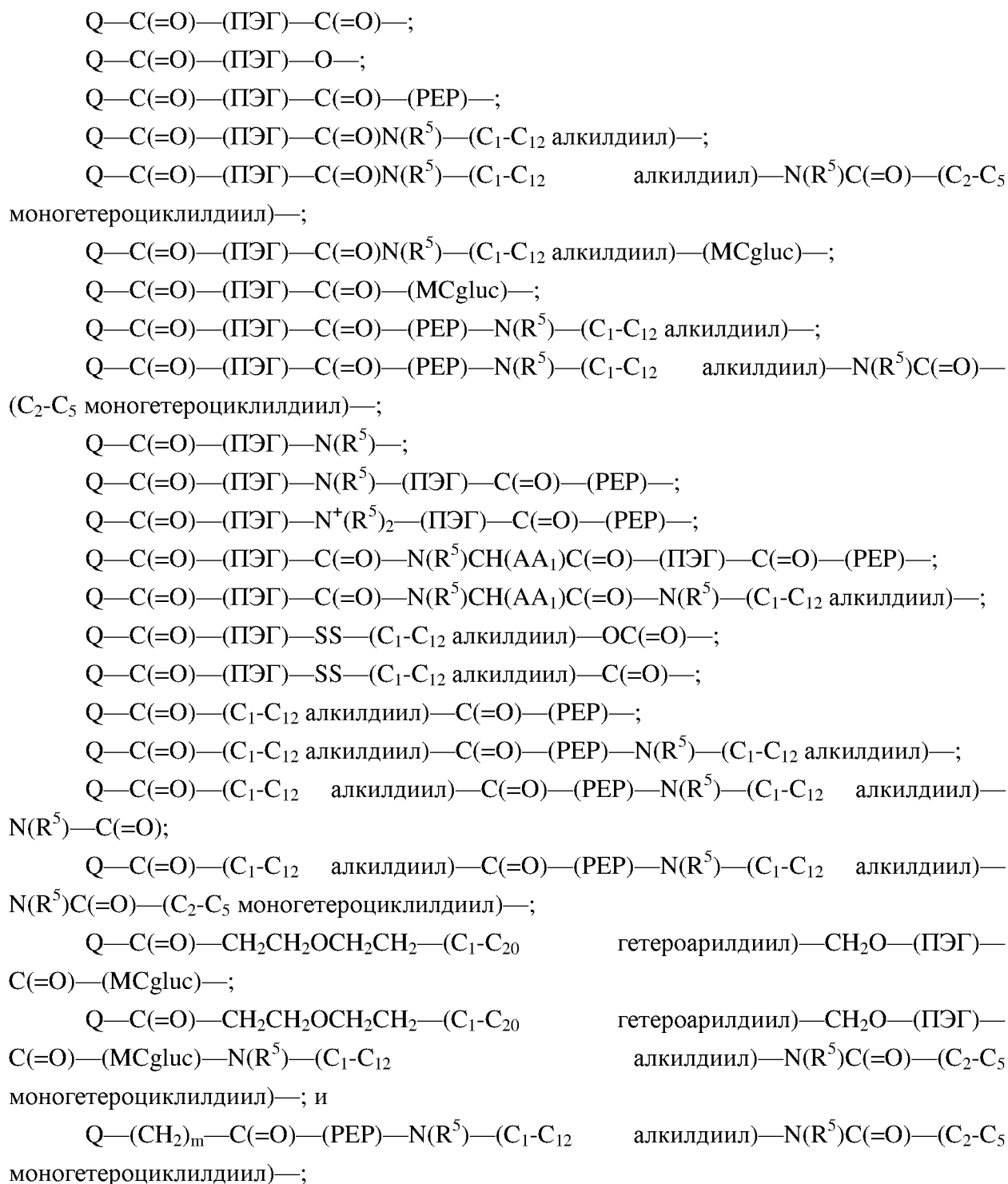
R^5 выбран из группы, состоящей из H , $C_6\text{—C}_{20}$ арила, $C_6\text{—C}_{20}$ арилдиила, $C_1\text{—C}_{12}$ алкила, и $C_1\text{—C}_{12}$ алкилдиила, или две группы R^5 вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

R^{5a} выбран из группы, состоящей из $C_6\text{—C}_{20}$ арила и $C_1\text{—C}_{20}$ гетероарила;

где звездочка * указывает на сайт присоединения L , и где один из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 присоединен к L ;

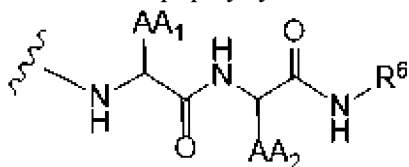
L представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из:

$Q\text{—C(=O)—(ПЭГ)—}$;



где ПЭГ имеет формулу: $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_m-$; m является целым числом от 1 до 5, а n является целым числом от 2 до 50;

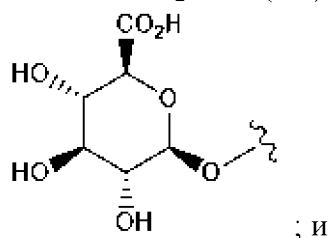
PEP имеет формулу:



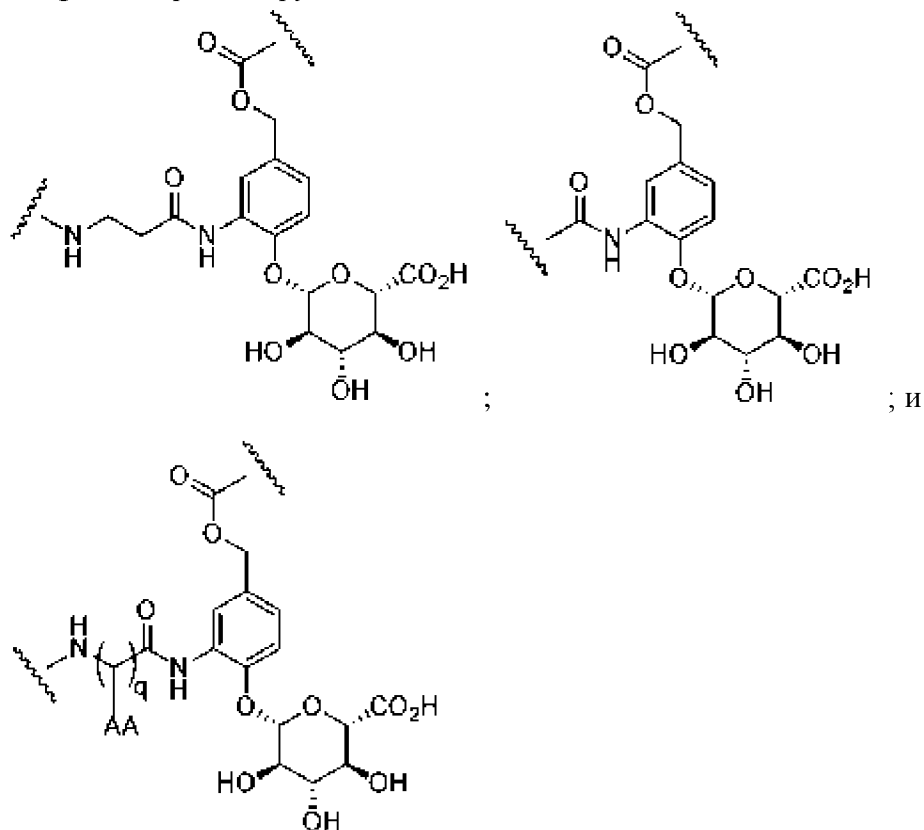
где AA_1 и AA_2 независимо выбраны из боковой цепи аминокислоты, или AA_1 или AA_2 и соседний атом азота образуют 5-членное кольцо пролиновой аминокислоты, а

волнистая линия указывает на точку присоединения и;

R⁶ выбран из группы, состоящей из C₆-C₂₀ арилдиила и C₁-C₂₀ гетероарилдиила, замещенного —CH₂O—C(=O)— и необязательно:



МСgluc выбран из групп:



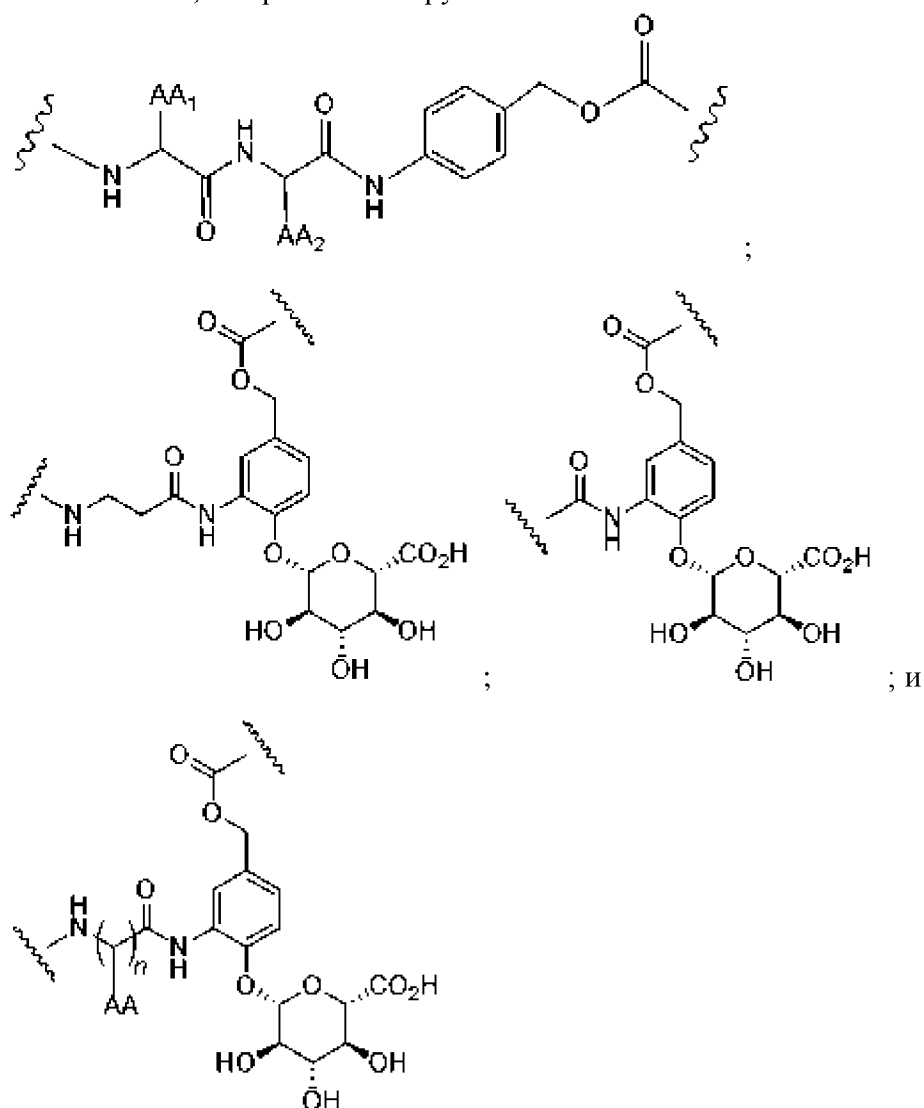
где q равно от 1 до 8, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты; и

Q выбран из группы, состоящей из N-гидроксисукцинимидила, N-гидроксисульфосукцинимидила, малеимида и фенокси, замещенных одной или более группами, независимо выбранными из F, Cl, NO₂, и SO₃⁻;

где алкил, алкилдиил, алкенил, алкенилдиил, алкинил, алкинилдиил, арил, арилдиил, карбоциклил, карбоциклилдиил, гетероциклил, гетероциклилдиил, гетероарил и гетероарилдиил необязательно замещены одной или более группами, независимо выбранными из F, Cl, Br, I, —CN, —CH₃, —CH₂CH₃, —CH=CH₂, —C≡CH, —C≡CCH₃, —CH₂CH₂CH₃, —CH(CH₃)₂, —CH₂CH(CH₃)₂, —CH₂OH, —CH₂OCH₃, —CH₂CH₂OH, —C(CH₃)₂OH, —CH(OH)CH(CH₃)₂, —C(CH₃)₂CH₂OH, —CH₂CH₂SO₂CH₃, —CH₂OP(O)(OH)₂, —CH₂F, —CHF₂, —CF₃, —CH₂CF₃, —CH₂CHF₂, —CH(CH₃)CN, —C(CH₃)₂CN, —CH₂CN, —CH₂NH₂, —CH₂NHSO₂CH₃, —CH₂NHCH₃, —CH₂N(CH₃)₂, —CO₂H, —COCH₃, —CO₂CH₃, —CO₂C(CH₃)₃, —COCH(OH)CH₃, —CONH₂, —CONHCH₃, —CON(CH₃)₂, —

$C(CH_3)_2CONH_2$, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-NHCOCH_3$, $-N(CH_3)COCH_3$, $-NHS(O)_2CH_3$, $-N(CH_3)C(CH_3)_2CONH_2$, $-N(CH_3)CH_2CH_2S(O)_2CH_3$, $-NHC(=NH)H$, $-NHC(=NH)CH_3$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-NHC(=O)NH_2$, $-NO_2$, $=O$, $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-OCH_2CH_2OCH_3$, $-OCH_2CH_2OH$, $-OCH_2CH_2N(CH_3)_2$, $-O(CH_2CH_2O)_n-$, $(CH_2)_mCO_2H$, $-O(CH_2CH_2O)_nH$, $-OP(O)(OH)_2$, $-S(O)_2N(CH_3)_2$, $-SCH_3$, $-S(O)_2CH_3$ и $-S(O)_3H$.

Иллюстративный вариант аминокензаепин-линкерного соединения Формулы II включает в себя РЕР, выбранный из групп:



где n равно 1 или более, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты.

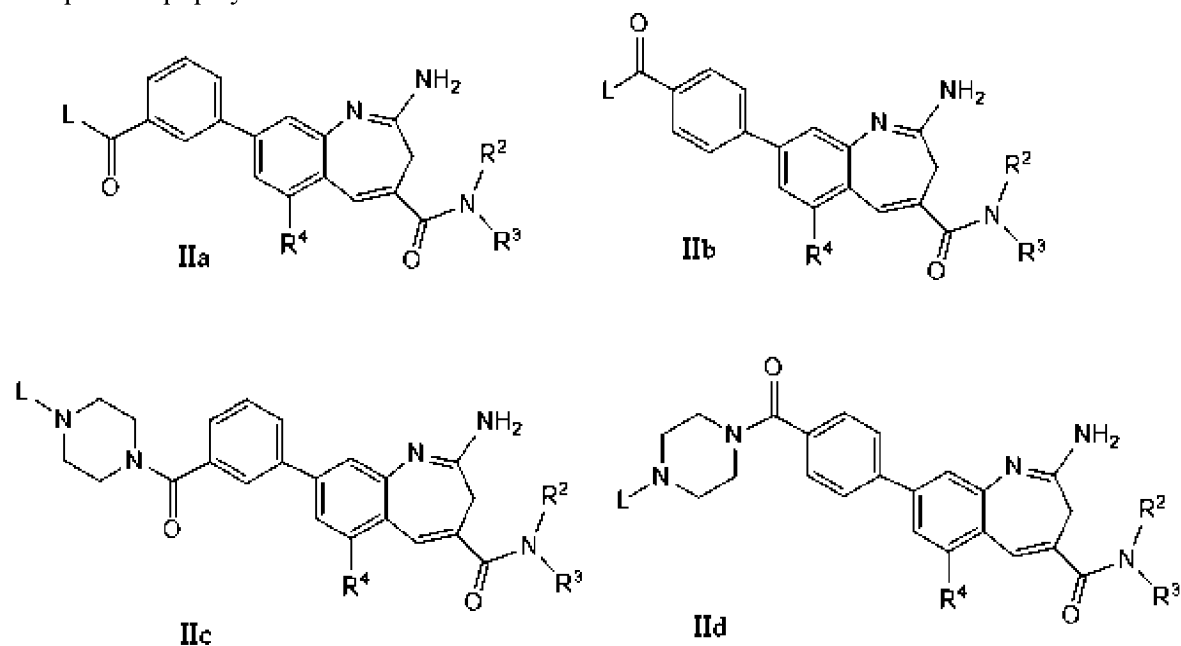
Иллюстративный вариант аминокензаепин-линкерного соединения формулы II включает в себя AA_1 и AA_2 независимо выбранные из боковой цепи встречающейся в природе аминокислоты.

Иллюстративный вариант аминокензаепин-линкерного соединения формулы II включает AA_1 и AA_2 независимо выбранные из H , $-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, $-CH_2(C_6H_5)$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$, $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH_2SO_3H$ и $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$.

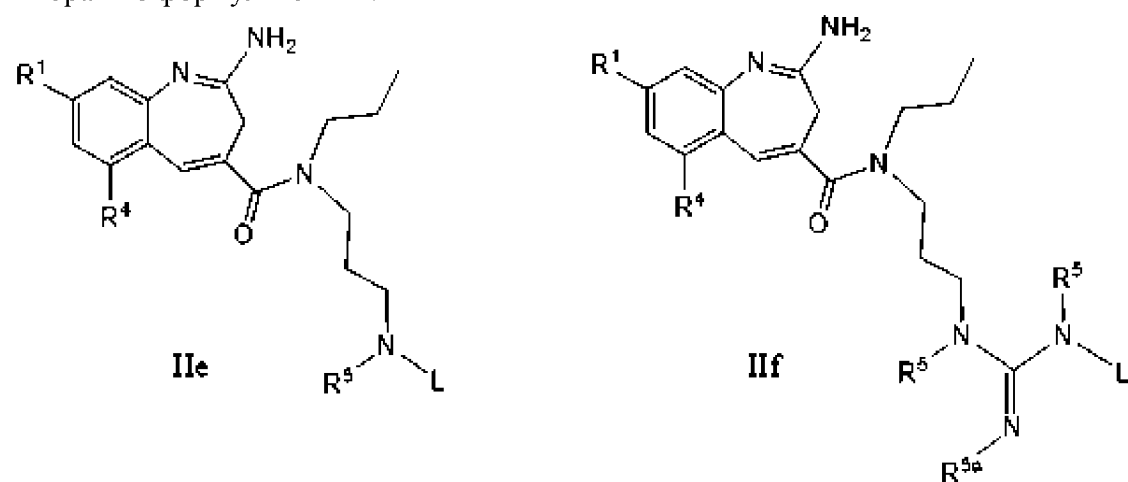
Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает AA₁, представляющее собой —CH(CH₃)₂, и AA₂ представляющее собой —CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает AA₁ и AA₂ независимо выбранные из GlcNAc аспариновой кислоты, —CH₂SO₃H и —CH₂OPO₃H.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** выбран из формул IIa-d:



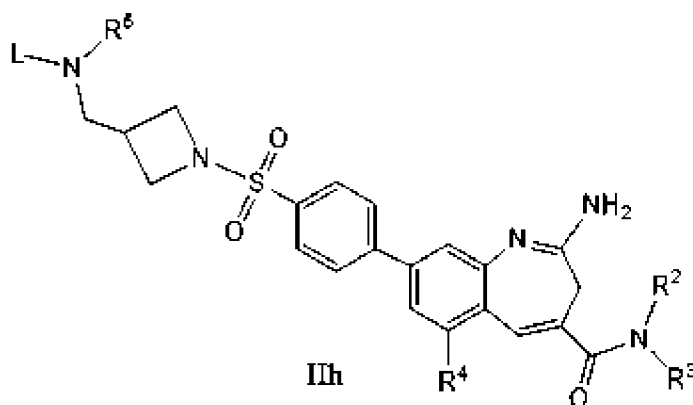
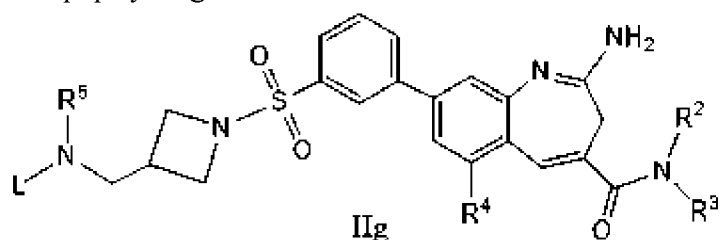
Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** выбран из формул IIe и IIIf:



где R^{5a} формулы IIIf представляет собой фенил, необязательно замещенный одной или более группами, выбранными из F, Cl, Br, I, —CN и —NO₂.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает L, представляющий собой Q—C(=O)—(ПЭГ)— или Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** выбран из формул IIg и IIh:



Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает L, представляющий собой $-\text{C}(=\text{O})-(\text{ПЭГ})-\text{C}(=\text{O})-(\text{ПЕР})-$.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает R^2 и R^3 представляющие собой каждый $\text{C}_1\text{-C}_8$ алкил.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает R^2 и R^3 представляющие собой каждый $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$.

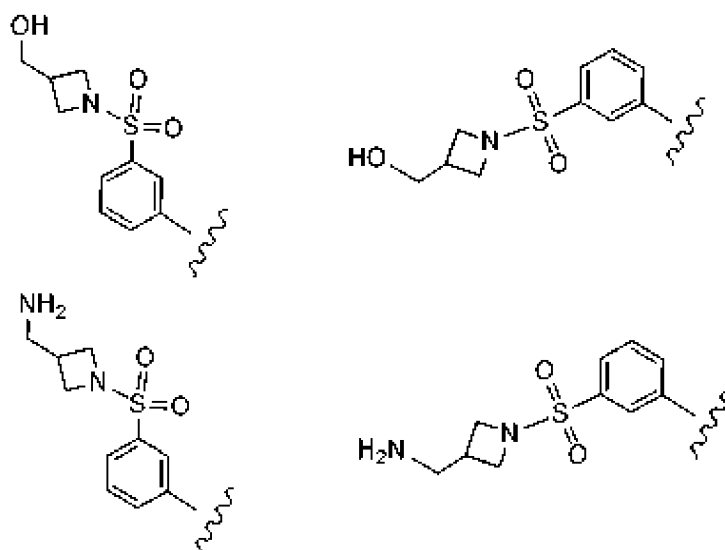
Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает X^2 и X^3 представляющие собой каждый связь, и R^2 или R^3 представляющие собой $-\text{O}-(\text{C}_1\text{-C}_{12} \text{ алкил})$.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает X^2 и X^3 представляющие собой каждый связь, и R^2 или R^3 представляющие собой $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает R^1 и R^4 выбранные из $-(\text{C}_6\text{-C}_{20} \text{ арилдиил})-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{C}_2\text{-C}_{20} \text{ гетероциклилдиил})-(\text{C}_1\text{-C}_{12} \text{ алкилдиил})-\text{N}(\text{R}^5)_2$ и $-(\text{C}_6\text{-C}_{20} \text{ арилдиил})-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{C}_2\text{-C}_{20} \text{ гетероциклилдиил})-(\text{C}_1\text{-C}_{12} \text{ алкилдиил})-\text{OH}$.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ арилдиил, представляющий собой фенилдиил и $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ гетероциклилдиил, представляющий собой азетидиндиил.

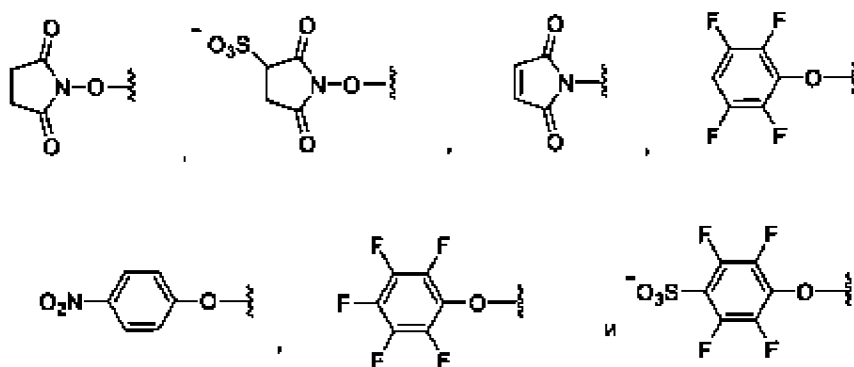
Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** выбран из формул:



Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает один из R^1 и R^4 представляющий собой $—C(=O)NR^5—(C_1-C_{20}$ гетероарилдиил)— $(C_2-C_{20}$ гетероциклилдиил)— $C(=O)NR^5—(C_1-C_{12}$ алкилдиил)— $NR^5—L$.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** включает C_1-C_{20} гетероарилдиил, представляющий собой пиридиндиил и C_2-C_{20} гетероциклилдиил, представляющий собой пиперидиил.

Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения Формулы **II** включает Q выбранный из групп:



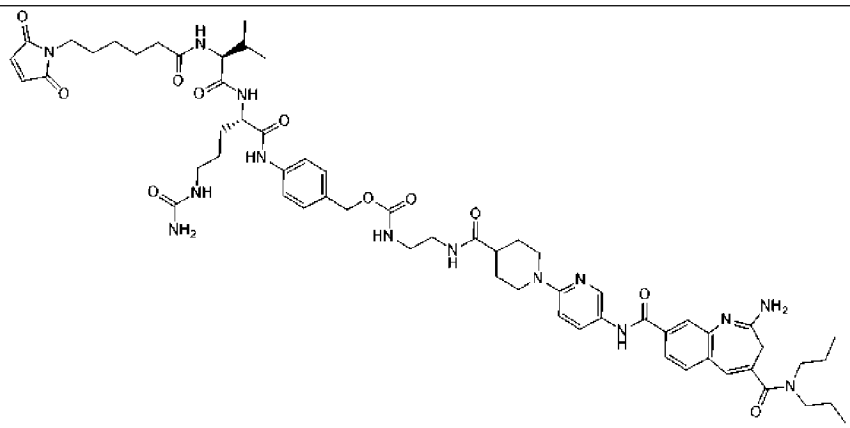
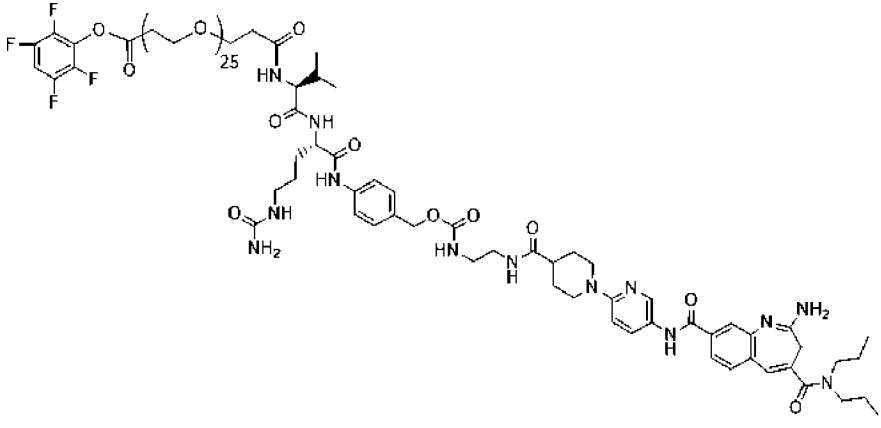
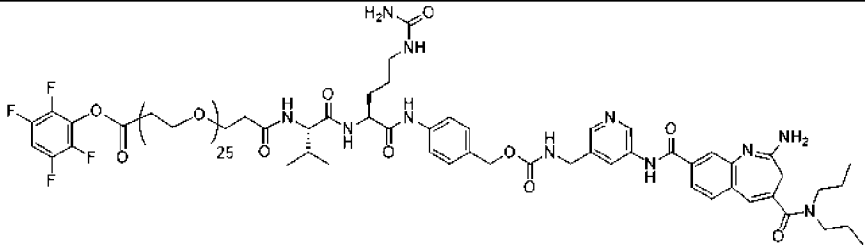
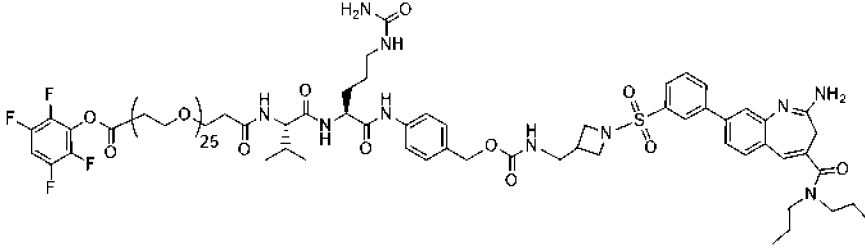
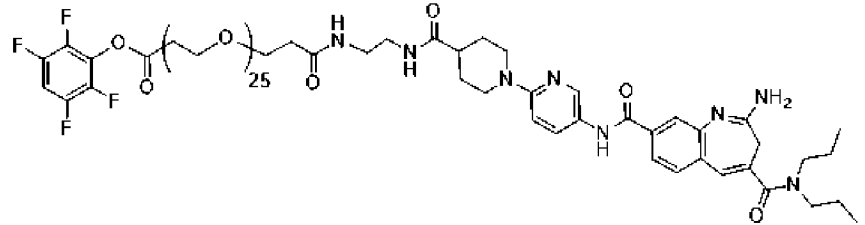
Изобретение включает в себя все разумные комбинации и преобразования характерных особенностей вариантов формулы **II**.

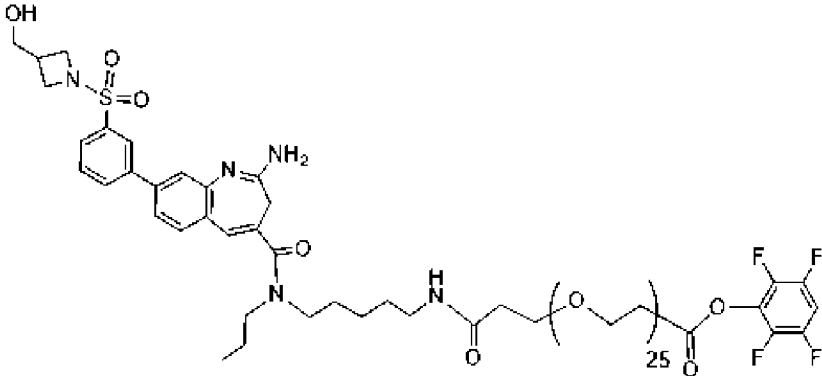
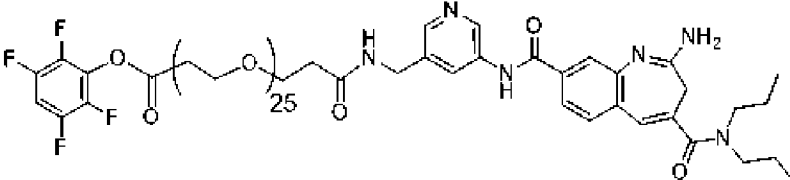
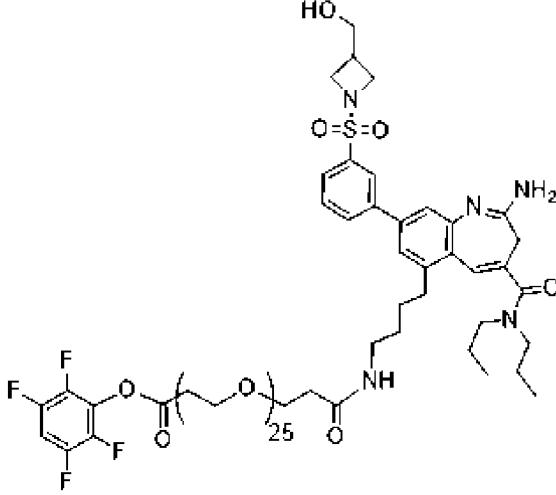
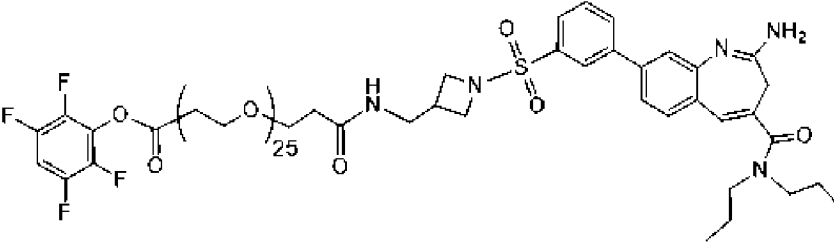
Иллюстративный вариант аминокбензазепин-линкерного соединения формулы **II** выбран из соединений таблиц 2a, 2b, и 2c. Каждое соединение было синтезировано и очищено способами, описанными в примерах, приведенных в данном документе, охарактеризовано масс-спектрометрией и показано, что оно имеет указанную массу. Аминокбензазепин-линкерные соединения из таблиц 2a, 2b и 2c демонстрируют удивительное и неожиданное свойство селективности агониста TLR8, которое может предсказывать полезную терапевтическую активность для лечения рака и других расстройств.

Таблица 2а: Аминобензазепин-линкерные соединения формулы II (BzL) и промежуточные соединения

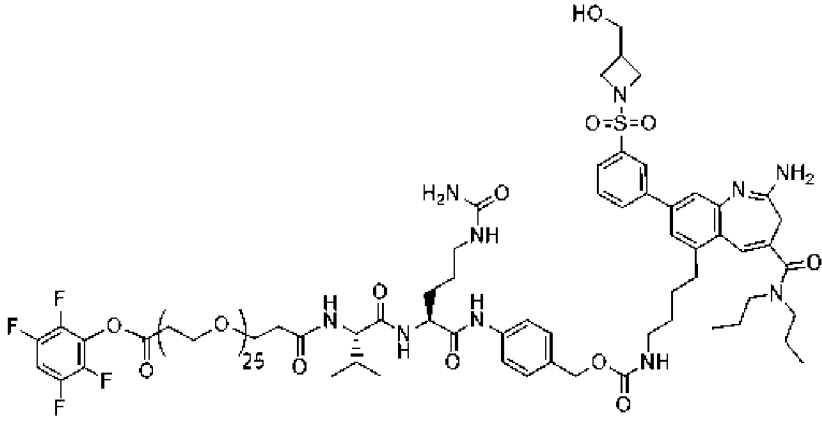
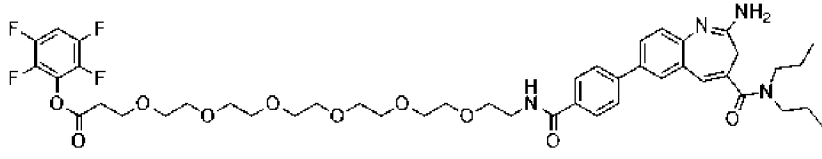
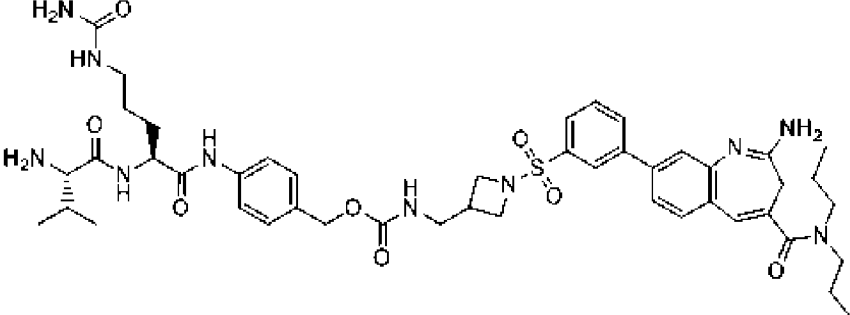
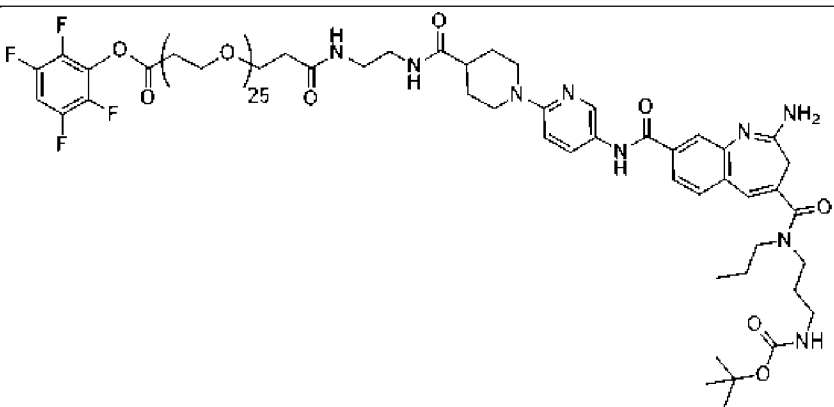
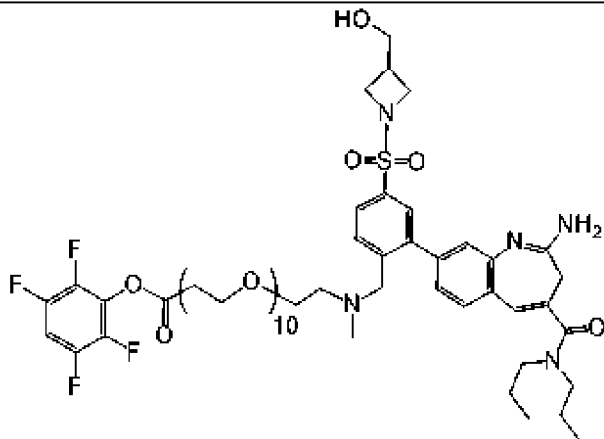
BzL No.	Структура	Молекулярная масса
BzL-1		657,6
BzL-2		1817,1
BzL-3		1214,4
BzL-4		1889,1

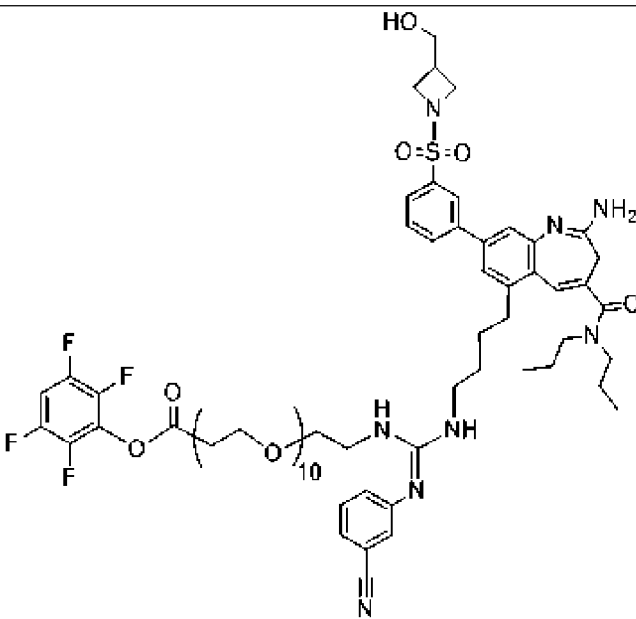
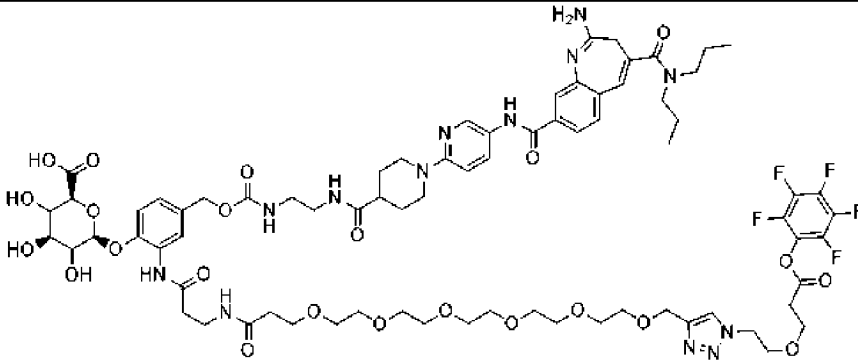
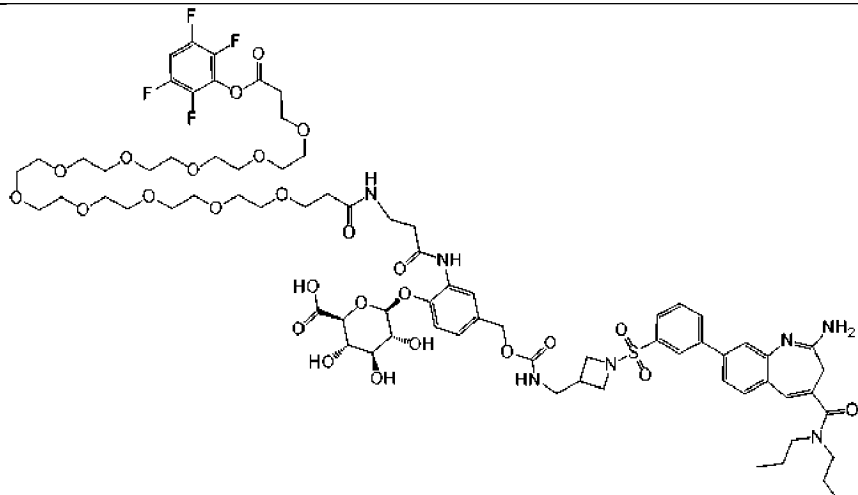
BzL-5		2294,6
BzL-6		833,82
BzL-7		902,9
BzL-8		958,1
BzL-9		958,1
BzL-10		574,7
BzL-11		840,0

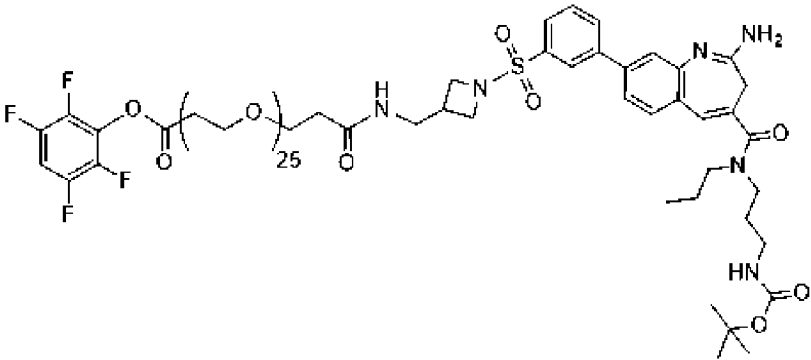
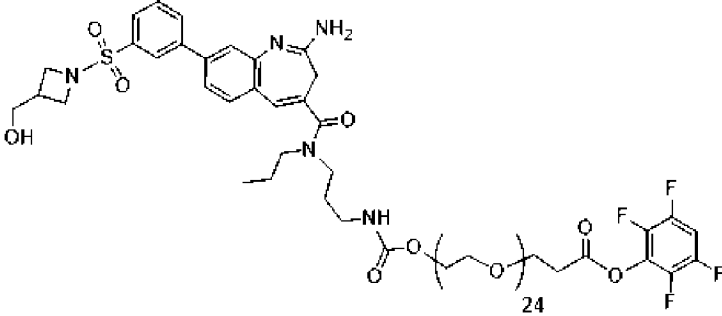
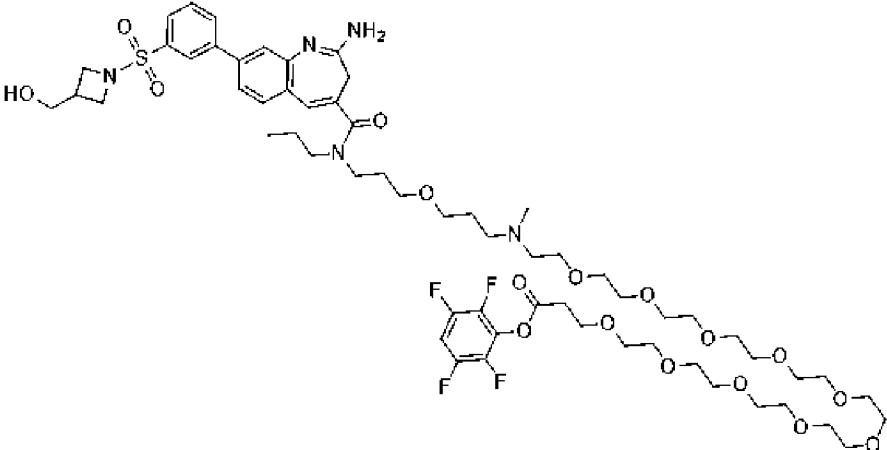
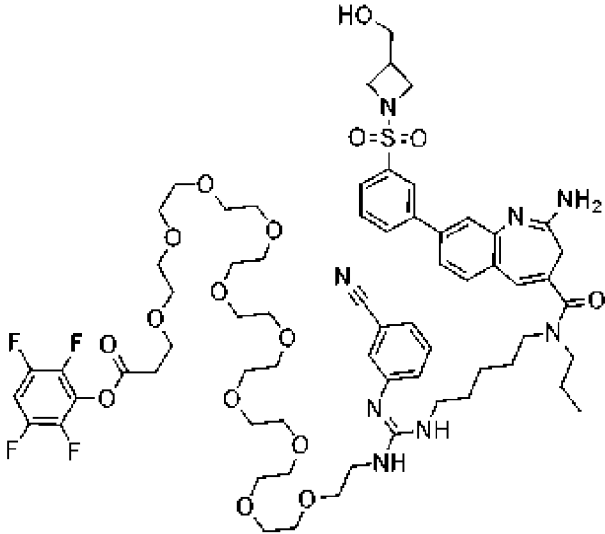
BzL-12		1173,4
BzL-13		2329,6
BzL-14		2189,4
BzL-15		2264,6
BzL-16		1924,2

BzL-17		1903,2
BzL-18		1784
BzL-19		1931,2
BzL-20		1859,1

[illegible]

BzL-24		2336,7
BzL-25		888,95
BzL-26		915,1
BzL-27		2039,3
BzL-28		1214,4

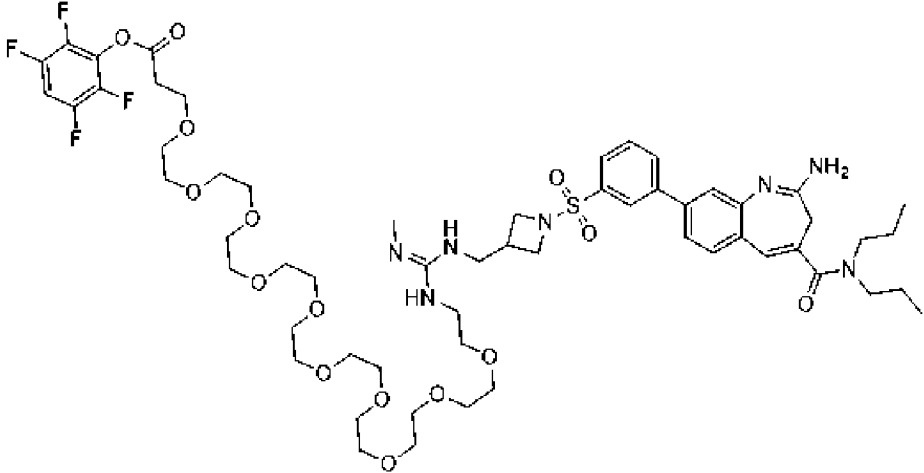
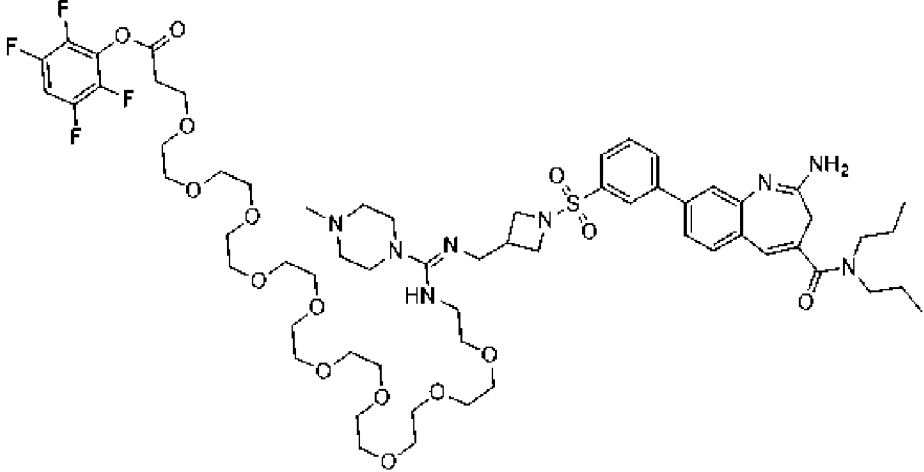
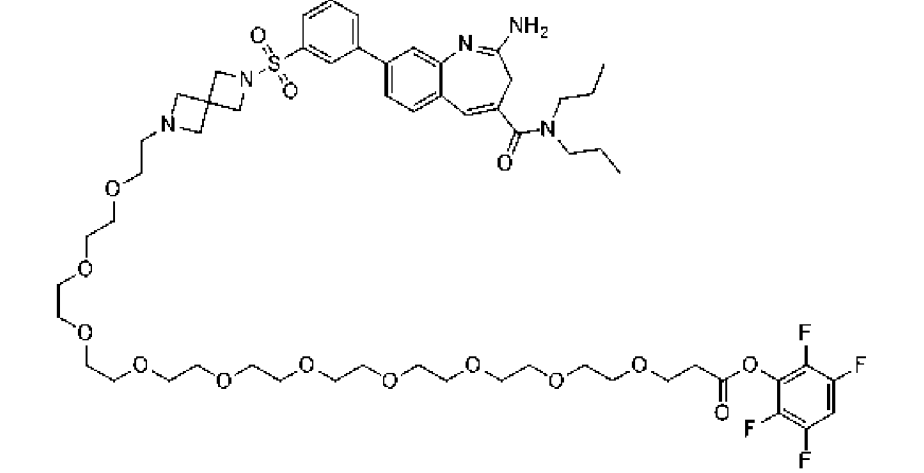
BzL-29		1385,6
BzL-30		1642,6
BzL-31		1610,7

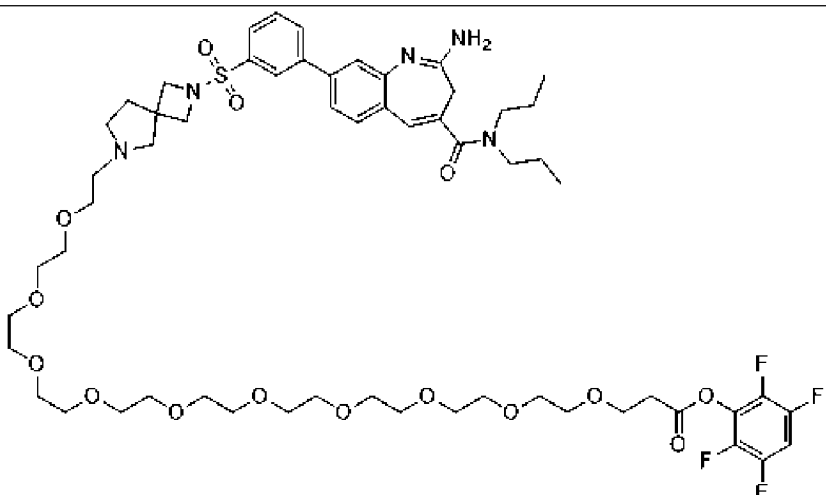
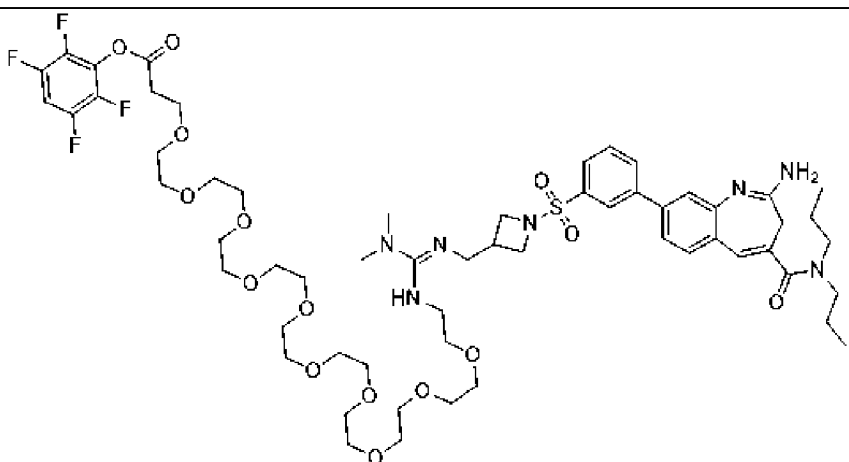
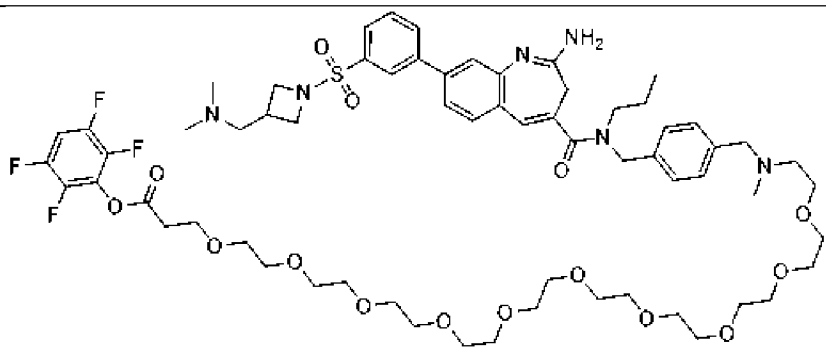
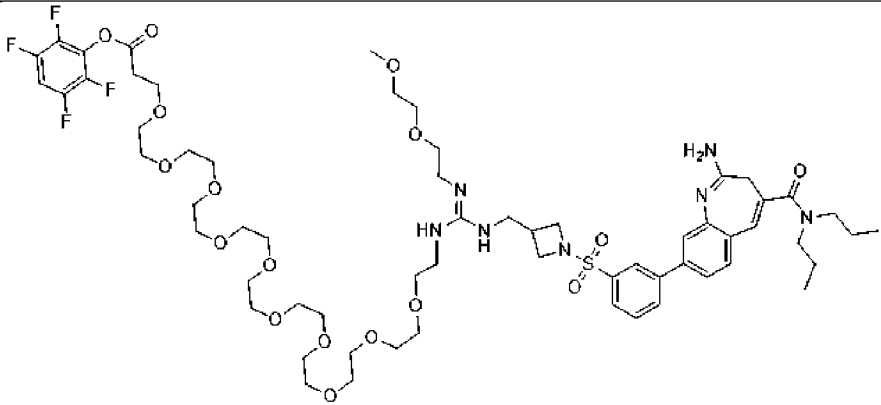
BzL-35		1974,2
BzL-36		1847,1
BzL-37		1258,4
BzL-38		1357,5

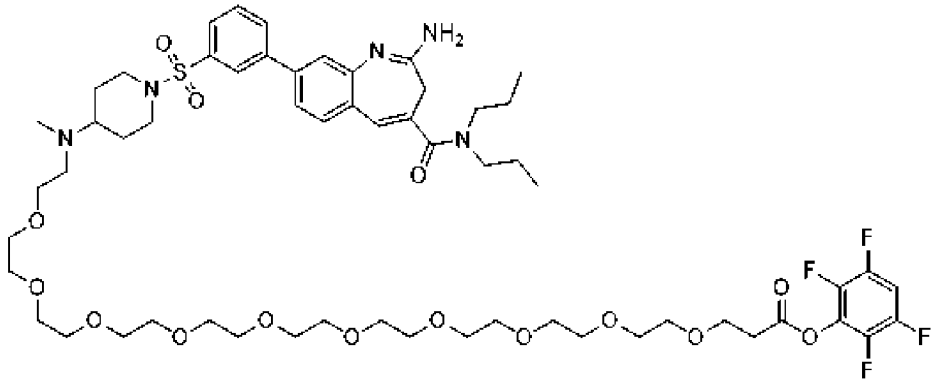
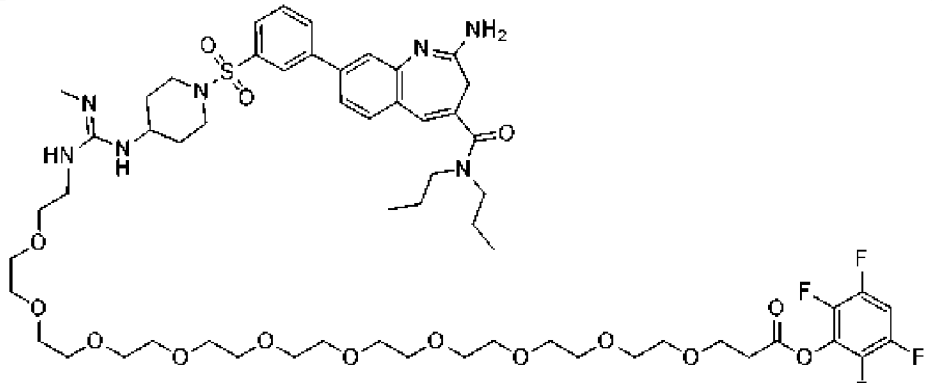
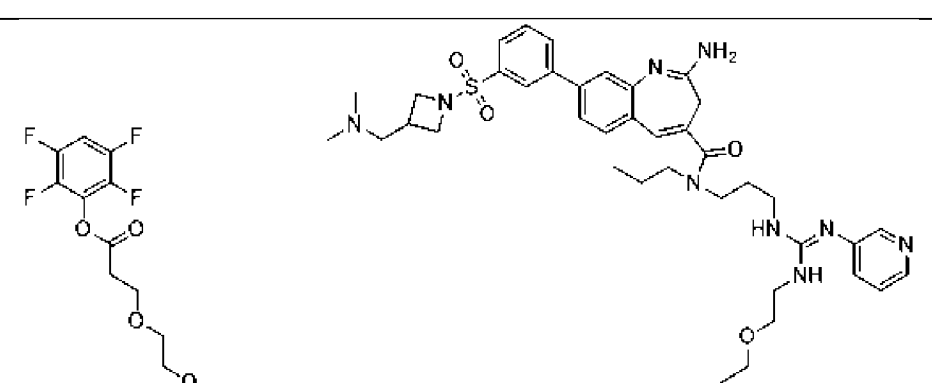
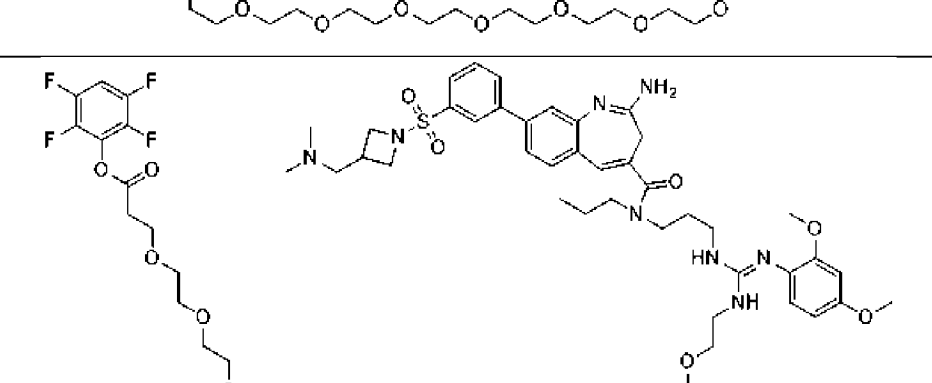
[illegible]

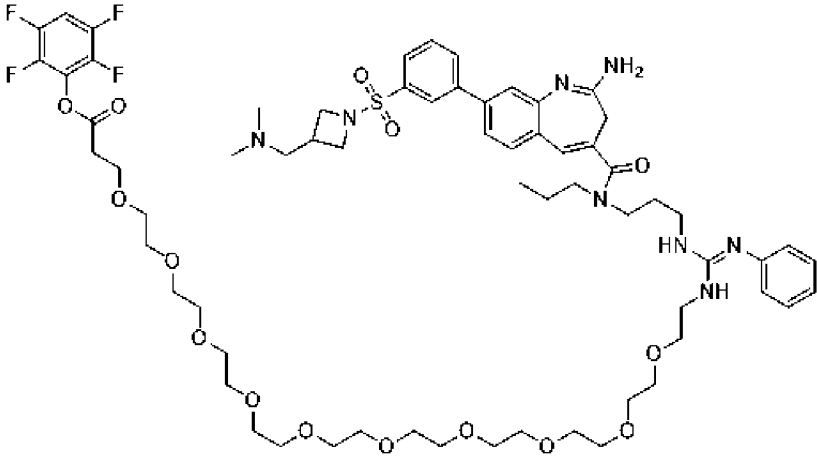
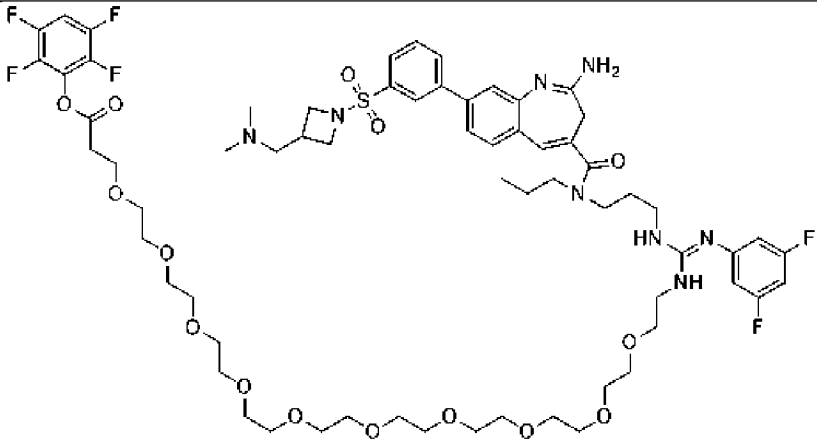
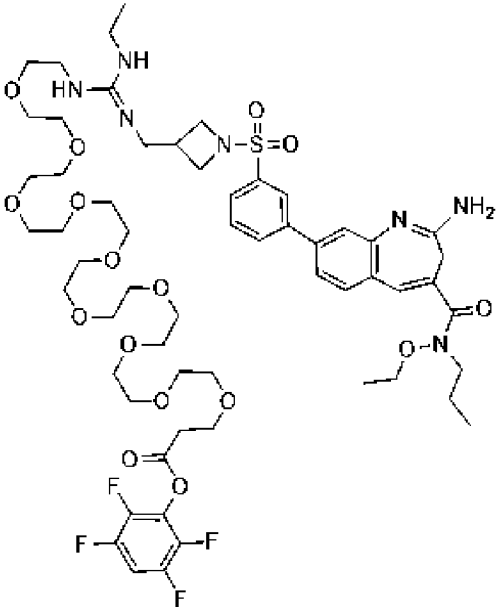
BzL-46		1262,4
BzL-47		1223,3
BzL-48		1391,5

Таблица 2с: Аминобензазепин-линкерные соединения формулы II (BzL) и промежуточные соединения

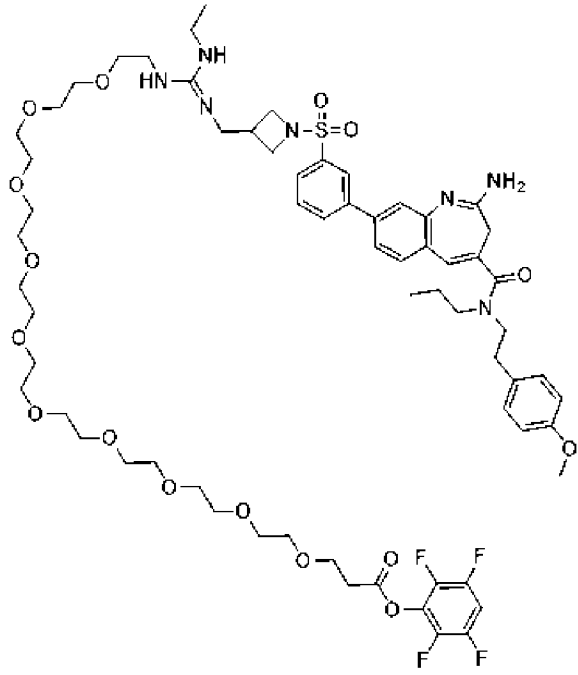
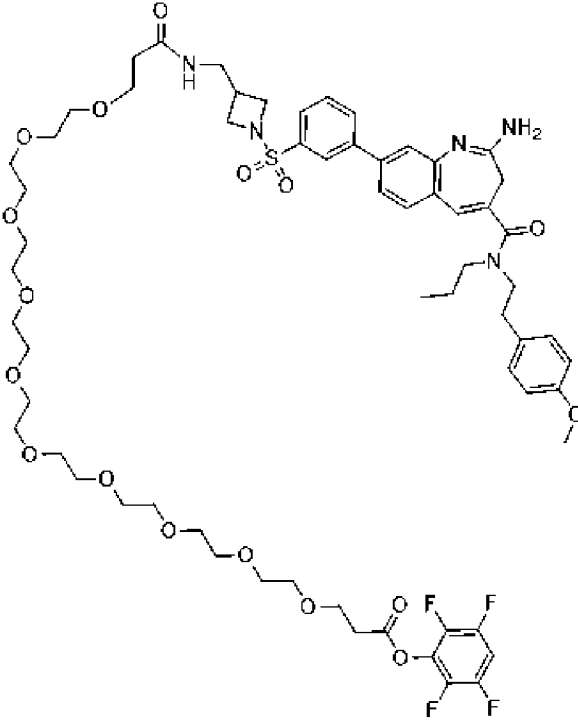
BzL №	Структура	Молекулярная масса
BzL-49		1226,4
BzL-50		1295,5
BzL-51		1182,3

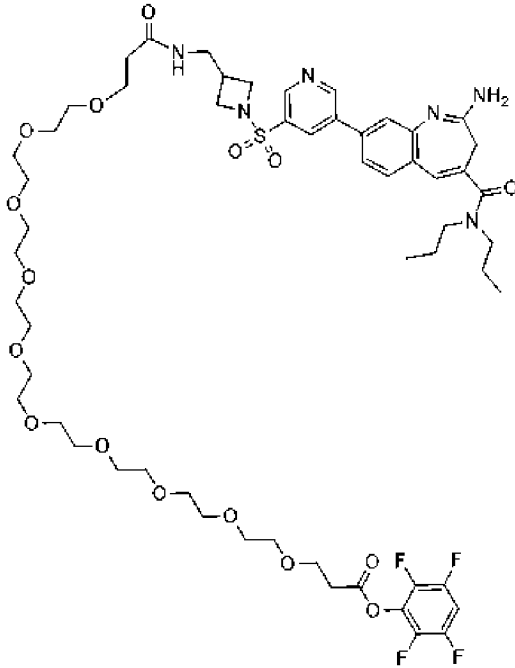
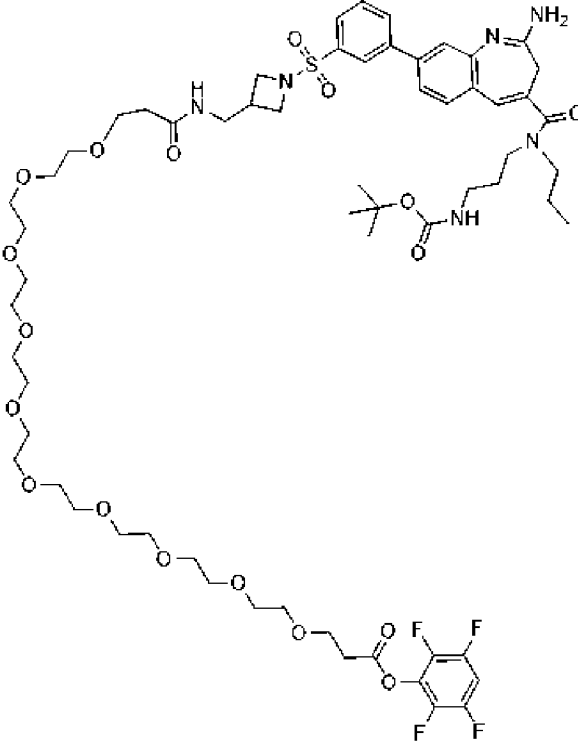
BzL-52		1196,4
BzL-53		1240,4
BzL-54		1289,5
BzL-55		1314,5

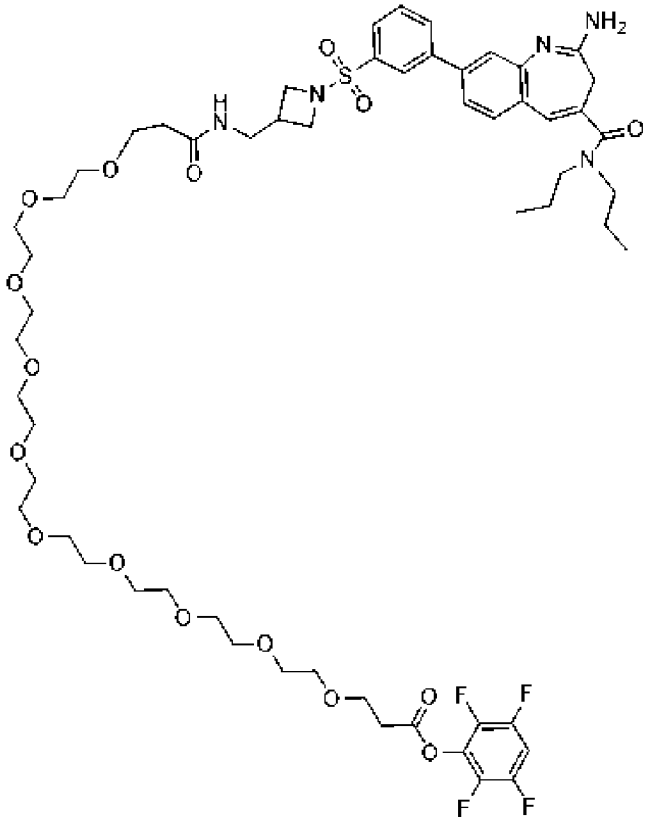
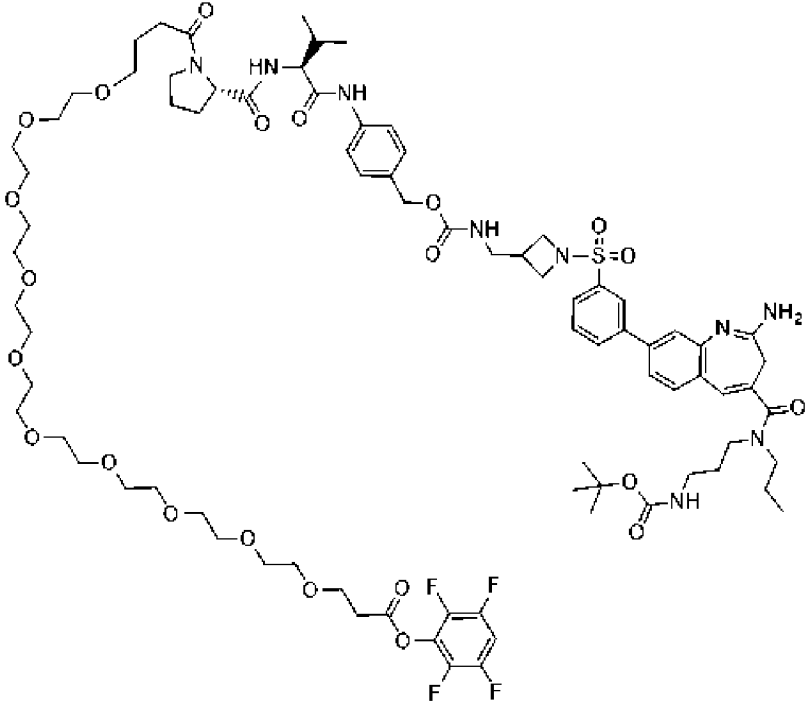
BzL-56		1198,4
BzL-57		1240,4
BzL-58		1332,5
BzL-59		1391,6

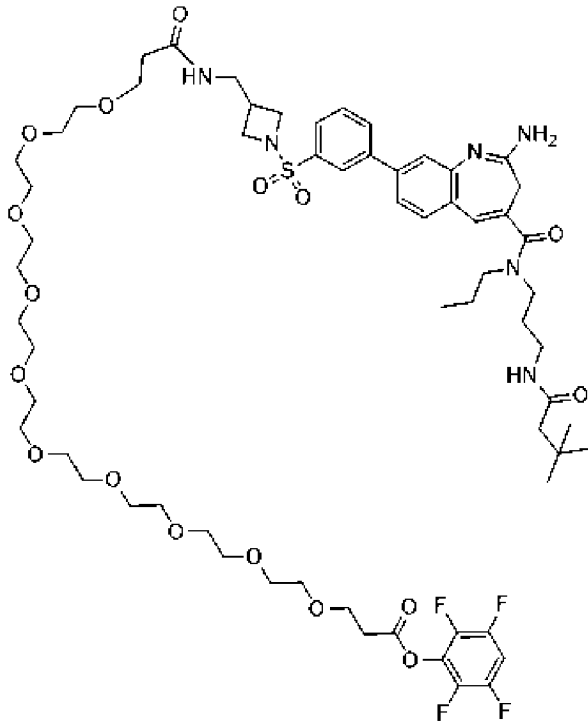
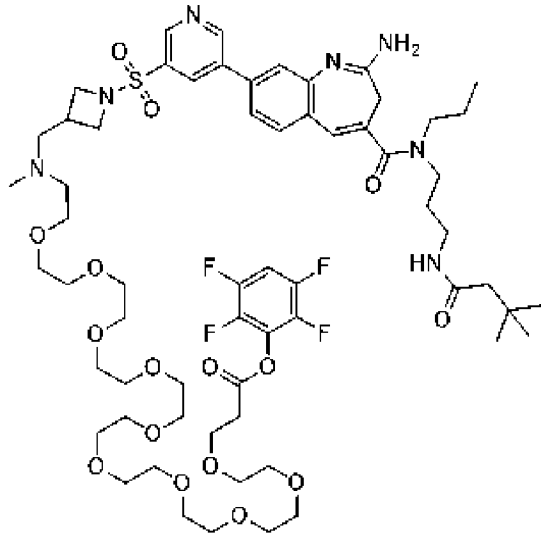
BzL-60	 Chemical structure of BzL-60: A long, flexible polyether chain (1,3-bis(2-methoxyethoxy)propane) is linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an ester linkage. The other end of the chain is linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an amide linkage. The chain also features a sulfonamide group and a 2-aminobenzimidazole moiety.	1331,5
BzL-61	 Chemical structure of BzL-61: A long, flexible polyether chain (1,3-bis(2-methoxyethoxy)propane) is linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an ester linkage. The other end of the chain is linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an amide linkage. The chain also features a sulfonamide group and a 2-aminobenzimidazole moiety.	1367,5
BzL-62	 Chemical structure of BzL-62: A long, flexible polyether chain (1,3-bis(2-methoxyethoxy)propane) is linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an ester linkage. The other end of the chain is linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an amide linkage. The chain also features a sulfonamide group and a 2-aminobenzimidazole moiety.	1242,4

[illegible]

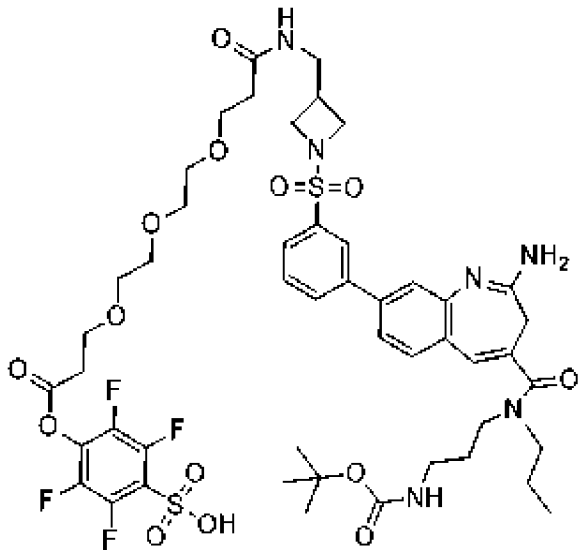
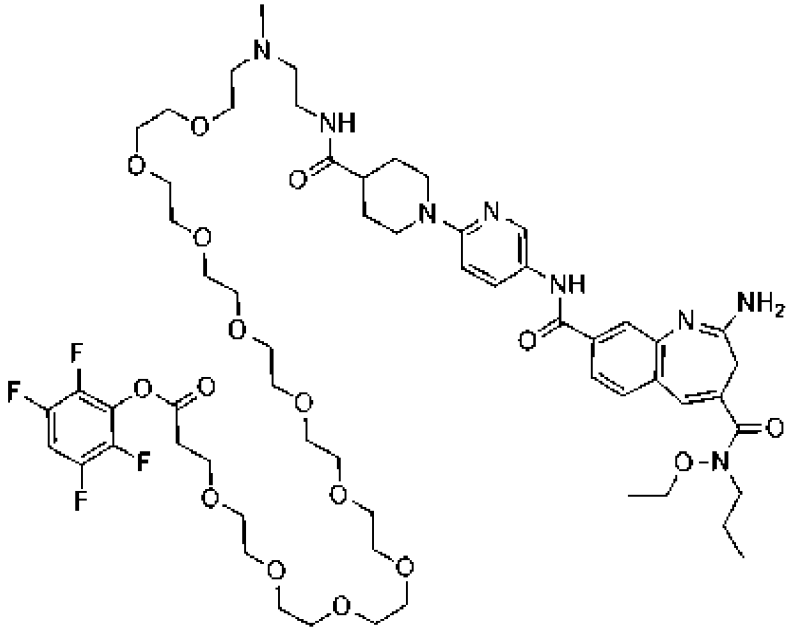
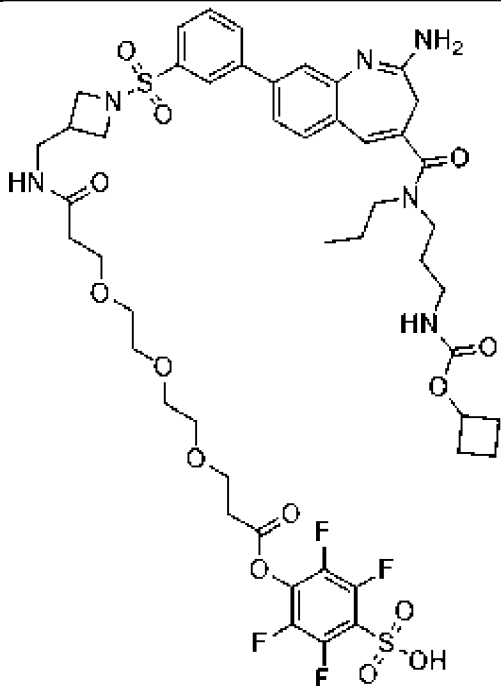
BzL-66	 The chemical structure of BzL-66 features a long, flexible poly(ethylene glycol) (PEG) chain. At one end of the PEG chain is a 4-(4-methoxyphenyl)butyl group connected to a tertiary amine. This amine is also linked to a 4-aminoquinoline ring. The quinoline ring is further substituted with a 4-sulfamoylphenyl group. The sulfonamide group is connected to a 4-((E)-2-((2-ethoxyethyl)amino)vinyl)phenyl group.	1332,5
BzL-67	 The chemical structure of BzL-67 is similar to BzL-66, featuring a long, flexible PEG chain. At one end of the PEG chain is a 4-(4-methoxyphenyl)butyl group connected to a tertiary amine. This amine is also linked to a 4-aminoquinoline ring. The quinoline ring is further substituted with a 4-sulfamoylphenyl group. The sulfonamide group is connected to a 4-((E)-2-((2-ethoxyethyl)amino)vinyl)phenyl group.	1290,4

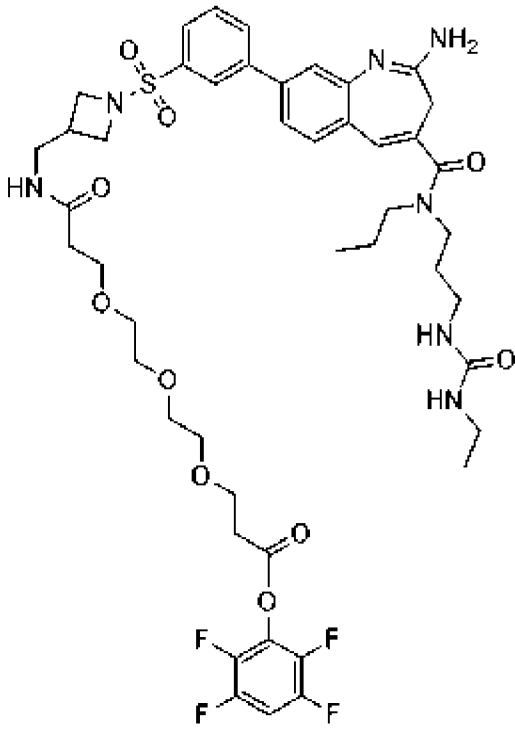
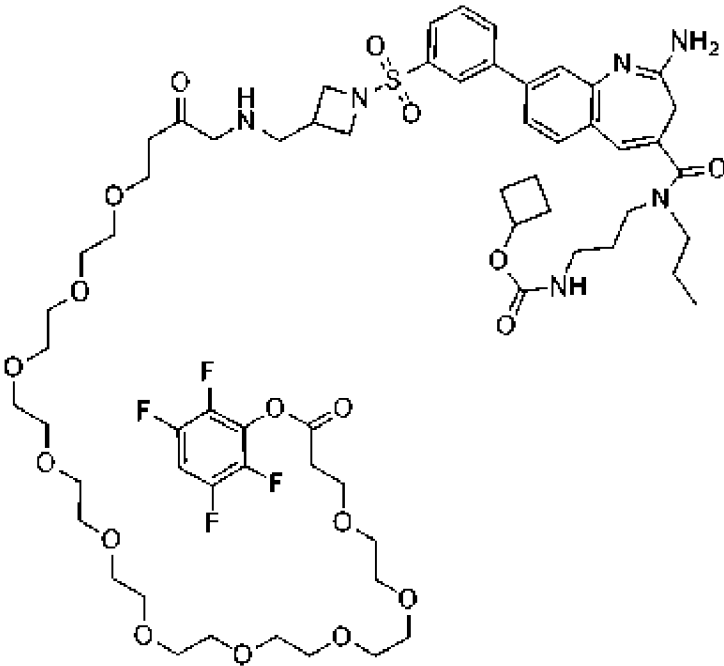
BzL-68	 Chemical structure of BzL-68: A long, flexible polyether chain (1,3-bis(2-oxoethyl)oxane) connects two complex organic moieties. The left moiety features a 4-aminopyridine ring linked via a sulfonamide group to a 4-ethylpiperidine ring. The right moiety consists of a 4-ethylpiperidine ring linked via a carbonyl group to a 4-aminopyridine ring, which is further connected to a 4-fluorophenyl ring.	1199,3
BzL-69	 Chemical structure of BzL-69: A long, flexible polyether chain (1,3-bis(2-oxoethyl)oxane) connects two complex organic moieties. The left moiety features a 4-aminopyridine ring linked via a sulfonamide group to a 4-ethylpiperidine ring. The right moiety consists of a 4-ethylpiperidine ring linked via a carbonyl group to a 4-aminopyridine ring, which is further connected to a 4-fluorophenyl ring.	1313,5

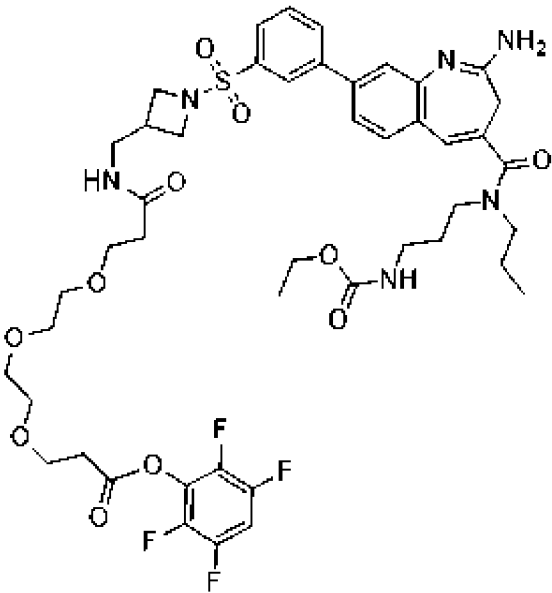
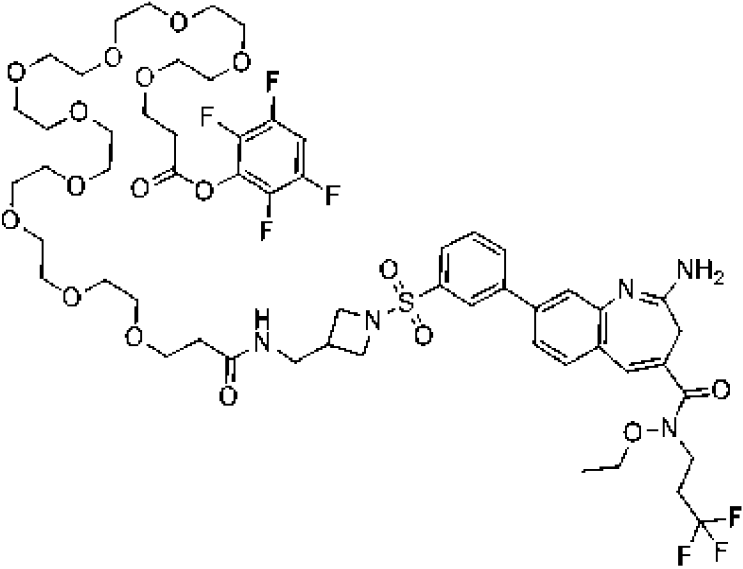
BzL-70	 The chemical structure of BzL-70 features a long, flexible polyether chain consisting of 12 repeating units of 2,2,5-trimethyl-1,3-dioxane. The chain is terminated at one end by a 4-(4-aminonaphthalen-1-yl)phenylsulfonamide group, which is further substituted with a diethylamino group. The other end of the chain is terminated by a 4-(4,4,5,5-tetrafluorophenyl)butyrate ester group.	1198,3
BzL-71	 The chemical structure of BzL-71 is a more complex molecule. It features a long, flexible polyether chain similar to BzL-70, but with a different termination at one end. This end is substituted with a 4-(4-aminonaphthalen-1-yl)phenylsulfonamide group, which is further substituted with a diethylamino group and a tert-butoxycarbonyl (Boc) protecting group. The other end of the chain is terminated by a 4-(4,4,5,5-tetrafluorophenyl)butyrate ester group.	1658,9

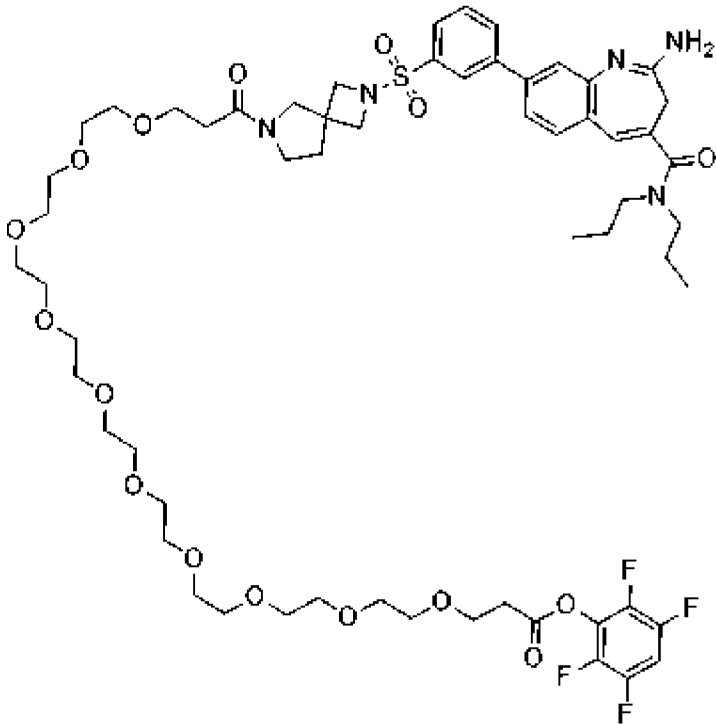
BzL-72	 Chemical structure of BzL-72: A complex molecule featuring a long, flexible polyether chain (poly(ethylene glycol) derivative) connected via an amide bond to a 4-aminopyridine ring. This pyridine ring is further substituted with a sulfonamide group (SO₂NH-) and a phenyl ring. The phenyl ring is connected to a quinoline system. The quinoline system is also substituted with an amide group (NH-CO-) and a tert-butyl group. The polyether chain is terminated by a trifluoromethyl group (CF₃).	1311,5
BzL-73	 Chemical structure of BzL-73: A complex molecule featuring a long, flexible polyether chain (poly(ethylene glycol) derivative) connected via an amide bond to a 4-aminopyridine ring. This pyridine ring is further substituted with a sulfonamide group (SO₂NH-) and a phenyl ring. The phenyl ring is connected to a quinoline system. The quinoline system is also substituted with an amide group (NH-CO-) and a tert-butyl group. The polyether chain is terminated by a trifluoromethyl group (CF₃).	1298,5

BzL-74		1312,5
BzL-75		890,0
BzL-76		1005,1

BzL-80	 Chemical structure of BzL-80: A complex molecule featuring a 2,4,6-trifluorophenyl group linked via an ester to a long poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated by a sulfonamide group. Another sulfonamide group is attached to a benzimidazole ring system, which is also linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group. A third sulfonamide group is attached to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an ester linkage.	1085,1
BzL-81	 Chemical structure of BzL-81: A complex molecule featuring a 2,4,6-trifluorophenyl group linked via an ester to a long poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated by a sulfonamide group. Another sulfonamide group is attached to a benzimidazole ring system, which is also linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group. A third sulfonamide group is attached to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an ester linkage.	1251,4
BzL-82	 Chemical structure of BzL-82: A complex molecule featuring a 2,4,6-trifluorophenyl group linked via an ester to a long poly(ethylene glycol) (PEG) chain. The PEG chain is terminated by a sulfonamide group. Another sulfonamide group is attached to a benzimidazole ring system, which is also linked to a 2,4,6-trifluorophenyl group. A third sulfonamide group is attached to a 2,4,6-trifluorophenyl group via an ester linkage.	1083,1

BzL-83	 The chemical structure of BzL-83 features a central 8-aminonaphthalene-1-sulfonyl group. This group is connected via a sulfonamide linkage to a 4-membered pyrrolidine ring. The pyrrolidine ring is further linked to a long, flexible polyether chain consisting of six repeating units of -CH2CH2OCH2CH2-. The other end of this chain is attached to a 2,4,6-trifluorophenyl group through an ester linkage (-COO-). Additionally, the naphthalene ring has a side chain at the 1-position, which includes a carbonyl group, a tertiary amine with a propyl group, and a secondary amide with an ethyl group.	976,1
BzL-84	 The chemical structure of BzL-84 is similar to BzL-83, featuring the same 8-aminonaphthalene-1-sulfonyl core and pyrrolidine linker. However, the polyether chain is longer, containing eight repeating units of -CH2CH2OCH2CH2-. The chain is terminated at one end by a 2,4,6-trifluorophenyl group via an ester linkage, and at the other end by a 4-membered cyclobutane ring via an amide linkage (-CONH-). The naphthalene ring also has a side chain at the 1-position, which includes a carbonyl group, a tertiary amine with a propyl group, and a secondary amide with a cyclobutyl group.	1325,5

BzL-85	 Chemical structure of BzL-85: A complex molecule featuring a 4-aminoquinoline ring system. The quinoline is substituted with a sulfonamide group (-SO₂NH-) linked to a cyclopropylmethyl group. Another branch from the quinoline is a carbonyl group (-C(=O)-) linked to a 4-ethylpiperazine ring. A third branch is a carbonyl group (-C(=O)-) linked to a 4-ethoxybutyl chain, which is further linked to a 4-(2,3,4,5-tetrafluorophenyl)butyrate ester group.	977,0
BzL-86	 Chemical structure of BzL-86: A complex molecule featuring a 4-aminoquinoline ring system. The quinoline is substituted with a sulfonamide group (-SO₂NH-) linked to a cyclopropylmethyl group. Another branch from the quinoline is a carbonyl group (-C(=O)-) linked to a 4-(2,2,2-trifluoroethyl)piperazine ring. A third branch is a carbonyl group (-C(=O)-) linked to a 4-(2,3,4,5-tetrafluorophenyl)butyrate ester group, which is further linked to a 4-(2,3,4,5-tetrafluorophenyl)butyrate ester group.	1254,3

BzL-87		1224,4

Иммуноконъюгаты

Иллюстративные варианты иммуноконъюгатов включают антитело, ковалентно присоединенное к двухвалентному линкеру, который ковалентно присоединен к одному или более фрагментам аминокбензазепина, и имеют Формулу I:



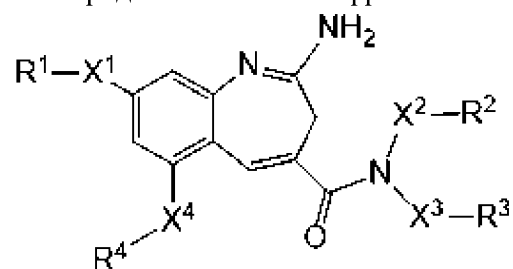
или их фармацевтически приемлемая соль,

где:

Ab представляет собой антитело;

p является целым числом от 1 до 8;

Bza представляет собой фрагмент аминокбензазепина, имеющий формулу:



R^1 , R^2 , R^3 , и R^4 независимо выбраны из группы, состоящей из H, C_1 - C_{12} алкила, C_2 - C_6 алкенила, C_2 - C_6 алкинила, C_3 - C_{12} карбоциклила, C_6 - C_{20} арила, C_2 - C_9 гетероциклила и C_1 - C_{20} гетероарила, где алкил, алкенил, алкинил, карбоциклил, арил, гетероциклил и гетероарил независимо и необязательно замещены одной или более группами, выбранными из:



- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—*;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—NR⁵—C(=NR⁵)NR⁵—*;
- (C₆-C₂₀ арил);
- (C₆-C₂₀ арил)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—C(=NR^{5a})N(R⁵)—*;
- (C₂-C₂₀ гетероциклил);
- (C₂-C₂₀ гетероциклил)—*;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—NR⁵—C(=NR^{5a})NR⁵—*;
- (C₁-C₂₀ гетероарил);
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—*;
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—NR⁵—C(=NR^{5a})N(R⁵)—*;
- C(=O)—*;
- C(=O)—(C₂-C₂₀ гетероциклилдиил)—*;
- C(=O)N(R⁵)₂;
- C(=O)N(R⁵)—*;
- C(=O)N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)C(=O)R⁵;
- C(=O)N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)C(=O)N(R⁵)₂;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)CO₂R⁵;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)C(=NR^{5a})N(R⁵)₂;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵C(=NR^{5a})R⁵;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₈ алкилдиил)—NR⁵(C₂-C₅ гетероарил);
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₂₀ гетероарилдиил)—N(R⁵)—*;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₂₀ гетероарилдиил)—*;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₂₀ гетероарилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₂₀ гетероарилдиил)—(C₂-C₂₀ гетероциклилдиил)—C(=O)NR⁵—
- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*;
- N(R⁵)₂;
- N(R⁵)—*;
- N(R⁵)C(=O)R⁵;
- N(R⁵)C(=O)—*;
- N(R⁵)C(=O)N(R⁵)₂;

$\text{—N(R}^5\text{)C(=O)N(R}^5\text{)—*}$;
 $\text{—N(R}^5\text{)CO}_2\text{R}^5$;
 $\text{—NR}^5\text{C(=NR}^{5a}\text{)N(R}^5\text{)}_2$;
 $\text{—NR}^5\text{C(=NR}^{5a}\text{)N(R}^5\text{)—*}$;
 $\text{—NR}^5\text{C(=NR}^{5a}\text{)R}^5$;
 $\text{—N(R}^5\text{)—(C}_2\text{—C}_5\text{ гетероарил)}$;
 $\text{—O—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкил)}$;
 $\text{—O—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)}_2$;
 $\text{—O—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)—*}$;
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{ гетероциклилдиил)—*}$;
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{ гетероциклилдиил)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)}_2$;
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{ гетероциклилдиил)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—NR}^5\text{—*}$; и
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{ гетероциклилдиил)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—OH}$;
 или R^2 и R^3 вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

X^1 , X^2 , X^3 , и X^4 независимо выбраны из группы, состоящей из связи, C(=O) , $\text{C(=O)N(R}^5\text{)}$, O , $\text{N(R}^5\text{)}$, S , S(O)_2 и $\text{S(O)}_2\text{N(R}^5\text{)}$;

R^5 выбран из группы, состоящей из H , $\text{C}_6\text{—C}_{20}$ арила, $\text{C}_6\text{—C}_{20}$ арилдиила, $\text{C}_1\text{—C}_{12}$ алкила, и $\text{C}_1\text{—C}_{12}$ алкилдиила, или две группы R^5 вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

R^{5a} выбран из группы, состоящей из $\text{C}_6\text{—C}_{20}$ арила и $\text{C}_1\text{—C}_{20}$ гетероарила;

где звездочка * указывает на сайт присоединения L , и где один из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 присоединен к L ;

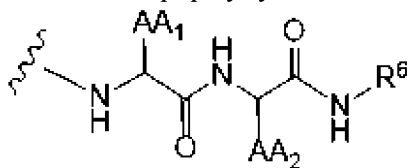
L представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из:

—C(=O)—(ПЭГ)— ;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—}$;
 —C(=O)—(ПЭГ)—O— ;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)N(R}^5\text{)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)N(R}^5\text{)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)C(=O)—(C}_2\text{—C}_5\text{ моногетероциклилдиил)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)N(R}^5\text{)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—(MCgluc)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(MCgluc)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—N(R}^5\text{)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—N(R}^5\text{)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—N(R}^5\text{)C(=O)—(C}_2\text{—C}_5\text{ моногетероциклилдиил)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—N(R}^5\text{)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—N(R}^5\text{)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—N}^+(\text{R}^5\text{)}_2\text{—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—N(R}^5\text{)CH(AA}_1\text{)C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—}$;
 $\text{—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—N(R}^5\text{)CH(AA}_1\text{)C(=O)—N(R}^5\text{)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{ алкилдиил)—}$;

$—C(=O)—(ПЭГ)—SS—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—OC(=O)—;$
 $—C(=O)—(ПЭГ)—SS—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—C(=O)—;$
 $—C(=O)—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—C(=O)—(PEP)—;$
 $—C(=O)—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—C(=O)—(PEP)—N(R^5)—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—;$
 $—C(=O)—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—C(=O)—(PEP)—N(R^5)—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—$
 $N(R^5)—C(=O);$
 $—C(=O)—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—C(=O)—(PEP)—N(R^5)—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—$
 $N(R^5)C(=O)—(C_2-C_5 \text{ моногетероциклдиил})—;$
 $—C(=O)—CH_2CH_2OCH_2CH_2—(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})—CH_2O—(ПЭГ)—C(=O)—$
 $(MCgluc)—;$
 $—C(=O)—CH_2CH_2OCH_2CH_2—(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})—CH_2O—(ПЭГ)—C(=O)—$
 $(MCgluc)—N(R^5)—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—N(R^5)C(=O)—(C_2-C_5 \text{ моногетероциклдиил})—;$ и
 $—(\text{сукцинимидил})—(CH_2)_m—C(=O)—(PEP)—N(R^5)—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—$
 $N(R^5)C(=O)—(C_2-C_5 \text{ моногетероциклдиил})—;$

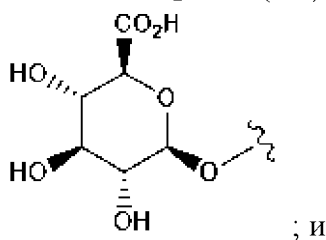
ПЭГ имеет формулу: $—(CH_2CH_2O)_n—(CH_2)_m—$; m является целым числом от 1 до 5, а n является целым числом от 2 до 50;

PEP имеет формулу:

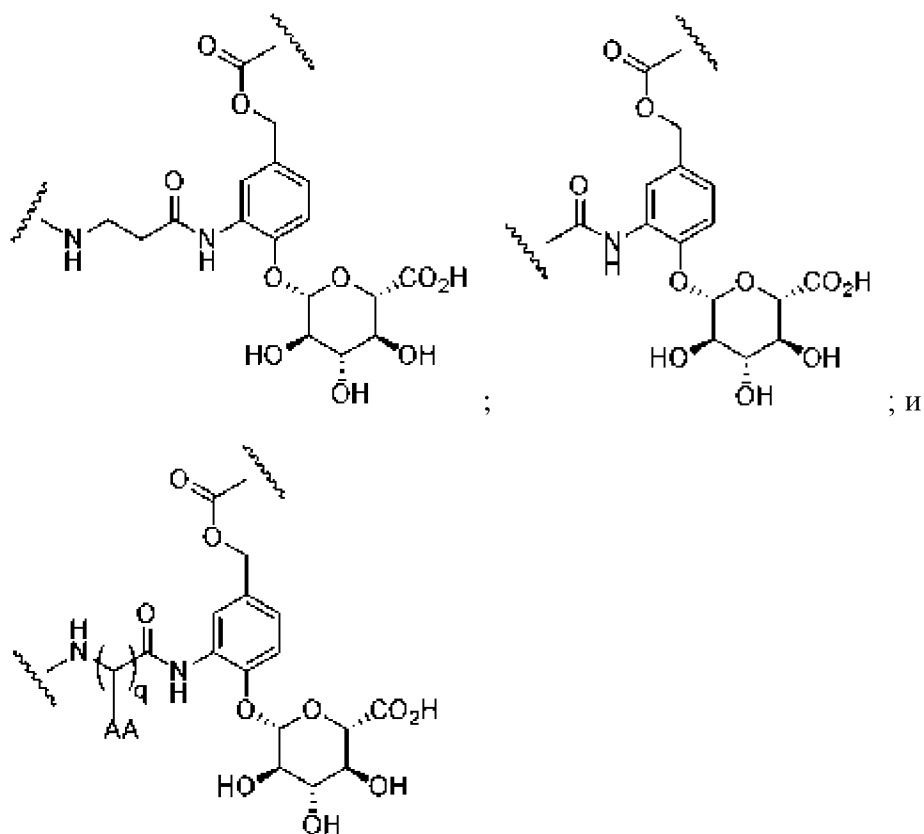


где AA₁ и AA₂ независимо выбраны из боковой цепи аминокислоты, или AA₁ или AA₂ и соседний атом азота образуют 5-членное кольцо пролиновой аминокислоты, а волнистая линия указывает на точку присоединения;

R⁶ выбран из группы, состоящей из C₆-C₂₀ арилдиила и C₁-C₂₀ гетероарилдиила, замещенного $—CH_2O—C(=O)—$ и необязательно:



MCgluc выбран из групп:



где q равно от 1 до 8, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты; и алкил, алкилдиил, алкенил, алкенилдиил, алкинил, алкинилдиил, арил, арилдиил, карбоциклил, карбоциклилдиил, гетероциклил, гетероциклилдиил, гетероарил и гетероарилдиил необязательно замещены одной или более группами, независимо выбранными из F, Cl, Br, I, $-\text{CN}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CHF}_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CN}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{COCH}_3$, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$, $-\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONHCH}_3$, $-\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{NHCOCH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{COCH}_3$, $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$, $-\text{NHC}(\text{=NH})\text{H}$, $-\text{NHC}(\text{=NH})\text{CH}_3$, $-\text{NHC}(\text{=NH})\text{NH}_2$, $-\text{NHC}(\text{=O})\text{NH}_2$, $-\text{NO}_2$, $=\text{O}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$, $(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{SCH}_3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$, и $-\text{S}(\text{O})_3\text{H}$.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает в себя антитело, представляющее собой конструкцию антитела, которая содержит антигенсвязывающий домен, который связывает PD-L1

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает в себя антитело, выбранное из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба и авелумаба или их биосимиляра, или биобеттера.

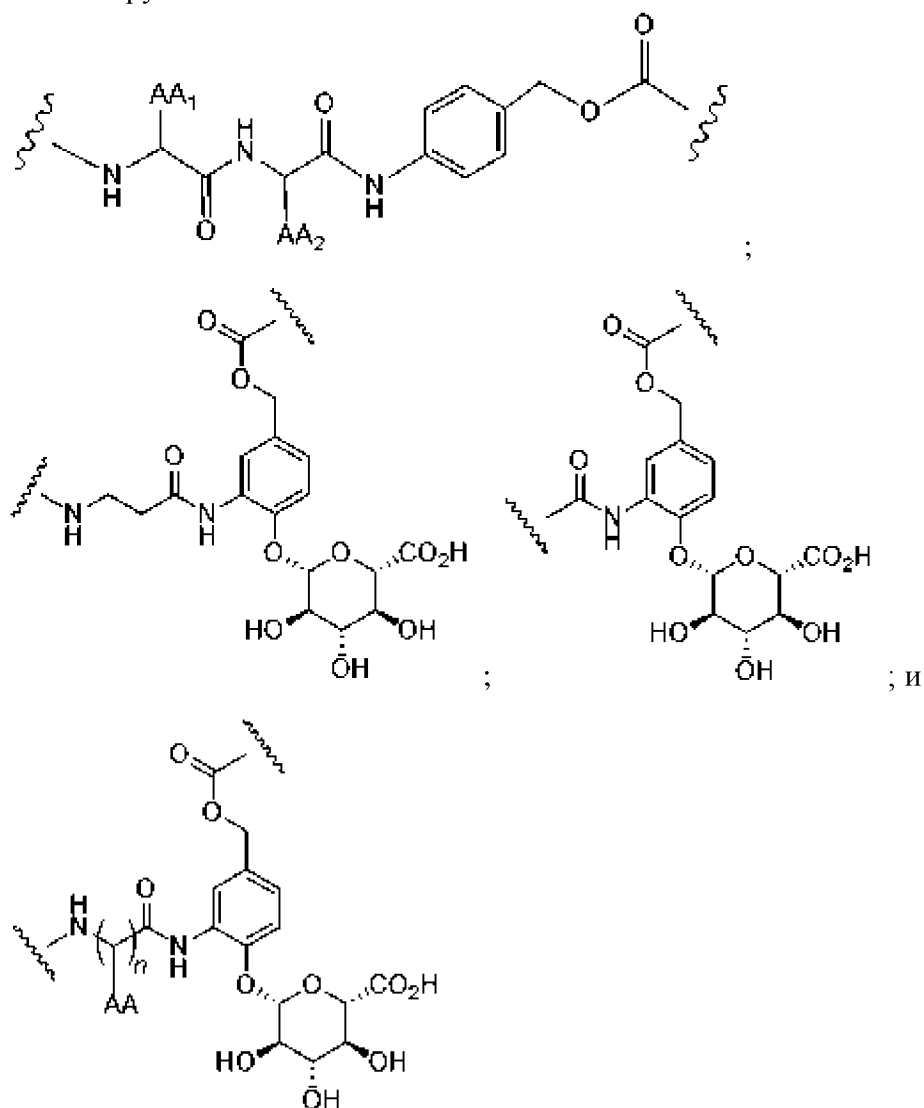
Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает в себя антитело, представляющее собой конструкцию антитела, которая содержит антигенсвязывающий домен, который связывает HER2.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает в себя антитело, выбранное из группы, состоящей из трастузумаба и пертузумаба или их биосимиляра, или биобеттера.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает в себя антитело, представляющее собой конструкцию антитела, которая содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CEA.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает в себя антитело, представляющее собой лабетузумаб или его биосимилар или биобеттер.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает в себя PEP, выбранный из групп:



где n равно 1 или более, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты.

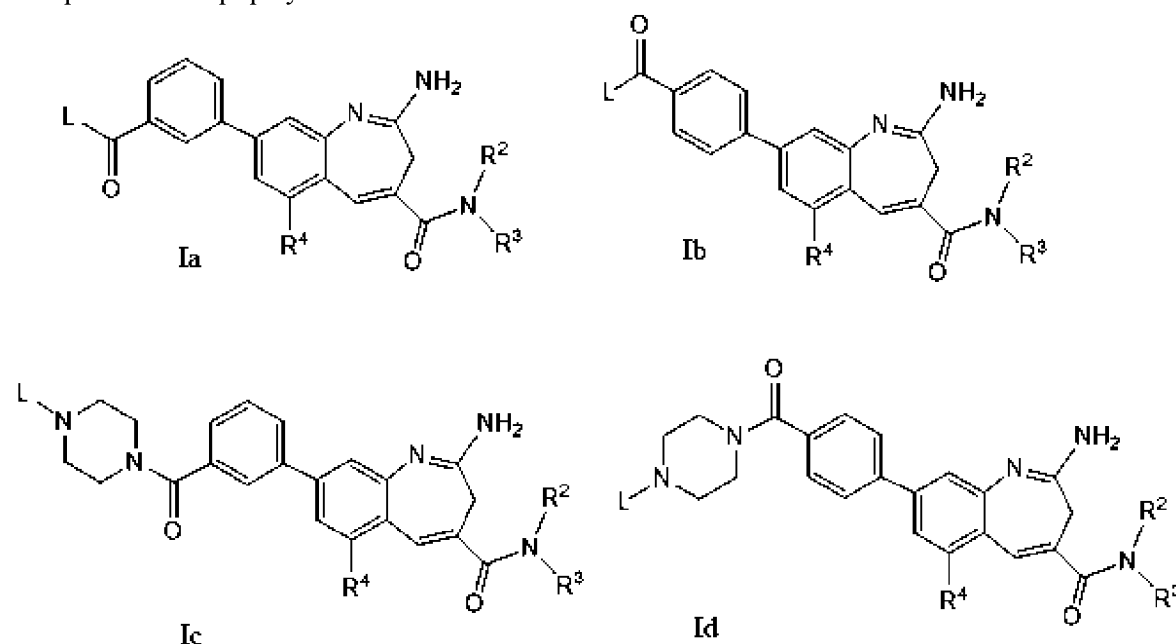
Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает в себя AA₁ и AA₂ независимо выбранные из боковой цепи встречающейся в природе аминокислоты.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает AA₁ и AA₂ независимо выбранные из H, —CH₃, —CH(CH₃)₂, —CH₂(C₆H₅), —CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, —CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂, —CH₂CH(CH₃)₂, —CH₂SO₃H и —CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂.

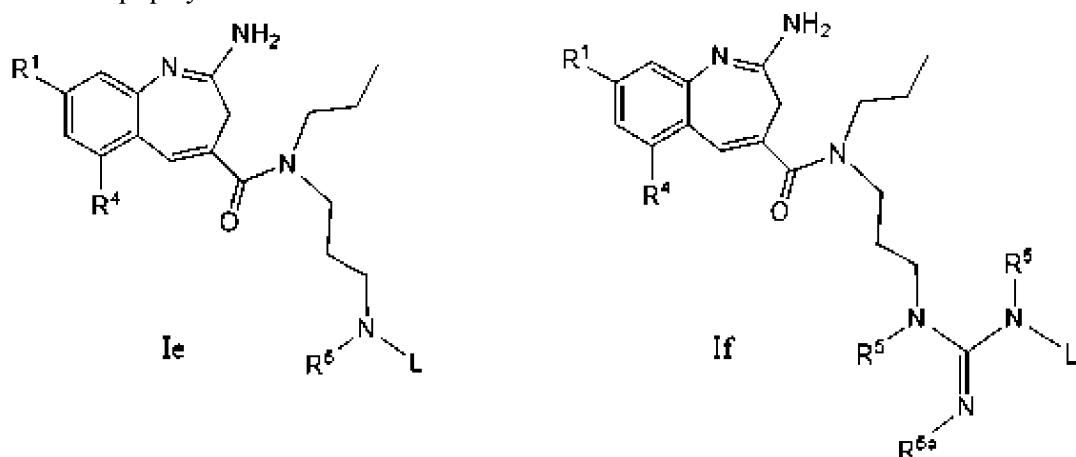
Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает AA₁, представляющее собой —CH(CH₃)₂, и AA₂ представляющее собой —CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает AA₁ и AA₂ независимо выбранные из GlcNAc аспаргиновой кислоты, —CH₂SO₃H, и —CH₂OPO₃H.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает в себя Bza, выбранный из формул Ia-d:



Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает в себя Bza, выбранный из формул Ie и If:



где R^{5a} формулы If представляет собой фенил, необязательно замещенный одной или более группами, выбранными из F, Cl, Br, I, —CN и —NO₂.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает L, представляющий собой —C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—.

(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает R² и R³ один из которых выбран из:

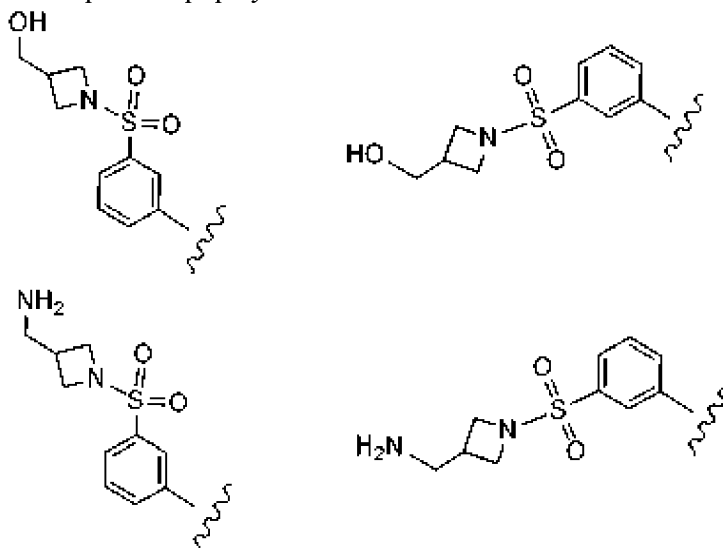
- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—O—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)C(=NR⁵)—N(R⁵)—*;
- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—(C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—(C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—C(=NR⁵)N(R⁵)—*;
- (C₂-C₆ алкилдиил)—N(R⁵)—*; и
- (C₂-C₆ алкилдиил)—N(R⁵)C(=NR⁵)N(R⁵)—*;

X² и X³ представляют собой связь, и где звездочка * указывает на сайт присоединения L.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает R¹ и R⁴, один из которых выбран из —(C₆-C₂₀ арилдиил)—S(=O)₂—(C₂-C₂₀ гетероциклилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂ и —(C₆-C₂₀ арилдиил)—S(=O)₂—(C₂-C₂₀ гетероциклилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—ОН.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает C₆-C₂₀ арилдиил, представляющий собой фенилдиил, и C₂-C₂₀ гетероциклилдиил, представляющий собой азетидиндиил.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает R¹ и R⁴, один из которых выбран из формул:

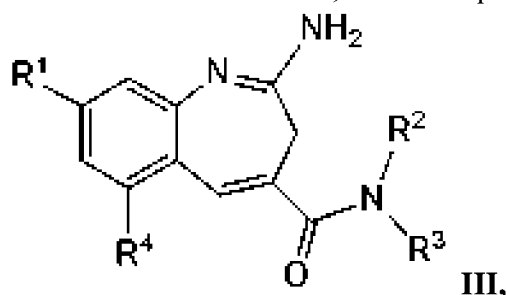


Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает R¹ и R⁴ один из которых представляет собой —C(=O)NR⁵—(C₁-C₂₀ гетероарилдиил)—(C₂-C₂₀ гетероциклилдиил)—C(=O)NR⁵—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—L.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** включает C₁-C₂₀ гетероарилдиил, представляющий собой пиридиндиил, и C₂-C₂₀ гетероциклилдиил, представляющий собой пиперидиндиил.

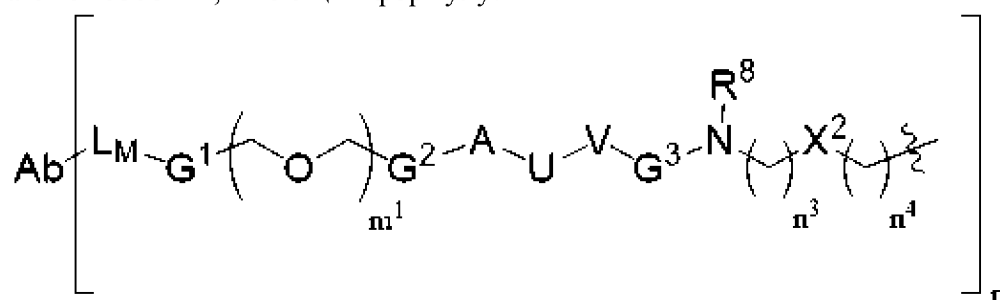
В иллюстративном варианте осуществления p равно 1, 2, 3 или 4.

Иллюстративные варианты иммуноконъюгатов включают антитело, ковалентно присоединенное к линкеру, который ковалентно присоединен к одному или более фрагментам аминобензазепина, и имеют формулу **III**:

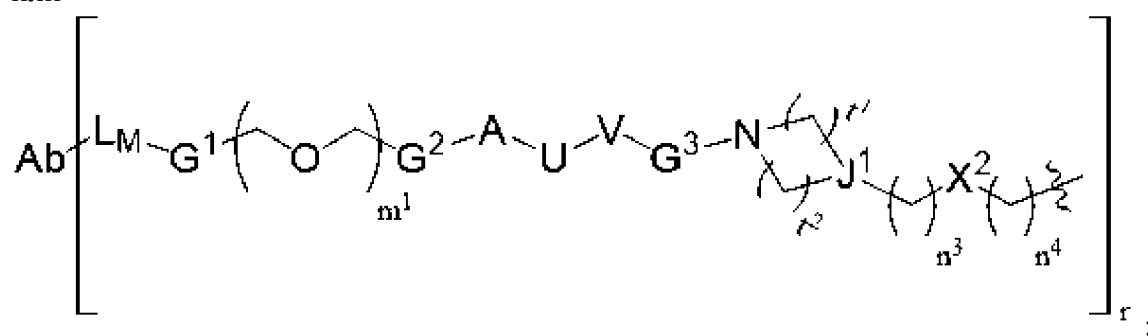


его фармацевтически приемлемую соль или его четвертичную аммониевую соль, где

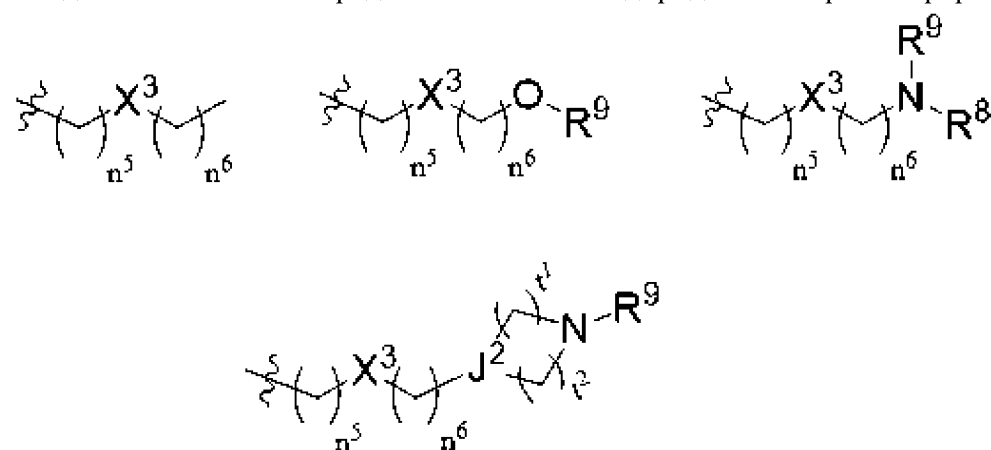
R^1 , R^2 , R^3 , и R^4 независимо представляют собой Y или Z, где один из R^1 , R^2 , R^3 , и R^4 представляет собой Y, имеющий формулу:



или



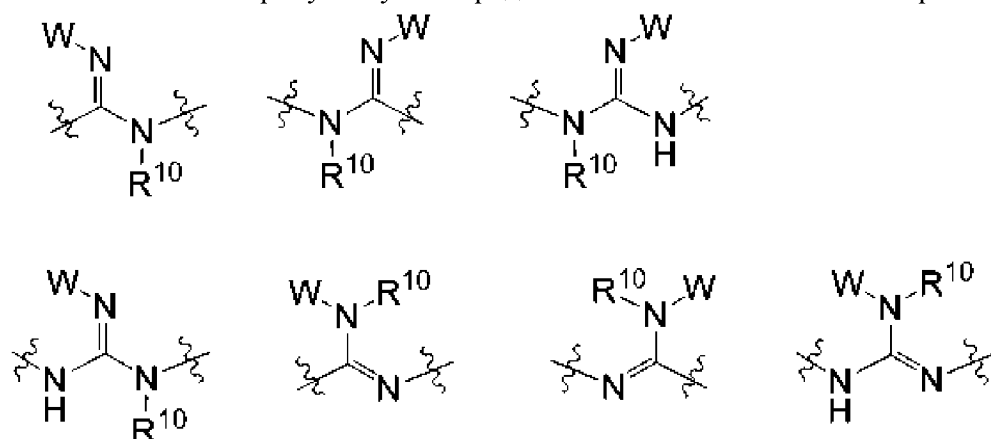
каждый Z независимо представляет собой водород или выбран из формул:



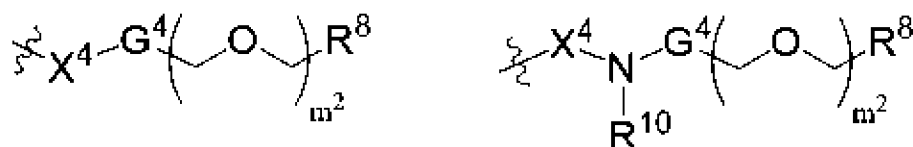
;

U необязательно присутствует и представляет собой CH_2 , C(=O) , $\text{CH}_2\text{C(=O)}$, или C(=O)CH_2 ,

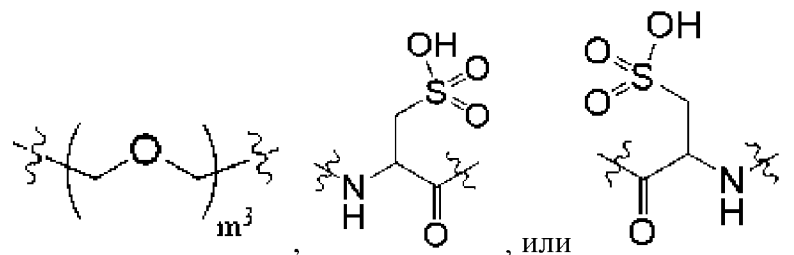
A необязательно присутствует и представляет собой NR^{10} или выбран из формул:



R^{10} и W независимо представляют собой водород, Ar^1 , или формулу:



V необязательно присутствует и имеет формулу:



J^1 и J^2 независимо представляют собой CH или N ,

m^1 , m^2 , и m^3 независимо являются целыми числами от 0 до 25, за исключением того, что по меньшей мере одно из m^1 , m^2 , и m^3 является ненулевым целым числом,

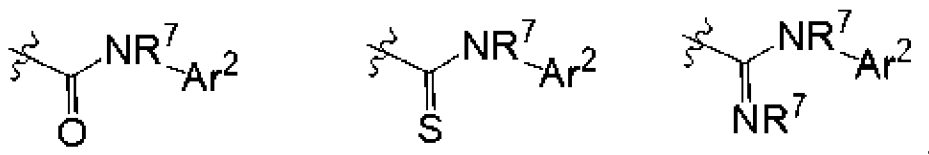
n^1 , n^2 , n^3 , n^4 , n^5 , и n^6 независимо являются целыми числами от 0 до 10,

t^1 и t^2 независимо являются целыми числами от 1 до 3,

G^1 , G^2 , G^3 , и G^4 независимо представляют собой CH_2 , C(=O) , $\text{CH}_2\text{C(=O)}$, C(=O)CH_2 , или связь,

X^1 , X^2 , X^3 , и X^4 необязательно присутствуют и независимо представляют собой O , NR^7 , CHR^7 , SO_2 , S , или одну или две циклоалкилдиильную, гетероциклоалкилдиильную, арилдиильную или гетероарилдиильную группы, и когда присутствует более, чем одна циклоалкилдиильная, гетероциклоалкилдиильная, арилдиильная или гетероарилдиильная группы, более чем одна циклоалкилдиильная, гетероциклоалкилдиильная, арилдиильная, или гетероарилдиильная группы связаны или слиты, причем, связанные циклоалкилдиильная, гетероциклоалкилдиильная, арилдиильная или гетероарилдиильная группы связаны через связь или $-\text{CO}-$,

R^9 представляет собой водород, C_1 - C_4 алкил или выбран из формул:



R^8 независимо представляет собой водород или C_1 - C_4 алкил,

Ar^1 и Ar^2 независимо представляют собой арильную или гетероарильную группу, необязательно замещенную одним или более галогенами (например, фтором, хлором, бромом или йодом), нитрилами, гидроксилами, C_1 - C_4 алкильными группами или их комбинацией,

L_M представляет собой связывающий фрагмент, который включает функциональную группу, выбранную из амида, амина, сложного эфира, карбамата, мочевины, тиозфира, тиокарбамата, тиокарбоната и тиомочевины,

g является целым числом от 1 до 10,

Ab представляет собой антитело, и

каждая волнистая линия () представляет собой точку присоединения.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **III** включает в себя индекс g равный 1.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** или **III** включает в себя антитело, представляющее собой конструкцию антитела, которая содержит антигенсвязывающий домен, который связывает PD-L1.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** или **III** включает в себя антитело, выбранное из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба и авелумаба или их биосимиляра, или биобеттера.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** или **III** включает в себя антитело, представляющее собой конструкцию антитела, которая содержит антигенсвязывающий домен, который связывает HER2.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** или **III** включает в себя антитело, выбранное из группы, состоящей из трастузумаба и пертузумаба или их биосимиляра, или биобеттера.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** или **III** включает в себя антитело, представляющее собой конструкцию антитела, которая содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CEA.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы **I** или **III** включает в себя антитело, выбранное из группы, состоящей из лабетузумаба (также известного как MN-14, hMN14 или CEA-CIDETM), PR1A3, MFE-23, SM3E или их биосимиляра, или биобеттера.

Изобретение включает в себя все разумные комбинации и преобразования характерных особенностей вариантов формулы **I** и **III**.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгаты по изобретению включают соединения, обладающие иммуностимулирующей активностью. Конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению избирательно доставляют эффективную

дозу аминокбензазепинового лекарственного средства в опухолевую ткань, что позволяет достичь большей избирательности (*т.е.* более низкой эффективной дозы) при увеличении терапевтического индекса («терапевтического диапазона») по сравнению с неконъюгированным аминокбензазепином.

Нагрузка лекарственного средства представлена p , числом фрагментов аминокбензазепина на антитело в иммуноконъюгате формулы I или III. Нагрузка лекарственного средства (аминокбензазепина) может варьироваться от 1 до около 8 фрагментов лекарственного средства (D) на антитело. Иммуноконъюгаты формул I и III включают смеси или коллекции антител, конъюгированных с рядом лекарственных компонентов, от 1 до около 8. В некоторых вариантах осуществления количество лекарственных компонентов, которые могут быть конъюгированы с антителом, ограничено количеством реакционноспособных или доступных остатков аминокислотных боковых цепей, таких как лизин и цистеин. В некоторых вариантах осуществления свободные цистеиновые остатки вводят в аминокислотную последовательность антитела описанными в данном документе способами. В таких аспектах p может быть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, и диапазонах данных чисел, например, от 1 до 8 или от 2 до 5. В любом таком аспекте p и n равны (*т. е.* $p=n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ или 8, или некоторому диапазону между ними). Иллюстративные конъюгаты антитело-лекарственное средство формулы I включают, но не ограничиваются ими, антитела, которые содержат 1, 2, 3 или 4 сконструированных цистеиновых аминокислот. (Lyon, R. И др. (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138). В некоторых вариантах осуществления один или более свободных цистеиновых остатков уже присутствуют в антителе, образующем внутрицепочечные дисульфидные связи, без использования инженерии, и в этом случае существующие свободные цистеиновые остатки можно использовать для конъюгирования антитела с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления антитело подвергают воздействию восстанавливающих условий перед конъюгацией антитела для образования одного или более свободных цистеиновых остатков.

Для некоторых иммуноконъюгатов p может быть ограничено количеством сайтов присоединения на антителе. Например, если присоединение представляет собой тиол цистеина, как в некоторых иллюстративных вариантах осуществления, описанных в данном документе, антитело может иметь только одну или ограниченное количество тиоловых групп цистеина, или может иметь только одну или ограниченное количество достаточно реакционноспособных тиоловых групп, к которым может присоединиться лекарственное средство. В других вариантах осуществления одна или более аминокислотных групп лизина в антителе могут быть доступными и реакционноспособными для конъюгации с аминокбензазепин-линкерным соединением формулы II. В некоторых вариантах осуществления более высокая нагрузка лекарственного средства, *например*, $p > 5$, может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю проницаемости в клетки определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления средняя нагрузка лекарственного средства для иммуноконъюгата

составляет от 1 до около 8; от около 2 до около 6; или от около 3 до около 5. В некоторых вариантах осуществления антитело подвергают денатурирующим условиям для выявления реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин.

Нагрузку (соотношение лекарственное средство/антитело) иммуноконъюгата можно контролировать различными способами, например: (i) ограничивая молярный избыток промежуточного аминокислоты-линкерного соединения по отношению к антителу, (ii) ограничивая время реакции конъюгации или температуру и (iii) условиями частичного или предельного восстановительного денатурирования для оптимизации реакционной способности антитела.

Следует понимать, что если более чем одна нуклеофильная группа антитела взаимодействует с лекарственным средством, тогда полученный продукт представляет собой смесь соединений конъюгатов антитело-лекарственное средство с распределением одного или более фрагментов лекарственного средства, присоединенных к антителу. Среднее количество лекарственных средств на антитело можно рассчитать из смеси с помощью двойного анализа антител ELISA, который специфичен для антитела и специфичен для лекарственного средства. Отдельные молекулы иммуноконъюгата могут быть идентифицированы в смеси с помощью масс-спектропии и разделены с помощью ВЭЖХ, например хроматография гидрофобного взаимодействия (см, например, McDonagh и др. (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). В некоторых вариантах осуществления гомогенный иммуноконъюгат с одной величиной нагрузки может быть выделен из конъюгационной смеси с помощью электрофореза или хроматографии.

Иллюстративный вариант иммуноконъюгата формулы I выбран из таблиц 3a, 3b, 3c Иммуноконъюгаты.

Таблица 3a: Иммуноконъюгаты (IC)

Иммуноконъюгат No.	BzL линкер- адъювант Таблица 2a	Антитело Антиген	DAR	Секреция миелоидного ФНО α EC50, нМ
IC-1	BzL-2	Трастузумаб HER2	2,33	> 1000
IC-2	BzL-3	Трастузумаб HER2	2,06	14,8

IC-3	BzL-4	Трастузумаб HER2	2,05	> 1000
IC-4	BzL-5	Трастузумаб HER2	1,82	> 1000
IC-5	BzL-7	Трастузумаб HER2	1,6	н/о
IC-6	BzL-8	Трастузумаб HER2	0,5	н/о
IC-7	BzL-9	Трастузумаб HER2	1,6	н/о
IC-8	BzL-15	Трастузумаб HER2	1,9	233,7
IC-9	BzL-15	авелумаб PD-L1	2,16	161,03
IC-10	BzL-16	Трастузумаб HER2	2,49	> 1000
IC-11	BzL-17	Трастузумаб HER2	1,84	> 1000
IC-12	BzL-18	Трастузумаб HER2	2,49	> 1000
IC-13	BzL-19	Трастузумаб HER2	2,05	> 1000
IC-14	BzL-20	Трастузумаб HER2	1,91	> 1000
IC-15	BzL-21	авелумаб PD-L1	2,85	199,5
IC-16	BzL-21	Трастузумаб HER2	1,74	> 1000
IC-17	BzL-22	Трастузумаб HER2	2,65	> 1000
IC-18	BzL-25	Трастузумаб HER2	н/о	н/о
IC-19	BzL-27	Трастузумаб	1,61	> 1000

		HER2		
IC-20	BzL-31	Трастузумаб HER2	2,57	788
IC-21	BzL-28	Трастузумаб HER2	2,39	> 1000

Таблица 3b: Иммуноконъюгаты (IC)

Иммуноконъюгат No.	BzL линкер- адъювант Таблица 2b	Антитело Антиген	DAR	Секреция миелоидного ФНО α EC50, нМ
IC-22	BzL-33	Трастузумаб HER2	2,37	> 1000
IC-23	BzL-35	Трастузумаб HER2	2,65	464
IC-24	BzL-36	Трастузумаб HER2	2,60	> 1000
IC-25	BzL-37	Трастузумаб HER2	2,28	> 1000
IC-26	BzL-38	Трастузумаб HER2	2,0	62
IC-27	BzL-34	Трастузумаб HER2	2,06	97
IC-28	BzL-39	Трастузумаб HER2	2,32	> 1000
IC-29	BzL-40	Трастузумаб HER2	2,95	> 1000
IC-30	BzL-41	Трастузумаб HER2	2,83	459
IC-31	BzL-42	Трастузумаб HER2	2,05	17,2
IC-32	BzL-43	Трастузумаб HER2	2,05	133
IC-33	BzL-44	Трастузумаб HER2	2,0	71

IC-34	BzL-45	Трастузумаб HER2	2,26	78
IC-35	BzL-46	Трастузумаб HER2	1,54	68

Таблица 3с: Иммуноконъюгаты (IC)

Иммуноконъюгат No.	BzL линкер-адъювант Таблицы 2а-с	Антитело Антиген	DAR
IC-36	BzL-40	PDL1.24-G1f	2,39
IC-37	BzL-39	PDL1.24-G1f	1,6
IC-38	BzL-49	Трастузумаб HER2	2,24
IC-39	BzL-35	Ритуксимаб CD20	2,40
IC-40	BzL-50	Трастузумаб HER2	2,48
IC-41	BzL-51	Трастузумаб HER2	2,57
IC-42	BzL-52	Трастузумаб HER2	2,62
IC-43	BzL-53	Трастузумаб HER2	2,18
IC-44	BzL-55	Трастузумаб HER2	2,18
IC-45	BzL-56	Трастузумаб HER2	1,96
IC-46	BzL-35	анти-mPD-L1	2,27
IC-47	BzL-35	крысиный IgG2b изотипический контроль	2,4
IC-48	BzL-49	PDL1.85-G1f	2,21
IC-49	BzL-49	PDL1.85-G1f	2,21
IC-50	BzL-54	Трастузумаб HER2	2,13 2,36
IC-51	BzL-49	CEA.5G1fhL2	2,35

IC-52	BzL-57	Трастузумаб HER2	2,58
IC-53	BzL-60	Трастузумаб HER2	2,11
IC-54	BzL-62	Трастузумаб HER2	2,46
IC-55	BzL-58	Трастузумаб HER2	2,35
IC-56	BzL-65	Трастузумаб HER2	1,80
IC-57	BzL-35	CEA.5G1fhL2	2,21
IC-58	BzL-35	Tras-G1f-N297A	2,34
IC-59	BzL-66	Трастузумаб HER2	2,38
IC-60	BzL-67	Трастузумаб HER2	2,15 1,93
IC-61	BzL-68	Трастузумаб HER2	2,36
IC-62	BzL-69	Трастузумаб HER2	2,15 2,99
IC-63	BzL-69	Ритуксимаб CD20	2,60
IC-64	BzL-69	Tras-G1f-N297A	2,41
IC-65	BzL-70	Трастузумаб HER2	2,39
IC-66	BzL-72	Трастузумаб HER2	2,39
IC-67	BzL-41	CEA.9-G1fhL2	2,26
IC-68	BzL-35	CEA.9-G1fhL2	2,37
IC-69	BzL-69	CEA.9-G1fhL2	2,41
IC-70	BzL-63	Трастузумаб HER2	2,24
IC-71	BzL-64	Трастузумаб HER2	2,34

IC-72	BzL-35	PDL1.24-G1f	2,66
IC-73	BzL-35	PDL1.85-G1f	2,84
IC-74	BzL-73	Трастузумаб HER2	2,17
IC-75	BzL-74	Трастузумаб HER2	2,74
IC-76	BzL-77	Трастузумаб HER2	2,43
IC-77	BzL-76	Трастузумаб HER2	1,19
IC-78	BzL-78	Трастузумаб HER2	2,10
IC-79	BzL-75	Трастузумаб HER2	1,45
IC-80	BzL-69	CEACAM5	1,84 2,74
IC-81	BzL-77	CEA.9-G1fhL2	2,39 2,45
IC-82	BzL-72	CEA.9-G1fhL2	2,70
IC-83	BzL-74	CEA.9-G1fhL2	2,41
IC-84	BzL-80	CEA.9-G1fhL2	1,81
IC-85	BzL-69	PDL1.85-G1f	2,69
IC-86	BzL-80	Трастузумаб HER2	2,92
IC-87	BzL-82	Трастузумаб HER2	2,56
IC-88	BzL-77	PDL1.85-G1f	2,55
IC-89	BzL-74	PDL1.85-G1f	2,68
IC-90	BzL-81	Трастузумаб HER2	1,91
IC-91	BzL-85	Трастузумаб HER2	2,18
IC-92	BzL-69	Трастузумаб HER2	3,07

КОМПОЗИЦИИ ИММУНОКОНЬЮГАТОВ

В изобретении предлагается композиция, например, фармацевтически или фармакологически приемлемая композиция или состав, включающая множество иммуноконъюгатов, как описано в данном документе, и необязательно носитель для них, например, фармацевтически или фармакологически приемлемый носитель. Иммуноконъюгаты могут быть одинаковыми или разными в композиции, т.е. композиция может включать иммуноконъюгаты, которые содержат одинаковое количество адъювантов, связанных с одинаковыми положениями на конструкции антитела, и/или иммуноконъюгаты, которые содержат одинаковое количество адъювантов, связанных с разными положениями на конструкции антитела, которые содержат разное количество адъювантов, связанных с одними и теми же положениями на конструкции антитела, или которые имеют разное количество адъювантов, связанных с разными положениями на конструкции антитела.

В иллюстрационном варианте осуществления композиция, содержащая соединения иммуноконъюгата, включает смесь соединений иммуноконъюгата, где средняя нагрузка лекарственного средства на антитело в смеси соединений иммуноконъюгата составляет от около 2 до около 5.

Композиция иммуноконъюгатов по изобретению может иметь среднее отношение адъюванта к конструкции антитела от около 0,4 до около 10. Квалифицированный специалист поймет, что количество аминокислотных адъювантов, конъюгированных с конструкцией антитела, может варьироваться от иммуноконъюгата к иммуноконъюгату в композиции, включающей множество иммуноконъюгатов по изобретению, и, таким образом, соотношение адъюванта к конструкции антитела (например, антителу) можно измерить как среднее, что может быть обозначено, как соотношение лекарственного средства к антителу (DAR). Соотношение адъюванта к конструкции антитела (например, антитела) можно оценить любыми подходящими способами, многие из которых известны в данной области.

Среднее количество адъювантных фрагментов на антитело (DAR) в препаратах иммуноконъюгатов, полученных в результате реакций конъюгации, можно охарактеризовать обычными методами, такими как масс-спектрометрия, анализ ELISA и ВЭЖХ. Также можно определить количественное распределение иммуноконъюгатов в композиции с точки зрения p . В некоторых случаях разделение, очистка и характеристика однородных иммуноконъюгатов, в которых p равно определенному значению, от иммуноконъюгатов с другими лекарственными нагрузками может быть достигнуто с помощью таких способов, как обращенно-фазовая ВЭЖХ или электрофорез.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ

В других вариантах осуществления другой аспект изобретения относится к фармацевтическим композициям или лекарственным формам, включающим терапевтически эффективное количество иммуноконъюгата по изобретению и один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, носителей, наполнителей или

вспомогательных веществ.

Фармацевтические композиции могут быть в любой форме, позволяющей вводить их пациенту. Например, фармацевтическая композиция может быть в форме твердого вещества или жидкости. Типичные пути введения включают, без ограничения, парентеральный, глазной и внутриопухолевый. Парентеральное введение включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные или внутривенные инъекции или инфузионные способы. В одном варианте осуществления композиции вводят парентерально. В частном варианте осуществления композиции вводятся внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или более фармацевтически или фармакологически приемлемых наполнителей. Например, иммуноконъюгаты по изобретению могут быть сформированы для парентерального введения, такого как внутривенное введение или введение в полость тела или просвет органа. Альтернативно, иммуноконъюгаты можно вводить внутриопухолевым путем. Композиции для инъекций обычно включают раствор иммуноконъюгата, растворенный в фармацевтически приемлемом носителе. К приемлемым носителям и растворителям, которые можно использовать, относятся вода и изотонический раствор одной или более солей, таких как хлорид натрия, например раствор Рингера. Кроме того, стерильные нелетучие масла обычно можно использовать в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моноглицериды или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, аналогичным образом можно использовать при приготовлении инъекционных препаратов. Оптимально, чтобы эти композиции были стерильными и в целом не содержали нежелательных веществ. Эти композиции можно стерилизовать обычными, хорошо известными способами стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения их к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH агенты и буферные агенты, регулирующие токсичность агенты, например, ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и тому подобное.

Композиция может содержать любую подходящую концентрацию иммуноконъюгата. Концентрация иммуноконъюгата в композиции может широко варьироваться и выбирается, прежде всего, на основе объемов жидкости, вязкости, массы тела и т.п., в соответствии с конкретным выбранным способом введения и потребностями пациента. В некоторых вариантах осуществления концентрация иммуноконъюгата в составе раствора для инъекций будет находиться в диапазоне от около 0,1% (мас/мас) до около 10% (мас/мас).

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ИММУНОКОНЪЮГАТАМИ

В изобретении предложен способ лечения рака. Способ включает введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата, как описано в данном документе (например, в виде фармацевтической композиции, как описано в данном

документе), субъекту, который в этом нуждается, например субъекту, который болен раком и нуждается в лечении от рака. Способ включает введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата (IC), выбранного из таблицы 3.

Предполагается, что иммуноконъюгат по настоящему изобретению можно использовать для лечения различных гиперпролиферативных заболеваний или нарушений, например характеризуется сверхэкспрессией опухолевого антигена. Примеры гиперпролиферативных нарушений включают доброкачественные или злокачественные солидные опухоли и гематологические нарушения, такие как лейкоз и лимфоидные злокачественные новообразования.

В другом аспекте предоставлен иммуноконъюгат для использования в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления в изобретении представлен иммуноконъюгат для использования в способе лечения индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества иммуноконъюгата. В одном из таких вариантов осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, *например*, как описано в данном документе.

В другом аспекте изобретение предусматривает использование иммуноконъюгата в производстве или приготовлении лекарственного средства. В одном варианте осуществления лекарственное средство предназначено для лечения рака, причем способ включает введение индивидууму, страдающему раком, эффективного количества лекарственного средства. В одном из таких вариантов осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, *например*, как описано в данном документе.

Карциномы представляют собой злокачественные новообразования, возникающие в эпителиальных тканях. Эпителиальные клетки покрывают внешнюю поверхность тела, выстилают внутренние полости и образуют выстилку железистых тканей. Примеры карцином включают, но не ограничиваются ими, аденокарциному (рак, который начинается в железистых (секреторных) клетках, такой как рак груди, поджелудочной железы, легких, простаты, желудка, гастроэзофагеального перехода и толстой кишки) карциному надпочечников; гепатоцеллюлярную карциному; почечно-клеточную карциному; рак яичников; карциному *in situ*; протоковую карциному; рак груди; базально-клеточную карциному; плоскоклеточную карциному; переходноклеточную карциному; карциному толстой кишки; карциному носоглотки; мультилокулярную кистозно почечно-клеточную карциному; овсяноклеточную карциному; крупноклеточный рак легкого; мелкоклеточный рак легкого; немелкоклеточный рак легкого; и тому подобное. Карциномы могут быть обнаружены в предстательной железе, поджелудочной железе, толстой кишке, головном мозге (обычно в виде вторичных метастазов), легких, груди и коже. В некоторых вариантах осуществления способы лечения немелкоклеточной карциномы легкого включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструкцию

антитела, которая способна связывать PD-L1 (например, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биосимиляры или их биоветтеры). В некоторых вариантах осуществления способы лечения рака молочной железы включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструкцию антитела, которая способна связывать PD-L1 (например, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биосимиляры или их биоветтеры). В некоторых вариантах осуществления способы лечения трижды негативного рака молочной железы включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструкцию антитела, которая способна связывать PD-L1 (например, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биосимиляры или их биоветтеры).

Опухоли мягких тканей представляют собой весьма разнообразную группу редких опухолей, происходящих из соединительной ткани. Примеры опухолей мягких тканей включают, но не ограничиваются ими, альвеолярную саркому мягких тканей; ангиоматозную фиброзную гистиоцитому; хондромиксоидную фиброму; скелетную хондросаркому; экстраклеточную миксоидную хондросаркому; светлоклеточную саркому; десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль; протуберанскую дерматофибросаркому; опухоль стромы эндометрия; саркому Юинга; фиброматоз (десмоид); детскую фибросаркому; гастроинтестинальную стромальную опухоль; костную гигантоклеточную опухоль; теносиновиальную гигантоклеточную опухоль; воспалительную миофибробластическую опухоль; лейомиому матки; лейомиосаркому; липобластому; типичную липому; веретенноклеточную или плеоморфную липому; атипичную липому; хондронную липому; хорошо дифференцированную липосаркому; миксоидную/круглоклеточную липосаркому; плеоморфную липосаркому; миксоидную злокачественную фиброзную гистиоцитому; высокозлокачественную злокачественную фиброзную гистиоцитому; миксофибросаркому; злокачественную опухоль оболочки периферического нерва; мезотелиому; нейробластому; остеохондрому; остеосаркому; примитивную нейроэктодермальную опухоль; альвеолярную рабдомиосаркому; эмбриональную рабдомиосаркому; доброкачественную или злокачественную шванному; синовиальную саркому; опухоль Эвана; нодулярный фасцит; фиброматоз десмоидного типа; солитарную фиброзную опухоль; дерматофибросаркому протуберанов (DFSP); ангиосаркому; эпителионную гемангиоэндотелиому; теносиновиальную гигантоклеточную опухоль (TGCT); пигментный вилонодулярный синовит (PVNS); фиброзную дисплазию; миксофибросаркому; фибросаркому; синовиальную саркому; злокачественную опухоль оболочки периферического нерва; нейрофибром; плеоморфную аденому мягких тканей; и новообразования, происходящие из фибробластов, миофибробластов, гистиоцитов, сосудистых клеток/эндотелиальных клеток и клеток оболочки нервов.

Саркома представляет собой редкий тип рака, который возникает в клетках мезенхимального происхождения, например, в костях или мягких тканях тела, включая хрящи, жир, мышцы, кровеносные сосуды, фиброзную ткань или другую соединительную или поддерживающую ткань. Различные типы саркомы зависят от того, где образуется

рак. Например, остеосаркома образуется в костях, липосаркома образуется в жировой ткани, а рабдомиосаркома образуется в мышцах. Примеры сарком включают, но не ограничиваются ими, опухоль Аскина; саркому ботриоида; хондросаркому; саркому Юинга; злокачественную гемангиоэндотелиому; злокачественную шванному; остеосаркому; и саркомы мягких тканей (например, альвеолярную саркому мягких тканей; ангиосаркому; цистосаркому филлодеса; дерматофибросаркому протуберанов (DFSP); десмоидную опухоль; десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль; эпителиоидную саркому; внескелетную хондросаркому; внескелетную остеосаркому; фибросаркому; гастроинтестинальная стромальная опухоль (GIST); гемангиоперицитомы; гемангиосаркома (чаще называемая «ангиосаркома»); саркома Капоши; лейомиосаркома; липосаркома; лимфангиосаркома; злокачественная опухоль оболочек периферических нервов (MPNST); нейрофибросаркома; синовиальная саркома; и недифференцированная плеоморфная саркома).

Тератома представляет собой тип эмбрионально-клеточной опухоли, которая может содержать несколько различных типов ткани (например, может включать ткани, полученные из любого и/или всех трех зародышевых слоев: энтодермы, мезодермы и эктодермы), включая, например, волосы, мышцы и кости. Чаще всего тератомы возникают в яичниках у женщин, яичках у мужчин и копчике у детей.

Меланома представляет собой форму рака, которая начинается в меланоцитах (клетках, вырабатывающих пигмент меланин). Меланома может начаться в родимом пятне (меланома кожи), но также может начаться в других пигментированных тканях, например в глазу или кишечнике.

Карцинома из клеток Меркеля представляет собой редкий тип рака кожи, который обычно проявляется в виде узелков телесного или синевато-красного цвета на лице, голове или шее. Карцинома из клеток Меркеля также называется нейроэндокринной карциномой кожи. В некоторых вариантах осуществления способы лечения карциномы из клеток Меркеля включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструкцию антитела, способного связывать PD-L1 (например, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биосилияры или биобеттеры). В некоторых вариантах осуществления изобретения на момент введения препарата карцинома из клеток Меркеля уже метастазировала.

Лейкозы представляют собой рак, который начинается в кроветворной ткани, такой как костный мозг, и вызывает образование большого количества аномальных клеток крови, которые попадают в кровоток. Например, лейкозы могут возникать в клетках костного мозга, которые обычно созревают в кровеносной системе. Лейкозы именуют исходя из того, как быстро развивается и прогрессирует болезнь (например, острая или хроническая) и по типу лейкоцитов, которые поражены (например, миелоидная или лимфоидная). Миелоидные лейкозы также называют миелогенными или миелобластными лейкозами. Лимфоидные лейкозы также называют лимфобластными или лимфоцитарными лейкозами. Клетки лимфоидного лейкоза могут скапливаться в лимфатических узлах, которые могут увеличиваться в размерах. Примеры лейкозов

включают, но не ограничиваются ими, острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический миелоидный лейкоз (CML) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL).

Лимфомы представляют собой рак, который начинается в клетках иммунной системы. Например, лимфомы могут возникать в клетках костного мозга, которые обычно созревают в лимфатической системе. Существуют две основные категории лимфом. Одной из категорий лимфомы является лимфома Ходжкина (HL), которая характеризуется наличием типа клеток, называемых клетками Рида-Штернберга. В настоящее время существует 6 признанных типов HL. Примеры лимфом Ходжкина включают классическую лимфому Ходжкина с нодулярным склерозом (CHL), смешанно-клеточная CHL, CHL с истощением лимфоидной ткани, CHL с высоким содержанием лимфоцитов и нодулярная лимфома Ходжкина HL с лимфоидным преобладанием.

Другая категория лимфомы представляет собой неходжкинские лимфомы (NHL), которые включают большую и разнообразную группу раковых заболеваний клеток иммунной системы. Неходжкинские лимфомы можно разделить на рак с вялотекущим (медленно растущим) течением и рак с агрессивным (быстрорастущим) течением. В настоящее время существует 61 признанный тип NHL. Примеры неходжкинских лимфом включают, но не ограничиваются ими, лимфомы, связанные со СПИДом, анапластическую крупноклеточную лимфому, ангиоиммунобластную лимфому, бластную НК-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, лимфому типа Беркитта (мелкоклеточная лимфома с нерассеченными ядрами), хроническую лимфоцитарную лейкемию/малую лимфоцитарную лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, Т-клеточную лимфому энтеропатического типа, фолликулярную лимфому, гепатоспленические гамма-дельта Т-клеточные лимфомы, Т-клеточные лейкозы, лимфобластную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, назальную Т-клеточную лимфому, педиатрическую лимфому, узловую Т-клеточную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, трансформированные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, связанные с лечением, и макроглобулинемию Вальденстрема.

Рак головного мозга включает любой рак тканей головного мозга. Примеры рака головного мозга включают, но не ограничиваются ими, глиомы (например, глиобластомы, астроцитомы, олигодендроглиомы, эпендимомы и т.п.), менингиомы, аденомы гипофиза и вестибулярные шванномы, примитивные нейроэктодермальные опухоли (медуллобластомы).

Иммуноконъюгаты по изобретению можно использовать в терапии либо отдельно, либо в комбинации с другими агентами. Например, иммуноконъюгат можно вводить одновременно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством, таким как химиотерапевтическое средство. Такие комбинированные терапии, включают комбинированное введение (когда два или более терапевтических средства включены в одни и те же или отдельные составы) и раздельное введение, в этом случае введение

иммуноконъюгата может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта. Иммуноконъюгаты также можно использовать в сочетании с лучевой терапией.

Иммуноконъюгаты по изобретению (и любое дополнительное терапевтическое средство) можно вводить любыми подходящими способами, включая парентеральный, внутрилегочный и интраназальный, и, если желательно, для местного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование можно осуществлять любым подходящим путем, *например*, инъекциями, такими как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или хроническим. В данном документе предусмотрены различные схемы дозирования, включая, помимо прочего, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и пульсовую инфузию.

Известно, что атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биосимиляры и их биобеттеры полезны при лечении рака, в частности, рака молочной железы, особенно тройного негативного (отрицательный результат теста на рецепторы эстрогена, рецепторы прогестерона и избыток белка HER2) рака молочной железы, рака мочевого пузыря и карциномы из клеток Меркеля. Описанный в данном документе иммуноконъюгат можно использовать для лечения тех же типов рака, что и атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биосимиляры и их биобеттеры, в частности рака молочной железы, особенно трижды негативного (отрицательный результат теста на рецепторы эстрогена, рецепторы прогестерона и избыток белка HER2) рака молочной железы, рака мочевого пузыря и карциномы из клеток Меркеля.

Иммуноконъюгат вводят нуждающемуся в этом субъекту в любом терапевтически эффективном количестве с использованием любого подходящего режима дозирования, такого как режимы дозирования, применяемые для атезолизумаба, дурвалумаба, авелумаба, их биосимиляров и их биобеттеров. Например, способы могут включать введение субъекту иммуноконъюгата для обеспечения дозы от около 100 нг/кг до около 50 мг/кг. Доза иммуноконъюгата может находиться в диапазоне от около 5 мг/кг до около 50 мкг/кг, от около 10 мкг/кг до около 5 мг/кг или от около 100 мкг/кг до около 1 мг/кг. Доза иммуноконъюгата может составлять около 100, 200, 300, 400 или 500 мкг/кг. Доза иммуноконъюгата может составлять около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг. Доза иммуноконъюгата также может выходить за пределы этих диапазонов, в зависимости от конкретного конъюгата, а также типа и тяжести рака, подлежащего лечению. Частота введения может варьироваться от одноразовой дозы до многократных доз в неделю или чаще. В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат вводят от около одного раза в месяц до около пяти раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат вводят один раз в неделю.

В другом аспекте в изобретении предложен способ предотвращения рака. Способ

включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата (например, в виде композиции, как описано выше). В некоторых вариантах осуществления субъект предрасположен к определенному раку, который необходимо предотвратить. Например, способы могут включать введение субъекту иммуноконъюгата для обеспечения дозы от около 100 нг/кг до около 50 мг/кг. Доза иммуноконъюгата может находиться в диапазоне от около 5 мг/кг до около 50 мкг/кг, от около 10 мкг/кг до около 5 мг/кг или от около 100 мкг/кг до около 1 мг/кг. Доза иммуноконъюгата может составлять около 100, 200, 300, 400 или 500 мкг/кг. Доза иммуноконъюгата может составлять около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг. Доза иммуноконъюгата также может выходить за пределы этих диапазонов, в зависимости от конкретного конъюгата, а также типа и тяжести рака, подлежащего лечению. Частота введения может варьироваться от однократной дозы до многократных доз в неделю или чаще. В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат вводят от около одного раза в месяц до около пяти раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат вводят один раз в неделю.

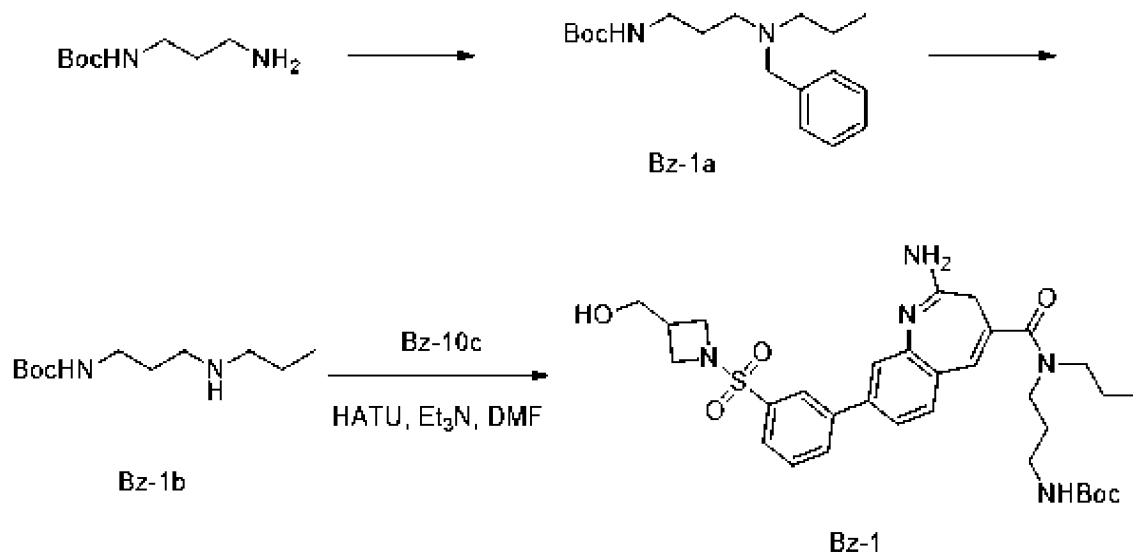
В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены способы лечения рака, как описано выше, где рак представляет собой рак молочной железы. Рак молочной железы может возникать в разных областях молочной железы, и охарактеризовано множество различных типов рака молочной железы. Например, иммуноконъюгаты по изобретению можно использовать для лечения протоковой карциномы *in situ*; инвазивная протоковая карцинома (*например*, канальцевая карцинома; медуллярная карцинома; муцинозная карцинома; папиллярная карцинома; или решетчатая карцинома молочной железы); лобулярная карцинома *in situ*; инвазивная лобулярная карцинома; воспалительный рак молочной железы; и другие формы рака молочной железы, такие как тройной негативный (отрицательный результат теста на рецепторы эстрогена, рецепторы прогестерона и избыток белка HER2) рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления способы лечения рака молочной железы включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструкцию антитела, которая способна связывать HER2 (*например*, трастузумаб, пертузумаб, их биосимиляры или биобеттеры) и PD-L1 (*например*, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биосимиляры или биобеттеры). В некоторых вариантах осуществления способы лечения рака толстой кишки, рака легких, рака почек, рака поджелудочной железы, рака желудка и рака пищевода включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструкцию антитела, способную связывать СЕА, или опухоли, сверхэкспрессирующие СЕА (*например*, лобетумаб, его биосимиляры или биобеттеры).

В некоторых вариантах осуществления рак чувствителен к провоспалительному ответу, индуцированному TLR7 и/или TLR8.

ПРИМЕРЫ

Получение аминокбензазепиновых соединений (Bz) и промежуточных соединений

Пример 1 Синтез Bz-1



Синтез *трет*-бутил (3-(бензил(пропил)амино)пропил)карбамата Bz-1a.

трет-Бутил N-(3-аминопропил)карбамат (10 г, 57,39 ммоль, 10,02 мл, 1 экв) и бензальдегид (6,09 г, 57,39 ммоль, 5,80 мл, 1 экв) в ДХЭ (100 мл) перемешивали при 70°C в течение 24 часов. MeOH (100 мл) и NaBH₃CN (16,23 г, 258,26 ммоль, 4,5 экв) добавляли к смеси порциями при 0 °С. Смесь перемешивали при 0°C в течение 2 часов, затем при 0°C добавляли пропаналь (16,67 г, 286,96 ммоль, 20,89 мл, 5 экв.) и перемешивали в течение 2 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. В смесь добавляли несколько капель воды и концентрировали при пониженном давлении при 40 °С. Остаток выливали в воду со льдом (200 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Водную фазу экстрагировали этилацетатом (200 мл x 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (300 мл), сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/этилацетат=10/1, 3/1) с получением трет-бутил-N-[3-[бензил(пропил)амино]пропил]карбамата, Bz-1a (16 г, 52,21 ммоль, выход 90,98%) в виде светло-желтого масла. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 7,39-7,29 (м, 5H), 3,60-3,52 (м, 2H), 3,20-3,08 (м, 2H), 2,56-2,45 (м, 2H), 2,39 (с, 2H), 1,73-1,61 (м, 2H), 1,58-1,48 (м, 2H), 1,42 (с, 1H), 1,45 (с, 9H), 0,89 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Синтез трет-бутил-N-[3-(пропиламино)пропил]карбамата, Bz-1b.

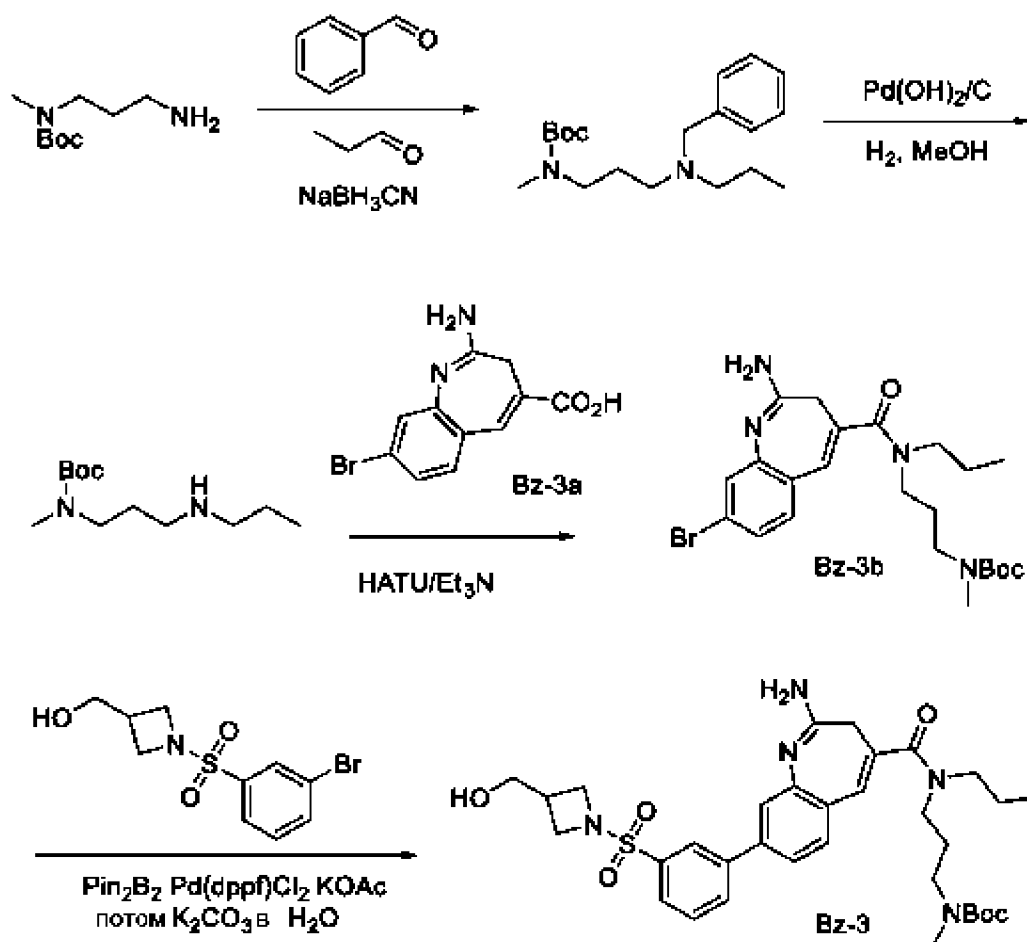
К раствору трет-бутил-N-[3-[бензил(пропил)амино]пропил]карбамата, Bz-1a (10 г, 32,63 ммоль, 1 экв.) в MeOH (150 мл) добавляли Pd(OH)₂/C (10%, 3 г) в атмосфере N₂. Суспензию дегазировали под вакуумом и несколько раз продували H₂. Смесь перемешивали в атмосфере H₂ (50 фунт/кв. дюйм) при 50°C в течение 12 часов. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат=3: 1) показала, что исходный материал полностью израсходован. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали с получением трет-бутил-N-[3-(пропиламино)пропил]карбамата, Bz-1b (5 г, 23,11 ммоль, выход 70,83%) в виде бесцветного масла, которое использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 3,13-3,05 (м, 2H), 2,60 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,56-2,50 (м, 2H), 1,66 (м, 2H), 1,58-1,48 (м, 2H), 1,44 (с, 9H), 0,94 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Синтез трет-бутил N-[3-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]

сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]пропил]карбамат, Bz-1.

К смеси трет-бутил N-[3-(пропиламино)пропил]карбамата, Bz-1b (202,42 мг, 935,73 мкмоль (микромоль), 2 экв) и 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, Bz-10с из примера 6 (0,2 г, 467,87 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (2 мл) добавляли HATU (213,48 мг, 561,44 мкмоль, 1,2 экв) и Et₃N (94,69 мг, 935,73 мкмоль, 130,24 мкл (микролитр), 2 экв) одной порцией при 15 °С. Смесь перемешивали при 15°С в течение 30 минут. ЖХМС и ВЭЖХ показали, что реакция завершена. Смесь фильтровали и очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Waters Xbridge 150×25 мм, размер частиц 5 микрон; подвижная фаза: [вода (10 мМ NH₄HCO₃)-АЦН]; В%: 30%-50%, 20мин) с получением трет-бутил N-[3-[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]пропил]карбамата, Bz-1 (0,087 г, 139,03 мкмоль, выход 29,72%) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,07 (с, 1H), 8,03 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,86-7,81 (м, 1H), 7,79-7,73 (м, 1H), 7,50-7,45 (м, 2H), 7,39 (м, 1H), 6,92 (с, 1H), 3,86 (т, J=8,0 Гц, 2H), 3,61-3,58 (м, 2H), 3,52-3,48 (м, 2H), 3,45 -3,41 (м, 4H), 3,10 (с, 4H), 2,62-2,52 (м, 1H), 1,86-1,79 (м, 2H), 1,71-1,65 (м, 2H), 1,42-1,50 (м, 9H) 0,87-0,95 (м, 3H). ЖХ/МС [M+H] 626,30 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 626,40 (определено).

Пример 2 Синтез Bz-3



Синтез трет-бутил (3-(бензил(пропил)амино)пропил)(метил)карбамата

К смеси бензальдегида (310,02 мг, 2,92 ммоль, 295,26 мкл, 1 экв) в ДХЭ (10 мл) добавляли трет-бутил N-(3-аминопропил)-N-метилкарбамат (0,55 г, 2,92 ммоль, 1 экв) при 25°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 60°C в течение 12 часов, затем охлаждали до 0 °C, к смеси добавляли MeOH (10 мл), к смеси добавляли NaBH₃CN (550,48 мг, 8,76 ммоль, 3 экв) и перемешивали в течение 1 часа. К смеси добавляли пропаналь (339,18 мг, 5,84 ммоль, 425,04 мкл, 2 экв) и перемешивали при 0°C в течение 1 часа. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ, колонка: Luna C18 100 × 30 5ц; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 10%-40%, 10 мин с получением трет-бутил N- [3- [бензил(пропил)амино]пропил]-N-метилкарбамата (0,4 г, 1,25 ммоль, выход 42,75%) в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 7,18-7,37 (м, 5H), 3,57 (с, 2H), 3,20 (т, J=7,2 Гц, 2H), 2,78 (с, 3H), 2,35-2,52(м, 4H), 1,70 (квин, J=7,2 Гц, 2H), 1,47-1,57 (м, 2H), 1,42 (с, 9H), 0,88 (т, J=7,2 Гц, 3H)

Синтез трет-бутил метил(3-(пропиламино)пропил)карбамата

К раствору трет-бутил N-[3-[бензил(пропил)амино]пропил]-N-метилкарбамата (0,4 г, 1,25 ммоль, 1 экв) в MeOH (20 мл) добавляли Pd(OH)₂/C (0,2 г, чистота 5%) в атмосфере N₂. Суспензию дегазировали под вакуумом и несколько раз продували H₂. Смесь перемешивали в атмосфере H₂ (50 фунт/кв. дюйм) при 50°C в течение 12 часов. ЖХМС показала, что реактив был израсходован, была обнаружена целевая масса. Смесь фильтровали и концентрировали в вакууме. Получили трет-бутил N-метил-N-[3-(пропиламино)пропил]карбамат (0,25 г, 1,09 ммоль, выход 86,95%) в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 3,26-3,31 (м, 2H), 2,85 (с, 3H), 2,56 (q, J=8,0 Гц, 4H), 1,74 (квин, J=7,2 Гц, 2H), 1,48-1,59 (м, 2H), 1,46 (с, 9H), 0,94 (т, J=7,2 Гц, 3H)

Синтез трет-бутил (3-(2-амино-8-бром-N-пропил-3H-бензо[b] азепин-4-карбоксамидо)пропил)(метил) карбамата, Vz-3b

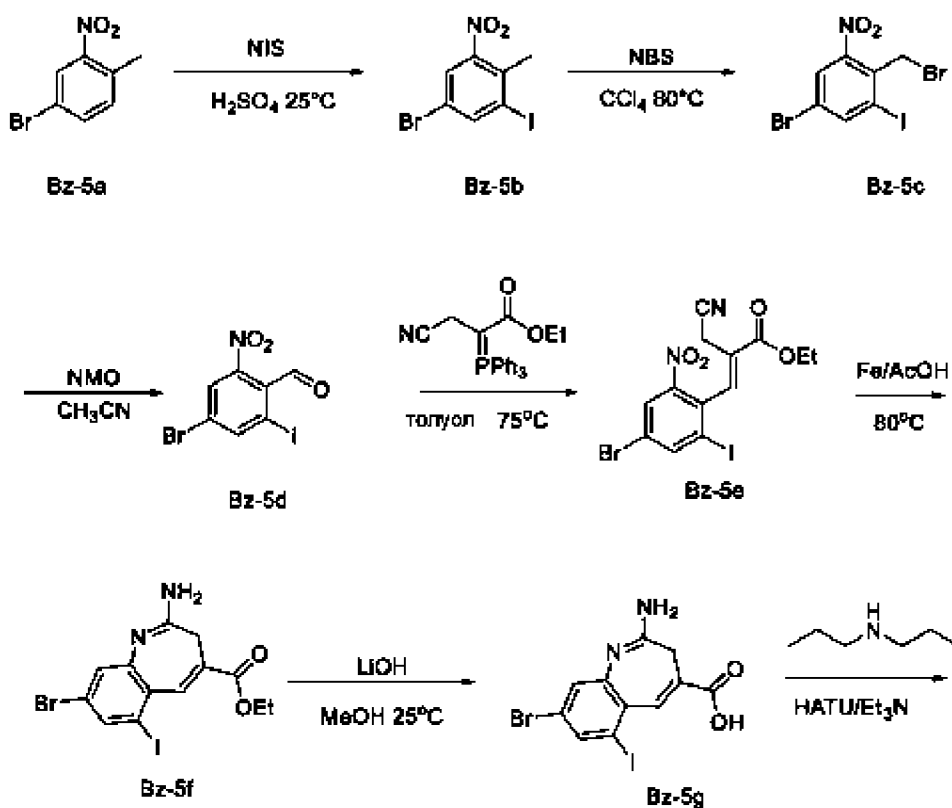
К смеси 2-амино-8-бром-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, Vz-3a (80 мг, 284,59 мкмоль, 1 экв) и трет-бутил N-метил-N-[3-(пропиламино)пропил]карбамата (78,67 мг, 341,51 мкмоль, 1,2 экв) в ДМФ (1 мл) добавляли HATU (162,32 мг, 426,89 мкмоль, 1,5 экв) Et₃N (57,60 мг, 569,18 мкмоль, 79,22 мкл, 2 экв) при 25°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХМС показала получение целевого продукта. Смесь выливали в воду (20 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (20 мл×3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (20 мл), сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной ТСХ (петролейный эфир/этилацетат=0/1) с получением Vz-3b (60 мг, 121,60 мкмоль, выход 42,73%) в виде желтого масла.

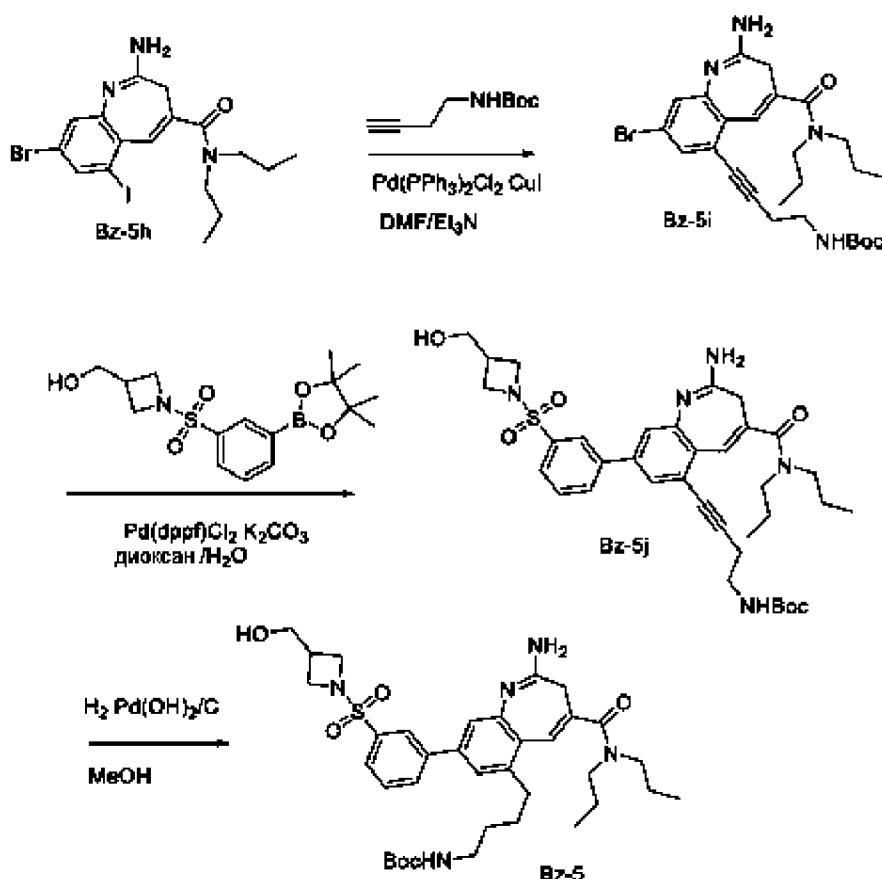
Синтез трет-бутил (3-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)(метил)карбамата, Vz-3

К смеси [1-(3-бромфенил)сульфониазетидин-3-ил]метанола (155,12 мг, 506,65

мкмоль, 1 экв), Pin_2B_2 (154,39 мг, 607,98 мкмоль, 1,2 экв), ацетата калия KOAc (124,31 мг, 1,27 ммоль, 2,5 экв) в диоксане (30 мл) добавляли $\text{Pd(dppf)Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (41,38 мг, 50,67 мкмоль, 0,1 экв) при 25°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 90°C в течение 2 часов. трет-бутил N-[3-[(2-амино-8-бром-3Н-1-бензазепин-4-карбонил)-пропиламино]пропил]-N-метилкарбамат, **Bz-3b** (0,25 г, 506,65 мкмоль, 1 экв), K_2CO_3 (140,04 мг, 1,01 ммоль, 2 экв) в H_2O (2 мл) добавляли к смеси, перемешивали при 90°C в течение 2 ч (часов) в атмосфере азота, N_2 . ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной ТСХ ($\text{EtOAc/MeOH}=7:1$) с получением **Bz-3** (112 мг, 175,05 мкмоль, выход 34,55%) в виде светло-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD , 400 МГц) δ 8,07 (с, 1H), 8,03 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,85 (уш д, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,73-7,79 (м, 1H), 7,41-7,54 (м, 3H), 6,95 (с, 1H), 3,86 (т, $J=8,2$ Гц, 2H), 3,60 (дд, $J=8,0, 6,0$ Гц, 2H), 3,39-3,52 (м, 6H), 3,17-3,29 (м, 2H), 2,82-2,90 (м, 4H), 2,53-2,67 (м, 1H), 1,89-1,92 (м, 2H), 1,66-1,72 (м, 2H), 1,42-1,46 (м, 9H), 0,80-1,05 (м, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 640,32 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 640,30 (определено).

Пример 3 Синтез **Bz-5**





Синтез 5-бром-1-йод-2-метил-3-нитробензола, Bz-5b

К смеси 4-бром-1-метил-2-нитробензола, Bz-5a (20 г, 92,58 ммоль, 20,00 мл, 1 экв) в H_2SO_4 (20 мл) добавляли NIS (37,49 г, 166,64 ммоль, 1,8 экв) при 0°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. ТСХ показала, что реагент израсходован и образовались две точки. Смесь медленно выливали в воду со льдом (200 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (150 мл $\times$ 2). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (150 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=100/1, 20/1) с получением Bz-5b (14 г, 40,94 ммоль, выход 44,23%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 8,20 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,87 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 2,55 (с, 3H).

Синтез 5-бром-2-(бромметил)-1-йод-3-нитробензола, Bz-5c

К смеси 5-бром-1-йод-2-метил-3-нитробензола, Bz-5b (13 г, 38,02 ммоль, 1 экв) в CCl_4 (100 мл) добавляли NBS (10,15 г, 57,03 ммоль, 1,5 экв) ВРО (920,94 мг, 3,80 ммоль, 0,1 экв) при 25°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 90°C в течение 12 часов. ТСХ показала образование одной новой точки, ВЭЖХ и ЖХМС показали образование около 50% целевого продукта и, что около 50% реагента осталось. Смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=50/1, 10/1) с получением Bz-5c (7 г, 16,63 ммоль, выход 43,75%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, 400 МГц) δ 8,29 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 8,02 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 4,82 (с, 3H).

Синтез 4-бром-2-йод-6-нитробензальдегида, Vz-5d

К смеси 5-бром-2-(бромметил)-1-йод-3-нитробензола, Vz-5c (7 г, 16,63 ммоль, 1 экв) в CH_3CN (10 мл) добавляли NMO (3,90 г, 33,27 ммоль, 3,51 мл, 2 экв) при 25°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. ТСХ показала, что реакция завершена. Смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=20/1, 4/1) с получением Vz-5d (5 г, 14,05 ммоль, выход 84,46%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 10,00 (с, 1H), 8,37 (д, $J=1,6$ Гц, 1H), 8,15 (д, $J=1,6$ Гц, 1H)

Синтез (E)-этил 3-(4-бром-2-йод-6-нитрофенил)-2-(цианометил)акрилата, Vz-5e

К смеси 4-бром-2-йод-6-нитробензальдегида, Vz-5d (3,5 г, 9,83 ммоль, 1 экв) в толуоле (30 мл) добавляли этил 3-циано-2-(трифенилфосфанилиден)пропаноат (5,71 г, 14,75 ммоль, 1,5 экв) при 25°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 85°C в течение 12 часов. ТСХ показала получение ожидаемого. Смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=10/1, 1/1) с получением Vz-5e (2 г, 4,30 ммоль, выход 43,73%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 8,62 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 8,42 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 7,74 (с, 1H), 4,32 (кв, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,33 (с, 2H), 1,31 (т, $J=7,2$ Гц, 3H)

Синтез этил-2-амино-8-бром-6-йод-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксилата, Vz-5f

К смеси этил (E)-3-(4-бром-2-йод-6-нитрофенил)-2-(цианометил)проп-2-еноата, Vz-5e (2 г, 4,30 ммоль, 1 экв) в уксусной кислоте, AcOH (20 мл) добавляли Fe (1,20 г, 21,50 ммоль, 5 экв) при 25°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 80°C в течение 5 часов. ЖХМС показала получение целевого продукта, и что реагент был израсходован. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=1/1, 0/1) с получением Vz-5f (1,8 г, 4,14 ммоль, выход 96,20%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$, 400 МГц) δ 7,71 (с, 1H), 7,69 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,22 (уш д, $J=2,0$ Гц, 1H), 4,26 (кв, $J=7,0$ Гц, 3H), 2,83 (с, 2H), 1,30 (т, $J=7,2$ Гц, 3H).

Синтез 2-амино-8-бром-6-йод-3H-бензо[b]азепин-4-карбоновой кислоты, Vz-5g

К смеси этил-2-амино-8-бром-6-йод-3H-1-бензазепин-4-карбоксилата, Vz-5f (1,8 г, 4,14 ммоль, 1 экв) в EtOH (40 мл) добавляли $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1,04 г, 24,82 ммоль, 6 экв) в H_2O (10 мл) при 25°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 35°C в течение 2 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь концентрировали для удаления EtOH, затем доводили pH до 5 водной HCl (4M), фильтровали с получением ожидаемого твердого вещества Vz-5g (1,2 г, 2,95 ммоль, выход 71,26%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$, 400 МГц) δ 7,77 (с, 1H), 7,69 (с, 1H), 7,29 (с, 1H), 2,92 (с, 2H)

Синтез 2-амино-8-бром-6-йод-N, N-дипропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамиды, Vz-5h

К смеси N-пропилпропан-1-амин (186,47 мг, 1,84 ммоль, 254,04 мкл, 1,5 экв) и 2-амино-8-бром-6-йод-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, Vz-5 г (0,5 г, 1,23 ммоль, 1 экв) в ДМФ (10 мл) добавляли HATU (700,67 мг, 1,84 ммоль, 1,5 экв) Et₃N (186,47 мг, 1,84 ммоль, 256,49 мкл, 1,5 экв) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 30 минут. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь выливали в воду (50 мл), выделяли из смеси и фильтровали с получением Vz-5h (0,55 г, 1,12 ммоль, выход 91,33%) в виде твердого желтого вещества. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц) δ 7,74 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,33 (д, J=2,0 Гц, 1H), 6,81 (с, 1H), 3,43-3,47 (м, 4H), 1,66-1,72 (м, 4H), 0,93 (с, 6H)

Синтез трет-бутил (4-(2-амино-8-бром-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-6-ил)бут-3-ин-1-ил)карбамата, Vz-5i

К смеси 2-амино-8-бром-6-йод-N, N-дипропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамид, Vz-5h (200 мг, 408,02 мкмоль, 1 экв) и трет-бутил N-but-3-инилкарбамат (72,50 мг, 428,42 мкмоль, 1,05 экв) в ДМФ (5 мл) Et₃N (1 мл) добавляли Pd(PPh₃)₂Cl₂ (14,32 мг, 20,40 мкмоль, 0,05 экв) Et₃N (0,5 мл) CuI (15,54 мг, 81,60 мкмоль, 0,2 экв) При 25°С в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 80°С в течение 1 часа. ЖХМС показала получение целевого продукта. Смесь выливали в воду (20 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (20 мл×3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (20 мл), сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной ТСХ (петролейный эфир/этилацетат=0/1) с получением Vz-5i (0,2 г, 376,31 мкмоль, выход 92,23%) в виде твердого желтого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 7,40 (с, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,13 (с, 1H), 3,46-3,52 (м, 4H), 3,35-3,40 (м, 2H), 2,65 (с, 2H), 1,58-1,78 (м, 4H), 1,46 (с, 9H), 0,93 (т, J=7,2 Гц, 6H)

Синтез трет-бутил (4-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-8-(3-((3-гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-6-ил)бут-3-ин-1-ил)карбамат, Vz-5j

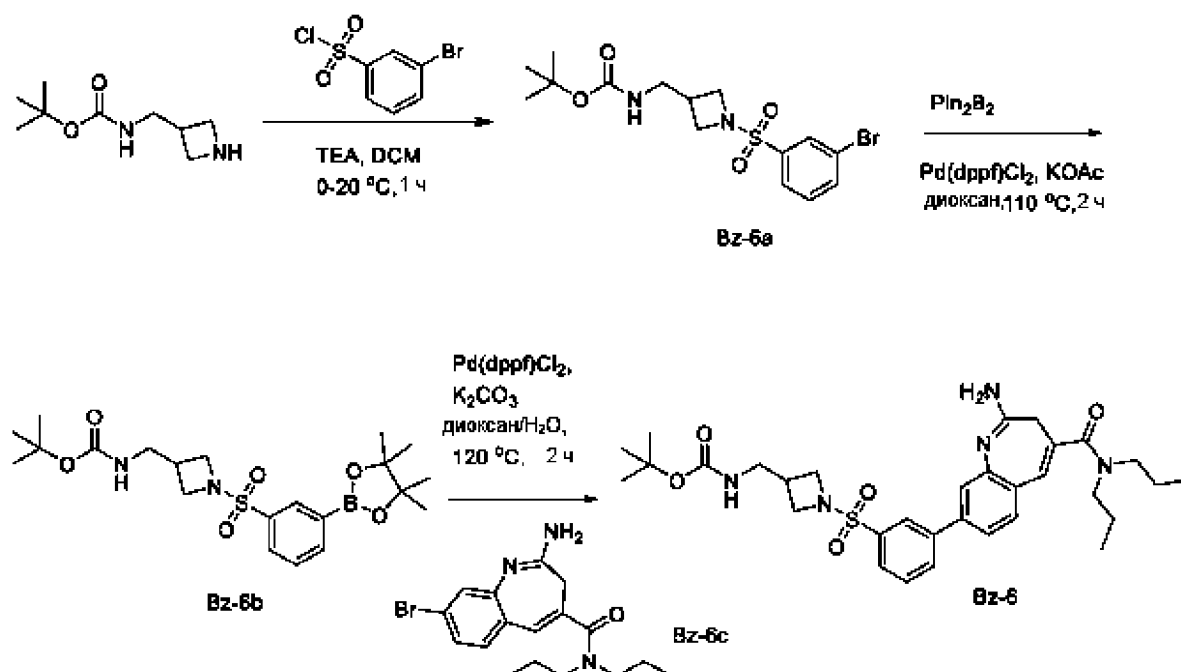
К смеси трет-бутил-N-[4-[2-амино-8-бром-4-(дипропилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-6-ил]бут-3-инил]карбамата, Vz-5i (0,18 г, 338,67 мкмоль, 1 экв) и [1-[3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метанол (179,45 мг, 508,01 мкмоль, 1,5 экв) в диоксане (10 мл) H₂O (1 мл). добавляли Pd(dppf)Cl₂ (12,39 мг, 16,93 мкмоль, 0,05 экв) K₂CO₃ (93,61 мг, 677,35 мкмоль, 2 экв) При 25°С в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 90°С в течение 2 часов. ЖХМС показала, что была зафиксирована целевая масса. Смесь концентрировали в вакууме с получением Vz-5j (0,2 г, неочищенного продукта) в виде желтого твердого вещества.

Синтез трет-бутил (4-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-8-(3-((3-гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-6-ил)бутил)карбамата, Vz-5

К раствору трет-бутил N-[4-[2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-6-ил]бут-3-енил]карбамата, Vz-5j (140 мг, 206,53 мкмоль, 1 экв) в MeOH (20 мл) добавляли Pd(OH)₂/C (0,1 г, 5% чистота) в атмосфере N₂. Суспензию дегазировали под вакуумом и несколько

раз продували H_2 . Смесь перемешивали в атмосфере H_2 (50 фунт/кв. дюйм) при $25^\circ C$ в течение 2 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ, колонка: Xtimate C18 150×25 мм, размер частиц 5 микрон; подвижная фаза: [вода (0,04% NH_3H_2O +10мМ NH_4HCO_3)-АЦН]; В%: 50%-60%, 10,5 мин. Получено Bz-5 (45 мг, 65,99 мкмоль, выход 31,95%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,00-8,08 (м, 2H), 7,83 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,71-7,79 (м, 1H), 7,33 (с, 1H), 7,28 (с, 1H), 6,99 (с, 1H), 3,86 (т, J=8,0 Гц, 2H), 3,57-3,66 (м, 2H), 3,38-3,51 (м, 6H), 3,06 (т, J=6,4 Гц, 2H), 2,84 (т, J=7,6 Гц, 2H), 2,52-2,63 (м, 1H), 1,50-1,77 (м, 8H), 1,41 (с, 9H), 0,94 (с, 6H). ЖХ/МС [M+H] 682,36 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 682,40 (определено).

Пример 4 Синтез Bz-6



Синтез *трет*-бутил ((1-((3-бромфенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)карбамата, Bz-6a

К смеси трет-бутил N-(азетидин-3-илметил)карбамата (1,6 г, 8,59 ммоль, 1,2 экв) в ДХМ (5 мл) добавляли ТЭА (1,45 г, 14,32 ммоль, 1,99 мл, 2 экв) и 3-бромбензолсульфонилхлорид (1,83 г, 7,16 ммоль, 1,03 мл, 1 экв) при $0^\circ C$. Смесь перемешивали при $20^\circ C$ в течение 1 часа. Смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали ДХМ (25 мл × 3). Органический слой промывали рассолом (25 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; флэш-колонка с силикагелем SepaFlash® 4 г, элюент этилацетат/петролейный эфир, градиент 0~100% @ 35 мл/мин). Соединение трет-бутил N-[[1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамат, Bz-6a (2,5 г, 6,17 ммоль, выход 86,16%) получали в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 7,99 (т, J=4,0 Гц, 1H), 7,74-7,81 (м, 2H), 7,47 (т, J=8,0 Гц, 1H), 4,61 (с, 1H), 3,86 (т,

$J=8,0$ Гц, 2H), 3,50-3,58 (м, 2H), 3,19 (т, $J=4,0$ 2H), 2,58-2,70 (м, 1H), 1,42 (с, 9H).

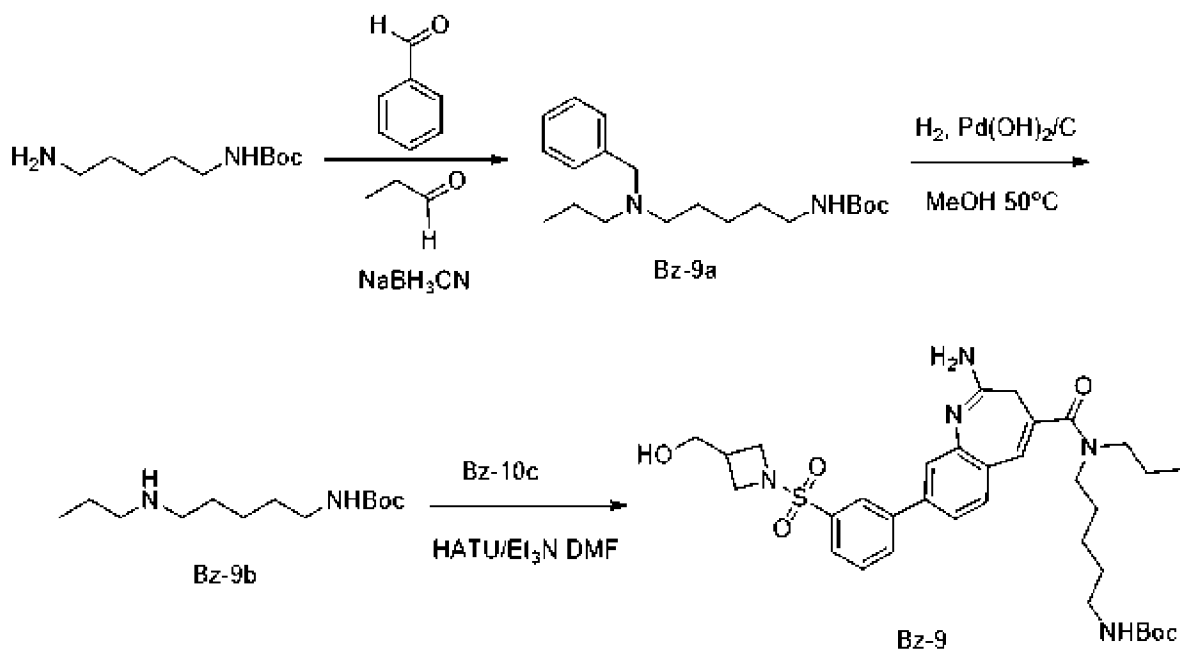
Получение трет-бутил-N-[[1-[3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамата, Vz-6b

К смеси трет-бутил-N-[[1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамата, Vz-6a (1 г, 2,47 ммоль, 1 экв) в диоксане (10 мл) добавляли Pin_2B_2 (939,80 мг, 3,70 ммоль, 1,5 экв) и KOAc (484,29 мг, 4,93 ммоль, 2 экв), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (90,27 мг, 123,36 мкмоль, 0,05 экв) при 15°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 110°C в течение 2 часов. Продукт трет-бутил-N-[[1-[3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамат, Vz-6b не выделяли и не использовали на следующем этапе.

Синтез трет-бутил ((1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)карбамата, Bz-6

К смеси трет-бутил-N-[[1-[3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамата, Vz-6b (1,12 г, 2,48 ммоль, 1 экв) и 2-амино-8-бром-N, N-дипропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, Vz-6c (901,90 мг, 2,48 ммоль, 1 экв) в диоксане (3 мл) добавляли K_2CO_3 (684,35 мг, 4,95 ммоль, 2 экв) и $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (90,58 мг, 123,79 мкмоль, 0,05 экв) при 15°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 120°C в течение 2 часов. Смесь фильтровали и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; флэш-колонка с силикагелем SepaFlash® 2 г, элюент этилацетат/петролейный эфир, градиент 0~100% @ 60 мл/мин) с получением Bz-6 (600 мг, 983,97 мкмоль, выход 39,74%, чистота 100%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD-d_4 , 400 МГц) δ 7,99-8,10 (м, 2H), 7,74-7,86 (м, 2H), 7,36-7,52 (м, 3H), 6,89 (с, 1H), 3,83 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,54 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,34-3,48 (м, 6H), 3,02 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 2,48-2,64 (м, 1H), 1,59-1,76 (м, 4H), 1,37 (с, 9H), 0,96-0,89 (м, 6H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 610,31 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 610,40 (определено).

Пример 5 Синтез Bz-9



Синтез трет-бутил (5-(бензил(пропил)амино)пентил)карбамата Bz-9a

К смеси трет-бутил N-(5-аминопентил)карбамата (1 г, 4,94 ммоль, 1 экв) и бензальдегида (524,59 мг, 4,94 ммоль, 499,61 мкл, 1 экв) в ДХЭ (10 мл) и перемешивали при 60°C в течение 12 часов. Затем смесь охлаждали до 0°C и к смеси добавляли MeOH (10 мл). К смеси добавляли NaBH₃CN (931,94 мг, 14,83 ммоль, 3 экв) и перемешивали в течение 1 ч при 0 °C. К смеси добавляли пропаналь (574,20 мг, 9,89 ммоль, 719,55 мкл, 2 экв) и перемешивали в течение 1 часа. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь концентрировали. Остаток подвергали дальнейшей очистке с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка: Luna C18 100×30, размер частиц 5 микрон; подвижная фаза: [вода(0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 25%-40%, 10 мин) с получением трет-бутил-N-[5-[бензил(пропил)амино]пентил]карбамата Bz-9a (0,5 г, 1,49 ммоль, выход 30,24%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ-d₄) δ=7,33-7,28 (м, 3H), 7,27-7,19 (м, 1H), 3,58 (с, 2H), 3,00 (т, J =7,2 Гц, 2H), 2,47- 2,37 (м, 4H), 1,58-1,46 (м, 6H), 1,47 (с, 9H) 1,37-1,20 (м, 3H), 0,87 (т, J =7,6 Гц, 3H)

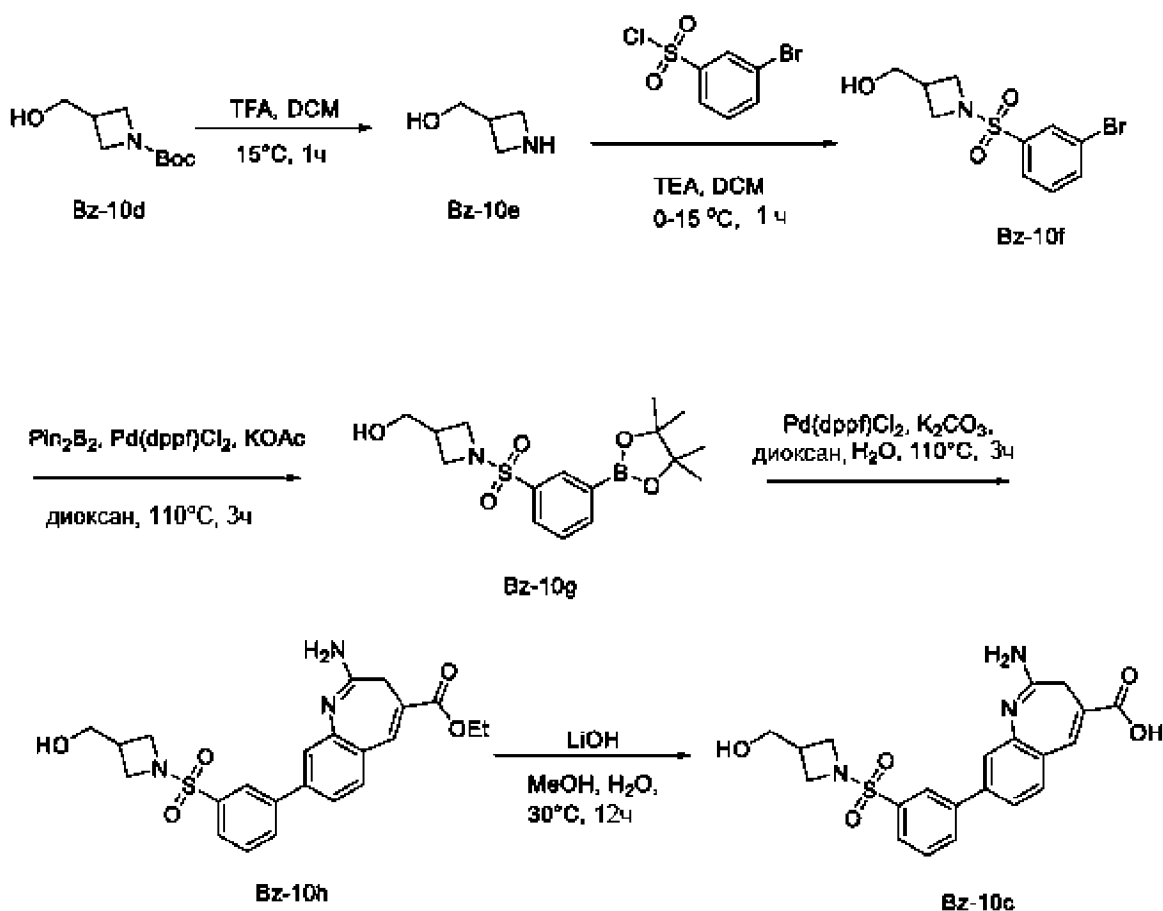
Синтез трет-бутил(5-(пропиламино)пентил)карбамата Bz-9b

К раствору трет-бутил N-[5-[бензил(пропил)амино]пентил]карбамата Bz-9a (0,5 г, 1,49 ммоль, 1 экв) в MeOH (20 мл) добавляли Pd(OH)₂/C (0,2 г, чистота 5%) при 25°C в атмосфере N₂. Суспензию дегазировали под вакуумом и несколько раз продували H₂. Смесь перемешивали в атмосфере H₂ (50фунт/кв. дюйм) при 50°C в течение 12 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь фильтровали и концентрировали. Для получения продукта трет-бутил N-[5-(пропиламино)пентил]карбамата Bz-9b (0,3 г, неочищенного продукта) в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (400МГц, МЕТАНОЛ-d₄) δ=3.03 (т, J=6,8 Гц, 2H), 2,55 (д, J=7,6, 13,6 Гц, 4H), 1,59-1,44 (м, 6H), 1,47 (с, 9H) 1,43-1,20 (м, 2H), 0,97-0,88 (м, 3H).

К смеси трет-бутил-N-[5-(пропиламино)пентил]карбамата Bz-9b (57,17 мг, 233,93 мкмоль, 1 экв) и 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-

бензазепин-4-карбоновой кислоты Vz-10с (0,1 г, 233,93 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (4 мл) добавляли НАТУ (133,42 мг, 350,90 мкмоль, 1,5 экв) и Et₃N (71,02 мг, 701,80 мкмоль, 97,68 мкл, 3 экв) одной порцией при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 0,5 часа. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь разбавляли водой и экстрагировали с помощью ЭА (30 мл×3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток подвергали дальнейшей очистке с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка: Xtimate C18 150×25мм, размер частиц 5 микрон; подвижная фаза: [вода(0,1% ТФУ) -АЦН]; В%: 32%-62%, 10,5 мин) с получением трет-бутил N-[5-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]пентил]карбамата Vz-9 (0,128 г, 179,48 мкмоль, выход 76,72%, чистота 91,68%) в виде желтого твердого вещества. ¹Н ЯМР (400 МГц, МЕТАНОЛ-d₄) δ=8,10 (с, 1Н), 8,07 (д, J=7,6 Гц, 1Н), 7,89 (д, J=7,8 Гц, 1Н), 7,83-7,78 (м, 1Н), 7,77-7,65 (м, 3Н), 7,09 (с, 1Н), 3,86 (т, J=8,2 Гц, 2Н), 3,61 (J=5,6, 8,0 Гц, 2Н), 3,56-3,35 (м, 8Н), 3,31 (с, 2Н), 3,10-2,99 (м, 2Н), 2,64-2,53 (м, 1Н), 1,80-1,59 (м, 4Н), 1,57-1,47 (м, 2Н), 1,40 (с, 9Н), 1,03-0,86 (м, 3Н). ЖХ/МС [М+Н] 654,33 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 654,50 (определено).

Пример 6 Синтез Vz-10



Получение Vz-10с: К смеси трет-бутил-3-(гидроксиметил)азетидин-1-карбоксилата Vz-10d (15 г, 80,11 ммоль) в ДХМ (100 мл) добавляли ТФУ (63,94 г, 560,79 ммоль, 41,52

мл, 7 экв) при 15 °С. Смесь перемешивали при 15°С в течение 1 часа. Смесь концентрировали с получением азетидин-3-илметанола Bz-10e (36 г, неочищенный, ТФУ) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц) δ 4,50-4,56 (м, 2H), 3,94-4,10 (м, 2H), 3,80-3,93 (м, 2H), 3,15-3,30 (м, 1H).

Получение [1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]метанола, Bz-10f: К смеси азетидин-3-илметанола (33,06 г, 164,37 ммоль, 2 экв, ТФУ) и 3-бромбензолсульфонилхлорида (21 г, 82,19 ммоль, 11,86 мл, 1 экв) в ДХМ (200 мл) добавляли ТЭА (33,27 г, 328,75 ммоль, 45,76 мл, 4 экв) при 0 °С. Смесь перемешивали при 15°С в течение 1 часа. Остаток выливали в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (200 мл) и перемешивали 10 мин. Водную фазу экстрагировали ДХМ (100 мл × 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (100 мл), сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; флэш-колонка с силикагелем SepaFlash® 1 г, элюент этилацетат/петролейный эфир, градиент 0~100% при 50 мл/мин). Соединение [1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]метанол Bz-10f (21 г, 68,59 ммоль, выход 83,45%) получали в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 7,89-8,11 (м, 1H), 7,78 (дд, J=8,0, 2,0 Гц, 2H), 7,39-7,54 (м, 1H), 3,78-3,97 (м, 2H), 3,49-3,74 (м, 4H), 2,41-2,77 (м, 1H).

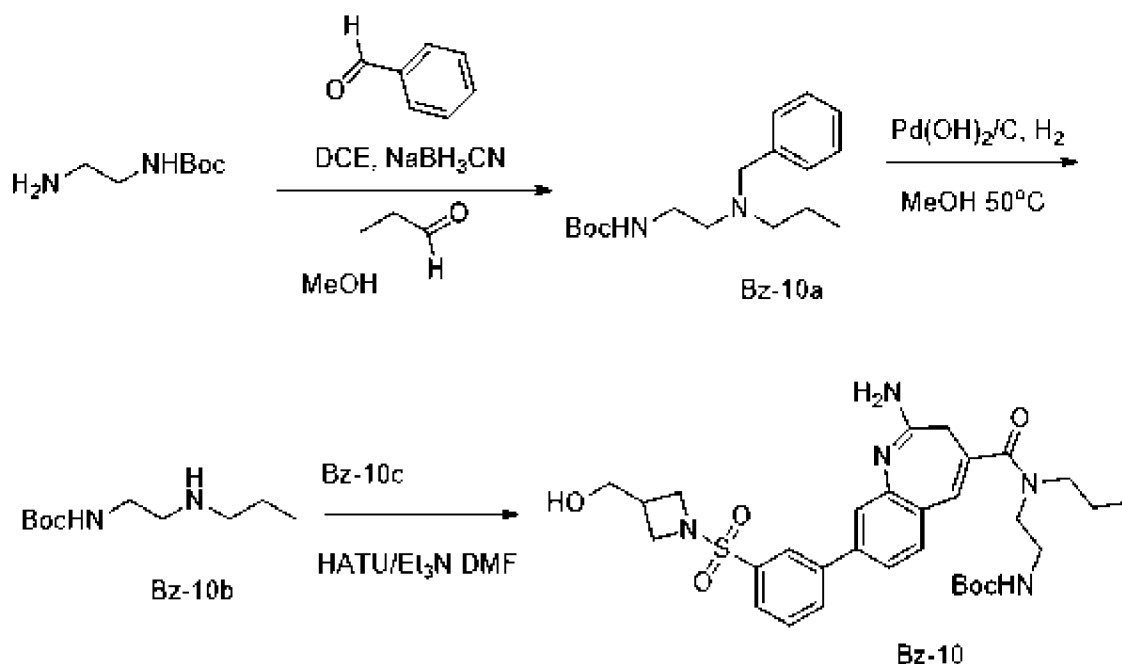
Получение [1-[3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метанола, Bz-10g: К смеси [1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]метанола (8 г, 26,13 ммоль, 1 экв) в диоксане (10 мл) добавляли Pin₂B₂ (9,95 г, 39,19 ммоль, 1,5 экв), KOAc (5,13 г, 52,26 ммоль, 2 экв) и Pd(dppf)Cl₂ (1,91 г, 2,61 ммоль, 0,1 экв) при 15 °С. Смесь перемешивали при 110°С в течение 3 часов. ЖХ-МС показала, что реагент 1 был полностью израсходован, и был обнаружен один основной пик с целевой массой. Смесь фильтровали, промывали этилацетатом. Затем фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=1/1, 0/1) с получением 12 г неочищенного продукта. Неочищенный продукт растирали с гептаном/метил-трет-бутиловым эфиром=5/1(50 мл), фильтровали, фильтровальный осадок сушили в вакууме. Соединение [1-[3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метанол (8,2 г, 23,21 ммоль, выход 88,84%) получали в виде твердого розового вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 8,28 (с, 1H), 8,06 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,89-7,95 (м, 1H), 7,58 (т, J=8,0 Гц, 1H), 3,87 (т, J=8,0 Гц, 2H), 3,62-3,68 (м, 4H), 2,55-2,65 (м, 1H), 1,37 (с, 12H).

Получение этил-2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбоксилата, Bz-10h: К смеси [1-[3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метанола, Bz-10g (4,11 г, 11,64 ммоль, 1,2 экв) и этил-2-амино-8-бром-3H-1-бензазепин-4-карбоксилата (3 г, 9,70 ммоль, 1 экв) в диоксане (40 мл) и H₂O (3 мл) добавляли K₂CO₃ (2,68 г, 19,41 ммоль, 2 экв) и

Pd(dppf)Cl_2 (355,02 мг, 485,19 мкмоль, 0,05 экв) при 15°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 110°C в течение 3 часов. ЖХ-МС показала, что реагент 1 был полностью израсходован, и был обнаружен один основной пик с целевой массой. Смесь концентрировали. Неочищенный продукт растирали с $\text{EtOAc/H}_2\text{O}=1:1$ (200 мл) при 0°C в течение 10 мин и фильтровали, фильтровальный осадок сушили в вакууме. Соединение этил 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбоксилат, Vz-10h (4 г, неочищенный) получали в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (DMSO-d_6 , 400 МГц) δ 8,06-8,15 (м, 1H), 7,96 (с, 1H), 7,71-7,85 (м, 3H), 7,57 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,29-7,38 (м, 2H), 6,94 (с, 2H), 4,17-4,30 (м, 2H), 3,77 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,49 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,2 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 2,93 (с, 2H), 2,43-2,49 (м, 1H), 1,31 (т, $J=8,0$ Гц, 3H).

2-Амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбоновая кислота, Vz-10с

К раствору этил-2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбоксилата, Vz-10h (4 г, 8,78 ммоль, 1 экв) в MeOH (50 мл) и H_2O (10 мл) добавляли $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1,84 г, 43,91 ммоль, 5 экв). Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов. ЖХ-МС показала, что реагент 1 был полностью израсходован, и был обнаружен один основной пик с целевой массой. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления MeOH . Смесь фильтровали. pH фильтрата довели до около 6, постепенно добавляя раствор HCl (1 М), а затем фильтровали с получением сырого продукта. Неочищенный продукт растирали с CH_3CN (100 мл) при 0°C в течение 10 мин. Продукт сушили в вакууме. Соединение 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбоновую кислоту, Vz-10с (2,51 г, 5,72 ммоль, выход 65,11%, чистота 97,375%) получали в виде серого твердого вещества. ^1H ЯМР (DMSO-d_6 , 400 МГц) δ 8,11-8,16 (м, 1H), 8,02 (с, 1H), 7,92 (с, 1H), 7,78-7,88 (м, 4H), 7,75 (с, 1H), 3,76 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,45-3,54 (м, 4H), 3,20 (д, $J=4,0$ Гц, 2H), 2,45-2,49 (м, 1H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 428,13 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 428,20 (определено).



Синтез трет-бутил-N-[2-[бензил(пропил)амино]этил]карбамата Bz-10a

К смеси бензальдегида (2 г, 18,85 ммоль, 1,90 мл, 1 экв) и трет-бутил N-(2-аминоэтил)карбамата (3,32 г, 20,73 ммоль, 3,26 мл, 1,1 экв) в ДХЭ (30 мл) добавляли NaBH_3CN (2,37 г, 37,69 ммоль, 2 экв) при 0 °С. Смесь перемешивали при 0°С в течение 30 минут, к смеси добавляли пропаналь (5,47 г, 94,23 ммоль, 6,86 мл, 5 экв) и перемешивали в течение 1 часа при 25 °С. Смесь выливали в воду со льдом (50 мл) и водную фазу экстрагировали этилацетатом (50 мл x 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (50 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=5/1, 1/1) с получением трет-бутил-N-[2-[бензил(пропил)амино]этил]карбамата Bz-10a (3 г, 10,26 ммоль, выход 54,44%) в виде бесцветного масла.

Синтез трет-бутил-N-[2-(пропиламино)этил]карбамата Bz-10b

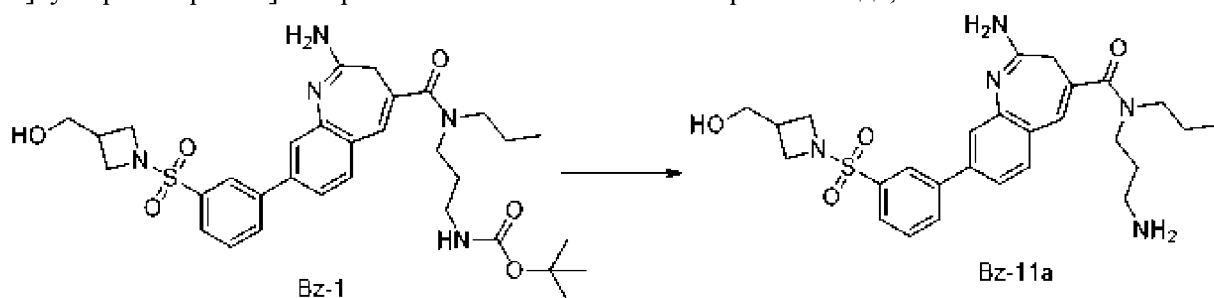
К раствору трет-бутил-N-[2-[бензил(пропил)амино]этил]карбамата (2 г, 6,84 ммоль, 1 экв) в MeOH (50 мл) добавляли $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (10% , 1 г) в атмосфере N_2 . Суспензию дегазировали под вакуумом и несколько раз продували H_2 . Смесь перемешивали в атмосфере H_2 (50 фунт/кв. дюйм) при 50°С в течение 12 часов. ТСХ (петролейный эфир/этилацетат=3: 1) показала, что исходный материал полностью израсходован. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали с получением трет-бутил-N-[2-(пропиламино)этил]карбамата (1,3 г, 6,43 ммоль, выход 93,96%) в виде бесцветного масла, которое использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. ^1H ЯМР (MeOD, 400МГц) δ 3,18 (т, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,68 (т, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,56 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 1,58-1,48 (м, 2H), 1,44 (с, 9H), 0,94 (т, $J=8,0$ Гц, 3H).

Синтез трет-бутил (2-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)этил)карбамата, Bz-10

К смеси 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, Bz-10с (0,15 г, 350,90 мкмоль, 1 экв) и трет-бутил-N-[2-(пропиламино)этил]карбамата (141,97 мг, 701,80 мкмоль, 2 экв) в ДМФ (4 мл) добавляли НАТУ (160,11 мг, 421,08 мкмоль, 1,2 экв), Et₃N (106,52 мг, 1,05 ммоль, 146,52 мкл, 3 экв) одной порцией при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 12 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь фильтровали и очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Waters Xbridge 150×25 5микрон; подвижная фаза: [вода (10 мМ NH₄HCO₃) - АЦН]; В%: 25% -45%, 20 мин) с получением трет-бутил N-[2-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]этил]карбамат (0,036 г, 55,05 мкмоль, выход 15,69%, чистота 93,54%) в виде твердого желтого вещества. ¹Н ЯМР (MeOD, 400МГц) δ 8,07 (с, 1Н), 8,03 (д, J=7,6 Гц, 1Н), 7,86-7,81 (д, J=8,0 Гц, 1Н), 7,78-7,73 (м, 1Н), 7,47 (с, 2Н), 7,41-7,36 (м, 1Н), 6,95 (с, 1Н), 3,86 (т, J=8,4 Гц, 2Н), 3,62-3,53 (м, 4Н), 3,49-3,44 (м, 2Н), 3,41 (д, J=6,4 Гц, 2Н), 3,32-3,29 (м, 3Н), 2,63-2,51 (м, 1Н), 1,68 (д, J=7,2 Гц, 2Н), 1,43 (с, 9Н), 0,98-0,83 (м, 3Н). ЖХ/МС [M+H] 612,29 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 612,40 (определено).

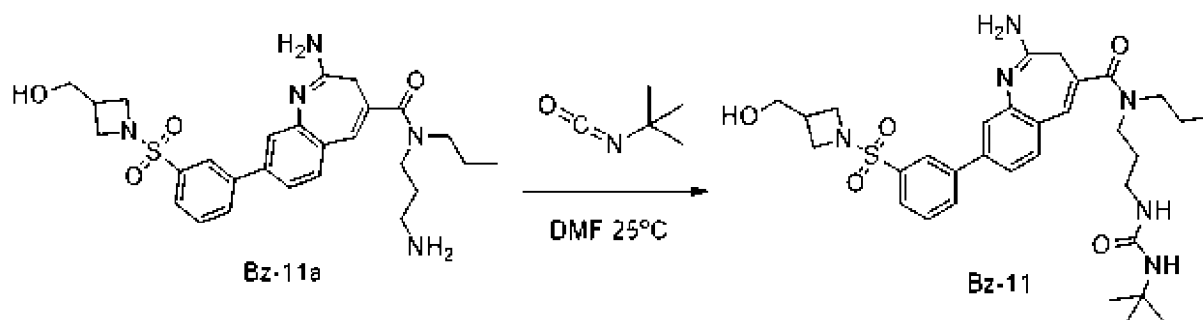
Пример 7 Синтез Bz-11

Синтез 2-амино-N-(3-аминопропил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3Н-1-бензазепин-4-карбоксамида, Bz- 11a.



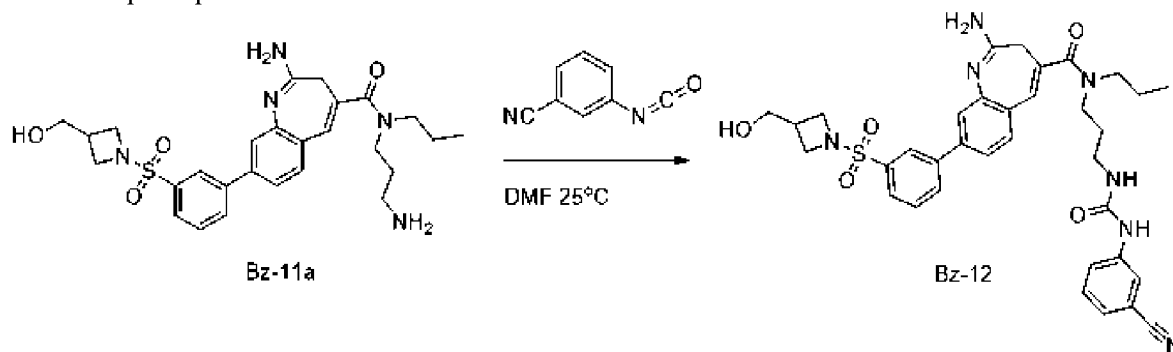
К смеси трет-бутил N-[3-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]пропил]карбамата, Bz-1 (0,5 г, 799,01 мкмоль, 1 экв) в ДХМ (20 мл) добавляли ТФУ (1,82 г, 15,98 ммоль, 1,18 мл, 20 экв) одной порцией при 15 °С. Смесь перемешивали при 15°С в течение 3 часов. ЖХМС показала, что реагент израсходован. Смесь концентрировали в вакууме, остаток выливали в воду со льдом (30 мл) и доводили рН до 11 с помощью Na₂CO₃.водн. Водную фазу экстрагировали ДХМ/и-PrOH=3/1 (20 мл × 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (10 мл), сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт 2-амино-N-(3-аминопропил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3Н-1-бензазепин-4-карбоксамида, Bz -11a (0,4 г, неочищенный) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез 2-амино-N-[3-(трет-бутилкарбамоиламино)пропил]-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3Н-1-бензазепин-4-карбоксамида, Bz-11



К раствору 2-амино-N-(3-аминопропил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, Bz-11a (0,1 г, 190,24 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (2 мл) добавляли 2-изоцианато-2-метилпропан (18,86 мг, 190,24 мкмоль, 22,45 мкл, 1 экв) одной порцией при 15 °С. Смесь перемешивали при 15°С в течение 12 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь фильтровали и очищали препаративной ВЭЖХ (колонок: Nano-micro Kromasil® (Nouryon) C18 100×30мм, размер частиц 5 микрон; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 25%-45%, 10 мин) с получением неочищенного продукта, который затем очищают препаративной ВЭЖХ (колонок: Welch Xtimate C18 150×25мм, размер частиц 5 микрон; подвижная фаза: [вода (10 мМ NH₄HCO₃)-АЦН]; В%: 25%-65%, 10,5 мин) с получением Bz-11 (0,007 г, 11,20 мкмоль, выход 5,89%) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,09 (с, 1H), 8,05 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,87-7,85 (м, 1H), 7,80-7,76 (м, 1H), 7,51-7,49 (м, 2H), 7,43-7,41 (м, 1H), 6,94 (с, 1H), 3,88 (т, J=8,0 Гц, 2H), 3,63-3,60 (м, 2H), 3,54-3,50 (м, 2H), 3,44-3,43 (м, 4H), 3,15-2,91 (м, 4H), 2,67-2,58 (м, 1H), 1,84-1,79 (м, 2H), 1,73-1,66 (м, 2H), 1,40-1,14 (м, 9H), 1,00-0,90 (м, 3H).

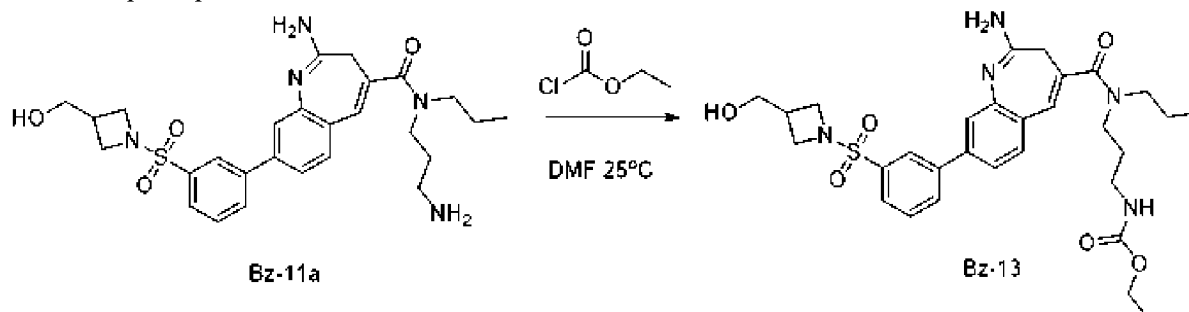
Пример 8 Синтез Bz-12



К раствору 2-амино-N-(3-аминопропил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, Bz-11a (0,1 г, 190,24 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (0,3 мл) добавляли 3-изоцианатобензонитрил (27,42 мг, 190,24 мкмоль, 1 экв) одной порцией при 15 °С. Смесь перемешивали при 15°С в течение 12 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь фильтровали и очищали препаративной ВЭЖХ (колонок: Nano-micro Kromasil C18 100×30мм 5 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 25%-45%, 10 мин) с получением 2-амино-N-[3-[(3-цианофенил)карбамоиламино]пропил]-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, Bz-12 (10 мг, 14,93

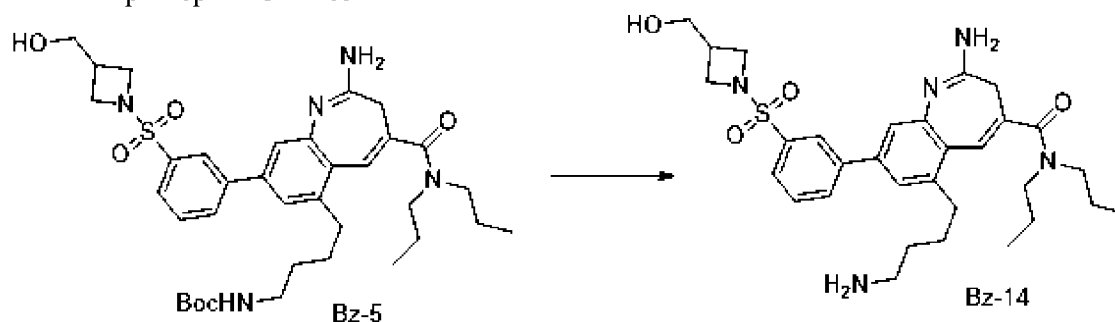
мкмоль, выход 7,85%) в виде твердого желтого вещества. ^1H ЯМР (CD_3OD , 400 МГц) δ 8,21-7,88 (м, 4H), 7,86-7,80 (м, 1H), 7,68 (с, 3H), 7,59-7,24 (м, 3H), 7,15 (с, 1H), 3,89 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,64 (м, 4H), 3,51 (с, 2H), 3,46 (д, $J=6,0$ Гц, 2H), 3,40 (с, 2H), 3,30-3,19 (м, 2H), 2,63-2,60 (м, 1H), 1,96-1,92 (м, 2H), 1,77-1,71 (м, 2H), 1,07-0,86 (м, 3H).

Пример 9 Синтез Vz-13



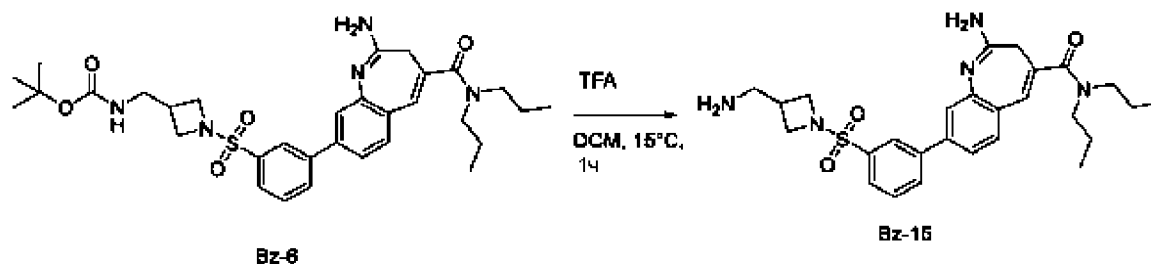
К раствору 2-амино-N-(3-аминопропил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, Vz-11a (0,1 г, 190,24 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (2 мл) добавляли этилкарбонхлоридат (этилхлорформиат) (61,94 мг, 570,72 мкмоль, 54,33 мкл, 3 экв) одной порцией при 15 °С. Смесь перемешивали при 15°С в течение 1 часа. ЖХМС и ВЭЖХ показали, что было обнаружено целевое соединение. Смесь фильтровали и очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Waters Xbridge ВЕН C18, 100×25мм, 5мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 25%-45%, 20 мин) с получением этил N-[3-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]пропил] карбамата, Vz - 13 (0,018 г, 30,11 мкмоль, выход 15,83%) в виде светло-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (CD_3OD , 400 МГц) δ 8,11 (с, 1H), 8,08 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,91 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,83 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,81-7,75 (м, 1H), 7,74-7,68 (м, 2H), 7,12 (с, 1H), 4,07 (уш. с, 2H), 3,87 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,61 (м, 2H), 3,55 (м, 2H), 3,48 (м, 2H), 3,42 (д, $J=6,4$ Гц, 2H), 3,37 (с, 2H), 3,14 (м, 2H), 2,67-2,51 (м, 1H), 1,93-1,80 (м, 2H), 1,77-1,64 (м, 2H), 1,33-1,06 (м, 3H), 0,95 (с, 3H).

Пример 10 Синтез Vz-14



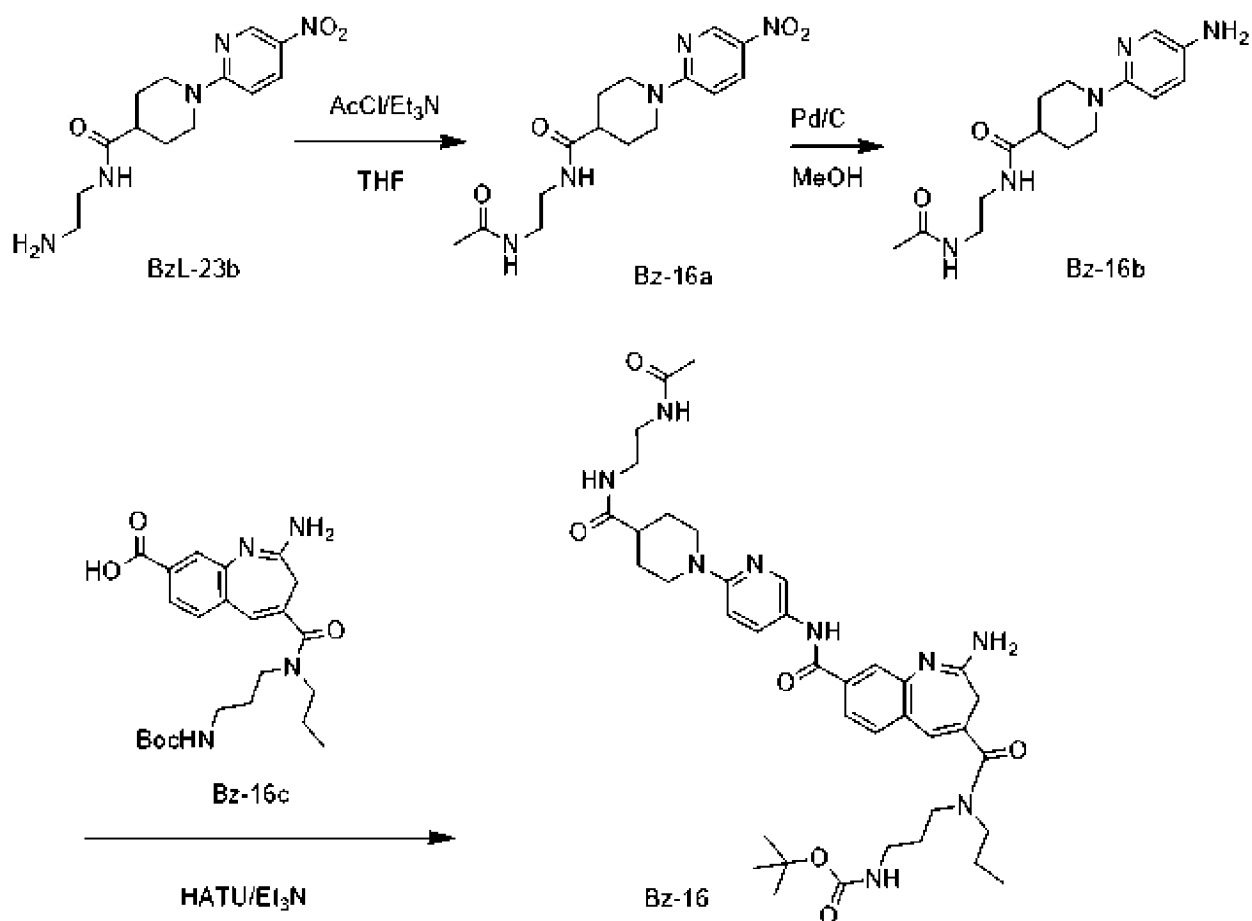
2-Амино-6-(4-аминобутил)-8-3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N, N-дипропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамида, Vz-14 был синтезирован из Vz-5 в соответствии со способом, описанным для Vz-11a. ЖХ/МС $[M+H]$ 582,31 (рассчитано); ЖХ/МС $[M+H]$ 582,57 (определено).

Пример 11 Синтез Vz-15



К раствору трет-бутил-N-[[1-[3-[2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-8-ил]фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамат, Vz -6 (0,15 г, 245,99 мкмоль, 1 экв) в ДХМ (20 мл) добавляли ТФУ (56,10 мг, 491,98 мкмоль, 36,43 мкл, 2 экв) при 25°C и перемешивали в течение 1 часа. Смесь концентрировали при пониженном давлении при 40°C. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil C18 100×30мм 5мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 25% -50%, 10 мин) с получением 2-амино-8-[3-[3-(аминометил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N, N-дипропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, Vz-15 (0,0546 г, 105,69 мкмоль, выход 42,97%, чистота 98,66%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD-d₄, 400 МГц) δ 8,16-8,07 (м, 2H), 7,92 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,83 (т, J=7,6 Гц, 1H), 7,79-7,72 (м, 2H), 7,68 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,09 (с, 1H), 3,96 (т, J=8,4 Гц, 2H), 3,67-3,63 (м, 2H), 3,50-3,42 (м, 4H), 3,37 (с, 2H), 3,05 (д, J=7,4 Гц, 2H), 2,78-2,65 (м, 1H), 1,75-1,66 (м, 4H), 1,08-0,82 (м, 6H). ЖХ/МС [M+H] 510,25 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 510,10 (определено).

Пример 12 Синтез Vz-16



Синтез N-(2-ацетамидоэтил)-1-(5-нитропиперидин-2-ил)пиперидин-4-карбоксамида, Bz-16a.

К смеси ацетилхлорида (142,82 мг, 1,82 ммоль, 129,83 мкл, 3 экв) и N-(2-аминоэтил)-1-(5-нитро-2-пиридил)пиперидин-4-карбоксамида, BzL-23b (0,2 г, 606,46 мкмоль, 1 экв, HCl) в ТГФ (10 мл) добавляли Et₃N (245,47 мг, 2,43 ммоль, 337,65 мкл, 4 экв) при 25°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь выливали в воду (20 мл). Смесь фильтровали с получением Bz-16a (0,2 г, 596,38 мкмоль, выход 98,34%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц) δ 8,95 (д, J=2,4 Гц, 1H), 8,19 (дд, J=9,6, 2,4 Гц, 1H), 7,78-7,98 (м, 2H), 6,95 (д, J=9,6 Гц, 1H), 4,50 (д, J=9,6 Гц, 2H), 2,93-3,15 (м, 7H), 1,73-1,80 (м, 5H), 1,43-1,62 (м, 2H), 1,07-1,28 (м, 3H).

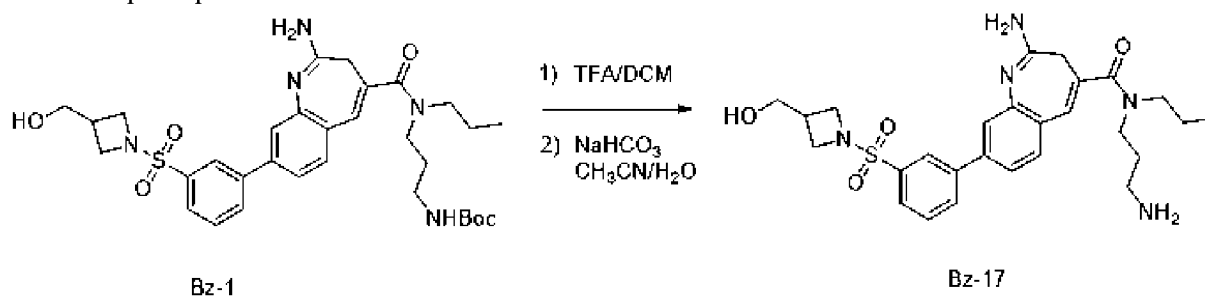
Синтез N-(2-ацетамидоэтил)-1-(5-аминопиперидин-2-ил)пиперидин-4-карбоксамида, Bz-16b.

К раствору N-(2-ацетамидоэтил)-1-(5-нитро-2-пиридил)пиперидин-4-карбоксамида, Bz-16a (0,2, 596,38 мкмоль, 1 экв) в MeOH (20 мл) добавляли Pd/C (0,2 г, чистота 5%) в атмосфере N₂. Суспензию дегазировали под вакуумом и несколько раз продували H₂. Смесь перемешивали в атмосфере H₂ (15 фунт/кв. дюйм) при 25°C в течение 4 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь фильтровали и концентрировали с получением Bz-16b (0,18 г, 589,44 мкмоль, выход 98,84%) в виде твердого желтого вещества.

Синтез трет-бутил (3-(8-((6-(4-((2-ацетамидоэтил)карбамоил)пиперидин-1-ил)пиридин-3-ил)карбамоил)-2-амино-N-пропил-3Н-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамат, Bz-16.

К смеси 2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропил-пропилкарбамоил]-3Н-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты, Bz-16с (0,22 г, 494,91 мкмоль, 1 экв), НАТУ (225,82 мг, 593,90 мкмоль, 1,2 экв) в ДМФ (5 мл) добавляли Et₃N (150,24 мг, 1,48 ммоль, 206,66 мкл, 3 экв) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 5 минут, затем к смеси добавляли N-(2-ацетамидоэтил)-1-(5-амино-2-пиридил)пиперидин-4-карбоксамид, Bz-16b (151,13 мг, 494,91 мкмоль, 1 экв), перемешивали в течение 30 мин. Смесь выливали в воду (50 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (50 мл), сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ, колонка: Welch Xtimate C18 150×25 мм, 5 мкм; подвижная фаза: [вода (10 mM NH₄HCO₃) -АЦН]; В%: 30%-50%, 10,5 мин с получением Bz-16 (96 мг, 131,17 мкмоль, выход 26,50%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹Н ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,39 (д, J=2,6 Гц, 1H), 7,90 (дд, J=9,2, 2,6 Гц, 1H), 7,69 (д, J=1,2 Гц, 1H), 7,54-7,60 (м, 1H), 7,46 (уш д, J=8,0 Гц, 1H), 6,85-6,95 (м, 2H), 4,30 (д, J=13,6 Гц, 2H), 3,39-3,53 (м, 4H), 3,28 (с, 2H), 3,08-3,12 (м, 2H), 2,83-2,93 (м, 2H), 2,37-2,47 (м, 1H), 1,94 (с, 3H), 1,60-1,90 (м, 8H), 1,24 -1,50 (м, 9H). ЖХ/МС [М+Н] 732,42 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 732,40 (определено).

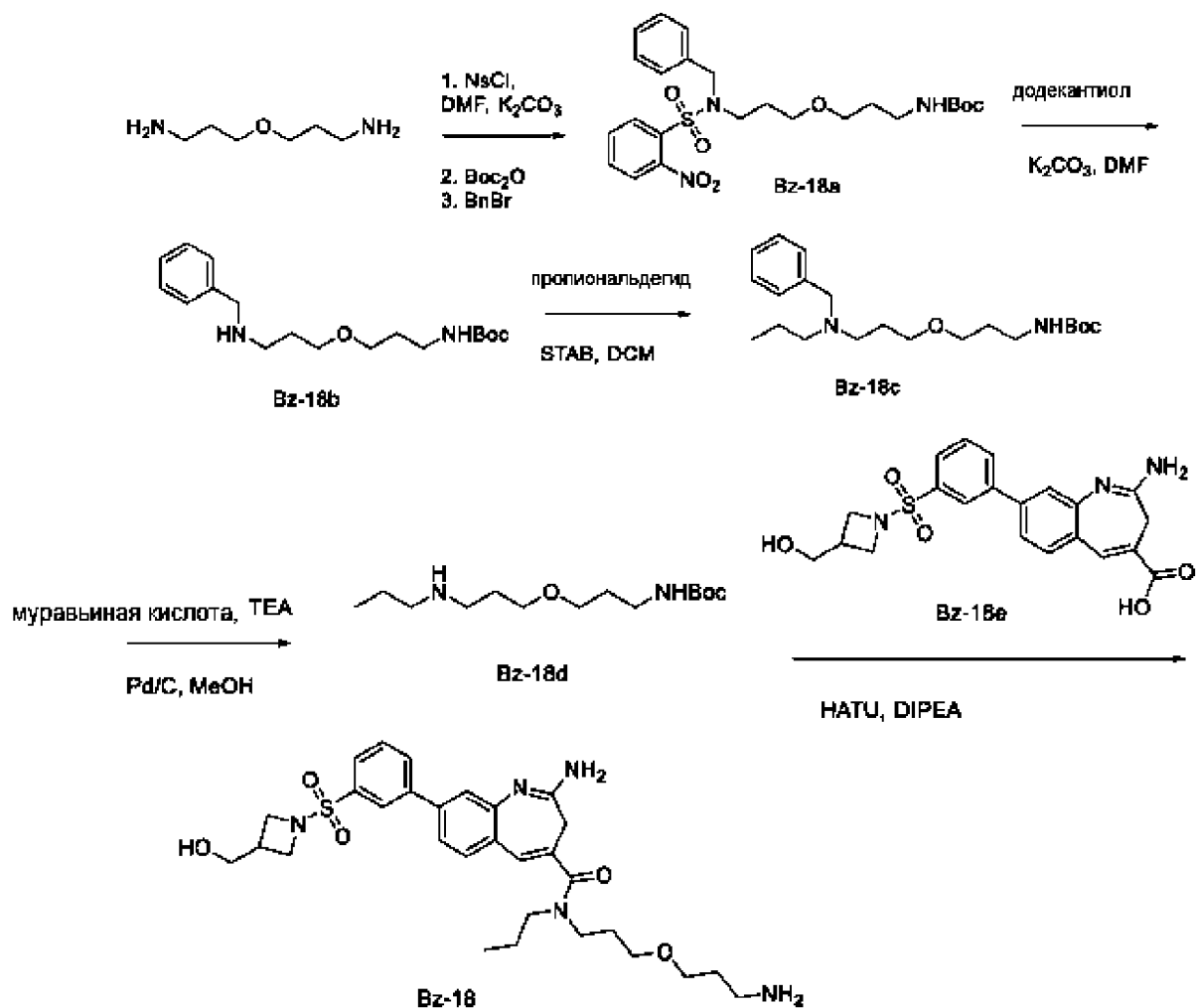
Пример 13 Синтез Bz-17



К раствору трет-бутил-N-[3-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]пропил]карбамата, Bz-1 (1,5 г, 2,40 ммоль, 1 экв) в ДХМ (20 мл) добавляли ТФУ (6,16 г, 54,03 ммоль, 4 мл, 22,54 экв) при 25°С в атмосфере N₂ и затем перемешивали при этой температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли CH₃CN (30 мл) и H₂O (10 мл) и доводили pH до 8-9 водн. NaHCO₃ при 0 °С. Смесь перемешивали в течение 30 минут при 25°С и затем концентрировали при пониженном давлении для удаления CH₃CN. Водную фазу экстрагировали ДХМ/*i*-PrOH=3/1 (20 мл x 3), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (условия: ТФУ; колонка: luna® (Phenomenex) C18 250 * 80мм*10 мкм (микрон); подвижная фаза: [вода (0,1%ТФУ)-АЦН];В%: 10%-40%,20 мин) с получением 2-амино-N-(3-аминопропил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3Н-1-бензазепин-4-

карбоксиамида, Vz-17 (1,00 г, 1,57 ммоль, выход 65,48%, соль ТФУ) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD-d_4 , 400 МГц) δ 8,14-8,05 (м, 2H), 7,91 (д, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,86-7,81 (м, 1H), 7,80-7,72 (м, 2H), 7,71-7,67 (м, 1H), 7,15 (с, 1H), 3,87 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,65-3,57 (м, 4H), 3,55-3,52 (м, 2H), 3,45-3,36 (м, 4H), 3,04-3,01 (м, 2H), 2,63-2,53 (м, 1H), 2,04 (квин, $J=7,2$ Гц, 2H), 1,77-1,70 (м, 2H), 0,94 (уш т, $J=6,8$ Гц, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 526,2 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 526,2 (определено).

Пример 14 Синтез Vz-18



Получение *трет*-бутил (3-(3-((N-бензил-2-нитрофенил)сульфонамидо)пропокси)пропил)карбамата, Vz-18a.

3,3'-Оксибис(пропан-1-амин) (0,5 г, 3,8 ммоль, 1 экв) и карбонат калия (1,3 г, 9,5 ммоль, 2,5 экв) помещали в 10 мл ДМФ. Добавляли 2-нитрофенилсульфонилхлорид (0,84 г, 3,8 ммоль, 1 экв), и реакцию контролировали с помощью ЖХМС. Затем добавляли ди-*трет*-бутилкарбонат (0,87 мл, 3,8 ммоль, 1 экв). Примерно через один дополнительный час добавляли бензилбромид (0,45 мл, 3,8 ммоль, 1 экв), и реакционную смесь нагревали до 75 °С. По завершении реакционную смесь фильтровали, концентрировали и очищали флэш-хроматографией с получением Vz-18a (0,47 г, 0,93 ммоль, 25%). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$

508,21 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 508,43 (определено).

Получение *трет*-бутил (3-(3-(бензиламино)пропокси)пропил)карбамата, Vz-18b

Vz-18a (0,47 г, 0,93 ммоль, 1 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли карбонат калия (0,19 г, 1,4 ммоль, 1,5 экв), а затем додекантиол (0,33 мл, 1,4 ммоль, 1,5 экв). Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение ночи, а затем очищали колоночной хроматографией с получением Vz-18b (0,18 г, 0,57 ммоль, 61%). ЖХ/МС [М+Н] 323,23 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 323,38 (определено).

Получение *трет*-бутил (3-(3-(бензил(пропил)амино)пропокси)пропил)карбамата, Vz-18c

Vz-18b (0,183 г, 0,57 ммоль, 1 экв) растворяли в ДХМ. Добавляли пропионовый альдегид (0,1 мл, 1,4 ммоль, 2,5 экв) и триацетоксиборгидрид натрия (0,3 г, 1,4 ммоль, 2,5 экв). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением Vz-18c (0,058 г, 0,159 ммоль, 31%). ЖХ/МС [М+Н] 365,28 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 365,44 (определено).

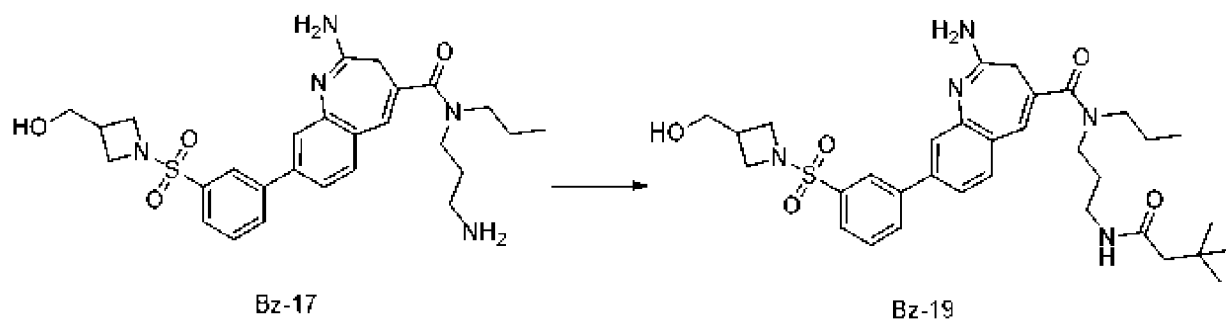
Получение *трет*-бутил (3-(3-(пропиламино)пропокси)пропил)карбамата, Vz-18d

Vz-18c (0,058 г, 0,159 ммоль, 1 экв) растворяли в 4 мл метанола. К раствору добавляли триэтиламин (0,067 мл, 0,48 ммоль, 3 экв), затем муравьиную кислоту (0,015 мл, 0,40 ммоль, 2,5 экв) и затем Pd/C (5 мг, 10 мас.%). Смесь нагревали до 60 °C. После исчерпания исходного материала реакцию смесь фильтровали и концентрировали с получением Vz-18d (0,007 г, 0,0092 ммоль, 26%). ЖХ/МС [М+Н] 275,23 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 275,27 (определено).

Получение Vz-18

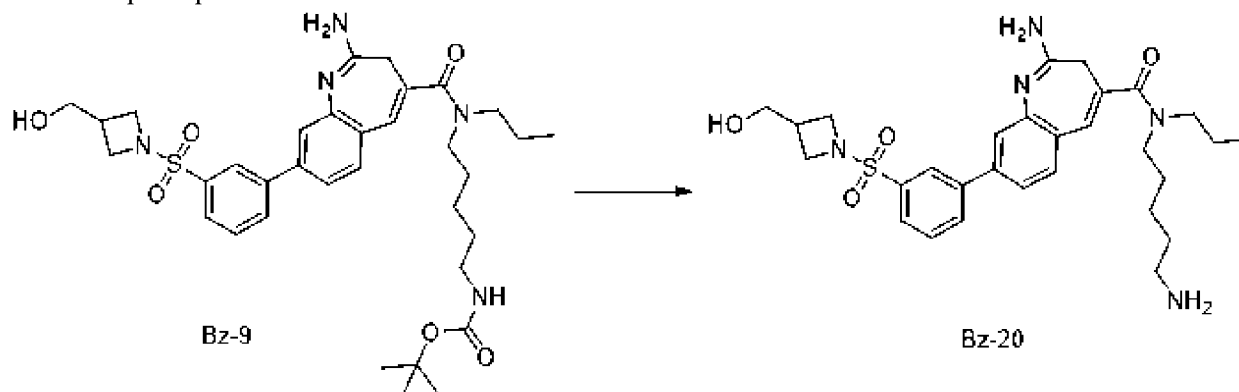
2-Амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[b]азепин-4-карбоновую кислоту, Vz-18e (0,025 г, 0,075 ммоль, 1 экв), Vz-18d (0,02 г, 0,075 ммоль, 1 экв) и диизопропилэтиламин (0,065 мл, 0,38 ммоль, 5 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли НАТУ (0,043 г, 0,113 ммоль, 1,5 экв), и смесь перемешивали при комнатной температуре. По завершении реакцию смесь концентрировали и очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ. Выделенный продукт концентрировали, растворяли в минимальном количестве ТФУ и оставляли при комнатной температуре на 15 минут. Затем раствор концентрировали, очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ и лиофилизировали с получением 2-амино-N-(3-(3-аминопропокси)пропил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3Н-бензо[b]азепин-4-карбоксамид, Vz-18 в виде белого порошка (1,2 мг, 0,002 ммоль, 3%). ЖХ/МС [М+Н] 584,29 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 584,50 (определено).

Пример 15 Синтез Vz-19



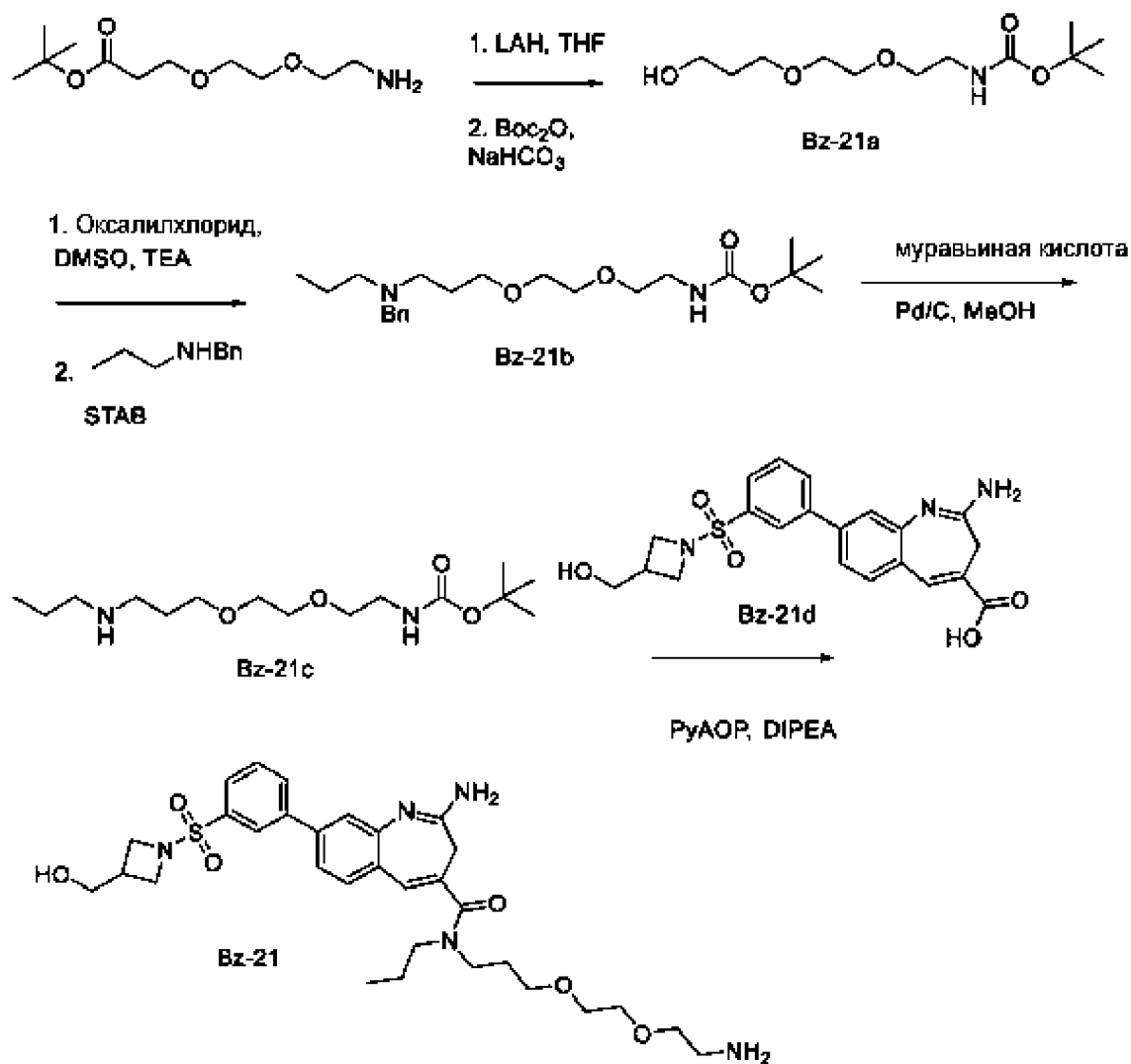
В сосуд помещали Vz-17 (0,0275 ммоль), диизопропилэтиламин (15 мкл, 0,0825 ммоль), *трет*-бутилацетилхлорид (0,0275 ммоль), 250 мкл ДХМ и 250 мкл ДМФ. Реакционную смесь выдерживали в течение трех часов и очищали с помощью нормально-фазовой хроматографии с использованием МеОН:ДХМ, градиент 0-10%, с получением 6,6 мг 2-амино-N-(3-(3,3-диметилбутанамидо)пропил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамида, Vz-19 с выходом 39%. ЖХ/МС [M+H] 624,3 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 624,3 (определено).

Пример 16 Синтез Vz-20



В сосуд помещали Vz-9 (28 мг, 0,043 ммоль), 300 мкл ДХМ и 100 мкл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали в течение 1 часа, после чего ее концентрировали при пониженном давлении. Полученное масло трижды азеотропировали с 1 мл толуола, после чего добавляли 1 мл метанола и K_2CO_3 (38 мг, 0,28 ммоль). После перемешивания в течение 16 часов реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, а затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 5,8 мг 2-амино-N-(5-аминопентил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамида, Vz-20 с выходом 24%. ЖХ/МС [M+H] 554,28 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 554,47 (определено).

Пример 17 Синтез Vz-21



Получение *трет*-бутил (2-(2-(3-гидроксипропокси)этокси)этил)карбамата, Bz-21a
трет-бутил-3-(2-(2-аминоэтокси)этокси)пропаноат (0,5 г, 2,1 ммоль, 1 экв) растворяли в ТГФ. Добавляли алюмогидрид лития (0,244 г, 6,4 ммоль, 3 экв) и реакционную смесь нагревали до 60 °С. После полного восстановления сложного эфира реакционную смесь охлаждали на льду и добавляли насыщенный водный раствор бикарбоната натрия. Смесь перемешивали в течение 10 минут, а затем добавляли ди-*трет*-бутилдикарбонат (0,49 мл, 2,1 ммоль, 1 экв). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, а затем концентрировали для удаления ТГФ перед очисткой ВЭЖХ с получением Bz-21a (0,205 г, 0,78 ммоль, 36%). ЖХ/МС [M+H] 264,18 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 264,27 (определено).

Получение *трет*-бутил (2-(2-(3-бензил(пропил)амино)пропокси)этокси)этил)карбамата, Bz-21b

Оксалилхлорид (0,205 мл, 2,4 ммоль, 3 экв) растворяли в 0,5 мл ДХМ при -78 °С. По каплям добавляли ДМСО (0,34 мл, 4,8 ммоль, 6 экв). Реакционную смесь перемешивали при -78 °С в течение 15 минут, затем по каплям добавляли Bz-21a (0,21 г, 0,80 ммоль, 1 экв) в виде раствора в 0,5 мл ДХМ. Реакционную смесь перемешивали 30

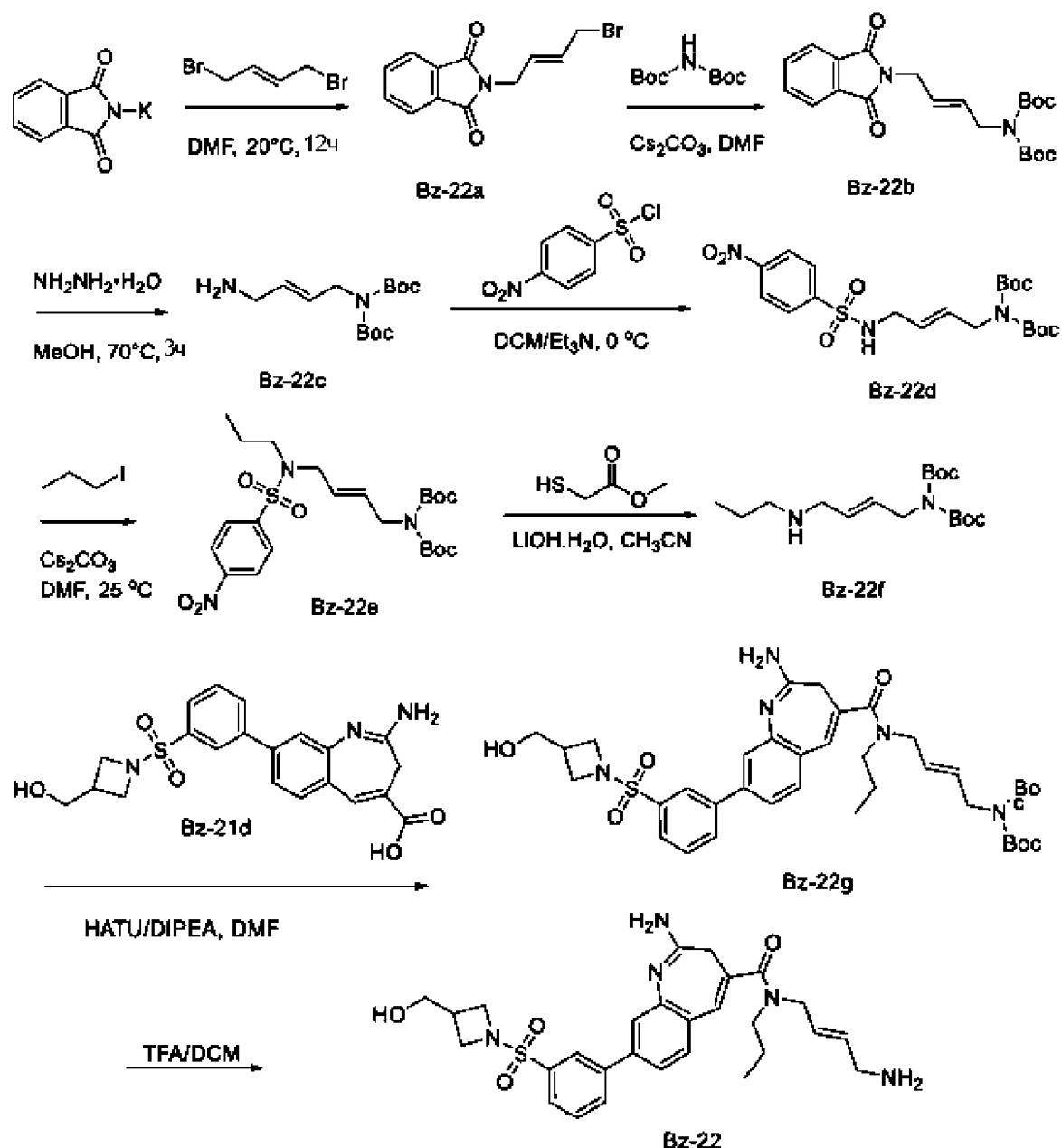
минут при $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, а затем по каплям добавляли триэтиламин (1 мл, 7,2 ммоль, 9 экв). Реакционную смесь перемешивали еще 30 минут при $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем снимали с охлаждения и давали нагреться до температуры окружающей среды в течение 30 минут. N-Бензилпропан-1-амин (0,119 г, 0,80 ммоль, 1 экв) и триацетоксиборгидрид натрия, STAB (0,845 г, 4,0 ммоль, 5 экв) суспендировали в 2 мл ДХМ. Раствор неочищенного альдегида добавляли к перемешиваемому раствору амина. Через 30 минут реакционную смесь добавляли в делительную воронку и промывали насыщенным NaHCO_3 , водой и затем рассолом. Органическую фракцию сушили над сульфатом натрия, фильтровали, концентрировали и затем очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ с получением Vz-21b (0,228 г, 0,58 ммоль, 73%). ЖХ/МС [М+Н] 395,29 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 395,44 (определено).

Получение *трет*-бутил (2-(2-(3-(пропиламино)пропокси)этокси)этил)карбамата, Vz-21c

Vz-21b (0,228 г, 0,58 ммоль, 1 экв) растворяли в метаноле. Добавляли муравьиную кислоту (0,033 моль, 0,87 ммоль, 1,5 экв), а затем 10 мас.% Pd/C (0,02 г). Реакционную смесь перемешивали при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, а затем фильтровали, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением Vz-21c в виде соли ТФУ (0,193 г, 0,46 ммоль, 80%). ЖХ/МС [М+Н] 305,24 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 305,38 (определено).

Получение Vz-21: 2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[b]азепин-4-карбоновую кислоту, Vz-21d (0,042 г, 0,099 ммоль, 1 экв), Vz-21c (0,03 г, 0,099 ммоль, 1 экв) и диизопропилэтиламин (0,1 мл, 0,57 ммоль, 5,8 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли 7-Аза-бензотриазол-1-илокси-трипирролидинофосфоний гексафторфосфат, PyAOP, CAS Reg. No. 156311-83-0 (0,077 г, 0,15 ммоль, 1,5 экв), и смесь перемешивали при комнатной температуре. По завершении реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ. Выделенный продукт концентрировали, растворяли в минимальном количестве ТФУ и оставляли при комнатной температуре на 15 минут. Затем раствор концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением масла, которое растирали с диэтиловым эфиром, получая 2-амино-N-(3-(2-(2-аминоэтокси)этокси)пропил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3Н-бензо[b]азепин-4-карбоксамид, Vz-21 в виде белого твердого вещества (0,037 г, 0,060 ммоль, 61%). ЖХ/МС [М+Н] 614,30 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 614,58 (определено).

Пример 18 Синтез Vz-22



Получение (E)-2-(4-бромбут-2-ен-1-ил)изоиндолин-1,3-диона, Bz-22a

К раствору (1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)калия (7,5 г, 40,5 ммоль, 1 экв) в ДМФ (100 мл) добавляли (E)-1,4-дибромбут-2-ен (17,3 г, 80,9 ммоль, 2 экв). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 часов, а затем разбавляли водой (200 мл) и экстрагировали EtOAc (80 мл x 3). Органический слой промывали рассолом (50 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; флэш-колонка с силикагелем SepaFlash® 12 г, элюент этилацетат/петролейный эфир, градиент 0~60% при 60 мл/мин) с получением Bz-22a (8,6 г, 30,7 ммоль, выход 75,82%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 7,90-7,83 (м, 2H), 7,78-7,70 (м, 2H), 6,01-5,90 (м, 1H), 5,89-5,79 (м, 1H), 4,32 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,92 (д, J=7,2 Гц, 2H).

Получение трет-бутил-N-трет-бутоксикарбонил-N-[(E)-4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-

ил)бут-2-енил]карбамата, Vz-22b

К раствору Vz-22a (11 г, 39,3 ммоль, 1 экв) в ДМФ (200 мл) добавляли Cs_2CO_3 (19,2 г, 58,9 ммоль, 1,5 экв) и трет-бутил-N-трет-бутоксикарбонилкарбамат (11,1 г, 51,1 ммоль, 1,3 экв). Смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч и затем разбавляли водой (400 мл), и экстрагировали EtOAc (100 мл x 3). Органический слой промывали рассолом (80 мл x 3), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; флэш-колонка с силикагелем SepaFlash® 5 г, элюент этилацетат/петролейный эфир, градиент 0~70% @ 65 мл/мин) с получением Vz-22b (16 г, 38,4 ммоль, выход 97,83%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$, 400 МГц) δ 7,90-7,83 (м, 4H), 5,63-5,53 (м, 2H), 4,20-4,12 (м, 2H), 4,05-3,99 (м, 2H), 1,36 (с, 18H)

Получение трет-бутил-N-[(E)-4-аминобут-2-енил]-N-трет-бутоксикарбонилкарбамата, Vz-22c

К раствору Vz-22b (18 г, 43,2 ммоль, 1 экв) в MeOH (200 мл) добавляли гидразингидрат (10,2 г, 173 ммоль, 9,90 мл чистота 85%, 4 экв) при 20°C и затем перемешивали при 70°C в течение 3 ч. Смесь фильтровали и фильтрат концентрировали. Неочищенный продукт растирали с CH_3CN при 20°C в течение 20 мин и фильтровали, фильтрат концентрировали с получением Vz-22c (10 г, 34,9 ммоль, выход 80,80%) в виде светло-желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 5,78-5,69 (м, 1H), 5,64-5,54 (м, 1H), 4,17-4,09 (м, 2H), 3,31-3,23 (м, 2H), 1,49 (с, 18H)

Получение трет-бутил-N-трет-бутоксикарбонил-N-[(E)-4-[(4-нитрофенил)сульфониламино]бут-2-енил]карбамата, Vz-22d

К раствору Vz-22c (1 г, 3,49 ммоль, 1 экв) в ДХМ (10 мл) добавляли ТЭА (706,72 мг, 6,98 ммоль, 972,10 мкл (микролитров), 2 экв) и 4-нитробензолсульфонилхлорид (851,29 мг, 3,84 ммоль, 1,1 экв) при 0°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч, а затем гасили добавлением H_2O (20 мл) при 0°C, а затем экстрагировали EtOAc (10 мл x 3). Объединенные органические слои промывали рассолом (5 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 1/1) с получением Vz-22d (1,2 г, 2,54 ммоль, выход 72,74%) в виде светло-желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 8,41-8,35 (м, 2H), 8,05 (д, J=9,2 Гц, 2H), 5,71-5,61 (м, 1H), 5,57-5,47 (м, 1H), 4,61 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,10 (д, J=5,6 Гц, 2H), 3,67 (т, J=6,0 Гц, 2H), 1,49 (с, 18H).

Получение трет-бутил-N-трет-бутоксикарбонил-N-[(E)-4-[(4-нитрофенил)сульфонилпропиламино]бут-2-енил]карбамата, Vz-22e

К раствору Vz-22d (1 г, 2,12 ммоль, 1 экв) в ДМФ (10 мл) добавляли Cs_2CO_3 (1,38 г, 4,24 ммоль, 2 экв) и 1-йодпропан (360,52 мг, 2,12 ммоль, 207,19 мкл, 1 экв) при 25°C и затем перемешивали при этой температуре в течение 12 часов. Реакционную смесь гасили добавлением H_2O (50 мл) при 0°C, а затем экстрагировали EtOAc (30 мл x 3). Объединенные органические слои промывали рассолом (10 мл x 3), сушили над Na_2SO_4 ,

фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , **петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 3/1**) с получением Vz-22e (0,89 г, 1,73 ммоль, выход 81,71%) в виде светло-желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 8,36 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,99 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 5,74-5,60 (м, 1H), 5,51-5,37 (м, 1H), 4,11 (д, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,86 (д, $J=6,4$ Гц, 2H), 3,16-3,07 (м, 2H), 1,55-1,46 (м, 20H), 0,86 (т, $J=7,6$ Гц, 3H)

Получение трет-бутил-N-трет-бутоксикарбонил-N-[(E)-4-(пропиламино)бут-2-енил]карбамата, Vz-22f

К раствору Vz-22e (0,79 г, 1,54 ммоль, 1 экв) в CH_3CN (10 мл) добавляли $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (387,25 мг, 9,23 ммоль, 6 экв) и метил 2-сульфанилацетат (490 мг, 4,61 ммоль, 419 мкл, 3 экв) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали при 25 °С в течение 12 ч и затем фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли H_2O (20 мл) при 0 °С, затем доводили pH до 2-3 с помощью 1 М HCl и экстрагировали МТВЕ (10 мл x 3). pH водной фазы доводили до ~10 водн. K_2CO_3 и экстрагировали (10 мл x 3). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением Vz-22f (0,35 г, 1,07 ммоль, выход 69,28%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 5,79-5,58 (м, 2H), 4,15 (д, $J=5,2$ Гц, 2H), 3,23 (д, $J=5,6$ Hz, 2H), 2,56 (т, $J=6,8$ Hz, 2H), 1,56-1,42 (м, 20H), 0,92 (т, $J=7,6$ Hz, 3H).

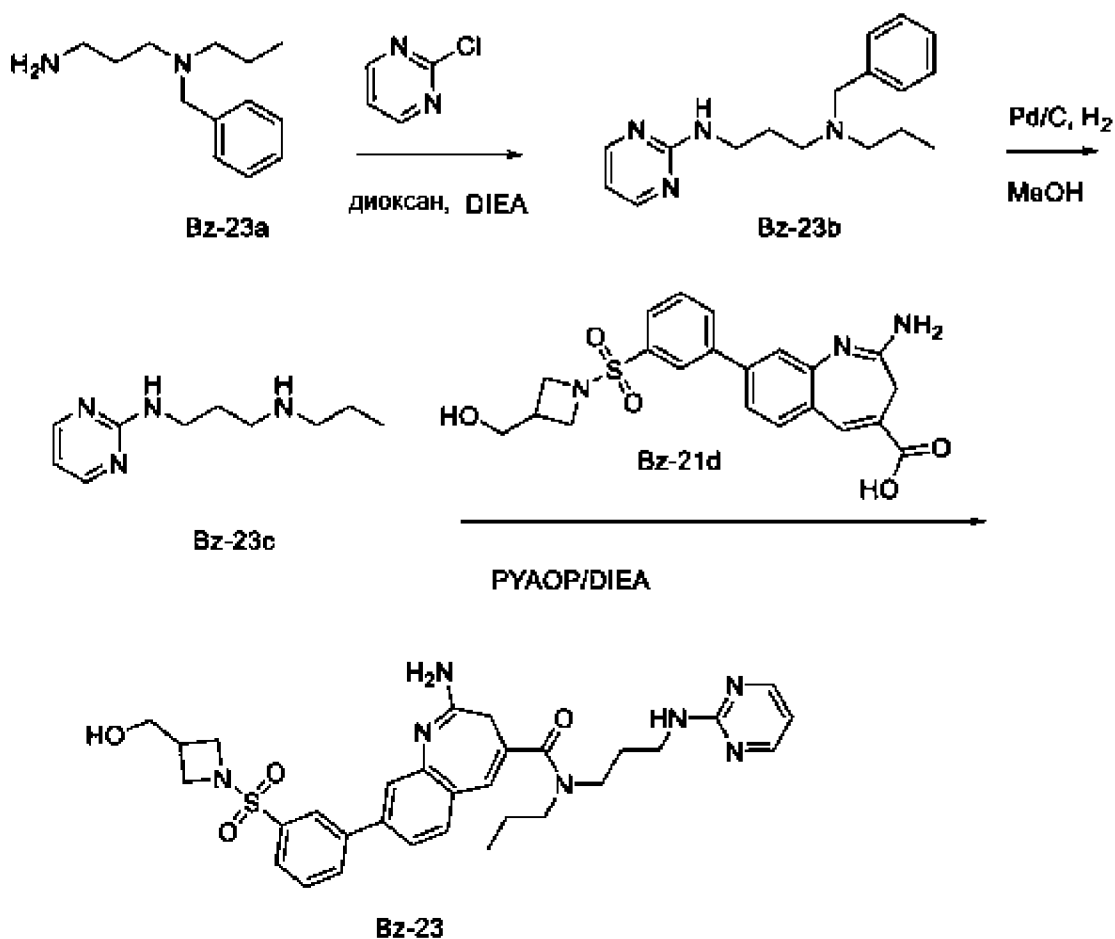
Получение трет-бутил-N-[(E)-4-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]бут-2-енил]-N-трет-бутоксикарбонил-карбамата, Vz-22g

К смеси 2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбоновой кислоты, Vz-21d (0,45 г 1,05 ммоль, 1 экв) в ДМФ (5 мл) добавляли HATU (440 мг, 1,16 ммоль, 1,1 экв) и DIPEA (408 мг, 3,16 ммоль, 550 мкл, 3 экв) при 25 °С. Через 10 минут к смеси добавляли Vz-22f (345,75 мг, 1,05 ммоль, 1 экв) при 25 °С и затем перемешивали при этой температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь выливали в воду со льдом (30 мл) при 0 °С, и экстрагировали ДХМ/i-PrOH=3/1 (20 мл x 3). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением Vz-22g (0,41 г, неочищенного продукта) в виде коричневого твердого вещества.

Получение Vz-22: К раствору трет-бутил-N-[(E)-4-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]бут-2-енил]-N-трет-бутоксикарбонилкарбамата (13 мг, 17,6 мкмоль (микромоль), 1 экв) в ДХМ (1 мл) добавляли TFA (154 мг, 1,35 ммоль, 0,1 мл, 76,7 экв) при 25 °С, а затем перемешивали при этой температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли CH_3CN (10 мл) и H_2O (1 мл) и доводили pH до 9 водн. LiOH at 0 °С. Смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ; колонка: **Welch Xtimate C18 100*25мм*3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 5%-35%, 12 мин**) с получением 2-амино-N-[(E)-4-аминобут-2-

енил]-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, Vz-22 (7 мг, 10,74 мкмоль, выход 60,97%, ТФУ) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD-d_4 , 400 МГц) δ 8,15-8,04 (м, 2H), 7,91 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,86-7,72 (м, 3H), 7,68 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,13 (с, 1H), 6,07-5,94 (м, 1H), 5,89-5,77 (м, 1H), 4,21 (уш. с, 2H), 3,87 (т, $J=8,4$ Гц, 2H), 3,67-3,56 (м, 4H), 3,48 (уш. с, 2H), 3,45-3,37 (м, 4H), 2,68-2,50 (м, 1H), 1,77-1,61 (м, 2H), 0,95-0,93 (м, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 538,2 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 538,3 (определено).

Пример 19 Синтез Vz-23



Получение N'-бензил-N'-пропил-N-пиримидин-2-илпропан-1,3-диамина, Vz-23b

Смесь N'-бензил-N'-пропил-пропан-1,3-диамина, Vz-23a (0,2 г, 823,77 мкмоль, 1 экв, HCl), DIEA (426 мг, 3,30 ммоль, 574 мкл, 4 экв) в диоксане (4 мл) перемешивали при 25°C в течение 10 минут, затем добавляли 2-хлорпиримидин (188,70 мг, 1,65 ммоль, 2 экв), затем смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Реакцию гасили H_2O (15 мл) и экстрагировали этилацетатом (15 мл x 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (10 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной ТСХ (SiO_2 , ДХМ: MeOH=7: 1) с получением Vz-23b (130 мг, 457 мкмоль, выход 55,49%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 8,26 (д, $J=4,8$ Гц, 2H), 7,38-7,32 (м, 2H), 7,30 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 7,26-7,20 (м, 1H), 6,49 (т, $J=5,2$ Гц, 1H), 5,74 (уш с, 1H), 3,58 (с, 2H), 3,47-3,39 (м, 2H), 2,54 (т, $J=6,8$ Гц, 2H), 2,44-2,38 (м, 2H),

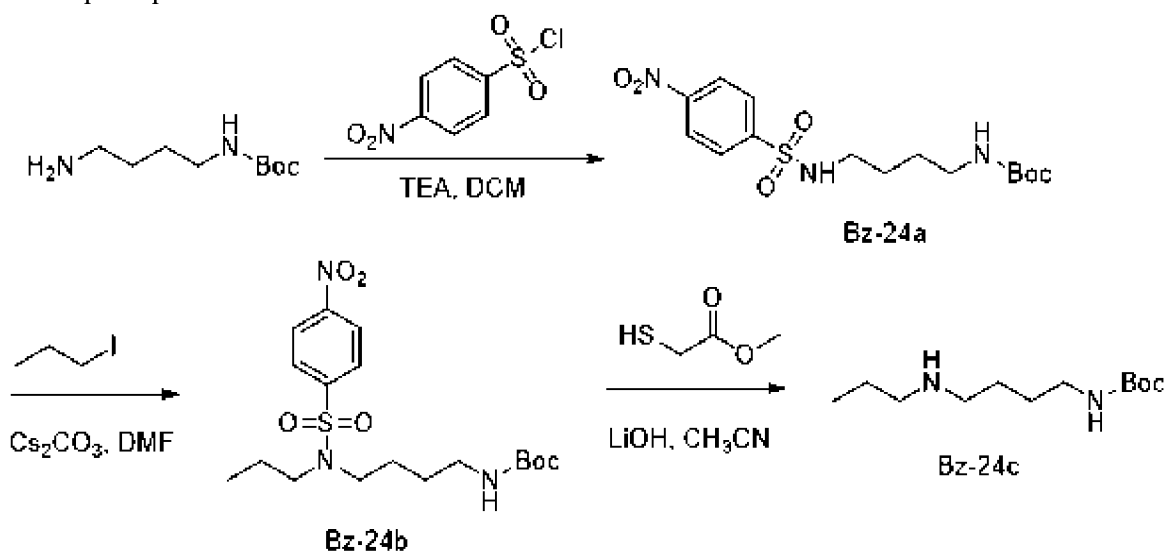
1,77 (кв, $J=6,4$ Гц, 2H), 1,57-1,50 (м, 2H), 0,88 (т, $J=7,2$ Гц, 3H)

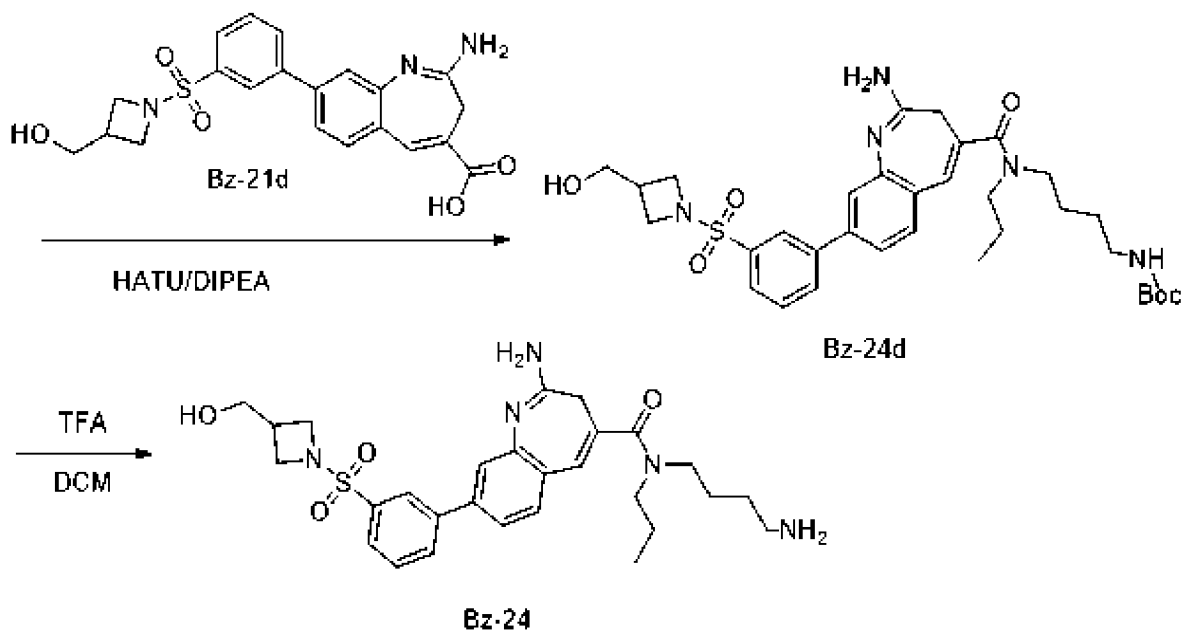
Получение N-пропил-N'-пиримидин-2-илпропан-1,3-диамина, Vz-23c

К раствору Vz-23b (130 мг, 457 мкмоль, 1 экв) в MeOH (10 мл) добавляли Pd/C (0,1 г, чистота 10%) в атмосфере N_2 . Суспензию дегазировали и трижды продували газообразным водородом, H_2 , смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов, а затем фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ТСХ (SiO_2 , DCM: MeOH=5:1) с получением Vz-23c (80 мг, 412 мкмоль, выход 90,09%) в виде коричневого масла.

Получение Vz-23: К раствору 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, Vz-21d (264 мг, 618 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (2 мл) добавляли DIEA (240 мг, 1,85 ммоль, 323 мкл, 3 экв), 7-азабензотриазол-1-илокситрипирролидинофосфоний гексафторфосфат, РУАОР (483 мг, 927 мкмоль, 1,5 экв) и Vz-23c (120 мг, 618 мкмоль, 1 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч и затем фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ WelchXtimateC18100×25мм x 3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%:15%-35%, 12мин) с получением 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-N-[3-(пиримидин-2-иламино)пропил]-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, Vz-23 (16 мг, 26,5 мкмоль, выход 4,29%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD- d_4 , 400 МГц) δ 8,38 (уш. с, 1H), 8,15 (с, 1H), 8,11 (с, 1H), 8,08 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,92 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,85-7,79 (м, 1H), 7,75 (уш. с, 1H), 7,71 (уш. с, 1H), 7,53 (с, 1H), 7,11 (уш. с, 1H), 6,74 (уш. с, 1H), 3,87 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,62 (дд, $J=6,0, 8,0$ Гц, 4H), 3,54-3,49 (м, 2H), 3,42 (д, $J=6,8$ Гц, 2H), 3,35 (уш. с, 2H), 2,64-2,51 (м, 1H), 2,08-1,95 (м, 2H), 1,77-1,66 (м, 2H), 0,99-0,94 (м, 3H). ЖХ/МС[M+H] 604,3 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 604,3 (определено).

Пример 20 Синтез Vz-24





Получение трет-бутил-N-[4-[(4-нитрофенил)сульфониламино]бутил]карбамата, Bz-24a

К раствору трет-бутил N-(4-аминобутил)карбамата (0,5 г, 2,66 ммоль, 1 экв) и Et_3N (537 мг, 5,31 ммоль, 739 мкл, 2 экв) в ДХМ (5 мл) добавляли 4-нитробензолсульфонилхлорид (647 мг, 2,92 ммоль, 1,1 экв) при 0 °С. После добавления полученную смесь перемешивали при 25°С в течение 1 ч и затем гасили добавлением H_2O (20 мл) при 0°С, а потом экстрагировали ДХМ(10 мл x 3). Объединенные органические слои промывали **рассолом** (5 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с PE/MTBE=10/1 (20 мл) и перемешивали в течение 30 минут, фильтровали и фильтровальный осадок сушили при пониженном давлении с получением Bz-24a (0,99 г, 2,65 ммоль, выход 99,82%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 8,37 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 8,07 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 5,28 (уш. с, 1H), 4,59 (уш. с, 1H), 3,12-3,03 (м, 4H), 1,58-1,48 (м, 4H), 1,44 (с, 9H)

Получение трет-бутил-N-[4-[(4-нитрофенил)сульфонилпропиламино]бутил]карбамата, Bz-24b

К раствору Bz-24a (0,99 г, 2,65 ммоль, 1 экв) в ДМФ (7 мл) добавляли Cs_2CO_3 (1,73 г, 5,30 ммоль, 2 экв) и 1-йодпропан (451 мг, 2,65 ммоль, 259 мкл, 1 экв) при 0 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 12 ч и затем выливали в воду со льдом (30 мл) при 0 °С, а затем экстрагировали **EtOAc**(20 мл x 3). Объединенные органические слои промывали **рассолом** (10 мл x 3), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растирали с PE/MTBE=10/1 (20 мл) и перемешивали при 25°С в течение 30 минут, фильтровали и фильтровальный осадок сушили при пониженном давлении с получением Bz-24b (0,97 г, 2,33 ммоль, 88,06% yield) в виде светло-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (DMCO-d_6 , 400 МГц) δ 8,39 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 8,07 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 6,79 (уш. т, $J=6,0$ Гц, 1H), 3,13-3,05 (м, 4H), 2,88 (кв, $J=6,4$ Гц, 2H), 1,54-1,40 (м, 4H), 1,39-1,27 (м, 11H), 0,81 (т, $J=7,2$ Гц, 3H).

Получение трет-бутил-N-[4-(пропиламино)бутил]карбамата, Vz-24c

К раствору Vz-24b (0,97 г, 2,33 ммоль, 1 экв) в CH_3CN (10 мл) добавляли $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (587,74 мг, 14,01 ммоль, 6 экв) и метил 2-сульфанилацетат (744 мг, 7,00 ммоль, 635 мкл, 3 экв) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали при 25 °С в течение 12 ч и затем фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли H_2O (20 мл) при 0 °С, затем доводили pH до 2-3 с помощью 1 М HCl и экстрагировали MTBE (10 мл x 3). pH водной фазы доводили до ~10 водн. K_2CO_3 и экстрагировали EtOAc (10 мл x 3). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением Vz-24c (445 мг, 1,93 ммоль, выход 82,75%) в виде коричневого масла. ^1H ЯМР (DMSO-d_6 , 400 МГц) δ 6,81 (уш с, 1H), 2,89 (кв, J=6,4 Гц, 2H), 2,47-2,39 (м, 4H), 1,44-1,31 (м, 15H), 0,85 (т, J=7,6 Гц, 3H).

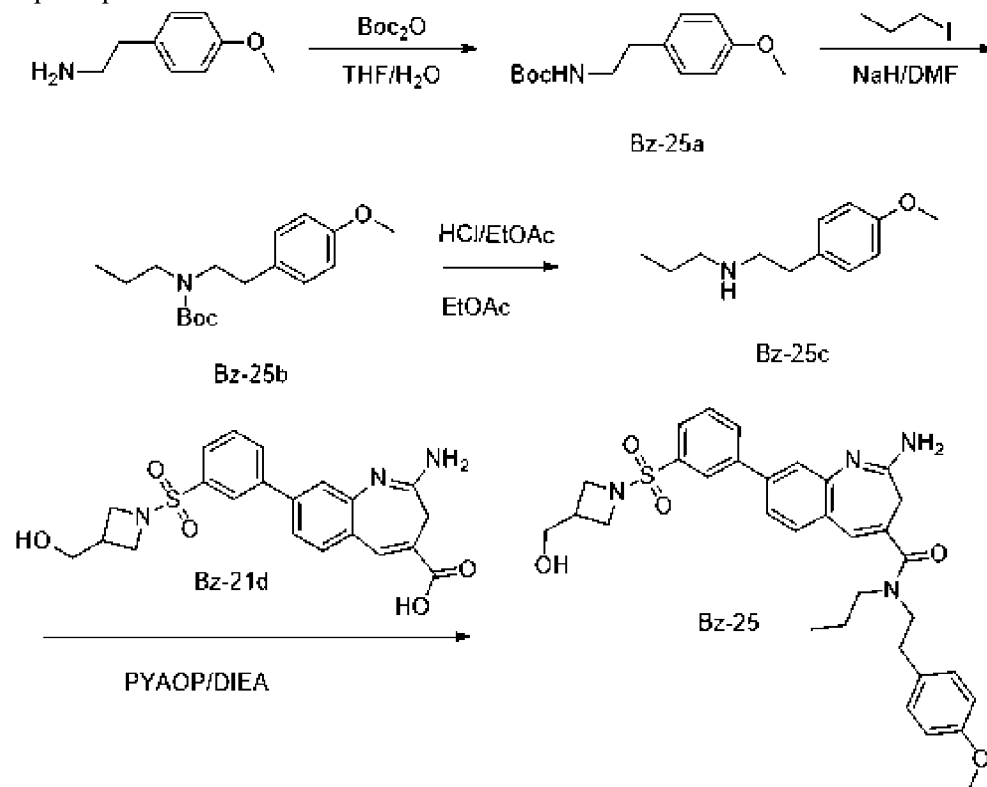
Получение трет-бутил N-[4-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]бутил]карбамата, Vz-24d

К раствору 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, Vz-21d (100 мг, 234 мкмоль, 1 экв) и DIPEA (90,7 мг, 702 мкмоль, 122,24 мкл, 3 экв) в ДМФ (1 мл) добавляли HATU (97,8 мг, 257 мкмоль, 1,1 экв) при 25 °С. Через 10 минут добавляли Vz-24c (64,66 мг, 280,72 мкмоль, 1,2 экв) при 25 °С и затем перемешивали при этой температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ; колонка: Welch Xtimate C18 100*25 мм*3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 30%-45%, 12 мин). Vz-24d (8 мг, 12,50 мкмоль, выход 5,35%) получали в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD-d_4 , 400 МГц) δ 8,14-8,04 (м, 2H), 7,92 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,85-7,81 (м, 1H), 7,81-7,76 (м, 1H), 7,73-7,68 (м, 2H), 7,11 (с, 1H), 3,87 (т, J=7,6 Гц, 2H), 3,61 (дд, J=6,0 Гц, 7,6 Гц, 2H), 3,58-3,45 (м, 4H), 3,44-3,35 (м, 4H), 3,12-3,04 (м, 2H), 2,65-2,52 (м, 1H), 1,78-1,63 (м, 4H), 1,55-1,40 (м, 11H), 0,95-0,93 (м, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 640,3 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 640,3 (определено).

Получение Vz-24: К раствору Vz-24d (0,1 г, 156 мкмоль, 1 экв) в ДХМ (2 мл) добавляли ТФУ (308 мг, 2,70 ммоль, 0,2 мл, 17,28 экв) при 25 °С и затем перемешивали при этой температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли CH_3CN (10 мл) и H_2O (1 мл) и доводили pH до 9 водн. LiOH при 0 °С. Смесь перемешивали в течение 1 ч при 25 °С, а затем фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (условия ТФУ; колонка: Welch Xtimate C18 100*25 мм*3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 5%-30%, 12 мин) с получением 2-амино-N-(4-аминобутил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксиамида, Vz-24 (34 мг, 52,01 мкмоль, выход 33,28%, ТФУ) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD-d_4 , 400 МГц) δ 8,13-8,05 (м, 2H), 7,90 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,85-7,78 (м, 1H), 7,77-7,72 (м, 2H), 7,71-7,65 (м, 1H), 7,10 (с, 1H), 3,86 (т, J=8,4 Гц, 2H), 3,61 (дд,

$J=5,6$ Гц, $7,6$ Гц, $2H$), $3,58-3,46$ (м, $4H$), $3,44-3,36$ (м, $4H$), $3,05-2,94$ (м, $2H$), $2,64-2,52$ (м, $1H$), $1,84-1,62$ (м, $6H$), $1,03-0,85$ (м, $3H$). ЖХ/МС $[M+H]$ $540,3$ (рассчитано); ЖХ/МС $[M+H]$ $540,3$ (определено).

Пример 21 Синтез Bz-25



Получение трет-бутил-N- [2- (4-метоксифенил) этил] карбамата, Bz-25a

К смеси 2-(4-метоксифенил)этанамин (1 г, 6,61 ммоль, 970,87 мкл, 1 экв) в ТГФ и H_2O (10 мл) добавляли Boc_2O (2,17 г, 9,92 ммоль, 2,28 мл, 1,5 экв) и затем перемешивали при 25°C в течение 30 минут в атмосфере N_2 . Смесь разбавляли водой и экстрагировали EtOAc (50 мл $\times$ 3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=5/1-1/1) с получением Bz-25a (1,60 г, 6,37 ммоль, выход 96,26%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 7,12 (д, $J=8,4$ Гц, $2H$), 6,85 (д, $J=8,4$ Гц, $2H$), 4,53 (уш с, $1H$), 3,80 (с, $3H$), 3,37 -3,33 (м, $2H$), 2,74 (уш т, $J=6,4$ Гц, $2H$), 1,44 (с, $9H$)

Получение трет-бутил-4-метоксифенэтил (пропил) карбамата, Bz-25b

К смеси Bz-25a (0,8 г, 3,18 ммоль, 1 экв) и 1-йодпропана (1,08 г, 6,37 ммоль, 621 мкл, 2 экв) в ДМФА (8 мл) добавляли NaH (191 мг, 4,77 ммоль, чистота 60%, 1,5 экв) при 0°C , а затем перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Смесь выливали в воду (20 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (15 мл $\times$ 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (10 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш,

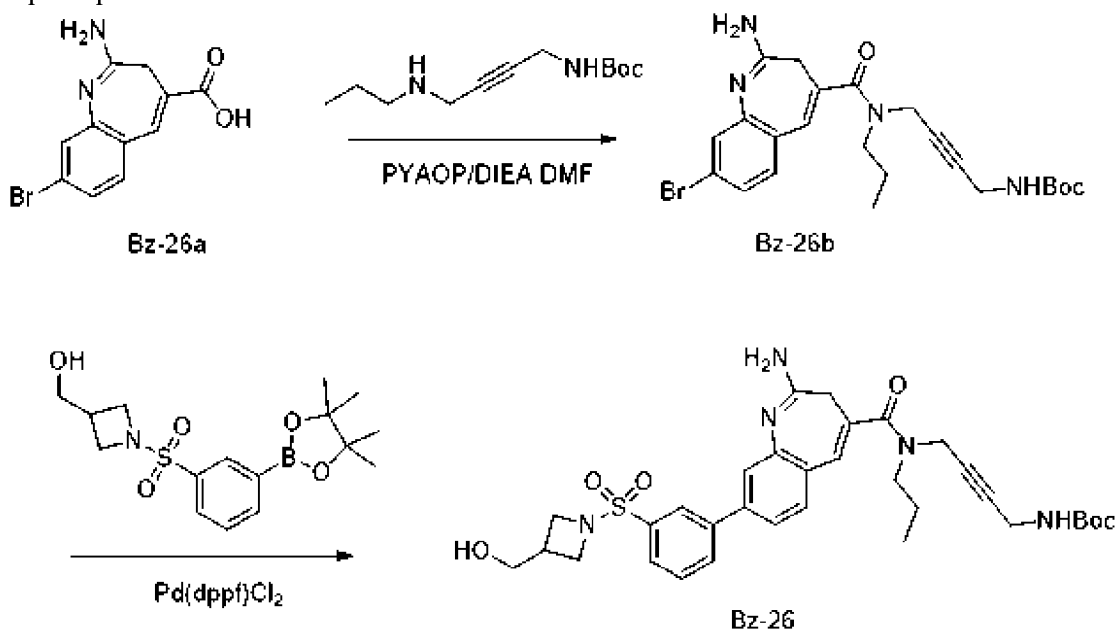
петролейный эфир/этилацетат=5/1, 1/1) с получением Bz-25b (365 мг, 1,24 ммоль, выход 39,08%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 7,11 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 6,84 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 3,79 (с, 3H), 3,36-3,30 (м, 2H), 3,15-3,09 (м, 2H), 2,79-2,71 (м, 2H), 1,57-1,50 (м, 2H), 1,46 (с, 9H), 0,87 (т, $J=7,6$ Гц, 3H).

Получение N-[2-(4-метоксифенил)этил]пропан-1-амин, Bz-25c

К раствору Bz-25b (365 мг, 1,24 ммоль, 1 экв) в EtOAc (5 мл) добавляли HCl/EtOAc (5 мл). Смесь перемешивали при 25°C в течение 3 часов и затем концентрировали в вакууме с получением Bz-25c.

Получение Bz-25: К раствору 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, Bz-21d (186 мг, 435 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (1,00 мл) добавляли PUAOP (340 мг, 653 мкмоль, 1,5 экв) и DIEA (393 мг, 3,05 ммоль, 531 мкл, 7 экв), а затем Bz-25c (100 мг, 435 мкмоль, 1 экв, HCl). Смесь перемешивали при 25°C в течение 3 часов, а затем фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil® C18 100*30мм 8 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 25%-55%, 10 мин) с получением 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-[2-(4-метоксифенил)этил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамид, Bz-25 (14 мг, 23,23 мкмоль, выход 5,34%) в виде светло-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD-d_4 , 400 МГц) δ 8,13-8,03 (м, 2H), 7,93-7,87 (м, 1H), 7,84-7,80 (м, 1H), 7,79-7,74 (м, 1H), 7,69 (уш с, 1H), 7,60 (уш д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,08-6,51 (м, 5H), 3,86 (т, $J=8,4$ Гц, 2H), 3,75 (с, 4H), 3,61 (дд, $J=5,8, 8,1$ Гц, 2H), 3,56-3,45 (м, 1H), 3,54-3,49 (м, 1H), 3,42 (д, $J=6,2$ Гц, 2H), 2,93-2,87 (м, 2H), 2,65-2,47 (м, 1H), 1,75-1,68 (м, 2H), 1,03-0,94 (м, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 603,3 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 603,3 (определено).

Пример 22 Синтез Bz-26.

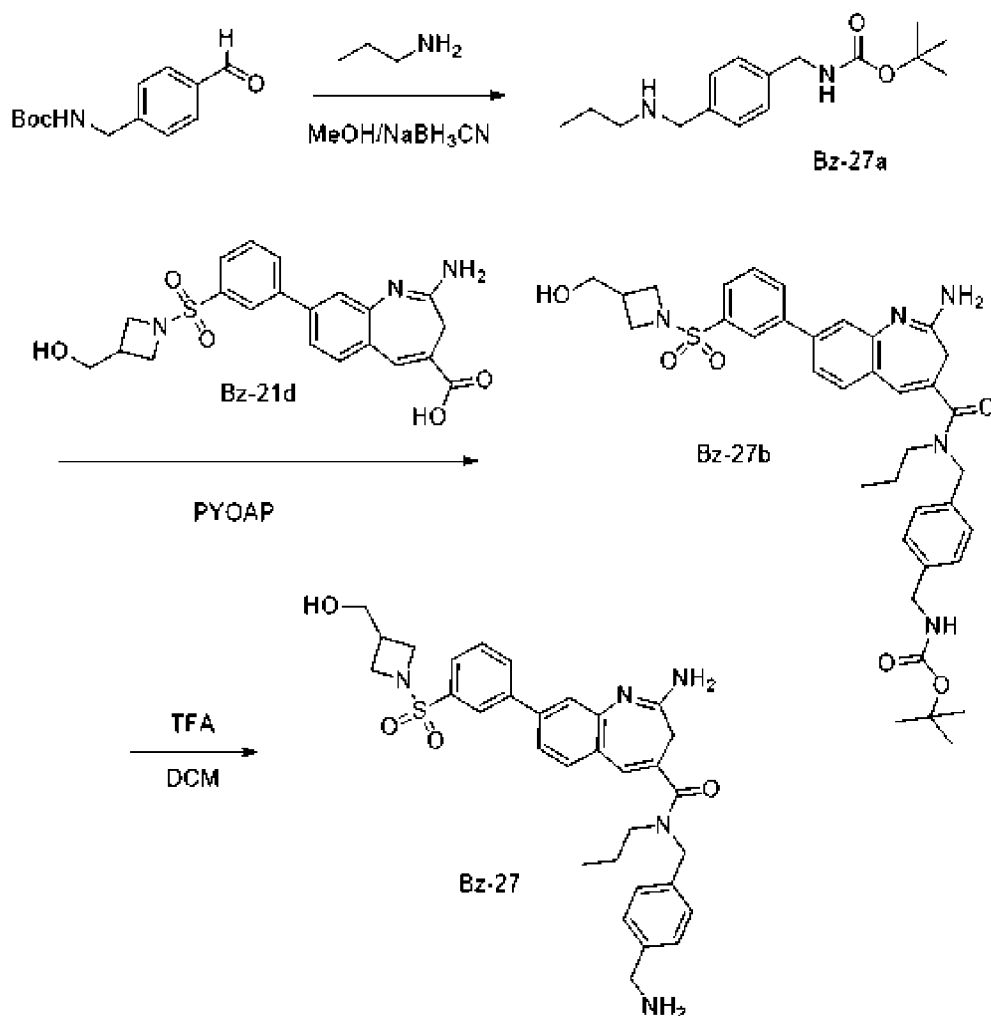


Получение Bz-26b: К смеси 2-амино-8-бром-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, Bz-26a (0,5 г, 1,78 ммоль, 1,0 экв), PUAOP (1,02 г, 1,96 ммоль, 1,1 экв) и DIEA

(920 мг, 7,11 ммоль, 1,24 мл, 4,0 экв) в ДМФ (8 мл) добавляли трет-бутил N-[4-(пропиламино)бут-2-инил]карбамат (400 мг, 1,78 ммоль, 1,0 экв) при 25°C и затем перемешивали в течение 0,5 часа при этой температуре. Смесь выливали в воду (40 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (30 мл x 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (30 мл), сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=1/1, 0/1) с получением трет-бутил-N-[4-[(2-амино-8-бром-3Н-1-бензазепин-4-карбонил)-пропиламино]бут-2-инил]карбамата, Vz-26b (0,5 г, 1,02 ммоль, выход 57,4%) в виде светло желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ7,52 (с, 1H), 7,39 (с, 2H), 7,07 (уш с, 1H), 4,37 (с, 2H), 4,06 (д, J=5,2 Гц, 2H), 3,65 (с, 2H), 2,91 (с, 2H), 1,88-1,74 (м, 2H), 1,57 (с, 9H), 1,06 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Получение Vz-26: К смеси [1-[3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метанола (1,73 г, 4,90 ммоль, 1,2 экв), Vz-26b (2,0 г, 4,09 ммоль, 1,0 экв) и Pd(dppf)Cl₂ (150 мг, 204 мкмоль, 0,05 экв) в диоксане (40 мл) добавляли K₂CO₃ (1,13 г, 8,17 ммоль, 2 экв) в H₂O (5 мл) при 25°C в атмосфере N₂ и затем перемешивали при 100°C в течение 1 часа. Смесь фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=1/1, 0/1) с получением трет-бутил-N-[4-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]бут-2-инил]карбамата, Vz-26 (2,0 г, 3,15 ммоль, выход 76,9%) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ8,07 (с, 1H), 8,04 (уш д, J=7,6 Гц, 1H), 7,88-7,82 (м, 1H), 7,79-7,73 (м, 1H), 7,53-7,46 (м, 2H), 7,43-7,37 (м, 1H), 7,12 (с, 1H), 4,29 (с, 2H), 3,93-3,82 (м, 4H), 3,62-3,50 (м, 4H), 3,42 (д, J=6,4 Гц, 2H), 3,31 (с, 2H), 2,64-2,52 (м, 1H), 1,76-1,70 (м, 2H), 1,43 (с, 9H), 0,99-0,91 (м, 3H). ЖХ/МС [М+Н] 636,3 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 636,3 (определено). ЖХМС (ESI): вычисленная масса. для C₃₃H₄₁N₅O₆S 635,28, определено m/z 636,3 [М+Н]⁺

Пример 23 Синтез Vz-27:



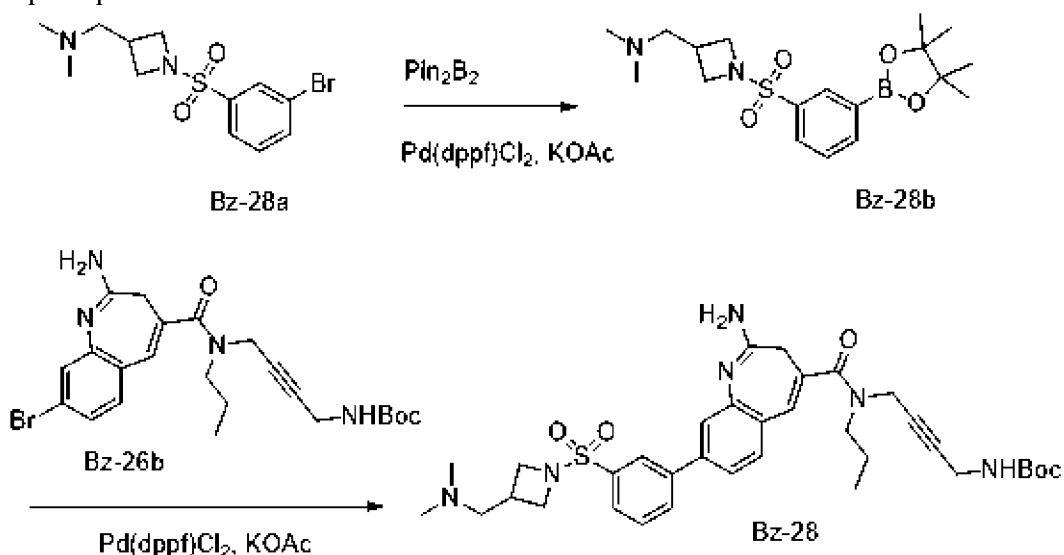
Получение Bz-27a: К раствору трет-бутил-N-[(4-формилфенил)метил]карбамата (400 мг, 1,70 ммоль, 1 экв), пропан-1-амин (1,00 г, 17,0 ммоль, 1,40 мл, 10 экв) и AcOH (10 мг, 170 мкмоль, 9,72 мкл, 0,1 экв) в MeOH (1 мл) добавляли NaBH_3CN (213 мг, 3,40 ммоль, 2 экв), смесь перемешивали при 25°C в течение 3 часов. Реакционную смесь выливали в воду (10 мл), и затем экстрагировали EtOAc (5 мл x 3). Объединенные органические слои промывали рассолом (5 мл x 1), высушивали, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ТСХ (SiO_2 , $\text{EtOAc}:\text{MeOH}=5:1$) с получением трет-бутил-N-[[4-(пропиламинометил)фенил]метил]карбамата, Bz-27a (200 мг, 718 мкмоль, выход 42,26%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР ($\text{MeOD}-d_4$, 400 МГц) δ 7,43 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,37 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 4,24 (с, 2H), 4,17 (с, 2H), 3,00-2,96 (м, 2H), 1,77-1,67 (м, 2H), 1,44 (с, 9H), 1,01 (т, $J=7,6$ Гц, 3H).

Получение Bz-27b: К раствору 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, Bz-21d (122 мг, 287 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (0,80 мл) добавляли PyOAP (224 мг, 431,05 мкмоль, 1,5 экв) и DIEA (111 мг, 862,10 мкмоль, 150,16 мкл, 3 экв). Затем добавляли трет-бутил-N-[[4-(пропиламинометил)фенил]метил]карбамат (80 мг, 287 мкмоль, 1 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 3 часов, затем фильтровали и концентрировали.

Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонок: Welch Xtimate C18100*25 мм*3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 30%-50%, 12 мин]). Соединение трет-бутил-N-[[4-[[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]метил]фенил]метил]карбамат (27 мг, 39,3 мкмоль, выход 13,66%) получали в виде светло-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD-d_4 , 400 МГц) δ 8,08 (т, $J=9,6$ Гц, 2H), 7,92-7,90 (м, 1H), 7,82 (т, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,81-7,79 (м, 1H), 7,69-7,64 (м, 4H), 7,57 (с, 1H), 7,30-7,29 (м, 4H), 7,13 (с, 1H), 4,23 (с, 2H), 3,87 (т, $J=8,4$ Гц, 2H), 3,61 (т, $J=6,0$ Гц, 2H), 3,42-3,41 (м, 2H), 3,31 (т, $J=1,6$ Гц, 2H), 2,60-2,55 (м, 1H), 1,71-1,70 (м, 2H), 1,44 (с, 9H), 0,99-0,90 (м, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 688,3 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 688,3 (определено).

Получение Bz-27: К раствору Bz-27b (50 мг, 72,7 мкмоль, 1 экв) в ДХМ (1 мл) добавляли ТФУ (165 мг, 1,45 ммоль, 108 мкл, 20 экв) и затем перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Смесь фильтровали и концентрировали. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонок: Nano-micro Kromasil C18 100*30мм8мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-КАС]; В%: 5%-30%, 10 мин]) с получением 2-амино-N-[[4-(аминометил)фенил]метил]-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3Н-1-бензазепин-4-карбоксамида, Bz-27 (4 мг, 6,81 мкмоль, выход 9,36%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOH-d_4 , 400 МГц) δ 8,13-8,03 (м, 2H), 7,91 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,85-7,78 (м, 1H), 7,75-7,70 (м, 2H), 7,59-7,33 (м, 5H), 7,15 (с, 1H), 4,13 (с, 2H), 3,86 (т, $J=8,4$ Гц, 2H), 3,61 (дд, $J=6,1, 7,8$ Гц, 2H), 3,48 (уш д, $J=7,6$ Гц, 2H), 3,42 (д, $J=6,2$ Гц, 4H), 3,32 (уш с, 1H), 3,31-3,31 (м, 1H), 3,31-3,30 (м, 2H), 2,63-2,52 (м, 1H), 1,76-1,61 (м, 2H), 0,91 (уш с, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 588,3 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 588,3 (определено).

Пример 24 Синтез Bz-28

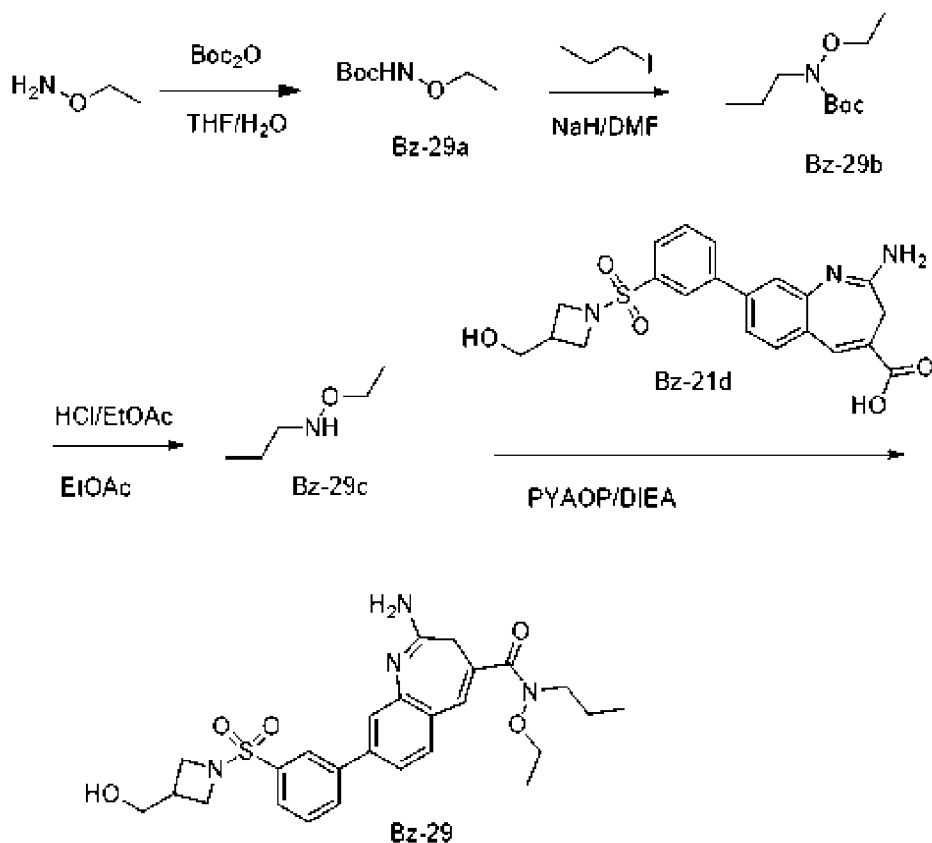


Получение Bz-28b: Смесь 1-[1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]-N, N-диметилметанамина, Bz-28a (0,3 г, 900,24 мкмоль, 1 экв), Pin_2B_2 (342,91 мг, 1,35 ммоль, 1,5 экв), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (32,94 мг, 45,01 мкмоль, 0,05 экв) и KOAc (176,70 мг, 1,80 ммоль, 2 экв) в диоксане (6 мл) дегазировали и продували N_2 для 3 раза, а затем перемешивали при 90°C в

течение 2 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь охлаждали до 25°C, добавляли **силикагель de-Pd** (1 г) и затем перемешивали при 25°C в течение 30 мин. Смесь фильтровали и промывали EtOAc (10 мл x 5) и концентрировали при пониженном давлении с получением N, N-диметил-1-[1-[3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метанамин, Bz-28b (0,6 г, сырой) в виде желтого масла.

Получение Bz-28: Смесь Bz-28b (699 мг, 920 мкмоль, 1,5 экв), трет-бутил N-[4-[(2-амино-8-бром-3H-1-бензазепин-4-карбонил)-пропил-амино]бут-2-инил]карбамат, Bz-26b (300 мг, 613 мкмоль, 1 экв), Pd(dppf)Cl₂ (22,4 мг, 30,6 мкмоль, 0,05 экв) и K₂CO₃ (169 мг, 1,23 ммоль, 2 экв) в диоксане (20 мл) и H₂O (2 мл) дегазировали и продували N_2 3 раза, а затем перемешивали при 90°C в течение 2 ч в атмосфере N_2 . Реакционную смесь гасили добавлением **H₂O (60 мл)** при 0°C, и затем экстрагировали **EtOAc(30 мл x 3)**. Объединенные органические слои промывали **рассолом (10 мл x 3)**, сушили над **Na₂SO₄**, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией (SiO₂, **петролейный эфир:этилацетат=от 1:0 до 0:1**), а затем (SiO₂, **EtOAc:MeOH=от 1:0 до 1:1**) с получением трет-бутил N-[4 -[[2-амино-8-[3-[3-[(диметиламино)метил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]бут-2-инил]карбамат, Bz-28 (230 мг сырого продукта, 347 мкмоль, выход 56,61%) в виде коричневого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD-d₄, 400 МГц) δ8,16-8,06 (м, 2H), 7,97-7,90 (м, 1H), 7,89-7,65 (м, 4H), 7,34 (уш с, 1H), 4,34 (с, 2H), 4,01 (т, J=8,4 Гц, 2H), 3,87 (с, 2H), 3,69 (дд, J=5,6, 8,4 Гц, 2H), 3,56 (уш с, 2H), 3,39 (с, 2H), 3,33 (с, 2H), 3,03-2,89 (м, 1H), 2,82 (с, 6H), 1,81-1,67 (м, 2H), 1,43 (с, 9H), 0,97 (уш т, J=6,8 Гц, 3H). ЖХ/МС [M+H] 663,3 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 663,3 (определено).

Пример 25 Синтез Bz-29



Получение Bz-29a: К смеси О-этилгидроксиламина (3 г, 30,8 ммоль, 1 экв, HCl) и Na_2CO_3 (32,6 г, 307,55 ммоль, 10 экв) в ДХМ (30 мл) и воды (30 мл) добавляли трет-бутоксикарбонил-трет-бутилкарбонат (8,05 г, 36,9 ммоль, 8,48 мл, 1,2 экв) при 25°C, а затем перемешивали в течение 3 часов. Смесь разделяли, органический слой сушили над Na_2SO_4 , концентрировали до остатка. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , петролейный эфир/этилацетат=1:0-5:1) с получением трет-бутил-N-этоксикарбамата, Bz-29a (4 г, 24,81 ммоль, выход 80,68%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ 3,87 (кв, $J=7,2$ Гц, 2H), 1,45 (с, 9H), 1,20 (т, $J=7,2$ Гц, 3H).

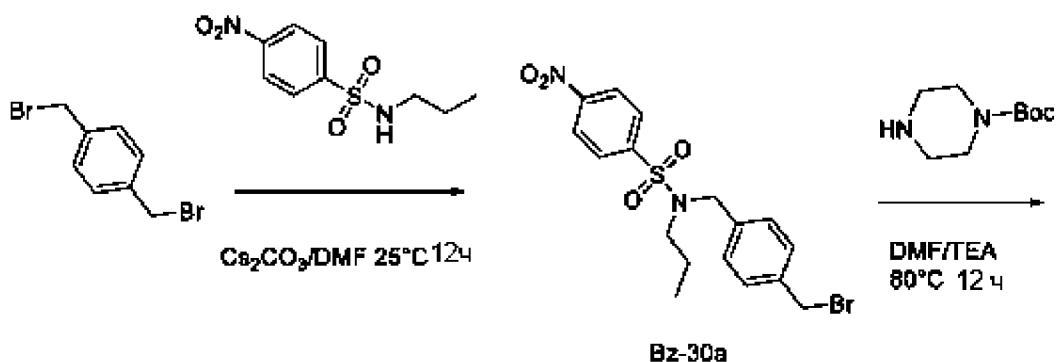
Получение Bz-29b: к смеси Bz-29a (1 г, 6,20 ммоль, 1 экв) в ДМФА (10 мл) добавляли NaH (298 мг, 7,44 ммоль, чистота 60%, 1,2 экв) при 0°C и затем перемешивали при 0°C в течение 0,5 часа, к смеси добавляли 1-йодпропан (1,16 г, 6,82 ммоль, 666,67 мкл, 1,1 экв) при 0°C и перемешивали при 25°C в течение 10 часов. Смесь гасили насыщенным раствором NH_4Cl (10 мл) и затем экстрагировали EtOAc (3* 10 мл). Органический слой сушили над Na_2SO_4 , концентрировали с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , петролейный эфир/этилацетат=1:0-5:1) с получением трет-бутил-N-этокси-N-пропилкарбамата, Bz-29b (0,84 г, 4,13 ммоль, выход 66,61%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ 3,89 (кв, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,47-3,25 (м, 2H), 1,69-1,59 (м, 2H), 1,49 (с, 9H), 1,23 (т, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,91 (т, $J=7,2$ Гц, 3H).

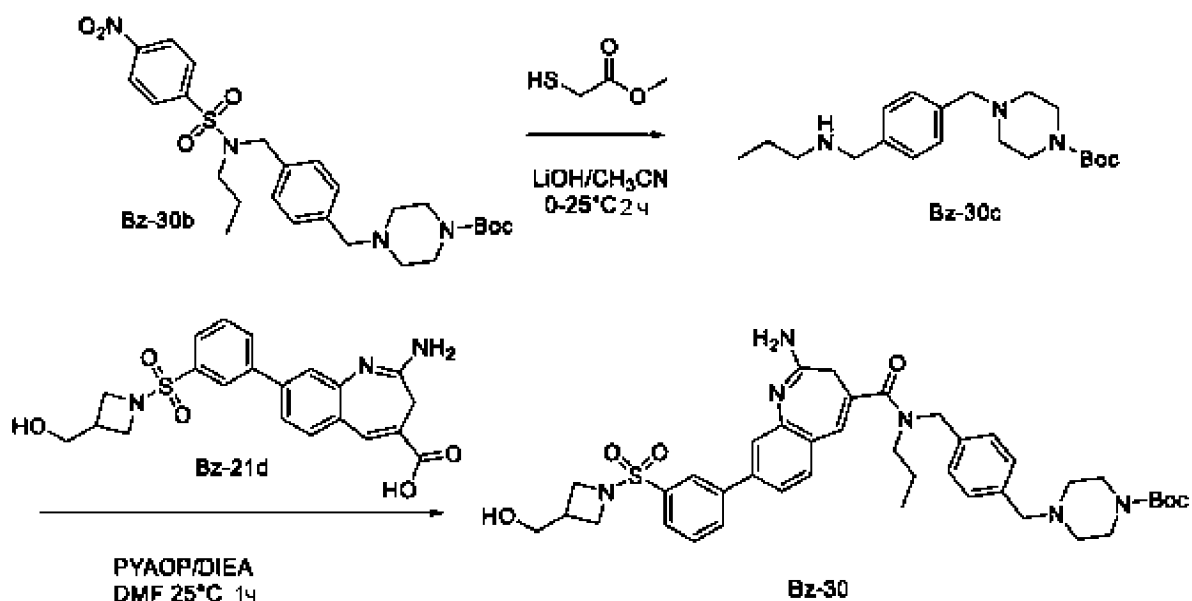
Получение Bz-29c: К смеси Bz-29b (0,84 г, 4,13 ммоль, 1 экв) в EtOAc (10 мл) добавляли HCl/EtOAc (4 М, 5 мл, 4,84 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2

часов. Смесь концентрировали с получением N-этоксипропан-1-амин, Vz-29с (0,4 г, 2,86 ммоль, выход 69,33%, HCl) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, метанол- d_4) δ 4,16 (дкв, $J=2,0$, 7,2 Гц, 2H), 3,29-3,23 (м, 2H), 1,76 (скт, $J=7,6$ Гц, 2H), 1,32 (т, $J=7,2$ Гц, 3H), 1,05 (т, $J=7,2$ Гц, 3H).

Получение Vz-29: К смеси 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты (200 мг, 468 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (2 мл) добавляли PUAOP (293 мг, 561 мкмоль, 1,2 экв) и DIEA (181 мг, 1,40 ммоль, 245 мкл, 3 экв), через 3 мин добавляли N-этоксипропан-1-амин. (71,86 мг, 514,65 мкмоль, 1,1 экв, HCl). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа и затем концентрировали с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex Gemini-NX C18 75*30 мм*3 мкм; подвижная фаза: [вода (10 mM NH_4HCO_3)-АЦН]; В%:30%-60%, 10,5 мин) с получением 2-амино-N-этоксипропан-1-ил-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамид, Vz-29 (3,5 мг, 6,36 мкмоль, выход 1,36%, чистота 93,17%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, метанол- d_4) δ 8,10-8,02 (м, 2H), 7,89-7,73 (м, 2H), 7,53-7,48 (м, 2H), 7,46-7,40 (м, 1H), 7,31 (с, 1H), 3,95 (кв, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,86 (т, $J=8,4$ Гц, 2H), 3,74 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,60 (дд, $J=6,4$, 8,2 Гц, 2H), 3,41 (д, $J=6,4$ Гц, 2H), 3,34-3,31 (м, 2H), 2,67-2,43 (м, 1H), 1,77 (скт, $J=7,2$ Гц, 2H), 1,18 (т, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,99 (т, $J=7,6$ Гц, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 513,2 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 513,4 (определено).

Пример 26 Синтез Vz-30





Получение Bz-30a: К смеси 1,4-бис(бромметил)бензола (6,48 г, 24,6 ммоль, 2,0 экв) и 4-нитро-N-пропилбензолсульфонамида (3,0 г, 12,3 ммоль, 1,0 экв) в ДМФ (40 мл) добавляли Cs₂CO₃ (4,80 г, 14,7 ммоль, 1,2 экв) одной порцией при 25°C и затем перемешивали в течение 12 часов. Реакционную смесь разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали EtOAc (50 мл x 3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/этилацетат=1/0, 3/1) с получением N-[[4-(бромметил)фенил]метил]-4-нитро-N-пропилбензолсульфонамида, Bz-30a (1,5 г, 3,51 ммоль, выход 28,6%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 8,35 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,98 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,35 (д, J=8,0 Гц, 2H), 7,24 (д, J=8,0 Гц, 2H), 4,48 (с, 2H), 4,40 (с, 2H), 3,19-3,11 (м, 2H), 1,42 (м, 2H), 0,76 (т, J=7,6 Гц, 3H).

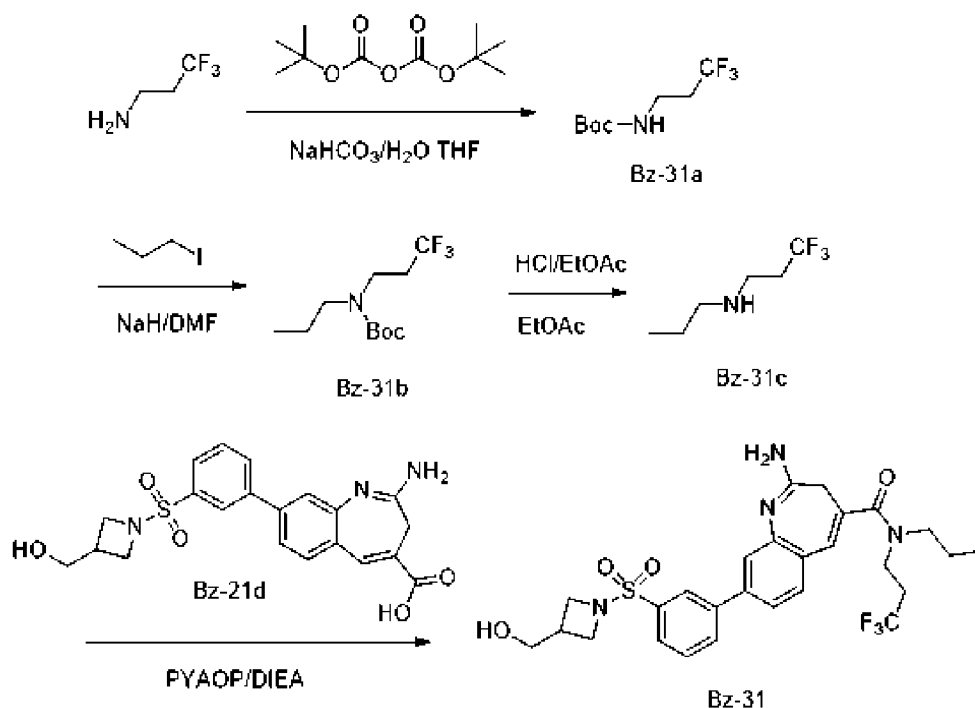
Получение Bz-30b: К смеси Bz-30a (1,3 г, 3,04 ммоль, 1,0 экв) и трет-бутилпиперазин-1-карбоксилата (2,27 г, 12,2 ммоль, 4,0 экв) в ДМФ (15 мл) добавляли Et₃N (1,23 г, 12,2 ммоль, 1,69 мл, 4,0 экв) при 25 °C, а затем перемешивали при 80°C в течение 12 часов. Смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали EtOAc (50 мл x 3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/этилацетат=1/0, 3/1) с получением трет-бутил-4-[[4-[[[(4-нитрофенил)сульфонил-пропил-амино]метил]фенил]метил]пиперазин-1-карбоксилата, Bz-30b (1,7 г, неочищенного продукта) в виде твердого желтого вещества. ¹H ЯМР (DMSO, 400 МГц) δ 8,39 (д, J=8,8 Гц, 2H), 8,11 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,21 (с, 4H), 4,36 (с, 2H), 3,45 (с, 2H), 3,31-2,27 (м, 4H), 3,12-3,05 (м, 2H), 2,28-2,26 (м, 4H), 1,38 (с, 9H), 1,33-1,25 (м, 2H), 0,65 (т, J=7,6 Гц, 3H).

Получение Bz-30c: К раствору Bz-30b (1,0 г, 1,88 ммоль, 1,0 экв) в CH₃CN (6 мл) добавляли LiOH·H₂O (473 мг, 11,3 ммоль, 6,0 экв) одной порцией при 0 °C. Затем добавляли метил-2-сульфанилацетат (598 мг, 5,63 ммоль, 511 мкл, 3,0 экв) и

перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Смесь фильтровали и концентрировали. Остаток разбавляли МТВЕ (5 мл), и затем доводили pH смеси до около 2 с помощью водн. HCl (1M), экстрагировали МТВЕ (20 мл) (отбрасывали). pH водной фазы доводили до 9 с помощью водного раствора NaHCO₃, а затем экстрагировали EtOAc (30 мл x 3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением трет-бутил-4-[[4-(пропиламинометил)фенил]метил]пиперазин-1-карбоксилата, Bz-30c (0,5 г, неочищенного продукта) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 7,32-7,30 (м, 4H), 3,73 (с, 2H), 3,53 (с, 2H), 3,43-3,40 (м, 4H), 2,57-2,50 (м, 2H), 2,41-2,48 (м, 4H), 1,58-1,51 (м, 2H), 1,45 (с, 9H), 0,92 (т, J = 7,6 Гц, 3H).

Получение Bz-30: К смеси 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты Bz-21d (400 мг, 936 мкмоль, 1,0 экв) в ДМФ (8 мл) добавляли РУАОР (585 мг, 1,12 ммоль, 1,2 экв), DIEA (363 мг, 2,81 ммоль, 489 мкл, 3,0 экв) и Bz-30c (358 мг, 1,03 ммоль, 1,1 экв) одной порцией при 25°C и затем перемешивали в течение 1 часа. Смесь фильтровали и концентрировали. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex Luna C18 100 * 30 мм * 5 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ) - АЦН]; В%: 15%-45%, 10 мин) с получением трет-бутила-4-[[4-[[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]метил]фенил]метил]пиперазин-1-карбоксилата, Bz-30 (0,35 г, 462 мкмоль, выход 49,4%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,14-8,05 (м, 2H), 7,92 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,82 (т, J=7,6 Гц, 1H), 7,78-7,69 (м, 2H), 7,63-7,42 (м, 5H), 7,17 (с, 1H), 4,37 (с, 2H), 3,86 (т, J=8,0 Гц, 2H), 3,61 (дд, J=6,0, 8,0 Гц, 2H), 3,53 -3,49 (м, 2H), 3,43-3,41 (м, 6H), 3,31-3,29 (м, 8H), 2,63-2,54 (м, 1H), 1,76-1,65 (м, 2H), 1,47 (с, 9H), 0,95-0,89 (м, 3H). ЖХ/МС [M+H] 757,4 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 757,4 (определено).

Пример 27 Синтез Bz-31



Получение Bz-31a: К смеси 3,3,3-трифторпропан-1-аминa (0,5 г, 3,34 ммоль, 1 экв, HCl) и NaHCO_3 (842,64 мг, 10,03 ммоль, 390,11 мкл, 3 экв) в ТГФ (3 мл) и H_2O (3 мл) добавляли трет-бутоксикарбонил-трет-бутилкарбонат (730 мг, 3,34 ммоль, 768 мкл, 1 экв) и затем перемешивали при 25°C в течение 1 часа в атмосфере N_2 . Смесь выливали в H_2O (15 мл), экстрагировали этилацетатом (15 мл x 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (15 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали хроматографией на силикагеле, элюируя смесью (петролейный эфир:этилацетат=от 5:0 до 1:1), с получением трет-бутил-N-(3,3,3-трифторпропил)карбамата, Bz-31a (500 мг, 2,35 ммоль, выход 70,14%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 4,75 (уш с, 1H), 3,40 (кв, $J=6,4$ Гц, 2H), 2,40-2,27 (м, 2H), 1,45 (с, 9H).

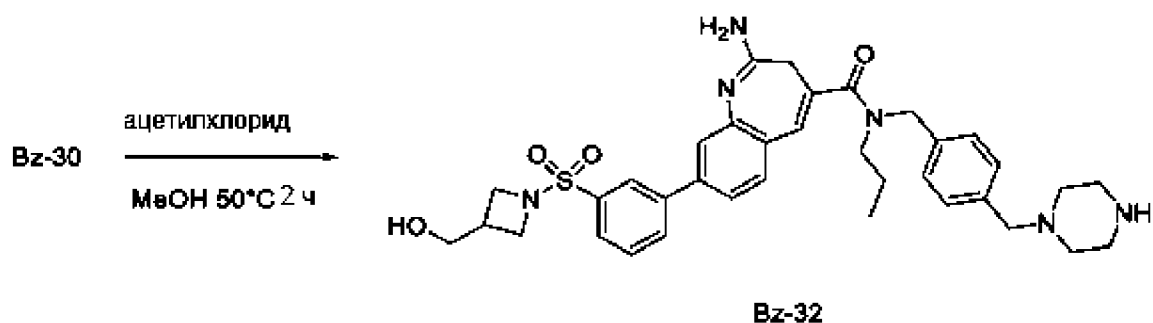
Получение Bz-31b: К раствору Bz-31a (400 мг, 1,88 ммоль, 1 экв) в ДМФ (5 мл) добавляли NaH (113 мг, 2,81 ммоль, чистота 60%, 1,5 экв) при 0°C. Через 30 минут к смеси добавляли 1-йодпропан (637,88 мг, 3,75 ммоль, 366 мкл, 2 экв) и затем перемешивали при 20°C в течение 2 часов. Реакционную смесь гасили при 0°C добавлением насыщенного NH_4Cl (10 мл), затем экстрагировали EtOAc (10 мл x 3). Органическую фазу сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Реакционную смесь очищали колоночной хроматографией на силикагеле (петролейный эфир:этилацетат=от 5:1 до 1:1). Соединение трет-бутил-N-пропил-N-(3,3,3-трифторпропил)карбамат, Bz-31b (400 мг, 1,57 ммоль, выход 83,52%) получали в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 3,41 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,19-3,12 (м, 1H), 2,40-2,32 (м, 2H), 1,58-1,50 (м, 2H), 1,47 (с, 9H), 0,89 (т, $J=7,6$ Гц, 3H).

Получение Bz-31c: К раствору трет-бутил-N-пропил-N-(3,3,3-трифторпропил)карбамата (400 мг, 1,57 ммоль, 1 экв) в EtOAc (3 мл) добавляли HCl/EtOAc (4 М, 5,88 мл, 15 экв), а затем перемешивали при 20°C в течение 2 часов.

Смесь фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 3,3,3-трифтор-N-пропилпропан-1-амин, Vz-31с (240 мг, неочищенный, HCl) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD- d_4 , 400 МГц) δ 3,34-3,31 (м, 2H), 3,06-3,00 (м,

Получение Vz-31: раствор 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, Vz-21d (100 мг, 233 мкмоль, 1 экв), DIEA (90,7 мг, 702 мкмоль, 122 мкл, 3 экв) и РУАОР (183 мг, 351 мкмоль, 1,5 экв) в ДМФ (1 мл) добавляли Vz-31с (44,8 мг, 234 мкмоль, 1 экв, HCl), а затем перемешивали при 20°C в течение 1 часа. Смесь фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Waters Xbridge ВЕН C18 100*30 мм*10 мкм; подвижная фаза: [вода (10мМ NH_4HCO_3)-ACN]; В%: 30%-60%, 8 мин) с получением 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-N-(3,3,3-трифторпропил)-3H-1-бензазепин-4-карбоксамид, Vz-31 (7 мг, 12,40 мкмоль, выход 5,30%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD- d_4 , 400 МГц) δ 8,07 (с, 1H), 8,04 (уш. д, J=7,6 Гц, 1H), 7,86-7,81 (м, 1H), 7,80-7,73 (м, 1H), 7,49 -7,44 (м, 2H), 7,42-7,37 (м, 1H), 6,94 (с, 1H), 3,86 (т, J=8,4 Гц, 2H), 3,73 (уш с, 2H), 3,60 (дд, J=6,0, 8,0 Гц, 2H), 3,52-3,45 (м, 2H), 3,42 (д, J=6,4 Гц, 2H), 3,33-3,32 (м, 2H), 2,68-2,53 (м, 3H), 1,74-1,64 (м, 2H), 0,91 (уш с, 3H). ЖХ/МС [M+H] 565,2 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 565,3 (определено).

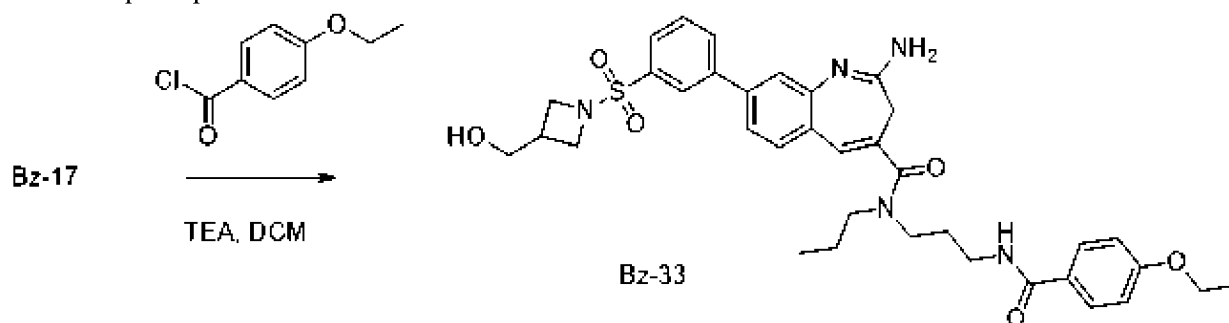
Пример 28 Синтез Vz-32



Получение Vz-32: К раствору трет-бутил 4-[[4-[[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]метил]фенил]метил]пиперазин-1-карбоксилата, Vz-30 (0,16 г, 211 мкмоль, 1,0 экв) в MeOH (10 мл), добавляли ацетилхлорид (49,8 мг, 634 мкмоль, 45,3 мкл, 3,0 экв) при 25°C и перемешивали при 50°C в течение 2 часов. Смесь концентрировали в вакууме, и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Waters Xbridge ВЕН C18 100*25 мм*5 мкм; подвижная фаза: [вода (10 мМ NH_4HCO_3)-ACN]; В%: 25%-55%, 10 мин) с получением 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-[[4-(пиперазин-1-илметил)фенил]метил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамид, Vz-32 (36 мг, 54,8 мкмоль, выход 25,9%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,06 (с, 1H), 8,02 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,83 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,79-7,72 (м, 1H), 7,46 (с, 2H), 7,40-7,22 (м, 5H), 6,93 (с, 1H), 4,74 (с, 2H), 3,85 (т, J=8,4 Гц, 2H), 3,62-3,56 (м, 2H), 3,52 (с, 2H), 3,45-3,34 (м, 4H), 2,85 (т, J=4,4 Гц, 4H), 2,66-2,52 (м, 2H), 2,48-2,44 (м, 4H),

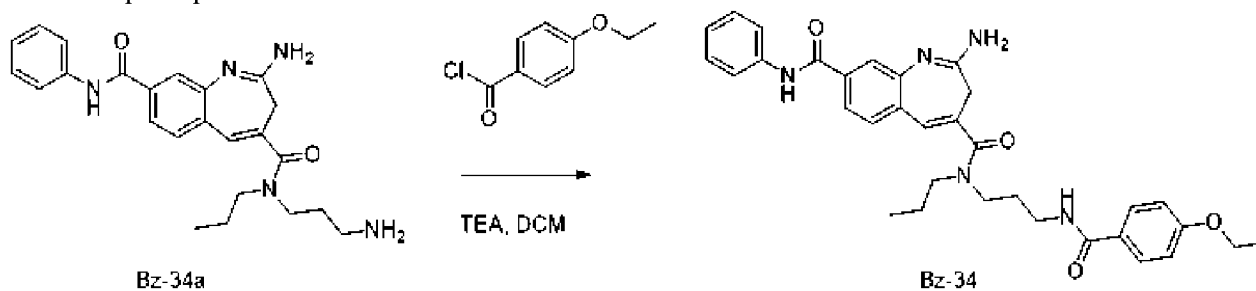
1,72-1,60 (м, 2H), 0,90-0,88 (м, 3H). ЖХ/МС [M+H] 657,3 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 657,5 (определено).

Пример 29 Синтез Bz-33



2-Амино-N-(3-аминопропил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамид, Bz-17 (0,01 г, 0,019 ммоль, 1 экв) растворяли в ДХМ. Добавляли триэтиламин (4 мкл, 0,029 ммоль, 1,5 экв), а затем 4-этоксibenzoилхлорид (0,004 г, 0,019 ммоль, 1 экв). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2-амино-N-(3-(4-этоксibenзамидо)пропил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамид, Bz-33 (0,0028 г, 0,0042 ммоль, 22%). ЖХ/МС [M+H] 674,30 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 674,74 (определено).

Пример 30 Синтез Bz-34



2-Амино-N⁴-(3-аминопропил)-N⁸-фенил-N⁴-пропил-3H-бензо[b]азепин-4,8-дикарбоксамид, Bz-34a (0,01 г, 0,024 ммоль, 1 экв) растворяли в ДХМ. Добавляли триэтиламин (5 мкл, 0,036 ммоль, 1,5 экв), а затем 4-этоксibenzoилхлорид (0,004 г, 0,024 ммоль, 1 экв). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2-амино-N⁴-(3-(4-этоксibenзамидо)пропил)-N⁸-фенил-N⁴-пропил-3H-бензо[b]азепина-4,8-дикарбоксамид, Bz-34 (0,005 г, 0,009 ммоль, 38%). ЖХ/МС [M+H] 568,29 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 568,50 (определено).

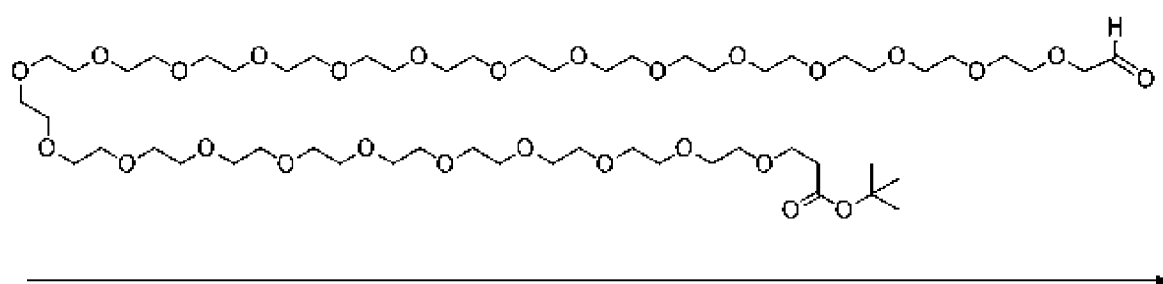
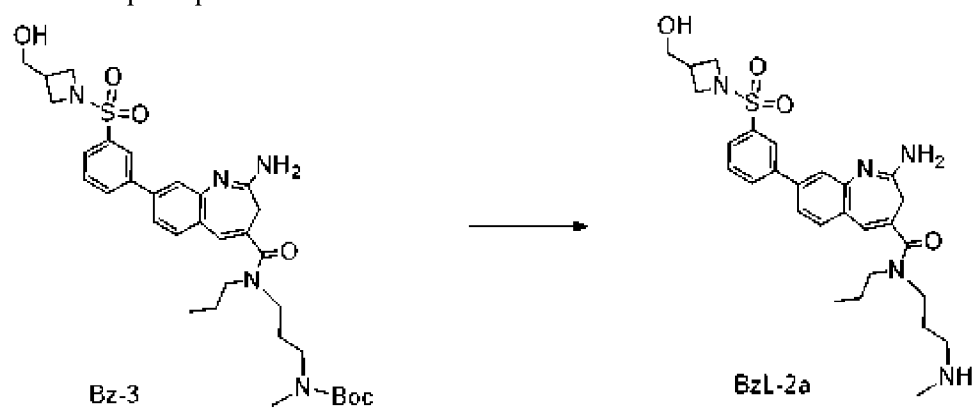
Получение аминокбензазепин-линкерных соединений формулы II (BzL) и промежуточных соединений

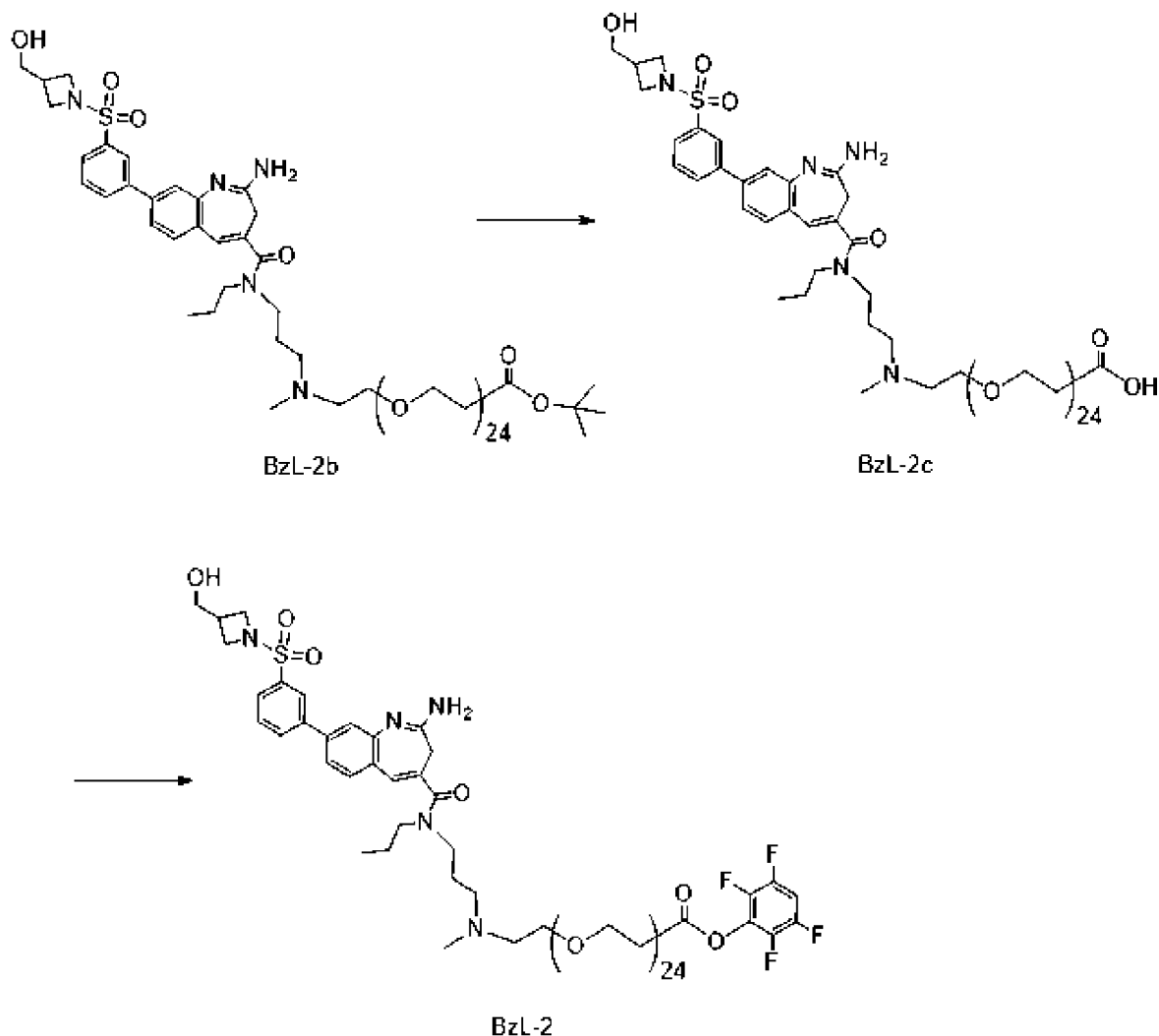
Пример 31 Синтез BzL-1

Следуя описанным в данном документе способам, был получен и охарактеризован этил 2-амино-8-(3-((2-(2-(3-оксо-3-(2,3,5,6-

тетрафторфенокси)пропокси)этокси)этил)карбамоил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксилат, BzL-1.

Пример 32 Синтез BzL-2





Синтез 2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-(3-(метиламино)пропил)-N-пропил-3Н-бензо[*b*]азепин-4-карбоксамид, BzL-2a

BzL-2a был синтезирован из Bz-3 в соответствии со способом, описанным для Bz-11a. ЖХ/МС [М+Н] 540,26 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 540,53 (определено).

Синтез *трет*-бутил 80-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[*b*]азепин-4-карбонил)-76-метил-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73-тетракозаокса-76,80-дiazатриоктaнтaноaтa, BzL-2b.

В сосуд помещали BzL-2a (15,1 мг, 0,028 ммоль), трет-бутил 1-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептaнтaнтaн-75-oат (0,042 ммоль), триацетоксиборгидрид натрия (30 мг, 0,14 ммоль) в 100 мкл ДМФ. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч, после чего добавляли 100 мкл 10% карбоната натрия и перемешивали в течение 1 ч. Смесь фильтровали и очищали препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 40,7 мг BzL-2b с выходом 84%. ЖХ/МС [М+Н] 1724,98 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1726,52 (определено).

Синтез 80-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-

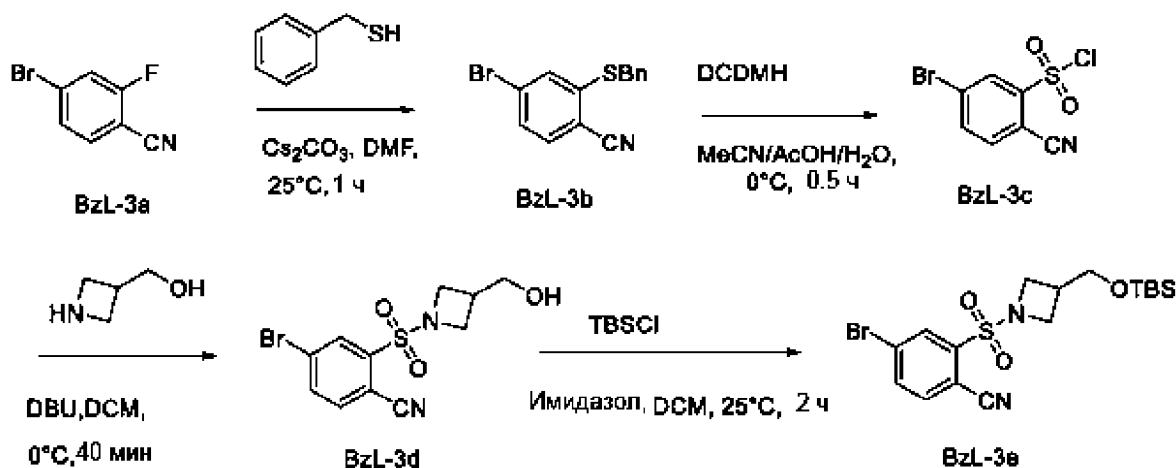
бензо[b]азепин-4-карбонил)-76-метил-

4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73-тетракозаокса-76,80-дiazатриоктантаоновой кислоты, VzL-2с.

В сосуд помещали VzL-2b (18 мг, 0,010 ммоль), 300 мкл ДХМ и 100 мкл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали в течение 45 мин, концентрировали под вакуумом и азеотропировали трижды с 1 мл толуола. Реакцию продолжали без какой-либо дополнительной очистки.

2,3,5,6-Тетрафторфенил 80-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[b]азепин-4-карбонил)-76-метил-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73-тетракозаокса-76,80-дiazатриоктантаонат, VzL-2 синтезировали в соответствии со способом, описанным для VzL-22. ЖХ/МС [M+H] 1816,91 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1818,51 (определено).

Пример 33 Синтез VzL-3



Синтез 2-бензилсульфанил-4-бромбензонитрила, VzL-3b

К смеси фенилметантиола (3,10 г, 25,00 ммоль, 2,93 мл, 1 экв) и 4-бром-2-фторбензонитрила VzL-3a (5 г, 25,00 ммоль, 1 экв) в ДМФ (10 мл) добавляли Cs_2CO_3 (12,22 г, 37,50 ммоль, 1,5 экв) при 25°C . Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ТСХ и ЖХМС показали, что реакция завершена. Смесь выливали в воду со льдом (100 мл), перемешивали в течение 5 минут и фильтровали с получением VzL-3b (4 г, 13,15 ммоль, выход 52,60%) в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 7,50 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,47-7,43 (м, 1H), 7,41-7,38 (м, 1H), 7,35-7,28 (м, 5H), 4,23 (с, 2H).

Синтез 5-бром-2-цианобензолсульфонилхлорида, VzL-3с

К смеси 2-бензилсульфанил-4-бромбензонитрила (1 г, 3,29 ммоль, 1 экв) в CH_3CN (20 мл), AcOH (0,7 мл) и H_2O (0,5 мл) добавляли 1,3-дихлор-5,5-иметилимидазолидин-2,4-дион (1,30 г, 6,57 ммоль, 2 экв) порциями при 0°C . Смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин. ТСХ и ЖХМС показали, что реакция завершена. Смесь выливали в воду со льдом (50 мл) и перемешивали в течение 2 мин. Водную фазу экстрагировали ДХМ (20

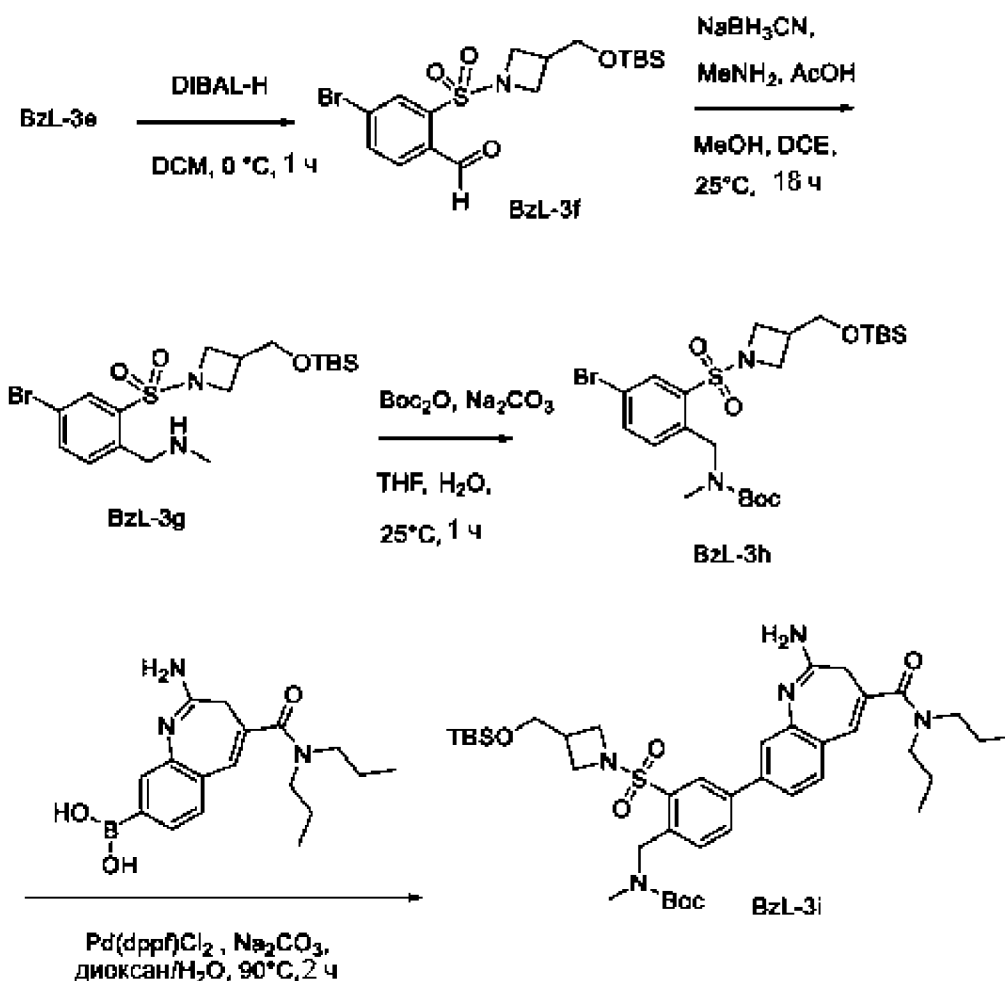
мл x 2). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (30 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/этилацетат=20/1, 10/1) с получением VzL-3c (0,8 г, 2,85 ммоль, выход 86,75%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 8,34 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,99 (дд, $J=8,4$, 2,0 Гц, 1H), 7,83 (д, $J=8,4$ Гц, 1H).

Синтез 4-бром-2-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилбензонитрила, VzL-3d

К смеси азетидин-3-илметанола (1,54 г, 12,48 ммоль, 1 экв, HCl) в ДХМ (100 мл) по каплям добавляли DBU (3,80 г, 24,95 ммоль, 3,76 мл, 2 экв.) при 0°C и перемешивали в течение 10 мин. В смесь добавляли 5-бром-2-цианобензолсульфонилхлорид, VzL-3c (3,5 г, 12,48 ммоль, 1 экв) и перемешивали при 0°C в течение 30 мин. ТСХ показала завершение реакции. Смесь выливали в воду со льдом (100 мл) и перемешивали в течение 2 мин. Водную фазу экстрагировали ДХМ (50 мл x 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (20 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением VzL-3d (3,5 г, неочищенного продукта) в виде бесцветного масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Синтез 4-бром-2-[3-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]азетидин-1-ил]сульфонилбензонитрила, VzL-3e

К смеси 4-бром-2-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилбензонитрила, VzL-3d (3,5 г, 10,57 ммоль, 1 экв) и трет-бутилдиметилсилилхлорида, TBSCl (1,91 г, 12,68 ммоль, 1,55 мл, 1,2 экв) в ДХМ (30 мл) добавляли имидазол (1,08 г, 15,85 ммоль, 1,5 экв) одной порцией при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь выливали в воду со льдом (200 мл) и перемешивали в течение 2 мин. Водную фазу экстрагировали ДХМ (100 мл x 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (50 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/этилацетат=20/1, 10/1) с получением VzL-3e (3,8 г, 8,53 ммоль, выход 80,72%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 8,20 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 7,82 (дд, $J=8,4$, 2,0 Гц, 1H), 7,72 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 4,10-4,06 (м, 2H), 3,96-3,93 (м, 2H), 3,68 (д, $J=5,2$ Гц, 2H), 2,82-2,76 (м, 1H), 0,86 (с, 9H), 0,00 (с, 6H).



Синтез 4-бром-2-[3-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]азетидин-1-ил]сульфонилбензальдегида, BzL-3f

К раствору 4-бром-2-[3-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]азетидин-1-ил]сульфонилбензонитрила, BzL-3e (3,8 г, 8,53 ммоль, 1 экв) в ДХМ (100 мл) добавляли по каплям гидрид диизобутилалюминия, DIBAL-H (1 М, 9,38 мл, 1,1 экв) при 0°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. ЖХМС показала, что реакция завершена. К смеси добавляли насыщенный водный раствор NH_4Cl (3 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=20/1, 5/1) с получением BzL-3f (3,5 г, 7,80 ммоль, выход 91,49%) в виде светло-желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 10,69 (с, 1H), 8,16 (д, $J=1,6$ Гц, 1H), 7,97 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,86 (дд, $J=1,6, 8,4$ Гц, 1H), 3,95-3,88 (м, 2H), 3,81-3,76 (м, 2H), 3,65-3,64 (м, 2H), 2,85-2,71 (м, 1H), 0,85 (с, 8H), 0,03 (с, 6H).

Синтез 1-[4-бром-2-[3-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-метилметанамина, BzL-3g

К раствору метанамина (4,16 г, 40,14 ммоль, 5 экв) (30% в MeOH) и 4-бром-2-[3-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]азетидин-1-ил]сульфонил-бензальдегида, BzL-3f (3,6 г, 8,03 ммоль, 1 экв) в MeOH (15 мл) и ДХЭ (15 мл) добавляли AcOH (482,08 мг, 8,03

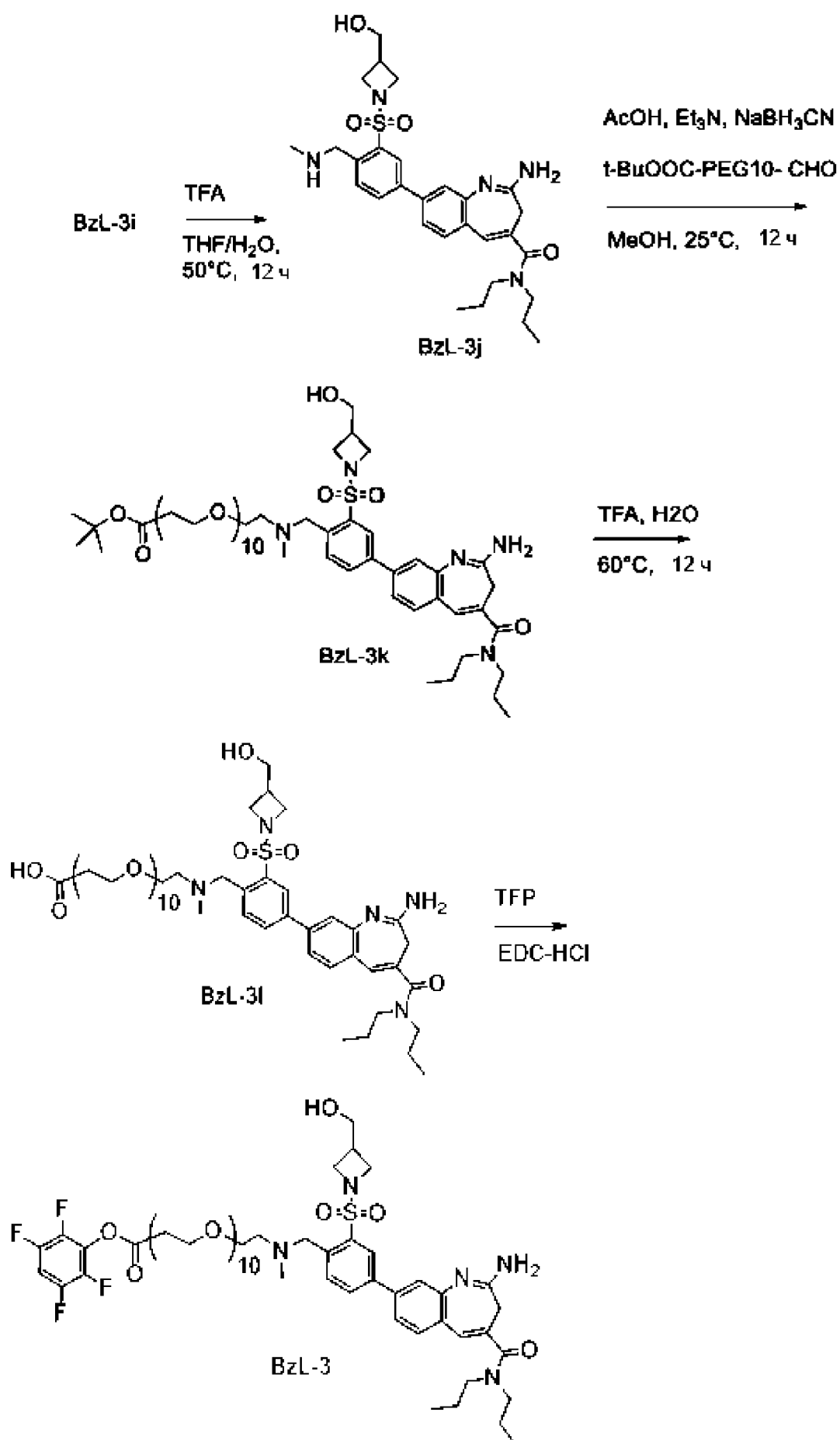
ммоль, 459,12 мкл, 1 экв) и NaBH_3CN (1,26 г, 20,07 ммоль, 2,5 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 часов. В смесь добавляли несколько капель воды и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , петролейный эфир/этилацетат=1:1) с получением **BzL-3g** (2 г, 4,31 ммоль, выход 53,75%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (DMCO-d_6 , 400 МГц) δ 8,09-8,06 (м, 1H), 8,01-7,99 (м, 1H), 7,71 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 4,27 (с, 2H), 3,85-3,80 (м, 2H), 3,62-3,58 (м, 2H), 3,55 (д, $J=5,2$ Гц, 2H), 2,69-2,75 (м, 1H), 2,56 (с, 3H), 0,82 (с, 9H), 0,00 (с, 6H)

Синтез трет-бутил-N-[[4-бром-2-[3-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]метил]-N-метилкарбамата, **BzL-3h**

К смеси 1-[4-бром-2-[3-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]азетидин-1-ил]сульфонил-фенил]-N-метилметанамина **BzL-3g** (2 г, 4,31 ммоль, 1 экв) в ТГФ (15 мл) и H_2O (3 мл) добавляли Na_2CO_3 (914,68 мг, 8,63 ммоль, 2 экв) и Woc_2O (1,41 г, 6,47 ммоль, 1,49 мл, 1,5 экв) одной порцией при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Остаток выливали в воду со льдом (10 мл) и перемешивали в течение 1 минуты. Водную фазу экстрагировали этилацетатом (10 мл x 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (20 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; флэш-колонка с силикагелем SepaFlash® 2 г, элюент этилацетат/петролейный эфир, градиент 0~50% при 45 мл/мин) с получением **BzL-3h** (1,4 г, 2,48 ммоль, выход 57,57%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (DMCO-d_6 , 400 МГц) δ 8,00-7,99 (м, 2H), 7,23 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 4,66 (с, 2H), 3,85-3,79 (м, 2H), 3,61-3,57 (м, 4H), 2,85 (с, 3H), 2,51-2,49 (м, 1H), 1,47-1,31 (м, 9H), 0,81 (с, 9H), -0,01 (с, 6H)

Синтез трет-бутил-N-[[4-[2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-8-ил]-2-[3-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]метил]-N-метилкарбамата, **BzL-3i**

К смеси [2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-8-ил]бороновой кислоты (360 мг, 1,09 ммоль, 1 экв) и трет-бутил-N-[[4-бром-2-[3-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]метил]-N-метилкарбамата, **BzL-3h** (616,35 мг, 1,09 ммоль, 1 экв) в диоксане (3 мл) и H_2O (0,5 мл) добавляли Pd(dppf)Cl_2 (80,02 мг, 109,36 мкмоль, 0,1 экв) и Na_2CO_3 (231,81 мг, 2,19 ммоль, 2 экв) одной порцией при 25°C в атмосфере N_2 . Смесь перемешивали при 90°C в течение 2 часов. Смесь фильтровали и концентрировали. Смесь выливали в H_2O (20 мл) и этилацетатом (20 мл x 2). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (20 мл), сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; флэш-колонка с силикагелем SepaFlash® 1 г, элюент этилацетат/петролейный эфир, градиент 0~100% при 75 мл/мин) с получением **BzL-3i** (360 мг, 468,69 мкмоль, выход 42,86%) в виде твердого желтого вещества.



Синтез 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонил-4-(метиламинометил)фенил]-N, N-дипропил-3Н-1-бензазепин-4-карбоксамида, BzL-3j

Смесь трет-бутил N-[[4-[2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-1-бензазепин-8-ил]-2-[3-[[трет-бутил(диметил)силил]оксиметил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]метил]-N-метилкарбамата, BzL-3i (170 мг, 221,33 мкмоль, 1 экв) в ТГФ (5 мл) и H₂O (1 мл) добавляли ТФУ (504,72 мг, 4,43 ммоль, 327,74 мкл, 20 экв) смесь перемешивали при 50°C в течение 12 часов. ЖХ-МС показала, что реагент 1 был полностью израсходован, и был обнаружен один основной пик с целевой массой. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil C18 100×30 мм, 5 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 20%-45%, 10 мин) с получением BzL- 3j (95 мг неочищенного продукта) в виде твердого желтого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц) δ 12,49 (с, 1H), 9,88 (с, 1H), 9,50 (с, 1H), 8,87 (с, 2H), 8,24-8,22 (м, 1H), 8,17- 8,16 (м, 1H), 7,92-7,90 (м, 1H), 7,74-7,71 (м, 1H), 7,67-7,70 (м, 2H), 7,06 (с, 1H), 4,79 (с, 1H), 4,46 (с, 2H), 3,85 (т, J=8,0 Гц, 2H), 3,61 (т, J=4,0 Гц, 2H), 3,35 (с, 4H), 2,67 (с, 3H), 2,64-2,55 (м, 2H), 1,74-1,39 (м, 4H), 0,86-0,80 (м, 6H). ЖХ/МС [M+H] 554,28 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 554,40 (определено).

Синтез трет-бутил 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-1-бензазепин-8-ил]-2-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонил-фенил]метил-метил-амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата, BzL-3k

К смеси 2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонил-4-(метиламинометил)фенил]-N, N-дипропил-3Н-1-бензазепин-4-карбоксамида, BzL-3j (0,05 г, 90,30 мкмоль, 1 экв) и трет-бутил 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-оксоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата, t-BuOOC-PEG10-CHO (52,80 мг, 90,30 мкмоль, 1 экв) в MeOH (2 мл) добавляли Et₃N (27,41 мг, 270,90 мкмоль, 37,71 мкл, 3 экв) и AcOH (5,42 мг, 90,30 мкмоль, 5,16 мкл, 1 экв) и NaBH₃CN (14,19 мг, 225,75 мкмоль, 2,5 экв) при 25 °С. Смесь перемешивали в течение 12 ч. Смесь концентрировали в вакууме с получением BzL-3k (100 мг неочищенного продукта) в виде желтого твердого вещества.

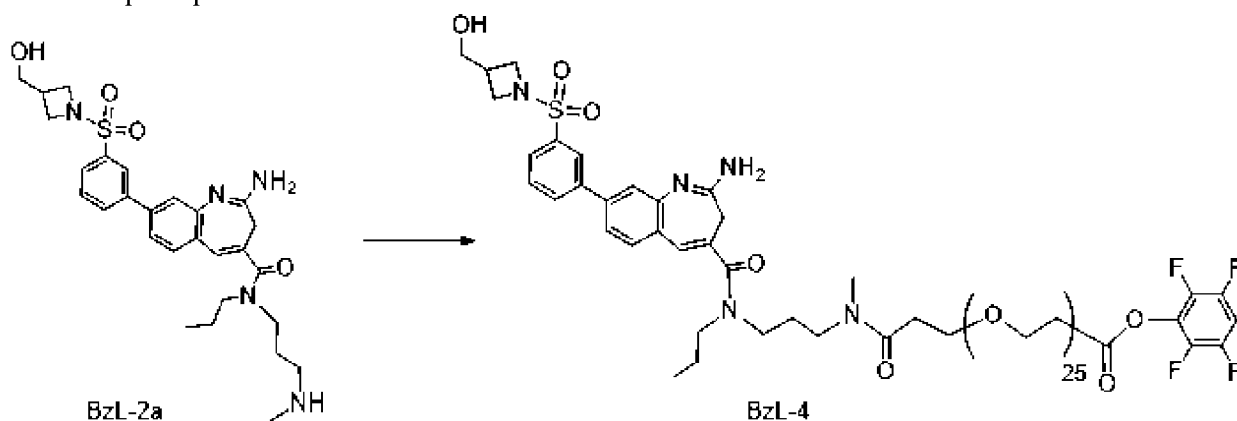
Синтез 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-1-бензазепин-8-ил]-2-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонил-фенил]метил-метил-амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропановой кислоты, BzL-3l

К раствору BzL-3k (100 мг, 89,09 мкмоль, 1 экв) в H₂O (1 мл) добавляли ТФУ (203,18 мг, 1,78 ммоль, 131,93 мкл, 20 экв). Смесь перемешивали при 60°C в течение 12 часов. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Luna C18 100×30 5 мк.; жидкая фаза: [А-ТФУ/H₂O=0,075% об/об; В-АЦН], В%: 20%-45%, 10 мин]) с получением BzL-3l (20 мг, 18,38 мкмоль, выход 20,63%, чистота 97,989%) в виде

бесцветного масла. ^1H ЯМР (MeOD , 400 МГц) δ 8,39-8,38 (м, 1H), 8,23-8,20 (м, 1H), 7,98-7,96 (м, 1H), 7,83-7,81 (м, 2H), 7,73-7,71 (м, 1H), 7,11 (с, 1H), 4,02-4,00 (м, 2H), 3,94-3,88 (м, 2H), 3,79-3,74 (м, 2H), 3,74-3,40 (м, 45H), 3,40-3,35 (м, 2H), 2,98-2,94 (м, 3H), 2,79-2,71 (м, 2H), 2,56-2,51 (м, 2H), 1,80-1,66 (м, 5H), 0,95 (с, 6H). ЖХ/МС $[\text{M}+2\text{H}/2]$ 533,78 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+2\text{H}/2]$ 534,20 (определено).

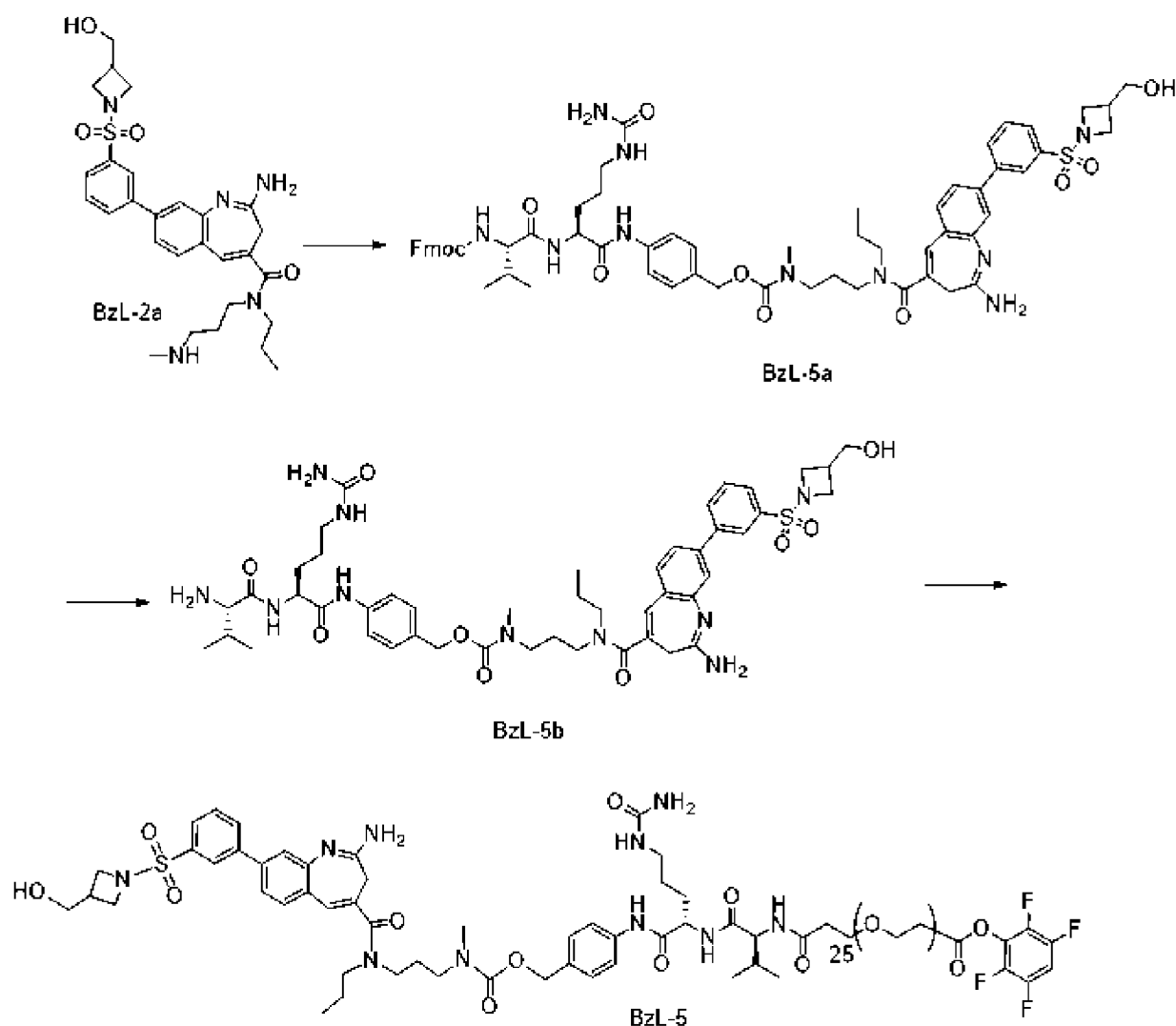
2,3,5,6-Тетрафторфенил 1-(4-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)-2-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-2-метил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азапентаэриаконтан-35-оат, BzL-3 синтезировали в соответствии со способом описанным для BzL-22. ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 1214,56 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 1214,97 (определено).

Пример 34 Синтез BzL-4



2,3,5,6-Тетрафторфенил 84-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбонил)-80-метил-79-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаокса-80,84-диазагептаоктаконтаноат, BzL-4 синтезировали в соответствии со способом, описанным для BzL-15. ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 1888,93 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 1889,53 (определено).

Пример 35 Синтез BzL-5

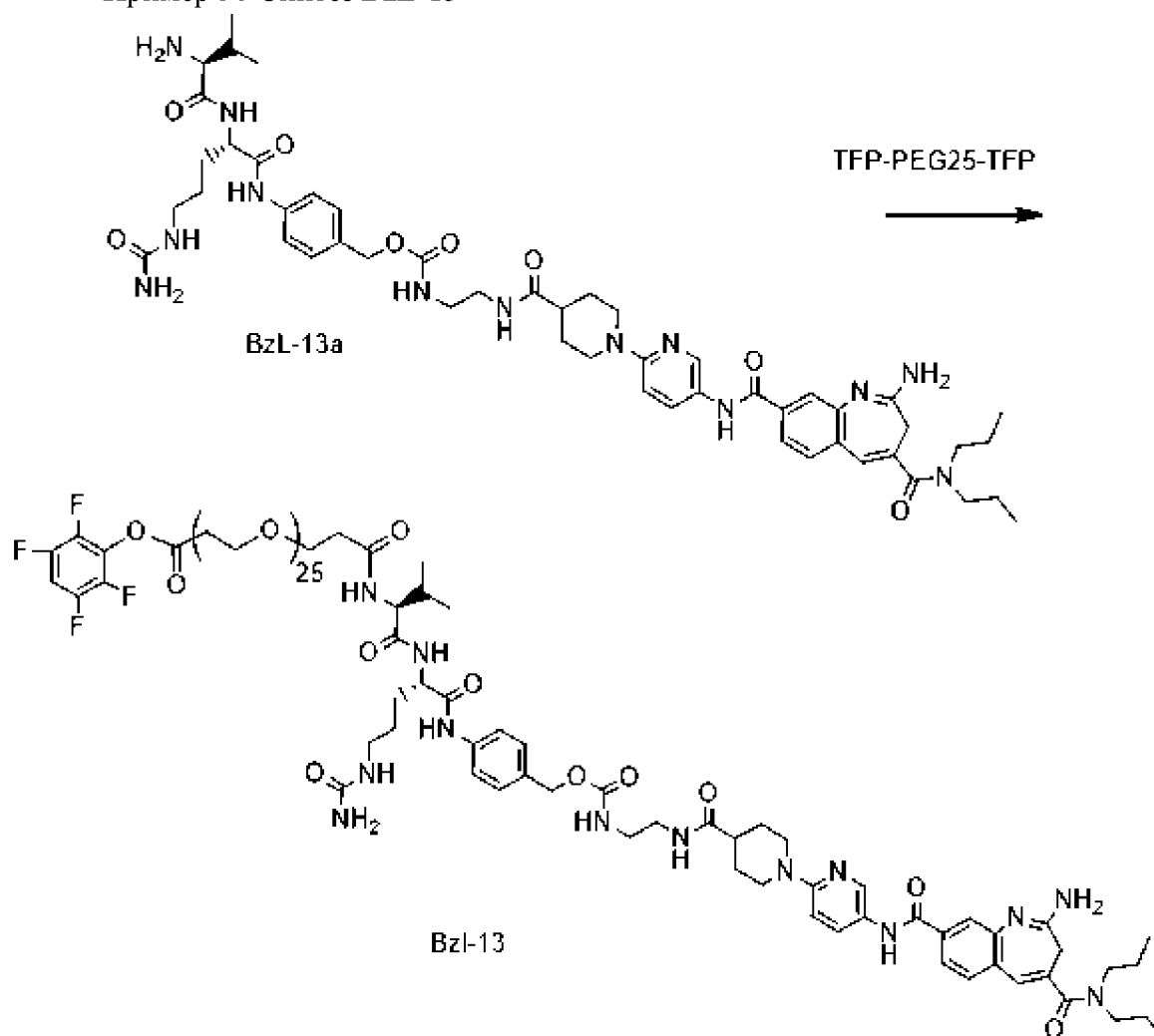


4-((S)-2-((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил(3-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)(метил)карбамат, BzL-5a синтезировали в соответствии со способом, описанным для BzL-26a.

4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил(3-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)(метил)карбамат, BzL-5b синтезировали в соответствии со способом, описанным для BzL-26. ЖХ/МС [M+H] 945,47 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 945,82 (определено).

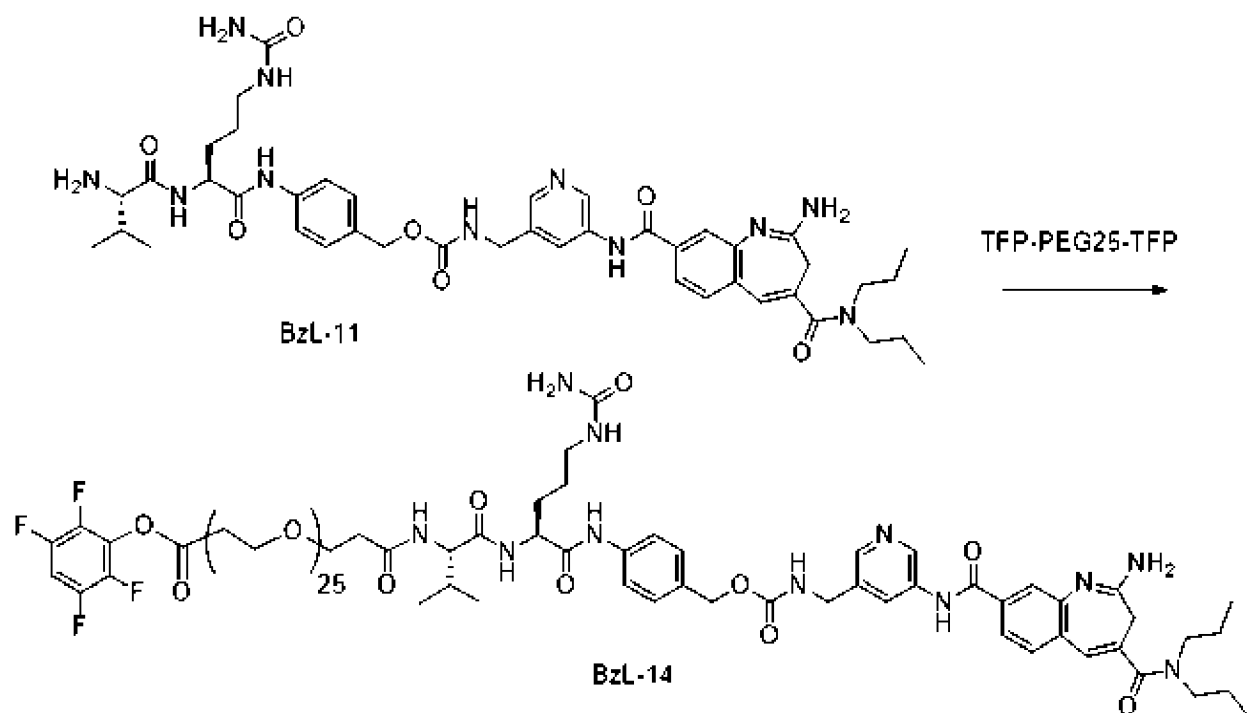
2,3,5,6-Тетрафторфенил (6S,9S)-1-амино-6-(((4-(((3-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)(метил)карбамоил)окси)метил)фенил)карбамоил)-9-изопропил-1,8,11-триоксо-14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86-пентакозаокса-2,7,10-триазанонаоктаконтан-89-оат, BzL-5 синтезировали в соответствии со способом, описанным для BzL-15. ЖХ/МС [M+2H/2] 1147,57 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1148,37 (определено).

Пример 36 Синтез BzL-13



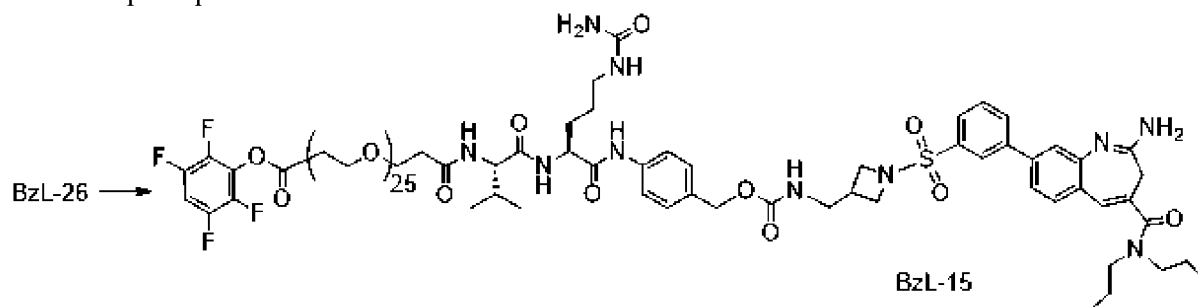
2,3,5,6-Тетрафторфенил (6S,9S)-1-амино-6-((4-(((2-(1-(5-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоксамидо)пиридин-2-ил)пиперидин-4-карбоксамидо)этил)карбамоил)окси)метил)фенил)карбамоил)-9-изопропил-1,8,11-триоксо-14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86-пентакозаокса-2,7,10-триазанонаоктаконтан-89-оат, BzL-13 синтезировали из BzL-13a и TFP-PEG25-TFP в соответствии со способом, описанным для BzL-15. ЖХ/МС [M+2H/2] 1165,10 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1165,91 (определено).

Пример 37 Синтез BzL-14



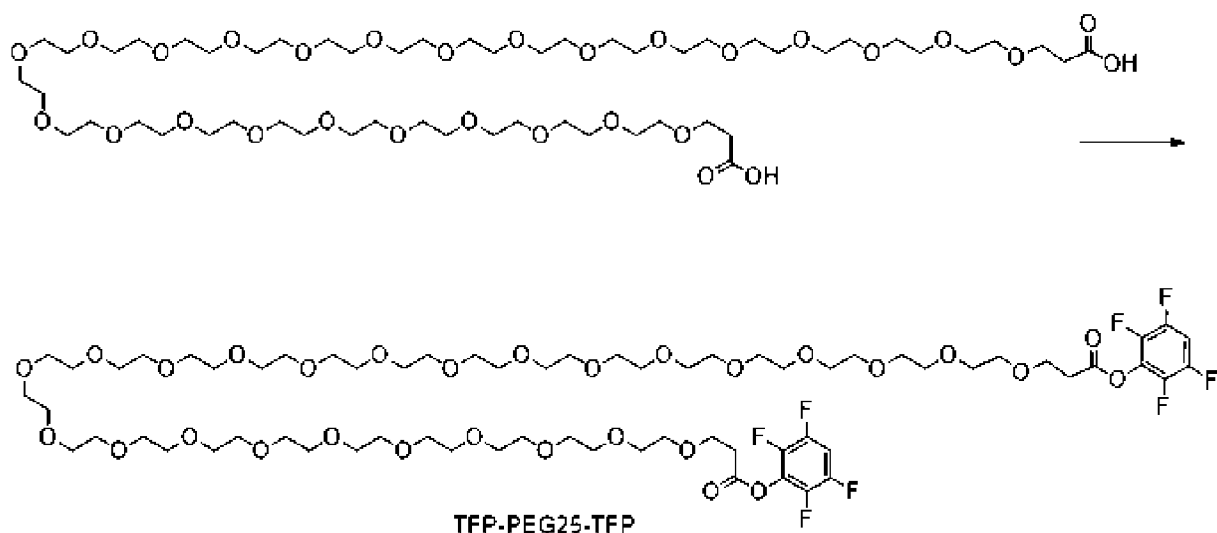
2,3,5,6-Тетрафторфенил (6S,9S)-1-амино-6-((4-((((6-(2-амино-4-
(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоксамидо)пиридин-3-
ил)метил)карбамоил)окси)метил)фенил)карбамоил)-9-изопропил-1,8,11-триоксо-
14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86-пентакозаокса-
2,7,10-триазанонаоктатоктан-89-оат, BzL-14 синтезировали из BzL-11 и TFP-PEG25-TFP в
соответствии со способом, описанным для BzL-15. ЖХ/МС [M+2H/2] 1095,06
(рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1095,87 (определено).

Пример 38 Синтез BzL-15



Синтез 2,3,5,6-тетрафторфенил(6S,9S)-1-амино-6-((4-((((1-((3-(2-амино-4-
(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-
ил)метил)карбамоил)окси)метил)фенил)карбамоил)-9-изопропил-1,8,11-триоксо-
14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86-пентакозаокса-
2,7,10-триазанонаоктатоктан-89-оат, BzL-15)

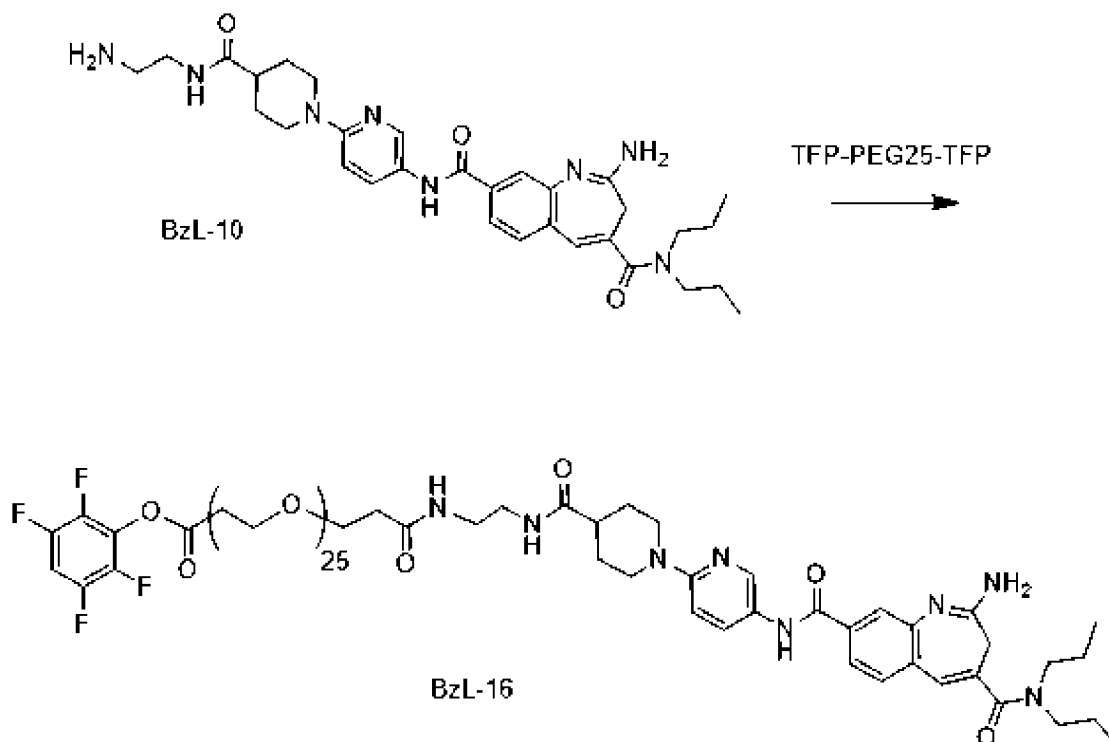
Синтез бис(2,3,5,6-тетрафторфенил)
4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-
пентакозаоксанонагептаконтандиоат, TFP-PEG25-TFP



В сосуд помещали 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаоксанагептаконтандиовую кислоту (269 мг, 0,221 ммоль), 2,3,5,6-тетрафторфенол (110 мг, 0,662 ммоль), коллидин (176 мкл, 1,33 ммоль), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (127 мг, 0,221 ммоль) и 3 мл ДМФ. Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч, затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 266 мг TFP-PEG25-TFP с выходом 79%. ЖХ/МС $[M+H]$ 1515,68 (рассчитано); ЖХ/МС $[M+H]$ 1516,00 (определено).

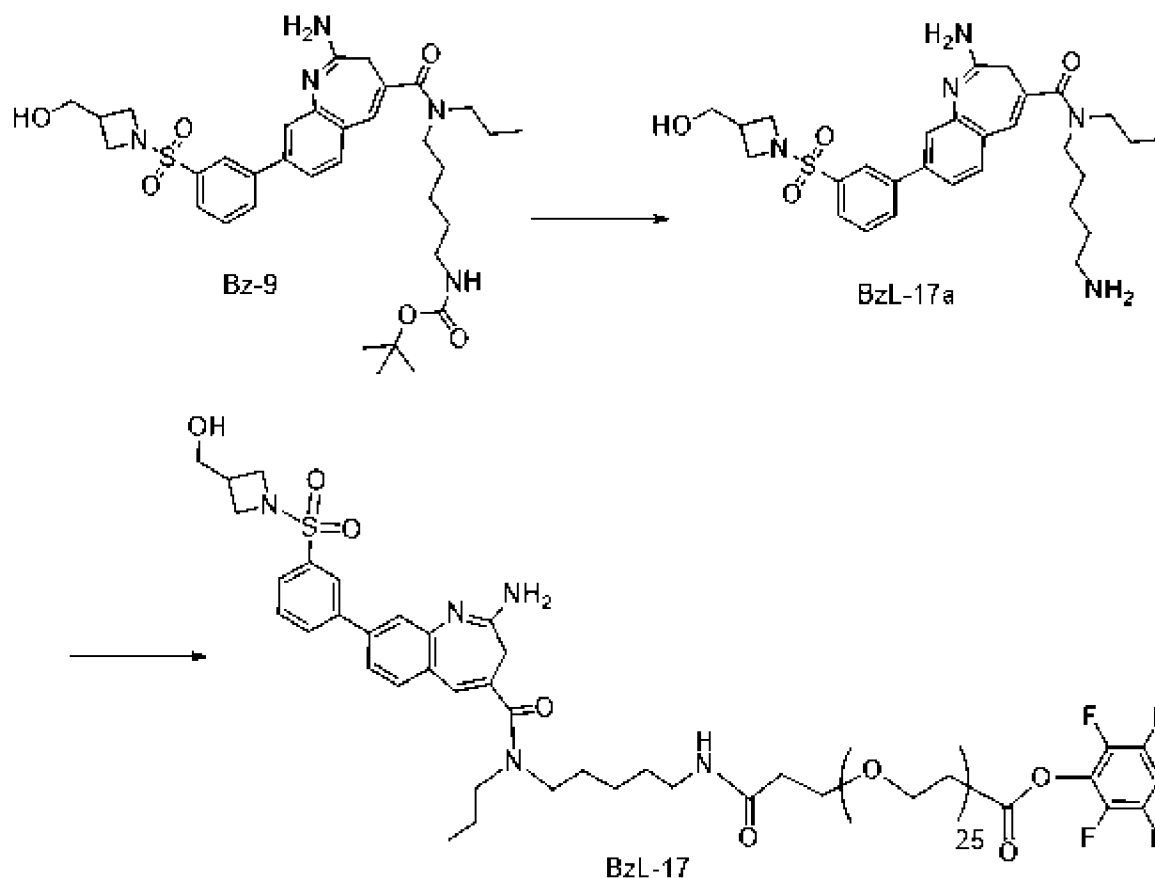
В сосуд помещали VzL-26 (11,9 мг, 0,013 ммоль), TFP-PEG25-TFP (19,7 мг, 0,013 ммоль), коллидин (5,6 мкл, 0,042 ммоль) в 300 мкл ДМФ. Реакционную смесь выдерживали в течение 5 часов и затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 7,7 мг VzL-15 с выходом 26%. ЖХ/МС $[M+2H/2]$ 1132,56 (рассчитано); ЖХ/МС $[M+2H/2]$ 1133,30 (определено).

Пример 39 Синтез VzL-16



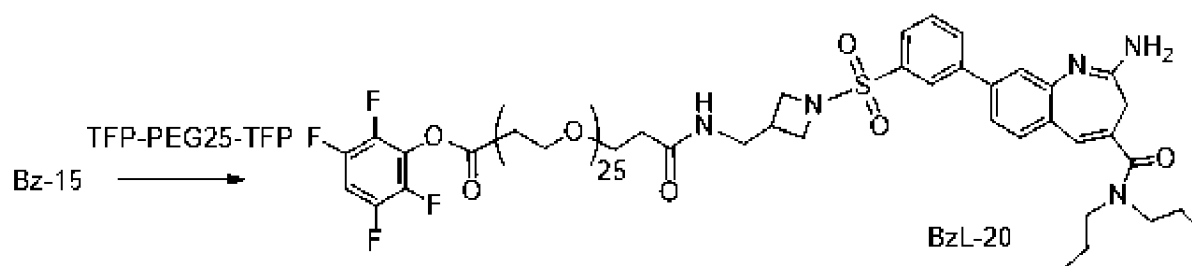
Синтез 2,3,5,6-тетрафторфенил-1-(1-(5-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[*b*]азепин-8-карбоксамидо)пиридин-2-ил)пиперидин-4-ил)-1,6-диоксо-9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81-пентакозаокса-2,5-диазатетраоктанта-84-оата, BzL-16 синтезировали из BzL-10 и TFP-PEG25-TFP в соответствии со способом, описанным для Bz-31. ЖХ/МС [M+H] 1924,01 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1925,23 (определено).

Пример 40 Синтез BzL-17



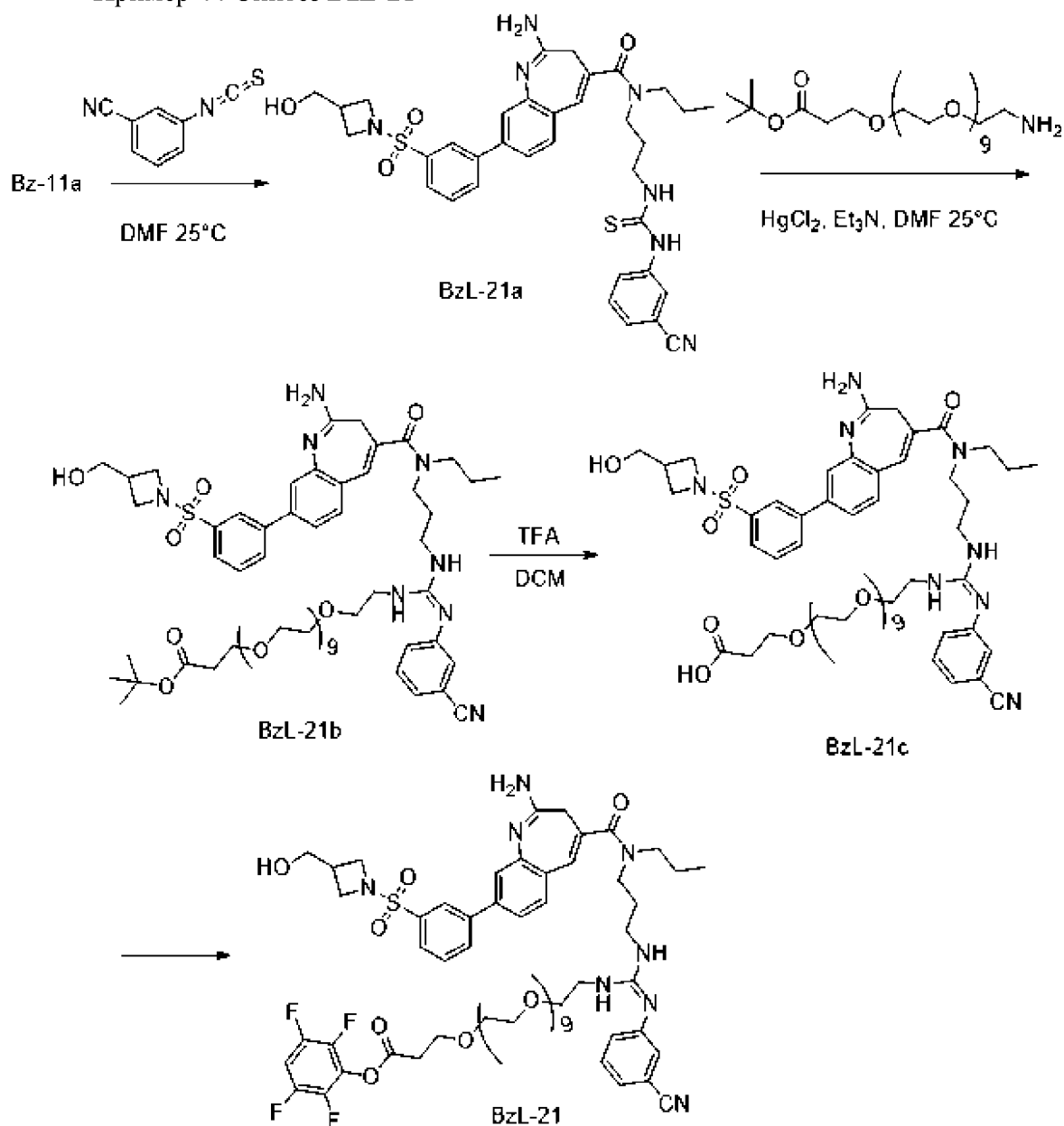
Синтез 2-амино-N-(5-аминопентил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксиамида, BzL-17a. В сосуд помещали Bz-9 (28 мг, 0,043 ммоль), 300 мкл ДХМ и 100 мкл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали в течение 1 часа, после чего ее концентрировали при пониженном давлении. Полученное масло трижды азеотропировали с 1 мл толуола, после чего добавляли 1 мл метанола и K_2CO_3 (38 мг, 0,28 ммоль). После перемешивания в течение 16 часов реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, а затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 5,8 мг BzL-17a с выходом 24%. ЖХ/МС [M+H] 554,28 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 554,47 (определено).

Синтез 2,3,5,6-тетрафторфенил 86-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбонил)-79-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаокса-80,86-дизанонаоктантаоната, BzL-17. В сосуд помещали BzL-17a (5,8 мг, 0,011 ммоль), TFP-PEG25-TFP (23,8 мг, 0,016 ммоль), коллидин (5,6 мкл, 0,042 ммоль) в 300 мкл ДМФ. Реакционную смесь выдерживали в течение 5 ч, а затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода 25-75% (АЦН:Н₂O), содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ). Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 5,0 мг BzL-17 с выходом 25%. ЖХ/МС [M+H] 1902,95 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1903,37 (определено).



2,3,5,6-Тетрафторфенил 1-(1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[б]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)-3-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-пентакозаокса-2-азахеноконтан-81-оат, BzL-20 синтезировали реакцией TFP-PEG25-TFP и Bz-15 в соответствии со способом, описанным для BzL-15. ЖХ/МС [M+H] 1858,92 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1859,59 (определено).

Пример 44 Синтез BzL-21



Синтез

2-амино-N-[3-[(3-цианофенил)карбамотиоиламино]пропил]-8-[3-[3-

(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, VzL-21a

К смеси 2-амино-N-(3-аминопропил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, Vz-11a (0,1 г, 190,24 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (2 мл) добавляли 3-изотиоцианатобензонитрил (30,48 мг, 190,24 мкмоль, 1 экв) одной порцией при 15°C. Смесь перемешивали при 15°C в течение 3 часов. ЖХМС показала наличие желаемого продукта. Смесь фильтровали и очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil C18 100×30 мм, 5 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 20%-60%, 10 мин) с получением 2-амино-N-[3-[(3-цианофенил)карбамотиоиламино]пропил]-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, VzL-21a (0,06 г, 87,48 мкмоль, выход 45,99%), получали в виде светло-желтого твердого вещества.

Синтез трет-бутила 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(Z)-[[3-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]пропиламино]-(3-цианоанилино)метиле]амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата, VzL-21b

К смеси VzL-21a (0,06 г, 87,48 мкмоль, 1 экв) и трет-бутил 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(Z)-[[3-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]пропиламино]-(3-цианоанилино)метиле]амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноат (61,49 мг, 104,98 мкмоль, 1,2 экв) в ДМФ (2 мл) и добавляли Et₃N (17,70 мг, 174,96 мкмоль, 2 экв) и HgCl₂ (28,50 мг, 104,98 мкмоль, 5,24 мкл, 1,2 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 18 часов. ЖХМС показала, что реагент израсходован. Смесь фильтровали и выливали в воду (10 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (10 мл × 3). Объединенную органическую фазу концентрировали с получением VzL-21b (0,1 г, неочищенного продукта) в виде светло-желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

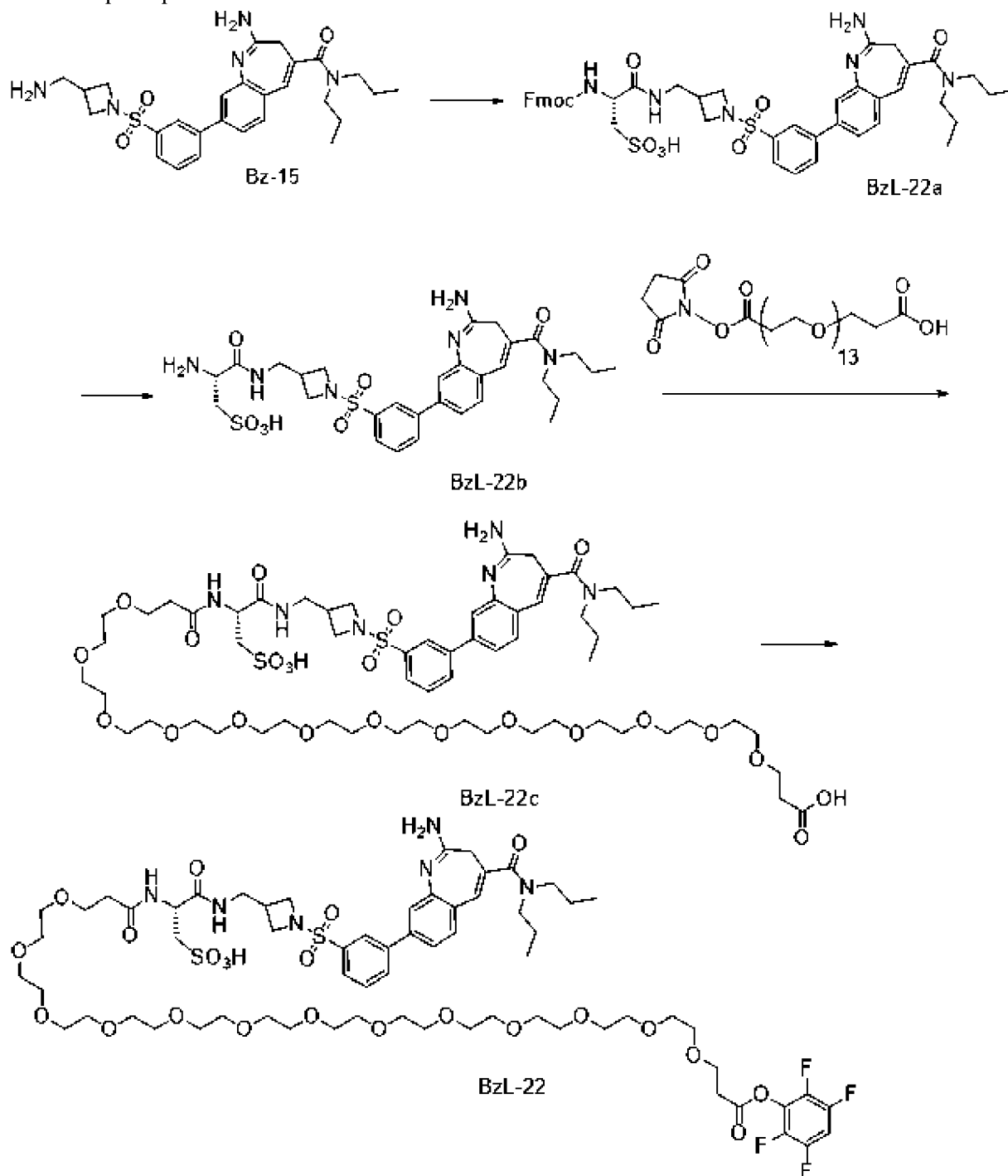
Синтез 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(Z)-[[3-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]пропиламино]-(3-цианоанилино)метиле]амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропановой кислоты, VzL-21c

К смеси VzL-21b (86,04 мг, 69,52 мкмоль, 1 экв) в H₂O (10 мл) добавляли ТФУ (396,36 мг, 3,48 ммоль, 257,38 мкл, 50 экв.) одной порцией при 15 °C. Смесь перемешивали при 85°C в течение 10 минут. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь концентрировали. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil C18 100×30 мм, 5 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 10%-40%, 10 мин) с получением VzL-21c. (18 мг, 13,71 мкмоль, выход 19,72%, чистота 90%) получали в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,12-8,08 (м, 2H), 7,92 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,84-7,81 (м, 4H), 7,64 (с, 3H), 7,12 (с, 1H), 3,87 (т, J=8,4 Гц, 2H),

3,72-3,70 (м, 9H), 3,63-3,58 (м, 38H), 3,43-3,41 (м, 6H), 2,62-2,57 (м, 1H), 2,52 (т, J=6,0 Гц, 2H), 2,04 (с, 2H), 1,75-1,70 (м, 3H), 0,96-0,92 (м, 3H).

2,3,5,6-Тетрафторфенил (Z)-40-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбонил)-35-((3-цианофенил)имино)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаокса-34,36,40-триазатритетраконтаноат, BzL-21 был синтезирован по методике, описанной для BzL-22. ЖХ/МС [M+H] 1329,57 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1329,77 (определено).

Пример 45 Синтез BzL-22



Синтез (R)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-3-(((1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-

ил)метил)амино)-3-оксопропан-1-сульфоновой кислоты, VzL-22a.

В сосуд помещали Vz-15 (14,7 мг, 0,024 ммоль), Fmoc-L-цистеиновую кислоту (11,2 мг, 0,024 ммоль), коллидин (12 мкл, 0,090 ммоль), HATU (12 мг, 0,032 ммоль) и 500 мкл. ДМФ. Реакционную смесь перемешивали до тех пор, пока Vz-15 не был израсходован, что подтверждали ЖХМС. Неочищенную смесь очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 8,6 мг VzL-22a с выходом 41%. ЖХ/МС [М+Н] 883,32 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 883,49 (определено).

Синтез (R)-2-амино-3-(((1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)амино)-3-оксопропан-1-сульфоукислоты, VzL-22b.

В сосуд помещали VzL-22a (8,6 мг, 0,01 ммоль), диэтиламин (10 мкл, 0,10 ммоль), 100 мкл ацетонитрила и 50 мкл ДМФ. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч, затем концентрировали при пониженном давлении. Неочищенную реакцию смесь трижды азеотропировали с 2 мл толуола и использовали на следующей стадии.

Синтез (R)-1-(1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)-3,6-диоксо-4-(сульфометил)-9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45-тридекаокса-2,5-диазаоктатетраконтан-48-овая кислота, VzL-22c

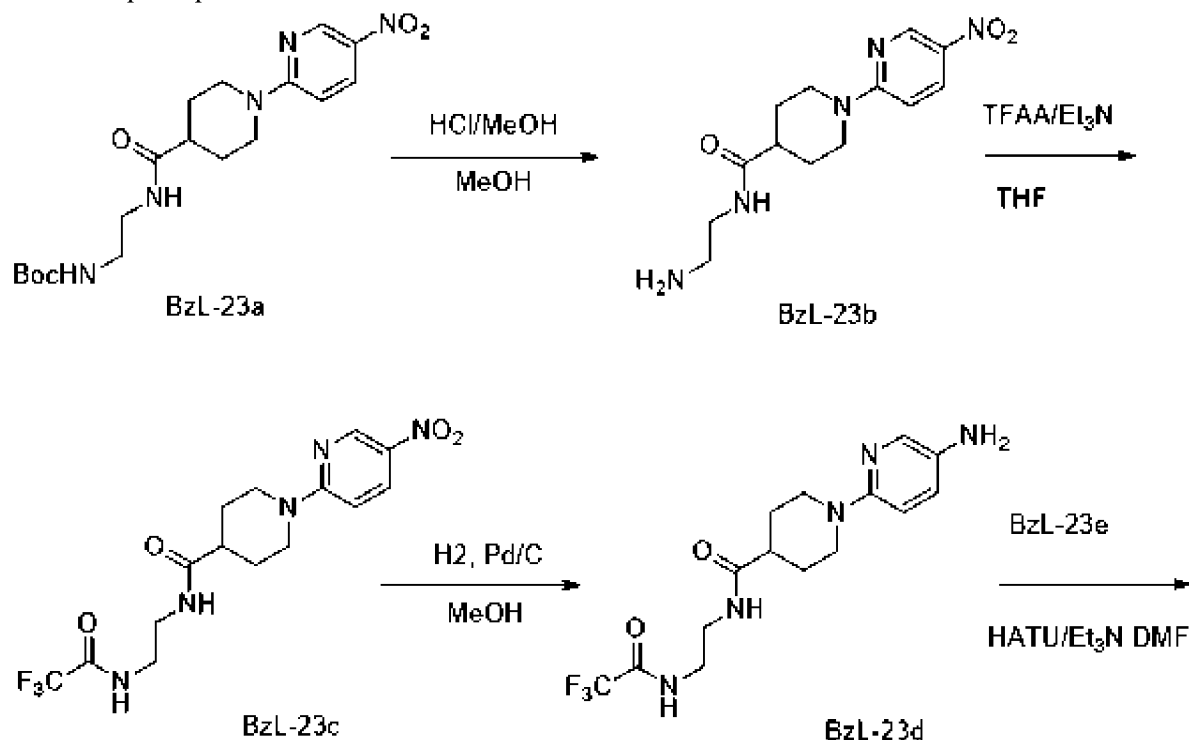
В сосуд помещали неочищенный VzL-22b (0,01 ммоль), 43-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-43-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-тридекаоксатридекаконтановая кислота (7,7 мг, 0,01 ммоль), диизопропилэтиламин (5,3 мкл, 0,03 ммоль), 1-гидрокси-7-азабензотриазол, HOAt, CAS Reg. № 39968-33-7 (4 мг, 0,03 ммоль) и 140 мкл ДМФ. Реакционную смесь перемешивали в течение 8 ч, затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 8,4 мг VzL-22c с выходом 64%. ЖХ/МС [М+Н] 1333,60 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1333,69 (определено).

Синтез (R)-2-(((1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)карбамоил)-4,46-диоксо-46-(2,3,5,6-тетрафторфеноксид)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43-тридекаокса-3-азагексатетраконтан-1-сульфоукислоты, VzL-22.

В сосуд помещали VzL-22c (7,2 мг, 0,005 ммоль), 2,3,5,6-тетрафторфенол (1,8 мг, 0,011 ммоль), коллидин (2,2 мкл, 0,016 ммоль), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (1 мг, 0,005 ммоль) и 100 мкл ДМФ. Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч, затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 5,3 мг VzL-22 с выходом 66%. ЖХ/МС [М+Н] 1481,60 (рассчитано); ЖХ/МС

[M+H] 1481,82 (определено).

Пример 46 Синтез BzL-23



Синтез N-(2-аминоэтил)-1-(5-нитропиридин-2-ил)пиперидин-4-карбоксамид, BzL-23b

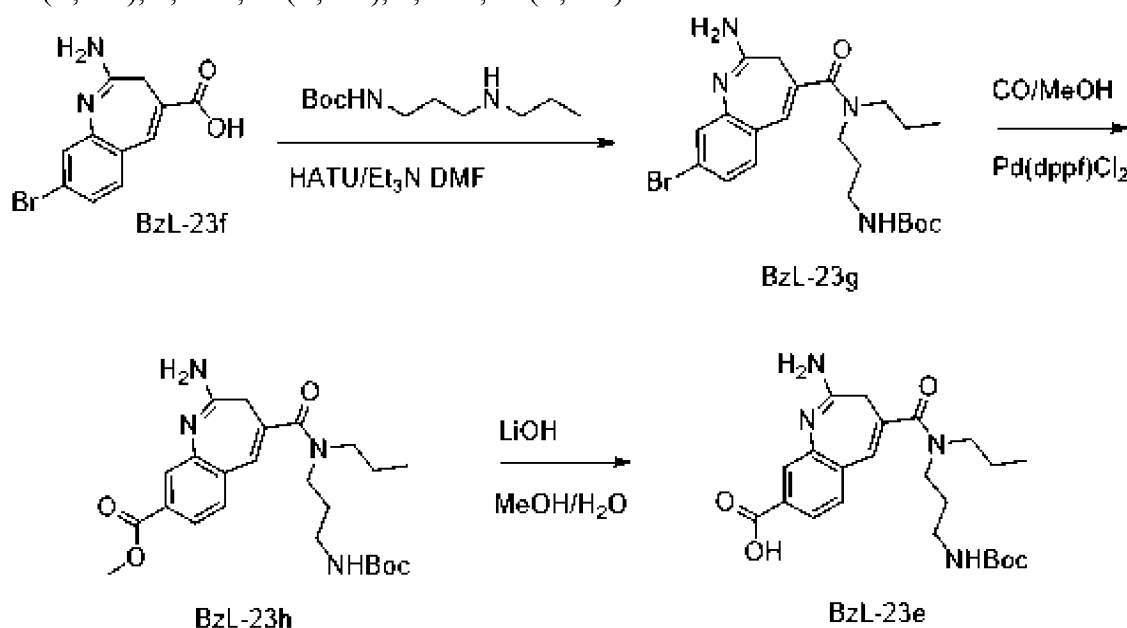
К смеси трет-бутил-N-[2-[[1-(5-нитро-2-пиридил)пиперидин-4-карбонил]амино]этил]карбамата, BzL-23a (0,5 г, 1,27 ммоль, 1 экв) в EtOAc (10 мл) добавляли HCl/EtOAc (4M, 3,18 мл, 10 экв) при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением BzL-23b (0,4 г, 1,21 ммоль, выход 95,44%, HCl) в виде твердого желтого вещества.

Синтез 1-(5-нитропиридин-2-ил)-N-(2-(2,2,2-трифторацетида)этил)пиперидин-4-карбоксамид, BzL-23c

К смеси N-(2-аминоэтил)-1-(5-нитро-2-пиридил)пиперидин-4-карбоксамид, BzL-23b (0,4 г, 1,21 ммоль, 1 экв, HCl) в ТГФ (10 мл) добавляли Et₃N (368,21 мг, 3,64 ммоль, 506,47 мкл, 3 экв) и (2,2,2-трифторацетил) 2,2,2-трифторацетат (382,13 мг, 1,82 ммоль, 253,06 мкл, 1,5 экв) при 25 °C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХМС показала получение целевого продукта. Смесь выливали в воду (50 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (30 мл×3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (30 мл), сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток, содержащий BzL-23c (0,4 г, 1,03 ммоль, выход 84,71%) в виде твердого желтого вещества непосредственно использовали на следующей стадии. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц) δ 9,37-9,45 (м, 1H), 8,95 (д, J=2,8 Гц, 1H), 8,19 (дд, J=9,6, 2,8 Гц, 1H), 8,03 (уш т, J=5,2 Гц, 1H), 6,96 (д, J=9,6 Гц, 1H), 4,47-4,53 (м, 2H), 2,99-3,25 (м, 6H), 2,38-2,47 (м, 3H), 1,73- 1,80 (м, 2H), 1,41-1,58 (м, 2H)

Синтез 1-(5-аминопиридин-2-ил)-N-(2-(2,2,2-трифторацетида)этил)пиперидин-4-карбоксамида, BzL-23d

К раствору 1-(5-нитро-2-пиридил)-N-[2-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этил]пиперидин-4-карбоксамида, BzL-23c (0,4 г, 1,03 ммоль, 1 экв) в MeOH (30 мл) добавляли Pd/C (0,5 г, чистота 5%) в атмосфере N₂. Суспензию дегазировали под вакуумом и несколько раз продували H₂. Смесь перемешивали в атмосфере H₂ (50 фунт/кв. дюйм) при 25°C в течение 2 часов. ТСХ показала, что реакция завершена. Смесь фильтровали и концентрировали в вакууме с получением BzL-23d (0,3 г, 834,85 мкмоль, выход 81,26%) в виде серого твердого вещества. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц) δ 9,39-9,46 (м, 1H), 7,97 (т, J=5,2 Гц, 1H), 7,59 (д, J=2,8 Гц, 1H), 6,90 (дд, J=8,8, 2,8 Гц, 1H), 6,64 (д, J=8,8 Гц, 1H), 3,99 (д, J=12,8 Гц, 2H), 3,15-3,26 (м, 6H), 2,54-2,63 (м, 2H), 2,16-2,26 (м, 1H), 1,65-1,71 (м, 2H), 1,48-1,60 (м, 2H)



Синтез трет-бутил-(3-(2-амино-8-бром-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамида)пропил)карбамата, BzL-23g

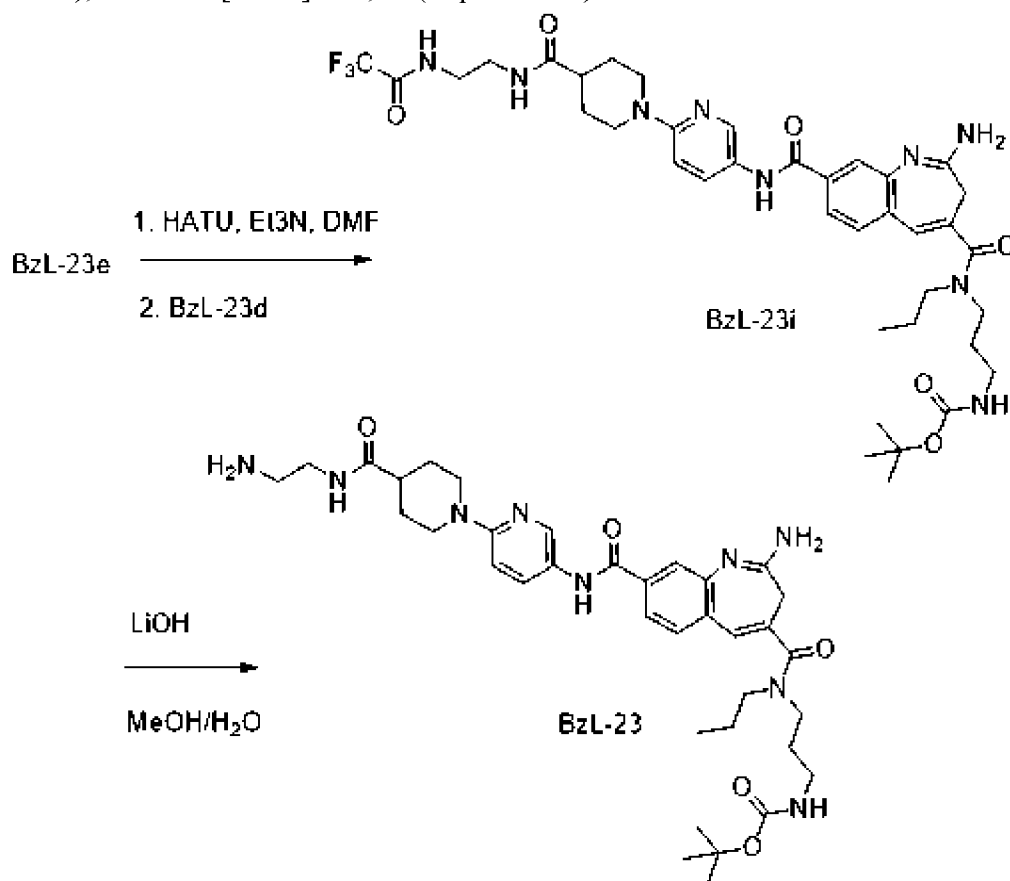
К смеси 2-амино-8-бром-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, BzL-23f (4,09 г, 14,56 ммоль, 1 экв) и трет-бутил-N-[3-(пропиламино)пропил]карбамата (3,78 г, 17,47 ммоль, 1,2 экв) в ДМФ (10 мл), добавляли HATU (6,64 г, 17,47 ммоль, 1,2 экв) и Et₃N (2,95 г, 29,12 ммоль, 4,05 мл, 2 экв) одной порцией при 25°C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь разбавляли водой и экстрагировали EtOAc (50 мл × 3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=1/0, 0/1) с получением BzL-23g (6 г, 12,52 ммоль, выход 85,95%) в виде желтого масла.

Синтез метил-2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропил-пропил-карбамоил]-3H-1-бензазепин-8-карбоксилата, BzL-23h

К раствору трет-бутил-N-[3-[(2-амино-8-бром-3H-1-бензазепин-4-карбонил)-пропил-амино]пропил]карбамата, BzL-23g (5 г, 10,43 ммоль, 1 экв) в MeOH (50 мл) добавляли Et₃N (3,17 г, 31,29 ммоль, 4,35 мл, 3 экв) и Pd(dppf)Cl₂ (763,13 мг, 1,04 ммоль, 0,1 экв) в атмосфере N₂. Суспензию дегазировали под вакуумом и несколько раз продували CO (10,43 ммоль, 1 экв). Смесь перемешивали в атмосфере CO (50 фунт/кв. дюйм) при 80°C в течение 12 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь фильтровали и концентрировали с получением BzL-23h (7 г, неочищенного продукта) в виде желтого масла.

Синтез 2-амино-4-((3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропил)(пропил)карбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоновой кислоты, BzL-23e

К смеси метил 2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропил-пропил-карбамоил]-3H-1-бензазепин-8-карбоксилата, BzL-23h (6 г, 13,08 ммоль, 1 экв) в MeOH (80 мл) добавляли LiOH (1,25 г, 52,34 ммоль, 4 экв) одной порцией при 30°C. Смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь доводили до pH 6 с помощью водной HCl (1 М) при 25 °C. Смесь концентрировали. Смесь дополнительно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex luna C18 250×50 мм, 10 мкм (микрон); подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 10%-40%, 20 мин) с получением BzL-23e (1,4 г, 3,09 ммоль, выход 23,64%, чистота 98,23%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,06 (д, J=1,2 Гц, 1H), 8,02 (дд, J=1,6, 8,0 Гц, 1H), 7,68 (с, 1H), 7,14 (с, 1H), 3,58- 3,44 (м, 4H), 3,37 (с, 2H), 3,10 (м, 2H), 1,85 (м, 2H), 1,71 (м, 2H), 1,51-1,33 (м, 9H), 0,92-0,98 (м, 3H). ЖХ/МС [M+H] 445,25 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 445,10 (определено).



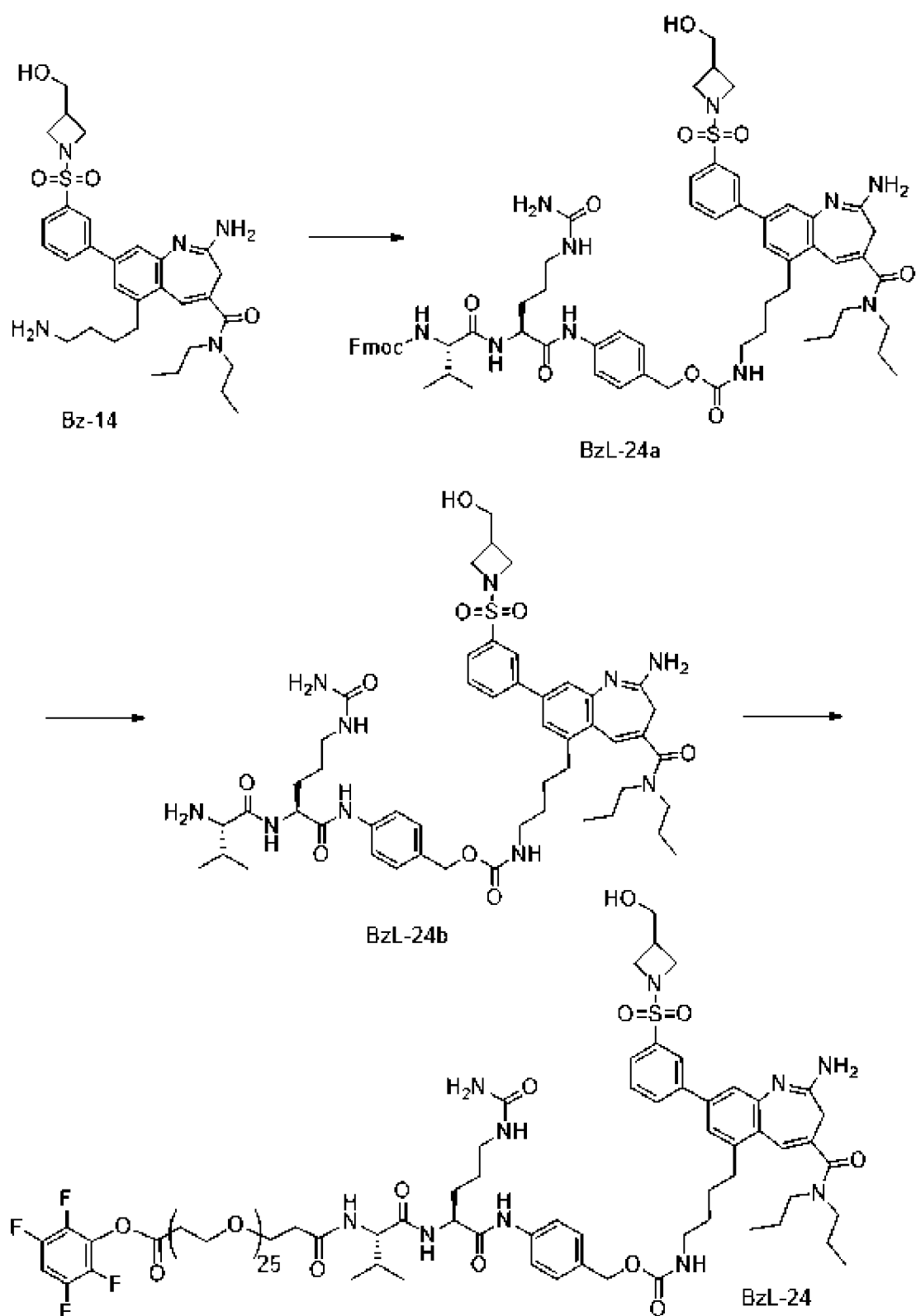
Синтез трет-бутил-(3-(2-амино-N-пропил-8-((6-(4-((2-(2,2,2-трифторацетидамино)этил)карбамоил)пиперидин-1-ил)пиридин-3-ил)карбамоил)-3Н-бензо[б]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамата, VzL-23i

К смеси 2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропил-пропилкарбамоил]-3Н-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты, VzL-23e (200 мг, 449,92 мкмоль, 1 экв) HATU (205,29 мг, 539,90 мкмоль, 1,2 экв) в ДМФ (3 мл) добавляли Et₃N (136,58 мг, 1,35 ммоль, 1,87,87 мкл, 3 экв) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 5 мин, затем 1-(5-амино-2-пиридил)-N-[2-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этил]пиперидин-4-карбоксамид, VzL-23d (161,68 мг, 449,92 мкмоль, 1 экв) добавляли к смеси, перемешивали в течение 30 мин. ЖХМС показала поучение целевого продукта. Смесь выливали в воду (50 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (50 мл). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (50 мл), сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением VzL-23i (0,3 г, 381,75 мкмоль, выход 84,85%) в виде желтого масла.

Синтез трет-бутил-(3-(2-амино-8-((6-(4-((2-аминоэтил)карбамоил)пиперидин-1-ил)пиридин-3-ил)карбамоил)-N-пропил-3Н-бензо[б]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамата, VzL-23

К смеси трет-бутил N-[3-[[2-амино-8-[[6-[4-[2-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этилкарбамоил]-1-пиперидил]-3-пиридил]карбамоил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]пропил]карбамат, VzL-23i (0,25 г, 318,13 мкмоль, 1 экв) в MeOH (10 мл) добавляли LiOH·H₂O. (40,05 мг, 954,38 мкмоль, 3 экв) в H₂O (1 мл) при 25°С. Смесь перемешивали при 40°С в течение 12 часов. ЖХМС показала получение целевого продукта. Смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ колонка: Nano-micro Kromasil C18 100×30мм 5 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 15%-45%, 10 мин с получением VzL-23 (45 мг, 65,23 мкмоль, выход 20,51%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,73 (д, J=2,4 Гц, 1H), 8,24 (дд, J=9,8, 2,4 Гц, 1H), 7,75 (уш с, 1H), 7,45 (д, J=9,8 Гц, 1H), 7,15 (уш с, 1H), 4,24 (уш д, J=13,6 Гц, 2H) , 3,35-3,62 (м, 9H), 3,05-3,12 (м, 4H), 2,59-2,72 (м, 1H), 1,99-2,09 (м, 2H), 1,65-1,94 (м, 6H), 1,45 (с, 9H), 0,90-0,98 (м, 3H). ЖХ/МС [M+H] 690,41 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 690,40 (определено).

Пример 47 Синтез VzL-24

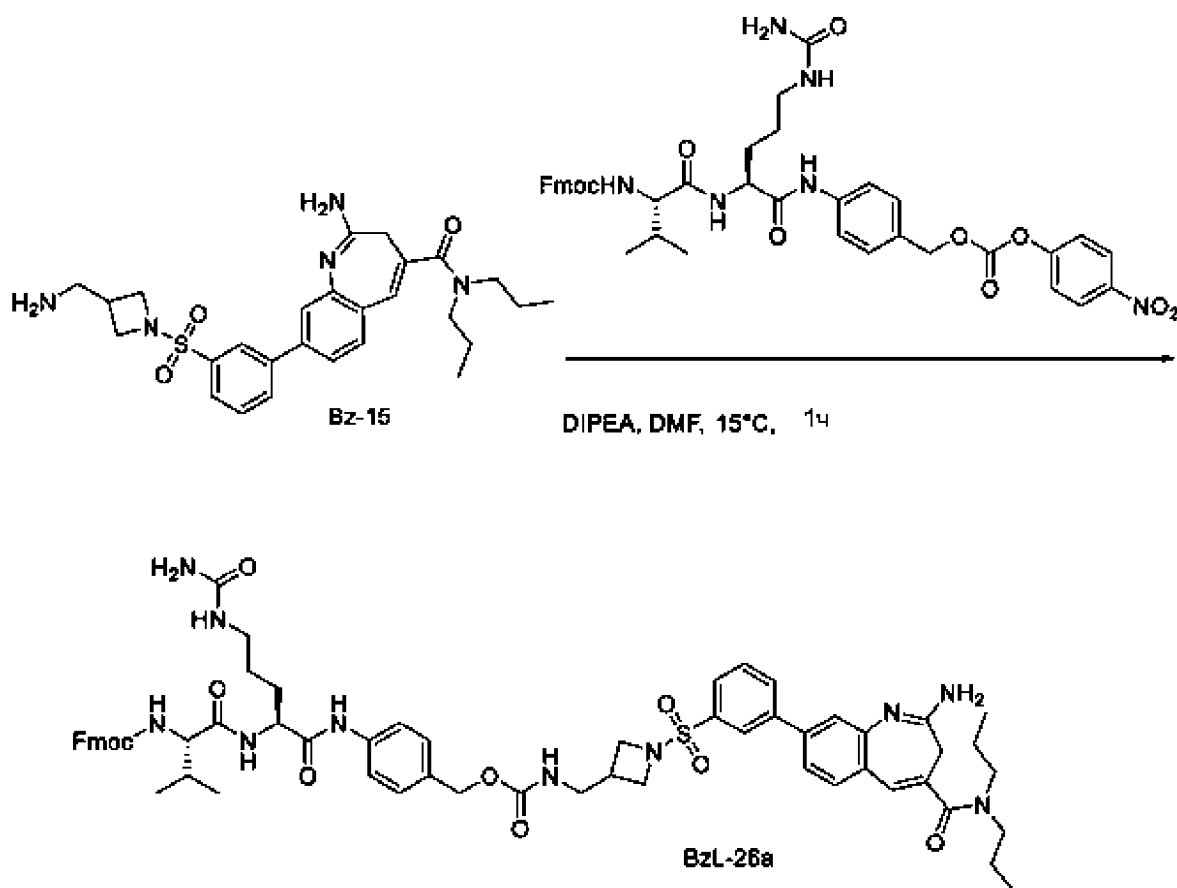


4-(((S)-2-(((S)-2-((((9H-Флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил(4-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-6-ил)бутил)карбамат, BzL-24a синтезировали из Bz-14 в соответствии со способом, описанным для BzL-26a. ЖХ/МС [M+H] 1209,58 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1209,85 (определено).

4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил(4-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[b]азепин-6-ил)бутил)карбамат, BzL-24b синтезировали в соответствии со способом, описанным для BzL-26. ЖХ/МС [M+H] 987,51 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 987,75 (определено).

2,3,5,6-Тетрафторфенил (6S,9S)-1-амино-6-(((4-(((4-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[b]азепин-6-ил)бутил)карбамоил)окси)метил)фенил)карбамоил)-9-изопропил-1,8,11-триоксо-14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86-пентакозаокса-2,7,10-триазанонаоктаконтан-89-оат, BzL-24 синтезировали в соответствии со способом, описанным для BzL-15. ЖХ/МС [M+2H/2] 1168,59 (рассчитано); ЖХ/МС [M+2H/2] 1169,36 (определено).

Пример 48 Синтез BzL-26



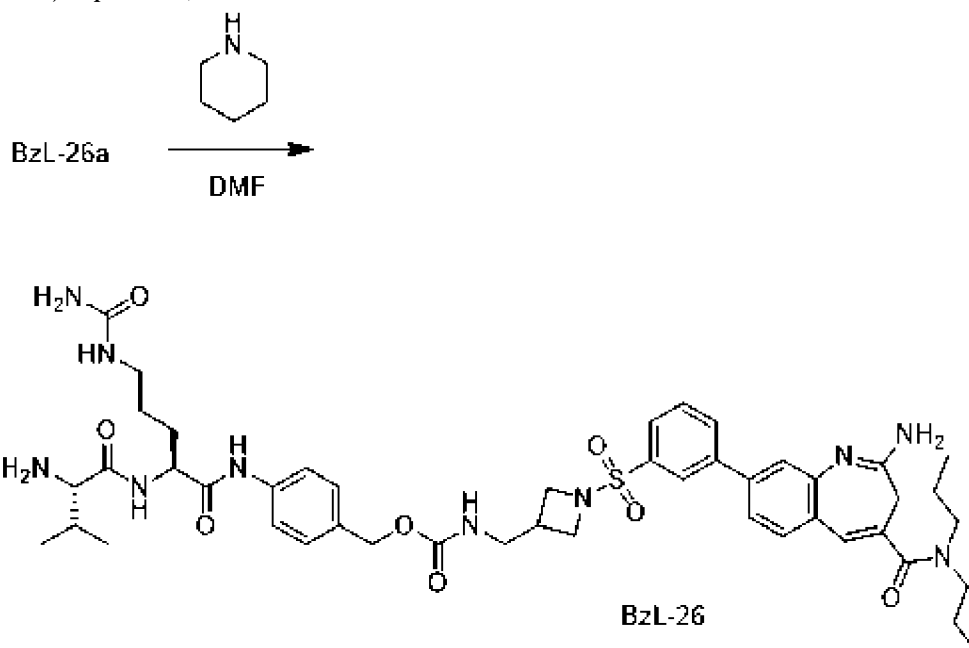
Синтез (9Н-флуорен-9-ил)метил((S)-1-(((S)-1-(((4-(((1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)карбамоил)окси)метил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата, BzL-26a

К раствору [4-[(2S)-2-[(2S)-2-(9Н-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилбутаноил]амино]-5-уреидопентаноил]амино]фенил]метил(4-нитрофенил)карбоната (200 мг, 260,83 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (1 мл) добавляли раствор 2-амино-8-[3-[3-

(аминометил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N, N-дипропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, Vz-15 (325,35 мг, 521,65 мкмоль, 2 экв, ТФУ) и DIPEA (67,42 мг, 521,65 мкмоль, 90,86 мкл, 2 экв) в ДМФ (1 мл) при 15°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. Смесь фильтровали. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil C18 100×30 мм, 5 мкм; жидкая фаза: [А-ТФУ/Н₂О=0,1% об/об; В-АЦН] В%: 30%-60%, 12 мин]) с получением [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилбутаноил]амино]-5-

уреидопентаноил]амино]фенил]метил-N-[[1-[3-[2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-8-ил]фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамата, VzL-26a (73 мг, 63,07 мкмоль, выход 24,18%, чистота 98,259%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD-d₄, 400 МГц) δ 8,05-8,09 (м, 1H), 7,92-7,98 (м, 1H), 7,84-7,90 (м, 1H), 7,58-7,83 (м, 8H), 7,46-7,57 (м, 2H), 7,33-7,42 (м, 2H), 7,25-7,33 (м, 2H), 7,11-7,23 (м, 2H), 7,04-7,09 (м, 1H), 4,87-4,94 (м, 2H), 4,46-4,56 (м, 1H), 4,31-4,45 (м, 2H), 4,16-4,26 (м, 1H), 3,95 (уш д, J=7,0 Гц, 1H), 3,85 (уш т, J=8,0 Гц, 2H), 3,52-3,63 (м, 2H), 3,46 (уш д, J=2,0 Гц, 4H), 3,35 (с, 3H), 3,15-3,23 (м, 1H), 3,01-3,13 (м, 3H), 2,58-2,71 (м, 1H), 2,00-2,16 (м, 1H), 1,84-1,96 (м, 1H), 1,64-1,77 (м, 4H), 1,49-1,62 (м, 2H), 0,75-1,09 (м, 12H) ЖХ/МС [M+H] 1137,52 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1137,10 (наблюдалось).

Синтез 4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил((1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)карбамат, VzL-26

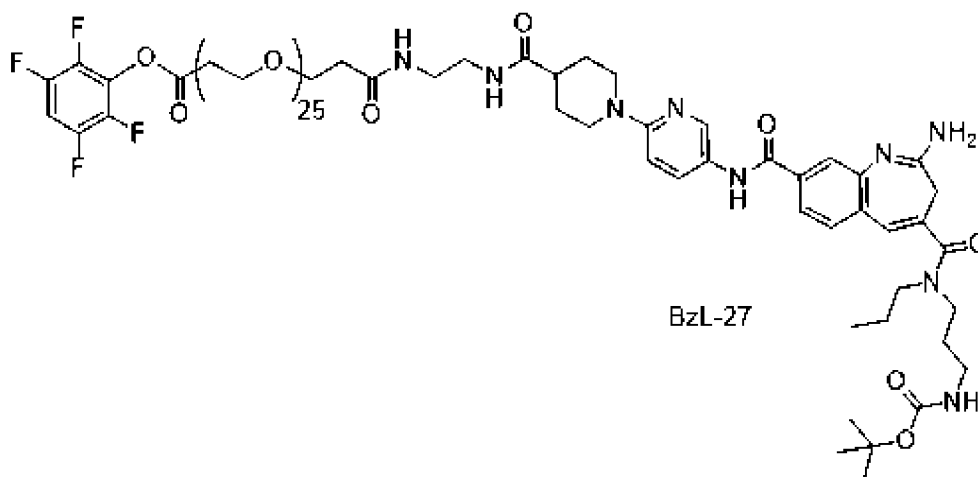
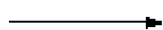


К раствору [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилбутаноил]амино]-5-уреидопентаноил]амино] фенил]метил-N-[[1-[3-[2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-8-ил]фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамата, VzL-26a (0,12 г, 105,51 мкмоль, 1 экв) в ДМФ (2 мл), добавляли пиперидин (44,92 мг, 527,54 мкмоль, 52,10 мкл, 5 экв) при 25°C и перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали. Остаток очищали

препаративной ВЭЖХ (колонка: Welch Xtimate C18 100 x 25мм x 3мкм; подвижная фаза: [вода (10мМ NH₄HCO₃)-АЦН]; В%: 25%-65%, 12 мин). Соединение [4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-амино-3-метилбутаноил]амино]-5-уреидопентаноил]амино]фенил]метил-N-[[1-[3-[2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-1-бензазепин-8-ил]фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамат, BzL-26 (0,037 г, 38,51 мкмоль, выход 36,50%, чистота 95,25%) получали в виде твердого желтого вещества. ¹Н ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,06 (с, 1H), 7,98 (д, J=7,4 Гц, 1H), 7,82 (д, J=7,4 Гц, 1H), 7,74 (т, J=7,4 Гц, 1H), 7,54 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,50-7,43 (м, 2H), 7,38 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,23 (д, J=8,8 Гц, 2H), 6,90 (с, 1H), 4,95-4,90 (м, 2H), 4,62-4,54 (м, 2H), 3,84 (т, J=8,2 Гц, 2H), 3,56 (т, J=4,2 Гц, 2H), 3,44 (т, J=4,0 Гц, 4H), 3,23 (д, J=5,2 Гц, 2H), 3,14-3,03 (м, 2H), 2,68-2,62 (м, 1H), 2,04-1,99 (м, 2H), 1,92-1,84 (м, 2H), 1,79-1,47 (м, 8H), 1,08-0,75 (м, 12H). ЖХ/МС [M+H] 915,46 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 915,10 (определено).

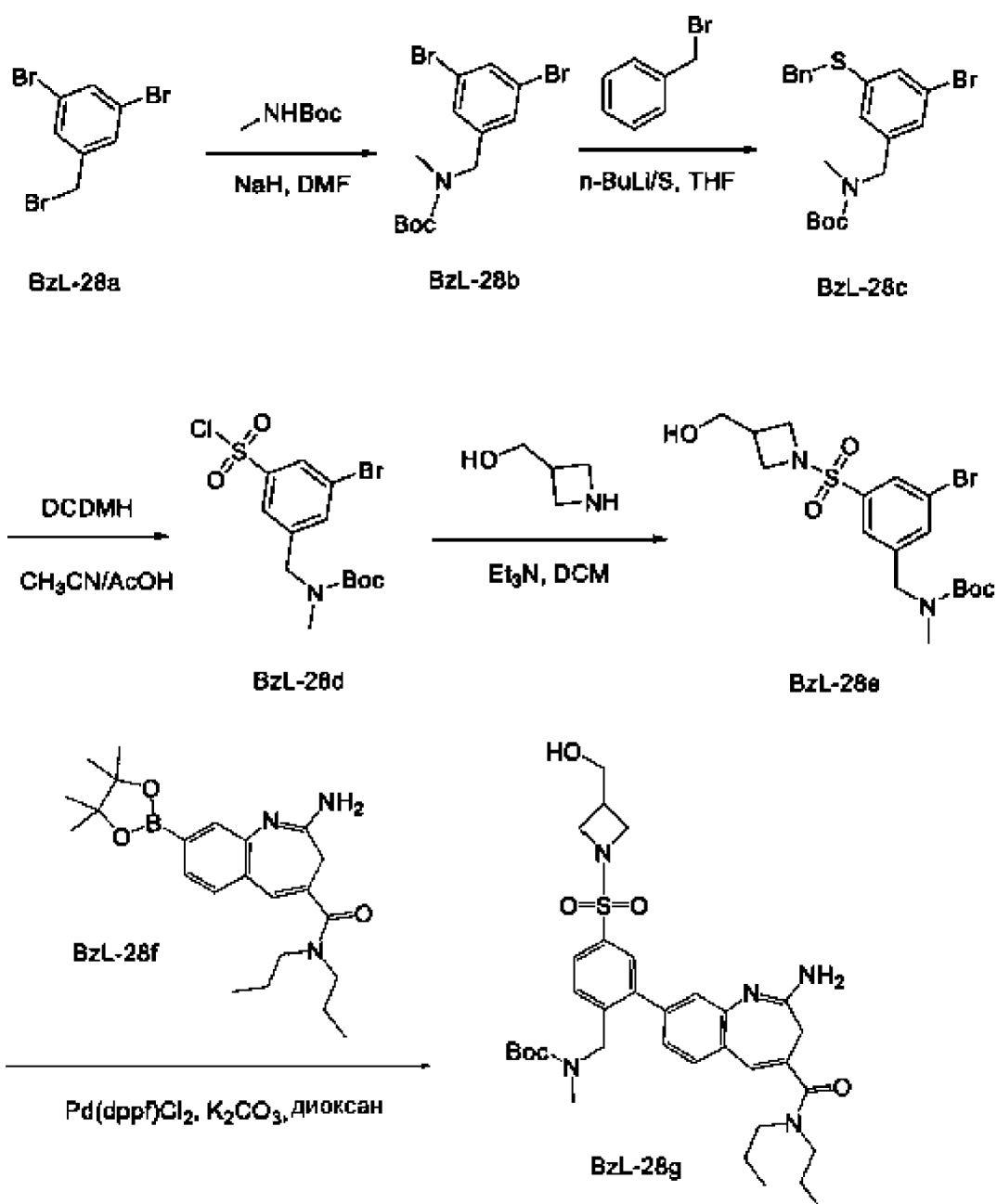
Пример 49 Синтез BzL-27
TFP-PEG25-TFP

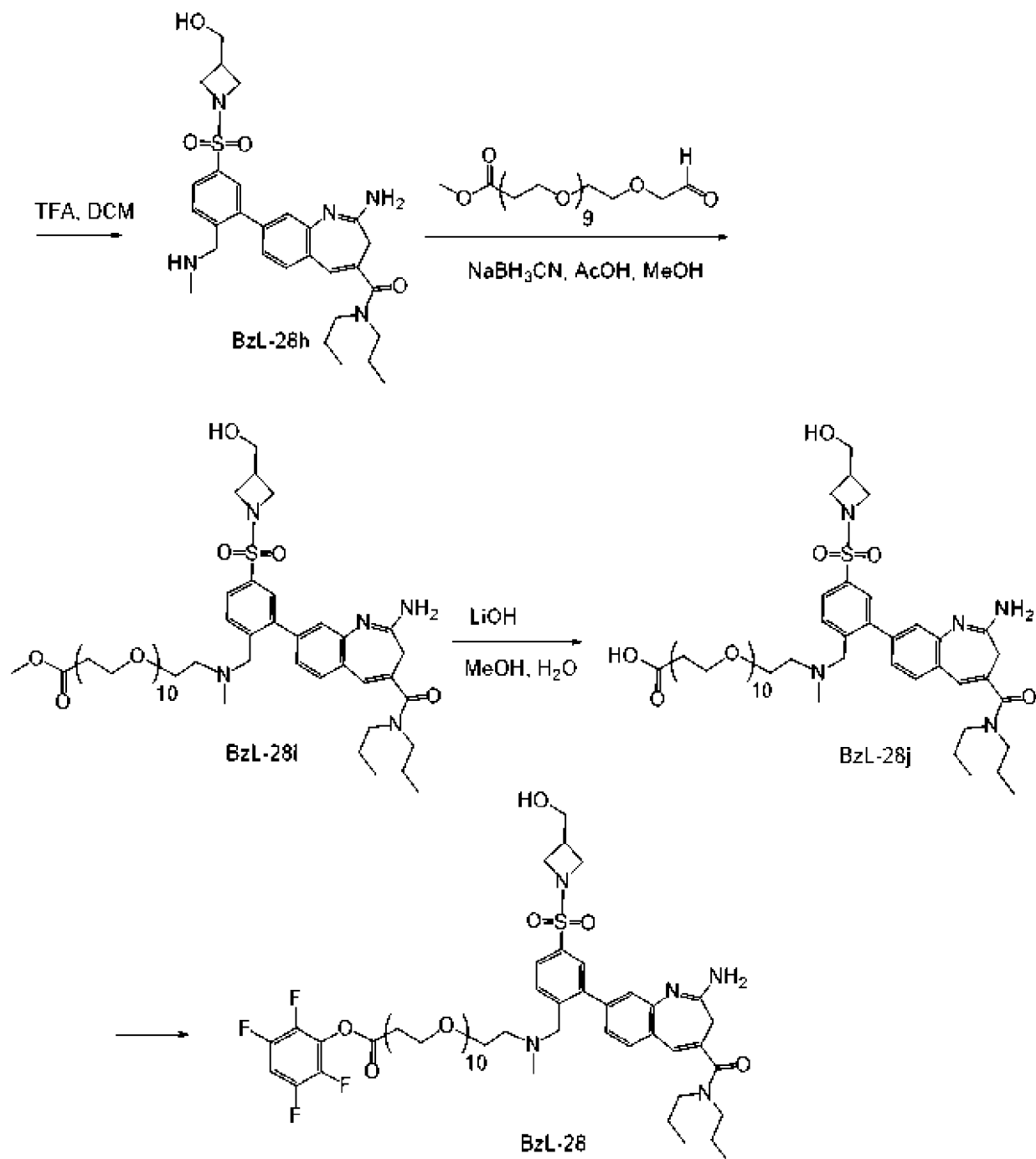
BzL-23



2,3,5,6-Тетрафторфенил 1-(1-(5-(2-амино-4-((3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропил)(пропил)карбамоил)-3Н-бензо[б]азепин-8-карбоксамидо)пиридин-2-ил)пиперидин-4-ил)-1,6-диоксо-9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81-пентакозаокса-2,5-дiazатетраоктaконтaн-84-оат, BzL-27 синтезировали из BzL-23 и TFP-PEG25-TFP в соответствии со способом, описанным для Bz-31. ЖХ/МС [M+H] 2039,07 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 2039,40 (определено).

Пример 50 Синтез BzL-28.





Синтез трет-бутил-3,5-дибромбензил(метил)карбамата, BzL-28b

К раствору трет-бутил-N-метилкарбамата (2,5 г, 19,06 ммоль, 1 экв) в ДМФ (80 мл) медленно добавляли NaH (914,82 мг, 22,87 ммоль, чистота 60%, 1,2 экв) при 0 °С. После добавления смесь перемешивали при 15 °С в течение 30 минут, а затем при 0 °С добавляли 1,3-дибром-5-(бромметил)бензол, BzL-28a (8,77 г, 26,68 ммоль, 1,4 экв). Полученную смесь перемешивали при 15 °С в течение 2 часов. ТСХ показала, что реагент полностью израсходован. Реакционную смесь гасили добавлением водн. NH₄Cl (250 мл) при 0 °С, а затем экстрагировали EtOAc (100 мл x 3). Объединенные органические слои промывали рассолом (30 мл x 3), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией (SiO₂, петролейный эфир:этилацетат=от 1:0 до 5:1) с получением BzL-

28b (6,6 г, 17,41 ммоль, выход 91,35%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 7,59-7,56 (м, 1H), 7,31 (с, 2H), 4,36 (с, 2H), 2,87 (с, 3H), 1,49 (с, 9H).

Синтез трет-бутил-3-(бензилтио)-5-бромбензил(метил)карбамата, BzL-28c

К раствору трет-бутил-3,5-дибромбензил(метил)карбамата, BzL-28b (3,6 г, 9,50 ммоль, 1 экв) в ТГФ (70 мл) по каплям добавляли $n\text{-BuLi}$ (2,5 М, 3,80 мл, 1 экв) при -78°C в атмосфере N_2 . После добавления смесь перемешивали при -78°C в течение 15 минут, а затем добавляли серу, S (304,55 мг, 9,50 ммоль, 1 экв) при -78°C . После добавления смесь перемешивали при -78°C в течение 45 мин, а затем добавляли бромметилбензол (1,62 г, 9,50 ммоль, 1,13 мл, 1 экв) при -78°C . Полученную смесь нагревали до 15°C и перемешивали при 15°C в течение 30 мин. ТСХ показала, что BzL-28b полностью израсходован. Реакционную смесь гасили добавлением водн. NH_4Cl (70 мл) при 0°C , а затем экстрагировали EtOAc (50 мл x 3). Объединенные органические слои промывали рассолом (20 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , **петролейный эфир:этил ацетат=от 1:0 до 5:1**) с получением BzL-28c (0,97 г, 2,30 ммоль, выход 24,18%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 7,35-7,26 (м, 5H), 7,26-7,21 (м, 1H), 7,17 (с, 1H), 7,04 (с, 1H), 4,34 (с, 2H), 4,12 (с, 2H), 2,79 (с, 3H), 1,48 (с, 9H).

Синтез трет-бутил-3-бром-5-(хлорсульфонил)бензил(метил)карбамата, BzL-28d

К раствору трет-бутил-3-(бензилтио)-5-бромбензил(метил)карбамата, BzL-28c (1,22 г, 2,89 ммоль, 1 экв) в CH_3CN (25 мл) и H_2O (1 мл) и уксусной кислоте AcOH (520,35 мг, 8,67 ммоль, 495,57 мкл, 3 экв) добавляли 1,3-дихлор-5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион, DCDMH (1,14 г, 5,78 ммоль, 2 экв) при 0°C . Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа. ТСХ показала, что BzL-28c полностью израсходован. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток разводили H_2O (20 мл) и экстрагировали EtOAc (20 мл x 3). Объединенные органические слои промывали рассолом (10 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , **петролейный эфир:этилацетат=от 1:0 до 5:1**) с получением BzL-28d (0,51 г, 1,28 ммоль, выход 44,29%) в виде светло желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 8,08 (с, 1H), 7,83 (с, 1H), 7,74 (с, 1H), 4,50 (с, 2H), 2,91 (с, 3H), 1,49 (с, 9H).

Синтез трет-бутил-3-бром-5-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)бензил(метил)карбамата, BzL-28e

К раствору трет-бутил-3-бром-5-(хлорсульфонил)бензил(метил)карбамата, BzL-28d (0,74 г, 1,86 ммоль, 1 экв) и азетидин-3-илметанола (746,66 мг, 3,71 ммоль, 2 экв, ТФУ) в ДХМ (15 мл) добавляли ТЭА (751,25 мг, 7,42 ммоль, 1,03 мл, 4 экв) при 0°C . Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. ТСХ показала, что реагент 1 полностью израсходован. Реакционную смесь гасили добавлением H_2O (15 мл) при 0°C , а затем экстрагировали EtOAc (15 мл x 3). Объединенные органические слои промывали рассолом (10 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, очищенного колоночной хроматографией (SiO_2 ,

петролейный эфир:этилацетат=от 10:1 до 0:1 с получением BzL-28e (640 мг, 1,42 ммоль, выход 76,74%) в виде светло-желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 7,90 (с, 1H), 7,69-7,53 (м, 2H), 4,48 (с, 2H), 3,89 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,64 (д, $J=6,0$ Гц, 3H), 3,42 (с, 1H), 2,95 (с, 3H), 2,65 (с, 1H), 1,49 (с, 9H).

Синтез трет-бутил 3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)-5-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)бензил(метил)карбамат, BzL-28g

Смесь трет-бутил 3-бром-5-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)бензил(метил)карбамата, BzL-28e (590 мг, 1,31 ммоль, 1 экв), 2-амино-N,N-дипропил-8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамида, BzL-28f (702,11 мг, 1,71 ммоль, 1,3 экв), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (48,0 мг, 65,7 мкмоль, 0,05 экв), K_2CO_3 (362,9 мг, 2,63 ммоль, 2 экв) в диоксане (10 мл) и H_2O (1 мл) дегазировали и продували N_2 3 раза, затем смесь перемешивали при 90 °С в течение 3 часов в атмосфере N_2 . Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (**ТФУ, условия: колонка: Nano-micro Kromasil C18 100×30 мм, 5 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 40%-60%, 10 мин**) с получением BzL-28g (180 мг, 275,30 мкмоль, выход 20,97%) в виде желтого твердого вещества.

Синтез 2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)-5-((метиламино)метил)фенил)-N,N-дипропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамида, BzL-28h

К раствору трет-бутил 3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)-5-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)бензил(метил)карбамата, BzL-28g (180 мг, 275,30 мкмоль, 1 экв) в ДХМ (2 мл) добавляли ТФУ (627,80 мг, 5,51 ммоль, 407,66 мкл, 20 экв) при 15 °С. Смесь перемешивали при 15 °С в течение 1 часа. ЖХ-МС показала, что реагент 1 был израсходован. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. К остатку добавляли ТГФ (5 мл) и водн. NaHCO_3 (5 мл) до pH 8-9 при 0 °С и затем перемешивали при 15 °С в течение 30 мин. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка и экстрагировали **EtOAc (10 мл x 3)**. Объединенные органические слои промывали **рассолом (5 мл)**, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением BzL-28h (110 мг, 198,66 мкмоль, выход 72,16%) в виде желтого масла. ЖХ/МС [М+Н] 554,28 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 554,30 (определено).

Синтез метил-1-(3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)-5-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-2-метил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азапента триаконтан-35-оат, BzL-28i

К раствору 2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)-5-((метиламино)метил)фенил)-N,N-дипропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамида, BzL-28h (110 мг, 198,66 мкмоль, 1 экв) и метил-1-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксатри триаконтан-33-оата (140,13 мг, 258,26 мкмоль, 1,3 экв) в MeOH (2 мл) добавляли AcOH (11,93 мг, 198,66 мкмоль, 11,36 мкл, 1 экв) при 15 °С. После добавления смесь перемешивали при 15 °С в течение 15 минут, а затем добавляли NaBH_3CN (24,97 мг,

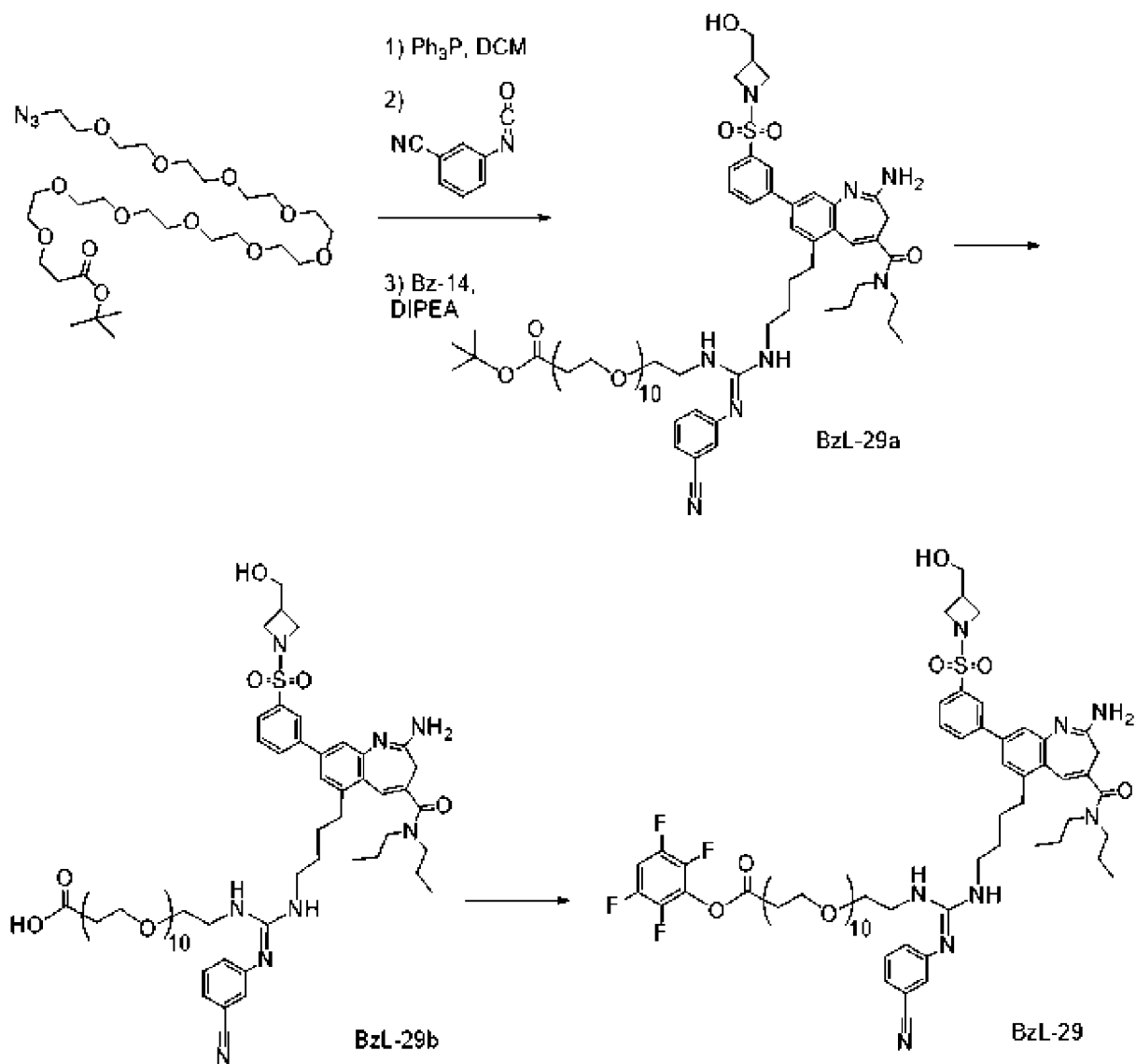
397,32 мкмоль, 2 экв) при 15 °С. Полученную смесь перемешивали при 15 °С в течение 12 часов. Реакционную смесь использовали непосредственно на следующей стадии, она содержала VzL-28i (0,22 г, неочищенного продукта) (в MeOH) в виде светло-желтой жидкости. ЖХ/МС [М+2Н/2] 540,79 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 541,1 (определено).

Синтез 1-(3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[б]азепин-8-ил)-5-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-2-метил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азапентатриаконтан-35-овой кислоты, VzL-28j

К раствору метил 1-(3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[б]азепин-8-ил)-5-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-2-метил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азапентатриаконтан-35-оата, VzL-28i (0,22 г, 203,64 мкмоль, 1 экв) в MeOH (2 мл) и H₂O (1 мл) добавляли LiOH·H₂O (68,36 мг, 1,63 ммоль, 8 экв) при 15 °С. Смесь перемешивали при 15 °С в течение 5 часов. ЖХ-МС показала что VzL-28i был израсходован. Реакционную смесь доводили до pH 6-7 с помощью 1 н HCl при 0 °С и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток дважды очищали препаративной ВЭЖХ (условия: ТФУ, колонка: Welch Xtimate C18 100×25 мм, 3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 20%-40%, 12 мин) с получением VzL-28j (104 мг, 94,31 мкмоль, выход 46,31%, HCl) в виде светло-желтого масла. ¹H ЯМР (MeOD-d₄, 400 МГц) δ 8,33 (с, 1H), 8,24 (с, 1H), 8,12 (с, 1H), 7,90-7,84 (м, 2H), 7,74 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,12 (с, 1H), 3,96-3,88 (м, 4H), 3,76-3,67 (м, 8H), 3,66-3,52 (м, 33H), 3,51-3,37 (м, 9H), 3,02 (с, 3H), 2,71-2,59 (м, 1H), 2,53 (т, J=6,0 Гц, 2H), 1,77-1,63 (м, 4H), 0,95 (уш с, 6H). ЖХ/МС [М+Н] 1066,56 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1066,10 (определено).

2,3,5,6-Тетрафторфенил 1-(3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[б]азепин-8-ил)-5-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-2-метил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азапентатриаконтан-35-оат, VzL-28 синтезировали путем реакции с 2,3,5,6-тетрафторфенолом в соответствии со способом, описанным для VzL-22. ЖХ/МС [М+Н] 1214,56 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1214,83 (определено).

Пример 51 Синтез VzL-29.



Синтез *трет*-бутил-(Z)-40-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[*b*]азепин-6-ил)-35-((3-цианофенил)имино)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаокса-34,36-дiazатетраконтаноата, BzL-29a

В сосуд объемом 4 мл помещали *трет*-бутил 1-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксатриаконтан-33-оат (0,011 ммоль, 6,9 мг), трифенилфосфин (0,011 ммоль, 3 мг) и 200 мкл безводного дихлорметана. Реакционную смесь выдерживали при 30°C в течение 90 минут, после чего добавляли 3-цианофенилизоцианат (0,011 ммоль, 1,6 мг). Через 45 мин добавляли раствор, содержащий Bz-14 (0,011 ммоль) и диизопропилэтиламин, основание Хунига (0,034 ммоль) в 200 мкл ДМФ. Реакционную смесь выдерживали в течение 2 ч затем концентрировали при пониженном давлении. Неочищенную смесь очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 4,1 мг BzL-29a с выходом 63%. ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 1293,71 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 1294,04 (определено).

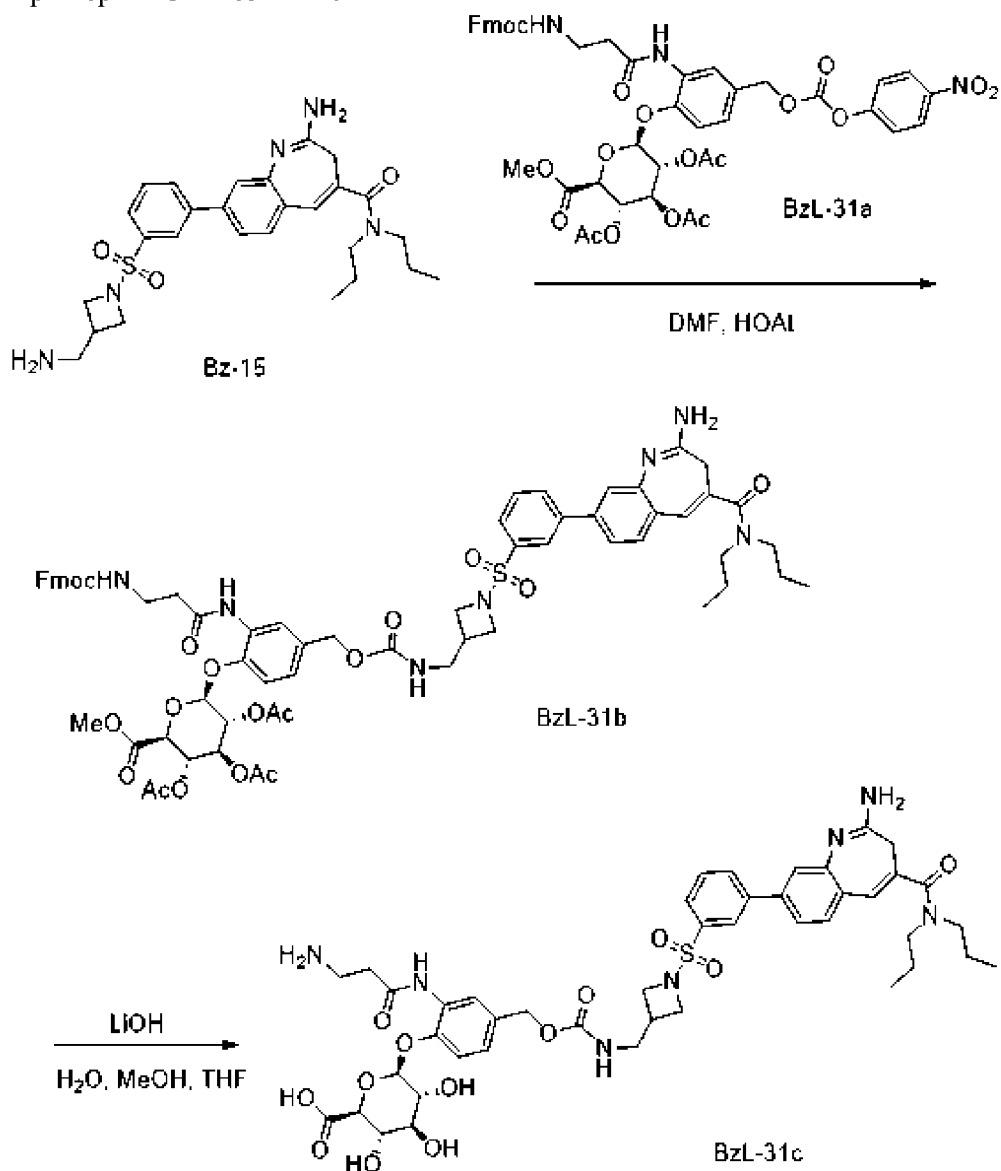
Синтез (Z)-40-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-

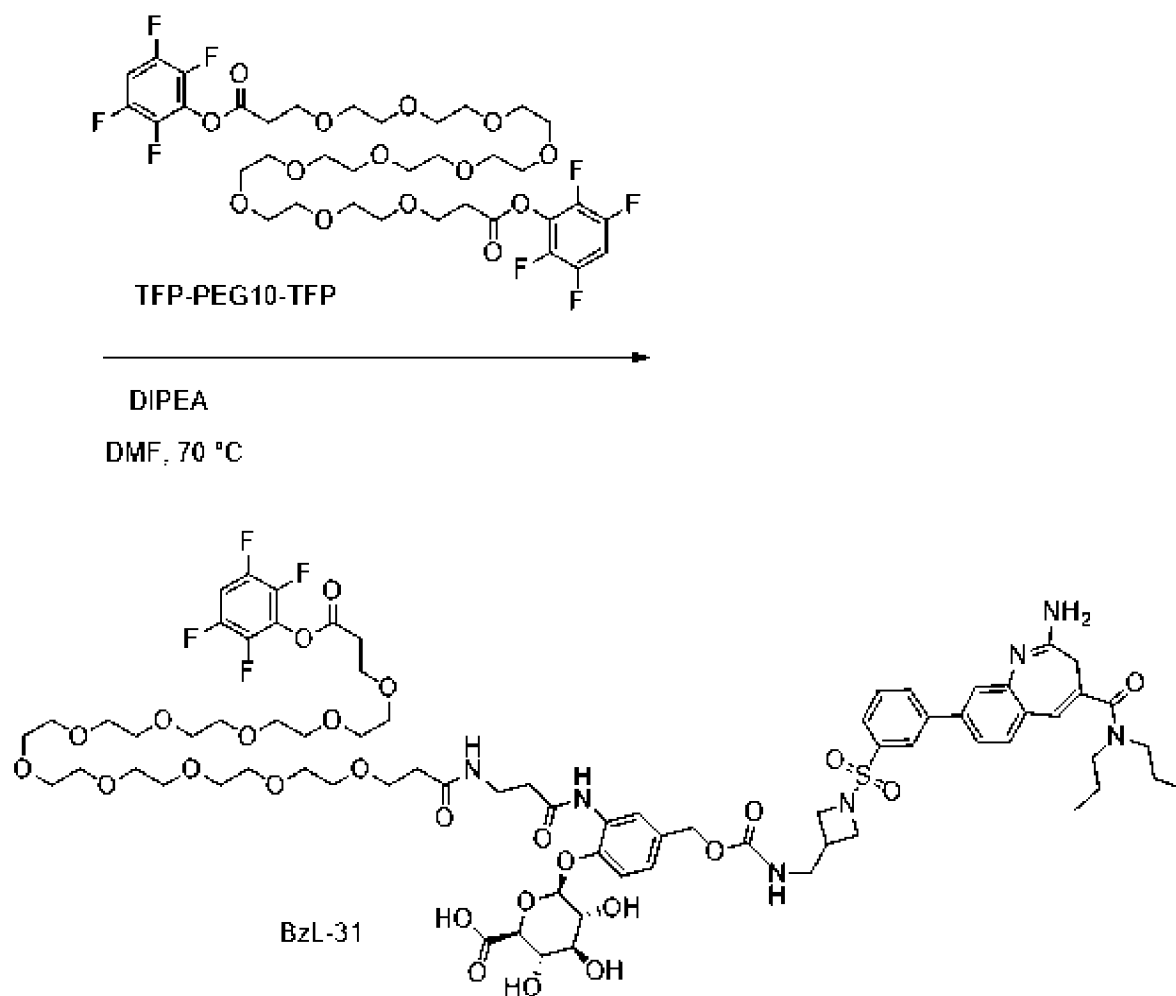
1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-6-ил)-35-((3-цианофенил)имино)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаокса-34,36-дiazатетрактановой кислоты, BzL-29b

В сосуд помещали BzL-29a (4,1 мг, 0,003 ммоль), 500 мкл ДХМ и 100 мкл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали в течение 1 ч, концентрировали при пониженном давлении и трижды азеотропировали с 1 мл толуола. Неочищенный продукт BzL-29b использовали на следующей стадии.

2,3,5,6-Тетрафторфенил (Z)-40-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-6-ил)-35-((3-цианофенил)имино)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаокса-34,36-дiazатетрактаноеат, BzL-29 синтезировали реакцией BzL-29b с 2,3,5,6-тетрафторфенолом в соответствии со способом, описанным для Bz-22. ЖХ/МС [M+H] 1385,64 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1385,84 (определено).

Пример 52 Синтез BzL-31





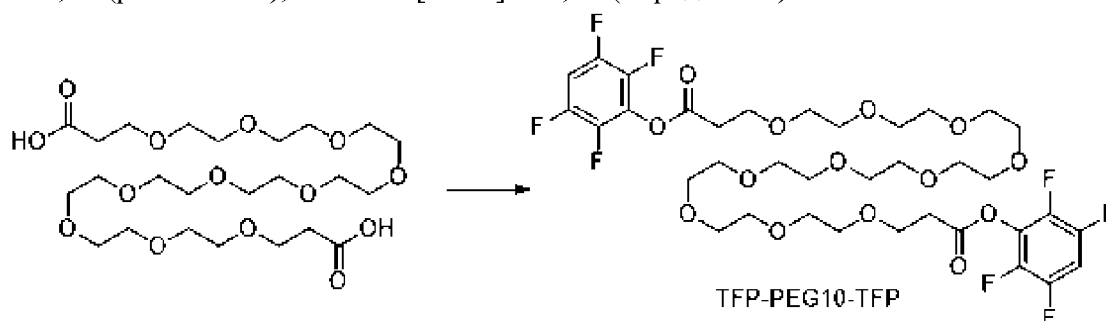
Синтез гас-(2R,3S,4R,5R,6R)-2-(2-(3-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)пропанамидо)-4-((((1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)карбамоил)окси)метил)фенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетата, BzL-31b

К раствору Bz-15 (50 мг, 0,098 ммоль, 1 экв) и гас-(2R,3S,4R,5R,6R)-2-(2-(3-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)пропанамидо)-4-((((4-нитрофенокси)карбонил)окси)метил)фенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетата, BzL-31a (90 мг, 0,098 ммоль, 1 экв) в ДМФ (0,2 мл) добавляли HOAt (13,3 мг, 0,098 ммоль, 1 экв). Реакцию перемешивали при температуре окружающей среды и контролировали с помощью ЖХМС. Реакционную смесь разбавляли смесью вода:ацетонитрил 1:1 и очищали ВЭЖХ с получением BzL-31b (67 мг, 0,052 ммоль, 53%). ЖХ/МС [M+H] 1284,48 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1284,81 (определено).

Синтез гас-(2R,3R,4R,5S,6R)-6-(4-((((1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)карбамоил)окси)метил)-2-(3-аминопропанамидо)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновой кислоты, BzL-31c

BzL-31b (67 мг, 0,052 ммоль, 1 экв) растворяли в 20 mM растворе LiOH в 5:2:1 ТГФ:MeOH:H₂O (2,6 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при

температуре окружающей среды, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением VzL-31с в виде белого твердого вещества (25 мг, 0,027 ммоль, 52%). ЖХ/МС [M+H] 922,37 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 922,56 (определено).

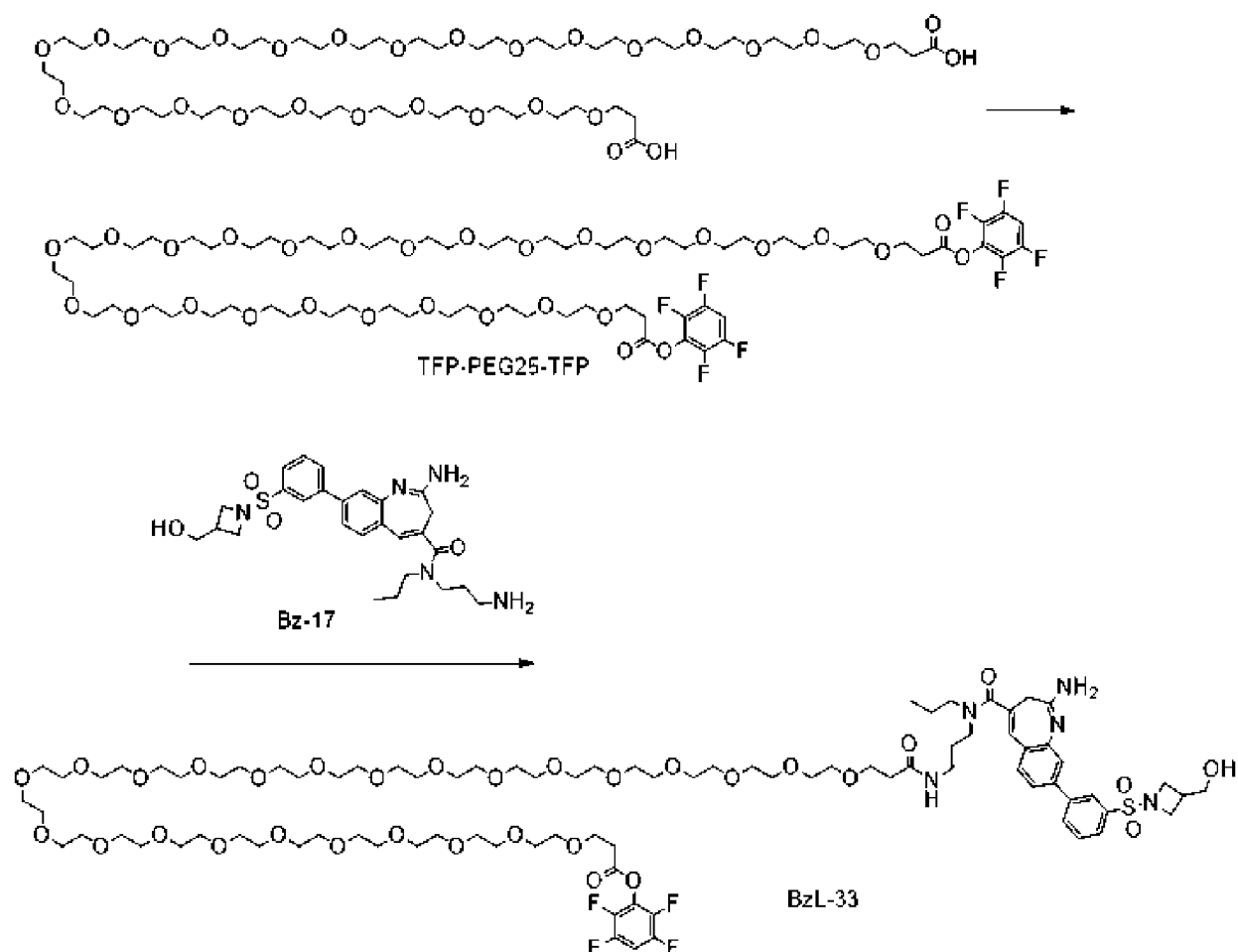


Бис(2,3,5,6-тетрафторфенил) 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31- декаоксатетратриаконтандиоат, ТФП-ПЭГ10-ТФП синтезировали из 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаоксатетратриаконтандиовой кислоты в соответствии со способом, описанным для TFP-PEG25-TFP. ЖХ/МС [M+H] 855,28 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 855,53 (определено).

Синтез гас-(2R,3R,4R,5S,6R)-6-(4-((((1-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[б]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)карбамоил)окси)метил)-2-(1,34-диоксо-1-(2,3,5,6-тетрафторфенокси)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаокса-35-азаоктатриаконтан-38-амидо)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновой кислоты, VzL-31

VzL-31с (25 мг, 0,027 ммоль, 1 экв) и TFP-PEG10-TFP бис(2,3,5,6-тетрафторфенил) 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаоксатетратриаконтандиоат (35 мг, 0,040 ммоль, 1,5 экв) растворяли в ДМФ (5 мл). Реакционную смесь нейтрализовали примерно до pH 7 с помощью DIPEA и нагревали до 70°C. Через 1 час другую порцию бис(2,3,5,6-тетрафторфенил) 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаоксатетратриаконтандиоата (35 мг, 0,040 ммоль, 1,5 экв) добавляли к реакционной смеси. После исчерпания VzL-31с реакционную смесь концентрировали до получения желтой пленки, затем растирали с диэтиловым эфиром 6 x 3 мл с получением твердого желтого вещества, которое очищали с помощью ВЭЖХ с получением VzL-31 (14,3 мг, 0,0089 ммоль, 33%). ЖХ/МС [M+H] 1610,64 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1610,99 (определено).

Пример 53 Синтез VzL-33

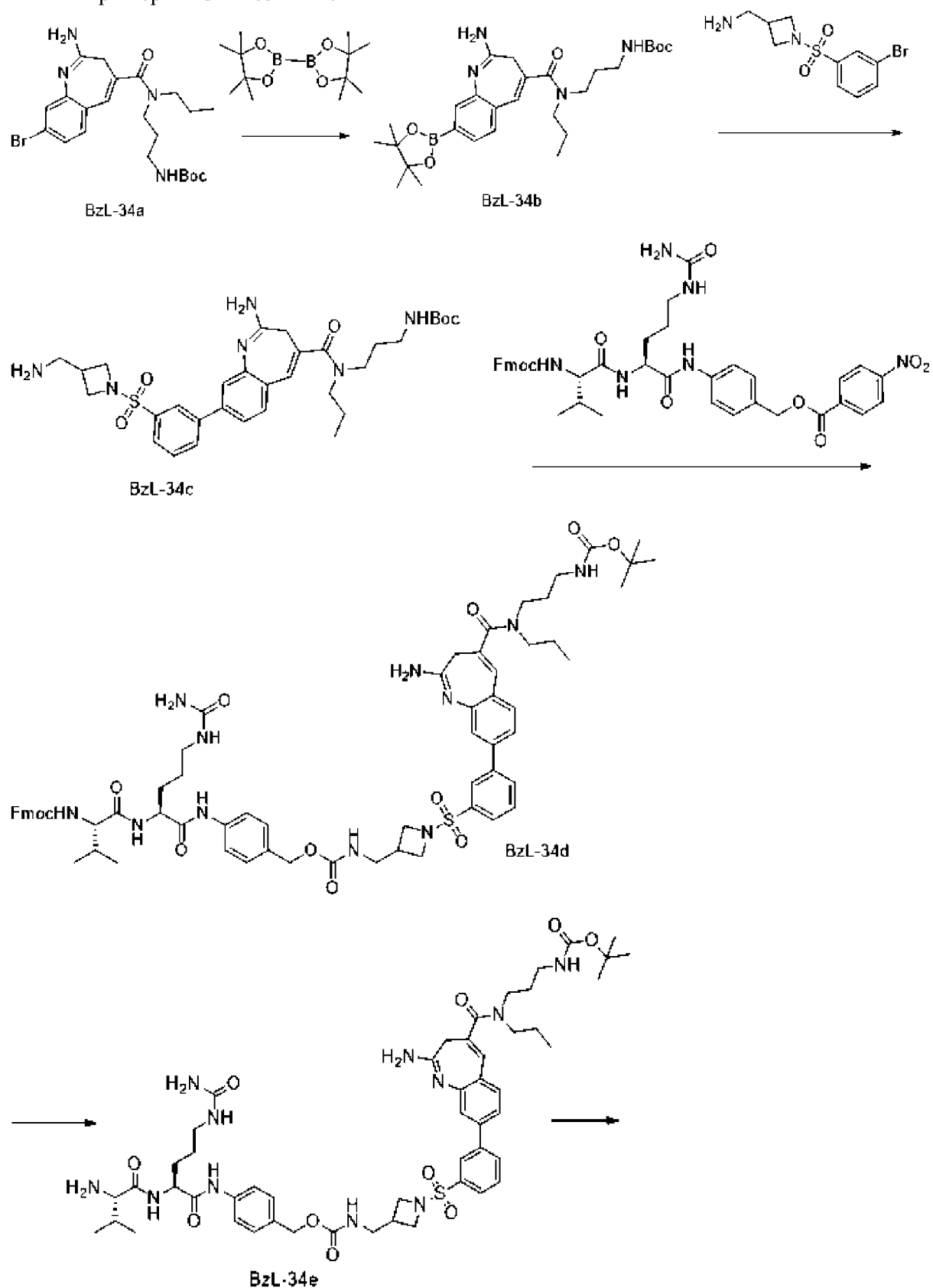


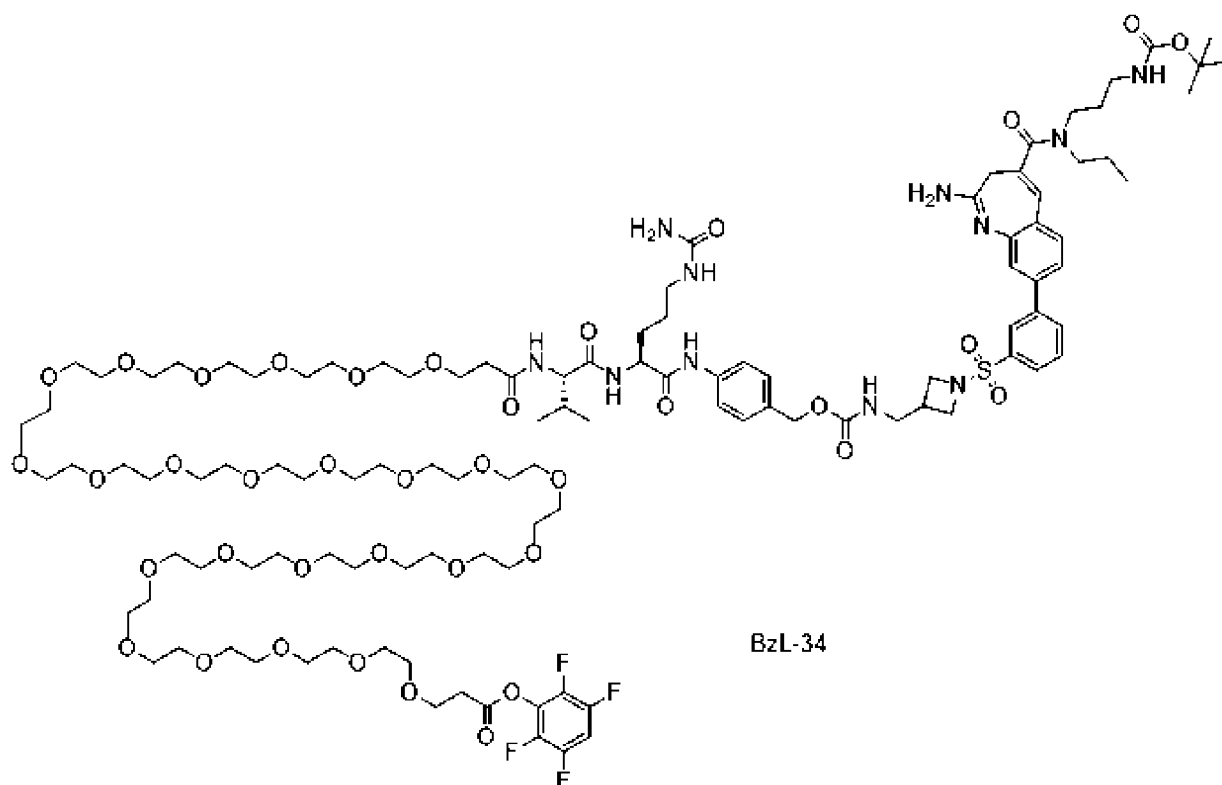
В сосуд помещали 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаоксанагептаконтандиовую кислоту (269 мг, 0,221 ммоль), 2,3,5,6-тетрафторфенол (110 мг, 0,662 ммоль), коллидин (176 мкл, 1,33 ммоль), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (127 мг, 0,221 ммоль) и 3 мл ДМФ. Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч, затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 266 мг бис(2,3,5,6-тетрафторфенил) 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаоксанагептаконтандиоата, TFP-PEG25-TFP с выходом 79%. ЖХ/МС [М+Н] 1515,68 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1516,00 (определено).

В сосуд помещали 2-амино-N-(3-аминопропил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3Н-1-бензазепин-4-карбоксамид, Bz-17 (0,0275 ммоль), TFP-PEG25-TFP (0,0275 ммоль), коллидин (0,0825 ммоль) в 300 мкл ДМФ. Реакционную смесь выдерживали в течение 5 часов и затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 8,2 мг 2,3,5,6-тетрафторфенил-84-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[б]азепин-4-карбонил)-79-

оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаокса-80,84-диазагептаоктаконтаноата, BzL-33 с выходом 25%. ЖХ/МС [M+H] 1874,9 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1874,9 (определено).

Пример 54 Синтез BzL-34





Получение BzL-34b: К смеси трет-бутил-N-[3-[(2-амино-8-бром-3H-1-бензазепин-4-карбонил)-пропил-амино]пропил]карбамата, BzL-34a (0,80 г, 1,67 ммоль, 1,0 экв) в диоксане (10 мл) добавляли 4,4,4',4',5,5,5',5'-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксаборолан), Pin_2B_2 (509 мг, 2,00 ммоль, 1,2 экв), KOAc (246 мг, 2,50 ммоль, 1,5 экв) и $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (122 мг, 167 мкмоль, 0,1 экв) одной порцией при 15 °С в атмосфере N_2 , а затем перемешивали при 90°С в течение 12 часов. Смесь фильтровали и концентрировали с получением трет-бутил-N-[3-[[2-амино-8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]пропил]карбамат, BzL-34b (0,90 г, сырой) в виде черного твердого вещества.

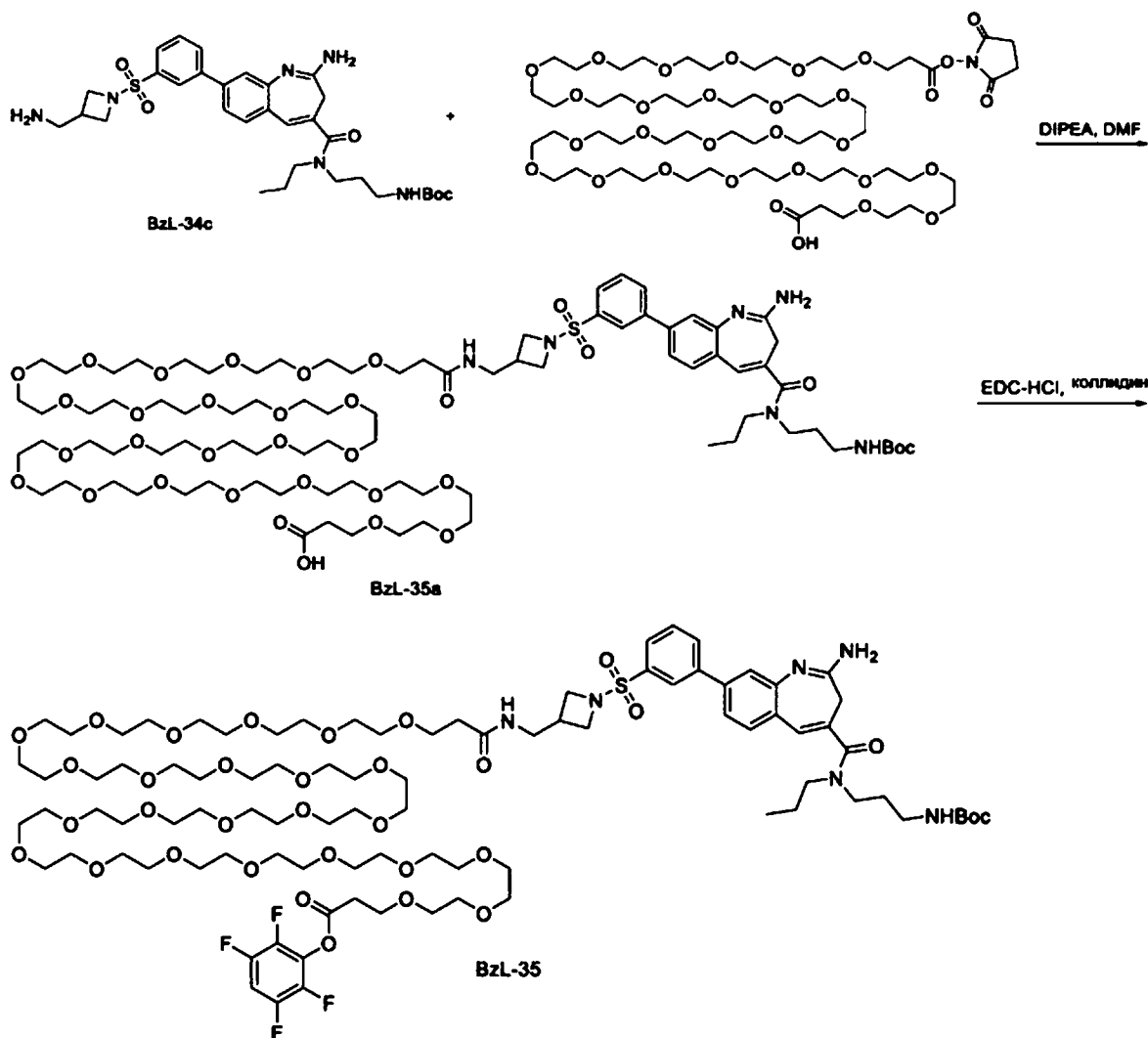
Получение BzL-34c: К смеси [1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]метанамина (0,40 г, 1,17 ммоль, 1 экв, HCl) и BzL-34b (493 мг, 937 мкмоль, 0,8 экв) в диоксане (4 мл) добавляли раствор K_2CO_3 (728 мг, 5,27 ммоль, 4,5 экв) в H_2O (0,4 мл) и $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (85,7 мг, 117 мкмоль, 0,1 экв) при 15°С в атмосфере N_2 и затем перемешивали при 90°С в течение 2 часов. Смесь фильтровали и концентрировали. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Welch Xtimate C18 100*25мм*3мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 20%-45%, 10,5 мин) с получением трет-бутил N-[3-[[2-амино-8-[3-[3-(аминометил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]пропил]карбамата, BzL-34c (0,223 г, 357 мкмоль, выход 30,5%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,14-8,07 (м, 2H), 7,92 (д, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,86-7,81 (м, 1H), 7,79-7,70 (м, 3H), 7,12 (с, 1H), 3,96 (т, $J=8,4$ Гц, 2H), 3,65 (дд, $J=5,2, 8,4$ Гц, 2H), 3,58-3,42 (м, 4H), 3,37 (с, 2H), 3,06 (д, $J=7,2$ Гц, 4H), 1,90-1,78 (м, 2H), 1,74-1,64 (м, 2H), 1,44 (с, 9H), 0,96-0,90 (м, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 625,3 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 625,0 (определено).

Получение VzL-34d: К смеси VzL-34c (0,18 г, 288 мкмоль, 1,0 экв) и [4-[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилбутаноил]амино]-5-уреидопентаноил]амино]фенил]метил(4-нитрофенил)карбоната (176,7 мг, 230 мкмоль, 0,8 экв) в ДМФ (2 мл) добавляли DIEA (74,5 мг, 576 мкмоль, 100 мкл, 2,0 экв) одной порцией при 15 °С. Смесь перемешивали при той же температуре в течение 0,5 часа. Затем смесь фильтровали и очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Welch Xtimate C18 150*25мм*5мкм; подвижная фаза: [вода (10 мМ NH₄НСО₃)-АЦН]; В%: 55%-75%, 10,5 мин) с получением [4-[(2S)-2-[[[(2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилбутаноил]амино]-5-уреидопентаноил]амино]фенил]метил-N-[[1-[3-[2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропил-пропил-карбамоил]-3H-1-бензазепин-8-ил]фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамата, VzL-34d (0,024 г, 19,16 мкмоль, выход 6,65%) в виде твердого желтого вещества. ¹H ЯМР (MeOH, 400 МГц) δ 8,04 (с, 1H), 7,95 (д, J=6,4 Гц, 1H), 7,81-7,79 (м, 3H), 7,73 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,65 (т, J=6,8 Гц, 2H), 7,54 (д, J=8,0 Гц, 2H), 7,48-7,43 (м, 2H), 7,41-7,33 (м, 3H), 7,32-7,27 (м, 2H), 7,20 (д, J=8,0 Гц, 2H), 6,91 (с, 1H), 4,59 (с, 2H), 4,52 (с, 1H), 4,42-4,32 (м, 2H), 4,24-4,17 (м, 1H), 3,95 (д, J=7,2 Гц, 1H), 3,86-3,77 (м, 2H), 3,58-3,47 (м, 4H), 3,46-3,39 (м, 2H), 3,19-3,02 (м, 6H), 2,62 (д, J=7,6 Гц, 1H), 2,13-2,01 (м, 1H), 1,97-1,80 (м, 3H), 1,66 (с, 3H), 1,57 (с, 2H), 1,49-1,28 (м, 8H), 1,00-0,95 (м, 10H). ЖХ/МС [M+H] 1252,6 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1252,2 (определено).

Приготовление VzL-34e: В сосуд помещали Vz-34d (20 мг, 0,016 ммоль), диэтиламин (0,08 ммоль) и 150 мкл ДМФ. Реакцию поддерживали в течение 6 ч, затем концентрировали при пониженном давлении с получением 4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил((1-((3-(2-амино-4-((3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропил)(пропил)карбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)карбамат, VzL-34e, который использовали на последующей стадии без дополнительной очистки.

Получение VzL-34: Используя способы, описанные для VzL-33, получали 2,3,5,6-тетрафторфенил (6S,9S)-1-амино-6-((4-((((1-((3-(2-амино-4-((3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропил)(пропил)карбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)метил)карбамоил)окси)метил)фенил)карбамоил)-9-изопропил-1,8,11-триоксо-14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86-пентакозаокса-2,7,10-триазанонаоктаконтан-89-оат, VzL-34. ЖХ/МС [M+H] 2379,2 (рассчитано); ЖХ/МС [M+2H/2] 1190,1 (определено).

Пример 55 Синтез VzL-35

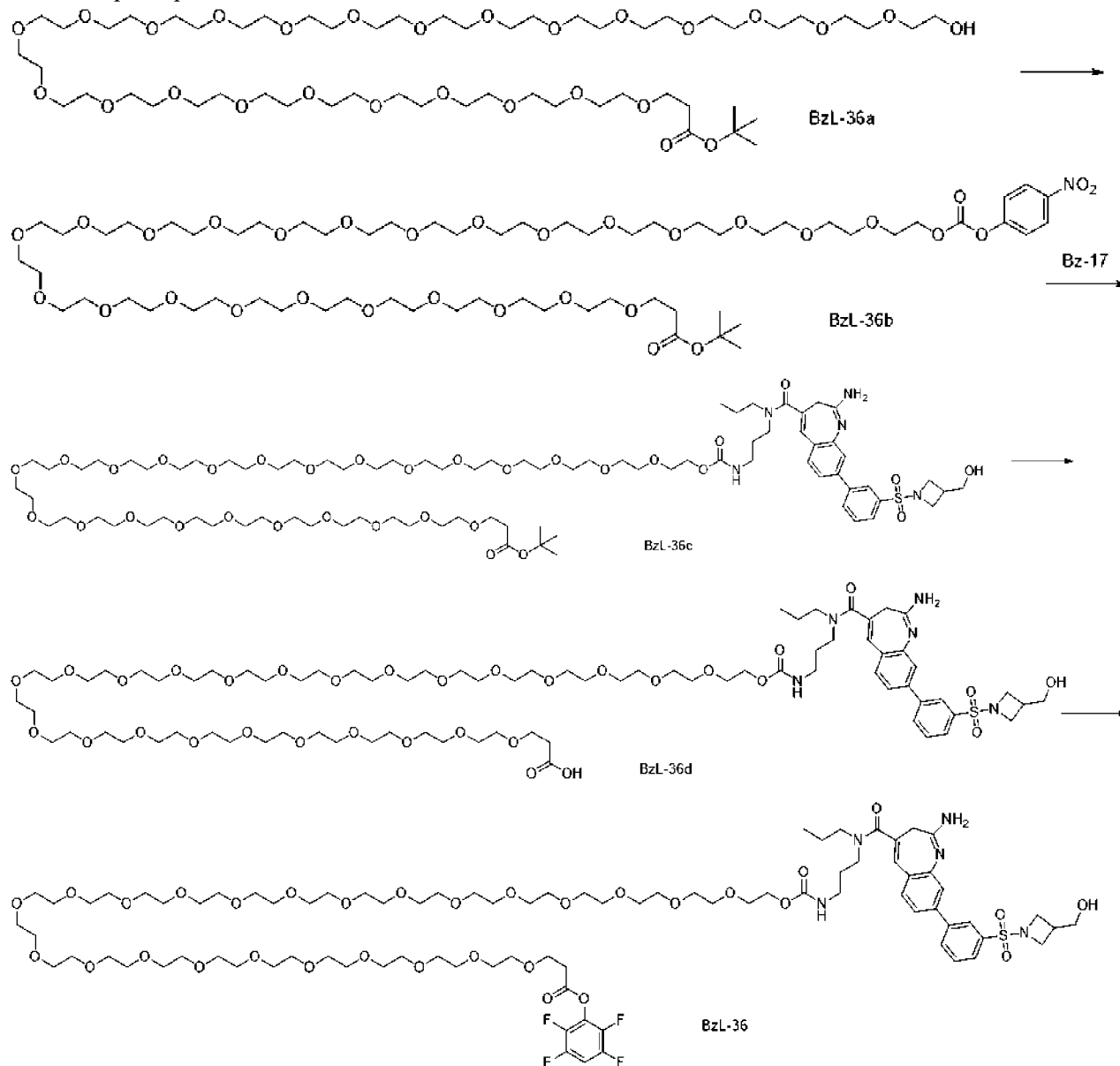


Получение BzL-35a: *трет*-Бутил-(3-(2-амино-8-(3-((3-(аминометил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамат, BzL-34c (0,04 г, 0,064 ммоль, 1 экв) и 79-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-79-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаоксанагептаконтановую кислоту (0,084 мг, 0,064 ммоль, 1 экв) растворяли в ДМФ с диизопропилэтиламином (0,033 мл, 0,192 ммоль, 3 экв). Реакцию контролировали с помощью ЖХМС и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 1-(1-((3-(2-амино-4-((3-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)пропил)(пропил)карбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)-3-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-пентакозокса-2-азахеноконтан-81-овой кислоты, BzL-35a (0,056, 0,031 ммоль, 48%). ЖХ/МС [M+H] 1825,99 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1826,24 (определено).

Получение BzL-35: BzL-35a (0,060 г, 0,033 ммоль, 1 экв) и 2,3,5,6-тетрафторфенол, TFP (0,011 г, 0,065 ммоль, 2 экв) растворяли в 1 мл ДМФ. Добавляли коллидин, 2,4,6-триметилпиридин (0,022 мл, 0,16 ммоль, 5 экв), после чего добавляли гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида, EDC-HCl, CAS Reg. № 25952-53-8 (0,019 г,

0,098 ммоль, 3 экв). Реакцию перемешивали при комнатной температуре и контролировали с помощью ЖХМС, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2,3,5,6-тетрафторфенил 1-(1-(((3-(2-амино-4-(((3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропил)(пропил)карбамоил)-3Н-бензо[*b*]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)-3-оксо-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78-пентакозаокса-2-азахеноконтан-81-оата, VzL-35 (0,027 г, 0,014 ммоль, 42%). ЖХ/МС [М+Н] 1973,98 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1974,62 (определено).

Пример 56 Синтез VzL-36:



Получение VzL-36b: В сосуд помещали трет-бутил 1-гидрокси-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтан-75-оат, VzL-36a (148 мг, 0,123 ммоль), диизопропилэтиламин (0,369 ммоль) и 0,6 мл безводного ДМФ. Сосуд охлаждали до 0 °С, затем порциями добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (0,123 ммоль). Реакционную смесь

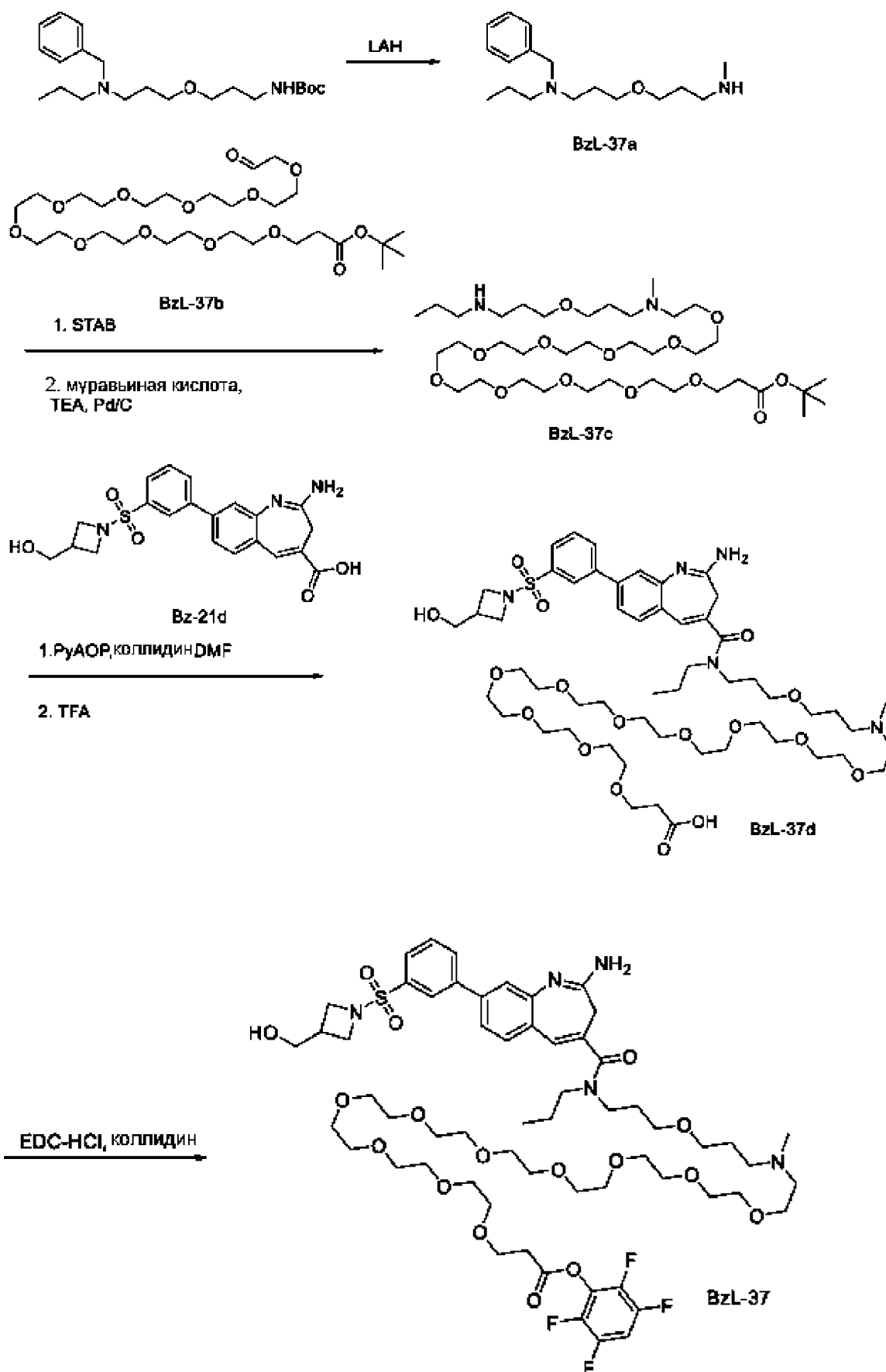
нагревали до комнатной температуры и выдерживали в течение 3 ч, затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 42,5 мг трет-бутил-1-(4-нитрофеноксид)-1-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74-пентакозаоксагептаконтан-77-оата, VzL-36b. ЖХ/МС [М+Н] 1368,7 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1368,7 (определено).

Получение VzL-36c: В сосуд помещали Vz-17 (0,0275 ммоль), VzL-36b (0,0275 ммоль), НОАТ (0,02 ммоль), диизопропилэтиламин (0,0825 ммоль), 250 мкл ДХМ и 250 мкл ДМФ. Реакционную смесь выдерживали до тех пор, пока весь исходный материал не был израсходован, контролировали с помощью ЖХМС. Неочищенную реакционную смесь очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 22,5 мг трет-бутил-82-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[*b*]азепин-4-карбонил)-77-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаокса-78,82-диазапентаоктаконтан-оата, VzL-36c. ЖХ/МС [М+Н] 1754,9 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1754,9 (определено).

Получение VzL-36d: В сосуд помещали VzL-36c (0,0128 ммоль), 1 мл ДХМ и 0,2 мл трифторуксусной кислоты. Реакционную смесь выдерживали в течение 3 ч, затем концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток трижды азеотропировали с толуолом с получением 82-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[*b*]азепин-4-карбонил)-77-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаокса-78,82-диазапентаоктаконтановой кислоты, VzL-36d, которую сразу использовали на следующей стадии.

Приготовление VzL-36: В сосуд помещали VzL-36d (8,9 мг, 0,005 ммоль), 2,3,5,6-тетрафторфенол (1,8 мг, 0,011 ммоль), коллидин (2,2 мкл, 0,016 ммоль), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (1 мг, 0,005 ммоль) и 100 мкл ДМФ. Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч, затем очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ с использованием градиента ацетонитрил:вода, 25-75%, содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 6,3 мг 2,3,5,6-тетрафторфенил-82-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[*b*]азепин-4-карбонил)-77-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозокса-78,82-диазапентаоктаконтан-оата, VzL-36. ЖХ/МС [М+Н] 1846,9 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1846,9 (определено).

Пример 57 Синтез VzL-37



Получение BzL-37a: *tert*-бутил-(3-(3-(бензил(пропил)амино)пропокси)пропил)карбамат (0,032 г, 0,088 ммоль, 1 экв) растворяли

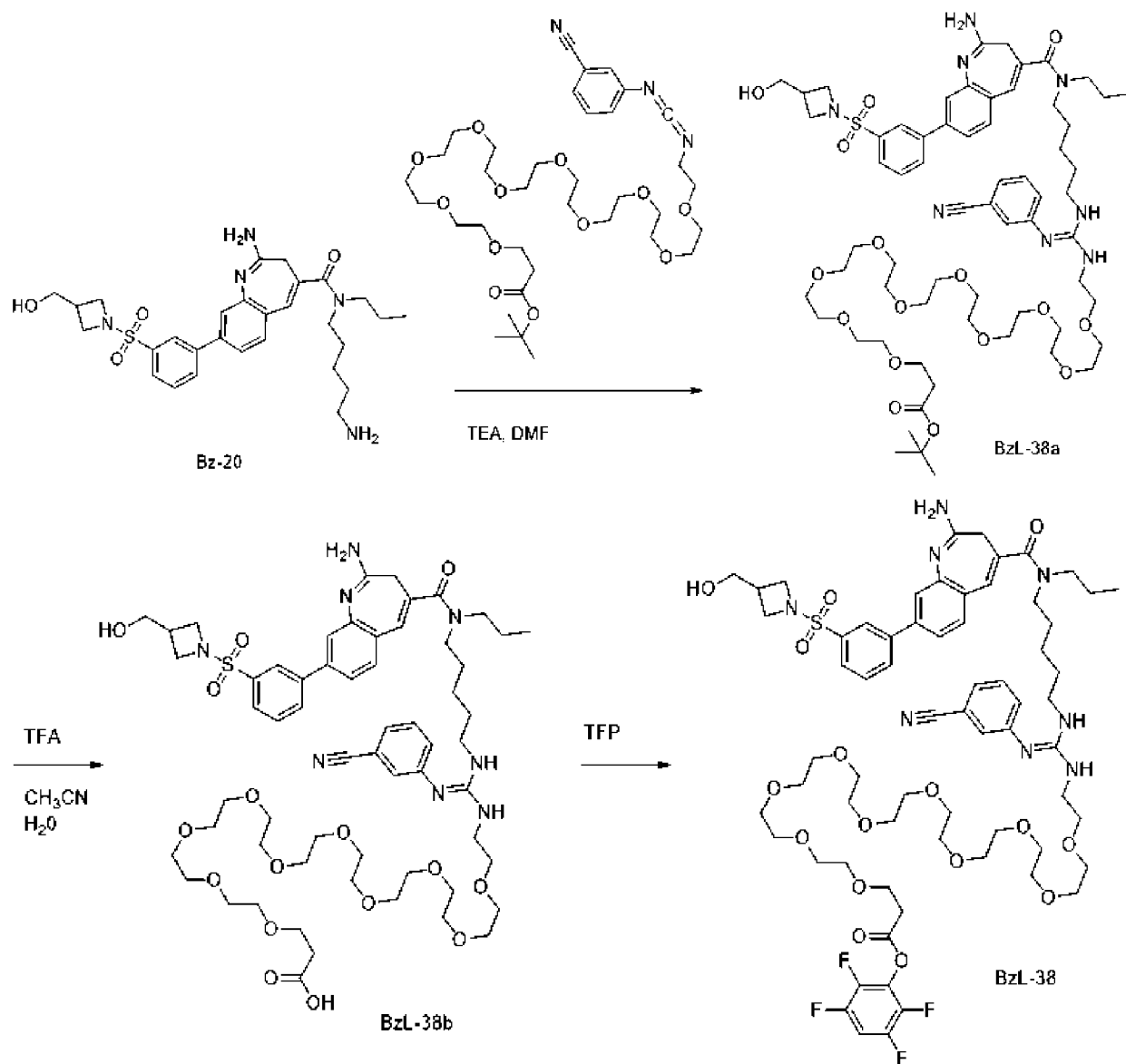
в ТГФ. Добавляли алюмогидрид лития (0,01 г, 0,26 ммоль, 3 экв) и реакционную смесь нагревали до 60°C. Реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением N-бензил-3-(3-(метиламино)пропокси)-N-пропилпропан-1-амин, VzL-37a (0,01 г, 0,036 ммоль, 41%). ЖХ/МС [М+Н] 279,24 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 279,33 (определено).

Получение VzL-37c: VzL-37a (0,01 г, 0,036 ммоль, 1 экв) и *трет*-бутил-1-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксатриаконтан-33-оат, VzL-37b (0,02 г, 0,036 ммоль, 1 экв) растворяли в ДХМ. Добавляли триацетоксиборгидрид натрия, СТАВ (0,022 г, 0,11 ммоль, 3 экв), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Раствор концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ. Очищенный продукт смешивали с триэтиламином в среде метанола. Добавляли муравьиную кислоту, затем 10 мас.% Pd/C, и реакционную смесь нагревали до 60°C. По исчерпанию исходного материала реакционную смесь фильтровали и концентрировали с получением *трет*-бутил-34-метил-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,38-ундекаокса-34,42-диазапентатетраконтан-оат, VzL-37c (0,007 г, 0,0092 ммоль, 26%). ЖХ/МС [М+Н] 757,74 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 757,85 (определено).

Получение VzL-37d: 2-Амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[b]азепин-4-карбоновой кислоты, Vz-21d (0,0040 г, 0,0092 ммоль, 1 экв), VzL-37c (0,007 г, 0,0092 ммоль, 1 экв) и коллидин (0,004 мл, 0,028 ммоль, 3 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли РuАОР (0,0072 г, 0,014 ммоль, 1,5 экв), и смесь перемешивали при комнатной температуре. По завершении реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ. Выделенный продукт концентрировали, растворяли в минимальном количестве ТФУ и оставляли при комнатной температуре на 15 минут. Затем раствор концентрировали и очищали ОФ-ВЭЖХ с получением 42-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[b]азепин-4-карбонил)-34-метил-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,38-ундекаокса-34,42-диазапентатетраконтановой кислоты, VzL-37d (0,004 г, 0,0036 ммоль, 39%). ЖХ/МС [М+Н] 1110,59 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1110,93 (определено).

Получение VzL-37: VzL-37d (0,004 г, 0,0036 ммоль, 1 экв) и TFP (0,0033 г, 0,018 ммоль, 5 экв) растворяли в 1 мл ДМФ. Добавляли коллидин (0,005 мл, 0,036 ммоль, 10 экв), а затем EDC-HCl (0,0035 г, 0,018 ммоль, 5 экв). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и контролировали с помощью ЖХМС, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2,3,5,6-тетрафторфенил-42-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[b]азепин-4-карбонил)-34-метил-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,38-ундекаокса-34,42-диазапентатетраконтан-оата, VzL-37 (0,0016 г, 0,0013 ммоль, 35%). ЖХ/МС [М+Н] 1258,58 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1258,96 (определено).

Пример 58 Синтез VzL-38

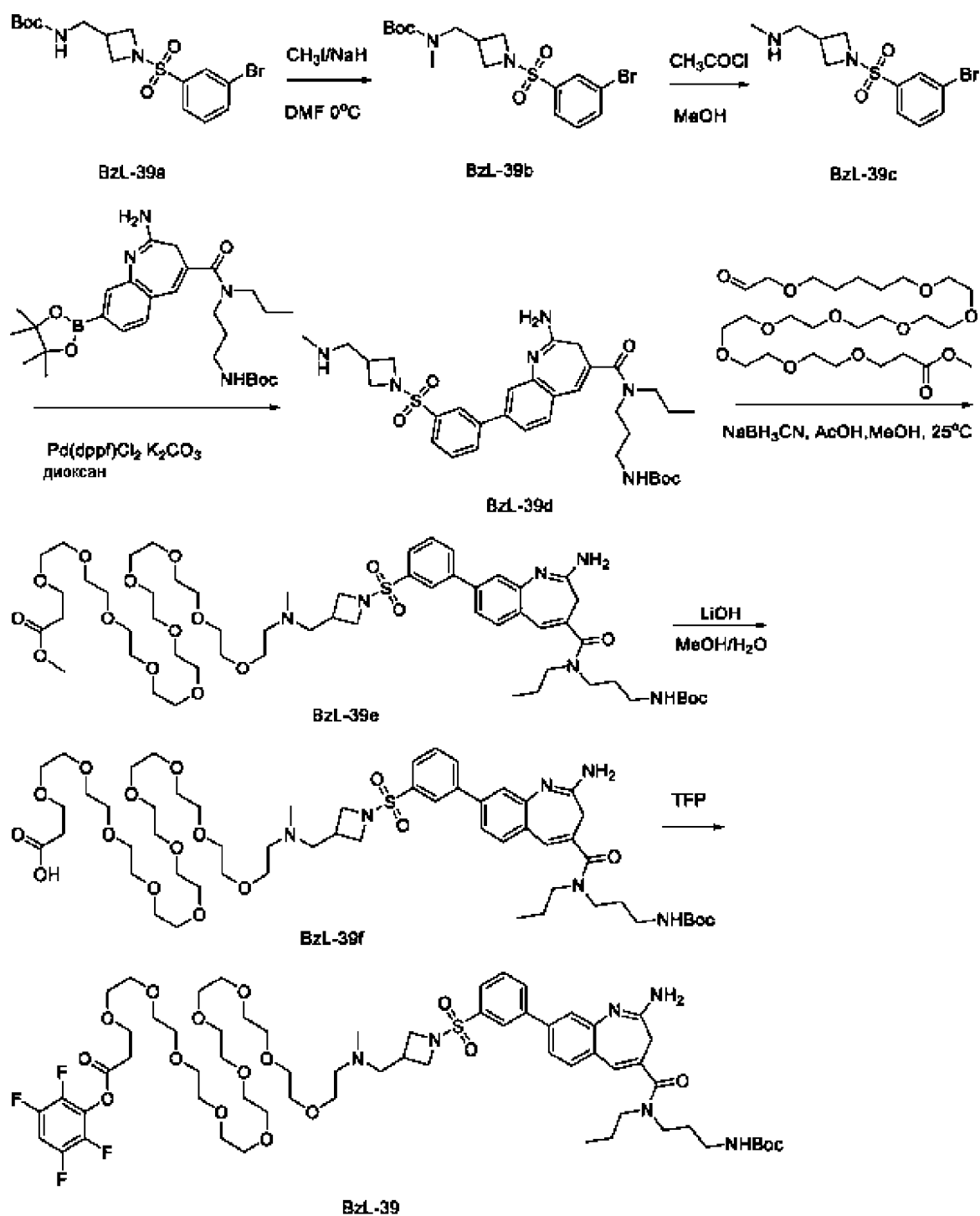


Получение BzL-38a: Соединение получали с использованием тех же способов, которые описаны для синтеза BzL-42. ЖХ/МС [M+H] 1265,7 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1265,7 (определено).

Получение BzL-38b: Соединение получали с использованием того же способа, который описан для синтеза BzL-42. ЖХ/МС [M+H] 1209,6 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1209,6 (определено).

Получение BzL-38: Соединение получали с использованием того же способа, который описан для синтеза BzL-42. ЖХ/МС [M+H] 1357,6 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1357,6 (определено).

Пример 59 Синтез BzL-39



Получение BzL-39b: К раствору трет-бутил-N-[[1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамата, BzL-39a (1,0 г, 2,47 ммоль, 1,0 экв) в ДМФ (10 мл) порциями добавляли гидрид натрия, NaH (148 мг, 3,70 ммоль, чистота 60%, 1,5 экв) и перемешивали при 0°C в течение 0,5 часа. Затем добавляли метилйодид CH₃I (1,05 г, 7,40 ммоль, 461 мкл, 3,0 экв) и перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Реакцию гасили водой и экстрагировали EtOAc (30 мл x 3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением трет-бутил-N-[[1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]метил]-N-метилкарбамата, BzL-

39b (1,3 г, сырой) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 7,99 (т, J=2,0 Гц, 1H), 7,80-7,75 (м, 2H), 7,47 (т, J=8,0 Гц, 1H), 3,85 (т, J=7,6 Гц, 2H), 3,57 (т, J=7,2 Гц, 2H), 3,29 (д, J=7,2 Гц, 2H), 2,75 (с, 3H), 2,74-2,70 (м, 1H), 1,43 (с, 9H), 1,26 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Получение **BzL-39c**: К раствору **BzL-39b** (1,3 г, 3,10 ммоль, 1,0 экв) в MeOH (20 мл) добавляли ацетилхлорид (1,22 г, 15,5 ммоль, 1,11 мл, 5,0 экв) при 25°C и перемешивали при 50°C в течение 1 часа. Затем смесь концентрировали с получением 1-[1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]-N-метилметанамина, **BzL-39c** (1 г, неочищенного прдукта) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,00-7,98 (м, 1H), 7,93 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,84 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,64-7,59 (м, 1H), 3,94 (т, J=8,4 Гц, 2H), 3,64 (дд, J=5,6, 8,4 Гц, 2H), 3,14 (д, J=7,6 Гц, 2H), 2,84-2,77 (м, 1H), 2,66 (с, 3H).

Получение BzL-39d: К смеси трет-бутил N-[3-[[2-амино-8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]пропил]карбамат (0,44 г, 835 мкмоль, 1,0 экв) и Bzl-39с (357 мг, 1,00 ммоль, 1,2 экв, HCl) в диоксане (4 мл) и H₂O (0,5 мл) добавляли Pd(dppf)Cl₂ (30,6 мг, 41,79 мкмоль, 0,05 экв) и K₂CO₃ (231,0 мг, 1,67 ммоль, 2,0 экв) при 15°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 90°C в течение 3 часов. Реакционную смесь охлаждали до 15°C и фильтровали. Фильтрат выливали в воду со льдом (30 мл) и перемешивали в течение 5 мин. Водную фазу экстрагировали этилацетатом (20 мл x 3) и объединенную органическую фазу промывали рассолом (20 мл), сушили безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; флэш-колонка с силикагелем SepaFlash® 40 г, элюент этилацетат/петролейный эфир к EtOAc/MeOH=3/1, градиент 0~100% @ 60 мл/мин) с получением трет-бутил-N-[3-[[2-амино-8-[3-[3-(метиламинометил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]пропил]карбамата BzL-39d (0,32 г, 500,92 мкмоль, выход 59,94%) в виде твердого желтого вещества.

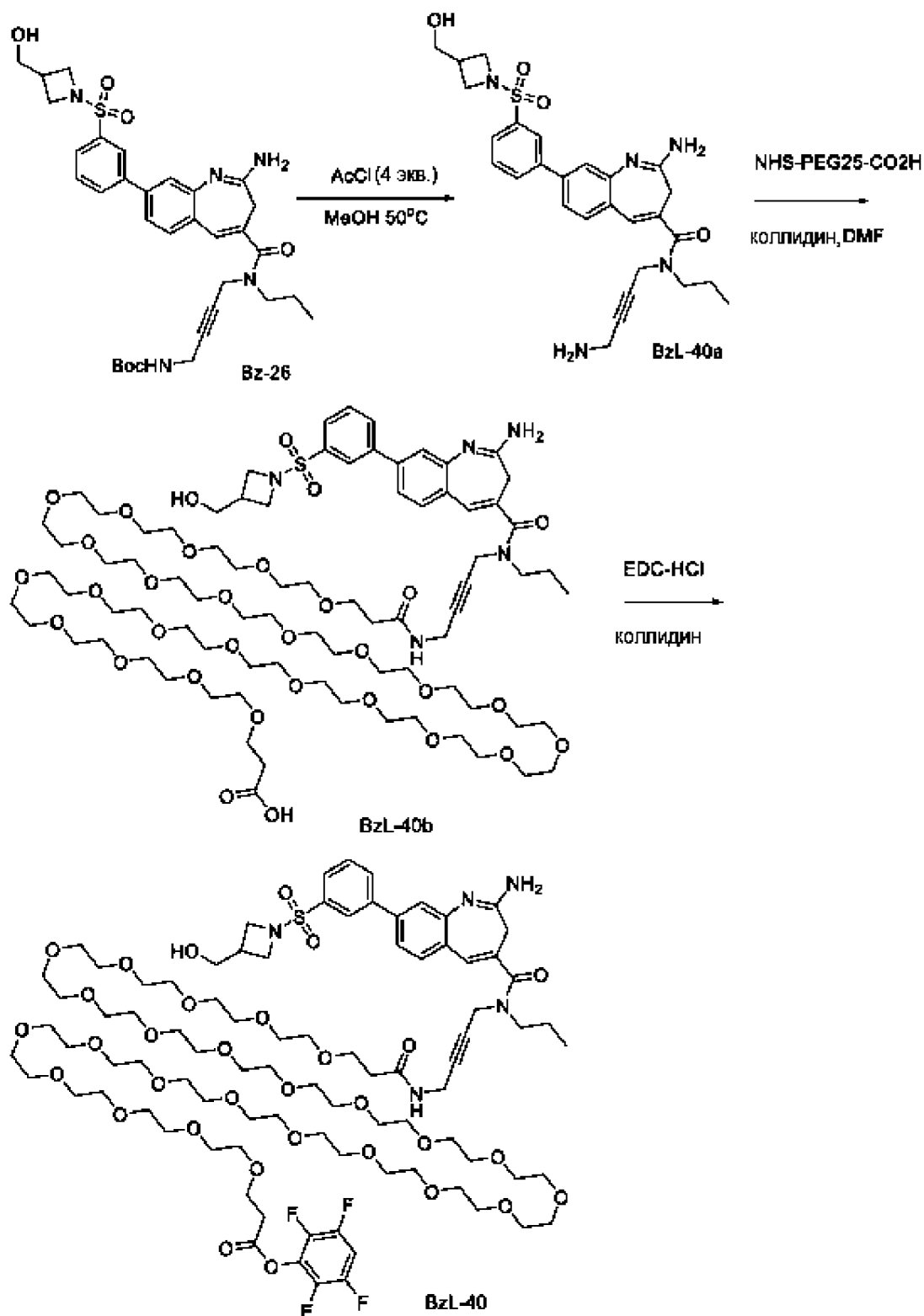
[illegible]

Получение BzL-39f: К смеси BzL-39e (0,36 г, 308 мкмоль, 1,0 экв) в MeOH (20 мл) добавляли раствор гидрата гидроксида лития, LiOH·H₂O (130 мг, 3,09 ммоль, 10,0 экв.) в H₂O (2 мл) при 25°C и затем перемешивали при 25°C в течение 18 часов. Реакционную

смесь гасили водным HCl (4 M) до pH=7 и концентрировали при 40°C. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонок: Welch Xtimate C18 100*25 мм*3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ) - АЦН]; В%: 20%-40%, 12 мин) с получением 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[1-[3-[2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропил-пропил-карбамоил]-3Н-1-бензазепин-8-ил]фенил]сульфонилазетидин-3-ил]метил-метил-амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропановая кислота, VzL-39f (56 мг, 48,64 мкмоль, выход 16%) в виде светло-желтого масла. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,19-8,03 (м, 2H), 7,97-7,88 (м, 1H), 7,88-7,82 (м, 1H), 7,82-7,76 (м, 2H), 7,73-7,71 (м, 1H), 7,13 (с, 1H), 4,02 (т, J=8,0 Гц, 2H), 3,79 (т, J=4,8 Гц, 2H), 3,75-3,68 (м, 4H), 3,64-3,45 (м, 42H), 3,38 (с, 2H), 3,17-2,94 (м, 4H), 2,86 (с, 3H), 2,53 (т, J=6,4 Гц, 2H), 1,89-1,80 (м, 2H), 1,75-1,63 (м, 2H), 1,47-1,42 (м, 9H), 1,02-0,86 (м, 3H). ЖХ/МС [M+H] 1151,61 (рассчитано); ЖХ/МС [M+2H/2] 576,5 (определено).

Получение VzL-39. VzL-39f (0,056 г, 0,049 ммоль, 1 экв) и TFP (0,040 г, 0,24 ммоль, 5 экв) растворяли в 2 мл ДМФ. Добавляли коллидин (0,064 мл, 0,49 ммоль, 10 экв), а затем EDC-HCl (0,047 г, 0,24 ммоль, 5 экв). Реакцию перемешивали при комнатной температуре и контролировали с помощью ЖХМС, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2,3,5,6-тетрафторфенил-1-(1-((3-(2-амино-4-((3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропил)(пропил)карбамоил)-3Н-бензо[b]азепин-8-ил)фенил)сульфонил)азетидин-3-ил)-2-метил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азапентатриаконтан-35-оата, VzL-39 (0,027 г, 0,021 ммоль, 42%). ЖХ/МС [M+H] 1299,61 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1300,00 (определено).

Пример 60 Синтез VzL-40



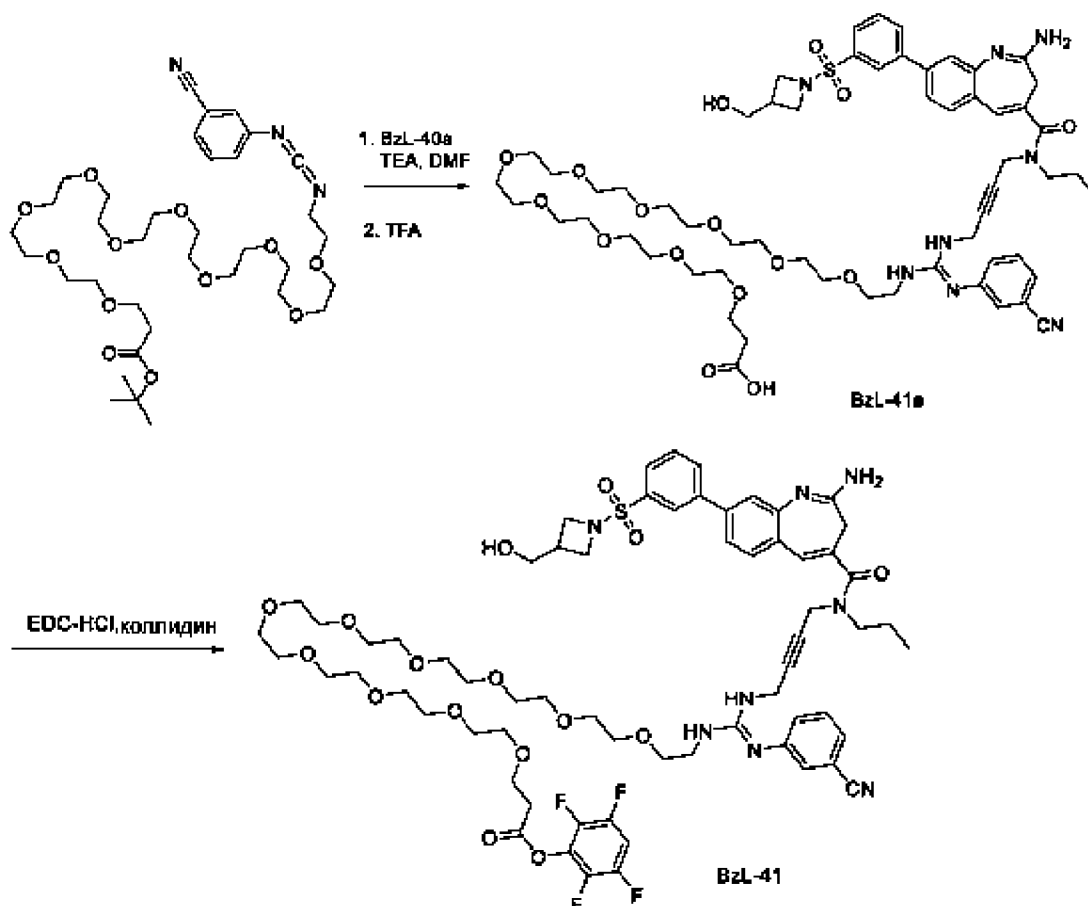
Получение BzL-40a: К смеси трет-бутил N-[4-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]бут-2-инил]карбамата, Bz-26 (800 мг, 1,26 ммоль, 1,0 экв) в MeOH (20 мл) добавляли ацетилхлорид (395 мг, 5,03 ммоль, 360 мкл, 4,0 экв) при 25°C в атмосфере N₂ и затем перемешивали при 50°C в течение 1 часа. Смесь гасили твердым NaHCO₃ до pH ~8, затем фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ

(колонка: Phenomenex Luna C18 200*40мм*10мкм; подвижная фаза: [вода (10 мМ NH_4HCO_3)-АЦН]; В%: 10%-40%, 10 мин) с получением 2-амино-N-(4-аминобут-2-инил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамидА, VzL-40a (220 мг, 411 мкмоль, выход 32,6%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD , 400 МГц) δ 8,12-8,01 (м, 2H), 7,90-7,82 (м, 1H), 7,80-7,72 (м, 1H), 7,56-7,47 (м, 2H), 7,44-7,38 (м, 1H), 7,15 (с, 1H), 4,32 (с, 2H), 3,86 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,69-3,47 (м, 6H), 3,41 (д, $J=6,4$ Гц, 2H), 2,64-2,51 (м, 1H), 1,84-1,63 (м, 2H), 0,99-0,91 (м, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 536,2 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 536,3 (определено).

Получение VzL-40b: VzL-40a (0,045 г, 0,084 ммоль, 1 экв) и 79-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-79-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаоксанонагептаконтановой кислоты, NHS-PEG25- CO_2H (0,11 г, 0,084 ммоль, 1 экв) растворяли в ДМФ, а затем в коллидине (0,054 мл, 0,42 ммоль, 5 экв). Реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ с получением 85-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбонил)-79-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаокса-80,85-диазаоктаоктаконт-82-иновая кислота, VzL-40b (0,1 г, 0,0058 ммоль, 69%). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 1736,90 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 1737,32 (определено).

Получение VzL-40: VzL-40b (0,1 г, 0,0058 ммоль, 1 экв) и TFP (0,014 г, 0,086 ммоль, 1,5 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли коллидин (0,038 мл, 0,29 ммоль, 5 экв), после чего EDC-HCl (0,022 г, 0,115 ммоль, 2 экв). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и контролировали с помощью ЖХМС, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2,3,5,6-тетрафторфенил-85-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбонил)-79-оксо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаокса-80,85-диазаоктаоктаконт-82-иноата, VzL-40 (0,014 г, 0,0076 ммоль, 13%). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 1884,90 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 1885,44 (определено).

Пример 61 Синтез VzL-41

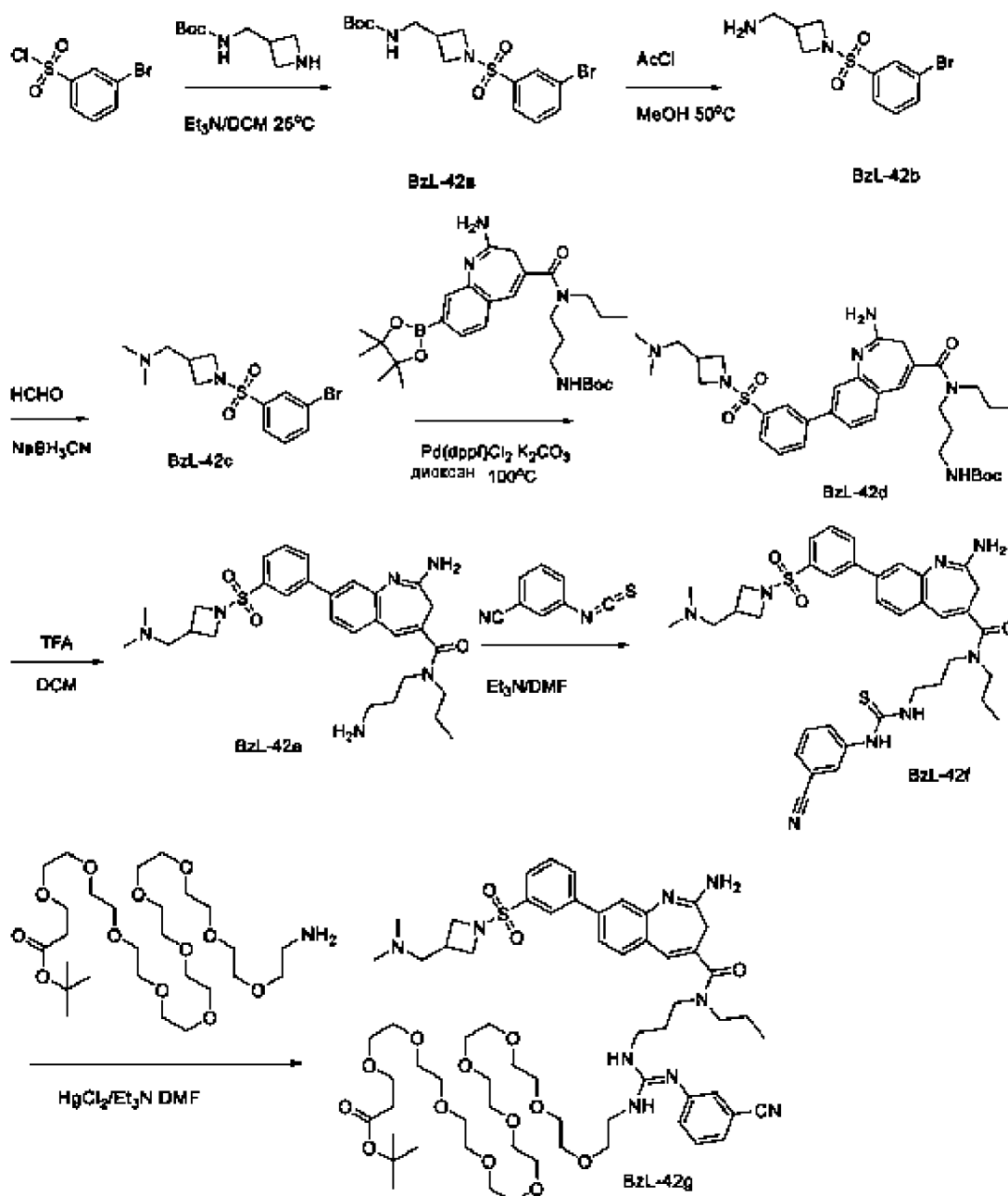


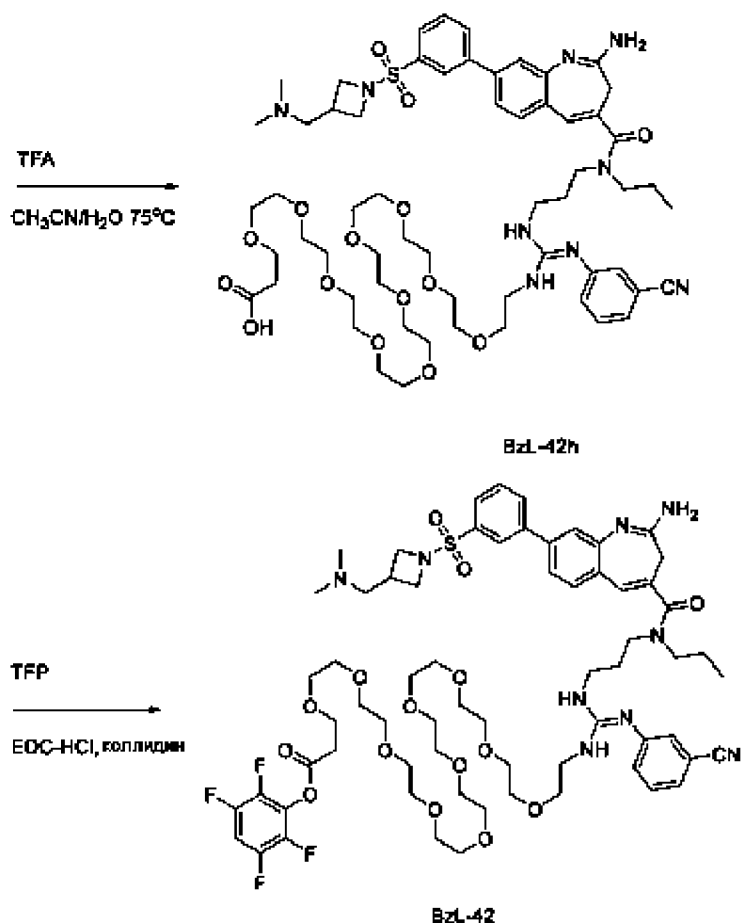
Получение BzL-41a: 2-Амино-N-(4-аминобут-2-ин-1-ил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамид, BzL-40a (0,05 г, 0,093 ммоль, 1 экв) и *трет*-бутил-1-((3-цианофенил)имино)-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азапентатриаконт-1-ен-35-оат (0,066 г, 0,093 ммоль, 1 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли триэтиламин (0,05 мл, 0,36 ммоль, 3,8 экв), и реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды. После исчерпания исходного аминного материала реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ. Выделенный продукт трет-бутилового эфира растворяли в минимальном количестве ТФУ в течение 10 минут, затем концентрировали с получением 41-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбонил)-35-((3-цианофенил)имино)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаокса-34,36,41-триазатетраокт-38-иновой кислоты, BzL-41a (0,05 г, 0,042 ммоль, 45%). ЖХ/МС [M+H] 1191,56 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1192,00 (определено).

Получение BzL-41: BzL-41a (0,05 г, 0,042 ммоль, 1 экв) и TFP (0,01 г, 0,063 ммоль, 1,5 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли коллидин (0,028 мл, 0,21 ммоль, 5 экв.), затем EDC-HCl (0,016 г, 0,084 ммоль, 2 экв). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и контролировали с помощью ЖХМС, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2,3,5,6-тетрафторфенил 41-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбонил)-35-((3-

цианопенил)имино)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаокса-34,36,41-триазатетратетраокт-38-иноата, BzL-41 (0,019 г, 0,014 ммоль, 35%). ЖХ/МС [M+H] 1339,56 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1340,04 (определено).

Пример 62 Синтез BzL-42





Получение BzL-42a: К смеси 3-бромбензолсульфонилхлорида (8,23 г, 32,2 ммоль, 4,65 мл, 1,0 экв) и трет-бутил-N-(азетидин-3-илметил)карбамата (6,0 г, 32,2 ммоль, 1,0 экв) в ДХМ (100 мл) добавляли Et₃N (6,52 г, 64,4 ммоль, 8,97 мл, 2,0 экв) при 0°C и затем перемешивали при этой температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали EtOAc (50 мл × 3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением трет-бутил-N-[[1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]метил]карбамата, BzL-42a (12 г, неочищенного продукта) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 7,99 (т, J=1,6 Гц, 1H), 7,78 (м, 2H), 7,47 (т, J=8,0 Гц, 1H), 4,63 (с, 1H), 3,85 (т, J=8,0 Гц, 2H), 3,54 (дд, J=5,6, 8,0 Гц, 2H), 3,21-3,16 (м, 2H), 2,67-2,62 (м, 1H), 1,42 (с, 9H). ЖХ/МС [M+Na] 427,0 (рассчитано); ЖХ/МС [M+Na] 427,0 (определено).

Получение BzL-42b: К смеси BzL-42a (2 г, 4,93 ммоль, 1,0 экв) в MeOH (30 мл) добавляли ацетилхлорид (1,94 г, 24,67 ммоль, 1,76 мл, 5,0 экв) при 25°C и затем перемешивали при этой температуре в течение 2 часов. Смесь концентрировали с получением [1-(3-бромфенил)сульфонилазетидин-3-ил]метанамина, BzL-42b (1,5 г, неочищенного продукта) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 7,99 (т, J=1,6 Гц, 1H), 7,93 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,84 (д, J=7,2 Гц, 1H), 7,62 (т, J=8,0 Гц, 1H), 3,93 (т, J=8,4 Гц, 2H), 3,61 (м, 2H), 3,06-3,03 (м, 2H), 2,78-2,66 (м, 1H).

Получение BzL-42c: К смеси BzL-42b (4,0 г, 13,1 ммоль, 1,0 экв) в MeOH (40 мл)

добавляли Et₃N (1,99 г, 19,7 ммоль, 2,74 мл, 1,5 экв), формальдегид (4,25 г, 52,4 ммоль, 3,90 мл, чистота 37%, 4,0 экв) и NaBH₃CN (1,65 г, 26,2 ммоль, 2,0 экв) при 25°C и перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Смесь разбавляли водой и экстрагировали EtOAc (30 мл × 3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, EtOAc (1,5% NH₃·H₂O): MeOH=1/0, 1/1) с получением 1-[1-(3-бромфенил)сульфониазетидин-3-ил]-N, N-диметилметанамина, VzL-42c (1,6 г, 4,80 ммоль, выход 36,6%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,01 (т, J=1,6 Гц, 1H), 7,96-7,91 (м, 1H), 7,86 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,66-7,60 (м, 1H), 3,98-3,90 (м, 2H), 3,47 (дд, J=6,0, 8,4 Гц, 2H), 2,74-2,60 (м, 1H), 2,28 (д, J=7,6 Гц, 2H), 2,15 (с, 6H). ЖХ/МС [M+H] 333,0 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 333,0 (определено).

Получение VzL-42d: К смеси VzL-42c (299 мг, 898 мкмоль, 1,1 экв) и трет-бутил N-[3-[[2-амино-8-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]пропил]карбамата (0,43 г, 817 мкмоль, 1,0 экв) в диоксане (10 мл), H₂O (1 мл) добавляли K₂CO₃ (395 мг, 2,86 ммоль, 3,5 экв), Pd(dppf)Cl₂ (29,9 мг, 40,8 мкмоль, 0,05 экв) при 25°C в атмосфере N₂ и затем перемешивали при 100°C в течение 2 часов. Смесь фильтровали, разбавляли водой и экстрагировали EtOAc (30 мл × 3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=1/0, 0/1) с получением трет-бутил-N-[3-[[2-амино-8-[3-[3-[(диметиламино)метил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]пропил]карбамата, VzL-42d (0,3 г, 459 мкмоль, выход 56,3%) в виде твердого желтого вещества.

Получение VzL-42e: К смеси VzL-42d (0,25 г, 383 мкмоль, 1,0 экв) в ДХМ (2 мл) добавляли ТФУ (1,31 г, 11,5 ммоль, 851 мкл, 30,0 экв) одной порцией при 25°C и затем перемешивали в течение 1 часа. Смесь концентрировали с получением 2-амино-N-(3-аминопропил)-8-[3-[3-[(диметиламино)метил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамид, VzL-42e (0,2 г, неочищенного продукта) в виде желтого масла.

Получение VzL-42f: К смеси VzL-42e (0,2 г, 362 мкмоль, 1,0 экв) в ДМФ (0,5 мл) добавляли Et₃N (256 мг, 2,53 ммоль, 353 мкл, 7,0 экв) и 3-изотиоцианатобензонитрил (52,2 мг, 326 мкмоль, 0,9 экв) при 25°C и затем перемешивали при этой температуре в течение 1 часа. Смесь фильтровали и фильтрат очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Welch Xtimate C18 100*25мм*3мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 10%-40%, 12мин) с получением 2-амино-N-[3-[(3-цианофенил)карбамотиоиламино]пропил]-8-[3-[3-[(диметиламино)метил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамид, VzL-42f (0,18 г, 252 мкмоль, выход 69,8%) в виде твердого желтого вещества. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,12-8,06 (м, 2H), 7,92-7,02 (м, 10H), 4,01 (т, J=8,4 Гц, 2H), 3,76-3,40 (м, 8H), 3,40-3,36 (м, 2H), 3,34-3,32 (м, 2H), 3,03-2,91 (м, 1H), 2,82 (с,

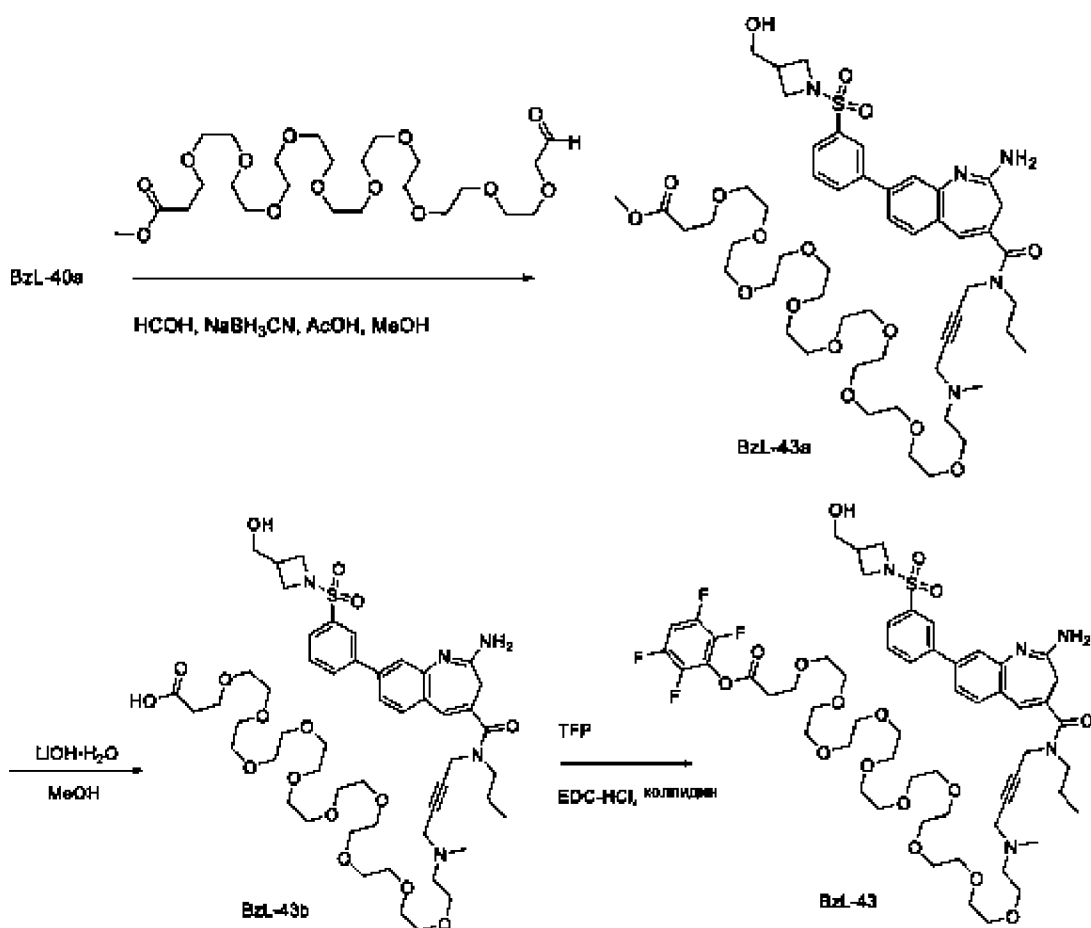
6H), 2,04 (с, 2H), 1,77-1,67 (м, 2H), 0,97 (с, 3H).

Получение VzL-42g: К смеси VzL-42f (0,14 г, 196 мкмоль, 1,0 экв) и трет-бутил-3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноат а (138 мг, 236 мкмоль, 1,2 экв) в ДМФ (0,5 мл) добавляли Et₃N (40,0 мг, 393 мкмоль, 2,0 экв) и HgCl₂ (64,0 мг, 236 мкмоль, 1,2 экв) при 25°C и затем перемешивали в течение 18 ч при этой температуре. Смесь фильтровали и фильтрат очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil C18 100*30мм 8мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 15%-45%, 10мин) с получением трет-бутил-3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(Z)-N-[3-[[2-амино-8-[3-[3-[(диметиламино)метил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]пропил]-N'-(3-цианофенил)карбамимидоил]амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата, VzL-42g (0,14 г, 111 мкмоль, выход 56,4%) в виде желтого масла.

Получение VzL-42h: К раствору VzL-42g (0,12 г, 94,9 мкмоль, 1,0 экв) в H₂O (2 мл) и CH₃CN (0,5 мл) добавляли ТФУ (325 мг, 2,85 ммоль, 211 мкл, 30,0 экв) при 25°C и затем перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Смесь концентрировали в вакууме с получением остатка, остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Xtimate C18 100*30 мм*3мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 5%- 35%, 10мин) с получением 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(Z)-N-[3-[[2-амино-8-[3-[3-[(диметиламино)метил]азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]пропил]-N'-(3-цианофенил)карбамимидоил]амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропановой кислоты, VzL-42h (32 мг, 26,5 мкмоль, выход 27,9%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,16-8,09 (м, 2H), 7,93 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,87-7,81 (м, 1H), 7,81-7,74 (м, 3H), 7,66-7,62 (м, 4H), 7,12 (с, 1H), 4,01 (т, J=8,4 Гц, 2H), 3,80-3,66 (м, 10H), 3,66-3,45 (м, 40H), 3,40 (с, 3H), 2,82 (с, 6H), 2,53 (т, J=6,4 Гц, 2H), 2,07-2,01 (м, 1H), 1,77-1,67 (м, 2H), 0,98-0,90 (м, 3H). ЖХ/МС [М+Н] 1208,6 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1208,6 (определено).

Получение VzL-42: VzL-42h (0,032 г, 0,026 ммоль, 1 экв) и TFP (0,009 г, 0,05 ммоль, 2 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли коллидин (0,017 мл, 0,13 ммоль, 5 экв), затем EDC-НСl (0,015 г, 0,079 ммоль, 3 экв). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и контролировали с помощью ЖХМС, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2,3,5,6-тетрафторфенил-40-(2-амино-8-(3-((3-((диметиламино)метил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбонил)-35-((3-цианофенил)имино)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаокса-34,36,40-триазатритетраконтаноат (0,018 г, 0,013 ммоль, 49%). ЖХ/МС [М+Н] 1356,62 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1357,10 (определено).

Пример 63 Синтез VzL-43



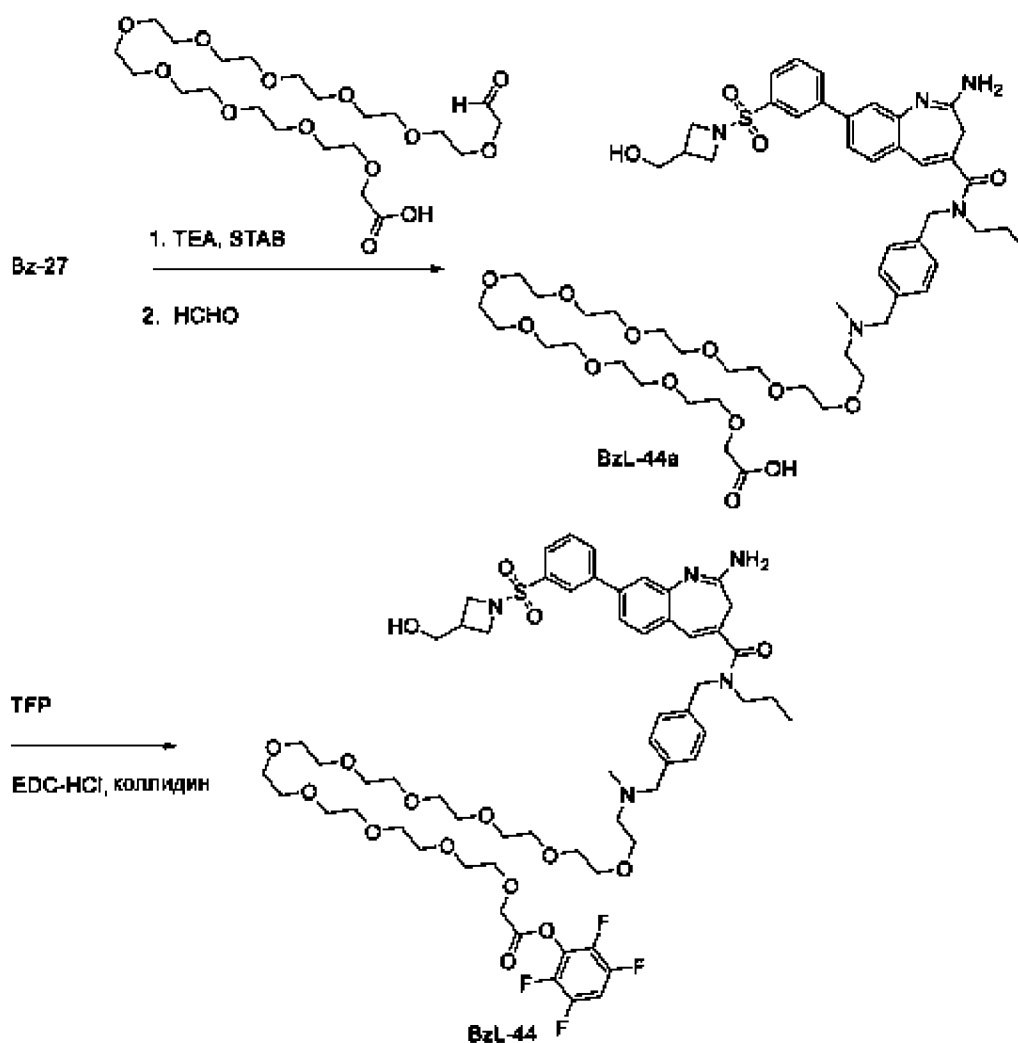
Получение BzL-43a: К смеси 2-амино-N-(4-аминобут-2-инил)-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамида, BzL-40a (0,1 г, 187 мкмоль, 1,0 экв) и метил 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-оксоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата (101,3 мг, 187 мкмоль, 1,0 экв) в MeOH (10 мл) добавляли AcOH (11,2 мг, 187 мкмоль, 11 мкл, 1,0 экв) и NaBH_3CN (35,2 мг, 560 мкмоль, 3,0 экв) одной порцией при 25°C и затем перемешивали в течение 2 часов. Затем добавляли формальдегид (29,5 мг, 373 мкмоль, 27 мкл, 2,0 экв) и перемешивали в течение 1 часа при той же температуре. В смесь добавляли несколько капель воды и концентрировали. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Xtimate C18 100*30мм*3мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 10%-35%, 10мин) с получением метил-3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]бут-2-инил-метил-амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата, BzL-43a (0,05 г, 46,46 мкмоль, выход 24,88%) в виде бесцветного масла.

Получение BzL-43b: К раствору BzL-43a (50 мг, 46,5 мкмоль, 1,0 экв) в MeOH (3,0 мл) и H_2O (0,3 мл) добавляли $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (19,5 мг, 465 мкмоль, 10,0 экв) одной порцией

при 25°C и перемешивали при той же температуре в течение 16 часов. Смесь охлаждали до 0 °C, доводили pH до 7 с помощью водн. HCl(1M) и концентрировали при пониженном давлении при 40 °C. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil C18 100*30мм 8мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ)-АЦН]; В%: 10%-40%, 10мин) с получением 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[[2-амино-8-[3-[3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил]сульфонилфенил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]бут-2-инил-метил-амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропановой кислоты, VzL-43b (30 мг, 28,24 мкмоль, выход 60,79%) в виде светло-желтого масла. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,15-8,07 (м, 2H), 7,93 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,86-7,76 (м, 3H), 7,74-7,69 (м, 1H), 7,24 (с, 1H), 4,29 (с, 2H), 3,91-3,84 (м, 4H), 3,74-3,55 (м, 43H), 3,52-3,38 (м, 7H), 3,34-3,32 (м, 2H), 3,02 (с, 3H), 2,64-2,56 (м, 1H), 2,53 (т, J=6,4 Гц, 2H), 1,85-1,72 (м, 2H), 0,98 (т, J=7,2 Гц, 3H). ЖХ/МС [М+Н] 1062,5 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1062,6 (определено).

Получение Vz-43: VzL-43b (0,03 г, 0,028 ммоль, 1 экв) и TFP (0,009 г, 0,06 ммоль, 2 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли коллидин (0,019 мл, 0,14 ммоль, 5 экв), затем EDC-HCl (0,016 г, 0,085 ммоль, 3 экв). Реакцию перемешивали при комнатной температуре и контролировали с помощью ЖХМС, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2,3,5,6-тетрафторфенил-38-(2-амино-8-(3-((3-((диметиламино)метил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-3Н-бензо[b]азепин-4-карбонил)-33-метил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаокса-33,38-диазагентетраоконт-35-иноата, VzL-43 (0,016 г, 0,013 ммоль, 46%). ЖХ/МС [М+Н] 1210,53 (рассчитано); ЖХ/МС [М+Н] 1210,95 (определено).

Пример 64 Синтез VzL-44

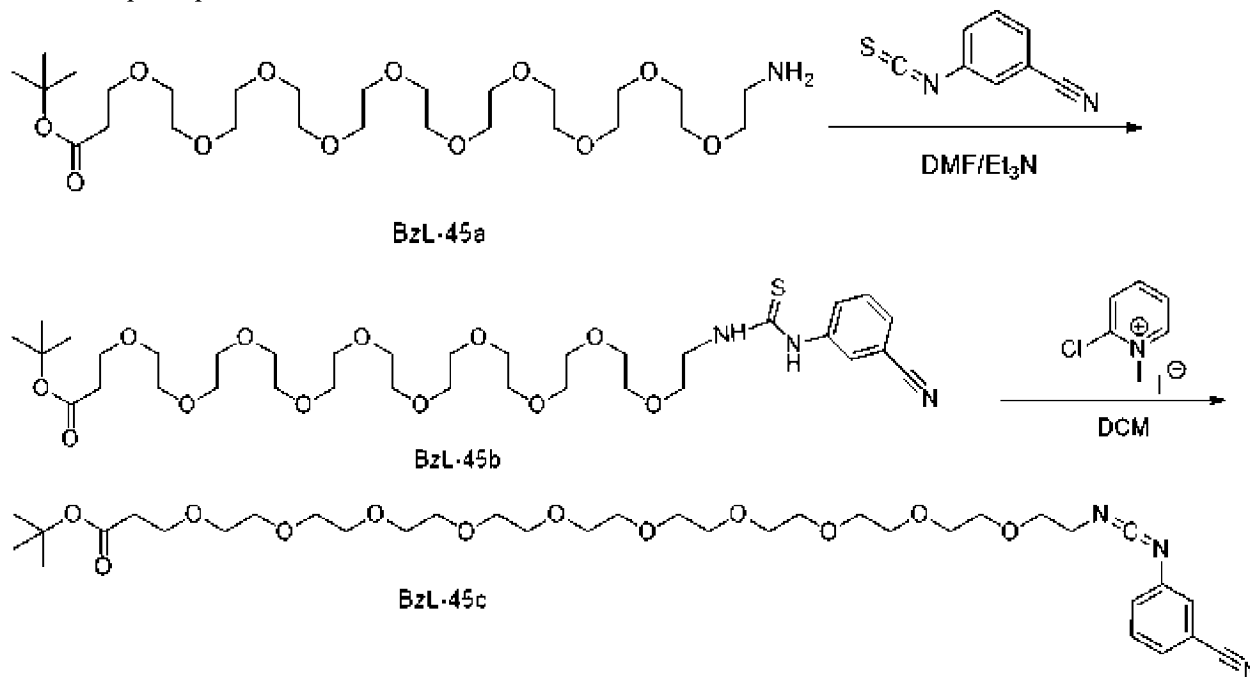


Получение BzL44a: 2-амино-N-(4-(аминометил)бензил)-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамид, Bz-27 (0,119 г, 0,203 ммоль, 1 экв) и 32-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриактановую кислоту (0,107 г, 0,203 ммоль, 1 экв) растворяли в 1:1 АЦН:ДХМ. Добавляли триэтиламин (0,17 мл, 1,2 ммоль, 6 экв), а затем триацетоксиборгидрид натрия (0,13 г, 0,61 ммоль, 3 экв). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 40 минут, а затем добавляли формальдегид (0,02 мл, 0,27 ммоль, 1,3 экв, 37 мас.% в H₂O). Через 10 минут реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 1-(4-((2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)метил)фенил)-2-метил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азатетратриактан-34-овой кислоты, BzL44a (0,067 г, 0,060 ммоль, 30%). ЖХ/МС [M+H] 1114,56 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1114,89 (определено).

Получение BzL-44: BzL-44a (0,067 г, 0,06 ммоль, 1 экв) и TFP (0,020 г, 0,12 ммоль, 2 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли коллидин (0,040 мл, 0,30 ммоль, 5 экв), затем EDC-HCl (0,035 г, 0,18 ммоль, 3 экв). Реакционную смесь перемешивали при комнатной

температуре и контролировали с помощью ЖХМС, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2,3,5,6-тетрафторфенил-1-(4-((2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)метил)фенил)-2-метил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азатетратриаконтан-34-оата, BzL-44 (0,026 г, 0,021 ммоль, 34%). ЖХ/МС [M+H] 1262,56 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1262,86 (определено).

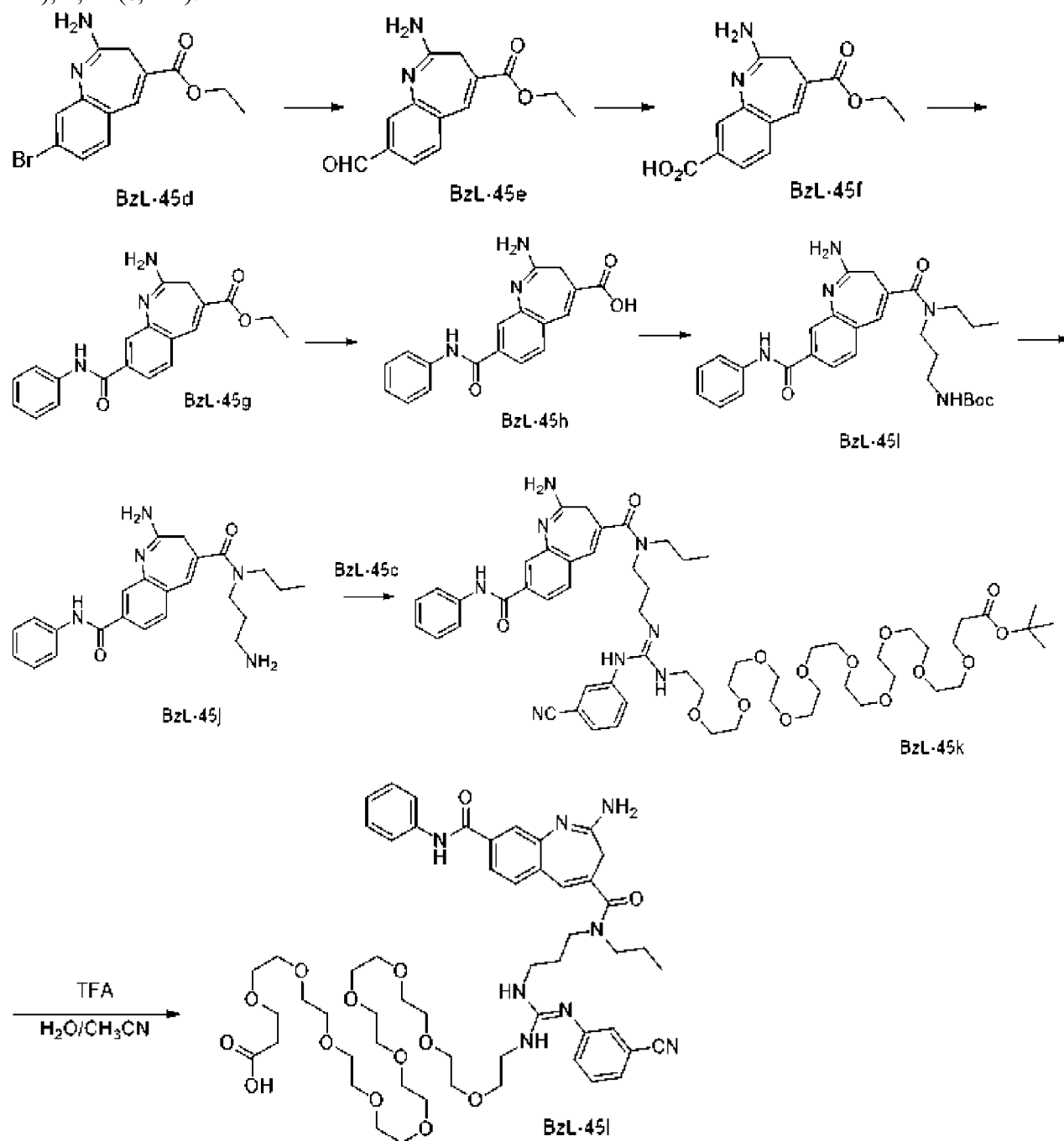
Пример 65 Синтез BzL-45

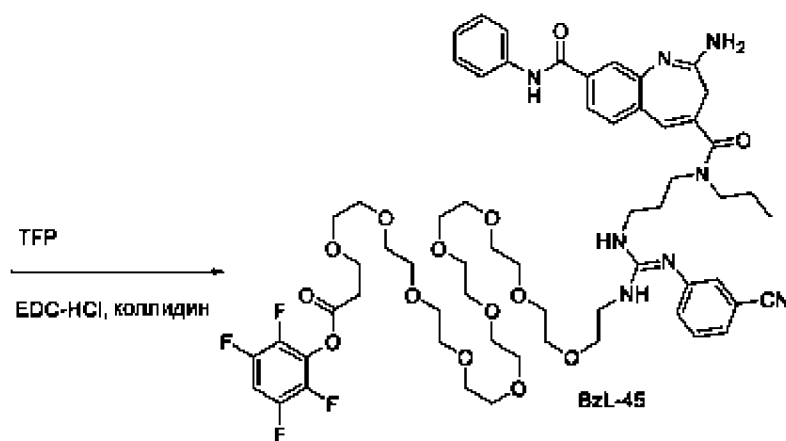


Получение BzL-45b: К смеси трет-бутил 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-аминоэтокс)этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]пропаноат а, BzL-45a (2,7 г, 4,61 ммоль, 1,0 экв) в ТГФ (20 мл) добавляли Et₃N (700 мг, 6,91 ммоль, 960 мкл, 1,5 экв) и 3-изотиоцианатобензонитрил (1,48 г, 9,22 ммоль, 2,0 экв) при 25°C и перемешивали в течение 1 часа при этой температуре. Затем смесь разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали EtOAc (50 мл x 3). Органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (MeOH/этилацетат=0/1, 1/10) с получением трет-бутил-3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(3-цианофенил)карбамотиоиламино]этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]пропаноата, BzL-45b (0,5 г, 670 мкмоль, выход 14,54%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 7,99 (с, 1H), 7,89 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,44-7,39 (м, 2H), 3,76-3,58 (м, 42H), 2,55-2,46 (м, 2H), 1,45 (с, 9H).

Получение BzL-45c: К смеси BzL-45b (0,4 г, 536 мкмоль, 1,0 экв) и Et₃N (163 мг, 1,61 ммоль, 223 мкл, 3,0 экв) в ДХМ (10 мл) и ДМФ (0,4 мл) добавляли 2-хлор-1-метилпиридин-1-ий иодид (164 мг, 643 мкмоль, 1,2 экв) при 25°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (CH₃CN/этилацетат=от 0/1 до

1/1) с получением трет-бутил-3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(3-цианофенил)иминометиленамино]этокси]этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]этокс]пропаноата, BzL-45c (0,29 г, 407 мкмоль, выход 75,9%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц) δ 7,43-7,33 (м, 4H), 3,70-3,62 (м, 42H), 2,51 (т, $J=6,4$ Гц, 2H), 1,45 (с, 9H).





Получение BzL-45e: К раствору этил-2-амино-8-бром-3H-1-бензазепин-4-карбоксилата, BzL-45d (10 г, 32,4 ммоль, 1,0 экв) в ДМФ (100 мл) добавляли Et_3SiH (72,8 г, 626,09 ммоль, 100 мл, 19,36 экв), Et_3N (6,5 г, 64,69 ммоль, 9,00 мл, 2,0 экв) и $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (1,18 г, 1,62 ммоль, 0,05 экв) в атмосфере N_2 . Суспензию дегазировали в вакууме и несколько раз продували CO и перемешивали в атмосфере CO (50 фунт/кв. дюйм) при 80°C в течение 12 часов. Смесь разбавляли водой (300 мл) и экстрагировали EtOAc (80 мл x 3). Органический слой промывали рассолом (50 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали, а остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; флэш-колонка с силикагелем SepaFlash® 15 г, элюент этилацетат/петролейный эфир, градиент 0~100% @ 65 мл/мин) с получением этил-2-амино-8-формил-3H-1-бензазепин-4-карбоксилата, BzL-45e (3 г, 11,6 ммоль, выход 35,9%) в виде твердого желтого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц) δ 10,00 (с, 1H) 7,79 (с, 1H) 7,61 (д, $J=8,4$ Гц, 1H) 7,55 (д, $J=1,2$ Гц, 1H) 7,40 (дд, $J=8,0$, 1,2 Гц, 1H) 7,07 (с, 2H) 4,25 (кв, $J=6,8$ Гц, 2H) 2,91 (с, 2H) 1,31 (т, $J=6,8$ Гц, 3H).

Получение BzL-45f: К раствору BzL-45e (2,6 г, 10,1 ммоль, 1,0 экв) в CH_3CN (15 мл) добавляли NaH_2PO_4 (362 мг, 3,02 ммоль, 0,3 экв), H_2O_2 (5,71 г, 50,33 ммоль, 4,84 мл, чистота 30%, 5,0 экв) и NaClO_2 (1,46 г, 16,1 ммоль, 1,6 экв) при 0°C и перемешивали при 25°C в течение 5 часов. Реакционную смесь гасили Na_2SO_3 (водн) и разбавляли H_2O (30 мл) и EtOAc (30 мл), pH смеси доводили до 4 водным раствором HCl (1 М), затем фильтровали с получением целевого твердого вещества, которое сушили в вакууме с получением 2-амино-4-этоксикарбонил-3H-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты, BzL-45f (2,1 г, 7,66 ммоль, выход 76,1%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц) δ 7,87 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,72-7,67 (м, 2H), 4,27 (кв, $J=7,2$ Hz, 2H), 3,28 (с, 2H), 1,31 (т, $J=7,2$ Hz, 3H).

Получение BzL-45g: К смеси BzL-45f (1,0 г, 3,65 ммоль, 1,0 экв) в ДМФА (20 мл) добавляли РУАОР (2,28 г, 4,38 ммоль, 1,2 экв) и DIEA (2,36 г, 18,2 ммоль, 3,18 мл, 5,0 экв) при 25°C и перемешивали в течение 10 минут, затем добавляли анилин (373 мг, 4,01 ммоль, 366 мкл, 1,1 экв) и перемешивали в течение 1 часа при 25°C . Смесь выливали в воду со льдом (50 мл) и перемешивали в течение 2 мин. Водную фазу экстрагировали этилацетатом (20 мл x 3). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (20 мл),

сушили безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме, а остаток очищали хроматографией на силикагеле ($\text{EtOAc}/\text{MeOH}=1:0 \sim 2:1$) с получением этил 2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3Н-1-бензазепин-4-карбоксилата, **BzL-45g** (0,5 г, 1,43 ммоль, выход 39,25%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD , 400 МГц) δ 7,89 (с, 1H), 7,76-7,65 (м, 3H), 7,62-7,56 (м, 1H), 7,37 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,16 (т, $J=8,0$ Гц, 1H), 4,35 (кв, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,32 (с, 2H), 1,38 (т, $J=7,2$ Гц, 3H).

Получение **BzL-45h**: К смеси **BzL-45g** (0,36 г, 1,03 ммоль, 1,0 экв) в EtOH (10 мл) добавляли раствор $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (216 мг, 5,15 ммоль, 5,0 экв) в H_2O (1 мл) при 25°C и перемешивали в течение 16 часов при этой температуре. Смесь гасили HCl (4М) до pH 5 и концентрировали при пониженном давлении при 40°C для удаления EtOH . Добавляли воду (10 мл) и затем фильтровали с получением 2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3Н-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, **BzL-45h** (0,2 г, 622 мкмоль, выход 60,41%) в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$, 400 МГц) δ 7,84-7,74 (м, 3H), 7,66 (с, 1H), 7,56-7,47 (м, 2H), 7,34 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,09 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,92 (с, 2H).

Получение **BzL-45i**: К раствору **BzL-45h** (0,2 г, 622 мкмоль, 1,0 экв) в ДМФ (5 мл) добавляли NATU (284 мг, 746 мкмоль, 1,2 экв) и DIEA (241 мг, 1,87 ммоль, 325 мкл, 3,0 экв) при 25°C и перемешивали в течение 10 мин при этой температуре, затем к смеси добавляли трет-бутил-N-[3-(пропиламино)пропил]карбамат, **Bz-1b** (161 мг, 746 мкмоль, 1,2 экв) и перемешивали при 25°C в течение 3 часов. Реакционную смесь выливали в воду со льдом (30 мл) и перемешивали в течение 10 мин. Водную фазу экстрагировали EtOAc (10 мл x 3), и объединенную органическую фазу промывали H_2O (10 мл x 2) и рассолом (10 мл), сушили над Na_2SO_4 и концентрировали с получением трет-бутил N-[3-[[2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]пропил]карбамата, **BzL-45i** (0,3 г, 577 мкмоль, выход 92,76%) в виде желтого масла.

Получение **BzL-45j**: К раствору **BzL-45i** (0,4 г, 769 мкмоль, 1,0 экв) в MeOH (10 мл) добавляли HCl/MeOH (4 М, 9,62 мл, 50 экв) при 25°C . Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа и затем концентрировали при пониженном давлении при 40°C . Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil C18 100*30мм 8мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ) - АЦН]; В%: 5% - 30%, 10мин) с получением 2-амино-N4-(3-аминопропил)-N8-фенил-N4-пропил-3Н-1-бензазепин-4,8-дикарбоксамида, **BzL-45j** (0,23 г, 431 мкмоль, выход 56,0%, соль ТФУ) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (MeOD , 400 МГц) δ 8,01-7,94 (м, 2H), 7,76-7,70 (м, 3H), 7,41 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,21 (т, $J=7,6$ Гц, 2H), 3,63 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,58-3,49 (м, 2H), 3,41 (с, 2H), 3,10-2,95 (м, 2H), 2,12-1,99 (м, 2H), 1,82-1,68 (м, 2H), 0,95 (т, $J=7,2$ Гц, 3H). ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 420,2 (рассчитано); ЖХ/МС $[\text{M}+\text{H}]$ 420,2 (определено).

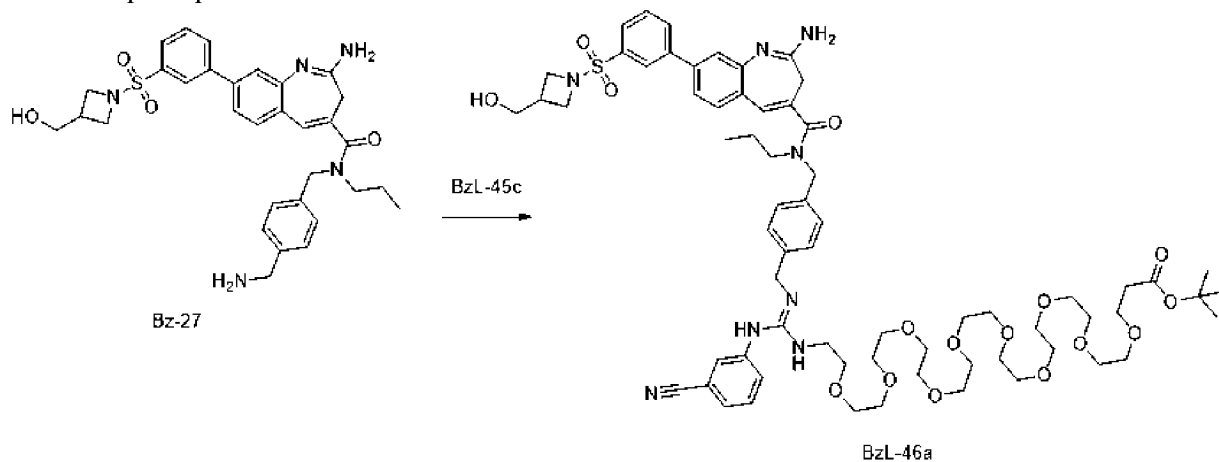
Получение **BzL-45k**: К смеси **Bz-45j** (0,06 г, 112 мкмоль, 1,0 экв, соль ТФУ) в ДМФ (1 мл) добавляли Et_3N (28 мг, 281 мкмоль, 2,5 экв) и **BzL-45c** (88 мг, 123 мкмоль, 1,1 экв) при 25°C . Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа и затем фильтровали и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil C18 100*30мм

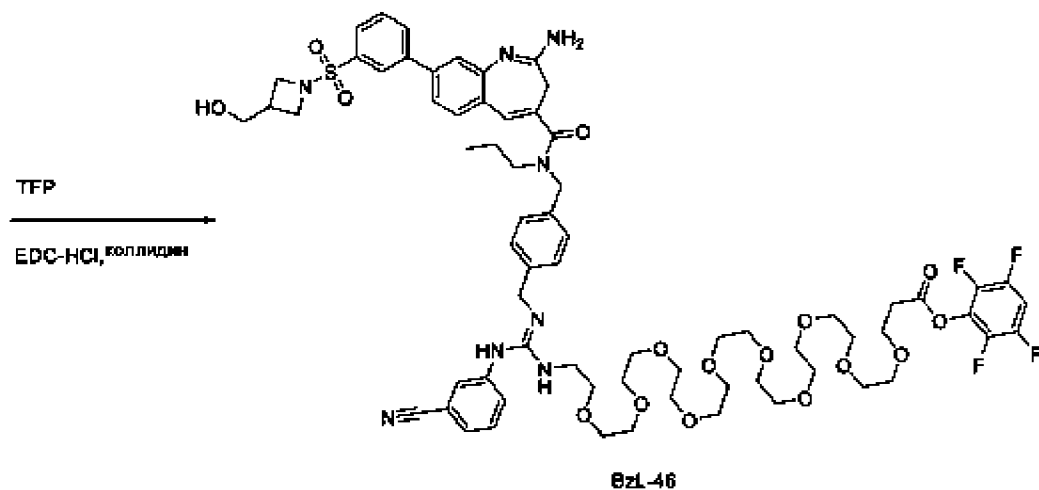
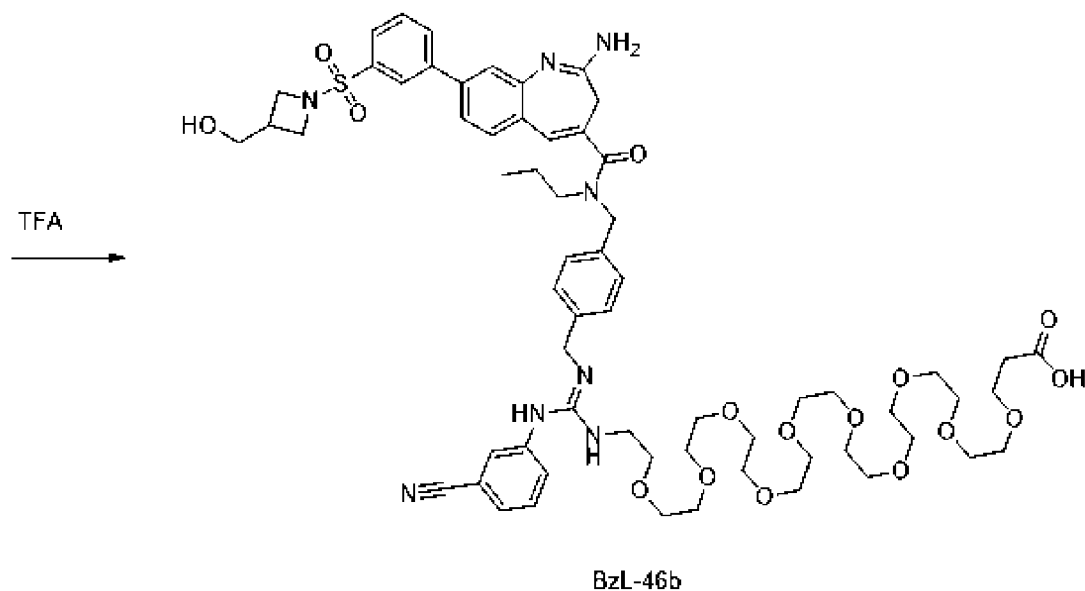
8мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУ) - АЦН]; В%: 20%-50%, 10 мин) с получением трет-бутил 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[Z)-N'-[3-[[2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропиламино]пропил]-N-(3-цианофенил)карбамимидоил]амино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропаноата, BzL-45k (0,08 г, 70,7 мкмоль, выход 62,9%) в виде бесцветного масла.

Получение BzL-45l: К раствору BzL-45k (0,07 г, 61 мкмоль, 1,0 экв) в H₂O (5 мл) и CH₃CN (1 мл) добавляли ТФУ (211 мг, 1,86 ммоль, 30 экв) при 25°C. Смесь перемешивали при 80°C в течение 2 часов и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток лиофилизировали с получением 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[Z)-N'-[3-[[2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]-пропил-амино]пропил]-N-(3-цианофенил)карбамимидоил]амино]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]этоксид]пропановой кислоты, BzL-45l (51 мг, 42,9 мкмоль, выход 69,3%, соль ТФУ) в виде светло-желтого масла. ¹H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,01-7,94 (м, 2H), 7,79-7,75 (м, 1H), 7,72 (д, J=8,0 Гц, 2H), 7,66-7,64 (м, 4H), 7,39 (т, J=7,6 Гц, 2H), 7,19 (т, J=7,6 Гц, 1H), 7,13 (с, 1H), 3,76-3,52 (м, 46H), 3,42-3,40 (м, 4H), 2,53 (т, J=6,4 Гц, 2H), 2,04 (м, 2H), 1,79-1,65 (м, 2H), 0,93 (т, J=7,2 Гц, 3H). ЖХ/МС [M+H] 1075,6 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1075,6 (определено).

Получение BzL-45: BzL-45 (0,051 г, 0,047 ммоль, 1 экв) и TFP (0,016 г, 0,095 ммоль, 2 экв) растворяли в ДМФ. Добавляли коллидин (0,031 мл, 0,24 ммоль, 5 экв), затем EDC-НСl (0,027 г, 0,14 ммоль, 3 экв). Реакцию перемешивали при комнатной температуре и контролировали с помощью ЖХМС, затем концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением 2,3,5,6-тетрафторфенил-40-(2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3Н-бензо[b]азепин-4-карбонил)-35-((3-цианофенил)имино)-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-декаокса-34,36,40-триазатритетраоктаноата, BzL-45 (0,043 г, 0,035 ммоль, 74%). ЖХ/МС [M+H] 1223,56 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1223,87 (определено).

Пример 66 Синтез BzL-46





Получение BzL-46a: Реакцией Bz-27 и BzL-45с получали трет-бутил-(Z)-1-(4-((2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3Н-бензо[б]азепин-4-карбоксамидо)метил)фенил)-3-((3-цианофенил)амино)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-декаокса-2,4-дизагептатриаконт-2-ен-37-оат, BzL-46a согласно способам, описанным для BzL-42. ЖХ/МС [M+H] 1299,7 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1299,7 (определено).

Получение BzL-46b: Реакцией BzL-46a с трифторуксусной кислотой, ТФУ, согласно способам, описанным в синтезе BzL-42, получали (Z)-1-(4-((2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3Н-бензо[б]азепин-4-карбоксамидо)метил)фенил)-3-((3-цианофенил)амино)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-декаокса-2,4-дизагептатриаконт-2-ен-37-оевую кислоту, BzL-46b. ЖХ/МС [M+H] 1243,6 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1243,6 (определено).

Получение BzL-46: Реакцией BzL-46b с 2,3,5,6-тетрафторфенолом, TFP и EDC-HCl, как описано в способах синтеза BzL-42, получали 2,3,5,6-тетрафторфенил (Z)-1-(4-((2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3Н-бензо[б]азепин-4-карбоксамидо)метил)фенил)-3-((3-цианофенил)амино)-

7,10,13,16,19,22,25,28,31,34-декаокса-2,4-диазагептатриаконт-2-ен-37-оат, BzL-46. ЖХ/МС [M+H] 1391,6 (рассчитано); ЖХ/МС [M+H] 1391,6 (определено).

Пример 67 Получение иммуноконъюгатов (IC)

В иллюстративном способе происходит перемещение антитела через буфер в буфер для конъюгации, содержащий 100 мМ борной кислоты, 50 мМ хлорида натрия, 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты при pH 8,3, с использованием колонок для обессоливания G-25 SEPHADEX™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Затем каждый элюат доводят до 6 мг/мл с помощью буфера, а затем стерильно фильтруют. Антитело в концентрации 6 мг/мл предварительно нагревают до 30°C и быстро смешивают с 2-20 (например, 7-10) молярными эквивалентами аминокензазепин-линкерного соединения формулы II. Реакцию продолжают в течение 16 часов при 30 °C, и иммуноконъюгат А отделяют от реагентов, путем пропускания через две последовательные обессоливающие колонки G-25, уравновешенные в фосфатно-солевом буфере (PBS) при pH 7,2, с получением иммуноконъюгата (IC), представленного в таблицах 3а и 3b. Соотношение адъювант-антитело (DAR) определяют методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии с использованием колонки с обращенной фазой C4 на ACQUITY™ UPLC H-класса (Waters Corporation, Milford, Massachusetts), соединенной с масс-спектрометром XEVO™ G2-XS TOF (Waters Corporation).

Для конъюгации антитело можно растворить в физиологической буферной системе, известной в данной области техники, которая не оказывает неблагоприятного воздействия на стабильность или антигенсвязывающую специфичность антитела. Можно использовать фосфатно-солевой буферный раствор. Промежуточное аминокензазепин-линкерное соединение растворяют в системе растворителей, включающей по меньшей мере один полярный апротонный растворитель, как описано в другом месте данного документа. В некоторых таких аспектах промежуточное аминокензазепин-линкерное соединение растворяют до концентрации около 5 мМ, 10 мМ, около 20 мМ, около 30 мМ, около 40 мМ или около 50 мМ и в таких диапазонах, как от около 50 мМ до около 50 мМ или от около 10 мМ до около 30 мМ в Трис-буфере с pH 8 (например, 50 мМ Трис). В некоторых аспектах промежуточное аминокензазепин-линкерное соединение растворяют в ДМСО, или ацетонитриле, или в ДМСО. В реакции конъюгации эквивалентный избыток раствора промежуточного аминокензазепин-линкерного соединения разбавляют и объединяют с охлажденным раствором антитела (например, от около 1°C до около 10 °C). Раствор промежуточного аминокензазепин-линкерного соединения может быть подходящим образом разбавлен по меньшей мере одним полярным апротонным растворителем и по меньшей мере одним полярным протонным растворителем, примеры которых включают воду, метанол, этанол, н-пропанол и уксусную кислоту. В некоторых конкретных аспектах промежуточное аминокензазепин-линкерное соединение растворяют в ДМСО и разбавляют ацетонитрилом и водой перед смешиванием с раствором антитела. Молярные эквиваленты промежуточного аминокензазепин-линкерного соединения к антителу могут составлять около 1,5:1, около 3:1, около 5:1, около 10:1, около 15:1 или

около 20:1, а также их диапазоны, например, от около 1,5:1 до около 20:1, от около 1,5:1 до около 15:1, от около 1,5:1 до около 10:1, от около 3:1 до около 15:1, от около 3:1 до около 10:1, от около 5:1 до около 15:1 или от около 5:1 до около 10:1. Завершение реакции можно контролировать с помощью способов, известных в данной области техники, таких как ЖХ-МС, и реакция обычно завершается в течение от около 1 часа до около 24 часов. После завершения реакции к реакционной смеси можно добавить реагент для гашения реакции и/или экпирования непрореагировавших тиоловых групп антитела. Примером подходящего экпирующего реагента является этилмалеимид.

После конъюгации в соответствии с примером 5 иммуноконъюгаты можно очищать и отделять от неконъюгированных реагентов и/или агрегатов конъюгатов способами очистки известными в данной области техники, такими как, например, и не ограничиваясь ими, эксклюзионная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия, ионообменная хроматография, хроматофокусирование, ультрафильтрация, центробежная ультрафильтрация и их комбинациями. Например, очистке может предшествовать разведение иммуноконъюгата, например, в 20 мМ сукцината натрия, pH 5. Разбавленный раствор наносят на катионообменную колонку с последующей промывкой, например, по меньшей мере 10 объемами колонки 20 мМ сукцината натрия, pH 5. Конъюгат можно соответствующим образом элюировать буфером, таким как PBS.

Пример 68 репортерный анализ НЕК

Репортерные клетки HEK293, экспрессирующие человеческий TLR7 или человеческий TLR8, были приобретены у компании Invivogen, и для размножения клеток и проведения экспериментов следовали протоколам поставщика. Вкратце, клетки выращивали до 80-85% конфлюэнтности при 5% CO₂ в среде DMEM с добавлением 10% FBS, зеоцина и бластицидина. Затем клетки высевали в 96-луночные плоские планшеты по 4×10⁴ клеток/лунку с субстратом, содержащим среду для выявления НЕК и иммуностимулирующие молекулы. Активность измеряли с помощью планшет-ридера при длине волны 620-655 нм.

Пример 69 Оценка активности иммуноконъюгатов *in vitro*

Этот пример показывает, что иммуноконъюгаты по изобретению эффективны при индуцировании миелоидной активации, и поэтому полезны для лечения рака.

Выделение человеческих антиген-презентирующих клеток: Миелоидные антиген-презентирующие клетки человека (APC) подвергали негативной селекции из периферической крови человека, полученной от здоровых доноров крови (Стэнфордский центр крови, Пало-Альто, Калифорния) путем центрифугирования в градиенте плотности с использованием коктейля для обогащения моноцитов человека ROSETTESEP™ (Stem Cell Technologies, Ванкувер, Канада), содержащего моноклональные антитела против CD14, CD16, CD40, CD86, CD123 и HLA-DR. Незрелые APC впоследствии очищали до чистоты >90% посредством негативной селекции с использованием набора для обогащения моноцитов человека EASYSEP™ (технологии стволовых клеток) без

истощения CD16, содержащего моноклональные антитела против CD14, CD16, CD40, CD86, CD123 и HLA-DR.

Анализ активации миелоидных APC: 2×10^5 APC инкубировали в 96-луночных планшетах (Corning, Corning, NY), содержащих среду Дульбекко в модификации Искова, IMDM (Lonza) с добавлением 10% FBS, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл (микрограммов на миллилитр) стрептомицина, 2 mM L-глутамина, пирувата натрия, заменимых аминокислот и, где указано, различные концентрации неконъюгированных (голых) антител PD-L1 или HER2 и иммуноконъюгата Р по изобретению (полученного в соответствии с примером выше). В качестве конструкций антител использовали трастузумаб и авелумаб. Бесклеточные супернатанты анализировали через 18 часов с помощью ELISA на секрецию ФНО α .

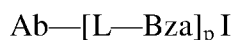
Активацию типов миелоидных клеток можно измерить с помощью различных скрининговых анализов, в которых используются разные популяции миелоидных клеток. Они могут включать следующее: моноциты, выделенные из крови здорового донора, M-CSF-дифференцированные макрофаги, GM-CSF-дифференцированные макрофаги, дендритные клетки, полученные из моноцитов GM-CSF+IL-4, классические дендритные клетки, выделенные из крови здорового донора, и миелоидные клетки, поляризованные до иммуносупрессивного состояния (также называемые супрессорными клетками миелоидного происхождения или MDSC). Примеры поляризованных клеток MDSC включают моноциты, дифференцированные в сторону иммуносупрессивного состояния, такие как M2a МФ (IL4/IL13), M2c МФ (IL10/TGF β), GM-CSF/IL6 MDSC и опухолеобразующие моноциты (TEM). Дифференцировку TEM можно проводить с использованием кондиционированных опухолями сред (например, 786.O, MDA-MB-231, HCC1954). Первичные опухоль-ассоциированные миелоидные клетки, могут также включать первичные клетки, присутствующие в суспензиях диссоциированных опухолевых клеток (Discovery Life Sciences).

Оценку активации описанных популяций миелоидных клеток можно проводить в виде монокультуры или сокультуры с клетками, экспрессирующими представляющий интерес антиген, с которым ISAC может связываться через область CDR антитела. После инкубации в течение 18-48 часов активацию можно оценить по повышению экспрессии костимулирующих молекул клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии или по измерению секретируемых провоспалительных цитокинов. Для измерения цитокинов собирают бесклеточный супернатант и анализируют с помощью массива гранул цитокинов (например, LegendPlex от Biolegend) с использованием проточной цитометрии.

Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в данном документе, настоящим включены в качестве ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была отдельно и специально указана для включения в качестве ссылки и изложена в данном документе полностью.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуноконъюгат, содержащий антитело, ковалентно присоединенное к одному или более фрагментам аминокбензазепина с помощью линкера, и имеющий формулу I:



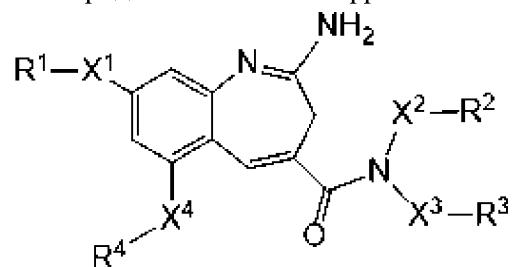
или его фармацевтически приемлемая соль,

где:

Ab представляет собой антитело;

p является целым числом от 1 до 8;

Bza представляет собой фрагмент аминокбензазепина, имеющий формулу:



R¹, R², R³, и R⁴ независимо выбраны из группы, состоящей из H, C₁-C₁₂ алкила, C₂-C₆ алкенила, C₂-C₆ алкинила, C₃-C₁₂ карбоциклила, C₆-C₂₀ арила, C₂-C₉ гетероциклила и C₁-C₂₀ гетероарила, где алкил, алкенил, алкинил, карбоциклил, арил, гетероциклил и гетероарил независимо и необязательно замещены одной или более группами, выбранными из:

- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил);
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—*;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₃-C₁₂ карбоциклил)—NR⁵—C(=NR⁵)NR⁵—*;
- (C₆-C₂₀ арил);
- (C₆-C₂₀ арил)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—C(=NR⁵ᵃ)N(R⁵)—*;
- (C₂-C₂₀ гетероциклил);
- (C₂-C₂₀ гетероциклил)—*;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—NR⁵—C(=NR⁵ᵃ)NR⁵—*;
- (C₁-C₂₀ гетероарил);
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—*;

$-(C_1-C_{20} \text{ гетероарил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)-*$;
 $-(C_1-C_{20} \text{ гетероарил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)_2$;
 $-(C_1-C_{20} \text{ гетероарил})-NR^5-C(=NR^{5a})N(R^5)-*$;
 $-C(=O)-*$;
 $-C(=O)-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклилдиил})-*$;
 $-C(=O)N(R^5)_2$;
 $-C(=O)N(R^5)-*$;
 $-C(=O)N(R^5)-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)C(=O)R^5$;
 $-C(=O)N(R^5)-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)C(=O)N(R^5)_2$;
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)CO_2R^5$;
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)C(=NR^{5a})N(R^5)_2$;
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-NR^5C(=NR^{5a})R^5$;
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_8 \text{ алкилдиил})-NR^5(C_2-C_5 \text{ гетероарил})$;
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})-N(R^5)-*$;
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})-*$;
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)_2$;
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклилдиил})-C(=O)NR^5-$
 $(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-NR^5-*$;
 $-N(R^5)_2$;
 $-N(R^5)-*$;
 $-N(R^5)C(=O)R^5$;
 $-N(R^5)C(=O)-*$;
 $-N(R^5)C(=O)N(R^5)_2$;
 $-N(R^5)C(=O)N(R^5)-*$;
 $-N(R^5)CO_2R^5$;
 $-NR^5C(=NR^{5a})N(R^5)_2$;
 $-NR^5C(=NR^{5a})N(R^5)-*$;
 $-NR^5C(=NR^{5a})R^5$;
 $-N(R^5)-(C_2-C_5 \text{ гетероарил})$;
 $-O-(C_1-C_{12} \text{ алкил})$;
 $-O-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)_2$;
 $-O-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)-*$;
 $-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклилдиил})-*$;
 $-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклилдиил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)_2$;
 $-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклилдиил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-NR^5-*$; и
 $-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклилдиил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-OH$;
 или R^2 и R^3 вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;
 X^1 , X^2 , X^3 и X^4 независимо выбраны из группы, состоящей из связи, $C(=O)$,
 $C(=O)N(R^5)$, O , $N(R^5)$, S , $S(O)_2$ и $S(O)_2N(R^5)$;
 R^5 выбран из группы, состоящей из H , C_6-C_{20} арила, C_6-C_{20} арилдиила, C_1-C_{12}

алкила, и C_1-C_{12} алкилдиила, или две группы R^5 вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

R^{5a} выбран из группы, состоящей из C_6-C_{20} арила и C_1-C_{20} гетероарила;

где звездочка * указывает на сайт присоединения L, и где один из R^1 , R^2 , R^3 и R^4 присоединен к L;

L представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из:

—C(=O)—(ПЭГ)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—O—;

—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—N(R^5)C(=O)—(C_2-C_5 моногетероциклилдиил)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—(MCgluc)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(MCgluc)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—N(R^5)C(=O)—(C_2-C_5 моногетероциклилдиил)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—N(R^5)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—N(R^5)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—N⁺(R^5)₂—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—N(R^5)CH(AA₁)C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—N(R^5)CH(AA₁)C(=O)—N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—SS—(C_1-C_{12} алкилдиил)—OC(=O)—;

—C(=O)—(ПЭГ)—SS—(C_1-C_{12} алкилдиил)—C(=O)—;

—C(=O)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—;

—C(=O)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—;

—C(=O)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—N(R^5)C(=O);

—C(=O)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—N(R^5)C(=O)—(C_2-C_5 моногетероциклилдиил)—;

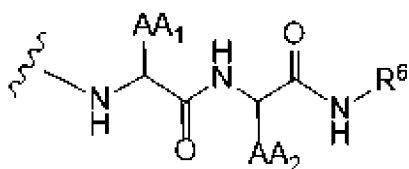
—C(=O)—CH₂CH₂OCH₂CH₂—(C_1-C_{20} гетероарилдиил)—CH₂O—(ПЭГ)—C(=O)—(MCgluc)—;

—C(=O)—CH₂CH₂OCH₂CH₂—(C_1-C_{20} гетероарилдиил)—CH₂O—(ПЭГ)—C(=O)—(MCgluc)—N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—N(R^5)C(=O)—(C_2-C_5 моногетероциклилдиил)—; и

—(сукцинимидил)—(CH₂)_m—C(=O)—(PEP)—N(R^5)—(C_1-C_{12} алкилдиил)—N(R^5)C(=O)—(C_2-C_5 моногетероциклилдиил)—;

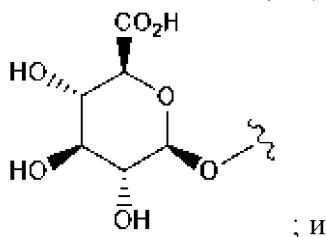
ПЭГ имеет формулу: —(CH₂CH₂O)_n—(CH₂)_m—; m является целым числом от 1 до 5, а n является целым числом от 2 до 50;

PEP имеет формулу:

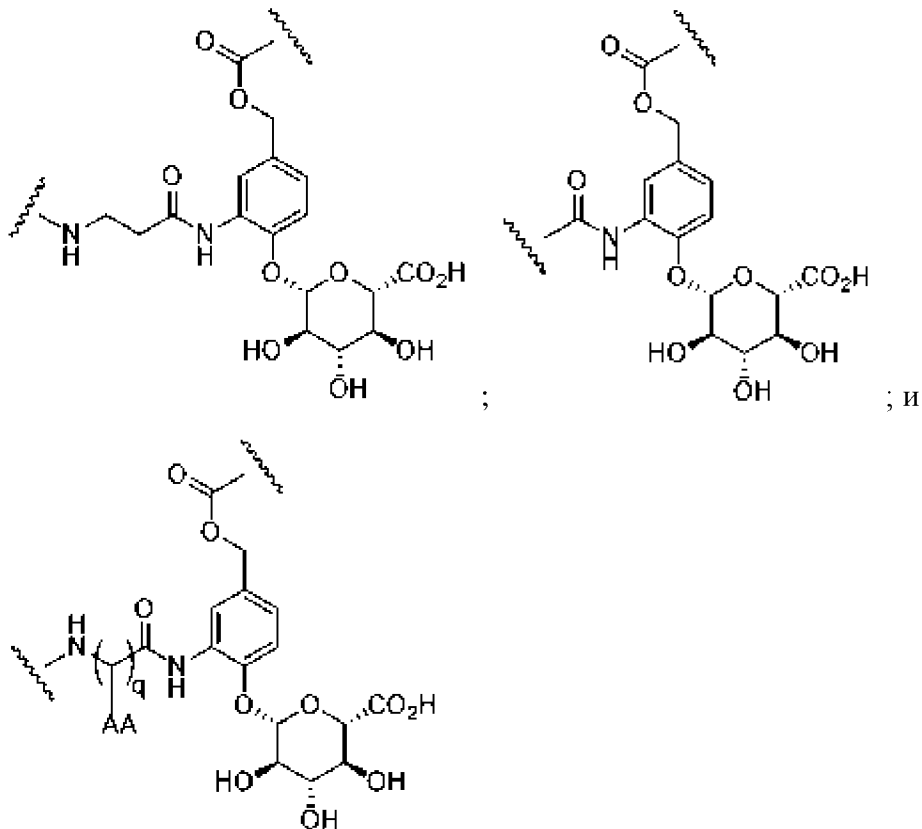


где AA₁ и AA₂ независимо выбраны из боковой цепи аминокислоты, или AA₁ или AA₂ и соседний атом азота образуют 5-членное кольцо пролиновой аминокислоты, а волнистая линия указывает на точку присоединения;

R⁶ выбран из группы, состоящей из C₆-C₂₀ арилдиила и C₁-C₂₀ гетероарилдиила, замещенного —CH₂O—C(=O)— и необязательно:



MCgluc выбран из групп:



где q равно от 1 до 8, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты; и

алкил, алкилдиил, алкенил, алкенилдиил, алкинил, алкинилдиил, арил, арилдиил, карбоцикл, карбоциклдиил, гетероцикл, гетероциклдиил, гетероарил и гетероарилдиил необязательно замещены одной или более группами, независимо выбранными из F, Cl, Br, I, —CN, —CH₃, —CH₂CH₃, —CH=CH₂, —C≡CH, —C≡CCH₃, —CH₂CH₂CH₃, —CH(CH₃)₂, —CH₂CH(CH₃)₂, —CH₂OH, —CH₂OCH₃, —CH₂CH₂OH, —C(CH₃)₂OH, —CH(OH)CH(CH₃)₂, —C(CH₃)₂CH₂OH, —CH₂CH₂SO₂CH₃, —CH₂OP(O)(OH)₂,

—CH₂F, —CHF₂, —CF₃, —CH₂CF₃, —CH₂CHF₂, —CH(CH₃)CN, —C(CH₃)₂CN, —CH₂CN, —CH₂NH₂, —CH₂NHSO₂CH₃, —CH₂NHCH₃, —CH₂N(CH₃)₂, —CO₂H, —COCH₃, —CO₂CH₃, —CO₂C(CH₃)₃, —COCH(OH)CH₃, —CONH₂, —CONHCH₃, —CON(CH₃)₂, —C(CH₃)₂CONH₂, —NH₂, —NHCH₃, —N(CH₃)₂, —NHCOCH₃, —N(CH₃)COCH₃, —NHS(O)₂CH₃, —N(CH₃)C(CH₃)₂CONH₂, —N(CH₃)CH₂CH₂S(O)₂CH₃, —NHC(=NH)H, —NHC(=NH)CH₃, —NHC(=NH)NH₂, —NHC(=O)NH₂, —NO₂, =O, —OH, —OCH₃, —OCH₂CH₃, —OCH₂CH₂OCH₃, —OCH₂CH₂OH, —OCH₂CH₂N(CH₃)₂, —O(CH₂CH₂O)_n—(CH₂)_mCO₂H, —O(CH₂CH₂O)_nH, —OP(O)(OH)₂, —S(O)₂N(CH₃)₂, —SCH₃, —S(O)₂CH₃, и —S(O)₃H.

2. Иммуноконъюгат по п. 1, отличающийся тем, что антитело представляет собой конструкцию антитела, имеющую антигенсвязывающий домен, который связывает PD-L1.

3. Иммуноконъюгат по п. 2, отличающийся тем, что антитело выбрано из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба и авелумаба, или их биосимиляра или биобеттера.

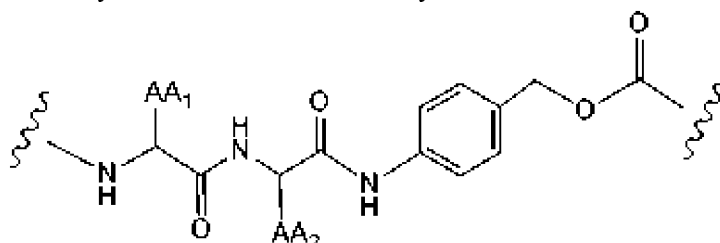
4. Иммуноконъюгат по п. 1, отличающийся тем, что антитело представляет собой конструкцию антитела, имеющую антигенсвязывающий домен, который связывает HER2.

5. Иммуноконъюгат по п. 4, отличающийся тем, что антитело выбрано из группы, состоящей из трастузумаба и пертузумаба, или их биосимиляра или биобеттера.

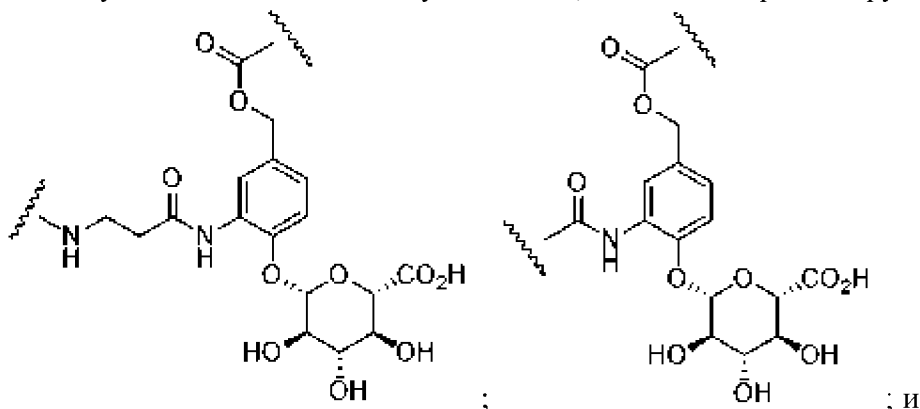
6. Иммуноконъюгат по п. 1, отличающийся тем, что антитело представляет собой конструкцию антитела, имеющую антигенсвязывающий домен, который связывает CEA.

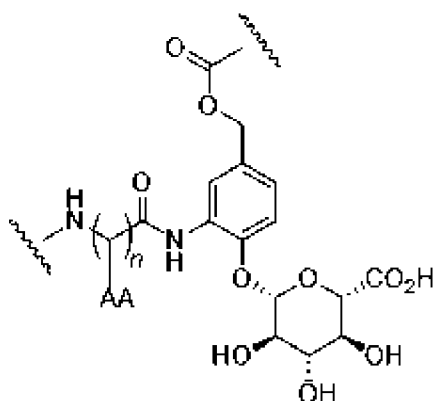
7. Иммуноконъюгат по п. 6, отличающийся тем, что антитело представляет собой лабетузумаб, или его биосимиляр или биобеттер.

8. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, где РЕР имеет формулу:



9. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, где РЕР выбран из групп:





где n равно 1 или более, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты.

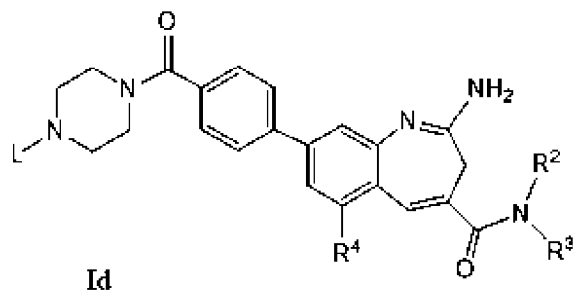
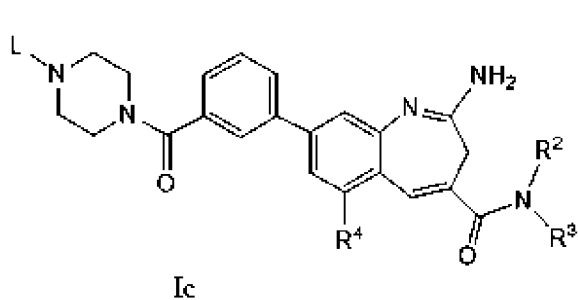
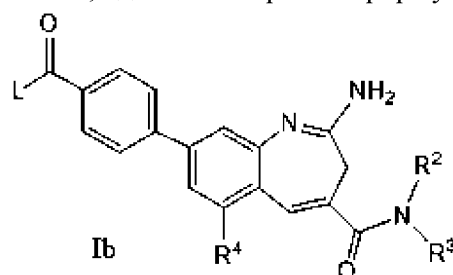
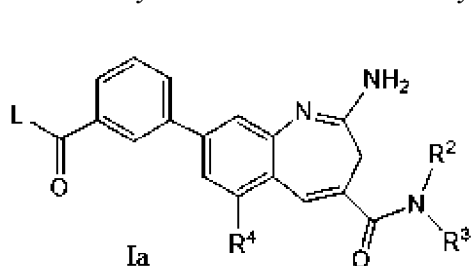
10. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-9, где AA_1 и AA_2 независимо выбраны из боковой цепи встречающейся в природе аминокислоты.

11. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-9, где AA_1 и AA_2 независимо выбраны из H, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_5)$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$.

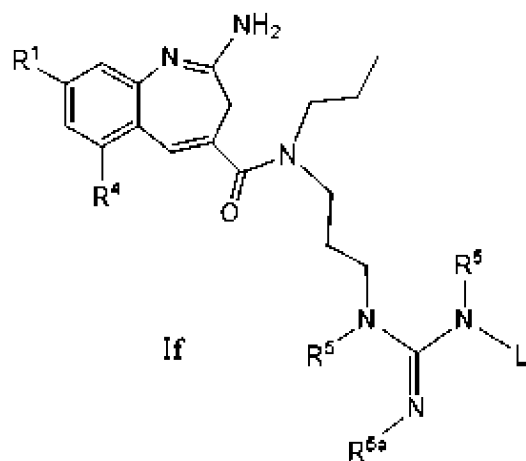
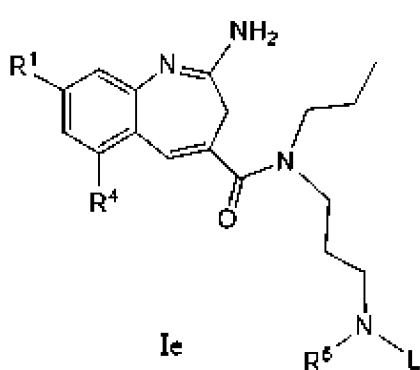
12. Иммуноконъюгат по п. 11, где AA_1 представляет собой $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, и AA_2 представляет собой $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$.

13. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, где AA_1 и AA_2 независимо выбраны из аспарагиновой кислоты GlcNAc, $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}$.

14. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-13, где Bza выбран из формул Ia-d:



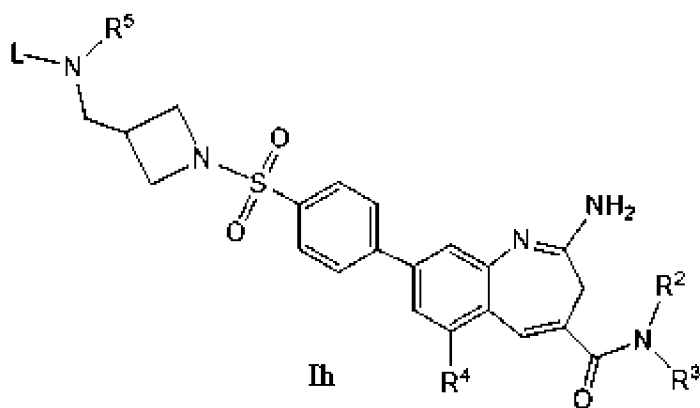
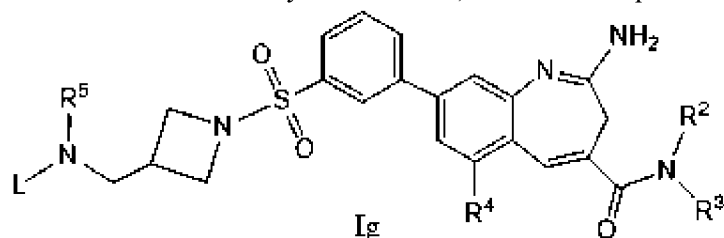
15. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-13, где Bza выбран из формул Ie и If:



где R^{5a} формулы If выбран из группы, состоящей из фенила и пиридила, необязательно замещенных одной или более группами, выбранными из F, Cl, Br, I, —CN, —NO₂ и —OCH₃.

16. Иммуноконъюгат по п. 15, где L представляет собой —C(=O)—(ПЭГ)—.

17. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-13, где Bza выбран из формул Ig и Ih:



18. Иммуноконъюгат по п. 17, где L представляет собой —C(=O)—(ПЭГ)— или —C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—.

19. Иммуноконъюгат по п. 18, где R^2 и R^3 каждый представляет собой C₁-C₈ алкил.

20. Иммуноконъюгат по п. 19, где R^2 и R^3 каждый представляет собой —CH₂CH₂CH₃.

21. Иммуноконъюгат по п. 1, где X^2 и X^3 каждый представляют собой связь, и R^2 или R^3 представляет собой —O—(C₁-C₁₂ алкил).

22. Иммуноконъюгат по п. 21, где R^2 или R^3 представляет собой —OCH₂CH₃.

23. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, где один из R^1 и R^4 выбран из:

—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;

$-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)C(=NR^5)N(R^5)-*$;
 $-(C_6-C_{20} \text{ арилдиил})-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклдиил})-*$;
 $-(C_6-C_{20} \text{ арилдиил})-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклдиил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)-*$;
 $-(C_6-C_{20} \text{ арилдиил})-C(=O)-*$;
 $-(C_6-C_{20} \text{ арилдиил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)-*$;
 $-(C_6-C_{20} \text{ арилдиил})-C(=O)-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклдиил})-*$;
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})-*$; и
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклдиил})-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-NR^5-*$.

X^1 и X^4 представляют собой связь, и где звездочка * указывает на сайт присоединения L.

24. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, где один из R^2 и R^3 выбран из:

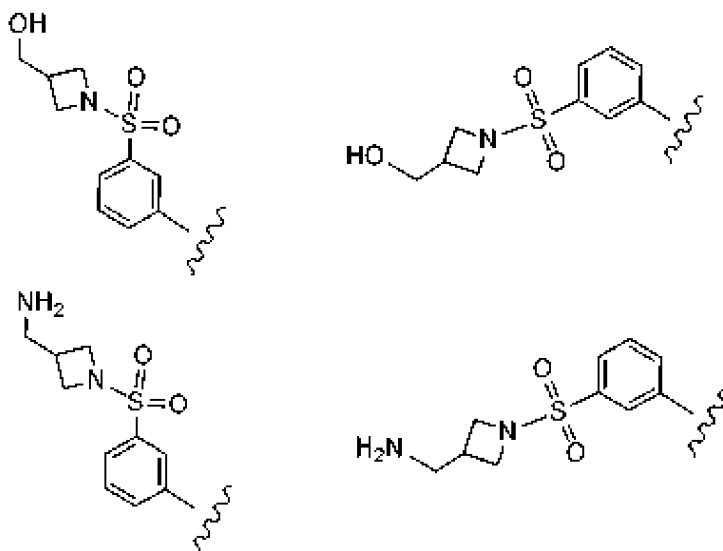
$-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)-*$;
 $-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-O-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)-*$;
 $-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)C(=NR^5)-N(R^5)-*$;
 $-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-(C_6-C_{20} \text{ арилдиил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)-*$;
 $-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-(C_6-C_{20} \text{ арилдиил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)-C(=NR^5)N(R^5)-*$;
 $-(C_2-C_6 \text{ алкилдиил})-N(R^5)-*$; и
 $-(C_2-C_6 \text{ алкилдиил})-N(R^5)C(=NR^5)N(R^5)-*$;

X^2 и X^3 представляют собой связь, и где звездочка * указывает на сайт присоединения L.

25. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, где один из R^1 и R^4 выбран из $-(C_6-C_{20} \text{ арилдиил})-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклдиил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)_2$ и $-(C_6-C_{20} \text{ арилдиил})-S(=O)_2-(C_2-C_{20} \text{ гетероциклдиил})-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-OH$.

26. Иммуноконъюгат по п. 25, где C_6-C_{20} арилдиил представляет собой фенилдиил, и C_2-C_{20} гетероциклдиил представляет собой азетидиндиил.

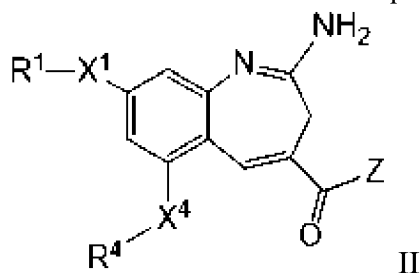
27. Иммуноконъюгат по п. 26, где один из R^1 и R^4 выбран из формул:



28. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, где один из R^1 и R^4 представляет собой $—C(=O)NR^5—(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})—(C_2-C_{20} \text{ гетероциклилдиил})—C(=O)NR^5—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—NR^5—L$.

29. Иммуноконъюгат по п. 28, где C_1-C_{20} гетероарилдиил представляет собой пиридиндиил, а C_2-C_{20} гетероциклилдиил представляет собой пиперидиил.

30. Аминобензазепин-линкерное соединение формулы II:



где

Z выбран из H , $—O(C_1-C_8 \text{ алкил})$, и $N(X^2R^2)(X^3R^3)$;

R^1 , R^2 , R^3 , и R^4 независимо выбраны из группы, состоящей из H , C_1-C_{12} алкила, C_2-C_6 алкенила, C_2-C_6 алкинила, C_3-C_{12} карбоциклила, C_6-C_{20} арила, C_2-C_9 гетероциклила и C_1-C_{20} гетероарила, где алкил, алкенил, алкинил, карбоциклил, арил, гетероциклил и гетероарил независимо и необязательно замещены одной или более группами, выбранными из:

- $—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—N(R^5)—*$;
- $—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—N(R^5)_2$;
- $—(C_3-C_{12} \text{ карбоциклил})$;
- $—(C_3-C_{12} \text{ карбоциклил})—*$;
- $—(C_3-C_{12} \text{ карбоциклил})—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—NR^5—*$;
- $—(C_3-C_{12} \text{ карбоциклил})—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—N(R^5)_2$;
- $—(C_3-C_{12} \text{ карбоциклил})—NR^5—C(=NR^5)NR^5—*$;
- $—(C_6-C_{20} \text{ арил})$;
- $—(C_6-C_{20} \text{ арил})—*$;

- (C₆-C₂₀ арилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₆-C₂₀ арилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—C(=NR^{5a})N(R⁵)—*;
- (C₂-C₂₀ гетероциклил);
- (C₂-C₂₀ гетероциклил)—*;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₂-C₉ гетероциклил)—NR⁵—C(=NR^{5a})NR⁵—*;
- (C₁-C₂₀ гетероарил);
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—*;
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- (C₁-C₂₀ гетероарил)—NR⁵—C(=NR^{5a})N(R⁵)—*;
- C(=O)—*;
- C(=O)—(C₂-C₂₀ гетероциклилдиил)—*;
- C(=O)N(R⁵)₂;
- C(=O)N(R⁵)—*;
- C(=O)N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)C(=O)R⁵;
- C(=O)N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)C(=O)N(R⁵)₂;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)CO₂R⁵;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)C(=NR^{5a})N(R⁵)₂;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵C(=NR^{5a})R⁵;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₈ алкилдиил)—NR⁵(C₂-C₅ гетероарил);
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₂₀ гетероарилдиил)—N(R⁵)—*;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₂₀ гетероарилдиил)—*;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₂₀ гетероарилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
- C(=O)NR⁵—(C₁-C₂₀ гетероарилдиил)—(C₂-C₂₀ гетероциклилдиил)—C(=O)NR⁵—
- (C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*;
- N(R⁵)₂;
- N(R⁵)—*;
- N(R⁵)C(=O)R⁵;
- N(R⁵)C(=O)—*;
- N(R⁵)C(=O)N(R⁵)₂;
- N(R⁵)C(=O)N(R⁵)—*;
- N(R⁵)CO₂R⁵;
- NR⁵C(=NR^{5a})N(R⁵)₂;
- NR⁵C(=NR^{5a})N(R⁵)—*;
- NR⁵C(=NR^{5a})R⁵;
- N(R⁵)—(C₂-C₅ гетероарил);

—O—(C₁-C₁₂ алкил);
 —O—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
 —O—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—*;
 —S(=O)₂—(C₂-C₂₀ гетероциклдиил)—*;
 —S(=O)₂—(C₂-C₂₀ гетероциклдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂;
 —S(=O)₂—(C₂-C₂₀ гетероциклдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—NR⁵—*; и
 —S(=O)₂—(C₂-C₂₀ гетероциклдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—OH;

или R² и R³ вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

X¹, X², X³, и X⁴ независимо выбраны из группы, состоящей из связи, C(=O), C(=O)N(R⁵), O, N(R⁵), S, S(O)₂ и S(O)₂N(R⁵);

R⁵ выбран из группы, состоящей из H, C₆-C₂₀ арила, C₆-C₂₀ арилдиила, C₁-C₁₂ алкила, и C₁-C₁₂ алкилдиила, или две группы R⁵ вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

R^{5a} выбран из группы, состоящей из C₆-C₂₀ арила и C₁-C₂₀ гетероарила;

где звездочка * указывает на сайт присоединения L, и где один из R¹, R², R³ и R⁴ присоединен к L;

L представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из:

Q—C(=O)—(ПЭГ)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—O—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)C(=O)—(C₂-C₅ моногетероциклдиил)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—(MCgluc)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(MCgluc)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)C(=O)—(C₂-C₅ моногетероциклдиил)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—N(R⁵)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—N(R⁵)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—N⁺(R⁵)₂—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—N(R⁵)CH(AA₁)C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—N(R⁵)CH(AA₁)C(=O)—N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—SS—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—OC(=O)—;

Q—C(=O)—(ПЭГ)—SS—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—C(=O)—;

Q—C(=O)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—;

Q—C(=O)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—;

Q—C(=O)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—N(R⁵)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)—C(=O);

$Q-C(=O)-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-C(=O)-(PEP)-N(R^5)-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)C(=O)-(C_2-C_5 \text{ моногетероциклилдиил})-$;

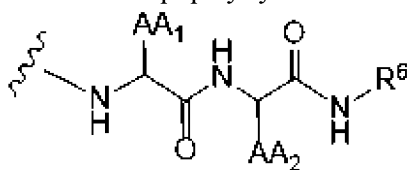
$Q-C(=O)-CH_2CH_2OCH_2CH_2-(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})-CH_2O-(ПЭГ)-C(=O)-(MCgluc)-$;

$Q-C(=O)-CH_2CH_2OCH_2CH_2-(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})-CH_2O-(ПЭГ)-C(=O)-(MCgluc)-N(R^5)-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)C(=O)-(C_2-C_5 \text{ моногетероциклилдиил})-$; и

$Q-(CH_2)_m-C(=O)-(PEP)-N(R^5)-(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})-N(R^5)C(=O)-(C_2-C_5 \text{ моногетероциклилдиил})-$;

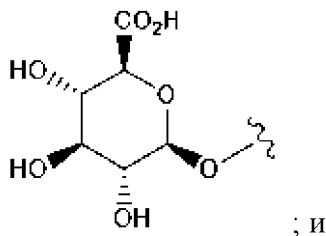
где ПЭГ имеет формулу: $-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_m-$; m является целым числом от 1 до 5, а n является целым числом от 2 до 50;

PEP имеет формулу:



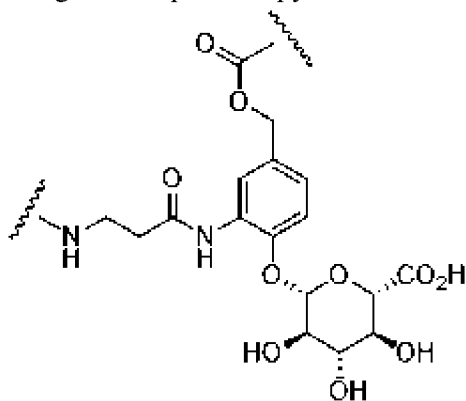
где AA₁ и AA₂ независимо выбраны из боковой цепи аминокислоты, или AA₁ или AA₂ и соседний атом азота образуют 5-членное кольцо пролиновой аминокислоты, а волнистая линия указывает на точку присоединения и;

R⁶ выбран из группы, состоящей из C₆-C₂₀ арилдиила и C₁-C₂₀ гетероарилдиила, замещенного $-CH_2O-C(=O)-$ и необязательно:

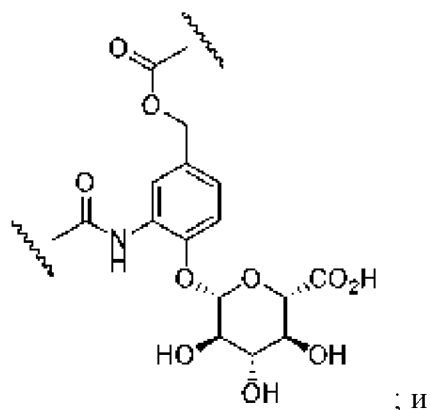


; и

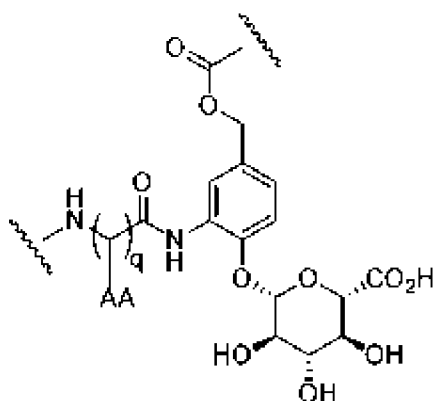
MCgluc выбран из групп:



;



; и

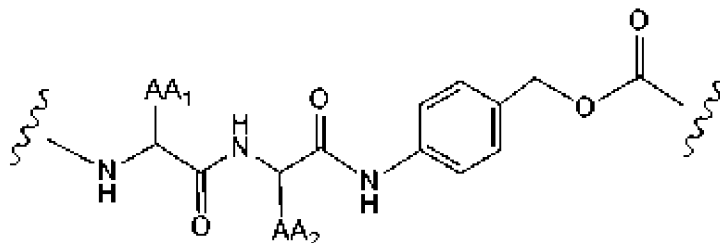


где q равно от 1 до 8, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты; и

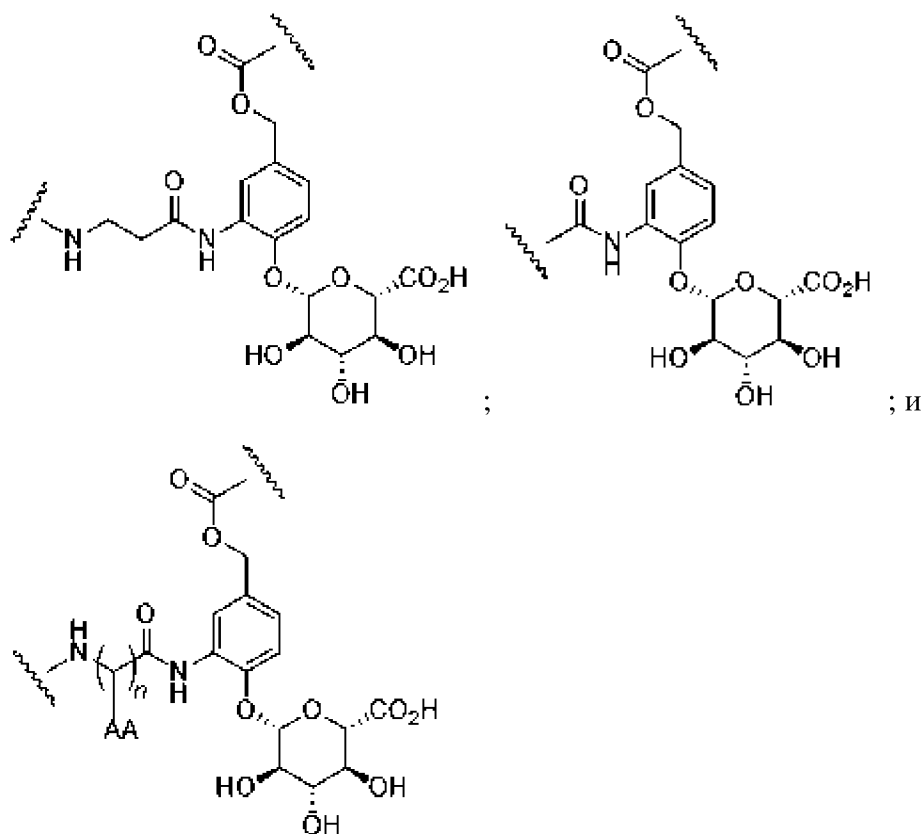
Q выбран из группы, состоящей из N-гидроксисукцинимидила, N-гидроксисульфосукцинимидила, малеимида и фенокси, замещенных одной или более группами, независимо выбранными из F, Cl, NO₂, и SO₃⁻;

где алкил, алкилдиил, алкенил, алкенилдиил, алкинил, алкинилдиил, арил, арилдиил, карбоцикллил, карбоцикллилдиил, гетероцикллил, гетероцикллилдиил, гетероарил и гетероарилдиил необязательно замещены одной или более группами, независимо выбранными из F, Cl, Br, I, —CN, —CH₃, —CH₂CH₃, —CH=CH₂, —C≡CH, —C≡CCH₃, —CH₂CH₂CH₃, —CH(CH₃)₂, —CH₂CH(CH₃)₂, —CH₂OH, —CH₂OCH₃, —CH₂CH₂OH, —C(CH₃)₂OH, —CH(OH)CH(CH₃)₂, —C(CH₃)₂CH₂OH, —CH₂CH₂SO₂CH₃, —CH₂OP(O)(OH)₂, —CH₂F, —CHF₂, —CF₃, —CH₂CF₃, —CH₂CHF₂, —CH(CH₃)CN, —C(CH₃)₂CN, —CH₂CN, —CH₂NH₂, —CH₂NHSO₂CH₃, —CH₂NHCH₃, —CH₂N(CH₃)₂, —CO₂H, —COCH₃, —CO₂CH₃, —CO₂C(CH₃)₃, —COCH(OH)CH₃, —CONH₂, —CONHCH₃, —CON(CH₃)₂, —C(CH₃)₂CONH₂, —NH₂, —NHCH₃, —N(CH₃)₂, —NHCOCH₃, —N(CH₃)COCH₃, —NHS(O)₂CH₃, —N(CH₃)C(CH₃)₂CONH₂, —N(CH₃)CH₂CH₂S(O)₂CH₃, —NHC(=NH)H, —NHC(=NH)CH₃, —NHC(=NH)NH₂, —NHC(=O)NH₂, —NO₂, =O, —OH, —OCH₃, —OCH₂CH₃, —OCH₂CH₂OCH₃, —OCH₂CH₂OH, —OCH₂CH₂N(CH₃)₂, —O(CH₂CH₂O)_n—(CH₂)_mCO₂H, —O(CH₂CH₂O)_nH, —OP(O)(OH)₂, —S(O)₂N(CH₃)₂, —SCH₃, —S(O)₂CH₃, и —S(O)₃H.

31. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 30, где РЕР имеет формулу:



32. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 30, где РЕР выбран из групп:



где n равно 1 или более, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты.

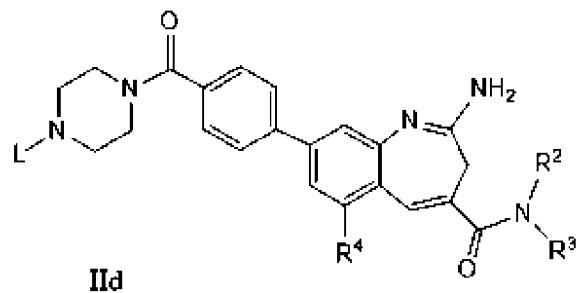
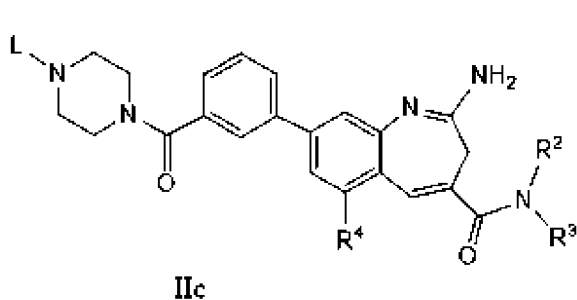
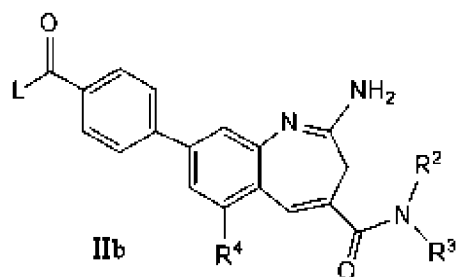
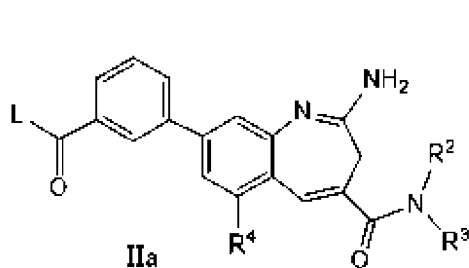
33. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-32, где AA₁ и AA₂ независимо выбраны из боковой цепи встречающейся в природе аминокислоты.

34. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-32, где AA₁ и AA₂ независимо выбраны из H, —CH₃, —CH(CH₃)₂, —CH₂(C₆H₅), —CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, —CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂, —CH₂CH(CH₃)₂, —CH₂SO₃H и —CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂.

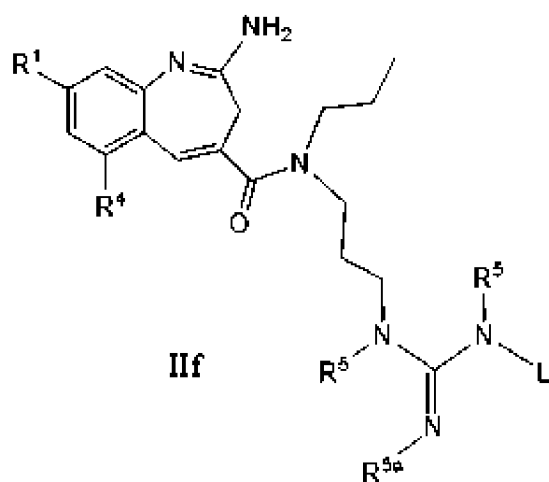
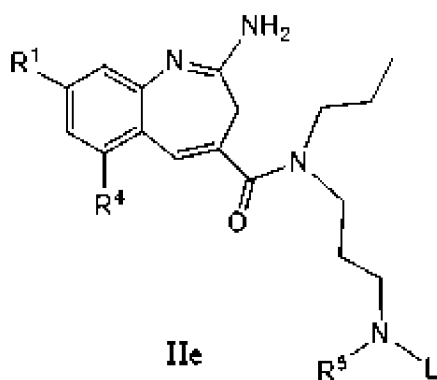
35. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 34, где AA₁ представляет собой —CH(CH₃)₂, и AA₂ представляет собой —CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂.

36. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-32, где AA₁ и AA₂ независимо выбраны из аспарагиновой кислоты GlcNAc, —CH₂SO₃H и —CH₂OPO₃H.

37. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-32, выбранное из формул IIa-d:



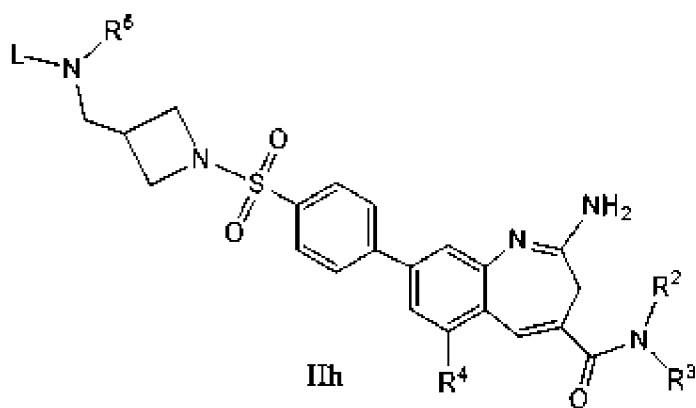
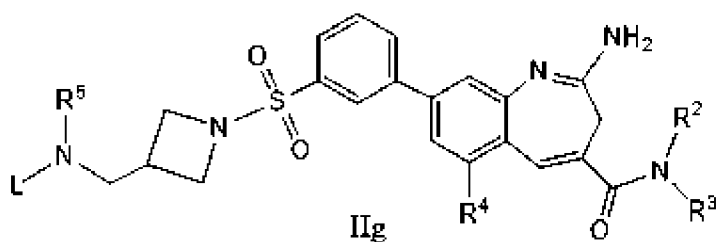
38. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-32, выбранное из формул IIe и IIf:



где R^{5a} формулы If выбран из группы, состоящей из фенила и пиридила, необязательно замещенных одной или более группами, выбранными из F, Cl, Br, I, —CN, —NO₂ и —OCH₃.

39. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 38, где L представляет собой Q—C(=O)—(ПЭГ)— или Q—C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—.

40. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-32, выбранное из формул IIg и IIh:



41. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 40, где L представляет собой —C(=O)—(ПЭГ)—C(=O)—(PEP)—.

42. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-41, где R² и R³ каждый представляет собой C₁-C₈ алкил.

43. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 42, где R² и R³, каждый, представляет собой —CH₂CH₂CH₃.

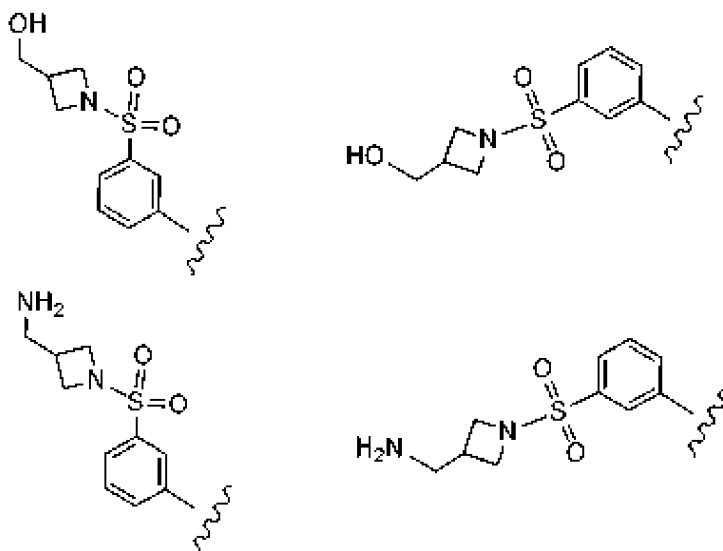
44. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 43, где X² и X³, каждый, представляет собой связь, и R² или R³ представляет собой —O—(C₁-C₁₂ алкил).

45. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 44, где R² или R³ представляет собой —OCH₂CH₃.

46. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-32, где один из R¹ и R⁴ выбран из —(C₆-C₂₀ арилдиил)—S(=O)₂—(C₂-C₂₀ гетероциклилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—N(R⁵)₂ и —(C₆-C₂₀ арилдиил)—S(=O)₂—(C₂-C₂₀ гетероциклилдиил)—(C₁-C₁₂ алкилдиил)—ОН.

47. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 46, где C₆-C₂₀ арилдиил представляет собой фенилдиил, а C₂-C₂₀ гетероциклилдиил представляет собой азетидиндиил.

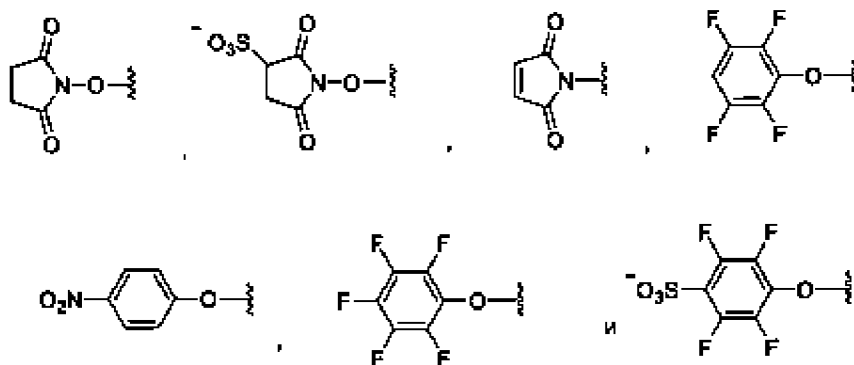
48. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-32, где один из R¹ и R⁴ выбран из формул:



49. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-32, где один из R^1 и R^4 представляет собой $—C(=O)NR^5—(C_1-C_{20} \text{ гетероарилдиил})—(C_2-C_{20} \text{ гетероциклилдиил})—C(=O)NR^5—(C_1-C_{12} \text{ алкилдиил})—NR^5—L$.

50. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 49, где C_1-C_{20} гетероарилдиил представляет собой пиридиндиил, а C_2-C_{20} гетероциклилдиил представляет собой пиперидиил.

51. Аминобензазепин-линкерное соединение по любому из пп. 30-32, где Q выбран из:



52. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 30, выбранное из таблицы 2а.

53. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 30, выбранное из таблицы 2b.

54. Аминобензазепин-линкерное соединение по п. 30, выбранное из таблицы 2с.

55. Иммуноконъюгат, полученный путем конъюгации антитела с аминобензазепин-линкерным соединением по любому из пп. 52-54.

56. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество иммуноконъюгата по любому из пп. 1-29 и один или более фармацевтически приемлемых разбавителей, наполнителей, носителей или эксципиентов.

57. Способ лечения рака, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 56 пациенту, нуждающемуся в этом.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что рак является чувствительным к провоспалительной ответной реакции, индуцированной агонизмом TLR7 и/или TLR8.

59. Способ по п. 57, отличающийся тем, что рак представляет собой рак, экспрессирующий PD-L1.

60. Способ по п. 57, отличающийся тем, что рак представляет собой рак, экспрессирующий HER2.

61. Способ по п. 57, отличающийся тем, что рак представляет собой рак, экспрессирующий CEA.

62. Способ по любому из пп. 57-61, отличающийся тем, что рак выбран из рака мочевого пузыря, рака мочевыводящих путей, уротелиальной карциномы, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, карциномы из клеток Меркеля, рака толстой кишки, колоректального рака, рака желудка, и рака молочной железы.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

64. Способ по п. 62, отличающийся тем, что карцинома из клеток Меркеля представляет собой метастатическую карциному из клеток Меркеля.

65. Способ по п. 62, отличающийся тем, что рак желудка представляет собой рак желудка сверхэкспрессирующий HER2.

66. Способ по пункту 62, отличающийся тем, что рак представляет собой аденокарциному гастроэзофагеального перехода.

67. Применение иммуноконъюгата по любому из пп. 1-29 для лечения рака.

68. Способ получения иммуноконъюгата формулы I по п. 1, отличающийся тем, что аминокислотопептид-линкерное соединение формулы II по п. 30 конъюгировано с антителом.

69. Иммуноконъюгат по п. 2, отличающийся тем, что конструкция антитела представляет собой антитело PD-L1 типа A и содержит полипептид вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина, при этом:

полипептид вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина содержит определяющую комплементарность область 1 (HCDR1), включающую любую из SEQ ID NO: 1-23 типа A, определяющую комплементарность область 2 (HCDR2), включающую любую из SEQ ID NO: 24-57, и определяющую комплементарность область 3 (HCDR3), включающую любую из SEQ ID NO: 58-95; или

полипептид вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина содержит определяющую комплементарность область 1 (LCDR1), включающую любую из SEQ ID NO: 96-128, определяющую комплементарность область 2 (LCDR2), включающую любую из SEQ ID NO: 129-151, и определяющую комплементарность область 3 (LCDR3), включающую любую из SEQ ID NO: 152-155;

при этом последовательности представлены на фигурах 1-4.

70. Иммуноконъюгат по п. 2, отличающийся тем, что конструкция антитела

представляет собой антитело PD-L1 типа А и содержит вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 223-264 или по меньшей мере ее CDR; и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 265-306 или по меньшей мере ее CDR;

при этом последовательности представлены на фигурах 1-4.

71. Иммуноконъюгат по п. 2, отличающийся тем, что конструкция антитела представляет собой антитело PD-L1 типа А и содержит полипептид вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 90% идентичной любой из SEQ ID NO: 223-264, и полипептид вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO: 265-306;

при этом последовательности представлены на фигурах 1-4.

72. Иммуноконъюгат по п. 2, отличающийся тем, что конструкция антитела представляет собой антитело PD-L1 типа А и содержит полипептиды тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина или по меньшей мере их CDR PD-L1-связывающего агента, представленные на фигурах 1A-D.

73. Иммуноконъюгат по п. 2, отличающийся тем, что конструкция антитела представляет собой антитело PD-L1 типа В и содержит полипептид вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина, при этом:

полипептид вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина содержит определяющую комплементарность область 1 (HCDR1), включающую любую из SEQ ID NO: 308-321, определяющую комплементарность область 2 (HCDR2), включающую любую из SEQ ID NO: 322-338, и определяющую комплементарность область 3 (HCDR3), включающую любую из SEQ ID NO: 339-359; или

полипептид вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина содержит определяющую комплементарность область 1 (LCDR1), включающую любую из SEQ ID NO: 360-374, определяющую комплементарность область 2 (LCDR2), включающую любую из SEQ ID NO: 131 и 375-386, и определяющую комплементарность область 3 (LCDR3), включающую любую из SEQ ID NO: 387-398;

при этом последовательности представлены на фигурах 5-8.

74. Иммуноконъюгат по п. 2, отличающийся тем, что конструкция антитела представляет собой антитело PD-L1 типа В и содержит вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 430-450 или по меньшей мере ее CDR; и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина любой из SEQ ID NO: 451-471 или по меньшей мере ее CDR;

при этом последовательности представлены на фигурах 5-8.

75. Иммуноконъюгат по п. 2, отличающийся тем, что конструкция антитела представляет собой антитело PD-L1 типа В и содержит полипептид вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, по меньшей

мере на 90% идентичной любой из SEQ ID NO: 430-450, и полипептид вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO: 451-471;

при этом последовательности представлены на фигурах 5-8.

76. Иммуноконъюгат по п. 2, отличающийся тем, что конструкция антитела представляет собой антитело PD-L1 типа В и содержит полипептиды тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина или по меньшей мере их CDR PD-L1-связывающего агента, представленные на фигурах 5А-В.

По доверенности

Связующее вещество	SEQ ID	HCDR1	SEQ ID	HCDR2	SEQ ID	HCDR3	SEQ ID	LCDR1	SEQ ID	LCDR2	SEQ ID	LCDR3
1	1	SYAIS	24	VINPSAGST DYAQKFQ G	58	DLYPYVVVVAAGS YGMDV	96	RASQGIDSYLA	129	AASSLQS	152	QQSYSTPIT
2	2	SYVMH	25	WMNPNSDI AGYAKKFQ G	59	PSIVGAYDAFDI	97	RASQSISSWLA	129	AASSLQS	153	QQSYTTPIT
3	3	RHLLH	26	WISPOHGV RNYAKKFQ G	60	ESVEGYFDL	98	RASQSISSYLN	129	AASSLQS	154	QQIFSTPLT
4	4	SHMH	27	WVSPSHGL TGIAQKFQ G	61	DNWNVHDAFDI	99	RASQGISSYLA	130	GASNLQS	155	QQSYSTPLT
5	5	RFMH	28	WMSLNSGL TGIAQKFQ G	62	GTYNDAFDI	100	RASQTISNYLN	129	AASSLQS	153	QQSYTTPIT
6	6	SYVIH	29	WMKPSSGT TGIAQKFQ G	63	EQWLVNDAFDI	101	RASQSVDRNYVT	131	GASTRAT	156	QQSYTTPYT
7	7	NYVIH	30	WMNPNGD VAGYAKKF QG	64	DSSGWMRNDAFDI	102	RASQGISQYLA	132	GASNLHS	157	QQIFTTPLT
8	2	SYVMH	31	GIDPNSGGT NYAQKFQ G	65	SMFPTIFGDNAFDI	103	QASQDIGNYLN	133	AASSLES	155	QQSYSTPLT
9	8	HYYMH	32	WMNPDSGS TGIAQKFQ G	66	ALFPYPFYFYMD V	104	RASQGIRNDLG	134	SASNLQS	158	QQANSFPFT
10	9	GYYMH	33	WMSLNSGL TGIAQKFQ G	67	DRGWFDP	97	RASQSISSWLA	135	AASTLES	159	QQSYTTPYS

Фиг. 1А

11	7	NYYIH	34	WMNPNGDV AGYADSFQG	64	DSSGWMRNDAFDI	102	RASQGISQYLA	132	GASNLHS	160	QQTFITPLT
12	10	NYMYH	35	WISTYHGST NYAQKFQG	68	DARGYSGYDL	105	RASQIIGNYLA	136	HASILET	161	QQSYSTPT
13	2	SYMH	25	WMNPNSDIA GYAQKFQG	69	EGRHGEYLY	106	RASQIISYLN	129	AASSLQS	162	QQGFSTPFT
14	11	TYVH	36	WMNPNTVY TGSAQKFQG	70	EGWGSSGYFDY	107	QASQDISNYLN	129	AASSLQS	163	QQSFTNPVT
15	12	SYALS	37	RIIPAVGSVT Y AQKFQG	71	HLFPTVFDDYYGM DV	108	RASQGISNYLA	137	AASTLQS	164	QQSYSAPYT
16	1	SYAIS	38	GIIPFGTAN Y AQKFQG	72	GGYSYGSFQH	109	RASQGISNNLN	138	AATTLQS	165	QQSYSTPYT
17	13	RHYVH	39	WMSPSSGIT GYAQKFQG	73	VRWSSDAFDI	98	RASQSISSYLN	129	AASSLQS	155	QQSYSTPLT
18	2	SYMH	40	WMTPTGN AGY AQKFQ G	74	EEWLGHFQH	110	RASQGISNGLS	137	AASTLQS	166	QQSHSTPLT
19	14	SHYMH	41	WMNPNSGN TG Y AQKFQ G	75	ERFLGGMDV	111	RASQSITGWLA	129	AASSLQS	165	QQSYSTPYT
20	15	DYYMH	42	WMHPNSGH TG Y AQKFQ G	74	EEWLGHFQH	97	RASQSISSWLA	139	DATHLET	152	QQSYSTPIT
21	14	SHYMH	43	WMNPNSGH TGNAQKFQ G	76	GNWVDAFDI	112	RASQGIRNDLA	137	AASTLQS	155	QQSYSTPLT
22	16	GYTLH	44	WIDPNSGVT SSAQKFQG	77	ESEVMMAYFQH	113	QASQDISSYLN	140	AASSLQT	165	QQSYSTPYT
23	9	GYMH	45	WISPNSGVT DFTQKFQG	78	ESWSGEFDY	114	RASQSITTYLN	141	AASSLQG	165	QQSYSTPYT

Фиг. 1В

24	17	NHYMH	46	WMNPNSGH TGYAQRFGG	79	EAVAGPMDV	SEQ ID	LCDR1	SEQ ID	LCDR2	SEQ ID	LCDR3
25	9	GYMH	25	WMNPNSDIA GYAQKFQG	80	DAWELLAFDI	98	RASQSISSYLN	129	AASSLQS	155	QQSYSTPLT
26	17	NHYMH	41	WMNPNSGN TGYAQKFQ G	81	DRWDGDYYSA	115	RASQSVSTWLA	142	AASNLES	165	QQSYSTPYT
27	7	NYIYH	47	WMSPNGGN TGYAQKFQ G	82	ESWELTGFDY	116	RASQSISSWLA	143	DVSHLES	167	QQSYSTPFT
28	2	SYMH	41	WMNPNSGN TGYAQKFQ G	83	ERFAGGMDA	117	QASQGISNYLA	144	DASSLQS	155	QQSYSTPLT
29	18	NSYMH	48	WMDPSSGY TGSAAHKFQG	84	DSGGAFDI	118	RASQSLSSSSLA	131	GASTRAT	168	QQYGSSPFT
30	19	TYMH	49	WMNPNSAD TGYAEKFQG	85	EVFEGGMDV	119	RASEHIANWLA	145	GVSSLES	165	QQSYSTPYT
31	2	SYMH	50	WLTPSTGHA GYAQKFQG	86	EGYGGNYGN	120	RASQSVGSWVA	146	PASTLQS	155	QQSYSTPLT
32	2	SYMH	51	WMNPNSGH TGYAQKFQ G	87	EDFYGDFDY	121	RASQSISSWLA	147	DASNLET	169	QQTYSTPIT
33	20	RHFIH	44	WIDPNSGVT SSAQKFQG	88	ELSRWGFDY	122	RASQGISRYLA	137	AASTLQS	155	QQSYSTPLT
34	3	RHLLH	52	WTSPQHGVR NYAHKFQG	60	ESVEGYFDL	123	RASQTVSSNYLA	148	GASTRAS	170	QQYYTTPLT

Fig. 1C

35	2	SYMH	53	MINPSGGSTS YAQKFQG	89	DIFPTMIAGGGFDL	98	RASQSISSYLN	129	AASSLQS	171	QQSFSTPLT
36	21	TFGIS	38	GIPIFGTANY AQKFQG	90	GGYSYGSFDY	97	RASQSISSWLA	147	DASNLET	172	QQSYSTPPT
37	22	SYGIN	41	WMNPNSGNT GYAQKFQG	91	GSFPLVFTTFGVGD V	109	RASQGISNNLN	150	ATSTLQS	165	QQSYSTPYT
38	2	SYMH	54	WISPRSGVTS YAQKFQG	92	DLDYVRAFDI	124	RSSQGIRNDLS	151	LASNHS	173	LQHNSYPLT
39	2	SYMH	55	WMDPNSGNT GYAQKFQG	93	ESWGGYFDL	126	RASQISRWLA	129	AASSLQS	165	QQSYSTPYT
40	23	NHYVH	56	WMNPTGGIT GYAQKFQG	94	DRITYAFDI	97	RASQSISSWLA	149	DSSSLQT	174	QQSYSTPVT
41	14	SHYMH	43	WMNPNSGHT GNAQKFQG	76	GNWVDAFDI	125	RDSHSITTWLA	142	AASNLES	175	QHFYNTQYT
42	3	RHLLH	57	WVSPHGLTG YAPRFQG	95	VHGSGSDGMDV	127	RASQVIRNDLA	137	AASTLQS	176	QQSLQYPSHF

Fig. 1D

Связующее вещество	SEQ ID	HFW1	SEQ ID	HFW2	SEQ ID	HFW3	SEQ ID	HFW4
1	177	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGGTFS	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
2	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	197	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCAI	202	WGQGTLVT VSS
3	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
4	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
5	179	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFN	192	WVRQAPGQG LEWMG	198	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCTR	202	WGQGTLVT VSS
6	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
7	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	193	WVRQAPGQG LEWLG	197	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCAI	202	WGQGTLVT VSS
8	180	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGNTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
9	181	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGHSFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
10	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	194	WVRQAPGQG LEWIG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS

Фиг. 2А

11	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYTFT	193	WVRQAPGQG LEWLG	197	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAI	202	WGQGTLVT VSS
12	177	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGGTFS	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
13	182	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYPFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
14	183	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYRFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
15	184	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSKASGGTFS	192	WVRQAPGQG LEWMG	199	RVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
16	184	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSKASGGTFS	192	WVRQAPGQG LEWMG	199	RVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
17	185	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGDTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
18	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYTFT	195	WVRQAPGQG LEWVG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
19	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	203	WGQGTIVT VSS
20	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	200	RVTMTRDTSTSTVNMESSLR SEDVAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS
21	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	204	WGQGTMT VSS
22	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	202	WGQGTLVT VSS

Фиг. 2B

23	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	202	WGQGTILVT VSS
24	185	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGDTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	203	WGQGTTVT VSS
25	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	202	WGQGTILVT VSS
26	186	QVQLAQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	202	WGQGTILVT VSS
27	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	202	WGQGTILVT VSS
28	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	203	WGQGTTVT VSS
29	187	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFS	192	WVRQAPGQG LEWMG	201	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAE	204	WGQGTIMVT VSS
30	188	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFS	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	203	WGQGTTVT VSS
31	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	202	WGQGTILVT VSS
32	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	202	WGQGTILVT VSS
33	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	205	WGPGTIMVT VSS
34	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDNAVYYCAR	206	WGRGTILVT VSS

Фиг. 2С

35	188	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYDFS	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	206	WGRGTLVT VSS
36	184	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFS	192	WVRQAPGQG LEWMG	199	RVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAR	202	WGQGTILVT VSS
37	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	204	WGQGTMTVT VSS
38	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	203	WGQGTTVT VSS
39	189	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYSFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	206	WGRGTLVT VSS
40	190	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFI	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	204	WGQGTMTVT VSS
41	178	QVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	196	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDVAVYYCAR	204	WGQGTMTVT VSS
42	191	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGYTFT	192	WVRQAPGQG LEWMG	199	RVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCAR	203	WGQGTTVT VSS

Фиг. 2D

Связующее вещество	SEQ ID	LFW1	SEQ ID	LFW2	SEQ ID	LFW3	SEQ ID	LFW4
1	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC	217	FGGGTKVEIK
2	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC	217	FGGGTKVEIK
3	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC	217	FGGGTKVEIK
4	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC	217	FGGGTKVEIK
5	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC	217	FGGGTKVEIK
6	208	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	211	WYQQKPGQAPRLIY	214	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YC	218	FGQGTKVEIK
7	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC	217	FGGGTKVEIK
8	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC	217	FGGGTKVEIK
9	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC	217	FGGGTKVEIK
10	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC	217	FGGGTKVEIK

Фиг. 3А

11	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	217	FGGGTKVEIK
12	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	217	FGGGTKVEIK
13	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	217	FGGGTKVEIK
14	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	217	FGGGTKVEIK
15	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	217	FGGGTKVEIK
16	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	217	FGGGTKVEIK
17	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	217	FGGGTKVEIK
18	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	217	FGGGTKVEIK
19	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	218	FGQGTKVEIK
20	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	219	FGQGTREIK
21	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	217	FGGGTKVEIK
22	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	210	WYQQKPGKAPKLLIY	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC	221	FGQGTKEIK

Фиг. 3В

23	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY C	218	FGQGTKVEI K
24	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY C	220	FGGGTKLEIK
25	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY C	221	FGQGTKLEIK
26	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY C	222	FGPGTKVDI K
27	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY C	217	FGGGTKVEI K
28	208	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS C	211	WYQQKPGQAPRLLI Y	214	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY C	222	FGPGTKVDI K
29	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY C	221	FGQGTKLEIK
30	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY C	217	FGGGTKVEI K
31	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY C	219	FGQGTRLEIK
32	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY C	218	FGQGTKVEI K
33	208	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS C	211	WYQQKPGQAPRLLI Y	214	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY C	217	FGGGTKVEI K
34	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYY C	219	FGQGTRLEIK

Фиг. 3С

35	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C	218	FGQGTKVEI K
36	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C	218	FGQGTKVEI K
37	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C	217	FGGGTKVEI K
38	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C	221	FGQGTKLEIK
39	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C	218	FGQGTKVEI K
40	209	DIQITHSPSSLSASVGRLTITC	212	WYHQPWNAPKLM Y	215	GVPSRFSGSGSGTYFTLTISSLQPEDFATYY C	218	FGQGTKVEI K
41	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	213	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C	218	FGQGTKVEI K
42	207	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT C	210	WYQQKPGKAPKLLI Y	216	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAPYY C	222	FGPGTKVDI K

Фиг. 3D

Связующее вещество	SEQ ID	VH
1	223	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGVNPSAGSTDYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDLYPYVVVVAAGSYGMDVWGQGTLLTVSS
2	224	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGMNPNSDIAGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAIPSVGAYDAFDIWGQGTLLTVSS
3	225	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRHLLHWVRQAPGQGLEWMGWISPHQHGVRNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARESVGEYFDLWGQGTLLTVSS
4	226	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHHMHVVRQAPGQGLEWMGWVSPSHGLTGAYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDNWNVHDAFDIWGQGTLLTVSS
5	227	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNRFMHVVRQAPGQGLEWMGWMNSGLTGAYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTRGTYNDAFDIWGQGTLLTVSS
6	228	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWMGWMKPSSGTTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREQWLVNDAFDIWGQGTLLTVSS
7	229	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWMGWMKPSSGTTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAREQWLVNDAFDIWGQGTLLTVSS
8	230	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGNTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGGIDPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSMFPTIFGDNAFDIWGQGTLLTVSS
9	231	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGHSFTHYMHVVRQAPGQGLEWMGMNPDSGSTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARALFPYPFYYYMDVWGQGTLLTVSS
10	232	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWIGWMSLNSGLTGAYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRGWFDPWGQGTLLTVSS
11	233	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNYYIHWVRQAPGQGLEWLGWMNPNGDVAGYADSFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAIDSSGWMRNDAFDIWGQGTLLTVSS

Фиг. 4А

12	234	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGTFSSNYMHVVRQAPGQGLEWMGWISTYHGSTNYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARDARGYSGYDLWGQGTLLTVSS
13	235	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPTSYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNSDIAGYAQKFQGRVTMTRDTSTST TVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGRHGEYLYWGQGTLLTVSS
14	236	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFTTYVHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNTVYTGSAQKFQGRVTMTRDTSTST TVYMELSSLRSEDTAVYYCAREGWSSGYFDYWGQGTLLTVSS
15	237	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYALSWVRQAPGQGLEWMGRIIPAVGSVTYAQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARHLFPTVFDYYGMDVWGQGTLLTVSS
16	238	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYALSWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGGYSYGSFQHWGQGTLLTVSS
17	239	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTRHYVHVVRQAPGQGLEWMGWMSPSSGITGYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARVRWSSDAFDIWGQGTLLTVSS
18	240	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWVGWMTPTSGNAGYAQKFQGRVTMTRDTSTST TVYMELSSLRSEDTAVYYCAREEWLGHFQHWGQGTLLTVSS
19	241	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTST TVYMELSSLRSEDTAVYYCARERFLGGMDVWGQGTLLTVSS
20	242	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHVVRQAPGQGLEWMGWMHPNSGHTGYAQKFQGRVTMTRDTSTST TVNMELSSLRSEDTAVYYCAREEWLGHFQHWGQGTLLTVSS
21	243	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGHTGNAQKFQGRVTMTRDTSTST TVYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWVDAFDIWGQGTMTVSS
22	244	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYTLHVVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGVTSSAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARESEVMMAFYFQHWGQGTLLTVSS
23	245	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWISPNSGVTDFQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARESWSGEFDYWGQGTLLTVSS

24	246	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTNHYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGHTGYAQRFFQGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCAREAVAGPMDVWGQGTITVTVSS
25	247	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNSDIAGYAQKFQGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARDARELLAFDIWGQGTITVTVSS
26	248	QVQLAQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNHYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARDRWGDYYSAGWQGTITVTVSS
27	249	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHVVRQAPGQGLEWMGWMSPNGGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARESWELTGFDYWGQGTITVTVSS
28	250	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARERFAGGMDAWGQGTITVTVSS
29	251	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSNHYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPSSGYTGSAAHKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCAEDSGGAFDIWGQGTITVTVSS
30	252	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNSADTGYAEKFQGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCAREVFEGGMDVWGQGTITVTVSS
31	253	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGWLTPTSTGHAGYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCAREGYGGNYGNWGQGTITVTVSS
32	254	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGHTGYAQKFQGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCAREDFYGDYWGQGTITVTVSS
33	255	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRHFIHVVRQAPGQGLEWMGWIDPNSGVTSSAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARELSRWGFDYWGPGTITVTVSS
34	256	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRHLLHVVRQAPGQGLEWMGWISPDHGVRYAHKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARESVGEYFDLWGRGTITVTVSS
35	257	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGMNPSSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARDIFPTMIAGGGFDLWGRGTITVTVSS

Фиг. 4C

36	258	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTFGISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGGYSYGSFDYWGQGTLVTVSS
37	259	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGINWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARGSFPLVFTIFGVGDVWGQGTMTVTVSS
38	260	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGWISPRSGVTSYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARDLDYVRAFDIWGQGTTVTVSS
39	261	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNNGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTST TVYMELSSLRSEDTAVYYCARESWGGYFDLWGRGTLVTVSS
40	262	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFINHYVHWVRQAPGQGLEWMGWMNP TGGITGYAQKFQGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARDRTTYAFDIWGQGTMTVTVSS
41	263	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHYMHWVRQAPGQGLEWMGWMNPNSGHTGNAQKFQGRVTMTRDTSTST TVYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWVDAFDIWGQGTMTVTVSS
42	264	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFRHLLHWVRQAPGQGLEWMGWVSPHGLTGYAPRFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARVHGSGSDGMDVWGQGTITVTVSS

Фиг. 4D

Связующее вещество	SEQ ID	VL
1	265	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIDSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSISTPI TFGGGTKVEIK
2	266	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSISTPI TFGGGTKVEIK
3	267	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQIFSTPLT FGGGTKVEIK
4	268	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSISTPL TFGGGTKVEIK
5	269	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQTISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSISTPI TFGGGTKVEIK
6	270	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDRNYVTWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQSISTT PYTFGGGTKVEIK
7	271	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISQYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQIFSTTP LTFGGGTKVEIK
8	272	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDIGNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSISTP LTFGGGTKVEIK
9	273	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP FTFGGGTKVEIK
10	274	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTESQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSISTPY SFGGGTKVEIK
11	275	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISQYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQIFSTPL TFGGGTKVEIK
12	276	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQIIGNYLNWYQQKPGKAPKLLIYHASILETGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSISTPTF GGGTKVEIK
13	277	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQIISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGFSTPFT FGGGTKVEIK
14	278	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSISTNP VTFGGGTKVEIK
15	279	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSISTAP YTFGGGTKVEIK
16	280	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYAATTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSISTP YTFGGGTKVEIK

17	281	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK
18	282	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNGLSWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSTPLTFGGGKVEIK
19	283	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITGWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKEIK
20	284	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDATHLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPI
21	285	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIHNDLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK
22	286	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKEIK
23	287	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITTYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKEIK
24	288	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK
25	289	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSTWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKEIK
26	290	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYDVSHLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPI
27	291	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK
28	292	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLSSSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQYGSSTFTFGPGTKVDIK
29	293	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEHIANWLAWYQQKPGKAPKLLIYGVSSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKEIK
30	294	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVGSWVAWYQQKPGKAPKLLIYPASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGKVEIK
31	295	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISIPWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPI
32	296	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKEIK
33	297	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRASGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQYYTTPLTFGGGKVEIK
34	298	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSFSTPLTFGQGTKEIK

Фиг. 4F

35	299	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP TFGQGTKVEIK
36	300	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYATSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPY TFGQGTKVEIK
37	301	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIRNDLSWYQQKPGKAPKLLIYLASNHSVGPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPL TFGGGTKVEIK
38	302	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPY TFGQGTKLEIK
39	303	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDSSSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPV TFGQGTKVEIK
40	304	DIQITHSPSSLSASVGYRLTITCRDSHSITTWLAWYHQKPNWAPKLMIIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTYFTLTISSLQPEDFATYYCQHFYNTQ YTFGQGTKVEIK
41	305	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRNDLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSLQYP SHFFGQGTKVEIK
42	306	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPL TFGPGTKVDIK

Фиг. 4G

Связующее вещество	SEQ ID	HCDR1	SEQ ID	HCDR2	SEQ ID	HCDR3	SEQ ID	LCDR1	SEQ ID	LCDR2	SEQ ID	LCDR3
1	308	SDYMH	322	WMSPYNGIT GYAQKFQG	339	DRFSGSYDY	360	RASQSISSWLA	375	AASSLQS	387	QQSYSTPYT
2	309	GYMH	323	WMSPSSGITG YAKKFQG	340	DRGWFD	361	RASQSVGTWLA	376	AASTLEN	388	QQSFSTPYT
3	310	SYMH	324	WMTTNSGIT GYAQKFQG	341	EGYSSGLDY	360	RASQSISSWLA	375	AASSLQS	387	QQSYSTPYT
4	311	GYIH	325	GIPIFGTASY AQKFQG	342	DGRFWSGYPDY	362	RASQGISNYLA	377	RASNLES	389	QQSYSTPLT
5	312	THYMH	326	WMNPNSGH AGSAQKFQG	343	ESIYVAGDY	360	RASQSISSWLA	378	AASTLQR	387	QQSYSTPYT
6	313	SHDIN	327	WMNPNSGNT GYAQKFQG	344	DRWYMGADY	363	RASQSISTWLA	379	AASTLQS	390	QQSYSTPFT
7	310	SYMH	327	WMNPNSGNT GYAQKFQG	345	DDWGGDWFD	364	QASQDISNHLN	380	GASNLR	391	QQSYSTPIT
8	312	THYMH	328	WMNPNSGNT GYSQKFQG	346	ERLSVAGFDY	365	RASQGISSWLA	375	AASSLQS	387	QQSYSTPYT
9	314	DHYLH	329	WMNPNGNT GYAQKFQG	347	EPLQLGGFDY	366	RASESISSWLA	375	AASSLQS	389	QQSYSTPLT
10	309	GYMH	330	WMNPNGGTT GYAQNFQG	348	EGFGPNAFDI	360	RASQSISSWLA	381	AASNLS	392	QYYSTPYT
11	309	GYMH	327	WMNPNSGNT GYAQKFQG	349	DSWYGDWFD	367	RASQSVGSWLA	382	GASSLQS	389	QQSYSTPLT
12	309	GYMH	322	WMSPYNGIT GYAQKFQG	350	EVIEVGMDV	360	RASQSISSWLA	383	AASHLQS	387	QQSYSTPYT
13	315	NYMH	323	WMSPSSGITG YAKKFQG	351	EAWFGE	368	RASQNISN	375	AASSLQS	393	QQSYSLPYT
14	316	AYYVH	331	WMNPNGIT DSAQKFQG	352	EAYVA	365	RASQGISSWLA	375	AASSLQS	389	QQSYSTPLT
15	317	RHYVH	332	WMNPNSGSA GYAQKFQG	353	ERGYNAFDY	369	RASQSLSSSYLA	131	GASTRAT	394	HQYFTTPLT
16	318	NYIH	333	WIHPRSGAT GYAPKFQG	354	DSVFGLDY	370	RASQSISSYLN	379	AASTLQS	395	QQSYSMPLYT
17	310	SYMH	334	WISPRSGVTS YAKKFQG	355	DLDYVRAFDI	371	RASQSISSWLA	375	AASSLQS	387	QQSYSTPYT

18	310	SYMH	335	WMDPNSGNT GYAQKFQG	356	ESWGGYFDL	360	RASQSISSWLA	385	DSSSLQT	396	QQSYSTPVT
19	319	NHYVH	336	WMNPTGGIT GYAQKFQG	357	DRTTYAFDI	372	RDSHSITTWLA	386	AASNLES	397	QHFYNTQYT
20	320	SHYMH	337	WMNPNNSGHT GNAQKFQG	358	GNWVDAFDI	373	RASQVIRNDLA	379	AASTLQS	398	QQSLQYPSHF
21	321	RHLLH	338	WVSPHGLTG YAPRFQG	359	VHGSGSDGMDV	374	RASQISRYLN	379	AASTLQS	389	QQSYSTPLT

Фиг. 5B

Связующее вещество	SEQ ID	HFW1	SEQ ID	HFW2	SEQ ID	HFW3	SEQ ID	HFW4
1	399	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFS	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
2	400	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
3	399	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFS	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
4	401	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPGGGLEW MG	410	RVTITADESTSTAYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
5	399	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFS	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
6	400	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
7	400	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
8	399	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFS	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
9	402	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
10	400	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	412	WGQGTTVTV SS
11	400	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
12	400	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	408	WVRQAPGGGLEW IG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	412	WGQGTTVTV SS
13	400	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
14	403	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYNFS	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	412	WGQGTTVTV SS
15	400	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
16	607	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTLP	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	411	WGQGTLLVTV SS
17	400	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPGGGLEW MG	409	RVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	412	WGQGTTVTV SS

Фиг. 6А

18	405	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFT	407	WVRQAPQGQLEW MG	409	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	413	WGRGTLVTV SS
19	406	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFI	407	WVRQAPQGQLEW MG	409	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	414	WGQGTMTVT SS
20	400	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPQGQLEW MG	409	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	414	WGQGTMTVT SS
21	401	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFT	407	WVRQAPQGQLEW MG	410	RVTITADESTSTAYMESSLRSED TAVYYCAR	412	WGQGTTVT SS

Фиг. 6B

Связующее вещество	SEQ ID	LFW1	SEQ ID	LFW2	SEQ ID	LFW3	SEQ ID	LFW4
1	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	425	FGGGTKVEIK
2	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	425	FGGGTKVEIK
3	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	425	FGGGTKVEIK
4	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	425	FGGGTKVEIK
5	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	426	FGQGTKLEIK
6	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	427	FGQGTKVEIK
7	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	428	FGQGTRLEIK
8	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	427	FGQGTKVEIK
9	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	426	FGQGTKLEIK
10	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	427	FGQGTKVEIK
11	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	425	FGGGTKVEIK
12	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYC	428	FGQGTRLEIK

Фиг. 7А

13	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYC	427	FGQGTKVEIK
14	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYC	425	FGGGTKVEIK
15	416	EIVMTQSPATLSVSPGER ATLSC	419	WYQQKPGQAPRLIY	422	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSED FAVYYC	428	FGQGTRLEIK
16	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYC	426	FGQGTKLEIK
17	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYC	426	FGQGTKLEIK
18	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYC	427	FGQGTKVEIK
19	417	DIQITHSPSSLSASVGYRL TITC	420	WYHQKPWNAPKLMY	423	GVPSRFSGSGSGTYFTLTISSLQPE DFATYYC	427	FGQGTKVEIK
20	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	421	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYC	427	FGQGTKVEIK
21	415	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC	418	WYQQKPGKAPKLLIY	424	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFAPYYC	429	FGPGTKVDIK

Фиг. 7B

Связу ющее веществ о	SEQ ID	VH
1	430	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSDYMHWVRQAPGGLEWMGWMSPYNGITGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARDRFSGSYDYWGQGTLVTVSS
2	431	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPGGLEWMGWMSPSSGITGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARDRGWFDPPWGQGLTVTVSS
3	432	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYYMHVVRQAPGGLEWMGWMNTNSGITGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREGYSSGLDYWGQGTLVTVSS
4	433	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTGYIHWVRQAPGGLEWMGGIPIFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCARDGRFWSGYPDYWGQGLTVTVSS
5	434	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHYMHVVRQAPGGLEWMGWMNPNSGHAGSAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARESLAVAGDYWGQGLTVTVSS
6	435	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHDINWVRQAPGGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARDRWYMGADYWGQGLTVTVSS
7	436	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARDWGGDWFDPPWGQGLTVTVSS
8	437	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSHYMHVVRQAPGGLEWMGWMNPNSGNTGYSQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARERLSVAGFDYWGQGLTVTVSS
9	438	QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKASGYTFTDHYLHWVRQAPGGLEWMGWMNPNGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREPLQLGGFDYWGQGLTVTVSS
10	439	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPGGLEWMGWMNPNGGTTGYAQNFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCAREGFGPNAFDIWGQGLTVTVSS
11	440	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHVVRQAPGGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCARDWSYGDWFDPPWGQGLTVTVSS

12	441	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWIGWMSPLYNGITGYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCAREVIEVGMDVWGQGITTVTVSS
13	442	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYMHWVRQAPGQGLEWMGWMSPLSSGITGYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCAREAWFGELSTWGGILVTVSS
14	443	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNFSAYYVHWVRQAPGQGLEWMGWMPNPNRGITDSAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCAREAYVAAFDIWGQGITTVTVSS
15	444	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTRHYVHWVRQAPGQGLEWMGWMPNNSGSAGYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARERGYNADFVWGQGITTVTVSS
16	445	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLPNYIHWVRQAPGQGLEWMGWIHPRSGATGYAPKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARDSEVGLDYWGQGITTVTVSS
17	446	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGWISPRSGVTSYAPKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARDLDYVRAFDIWGQGITTVTVSS
18	447	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGWMDPNSGNTGYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARESWGGYFDLWGRGTLTVTVSS
19	448	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFINHYVHWVRQAPGQGLEWMGWMPNPTGGITGYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARDRTTYAFDIWGQGITMTVTVSS
20	449	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTSHYMHVVRQAPGQGLEWMGWMPNNSGHTGNAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCARGNWVDAFDIWGQGITMTVTVSS
21	450	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTRHLLHWVRQAPGQGLEWMGWVSPHGLTGYAPRFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARVHGSGSDGMDVWGQGITTVTVSS

Связующее вещество	SEQ ID	VL
1	451	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGGGTKVEIK
2	452	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVGTWLAHYQQKPGKAPKLLIYAASILENGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSFSTPYTFGGGTKVEIK
3	453	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGGGTKVEIK
4	454	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
5	455	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK
6	456	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIK
7	457	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNHLNHYQQKPGKAPKLLIYGASNLQRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPIYTFGQGTKLEIK
8	458	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIK
9	459	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKLEIK
10	460	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPYTFGQGTKVEIK
11	461	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVGSWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
12	462	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASHLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK

Фиг. 8С

13	463	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNISNFWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSLPYTF GQGTKVEIK
14	464	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAHYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTF GGGTKVEIK
15	465	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLSSSYLAHYQQKPGKAPRLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCHQYFTTPLT FQQGTRLEIK
16	466	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSPYTF GQGTKLEIK
17	467	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISRWLAHYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTF GQGTKLEIK
18	468	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAHYQQKPGKAPKLLIYDSSSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPVTF GQGTKVEIK
19	469	DIQITHSPSSLSASVGYRLTITCRDSHSITTWLAHYHQPWNAPKLMIAASNLES GVPSRFSGSGSGTYFTLTISSLQPEDFATYYCQHFYNTQYTFGQGTKVEIK
20	470	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRNDLAHYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSLQYPSHF FQQGTKVEIK
21	471	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAPYYCQQSYSTPLTF GPGTKVDIK

Фиг. 8D