

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291007** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.06.28**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.09.29**

(51) Int. Cl. *C07D 223/16* (2006.01)  
*A61K 47/68* (2017.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)  
*C07K 16/32* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(54) **АМИДСВЯЗАННЫЕ ИММУНОКОНЬЮГАТЫ АМИНОБЕНЗАЗЕПИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/908,253**

(32) **2019.09.30**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/053224**

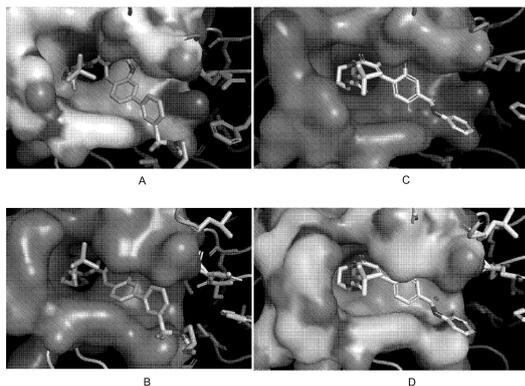
(87) **WO 2021/067242 2021.04.08**

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

(72) Изобретатель:  
**Кудирка Ромас, Сафина Брайан, Чжоу Мэттью (US)**

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

(57) Изобретение предусматривает иммуноконъюгаты формулы I, содержащие антитело, связанное посредством конъюгации с одним или несколькими производными 8-амидо-2-аминобензазепина. Изобретение также предусматривает композиции промежуточного соединения производного 8-амидо-2-аминобензазепина, содержащего реакционноспособную функциональную группу. Такие композиции промежуточных соединений являются подходящими субстратами для образования иммуноконъюгатов через линкер или связывающий фрагмент. Изобретение дополнительно предусматривает способы лечения рака с помощью иммуноконъюгатов.



**202291007**  
**A1**

**202291007**  
**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573814EA/061

### АМИД-СВЯЗАННЫЕ ИММУНОКОНЬЮГАТЫ АМИНОБЕНЗАЗЕПИНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки США № 62/908253, поданной 30 сентября 2019 г., которая полностью включена посредством ссылки.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 21 сентября 2020 г., названа 17019\_004WO1\_SL.txt и имеет размер 54747 байт.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

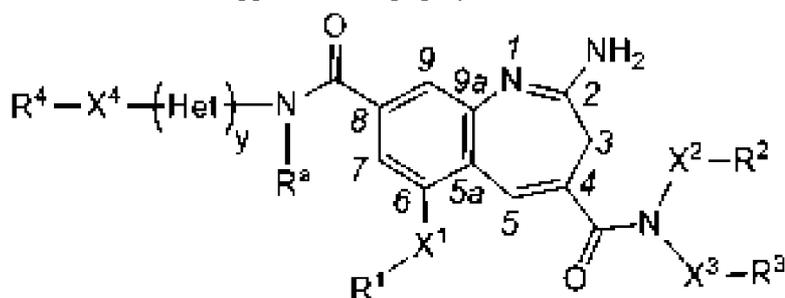
Настоящее изобретение относится главным образом к иммуноконъюгату, содержащему антитело, конъюгированное с одной или несколькими молекулами 8-амидо-2-аминобензазепина.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Новые композиции и способы доставки антител и адъювантов дендритных клеток/миелоидных клеток необходимы для достижения труднодоступных опухолей и/или расширения возможностей лечения онкологических больных и других субъектов. Настоящее изобретение предлагает такие композиции и способы.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение в целом касается иммуноконъюгатов, содержащих антитело, связанное посредством конъюгации с одним или несколькими производными 8-амидо-2-аминобензазепина. Изобретение дополнительно касается промежуточных композиций производных 8-амидо-2-аминобензазепина, содержащих реакционноспособную функциональную группу. Такие промежуточные композиции являются подходящими субстратами для образования иммуноконъюгатов, в которых антитело может быть ковалентно связано линкером L с положением 8 8-амидо-2-аминобензазепинового фрагмента формулы:



где один из  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  присоединен к L, y равен 0 или 1, и Het представляет собой 5- или 6-членный моноциклический гетероцикл или 5- или 6-членный

моноциклический гетероарилдиил. Положения структуры 3H-бензо[b]азепина пронумерованы в соответствии с правилами IUPAC. Заместители R<sup>a</sup>, X<sup>1-4</sup> и R<sup>1-4</sup> определены в данном документе.

Изобретение дополнительно касается применение таких иммуноконъюгатов при лечении заболевания, в частности рака.

Одним из аспектов изобретения является иммуноконъюгат, содержащий антитело, ковалентно присоединенное к линкеру, который ковалентно связан с одним или несколькими фрагментами 8-амидо-2-аминобензазепина.

Другой аспект изобретения представляет собой соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер.

Другим аспектом изобретения является способ лечения рака, включающий введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата, содержащего антитело, присоединенное путем конъюгации к одному или нескольким фрагментам 8-амидо-2-аминобензазепина.

Другим аспектом изобретения является применение иммуноконъюгата, содержащего антитело, присоединенное путем конъюгации к одному или нескольким фрагментам 8-амидо-2-аминобензазепина, для лечения рака.

Другой аспект изобретения представляет собой способ получения иммуноконъюгата путем конъюгации одного или нескольких фрагментов 8-амидо-2-аминобензазепина с антителом.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1A показана *in vitro* активность агонистов BZA-1 и BZA-2 по отношению к TLR8 в репортерных клетках НЕК293 человека. BZA-1: 2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N,N-дипропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамид. BZA-2: трет-бутил-(3-(2-амино-8-(3-((3-(гидроксиметил)азетидин-1-ил)сульфонил)фенил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамат.

На Фиг. 1B показана *in vitro* активность агонистов BZA-1 и BZA-2 по отношению к TLR7 в репортерных клетках НЕК293 человека.

На Фиг. 1C показана *in vitro* активность агонистов BZA-3 и BZA-4 по отношению к TLR8 в репортерных клетках НЕК293 человека. BZA-3: 2-амино-8-бензамидо-N,N-дипропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамид. BZA-4: трет-бутил-(3-(2-амино-8-бензамидо-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамат.

На Фиг. 1D показана *in vitro* активность агонистов BZA-3 и BZA-4 по отношению к TLR7 в репортерных клетках НЕК293 человека.

На Фиг. 2 представлено компьютерное изображение докинга BZA-2, показывающее взаимодействие с остатками Asp TLR8 и Leu TLR7.

На Фиг. 3A показано численное решение для докинга BZA-2 с TLR8.

На Фиг. 3B показано численное решение для докинга BZA-2 с TLR7, где гидрофобная трет-бутильная группа BZA-2 взаимодействует с Leu 557 в TLR7.

На Фиг. 3C показано численное решение для докинга BZA-4 с TLR8.

На Фиг. 3D показано численное решение для докинга BZA-4 с TLR7, где гидрофобная трет-бутильная группа BZA-4 взаимодействует с Leu 557 в TLR7.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее будет приведено детальное описание некоторых вариантов осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы на проводительных структурах и формулах. Ввиду того, что изобретение будет описано в сочетании с перечисленными вариантами осуществления, должно быть понятно, что они не должны ограничивать изобретение такими вариантами осуществления. Напротив, предполагается, что изобретение должно охватывать все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем изобретения, определяемый формулой изобретения.

Для специалиста в данной области техники очевидно существование многих способов и материалов, сходных или эквивалентных описанным в данном документе, которые могут применяться для практической реализации настоящего изобретения. Изобретение никоим образом не ограничивается описанными способами и материалами.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термин «иммуноконъюгат» относится к конструкту антитела, которое ковалентно связана с фрагментом адьюванта через линкер. Термин «адьювант» относится к веществу, способному вызывать иммунный ответ у субъекта, подвергшегося воздействию адьюванта. Фраза «фрагмент адьюванта» относится к адьюванту, который ковалентно связан с конструктом антитела, например, через линкер, как описано в данном документе. Фрагмент адьюванта может вызывать иммунный ответ при связывании с конструктом антитела или после отщепления (например, ферментативного расщепления) от конструкта антитела после введения иммуноконъюгата субъекту.

«Адьювант» относится к веществу, способному вызывать иммунный ответ у субъекта, подвергшегося воздействию адьюванта. Фраза «фрагмент адьюванта» относится к адьюванту, который ковалентно связан с конструктом антитела, например, посредством линкера, как описано в данном документе. Фрагмент адьюванта может вызывать иммунный ответ, пока он связан с конструктом антитела или после отщепления (например, ферментативного расщепления) от конструкта антитела после введения иммуноконъюгата субъекту.

Термины «Toll-подобный рецептор» и «TLR» относятся к любому члену семейства высококонсервативных белков млекопитающих, которые распознают ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны и действуют как ключевые сигнальные элементы врожденного иммунитета. Полипептиды TLR имеют общую характерную структуру, которая включает внеклеточный домен с богатыми лейцином повторами, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, участвующий в передаче сигналов TLR.

Термины «Toll-подобный рецептор 7» и «TLR7» относятся к нуклеиновым кислотам или полипептидам, имеющих по меньшей мере примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или более идентичности последовательностей с общедоступной последовательностью TLR7,

например, номер доступа GenBank AAZ99026 для полипептида TLR7 человека или номер доступа GenBank AAK62676 для мышинового полипептида TLR7.

Термины «Toll-подобный рецептор 8» и «TLR8» относятся к нуклеиновым кислотам или полипептидам, имеющим по меньшей мере примерно 70%, примерно 80%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или более идентичности последовательностей с общедоступной последовательностью TLR7, например, № доступа GenBank AAZ95441 для полипептида TLR8 человека, или № доступа GenBank AAK62677 для мышинового полипептида TLR8.

«Агонист TLR» представляет собой вещество, которое прямо или косвенно связывается с TLR (например, TLR7 и/или TLR8), индуцируя передачу сигналов TLR. Любое обнаруживаемое различие в сигнализации TLR может указывать на то, что агонист стимулирует или активирует TLR. Различия в сигнализации могут проявляться, например, в изменении экспрессии генов-мишеней, в фосфорилировании компонентов сигнальной трансдукции, во внутриклеточной локализации нижерасположенных элементов, таких как ядерный фактор-кВ (NF-кВ), в ассоциации определенных компонентов (таких как киназа, ассоциированная с рецептором IL-1 (IRAK)) с другими белками или внутриклеточными структурами, или в биохимической активности компонентов, таких как киназы (такие как митоген-активируемая протеинкиназа (МАРК)).

«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), соединенные дисульфидными связями. Каждая цепь состоит из структурных доменов, которые называются доменами иммуноглобулина. Эти домены подразделяются на разные категории по размерам и функциям, например, переменные домены или области легкой и тяжелой цепей ( $V_L$  и  $V_H$ , соответственно) и константные домены или области легкой и тяжелой цепей ( $C_L$  и  $C_H$ , соответственно). N-конец каждой цепи образует переменную область из примерно от 100 до 110 или более аминокислот, называемую паратопом, главным образом ответственным за распознавание антигена, т.е. антигенсвязывающий домен. Легкие цепи классифицируются на каппа- или лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируются на гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эpsilon-цепи, которые в свою очередь образуют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Антитела IgG представляют собой большие молекулы размером около 150 кДа, состоящие из четырех пептидных цепей. Антитела IgG содержат две идентичные тяжелые цепи класса  $\gamma$  с молекулярной массой около 50 кДа и две идентичные легкие цепи с молекулярной массой около 25 кДа, т.е. тетрамерную

четвертичную структуру. Две тяжелые цепи связаны каждая друг с другом и с легкой цепью дисульфидными связями. Полученный тетрамер имеет две одинаковые половины, которые вместе образуют Y-образную форму. Каждый конец вилки содержит идентичный антигенсвязывающий домен. У человека имеется четыре подкласса IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), названные в порядке их содержания в сыворотке (т.е. IgG1 является наиболее распространенным). Как правило, антигенсвязывающий домен антитела наиболее важен для специфичности и аффинности связывания с раковыми клетками.

«Конструкт 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 является конструктом, содержащим по меньшей мере антигенсвязывающую область антитела, одну или с другими компонентами, которые вместе составляют антигенсвязывающий конструкт. В данной области техники известно множество различных типов «фрагментов» антител, включая, например, (i) Fab-фрагмент, который представляет собой моновалентный фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_H1$ , (ii) фрагмент  $F(ab')_2$ , который представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, (iii) фрагмент Fv, состоящий из доменов  $V_L$  и  $V_H$  одного плеча антитела, (iv) фрагмент Fab', полученный в результате разрыва дисульфидного мостика фрагмента  $F(ab')_2$  с использованием мягких восстановительных условий, (v) стабилизированный дисульфидными связями фрагмент Fv (dsFv), и (vi) одноцепочечный Fv (scFv), который представляет собой моновалентную молекулу, состоящую из двух доменов фрагмента Fv (т.е.  $V_L$  и  $V_H$ ), соединенных синтетическим линкером, который позволяет синтезировать два домена в единую полипептидную цепь.

Антитело или фрагменты антител могут быть частью более крупного конструкта, например, конъюгата или конструкта слияния фрагмента антитела с дополнительными областями. Например, в некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела может быть слит с областью Fc, как описано в данном документе. В других вариантах осуществления фрагмент антитела (например, Fab или scFv) может быть частью химерного антигенного рецептора или химерного T-клеточного рецептора, например, путем слияния с трансмембранным доменом (необязательно, с промежуточным линкером или «стеблем» (например, шарнирной областью)) и необязательным межклеточным сигнальным доменом. Например, фрагмент антитела может быть слит с гамма- и/или дельта-цепями T-клеточного рецептора, чтобы получить подобный T-клеточному рецептору конструкт, который связывает PD-L1. В еще одном варианте осуществления фрагмент антитела является частью биспецифического активатора T-клеток (BiTE), содержащего связывающий домен CD1 или CD3 и линкер.

«Эпитоп» означает любую антигенную детерминанту или эпитопную детерминанту антигена, с которой связывается антигенсвязывающий домен (т.е. на паратопе антигенсвязывающего домена). Антигенные детерминанты обычно состоят из химически

активных поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда.

Термины «рецептор Fc» или «FcR» относятся к рецептору, который связывается с Fc-областью антитела. Существует три основных класса рецепторов Fc: (1) FcγR, который связывается с IgG, (2) FcαR, который связывается с IgA, и (3) FcεR, который связывается с IgE. Семейство FcγR включает несколько членов, таких как FcγI (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16A) и FcγRIIIB (CD16B). Рецепторы Fcγ различаются по своей аффинности к IgG, а также имеют различную аффинность к подклассам IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4).

«Биоаналог» относится к одобренному конструктору антитела, обладающему свойствами активного вещества, аналогичными, например, ранее одобренному конструктору антитела, нацеленного на PD-L1, такому как атезолизумаб (тецентрик (TECENTRIQ™), Genentech, Inc.), дурвалумаб (имфинзи (IMFINZI™), AstraZeneca) и авелумаб (бавенсио (BAVENCIO™), EMD Serono, Pfizer); ранее одобренному конструктору антитела, нацеленного на HER2, такому как трастузумаб (герцептин (HERCEPTIN™), Genentech, Inc.) и пертузумаб (перьета (PERJETA™), Genentech, Inc.); или антителу, нацеленному на РЭА, такому как лабетузумаб (CEA-CIDE™, MN-14, hMN14, Immunomedics) рег. № CAS 219649-07-7).

«Биобеттер» (biobetter) относится к одобренному конструктору антитела, который представляет собой усовершенствование ранее утвержденного конструктора антитела, такого как атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, трастузумаб, пертузумаб и лабетузумаб. Биобеттер может иметь одну или несколько модификаций (например, измененный профиль гликана или уникальный эпитоп) по сравнению с ранее одобренным конструктором 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 неприродные (не встречающиеся в природе) аминокислоты и их стереоизомеры. «Стереоизомеры» данной аминокислоты относятся к изомерам, имеющим одинаковую молекулярную формулу и внутримолекулярные связи, но отличающиеся пространственным расположением связей и атомов (например, L-аминокислота и соответствующая D-аминокислота). Аминокислоты могут быть гликозилированы (например, N-связанные гликаны, O-связанные гликаны, фосфогликаны, C-связанные гликаны или глипирование) или дегликозилированы. Аминокислоты могут обозначаться в данном документе либо общеизвестными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Встречающиеся в природе аминокислоты - это аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также аминокислоты, которые были впоследствии модифицированы, например, гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Встречающиеся в природе α-аминокислоты включают, без ограничений, аланин (Ala),

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. Стереизомеры встречающихся в природе  $\alpha$ -аминокислот включают, без ограничений, 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 аминокислоты, образующиеся 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 либо в L-, либо в D-конфигурации, которые функционируют 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, метионинсульфоксид и метионинметилсульфоний. «Аминокислотные миметики» относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислоты, но функционируют аналогично природной аминокислоте.

«Линкер» относится к функциональной группе, которая ковалентно связывает два или более фрагментов в соединении или материале. Например, связывающий фрагмент может ковалентно связывать фрагмент адьюванта с конструктором антитела в иммуноконъюгате.

“Связывающий фрагмент” относится к функциональной группе, которая ковалентно связывает два или более фрагментов в соединении или материале. Например, связывающий фрагмент может ковалентно связывать фрагмент адьюванта с антителом в иммуноконъюгате. Полезные связи для соединения связывающих фрагментов с белками и другими материалами включают, без ограничений, амиды, амины, сложные эфиры, карбаматы, мочевины, тиоэфиры, тиокарбаматы, тиокарбонаты и тиомочевины.

«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 группы включают двухвалентные полимерные группы, такие как двухвалентный

полиэтиленгликоль, двухвалентная циклоалкильная, двухвалентная гетероциклоалкильная, двухвалентная арильная и двухвалентная гетероарильная группы. «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 несколькими группами, выбранными из галоида, гидроксидной, аминной, алкиламинной, амидной, ацильной, нитро-, циано- и алкоксигрупп.

Волнистая линия («») обозначает точку присоединения указанного химического фрагмента. Если указанный химический фрагмент имеет две волнистые линии («»), следует понимать, что химический фрагмент можно использовать двусторонне, т.е. при порядке чтения слева направо или справа налево. В некоторых вариантах осуществления указанный фрагмент, имеющий две волнистые линии («»), считается используемым как прочитываемый слева направо.

«Алкил» относится к прямому (линейному) или разветвленному насыщенному алифатическому радикалу, имеющему указанное число атомов углерода. Алкил может содержать любое количество атомов углерода, например, от одного до двенадцати. Примеры алкильных групп включают, без ограничений, метил (Me,  $-\text{CH}_3$ ), этил (Et,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1-пропил (n-Pr, н-пропил,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2-пропил (i-Pr, изопропил,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1-бутил (n-Bu, н-бутил,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2-метил-1-пропил (i-Bu, изобутил,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2-бутил (s-Bu, втор-бутил,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2-метил-2-пропил (t-Bu, т-бутил,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1-пентил (н-пентил,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2-пентил ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3-пентил ( $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 2-метил-2-бутил ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3-метил-2-бутил ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3-метил-1-бутил ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2-метил-1-бутил ( $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1-гексил ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2-гексил ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3-гексил ( $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$ ), 2-метил-2-пентил ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3-метил-2-пентил ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4-метил-2-пентил ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3-метил-3-пентил ( $-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 2-метил-3-пентил ( $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2,3-диметил-2-бутил ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3,3-диметил-2-бутил ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1-гептил, 1-октил и т.п. Алкильные группы могут быть замещенными или незамещенными. «Замещенные алкильные» группы могут быть замещены одной или несколькими группами, выбранными из галоида, гидроксидной, аминной, оксо ( $=\text{O}$ ), алкиламинной, амидной, ацильной, нитро-, циано- и алкоксигрупп.

Термин «алкилдиил» относится к двухвалентному алкильному радикалу. Примеры алкилдиильных групп включают, без ограничений, метилен ( $-\text{CH}_2-$ ), этилен ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), пропилен ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) и т.п. Алкилдиильная группа также может называться «алкиленовой» группой.

«Алкенил» относится к прямому (линейному) или разветвленному ненасыщенному алифатическому радикалу, имеющему указанное число атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь, *sp*<sup>2</sup>. Алкенил может содержать от двух до примерно 12 или более атомов углерода. Алкенильные группы представляют собой радикалы, имеющие «цис» и «транс» ориентацию или, альтернативно, «E» и «Z» ориентацию. Примеры включают, без ограничений, этиленил или винил ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), аллил ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), бутенил, пентенил и их изомеры. Алкенильные группы могут быть замещенными или незамещенными. «Замещенные алкенильные» группы могут быть замещены одной или несколькими группами, выбранными из галоида, гидрокси, амина, оксо ( $=\text{O}$ ), алкиламино, амидо, ацила, нитро, циано и алкокси.

Термины «алкенилен» или «алкенилдиил» относятся к двухвалентному углеводородному радикалу с линейной или разветвленной цепью. Примеры включают, без ограничений, этиленилен или винилен ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), аллил ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ ) и т.п.

«Алкинил» относится к прямому (линейному) или разветвленному ненасыщенному алифатическому радикалу, имеющему указанное количество атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь, *sp*. Алкинил может содержать от двух до примерно 12 или более атомов углерода. Например,  $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$ -алкинил включает, без ограничений, этинил ( $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ), пропирил (пропаргил,  $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ), бутинил, пентинил, гексинил и их изомеры. Алкинильные группы могут быть замещенными или незамещенными. «Замещенные алкинильные» группы могут быть замещены одной или несколькими группами, выбранными из галоида, гидрокси, амина, оксо ( $=\text{O}$ ), алкиламино, амидо, ацила, нитро, циано и алкокси.

Термин «алкинилен» или «алкинилдиил» относится к двухвалентному алкинильному радикалу.

Термины «карбоцикл», «карбоциклил», «карбоциклическое кольцо» и «циклоалкил» относятся к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому конденсированному бициклическому или мостиковому полициклическому кольцу, содержащему от 3 до 12 атомов в кольце 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, имеющими одну или несколько двойных или тройных связей в кольце. Типичные частично ненасыщенные карбоциклические группы включают, без ограничений, циклобутен, циклопентен, циклогексен, циклогексадиен (1,3- и 1,4-изомеры), циклогептен, циклогептадиен, циклооктен, циклооктадиен (1,3-, 1,4- и 1,5-изомеры), норборнен и норборнадиен.

Термин «циклоалкилдиил» относится к двухвалентному циклоалкильному радикалу.

«Арил» относится к одновалентному ароматическому углеводородному радикалу из

6-20 атомов углерода ( $C_6—C_{20}$ ), полученному путем удаления одного атома водорода от одного атома углерода исходной ароматической кольцевой системы. Арильные группы могут быть моноциклическими конденсированными с образованием бициклических или трициклических групп, или соединенными связью 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.

Термины «арилен» или «арилдиил» означают двухвалентный ароматический углеводородный радикал из 6-20 атомов углерода ( $C_6—C_{20}$ ), полученный удалением двух атомов водорода от двух атомов углерода исходной ароматической кольцевой системы. Некоторые арилдиильные группы обозначаются в иллюстративных структурах как «Ag». Арилдиил включает бициклические радикалы, содержащие ароматическое кольцо, конденсированное с насыщенным, частично ненасыщенным кольцом или ароматическим карбоциклическим кольцом. Типичные арилдиильные группы включают, без ограничений, радикалы, полученные из бензола (фенилдиила), замещенных бензолов, нафталина, антрацена, бифенилена, инденилена, инданилена, 1,2-дигидронафталина, 1,2,3,4-тетрагидронафтила и т.п. Арилдиильные группы также называются «ариленами» и необязательно замещены одним или несколькими заместителями, описанными в данном документе.

Термины «гетероцикл», «гетероциклил» и «гетероциклическое кольцо» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к насыщенному или частично ненасыщенному (т.е. имеющему одну или более двойных и/или тройных связей в кольце) карбоциклическому радикалу, содержащему от 3 до примерно 20 кольцевых атомов, в которых по меньшей мере один кольцевой атом представляет собой гетероатом, выбранный из азота, кислорода, фосфора и серы, остальные кольцевые атомы представляют собой C, причем один или несколько кольцевых атомов необязательно независимо замещены одним или несколькими заместителями, описанными ниже. Гетероцикл может быть моноциклом, имеющим от 3 до 7 циклов (от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), или бициклом, имеющим от 7 до 10 циклов (от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 6 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например: бицикло [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] система. Гетероциклы описаны в Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), в частности, главы 1, 3, 4, 6, 7 и 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, с 1950 г. по настоящее время), в частности тома 13, 14, 16, 19 и 28; и J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. «Гетероциклил» также включает радикалы, в которых радикалы гетероцикла слиты с насыщенным, частично ненасыщенным кольцом или ароматическим карбоциклическим или гетероциклическим кольцом. Примеры гетероциклических колец включают, без ограничений, морфолин-4-ил, пиперидин-1-ил, пиперазинил, пиперазин-4-ил-2-он, пиперазин-4-ил-3-он, пирролидин-1-ил, тиоморфолин-

4-ил, S-диоксотiomорфолин-4-ил, азокан-1-ил, азетидин-1-ил, октагидропиридо[1,2-a]пиразин-2-ил, [1,4]дiazепан-1-ил, пирролидинил, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиенил, тетрагидропиранил, дигидропиранил, тетрагидротиопиранил, пиперидино, морфолино, тиоморфолино, тиоксанил, пиперазинил, гомопиперазинил, азетидинил, оксетанил, тиетанил, гомопиперидинил, оксепанил, тиепанил, оксазепинил, diaзепинил, тиазепинил, 2-пирролинил, 3-пирролинил, индолинил, 2H-пиранил, 4H-пиранил, диоксанил, 1,3-диоксоланил, пиразолинил, дитианил, дитиоланил, дигидропиранил, дигидротиенил, дигидрофуранил, пиразолидинилимидазолинил, имидазолидинил, 3-азабицикло[3.1.0]гексанил, 3-азабицикло[4.1.0]гептанил, азабицикло[2.2.2]гексанил, 3H-индолилхинолизинил и N-пиридилмочевины. Spiрогетероциклильные фрагменты также включены в объем этого определения. Примеры спирогетероциклильных фрагментов включают аза Spiро[2.5]октанил и аза Spiро[2.4]гептанил. Примерами гетероциклической группы, в которой 2 кольцевых атома замещены оксогруппами (=O), являются пиримидинонил и 1,1-диоксотiomорфолинил. Гетероциклические группы в данном документе, необязательно, независимо замещены одним или несколькими заместителями, описанными в данном документе.

Термин «гетероциклилдиил» относится к двухвалентному насыщенному или частично ненасыщенному (т.е., имеющему одну или более двойных и/или тройных связей в кольце) карбоциклическому радикалу, содержащему от 3 до примерно 20 атомов кольца, в котором по меньшей мере один кольцевой атом представляет собой гетероатом, выбранный из азота, кислорода, фосфора и серы, остальные кольцевые атомы представляют собой C, причем один или более кольцевых атомов необязательно замещены независимо одним или несколькими заместителями, как описано. Примеры 5-членных и 6-членных гетероциклилдиолов включают морфолинилдиил, пиперидинилдиил, пиперазинилдиил, пирролидинилдиил, диоксанилдиил, тиоморфолинилдиил и S-диоксотiomорфолинилдиил.

Термин «гетероарил» относится к моновалентному ароматическому радикалу из 5-, 6- или 7-членных колец и включает конденсированные кольцевые системы (по меньшей мере одно из которых является ароматическим) из 5-20 атомов, содержащие один или несколько гетероатомов, выбранных независимо из азота, кислорода и серы. Примерами гетероарильных групп являются пиридинил (включая, например, 2-гидроксипиридинил), имидазолил, имидазопиридинил, пиримидинил (включая, например, 4-гидроксипиримидинил), пиразолил, триазолил, пиразинил, тетразолил, фурил, тиенил, изоксазолил, тиазолил, оксадиазолил, оксазолил, изотиазолил, пирролил, хинолинил, изохинолинил, тетрагидроизохинолинил, индолил, бензимидазолил, бензофуранил, циннолинил, индазолил, индолизинил, фталазинил, пиридазинил, триазинил, изоиндолил, птеридинил, пуринил, оксадиазолил, тиадиазолил, тиадиазолил, фуразанил, бензофуразанил, бензотиофенил, бензотиазолил, бензоксазолил, хиназолинил, хиноксалинил, нафтиридинил и фуропиридинил. Гетероарильные группы необязательно замещены независимо одним или несколькими заместителями, описанными в данном

документе.

Термин «гетероарилдиил» относится к двухвалентному ароматическому радикалу 5-, 6- или 7-членных колец, и включает конденсированные кольцевые системы (по меньшей мере одна из которых является ароматической) из 5-20 атомов, содержащие один или более гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. Примеры 5-членных и 6-членных гетероарилдиолов включают пиридилдиил, имидазолдиил, пиримидиндиил, пиразолидиил, триазолидиил, пиразиндиил, тетразолидиил, фурилдиил, тиенилдиил, изоксазолидиил, тиазолидиил, оксадиазолидиил, оксазолидиил, изотиазоллидиил и пирролидиил.

Гетероциклические или гетероарильные группы могут быть присоединены через углерод (углерод-связанные) или азот (азот-связанные), где это возможно. В качестве примера и без ограничений, углерод-связанные гетероциклы или гетероарилы присоединены в положении 2, 3, 4, 5 или 6 пиридина, в положении 3, 4, 5 или 6 пиридазина, в положении 2, 4, 5 или 6 пиримидина, в положении 2, 3, 5 или 6 пиразина, в положении 2, 3, 4 или 5 фурана, тетрагидрофурана, тиюфурана, тиюфена, пиррола или тетрагидропиррола, в положении 2, 4 или 5 оксазола, имидазола или тиазола, в положении 3, 4 или 5 изоксазола, пиразола или изотиазола, в положении 2 или 3 азиридина, в положении 2, 3 или 4 азетидина, в положении 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 хинолина или в положении 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 изохинолина.

В качестве примера и без ограничений, азот-связанные гетероциклы или гетероарилы присоединены в положении 1 азиридина, азетидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3-пирролина, имидазола, имидазолидина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиразола, пиразолина, 2-пиразолина, 3-пиразолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина, 1H-индазола, в положении 2 изоиндола или изоиндолина, в положении 4 морфолина и в положении 9 карбазола или  $\beta$ -карболина.

Термины «галлоид» 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)-, т.е. к атому углерода, связанному двойной связью с кислородом и связанному с двумя другими группами во фрагменте, содержащем карбонил.

Используемая в данном документе фраза «четвертичная аммониевая соль» относится к третичному амину, который был кватернизован алкильным заместителем (например, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкилом, таким как метил, этил, пропил или бутил).

Термины «лечить», «лечение» и «лечебный» относятся к любым показателям успеха лечения или облегчения травмы, патологии, состояния (например, рака) или симптома (например, когнитивного нарушения), включая любые объективные или субъективные параметры, такие как облегчение; ремиссия; ослабление симптомов или улучшение 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, результаты медицинского осмотра.

Термины «рак», «новообразование» и «опухоль» используются в данном документе для обозначения клеток, которые демонстрируют автономный нерегулируемый рост, так что клетки демонстрируют aberrантный фенотип роста, характеризующийся значительной потерей контроля над клеточной пролиферацией. Клетки, представляющие интерес для обнаружения, анализа и/или лечения в контексте настоящего изобретения, включают раковые клетки (например, раковые клетки от индивидуума, больного раком), злокачественные раковые клетки, предметастатические раковые клетки, метастатические раковые клетки и неметастатические раковые клетки. Рак практически всех тканей является известным. Фраза «раковая нагрузка» относится к количеству раковых клеток или объему рака у субъекта. Уменьшение раковой нагрузки соответственно относится к уменьшению числа раковых клеток или объема раковых клеток у субъекта. Термин «раковая клетка», используемый в данном документе, относится к любой клетке, которая является раковой клеткой (например, любого из видов рака, от которого можно лечить индивидуума, например, выделенной у индивидуума, больного раком) или получена от раковой клетки, например, клон раковой клетки. Например, раковая клетка может происходить из установленной линии раковых клеток, может быть первичной клеткой, выделенной от индивидуума, больного раком, может быть клеткой-потомком первичной клетки, выделенной от индивидуума, больного раком, и т.п. В некоторых вариантах осуществления термин также может относиться к части раковой клетки, такой как субклеточная часть, часть клеточной мембраны или клеточный лизат раковой клетки. Специалистам в данной области известны многие типы рака, включая солидные опухоли, такие как карциномы, саркомы, глиобластомы, меланомы, лимфомы и миеломы, и циркулирующие виды рака, такие как лейкозы.

Используемый в данном документе термин «рак» включает любую форму рака, включая, без ограничений, солидные раковые опухоли (например, раки кожи, легких, предстательной железы, молочной железы, желудка, мочевого пузыря, толстой кишки, яичников, поджелудочной железы, почек, печени, глиобластома, медуллобластома, лейомиосаркома, плоскоклеточный рак головы и шеи, меланомы и нейроэндокринный рак) и гемобластомы (например, гематологический рак); карциномы; опухоли мягких тканей; саркомы; тератомы; меланомы; лейкозы; лимфомы; и раки головного мозга, включая минимальное остаточное заболевание, включая как первичные, так и метастатические опухоли.

«Экспрессия PD-L1» относится к клетке, которая имеет рецептор PD-L1 на поверхности клетки. Используемый в данном документе термин «сверхэкспрессия PD-L1» относится к клетке, которая имеет большее количество рецепторов PD-L1 по сравнению с соответствующей нераковой клеткой.

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

«Экспрессия HER2» относится к клетке, которая имеет рецептор HER2 на

поверхности клетки. Например, клетка может иметь от примерно 20000 до примерно 50000 рецепторов HER2 на поверхности клетки. При использовании в данном документе, «сверхэкспрессия HER2» относится к клетке, которая имеет более примерно 50000 рецепторов HER2. Например, клетка имеет в 2, 5, 10, 100, 1000, 10000, 100000 или 1000000 раз больше рецепторов HER2 по сравнению с соответствующей нераковой клеткой (например, примерно 1 или 2 миллиона рецепторов HER2). По оценкам, HER2 сверхэкспрессируется в от примерно 25 до примерно 30% случаев рака молочной железы.

«Патология» рака включает все явления, которые ухудшают самочувствие больного. Это включает, без ограничений, аномальный или неконтролируемый рост клеток, метастазирование, нарушение нормального функционирования соседних клеток, высвобождение цитокинов или других продуктов секреции с аномальными уровнями, подавление или обострение воспалительного или иммунологического ответа, неоплазию, предраковое состояние, злокачественное новообразование и инвазию в окружающие или отдаленные ткани или органы, такие как лимфатические узлы.

Используемые в данном документе 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», аналогично, происходит также, когда клетки опухоли диссеминируют в местные или отдаленные ткани и органы, следовательно, распространение опухоли включает в себя метастазы опухоли. «Инвазия опухоли» происходит, когда рост опухоли распространяется локально, нарушая функцию пораженных тканей путем сжатия, разрушения или предотвращения нормальной функции органа.

Используемый в данном документе термин «метастаз» относится к росту раковой опухоли в органе или части тела, которые не связаны напрямую с органом исходной раковой опухоли. Под метастазами следует понимать микрометастазы, которые представляют собой наличие неопределяемого количества раковых клеток в органе или части тела, которые не связаны непосредственно с органом исходной раковой опухоли. Метастазирование также может быть определено как несколько стадий процесса, такого как выход раковых клеток из участка исходной опухоли и миграция и/или инвазия раковых клеток в другие части тела.

Фразы «эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» относятся к дозе или количеству вещества, такого как иммуноконъюгат, которые оказывают терапевтические эффекты, для которых его вводят. Точная доза будет зависеть от цели лечения и может быть определена специалистом в данной области с использованием 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*, 11<sup>е</sup> издание (McGraw-Hill, 2006) и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22<sup>е</sup> издание (Pharmaceutical Press, London, 2012 г.)). В

случае рака терапевтически эффективное количество иммуноконъюгата может уменьшить количество раковых клеток; уменьшить размер опухоли; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и, предпочтительно, останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и, предпочтительно, останавливать) метастазирование опухоли; ингибировать, в некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчить в некоторой степени один или несколько симптомов, связанных с раком. В той мере, в какой иммуноконъюгат может предотвращать рост и/или убивать существующие раковые клетки, он может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Эффективность лечения рака 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 желательна диагностика, лечение или терапия (например, к людям). «Млекопитающее» для целей лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных в зоопарках, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кошки, коровы, овцы, козы, свиньи, верблюды и т.д. В некоторых вариантах осуществления млекопитающим является человек.

Фраза «синергичный адъювант» или «синергическая комбинация» в контексте настоящего изобретения включает комбинацию двух иммуномодуляторов, таких как агонист рецептора, цитокин и адъювантный полипептид, которые в комбинации оказывают синергическое воздействие на иммунитет по сравнению с любым из них при введении отдельно. В частности, раскрытые в данном документе иммуноконъюгаты содержат синергические комбинации заявляемого адъюванта и конструктора антитела. Такие синергические комбинации при введении вызывают больший эффект на иммунитет, например, по сравнению с тем, когда конструктор антитела или адъювант вводят в отсутствие другого фрагмента. Кроме того, можно вводить уменьшенное количество иммуноконъюгата (измеряемое по общему количеству конструкторов антител или общему количеству адъювантов, вводимых как часть иммуноконъюгата) по сравнению с тем, когда либо конструктор антитела, либо адъювант вводят отдельно.

Используемый в данном документе 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 устройства медленного высвобождения, например, миниосмотического насоса, субъекту.

Термины «примерно» и «около», используемые в данном документе для модификации числового значения, указывают на диапазон, окружающий числовое значение. Таким образом, если «X» представляет собой значение, «примерно X» или «около X» указывают значения от 0,9X до 1,1X, например, от 0,95X до 1,05X или от 0,99X до 1,01X.

Ссылка на «примерно X» или «около X» конкретно указывает на по меньшей мере значения X, 0,95X, 0,96X, 0,97X, 0,98X, 0,99X, 1,01X, 1,02X, 1,03X, 1,04X и 1,05X. Соответственно, «примерно X» и «около X» предназначены для представления и обеспечения письменного описания, поддерживающего ограничения формулы изобретения, например, «0,98X».

#### АНТИТЕЛА

Иммуноконъюгат по настоящему изобретению содержит антитело. В объем вариантов осуществления изобретения включены функциональные варианты конструкторов антител или антигенсвязывающего домена, описанные в данном документе. Термин «функциональный вариант», используемый в данном документе, относится к конструктору антитела, имеющему антигенсвязывающий домен с существенной или значимой идентичностью или сходством последовательности с исходным конструктором антитела или антигенсвязывающим доменом, при этом функциональный вариант сохраняет биологическую активность конструктора антитела или антигенсвязывающего домена, вариантом которого он является. Функциональные варианты охватывают, например, такие варианты конструкторов антител или антигенсвязывающего домена, описанных в данном документе (исходный конструктор антитела или антигенсвязывающий домен), которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени, экспрессирующие PD-L1, HER2 или РЭА, в аналогичной степени, в той же степени, или в большей степени, чем исходный конструктор антитела или антигенсвязывающий домен.

По отношению к конструктору антитела или антигенсвязывающему домену, функциональный вариант может иметь, например, по меньшей мере примерно 30%, примерно 50%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или более идентичности аминокислотной последовательности конструктора антитела или антигенсвязывающего домена.

Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность исходного конструктора антитела или антигенсвязывающего домена с по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой. Альтернативно или дополнительно, функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность конструктора исходного антитела или антигенсвязывающего домена с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В этом случае предпочтительно, чтобы неконсервативная аминокислотная замена не препятствовала и не ингибировала биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может усиливать биологическую активность функционального варианта, так что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с исходным конструктором антитела или антигенсвязывающим доменом.

Аминокислотные замены конструкторов антител или антигенсвязывающих доменов по настоящему изобретению предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены аминокислот известны в данной области техники и включают замены аминокислот, при которых одна аминокислота, имеющая

определенные физические и/или химические свойства, заменяется на другую аминокислоту, имеющую такие же или подобные химические или физические свойства. Например, консервативная замена аминокислоты может представлять собой замену кислой/отрицательно заряженной полярной аминокислоты на другую кислотную/отрицательно заряженную полярную аминокислоту (например, Asp или Glu), замену аминокислоты с неполярной боковой цепью на другую аминокислоту с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val и т. д.), замену основной/положительно заряженной полярной аминокислоты, на другую основную/положительно заряженную полярную аминокислоту (например, Lys, His, Arg и т. д.), замену незаряженной аминокислоты с полярной боковой цепью на другую незаряженную аминокислоту с полярной боковой цепью (например, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr и т. д.), замену аминокислоты с бета-разветвленной боковой цепью на другую аминокислоту с бета-разветвленной боковой цепью (например, Ile, Thr и Val), замену аминокислоты с ароматической боковой цепью на другую аминокислоту с ароматической боковой цепью (например, His, Phe, Trp и Tyr) и т.д.

Конструкт антитела или антигенсвязывающий домен могут состоять по существу из определенной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, так чтобы другие компоненты, например, другие аминокислоты, не изменяли существенно биологическую активность конструкта антитела или функционального варианта антигенсвязывающего домена.

В некоторых вариантах осуществления антитела в иммуноконъюгатах содержат модифицированный участок Fc, при этом модификация модулирует связывание участка Fc с одним или несколькими рецепторами Fc.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела в иммуноконъюгатах (например, антитела, конъюгированные с по меньшей мере двумя фрагментами адъюванта) содержат одну или несколько модификаций (например, вставку, делецию и/или замену аминокислоты) в области Fc, что приводит к модулированию связывания (например, повышению связывания или понижению связывания) с одним или несколькими рецепторами Fc (например, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) и/или FcγRIIB (CD16b)) по сравнению с нативным антителом, не имеющим мутации в Fc-области. В некоторых вариантах осуществления антитела в иммуноконъюгатах содержат одну или несколько модификаций (например, вставку, делецию и/или замену аминокислоты) в Fc-области, которые уменьшают связывание Fc-области антитела с FcγRIIB. В некоторых вариантах осуществления антитела в иммуноконъюгатах содержат одну или несколько модификаций (например, вставку, делецию и/или замену аминокислоты) в Fc-области антитела, которые снижают связывание антитела с FcγRIIB при сохранении связывания или повышении связывания с FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) и/или FcγRIIA (CD16a) по сравнению с нативным антителом, не имеющим мутации в области Fc. В некоторых вариантах осуществления антитела в иммуноконъюгатах содержат одну или несколько модификаций в Fc-области, которые

увеличивают связывание Fc-области антитела с Fc $\gamma$ RIIB.

В некоторых вариантах осуществления модулированное связывание обеспечивается мутациями в Fc-области антитела по сравнению с нативной Fc-областью антитела. Мутации могут быть в домене CH2, домене CH3, или их комбинации. «Нативная Fc-область» является синонимом «Fc-области дикого типа» и содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе, или идентичную аминокислотной последовательности Fc-области в нативном антителе (например, цетуксимабе). Fc-область человека с нативной последовательностью включает Fc-область IgG1 человека с нативной последовательностью, Fc-область IgG2 человека с нативной последовательностью, Fc-область IgG3 человека с нативной последовательностью и Fc-область IgG4 человека с нативной последовательностью, а также их встречающиеся в природе варианты. Нативная последовательность Fc включает различные аллотипы Fc (Jefferis et al, (2009) mAbs, 1(4):332-338).

В некоторых вариантах осуществления мутации в области Fc, приводящие к модулированному связыванию с одним или несколькими рецепторами Fc, могут включать одну или несколько 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 несколько мутаций в следующих аминокислотах: E233, G237, P238, H268, P271, L328 и A330. Дополнительные модификации Fc-области для модулирования связывания Fc-рецептора описаны, например, в US 2016/0145350 и US 7416726 и US 5624821, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления Fc-область антител иммуноконъюгатов модифицируют, чтобы обеспечить измененный характер гликозилирования Fc-области по сравнению с нативной немодифицированной Fc-областью.

Иммуноглобулин человека гликозилирован по остатку Asn297 в домене C $\gamma$ 2 каждой тяжелой цепи. Этот N-связанный олигосахарид состоит из корового гептасахарид N-ацетилглюкозамин-4-маннозы-3 (GlcNAc4Man3). Известно, что удаление гептасахарид с помощью эндогликозидазы или PNGазы F (пептид N-гликозидазы F) приводит к конформационным изменениям в области Fc антитела, что может значительно снизить аффинность связывания антител с активирующим Fc $\gamma$ R и привести к снижению эффекторной функции. Коровый гептасахарид часто содержит галактозу, разделяющую на две части GlcNAc, фукозу или сиаловую кислоту, которые по-разному влияют на связывание Fc с активирующим и ингибирующим Fc $\gamma$ R. Кроме того, было продемонстрировано, что  $\alpha$ 2,6-сиалирование усиливает противовоспалительную активность *in vivo*, в то время как дефукозилирование приводит к улучшению связывания Fc $\gamma$ RIIIa и 10-кратному увеличению антителозависимой клеточной цитотоксичности и антителозависимого фагоцитоза. Таким образом, специфические профили

гликозилирования можно использовать для контроля эффекторных функций воспаления.

В некоторых вариантах осуществления модификация для изменения паттерна гликозилирования представляет собой мутацию. Например, замена в положении Asn297. В некоторых вариантах осуществления, Asn297 мутирует в глутамин (N297Q). Способы контроля иммунного ответа с помощью антител, которые модулируют регулируемую Fc $\gamma$ R передачу сигналов, описаны, например, в патенте США 7416726 и публикациях патентных заявок США 2007/0014795 и 2008/0286819, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления антитела иммуноконъюгатов модифицированы таким образом, чтобы они содержали сконструированную Fab-область с неприродным профилем гликозилирования. Например, гибридомы могут быть генетически модифицированы для секреции афукозилированных мкАТ, десиаилированных мкАТ или дегликозилированных Fc со специфическими мутациями, которые обеспечивают повышенное связывание FcR $\gamma$ 3a и эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления антитела иммуноконъюгатов сконструированы афукозилированными.

В некоторых вариантах осуществления вся Fc-область антитела в иммуноконъюгатах заменена на другую Fc-область, так что Fab-область антитела конъюгирована с ненативной Fc-областью. Например, Fab-область цетуксимаба, которая обычно содержит Fc-область IgG1, может быть конъюгирована с IgG2, IgG3, IgG4 или IgA, или Fab-область ниволумаба, которая обычно содержит Fc-область IgG4, может быть конъюгирована с IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 или IgG2. В некоторых вариантах осуществления Fc-модифицированное антитело с ненативным Fc-доменом также содержит одну или несколько аминокислотных модификаций, таких как мутация S228P в Fc IgG4, которая модулирует стабильность описанного Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления Fc-модифицированное антитело с ненативным доменом Fc также содержит одну или несколько модификаций аминокислот, описанных в данном документе, которые модулируют связывание Fc с FcR.

В некоторых вариантах осуществления модификации, которые модулируют связывание Fc-области с FcR, не изменяют связывание Fab-области антитела с его антигеном по сравнению с нативным немодифицированным антителом. В других вариантах осуществления, модификации, которые модулируют связывание Fc-области с FcR, также повышают связывание Fab-области антитела с его антигеном по сравнению с нативным немодифицированным антителом.

В типичном варианте осуществления иммуноконъюгаты по настоящему изобретению содержат конструктор антитела, который содержит антигенсвязывающий домен, специфически распознающий и связывающий лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1, кластер дифференцировки 274, CD274, B7-гомолог 1 или B7-H1) принадлежит к суперсемейству белков B7 и является лигандом белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1, PDCD1, кластер дифференцировки 279 или CD279). PD-L1 также может 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. В частности, 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 предотвращают связывание лиганда с рецептором PD-1, предотвращают эту иммуносупрессию и, следовательно, могут при желании усиливать иммунный ответ, например, для лечения раковых заболеваний или инфекций. Путь PD-L1/PD-1 также способствует предотвращению аутоиммунитета и, следовательно, агонистические агенты против PD-L1 или агенты, которые доставляют иммуноингибирующую полезную нагрузку, могут помочь в лечении аутоиммунных расстройств.

Для лечения рака было разработано несколько антител, нацеленных на PD-L1, включая атезолизумаб (TECENTRIQ™), дурвалумаб (IMFINZI™) и авелумаб (BAVENCIO™). Тем не менее, по-прежнему существует потребность в новых агентах, связывающих PD-L1, включая агенты, которые связывают PD-L1 с высокой аффинностью и эффективно предотвращают передачу сигналов PD-L1/PD-1, и агенты, которые могут доставлять терапевтические полезные нагрузки к экспрессирующим PD-L1 клеткам. Кроме того, существует необходимость в новых агентах, связывающих PD-L1, для лечения аутоиммунных расстройств и инфекций.

Предложен способ доставки полезной нагрузки 8-амидо-2-аминобензазепина в клетку, экспрессирующую PD-L1, включающий введение в клетку, или млекопитающему, содержащему клетку, иммуноконъюгата, содержащего антитело против PD-L1, ковалентно присоединенное к линкеру, который ковалентно связан с одним или несколькими фрагментами 8-амидо-2-аминобензазепина.

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

Изобретение предусматривает агент, связывающий PD-L1, содержащий полипептид переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина и полипептид переменной области легкой цепи иммуноглобулина.

Агент, связывающий PD-L1, специфически связывает PD-L1. Специфичность связывания агента позволяет нацеливаться на клетки, экспрессирующие PD-L1, например, для доставки терапевтических полезных нагрузок в такие клетки.

В типичном варианте осуществления иммуноконъюгаты по настоящему изобретению содержат конструктор антитела, который содержит антигенсвязывающий домен, который специфически распознает и связывает HER2. В одном варианте осуществления изобретения анти-HER2 антитело иммуноконъюгата по настоящему изобретению содержит гуманизованное анти-HER2 антитело, 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 настоящее описание посредством ссылки. Эти антитела содержат каркасные области человека с определяющими комплементарность областями мышиного антитела (4D5), которое связывается с HER2. Гуманизованное антитело huMAb4D5-8, также известное как трастузумаб, имеется в продаже под торговым наименованием герцептин (HERCEPTIN™) (Genentech, Inc.).

Трастузумаб (CAS 180288-69-1, герцептин HERCEPTIN®, huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Genentech) представляет собой полученное из рекомбинантной ДНК IgG1 каппа-моноклональное антитело, являющееся гуманизированной версией мышиного анти-HER2 антитела (4D5), которое селективно связывается с высокой аффинностью в клеточном анализе ( $K_d=5$  нМ) с внеклеточным доменом HER2 (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 et al (1989) Science 244:707-12, Slamon et al (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792).

В варианте осуществления изобретения конструкт антитела или антигенсвязывающий домен содержат области CDR трастузумаба. В варианте осуществления изобретения антитело против HER2 дополнительно содержит каркасные области трастузумаба. В варианте осуществления изобретения антитело против HER2 дополнительно содержит одну или обе переменные области трастузумаба.

В другом варианте осуществления изобретения анти-HER2 антитело иммуноконъюгата по настоящему изобретению содержит гуманизованное анти-HER2 антитело, например, гуманизованное 2C4, как описано в US 7862817. Примером гуманизованного антитела 2C4 является пертузумаб (регистрационный № CAS 380610-27-5), PERJETA™ (Genentech, Inc.). Пертузумаб является ингибитором димеризации HER (HDI) и действует, подавляя 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 Sliwkowski. Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-37 (2001); Sliwkowski Nat Struct Biol 10:158-9 (2003); Cho et al. Nature 421:756-60 (2003); и Malik et al. Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7 (2003). PERJETA™ одобрен для лечения рака молочной железы.

В варианте осуществления изобретения, конструкт антитела или антигенсвязывающий домен содержит CDR-области пертузумаба. В варианте осуществления изобретения, анти-HER2 антитело дополнительно содержит каркасные области пертузумаба. В варианте осуществления изобретения, анти-HER2 антитело дополнительно содержит одну или обе переменные области пертузумаба.

В типичном варианте осуществления иммуноконъюгаты по настоящему изобретению содержат конструкт антитела, который содержит антигенсвязывающий домен, специфически распознающий и связывающий каприн-1 (Ellis JA, Luzzo JP (1995) J Biol Chem. 270(35):20717-23; Wang B, et al (2005) J Immunol. 175 (7):4274-82; Solomon S, et al (2007) Mol Cell Biol. 27(6):2324-42). Каприн-1 также известен как GPIAP1, GPIP137, GRIP137, M11S1, RNG105, p137GPI и белок 1, ассоциированный с клеточным циклом.

Белок-1, ассоциированный с цитоплазматической активацией/пролиферацией (каприн-1), представляет собой РНК-связывающий белок, который участвует в регуляции генов, связанных с контролем клеточного цикла. Каприн-1 селективно связывается с мРНК с-Мус и циклина D2, что ускоряет продвижение клеток из фазы G1 в фазу S, повышает жизнеспособность клеток и способствует росту клеток, указывая на то, что он может играть важную роль в онкогенезе (Wang B, et al (2005) *J Immunol.* 175:4274-4282). Каприн-1 действует отдельно или в сочетании с другими РНК-связывающими белками, такими как белок 1, связывающий домен SH3 RasGAP, и хрупкий белок умственной отсталости X. В процессе онкогенеза каприн-1 функционирует преимущественно путем активации пролиферации клеток и повышения экспрессии белков контрольных точек иммунитета. Посредством образования стрессовых гранул каприн-1 также участвует в процессе, благодаря которому опухолевые клетки адаптируются к неблагоприятным условиям, что способствует резистентности к лучевой и химиотерапии. Учитывая его роль в различных клинических злокачественных новообразованиях, каприн-1 потенциально может использоваться в качестве биомаркера и мишени для разработки новых терапевтических средств (Yang, Z-S, et al (2019) *Oncology Letters* 18:15-21).

Были 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 типичном варианте осуществления, иммуноконъюгаты по настоящему изобретению содержат конструктор антитела, который содержит антигенсвязывающий домен, специфически распознающий и связывающий РЭА.

Повышенная экспрессия ракового эмбрионального антигена (РЭА, CD66e, CEACAM5) вовлечена в различные биологические аспекты неоплазии, особенно в адгезию опухолевых клеток, метастазирование, блокирование клеточных иммунных механизмов, и обладает антиапоптозными функциями. РЭА также используется в качестве маркера крови для многих карцином. Лабетузумаб (CEA-CIDE™, Immunomedics, регистрационный № CAS 219649-07-7), также известный как MN-14 и hMN14, представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1 и исследовался 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 молекулу адгезии клеток 5, связанную с карциноэмбриональным антигеном (CEACAM5), и исследуется у пациентов с рецидивирующим или рефрактерным метастатическим колоректальным раком (Sharkey, R. et al, (2018), *Molecular Cancer Therapeutics* 17(1):196-203; Cardillo, T. et al (2018) *Molecular Cancer Therapeutics* 17(1):150-160).

В варианте осуществления изобретения конструктор антитела, нацеленный на РЭА, или антигенсвязывающий домен содержит переменную легкую цепь (VL-каппа) hMN-14/лабетузумаба SEQ ID NO. 1 (патент США № 6676924).

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWTSTRH  
TGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSSLQPEDIATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIK SEQ ID NO. 1

В варианте осуществления изобретения конструктор антитела, нацеленный на РЭА, или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или каркасной области легкой цепи (LFR) hMN-14/лабетузамаба SEQ ID NO. 2-8 (патент США № 6676924).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	1-23	23	2
CDR-L1	KASQDVGTSVA	24-34	11	3
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	35-49	15	4
CDR-L2	WTSTRHT	50-56	7	5
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFITSSSLQPEDIAT YYC	57-88	32	6
CDR-L3	QQYSLYRS	89-96	8	7
LFR4	FGQGTKVEIK	97-106	10	8

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) hMN-14/лабетузамаба SEQ ID NO. 9 (патент США № 6676924).

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWVAEIH  
DSSTINYAPSLKDRFTISRDNKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQG  
TPVTVSS SEQ ID NO. 9

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или каркасной области тяжелой цепи (HFR) hMN-14/лабетузамаба SEQ ID NO. 10-16 (патент США № 6676924).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGF DFT	1-30	30	10
CDR-H1	TYWMS	31-35	5	11
HFR2	WVRQAPGKGLEWVA	36-49	14	12
CDR-H2	EIHPSSTINYAPSLKD	50-66	17	13
HFR3	RFTISRDNKNTLFLQMDSLRPEDTGV YFCAS	67-98	32	14
CDR-H3	LYFGFPWFAY	99-108	10	15

HFR4	WGQGTPVTVSS	109-119	11	16
------	-------------	---------	----	----

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи (VL каппа) hPR1A3 SEQ ID NO. 17 (патент США № 8642742).

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYR  
KRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIK SEQ ID  
NO. 17

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или каркасной области легкой цепи (LFR) hPR1A3 SEQ ID NO. 18-24 (патент США № 8642742).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	1-23	23	18
CDR-L1	KASAAVGTYVA	24-34	11	19
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	35-49	15	20
CDR-L2	SASYRKR	50-56	7	21
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYC	57-88	32	22
CDR-L3	HQYYTYPLFT	89-98	10	23
LFR4	FGQGTKLEIK	99-108	10	24

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или каркасной области тяжелой цепи (HFR) hPR1A3 SEQ ID NO. 25-31 (патент США № 8642742).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFT	1-30	30	25
CDR-H1	EFGMN	31-35	5	26
HFR2	WVRQAPGQGLEWMG	36-49	14	27
CDR-H2	WINTKTGEATYVEEFKG	50-66	17	28
HFR3	RVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAV YYCAR	67-98	32	29
CDR-H3	WDFAYYVEAMDY	99-110	12	30
HFR4	WGQGTITVTVSS	111-121	11	31

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи (VL каппа) hMFE-23 SEQ ID NO. 32 (патент США № 723288).

ENVLTQSPSSMSASVGDRVNIAC SASSSVSYMHWFQKPGKSPKLWIYSTSNLAS  
GVPSRFSGSGSGTDYSLTISSMQPEDAATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK SEQ ID NO.  
32

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или каркасной области легкой цепи (LFR) hMFE-23 SEQ ID NO. 33-39 (патент США № 723288).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	ENVLTQSPSSMSASVGDRVNIAC	1-23	23	33
CDR-L1	SASSSVSYMH	24-33	10	34
LFR2	WFQKPGKSPKLWIY	34-48	15	35
CDR-L2	STSNLAS	49-55	7	36
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISSMQPEDA ATYYC	56-87	32	37
CDR-L3	QQRSSYPLT	88-96	9	38
LFR4	FGGGTKLEIK	97-106	10	39

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) hMFE-23 SEQ ID NO. 40 (патент США № 723288).

QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDSYMHWLRQGPGQRLEWIGWIDP  
ENGDTEYAPKFQGKATFTTDSANTAYLGLSSLRPEDTAVYYCNEGTPYYPFDYWG  
QGTLVTVSS SEQ ID NO. 40

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или каркасной области тяжелой цепи (HFR) hMFE-23 SEQ ID NO. 41-47 (патент США № 723288).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASG FNIK	1-30	30	41
CDR-H1	DSYMH	31-35	5	42
HFR2	WLRQGPGQRLEWIG	36-49	14	43
CDR-H2	WIDPENGDTYAPKFQG	50-66	17	44

HFR3	KATFTTDTTSANTAYLGLSSLRPEDTAV YYCNE	67-98	32	45
CDR-H3	GTPTGPYYFDY	99-109	11	46
HFR4	WGQGLVTVSS	110-120	11	47

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи (VL каппа) SM3E SEQ ID NO. 48 (патент США № 723288).

ENVLTQSPSSMSVSVGDRVTIAC SASSVPYMH WLQKPGKSPKLLIY LTSNLAS  
GVPSRFSGSGSGTDYSLTISSVQPEDAATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK SEQ ID NO. 48

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или каркасной области легкой цепи (LFR) SM3E SEQ ID NO. 49-55 (патент США № 723288).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	ENVLTQSPSSMSVSVGDRVTIAC	1-23	23	49
CDR-L1	SASSVPYMH	24-33	10	50
LFR2	WLQKPGKSPKLLIY	34-48	15	51
CDR-L2	LTSNLAS	49-55	7	52
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISSVQPEDAA TYYC	56-87	32	53
CDR-L3	QQRSSYPLT	88-96	9	54
LFR4	FGGGTKLEIK	97-106	10	55

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) SM3E SEQ ID NO. 56 (патент США № 723288).

QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDSYMHWRQGPGRLEWIGWIDP  
ENGDTHEYAPKFQGKATFTTDTTSANTAYLGLSSLRPEDTAVYYCNEGTPYFDYWG  
QGTLVTVSS SEQ ID NO. 56

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или каркасной области тяжелой цепи (HFR) SM3E SEQ ID NO. 57-63 (патент США № 723288).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASG FNIK	1-30	30	57

CDR-H1	DSYMH	31-35	5	58
HFR2	WLRQGPQRLEWIG	36-49	14	59
CDR-H2	WIDPENGDTHEYAPKFQG	50-66	17	60
HFR3	KATFTTDT SANTAYLGLSSLRPEDTAV YYCNE	67-98	32	61
CDR-H3	GTPTGPYYFDY	99-109	11	62
HFR4	WGQGLTVTVSS	110-120	11	63

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или каркасной области легкой цепи (LFR) NP-4/арцитумаба SEQ ID NO. 64-70.

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	QTVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	1-23	23	64
CDR-L1	RASSSVTYIH	24-33	10	65
LFR2	WYQQKPGSSPKSWIY	34-48	15	66
CDR-L2	ATSNLAS	49-55	7	67
LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYC	56-87	32	68
CDR-L3	QHWSSKPPT	88-96	9	69
LFR4	FGGGTKLEIK	97-106	10	70

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) NP-4/арцитумаба SEQ ID NO. 71.

EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDYMNWVRQPPGKALEWLGFIGN  
KANGYTTEYSASVKGRFTISRDKSQSILYLQMNTLRAEDSATYYCTRDRGLRFYFDYW  
GQGTTLTVSS SEQ ID NO. 71.

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или каркасной области тяжелой цепи (HFR) NP-4 SEQ ID NO. 72-78.

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSG FTFT	1-30	30	72
CDR-H1	DYYMN	31-35	5	73

HFR2	WVRQPPGKALEWLG	36-49	14	74
CDR-H2	FIGNKANGYTTEYSASVKG	50-68	19	75
HFR3	RFTISRDKSQSILYLQMNTLRAEDSAT YYCTR	69-100	32	76
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101-110	10	77
HFR4	WGQGTTLTVSS	111-121	11	78

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи (VL каппа) M5A/hT84.66 SEQ ID NO. 79 (патент США № 7776330).

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGKAPKLLIYRAS  
NLESGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTNEDPYTFGQGTKVEIK SEQ ID  
NO. 79

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или каркасной области легкой цепи (LFR) M5A/hT84.66 SEQ ID NO. 80-86 (патент США № 7776330).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	1-23	23	80
CDR-L1	RAGESVDIFGVGFLH	24-38	15	81
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	39-53	15	82
CDR-L2	RASNLES	54-60	7	83
LFR3	GVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDFA TYYC	61-92	32	84
CDR-L3	QQTNEDPYT	93-101	9	85
LFR4	FGQGTKVEIK	102-111	10	86

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) M5A/hT84.66 SEQ ID NO. 87 (патент США № 7776330).

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYMHVWRQAPGKGLEWVARIDP  
ANGNSKYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAY  
WGQGTTLTVSS SEQ ID NO. 87

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или каркасной области тяжелой цепи (HFR) M5A/hT84.66 SEQ ID NO. 88-94 (патент США № 7776330).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FNIK	1-30	30	88
CDR-H1	DTYMH	31-35	5	89
HFR2	WVRQAPGKGLEWVA	36-49	14	90
CDR-H2	RIDPANGNSKYADSVKG	50-66	17	91
HFR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCAP	67-98	32	92
CDR-H3	FGYYVSDYAMAY	99-110	12	93
HFR4	WGQGTLVTVSS	111-121	11	94

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи (VL каппа) hAb2-3 SEQ ID NO. 95 (патент США № 9617345).

DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLA  
EGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQHNYGTPFTFGSGTKLEIK SEQ ID NO.  
95

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или каркасной области легкой цепи (LFR) hAb2-3 SEQ ID NO. 96-102 (патент США № 9617345).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITC	1-23	23	96
CDR-L1	RASENIFSYLA	24-34	11	97
LFR2	WYQQKPGKSPKLLVY	35-49	15	98
CDR-L2	NTRTLAE	50-56	7	99
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFA TYYC	57-88	32	100
CDR-L3	QHNYGTPFT	89-97	9	101
LFR4	FGSGTKLEIK	98-107	10	102

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO. 103 (патент США № 9617345).

EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSG  
GGITYAPSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDVAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQ

## GTLVTVSS SEQ ID NO. 103

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или каркасной области тяжелой цепи (HFR) hAb2-3 SEQ ID NO. 104-110.

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGF VFS	1-30	30	104
CDR-H1	SYDMS	31-35	5	105
HFR2	WVRQTPERGLEWVA	36-49	14	106
CDR-H2	YISSGGGITYAPSTVKG	50-66	17	107
HFR3	RFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTA VYYCAA	67-98	32	108
CDR-H3	HYFGSSGPFAY	99-109	11	109
HFR4	WGQGTLVTVSS	110-120	11	110

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи (VL каппа) A240VL-B9VH/AMG-211\_SEQ ID NO. 111 (патент США № 9982063).

QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRGINVGAYSIIWYQQKPGSPPQYLLRYKSD  
SDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHS GASAVFGGGTKLT  
VL SEQ ID NO. 111

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) легкой цепи или каркасной области легкой цепи (LFR) A240VL-B9VH/AMG-211 SEQ ID NO. 112-118 (патент США № 9982063).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
LFR1	QAVLTQPASLSASPGASASLTC	1-22	22	112
CDR-L1	TLRRGINVGAYSIIY	23-36	14	113
LFR2	WYQQKPGSPPQYLLR	37-51	15	114
CDR-L2	YKSDSDKQQGS	52-62	11	115
LFR3	GVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSED EADYYC	63-96	34	116
CDR-L3	MIWHS GASAV	97-106	10	117
LFR4	FGGGTKLTVL	107-116	10	118

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) B9VH SEQ ID NO. 119 (патент США № 9982063).

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFIRN  
KANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLRFYFDY  
WGQGTTVTVSS SEQ ID NO. 119

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или каркасной области тяжелой цепи (HFR) SEQ ID NO. 120-126 (патент США № 9982063).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGF TVS	1-30	30	120
CDR-H1	SYWMH	31-35	5	121
HFR2	WVRQAPGKGLEWVG	36-49	14	122
CDR-H2	FIRNKANGGTTEYAASVKG	50-68	19	123
HFR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR	69-100	32	124
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101-110	10	125
HFR4	WGQGTTVTVSS	111-121	11	126

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) E12VH SEQ ID NO. 127 (патент США № 9982063).

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFILN  
KANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRLRFYFDY  
WGQGTTVTVSS SEQ ID NO. 127

В варианте осуществления изобретения, нацеленный на РЭА конструктор антитела или антигенсвязывающий домен содержит последовательности CDR (область, определяющая комплементарность) тяжелой цепи или каркасной области тяжелой цепи (HFR) SEQ ID NO. 128-134 (патент США № 9982063).

Область	Фрагмент последовательности	Остатки	Длина	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFT VS	1-30	30	128
CDR-H1	SYWMH	31-35	5	129
HFR2	WVRQAPGKGLEWVG	36-49	14	130

CDR-H2	FILNKANGGTTEYAASVKG	50-68	19	131
HFR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR	69-100	32	132
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101-110	10	133
HFR4	WGQGTTVTVSS	111-121	11	134

В некоторых вариантах осуществления конструктор антитела дополнительно содержит домен Fc. В некоторых вариантах осуществления конструктор антитела представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления конструктор антитела представляет собой слитый белок. Антигенсвязывающий домен может быть одноцепочечным фрагментом вариабельной области (scFv). Одноцепочечный фрагмент вариабельной области (scFv), который представляет собой укороченный Fab-фрагмент, включающий вариабельный (V) домен тяжелой цепи антитела, связанный с V-доменом легкой цепи антитела посредством синтетического пептида, может быть получен с использованием обычной технологии рекомбинантной ДНК. Аналогично, фрагменты вариабельной области, стабилизированные дисульфидной связью (dsFv), могут быть получены по технологии рекомбинантной ДНК. Конструктор антитела или антигенсвязывающий домен могут содержать одну или несколько вариабельных областей (например, две вариабельные области) антигенсвязывающего домена анти-PD-L1 антитела, анти-HER2 антитела или анти-РЭА антитела, причем каждая вариабельная область содержит CDR1, CDR2 и CDR3.

В некоторых вариантах осуществления антитела в иммуноконъюгатах содержат модифицированный участок Fc, при этом модификация модулирует связывание участка Fc с одним или несколькими рецепторами Fc.

В некоторых вариантах реализации Fc-область модифицируют путем включения рецептора трансформирующего фактора роста бета-1 (TGFβ1) или его фрагмента, который способен связывать TGFβ1. Например, рецептор может представлять собой рецептор TGFβ II (TGFβRII). В некоторых вариантах осуществления рецептор TGFβ представляет собой рецептор TGFβ человека. В некоторых вариантах осуществления IgG имеет C-концевое слияние с внеклеточным доменом (ECD) TGFβRII, как описано в патенте США № 9676863, включенном в данный документ. Для присоединения IgG к внеклеточному домену TGFβRII может использоваться «линкер Fc», например, Fc-линкер G<sub>4</sub>S<sub>4</sub>G. Линкер Fc может представлять собой короткий гибкий пептид, который обеспечивает правильную трехмерную укладку молекулы при сохранении специфичности связывания с мишенями. В некоторых вариантах осуществления N-конец рецептора TGFβ слит с Fc конструктора антитела (с линкером Fc или без него). В некоторых вариантах осуществления, C-конец тяжелой цепи конструктора антитела сконденсирован с рецептором TGFβ (с Fc-линкером или без него). В некоторых вариантах осуществления C-концевой остаток лизина тяжелой цепи конструктора антитела мутирован в аланин.

В некоторых вариантах осуществления антитела в иммуноконъюгатах являются гликозилированными.

В некоторых вариантах осуществления антитела в иммуноконъюгатах представляют собой модифицированные с использованием цистеина антитела, которые обеспечивают сайт-специфическую конъюгацию адъюванта, метки или фрагмента лекарственного средства с антителом посредством цистеиновых замен в сайтах, в которых введенные цистеины доступны для конъюгации, но не нарушают укладку и сборку иммуноглобулина, или не изменяют связывание антигена и эффекторные функции (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dorman et al. (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; US 2012/0121615; WO 2009/052249). «Антитело, модифицированное с использованием цистеина» или «вариант антитела, модифицированного с использованием цистеина» представляет собой антитело, в котором один или несколько остатков антитела заменены остатками цистеина. Антитела, модифицированные цистеином, могут быть конъюгированы с 8-амидо-2-аминобензазепиновым адъювантом в виде соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер с одинаковой стехиометрией (например, до 2-х 8-амидо-2-аминобензазепиновых фрагментов на антитело в антителе, имеющем один модифицированный цистеиновый сайт).

В некоторых вариантах реализации модифицированные цистеином антитела, используемые для получения иммуноконъюгатов из Таблицы 3, имеют остаток цистеина, введенный в сайт лизина-149 легкой цепи (LC K149C). В других вариантах реализации модифицированные цистеином антитела содержат остаток цистеина, введенный в сайт аланина 118 (нумерация ЕС) тяжелой цепи (HC A118C). Альтернативно, этот сайт имеет номер 121 при последовательной нумерации или 114 при нумерации по Кабату (Kabat). В других вариантах осуществления модифицированные цистеином антитела имеют остаток цистеина, введенный в легкую цепь в положении G64C или R142C в соответствии с нумерацией по Кабату, или в тяжелую цепь в положении D101C, V184C или T205C в соответствии с нумерацией по Кабату.

#### СОЕДИНЕНИЯ 8-АМИДО-2-АМИНОБЕНЗАЗЕПИНОВЫХ АДЪЮВАНТОВ

Имуноконъюгат по настоящему изобретению содержит фрагмент 8-амидо-2-аминобензазепинового адъюванта. Фрагмент адъюванта, описанный в данном документе, представляет собой соединение, вызывающее иммунный ответ (т.е. иммуностимулирующее средство). Как правило, фрагмент адъюванта, описанный в данном документе, представляет собой агонист TLR. TLR представляют собой трансмембранные белки типа I, ответственные за инициацию врожденного иммунного ответа у позвоночных. TLR распознают различные связанные с патогенами молекулярные паттерны бактерий, вирусов и грибов, и действуют как первая линия защиты от вторжения патогенов. TLR вызывают перекрывающиеся, но разные биологические ответы из-за различий в клеточной экспрессии и в сигнальных путях, которые они иницируют. После активации (например, естественным стимулом или синтетическим агонистом TLR) TLR иницируют каскад передачи сигнала, приводящий к активации ядерного фактора-кВ (NF-кВ) через

адапторный белок гена первичного ответа миелоидной дифференцировки 88 (MyD88) и рекрутмент киназы, ассоциированной с рецептором IL-1 (IRAK). Фосфорилирование IRAK затем приводит к рекрутменту фактора 6, ассоциированного с рецептором ФНО (TRAF6), что приводит к фосфорилированию ингибитора I-кВ NF-кВ. В результате NF-кВ проникает в ядро клетки и инициирует транскрипцию генов, промоторы которых содержат сайты связывания NF-кВ, таких как цитокины. Дополнительные способы регуляции передачи сигналов TLR включают TIR-домен, содержащий индуцирующую адаптер интерферон- $\beta$  (TRIF)-зависимую индукцию ассоциированного с ФНО-рецептором фактора 6 (TRAF6) и активацию независимых путей MyD88 посредством TRIF и TRAF3, что приводит к фосфорилированию фактора 3 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-кВ.

Как правило, фрагмент адьюванта, описанный в данном документе, представляет собой агонист TLR7 и/или TLR8. TLR7 и TLR8 экспрессируются оба как в моноцитах, так и в дендритных клетках. У человека, TLR7 также экспрессируется в плазмоцитоидных дендритных клетках (pDC) и В-клетках. TLR8 экспрессируется в основном в клетках миелоидного происхождения, т.е. моноцитах, гранулоцитах и миелоидных дендритных клетках. TLR7 и TLR8 способны обнаруживать присутствие «чужой» одноцепочечной РНК внутри клетки в качестве средства ответа на вирусную инвазию. Обработка клеток, экспрессирующих TLR8, агонистами TLR8 может привести к продукции высоких уровней IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-1, ФНО- $\alpha$ , IL-6 и других воспалительных цитокинов. Аналогично, стимуляция клеток, экспрессирующих TLR7, таких как pDC, агонистами TLR7 может привести к продукции высоких уровней IFN- $\alpha$  и других воспалительных цитокинов. Вовлечение TLR7/TLR8 и результирующая продукция цитокинов могут активировать дендритные клетки и другие антигенпрезентирующие клетки, запуская различные механизмы врожденного и приобретенного иммунного ответа, ведущие к разрушению опухолей.

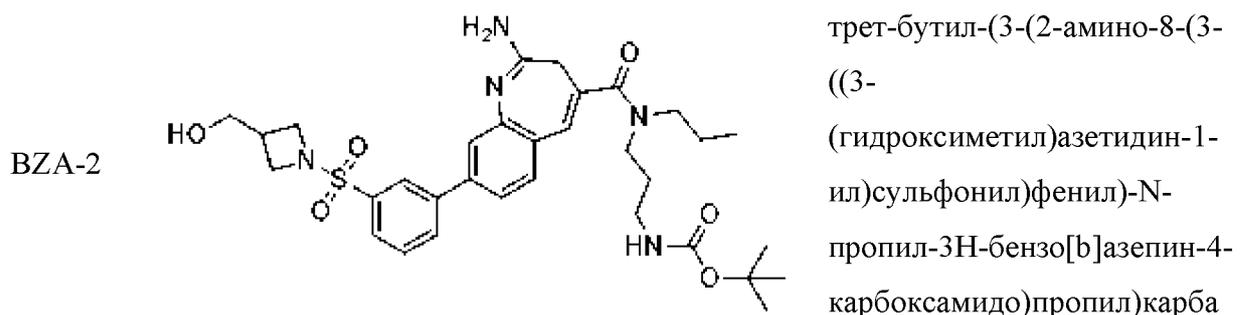
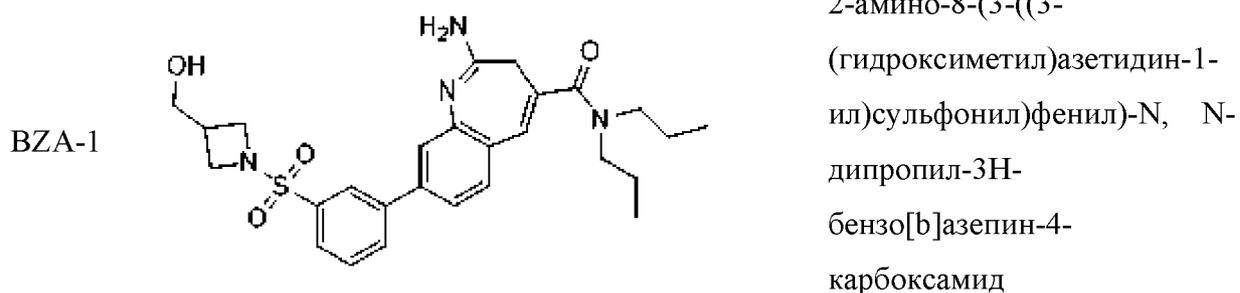
#### КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ С TLR 7/8

Структурные модификации 4-амидной боковой цепи бензазепинового скаффолда могут влиять на эффективность и селективность связывания 8-амидо-2-аминобензазепинового адьюванта с TLR7 и TLR8. Определенные структурные изменения могут превратить селективный агонист TLR8 в двойной агонист TLR7/8. Модификация дипропиламида на BZA-1 группой NH<sub>2</sub>OC (BZA-2) минимально нарушает активность TLR8 (Фиг. 1A) и значительно увеличивает активность TLR7 (Фиг. 1B). Кроме того, эта же структурная модификация, примененная к BZA-3 для получения BZA-4, позиционного изомера 8AmBza-9, увеличивает активность TLR7 (Фиг. 1D) и не влияет на активность TLR8 (Фиг. 1C).

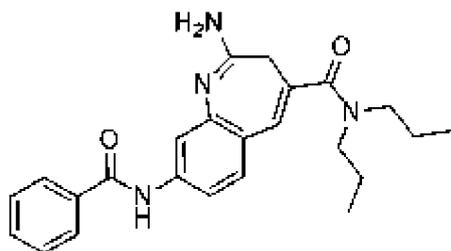
Молекулы BZA-2 и BZA-4 были конформационно пронумерованы с использованием Merck Molecular Force Field (MMFF94) с помощью RDKit, Open-Source Cheminformatics

Software (Halgren, TA (1999) *J. Comput. Chem.*, 20:720-729). Затем эти конформации были состыкованы с TLR8 (3w3n) с помощью rDock с последующей молекулярно-механической минимизацией (минимизация симплекса) поз в TLR8. rDock (ранее RiboDock) - это программа с открытым исходным кодом для молекулярного докинга, полезная для докинга малых молекул с белками и нуклеиновыми кислотами. rDock в первую очередь предназначен для высокопроизводительного виртуального скрининга и прогнозирования способа связывания (Morley, S.D. et al (2004) *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 18 (3):189-208; Ruiz-Carmona, S. (2014) *PLoS Computational Biology* 10 (4): e1003571). Энергии деформации были определены по окончательным ориентациям после докинга, с последующим проведением оптимизации и минимизации QM в Psi4.

На Фиг. 2 представлено компьютерное изображение пристыкованного BZA-2, показывающее взаимодействие с остатками Asp TLR8 и Leu TLR7. Возникновение этого эффекта может быть связано с взаимодействием разных аминокислотных остатков в TLR8 и TLR7: Asp(545) в TLR8; Leu(557) в TLR7. На Фиг. 3А представлено компьютерное изображение докинга BZA-2 с TLR8. На Фиг. 3В представлено компьютерное изображение докинга BZA-2 с TLR7, причем гидрофобная трет-бутильная группа взаимодействует с Leu 557 в TLR7, тем самым увеличивая активность TLR7. Напротив, конформация белка TLR8 способна вмещать структурный мотив NHVoc и сохранять умеренную активность TLR8 (Фиг. 3А). Такие же наблюдения верны при изучении состыкованных структур BZA-4, как видно на Фиг. 3С и 3D. Это удивительное и неожиданное свойство структурного мотива NHVoc может сделать возможной разработку сильнодействующих 8-амидо-2-аминобензазепиновых агонистов TLR 7/8. Эффективность и селективность связывания 8-амидо-2-аминобензазепинового адьюванта с TLR7 и TLR8 можно также ожидать для адьювантов с гидроксаматной группой, таких как 8AmBza-15 и 8AmBza-18 в Таблице 1b. Изображения численных решений для докинга предполагают взаимодействия с Туг 348.



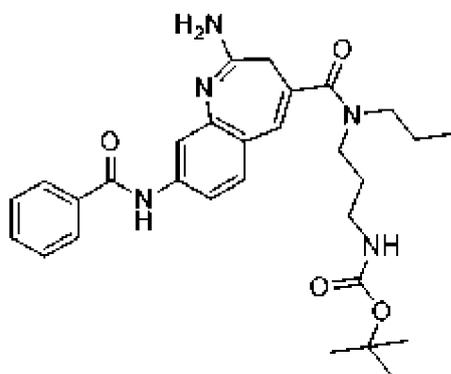
BZA-3



мат

2-амино-8-бензамидо-N, N-  
дипропил-3H-  
бензо[b]азепин-4-  
карбоксамид

BZA-4

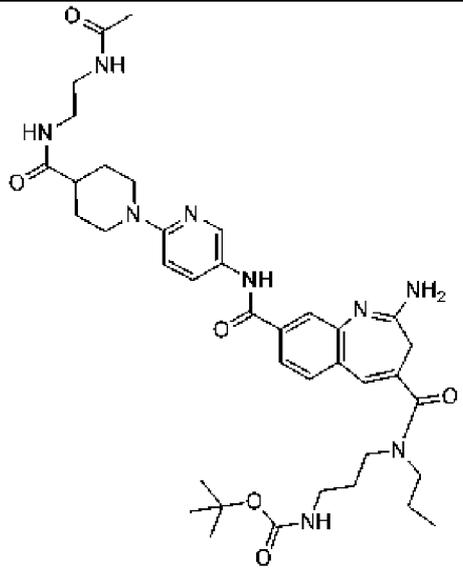
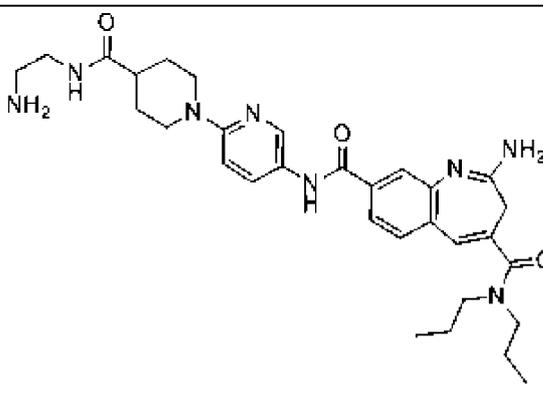
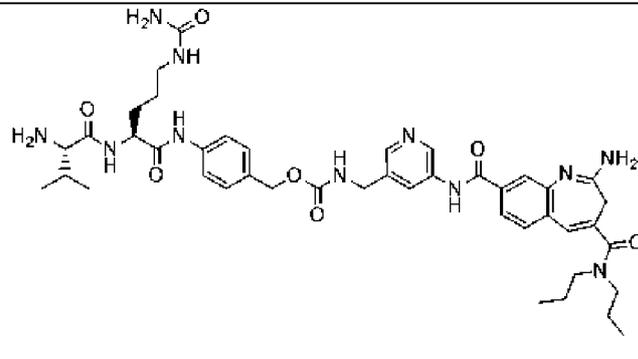
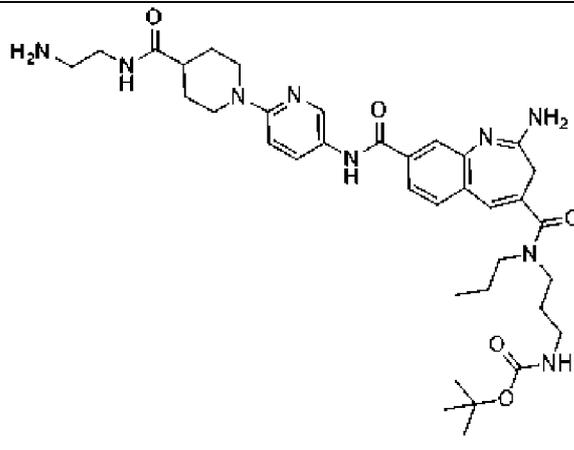


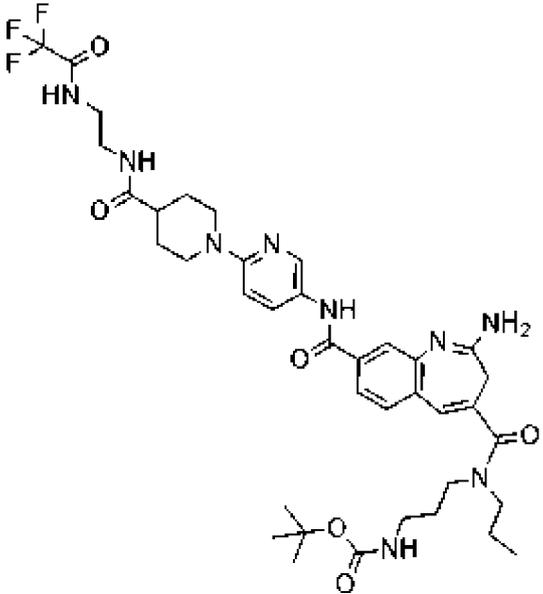
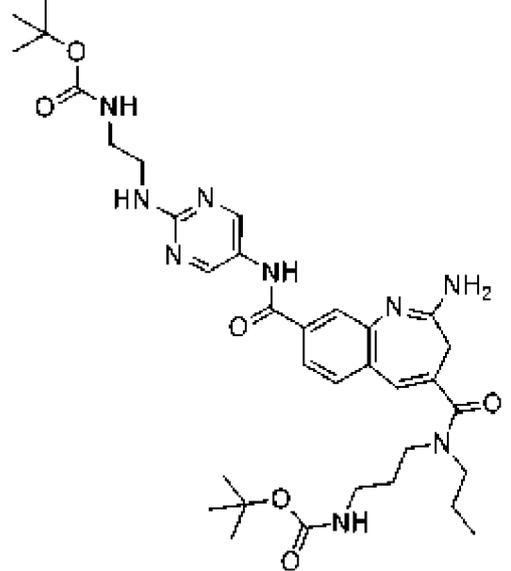
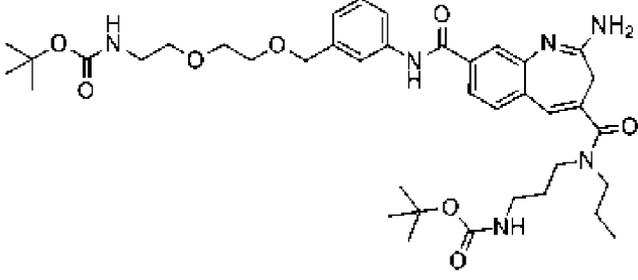
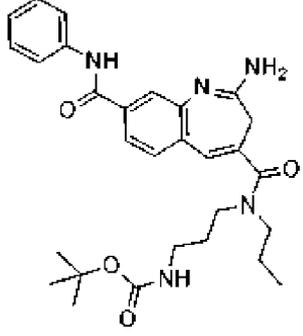
трет-бутил-(3-(2-амино-8-  
бензамидо-N-пропил-3H-  
бензо[b]азепин-4-  
карбоксамидо)пропил)карба  
мат

Примеры соединений 8-амидо-2-аминобензазепина (8AmBza) по настоящему изобретению показаны в Таблицах 1a и 1b. Каждое соединение было охарактеризовано с помощью масс-спектрометрии, и было показано, что оно имеет указанную массу. Активность в отношении репортерных клеток HEK293 NFKB, экспрессирующих человеческий TLR7 или человеческий TLR8, измеряли в соответствии с Примером 30.

Таблица 1a. Соединения 8-амидо-2-аминобензазепина (8AmBza)

8AmBza №	Структура	МВ	HEK293 hTLR7 EC50 (нМ)	HEK293 hTLR8 EC50 (нМ)
8AmBza-1		534,7	>9000	4,283

8AmBza-2		731,9	>9000	1047
8AmBza-3		574,7	н/д	н/д
8AmBza-4		840,0	н/д	н/д
8AmBza-5		689,9	н/д	н/д

8AmBza-6		785,9	н/д	н/д
8AmBza-7		679,8	>9000	1764
8AmBza-8		736,9	>9000	862
8AmBza-9		519,6	>9000	127

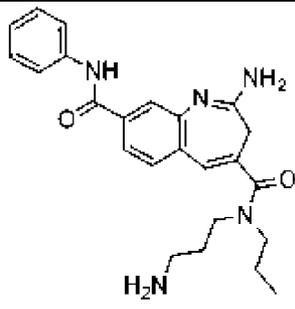
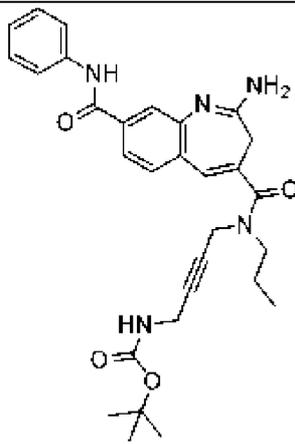
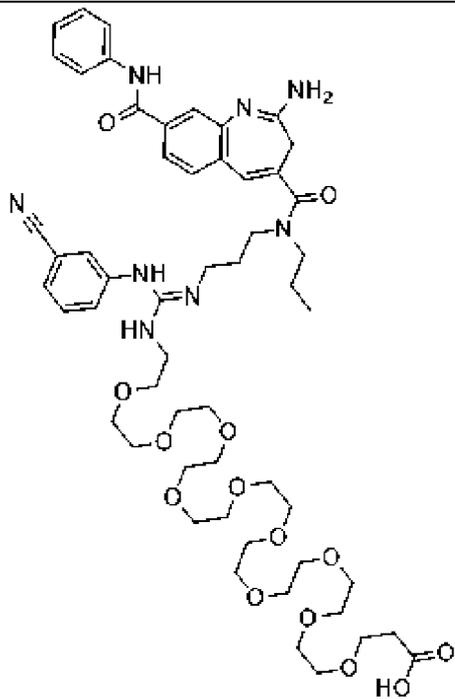
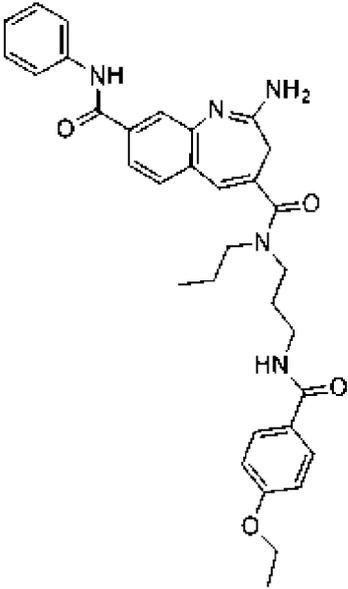
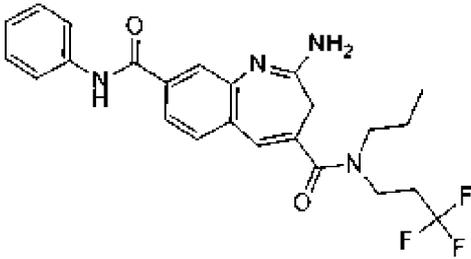
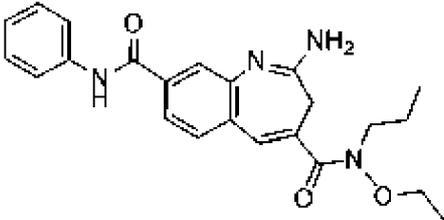
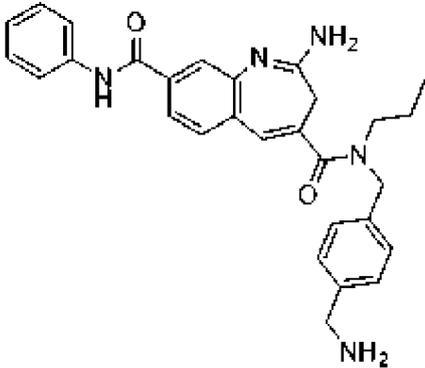
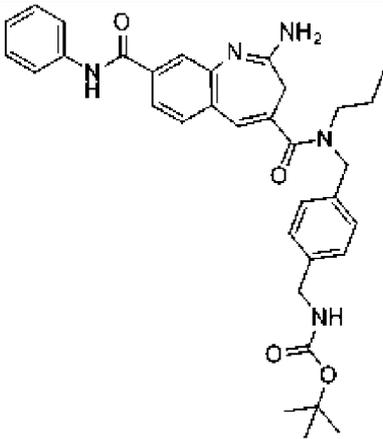
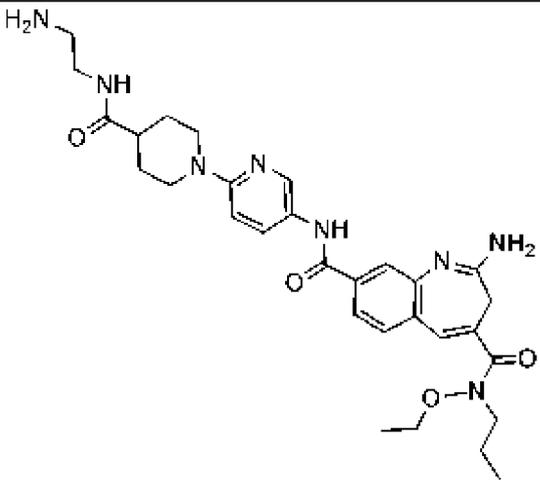
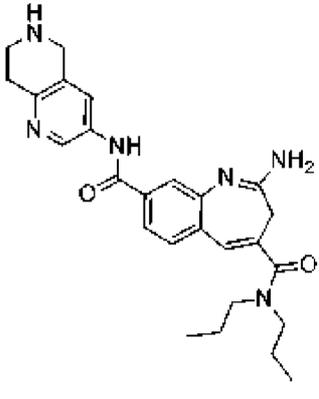
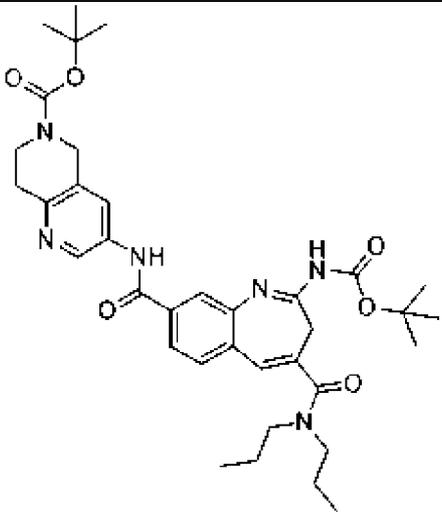
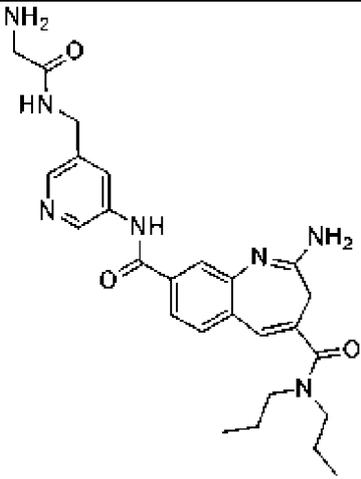
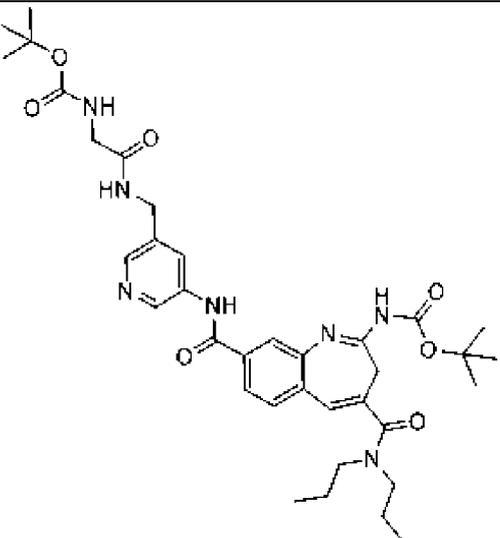
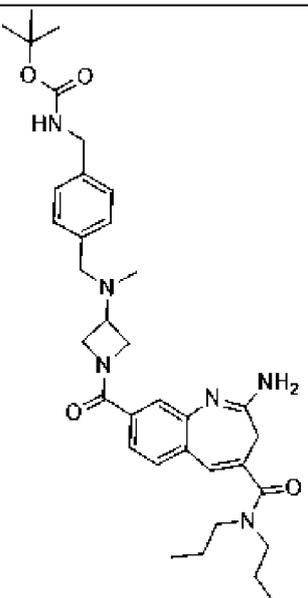
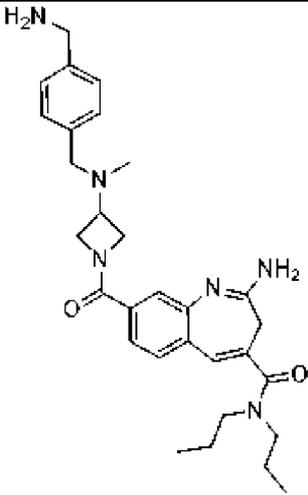
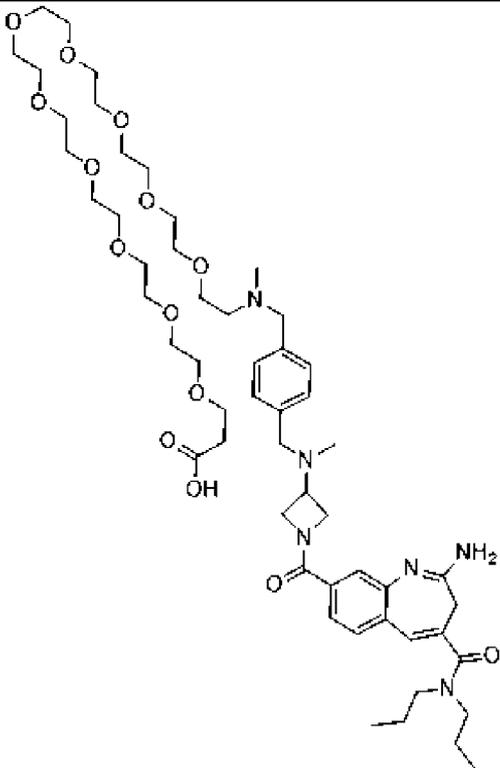
8AmBza-10		419,5	н/д	н/д
8AmBza-11		529,6	н/д	н/д
8AmBza-12		1075,3	н/д	н/д

Таблица 1b. Соединения 8-амидо-2-аминобензазепина (8AmBza)

8AmBza №	Структура	MB	HEK293 hTLR7 EC50 (нМ)	HEK293 hTLR8 EC50 (нМ)
8AmBza-13		567,7	>9000	1040
8AmBza-14		458,5	>9000	245
8AmBza-15		406,5	4860	34
8AmBza-16		481,6	>9000	77

8AmBza-17		581,7	>9000	782
8AmBza-18		576,7	>9000	5618
8AmBza-19		460,6	н/д	2182
8AmBza-20		660,8	8130	6080

8AmBza-21	 <p>Chemical structure of 8AmBza-21: A central benzimidazole core with an amino group at position 2, a diethylamino group at position 8, and a carbonyl group at position 7. The carbonyl group is linked to a pyridine ring at position 4. The pyridine ring has an acetamido group at position 3 and a 2-aminoacetamido group at position 5.</p>	491,6	>9000	4324
8AmBza-22	 <p>Chemical structure of 8AmBza-22: Similar to 8AmBza-21, but with tert-butyl ester protecting groups on the amino groups of the acetamido and 2-aminoacetamido side chains.</p>	691,8	>9000	>9000
8AmBza-23	 <p>Chemical structure of 8AmBza-23: Similar to 8AmBza-21, but with a tert-butyl ester protecting group on the amino group of the acetamido side chain, and a dimethylamino group on the benzimidazole ring at position 7.</p>			

8AmBza-24				
8AmBza-25				

### СОЕДИНЕНИЯ 8-АМИДО-2-АМИНОБЕНЗАЗЕПИН-ЛИНКЕР

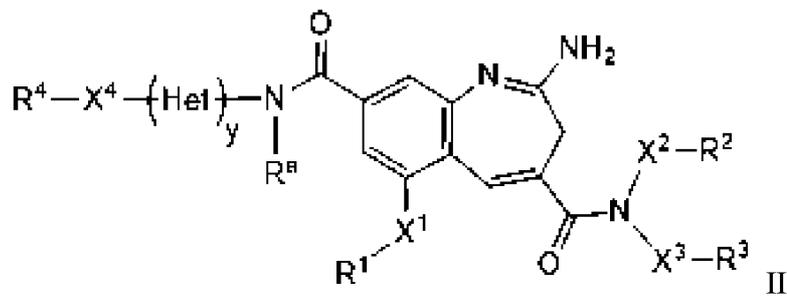
Иммуноконъюгаты по настоящему изобретению получают путем конъюгации антитела с соединением 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер. Соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер содержат фрагмент 8-амидо-2-аминобензазепина (8AmBza), ковалентно присоединенный к линкерному звену L. Линкерные звенья содержат функциональные группы и субъединицы, которые влияют на стабильность, проницаемость, растворимость и другие фармакокинетические свойства, безопасность и эффективность иммуноконъюгатов. Линкерное звено включает реакционноспособную функциональную группу, которая реагирует, т.е. конъюгирует, с реакционноспособной функциональной группой антитела. Например, нуклеофильная группа, такая как аминогруппа боковой цепи лизина антитела, взаимодействует с электрофильной реакционноспособной функциональной группой соединения 8AmBza-линкер с образованием иммуноконъюгата. Также, например, тиол цистеина антитела взаимодействует с малеимидной или

бромацетамидной группой соединения 8AmBza-линкер с образованием иммуноконъюгата.

Электрофильная реакционноспособная функциональная группа, подходящая для соединений 8AmBza-линкер, включает, без ограничений, N-гидроксисукцинимидиловые (NHS) сложные эфиры и N-гидроксисульфосукцинимидиловые (сульфо-NHS) сложные эфиры (реакционноспособные по отношению к аминам); карбодиимиды (реакционноспособные по отношению к аминам и карбоксилам); гидроксиметилфосфины (реакционноспособные по отношению к аминам); малеимиды (реакционноспособные по отношению к тиолами); галогенированные ацетамиды, такие как N-иодацетамиды (реакционноспособные по отношению к тиолами); арилазиды (реакционноспособные по отношению к первичными аминами); фторированные арилазиды (реакционноспособные за счет внедрения углерод-водород (C-H)); сложные эфиры пентафторфенила (PFP) (реакционноспособные по отношению к амином); сложные эфиры тетрафторфенила (TFP) (реакционноспособные по отношению к аминам); имидозэфиры (реакционноспособные по отношению к аминам); изоцианаты (реакционноспособные по отношению к гидроксилком); винилсульфоны (реакционноспособные по отношению к тиолами, аминами и гидроксилами); пиридилдисульфиды (реакционноспособные по отношению к тиолами); и производные бензофенона (реакционноспособные за счет внедрения в связь C-H). Другие реагенты включают, без ограничений, реагенты, описанные в Hermanson, *Bioconjugate Techniques* 2nd Edition, Academic Press, 2008.

Изобретение предлагает решения ограничений и проблем, связанных с конструированием, получением и применением иммуноконъюгатов. Некоторые линкеры могут быть лабильными в кровотоке, высвобождая при этом неприемлемые количества адьюванта/лекарственного средства до интернализации в клетке-мишени (Khot, A. et al (2015) *Bioanalysis* 7(13):1633-1648). Другие линкеры могут обеспечивать стабильность в кровотоке, но могут оказывать негативное влияние на эффективность внутриклеточного высвобождения. Линкеры, которые обеспечивают желаемое внутриклеточное высвобождение, обычно имеют низкую стабильность в кровотоке. Другими словами, стабильность в кровотоке и внутриклеточное высвобождение обычно находятся в обратной зависимости. Кроме того, в стандартных процессах конъюгации количество фрагмента адьюванта/лекарственного средства, загруженного в антитело, т.е. загрузка лекарственным средством, 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 фрагмента адьюванта/лекарственного средства и его производных, конъюгированных с антителом. При высокой лекарственной нагрузке образовавшиеся агрегаты необходимо удалять для терапевтического применения. В результате образование агрегатов, опосредованное нагрузкой лекарственным средством, снижает выход иммуноконъюгата и может затруднить масштабирование процесса.

Типичные варианты осуществления включают соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II:



где

у равен 0 или 1;

Het выбирают из группы, состоящей из гетероциклила, гетероциклилдиила, гетероарила и гетероарилдиила;

R<sup>a</sup> представляет собой H или образует Het с атомом азота, с которым он связан;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо выбирают из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинила, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила, C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила, где алкил, алкенил, алкинил, карбоциклил, арил, гетероциклил и гетероарил независимо и необязательно замещены одной или несколькими группами, выбранными из:

- (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—OR<sup>5</sup>;
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклила);
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклила)—\*;
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>—\*;
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклил)—NR<sup>5</sup>—C(=NR<sup>5</sup>)NR<sup>5</sup>—\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила);
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила)—\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклилдиила)—\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>—C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)—\*;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклила);
- (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклила)—\*;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>—\*;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклил)—NR<sup>5</sup>—C(=NR<sup>5a</sup>)NR<sup>5</sup>—\*;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила);
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила)—\*;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;

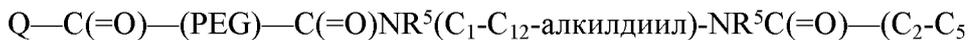
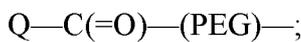
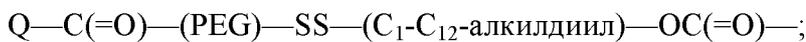
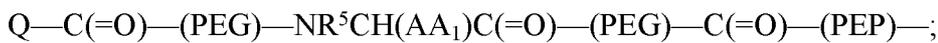
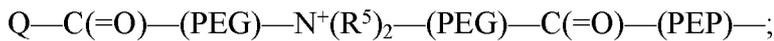
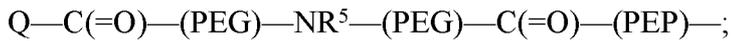
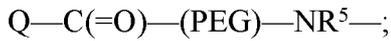
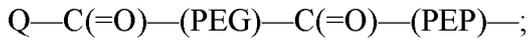
- $-(C_1-C_{20}\text{-гетероарил})-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-N(R^5)_2$ ;  
 $-(C_1-C_{20}\text{-гетероарил})-NR^5-C(=NR^{5a})N(R^5)-*$ ;  
 $-C(=O)-*$ ;  
 $-C(=O)-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-N(R^5)-*$ ;  
 $-C(=O)-(C_2-C_{20}\text{-гетероциклдиила})-*$ ;  
 $-C(=O)N(R^5)_2$ ;  
 $-C(=O)N(R^5)-*$ ;  
 $-C(=O)N(R^5)-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-N(R^5)C(=O)R^5$ ;  
 $-C(=O)N(R^5)-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-N(R^5)C(=O)N(R^5)_2$ ;  
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-N(R^5)CO_2R^5$ ;  
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-N(R^5)C(=NR^{5a})N(R^5)_2$ ;  
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5C(=NR^{5a})R^5$ ;  
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_8\text{-алкилдиил})-NR^5(C_2-C_5\text{-гетероарила})$ ;  
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20}\text{-гетероарилдиил})-N(R^5)-*$ ;  
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20}\text{-гетероарилдиила})-*$ ;  
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20}\text{-гетероарилдиил})-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-N(R^5)_2$ ;  
 $-C(=O)NR^5-(C_1-C_{20}\text{-гетероарилдиил})-(C_2-C_{20}\text{-гетероциклдиил})-C(=O)NR^5-$   
 $(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5-*$ ;  
 $-N(R^5)_2$ ;  
 $-N(R^5)-*$ ;  
 $-N(R^5)C(=O)R^5$ ;  
 $-N(R^5)C(=O)-*$ ;  
 $-N(R^5)C(=O)N(R^5)_2$ ;  
 $-N(R^5)C(=O)N(R^5)-*$ ;  
 $-N(R^5)CO_2R^5$ ;  
 $-NR^5C(=NR^{5a})N(R^5)_2$ ;  
 $-NR^5C(=NR^{5a})N(R^5)-*$ ;  
 $-NR^5C(=NR^{5a})R^5$ ;  
 $-N(R^5)-(C_2-C_5\text{-гетероарила})$ ;  
 $-O-(C_1-C_{12}\text{-алкила})$ ;  
 $-O-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-N(R^5)_2$ ;  
 $-O-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-N(R^5)-*$ ;  
 $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}\text{-гетероциклдиила})-*$ ;  
 $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}\text{-гетероциклдиил})-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-N(R^5)_2$ ;  
 $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}\text{-гетероциклдиил})-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5-*$ ; и  
 $-S(=O)_2-(C_2-C_{20}\text{-гетероциклдиил})-(C_1-C_{12}\text{-алкилдиила})-OH$ ;  
 или  $R^2$  и  $R^3$  вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;  
 $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  и  $X^4$  независимо выбирают из группы, состоящей из связи,  $C(=O)$ ,  
 $C(=O)N(R^5)$ ,  $O$ ,  $N(R^5)$ ,  $S$ ,  $S(O)_2$  и  $S(O)_2N(R^5)$ ;  
 $R^5$  выбирают из группы, состоящей из  $H$ ,  $C_6-C_{20}$ -арила,  $C_6-C_{20}$ -арилдиила,  $C_1-C_{12}$ -

алкила и C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдила, или две группы R<sup>5</sup> вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

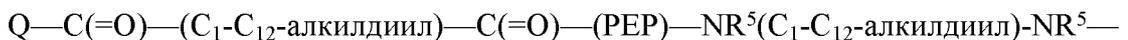
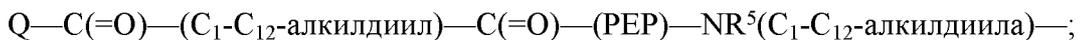
R<sup>5a</sup> выбирают из группы, состоящей из C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила;

где звездочка \* указывает сайт присоединения L, и где один из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> присоединен к L;

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



моногетероциклический диил)-;



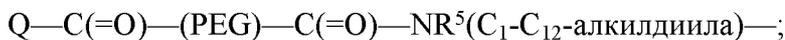
C(=O);

Q-C(=O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-C(=O)-(PEP)-NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> моногетероциклический дила)-;

Q-C(=O)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил)-CH<sub>2</sub>O-(PEG)-C(=O)-(MCgluc)-;

Q-C(=O)-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил)-CH<sub>2</sub>O-(PEG)-C(=O)-(MCgluc)-NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> моногетероциклический дила)-

;



Q-C(=O)-(PEG)-C(=O)-NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногетероциклический дила)-;

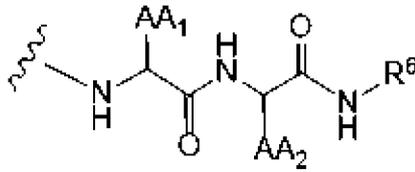


Q-C(=O)-(PEG)-C(=O)-(PEP)-NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногетероциклический дила)-; и

Q-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-(PEP)-NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногетероциклический дила)-;

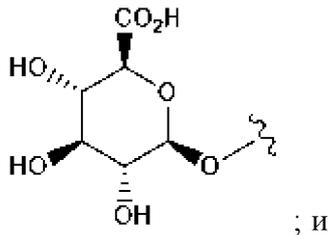
где PEG имеет формулу: -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-; m представляет собой целое число от 1 до 5, и n представляет собой целое число от 2 до 50;

PEP имеет формулу:

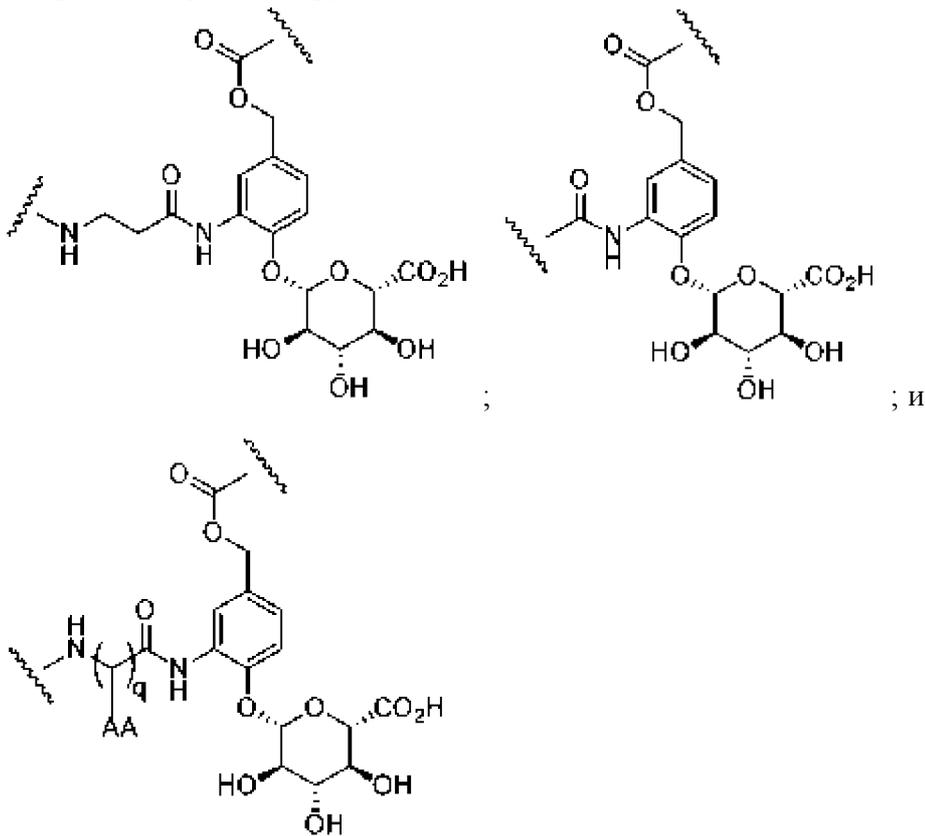


где AA<sub>1</sub> и AA<sub>2</sub> независимо выбирают из боковой цепи аминокислоты, или AA<sub>1</sub> или AA<sub>2</sub> и соседний атом азота образуют 5-членное кольцо пролиновой аминокислоты, и волнистая линия указывает точку присоединения; и

R<sup>6</sup> выбирают из группы, состоящей из C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдила, замещенных —CH<sub>2</sub>O—C(=O)— и, необязательно:



MCgluc выбирают из групп:



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

Q выбирают из группы, состоящей из N-гидроксисукцинимидила, N-гидроксисульфосукцинимидила, малеимида и фенокси, замещенных одной или несколькими группами, независимо выбранными из F, Cl, NO<sub>2</sub> и SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;

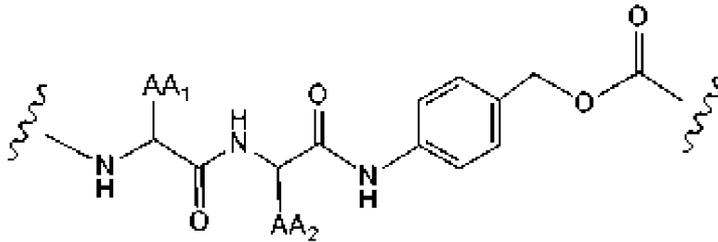
где алкил, алкилдиил, алкенил, алкенилдиил, алкинил, алкинилдиил, арил, арилдиил, карбоциклл, карбоцикллдиил, гетероциклл, гетероцикллдиил, гетероарил и

гетероарилдиил необязательно замещены одной или несколькими группами, независимо выбранными из F, Cl, Br, I, —CN, —CH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH=CH<sub>2</sub>, —C≡CH, —C≡CCH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>OH, —CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, —CH(OH)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>OP(O)(OH)<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>F, —CHF<sub>2</sub>, —CF<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub>, —CH(CH<sub>3</sub>)CN, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CN, —CH<sub>2</sub>CN, —CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —CO<sub>2</sub>H, —COCH<sub>3</sub>, —CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, —COCH(OH)CH<sub>3</sub>, —CONH<sub>2</sub>, —CONHCH<sub>3</sub>, —CON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, —NH<sub>2</sub>, —NHCH<sub>3</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —NHCOCH<sub>3</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)COCH<sub>3</sub>, —NHS(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —NO<sub>2</sub>, =O, —OH, —OCH<sub>3</sub>, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>—(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, —O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H, —OP(O)(OH)<sub>2</sub>, —S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —SCH<sub>3</sub>, —S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> и —S(O)<sub>3</sub>H.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где [includes wherein] у равен 0.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где у равен 1.

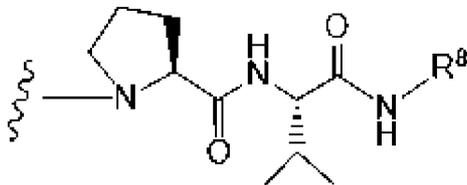
Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где PEP имеет формулу:



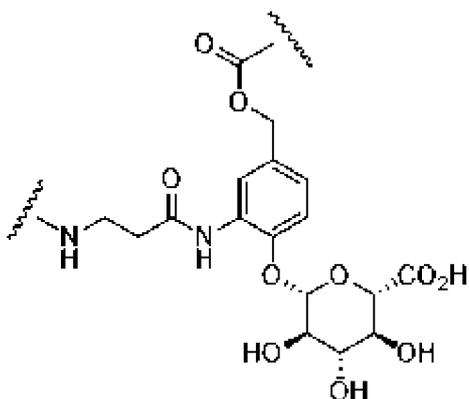
где AA<sub>1</sub> и AA<sub>2</sub> независимо выбирают из боковой цепи природной аминокислоты.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где AA<sub>1</sub> или AA<sub>2</sub> образуют с соседним атомом азота 5-членное кольцо с образованием пролиновой аминокислоты.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где PEP имеет формулу:



Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где MСgluc имеет формулу:



Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где  $AA_1$  и  $AA_2$  независимо выбирают из H,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_5)$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ , и  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ .

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где  $AA_1$  представляет собой  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , и  $AA_2$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ .

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где  $AA_1$  и  $AA_2$  независимо выбирают из GlcNAc аспарагиновой кислоты,  $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$  и  $-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}$ .

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где  $X^1$  представляет собой связь, и  $R^1$  представляет собой H.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где  $X^2$  представляет собой связь, и  $R^2$  представляет собой  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ -алкил.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где каждый из  $X^2$  и  $X^3$  представляет собой связь, а  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбирают из  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ -алкила,  $-\text{O}-(\text{C}_1\text{-}\text{C}_{12}\text{-алкила})$ ,  $-(\text{C}_1\text{-}\text{C}_{12}\text{-алкилдиил})-\text{OR}^5$ ,  $-(\text{C}_1\text{-}\text{C}_8\text{-алкилдиил})-\text{N}(\text{R}^5)\text{CO}_2\text{R}^5$  и  $-\text{O}-(\text{C}_1\text{-}\text{C}_{12}\text{-алкил})-\text{N}(\text{R}^5)\text{CO}_2\text{R}^5$ .

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где каждый из  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбирают из  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$  и  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ .

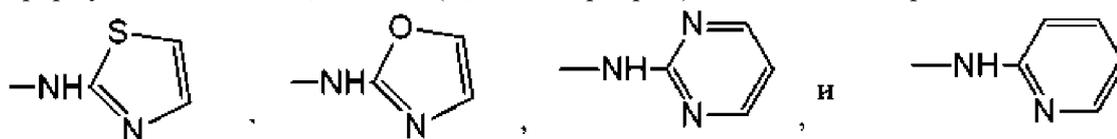
Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где  $R^2$  представляет собой  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ -алкил, а  $R^3$  представляет собой  $-(\text{C}_1\text{-}\text{C}_8\text{-алкилдиил})-\text{N}(\text{R}^5)\text{CO}_2\text{R}^4$ .

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где  $R^2$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  и  $R^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2(t\text{-Bu})$ .

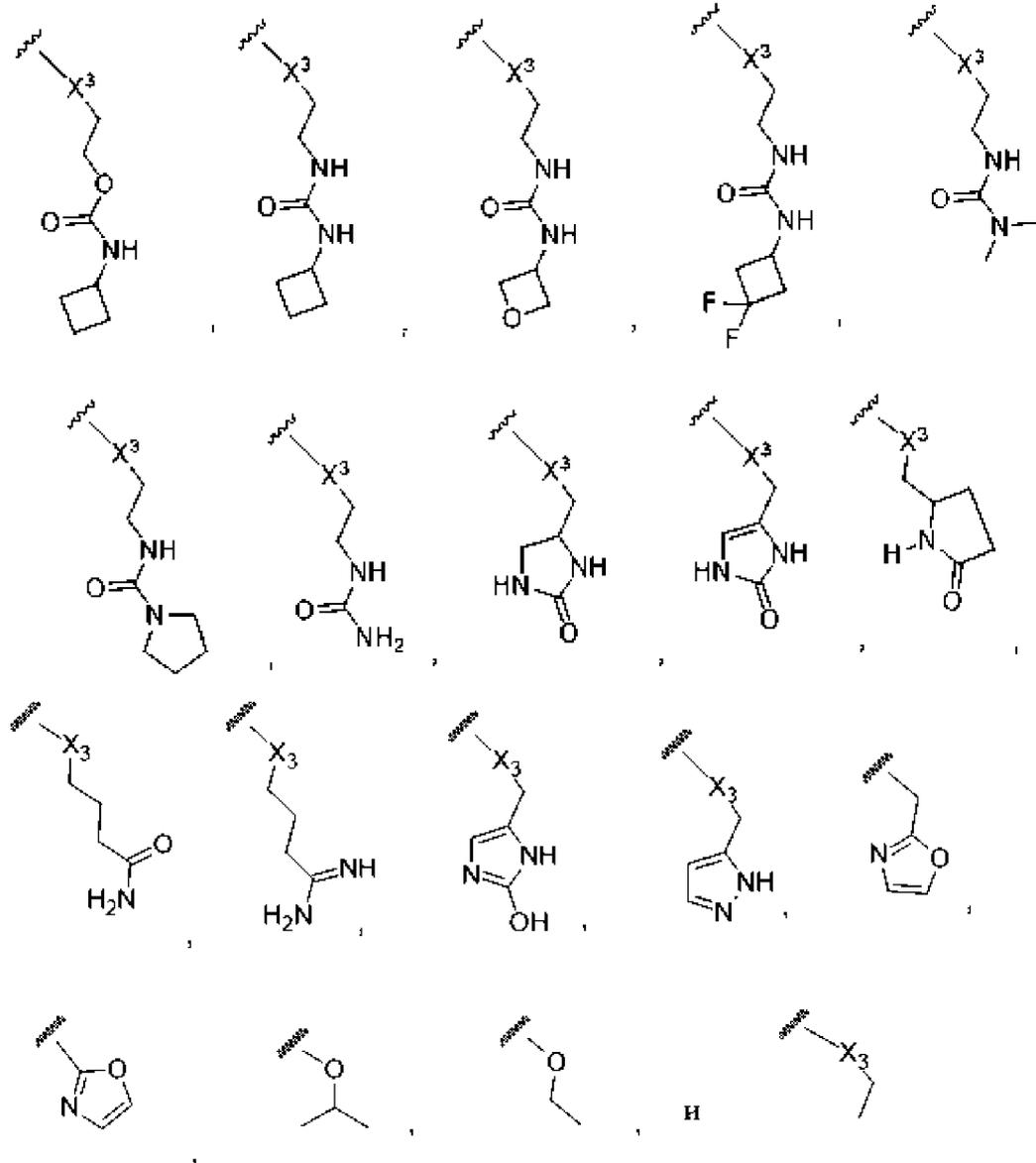
Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где  $R^2$  и  $R^3$  представляют собой каждый  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-

линкер формулы II включает, где  $\text{NR}^5$  ( $\text{C}_2$ - $\text{C}_5$ -гетероарил)  $\text{R}^1$  или  $\text{R}^3$  выбирают из:



Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где  $\text{X}^3$ - $\text{R}^3$  выбирают из группы, состоящей из:



Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где Нет представляет собой 5- или 6-членный моноциклический гетероарилдиил, выбранный из группы, состоящей из пиридилдиила, имидазолилдиила, пиримидинилдиила, пиразолилдиила, триазолилдиила, пиразинилдиила, тетразолилдиила, фурилдиила, тиенилдиила, изоксазолилдиилдиила, тиазолилдиила, оксадиазолилдиила, оксазолилдиила, изотиазолилдиила и пирролилдиила.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где Нет представляет собой 5- или 6-членный

моноциклический гетероциклилдиил, выбранный из группы, состоящей из морфолинилдиила, пиперидинилдиила, пиперазинилдиила, пирролидинилдиила, диоксанилдиила, тиоморфолинилдиила и S-диоксотиоморфолинилдиила.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где Het представляет собой 1,6-нафтиридиил или 1,6-нафтиридиил.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II включает, где L выбирают из группы, состоящей из:

$Q-C(=O)-CH_2CH_2OCH_2CH_2-(C_1-C_{20}\text{-гетероарилдиил})-CH_2O-(PEG)-C(=O)-(M\text{Cgluc})-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5C(=O)-(C_2-C_5\text{-моногоheteroциклилдиила})-$ ;

$Q-C(=O)-(PEG)-C(=O)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиила})-$ ;

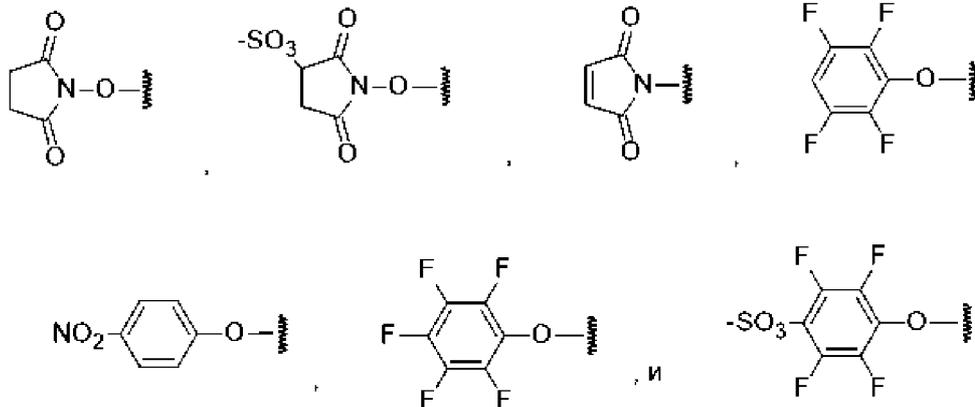
$Q-C(=O)-(PEG)-C(=O)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5C(=O)-(C_2-C_5\text{-моногоheteroциклилдиила})-$ ;

$Q-C(=O)-(PEG)-C(=O)-(PEP)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиила})-$ ;

$Q-C(=O)-(PEG)-C(=O)-(PEP)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5C(=O)-(C_2-C_5\text{-моногоheteroциклилдиила})-$ ; и

$Q-(CH_2)_m-C(=O)-(PEP)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5C(=O)-(C_2-C_5\text{-моногоheteroциклилдиила})-$ .

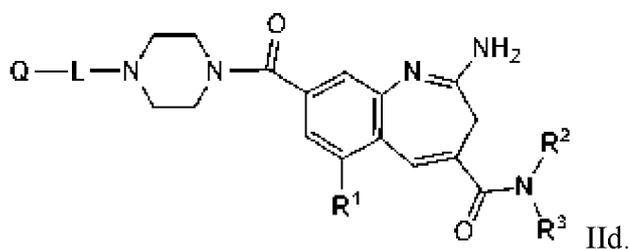
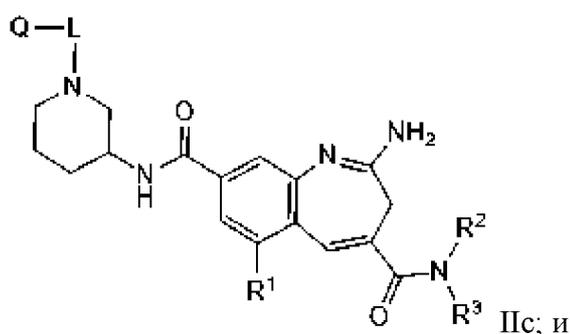
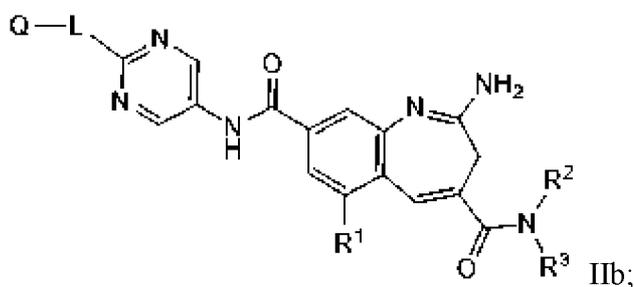
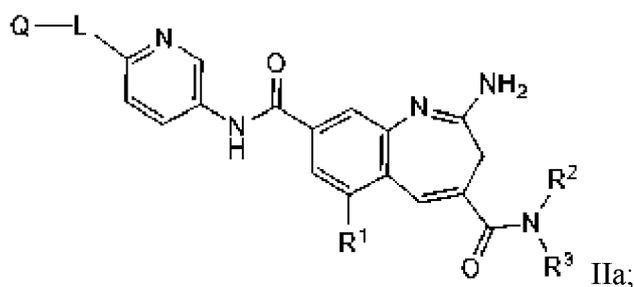
Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы IIa включает, где Q выбирают из:



Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы IIa включает, где Q представляет собой фенокси, замещенный одним или несколькими F.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы IIa включает, где Q представляет собой 2,3,5,6-тетрафторфенокси.

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II, выбранного из формул IIa-d:



Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формул IIIa-d включает, где  $R^2$  представляет собой  $C_1$ - $C_8$ -алкил и  $R^3$  представляет собой  $-(C_1$ - $C_8$ -алкилдиил)- $N(R^5)CO_2R^4$ .

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формул IIIa-d включает, где  $R^2$  представляет собой  $-CH_2CH_2CH_3$  и  $R^3$  представляет собой  $-CH_2CH_2CH_2NHCO_2(t-Bu)$ .

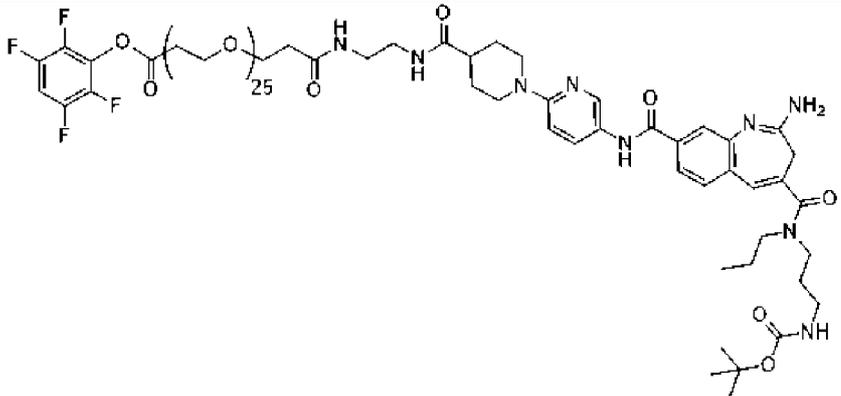
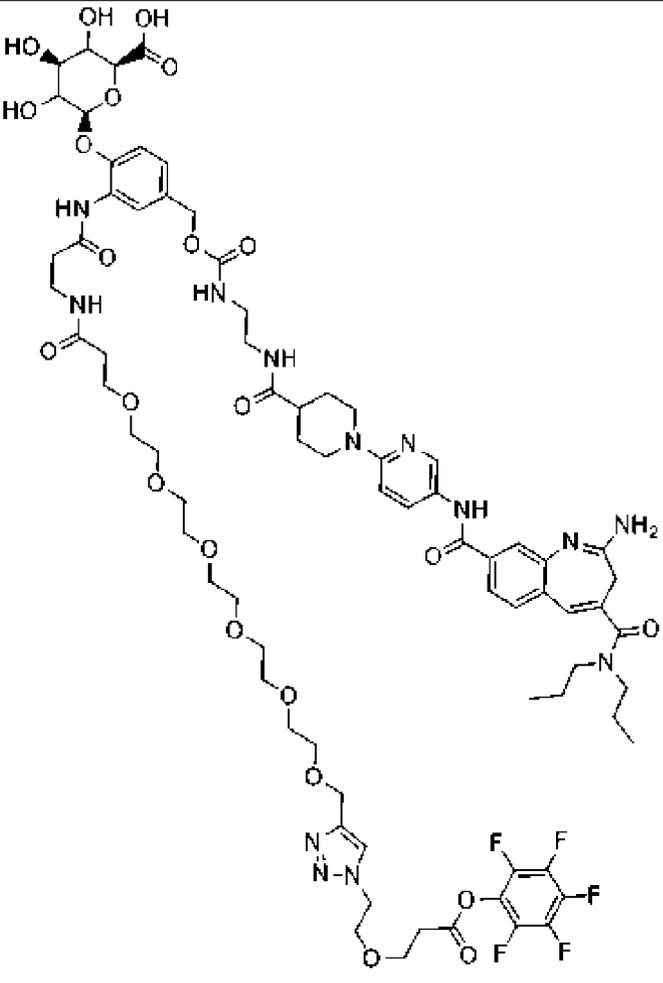
Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формул IIIa-d включает, где  $R^2$  и  $R^3$  представляют собой  $-CH_2CH_2CH_3$ .

Иллюстративный вариант осуществления соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формул IIIa-d включает, где Q представляет собой тетрафторфенил.

Типичный вариант соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкера выбирают из Таблицы 2. Каждое соединение было охарактеризовано с помощью масс-спектрометрии, и было показано, что оно имеет указанную массу.

Таблица 2a Соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер (8AmBza-L) формулы



8AmBza-L- 6	 <p>Chemical structure of 8AmBza-L-6. It features a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl group connected via an ester linkage to a poly(ethylene glycol) chain with a subscript of 25. This chain is further linked to a diethylamino group, which is connected to a piperidine ring. The piperidine ring is linked to a pyridine ring, which is connected to an amide group. This amide group is linked to a benzimidazole ring system, which is further connected to a diethylamino group and a tert-butyl ester group.</p>	2039,3
8AmBza-L- 7	 <p>Chemical structure of 8AmBza-L-7. It features a glucose molecule linked via an ether linkage to a piperidine ring. The piperidine ring is linked to a pyridine ring, which is connected to an amide group. This amide group is linked to a benzimidazole ring system, which is further connected to a diethylamino group and a tert-butyl ester group. The glucose molecule is also linked to a diethylamino group and a tert-butyl ester group.</p>	1642,6

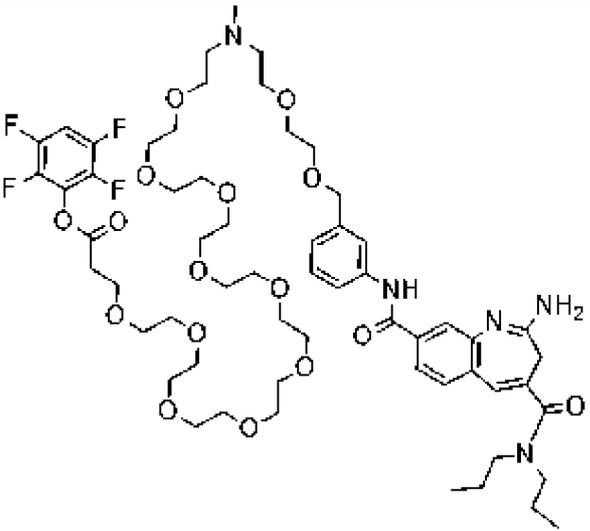
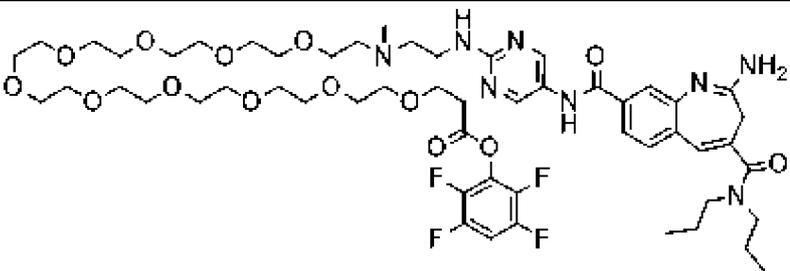
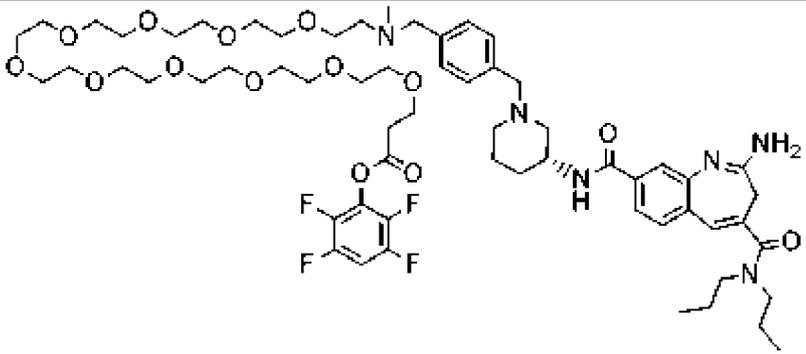
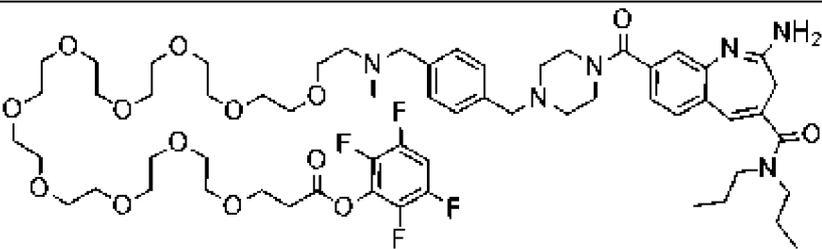
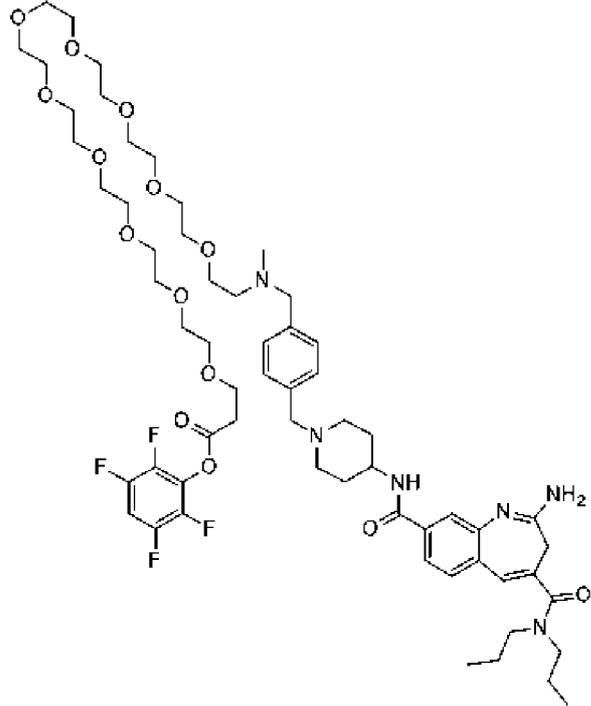
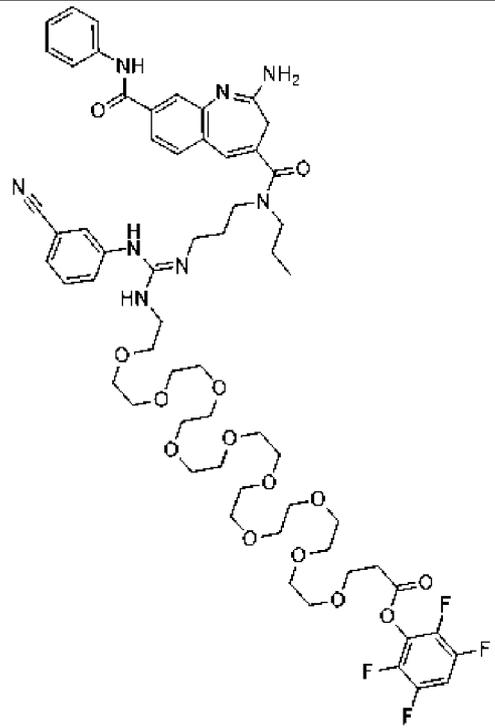
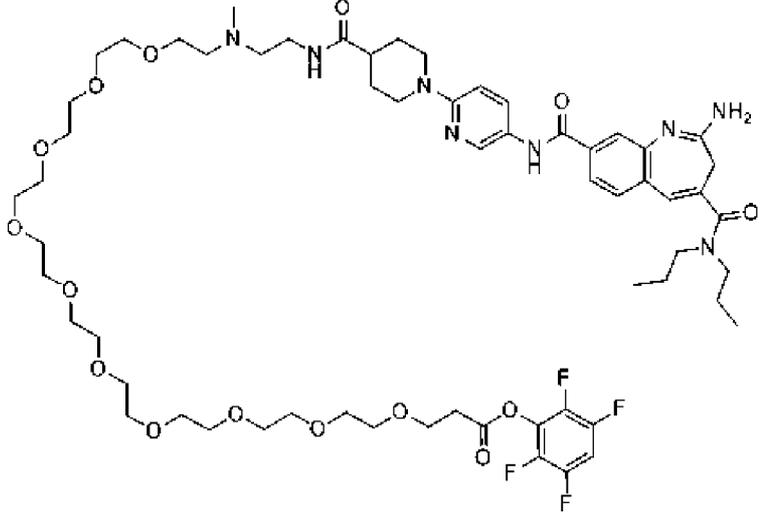
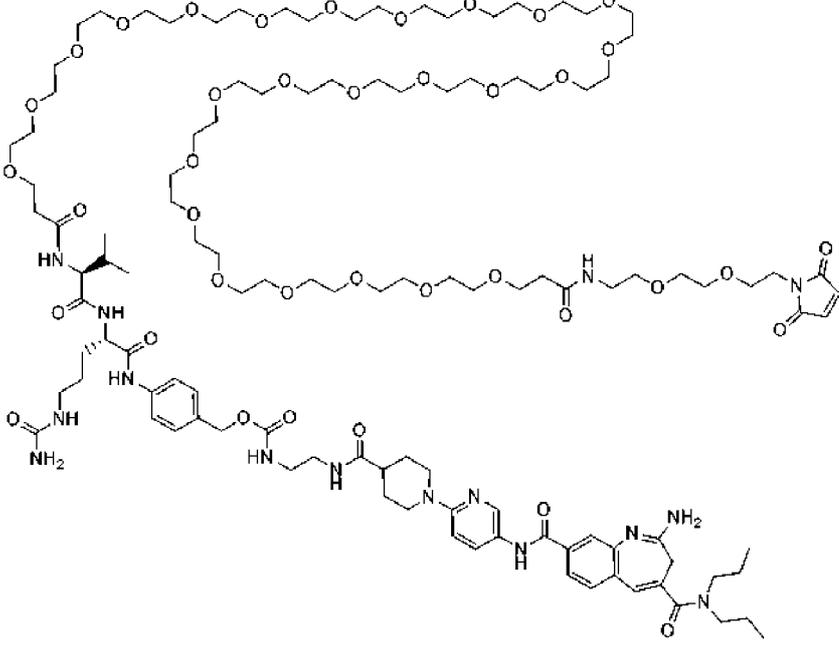
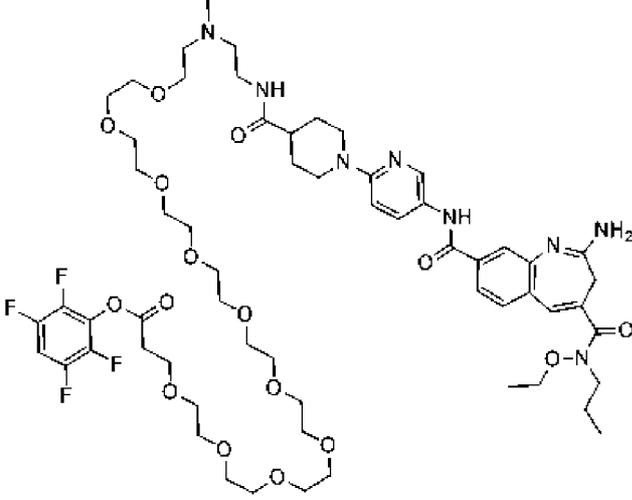
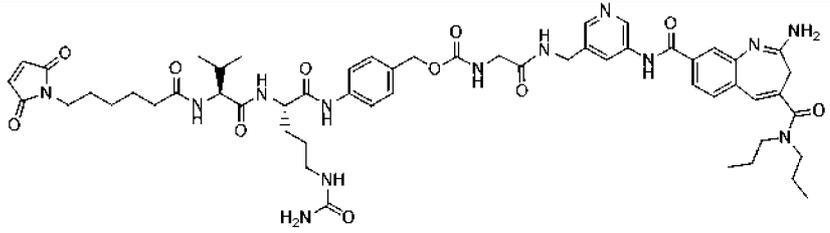
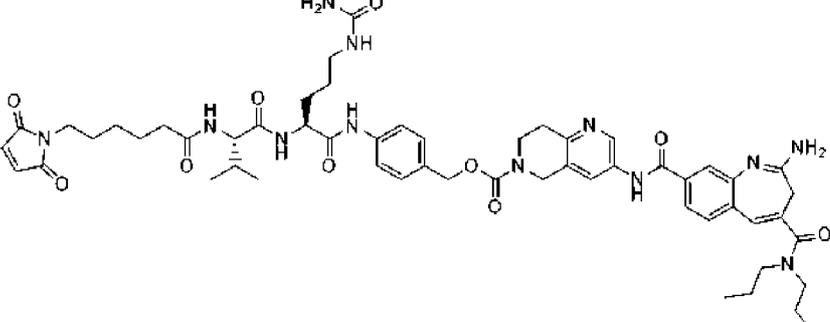
8AmBza-L- 8		1196,3
8AmBza-L- 9		1139,2
8AmBza-L- 10		1205,4
8AmBza-L- 11		1191,4

Таблица 2b Соединения 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер (8AmBza-L) формулы

II

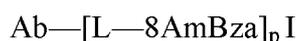
8AmBza-L	Структура	MB
8AmBza-L-12	 <p>The chemical structure of 8AmBza-L-12 is a complex molecule. It features a central 8-aminobenzimidazole core. Attached to this core are: a benzamide group (NH-C(=O)-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), a butylamino group (-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), and a carbonyl group (-C(=O)-) which is further linked to a piperidine ring. The piperidine ring is connected via a methylene bridge to a benzene ring. This benzene ring is substituted with a dimethylamino group (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) and a long, branched polyoxyethylene chain consisting of multiple ethylene oxide units.</p>	1205,4
8AmBza-L-13	 <p>The chemical structure of 8AmBza-L-13 is a complex molecule. It features a central 8-aminobenzimidazole core. Attached to this core are: a benzamide group (NH-C(=O)-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), a butylamino group (-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), and a carbonyl group (-C(=O)-) which is further linked to a piperidine ring. The piperidine ring is connected via a methylene bridge to a benzene ring. This benzene ring is substituted with a dimethylamino group (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) and a long, branched polyoxyethylene chain consisting of multiple ethylene oxide units. Additionally, there is a cyano group (-C≡N) attached to the benzene ring.</p>	1223,3

8AmBza-L- 14	 <p>Chemical structure of 8AmBza-L-14, featuring a long polyether chain with a piperazine ring, a pyridine ring, and a quinoline ring system. The quinoline ring is substituted with an amino group (NH<sub>2</sub>) and a diethylamino group. The polyether chain is terminated by a piperazine ring and a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl group.</p>	1249,4
8AmBza-L- 15	 <p>Chemical structure of 8AmBza-L-15, featuring a long polyether chain with a piperazine ring, a pyridine ring, and a quinoline ring system. The quinoline ring is substituted with an amino group (NH<sub>2</sub>) and a diethylamino group. The polyether chain is terminated by a piperazine ring and a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl group. The structure also includes a chiral center and a secondary amine group.</p>	2391,8
8AmBza-L- 16	 <p>Chemical structure of 8AmBza-L-16, featuring a long polyether chain with a piperazine ring, a pyridine ring, and a quinoline ring system. The quinoline ring is substituted with an amino group (NH<sub>2</sub>) and a diethylamino group. The polyether chain is terminated by a piperazine ring and a 2,3,4,5-tetrafluorophenyl group.</p>	1251,4

8AmBza-L- 17		1090,2
8AmBza-L- 18		1059,2

### ИММУНОКОНЬЮГАТЫ

Типовые варианты осуществления иммуноконъюгатов содержат антитело, ковалентно присоединенное к одному или нескольким фрагментам 8-амидо-2-аминобензазепина (8AmBza) с помощью линкера, и имеющее формулу I:



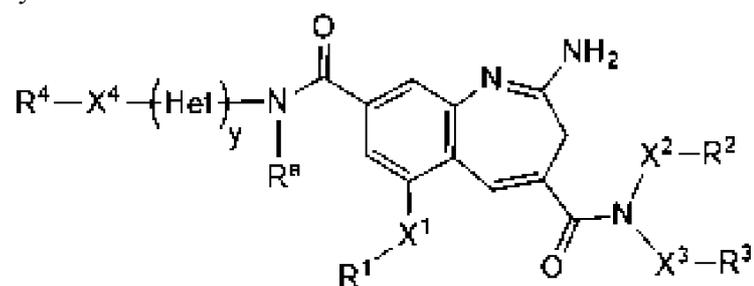
или его фармацевтически приемлемую соль,

где:

Ab представляет собой антитело;

p представляет собой целое число от 1 до 8;

8AmBza представляет собой фрагмент 8-амидо-2-аминобензазепина, имеющий формулу:



y равен 0 или 1;

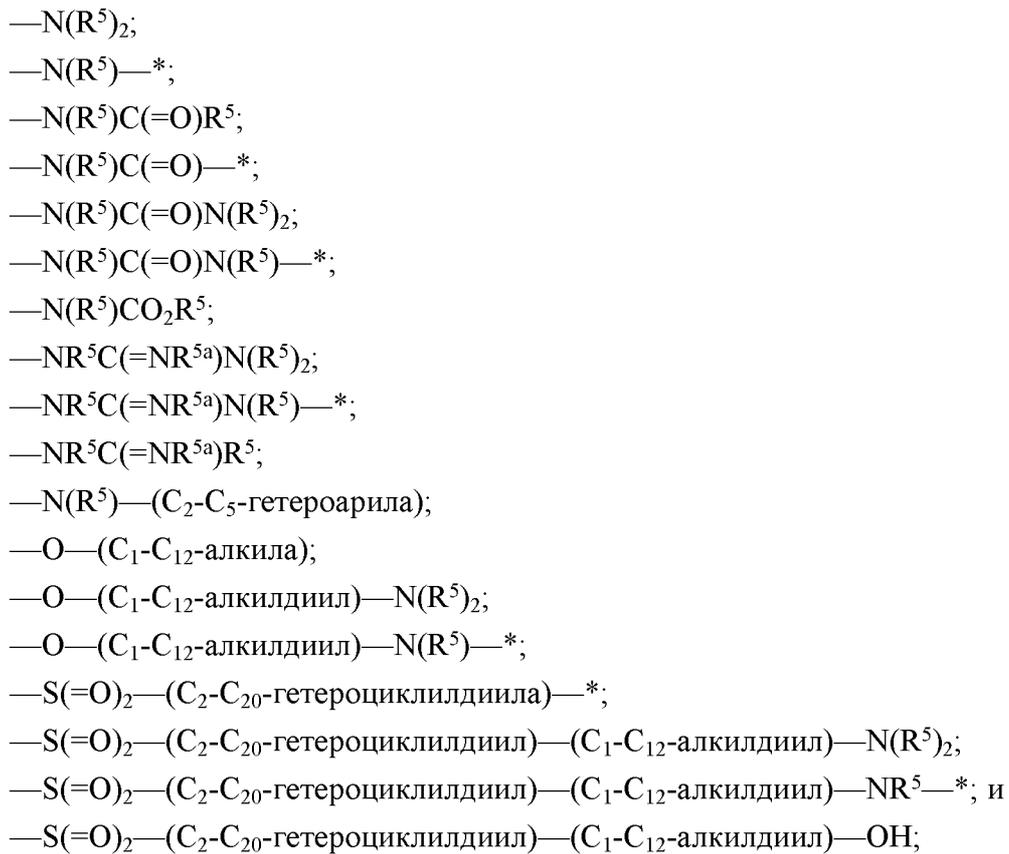
Het выбирают из группы, состоящей из гетероциклила, гетероциклилдила, гетероарила и гетероарилдила;

R<sup>a</sup> представляет собой H или образует Het с атомом азота, с которым он связан;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, и R<sup>4</sup> независимо выбирают из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинила, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила, C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила, где алкил, алкенил, алкинил, карбоциклил, арил, гетероциклил и гетероарил независимо и необязательно замещены одной или несколькими группами, выбранными из:



- (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—OR<sup>5</sup>;
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклила);
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклила)—\*;
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>—\*;
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклил)—NR<sup>5</sup>—C(=NR<sup>5</sup>)NR<sup>5</sup>—\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила);
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила)—\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклилдиила)—\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>—C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)—\*;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклила);
- (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклила)—\*;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>—\*;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклил)—NR<sup>5</sup>—C(=NR<sup>5a</sup>)NR<sup>5</sup>—\*;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила);
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила)—\*;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарил)—NR<sup>5</sup>—C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)—\*;
- C(=O)—\*;
- C(=O)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;
- C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклилдиила)—\*;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>)—\*;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)C(=O)R<sup>5</sup>;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>;
- C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>C(=NR<sup>5a</sup>)R<sup>5</sup>;
- C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-гетероарила);
- C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;
- C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиила)—\*;
- C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил)—(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклилдиил)—C(=O)NR<sup>5</sup>—
- (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>—\*;



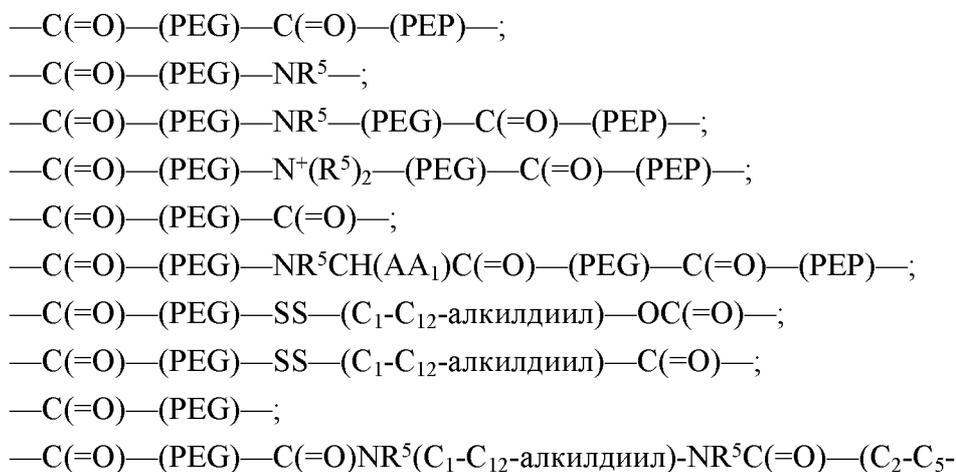
$\text{X}^1$ ,  $\text{X}^2$ ,  $\text{X}^3$  и  $\text{X}^4$  независимо выбирают из группы, состоящей из связи,  $\text{C}(=\text{O})$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^5)$ ,  $\text{O}$ ,  $\text{N}(\text{R}^5)$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{S}(\text{O})_2$  и  $\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^5)$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

$\text{R}^5$  выбирают из группы, состоящей из  $\text{H}$ ,  $\text{C}_6-\text{C}_{20}$ -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  $\text{R}^5$  вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

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

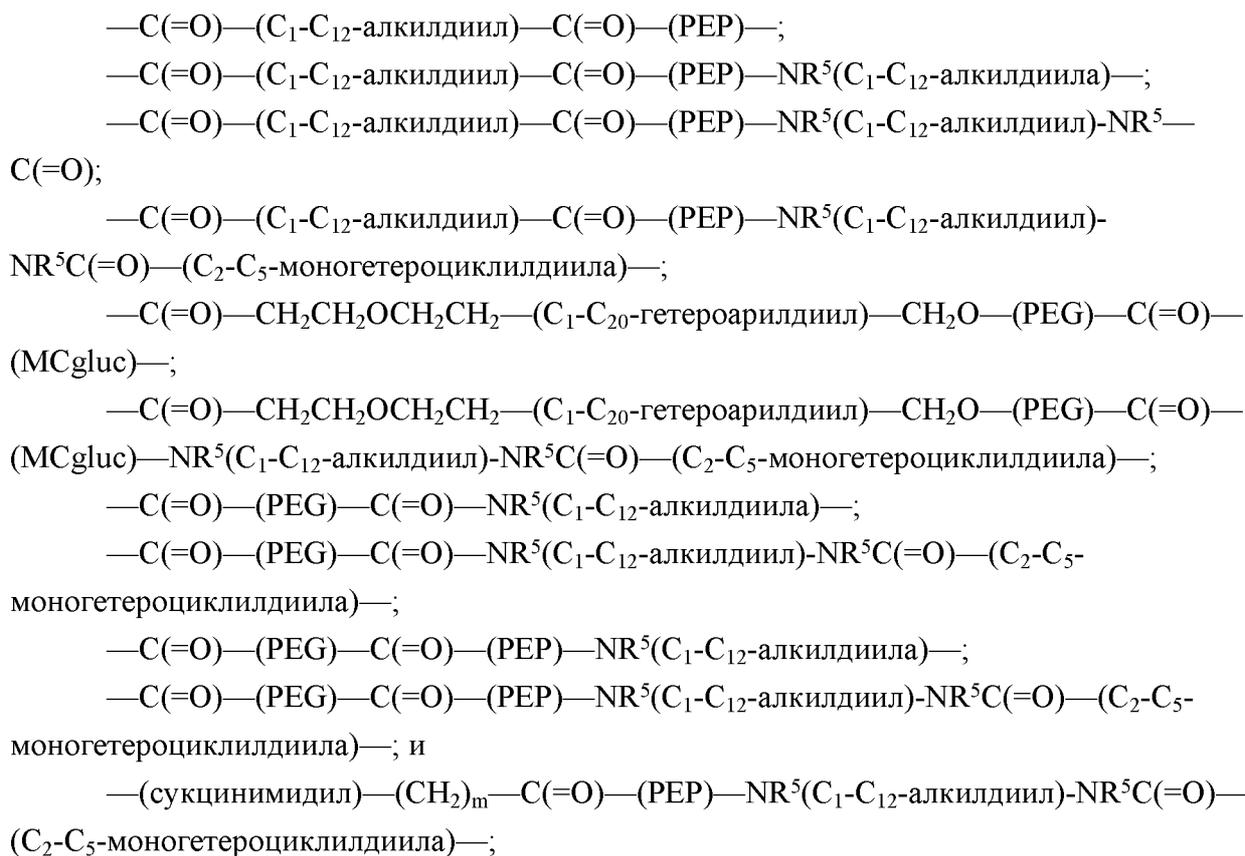
где звездочка \* указывает сайт присоединения  $\text{L}$ , и где один из  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  и  $\text{R}^4$  присоединен к  $\text{L}$ ;

$\text{L}$  представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из:



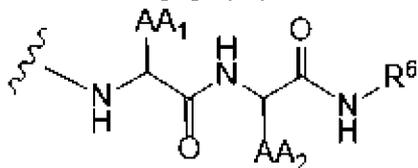
моногоheterоциклдиила)-





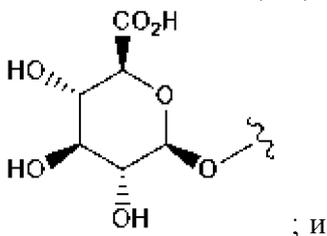
PEG имеет формулу:  $\text{—(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{—(CH}_2\text{)}_m\text{—}$ ; m представляет собой целое число от 1 до 5, и n представляет собой целое число от 2 до 50;

PEP имеет формулу:

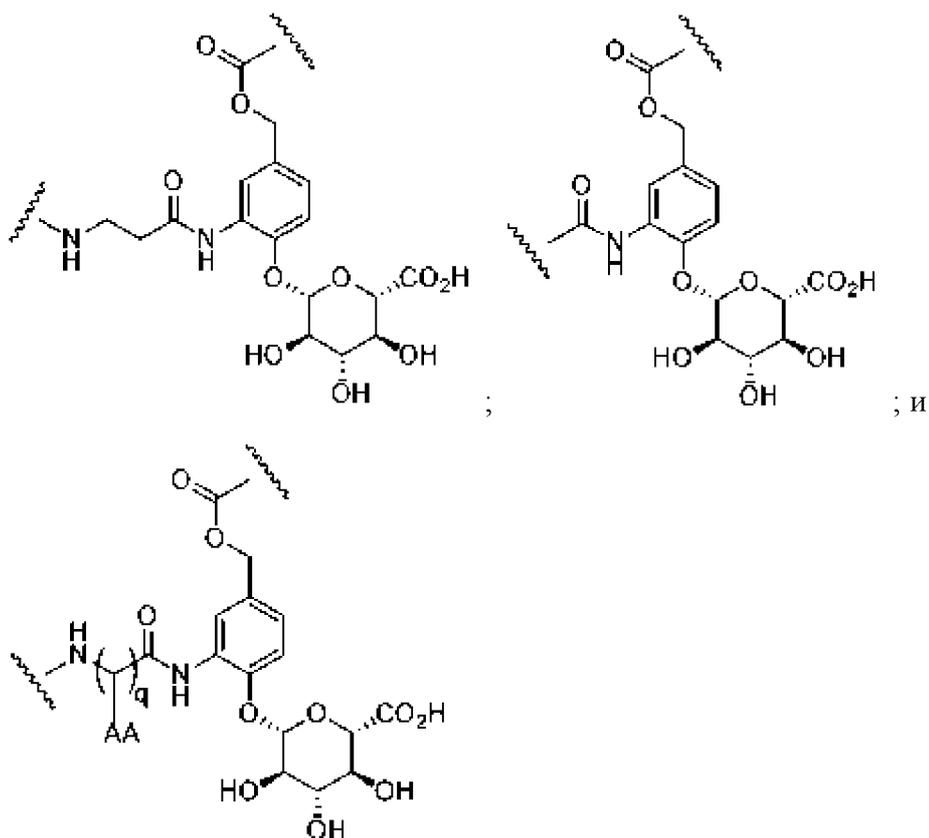


где AA<sub>1</sub> и AA<sub>2</sub> независимо выбирают из боковой цепи аминокислоты, или AA<sub>1</sub> или AA<sub>2</sub> и прилегающий атом азота образуют 5-членное кольцо пролиновой аминокислоты, и волнистая линия указывает точку присоединения; и

R<sup>6</sup> выбирают из группы, состоящей из C<sub>6</sub>–C<sub>20</sub>–арилдиила и C<sub>1</sub>–C<sub>20</sub>–heterоарилдиила, замещенных  $\text{—CH}_2\text{O—C(=O)—}$  и, необязательно:



MCgluc выбирают из групп:



где  $q$  имеет значение от 1 до 8, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты;

где алкил, алкилдиил, алкенил, алкенилдиил, алкинил, алкинилдиил, арил, арилдиил, карбоциклл, карбоцикллдиил, гетероциклл, гетероцикллдиил, гетероарил, и гетероарилдиил необязательно замещены одной или несколькими группами, независимо выбранными из F, Cl, Br, I, —CN, —CH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH=CH<sub>2</sub>, —C≡CH, —C≡CCH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>OH, —CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, —CH(OH)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>OP(O)(OH)<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>F, —CHF<sub>2</sub>, —CF<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub>, —CH(CH<sub>3</sub>)CN, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CN, —CH<sub>2</sub>CN, —CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —CO<sub>2</sub>H, —COCH<sub>3</sub>, —CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, —COCH(OH)CH<sub>3</sub>, —CONH<sub>2</sub>, —CONHCH<sub>3</sub>, —CON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, —NH<sub>2</sub>, —NHCH<sub>3</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —NHCOCH<sub>3</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)COCH<sub>3</sub>, —NHS(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —NO<sub>2</sub>, =O, —OH, —OCH<sub>3</sub>, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>—(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, —O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H, —OP(O)(OH)<sub>2</sub>, —S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —SCH<sub>3</sub>, —S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> и —S(O)<sub>3</sub>H.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $v$  равен 0.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $u$  равен 1.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает антитело, представляющее собой конструктор антитела, имеющий антигенсвязывающий

домен, который связывает PD-L1.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает антитело, выбранное из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба и авелумаба, или его биоаналога или биобеттера.

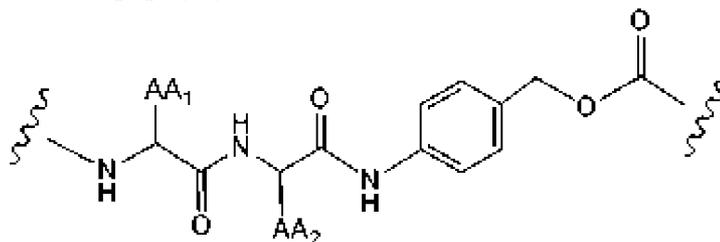
Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где антитело представляет собой конструкт антитела, имеющий антигенсвязывающий домен, который связывает HER2.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где антитело выбирают из группы, состоящей из трастузумаба и пертузумаба, или его биоаналога или биобеттера.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где антитело представляет собой конструкт антитела, имеющий антигенсвязывающий домен, который связывает SEA.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает антитело, в котором антитело представляет собой лабетузумаб, или его биоаналог или биобеттер.

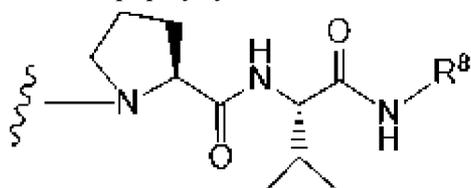
Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где PEP имеет формулу:



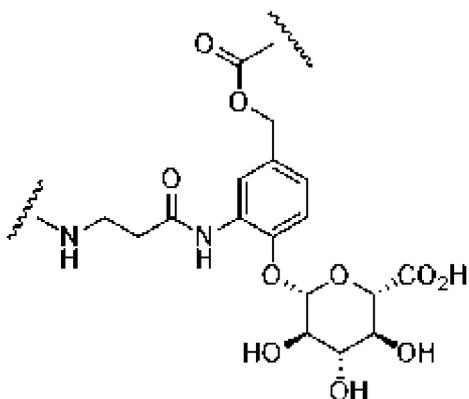
где AA<sub>1</sub> и AA<sub>2</sub> независимо выбирают из боковой цепи природной аминокислоты.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где AA<sub>1</sub> или AA<sub>2</sub> образуют с соседним атомом азота 5-членное кольцо пролиновой аминокислоты.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где PEP имеет формулу:



Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где MCgluc имеет формулу:



Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $AA_1$  и  $AA_2$  независимо выбирают из H,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_5)$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ ,  $-\text{CHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$  и  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ .

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $AA_1$  представляет собой  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , и  $AA_2$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ .

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $AA_1$  и  $AA_2$  независимо выбирают из GlcNAc аспарагиновой кислоты,  $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$  и  $-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}$ .

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $X^1$  представляет собой связь, а  $R^1$  представляет собой H.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $X^2$  представляет собой связь, и  $R^2$  представляет собой  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ -алкил.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $X^2$  и  $X^3$  каждый представляют собой связь, и  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбирают из  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ -алкила,  $-\text{O}-(\text{C}_1\text{-C}_{12}\text{-алкила})$ ,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{12}\text{-алкилдиил})-\text{OR}^5$ ,  $-(\text{C}_1\text{-C}_8\text{-алкилдиил})-\text{N}(\text{R}^5)\text{CO}_2\text{R}^5$  и  $-\text{O}-(\text{C}_1\text{-C}_{12}\text{-алкил})-\text{N}(\text{R}^5)\text{CO}_2\text{R}^5$ .

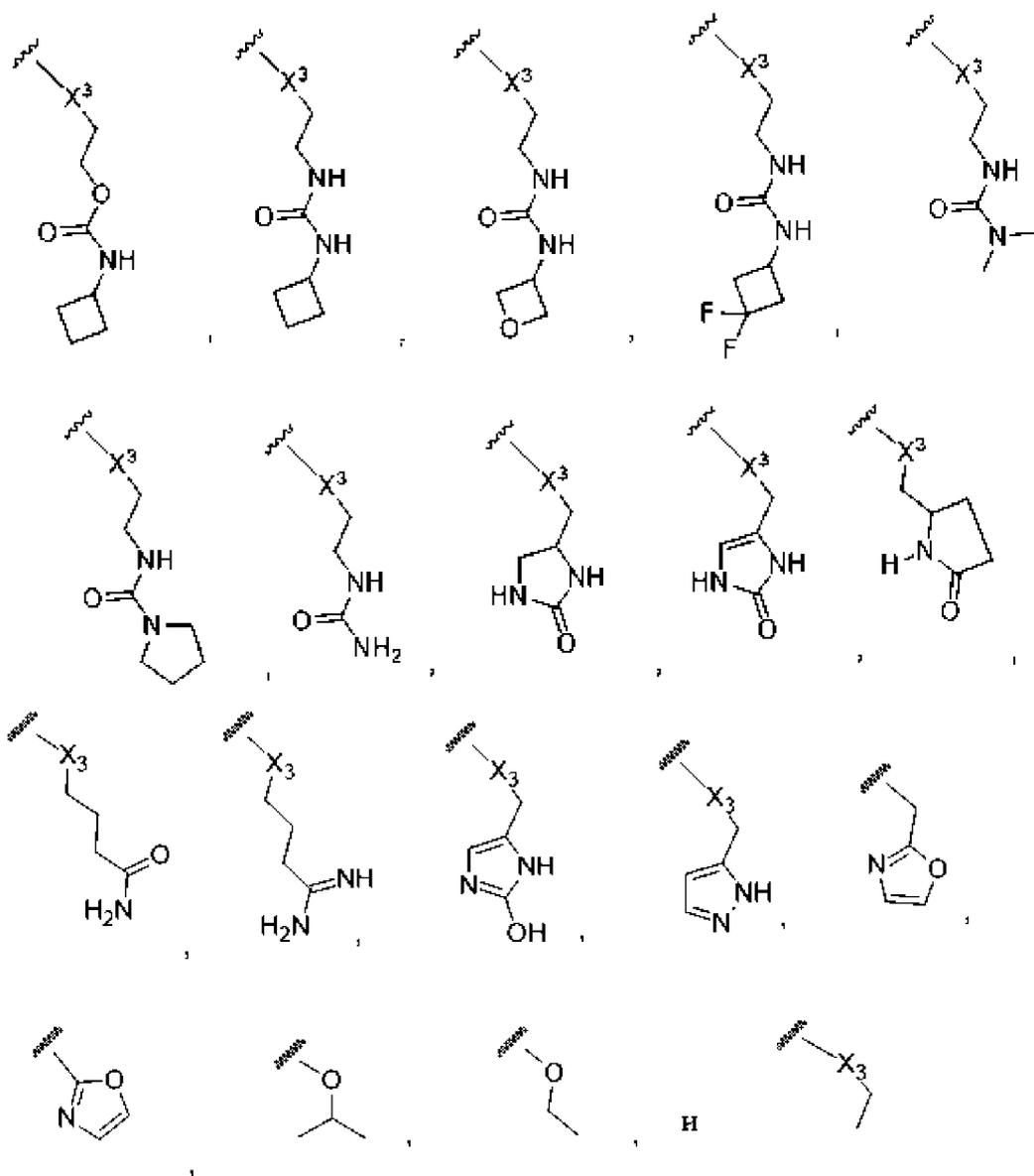
Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где каждый из  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбирают из  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$  и  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ .

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $R^2$  представляет собой  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ -алкил, и  $R^3$  представляет собой  $-(\text{C}_1\text{-C}_8\text{-алкилдиил})-\text{N}(\text{R}^5)\text{CO}_2\text{R}^4$ .

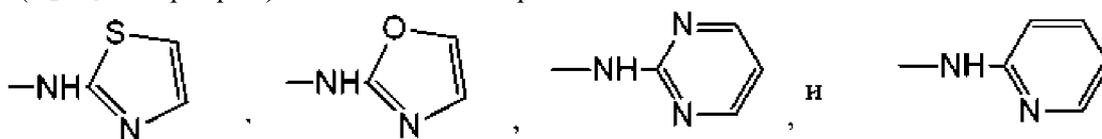
Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $R^2$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , и  $R^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}_2(t\text{-Bu})$ .

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где каждый из  $R^2$  и  $R^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $X^3$ - $R^3$  выбирают из группы, состоящей из:



Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где  $NR^5$  ( $C_2$ - $C_5$ -гетероарил) в  $R^1$  или  $R^3$  выбирают из:



Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где Нет представляет собой 5- или 6-членный моноциклический гетероарилдиил, выбранный из группы, состоящей из пиридилдиила, имидазолдиила, пиримидиндиила, пиразолидиила, триазолидиила, пиразиндиила, тетразолидиила, фурилдиила, тиенилдиила, изоксазолидиила, тиазолидиила, оксадиазолидиила, оксазолидиила, изотиазолидиила и пирролилдиила.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где Нет представляет собой 5- или 6-членный моноциклический гетероциклилдиил, выбранный из группы, состоящей из морфолинилдиила, пиперидинилдиила,

пиперазинилдиила, пирролидинилдиила, диоксанилдиила, тиоморфолинилдиила и S-диоксотiomорфолинилдиила.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где Het представляет собой 1,6-нафтиридил или 1,6-нафтиридиил.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I включает, где L выбирают из группы, состоящей из:

—C(=O)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил)—CH<sub>2</sub>O—(PEG)—C(=O)—(MCgluc)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногетероциклдиила)—;

—C(=O)—(PEG)—C(=O)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиила)—;

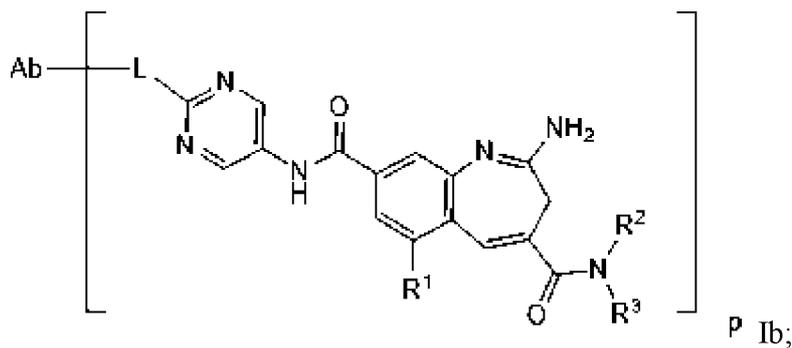
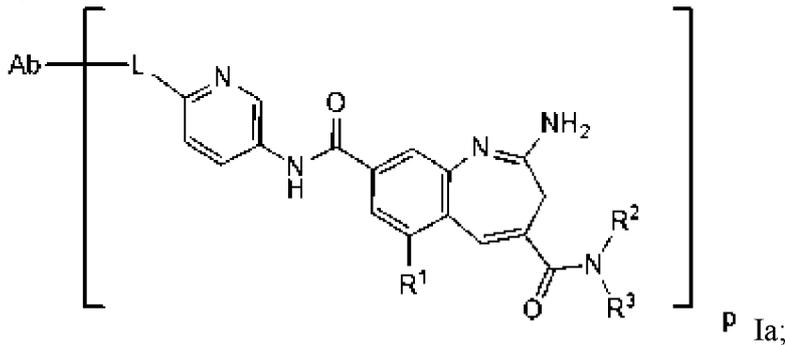
—C(=O)—(PEG)—C(=O)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногетероциклдиила)—;

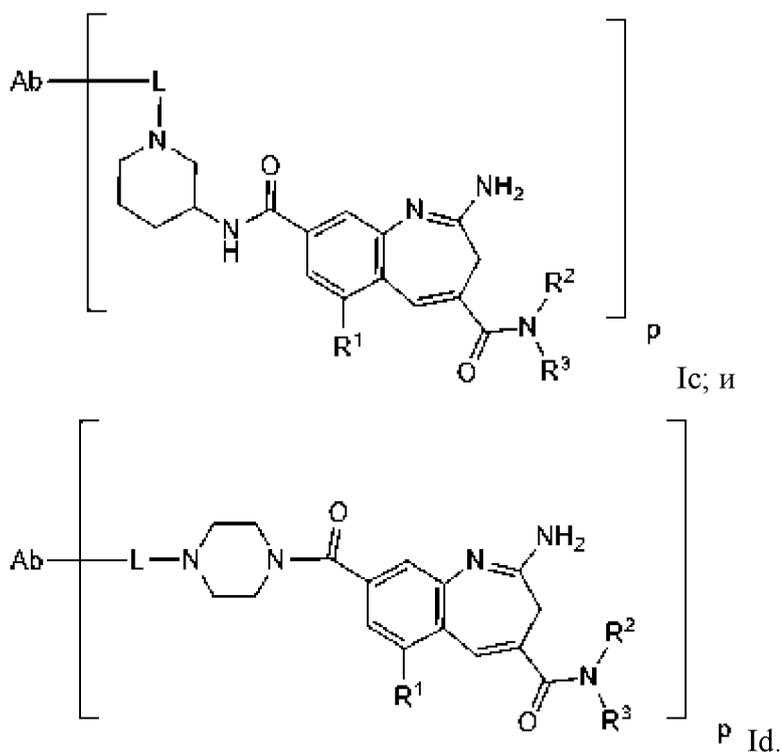
—C(=O)—(PEG)—C(=O)—(PEP)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиила)—;

—C(=O)—(PEG)—C(=O)—(PEP)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногетероциклдиила)—; и

—(сукцинимидил)—(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>—C(=O)—(PEP)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногетероциклдиила)—.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I, выбранного из формул Ia-d:





Изобретение включает все разумные комбинации и перестановки признаков вариантов осуществления формулы I.

В некоторых вариантах осуществления соединения иммуноконъюгатов по настоящему изобретению включают соединения с иммуностимулирующей активностью. Конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению избирательно доставляют эффективную дозу лекарственного средства 8-амидо-2-аминобензазепина в опухолевую ткань, посредством чего может быть достигнута большая селективность (*m.e.* более низкая эффективная доза) при одновременном увеличении терапевтического индекса («терапевтическое окно») по сравнению с неконъюгированным 8-амидо-2-аминобензазепином.

Нагрузка лекарственным средством представлена как  $p$ , количество фрагментов 8AmBza на антитело в иммуноконъюгате формулы I. Нагрузка лекарственным средством (8AmBza) может варьироваться от 1 до примерно 8 фрагментов лекарственного средства (D) на антитело. Иммуноконъюгаты формулы I включают смеси или наборы антител, конъюгированных с рядом фрагментов лекарственного средства, от 1 до примерно 8. В некоторых вариантах осуществления количество фрагментов лекарственного средства, которые могут быть конъюгированы с антителом, ограничено количеством реакционноспособных или доступных остатков боковых цепей аминокислот, таких как лизин и цистеин. В некоторых вариантах осуществления свободные цистеиновые остатки вводят в аминокислотную последовательность антител способами, описанными в данном документе. В таких аспектах  $p$  может иметь значение, равное 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, и диапазоны таких значений, такие как от 1 до 8 или от 2 до 5. В любом таком аспекте  $p$  и  $n$  равны друг другу (*t.e.*  $p=n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$  или 8, или составляют некоторый диапазон промежуточных значений). Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство

формулы I включают, без ограничений, антитела, которые содержат 1, 2, 3 или 4 модифицирующих аминокислоты цистеина (Lyon, R. et al. (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138). В некоторых вариантах осуществления один или несколько свободных остатков цистеина уже присутствуют в антителе, образующем внутрицепочечные дисульфидные связи, без проведения модификаций, и в этом случае существующие свободные остатки цистеина можно использовать для конъюгации антитела с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления антитело подвергают воздействию восстанавливающих условий перед конъюгацией антитела для получения одного или нескольких свободных остатков цистеина.

Для некоторых иммуноконъюгатов  $p$  может быть ограничено количеством сайтов связывания на антителе. Например, если место присоединения 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 быть присоединено лекарственное средство. В других вариантах осуществления одна или несколько аминогрупп лизина в антителе могут быть доступны и реакционноспособны для конъюгации с соединением  $\delta$ AmVza-линкер формулы II. В некоторых вариантах осуществления более высокая нагрузка лекарственным средством, например,  $p > 5$ , может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю клеточной проницаемости некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления средняя нагрузка лекарственным средством для иммуноконъюгата составляет от 1 до примерно 8; от примерно 2 до примерно 6; или от примерно 3 до примерно 5. В некоторых вариантах осуществления антитело подвергают воздействию денатурирующих условий для выявления реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин.

Нагрузку (соотношение лекарственное средство/антитело) иммуноконъюгата можно контролировать различными способами, например, путем: (i) ограничения молярного избытка промежуточного соединения  $\delta$ AmVza-линкер по отношению к антителу, (ii) ограничения времени реакции конъюгации или температуры, и (iii) создания условий частичной или ограниченной восстановительной денатурации для оптимизации реакционной способности антител.

Следует понимать, что когда более чем одна нуклеофильная группа антитела взаимодействует с лекарственным средством, тогда полученный продукт представляет собой смесь конъюгированных соединений антитело-лекарственное средство с некоторым распределением одного или нескольких фрагментов лекарственного средства, присоединенных к антителу. Среднее количество лекарственного средства на антитело можно рассчитать для смеси с помощью двойного ИФА-анализа антител, специфичного к антителу и специфичного к лекарственному средству. Отдельные молекулы иммуноконъюгата могут быть идентифицированы в смеси методом масс-спектропии и

разделены с помощью ВЭЖХ, например, хроматографии гидрофобного взаимодействия (см., например, McDonagh et al. (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 единым значением нагрузки может быть выделен из конъюгационной смеси с помощью электрофореза или хроматографии.

Иллюстративный вариант осуществления иммуноконъюгата формулы I выбирают из Таблиц 3а и 3б Иммуноконъюгаты.

Таблица 3а. Иммуноконъюгаты (ИК)

Иммуноконъюгат №	8AmBza-линкер Таблица 2а	Антитело (Ab) Антиген	Отношение антитело-лекарственное средство (DAR)	Секреция ФНО $\alpha$ миелоидными клетками EC50 [нМ]
ИК-1	8AmBza-L-2	трастузумаб HER2	2,53	273,3
ИК-2	8AmBza-L-3	трастузумаб HER2	0,8	58,6
ИК-3	8AmBza-L-4	трастузумаб HER2	2,49	>1000
ИК-4	8AmBza-L-5	трастузумаб HER2	2,49	>1000
ИК-5	8AmBza-L-6	трастузумаб HER2	1,61	>1000
ИК-6	8AmBza-L-8	трастузумаб HER2	2,24	364
ИК-7	8AmBza-L-9	трастузумаб HER2	2,50	н/д
ИК-8	8AmBza-L-10	трастузумаб HER2	2,49	н/д
ИК-9	8AmBza-L-11	трастузумаб	3,36	н/д

		HER2		
--	--	------	--	--

Таблица 3b. Иммуноконъюгаты (ИК)

Иммуноконъюгат №	8AmBza-линкер Таблица 2b	Антитело (Ab) Антиген	Отношение антитело-лекарственного средства (DAR)	Секреция ФНО $\alpha$ миелоидными клетками EC50 [нМ]
ИК-10		трастузумаб HER2	2,26	н/д
ИК-11		трастузумаб HER2	2,24	н/д
ИК-12		трастузумаб HER2	1,91	н/д
ИК-13		трастузумаб HER2	2,30	н/д

#### КОМПОЗИЦИИ ИММУНОКОНЪЮГАТОВ

Изобретение предусматривает композицию, например, фармацевтически или фармакологически приемлемую композицию или состав, содержащую множество иммуноконъюгатов, как описано в данном документе и, необязательно, носитель для них, например, фармацевтически или фармакологически приемлемый носитель. Иммуноконъюгаты в композиции могут быть одинаковыми или разными, т.е. композиция может содержать иммуноконъюгаты, которые имеют одинаковое количество адъювантов, связанных в одинаковых положениях конструкторов антитела, и/или иммуноконъюгаты, которые имеют одинаковое количество адъювантов 8AmBza, связанных с разными положениями конструкторов антитела, которые имеют разное количество адъювантов, связанных с одними и теми же положениями конструктора антитела, или которые имеют разное количество адъювантов, связанных с разными положениями конструктора антитела.

В иллюстративном варианте осуществления композиция, содержащая иммуноконъюгаты, содержит смесь иммуноконъюгатов, причем средняя нагрузка лекарственного средства (8AmBza) на антитело в смеси соединений иммуноконъюгатов составляет от примерно 2 до примерно 5.

Композиция иммуноконъюгатов по настоящему изобретению может иметь среднее соотношение адъюванта к конструктору антитела от примерно 0,4 до примерно 10. Квалифицированному специалисту понятно, что количество адъювантов 8AmBza, конъюгированных с конструктором антитела, может варьироваться для разных иммуноконъюгатов в композиции, содержащей несколько иммуноконъюгатов по настоящему изобретению и, таким образом, отношение адъюванта к конструктору антитела (например, антителу) может быть измерено как среднее значение, которое можно назвать

отношением лекарственного средства к антителу (DAR). Соотношение адъюванта и конструктора антитела (например, антитела) можно оценить любым подходящим способом, многие из которых известны в данной области техники.

Среднее количество фрагментов адъюванта на антитело (DAR) в препаратах иммуноконъюгатов, полученных в результате реакций конъюгации, можно охарактеризовать обычными способами, такими как масс-спектрометрия, анализ ИФА и ВЭЖХ. Также может быть определено количественное распределение иммуноконъюгатов в композиции в пересчете на р. В некоторых случаях выделение, очистка и характеристика гомогенных иммуноконъюгатов, где р представляет собой определенное значение, от иммуноконъюгатов с другими значениями лекарственной нагрузки могут быть осуществлены с помощью таких способов, как ВЭЖХ с обращенной фазой или электрофорез.

В некоторых вариантах осуществления, композиция дополнительно содержит один или несколько фармацевтически или фармакологически приемлемых эксципиентов. Например, иммуноконъюгаты по настоящему изобретению могут быть составлены для парентерального введения, такого как внутривенное (в/в) введение или введение в полость тела или в просвет органа. Альтернативно, иммуноконъюгаты можно вводить внутриопухолевым путем. Композиции для инъекций обычно содержат раствор иммуноконъюгата, растворенного в фармацевтически приемлемом носителе. В число приемлемых носителей и растворителей, которые могут использоваться, входят вода и изотонический раствор одной или нескольких солей, таких как хлорид натрия, например, раствор Рингера. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно можно использовать стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моноглицериды или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, также могут быть использованы при приготовлении препаратов для инъекций. Желательно, чтобы эти композиции были стерильными и, как правило, не содержали нежелательных веществ. Эти композиции можно стерилизовать обычными, хорошо известными методами стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, требуемые для аппроксимации физиологических условий, такие как агенты, регулирующие рН, и буферные агенты, агенты, регулирующие токсичность, например, ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и т.п.

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

## МЕТОД ЛЕЧЕНИЯ РАКА ИММУНОКОНЪЮГАТАМИ

Изобретение предусматривает способ лечения рака. Способ включает введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата, как описано в данном документе (например, в виде композиции, описанной в данном документе), нуждающемуся в этом субъекту, например, субъекту, который болен раком и нуждается в лечении рака. Способ включает введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата (ИК), выбранного из Таблицы 3.

Предусматривается, что иммуноконъюгат по настоящему изобретению можно использовать для лечения различных гиперпролиферативных заболеваний или расстройств, например, характеризующихся сверхэкспрессией опухолевого антигена. Примеры гиперпролиферативных расстройств включают доброкачественные или злокачественные солидные опухоли и гематологические расстройства, такие как лейкемия и лимфоидные злокачественные новообразования.

В другом аспекте предложен иммуноконъюгат для применения в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления изобретение предусматривает иммуноконъюгат для применения в способе лечения индивидуума, включающем введение индивидууму эффективного количества иммуноконъюгата. В одном таком варианте осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, *например*, как описано в данном документе.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение относится к применению 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 таком варианте осуществления, способ дополнительно включает введение индивидууму эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, *например*, как описано в данном документе.

Карциномы - это злокачественные новообразования, возникающие в эпителиальных тканях. Эпителиальные клетки покрывают наружную поверхность тела, выстилают внутренние полости и образуют выстилку железистой ткани. Примеры карцином включают, без ограничений, аденокарциному (рак, который начинается в железистых (секреторных) клетках, такую как раки молочной железы, поджелудочной железы, легкого, предстательной железы, желудка, пищеводно-желудочного перехода и толстой кишки), аденокарцинома; гепатоцеллюлярная карцинома; почечно-клеточный рак; рак яичников; карцинома *in situ*; протоковая карцинома; карцинома молочной железы; базальноклеточная карцинома; плоскоклеточная карцинома; переходноклеточная карцинома; карцинома толстой кишки; карцинома носоглотки; мультилокулярная кистозная почечно-клеточная карцинома; овсяноклеточная карцинома; крупноклеточная карцинома легкого; мелкоклеточная карцинома легкого; немелкоклеточная карцинома легкого; и т.п. Карциномы могут находиться в предстательной железе, поджелудочной железе, толстой кишке, головном мозге (обычно в виде вторичных метастазов), легких,

молочной железе и коже. В некоторых вариантах осуществления способы лечения немелкоклеточной карциномы легкого включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструкт антитела, который способен связывать PD-L1 (например, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биоаналоги или их биобеттеры). В некоторых вариантах осуществления, способы лечения рака молочной железы включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструкт антитела, который способен связывать PD-L1 (например, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биоаналогов или их биобеттеров). В некоторых вариантах осуществления, способы лечения трижды негативного рака молочной железы включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструкт антитела, который способен связывать PD-L1 (например, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биоаналогов или их биобеттеров).

Опухоли мягких тканей представляют собой очень разнообразную группу редких опухолей, происходящих из соединительной ткани. Примеры опухолей мягких тканей включают, без ограничений, альвеолярную саркому мягких тканей; ангиоматоидную фиброзную гистиоцитому; хондромиоксидную фиброму; скелетную хондросаркому; внескелетную миксоидную хондросаркому; светлоклеточную саркому; десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль; взрывающую дерматофибросаркому; эндометриальную стромальную опухоль; саркому Юинга; фиброматоз (десмоидный); инфантильную фибросаркому; гастроинтестинальную стромальную опухоль; костную гигантоклеточную опухоль; теносиновиальную гигантоклеточную опухоль; воспалительную миофибробластную опухоль; лейомиому матки; лейомиосаркому; липобластому; типичную липому; веретенноклеточную или плеоморфную липому; атипичную липому; хондроидную липому; высокодифференцированную липосаркому; миксоидную/круглоклеточную липосаркому; плеоморфную липосаркому; миксоидную злокачественную фиброзную гистиоцитому; злокачественную фиброзную гистиоцитому высокой степени злокачественности; миксофибросаркому; злокачественную опухоль оболочек периферических нервов; мезотелиому; нейробластому; остеохондрому; остеосаркому; примитивную нейроэктодермальную опухоль; альвеолярную рабдомиосаркому; эмбриональную рабдомиосаркому; доброкачественную или злокачественную шванному; синовиальную саркому; опухоль Эвана; узелковый фасциит; фиброматоз десмоидного типа; солитарную фиброзную опухоль; взрывающую дерматофибросаркому (DFSP); ангиосаркому; эпителиоидную гемангиоэндотелиому; теносиновиальную гигантоклеточную опухоль (TGCT); пигментный виллонодулярный синовит (ПВНС); фиброзную дисплазию; миксофибросаркому; фибросаркому; синовиальную саркому; злокачественную опухоль оболочек периферических нервов; нейрофиброму; плеоморфную аденому мягких тканей; и неоплазии, 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 в мягких тканях тела, включая

хрящи, жир, мышцы, кровеносные сосуды, фиброзную ткань или другую соединительную или поддерживающую ткань. Различные типы саркомы определяются по месту формирования рака. Например, остеосаркома образуется в костях, липосаркома - в жире, а рабдомиосаркома - в мышцах. Примеры сарком включают, без ограничений, опухоль Аскина; ботриоидную саркому; хондросаркому; саркому Юинга; злокачественную гемангиоэндотелиому; злокачественную шванному; остеосаркому; и саркомы мягких тканей (например, альвеолярную саркому мягких тканей; ангиосаркому; филлоидную цистосаркому, взбухающую дерматофибросаркому (DFSP); десмоидную опухоль; десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль; эпителиоидную саркому; экстраклеточную хондросаркому; экстраклеточную остеосаркому; фибросаркому; гастроинтестинальную стромальную опухоль (GIST); гемангиоперицитому; гемангиосаркому (чаще называемую «ангиосаркомой»); саркому Капоши; лейомиосаркому; липосаркому; лимфангиосаркому; злокачественную опухоль оболочек периферических нервов (MPNST); нейрофибросаркому; синовиальную саркому; и недифференцированную плеоморфную саркому).

Тератома представляет собой тип опухоли зародышевых клеток, которая может содержать несколько различных типов тканей (например, может включать ткани, происходящие из любого и/или всех трех зародышевых листков: энтодермы, мезодермы и эктодермы), в том числе, например, волосы, мышцы и кости. Тератомы чаще всего возникают в яичниках у женщин, яичках у мужчин и копчике у детей.

Меланома - это форма рака, которая начинается в меланоцитах (клетках, вырабатывающих пигмент меланин). Меланома может начаться в родинке (меланома кожи), но также может начаться в других пигментированных тканях, таких как глаза или кишечник.

Карцинома из клеток Меркеля - это редкий тип рака кожи, который обычно проявляется в виде узелка телесного или голубовато-красного цвета на лице, голове или шее. Карциному из клеток Меркеля также называют нейроэндокринной карциномой кожи. В некоторых вариантах осуществления способы лечения карциномы из клеток Меркеля включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструкт антитела, который способен связывать PD-L1 (например, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биоаналоги или их биобеттеры). В некоторых вариантах осуществления карцинома из клеток Меркеля метастазирует на момент введения.

Лейкозы - это виды рака, которые начинаются в кроветворной ткани, такой как костный мозг, и вызывают образование большого количества аномальных клеток крови, которые попадают в кровоток. Например, лейкозы могут возникать в клетках костного мозга, которые обычно созревают в кровотоке. Лейкозы получают названия по скорости развития и прогрессирования заболевания (например, острый или хронический) и по типу пораженных лейкоцитов (например, миелоидные или лимфоидные). Миелоидные лейкозы также называют миелогенными или миелобластными лейкозами. Лимфоидные лейкозы также называют лимфобластным или лимфоцитарным лейкозом. Клетки лимфоидного

лейкоза могут скапливаться в лимфатических узлах, которые могут опухать. Примеры лейкозов включают, без ограничений, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) и хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ).

Лимфомы - это раковые опухоли, которые начинаются в клетках иммунной системы. Например, лимфомы могут возникать из клеток костного мозга, которые в норме созревают в лимфатической системе. Существуют две основные категории лимфом. Одной из категорий лимфом является лимфома Ходжкина (ЛХ), которая характеризуется наличием типа клеток, называемых клетками Рида-Штернберга. В настоящее время существует 6 признанных типов ЛХ. Примеры лимфом Ходжкина включают классическую лимфому Ходжкина (КЛХ) с узловым склерозом, КЛХ со смешанной клеточностью, КЛХ с истощением лимфоцитов, КЛХ с высоким содержанием лимфоцитов и ЛХ с преобладанием узловых лимфоцитов.

Другой категорией лимфом являются неходжкинские лимфомы (НХЛ), которые включают в себя большую и разнообразную группу раковых заболеваний клеток иммунной системы. Неходжкинские лимфомы можно разделить на виды рака с индолентным течением (медленно растущие) и злокачественные новообразования с агрессивным течением (быстрорастущие). В настоящее время известно 61 тип НХЛ. Примеры неходжкинских лимфом включают, без ограничений, связанные со СПИДом лимфомы, анапластическую крупноклеточную лимфому, ангиоиммунобластную лимфому, бластную ПК-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, беркиттоподобную лимфому (мелкоклеточная лимфома без расщепленных клеток), хронический лимфолейкоз/малую лимфоцитарную лимфому, кожную Т-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому энтеропатического типа, фолликулярную лимфому, гепатолиенальную гамма-дельта Т-клеточную лимфому, Т-клеточный лейкоз, лимфобластную лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, назальную Т-клеточную лимфому, педиатрическую лимфому, периферические Т-клеточные лимфомы, первичную лимфому центральной нервной системы, трансформированные лимфомы, связанные с лечением Т-клеточные лимфомы и макроглобулинемию Вальденстрема.

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

Иммуноконъюгаты по настоящему изобретению можно использовать в терапии либо отдельно, либо в комбинации с другими агентами. Например, иммуноконъюгат можно вводить совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством, таким как химиотерапевтическое средство. Такая комбинированная терапия включает комбинированное введение (при котором два или более терапевтических агента включены

в один и тот же или в разные составы) и раздельное введение, и в этом случае введение иммуноконъюгата может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адъюванта. Иммуноконъюгаты также можно использовать в сочетании с лучевой терапией.

Иммуноконъюгаты по настоящему изобретению (и любое дополнительное терапевтическое средство) можно вводить любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение и, если это желательно при местном лечении, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование можно осуществлять любым подходящим путем, например, с помощью инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, частично, в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или хроническим. Настоящее изобретение предусматривает различные схемы введения доз, включая, без ограничений, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Известно, что атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биоаналоги и их биобеттеры полезны при лечении рака, в частности, рака молочной железы, особенно трижды негативного (отрицательный тест на рецепторы эстрогена, рецепторы прогестерона и избыток белка HER2) рака молочной железы, рака мочевого пузыря и карциномы из клеток Меркеля. Иммуноконъюгат, описанный в данном документе может быть использован для лечения тех же типов рака, при которых применяются атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биоаналоги и их биобеттеры, в частности, рака молочной железы, особенно трижды негативного (отрицательный тест на рецепторы эстрогена, рецепторы прогестерона и избыток белка HER2) рака молочной железы, рака мочевого пузыря и карциномы из клеток Меркеля.

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

В другом аспекте изобретение обеспечивает способ профилактики рака. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата (например, в виде композиции, описанной выше). В некоторых вариантах осуществления субъект восприимчив к определенному виду рака, профилактика которого проводится. Например, способы могут включать введение субъекту иммуноконъюгата для обеспечения дозы от примерно 100 нг/кг до примерно 50 мг/кг. Доза иммуноконъюгата может меняться в диапазоне от примерно 5 мг/кг до примерно 50 мг/кг, от примерно 10 мкг/кг до примерно 5 мг/кг, или от примерно 100 мкг/кг до примерно 1 мг/кг. Доза иммуноконъюгата может составлять примерно 100, 200, 300, 400 или 500 мкг/кг. Доза иммуноконъюгата может составлять примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг. Доза иммуноконъюгата может также выходить за пределы этих диапазонов, в зависимости от конкретного конъюгата, а также типа и тяжести рака, лечение которого проводится. Частота введения может варьироваться от одной дозы до нескольких доз в неделю или чаще. В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат вводят от примерно одного раза в месяц до примерно пяти раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат вводят один раз в неделю.

Некоторые варианты осуществления изобретения обеспечивают способы лечения рака, как описано выше, при этом рак представляет собой рак молочной железы. Рак молочной железы может возникать из разных областей молочной железы, и было охарактеризовано несколько различных типов рака молочной железы. Например, иммуноконъюгаты по настоящему изобретению можно использовать для лечения протоковой карциномы *in situ*; инвазивной протоковой карциномы (например, тубулярной карциномы, медуллярной карциномы, муцинозной карциномы, папиллярной карциномы или решетчатой карциномы молочной железы); дольковой карциномы *in situ*; инвазивной дольковой карциномы; воспалительного рака молочной железы; и других форм рака молочной железы, таких как тройной негативный (отрицательный тест 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 конструктор антитела, который способен связывать HER2 (например, трастузумаб, пертузумаб, их биоаналоги или биобеттеры) и PD-L1 (например, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, их биоаналоги или биобеттеры). В некоторых вариантах осуществления способы лечения рака толстой кишки, рака легких, рака почки, рака поджелудочной железы, рака желудка и рака пищевода включают введение иммуноконъюгата, содержащего конструктор антитела, который способен связывать РЭА, или опухолей, сверхэкспрессирующих РЭА (например, лабетузамаба, биоаналогов или их биобеттеров).

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

#### ПРИМЕРЫ

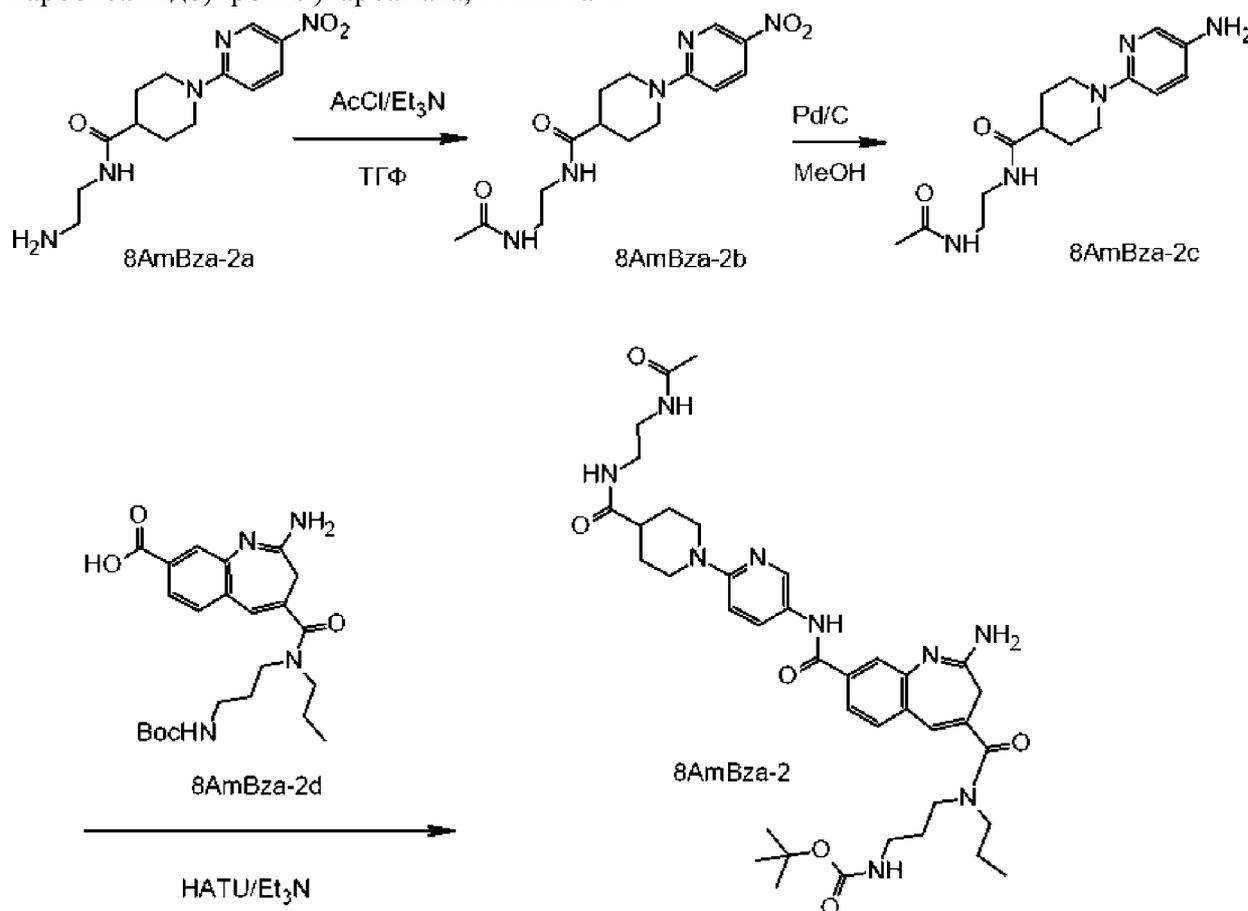
Получение соединений 8-амидо-2-аминобензазепина (8AmBza) и промежуточных

соединений

Пример 1. Синтез трет-бутил-((5-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3Н-бензо[б]азепин-8-карбоксамидо)пиперидин-3-ил)метил)карбамата, 8AmBza-1.

8AmBza-1 был получен и охарактеризован в соответствии с описанными в данном документе процедурами.

Пример 2. Синтез трет-бутил-(3-(8-(((6-(4-((2-ацетамидоэтил)карбамоил)пиперидин-1-ил)пиперидин-3-ил)карбамоил)-2-амино-N-пропил-3Н-бензо[б]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамата, 8AmBza-2



Получение N-(2-ацетамидоэтил)-1-(5-нитропиперидин-2-ил)пиперидин-4-карбоксамид, 8AmBza-2b

К смеси ацетилхлорида (142,82 мг, 1,82 ммоль, 129,83 мкл, 3 экв.) и N-(2-аминоэтил)-1-(5-нитро-2-пиперидил)пиперидин-4-карбоксамид, 8AmBza-2a (0,2 г, 606,46 мкмоль, 1 экв., HCl) в ТГФ (10 мл) добавляли Et<sub>3</sub>N (245,47 мг, 2,43 ммоль, 337,65 мкл, 4 экв.) при 25°С в атмосфере N<sub>2</sub>. Смесь перемешивали при 25°С в течение 1 часа. ЖХ-МС показала завершение реакции. Смесь выливали в воду (20 мл). Смесь фильтровали с получением 8AmBza-2b (0,2 г, 596,38 мкмоль, выход 98,34%) в виде желтого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-*d*<sub>6</sub>, 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).

Получение N-(2-ацетамидоэтил)-1-(5-аминопиперидин-2-ил)-пиперидин-4-карбоксамид, 8AmBza-2c

К раствору N-(2-ацетамидоэтил)-1-(5-нитро-2-пиридил)пиперидин-4-карбоксамид 8AmBza-2b (0,2, 596,38 мкмоль, 1 экв.) в MeOH (20 мл) добавляли Pd/C (0,2 г, чистота 5%) в атмосфере N<sub>2</sub>. Суспензию дегазировали под вакуумом и несколько раз продували H<sub>2</sub>. Смесь перемешивали в атмосфере H<sub>2</sub> (103 кПа (15 psi)) при 25°C в течение 4 часов. ЖХ-МС показала завершение реакции. Смесь фильтровали и концентрировали с получением 8AmBza-2c (0,18 г, 589,44 мкмоль, выход 98,84%) в виде желтого твердого вещества.

Получение трет-бутил-(3-(8-((6-(4-((2-ацетамидоэтил)карбамоил)пиперидин-1-ил)пиридин-3-ил)карбамоил)-2-амино-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамата, 8AmBza-2

К смеси 2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропилпропилкарбамоил]-3H-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты, 8AmBza-2d (0,22 г, 494,91 мкмоль, 1 экв.), 1-[бис(диметиламино)метиле]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния 3-оксида гексафторфосфата, гексафторфосфата азабензотриазолтетраметилурия, HATU, регистрационный № CAS № 148893-10-1 (225,82 мг, 593,90 мкмоль, 1,2 экв.) в ДМФА (5 мл) добавляли Et<sub>3</sub>N (150,24 мг, 1,48 ммоль, 206,66 мкл, 3 экв.) при 25 °C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 5 мин, затем добавляли к смеси N-(2-ацетамидоэтил)-1-(5-амино-2-пиридил)пиперидин-4-карбоксамид, 8AmBza-2c (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\*1). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (50 мл\*1), осушали безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали на колонке для препаративной ВЭЖХ: Welch Xtimate C18 150\*25 мм\*5 мкм; подвижная фаза: [вода (10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; V%: 30%-50%, 10,5 мин с получением 8AmBza-2 (96 мг, 131,17 мкмоль, выход 26,50%) в виде беловатого твердого вещества. <sup>1</sup>H 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 (шир.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 [M+H] 732,42 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 732,40 (наблюдаемая).

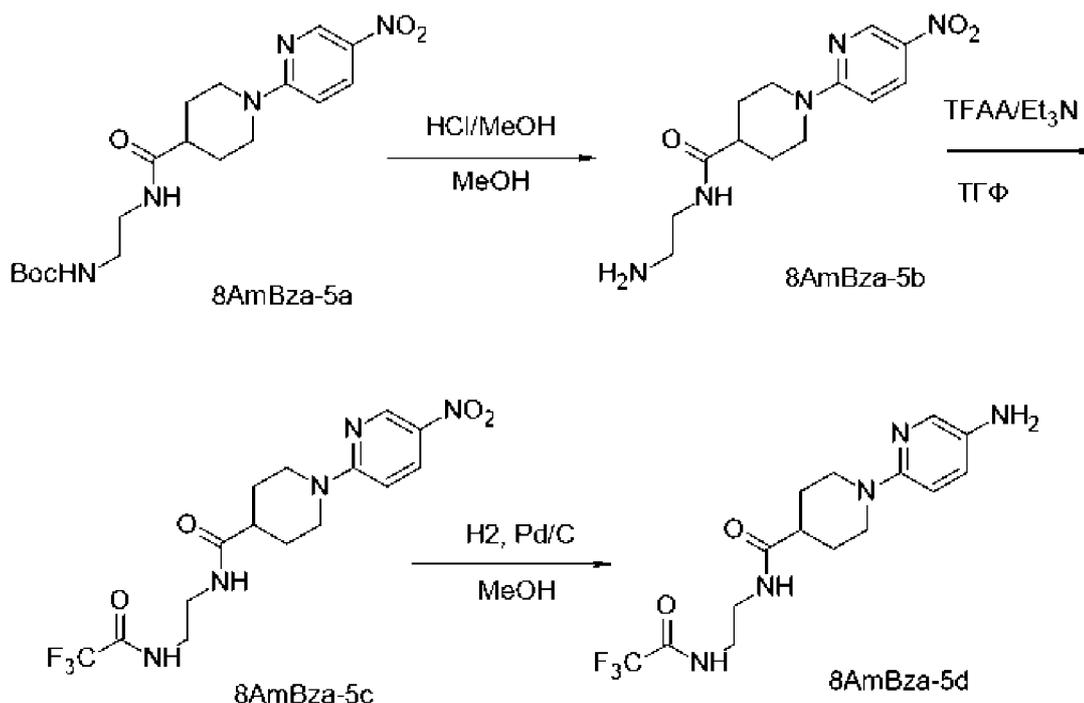
Пример 3. Синтез 2-амино-N8-(6-(4-((2-аминоэтил)карбамоил)пиперидин-1-ил)пиридин-3-ил)-N4,N4-дипропил-3H-бензо[b]азепин-4,8-дикарбоксамид, 8AmBza-3

8AmBza-3 был получен и охарактеризован в соответствии с процедурами, описанными в данном документе.

Пример 4. Синтез 4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил-((5-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоксамидо)пиридин-3-ил)метил)карбамата, 8AmBza-4

8AmBza-4 был получен и охарактеризован в соответствии с процедурами, описанными в данном документе.

Пример 5. Синтез трет-бутил-(3-(2-амино-8-((6-(4-((2-аминоэтил)карбамоил)пиперидин-1-ил)пиридин-3-ил)карбамоил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамата, 8AmBza-5



Получение N-(2-аминоэтил)-1-(5-нитропиридин-2-ил)пиперидин-4-карбоксамида, 8AmBza-5b

К смеси трет-бутил-N-[2-[[1-(5-нитро-2-пиридил)пиперидин-4-карбонил]амино]этил]карбамата, 8AmBza-5a (0,5 г, 1,27 ммоль, 1 экв.) в EtOAc (10 мл) добавляли HCl/EtOAc (4M, 3,18 мл, 10 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 2 часов. ЖХ-МС показала завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением 8AmBza-5b (0,4 г, 1,21 ммоль, выход 95,44%, HCl) в виде желтого твердого вещества.

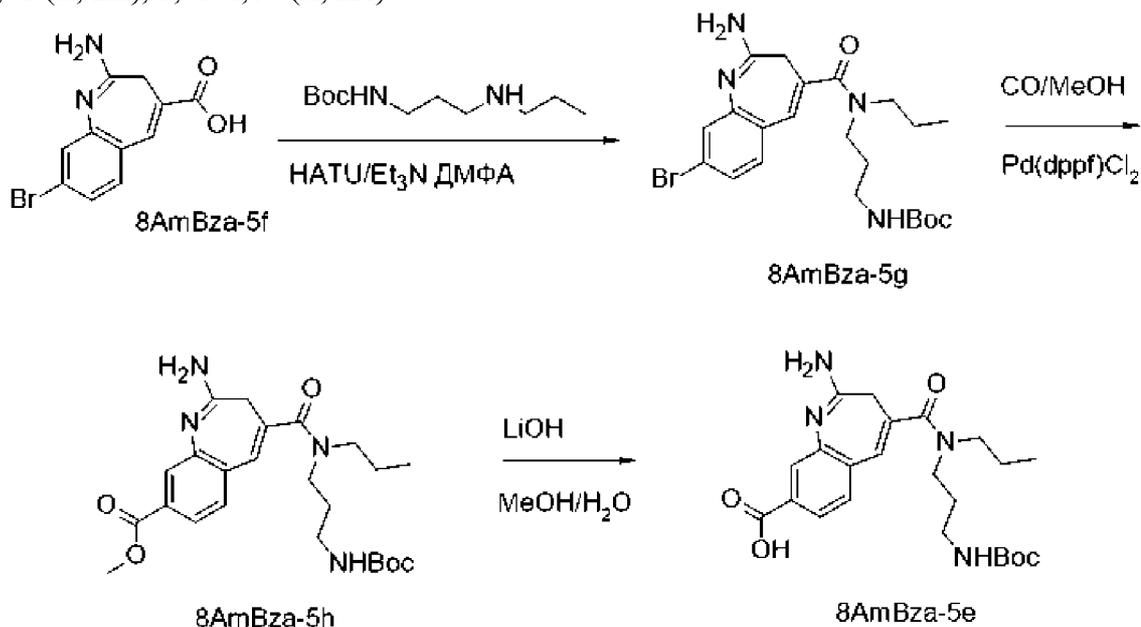
Получение 1-(5-нитропиридин-2-ил)-N-(2-(2,2,2-трифторацетида)этил)пиперидин-4-карбоксамида, 8AmBza-5c

К смеси N-(2-аминоэтил)-1-(5-нитро-2-пиридил)пиперидин-4-карбоксамида 8AmBza-5b (0,4 г, 1,21 ммоль, 1 экв., HCl) в ТГФ (10 мл) добавляли Et<sub>3</sub>N (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 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 1 часа. ЖХ-МС показала желаемый основной продукт. Смесь выливали в воду (50 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (30 мл\*3). Объединенные органические фазы промывали рассолом (30 мл\*1), осушали безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток использовали непосредственно на следующей стадии, он содержал 8AmBza-5c (0,4 г, 1,03 ммоль, выход 84,71%) в виде твердого вещества желтого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>, 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 (шир.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)

Получение 1-(5-аминопиридин-2-ил)-N-(2-(2,2,2-трифторацетида)этил)пиперидин-4-карбоксамида, 8AmBza-5d

К раствору 1-(5-нитро-2-пиридил)-N-[2-[(2,2,2-

трифторацетил)амино]этил]пиперидин-4-карбоксамида, 8AmBza-5c (0,4 г, 1,03 ммоль, 1 экв.) в MeOH (30 мл) добавляли Pd/C (0,5 г, чистота 5%) в атмосфере N<sub>2</sub>. Суспензию дегазировали под вакуумом и продували H<sub>2</sub> несколько раз. Смесь перемешивали под H<sub>2</sub> (345 кПа (50 psi)) при 25°C в течение 2 часов. ТСХ показала завершение реакции. Смесь фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 8AmBza-5d (0,3 г, 834,85 мкмоль, выход 81,26%) в виде серого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>, 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)



Получение *трет*-бутил-(3-(2-амино-8-бром-*N*-пропил-3*H*-бензо[*b*]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамата, 8AmBza-5g

К смеси 2-амино-8-бром-3*H*-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, 8AmBza-5f (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 ДМФА (10 мл), добавляли HATU (6,64 г, 17,47 ммоль, 1,2 экв.) и Et<sub>3</sub>N (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. ЖХ-МС показала, что реакция завершена. Смесь разбавляли водой и экстрагировали EtOAc (50 мл x 3). Органический слой промывали рассолом, осушали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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 8AmBza-5g (6 г, 12,52 ммоль, выход 85,95%) в виде маслянистой жидкости желтого цвета.

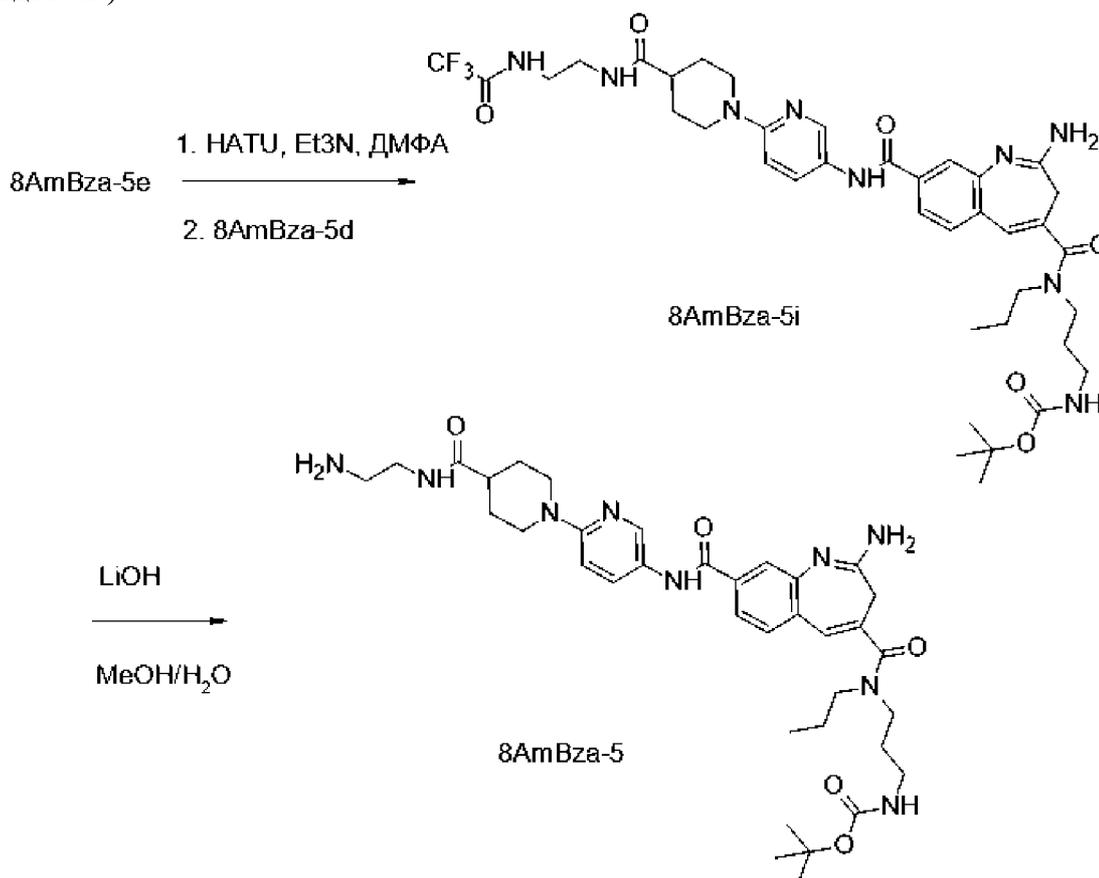
Получение метил-2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропилпропилкарбамоил]-3*H*-1-бензазепин-8-карбоксилата, 8AmBza-5h

К раствору трет-бутил-*N*-[3-[(2-амино-8-бром-3*H*-1-бензазепин-4-карбонил)пропиламино]пропил]карбамата, Vz-39g (5 г, 10,43 ммоль), 1 экв.) в MeOH (50 мл), добавляли Et<sub>3</sub>N (3,17 г, 31,29 ммоль, 4,35 мл, 3 экв.) и [1,1'-

бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II), Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>, CAS Рег. № 72287-26-4 (763,13 мг, 1,04 ммоль, 0,1 экв.) в атмосфере N<sub>2</sub>. Суспензию дегазировали под вакуумом и продували CO (10,43 ммоль, 1 экв.) несколько раз. Смесь перемешивали в атмосфере CO (345 кПа (50 psi)) при 80 °С в течение 12 часов. ЖХ-МС показала завершение реакции. Смесь фильтровали и концентрировали, получая 8AmBza-5h (7 г, сырой) в виде маслянистой жидкости желтого цвета.

Получение 2-амино-4-((3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропил)(пропил)карбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоновой кислоты, 8AmBza-5e

К смеси метил-2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропилпропилкарбамоил]-3H-1-бензазепин-8-карбоксилата, Vz-39h (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 °С. Смесь перемешивали при 30 °С в течение 12 часов. ЖХ-МС показала завершение реакции. Смесь доводили до pH 6 с помощью водн. (водного) HCl (1 M) при 25 °С. Смесь концентрировали. Смесь дополнительно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex luna® C18 250\*50 мм\*10 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУК)-ACN]; В%: 10%-40%, 20 мин) с получением 8AmBza-5e (1,4 г, 3,09 ммоль, выход 23,64%, чистота 98,23%) в виде маслянистой жидкости желтого цвета. <sup>1</sup>H 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 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 445,10 (наблюдаемая).



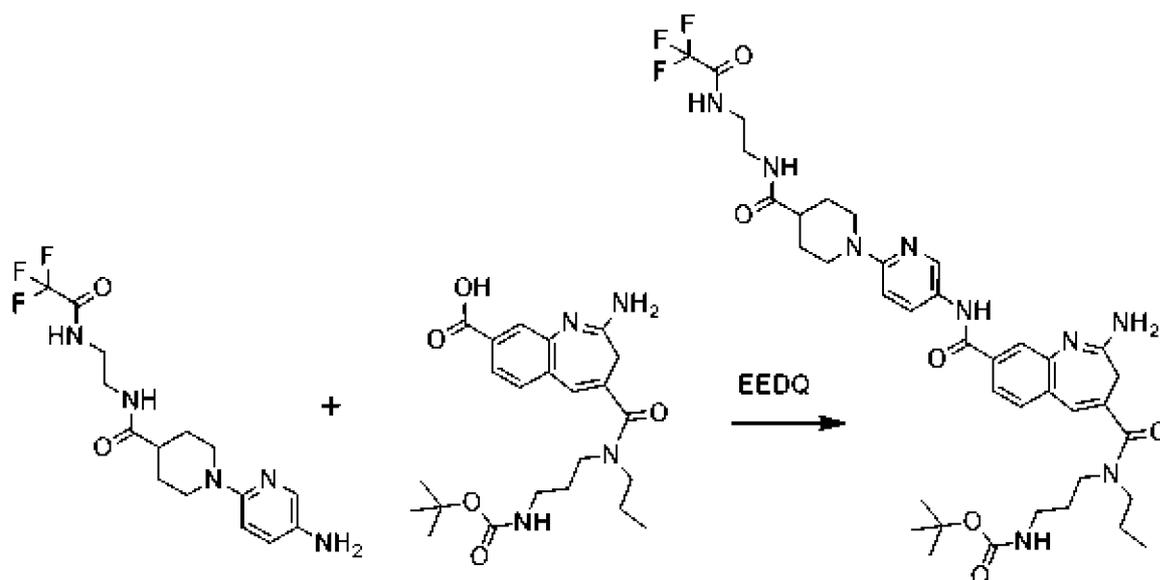
Получение трет-бутил-(3-(2-амино-N-пропил-8-((6-(4-((2-(2,2,2-трифторацетиламино)этил)карбамоил)пиперидин-1-ил)пиридин-3-ил)карбамоил)-3Н-бензо[б]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамата, 8AmBza-5i

К смеси 2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропилпропилкарбамоил]-3Н-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты, 8AmBza-5e (200 мг, 449,92 мкмоль, 1 экв.) HATU (205,29 мг, 539,90 мкмоль, 1,2 экв.) в ДМФА (3 мл) добавляли Et<sub>3</sub>N (136,58 мг, 1,35 ммоль, 187,87 мкл, 3 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 5 мин, затем добавляли к смеси 1-(5-амино-2-пиридил)-N-[2-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этил]пиперидин-4-карбоксамид, 8AmBza-5d (161,68 мг, 449,92 мкмоль, 1 экв.), перемешивали в течение 30 мин. ЖХ-МС показала желаемый основной продукт. Смесь выливали в воду (50 мл). Водную фазу экстрагировали этилацетатом (50 мл\*1). Объединенную органическую фазу промывали рассолом (50 мл), осушали безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме с получением 8AmBza-5i (0,3 г, 381,75 мкмоль, выход 84,85%) в виде маслянистой жидкости желтого цвета.

Получение 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, 8AmBza-5

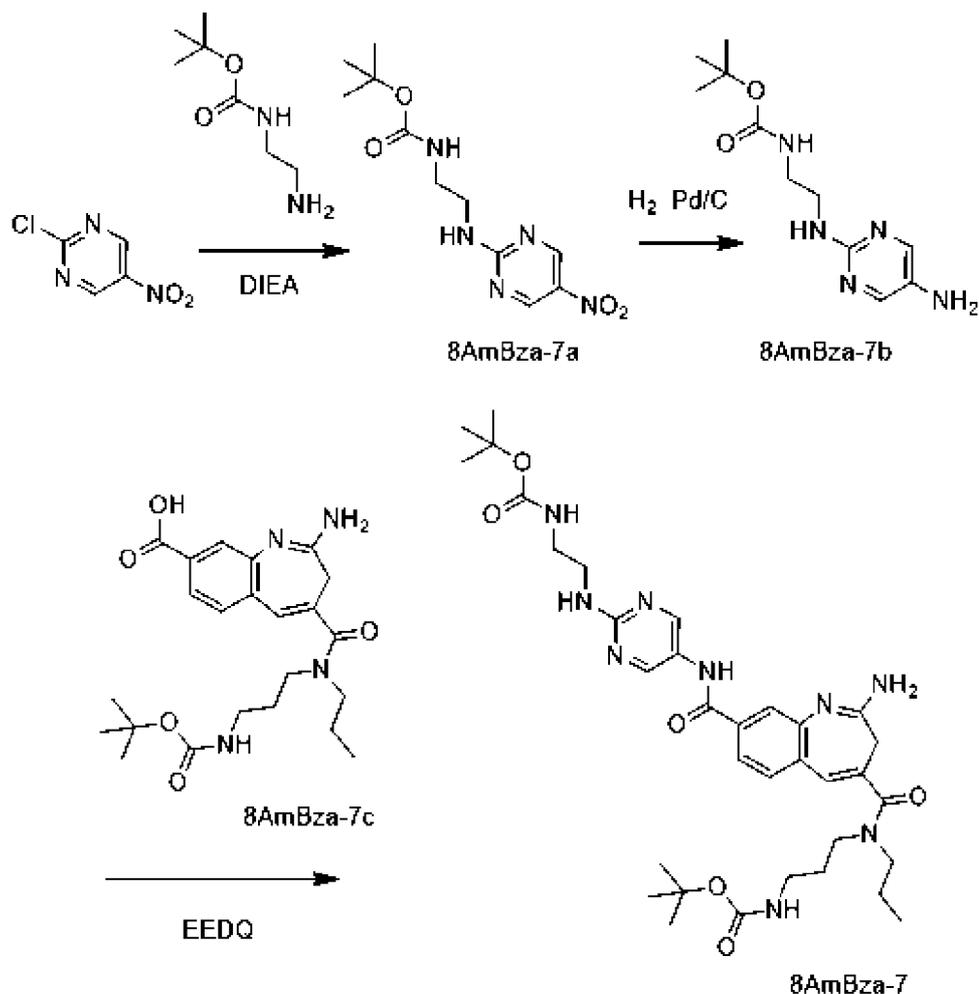
К смеси трет-бутил-N-[3-[[2-амино-8-[[6-[4-[2-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этилкарбамоил]-1-пиперидил]-3-пиридил]карбамоил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]пропил]карбамата, 8AmBza-5i (0,25 г, 318,13 мкмоль, 1 экв.) в MeOH (10 мл) добавляли LiOH·H<sub>2</sub>O (40,05 мг, 954,38 мкмоль, 3 экв.) в H<sub>2</sub>O (1 мл) при 25 °С. Смесь перемешивали при 40 °С в течение 12 часов. ЖХ-МС показала желаемый основной продукт. Смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ на колонке: Nano-micro Kromasil C18 100\*30 мм, 5 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУК)-ACN]; В%: 15-45%, 10 мин с получением 8AmBza-5 (45 мг, 65,23 мкмоль, выход 20,51%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H 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 (шир.с, 1H), 7,45 (д, J=9,8 Гц, 1H), 7,15 (шир.с, 1H), 4,24 (шир.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 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 690,40 (наблюдаемая).

Пример 6 Синтез 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]карбамата, 8AmBza-6



К смеси 2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропилпропилкарбамоил]-3Н-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты (0,43 г, 976 мкмоль, 1,0 экв.) и 1-(5-амино-2-пиримидил)-N-[2-[(2,2,2-трифторацетил)амино]этил]пиперидин-4-карбоксамид (526,26 мг, 1,46 ммоль, 1,5 экв.) в MeOH (2 мл) и ДХМ (4 мл) добавляли *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохиолин, EEDQ (362 мг, 1,46 ммоль, 1,5 экв.) при 25°C и перемешивали в течение 12 часов при этой температуре. Затем смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали колоночной хроматографией (SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир/этилацетат=от 30/1 до 0:1). 8AmBza-6 (0,58 г, 687 мкмоль, выход 70,4%, чистота 93,14%) получали в виде твердого вещества желтого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,70 (д, *J*=2,4 Гц, 1H), 8,19 (дд, *J*=2,4, 9,8 Гц, 1H), 8,05-7,89 (м, 2H), 7,74 (с, 1H), 7,42 (д, *J*=9,8 Гц, 1H), 7,14 (с, 1H), 4,21 (д, *J*=13,6 Гц, 1H), 3,59-3,32 (м, 10H), 3,28-3,24 (м, 2H), 3,16-3,11 (м, 2H), 2,63-2,53 (м, 1H), 2,06-1,90 (м, 2H), 1,89-1,78 (м, 3H), 1,74-1,61 (м, 2H), 1,53-1,25 (м, 9H), 1,06-0,84 (м, 3H). ЖХ/МС [M+H] 785,38 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 786,0 (наблюдаемая).

Пример 7 Синтез трет-бутил-N-[3-[[2-амино-8-[[2-[2-(трет-бутоксикарбониламино)этиламино]пиримидин-5-ил]карбамоил]-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]пропил]карбамата, 8AmBza-7



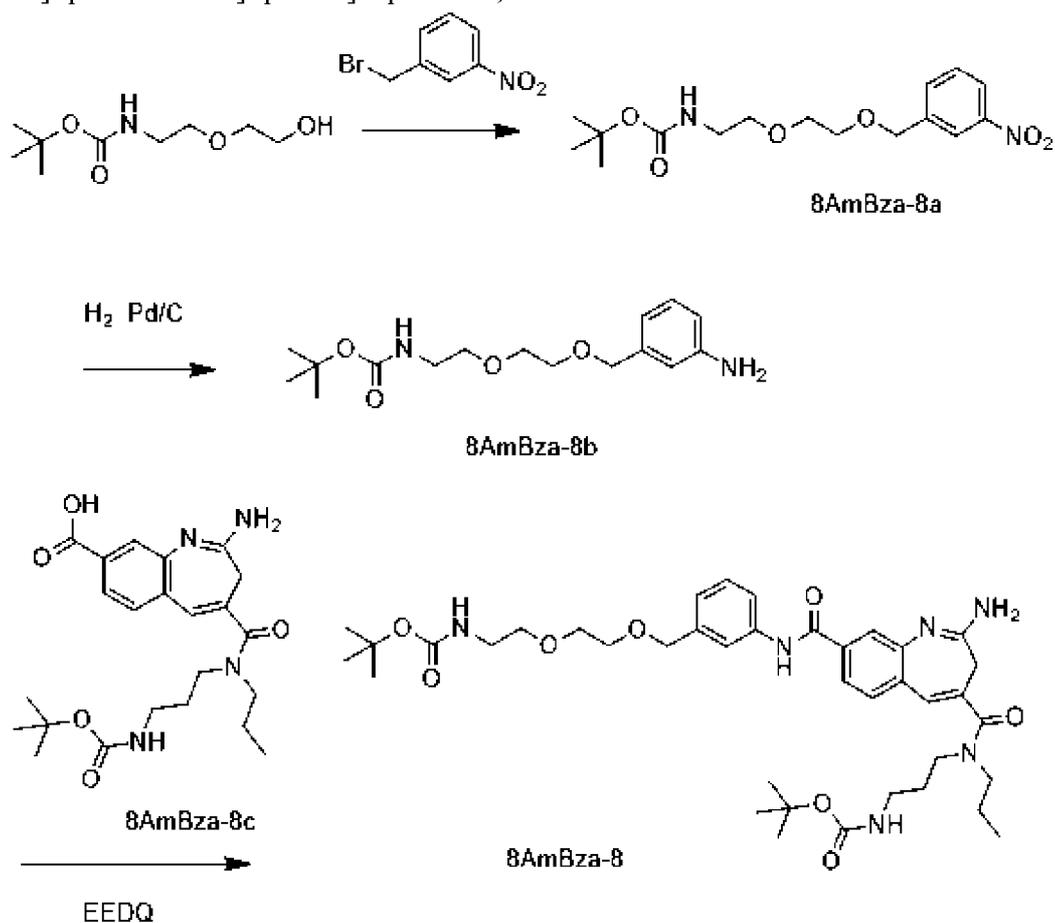
К смеси 2-хлор-5-нитропиримидина (2,9 г, 18,2 ммоль, 1,0 экв.) и трет-бутил-N-(2-аминоэтил)карбамата (3,2 г, 20,0 ммоль, 3,14 мл, 1,1 экв.) в ТГФ (50 мл) добавляли DIEA (4,7 г, 36,4 ммоль, 6,33 мл, 2,0 экв.) при 25°C и перемешивали в течение 2 часов при этой температуре. К смеси добавляли воду (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (50 мл x 3). Объединенные органические фазы промывали рассолом (50 мл), осушали безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Соединение трет-бутил-N-[2-[(5-нитропиримидин-2-ил)амино]этил]карбамат, 8AmBza-7a (5,7 г, неочищенный) получали в виде желтого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 400 МГц) δ 9,11 (д, J=2,8 Гц, 1H), 9,05 (д, J=2,8 Гц, 1H), 6,59 (с, 1H), 4,85 (с, 1H), 3,66 (кв, J=5,6 Гц, 2H), 3,44-3,41 (м, 2H), 1,45 (с, 9H).

К раствору 8AmBza-7a (1,0 г, 3,53 ммоль, 1,0 экв.) в MeOH (30 мл) добавляли Pd/C (0,5 г, чистота 10%) в атмосфере N<sub>2</sub>. Суспензию дегазировали под вакуумом и продували H<sub>2</sub> несколько раз. Смесь перемешивали в атмосфере H<sub>2</sub> (103 кПа (15 psi)) при 25°C в течение 12 часов, затем фильтровали и фильтрат концентрировали в вакууме. 8AmBza-7b (0,8 г, неочищенный) получали в виде твердого вещества желтого цвета.

К смеси 2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропилпропилкарбамоил]-3H-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты, 8AmBza-7c (60 мг, 135 мкмоль, 1,0 экв.) и 8AmBza-7b (103 мг, 405 мкмоль, 3 экв.) в MeOH (5 мл) и ДХМ (10 мл), добавляли EEDQ (50 мг, 202 мкмоль, 1,5 экв.) при 25°C и перемешивали в течение 12 часов при этой температуре. Смесь

концентрировали при пониженном давлении, а затем остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Welch Xtimate C18 100×25 мм×3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУК)-АСН]; В%: 25-45%, 12 мин). 8AmBza-7 (13 мг, 16,8 мкмоль, выход 12,4%, чистота 87,7%) получали в виде твердого вещества желтого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 8,64 (с, 2H), 8,05-7,90 (м, 2H), 7,73 (с, 1H), 7,14 (с, 1H), 3,53-3,48 (м, 6H), 3,37-3,34 (м, 2H), 3,31 (с, 2H), 3,29-3,13 (м, 2H), 1,90-1,78 (м, 2H), 1,75-1,64 (м, 2H), 1,56-1,40 (м, 18H), 1,02-0,87 (м, 3H). ЖХ/МС [M+H] 680,4 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 680,3 (наблюдаемая).

Пример 8 Синтез трет-бутил-N-[3-[[2-амино-8-[[3-[2-[2-(трет-бутоксикарбониламино)этокси]этоксиметил]фенил]карбамоил]-3H-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]пропил]карбамата, 8AmBza-8



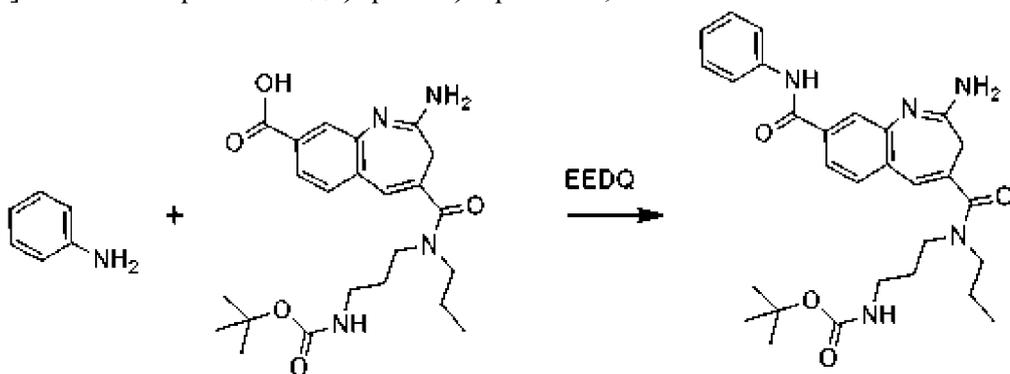
К смеси трет-бутил-N-[2-(2-гидроксиэтокси)этил]карбамата (2,9 г, 14,1 ммоль, 1,0 экв.) в ДМФА (10 мл) медленно добавляли гидрид натрия, NaH (565 мг, 14,1 ммоль, чистота 60%, 1,0 экв.) при 0 °С и перемешивали в течение 1 ч при этой температуре, затем к смеси добавляли 1-(бромметил)-3-нитробензол (3,05 г, 14,13 ммоль, 1,0 экв.) и перемешивали в течение 0,5 ч. Смесь разбавляли водой (30 мл) и экстрагировали этилацетатом, EtOAc (30 мл × 3). Органический слой промывали рассолом, осушали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/этилацетат=от 10/1 до 1/1) с получением трет-бутил-N-[2-[2-[(3-нитрофенил)метокси]этокси]этил]карбамата, 8AmBza-8a (2,2 г, 6,46 ммоль, выход 45,75%) в виде маслянистой жидкости желтого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 400 МГц) δ 8,24 (с, 1H), 8,15

(д,  $J=8,4$  Гц, 1H), 7,68 (д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 7,53 (т,  $J=8,0$  Гц, 1H), 4,96 (с, 1H), 4,67 (с, 2H), 3,71-3,64 (м, 4H), 3,59-3,52 (м, 2H), 3,37-3,28 (м, 2H), 1,43 (с, 9H).

К раствору 8AmVza-8a (400 мг, 1,18 ммоль, 1,0 экв.) в EtOAc (10 мл) добавляли Pd/C (0,3 г, чистота 10%) в атмосфере  $N_2$ . Суспензию дегазировали под вакуумом и продували  $H_2$  несколько раз. Смесь перемешивали в атмосфере  $H_2$  (103 кПа (15 psi)) при 25°C в течение 3 часов, затем фильтровали и концентрировали в вакууме с получением трет-бутил-N-[2-[2-[(3-аминофенил)метокси]этокси]этил]карбамата, 8AmVza-8b (0,35 г, неочищенный) в виде маслянистой жидкости желтого цвета.

К смеси 8AmVza-8b (42 мг, 135 мкмоль, 1,2 экв.) и 2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропилпропилкарбамоил]-3H-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты, 8AmVza-8c (50 мг, 112 мкмоль, 1,0 экв.) в MeOH (0,5 мл) и ДХМ (1 мл) добавляли EEDQ (42 мг, 168 мкмоль, 1,5 экв.) при 25 °C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч, а затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Welch Xtimate C18 100\*25 мм\*3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУК) - ACN]; В%: 30-50%, 12 мин) с получением 8AmVza-8 (8 мг, 10,9 мкмоль, выход 9,6%) в виде белого твердого вещества.  $^1H$  ЯМР (MeOD, 400 МГц)  $\delta$  8,02-7,95 (м, 2H), 7,80-7,71 (м, 2H), 7,68 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 7,40 (т,  $J=7,6$  Гц, 1H), 7,21 (д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 7,16 (с, 1H), 4,62 (с, 2H), 3,73-3,65 (м, 4H), 3,55 (т,  $J=5,6$  Гц, 4H), 3,50 (с, 2H), 3,39 (с, 2H), 3,25 (т,  $J=5,6$  Гц, 2H), 3,12 (д,  $J=18,4$  Гц, 2H), 1,92-1,81 (м, 2H), 1,77-1,64 (м, 2H), 1,43 (с, 18H), 0,94 (с, 3H). ЖХ/МС [M+H] 737,4 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 737,4 (наблюдаемая).

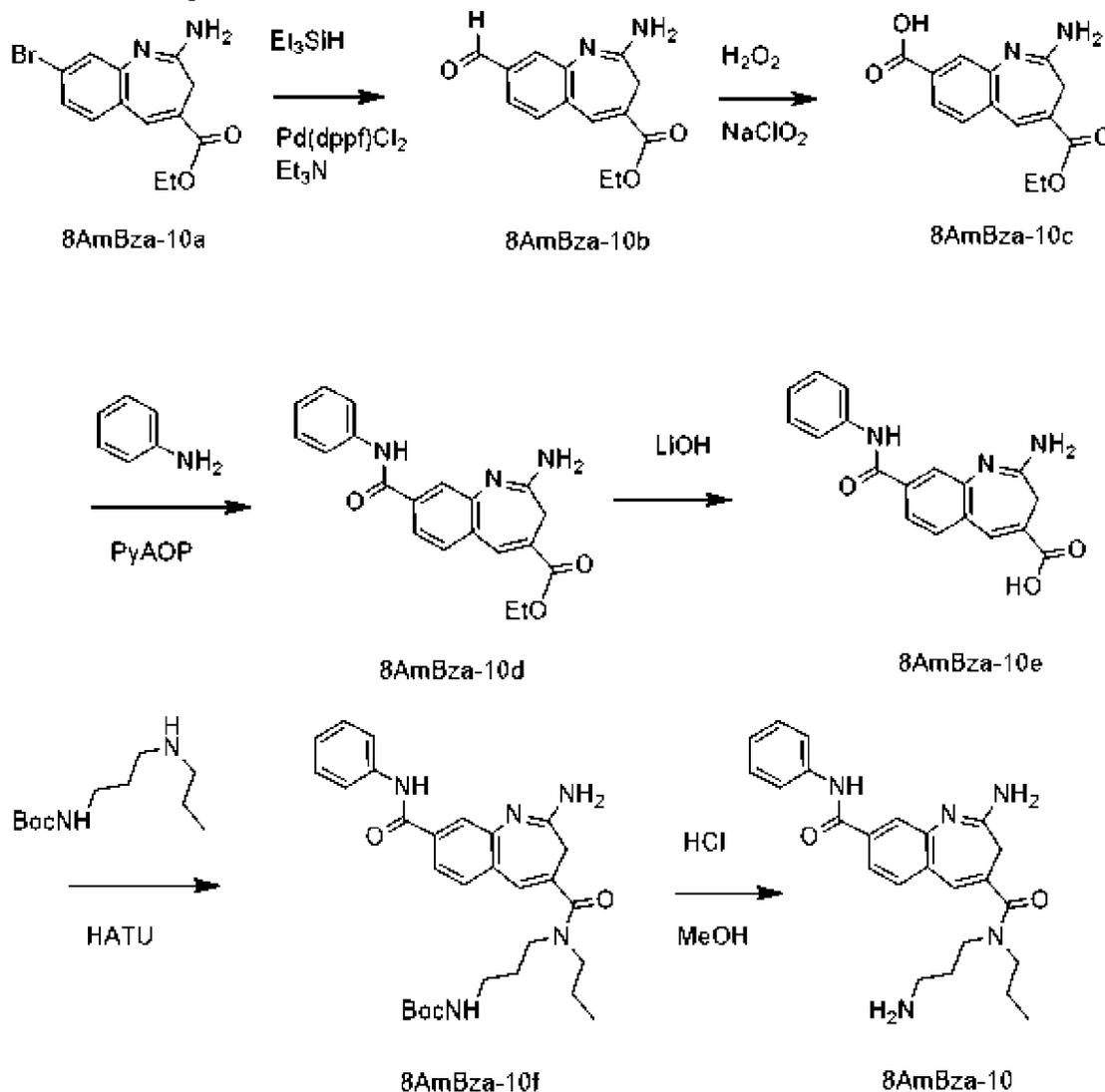
Пример 9. Синтез трет-бутил-(3-(2-амино-8-(фенилкарбамоил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамата, 8AmVza-9



К смеси анилина (25 мг, 270 мкмоль, 2,0 экв.) и 2-амино-4-[3-(трет-бутоксикарбониламино)пропилпропилкарбамоил]-3H-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты (60 мг, 135 мкмоль, 1,0 экв.) в ДХМ (2 мл) и MeOH (0,5 мл) добавляли EEDQ (50 мг, 202 мкмоль, 1,5 экв.) при 25°C в атмосфере  $N_2$ . Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов и затем концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Welch Xtimate C18 150\*25 мм\*5 мкм; подвижная фаза: [вода (10 mM  $NH_4HCO_3$ )-ACN]; В%: 40-70%, 10,5 мин) с получением 8AmVza-9 (10 мг, 19,2 мкмоль, выход 14,26%) в виде белого твердого вещества.  $^1H$  ЯМР (MeOD, 400 МГц)  $\delta$  7,73-7,66 (м, 3H), 7,57 (дд,  $J=1,6, 8,0$  Гц, 1H), 7,47 (шир.д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 7,37 (т,  $J=8,0$  Гц, 2H), 7,20-7,12 (м, 1H), 6,93 (с, 1H), 3,50 (шир.т,  $J=7,2$  Гц, 2H), 3,45-3,38 (м, 2H), 3,21-2,96 (м, 2H), 2,85 (с, 2H), 1,89-1,77 (м, 2H),

1,70-1,62 (м, 2H), 1,44 (с, 9H), 1,05-0,8 (м, 3H). ЖХ/МС [M+H] 520,3 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 520,3 (наблюдаемая).

Пример 10. Синтез 2-амино-N4-(3-аминопропил)-N8-фенил-N4-пропил-3H-1-бензазепин-4,8-дикарбоксимида, 8AmBza-10



Получение этил-2-амино-8-формил-3H-1-бензазепин-4-карбоксилата, 8AmBza-10b

К раствору этилового эфира 2-амино-8-бром-3H-1-бензазепин-4-карбоксилата, 8AmBza-10a (10 г, 32,4 ммоль, 1 экв.) в ДМФА (100 мл) добавляли  $\text{Et}_3\text{SiH}$  (72,8 г, 626,09 ммоль, 100 мл, 19,36 экв.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (6,5 г, 64,69 ммоль, 9,00 мл, 2 экв.) и  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$  (1,18 г, 1,62 ммоль, 0,05 экв.) в атмосфере  $\text{N}_2$ . Суспензию дегазировали в вакууме и несколько раз продували  $\text{CO}$  и перемешивали в атмосфере  $\text{CO}$  (345 кПа (50 psi)) при  $80^\circ\text{C}$  в течение 12 ч (часов). Смесь разбавляли водой (300 мл) и экстрагировали  $\text{EtOAc}$  (80 мл x 3). Органический слой промывали рассолом (50 мл), осушали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали, и остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; колонка SepaFlash® Silica Flash 15 г, элюент градиент 0~100% этилацетат/петролейный эфир при 65 мл/мин) с получением 8AmBza-10b (3 г, 11,6 ммоль, выход 35,9%) в виде твердого вещества желтого цвета.  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ , 400 МГц)  $\delta$  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 2-амино-4-этоксикарбонил-3H-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты, 8AmBza-10c

К раствору 8AmBza-10b (2,6 г, 10,1 ммоль, 1,0 экв.) в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (15 мл) добавляли  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (362 мг, 3,02 ммоль, 0,3 экв.),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5,71 г, 50,33 ммоль, 4,84 мл, чистота 30%, 5 экв.) и  $\text{NaClO}_2$  (1,46 г, 16,1 ммоль, 1,6 экв.) при 0 °С и перемешивали при 25 °С в течение 5 часов. Реакционную смесь гасили  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (водн.) и разбавляли  $\text{H}_2\text{O}$  (30 мл) и  $\text{EtOAc}$  (30 мл), доводили смесь до pH 4 водн.  $\text{HCl}$  (1M), затем фильтровали с получением желаемого твердого вещества. Твердое вещество сушили в вакууме, получая 8AmBza-10c (2,1 г, 7,66 ммоль, выход 76,1%) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 МГц)  $\delta$  7,87 (с, 1H), 7,81 (с, 1H), 7,72-7,67 (м, 2H), 4,27 (кв,  $J=7,2$  Гц, 2H), 3,28 (с, 2H), 1,31 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H).

Получение этил-2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-4-карбоксилата, 8AmBza-10d

К смеси 8AmBza-10c (1,0 г, 3,65 ммоль, 1,0 экв.) в ДМФА (20 мл) добавляли (7-аза-бензотриазол-1-илокситрипирролидинофосфония гексафторфосфат),  $\text{RuAOP}$  (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 °С и перемешивали при 25 °С в течение 10 мин, затем добавляли анилин (373 мг, 4,01 ммоль, 366 мкл, 1,1 экв.) и перемешивали в течение 1 часа при 25 °С. 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), осушали безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме, и остаток очищали хроматографией на силикагеле (от петролейный эфир/этилацетат=0/1 до  $\text{EtOAc}/\text{MeOH}=2/1$ ) с получением 8AmBza-10d (0,5 г, 1,43 ммоль, выход 39,25%) в виде твердого вещества желтого цвета.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{MeOD}$ , 400 МГц)  $\delta$  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 2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, 8AmBza-10e

К смеси 8AmBza-10d (0,36 г, 1,03 ммоль, 1,0 экв.) в  $\text{EtOH}$  (10 мл) добавляли раствор  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (216 мг, 5,15 ммоль, 5,0 экв.) в  $\text{H}_2\text{O}$  (1 мл) при 25 °С и перемешивали в течение 16 часов при этой температуре. Смесь гасили  $\text{HCl}$  (4M) до pH 5 и концентрировали при пониженном давлении при 40 °С для удаления  $\text{EtOH}$ . К смеси добавляли воду (10 мл) и затем фильтровали с получением желаемого твердого вещества 8AmBza-10e (0,2 г, 622 мкмоль, выход 60,41%) в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 МГц)  $\delta$  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 трет-бутил-N-[3-[[2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]пропил]карбамата, 8AmBza-10f

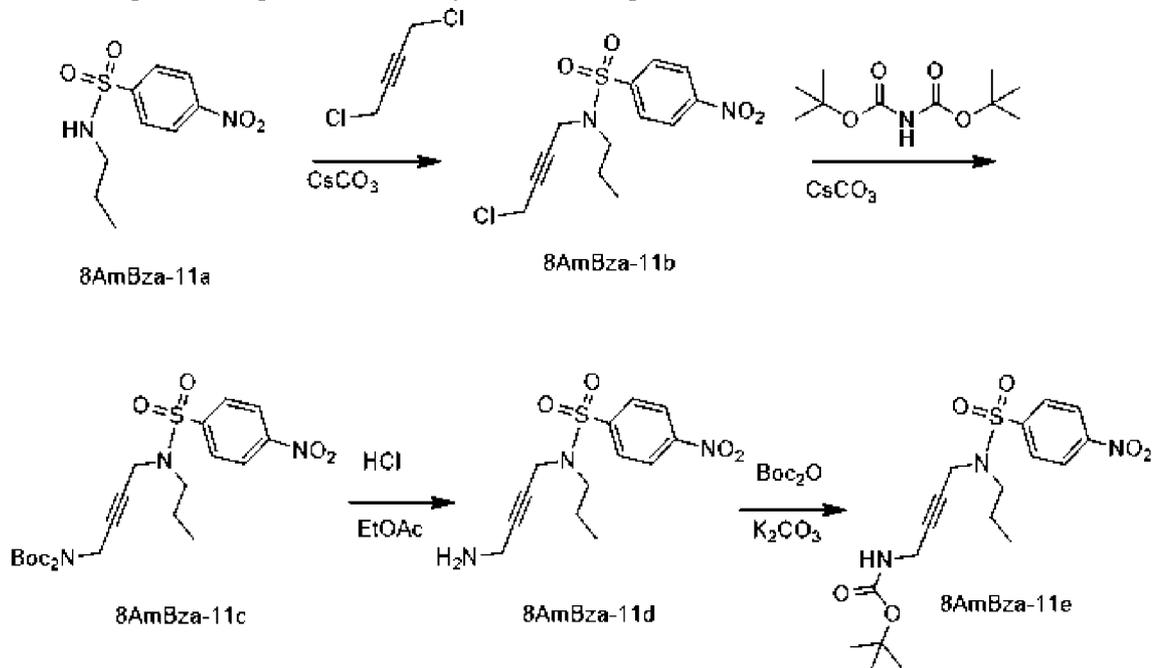
К раствору 8AmBza-10e (0,2 г, 622 мкмоль, 1,0 экв.) в ДМФА (5 мл) добавляли  $\text{NATU}$  (284 мг, 746 мкмоль, 1,2 экв.) и DIEA (241 мг, 1,87 ммоль, 325 мкл, 3,0 экв.) при 25 °С и

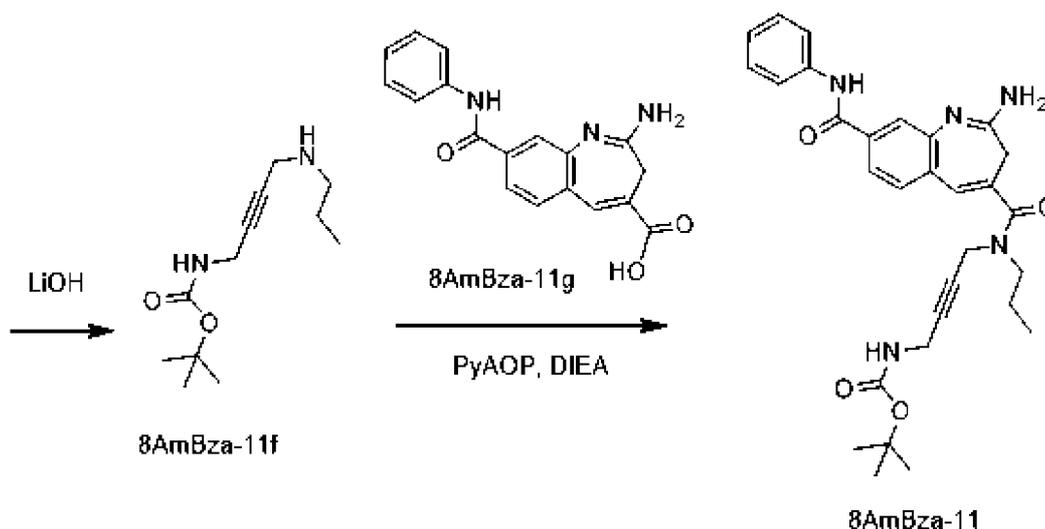
перемешивали в течение 10 мин при этой температуре, затем к смеси добавляли трет-бутил-N-[3-(пропиламино)пропил]карбамат (161 мг, 746 мкмоль, 1,2 экв.) и перемешивали при 25°C в течение 3 часов. Смесь выливали в воду со льдом (30 мл) и перемешивали в течение 10 мин. Водную фазу экстрагировали EtOAc (10 мл x 3), объединенную органическую фазу промывали H<sub>2</sub>O (10 мл x 2) и рассолом (10 мл), осушали Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали с получением 8AmBza-10f (0,3 г, 577 мкмоль, выход 92,76%) в виде маслянистой жидкости желтого цвета.

Получение 2-амино-N4-(3-аминопропил)-N8-фенил-N4-пропил-3H-1-бензазепин-4,8-дикарбоксамида, 8AmBza-10

К раствору 8AmBza-10f (0,4 г, 769 мкмоль, 1,0 экв.) в MeOH (10 мл) добавляли HCl/MeOH (4M, 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\*30 мм, 8 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУК) - ACN]; В%: 5-30%, 10 мин) с получением 8AmBza-10 (0,23 г, 431 мкмоль, выход 56,0%, соль ТФУК) в виде твердого вещества желтого цвета. <sup>1</sup>H 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 [M+H] 420,2 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 420,2 (наблюдаемая).

Пример 11 Синтез трет-бутил-N-[4-[[2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]бут-2-инил]карбамата, 8AmBza-11





Получение N-(4-хлорбут-2-инил)-4-нитро-N-пропилбензолсульфонамида, 8AmBza-11b

К раствору пропан-1-амина (7 г, 118 ммоль, 9,74 мл, 1,0 экв.) и Et<sub>3</sub>N (24 г, 237 ммоль, 33 мл, 2,0 экв.) в ДХМ (50 мл) добавляли 4-нитробензолсульфонилхлорида (26,2 г, 118 ммоль, 1,0 экв.) и перемешивали при 25°C в течение 0,5 часа. Реакционную смесь выливали в воду (60 мл) и экстрагировали ДХМ (100 мл\*3). Объединенные органические фазы промывали рассолом (50 мл), осушали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого продукта 4-нитро-N-пропилбензолсульфонамида, 8AmBza-11a (28 г, 114,6 ммоль, выход 96,8%) в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 400 МГц) δ 8,38 (д, J=8,8 Гц, 2H), 8,07 (д, J=8,8 Гц, 2H), 4,77 (с, 1H), 3,02-2,99 (м, 2H), 1,57-1,48 (м, 2H), 0,89 (т, J=7,6 Гц, 3H)

К раствору 8AmBza-11a (28 г, 115 ммоль, 1,0 экв.) в ДМФА (300 мл) добавляли Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (56 г, 172 ммоль, 1,5 экв.) и 1,4-дихлорбут-2-ин (28,2 г, 229 ммоль, 2,0 экв.) и перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Реакционную смесь выливали в воду (300 мл) и экстрагировали метил-трет-бутиловым эфиром (МТБЭ) (150 мл\*3). Объединенные органические фазы промывали рассолом (150 мл), осушали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, а остаток очищали колоночной хроматографией (SiO<sub>2</sub>, петролейный эфир/этилацетат=от 50/1 до 5/1) с получением 8AmBza-11b (28 г, 84,6 ммоль, выход 73,84%) в виде маслянистой жидкости желтого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 400 МГц) δ 8,37 (д, J=8,8 Гц, 2H), 8,05 (д, J=8,8 Гц, 2H), 4,22 (т, J=2,0 Гц, 2H), 3,85 (т, J=2,0 Гц, 2H), 3,17 (т, J=7,6 Гц, 2H), 1,65-1,56 (м, 2H), 0,94 (т, J=7,6 Гц, 3H).

Получение трет-бутил(трет-бутоксикарбонил)-(4-((4-нитро-N-пропилфенил)сульфонамидо)бут-2-ин-1-ил)карбамата, 8AmBza-11c

К раствору 8AmBza-11b (23,5 г, 71,0 ммоль, 1,0 экв.) в ДМФА (250 мл) добавляли Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (46,3 г, 142 ммоль, 2,0 экв.) и трет-бутил-N-трет-бутоксикарбонилкарбамат (23,1 г, 106 ммоль, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч, затем выливали в воду (300 мл) и экстрагировали МТБЭ (150 мл\*3). Объединенные органические фазы промывали

рассолом (200 мл), осушали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией ( $\text{SiO}_2$ , петролейный эфир/этилацетат=от 50/1 до 5/1) с получением 8AmBza-11c (32 г, неочищенный) в виде маслянистой жидкости желтого цвета.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 400 МГц)  $\delta$  8,39 (д,  $J=8,8$  Гц, 2H), 8,05 (д,  $J=8,8$  Гц, 2H), 4,21 (с, 2H), 4,11 (с, 2H), 3,14 (т,  $J=7,2$  Гц, 2H), 1,66-1,54 (м, 2H), 1,49 (с, 18H), 0,93 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H).

Получение N-(4-аминобут-2-инил)-4-нитро-N-пропилбензолсульфонамида, 8AmBza-11d

К раствору 8AmBza-11c (32 г, 62,5 ммоль, 1,0 экв.) в EtOAc (50 мл) добавляли HCl/EtOAc (4M, 60 мл, 3,8 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 ч и затем концентрировали при пониженном давлении с получением 8AmBza-11d (27 г, неочищенный, HCl-соль) в виде твердого вещества желтого цвета.

Получение трет-бутил-N-[4-[(4-нитрофенил)сульфонилпропиламино]бут-2-инил]карбамата, 8AmBza-11e

К раствору 8AmBza-11d (27 г, 77,6 ммоль, 1,0 экв., HCl) в ТГФ (100 мл) и воде (10 мл) добавляли  $\text{Woc}_2\text{O}$  (13,5 г, 62,1 ммоль, 14,3 мл, 0,8 экв.) и  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (21,5 г, 155 ммоль, 2 экв.). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа, затем выливали в воду (100 мл) и экстрагировали EtOAc (100 мл\*3). Объединенные органические фазы промывали рассолом (100 мл), осушали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией ( $\text{SiO}_2$ , петролейный эфир/этилацетат=от 80/1 до 3/1) с получением 8AmBza-11e (20 г, 48,6 ммоль, выход 62,6%) в виде твердого вещества желтого цвета.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 400 МГц)  $\delta$  8,37 (д,  $J=8,8$  Гц, 2H), 8,05 (д,  $J=8,8$  Гц, 2H), 4,42 (с, 1H), 4,19 (с, 2H), 3,67 (д,  $J=5,2$  Гц, 2H), 3,17 (т,  $J=7,2$  Гц, 2H), 1,64-1,59 (м, 2H), 1,44 (с, 9H), 0,95 (т,  $J=7,6$  Гц, 3H).

Получение трет-бутил-N-[4-(пропиламино)бут-2-инил]карбамата, 8AmBza-11f

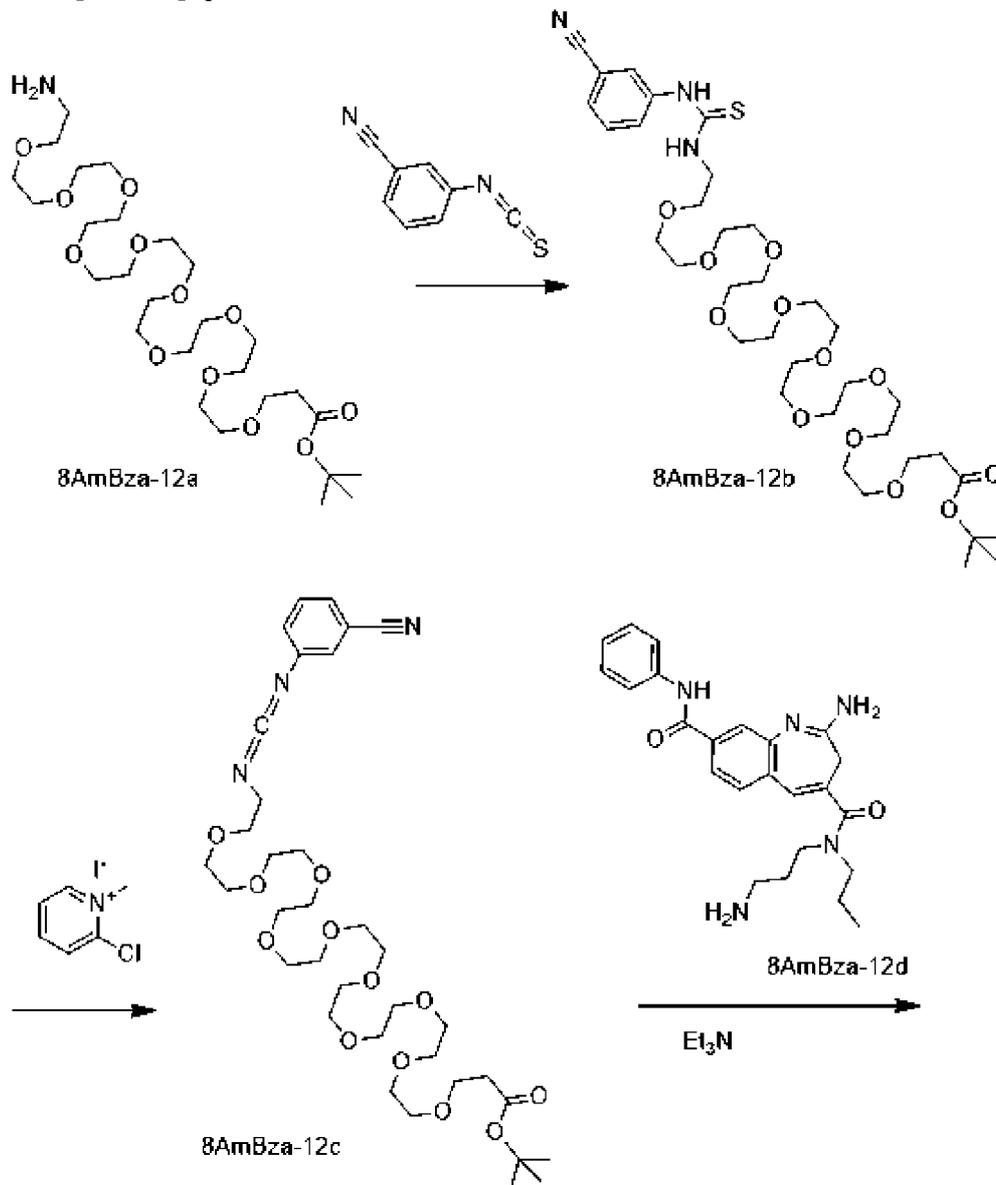
К раствору 8AmBza-11e (20 г, 48,6 ммоль, 1,0 экв.) и LiOH·H<sub>2</sub>O (12,2 г, 291 ммоль, 6,0 экв.) в MeCN (100 мл) добавляли метил-2-меркаптоацетат (15,5 г, 146 ммоль, 13,2 мл, 3,0 экв.) при 0 °C. Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. К смеси добавляли воду (100 мл) и доводили pH водной фазы до 2 с помощью 1 н. HCl при 0 °C. Смесь экстрагировали МТБЭ (100 мл\*2), pH водной фазы доводили до 9 с помощью насыщ.  $\text{NaHCO}_3$ , а затем экстрагировали EtOAc (50 мл x 3). Органические слои промывали рассолом (40 мл), осушали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого продукта 8AmBza-11f (10 г, 44,2 ммоль, выход 90,91%) в виде коричневой маслянистой жидкости, которую используют на следующем этапе без дополнительной очистки.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 400 МГц)  $\delta$  3,95 (с, 2H), 3,46 (с, 2H), 2,67 (т,  $J=7,2$  Гц, 2H), 1,59-1,50 (м, 2H), 1,47 (с, 9H), 0,96 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H).

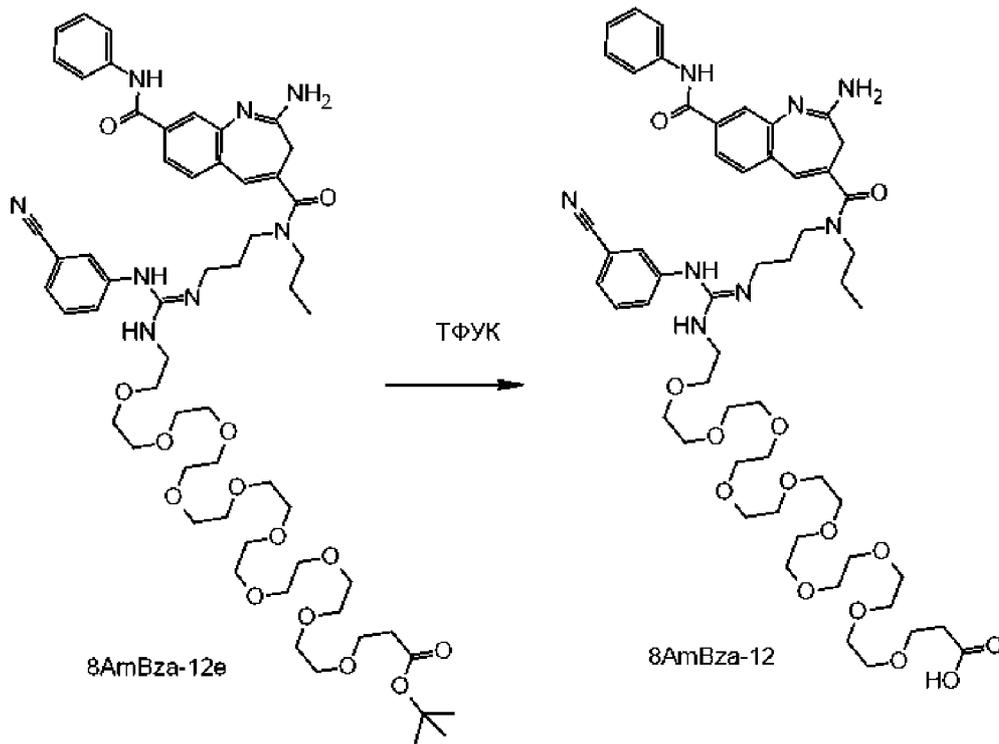
Получение трет-бутил-N-[4-[[2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]бут-2-инил]карбамата, 8AmBza-11g

К смеси 2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-4-карбоновой кислоты, 8AmBza-11g (0,1 г, 311 мкмоль, 1,0 экв.) в ДМФА (3 мл) добавляли PUAOP (194 мг, 373

мкмоль, 1,2 экв.) и DIEA (120 мг, 933 мкмоль, 162 мкл, 3,0 экв.) при 25 °С. Затем к смеси добавляли 8AmBza-11f (84 мг, 373 мкмоль, 1,2 экв.) и перемешивали при 25°С в течение 1 часа. Смесь фильтровали и концентрировали, остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Xtimate C18 100\*30 мм\*3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУК) - АСН]; В%: 25% - 55%, 10 мин) с получением 8AmBza-11 (13 мг, 24,6 мкмоль, выход 7,89%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (MeOD, 400 МГц) δ 7,98-7,93 (м, 2H), 7,71 (д, J=8,0 Гц, 3H), 7,39 (т, J=8,0 Гц, 2H), 7,19 (т, J=8,0 Гц, 1H), 4,33 (с, 2H), 3,86 (с, 2H), 3,61-3,47 (м, 2H), 3,39 (с, 2H), 1,80-1,70 (м, 2H), 1,43 (с,

Пример 12 Синтез 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(Z)-N'-[3-[[2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3H-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]пропил]-N-(3-цианопенил)карбамимидоил]амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропановая кислота, 8AmBza-12





Получение трет-бутил-3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(3-цианофенил)карбамотиоиламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата, 8AmBza-12b

К смеси трет-бутил-3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата, 8AmBza-12a (2,7 г, 4,61 ммоль, 1,0 экв.) в ТГФ (20 мл), добавляли Et<sub>3</sub>N (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, осушали над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (MeOH/этилацетат=0/1, 1/10) с получением 8AmBza-12b (0,5 г, 670 мкмоль, выход 14,54%) в виде маслянистой жидкости желтого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 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 трет-бутил-3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(3-цианофенил)иминометиленамино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата, 8AmBza-12c

К смеси 8AmBza-12b (0,4 г, 536 мкмоль, 1,0 экв.) и Et<sub>3</sub>N (163 мг, 1,61 ммоль, 223 мкл, 3,0 экв.) в ДХМ (10 мл) и ДМФА (0,4 мл) добавляли 2-хлор-1-метилпиридин-1-ия йодид (164 мг, 643 мкмоль, 1,2 экв.) при 25°C в атмосфере N<sub>2</sub>. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа и затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (CH<sub>3</sub>CN/этилацетат=от 0/1 до 1/1) с получением 8AmBza-12c (0,29 г, 407 мкмоль, выход 75,9%) в виде маслянистой жидкости желтого цвета. <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 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).

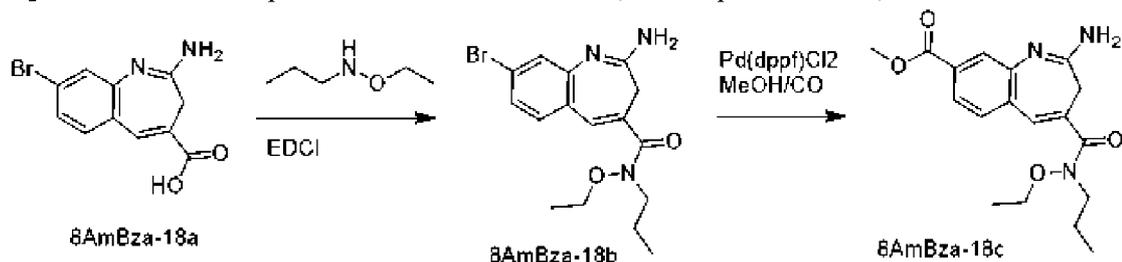
Получение трет-бутил-3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[*(Z)*]-N'-[3-[[2-амино-8-(фенилкарбамоил)-3Н-1-бензазепин-4-карбонил]пропиламино]пропил]-N-(3-цианофенил)карбамимидоил]амино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата, 8AmBza-12e

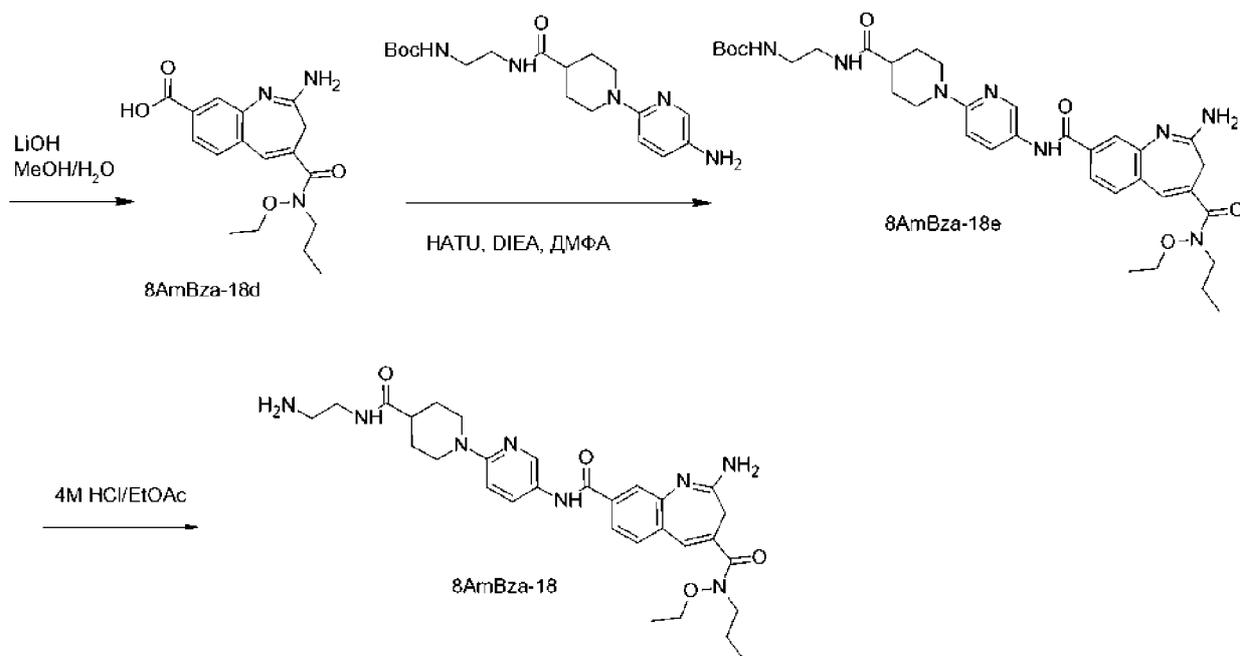
К смеси 2-амино-N4-(3-аминопропил)-N8-фенил-N4-пропил-3Н-1-бензазепин-4,8-дикарбоксамида, 8AmBza-12d (0,06 г, 112 мкмоль, 1,0 экв., соль ТФУК) в ДМФА (1 мл) добавляли Et<sub>3</sub>N (28 мг, 281 мкмоль, 2,5 экв.) и 8AmBza-12c (88 мг, 123 мкмоль, 1,1 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25°С в течение 1 часа, а затем фильтровали и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка: Nano-micro Kromasil C18 100\*30 мм, 8 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУК) - АСN]; В%: 20-50%, 10 мин) с получением 8AmBza-12e (0,08 г, 70,7 мкмоль, выход 62,9%) в виде бесцветной маслянистой жидкости.

Получение 3-[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]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропановой кислоты, 8AmBza-12

К раствору 8AmBza-12e (0,07 г, 61 мкмоль, 1,0 экв.) в H<sub>2</sub>O (5 мл) и CH<sub>3</sub>CN (1 мл) добавляли ТФУК (211 мг, 1,86 ммоль, 30 экв.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 80 °С в течение 2 часов и затем концентрировали при пониженном давлении at 50 °С. Остаток лиофилизировали с получением 8AmBza-12 (51 мг, 42,9 мкмоль, выход 69,3%, соль ТФУК) в виде светло-желтой маслянистой жидкости. <sup>1</sup>H 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 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 1075,6 (наблюдаемая).

Пример 18 Синтез 2-амино-N8-[6-[4-(2-аминоэтилкарбамоил)-1-пиперидил]-3-пиридил]-N4-этокси-N4-пропил-3Н-1-бензазепин-4,8-дикарбоксамида, 8AmBza-18





Получение 2-амино-8-бром-N-этокси-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамид, 8AmBza-18b

К смеси 2-амино-8-бром-3H-1-бензазепин-4-карбоновой кислоты, 8AmBza-18a (9,00 г, 32,0 ммоль, 1,0 экв.) и N-этоксипропан-1-амина (5,81 г, 41,6 ммоль, 1,3 экв., HCl) в ДХМ (150 мл) и DMA (150 мл) добавляли гидроклорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, EDCI, регистрационный № CAS 1892-57-5 (24,5 г, 128 ммоль, 4,0 экв.) одной порцией при 20 °С в атмосфере N<sub>2</sub>, а затем перемешивали при 20 °С в течение 10 часов. Смесь концентрировали в вакууме для удаления ДХМ, затем добавляли воду (200 мл) и водную фазу экстрагировали этилацетатом (100 мл\*4), объединенную органическую фазу промывали рассолом (200 мл\*1), осушали безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=10/1, 0/1) с получением 8AmBza-18b (6,00 г, 16,3 ммоль, выход 51,1%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,32 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,27-7,23 (м, 1H), 7,20 (с, 1H), 7,19-7,16 (м, 1H), 3,94 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 3,73 (т, J=7,2 Гц, 2H), 3,33 (с, 2H), 1,82-1,72 (м, 2H), 1,17 (т, J=7,2 Гц, 3H), 0,99 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Получение метил-2-амино-4-[этокси(пропил)карбамоил]-3H-1-бензазепин-8-карбоксилата, 8AmBza-18c

К раствору 2-амино-8-бром-N-этокси-N-пропил-3H-1-бензазепин-4-карбоксамид (340 мг, 928 мкмоль, 1,0 экв.) в MeOH (10 мл) добавляли Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (34,0 мг, 46,4 мкмоль, 0,05 экв.) и Et<sub>3</sub>N (282 мг, 2,78 ммоль, 388 мкл, 3,0 экв.) в атмосфере N<sub>2</sub>, суспензию дегазировали в вакууме и несколько раз продували CO, смесь перемешивали в атмосфере CO (345 кПа (50 psi)) при 80 °С в течение 10 часов. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, затем добавляли воду (10 мл) и водную фазу экстрагировали этилацетатом (10 мл\*3), объединенную органическую фазу промывали рассолом (10 мл\*1), осушали безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали

хроматографией на силикагеле (высота колонки: 250 мм, диаметр: 100 мм, силикагель 100-200 меш, петролейный эфир/этилацетат=10/1, 0/1) с получением 8AmBza-18c (180 мг, 521 мкмоль, выход 56,1%) в виде твердого вещества желтого цвета.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,84 (д,  $J=1,2$  Гц, 1H), 7,69-7,65 (м, 1H), 7,46 (д,  $J=8,0$  Гц, 1H), 7,28 (с, 1H), 3,96 (т,  $J=14,4$  Гц, 2H), 3,93 (с, 3H), 3,74 (т,  $J=7,2$  Гц, 2H), 3,33 (с, 2H), 1,83-1,72 (м, 2H), 1,18 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H), 1,00 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H).

Получение 2-амино-4-[этоксипропил]карбамоил-3H-1-бензазепин-8-карбоновой кислоты, 8AmBza-18d

К раствору 8AmBza-18c (180 мг, 521 мкмоль, 1,0 экв.) в MeOH (1 мл) и  $\text{H}_2\text{O}$  (3 мл) добавляли  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (65,6 мг, 1,56 ммоль, 3,0 экв.) одной порцией при 20 °C в атмосфере  $\text{N}_2$ , смесь перемешивали при 20 °C в течение 7 часов. Смесь гасили HCl (4M) до pH=7, желаемое твердое вещество осаждали из смеси и затем фильтровали с получением 8AmBza-18d (150 мг, 452 мкмоль, выход 86,8%) в виде серого твердого вещества.

Получение трет-бутил-N-[2-[[1-[5-[[2-амино-4-[этоксипропил]карбамоил]-3H-1-бензазепин-8-карбонил]амино]-2-пиридил]пиперидин-4-карбонил]амино]этил]карбамата, 8AmBza-18e

К раствору 8AmBza-18d (137 мг, 413 мкмоль, 1,0 экв.) в ДМФА (2 мл) добавляли NATU (141 мг, 372 мкмоль, 0,9 экв.) и DIEA (160 мг, 1,24 ммоль, 216 мкл, 3,0 экв.) одной порцией при 20 °C в атмосфере  $\text{N}_2$ . Смесь перемешивали при 20 °C в течение 30 мин, затем добавляли трет-бутил-N-[2-[[1-(5-амино-2-пиридил)пиперидин-4-карбонил]амино]этил]карбамат (195 мг, 537 мкмоль, 1,3 экв.) и перемешивали при 20 °C в течение еще 10 часов. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex Synergi C18 150\*25\*10 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУК)-ACN]; В%: 10%-40%, 8 мин) с получением 8AmBza-18e (20,0 мг, неочищенный) в виде коричневого твердого вещества.

Получение 8AmBza-18

К раствору 8AmBza-18e (20 мг, 29,5 мкмоль, 1,0 экв.) в EtOAc (2 мл) добавляли HCl/EtOAc (4M, 369 мкл, 50 экв.) одной порцией при 20 °C в атмосфере  $\text{N}_2$  и затем перемешивали при 20 °C в течение 3 часов. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex Synergi C18 150\*25\*10 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУК)-ACN]; В%: 1%-25%, 8 мин) с получением 8AmBza-18 (12,6 мг, 17,5 мкмоль, выход 59,2%, чистота 95,98%, ТФУК) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, MeOD)  $\delta$  8,57 (д,  $J=2,4$  Гц, 1H), 8,07 (дд,  $J=2,4, 9,6$  Гц, 1H), 8,00-7,96 (м, 2H), 7,74 (д,  $J=8,4$  Гц, 1H), 7,47 (с, 1H), 7,18 (д,  $J=9,6$  Гц, 1H), 4,30 (д,  $J=13,6$  Гц, 2H), 4,00 (кв,  $J=7,2$  Гц, 2H), 3,78 (т,  $J=7,2$  Гц, 2H), 3,51-3,44 (м, 5H), 3,17-3,05 (м, 4H), 2,62-2,53 (м, 1H), 1,96 (д,  $J=3,6$  Гц, 2H), 1,87-1,75 (м, 4H), 1,22 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H), 1,03 (т,  $J=7,2$  Гц, 3H). ЖХ/МС [M+H] 577,3 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 577,2 (наблюдаемая).

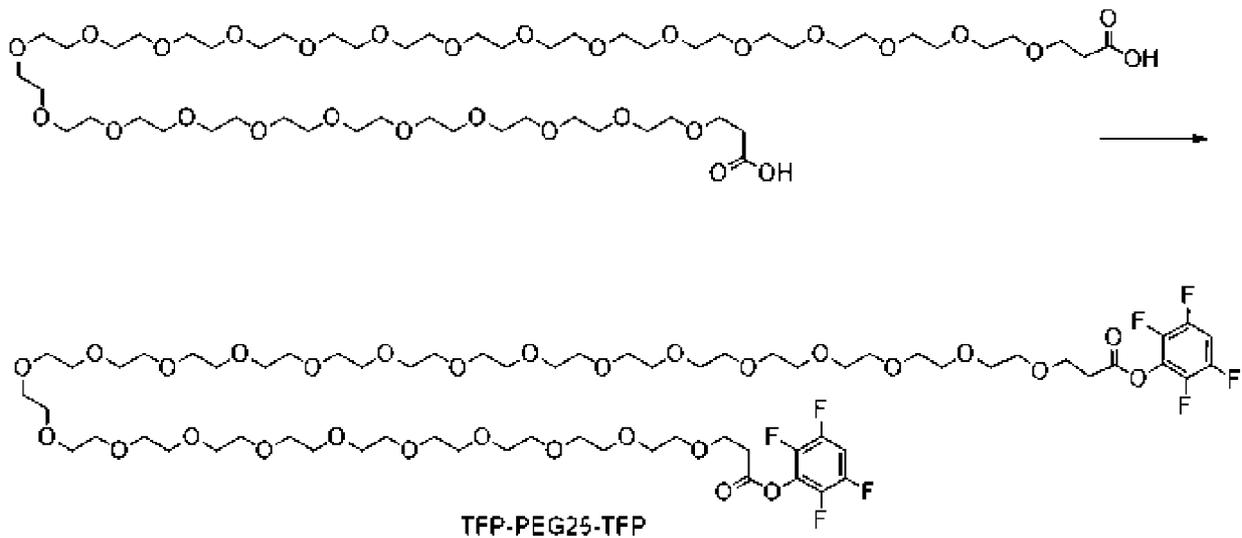
Пример L-1. Синтез 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил-(2-(1-(5-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоксамидо)пиридин-2-ил)пиперидин-4-

карбоксамидо)этил)карбамата, 8AmBza-L-1

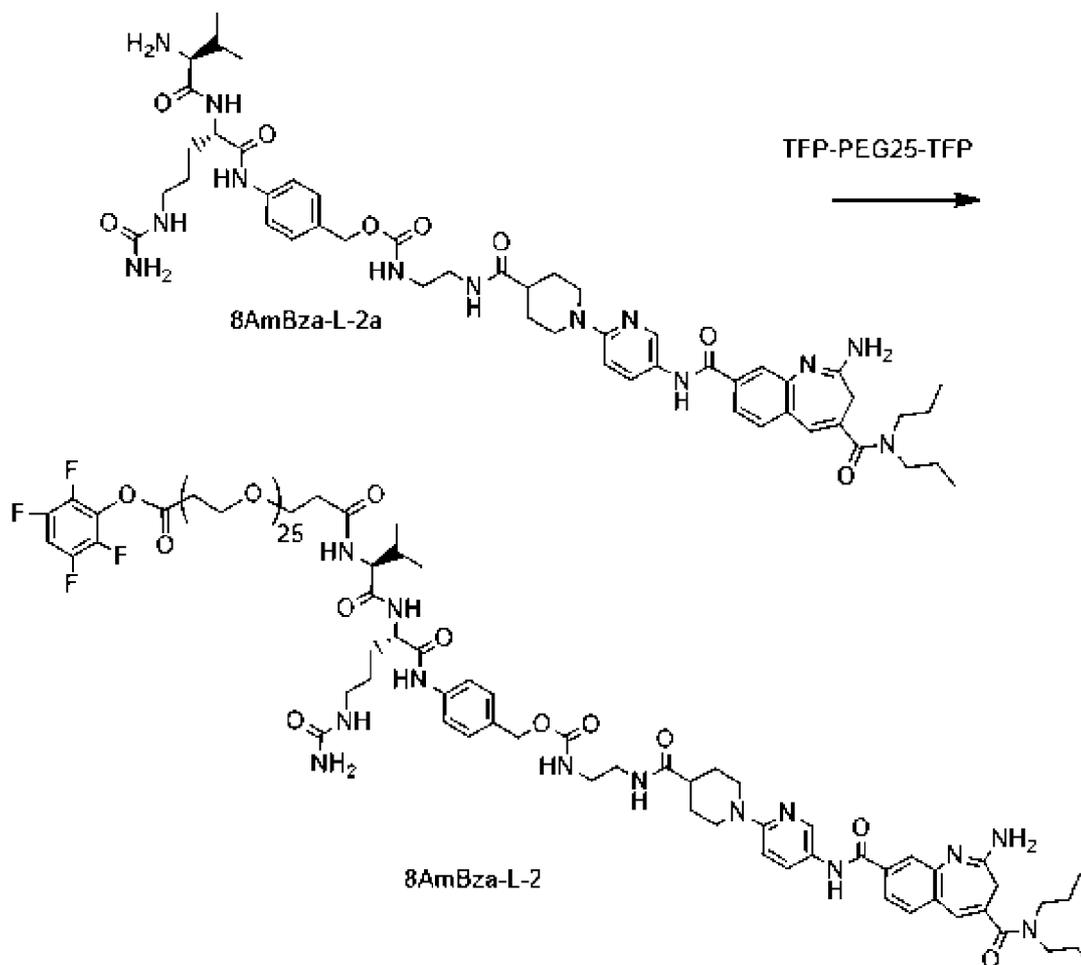
8AmBza-L-1 был получен и охарактеризован в соответствии с процедурами, описанными в данном документе.

Пример L-2 Синтез рац-2,3,5,6-тетрафторфенил-(6R,9R)-1-амино-6-((4-(((2-(1-(5-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоксамидо)пиперидин-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-триазанонаоктатан-89-оата, 8AmBza-L-2

Получение 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-пентакозаоксанонагептаконтандиоата, TFP-PEG25-TFP

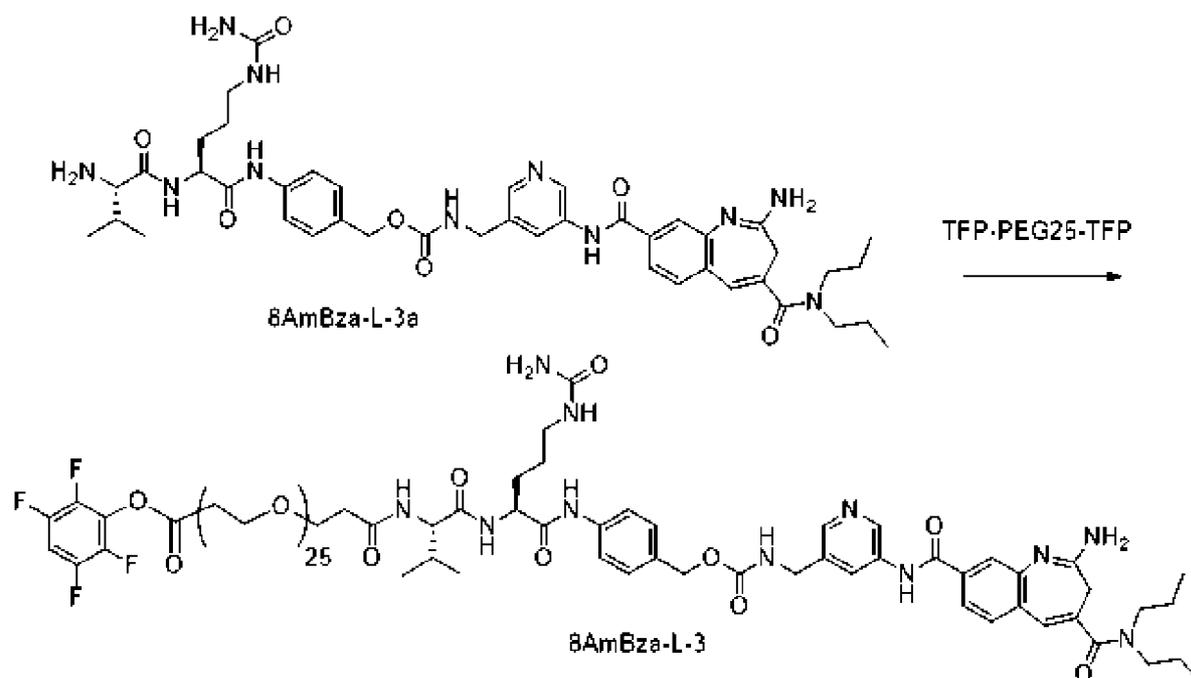


Во флакон загрузжали 4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-пентакозаоксанонагептаконтандиовую кислоту (269 мг, 0,221 ммоль), 2,3,5,6-тетрафторфенол (110 мг, 0,662 ммоль), коллидин (176 мкл, 1,33 ммоль), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (127 мг, 0,221 ммоль) и 3 мл ДМФ. Реакционную смесь перемешивали в течение 16 часов, затем очищали препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой с использованием градиента 25-75% смеси ацетонитрил:вода, содержащей 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 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 1516,00 (наблюдаемая).



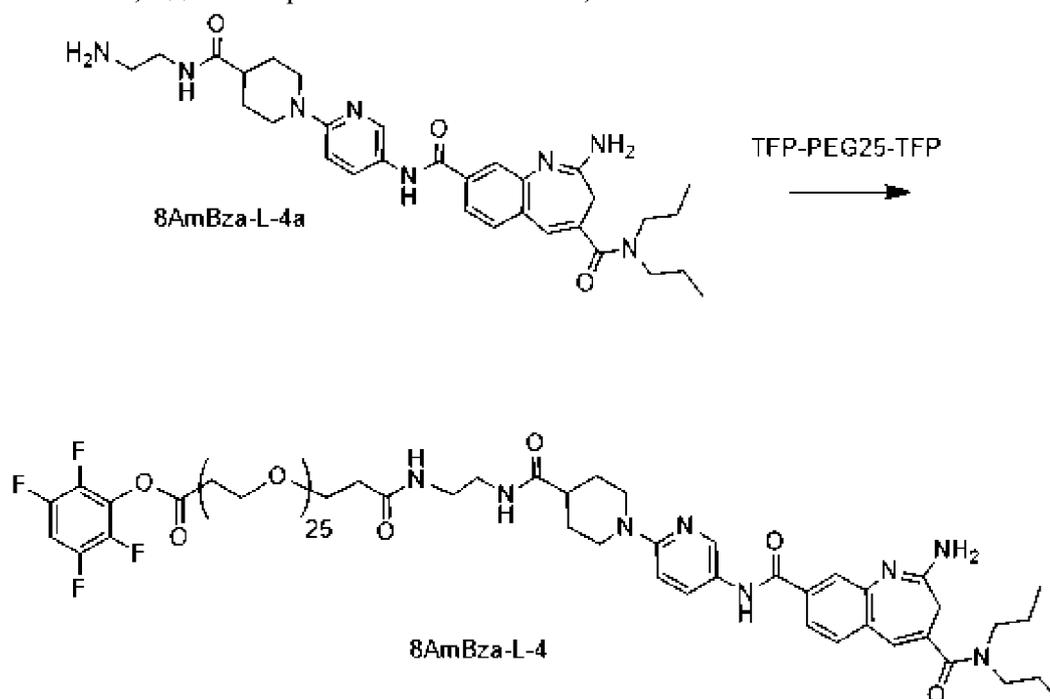
Проводили реакцию 4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил-(2-(1-(5-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоксамидо)пиридин-2-ил)пиперидин-4-карбоксамидо)этил)карбамата, 8AmBza-L-2a и TFP-PEG25-TFP в коллидине и ДМФА и очищали препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой с использованием градиента 25-75% ацетонитрил:вода, содержащей 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали с получением 8AmBza-L-2. ЖХ/МС [M+2H/2] 1165,10 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 1165,91 (наблюдаемая).

Пример L-3. Синтез 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-триазаноноактан-89-оата, 8AmBza-L-3



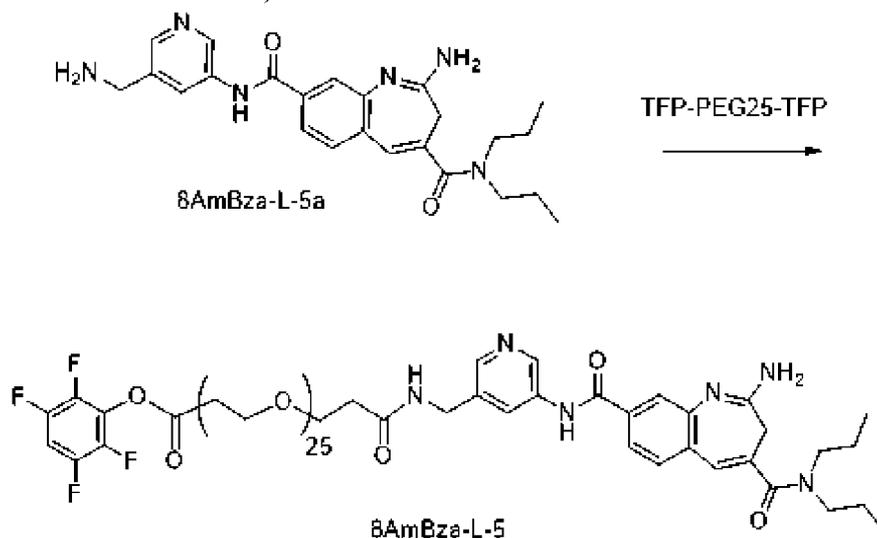
Проводили реакцию 4-((S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил-((5-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоксамидо)пиридин-3-ил)метил)карбамата, 8AmBza-L-3 и TFP-PEG25-TFP в коллидине и ДМФА, и очищали препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой с использованием градиента 25-75% ацетонитрил:вода, содержащей 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали, получая 8AmBza-L-3. ЖХ/МС [M+2H/2] 1095,06 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 1095,87 (наблюдаемая).

Пример L-4. Синтез 2,3,5,6-тетрафторфенил-1-(1-(5-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-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-дiazететраоктaконтан-84-оата, 8AmBza-L-4



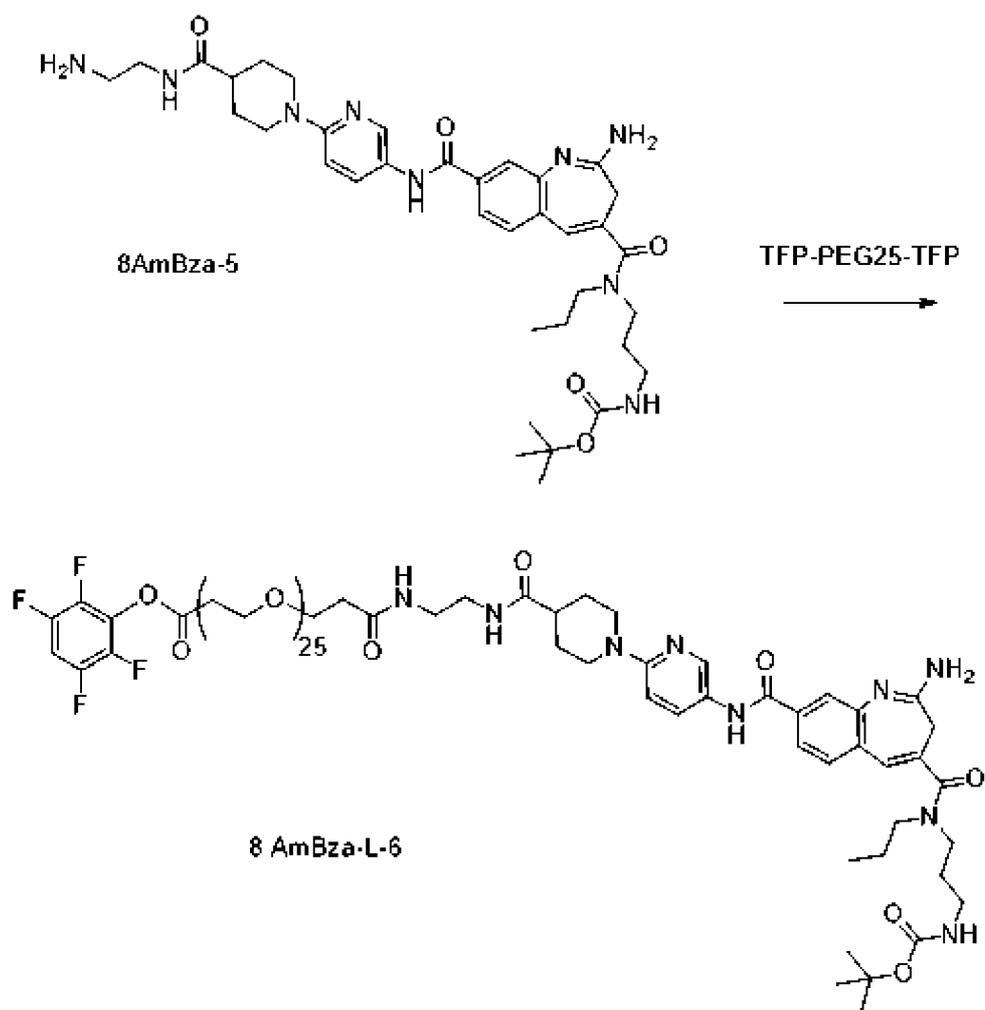
Проводили реакцию 2-амино-N8-(6-(4-((2-аминоэтил)карбамоил)пиперидин-1-ил)пиридин-3-ил)-N4,N4-дипропил-3H-бензо[b]азепин-4,8-дикарбоксамида, 8AmBza-L-4a и TFP-PEG25-TFP в коллидине и ДМФА и очищали препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой с использованием градиента 25-75% ацетонитрил:вода, содержащей 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали, получая 8AmBza-L-4. ЖХ/МС [M+H] 1924,01 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 1925,23 (наблюдаемая).

Пример L-5. Синтез 2,3,5,6-тетрафторфенил-1-(6-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоксамидо)пиридин-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-азагеноктаконтан-81-оата, 8AmBza-L-5



Проводили реакцию 2-амино-N8-(5-(аминометил)пиридин-3-ил)-N4,N4-дипропил-3H-бензо[b]азепин-4,8-дикарбоксамида, 8AmBza-L-5a и TFP-PEG25-TFP в коллидине и ДМФА, и очищали препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой с использованием градиента 25-75% ацетонитрил:вода, содержащей 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали, получая 8AmBza-L-5. ЖХ/МС [M+H] 1783,92 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 1784,19 (наблюдаемая).

Пример L-6. Синтез 2,3,5,6-тетрафторфенил-1-(1-(5-(2-амино-4-((3-((трет-бутоксикарбонил)амино)пропил)(пропил)карбамоил)-3H-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-дiazтетраоктаконтан-84-оата, 8AmBza-L-6.



Проводили реакцию трет-бутил-(3-(2-амино-8-((6-(4-((2-аминоэтил)карбамоил)пиперидин-1-ил)пиридин-3-ил)карбамоил)-N-пропил-3H-бензо[b]азепин-4-карбоксамидо)пропил)карбамата, 8AmBza-5 из Примера 5 и TFP-PEG25-TFP в коллидине и ДМФА, и очищали препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой с использованием градиента 25-75% ацетонитрил:вода, содержащей 0,1% трифторуксусной кислоты. Очищенные фракции объединяли и лиофилизировали, получая 8AmBza-L-6. ЖХ/МС [М+Н] 2039,07 (расчетная); ЖХ/МС [М+Н] 2039,40 (наблюдаемая).

Пример L-7. Синтез (2S,4S,6S)-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)-2-(20-оксо-1-(1-(2-(3-оксо-3-(перфторфенокси)пропокси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)-2,5,8,11,14,17-гексаокса-21-азатетраоксан-24-амидо)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновой кислоты, 8AmBza-L-7

8AmBza-L-7 был получен и охарактеризован в соответствии с процедурами, описанными в данном документе.

Пример L-8. Синтез 2,3,5,6-тетрафторфенил-1-(3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоксамидо)фенил)-8-метил-2,5,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-додекаокса-8-азагентактан-41-оата, 8AmBza-L-8

8AmBza-L-8 был получен и охарактеризован в соответствии с процедурами, описанными в данном документе.

Пример L-9. Синтез 2,3,5,6-тетрафторфенил-1-((5-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбоксамидо)пиримидин-2-ил)амино)-3-метил-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-декаокса-3-азагексатриаконтан-36-оата, 8AmBza-L-9

8AmBza-L-9 был получен и охарактеризован в соответствии с процедурами, описанными в данном документе.

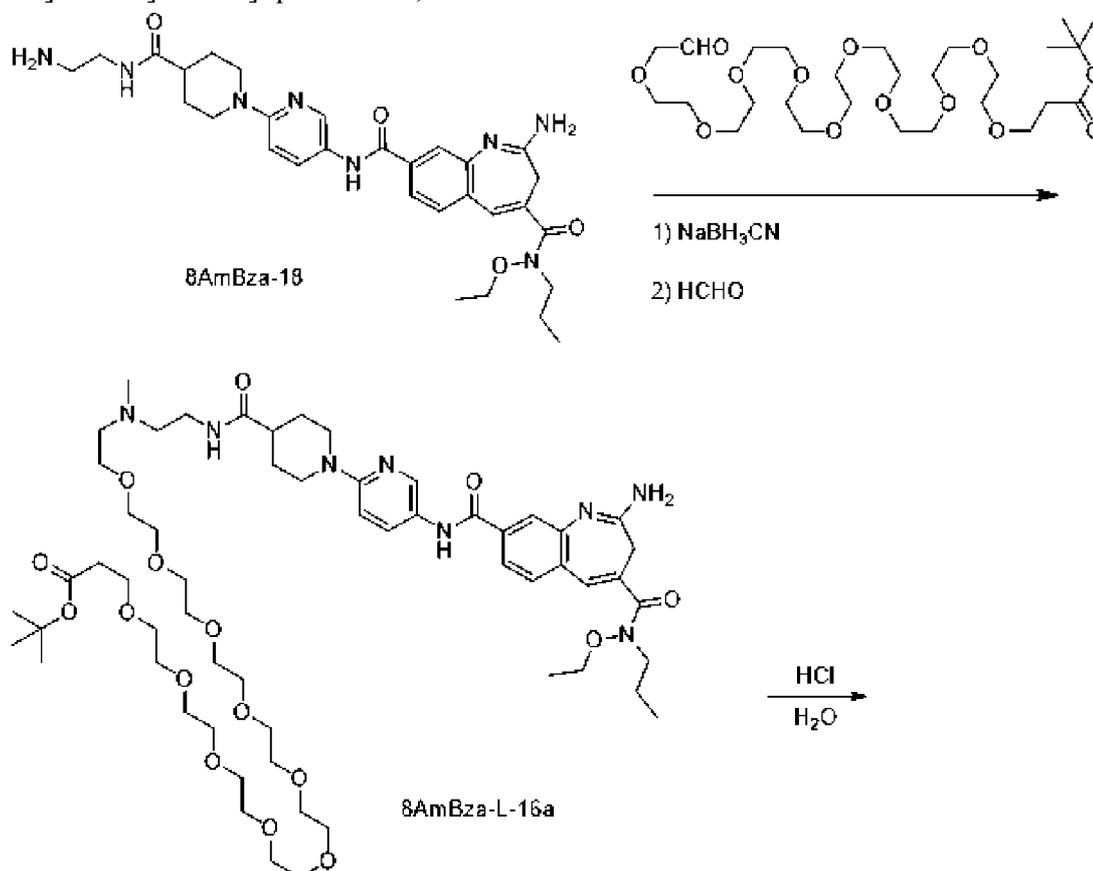
Пример L-10. Синтез 2,3,5,6-тетрафторфенил-(R)-1-(4-((3-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8)-карбоксамидо)пиперидин-1-ил)метил)фенил)-2-метил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азапентатриаконтан-35-оата, 8AmBza-L-10

8AmBza-L-10 был получен и охарактеризован в соответствии с процедурами, описанными в данном документе.

Пример L-11. Синтез 2,3,5,6-тетрафторфенил-1-(4-((4-(2-амино-4-(дипропилкарбамоил)-3H-бензо[b]азепин-8-карбонил)пиперазин-1-ил)метил)фенил)-2-метил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-декаокса-2-азапентатриаконтан-35-оата, 8AmBza-L-11

8AmBza-L-11 был получен и охарактеризован в соответствии с процедурами, описанными в данном документе.

Пример L-16. Синтез (2,3,5,6-тетрафторфенил)-3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[1-[5-[2-амино-4-[этокси(пропил)карбамоил]-3H-1-бензазепин-8-карбонил]амино]-2-пиридил]пиперидин-4-карбонил]амино]этилметиламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноата, 8AmBza-L-16





си]этокси]этокси]пропановой кислоты, 8AmBza-L-16b

К раствору 8AmBza-L-16a (50,0 мг, 43,1 мкмоль, 1,0 экв.) в MeCN (0,5 мл) и H<sub>2</sub>O (2 мл) добавляли HCl (12M, 107 мкл, 30 экв.) одной порцией при 20 °С в атмосфере N<sub>2</sub>, смесь перемешивали при 80 °С в течение 1 часа. Реакционную смесь концентрировали в вакууме с получением 8AmBza-L-16b (45 мг, 40,79 мкмоль, выход 94,6%) в виде бесцветной маслянистой жидкости.

#### Получение 8AmBza-L-16

К смеси 8AmBza-L-16b (45,0 мг, 40,7 мкмоль, 1,0 экв.) и 2,3,5,6-тетрафторфенола (67,7 мг, 407 мкмоль, 10 экв.) в ДХМ (2 мл) и ДМА (0,5 мл) добавляли EDCI (39,0 мг, 203 мкмоль, 5,0 экв.) одной порцией при 20 °С в атмосфере N<sub>2</sub>, смесь перемешивали при 20 °С в течение 1 часа. ДХМ (2 мл) удаляли в вакууме и смесь фильтровали, фильтрат очищали препаративной ВЭЖХ (колонка: Phenomenex Synergi C18 150\*30 мм\*4 мкм; подвижная фаза: [вода (0,1% ТФУК)-ACN]; В %: 20%-45%, 8 мин) с получением 8AmBza-L-16 (15,0 мг, 11,9 мкмоль, выход 29,3%, чистота 99,7%) в виде коричневой маслянистой жидкости. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 8,55 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,03 (дд, J=2,4, 9,2 Гц, 1H), 7,98 (с, 2H), 7,74 (д, J=9,2 Гц, 1H), 7,47 (с, 1H), 7,16-7,09 (м, 1H), 4,34-4,28 (м, 2H), 4,00 (д, J=7,0 Гц, 2H), 3,91-3,85 (м, 4H), 3,74-3,59 (м, 4H), 3,50 (с, 2H), 3,45 (с, 3H), 3,17-3,07 (м, 2H), 3,01 (с, 3H), 1,96 (д, J=10,6 Гц, 2H), 1,86-1,75 (м, 4H), 1,22 (т, J=7,2 Гц, 3H), 1,06-0,99 (м, 3H). ЖХ/МС [M+H] 1251,6 (расчетная); ЖХ/МС [M+H] 1251,4 (наблюдается).

#### Пример 201. Получение иммуноконъюгатов (ИК)

В типовой процедуре антитело подвергают замене буфера на буфер для конъюгации, содержащий 100 mM борной кислоты, 50 mM хлорида натрия, 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты при pH 8,3, с использованием колонок для обессоливания G-25 SEPHADEX™ (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Затем каждый элюат доводят до концентрации примерно 1-10 мг/мл с помощью буфера, а затем подвергают стерильной фильтрации. Антитело предварительно нагревают до 20-30°C и быстро смешивают с 2-20 (например, 7-10) молярными эквивалентами соединения 8AmBza-линкер формулы II. Реакции дают протекать в течение примерно 16 часов при 30 °С, и иммуноконъюгат (ИК) отделяют от реагентов, пропуская через две последовательные обессоливающие колонки G-25, уравновешенные фосфатно-солевым буфером (PBS) при pH 7,2, чтобы получить иммуноконъюгат (ИК) из Таблицы 3. Соотношение адъювант-антитело (DAR) определяют анализом методом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии с использованием колонки C4 с обращенной фазой на ACQUITY™ СВЭЖХ (UPLC) H-класса (Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс, США), сопряженной с времяпролетным масс-спектрометром XEVO™ G2-XS TOF (Waters Corporation).

Для конъюгации антитело можно растворить в водной буферной системе, известной в данной области техники, которая не оказывает неблагоприятного воздействия на стабильность или антигенсвязывающую специфичность антитела. Можно использовать фосфатно-солевой буфер. Промежуточное соединение 8AmBza-линкер растворяют в системе растворителей, содержащей по меньшей мере один полярный апротонный

растворитель, как описано в другом разделе данного документа. В некоторых таких аспектах промежуточное соединение 8AmVza-линкер растворяют до концентрации примерно 5 мМ, примерно 10 мМ, примерно 20 мМ, примерно 30 мМ, примерно 40 мМ или примерно 50 мМ, и в диапазонах таких значений, таких как от примерно 5 мМ до примерно 50 мМ, или от примерно 10 мМ до примерно 30 мМ, в трис-буфере с pH 8 (например, 50 мМ трис). В некоторых аспектах промежуточное соединение 8AmVza-линкер растворяют в ДМСО (диметилсульфоксиде), ДМА (диметилацетамиде) или ацетонитриле или другом подходящем диполярном апротонном растворителе.

В качестве альтернативы, в реакции конъюгации эквивалентный избыток раствора промежуточного соединения 8AmVza-линкер может быть разбавлен и объединен с раствором антитела. Раствор промежуточного соединения 8AmVza-линкер 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. Молярные эквиваленты промежуточного соединения 8AmVza-линкер по отношению к антителу могут составлять примерно 1,5:1, примерно 3:1, примерно 5:1, примерно 10:1, примерно 15:1 или примерно 20:1, и находиться в диапазонах таких значений, таких как от от примерно 1,5:1 до примерно 20:1, от примерно 1,5:1 до примерно 15:1, от примерно 1,5:1 до примерно 10:1, от примерно 3:1 до примерно 15:1, от примерно 3:1 до примерно 10:1, от примерно 5:1 до примерно 15:1 или от примерно 5:1 до примерно 10:1. Завершение реакции можно отслеживать с помощью методов, известных в данной области техники, таких как ЖХ-МС. Реакция конъюгации обычно завершается в диапазоне от примерно 1 часа до примерно 16 часов. После завершения реакции к реакционной смеси можно добавить реагент для гашения реакции. Если тиоловые группы антител реагируют с реакционной по отношению к тиолу группой, такой как малеимид промежуточного соединения 8AmVza-линкер, непрореагировавшие тиоловые группы антитела могут реагировать с кэпирующим реагентом. Примером подходящего кэпирующего реагента является этилмалеимид.

После конъюгации иммуноконъюгаты могут быть очищены и отделены от неконъюгированных реагентов и/или агрегатов конъюгатов способами очистки, известными в данной области техники, такими как, например, без ограничения, эксклюзионная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия, ионообменная хроматография, хроматофокусирование, ультрафильтрация, центробежная ультрафильтрация, тангенциальная поточная фильтрация и их комбинации. Например, очистке может предшествовать разведение иммуноконъюгата, например, в 20 мМ сукцинате натрия, pH 5. Разбавленный раствор наносят на катионообменную колонку с последующим промыванием, например, по меньшей мере 10 объемами колонки 20 мМ сукцинатом натрия, pH 5. Конъюгат можно удобно элюировать буфером, таким как PBS.

Пример 202. Репортерный анализ НЕК.

Репортерные клетки НЕК293, экспрессирующие человеческий TLR7 или человеческий TLR8, были приобретены у Invivogen, и при размножении клеток и

проведении экспериментов придерживались протоколов поставщиков. Вкратце, клетки выращивали до 80-85% слияния при 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), зеоцина и бластицидина. Затем клетки высевали в 96-луночные плоские планшеты в количестве 4×10<sup>4</sup> клеток/лунку с субстратом, содержащим среду для детектирования НЕК и иммуностимулирующие молекулы. Активность измеряли с помощью планшет-ридера при длине волны 620-655 нм.

#### Пример 203. Оценка активности иммуноконъюгата *in vitro*

Этот пример показывает, что иммуноконъюгаты по настоящему изобретению эффективно вызывают миелоидную активацию и поэтому применимы для лечения рака.

Выделение человеческих антигенпрезентирующих клеток: Человеческие миелоидные антигенпрезентирующие клетки (АПК) были отобраны путем негативной селекции из периферической крови человека, полученной от здоровых доноров крови (Стэнфордский центр крови (Stanford Blood Center), Пало-Альто, Калифорния) путем центрифугирования в градиенте плотности с использованием коктейля для обогащения человеческих моноцитов ROSETTESEP™ Human Monocyte Enrichment Cocktail (Stem Cell Technologies, Ванкувер, Канада), содержащего моноклональные антитела против CD14, CD16, CD40, CD86, CD123 и HLA-DR. Незрелые АПК были впоследствии очищены до чистоты >90% посредством негативной селекции с использованием набора для обогащения моноцитов человека EASYSEP™ (Stem Cell Technologies) без истощения CD16, содержащего моноклональные антитела против CD14, CD16, CD40, CD86, CD123 и HLA-DR.

Анализ активации миелоидных АПК: 2×10<sup>5</sup> АПК инкубировали в 96-луночных планшетах (Corning, Корнинг, Нью-Йорк, США), содержащих модифицированную по Искову среду Дульбекко, IMDM (Lonza) с добавлением 10% FBS, 100 Ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл (микрограмм на миллилитр) стрептомицина, 2 мМ L-глутамин, пирувата натрия, заменимых аминокислот и, где указано, различные концентрации неконъюгированных («голых») антител PD-L1 или HER2 и иммуноконъюгатов по настоящему изобретению (полученных в соответствии с вышеприведенным Примером). В качестве конструкторов антител использовали трастузумаб и авелумаб. Бесклеточные супернатанты анализировали через 18 часов с помощью ИФА (ELISA) для измерения секреции ФНОα в качестве показателя провоспалительной реакции.

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 здоровой донорской крови, M-CSF-дифференцированные макрофаги, GM-CSF-дифференцированные макрофаги, дендритные клетки, полученные из моноцитов GM-CSF+IL-4, классические дендритные клетки, выделенные из здоровой донорской крови, 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,

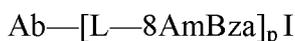
такие как M2a МФ (IL4/IL13), M2c МФ (IL10/TGFb), GM-CSF/IL6 MDSC и опухолевые моноциты (TEM). Дифференцировку TEM можно проводить с использованием кондиционированных опухолями сред (например, 786.O, MDA-MB-231, HCC1954). Миелоидные клетки, ассоциированные с первичными опухолями, могут также включать первичные клетки, присутствующие в суспензиях диссоциированных опухолевых клеток (Discovery Life Sciences).

Оценку активации описанных популяций миелоидных клеток можно проводить в виде монокультуры или совместной культуры с клетками, экспрессирующими представляющий интерес антиген, с которым ISAC (иммунный твердофазный аллергочип) может связываться через CDR-область антитела. После инкубации в течение 18-48 часов активацию можно оценить по активизации костимулирующих молекул клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии или по измерению секретируемых провоспалительных цитокинов. Для измерения цитокинов собирают бесклеточный супернатант и анализируют с помощью анализа цитокинов на массиве микросфер (например, LegendPlex от Biolegend) с использованием проточной цитометрии.

Все ссылки, включая публикации, патентные заявки и патенты, упоминаемые в данном документе, настоящим включены посредством ссылки в той же степени, как если бы для каждого источника было отдельно и специально указано про включение посредством ссылки и он был изложен в данном документе в полном объеме.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуноконъюгат, содержащий антитело, ковалентно присоединенное к одному или нескольким фрагментам 8-амидо-2-аминобензазепина с помощью линкера, и имеющий формулу I:



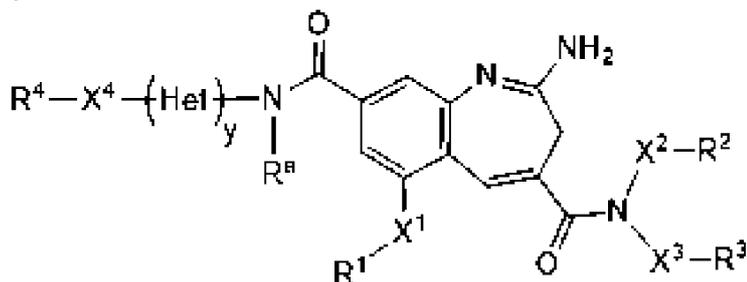
или его фармацевтически приемлемую соль,

где:

Ab представляет собой антитело;

p представляет собой целое число от 1 до 8;

8AmBza представляет собой фрагмент 8-амидо-2-аминобензазепина, имеющий формулу:

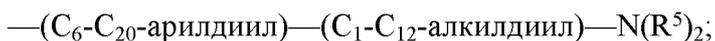
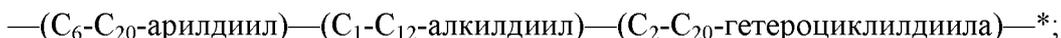
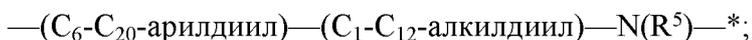
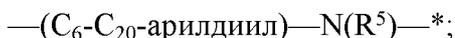
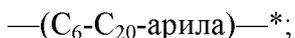
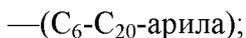
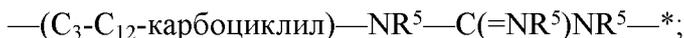
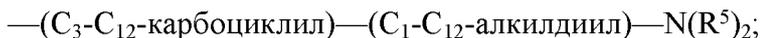


y равен 0 или 1;

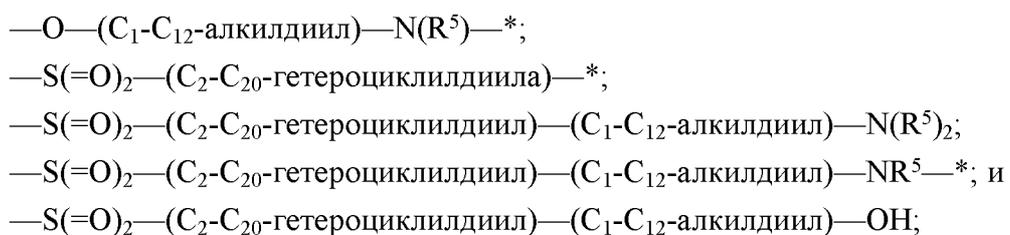
Het выбирают из группы, состоящей из гетероциклила, гетероциклилдиила, гетероарила и гетероарилдиила;

R<sup>a</sup> представляет собой H или образует Het с атомом азота, с которым он связан;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо выбирают из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинила, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила, C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила, при этом алкил, алкенил, алкинил, карбоциклил, арил, гетероциклил и гетероарил независимо и необязательно замещены одной или несколькими группами, выбранными из:



- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>—C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)—\*;  
 —(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклила);  
 —(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклила)—\*;  
 —(C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>—\*;  
 —(C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;  
 —(C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклил)—NR<sup>5</sup>—C(=NR<sup>5a</sup>)NR<sup>5</sup>—\*;  
 —(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила);  
 —(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила)—\*;  
 —(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;  
 —(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;  
 —(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарил)—NR<sup>5</sup>—C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)—\*;  
 —C(=O)—\*;  
 —C(=O)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;  
 —C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклилдиила)—\*;  
 —C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;  
 —C(=O)N(R<sup>5</sup>)—\*;  
 —C(=O)N(R<sup>5</sup>)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)C(=O)R<sup>5</sup>;  
 —C(=O)N(R<sup>5</sup>)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;  
 —C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>;  
 —C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;  
 —C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>C(=NR<sup>5a</sup>)R<sup>5</sup>;  
 —C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-гетероарила);  
 —C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил)—N(R<sup>5</sup>)—\*;  
 —C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиила)—\*;  
 —C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил)—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;  
 —C(=O)NR<sup>5</sup>—(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил)—(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклилдиил)—C(=O)NR<sup>5</sup>—  
 (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—NR<sup>5</sup>—\*;  
 —N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;  
 —N(R<sup>5</sup>)—\*;  
 —N(R<sup>5</sup>)C(=O)R<sup>5</sup>;  
 —N(R<sup>5</sup>)C(=O)—\*;  
 —N(R<sup>5</sup>)C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;  
 —N(R<sup>5</sup>)C(=O)N(R<sup>5</sup>)—\*;  
 —N(R<sup>5</sup>)CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>;  
 —NR<sup>5</sup>C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;  
 —NR<sup>5</sup>C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)—\*;  
 —NR<sup>5</sup>C(=NR<sup>5a</sup>)R<sup>5</sup>;  
 —N(R<sup>5</sup>)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-гетероарила);  
 —O—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкила);  
 —O—(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)—N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;



или R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

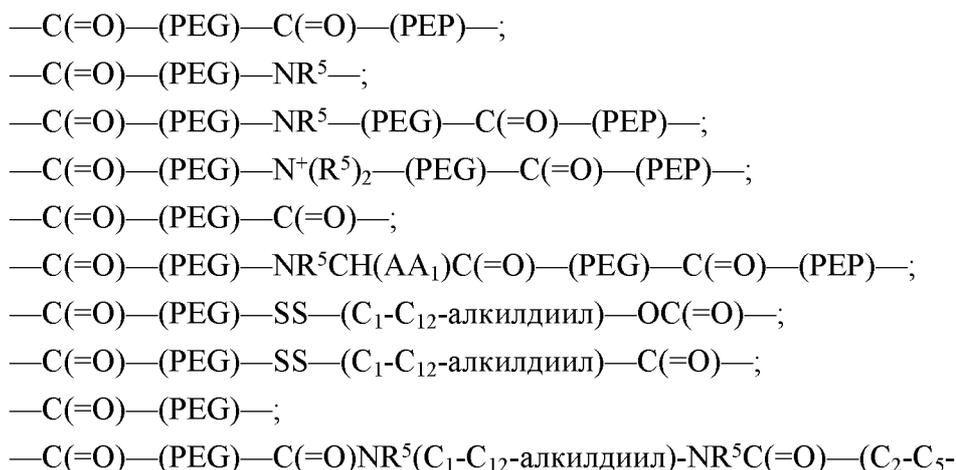
X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup> и X<sup>4</sup> независимо выбирают из группы, состоящей из связи, C(=O), C(=O)N(R<sup>5</sup>), O, N(R<sup>5</sup>), S, S(O)<sub>2</sub> и S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>5</sup>);

R<sup>5</sup> выбирают из группы, состоящей из H, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиила, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкила и C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиила, или две группы R<sup>5</sup> вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

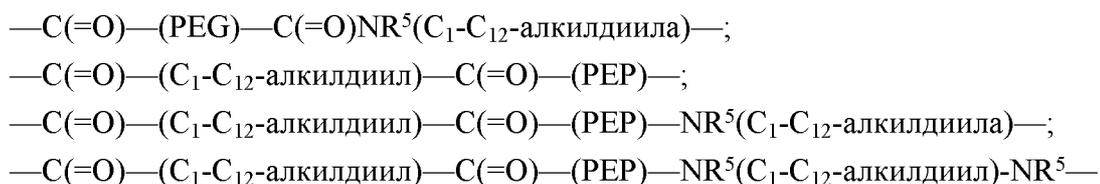
R<sup>5a</sup> выбирают из группы, состоящей из C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила;

где звездочка \* указывает сайт присоединения L, и где один из R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> присоединен к L;

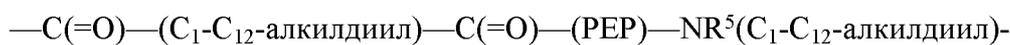
L представляет собой линкер, выбранный из группы, состоящей из:



моногоheterоциклдидиала)—};



C(=O);



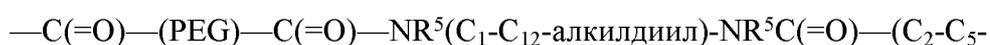
NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногоheterоциклдидиала)—};



(MCgluc)—};



(MCgluc)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногоheterоциклдидиала)—};

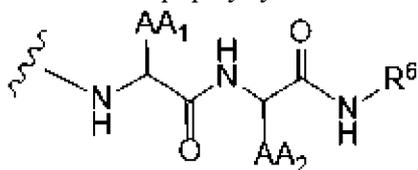


моногоheterоциклдидиала)—};

—C(=O)—(PEG)—C(=O)—(PEP)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиила)—;  
 —C(=O)—(PEG)—C(=O)—(PEP)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-  
 моногетероциклдиила)—; и  
 —(сукцинимидил)—(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>—C(=O)—(PEP)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—  
 (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногетероциклдиила)—;

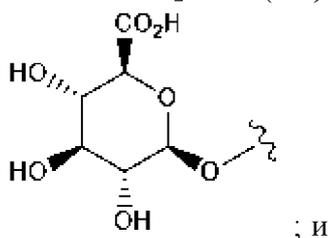
PEG имеет формулу: —(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>—(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>—; m представляет собой целое число от 1 до 5, и n представляет собой целое число от 2 до 50;

PEP имеет формулу:

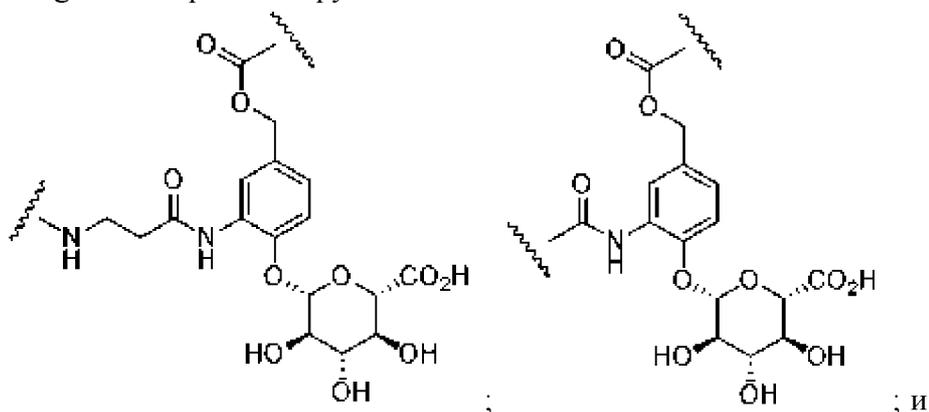


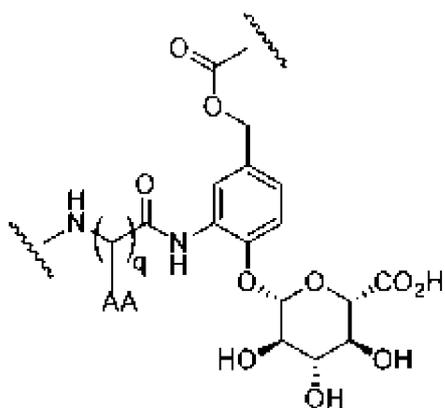
где AA<sub>1</sub> и AA<sub>2</sub> независимо выбирают из боковой цепи аминокислоты, или AA<sub>1</sub> или AA<sub>2</sub> и прилегающий атом азота образуют 5-членное кольцо пролиновой аминокислоты, и волнистая линия указывает точку присоединения; и

R<sup>6</sup> выбирают из группы, состоящей из C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиила, замещенного —CH<sub>2</sub>O—C(=O)— и, необязательно:



MSgluc выбирают из групп:





где  $q$  имеет значение от 1 до 8, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты;

где алкил, алкилдиил, алкенил, алкенилдиил, алкинил, алкинилдиил, арил, арилдиил, карбоцикллил, карбоцикллилдиил, гетероцикллил, гетероцикллилдиил, гетероарил, и гетероарилдиил необязательно замещены одной или несколькими группами, независимо выбранными из F, Cl, Br, I,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{F}$ ,  $-\text{CHF}_2$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CHF}_2$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{NHSO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{COCH}_3$ ,  $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONHCH}_3$ ,  $-\text{CON}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{NHCOCH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{COCH}_3$ ,  $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $=\text{O}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{SCH}_3$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}_3$  и  $-\text{S}(\text{O})_3\text{H}$ .

2. Иммуноконъюгат по п. 1, отличающийся тем, что антитело представляет собой конструктор антитела, имеющий антигенсвязывающий домен, который связывает PD-L1.

3. Иммуноконъюгат по п. 2, отличающийся тем, что антитело выбирают из группы, состоящей из атезолизумаба, дурвалумаба и авелумаба, или их биоаналогов или биобеттеров.

4. Иммуноконъюгат по п. 1, отличающийся тем, что антитело представляет собой конструктор антитела, имеющий антигенсвязывающий домен, который связывает HER2.

5. Иммуноконъюгат по п. 4, отличающийся тем, что антитело выбирают из группы, состоящей из трастузумаба и пертузумаба, или их биоаналогов или биобеттеров.

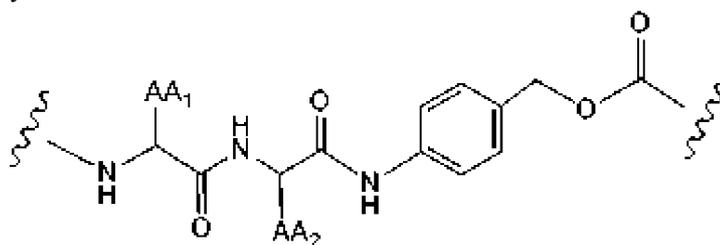
6. Иммуноконъюгат по п. 1, отличающийся тем, что антитело представляет собой конструктор антитела, имеющий антигенсвязывающий домен, который связывает РЭА.

7. Иммуноконъюгат по п. 6, отличающийся тем, что антитело представляет собой лабетузумаб, или его биоаналог или биобеттер.

8. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что  $u$  равен 0.

9. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что  $u$  равен 1.

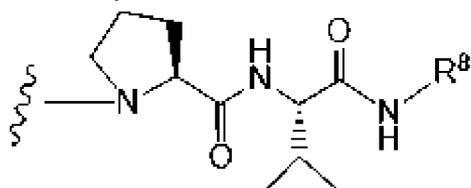
10. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что РЕР имеет формулу:



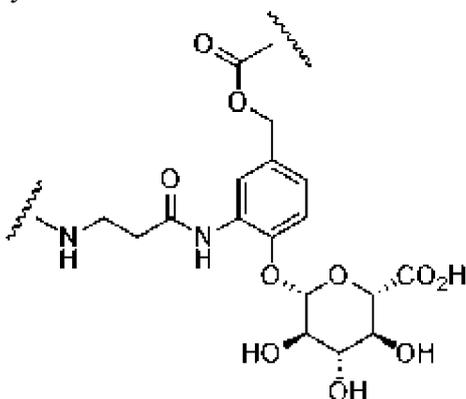
где  $AA_1$  и  $AA_2$  независимо выбирают из боковой цепи природной аминокислоты.

11. Иммуноконъюгат по п. 10, отличающийся тем, что  $AA_1$  или  $AA_2$  образуют с соседним атомом азота 5-членное кольцо пролиновой аминокислоты.

12. Иммуноконъюгат по п. 11, отличающийся тем, что РЕР имеет формулу:



13. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что МСgluc имеет формулу:



14. Иммуноконъюгат по п. 10, отличающийся тем, что  $AA_1$  и  $AA_2$  независимо выбирают из  $H$ ,  $-CH_3$ ,  $-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH_2(C_6H_5)$ ,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ ,  $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ ,  $-CHCH(CH_3)CH_3$ ,  $-CH_2SO_3H$  и  $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$ .

15. Иммуноконъюгат по п. 10, отличающийся тем, что  $AA_1$  представляет собой  $-CH(CH_3)_2$ , и  $AA_2$  представляет собой  $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$ .

16. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что  $X^1$  представляет собой связь, и  $R^1$  представляет собой  $H$ .

17. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что  $X^2$  представляет собой связь, и  $R^2$  представляет собой  $C_1$ - $C_8$ -алкил.

18. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что  $X^2$  и  $X^3$  каждый представляют собой связь, и  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбирают из  $C_1$ - $C_8$ -алкила,  $-O-(C_1-C_{12}$ -алкила),  $-(C_1-C_{12}$ -алкилдиил)- $OR^5$ ,  $-(C_1-C_8$ -алкилдиил)- $N(R^5)CO_2R^5$  и  $-O-(C_1-C_{12}$ -алкил)- $N(R^5)CO_2R^5$ .

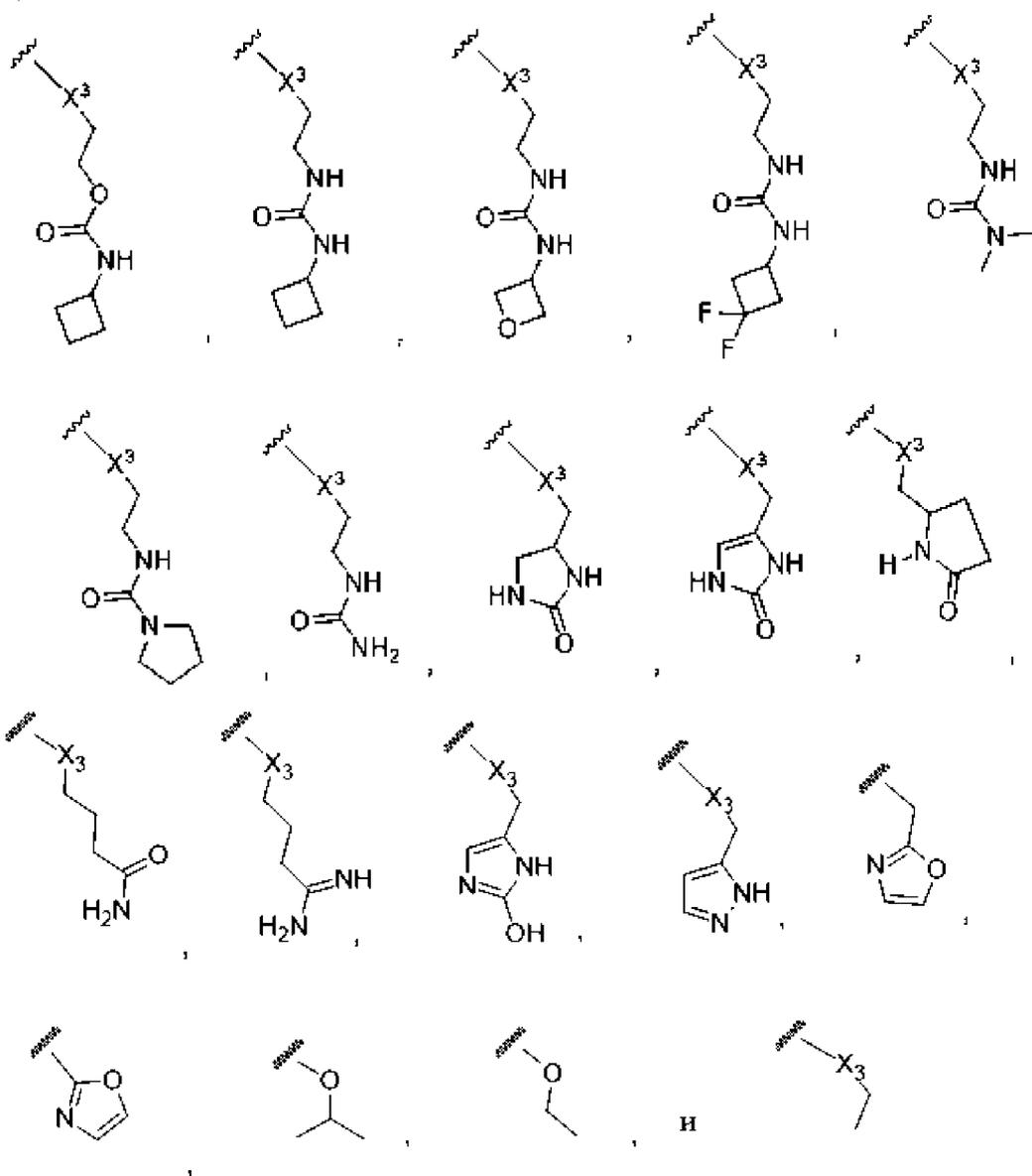
19. Иммуноконъюгат по п. 18, отличающийся тем, что каждый из  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбирают из  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$  и  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ .

20. Иммуноконъюгат по п. 18, отличающийся тем, что  $R^2$  представляет собой  $\text{C}_1\text{-C}_8$ -алкил, и  $R^3$  представляет собой  $-(\text{C}_1\text{-C}_8\text{-алкилдиил})-\text{N}(\text{R}^5)\text{CO}_2\text{R}^4$ .

21. Иммуноконъюгат по п. 20, отличающийся тем, что  $R^2$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  и  $R^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}_2(t\text{-Bu})$ .

22. Иммуноконъюгат по п. 23, отличающийся тем, что каждый из  $R^2$  и  $R^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

23. Иммуноконъюгат по п. 17, отличающийся тем, что  $X^3\text{-R}^3$  выбирают из группы, состоящей из:



24. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что Het представляет собой 5- или 6-членный моноциклический гетероарилдиил, выбранный из группы, состоящей из пиридилдиила, имидазолдиила, пиримидиндиила, пиразолилдиила, триазолилдиила, пиразинилдиила, тетразолилдиила, фурилдиила, тиенилдиила, изоксазолилдиила, тиазолилдиила, оксадиазолилдиила, оксазолилдиила, изотиазолилдиила

и пирролилдила.

25. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что Het представляет собой 5- или 6-членный моноциклический гетероциклдиил, выбранный из группы, состоящей из морфолинилдила, пиперидинилдила, пиперазинилдила, пирролидинилдила, диоксанилдила, тиоморфолинилдила и S-диоксотiomорфолинилдила.

26. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что Het представляет собой 1,6-нафтиридил или 1,6-нафтиридиил.

27. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что L выбирают из группы, состоящей из:

—C(=O)—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил)—CH<sub>2</sub>O—(PEG)—C(=O)—(M<sub>C</sub>gluc)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногоheterоциклдиила)—;

—C(=O)—(PEG)—C(=O)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиила)—;

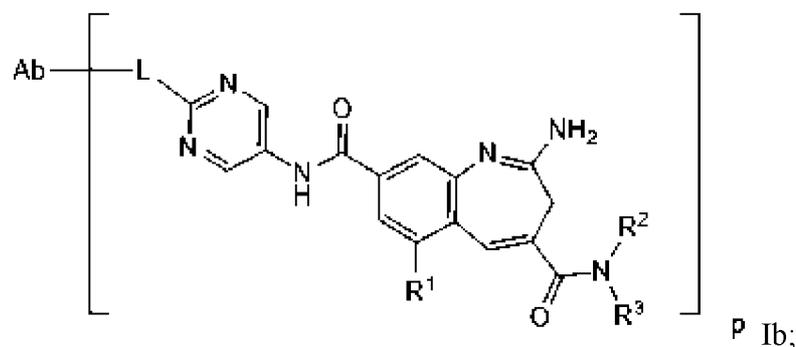
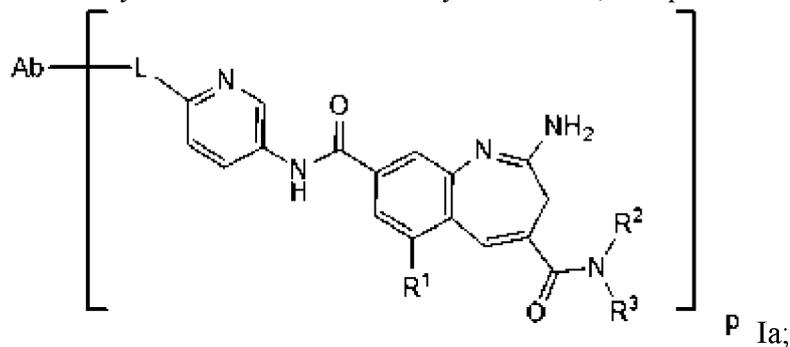
—C(=O)—(PEG)—C(=O)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногоheterоциклдиила)—;

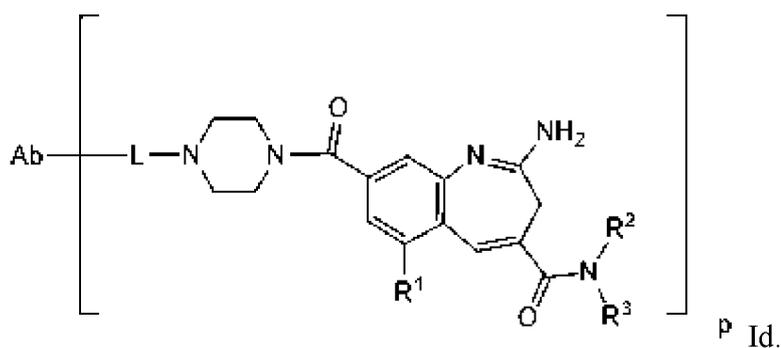
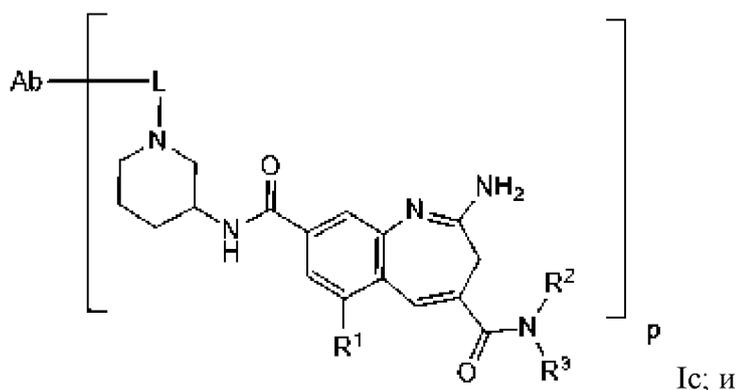
—C(=O)—(PEG)—C(=O)—(PEP)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиила)—;

—C(=O)—(PEG)—C(=O)—(PEP)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногоheterоциклдиила)—; и

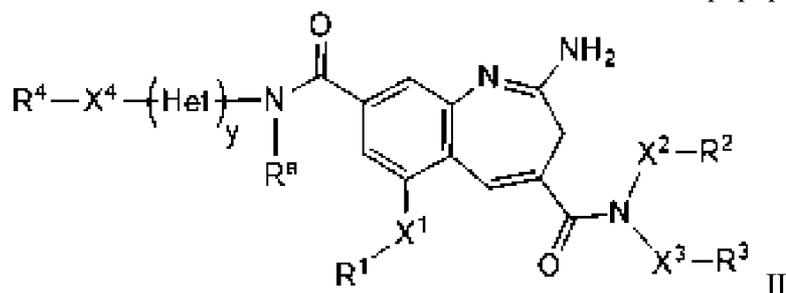
—(сукцинимидил)—(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>—C(=O)—(PEP)—NR<sup>5</sup>(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил)-NR<sup>5</sup>C(=O)—(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-моногоheterоциклдиила)—.

28. Иммуноконъюгат по любому из пп. 1-7, выбранный из формул Ia-d:





29. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II:



где

$y$  равен 0 или 1;

Het выбирают из группы, состоящей из гетероциклила, гетероциклилдиила, гетероарила и гетероарилдиила;

$R^a$  представляет собой H или образует Het с атомом азота, с которым он связан;

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  независимо выбирают 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, при этом алкил, алкенил, алкинил, карбоциклил, арил, гетероциклил и гетероарил независимо и необязательно замещены одной или несколькими группами, выбранными из:

—( $C_1$ - $C_{12}$ -алкилдиил)— $N(R^5)$ —\*;

—( $C_1$ - $C_{12}$ -алкилдиил)— $N(R^5)_2$ ;

—( $C_1$ - $C_{12}$ -алкилдиил)— $OR^5$ ;

—( $C_3$ - $C_{12}$ -карбоциклила);

—( $C_3$ - $C_{12}$ -карбоциклила)—\*;

—( $C_3$ - $C_{12}$ -карбоциклил)—( $C_1$ - $C_{12}$ -алкилдиил)— $NR^5$ —\*;

- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклл) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-карбоциклл) —NR<sup>5</sup> —C(=NR<sup>5</sup>)NR<sup>5</sup> —\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила);
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арила) —\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил) —N(R<sup>5</sup>) —\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>) —\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероцикллдиила) —\*;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-арилдиил) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —NR<sup>5</sup> —C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>) —\*;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклила);
- (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероциклила) —\*;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклл) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —NR<sup>5</sup> —\*;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклл) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклл) —NR<sup>5</sup> —C(=NR<sup>5a</sup>)NR<sup>5</sup> —\*;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила);
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарила) —\*;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарил) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>) —\*;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарил) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарил) —NR<sup>5</sup> —C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>) —\*;
- C(=O) —\*;
- C(=O) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>) —\*;
- C(=O) —(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероцикллдиила) —\*;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>) —\*;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>)C(=O)R<sup>5</sup>;
- C(=O)N(R<sup>5</sup>) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>)C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)NR<sup>5</sup> —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>)CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>;
- C(=O)NR<sup>5</sup> —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>)C(=NR<sup>5a</sup>)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)NR<sup>5</sup> —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —NR<sup>5</sup>C(=NR<sup>5a</sup>)R<sup>5</sup>;
- C(=O)NR<sup>5</sup> —(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкилдиил) —NR<sup>5</sup>(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>-гетероарила);
- C(=O)NR<sup>5</sup> —(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил) —N(R<sup>5</sup>) —\*;
- C(=O)NR<sup>5</sup> —(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиила) —\*;
- C(=O)NR<sup>5</sup> —(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил) —(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- C(=O)NR<sup>5</sup> —(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-гетероарилдиил) —(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-гетероцикллдиил) —C(=O)NR<sup>5</sup> —
- (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкилдиил) —NR<sup>5</sup> —\*;
- N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;
- N(R<sup>5</sup>) —\*;
- N(R<sup>5</sup>)C(=O)R<sup>5</sup>;
- N(R<sup>5</sup>)C(=O) —\*;
- N(R<sup>5</sup>)C(=O)N(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>;

$\text{—N(R}^5\text{)C(=O)N(R}^5\text{)—*}$ ;  
 $\text{—N(R}^5\text{)CO}_2\text{R}^5$ ;  
 $\text{—NR}^5\text{C(=NR}^{5a}\text{)N(R}^5\text{)}_2$ ;  
 $\text{—NR}^5\text{C(=NR}^{5a}\text{)N(R}^5\text{)—*}$ ;  
 $\text{—NR}^5\text{C(=NR}^{5a}\text{)R}^5$ ;  
 $\text{—N(R}^5\text{)—(C}_2\text{—C}_5\text{-гетероарила)}$ ;  
 $\text{—O—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкила)}$ ;  
 $\text{—O—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—N(R}^5\text{)}_2$ ;  
 $\text{—O—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—N(R}^5\text{)—*}$ ;  
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{-гетероцикллдиила)—*}$ ;  
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{-гетероцикллдиил)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—N(R}^5\text{)}_2$ ;  
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{-гетероцикллдиил)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—NR}^5\text{—*}$ ; и  
 $\text{—S(=O)}_2\text{—(C}_2\text{—C}_{20}\text{-гетероцикллдиил)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—OH}$ ;

или  $R^2$  и  $R^3$  вместе образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо;

$X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  и  $X^4$  независимо выбирают из группы, состоящей из связи,  $C(=O)$ ,  $C(=O)N(R^5)$ ,  $O$ ,  $N(R^5)$ ,  $S$ ,  $S(O)_2$  и  $S(O)_2N(R^5)$ ;

$R^5$  выбирают 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;

$R^{5a}$  выбирают из группы, состоящей из  $C_6\text{—}C_{20}$ -арила и  $C_1\text{—}C_{20}$ -гетероарила;

где звездочка \* указывает 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:

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—C(=O)—(PEP)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—NR}^5\text{—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—NR}^5\text{—(PEG)—C(=O)—(PEP)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—N}^+(\text{R}^5)_2\text{—(PEG)—C(=O)—(PEP)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—C(=O)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—NR}^5\text{CH(AA}_1\text{)C(=O)—(PEG)—C(=O)—(PEP)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—SS—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—OC(=O)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—SS—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—C(=O)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—C(=O)NR}^5\text{(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)-NR}^5\text{C(=O)—(C}_2\text{—C}_5\text{-}$   
 моногетероцикллдиила)—

$Q\text{—C(=O)—(PEG)—C(=O)NR}^5\text{(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиила)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—NR}^5\text{(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиила)—}$ ;

$Q\text{—C(=O)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—NR}^5\text{(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)-NR}^5\text{—}$

$C(=O)$ ;

$Q\text{—C(=O)—(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)—C(=O)—(PEP)—NR}^5\text{(C}_1\text{—C}_{12}\text{-алкилдиил)-}$

$\text{NR}^5\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_2\text{-C}_5\text{-моногетероциклдидиила})-$ ;

$\text{Q}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-(\text{C}_1\text{-C}_{20}\text{-гетероарилдидиил})-\text{CH}_2\text{O}-(\text{PEG})-\text{C}(=\text{O})-(\text{MCgluc})-$ ;

$\text{Q}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-(\text{C}_1\text{-C}_{20}\text{-гетероарилдидиил})-\text{CH}_2\text{O}-(\text{PEG})-\text{C}(=\text{O})-(\text{MCgluc})-\text{NR}^5(\text{C}_1\text{-C}_{12}\text{-алкилдидиил})-\text{NR}^5\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_2\text{-C}_5\text{-моногетероциклдидиила})-$ ;

$\text{Q}-\text{C}(=\text{O})-(\text{PEG})-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}^5(\text{C}_1\text{-C}_{12}\text{-алкилдидиила})-$ ;

$\text{Q}-\text{C}(=\text{O})-(\text{PEG})-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}^5(\text{C}_1\text{-C}_{12}\text{-алкилдидиил})-\text{NR}^5\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_2\text{-C}_5\text{-моногетероциклдидиила})-$ ;

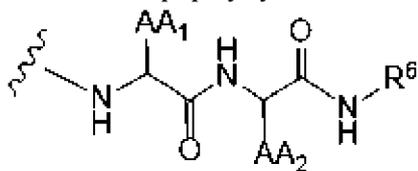
$\text{Q}-\text{C}(=\text{O})-(\text{PEG})-\text{C}(=\text{O})-(\text{PEP})-\text{NR}^5(\text{C}_1\text{-C}_{12}\text{-алкилдидиила})-$ ;

$\text{Q}-\text{C}(=\text{O})-(\text{PEG})-\text{C}(=\text{O})-(\text{PEP})-\text{NR}^5(\text{C}_1\text{-C}_{12}\text{-алкилдидиил})-\text{NR}^5\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_2\text{-C}_5\text{-моногетероциклдидиила})-$ ; и

$\text{Q}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})-(\text{PEP})-\text{NR}^5(\text{C}_1\text{-C}_{12}\text{-алкилдидиил})-\text{NR}^5\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_2\text{-C}_5\text{-моногетероциклдидиила})-$ ;

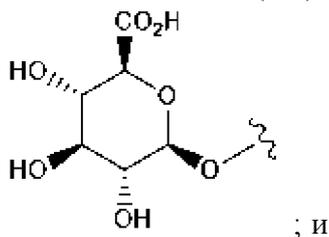
где PEG имеет формулу:  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2)_m-$ ;  $m$  представляет собой целое число от 1 до 5, и  $n$  представляет собой целое число от 2 до 50;

PEP имеет формулу:



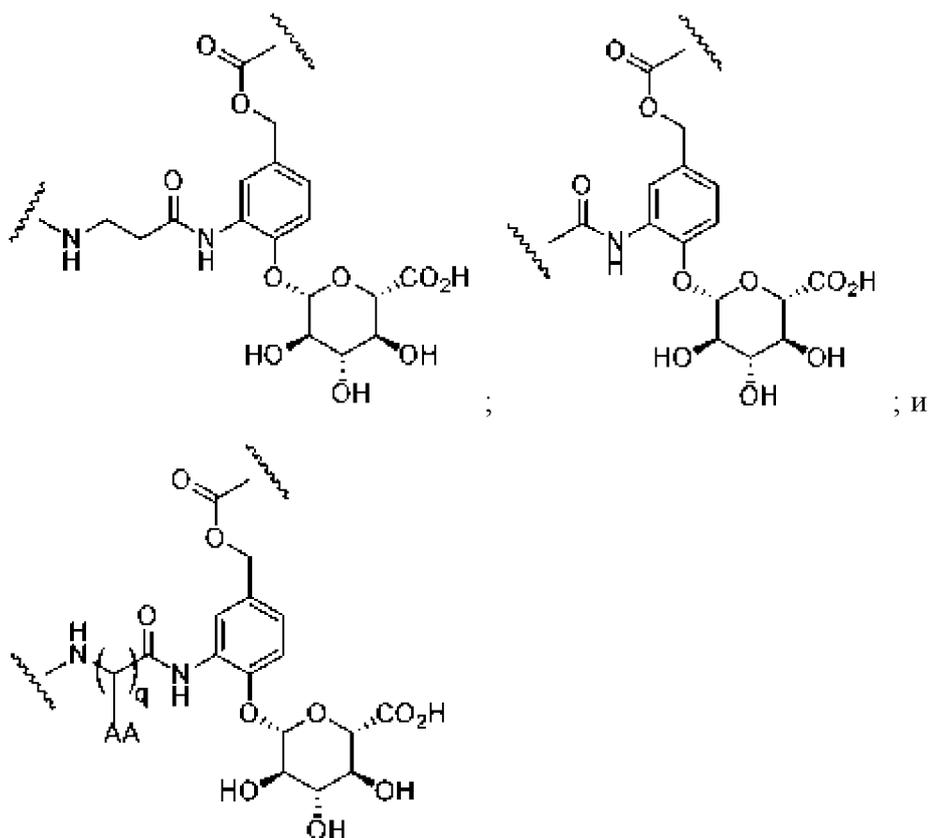
где  $\text{AA}_1$  и  $\text{AA}_2$  независимо выбирают из боковой цепи аминокислоты, или  $\text{AA}_1$  или  $\text{AA}_2$  и прилегающий атом азота образуют 5-членное кольцо пролиновой аминокислоты, и волнистая линия указывает точку присоединения; и

$\text{R}^6$  выбирают из группы, состоящей из  $\text{C}_6\text{-C}_{20}$ -арилдидиила и  $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ -гетероарилдидиила, замещенных  $-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$  и, необязательно:



; и

MCgluc выбирают из групп:



где  $q$  имеет значение от 1 до 8, и AA представляет собой боковую цепь аминокислоты; и

Q выбирают из группы, состоящей из N-гидроксисукцинимидила, N-гидроксисульфосукцинимидила, малеимида и фенокси, замещенных одной или несколькими группами, независимо выбранными из F, Cl, NO<sub>2</sub> и SO<sub>3</sub><sup>-</sup>;

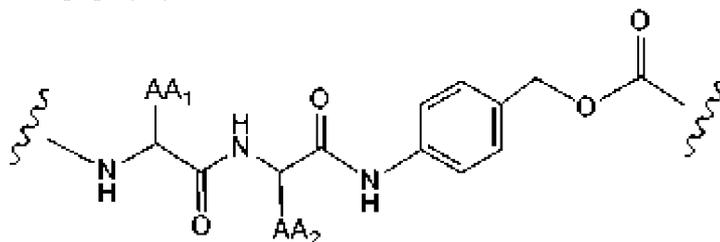
при этом алкил, алкилдиил, алкенил, алкенилдиил, алкинил, алкинилдиил, арил, арилдиил карбоцикл, карбоциклдиил, гетероцикл, гетероциклдиил, гетероарил и гетероарилдиил необязательно замещены одной или несколькими группами, независимо выбранными из F, Cl, Br, I, —CN, —CH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH=CH<sub>2</sub>, —C≡CH, —C≡CCH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>OH, —CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH, —CH(OH)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, —CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>OP(O)(OH)<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>F, —CHF<sub>2</sub>, —CF<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>CHF<sub>2</sub>, —CH(CH<sub>3</sub>)CN, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CN, —CH<sub>2</sub>CN, —CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, —CH<sub>2</sub>NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>, —CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —CO<sub>2</sub>H, —COCH<sub>3</sub>, —CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —CO<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, —COCH(OH)CH<sub>3</sub>, —CONH<sub>2</sub>, —CONHCH<sub>3</sub>, —CON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, —NH<sub>2</sub>, —NHCH<sub>3</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —NHCOCH<sub>3</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)COCH<sub>3</sub>, —NHS(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, —N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —NO<sub>2</sub>, =O, —OH, —OCH<sub>3</sub>, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, —OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>—(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, —O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>H, —OP(O)(OH)<sub>2</sub>, —S(O)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, —SCH<sub>3</sub>, —S(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> и —S(O)<sub>3</sub>H.

30. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что  $u$  равен 0.

31. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что

у равен 1.

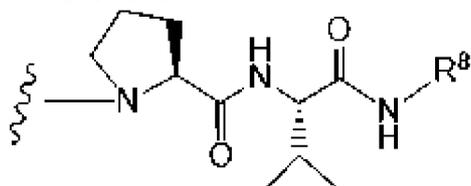
32. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что РЕР имеет формулу:



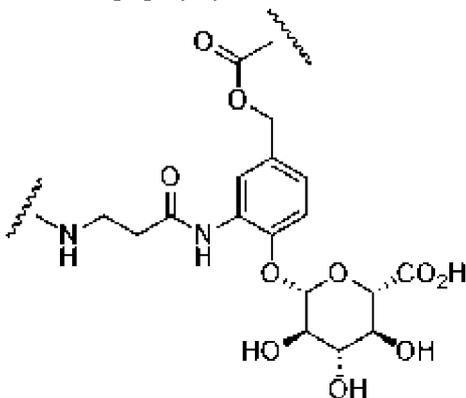
где  $AA_1$  и  $AA_2$  независимо выбирают из боковой цепи природной аминокислоты.

33. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 32, отличающееся тем, что  $AA_1$  или  $AA_2$  образуют с соседним атомом азота 5-членное кольцо с образованием пролиновой аминокислоты.

34. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 33, отличающееся тем, что РЕР имеет формулу:



35. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что МСgluc имеет формулу:



36. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 32, отличающееся тем, что  $AA_1$  и  $AA_2$  независимо выбирают из  $H$ ,  $-CH_3$ ,  $-CH(CH_3)_2$ ,  $-CH_2(C_6H_5)$ ,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ ,  $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ ,  $-CHCH(CH_3)CH_3$ ,  $-CH_2SO_3H$  и  $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$ .

37. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 32, отличающееся тем, что  $AA_1$  представляет собой  $-CH(CH_3)_2$ , и  $AA_2$  представляет собой  $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$ .

38. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что  $X^1$  представляет собой связь, и  $R^1$  представляет собой  $H$ .

39. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что  $X^2$  представляет собой связь, и  $R^2$  представляет собой  $C_1-C_8$ -алкил.

40. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что  $X^2$  и  $X^3$  каждый представляют собой связь, и  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбирают из  $C_1$ - $C_8$ -алкила,  $-O-(C_1-C_{12}$ -алкила),  $-(C_1-C_{12}$ -алкилдиил)- $OR^5$ ,  $-(C_1-C_8$ -алкилдиил)- $N(R^5)CO_2R^5$  и  $-O-(C_1-C_{12}$ -алкил)- $N(R^5)CO_2R^5$ .

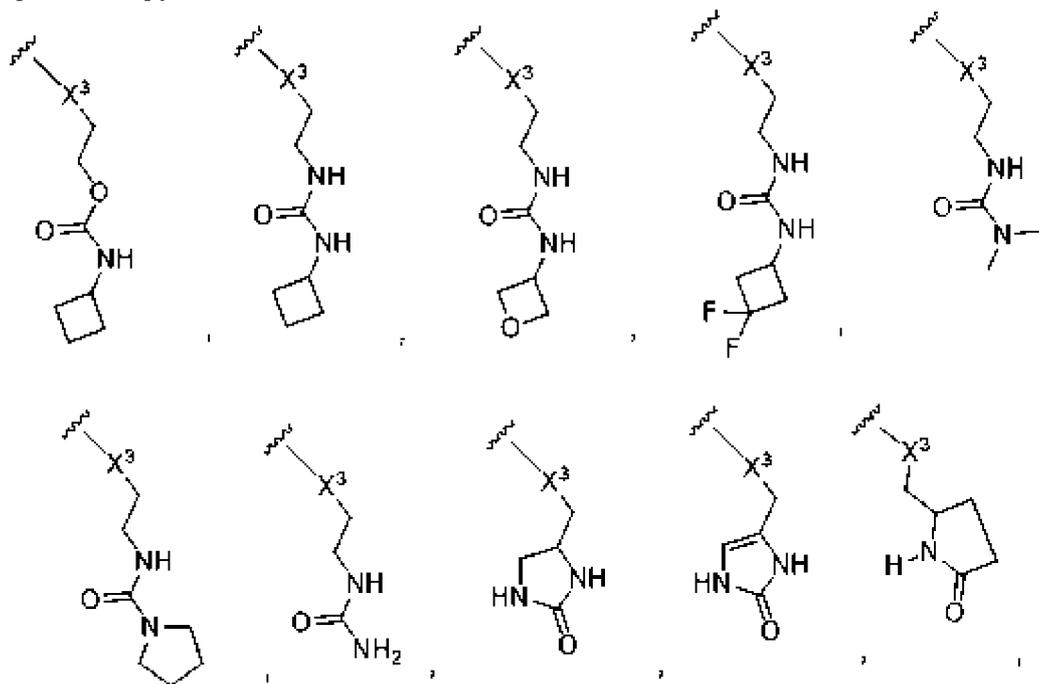
41. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 40, отличающееся тем, что каждый из  $R^2$  и  $R^3$  независимо выбирают из  $-CH_2CH_2CH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$ ,  $-CH_2CH_2CF_3$  и  $-CH_2CH_2CH_2OH$ .

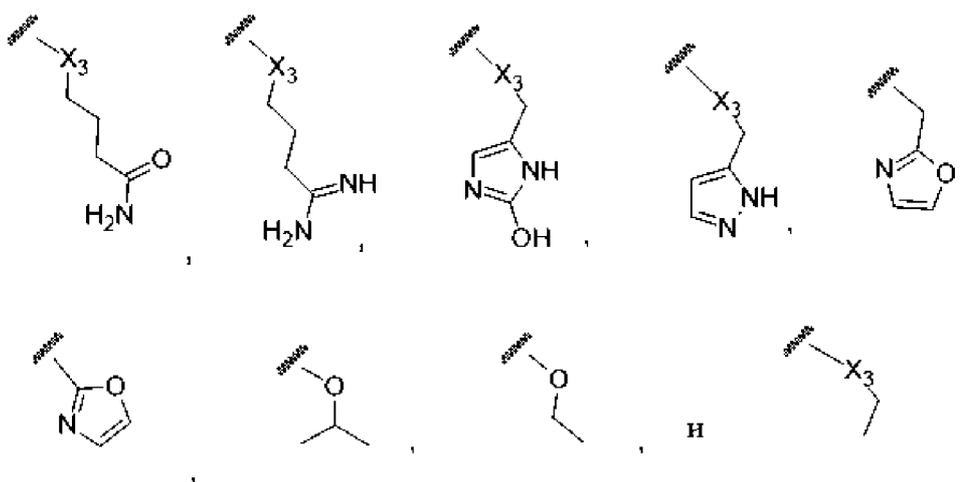
42. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 40, отличающееся тем, что  $R^2$  представляет собой  $C_1$ - $C_8$ -алкил, и  $R^3$  представляет собой  $-(C_1-C_8$ -алкилдиил)- $N(R^5)CO_2R^4$ .

43. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 42, отличающееся тем, что  $R^2$  представляет собой  $-CH_2CH_2CH_3$ , и  $R^3$  представляет собой  $-CH_2CH_2CH_2NHCO_2(t-Bu)$ .

44. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 40, отличающееся тем, что каждый из  $R^2$  и  $R^3$  представляет собой  $-CH_2CH_2CH_3$ .

45. Соединение 5-аминопиразолоазепин-линкер по п. 39, отличающееся тем, что  $X^3$  и  $R^3$  выбирают из группы, состоящей из:





46. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что Het представляет собой 5- или 6-членный моноциклический гетероарилдиил, выбранный из группы, состоящей из пиридилдиила, имидазолдиила, пиримидиндиила, пиразолилдиила, триазолилдиила, пиразинилдиила, тетразолилдиила, фурилдиила, тиенилдиила, изоксазолдиила, тиазолилдиила, оксадиазолилдиила, оксазолилдиила, изотиазолилдиила и пирролилдиила.

47. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что Het представляет собой 5- или 6-членный моноциклический гетероциклдиил, выбранный из группы, состоящей из морфолинилдиила, пиперидинилдиила, пиперазинилдиила, пирролидинилдиила, диоксанилдиила, тиоморфолинилдиила и S-диоксотiomорфолинилдиила.

48. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что Het представляет собой 1,6-нафтиридил или 1,6-нафтиридиил.

49. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что L выбирают из группы, состоящей из:

$Q-C(=O)-CH_2CH_2OCH_2CH_2-(C_1-C_{20}\text{-гетероарилдиил})-CH_2O-(PEG)-C(=O)-(MCgluc)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5C(=O)-(C_2-C_5\text{-моногетероциклдиил})-$ ;

$Q-C(=O)-(PEG)-C(=O)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-$ ;

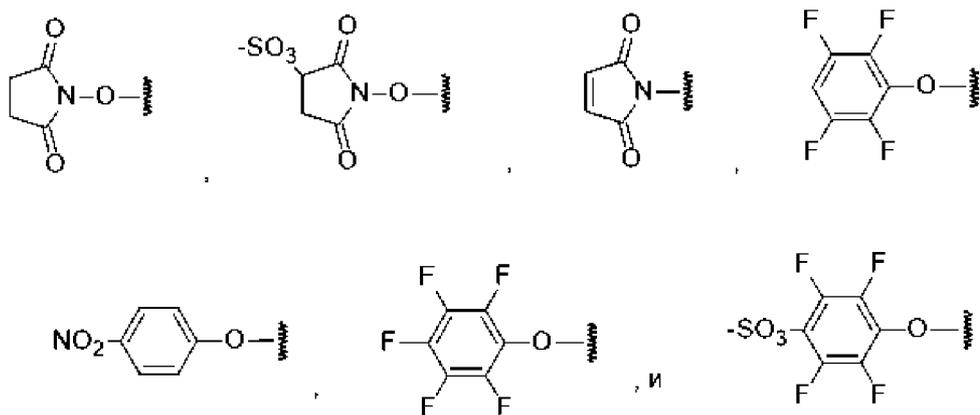
$Q-C(=O)-(PEG)-C(=O)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5C(=O)-(C_2-C_5\text{-моногетероциклдиил})-$ ;

$Q-C(=O)-(PEG)-C(=O)-(PEP)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-$ ;

$Q-C(=O)-(PEG)-C(=O)-(PEP)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5C(=O)-(C_2-C_5\text{-моногетероциклдиил})-$ ; и

$Q-(CH_2)_m-C(=O)-(PEP)-NR^5(C_1-C_{12}\text{-алкилдиил})-NR^5C(=O)-(C_2-C_5\text{-моногетероциклдиил})-$ .

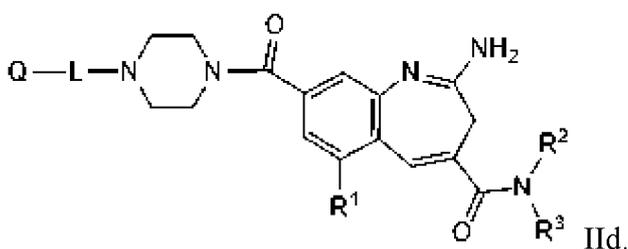
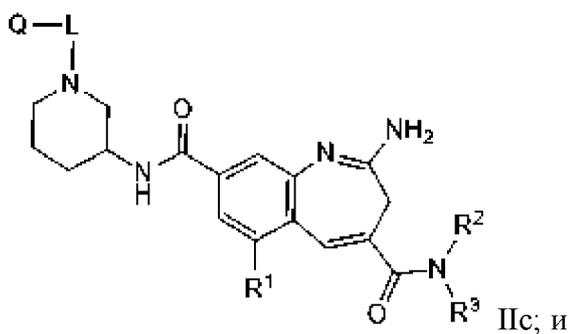
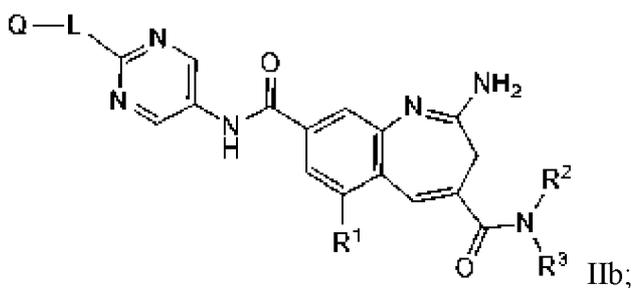
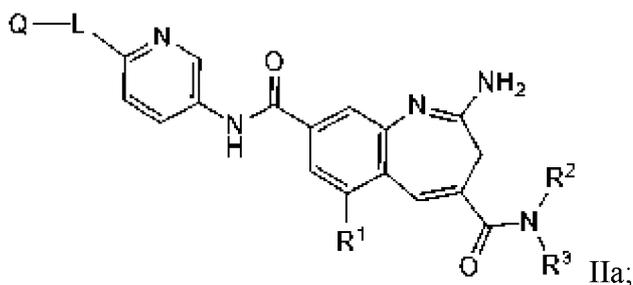
50. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что Q выбирают из:



51. Соединение аминоквинолин-линкер по п. 29, отличающееся тем, что Q представляет собой фенокси группу, замещенную одним или несколькими F.

52. Соединение аминоквинолин-линкер по п. 51, отличающееся тем, что Q представляет собой 2,3,5,6-тетрафторфенокси.

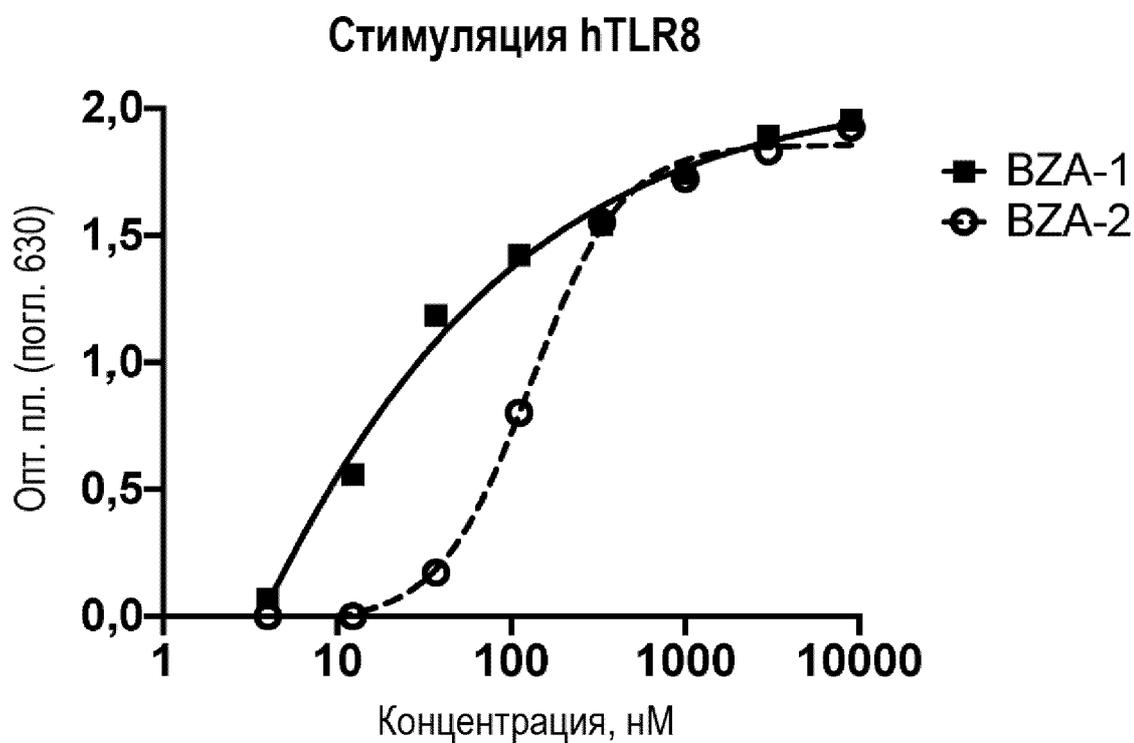
53. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, выбранное из формул Па-d:



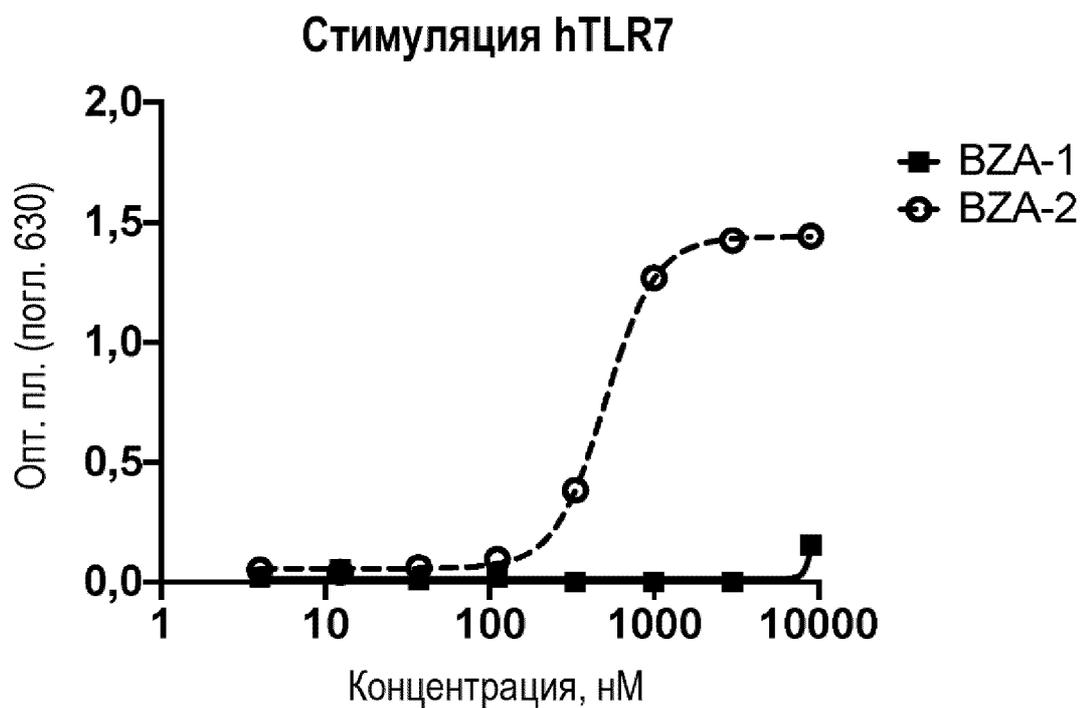
54. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, выбранное из Таблицы 2а.
55. Соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер по п. 29, выбранное из Таблицы 2б.
56. Способ лечения рака, включающий введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата по любому из пп. 1-7 нуждающемуся в этом пациенту.
57. Способ по п. 56, отличающийся тем, что рак чувствителен к провоспалительной реакции, индуцированной агонизмом TLR7 и/или TLR8.
58. Способ по п. 56, отличающийся тем, что рак представляет собой рак, экспрессирующий PD-L1.
59. Способ по п. 56, отличающийся тем, что рак представляет собой рак, экспрессирующий HER2.
60. Способ по п. 56, отличающийся тем, что рак представляет собой рак, экспрессирующий РЭА.
61. Способ по п. 56, отличающийся тем, что рак представляет собой рак, экспрессирующий каприн-1.
62. Способ по любому из пп. 56-61, отличающийся тем, что рак выбирают 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 раковая 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 со сверхэкспрессией HER2.
66. Способ по п. 62, отличающийся тем, что рак представляет собой аденокарциному желудочно-пищеводного перехода.
67. Применение иммуноконъюгата по любому из пп. 1-7 для лечения рака.
68. Способ получения иммуноконъюгата формулы I по п. 1, отличающийся тем, что соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер формулы II по п. 29 конъюгировано с антителом.
69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что соединение 8-амидо-2-аминобензазепин-линкер выбирают из Таблицы 2а или Таблицы 2б.

По доверенности

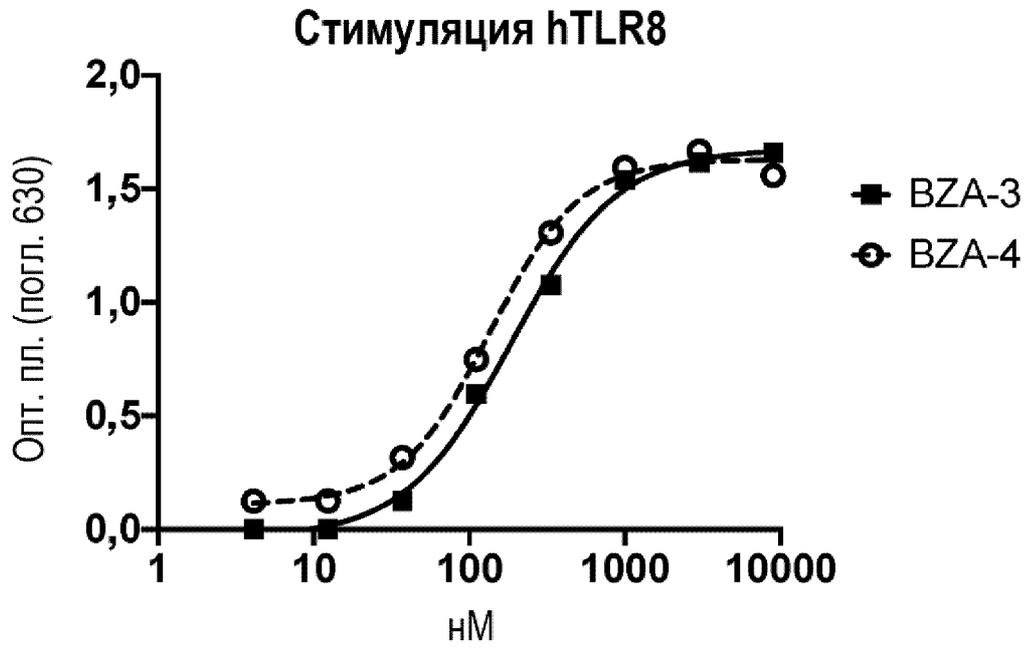
1/5



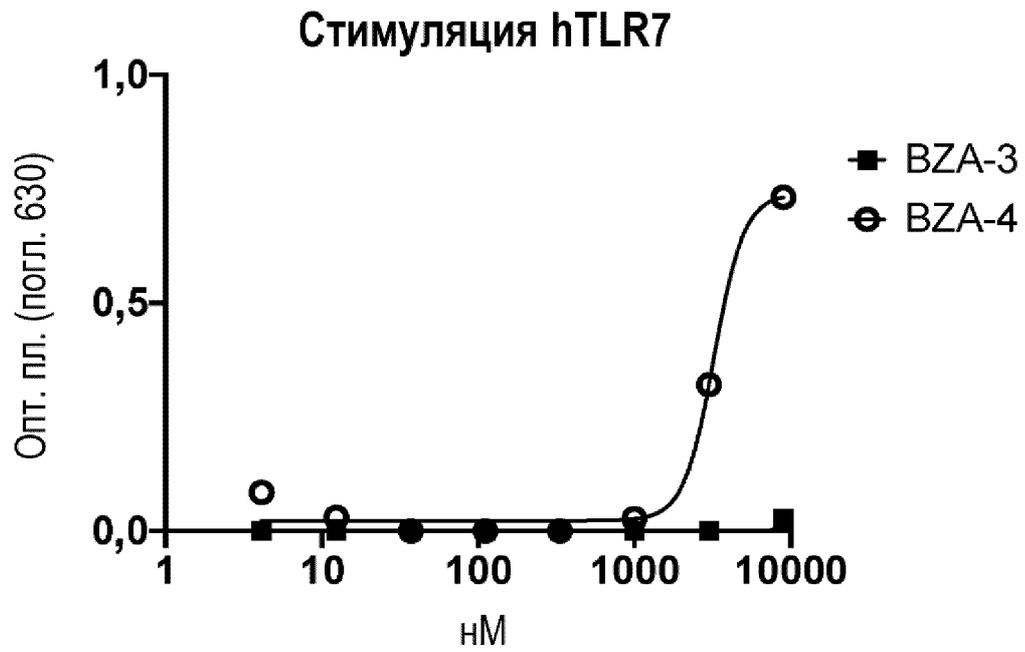
Фиг. 1А



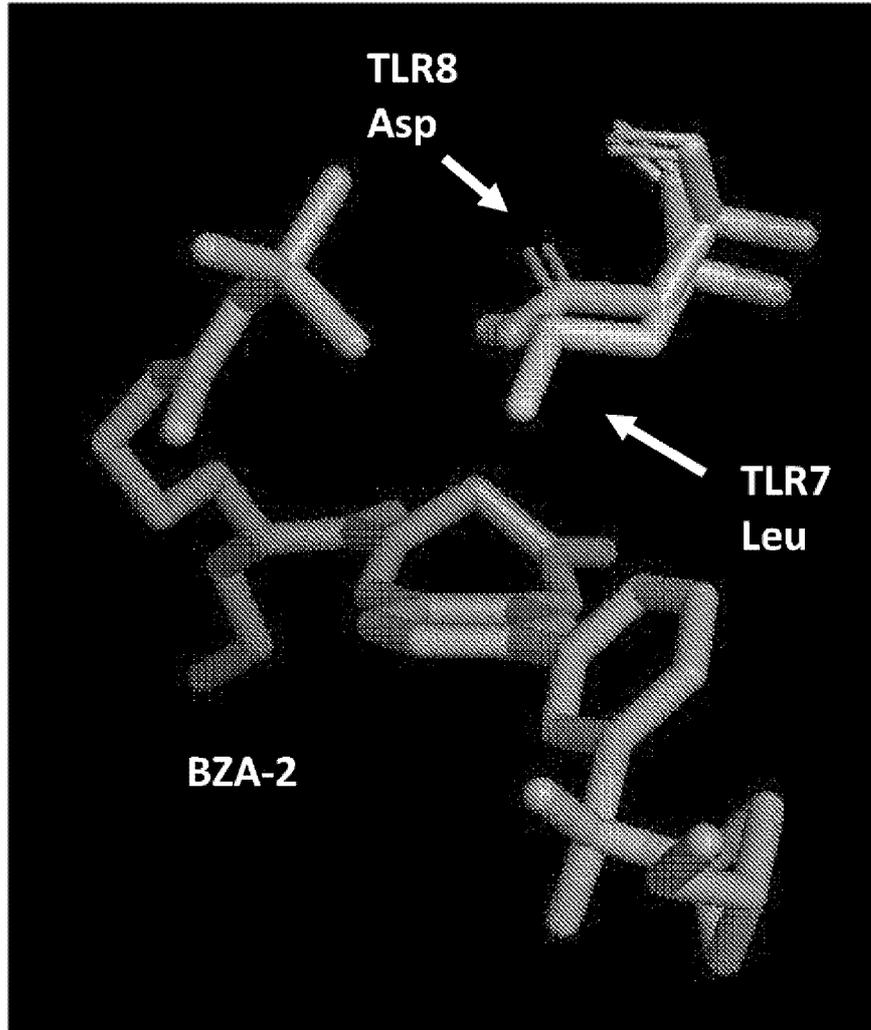
Фиг. 1В



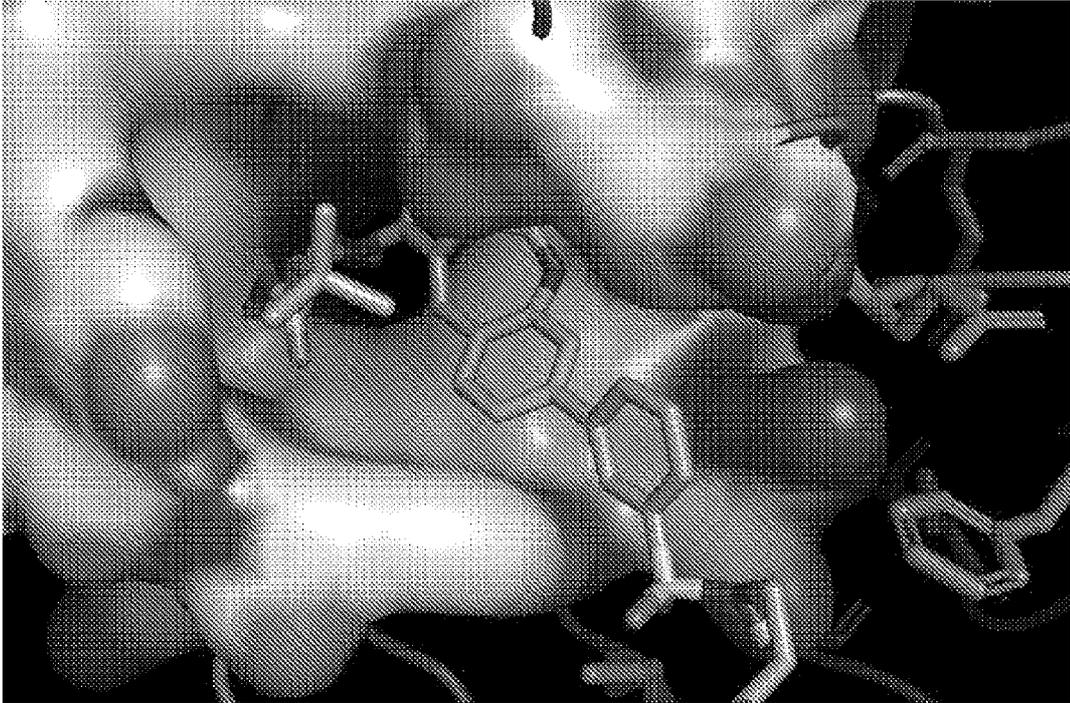
Фиг. 1С



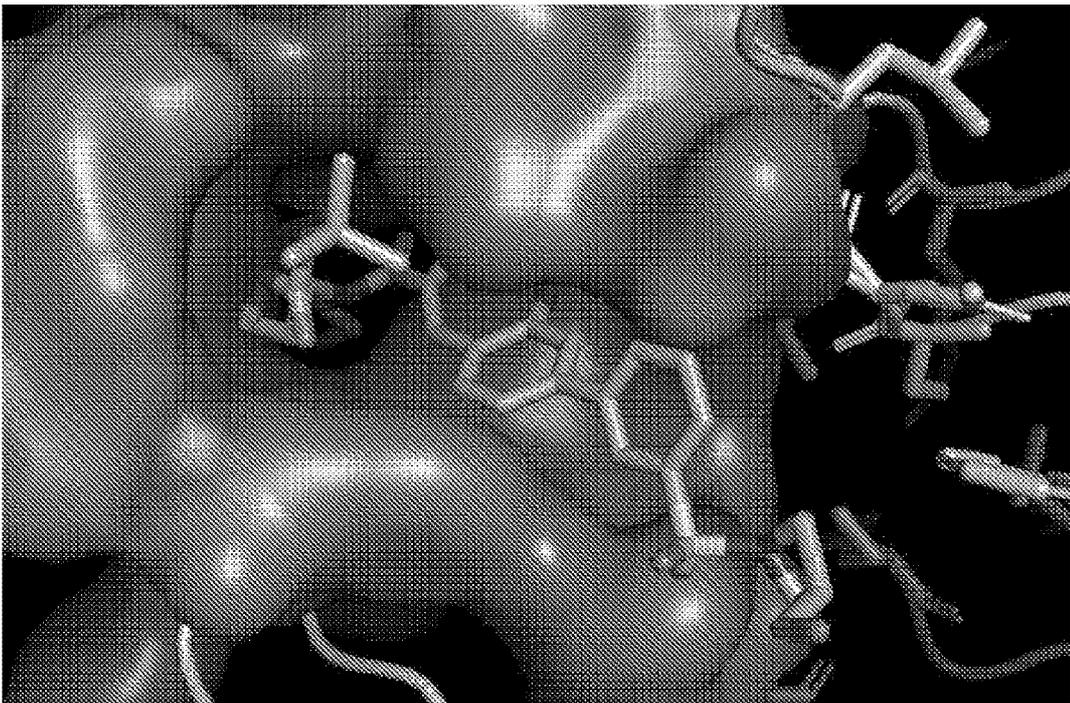
Фиг. 1D



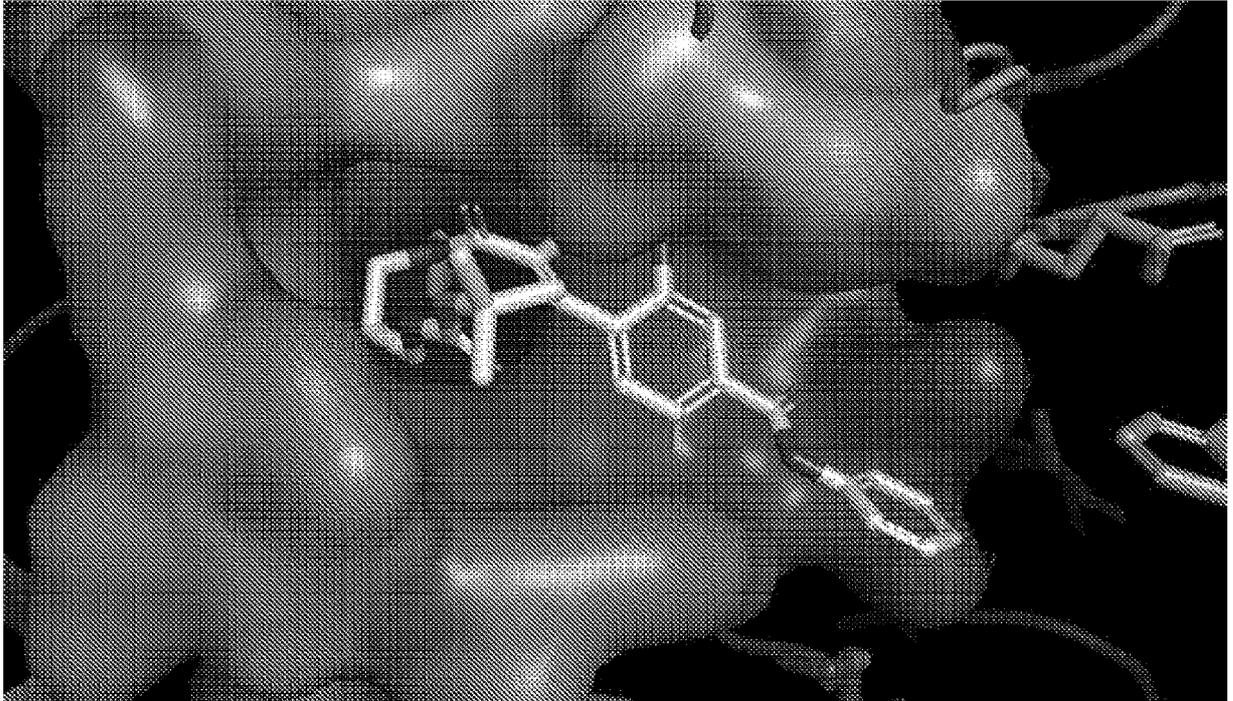
Фиг. 2



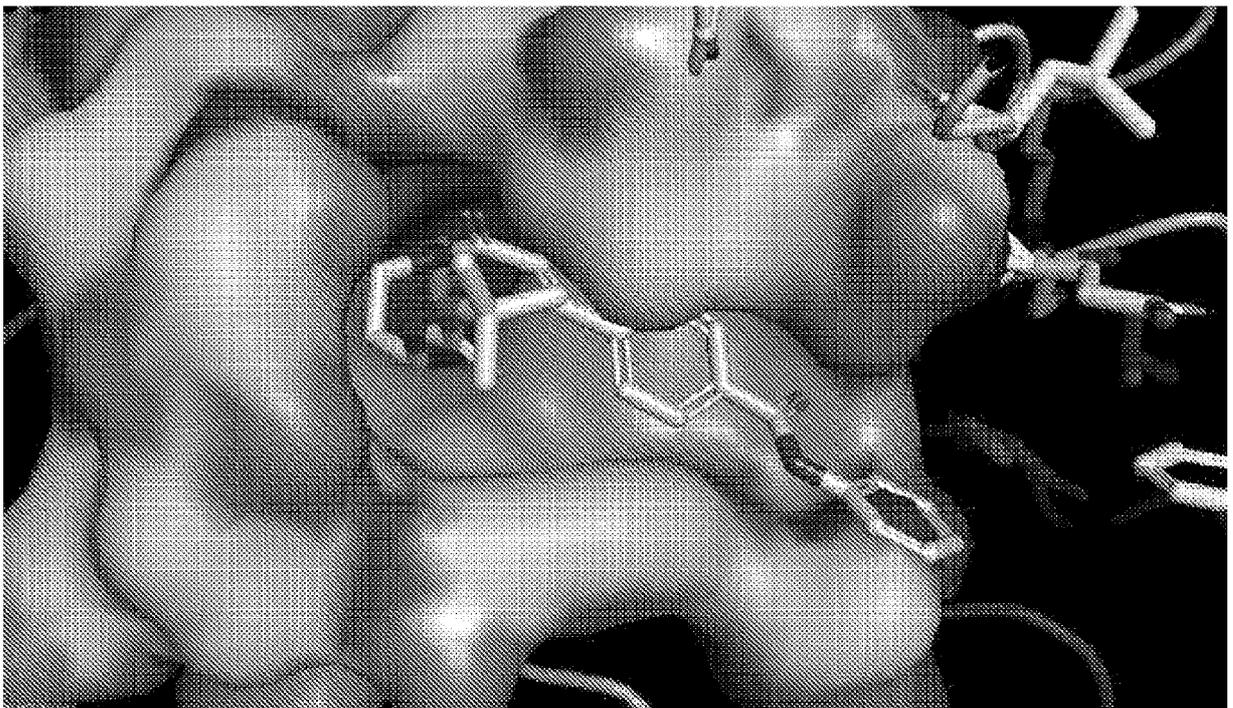
Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 3С



Фиг. 3D