(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290639 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.05

(22) Дата подачи заявки
2020.09.08

(51) Int. Cl. ***A61K 47/68*** (2017.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(31) **62/897,036; 62/941,405; 62/948,143; 62/959,857; 62/966,500; 62/970,491; 62/984,705; 62/988,304; 63/032,488; 63/062,377**

(32) **2019.09.06; 2019.11.27; 2019.12.13; 2020.01.10; 2020.01.27; 2020.02.05; 2020.03.03; 2020.03.11; 2020.05.29; 2020.08.06**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/049772**

(87) **WO 2021/046549 2021.03.11**

(71) Заявитель:
СИДАРА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Борхардт Аллен, Брэди Томас П., Чэнь Чжи-Ян, Лам Тхань, Тари Лесли В. (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Композиции и способы лечения вирусных инфекций включают конъюгаты, содержащие ингибиторы вирусной нейраминидазы (например, занамивир, перамивир или их аналоги), связанные с Fc-мономером, Fc-доменом и Fc-связывающим пептидом, белком альбумином или связывающим альбумин пептидом. В частности, конъюгаты можно применять при лечении вирусных инфекций (например, вирусных инфекций гриппа).

202290639 A1

202290639 A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Уровень техники

Потребность в новых противовирусных препаратах для лечения гриппа является значительной и особенно критичной в области медицины. Вирус гриппа, возбудитель гриппа, является причиной от трех до пяти миллионов случаев тяжелых заболеваний ежегодно и приблизительно 500 000 смертей во всем мире. В то время как большинство людей полностью выздоравливают от гриппа примерно за одну-две недели, у других развиваются опасные для жизни осложнения, такие как пневмония. Таким образом, грипп может быть смертельным, особенно для молодых, пожилых или хронических больных людей. Люди со слабой или ослабленной иммунной системой, такие как люди с запущенной ВИЧ-инфекцией или пациенты, перенесшие трансплантацию, с подавленной иммунной системой для предотвращения отторжения трансплантированного органа, подвергаются большему риску осложнений, связанных с гриппом. Беременные женщины и маленькие дети также подвержены высокому риску осложнений.

Разработка противовирусных препаратов для лечения гриппа остается сложной задачей. Несколько противовирусных средств для лечения гриппа были одобрены для использования в клинической практике, и эти средства играют важную роль в модулировании тяжести заболевания и борьбе с пандемиями в то время, как проводится изготовление вакцин. Однако к наиболее часто используемым ингибиторам появились штаммы, устойчивые к лекарственным средствам.

Противовирусные средства для лечения гриппа в основном нацелены на белки, представленные на поверхности частицы вируса гриппа. Оболочка вируса гриппа содержит два иммунодоминантных гликопротеина, гемагглютинин и нейраминидазу, которые играют ключевую роль в вирусной инфекции и распространении. Гемагглютинин влияет на прикрепление вируса к клетке-хозяину посредством взаимодействия с поверхностными сиаловыми кислотами, тем самым инициируя проникновение. Нейраминидаза представляет собой фермент экзогликозидазу, который отщепляет сиаловые кислоты (концевые остатки нейраминовой кислоты) от гликановых структур на поверхности инфицированных клеток-хозяев, высвобождая потомственные вирусы и позволяя вирусу распространяться от клетки-хозяина к неинфицированным окружающим клеткам. Таким образом, ингибирование нейраминидазы служит фармакологической мишенью для противовирусных препаратов. Были идентифицированы ингибиторы вирусной нейраминидазы, используемые для уменьшения распространения вируса, включая осельтамивир (Тамифлю™), занамивир (Relenza™) и перамивир (Rapivab™).

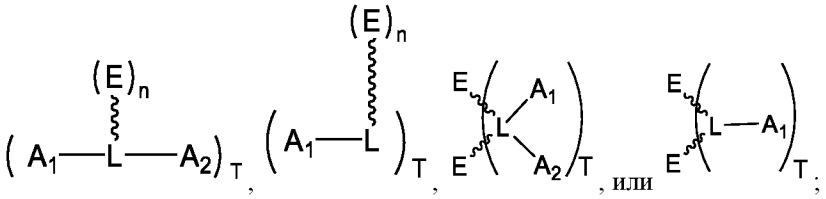
Однако грипп у реципиентов трансплантатов по-прежнему характеризуется длительным выделением вируса, что увеличивает вероятность развития штаммов, устойчивым к лекарственным средствам. Необходимы новые, более эффективные варианты лечения гриппа.

Сущность изобретения

Раскрытие относится к конъюгатам, композициям и способам ингибирования роста вирусов, а также к способам лечения вирусных инфекций. В частности, такие конъюгаты содержат мономеры или димеры фрагмента, который ингибирует нейраминидазу вируса гриппа (например, занамивир, перамивир или их аналоги), конъюгированные с Fc-мономерами, Fc-доменами, Fc-связывающими пептидами, белками альбумина или связывающими белок альбумин пептидами. Ингибитор нейраминидазы (например, занамивир, перамивир или их аналоги) в конъюгатах нацеливается на нейраминидазу на поверхности вирусной частицы. Fc-мономеры или Fc-домены в конъюгатах связываются с FcγR (например, FcRn, FcγRI,

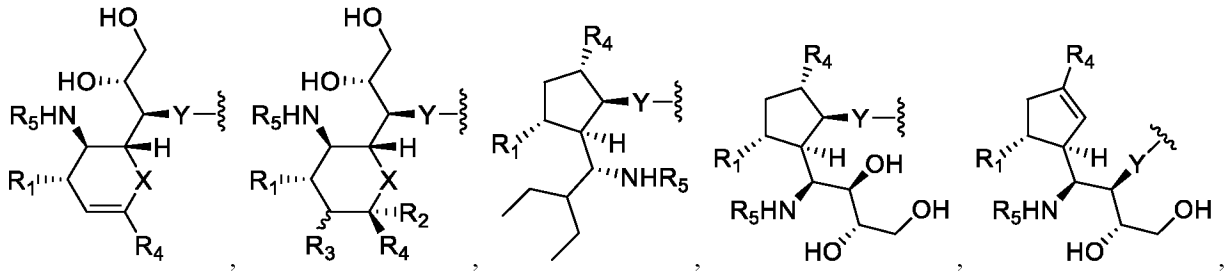
FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb) на иммунных клетках, например, нейтрофилах, для активации фагоцитоза и эффекторных функций, таких как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), что приводит к поглощению и разрушению вирусных частиц иммунными клетками и дальнейшему усилению противовирусной активности конъюгатов. Альбумин или связывающий альбумин пептид может увеличивать период полувыведения конъюгата, например, за счет связывания альбумина с рециркулирующим неонатальным Fc-рецептором. Такие композиции применимы в способах ингибирования роста вирусов и в способах лечения вирусных инфекций, таких как инфекции, вызываемые вирусом гриппа A, вирусом гриппа B и вирусом гриппа C.

В первом аспекте изобретение относится к конъюгату, описанному любой из формул (D-I), (M-I), (1) или (2):

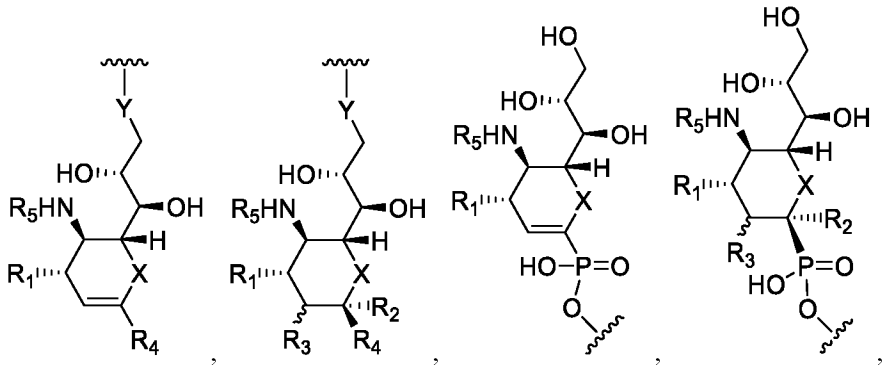


(D-I) (M-I) (1) (2)

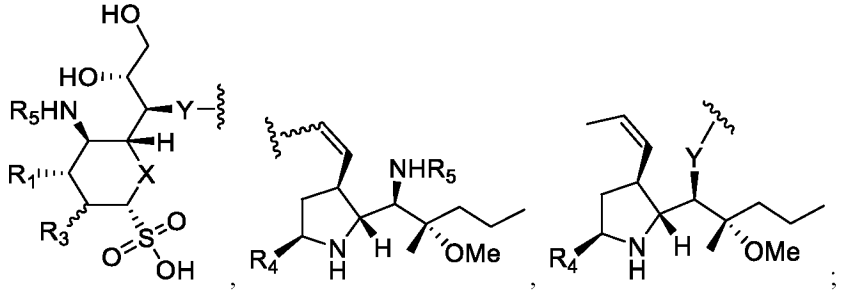
где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII):



(A-I) (A-II) (A-III) (A-IV) (A-V)

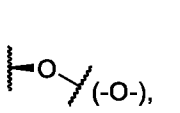
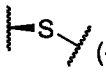


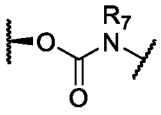
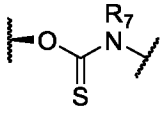
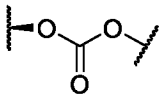
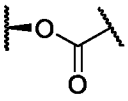
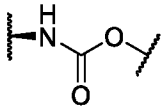
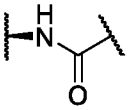
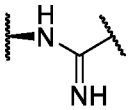
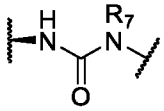
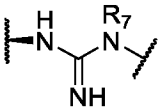
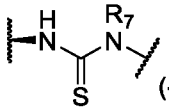
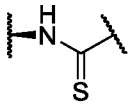
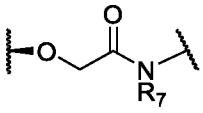
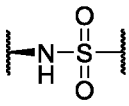
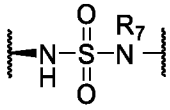
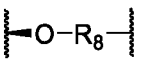
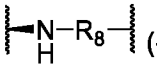
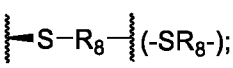
(A-VI) (A-VII) (A-VIII) (A-IX)

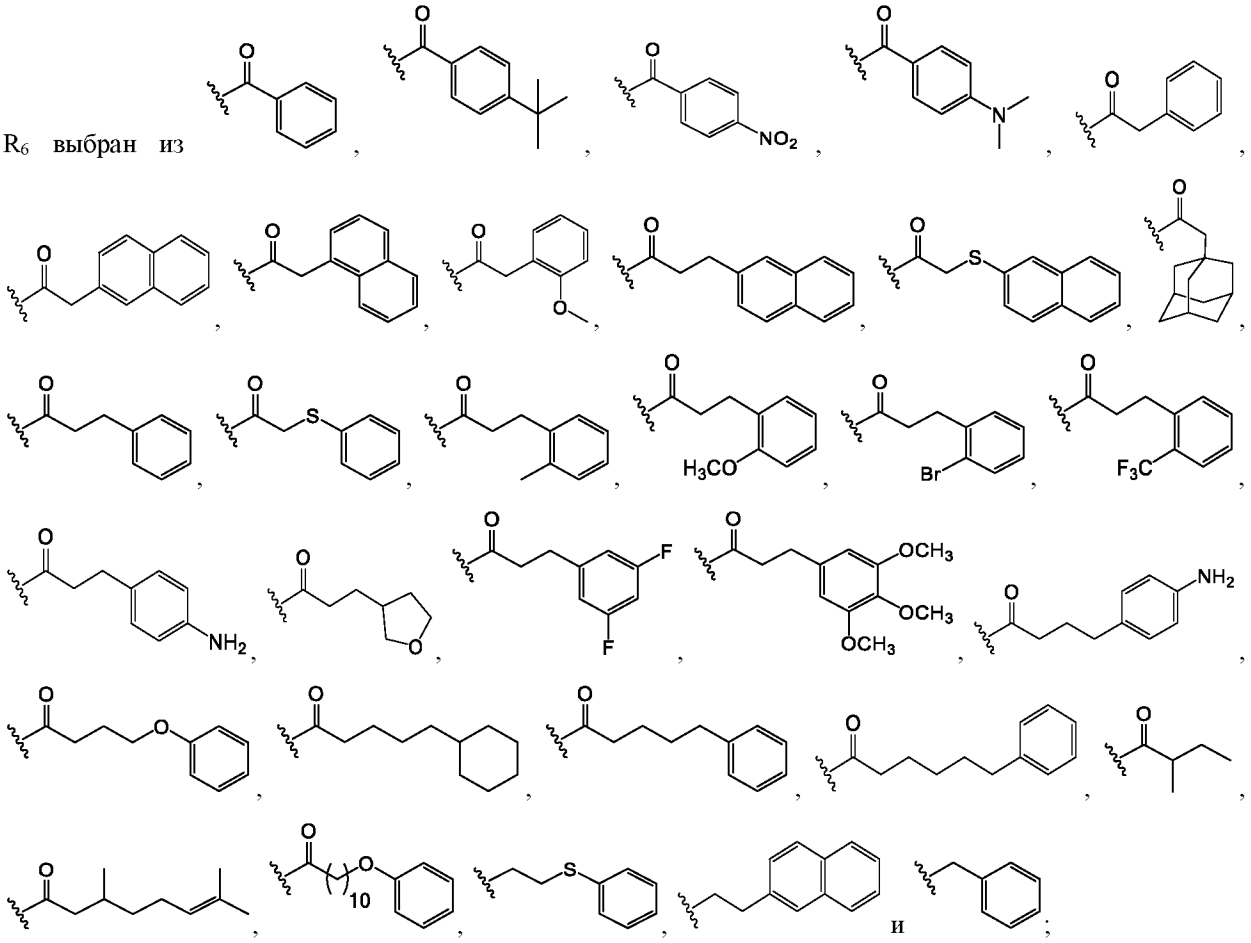


(A-X) (A-XI) (A-XII)

где R_1 выбран из -OH, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$ и $-NHC(=NH)NHR_6$; R_2 и R_3, каждый независимо, выбран из -H, -OH, -F, -Cl и -Br; R_4 выбран из $-CO_2H$, $-P(=O)(OH)_2$, $-SO_3H$; R_5 выбран из $-COCH_3$, $-COCF_3$, $-SO_2CH_3$; X выбран из -O- и -S-; Y выбран из


(-O-),

(-S-),

($-NR_7$-),

($-O(C=O)NR_7$-),

($-O(C=S)NR_7$-),

($-O(C=O)O$-),

($-O(C=O)$-),

($-NH(C=O)O$-),

($-NH(C=O)$-),

($-NH(C=NH)$-),

($-NH(C=O)NR_7$-),

($-NH(C=NH)NR_7$-),

($-NH(C=S)NR_7$-),

($-NH(C=S)$-),

($-OCH_2(C=O)NR_7$-),

($-NH(SO_2)$-),

($-NH(SO_2)NR_7$-),

($-OR_8$-),

($-NR_8$-), и

($-SR_8$-);

R_6 выбран из

;

R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-

C15 гетероарила; R_8 выбран из C3-C20 гетероциклоалкила, C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

n равно 1 или 2;

каждый E содержит мономер Fc-домена, белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид;

L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к E и к каждому Y каждого A_1 или каждого A_1 и A_2;

T является целым числом от 1 до 20, и

каждая волнистая линия в формулах (D-I), (M-I), (1) или (2) указывает, что L ковалентно присоединен к каждому E;

или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления n равен 1, и каждый E включает мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), пептид, связывающий белок альбумин, или пептид, связывающий Fc;

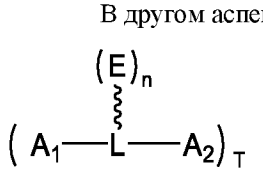
В некоторых вариантах осуществления n равен 2, и каждый E включает мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), где мономеры домена Fc димеризуются с образованием домена Fc;

L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к каждому E и к каждому Y или к каждому A_1 и/или A_2;

T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), и каждая волнистая линия в формулах (D-I), (M-I), (1) или (2) указывает на то, что L ковалентно присоединен (например, посредством ковалентной связи или линкера) к каждому E; или его фармацевтически приемлемой соли. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L или каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L или A_1-L-A_2, описанных в данном документе).

В предпочтительных вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, n равно 2, и каждый E включает мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138). В конъюгате, содержащем два мономера домена Fc (например, конъюгате формулы (1), формулы (2), формулы (D-I), где n равно 2, или (M-I), где n равно 2), мономеры домена Fc димеризуются с образованием домен Fc.

В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (D-I):

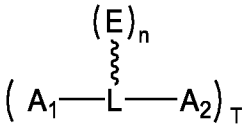


(D-I)

где каждый E включает мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138); L в каждом A_1-L-A_2 представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к атому серы шарнирного цистеина в E и к каждому из A_1 и A_2; n равно 1 или 2 (например, когда n равно 2, два мономера домена Fc димеризуются с образованием домена Fc); T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что каждый A_1-L-A_2 ковалентно присоединен (например, посредством ковалентной связи или линкера) к атому серы шарнирного цистеина в E, или его фармацевтически приемлемой соли. Когда T

больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе).

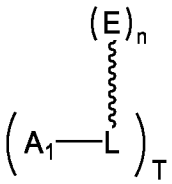
В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (D-I):



(D-I)

где каждый E включает мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138); L в каждом A_1- L-A_2 представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к атому азота экспонированного на поверхности цистеина в E и к каждому из A_1 и A_2; n равно 1 или 2 (например, когда n равно 2, два мономера домена Fc димеризуются с образованием домена Fc); T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что каждый A_1-L-A_2 ковалентно присоединен (например, посредством ковалентной связи или линкера) к атому азота экспонированного на поверхности лизина в E, или его фармацевтически приемлемой соли. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI) или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из формулы (A-I).

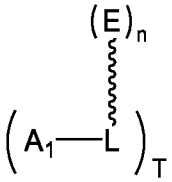
В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (M-I):



(M-I)

где каждый E включает мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138); L в каждом L-A_1 представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к атому серы шарнирного цистеина в E и к A_1; n равно 1 или 2 (например, когда n равно 2, два мономера домена Fc димеризуются с образованием домена Fc); T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что каждый L-A_1 ковалентно присоединен (например, посредством ковалентной связи или линкера) к атому серы шарнирного цистеина в E, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), каждый A_1 может быть независимо выбран из любой структуры, описанной формулой (A-I)-(A-XII). В некоторых вариантах осуществления каждый A_1 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый A_1 может быть независимо выбран из формулы (A-I).

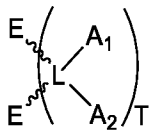
В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (M-I):



(M-I)

где каждый E включает мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138); L в каждом L-A_1 представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к атому азота экспонированного на поверхности цистеина в E и к каждому из A_1; n равно 1 или 2 (например, когда n равно 2, два мономера домена Fc димеризуются с образованием домена Fc); T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что каждый L-A_1 ковалентно присоединен (например, посредством ковалентной связи или линкера) к атому азота экспонированного на поверхности лизина в E, или его фармацевтически приемлемой соли. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), каждый A_1 может быть независимо выбран из любой структуры, описанной формулой (A-I)-(A-XII). В некоторых вариантах осуществления каждый A_1 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый A_1 может быть независимо выбран из формулы (A-I).

В одном аспекте в раскрытии представлен конъюгат, описанный формулой (1):

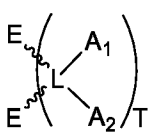


(1)

где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII);

каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138); L в каждом A_1-L-A_2 представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к атому серы шарнирного цистеина в каждом E и к каждому из A_1 и A_2; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а две волнистые линии, соединенные с двумя буквами E, указывают на то, что каждый A_1-L-A_2 ковалентно присоединен (например, посредством ковалентной связи или линкера) к паре атомов серы двух шарнирных цистеинов в двух E, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI) или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из формулы (A-I).

В другом аспекте в раскрытии представлен конъюгат, описанный формулой (1):

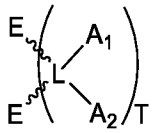


(1)

где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-V); каждый E содержит мономер

домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138); L в каждом A_1-L-A_2 представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к атому серы шарнирного цистеина в каждом E и к каждому из A_1 и A_2; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а две волнистые линии, соединенные с двумя буквами E, указывают на то, что каждый A_1-L-A_2 ковалентно присоединен (например, посредством ковалентной связи или линкера) к паре атомов серы двух шарнирных цистеинов в двух E, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе).

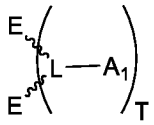
В другом аспекте в раскрытии представлен конъюгат, описанный формулой (1):



(1)

где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-VI)-(A-IX);
каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138); L в каждом A_1-L-A_2 представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к атому серы шарнирного цистеина в каждом E и к каждому из A_1 и A_2; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а две волнистые линии, соединенные с двумя буквами E, указывают на то, что каждый A_1-L-A_2 ковалентно присоединен (например, посредством ковалентной связи или линкера) к паре атомов серы двух шарнирных цистеинов в двух E, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе).

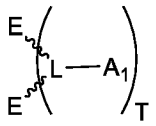
В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (2):



(2)

где каждый A_1 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII); каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138); L в каждом L-A_1 представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к атому серы в шарнирном цистеине в E и к A_1; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а две волнистые линии, соединенные с двумя атомами серы, указывают на то, что каждый L-A_1 ковалентно (например, посредством ковалентной связи или линкера) связан с парой атомов серы двух шарнирных цистеинов в двух E, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), каждый A_1 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII). В некоторых вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI) или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из формулы (A-I).

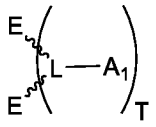
В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (2):



(2)

где каждый A_1 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-V); каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138); L в каждом L-A_1 представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к атому серы в шарнирном цистеине в E и к A_1; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а две волнистые линии, соединенные с двумя атомами серы, указывают на то, что каждый L-A_1 ковалентно связан (например, посредством ковалентной связи или линкера) с парой атомов серы двух шарнирных цистеинов в двух E, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), каждый A_1 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-V).

В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (2):



(2)

где каждый A_1 независимо выбран из любой из формул (A-VI)-(A-IX); каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138); L в каждом L-A_1 представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к атому серы в шарнирном цистеине в E и к A_1; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а две волнистые линии, соединенные с двумя атомами серы, указывают на то, что каждый L-A_1 ковалентно связан (например, посредством ковалентной связи или линкера) с парой атомов серы двух шарнирных цистеинов в двух E, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), каждый A_1 может быть независимо выбран из любой из формул (A-VI)-(A-IX).

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеупомянутых вариантов осуществления каждый E включает мономер Fc-домена, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из пары атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) цистеина шарнирной области SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, т.е., Cys10, Cys13, Cys16, или Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления пара атомов серы представляет собой атомы серы, соответствующие (например, атомам серы) Cys10 и Cys13 в SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, Cys10 и Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, Cys 30 и Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, Cys13 и Cys 36 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, Cys13 и Cys 38 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, и/или Cys 36 и Cys 38 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, пара атомов серы представляет собой (например, атомы серы, соответствующие) Cys10 и Cys13 в SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или Cys 36 и Cys 38 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления пара атомов серы включает один атом серы цистеина из каждого E, т.е. L-A вместе с атомами серы, к которым он присоединен, образует мостик между двумя Fc-

доменами (например, двумя Fc-доменами, содержащими последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 в SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E.

В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E.

В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E.

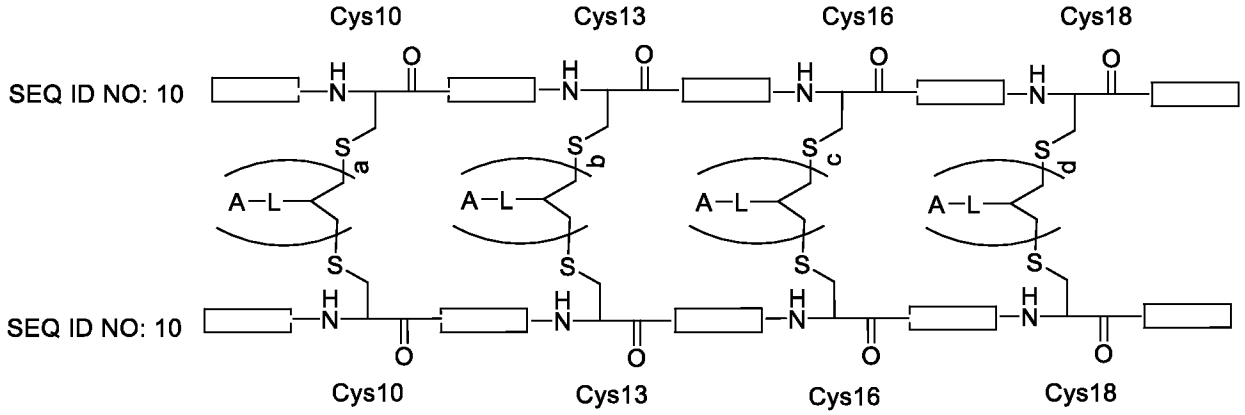
В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом

серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E.

В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 3, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 3, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 3, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 3, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E.

В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 3, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys16 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys18 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 из другого E.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру:



где каждое из a, b, c и d, независимо, равно 0 или 1 и где, в случае, когда a, b, c или d равно 0, два атома серы образуют дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления a равно 1, b, c и d равны 0. В некоторых вариантах осуществления a и b равны 1, c и d равны 0. В в некоторых вариантах осуществления a и c равны 1, b и d равны 0. В некоторых вариантах осуществления a и d равны 1, b и c равны 0. В некоторых вариантах осуществления a, b и c равны 1, d равно 0. В некоторых вариантах осуществления a, b и d равны 1, c равно 0. В некоторых вариантах осуществления a, c и d равны 1, b равно 0. В некоторых вариантах осуществления b и c равны 1, a и d равны 0. В некоторых вариантах осуществления b и d равны 1, a и c равны 0. В вариантах осуществления b, c и d равны 1, a равно 0. В некоторых вариантах осуществления c и d равны 1, a и b равны 0. В некоторых вариантах осуществления a, b, c и d равны 1.

В некоторых вариантах осуществления каждый E содержит последовательность MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4).

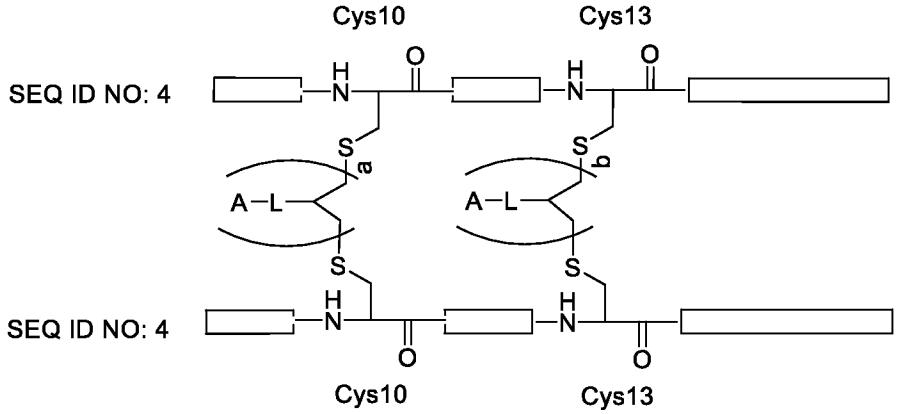
В некоторых вариантах осуществления каждый E содержит последовательность MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 33).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из пары атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) цистеина шарнирной области SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33, т.е., Cys10 и/или Cys13. В некоторых вариантах осуществления пара атомов серы представляет собой атомы серы, соответствующие (например, атомам серы) Cys10 и Cys13 в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления пара атомов серы включает один атом серы цистеина из каждого E, т.е. L-A вместе с атомами серы, к которым он присоединен, образует мостик между двумя Fc-доменами (например, двумя Fc-доменами, содержащими последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33 из одного E, и атом серы, соответствующий (например,

атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 33 из другого E.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру:

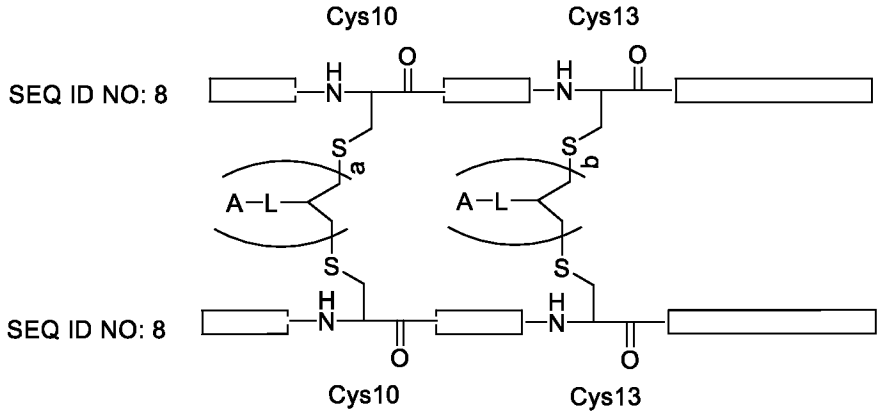


где каждое из a и b, независимо, равно 0 или 1 и где, в случае, когда a или b равно 0, два атома серы образуют дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления a равно 1 и b равно 0. В некоторых вариантах осуществления a равно 0 и b равно 1. В некоторых вариантах осуществления a и b равны 1.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из пары атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) цистеина шарнирной области SEQ ID NO: 8, т.е., Cys10 и/или Cys13. В некоторых вариантах осуществления пара атомов серы представляет собой атомы серы, соответствующие (например, атомам серы) Cys10 и Cys13 в SEQ ID NO: 8.

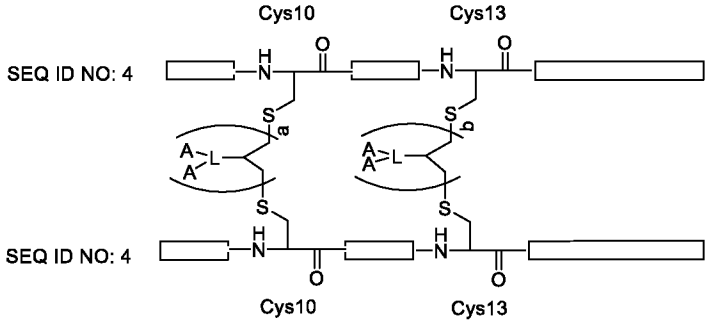
В некоторых вариантах осуществления пара атомов серы включает один атом серы цистеина из каждого E, т.е. L-A вместе с атомами серы, к которым он присоединен, образует мостик между двумя Fc-доменами (например, двумя Fc-доменами, содержащими последовательность SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 в SEQ ID NO: 8 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 8 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 8 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 8 из другого E. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, пара атомов серы представляет собой атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 8 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys10 SEQ ID NO: 8 из другого E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 8 из одного E, и атом серы, соответствующий (например, атому серы) Cys13 SEQ ID NO: 8 из другого E.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру:



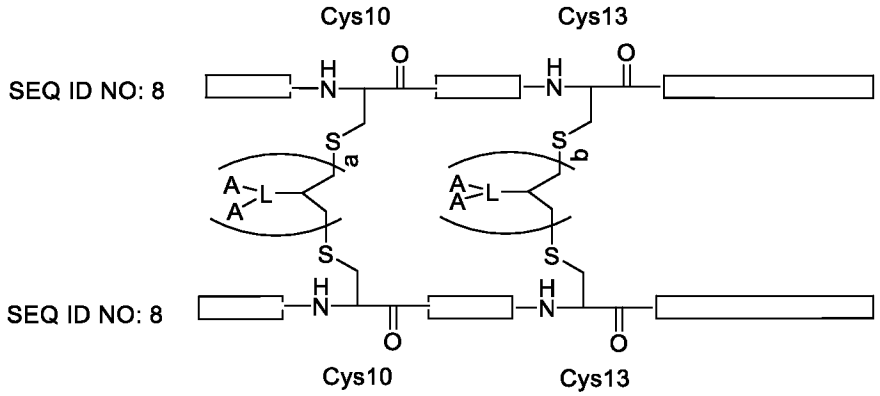
где каждое из a и b, независимо, равно 0 или 1 и где, в случае, когда a или b равно 0, два атома серы образуют дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления a равно 1 и b равно 0. В некоторых вариантах осуществления a равно 0 и b равно 1. В некоторых вариантах осуществления a и b равны 1.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру:



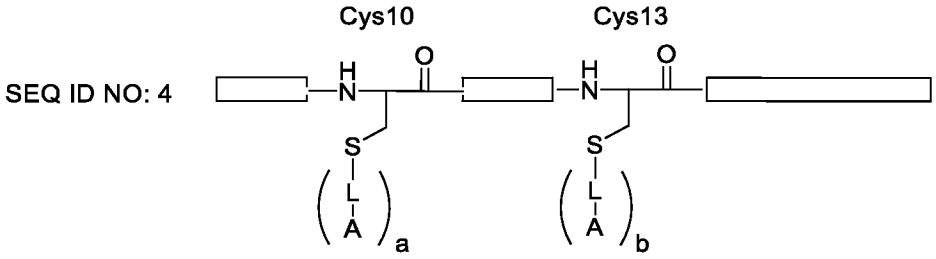
где каждое из a и b, независимо, равно 0 или 1 и где, в случае, когда a или b равно 0, два атома серы образуют дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления a равно 1 и b равно 0. В некоторых вариантах осуществления a равно 0 и b равно 1. В некоторых вариантах осуществления a и b равны 1.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру:



где каждое из a и b, независимо, равно 0 или 1 и где, в случае, когда a или b равно 0, два атома серы образуют дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления a равно 1 и b равно 0. В некоторых вариантах осуществления a равно 0 и b равно 1. В некоторых вариантах осуществления a и b равны 1.

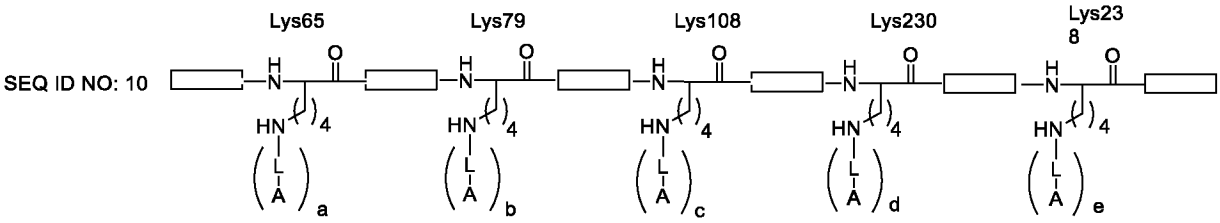
В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру:



где каждое из a и b, независимо, равно 0 или 1 и где, в случае, когда a или b равно 0, атомы серы представляют собой тиол. В некоторых вариантах осуществления a равно 1 и b равно 0. В некоторых вариантах осуществления a равно 0 и b равно 1. В некоторых вариантах осуществления a и b равны 1.

В некоторых вариантах осуществления предыдущих трех аспектов атом азота представляет собой азот доступного на поверхности лизина, например, атом азота, соответствующий (например, атому азота) Lys35, Lys63, Lys77, Lys79, Lys106, Lys123, Lys129, Lys181, Lys203, Lys228 или Lys236 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления атом азота представляет собой атом азота, соответствующий (например, атому азота) Lys65, Lys79, Lys108, Lys230 и/или Lys238 SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11.

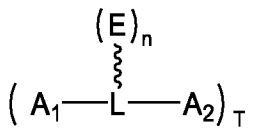
В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру:



где каждый из a, b, c, d и e, независимо, равно 0 или 1, и где, в случае, когда a, b, c, d или e равно 0, два атома азота представляют собой NH_2. В некоторых вариантах осуществления a равно 1, b, c, d и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления b равно 1, a, c, d и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления c равно 1, a, b, d и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления d равно 1, a, b, c и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления e равно 1, a, b, c и d равны 0. В некоторых вариантах осуществления a и b равны 1, c, d и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления a и c равны 1, b, d, и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления a и d равны 1, b, c, и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления a и e равны 1, b, c, и d равны 0. В некоторых вариантах осуществления b и c равны 1, a, d, и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления b и d равны 1, a, c, и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления b и e равны 1, a, c, и d равны 0. В некоторых вариантах осуществления c и d равны 1, a, b, и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления c и e равны 1, a, b, и d равны 0. В некоторых вариантах осуществления d и e равны 1, a, b, и c равны 0. В некоторых вариантах осуществления a, b, и c равны 1, d и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления a, b, и d равны 1, c и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления a, b, и e равны 1, c и d равны 0. В некоторых вариантах осуществления a, c, и d равны 1, b и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления a, c, и e равны 1, b и d равны 0. В некоторых вариантах осуществления a, d, и e равны 1, b и c равны 0. В некоторых вариантах осуществления b, c, и d равны 1, a и e равны 0. В некоторых вариантах осуществления b, d, и e равны 1, a и c равны 0. В некоторых вариантах осуществления c, d, и e равны 1, a и b равны 0.

В некоторых вариантах осуществления любого из конъюгатов, описанных в данном документе, конъюгат образует гомодимер, включающий Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления конъюгатов, описанных в данном документе, E гомодимеризуется с другим E с образованием Fc-домена.

В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный (D-I):

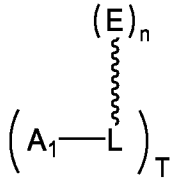


(D-I)

где E включает белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид; L в каждом A_1-L-A_2 представляет собой линкер, независимо ковалентно связанный с атомом серы доступного на поверхности цистеина или с атомом азота доступного на поверхности лизина в E и с каждым из A_1 и A_2; n равно 1; T является целым числом от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а волнистая линия, соединенная с E, и каждый A_1-L-A_2 независимо ковалентно присоединен к атому серы цистеина, подвергнутому воздействию растворителя, или атому азота, подвергнутому действию растворителя лизина в E или его фармацевтически приемлемой соли. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI) или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из формулы (A-I).

В предпочтительном варианте осуществления вышеизложенного x равно 2.

В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (M-I):



(M-I)

где E включает белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид; L в каждом L-A_1 представляет собой линкер, независимо ковалентно связанный с атомом серы доступного на поверхности цистеина или с атомом азота доступного на поверхности лизина в E и с A_1; n равно 1; T является целым числом от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), а волнистая линия, соединенная с E, и каждый L-A_1 независимо ковалентно присоединен к атому серы цистеина, подвергнутому воздействию растворителя, или атому азота, подвергнутому действию растворителя лизина в E или его фармацевтически приемлемой соли. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), каждый A_1 может быть независимо выбран из любой структуры, описанной формулой (A-I)-(A-XII). В некоторых вариантах осуществления каждый A_1 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый A_1 может быть независимо выбран из формулы (A-I). В предпочтительном варианте осуществления вышеизложенного x равно 2.

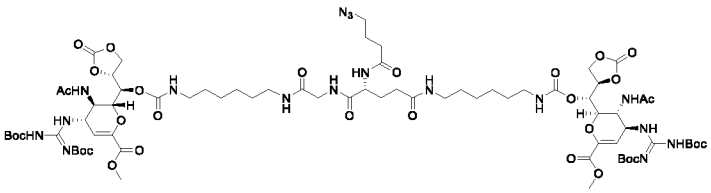
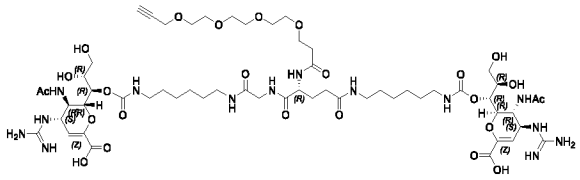
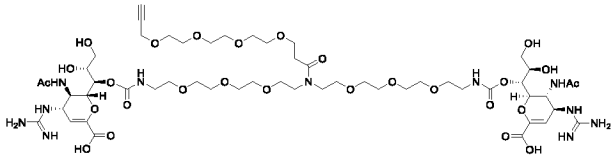
В некоторых вариантах осуществления каждый E включает белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141.

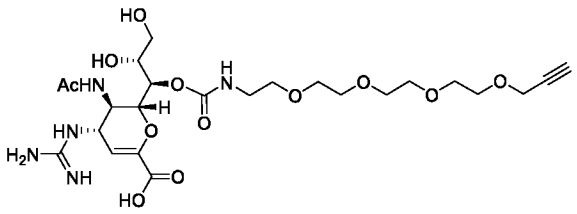
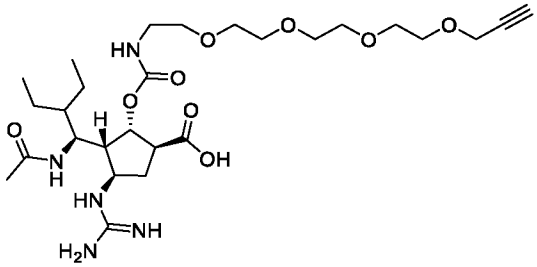
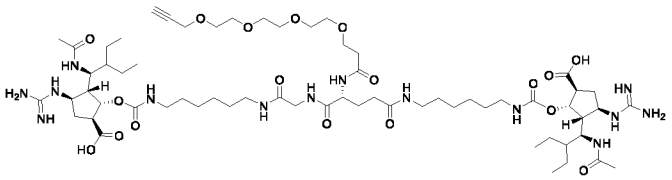
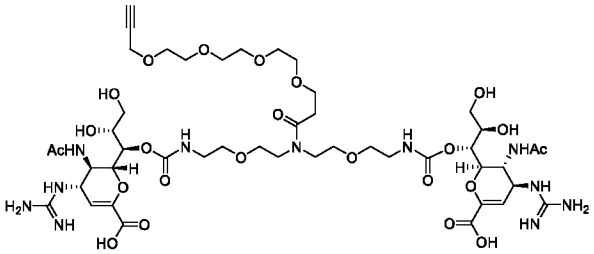
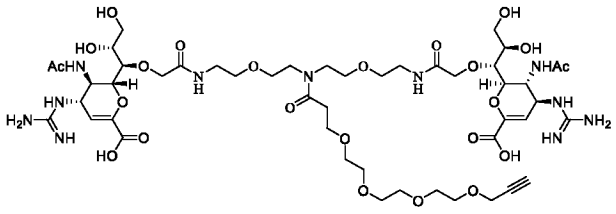
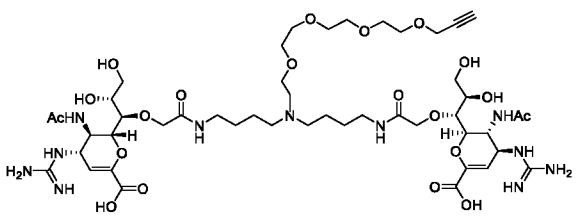
В некоторых вариантах осуществления T равно 1, и L-A_1 ковалентно присоединен к атому серы,

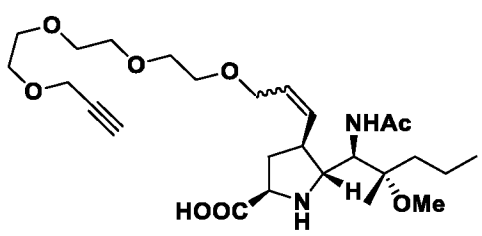
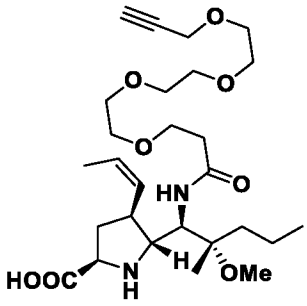
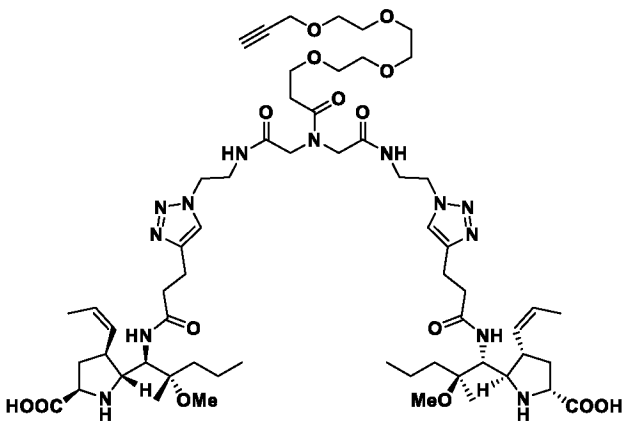
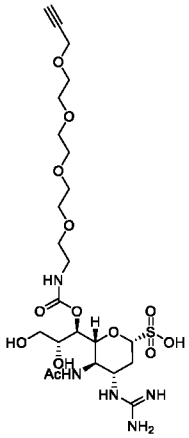
соответствующему Cys34 в SEQ ID NO: 139.

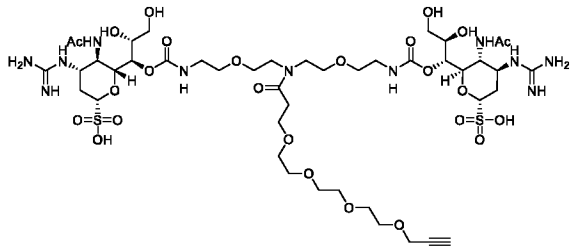
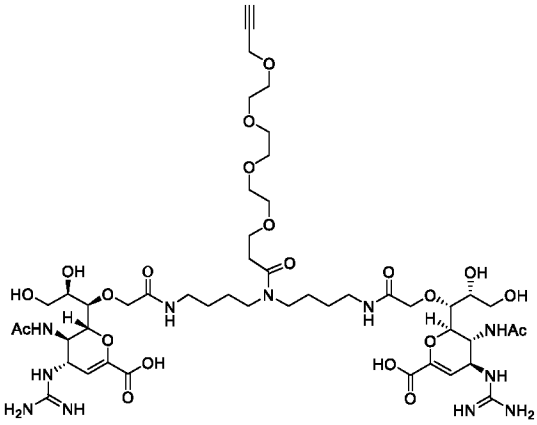
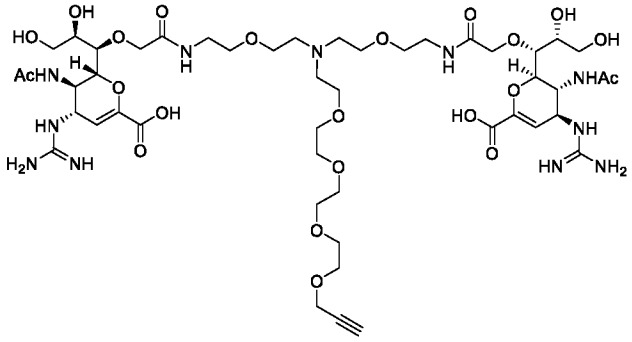
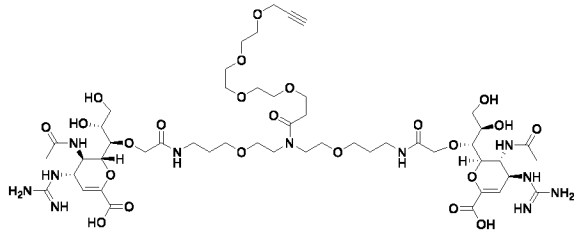
Промежуточные соединения из таблицы 1а могут быть конъюгированы с Fc-доменом или мономером Fc-домена (например, посредством линкера) любыми подходящими способами, известными специалистам в данной области, включая любой из способов, описанных или представленных в качестве примера в данном документе. В некоторых вариантах осуществления конъюгат (например, конъюгат, описанный любой из формул (1), (2), (D-I)-(D-XI) или (M-I)-(M-XI)) включает E, где E представляет собой мономер домена Fc или домен Fc (например, мономер домена Fc или домен Fc, причем каждый мономер домена Fc независимо имеет последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138). В предпочтительных вариантах осуществления один или более атомов азота одного или более экспонированных на поверхности остатков лизина E или один или более атомов серы одного или более экспонированных на поверхности цистеинов в E ковалентно конъюгированы с линкером (например, $ПЭГ_2$-$ПЭГ_{20}$ линкером). Линкер, конъюгированный с E, может быть функционализирован таким образом, что он может вступать в реакцию с образованием ковалентной связи с любым из Int, описанных в данном документе (например, Int таблицы 1а). В предпочтительных вариантах осуществления E конъюгирован с линкером, функционализированным азидогруппой, а Int (например, Int таблицы 1а) функционализирован алкиновой группой. Конъюгирование (например, посредством клик-химии) линкер-азидо E и линкер-алкин Int образует конъюгат по изобретению, например, конъюгат, описанный формулой (5). В других вариантах осуществления E конъюгирован с линкером, функционализированным алкиновой группой, а Int (например, Int таблицы 1а) функционализирован азидогруппой. Конъюгация (например, с помощью клик-химии; см., например, Фиг. 103) линкер-алкин E и линкер-азидо форм ПС образуют конъюгат по изобретению, например, конъюгат, описываемый любой из формул (1), (2), (D-I)-(D-XI), или (M-I)-(M-XI).

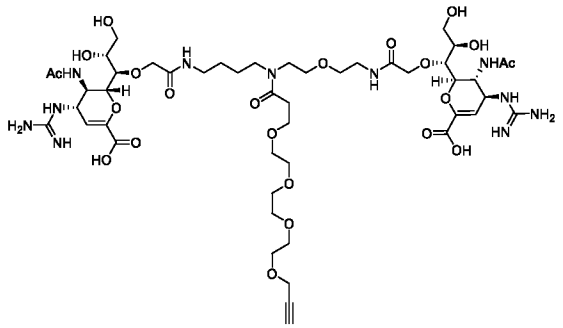
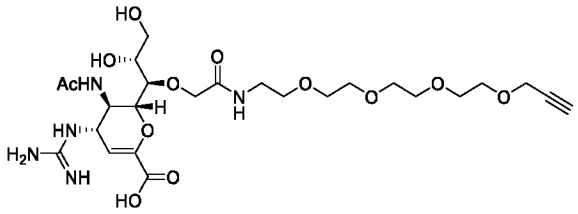
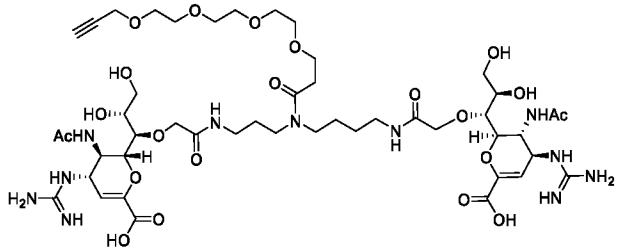
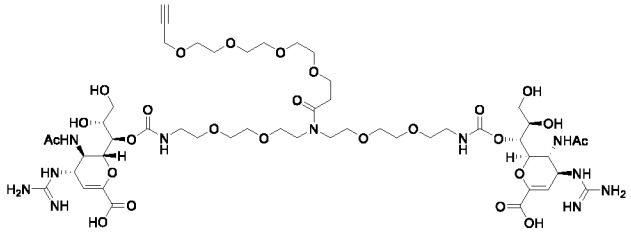
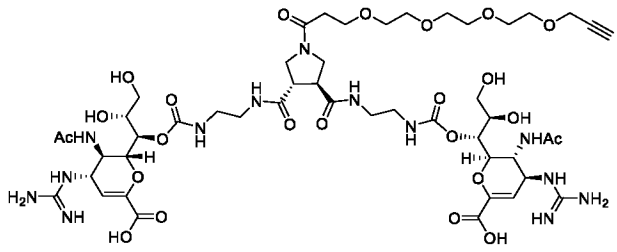
Таблица 1а: Промежуточные соединения

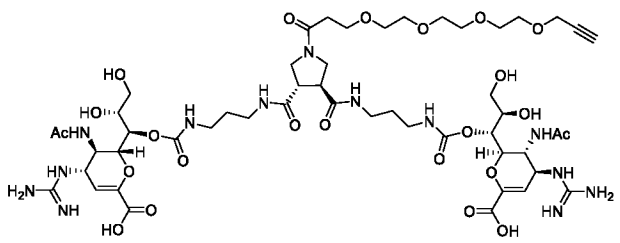
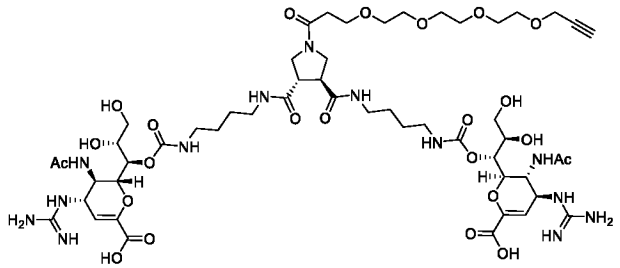
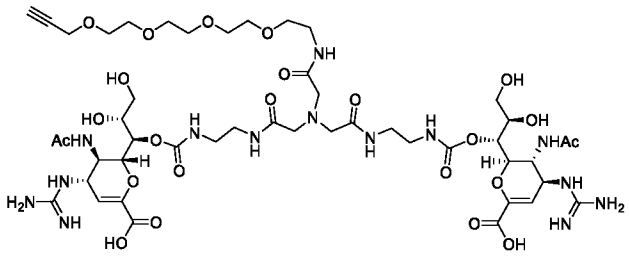
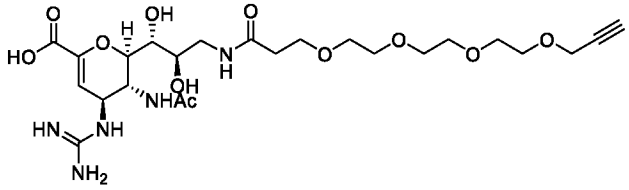
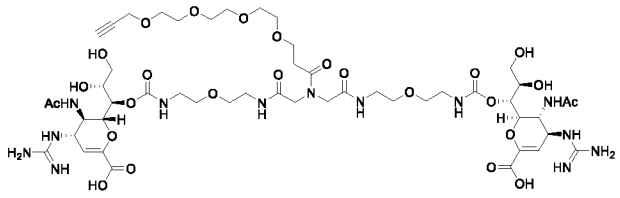
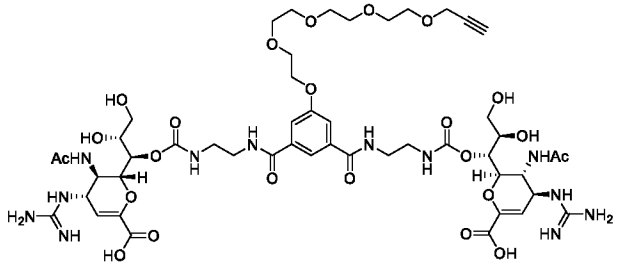
Промежуточное соединение	**Структура**
ПС 1	
ПС 2	
ПС 3	

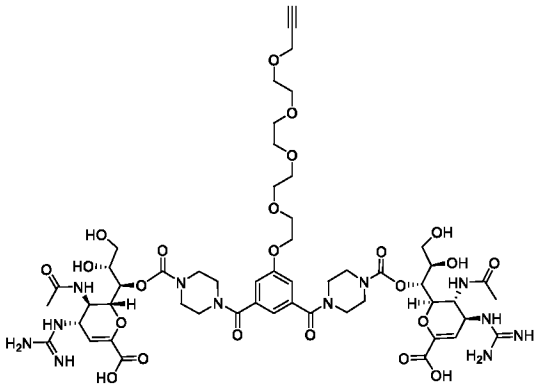
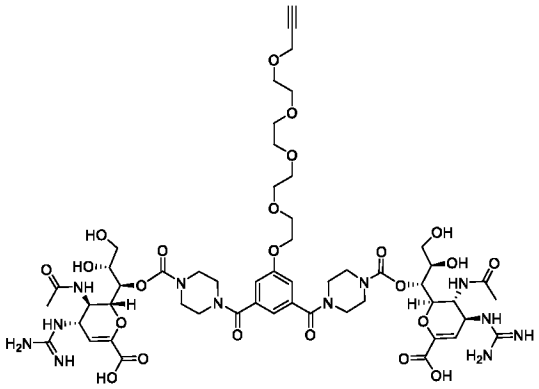
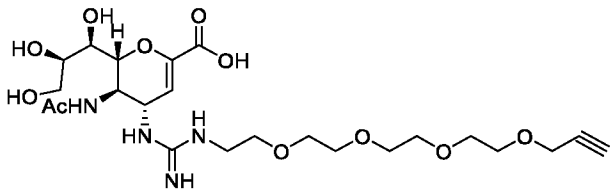
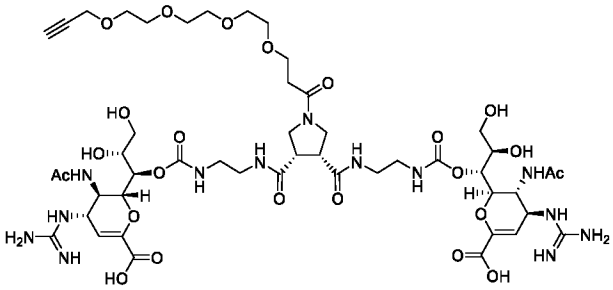
ПС 4	
ПС 5	
ПС 6	
ПС 7	
ПС 9	
ПС 12	

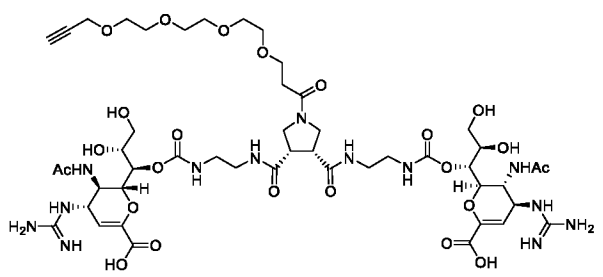
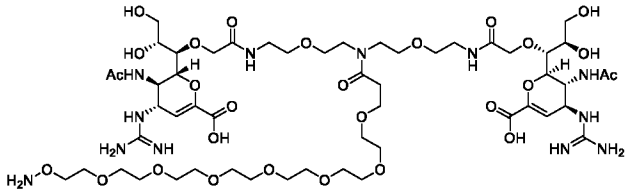
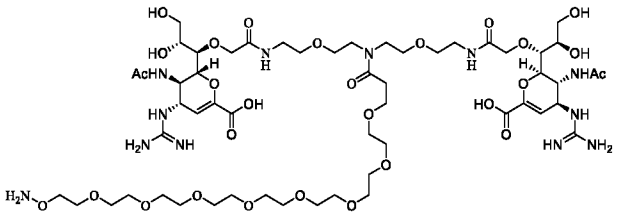
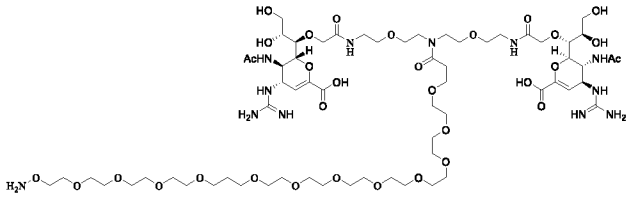
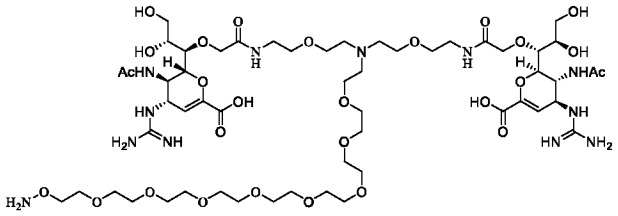
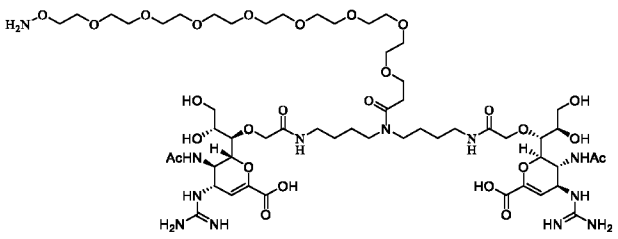
ПС 13	
ПС 14	
ПС 15	
ПС 16	

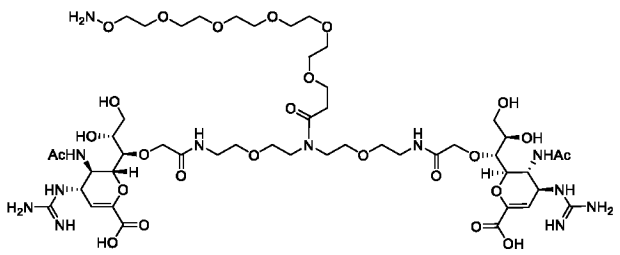
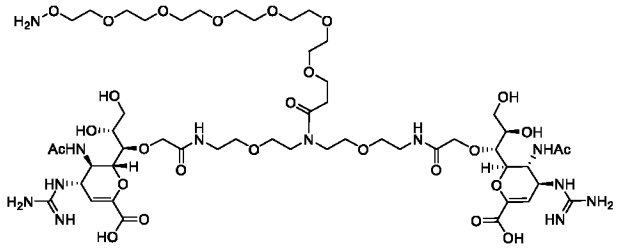
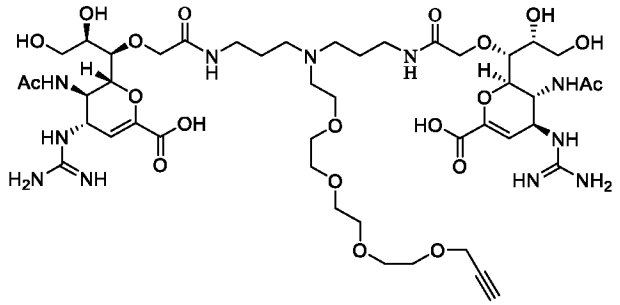
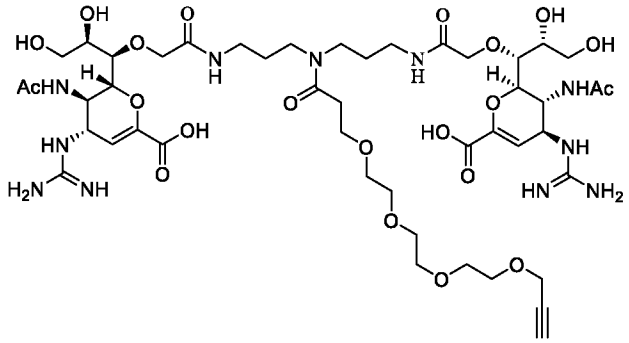
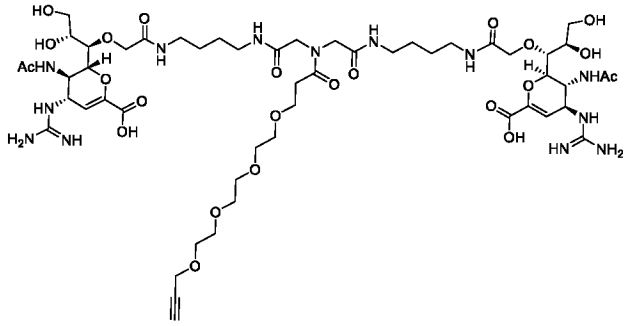
ПС 17	
ПС 18	
ПС 19	
ПС 20	

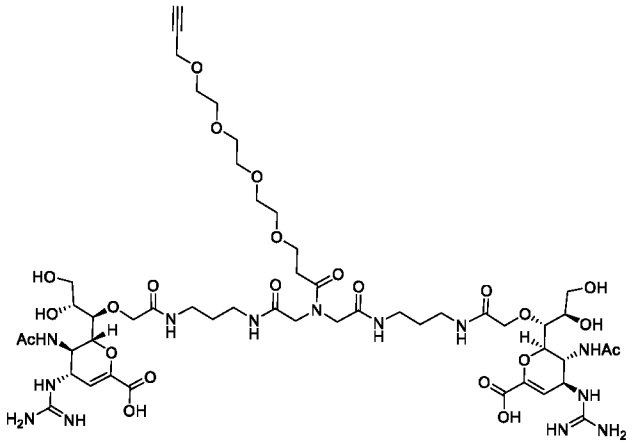
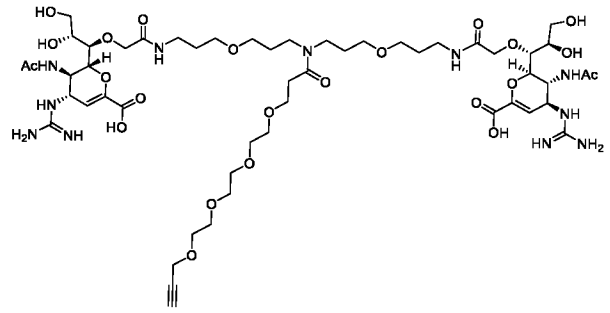
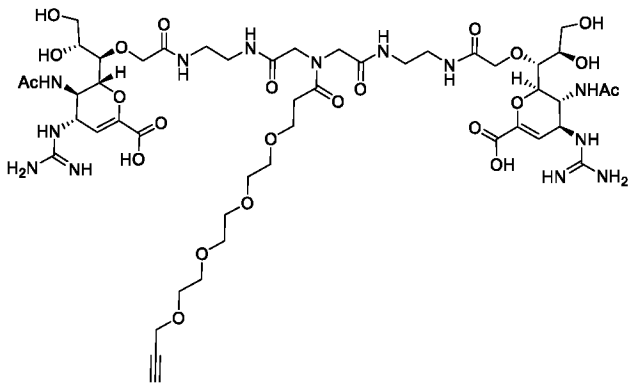
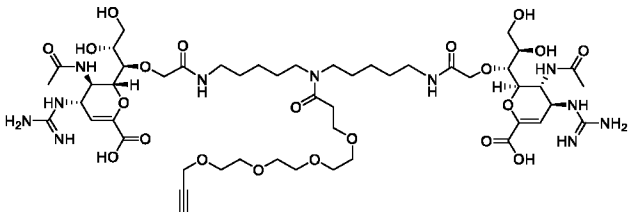
ПС 21	
ПС 22	
ПС 23	
ПС 24	
ПС 25	

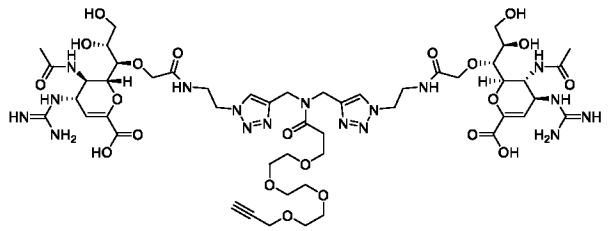
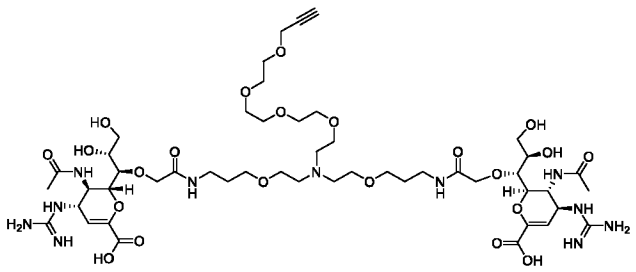
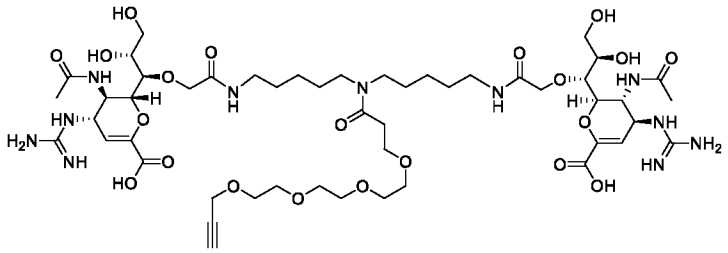
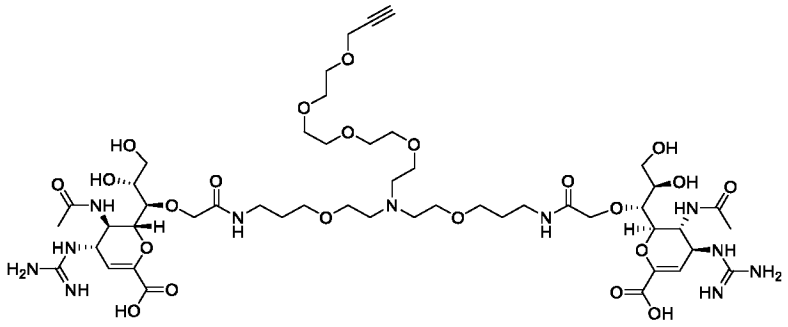
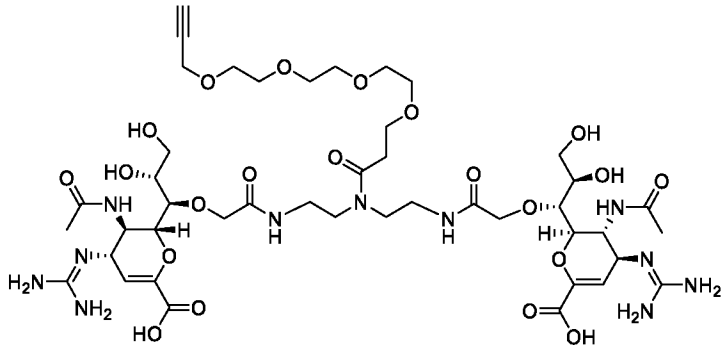
ПС 26	
ПС 27	
ПС 28	
ПС 30	
ПС 31	
ПС 34	

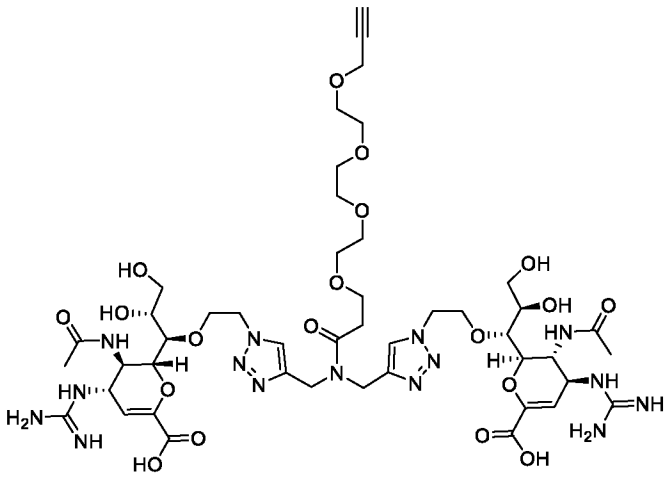
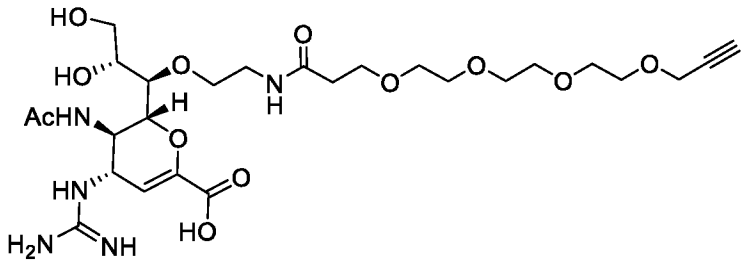
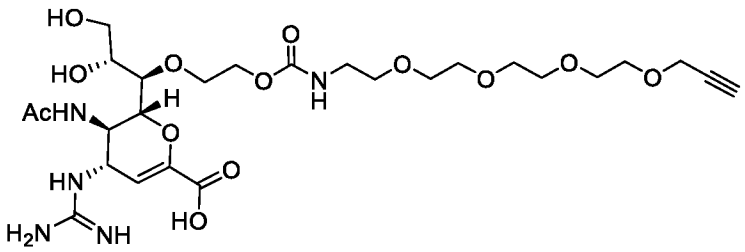
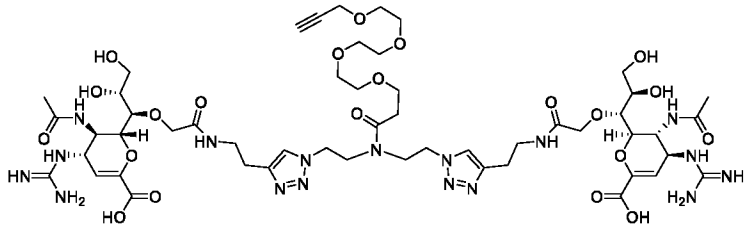
ПС 38	
ПС 39	
ПС 40	
ПС 42	

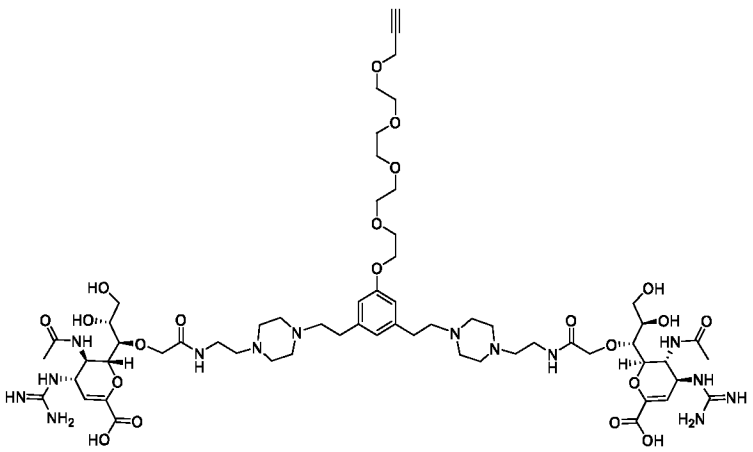
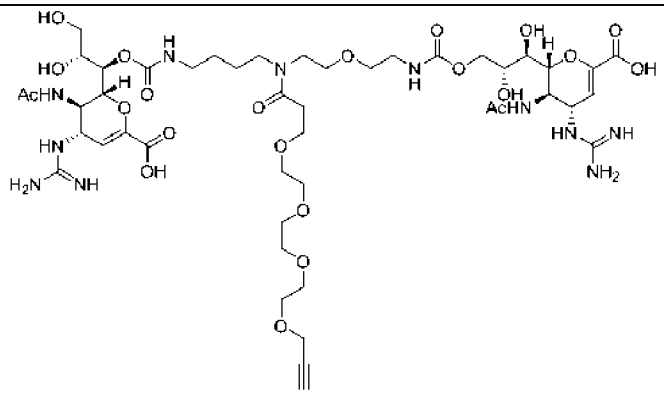
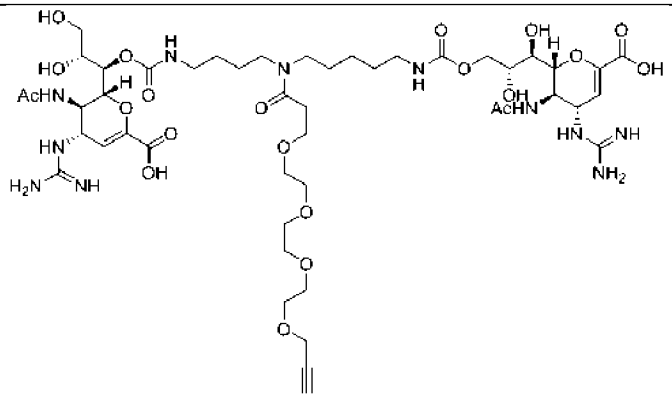
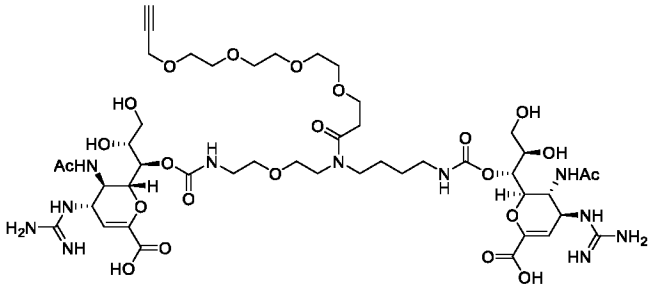
ПС 43	
ПС 44	
ПС 45	
ПС 46	
ПС 47	
ПС 48	

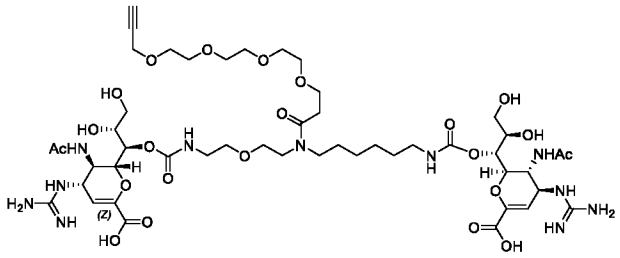
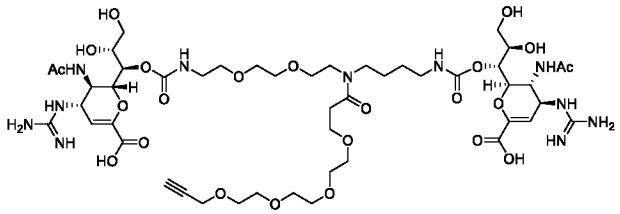
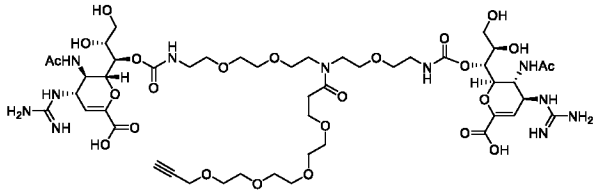
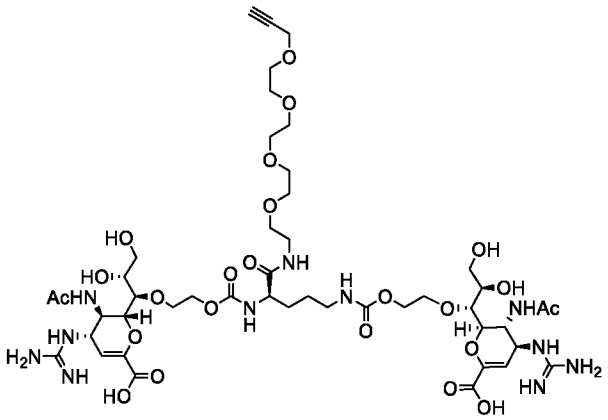
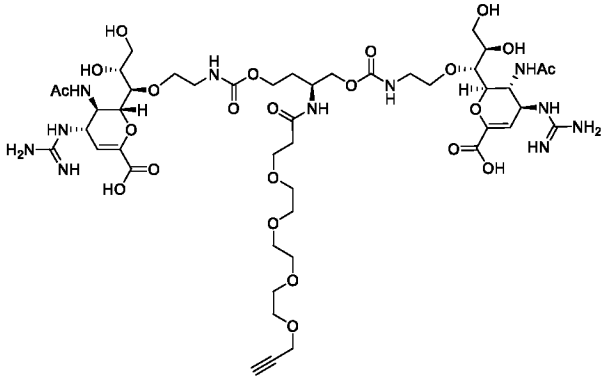
ПС 49	
ПС 50	
ПС 52	
ПС 53	
ПС 54	

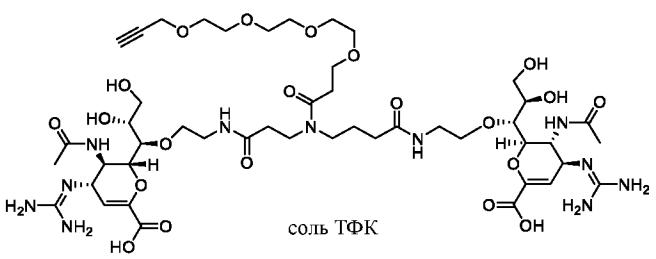
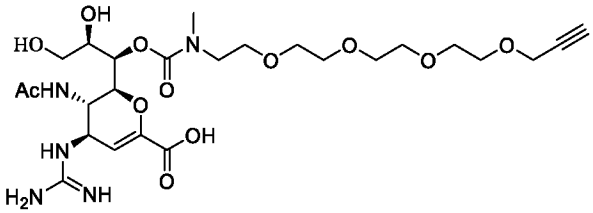
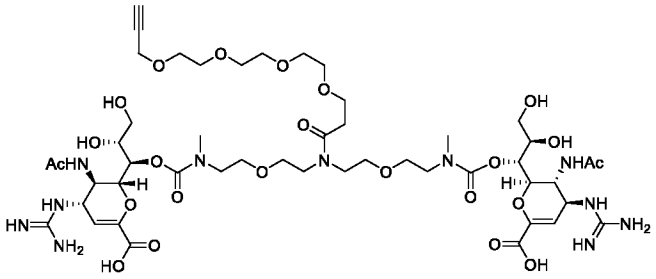
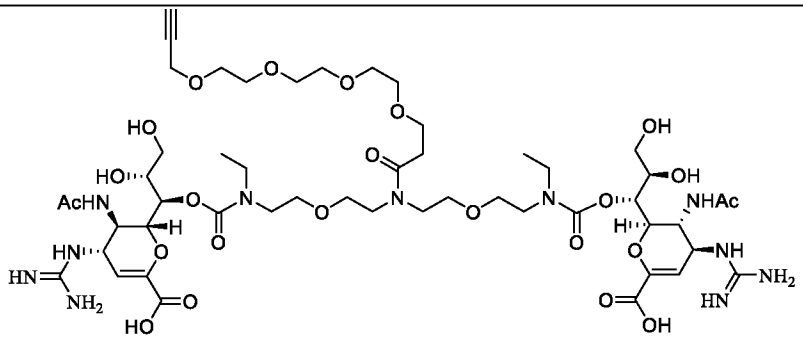
ПС 55	
ПС 57	
ПС 58	
ПС 59	

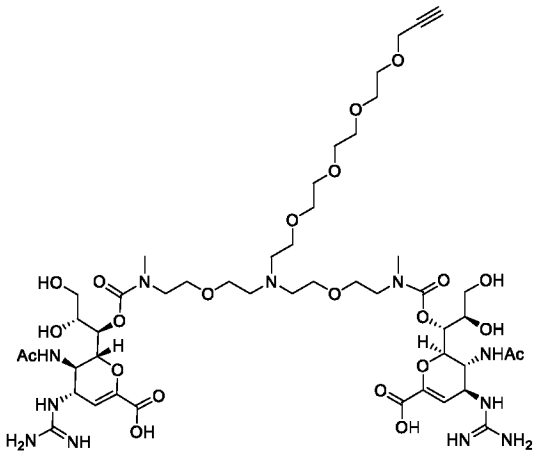
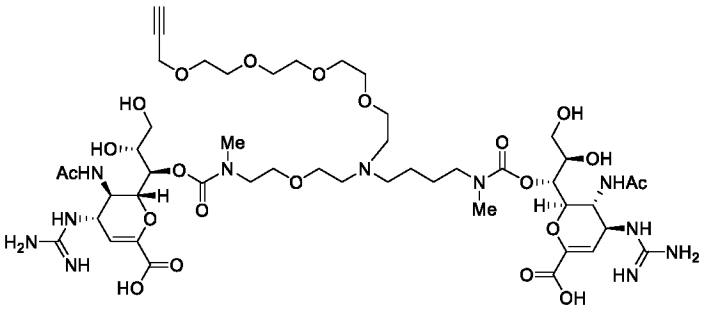
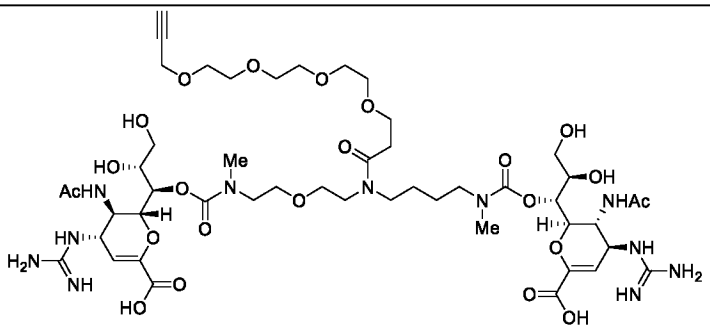
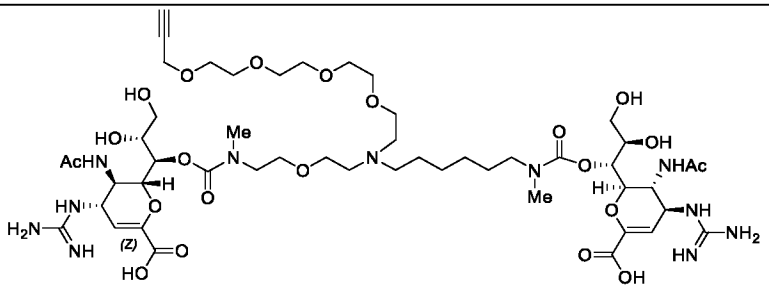
ПС 60	
ПС 61	
ПС 62	
ПС 63	
ПС 64	

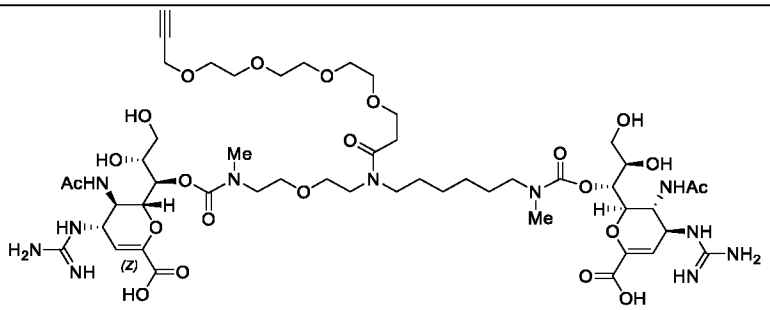
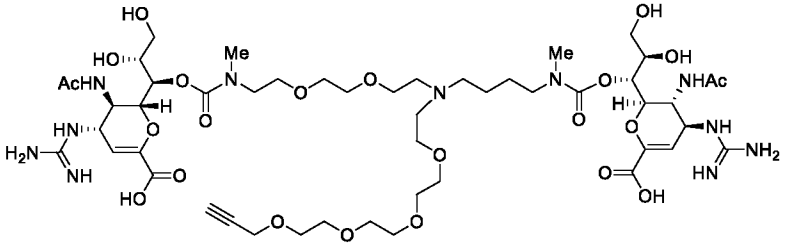
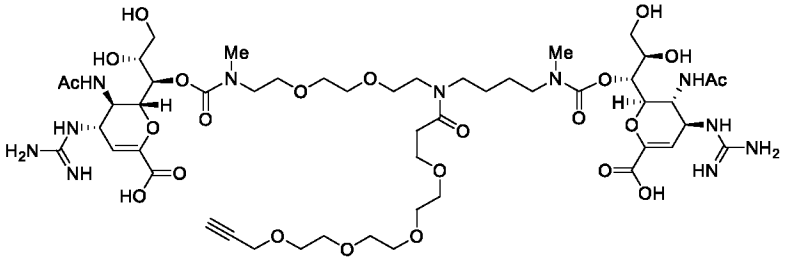
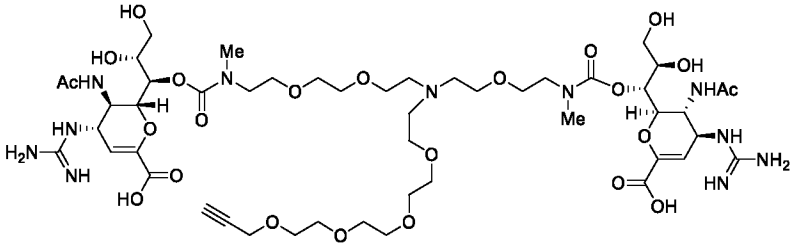
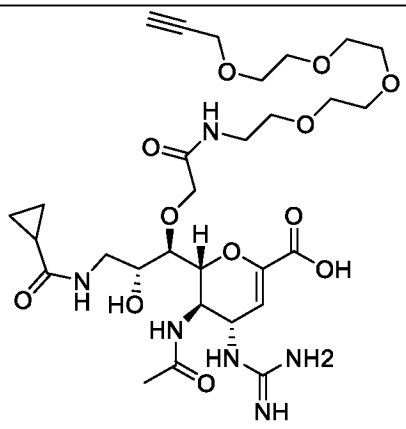
ПС 65	
ПС 67	
ПС 68	
ПС 69	

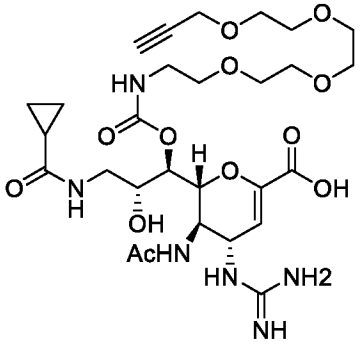
ПС 70	
ПС 71	
ПС 72	
ПС 73	

ПС 74	
ПС 75	
ПС 76	
ПС 77	
ПС 78	

ПС 79	 соль ТФК
ПС 80	
ПС 81	
ПС 82	

ПС 83	
ПС 84	
ПС 85	
ПС 86	

ПС 87	
ПС 88	
ПС 89	
ПС 90	
ПС 91	

ПС 92	

В еще одном аспекте изобретение включает конъюгаты из таблицы 1b. Каждый конъюгат в таблице 1b соответствует конъюгату либо формулы (M-I), либо формулы (D-I), как указано. Конъюгаты из таблицы 1b включают конъюгаты, образованные при помощи ковалентной реакции ПС из таблицы 1a с линкером, который, в свою очередь, конъюгирован с E (например, мономером домена Fc, белком альбумином, пептидом, связывающим белок альбумин, или связывающий Fc пептид). В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная часть ПС (например, алкиновая или азидогруппа) взаимодействует с соответствующей реакционноспособной группой (например, алкиновой или азидогруппой) линкера (представленного L'), ковалентно присоединенного к E, так что ПС из таблицы 1a ковалентно присоединен к E. Как представлено в таблице 1b, L' соответствует остатку L, как определено в (M-1) или (D-I) (например, L' представляет собой линкер, который ковалентно соединяет ПС и E). Например, L' может включать триазол (образованный при помощи реакции клик-химии между ПС и линкером, конъюгированным с E) и линкер (например, линкер $ПЭГ_2$-$ПЭГ_{20}$), который, в свою очередь, конъюгирован с боковой цепью аминокислоты E (см., например, Фиг. 103).

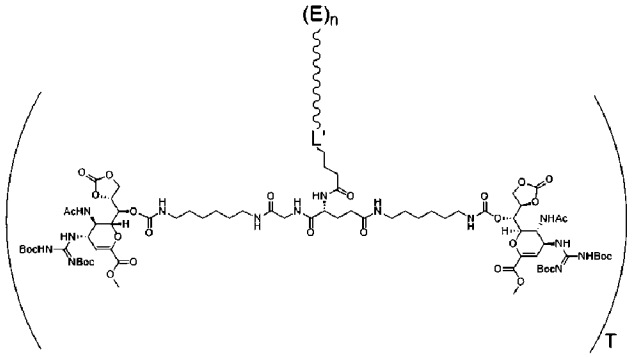
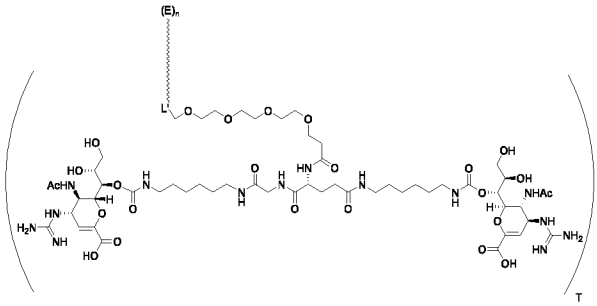
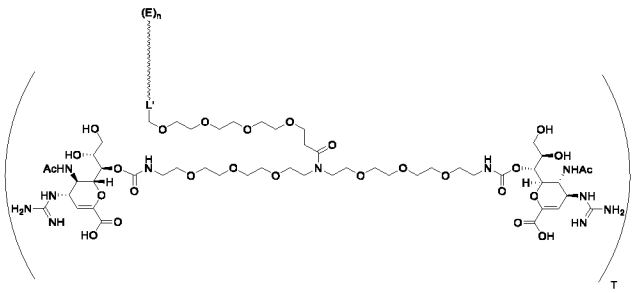
В некоторых вариантах осуществления конъюгата из таблицы 1b n равно 1 или 2. Когда n равно 1, каждый E включает мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), белок альбумин (например, белок альбумина, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), пептид, связывающий белок альбумин, или связывающий Fc пептид. Когда n равно 2, каждый E включает мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), и мономеры домена Fc димеризуются с образованием домена Fc.

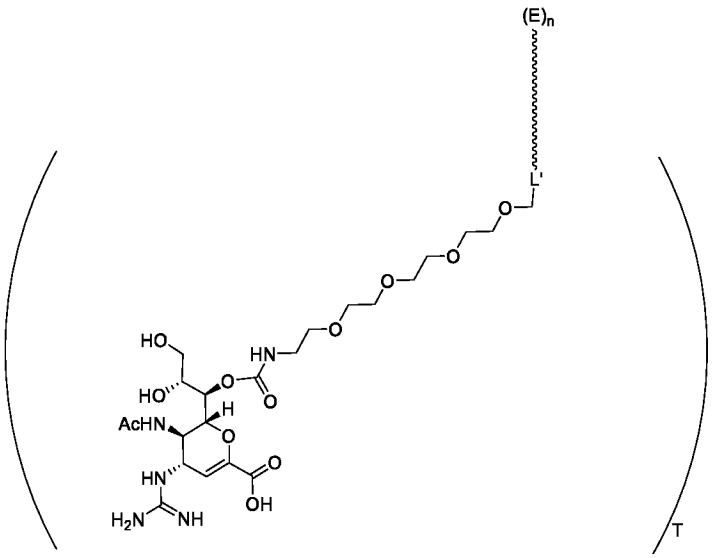
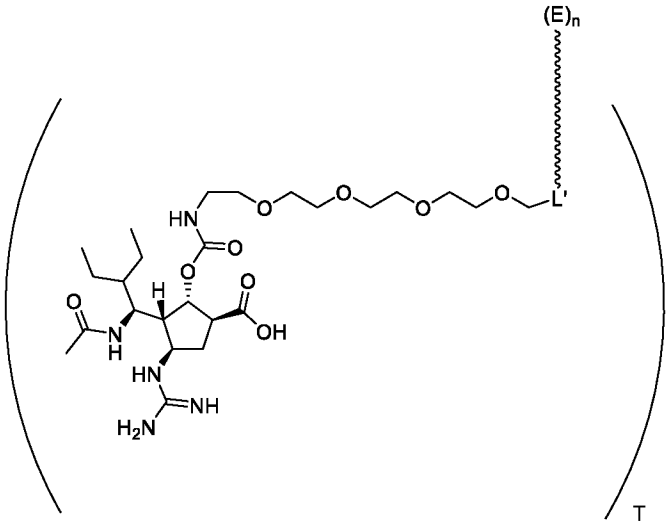
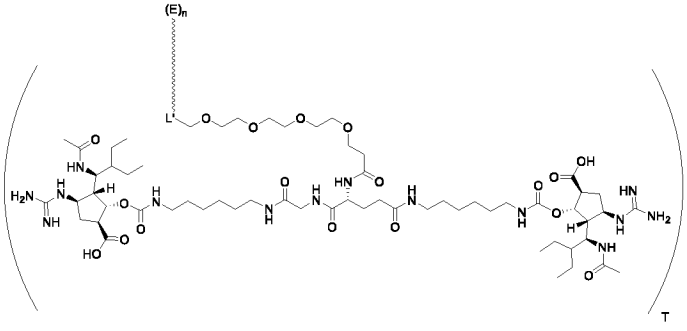
В некоторых вариантах осуществления любого конъюгата из таблицы 1b T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20). В описании также представлена совокупность любых конъюгатов из таблицы 2, где среднее значение T составляет от 1 до 20 (например, среднее значение T составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5). В некоторых вариантах осуществления среднее значение T составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В определенных вариантах осуществления среднее значение T составляет от 1 до 10 (например, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, или 10). В определенных вариантах осуществления среднее значение T составляет от 1 до 5 (например, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5). В некоторых вариантах осуществления среднее значение T составляет от 5 до 10 (например, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10). В

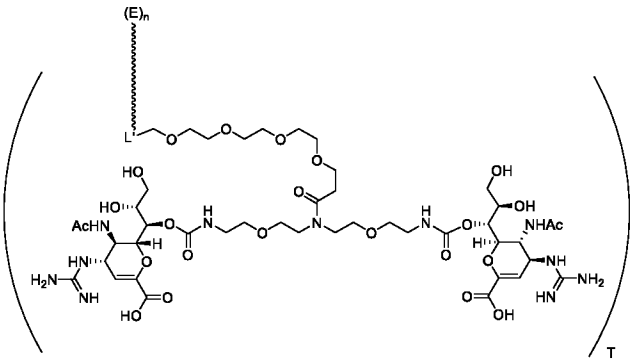
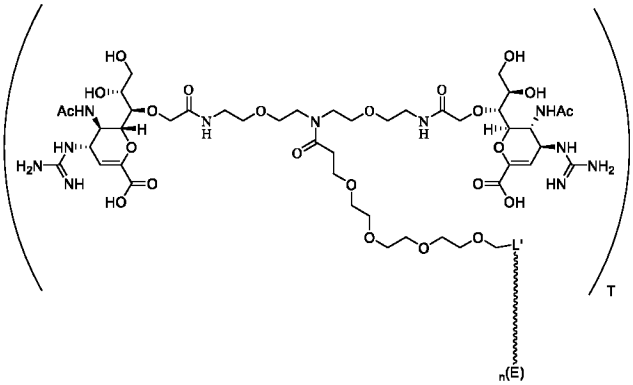
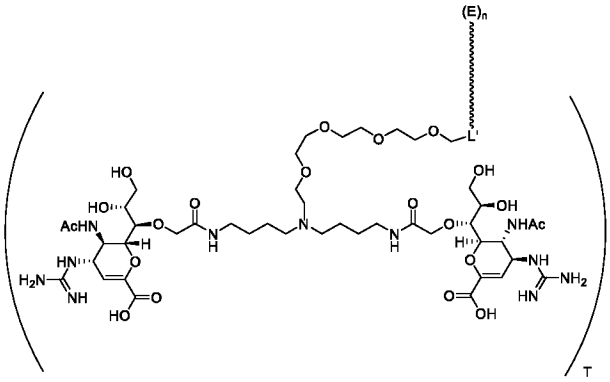
некоторых вариантах осуществления среднее значение T составляет от 2,5 до 7,5 (например, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5).

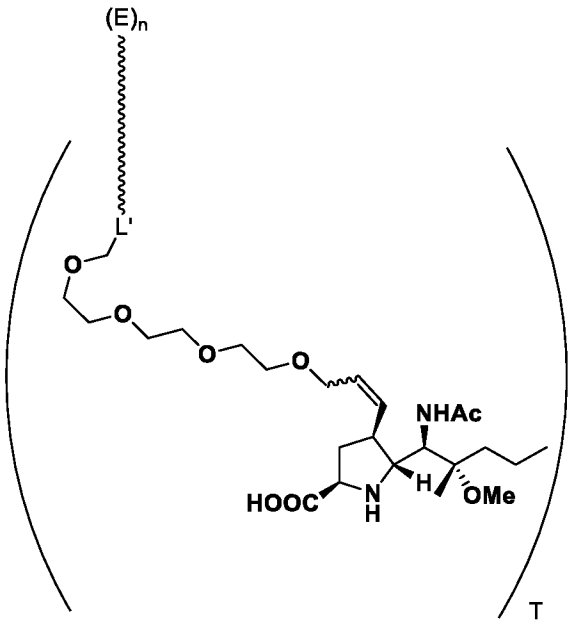
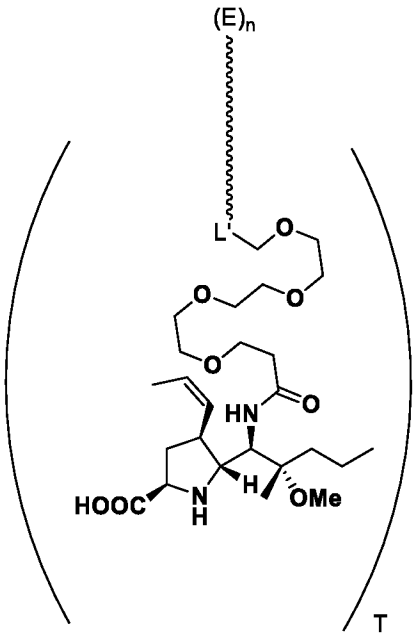
Волнистая линия в конъюгатах в таблице 1b указывает на то, что каждый L'-ПС ковалентно присоединен к боковой цепи аминокислоты в E (например, атому азота лизина на поверхности или атому серы цистеина на поверхности в E), или их фармацевтически приемлемых солях.

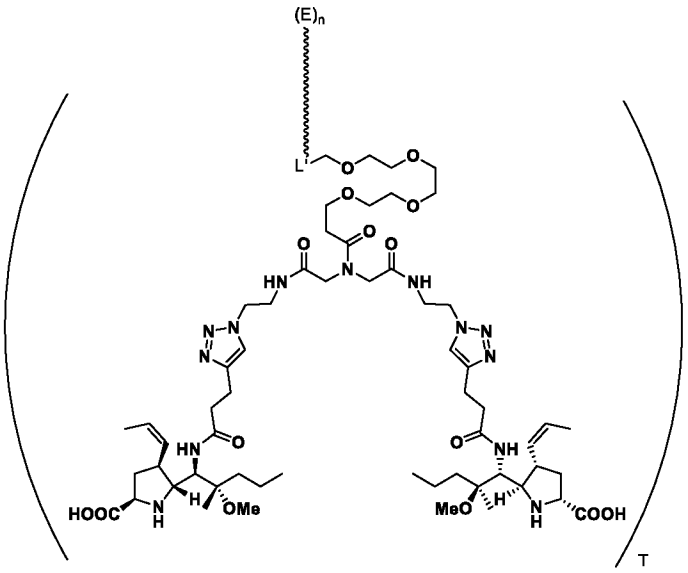
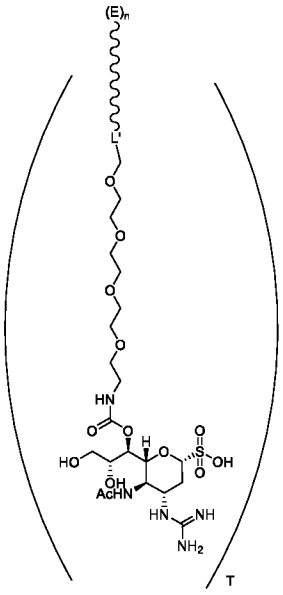
Таблица 1b: Конъюгаты, соответствующие промежуточным соединениям таблицы 1a

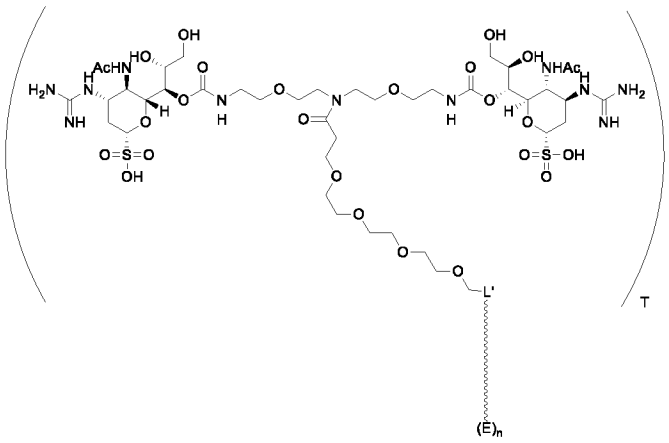
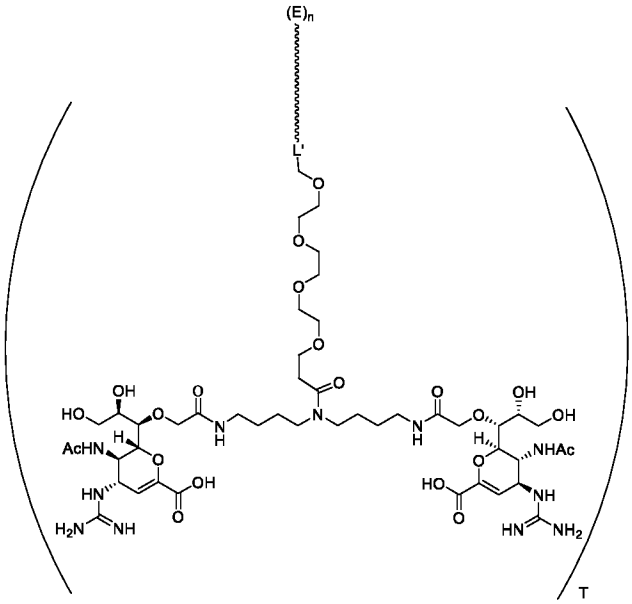
Соответствующий промежуточный продукт из таблицы 1a	**Описанный формулой**	**Структура конъюгата**
ПС 1	(D-I)	
ПС 2	(D-I)	
ПС 3	(D-I)	

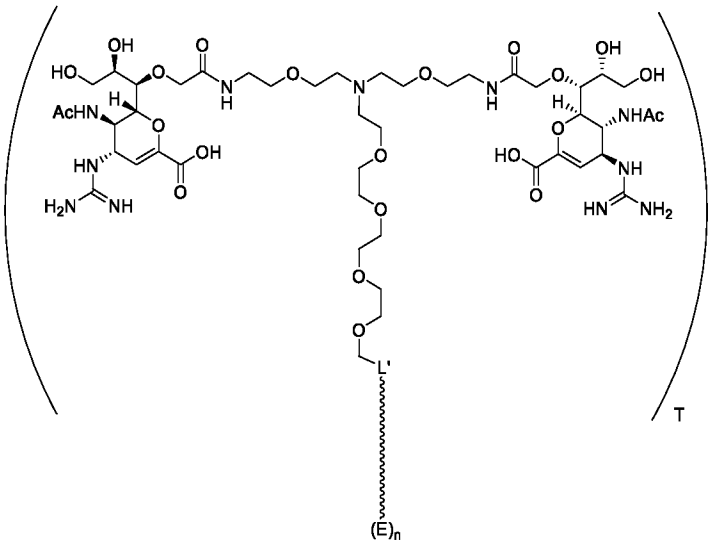
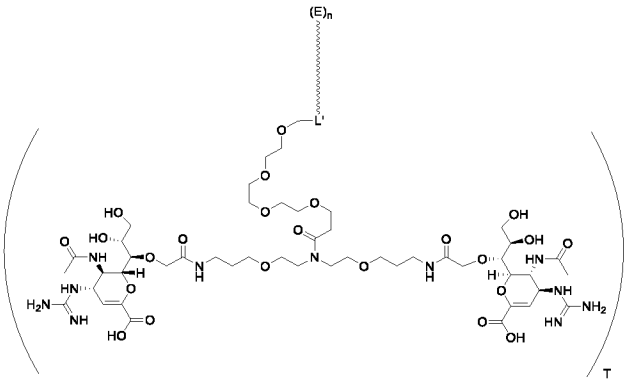
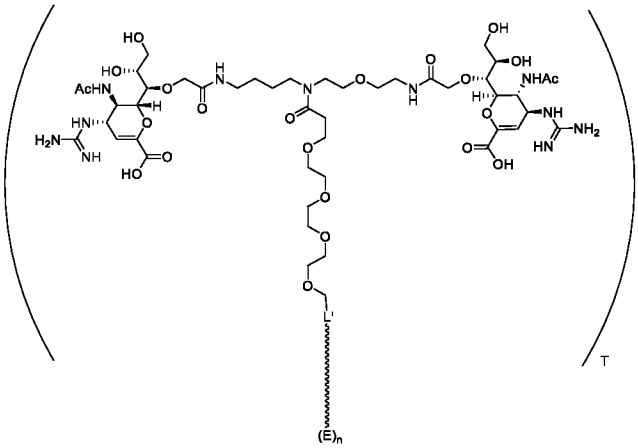
ПС 4	(M-I)	
ПС 5	(M-I)	
ПС 6	(D-I)	

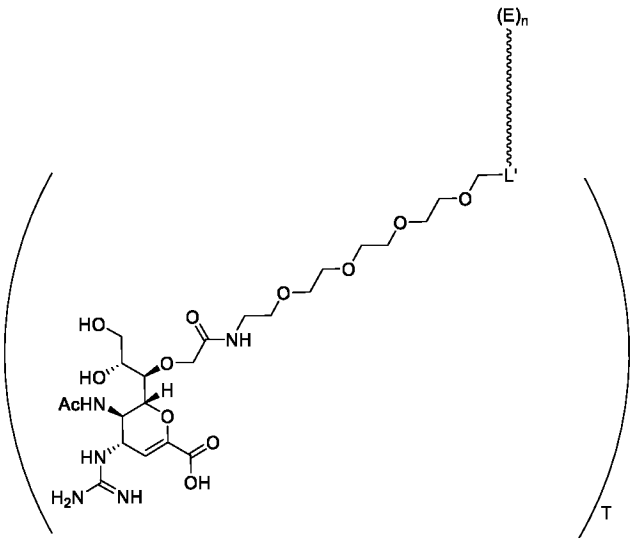
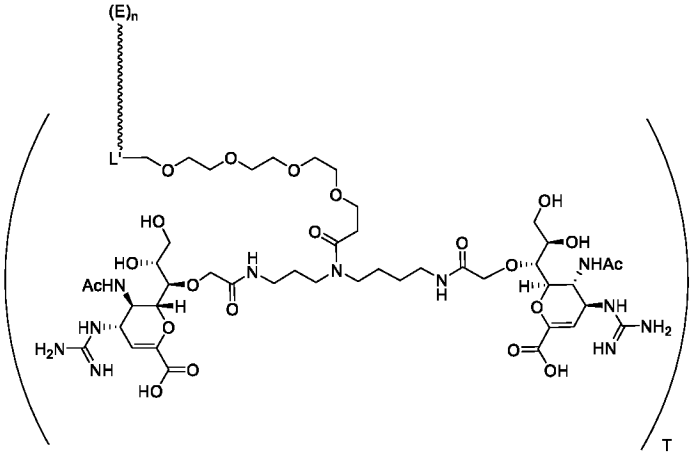
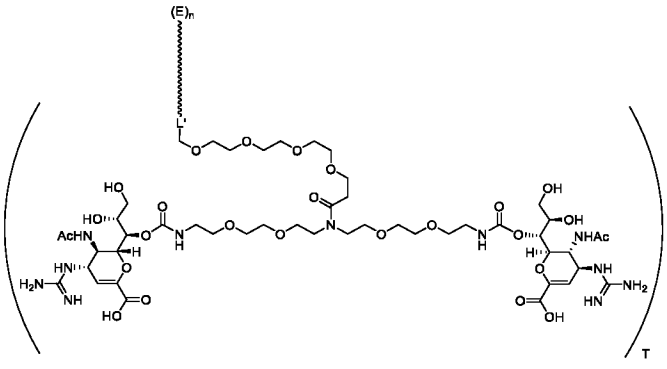
ПС 7	(D-I)	
ПС 9	(D-I)	
ПС 12	(D-I)	

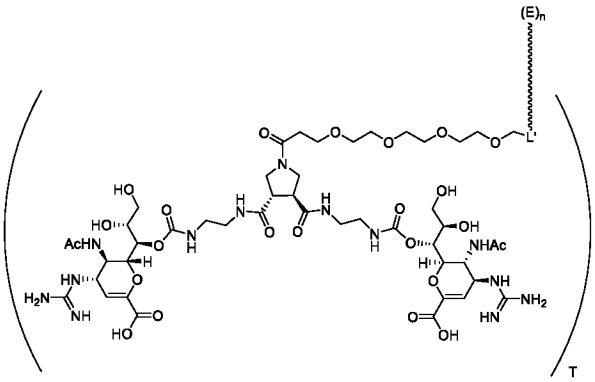
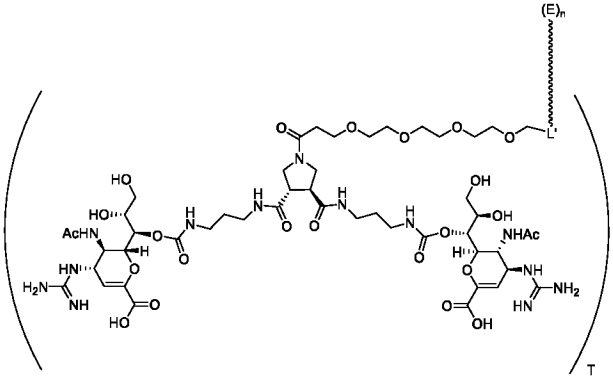
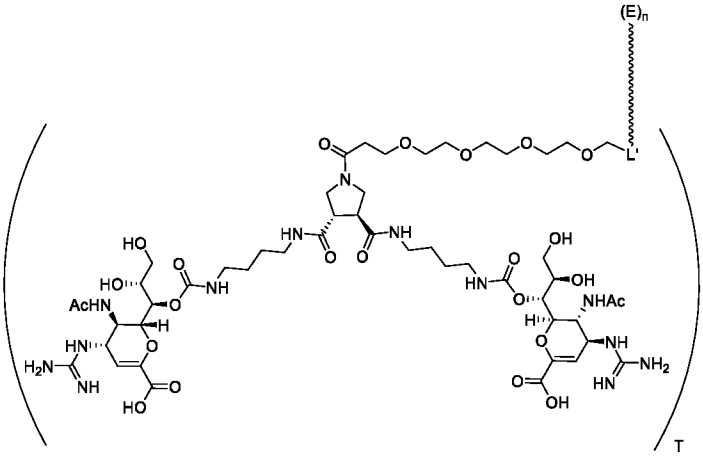
ПС 13	(M-I)	
ПС 14	(M-I)	

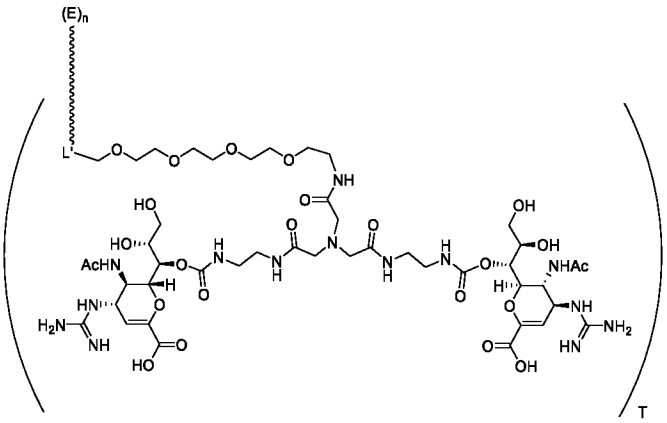
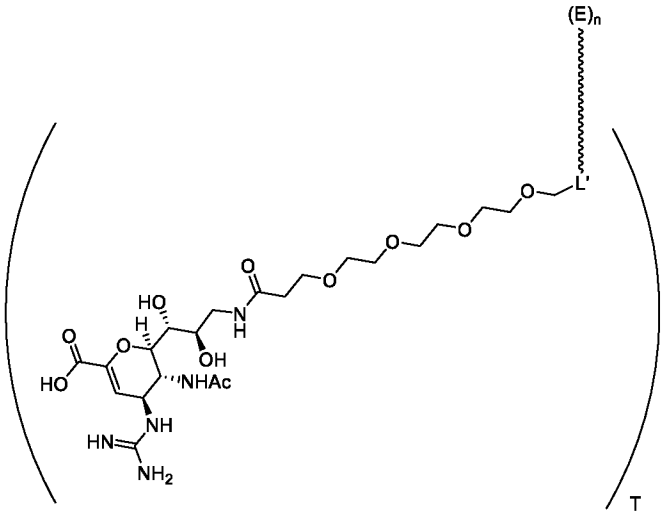
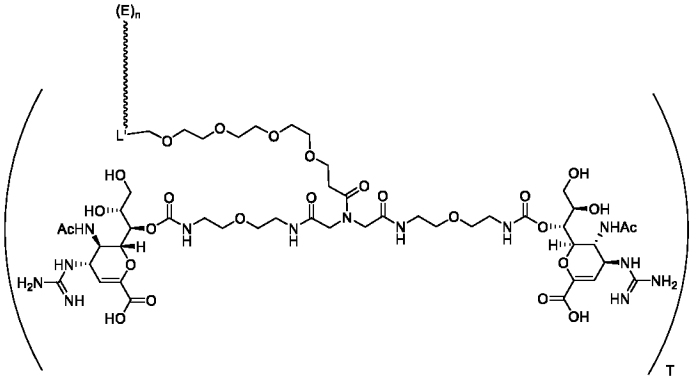
ПС 15	(D-I)	
ПС 16	(M-I)	

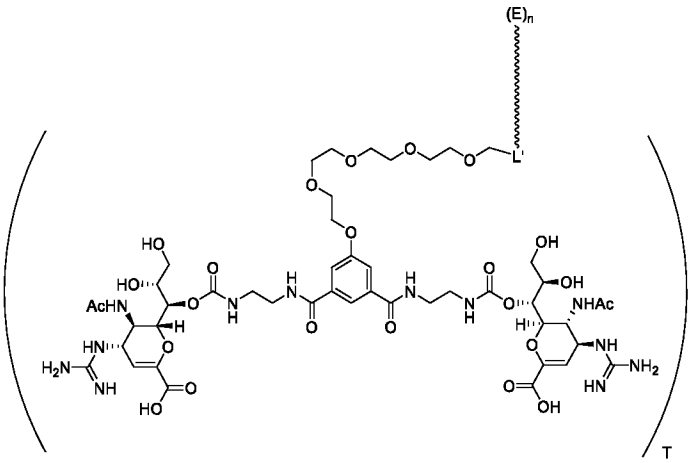
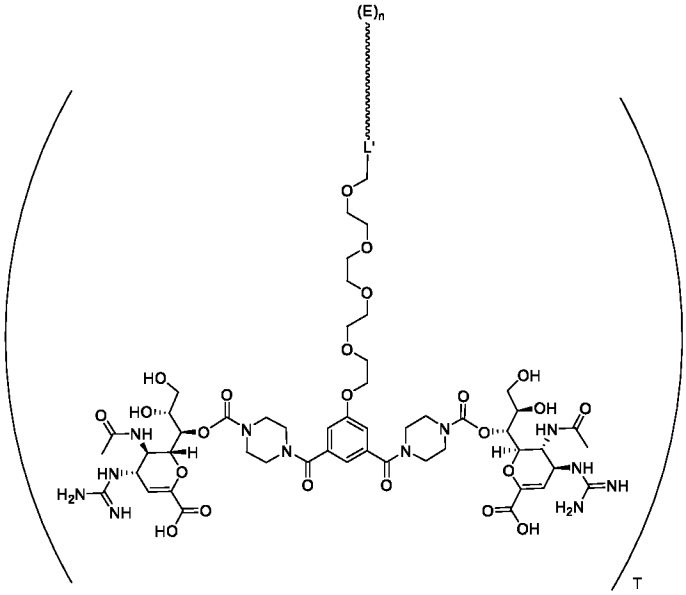
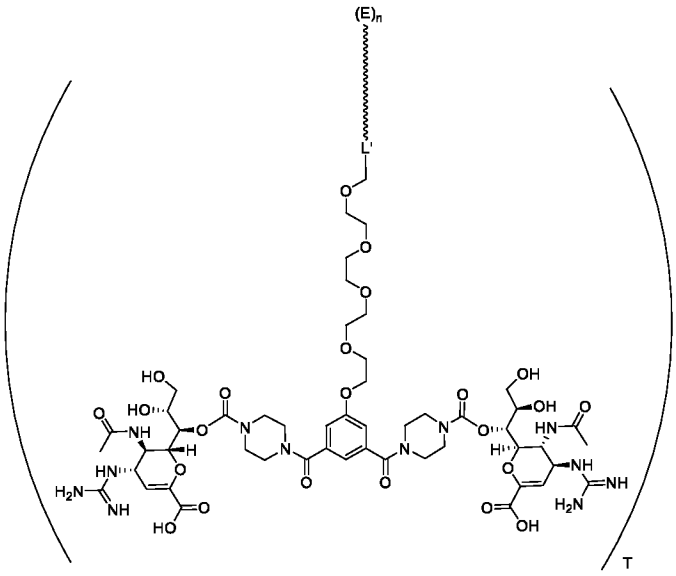
ПС 17	(D-I)	
ПС 18	(D-I)	

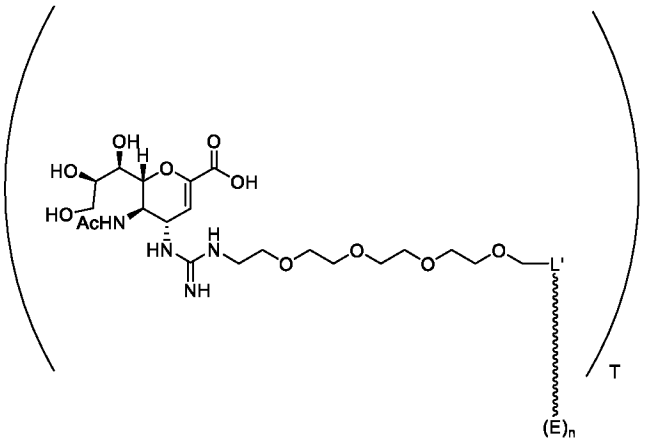
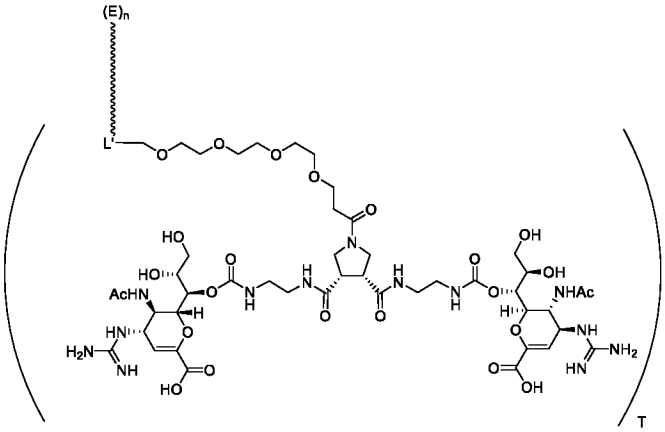
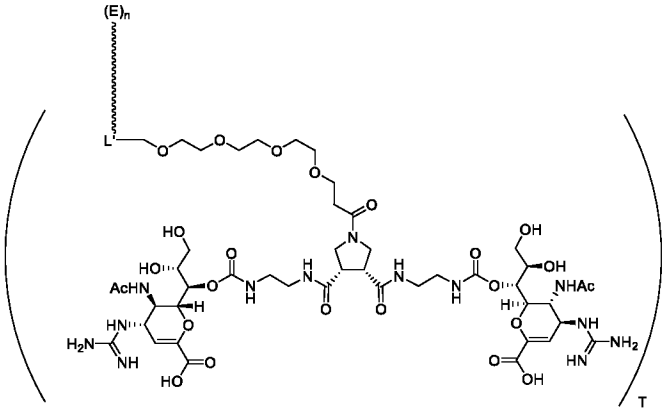
ПС 19	(D-I)	
ПС 20	(D-I)	
ПС 21	(D-I)	

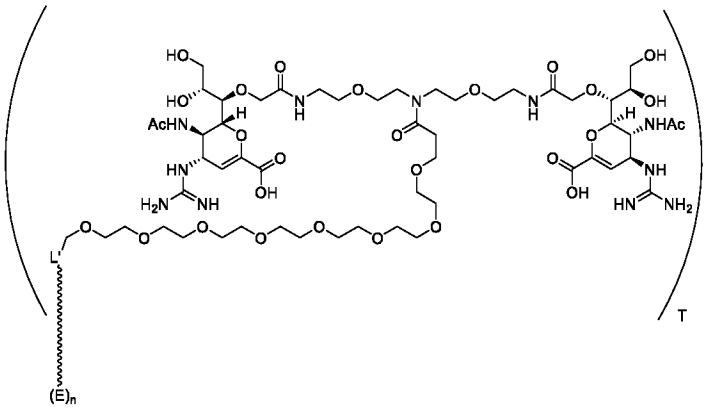
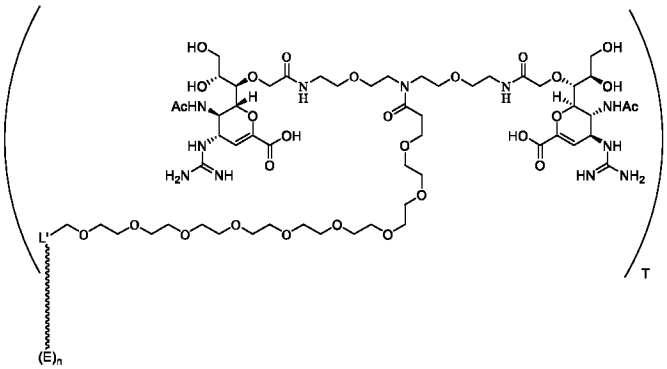
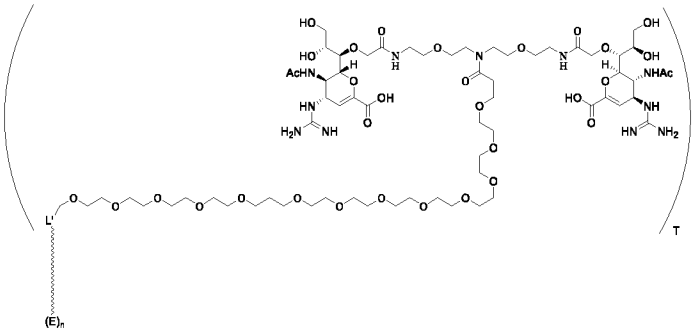
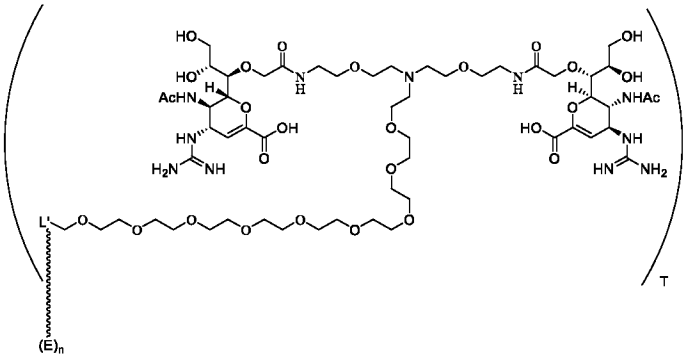
ПС 22	(M-I)	
ПС 23	(D-I)	
ПС 24	(D-I)	

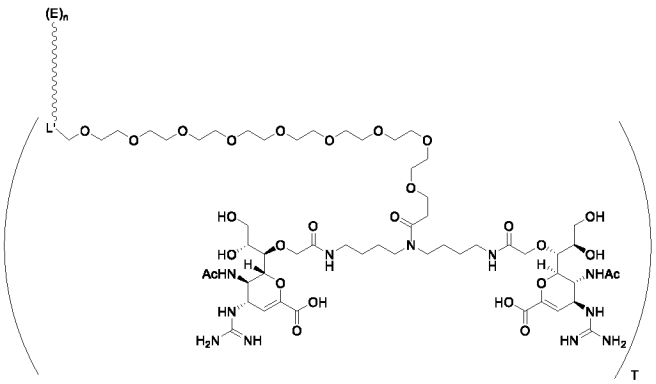
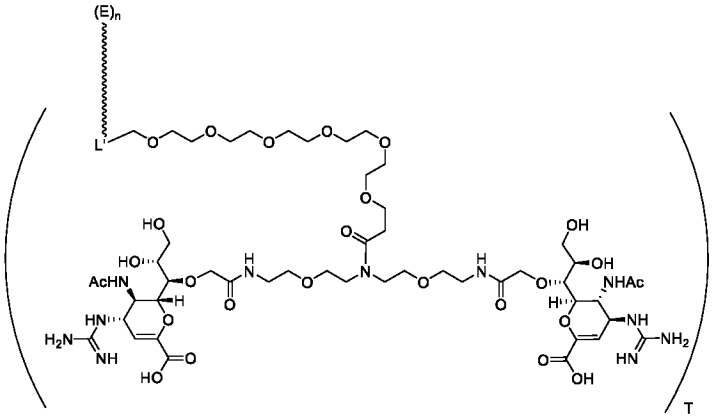
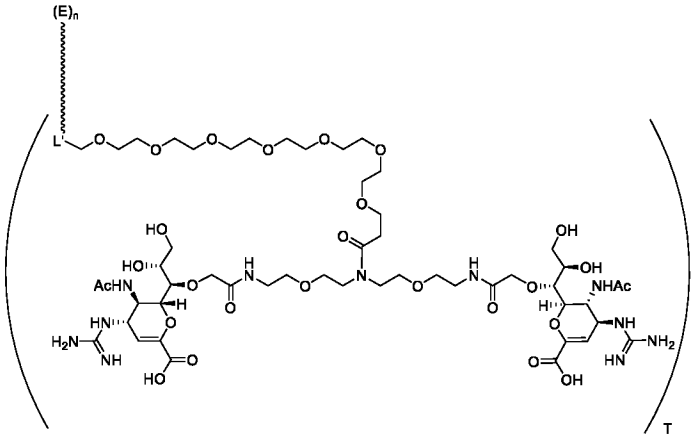
ПС 25	(D-I)	
ПС 26	(D-I)	
ПС 27	(D-I)	

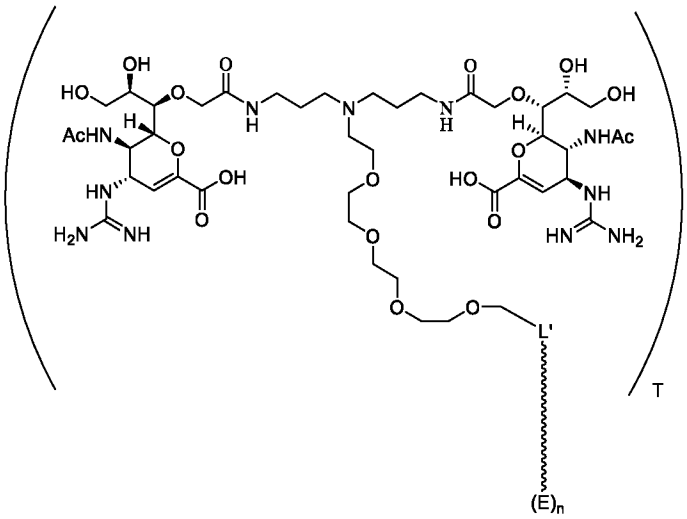
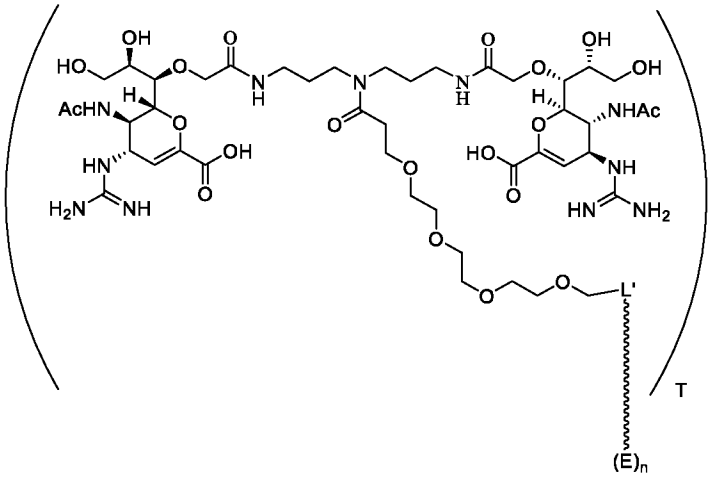
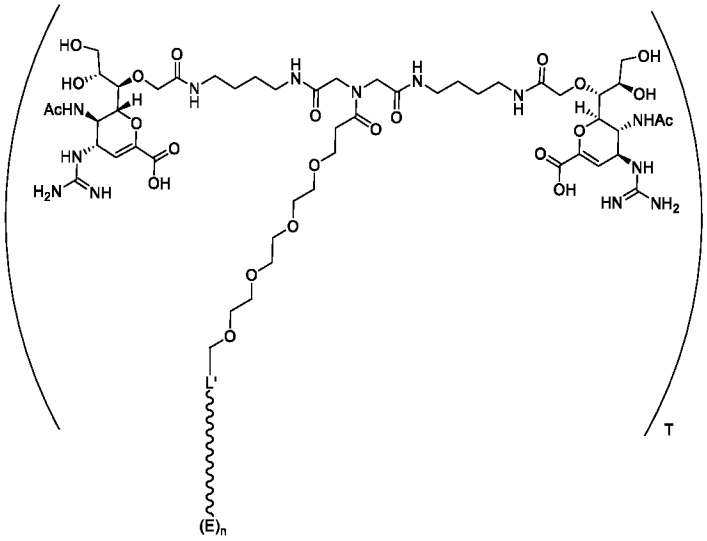
ПС 28	(D-I)	
ПС 30	(M-I)	
ПС 31	(D-I)	

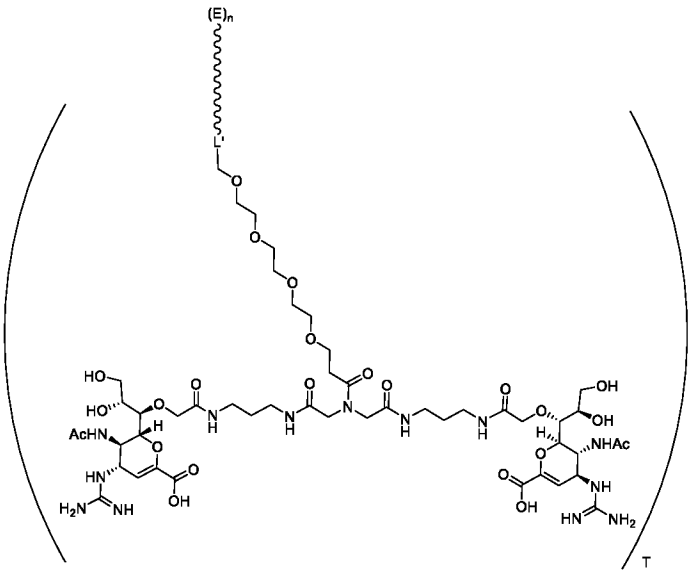
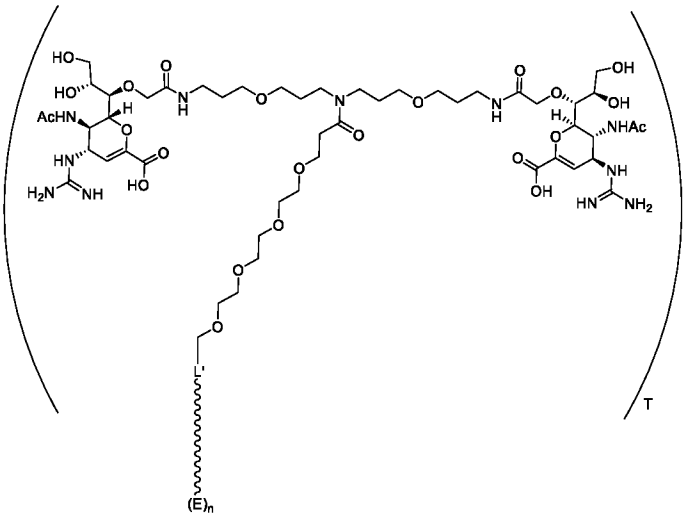
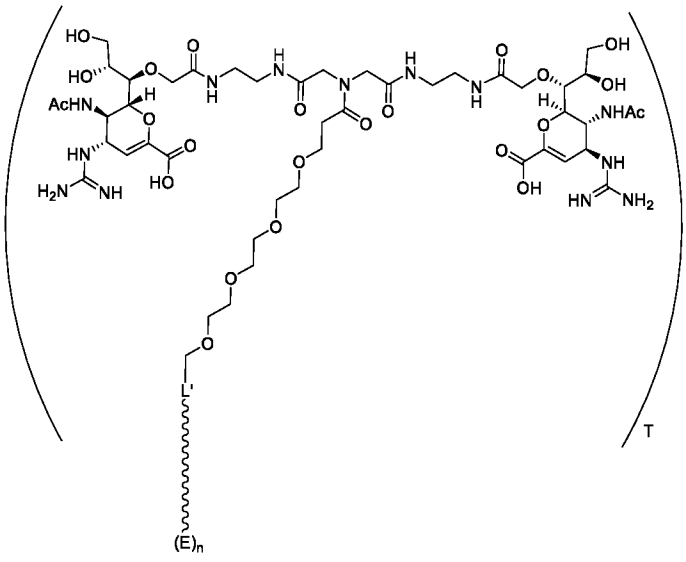
ПС 34	(D-I)	
ПС 38	(D-I)	
ПС 39	(D-I)	

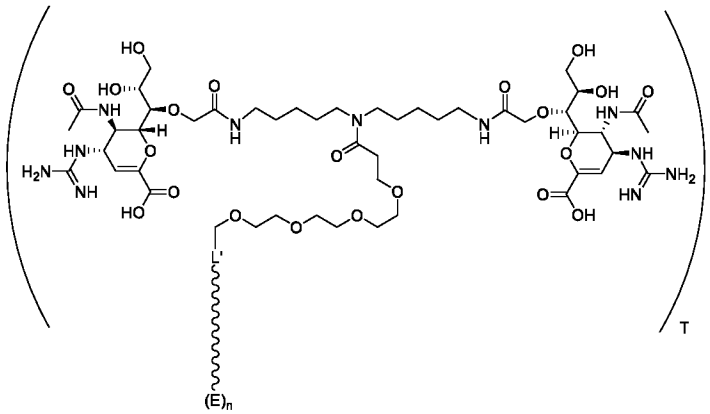
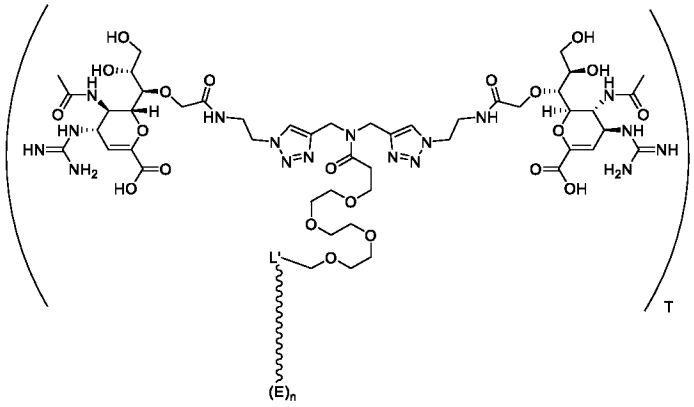
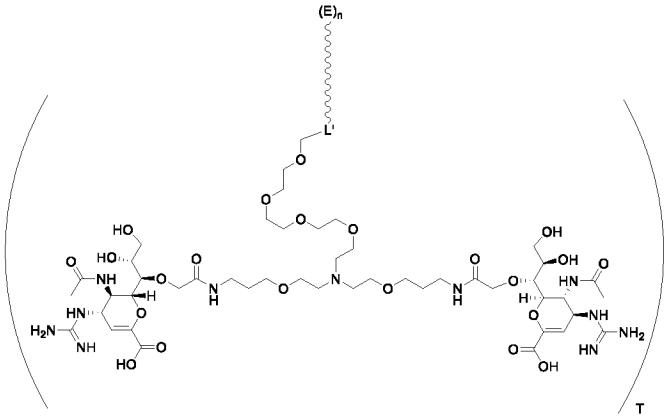
ПС 40	(D-I)	
ПС 42	(D-I)	
ПС 43	(D-I)	

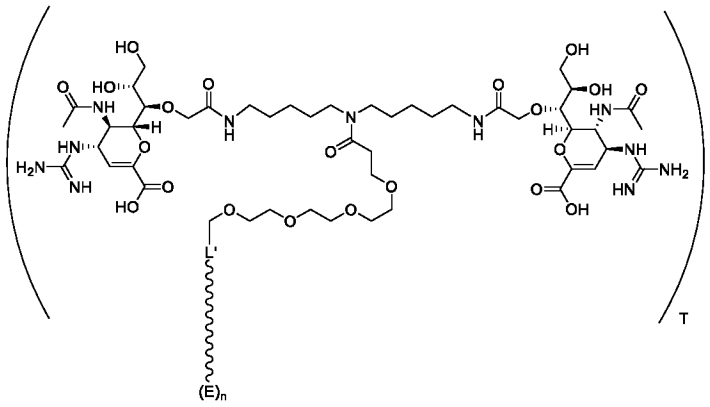
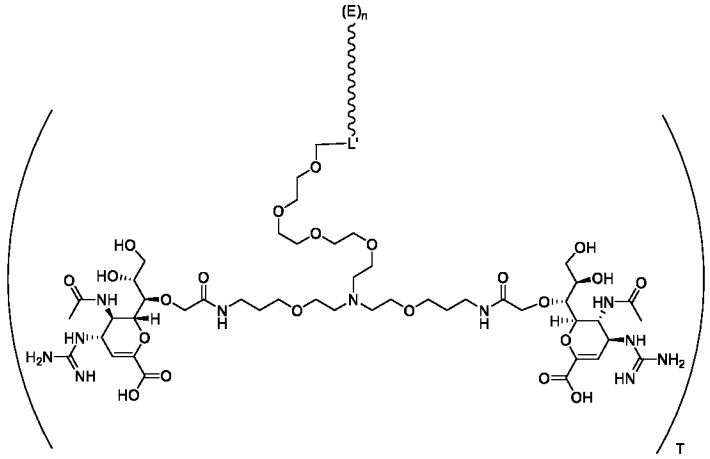
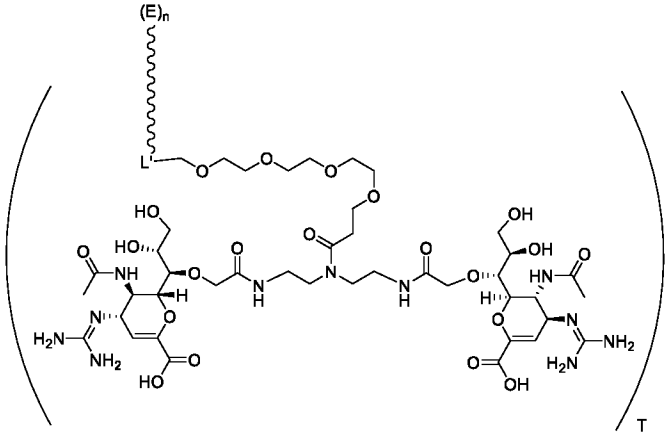
ПС 44	(D-I)	
ПС 45	(D-I)	
ПС 46	(D-I)	
ПС 47	(D-I)	

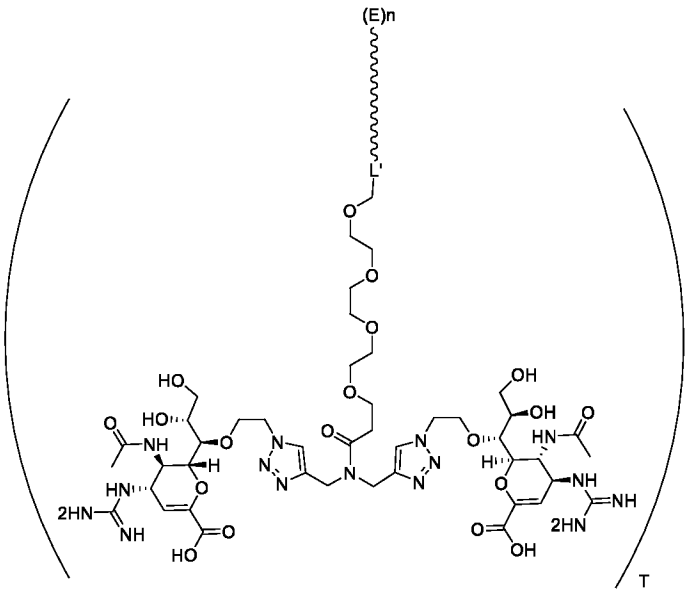
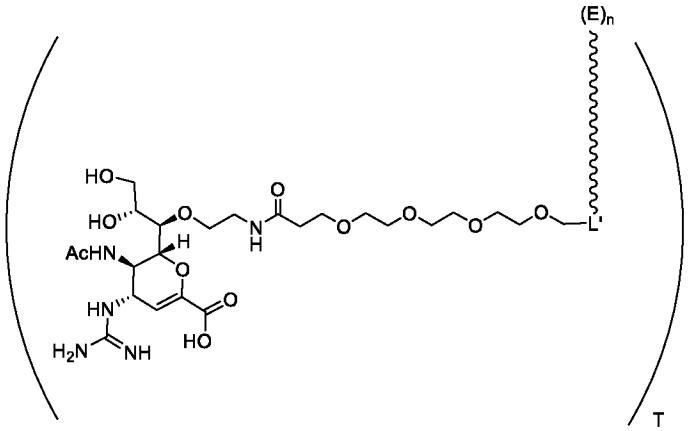
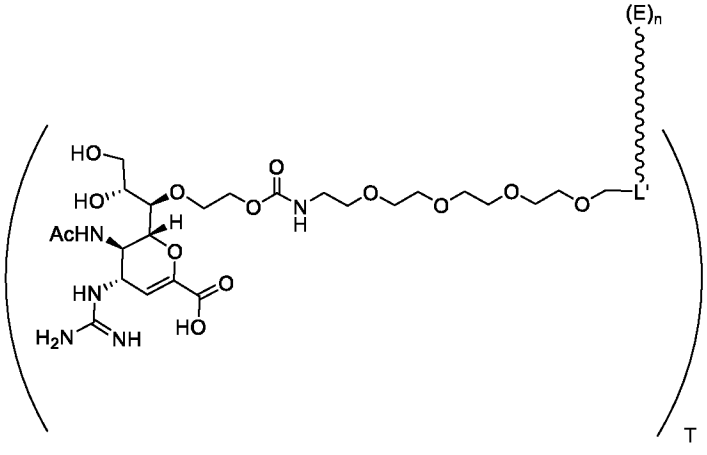
ПС 48	(D-I)	
ПС 49	(D-I)	
ПС 50	(D-I)	

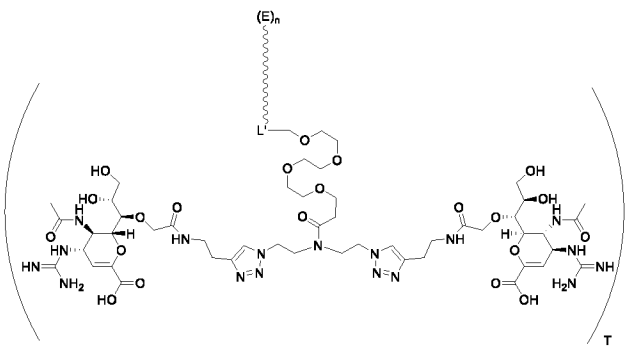
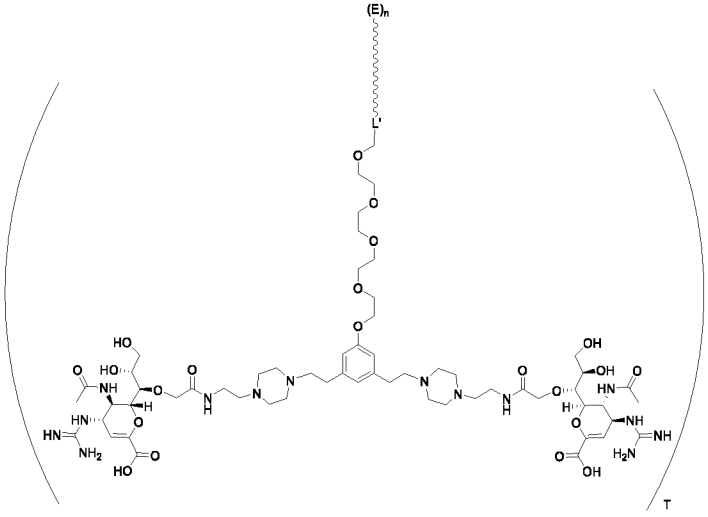
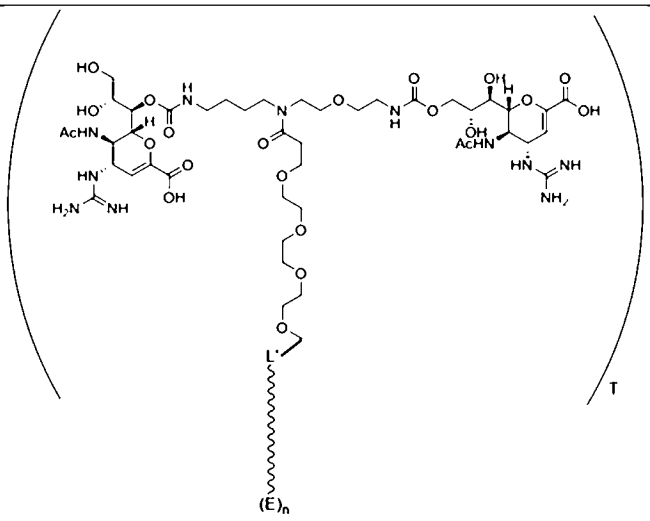
ПС 52	(D-I)	
ПС 53	(D-I)	
ПС 54	(D-I)	

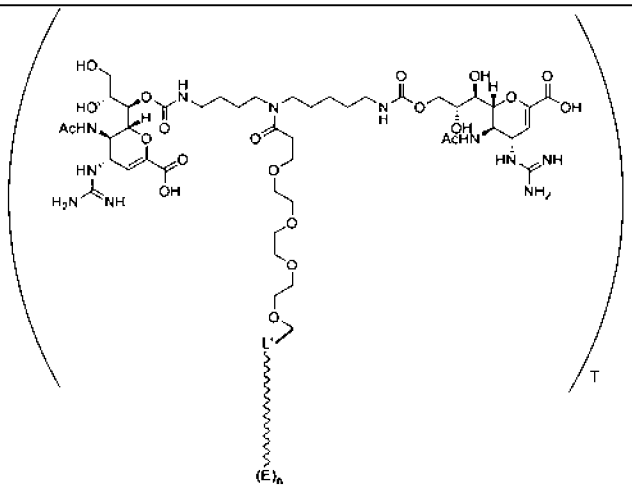
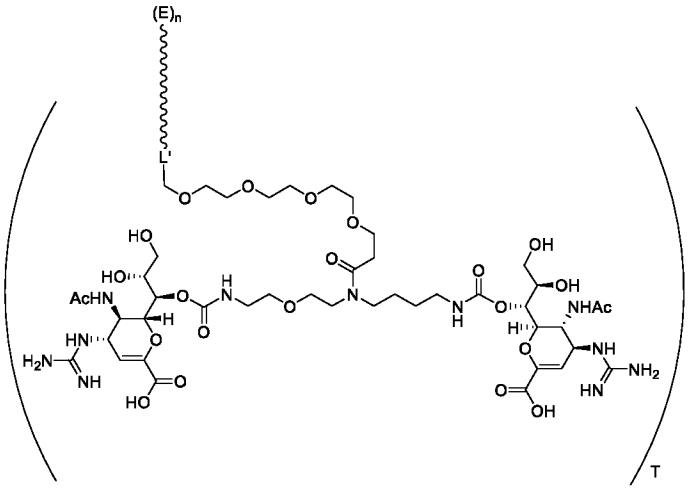
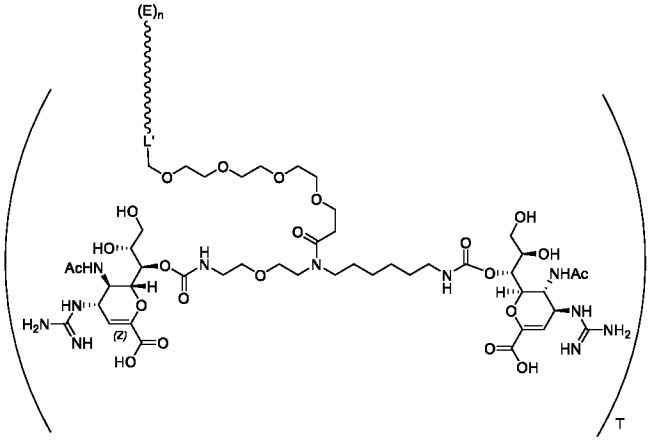
ПС 55	(D-I)	
ПС 57	(D-I)	
ПС 58	(D-I)	

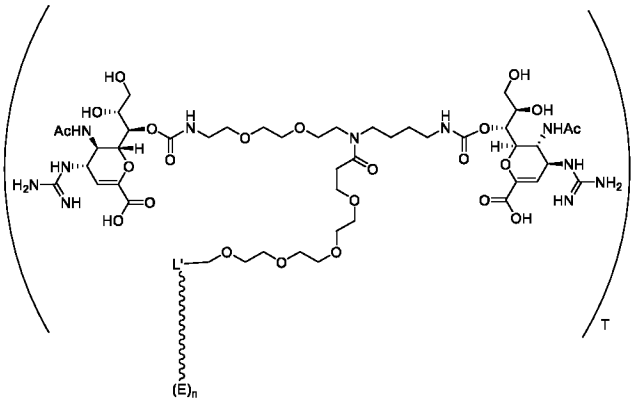
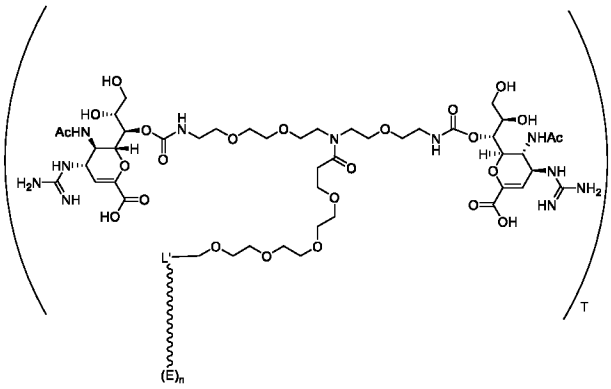
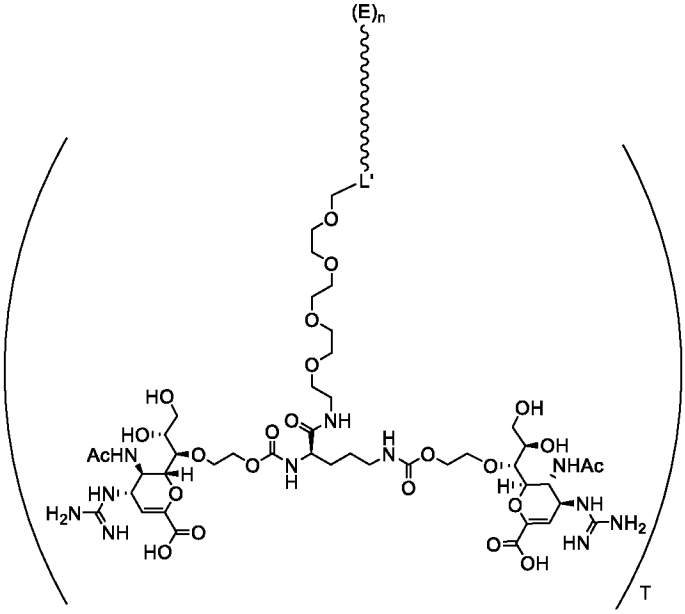
ПС 59	(D-I)	
ПС 60	(D-I)	
ПС 61	(D-I)	

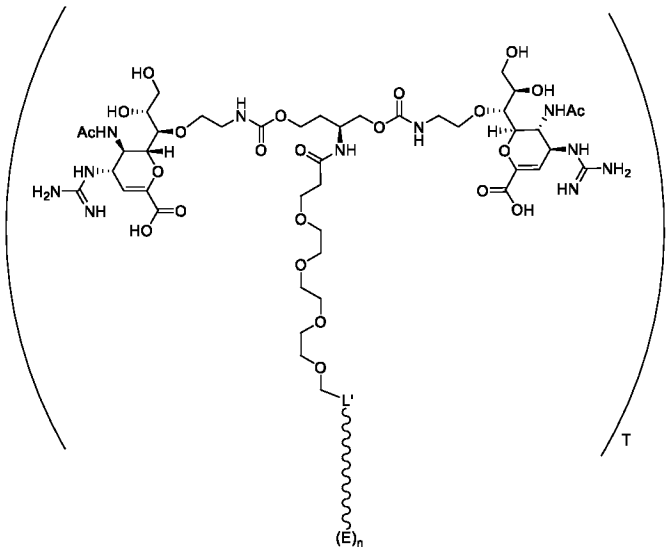
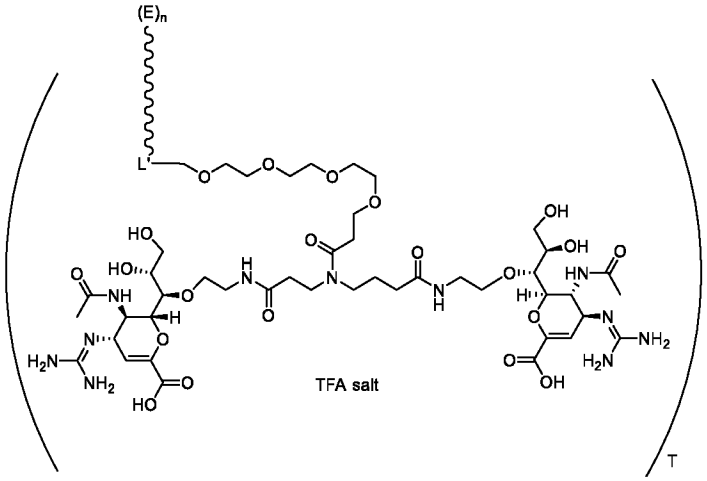
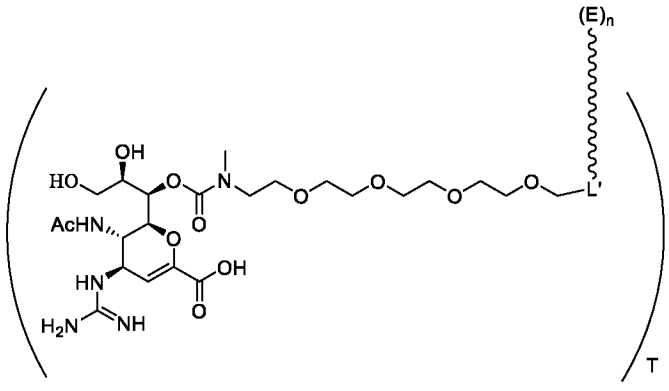
ПС 62	(D-I)	
ПС 63	(D-I)	
ПС 64	(D-I)	

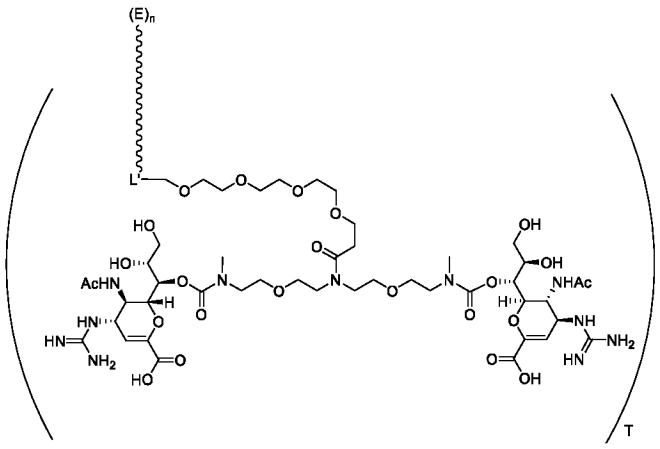
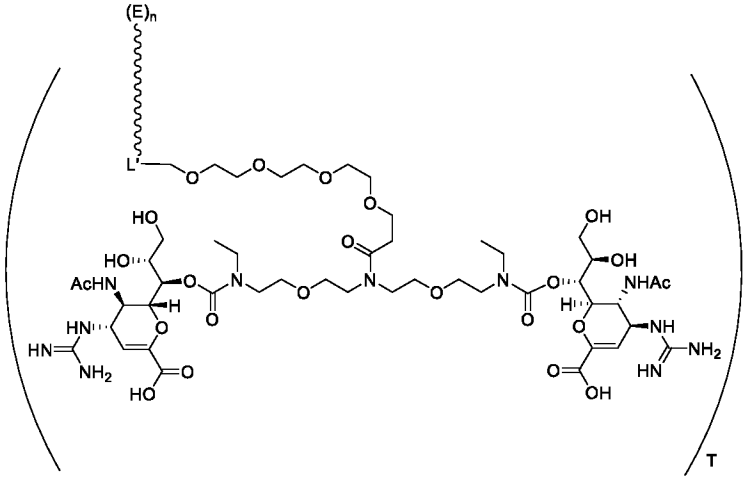
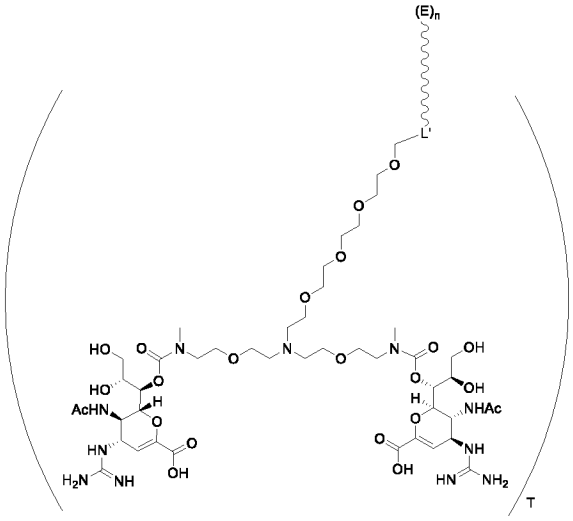
ПС 65	(D-I)	
ПС 67	(D-I)	
ПС 68	(D-I)	

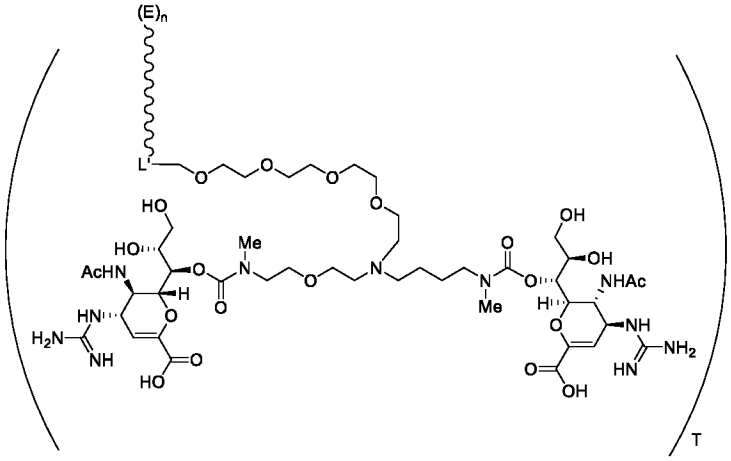
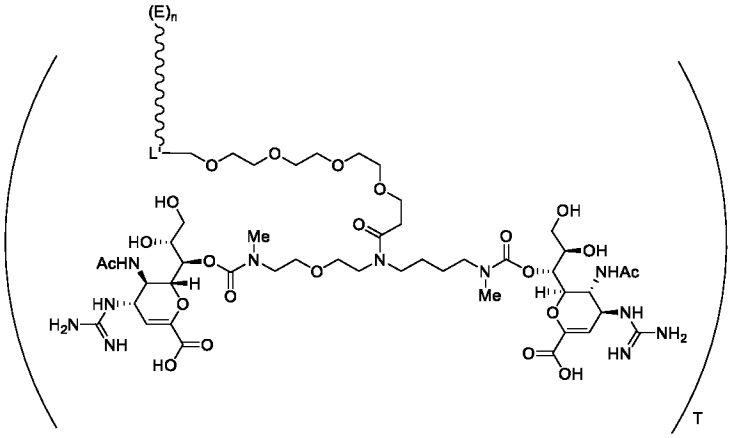
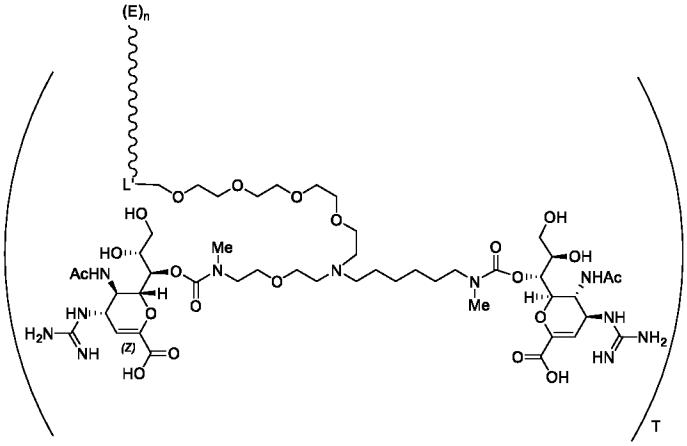
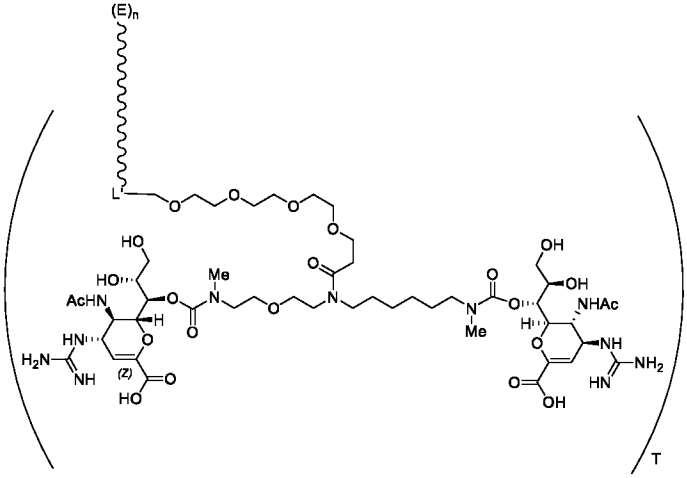
ПС 69	(D-I)	
ПС 70	(D-I)	
ПС 71	(D-I)	

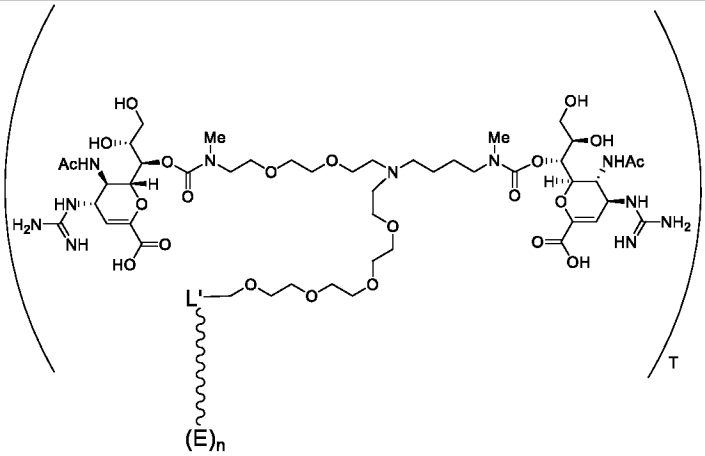
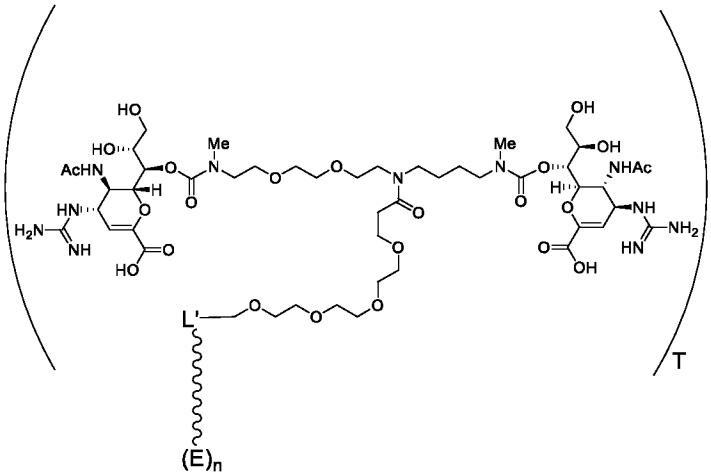
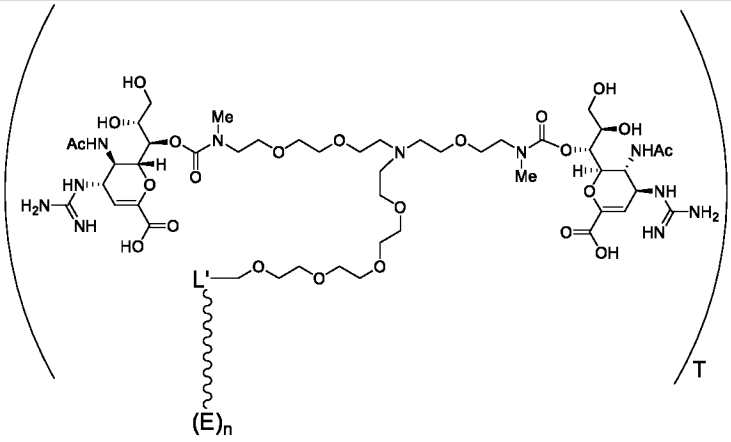
ПС 72	(D-I)	
ПС 73	(D-I)	
ПС 74	(D-I)	

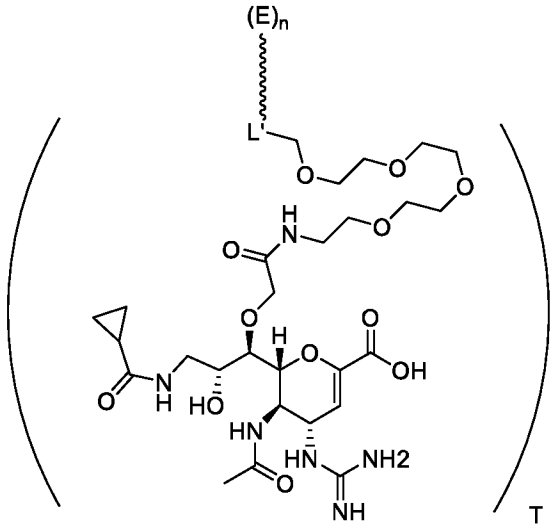
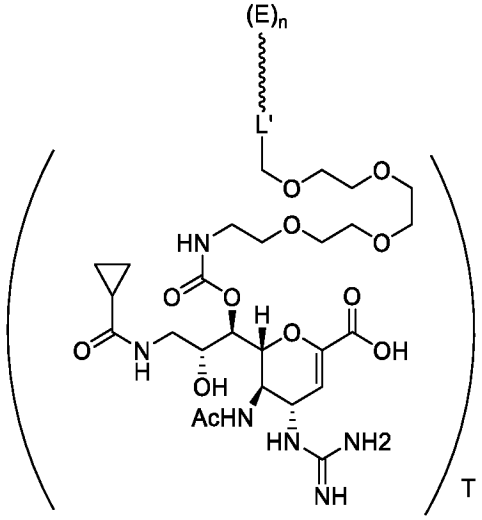
ПС 75	(D-I)	
ПС 76	(D-I)	
ПС 77	(D-I)	

ПС 78	(D-I)	
ПС 79	(D-I)	
ПС 80	(D-I)	

ПС 81	(D-I)	
ПС 82	(D-I)	
ПС 83	(D-I)	

ПС 84	(D-I)	
ПС 85	(D-I)	
ПС 86	(D-I)	
ПС 87	(D-I)	

ПС 88	(D-I)	
ПС 89	(D-I)	
ПС 90	(D-I)	

ПС 91	(M-I)	
ПС 92	(M-I)	

В некоторых вариантах осуществления каждый E включает мономер Fc-домена, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 64. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 77. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 или

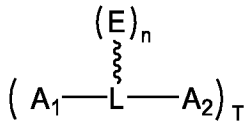
SEQ ID NO: 77. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86. В других вариантах осуществления каждый E включает мономер домена Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86.

В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, включающий (i) первый фрагмент A_1; (ii) второй фрагмент A_2; (iii) мономер Fc-домена или Fc-домен; и (iv) линкер, ковалентно присоединенный к A_1 и A_2, и к мономеру Fc-домена или Fc-домену; где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII). В некоторых вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI) или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из формулы (A-I). В предпочтительном варианте осуществления вышеизложенного x равно 2.

В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, включающий (i) первый фрагмент ПС; (ii) мономер домена Fc или домен Fc; и (iv) линкер, ковалентно присоединенный к ПС и к мономеру домена Fc или домену Fc; где каждый ПС независимо выбран из любого из промежуточных соединений таблицы 1a.

В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, включающий (i) первый фрагмент A_1; (ii) второй фрагмент A_2; (iii) белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид; и (iv) линкер, ковалентно присоединенный к A_1 и A_2, и к белку альбумину, связывающему белок альбумин пептиду, или Fc-связывающему; где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII). В некоторых вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI) или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из формулы (A-I). В предпочтительном варианте осуществления вышеизложенного x равно 2.

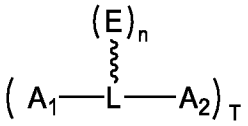
В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (D-I):



(D-I)

где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII); каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), пептид, связывающий белок альбумин, или связывающий Fc пептид; n равно 1 или 2; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, T равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); и L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к каждому из E, A_1 и A_2, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI) или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый из A_1 и A_2 может быть независимо выбран из формулы (A-I).

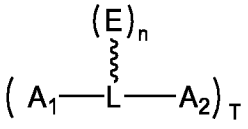
В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (D-I):



(D-I)

где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-V); каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), пептид, связывающий белок альбумин, или связывающий Fc пептид; n равно 1 или 2; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, T равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); и L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к каждому из E, A_1 и A_2, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе).

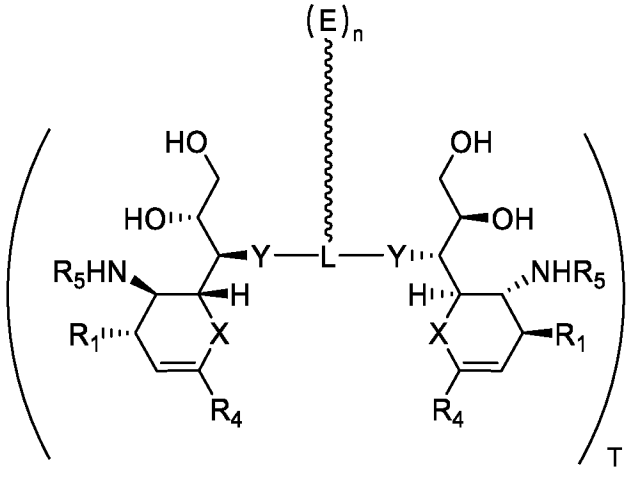
В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (D-I):



(D-I)

где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-VI)-(A-IX); каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), пептид, связывающий белок альбумин, или связывающий Fc пептид; n равно 1 или 2; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, T равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); и L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к каждому из E, A_1 и A_2, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе).

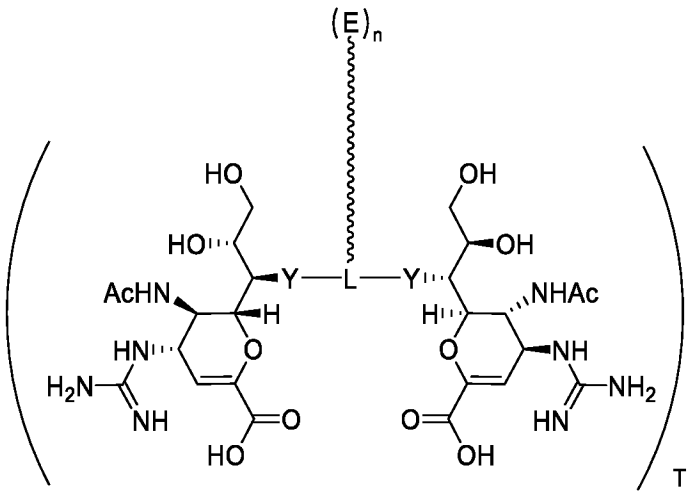
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II):



(D-II)

или его фармацевтически приемлемая соль.

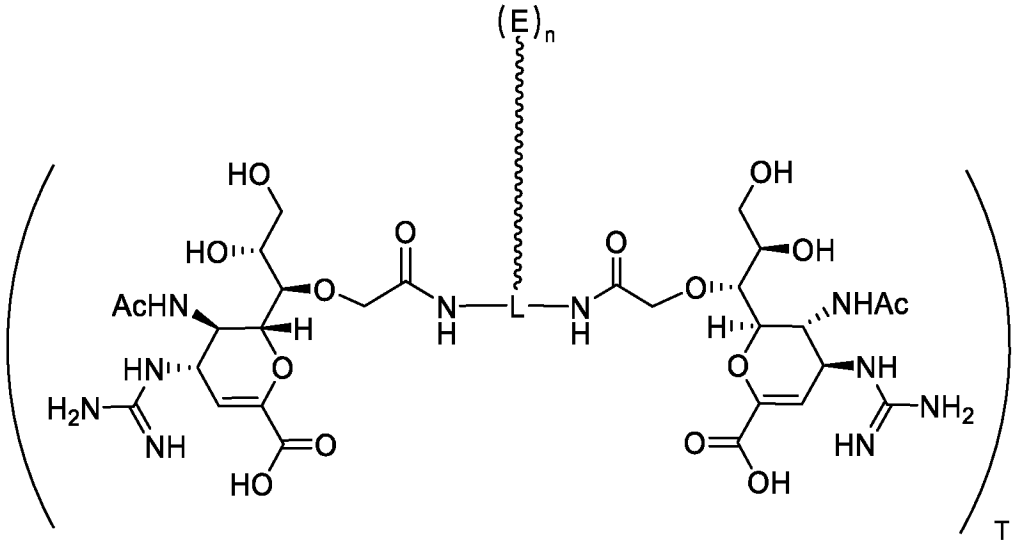
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-1):



(D-II-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

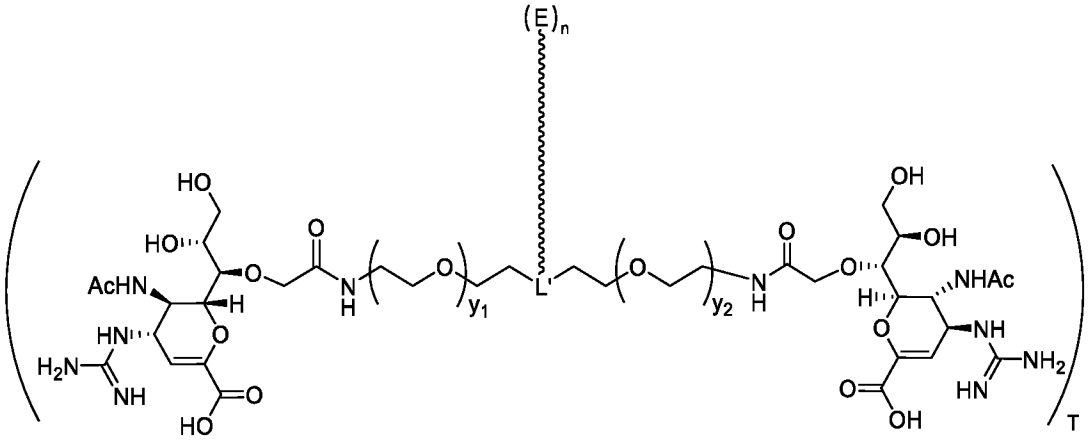
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-2):



(D-II-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-3):

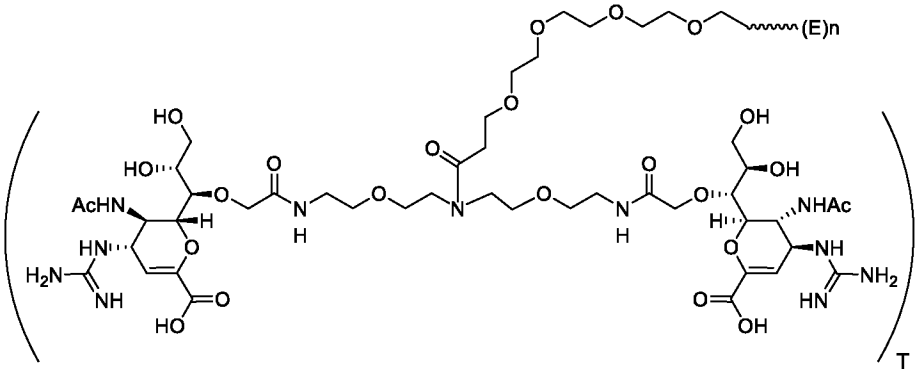


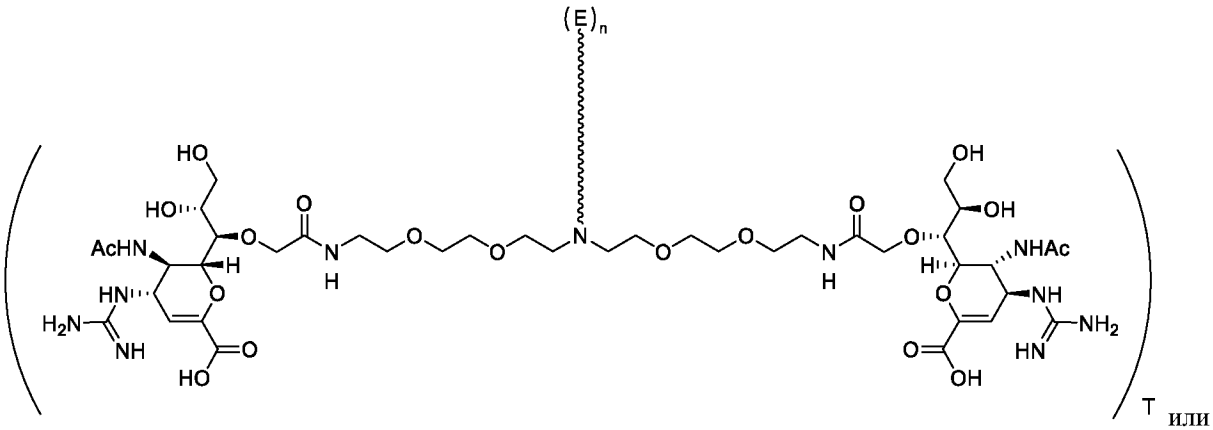
(D-II-3)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20

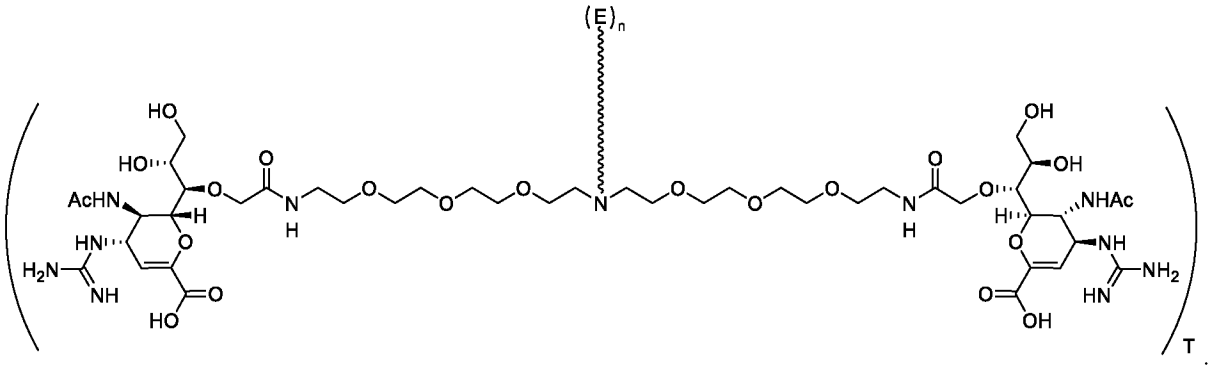
(например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру, выбранную из:

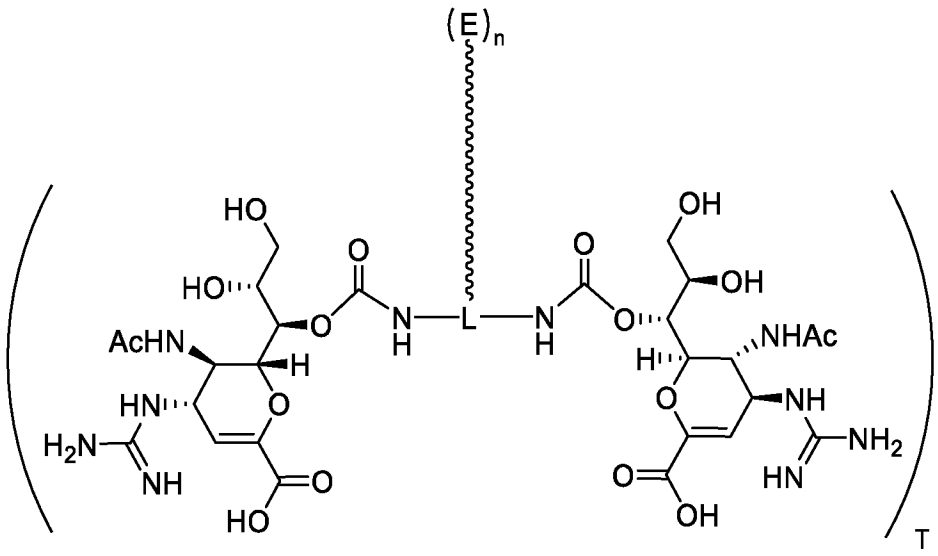




или



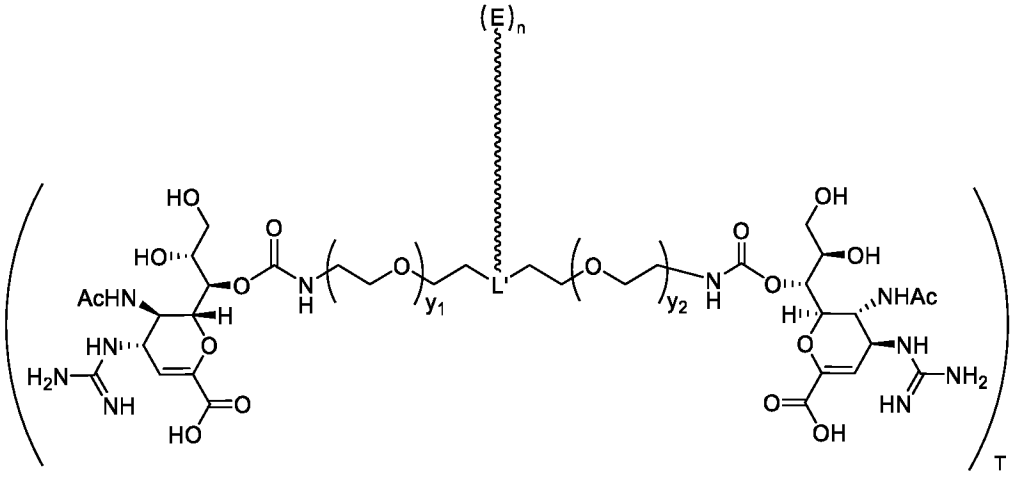
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-4):



(D-II-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

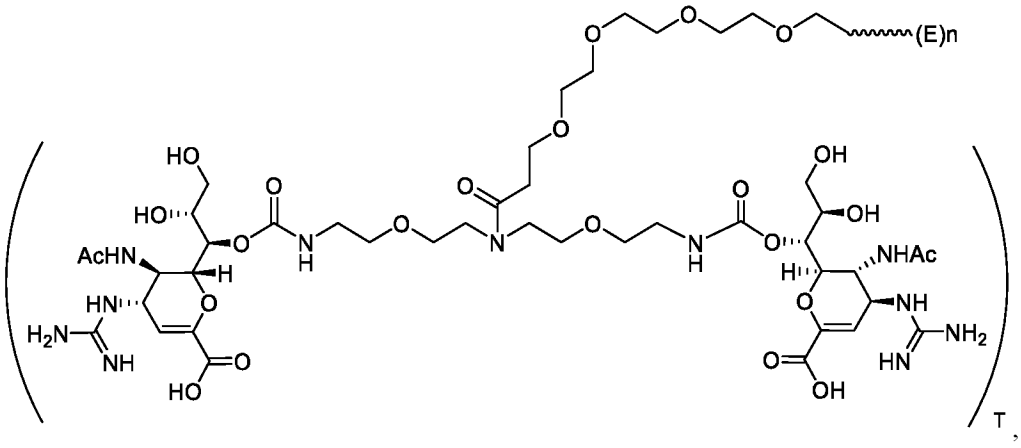
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-5):

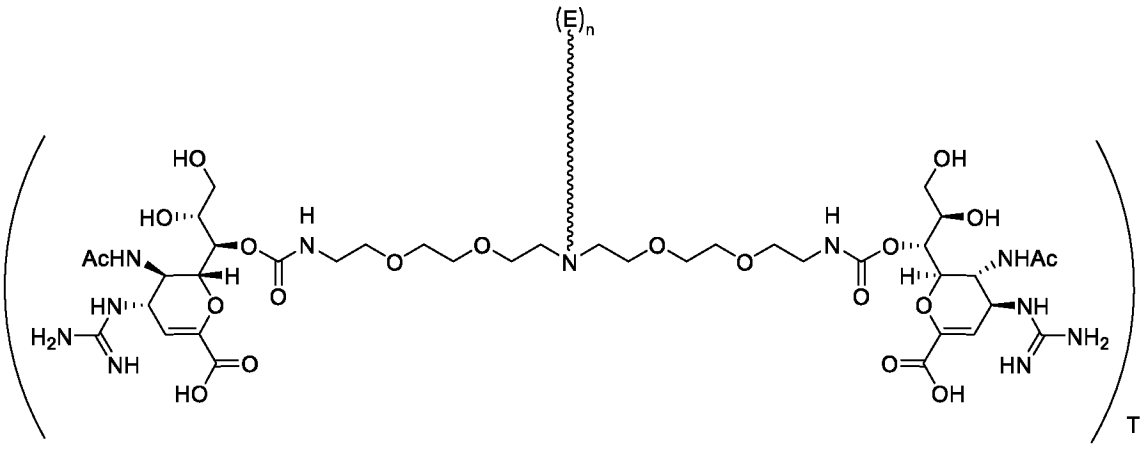


(D-II-5)

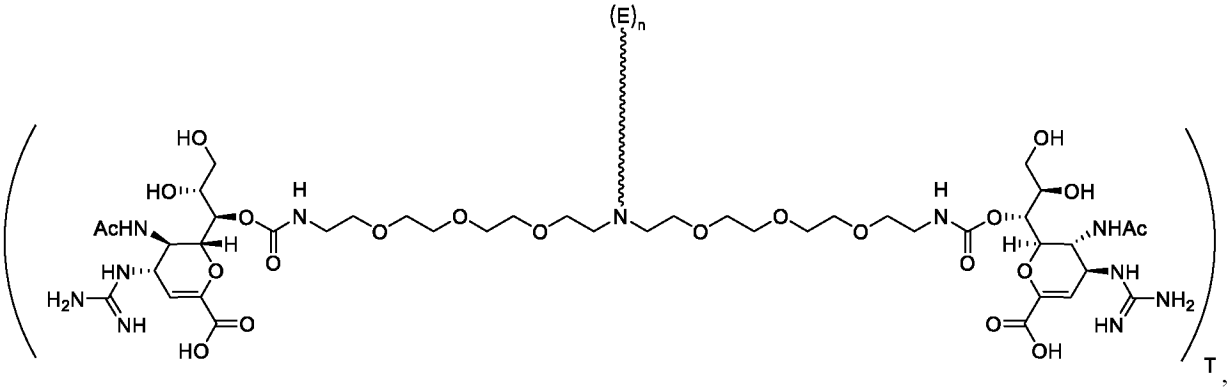
где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру, выбранную из:



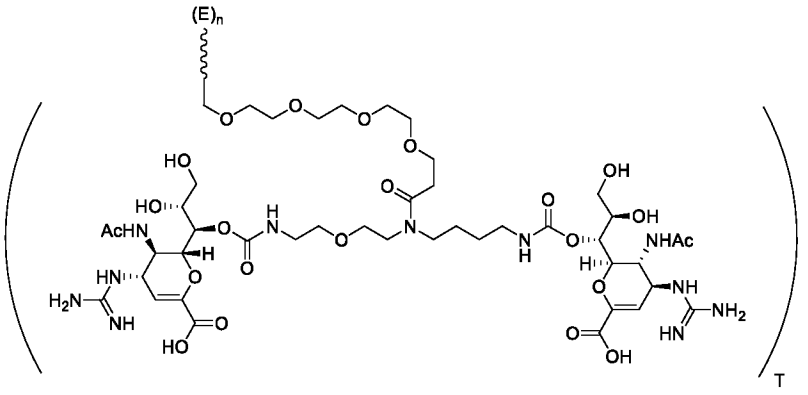


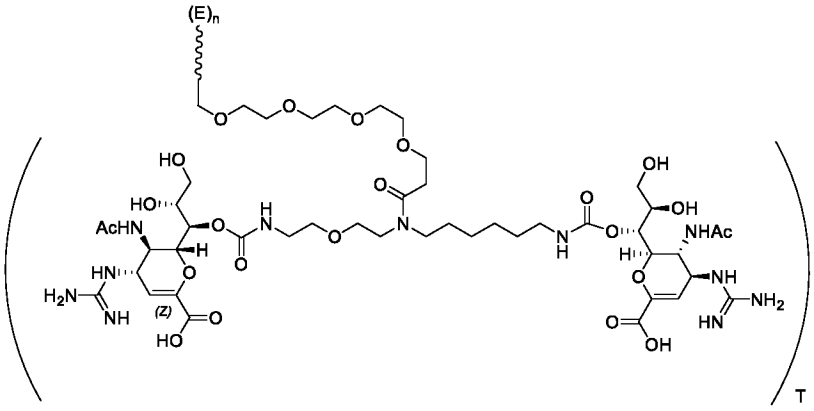
или

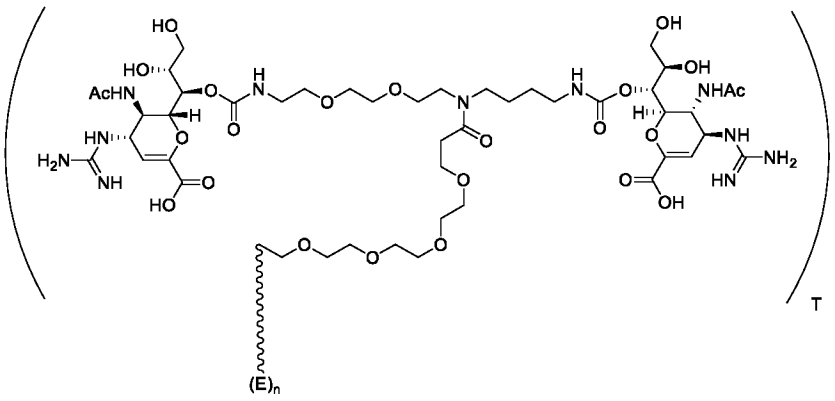


или его фармацевтически приемлемая соль.

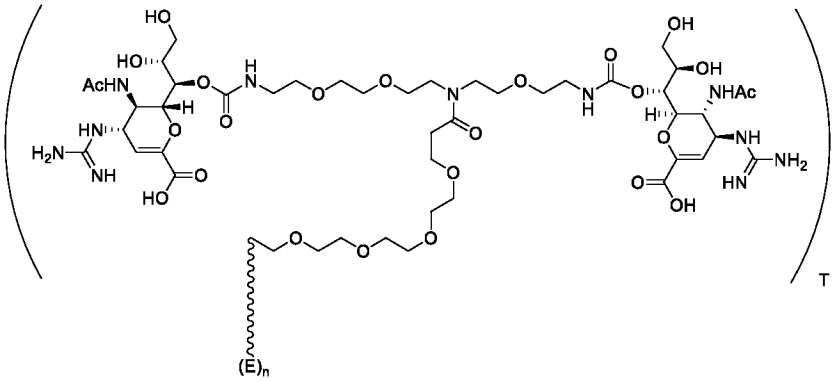
В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру, выбранную из:







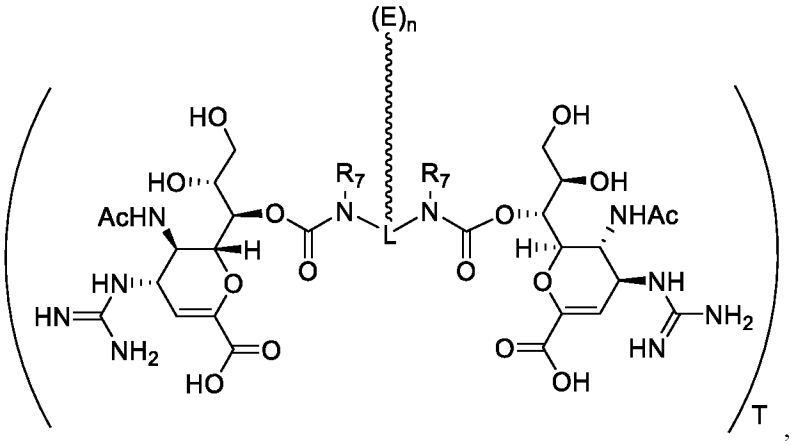
или



,

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-6):

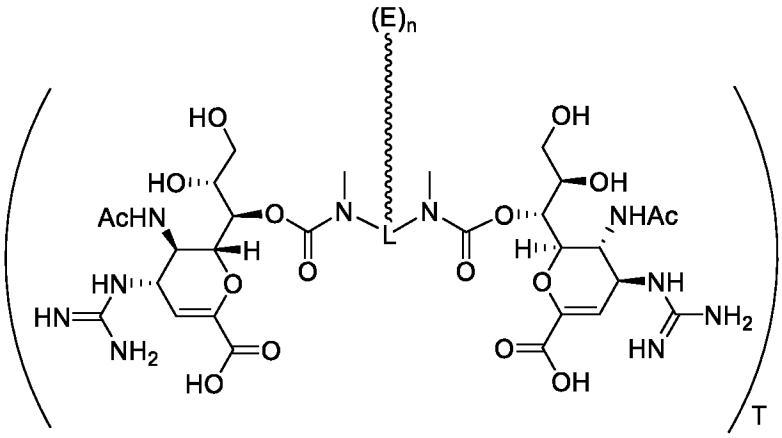


,

(D-II-6)

где R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила или их фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления R_7 выбран из C1-C20 алкила (например, метила, этила, пропила или бутила).

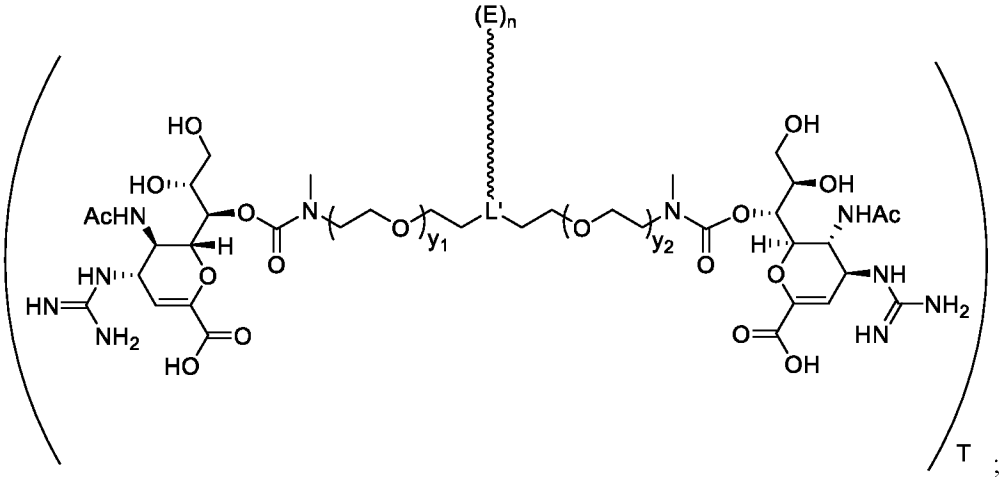
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-7):



(D-II-7)

или его фармацевтически приемлемая соль.

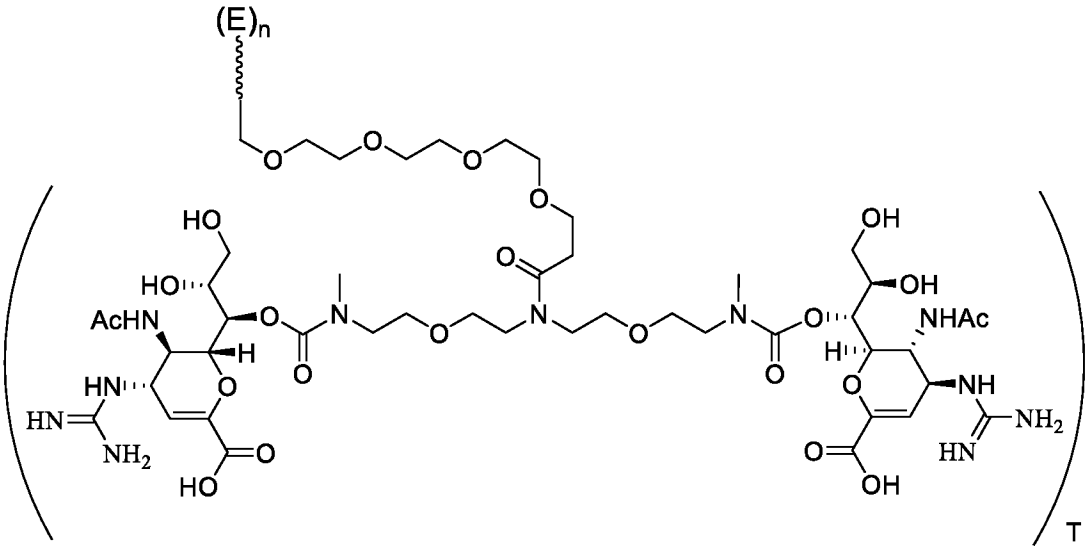
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-8):



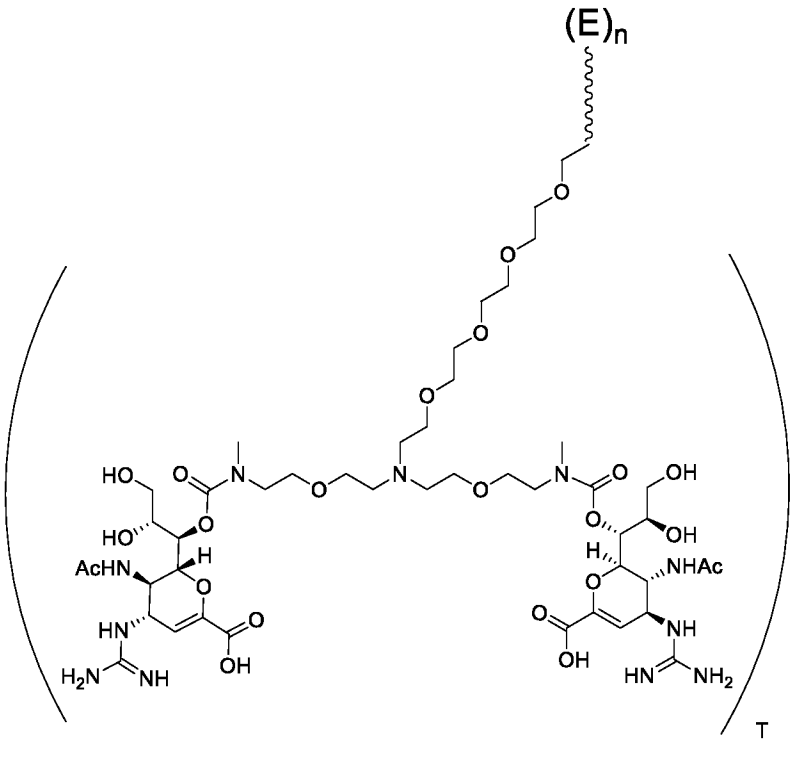
(D-II-8)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру



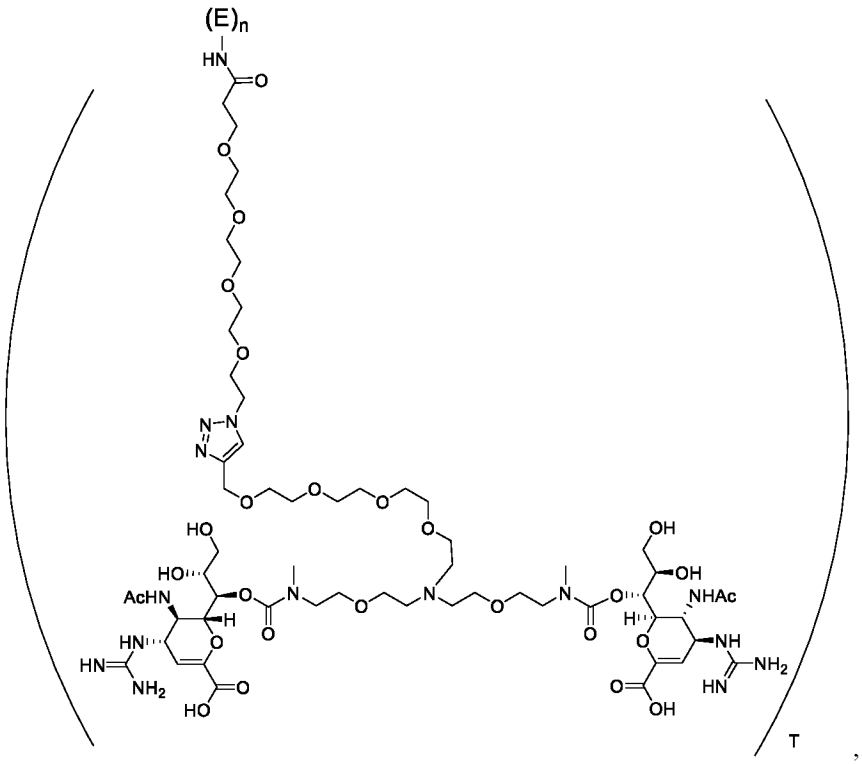
или



,

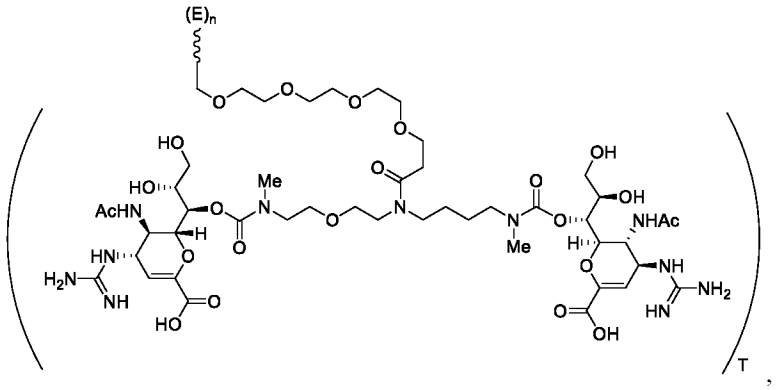
или его фармацевтически приемлемая соль.

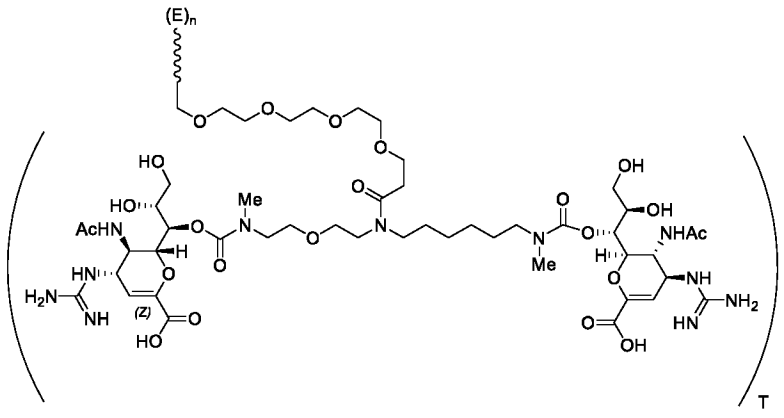
В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру

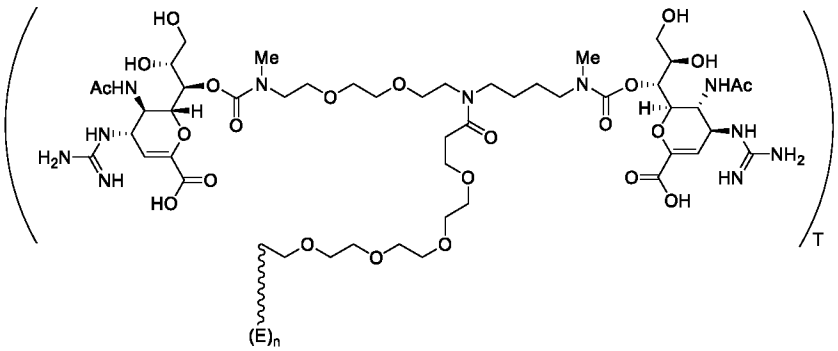


или его фармацевтически приемлемая соль.

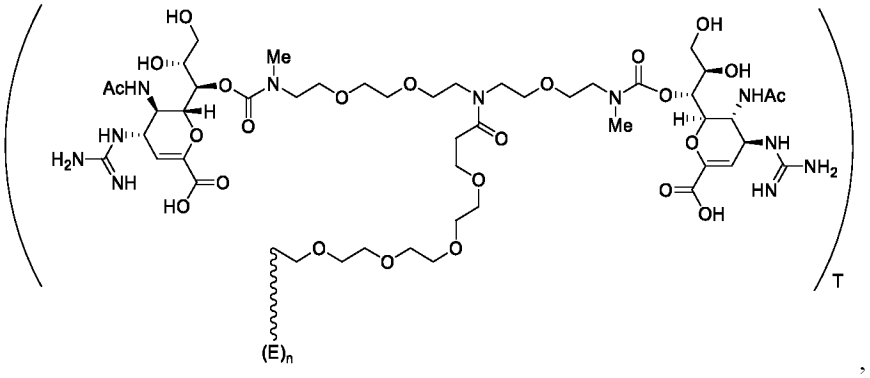
В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру







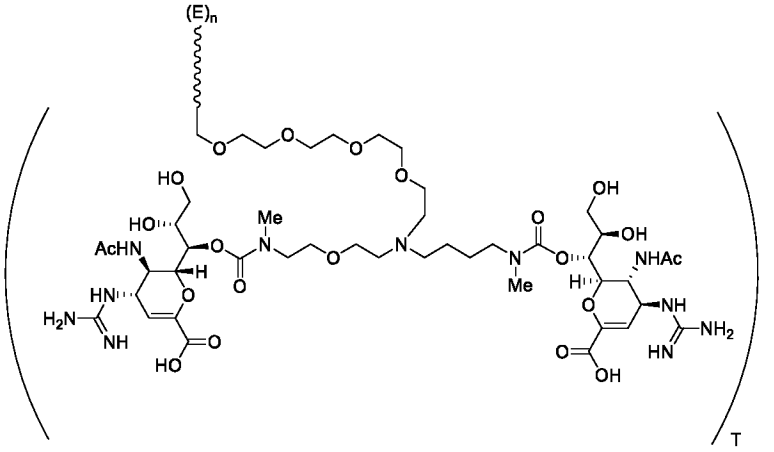
или



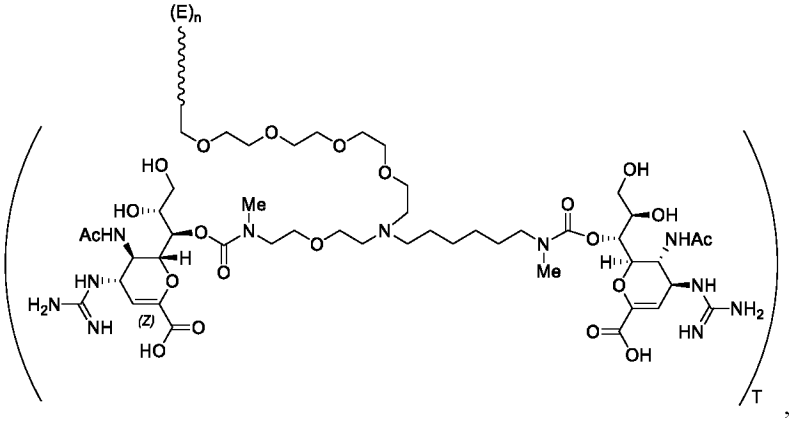
,

или его фармацевтически приемлемая соль.

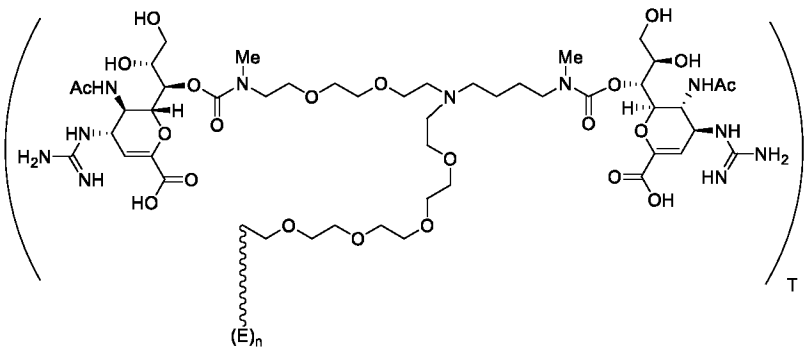
В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру



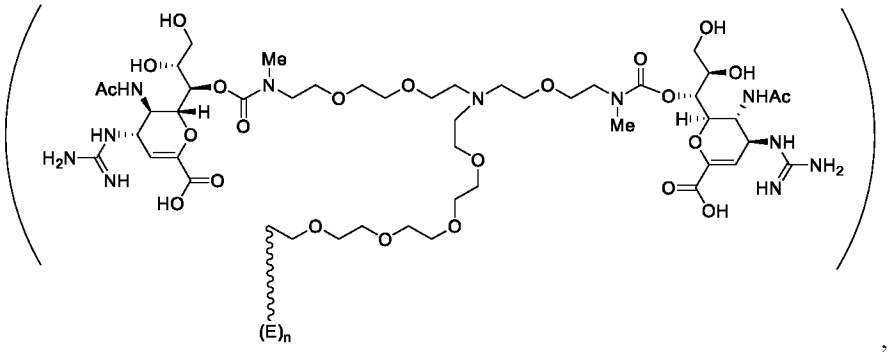
,



,



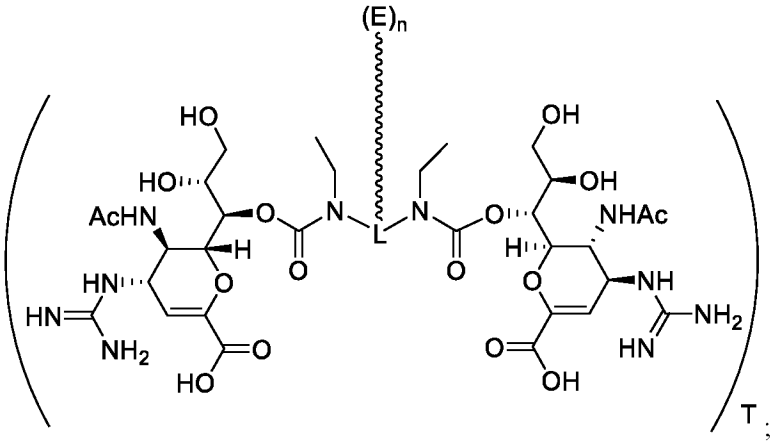
или



,

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-9):

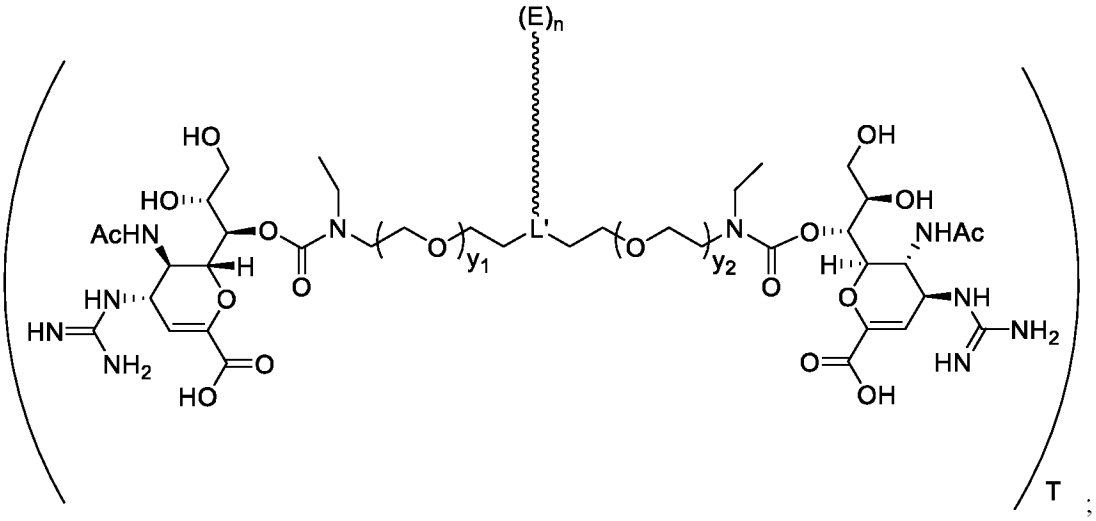


;

(D-II-9)

или его фармацевтически приемлемая соль.

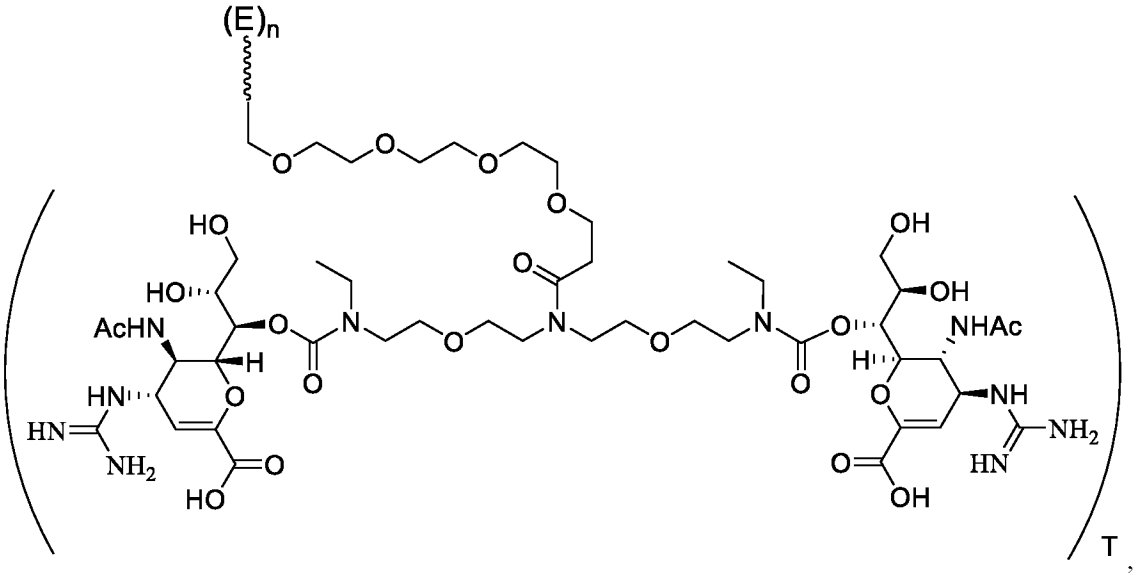
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-10):



(D-II-10)

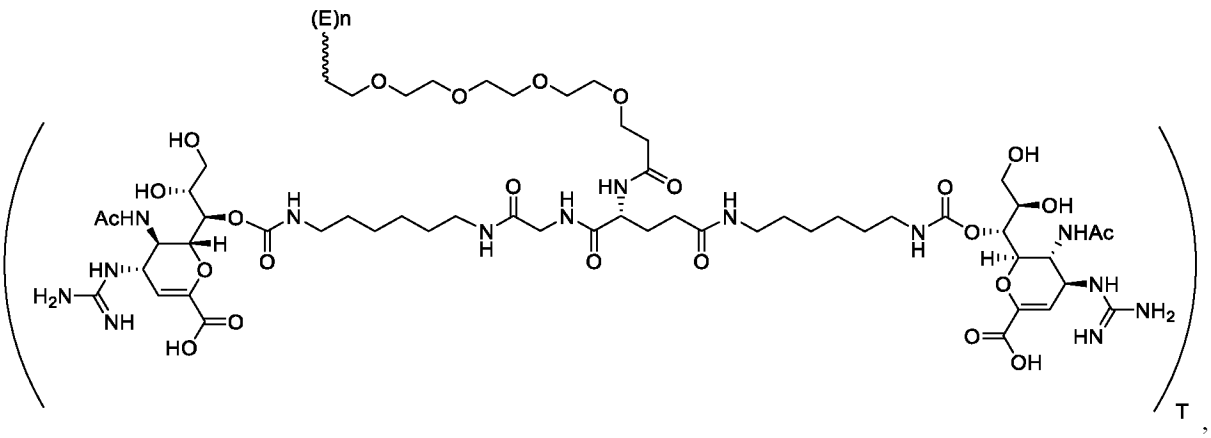
где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру



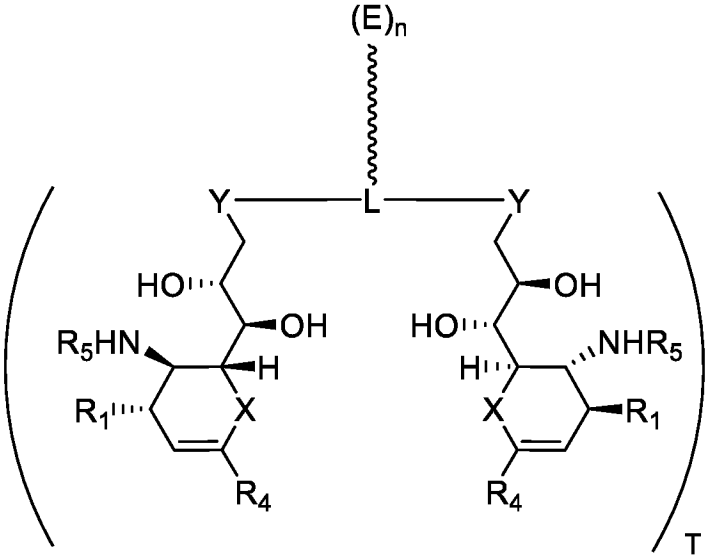
или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

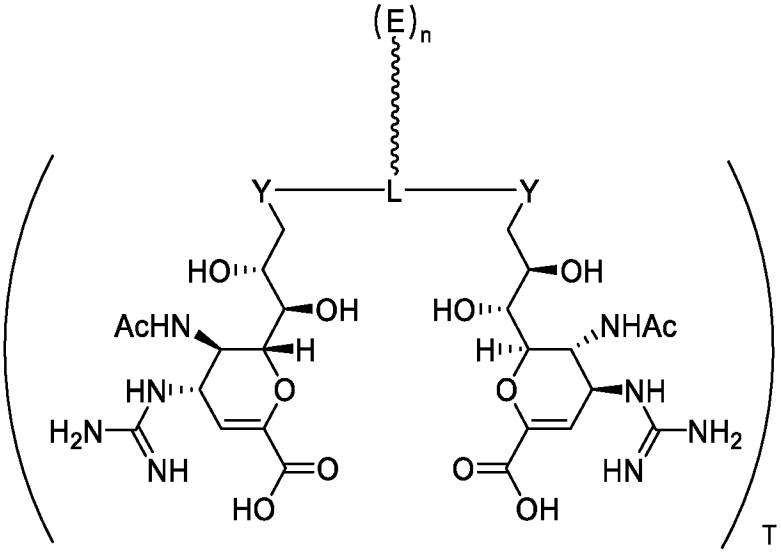
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-III):



(D-III)

или его фармацевтически приемлемая соль.

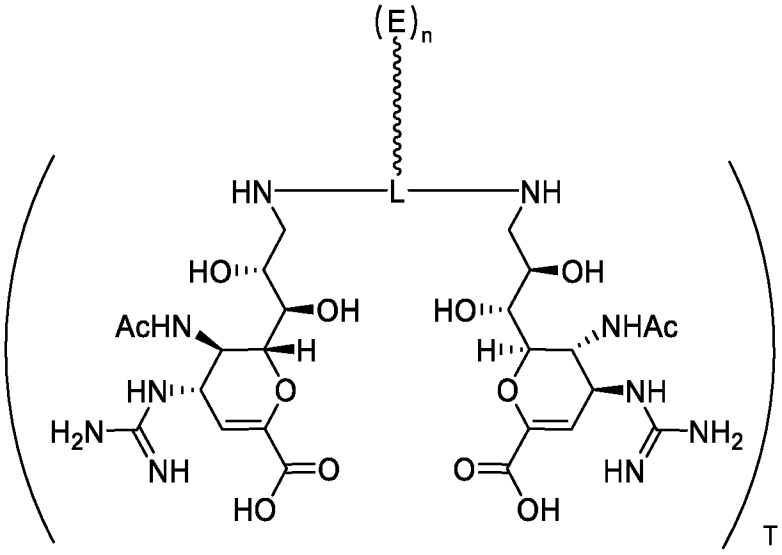
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-III-1):



(D-III-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

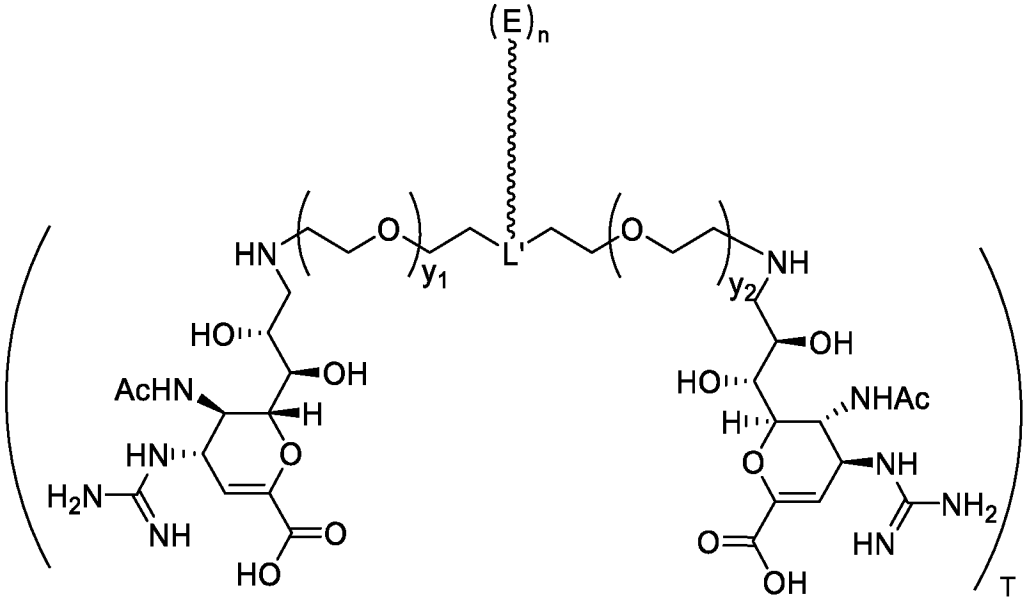
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-III-2):



(D-III-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

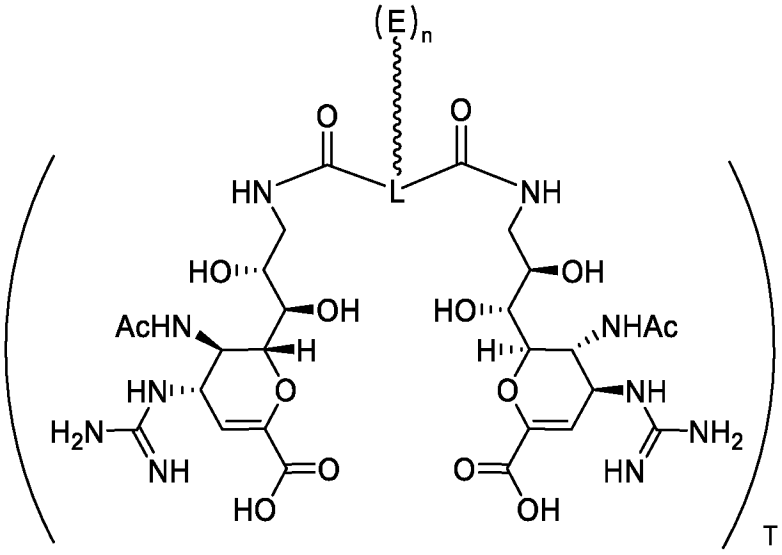
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-III-3):



(D-III-3)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

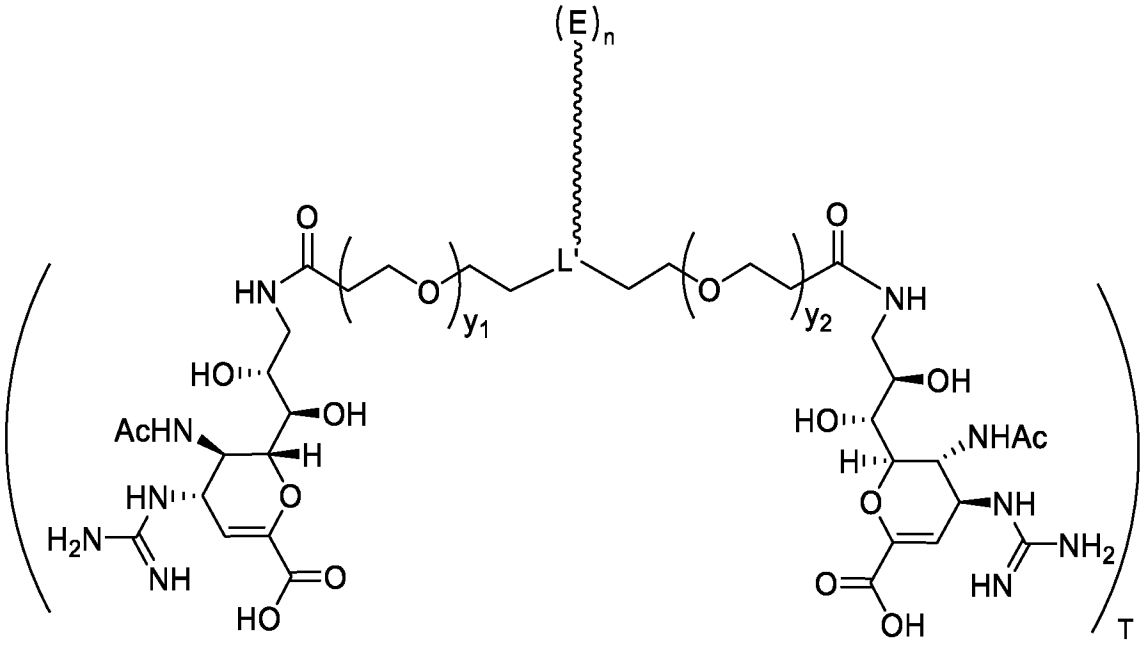
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-III-4):



(D-III-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

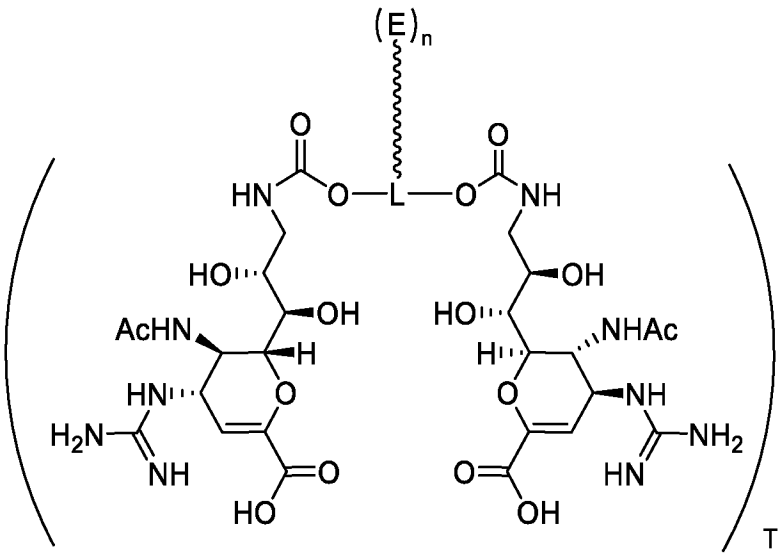
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-III-5):



(D-III-5)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

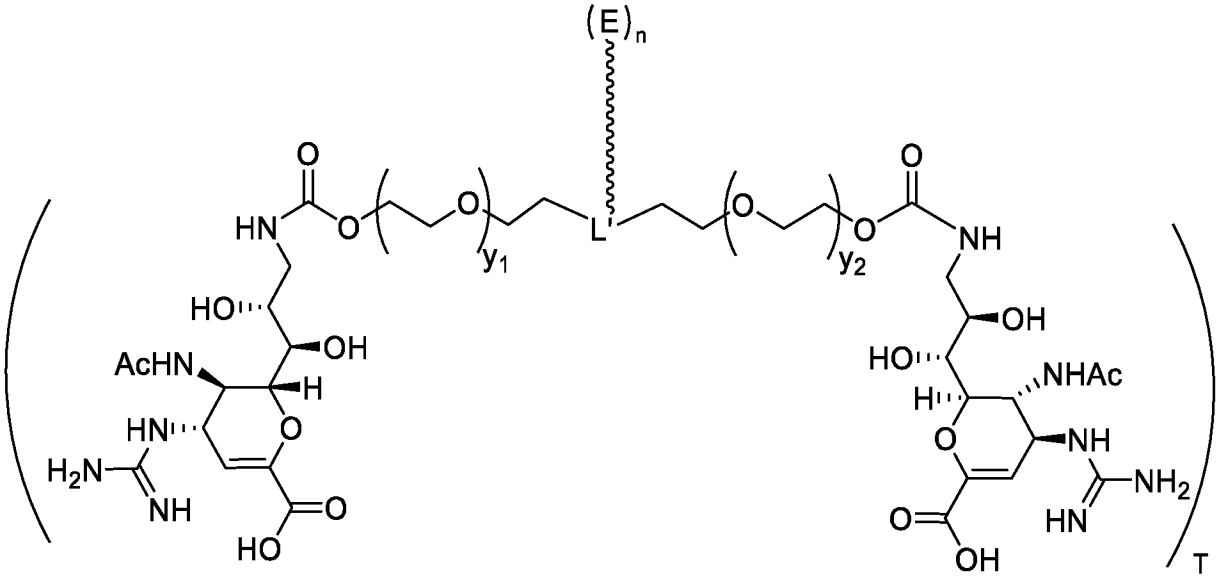
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-III-6):



(D-III-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

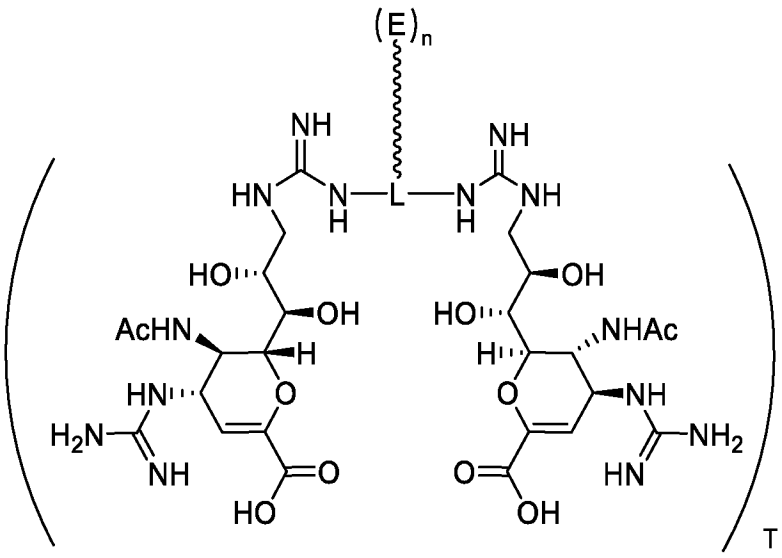
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-III-7):



(D-III-7)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

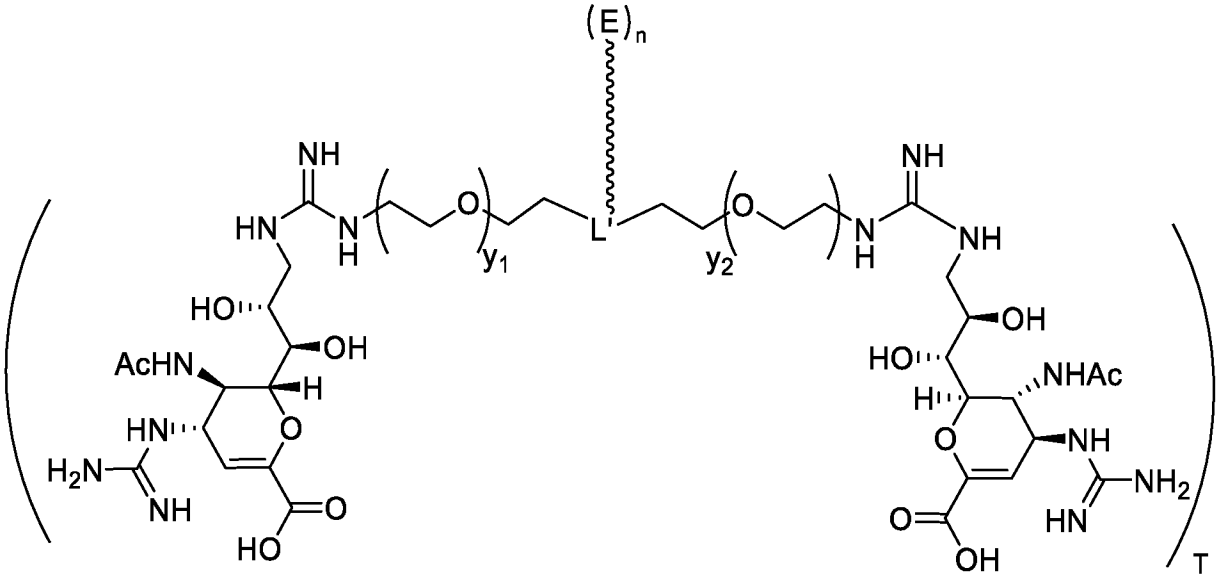
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-III-8):



(D-III-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

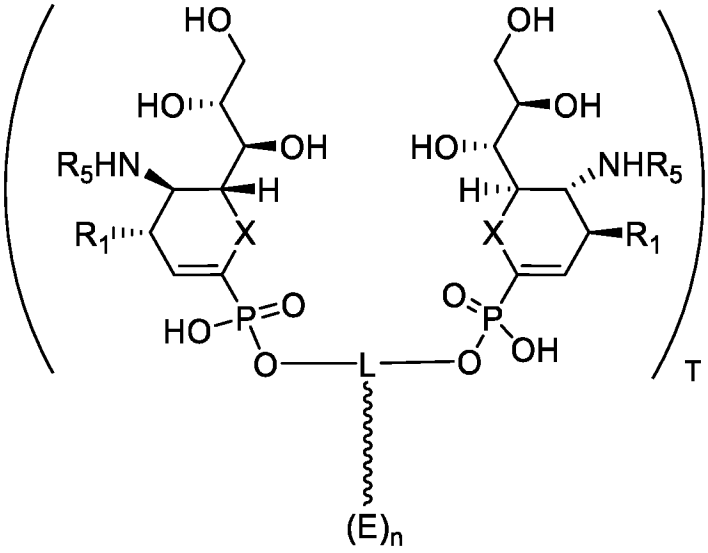
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-III-9):



(D-III-9)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

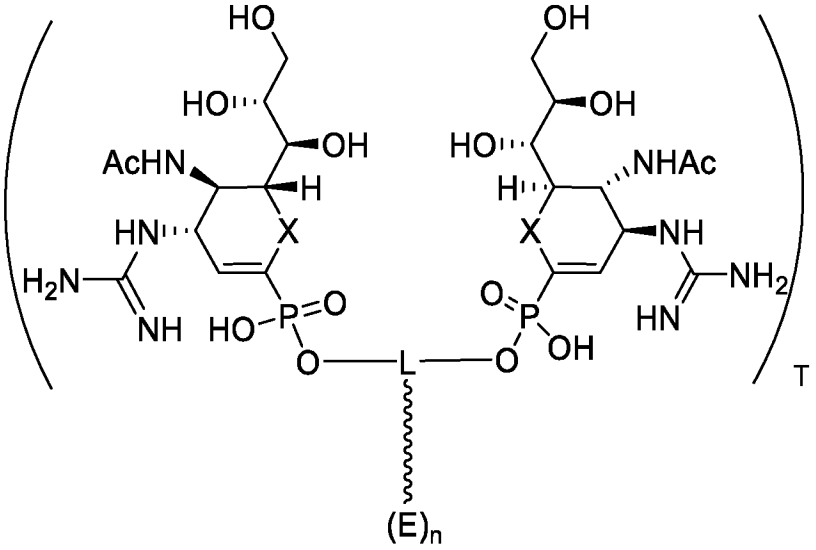
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-IV):



(D-IV)

или его фармацевтически приемлемая соль.

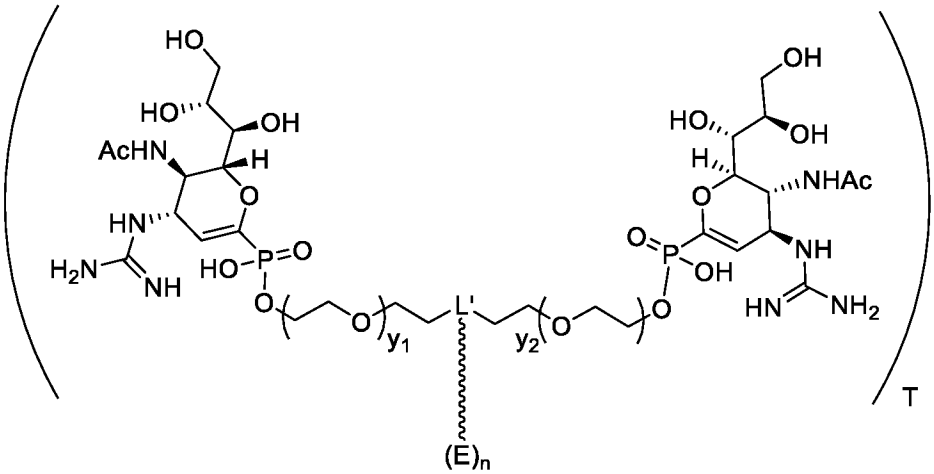
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-IV-1):



(D-IV-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

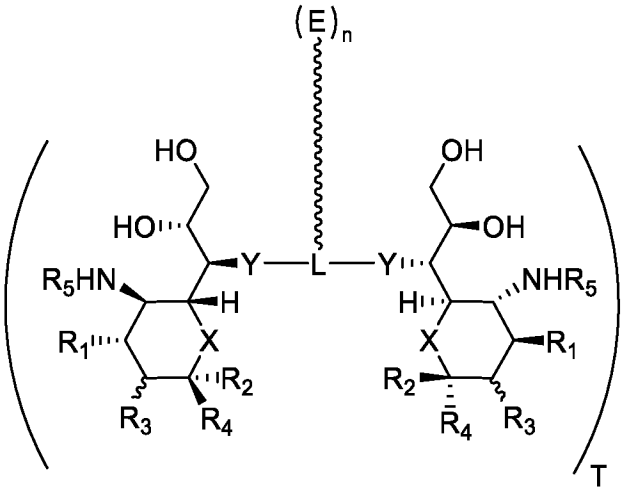
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-IV-2):



(D-IV-2)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

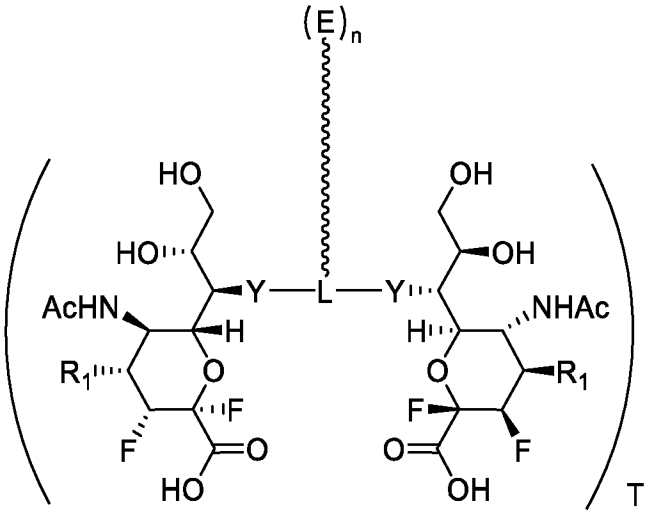
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V):



(D-V)

или его фармацевтически приемлемая соль.

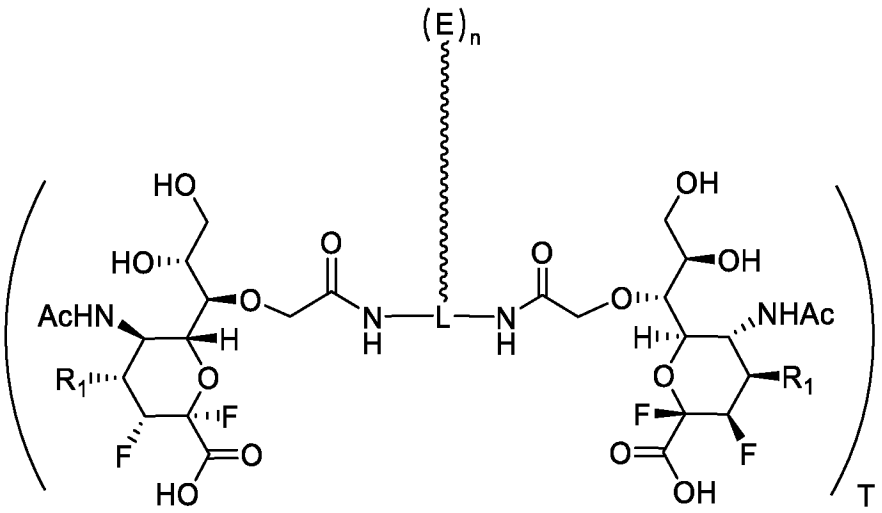
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V-1):



(D-V-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

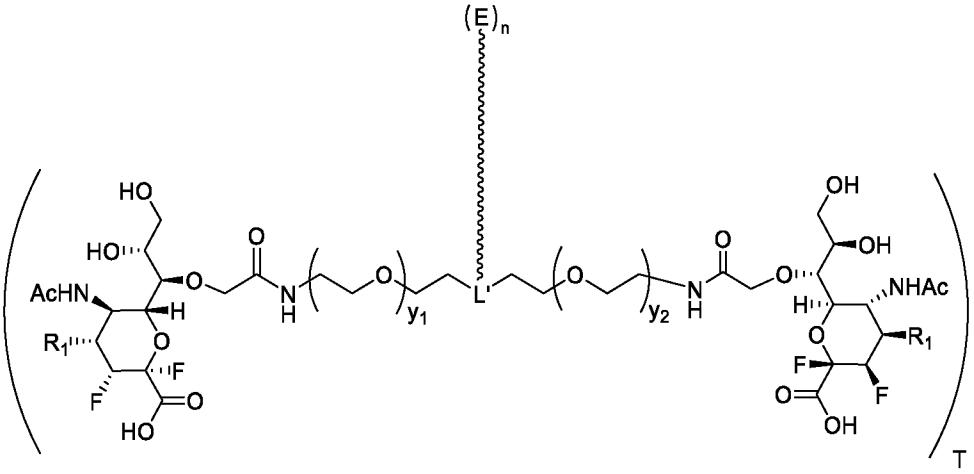
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V-2):



(D-V-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

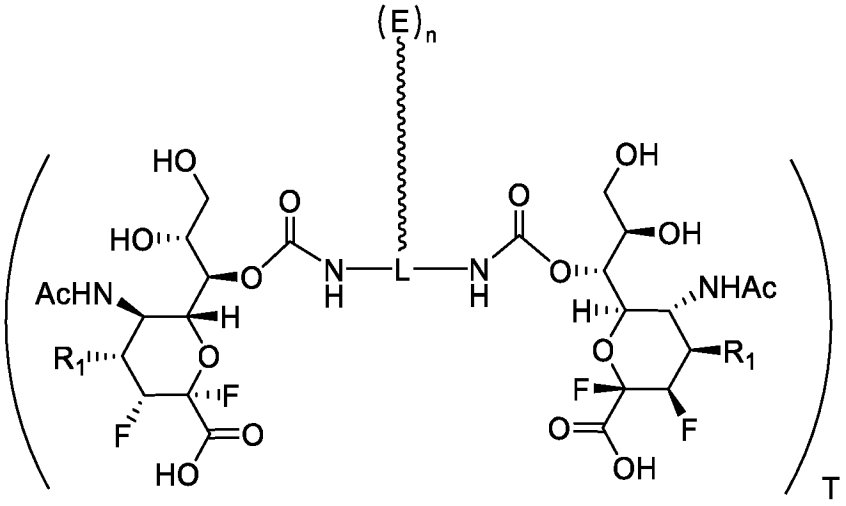
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V-3):



(D-V-3)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота. В некоторых вариантах осуществления y_1 и y_2, каждое равно 1, y_1 и y_2, каждый, равен 2, или y_1 и y_2, каждый, равен 3.

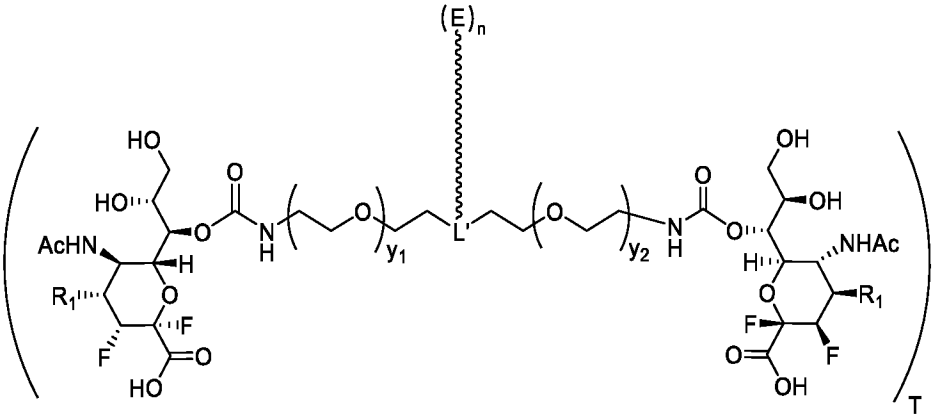
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V-4):



(D-V-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

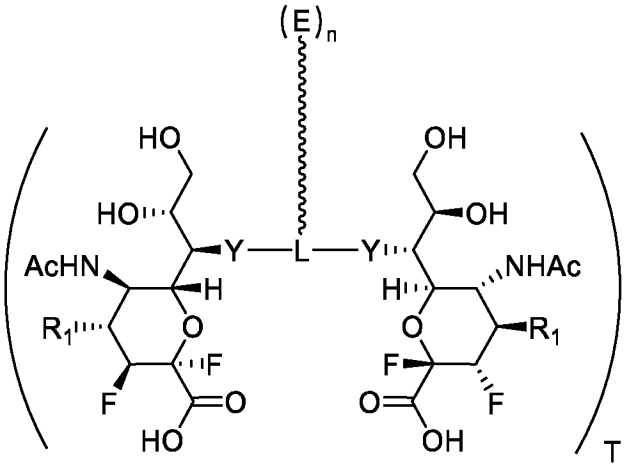
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V-5):



(D-V-5)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота. В некоторых вариантах осуществления y_1 и y_2, каждое равно 1, y_1 и y_2, каждый, равен 2, или y_1 и y_2, каждый, равен 3.

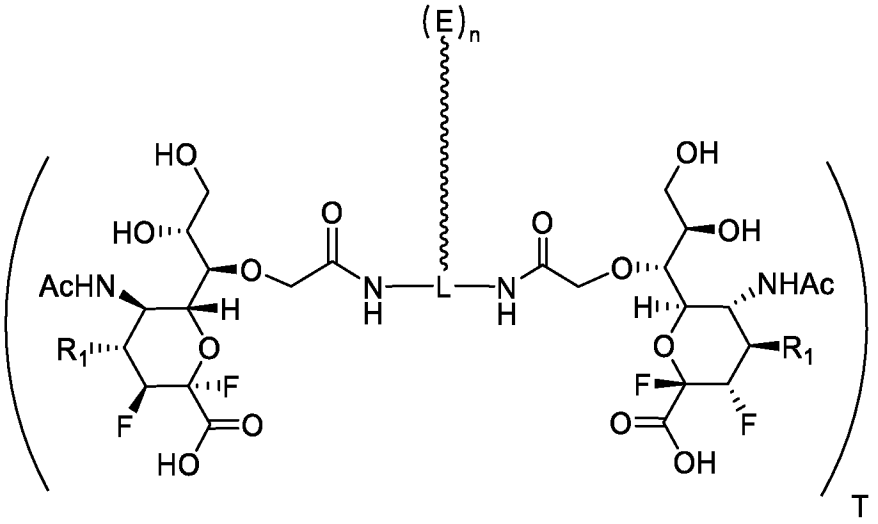
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V-6):



(D-V-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

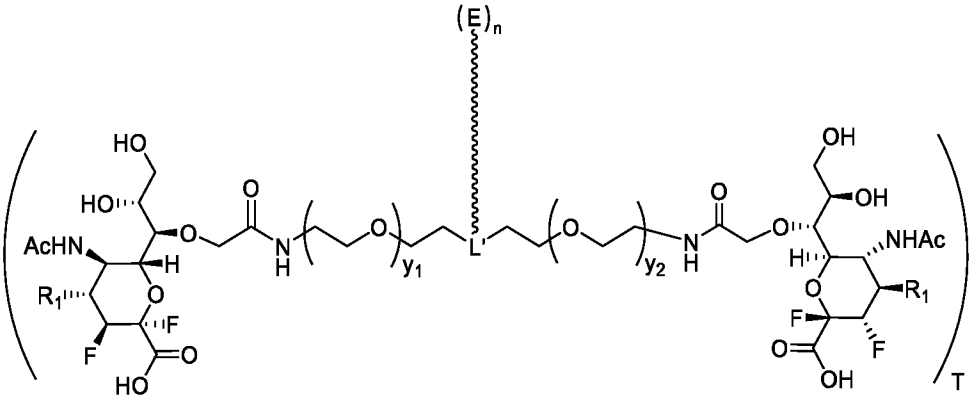
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V-7):



(D-V-7)

или его фармацевтически приемлемая соль.

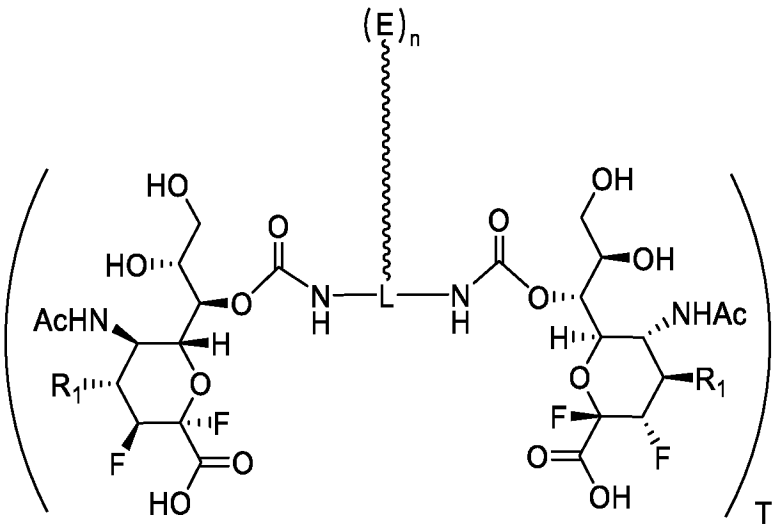
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V-8):



(D-V-8)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота. В некоторых вариантах осуществления y_1 и y_2, каждое равно 1, y_1 и y_2, каждый, равен 2, или y_1 и y_2, каждый, равен 3.

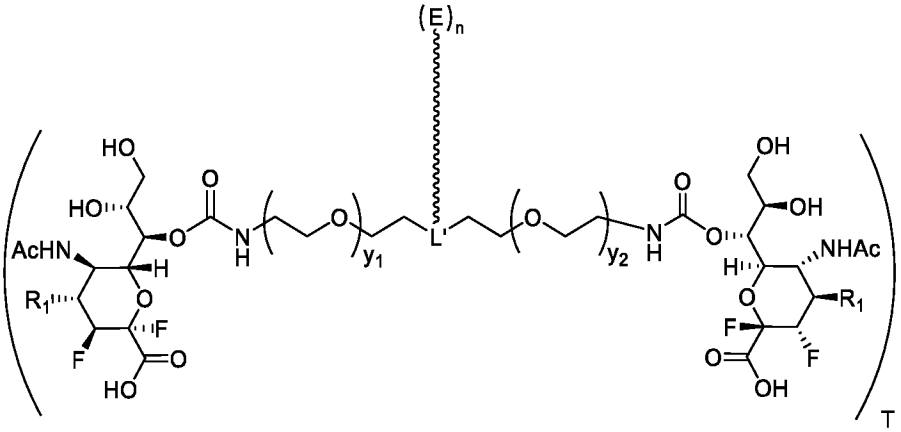
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V-9):



(D-V-9)

или его фармацевтически приемлемая соль.

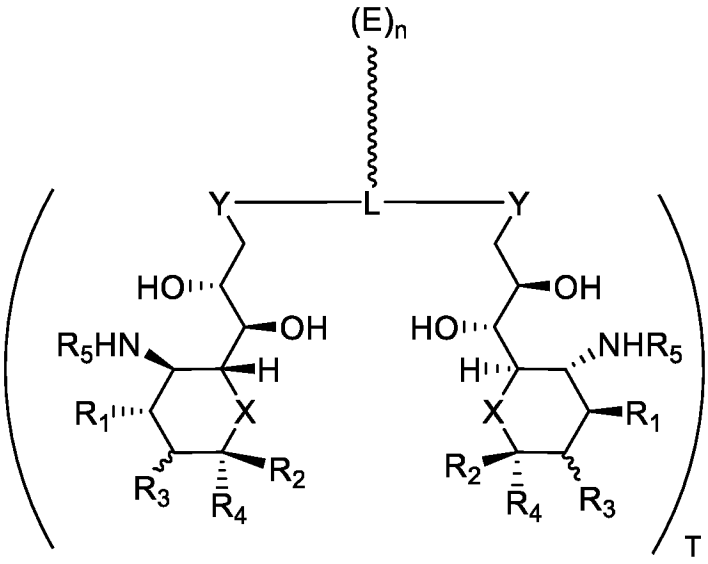
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-V-10):



(D-V-10)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота. В некоторых вариантах осуществления y_1 и y_2, каждое равно 1, y_1 и y_2, каждый, равен 2, или y_1 и y_2, каждый, равен 3.

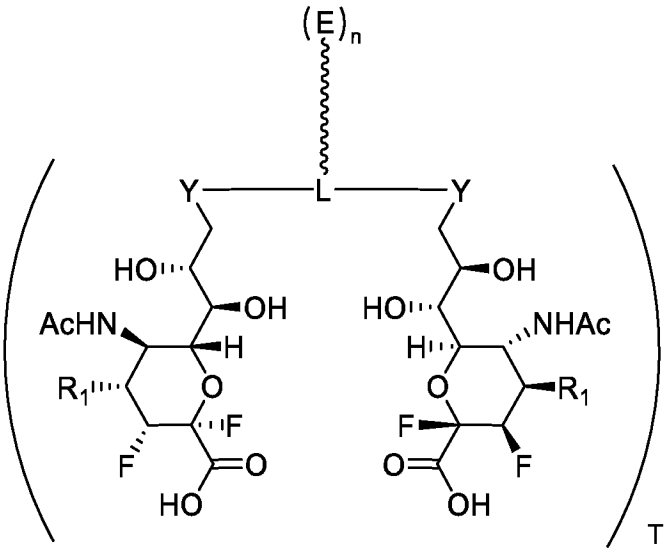
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VI):



(D-VI)

или его фармацевтически приемлемая соль.

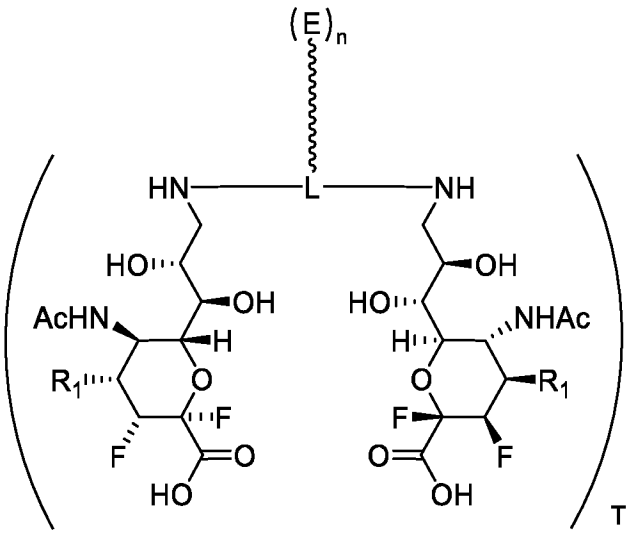
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VI-1):



(D-VI-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

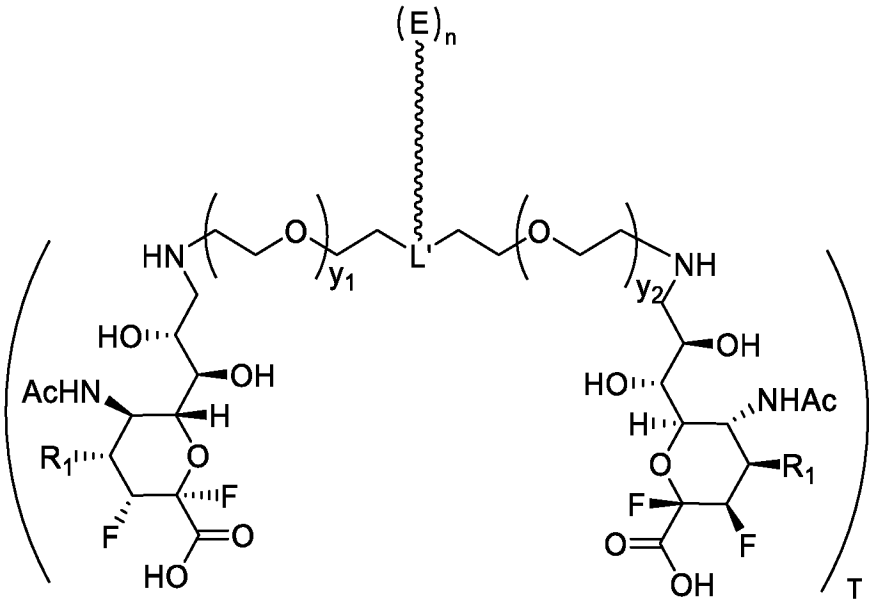
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VI-2):



(D-VI-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

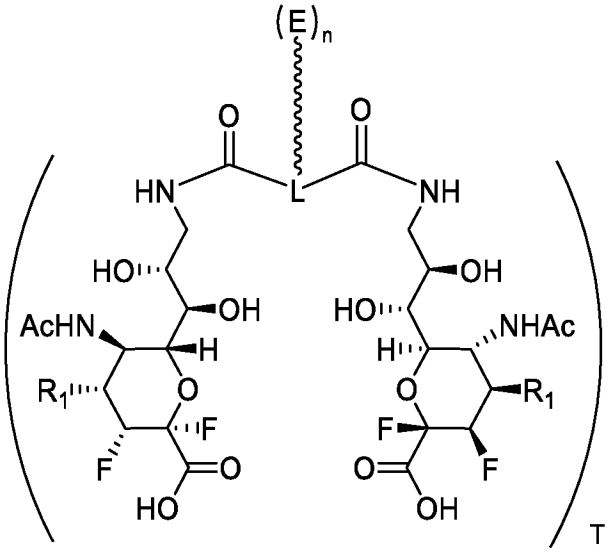
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VI-3):



(D-VI-3)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота. В некоторых вариантах осуществления y_1 и y_2, каждое равно 1, y_1 и y_2, каждый, равен 2, или y_1 и y_2, каждый, равен 3.

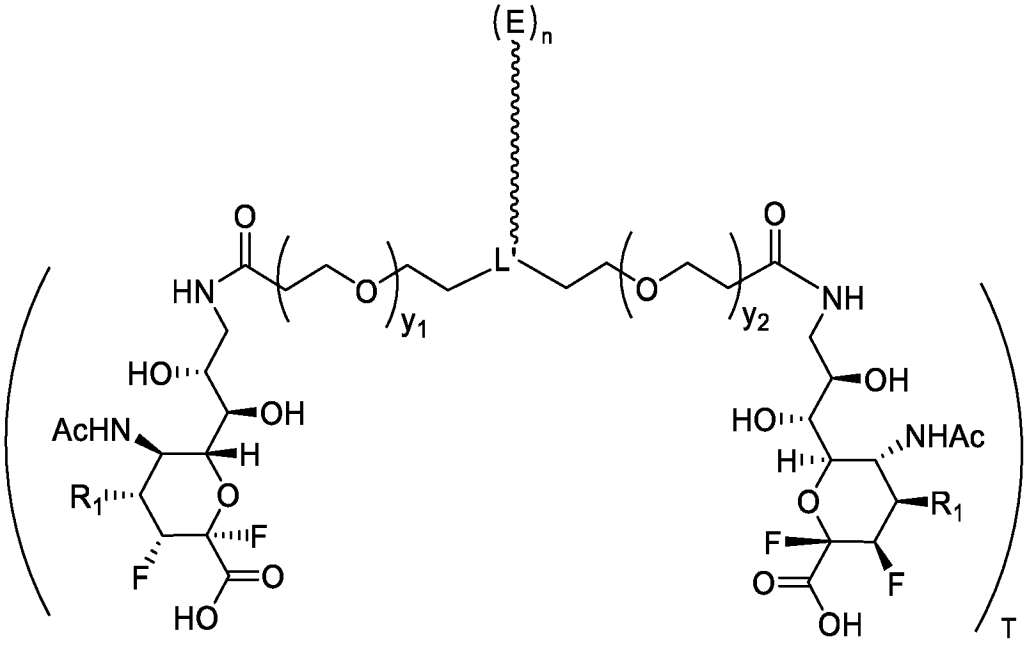
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VI-4):



(D-VI-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

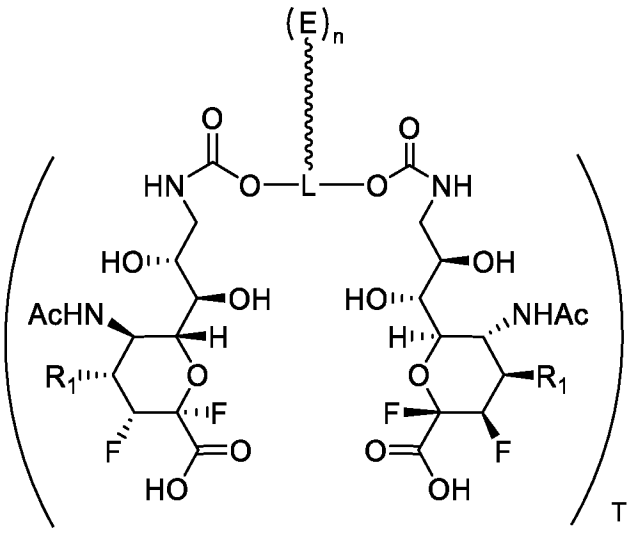
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VI-5):



(D-VI-5)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота. В некоторых вариантах осуществления y_1 и y_2, каждое равно 1, y_1 и y_2, каждый, равен 2, или y_1 и y_2, каждый, равен 3.

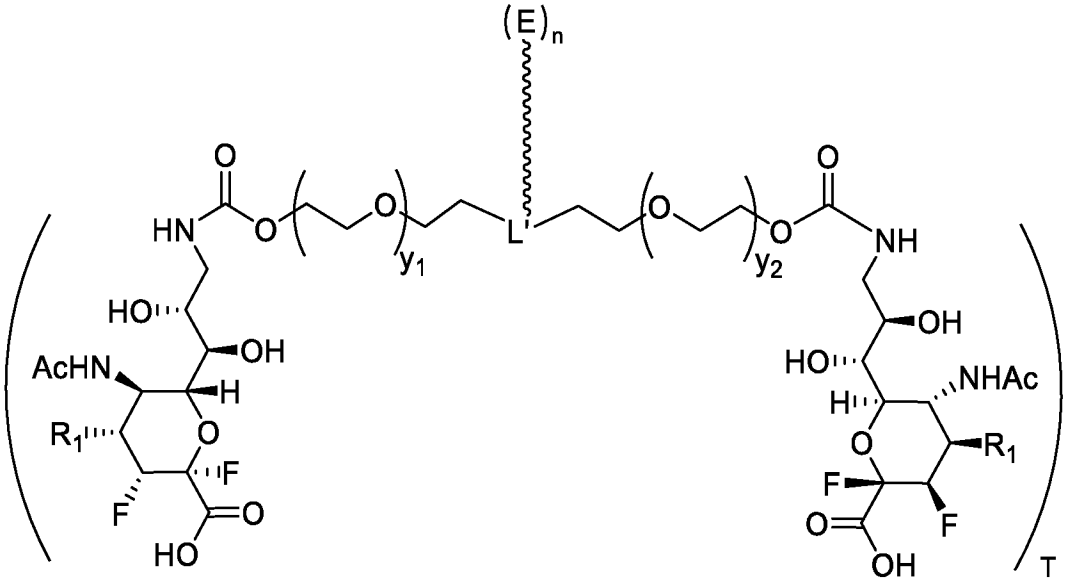
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VI-6):



(D-VI-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

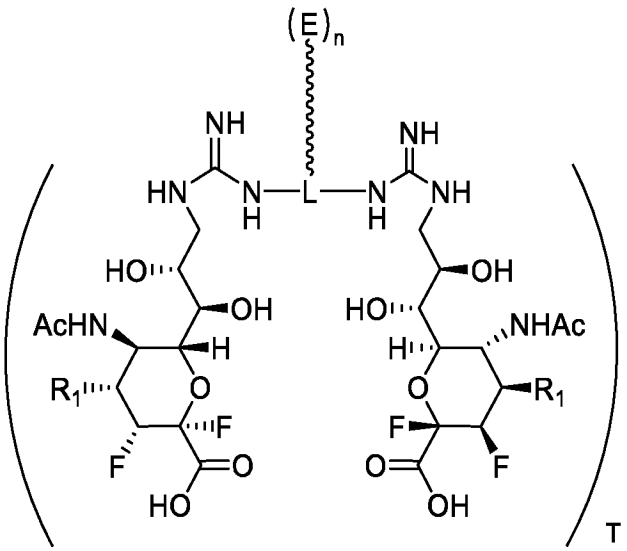
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VI-7):



(D-VI-7)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота. В некоторых вариантах осуществления y_1 и y_2, каждое равно 1, y_1 и y_2, каждый, равен 2, или y_1 и y_2, каждый, равен 3.

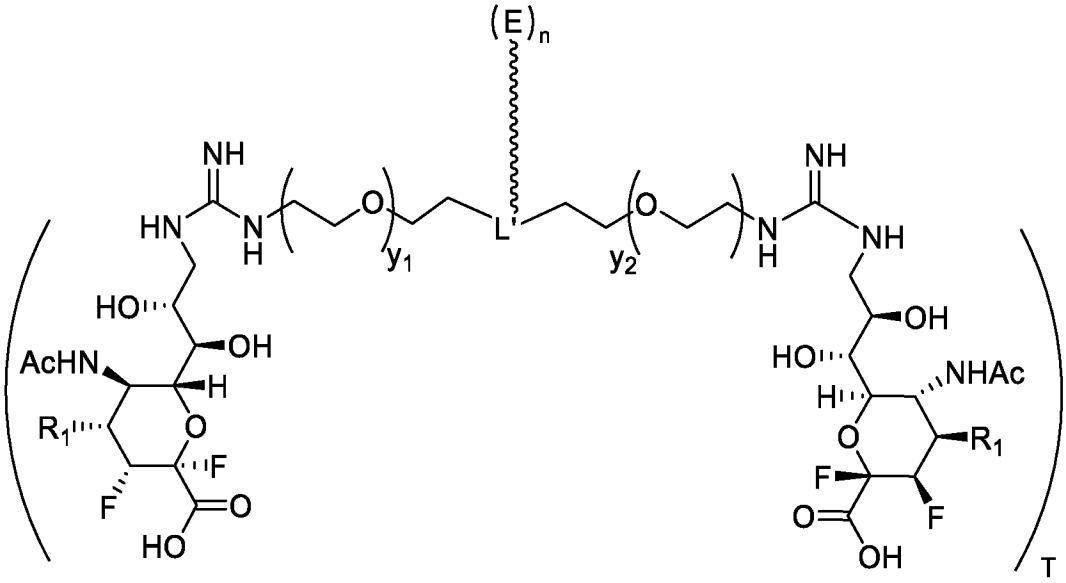
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VI-8):



(D-VI-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

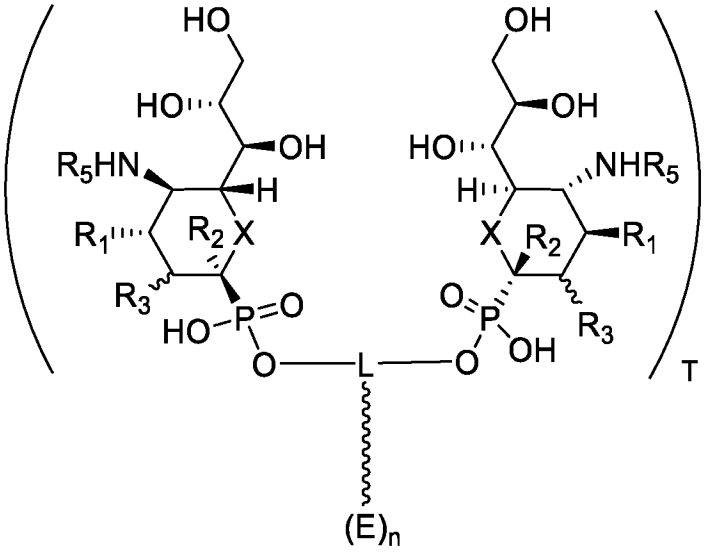
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VI-9):



(D-VI-9)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота. В некоторых вариантах осуществления y_1 и y_2, каждое равно 1, y_1 и y_2, каждый, равен 2, или y_1 и y_2, каждый, равен 3.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VII):

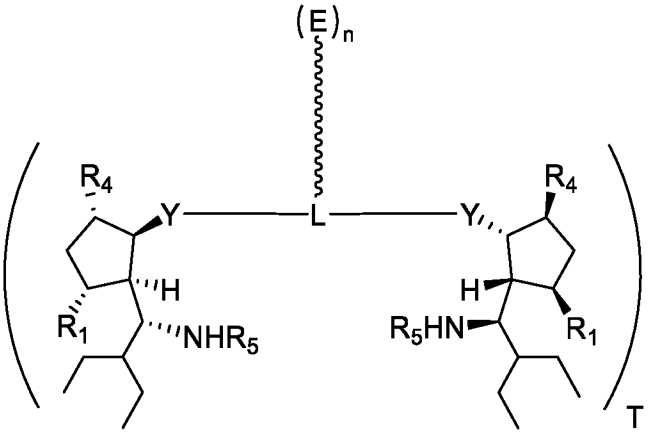


(D-VII)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_1 представляет собой OH. В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_1 представляет собой NH_2. В некоторых осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_1 представляет собой -NHC(=NH)NH_2.

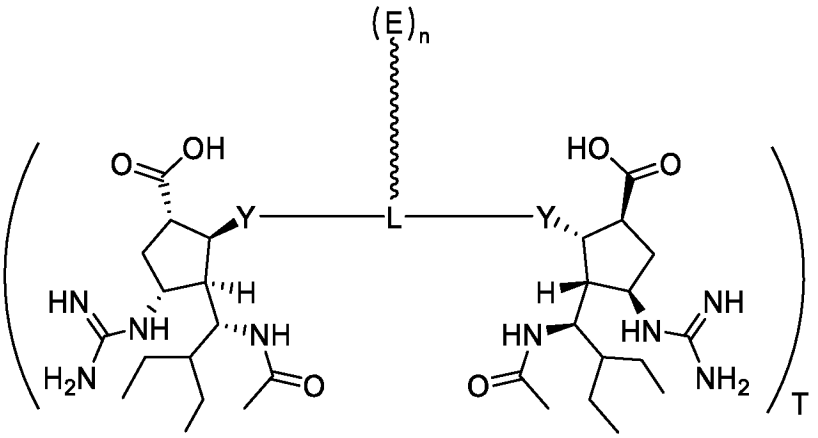
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII):



(D-VIII)

или его фармацевтически приемлемая соль.

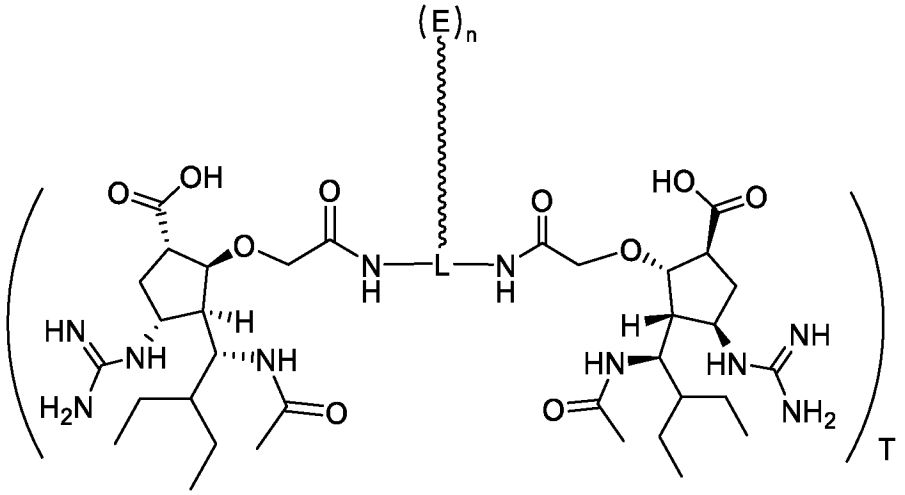
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-1):



(D-VIII-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

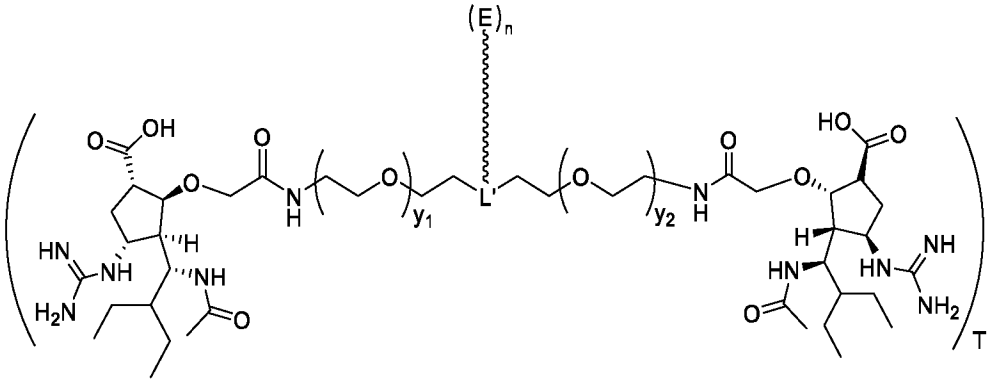
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-2):



(D-VIII-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

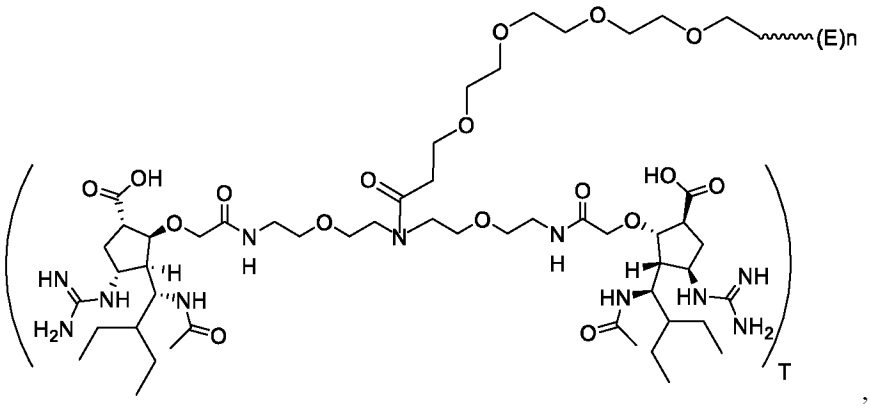
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-3):



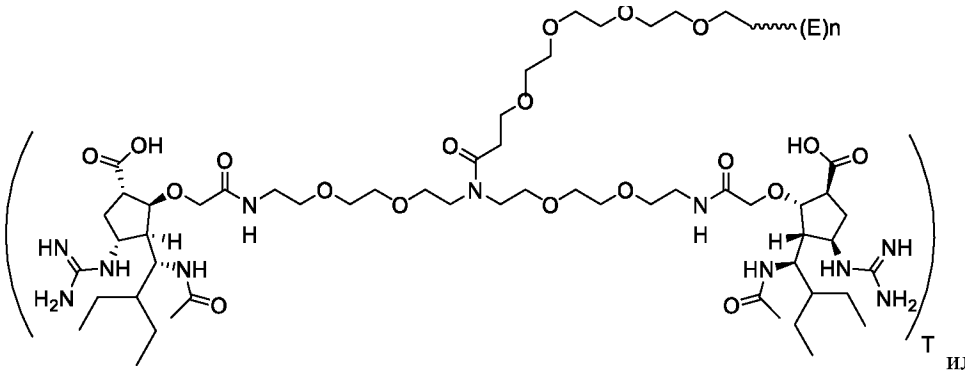
(D-VIII-3)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

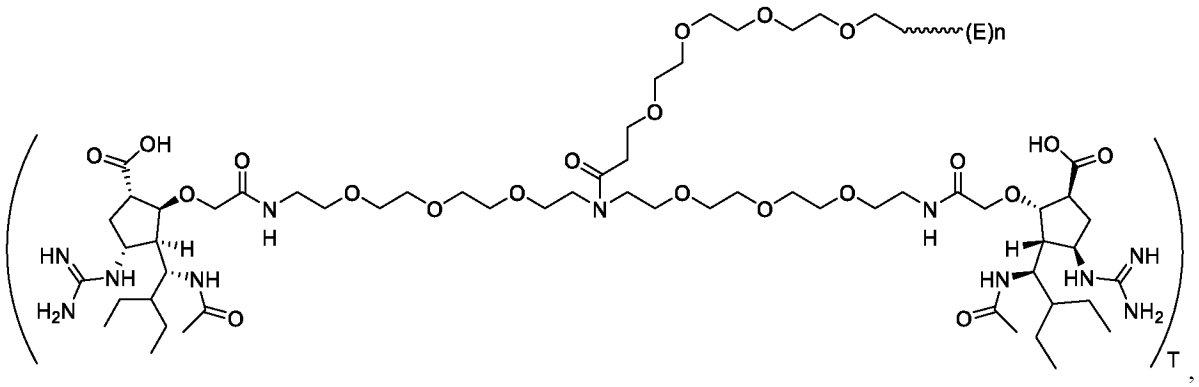
В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру, выбранную из



,

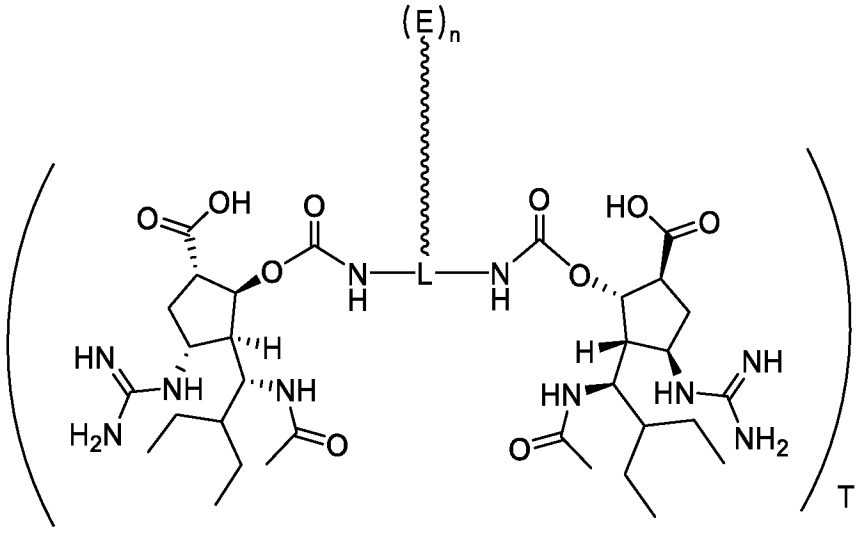


или



или его фармацевтически приемлемая соль.

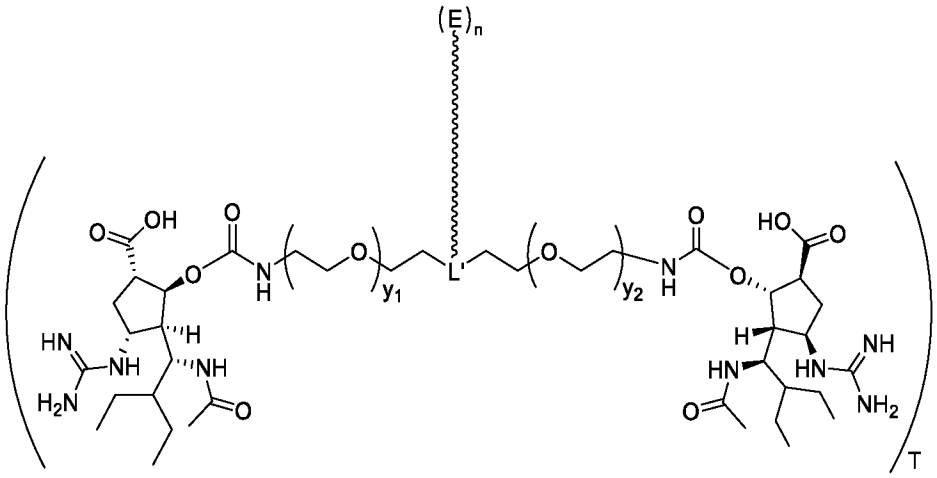
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-4):



(D-VIII-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

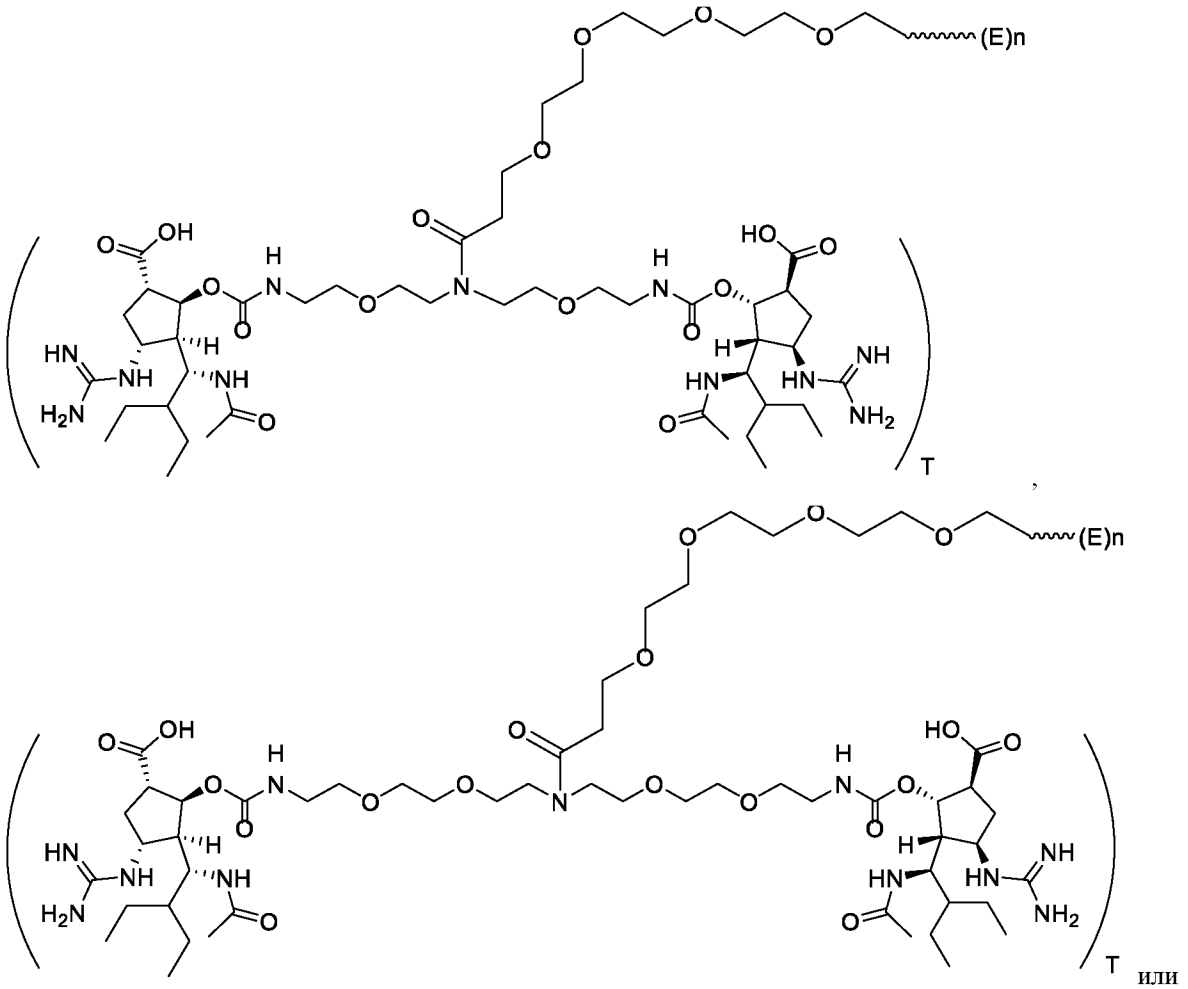
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-5):



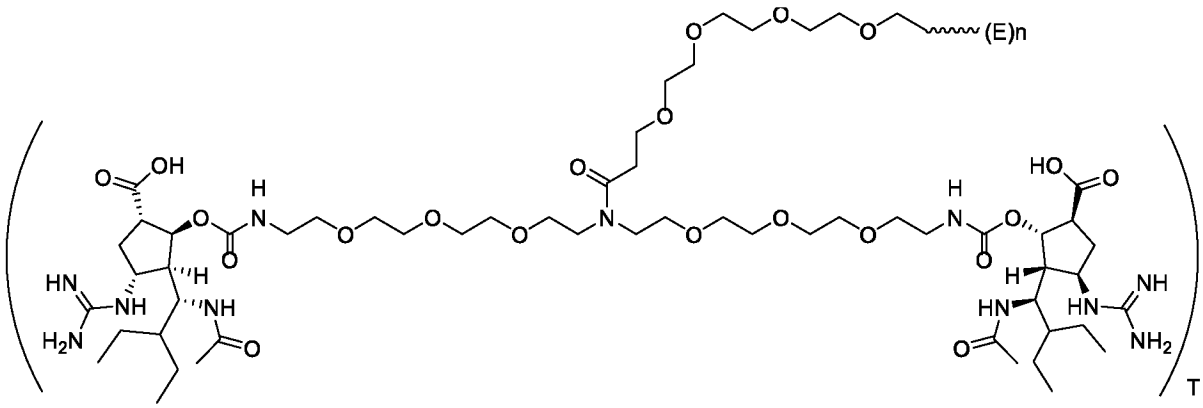
(D-VIII-5)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру, выбранную из:

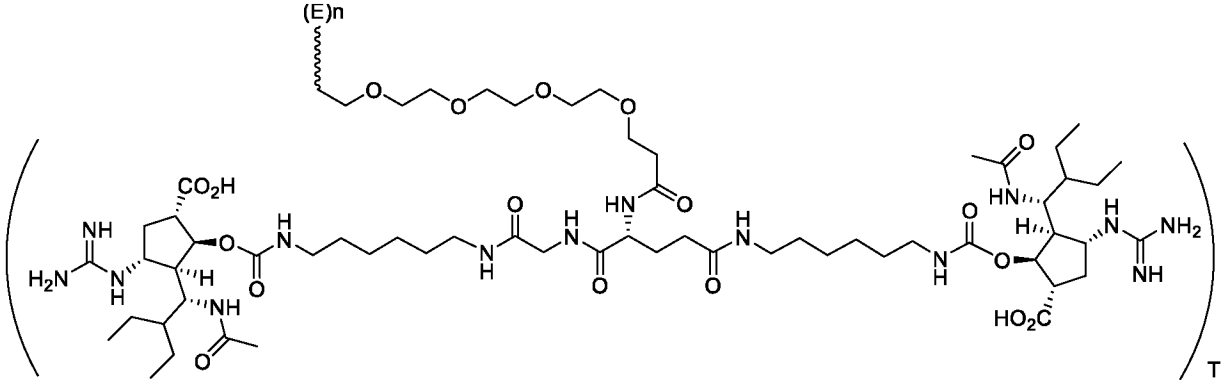


или



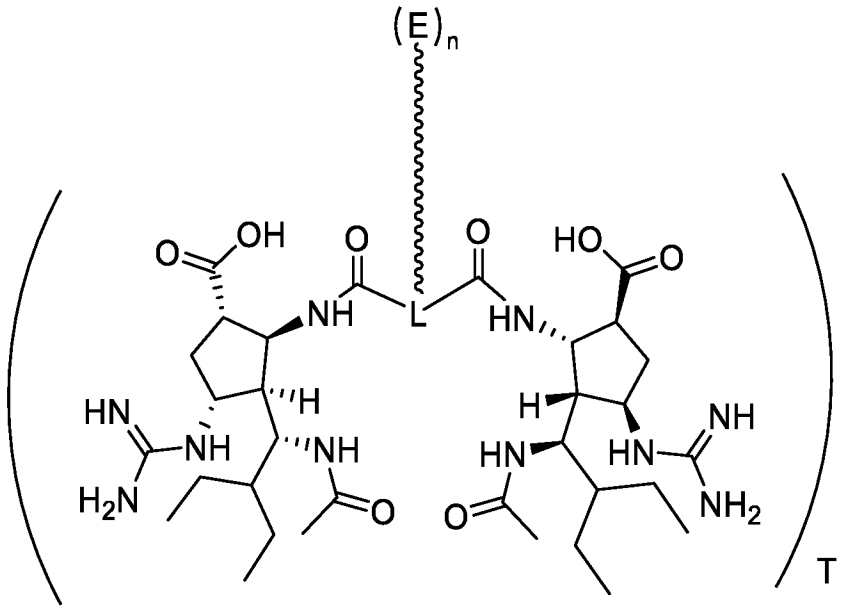
или его фармацевтически приемлемой солью.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан структурой



или его фармацевтически приемлемой солью.

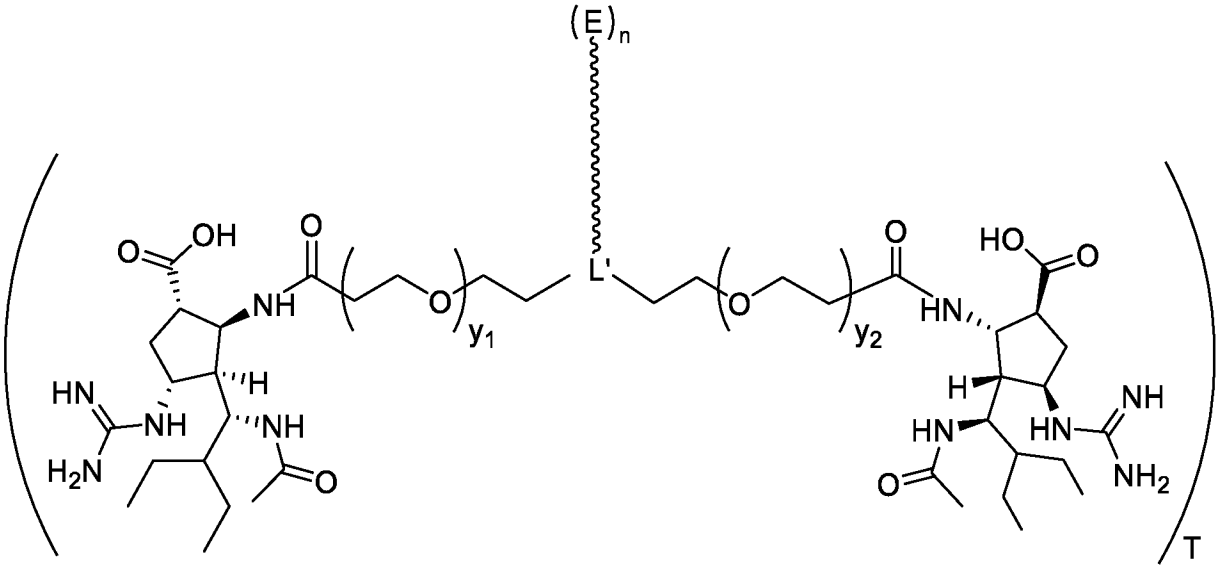
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-6):



(D-VIII-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

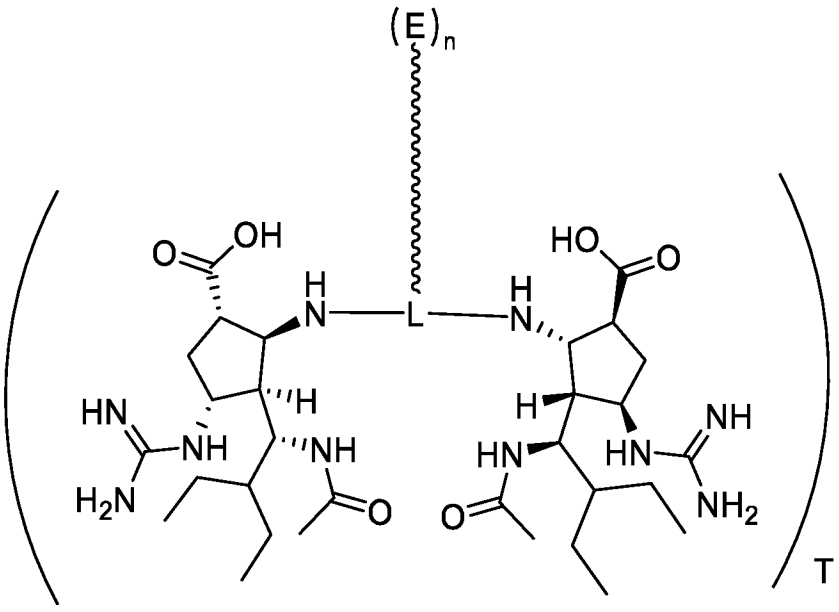
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-7):



(D-VIII-7)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

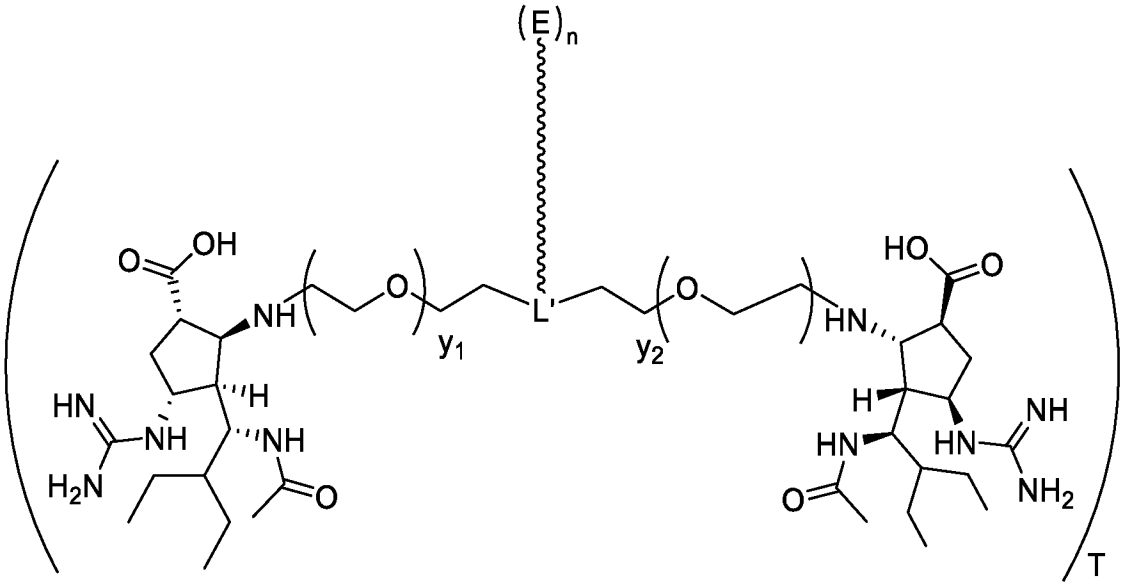
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-8):



(D-VIII-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

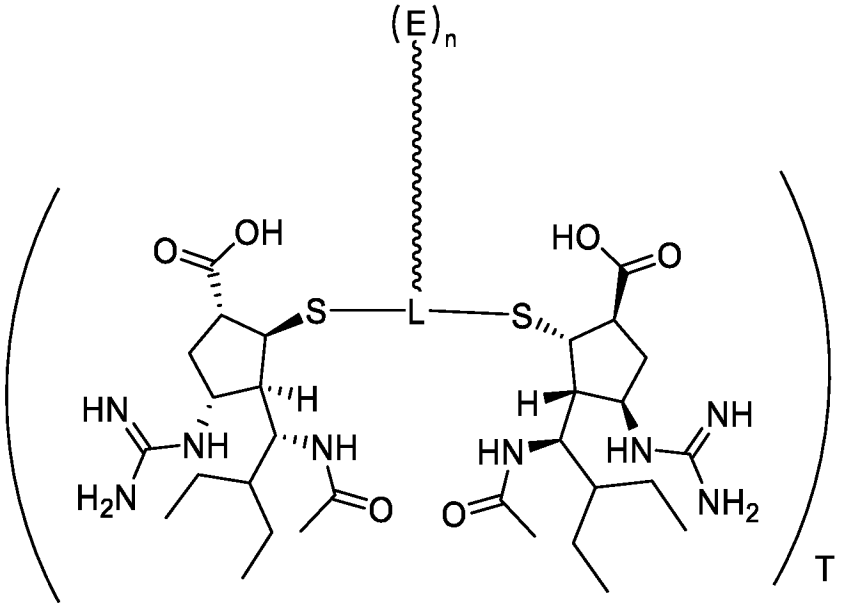
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-9):



(D-VIII-9)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

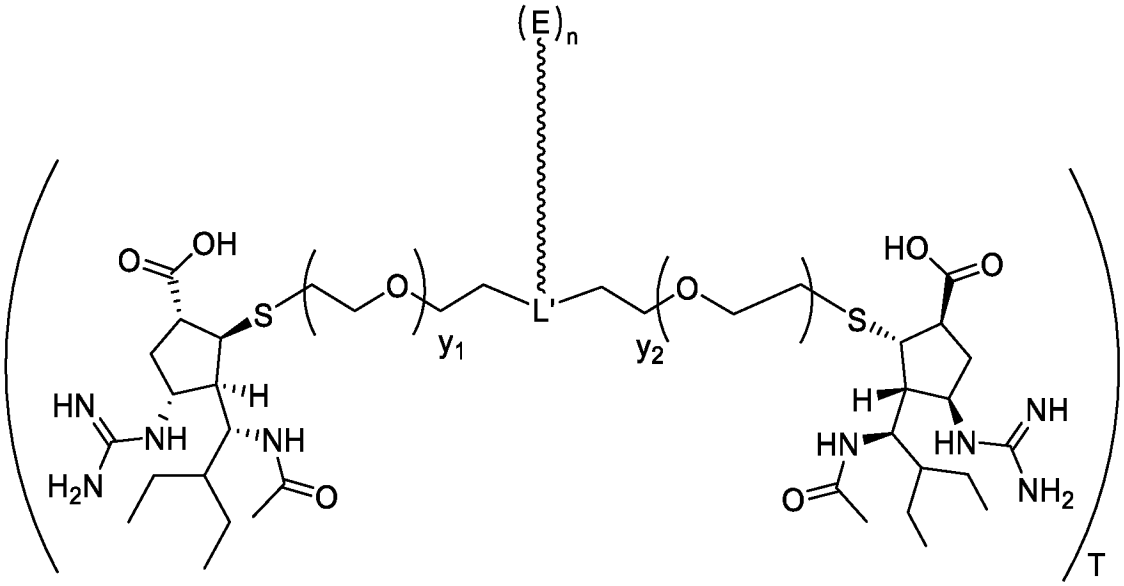
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-10):



(D-VIII-10)

или его фармацевтически приемлемая соль.

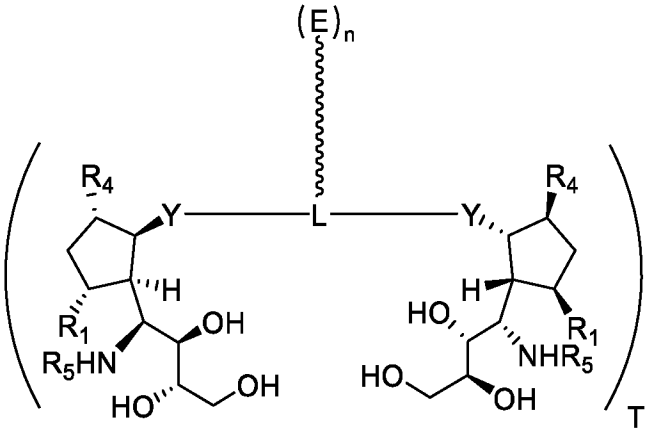
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-VIII-11):



(D-VIII-11)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20 (например, y_1 и y_2, каждый независимо, равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

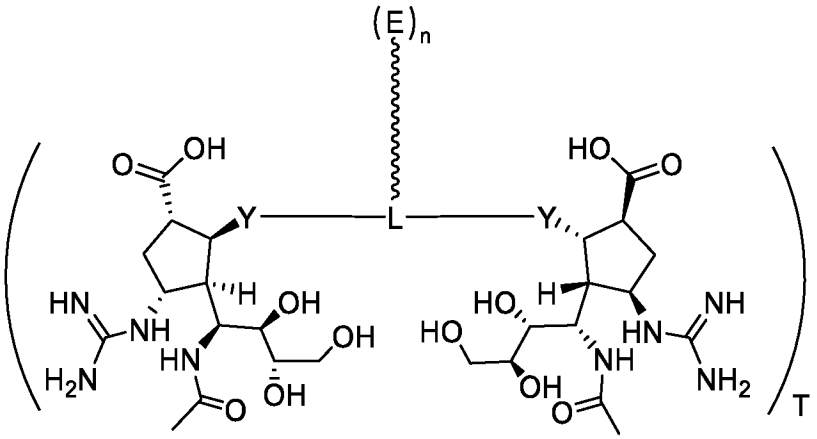
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-IX):



(D-IX)

или его фармацевтически приемлемая соль.

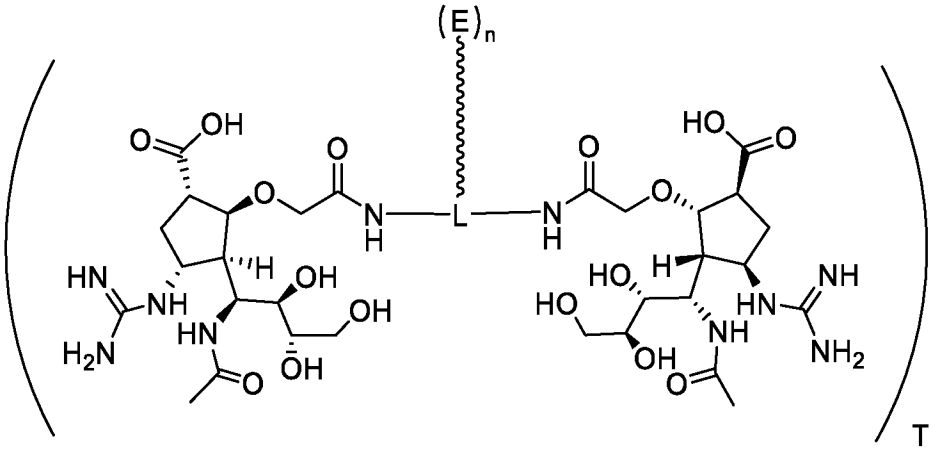
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-IX-1):



(D-IX-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

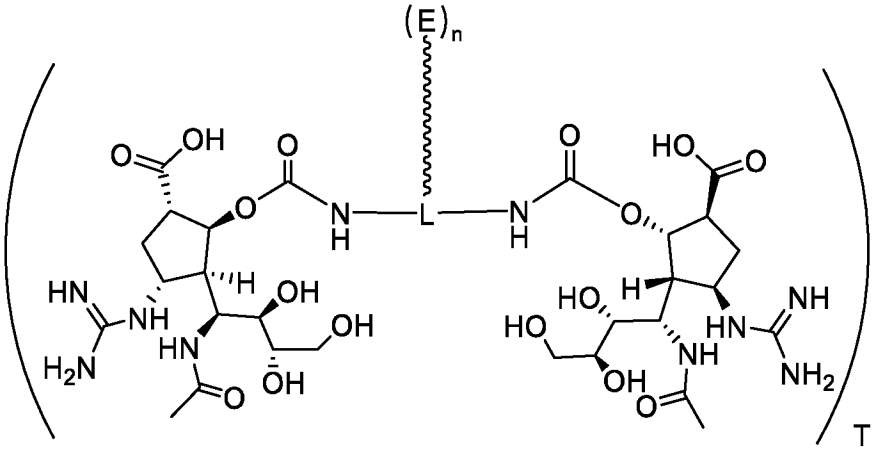
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-IX-2):



(D-IX-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

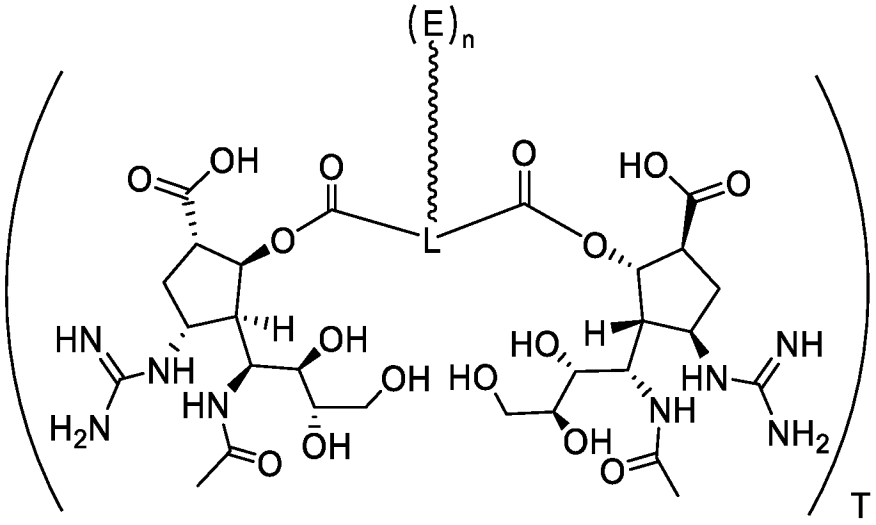
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-IX-3):



(D-IX-3)

или его фармацевтически приемлемая соль.

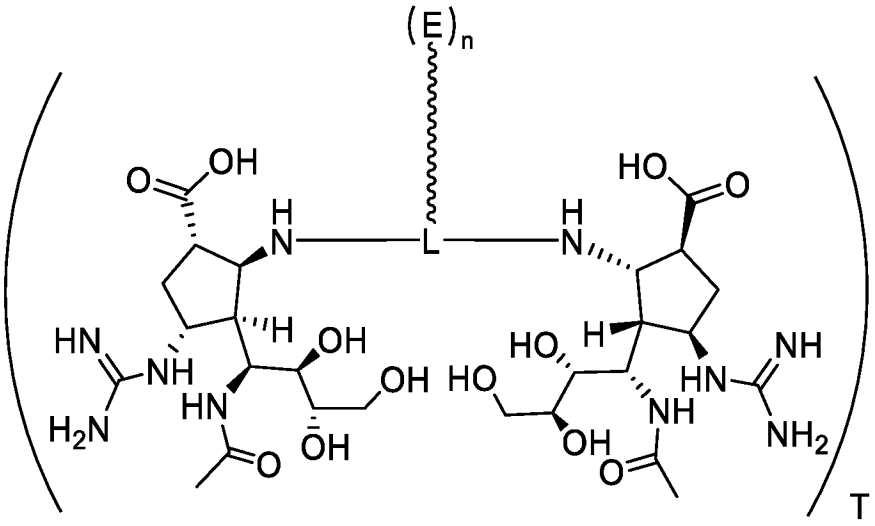
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-IX-4):



(D-IX-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

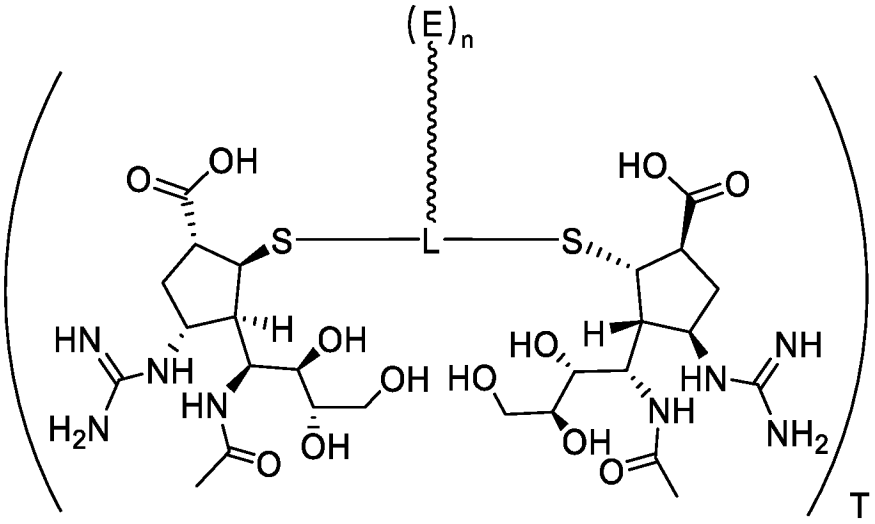
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-IX-5):



(D-IX-5)

или его фармацевтически приемлемая соль.

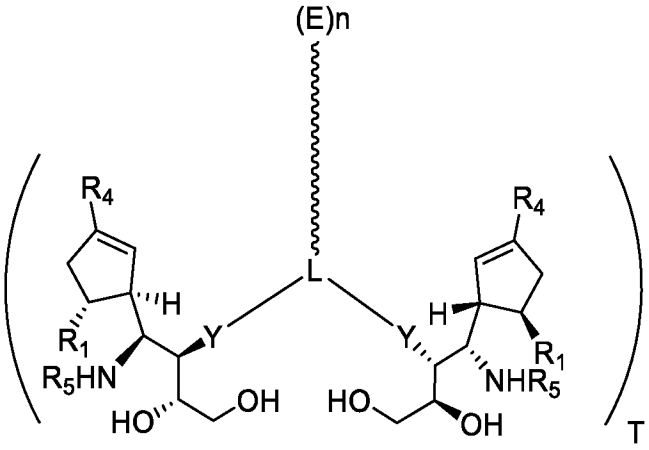
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-IX-6):



(D-IX-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

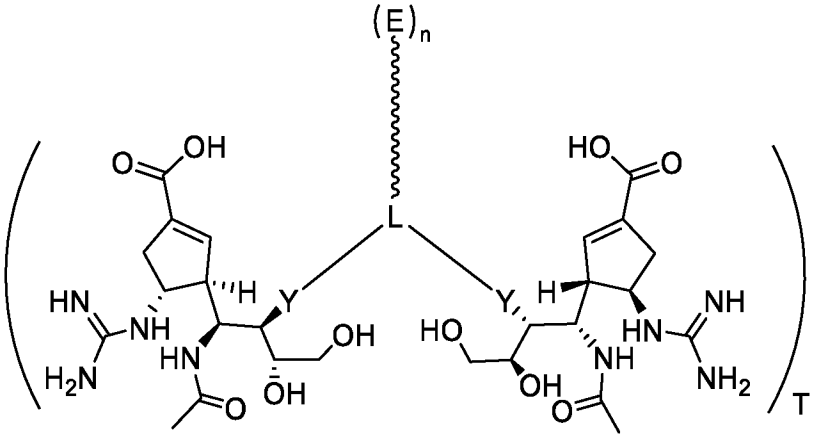
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-X):



(D-X)

или его фармацевтически приемлемая соль.

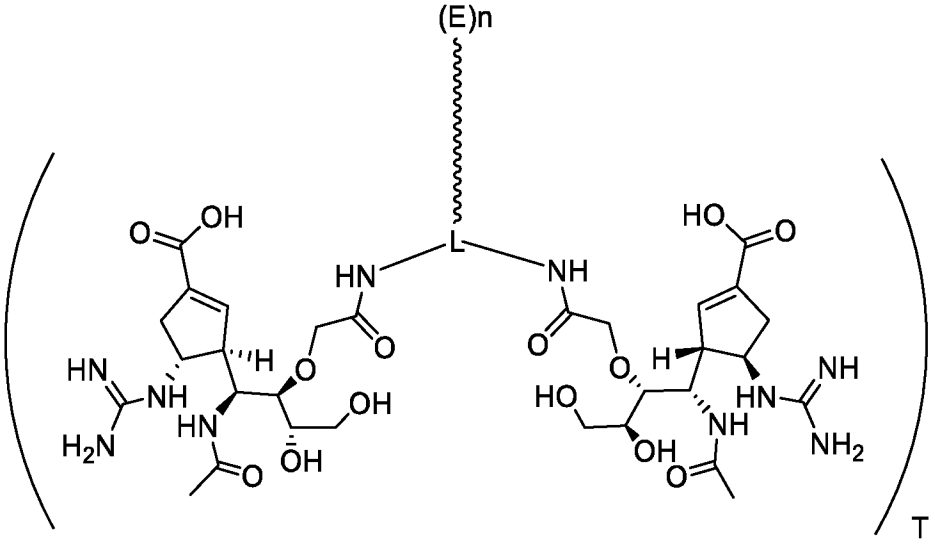
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-X-1):



(D-X-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

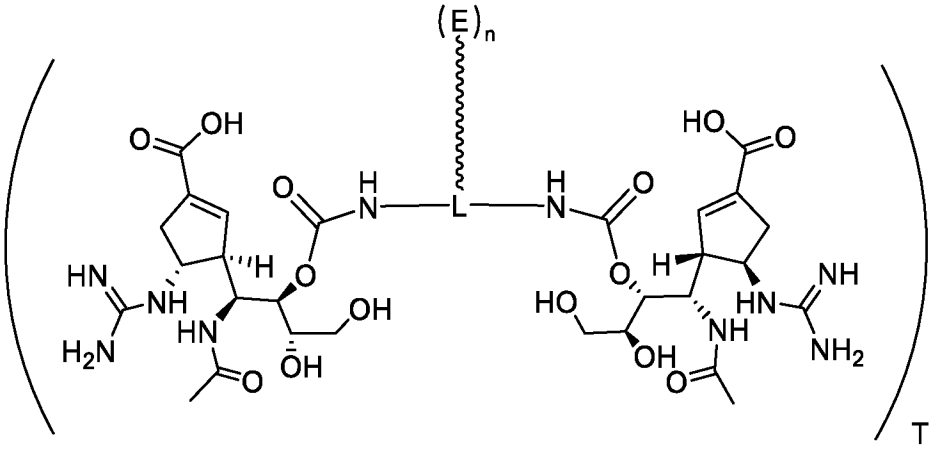
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-X-2):



(D-X-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-X-3):



(D-X-3)

или его фармацевтически приемлемая соль.

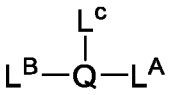
В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, L или L' включает один или более необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен, необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен, O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино, где R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, остов L или L' содержит один или более необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен, необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен, O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино, где R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил,

необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, L или L' является оксозамещенным. В некоторых вариантах осуществления остов L или L' содержит не более 250 атомов. В некоторых вариантах осуществления L или L' способен образовывать амидную, карбаматную, сульфонильную или карбамидную связь. В некоторых вариантах осуществления L или L' представляет собой связь. В некоторых вариантах осуществления L или L' представляет собой атом.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, каждый L описан формулой (D-L-I):



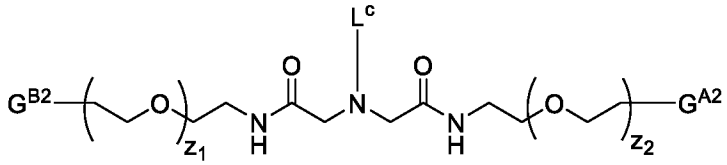
(D-L-I)

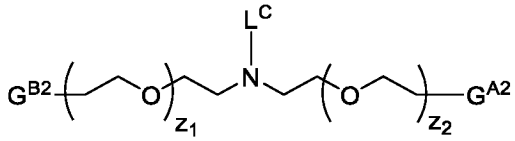
где L^A описан формулой G^{A1}-$(Z^{A1})_{g1}$-$(Y^{A1})_{h1}$-$(Z^{A2})_{i1}$-$(Y^{A2})_{j1}$-$(Z^{A3})_{k1}$-$(Y^{A3})_{l1}$-$(Z^{A4})_{m1}$-$(Y^{A4})_{n1}$-$(Z^{A5})_{o1}$-G^{A2}; L^B описан формулой G^{B1}-$(Z^{B1})_{g2}$-$(Y^{B1})_{h2}$-$(Z^{B2})_{i2}$-$(Y^{B2})_{j2}$-$(Z^{B3})_{k2}$-$(Y^{B3})_{l2}$-$(Z^{B4})_{m2}$-$(Y^{B4})_{n2}$-$(Z^{B5})_{o2}$-G^{B2}; L^C описан формулой G^{C1}-$(Z^{C1})_{g3}$-$(Y^{C1})_{h3}$-$(Z^{C2})_{i3}$-$(Y^{C2})_{j3}$-$(Z^{C3})_{k3}$-$(Y^{C3})_{l3}$-$(Z^{C4})_{m3}$-$(Y^{C4})_{n3}$-$(Z^{C5})_{o3}$-G^{C2}; G^{A1} представляет собой связь, присоединенную к Q; G^{A2} представляет собой связь, присоединенную к A1; G^{B1} представляет собой связь, присоединенную к Q; G^{B2} представляет собой связь, присоединенную к A2; G^{C1} представляет собой связь, присоединенную к Q; G^{C2} представляет собой связь, присоединенную к E, или функциональную группу, способную вступать в реакцию с функциональной группой, конъюгированной с E (например, малеимид и цистеин, амин и активированная карбоновая кислота, тиол и малеимид, активированная сульфоновая кислота и амин, изоцианат и амин, азид и алкин, алкен и тетразин); каждый из Z^{A1}, Z^{A2}, Z^{A3}, Z^{A4}, Z^{A5}, Z^{B1}, Z^{B2}, Z^{B3}, Z^{B4}, Z^{B5}, Z^{C1}, Z^{C2}, Z^{C3}, Z^{C4} и Z^{C5} независимо представляет собой необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен или необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен; каждый из Y^{A1}, Y^{A2}, Y^{A3}, Y^{A4}, Y^{B1}, Y^{B2}, Y^{B3}, Y^{B4}, Y^{C1}, Y^{C2}, Y^{C3} и Y^{C4} независимо представляет собой O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино; R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил, необязательно замещенный C2-C15 гетероарил; каждое из g1, h1, i1, j1, k1, l1, m1, n1, o1, g2, h2, i2, j2, k2, l2, m2, n2, o2, g3, h3, i3, j3, k3, l3, m3, n3 и o3 независимо равно 0 или 1; Q представляет собой атом азота, необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен,

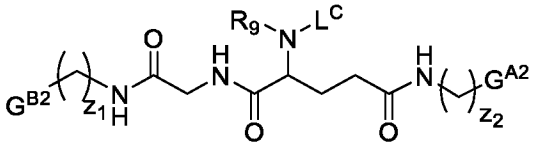
необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен или необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен.

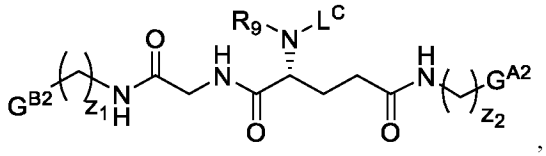
В некоторых вариантах осуществления L^C может иметь две точки присоединения к Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду (например, два G^{C2}). В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, L включает полиэтиленгликолевый (ПЭГ) линкер. ПЭГ линкер включает линкер, имеющий структуру повторяющегося элемента $(-CH_2CH_2O-)_n$, где n является целым числом от 2 до 100. Полиэтиленгликолевый линкер может ковалентно соединять ингибитор нейраминидазы и E (например, в конъюгате любой из формул (M-I)-(M-XI)). Полиэтиленгликолевый линкер может ковалентно соединять первый ингибитор нейраминидазы и второй ингибитор нейраминидазы (например, в конъюгате любой из формул (D-I)-(D-XI)). Полиэтиленгликолевый линкер может ковалентно соединять димер ингибитора нейраминидазы и E (например, в конъюгате любой из формул (D-I)-(D-XI)). Полиэтиленгликолевый линкер может быть выбран из любого из $ПЭГ_2$ -$ПЭГ_{100}$ (например, $ПЭГ_2$, $ПЭГ_3$, $ПЭГ_4$, $ПЭГ_5$, $ПЭГ_5$-$ПЭГ_{10}$, $ПЭГ_{10}$-$ПЭГ_{20}$, $ПЭГ_{20}$-$ПЭГ_{30}$, $ПЭГ_{30}$-$ПЭГ_{40}$, $ПЭГ_{50}$-$ПЭГ_{60}$, $ПЭГ_{60}$-$ПЭГ_{70}$, $ПЭГ_{70}$-$ПЭГ_{80}$, $ПЭГ_{80}$-$ПЭГ_{90}$, $ПЭГ_{90}$-$ПЭГ_{100}$). В некоторых вариантах осуществления L^c включает ПЭГ линкер, где L^C ковалентно присоединен к каждому из Q и E.

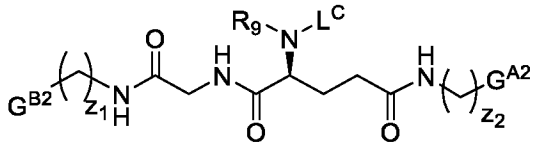
В некоторых вариантах осуществления L представляет собой.

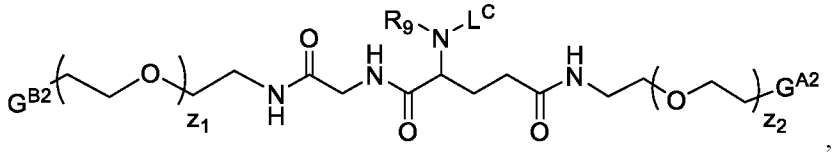

,

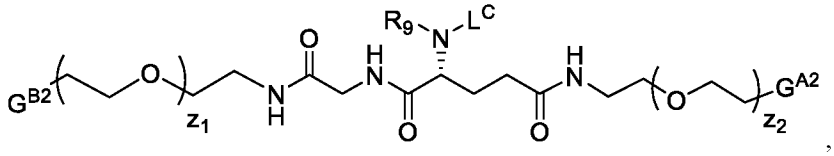

,

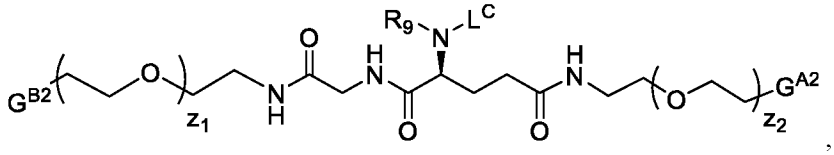

,

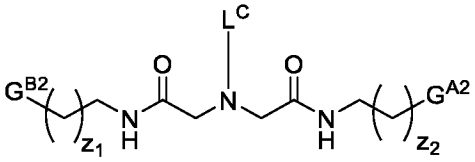
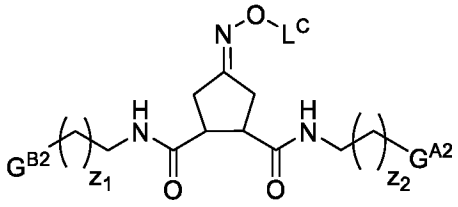
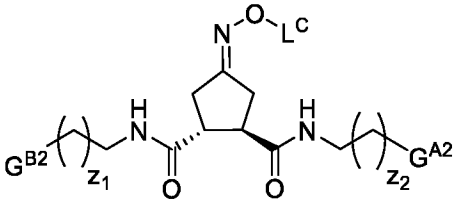
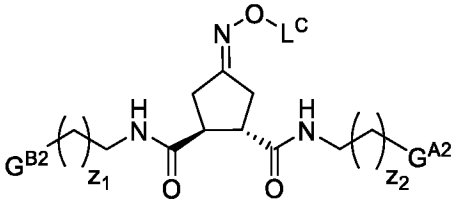
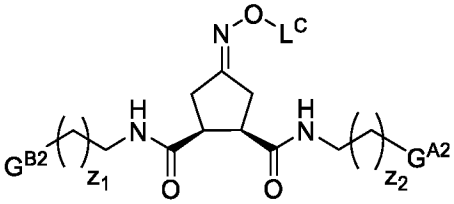
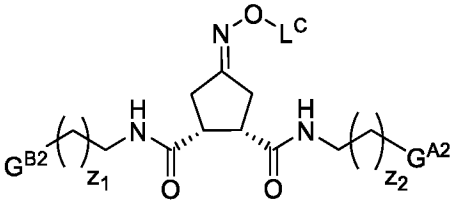
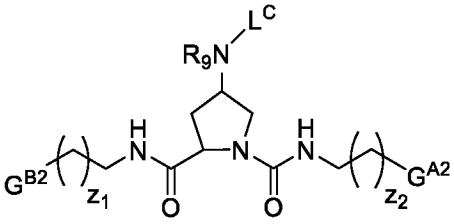
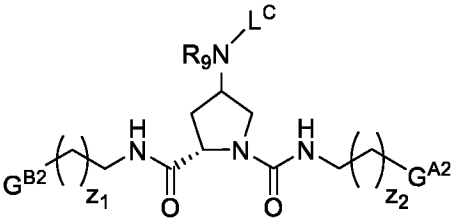
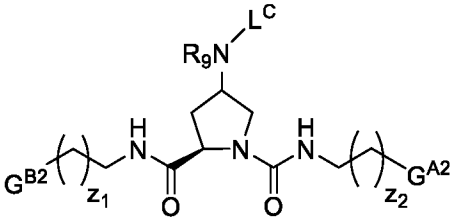
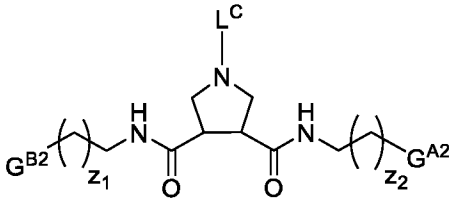
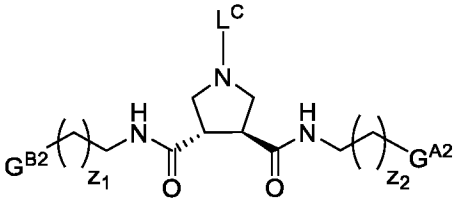
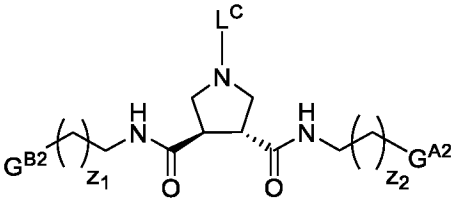
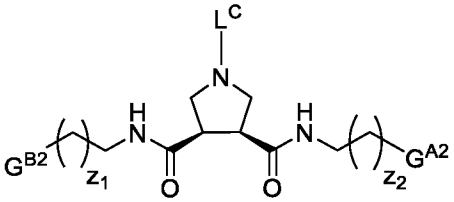
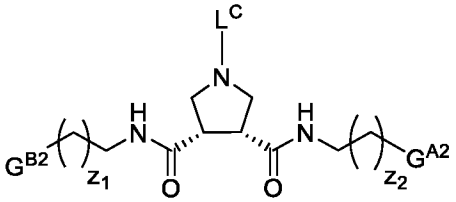
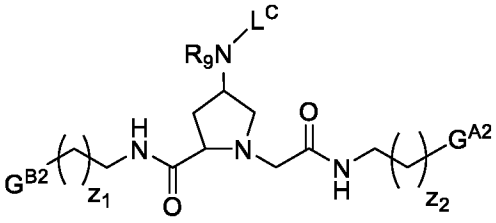
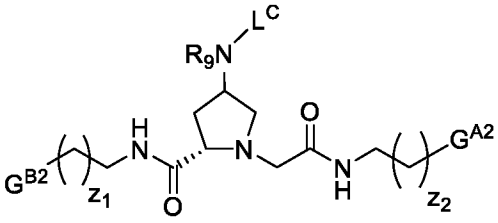

,

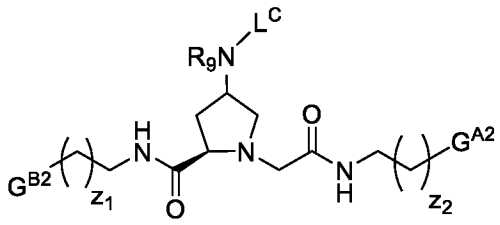
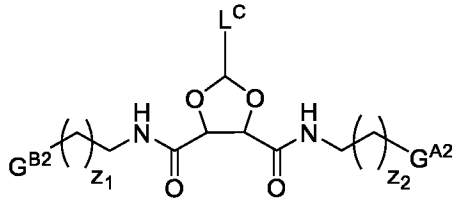
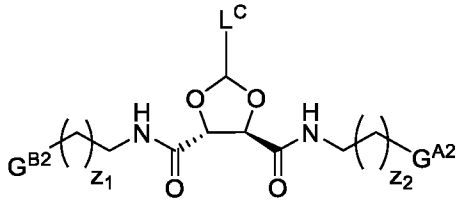
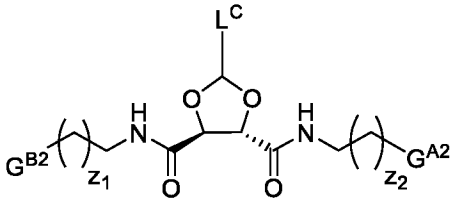
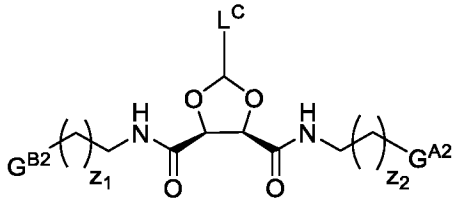
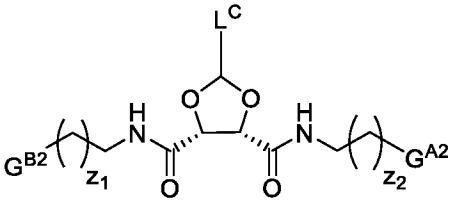
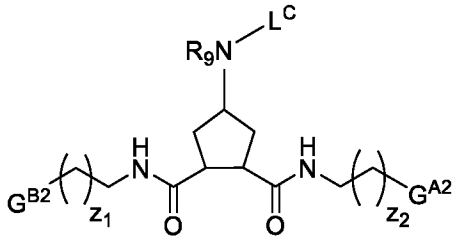
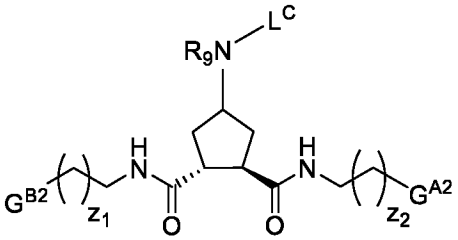
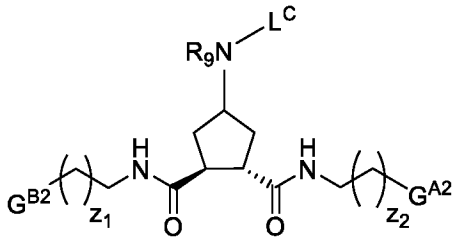
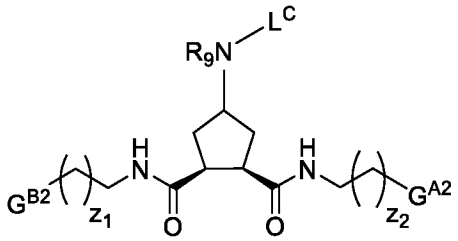
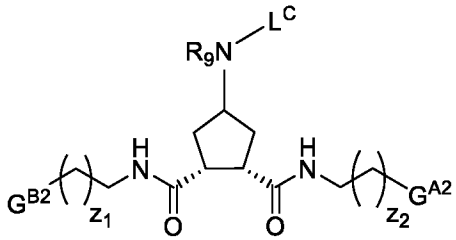
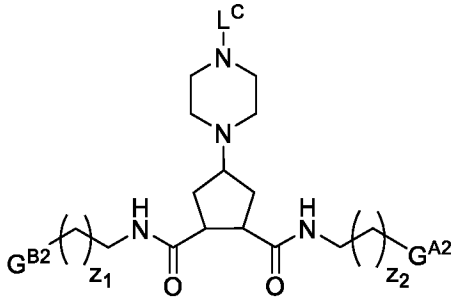
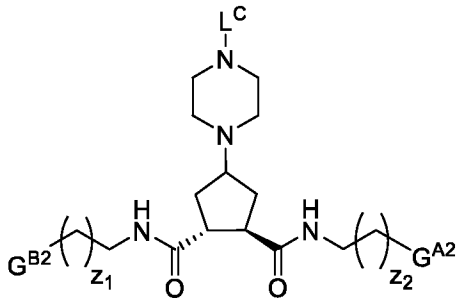
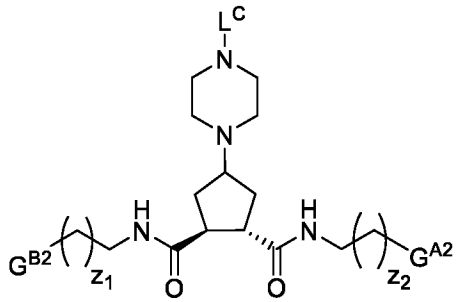

,

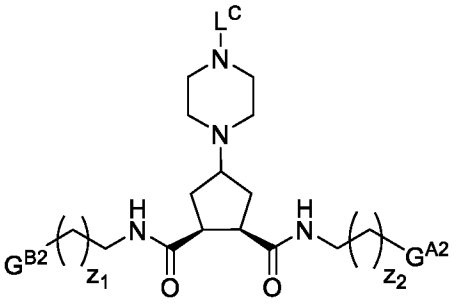
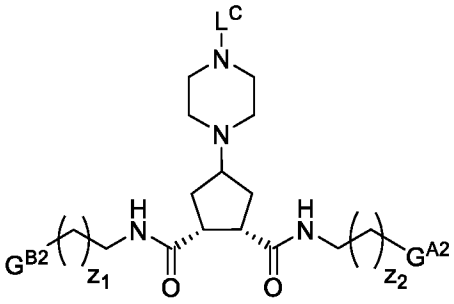
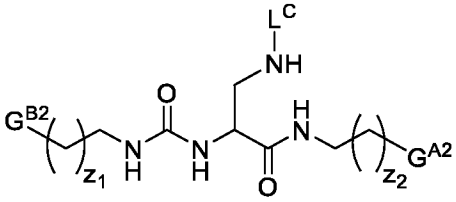
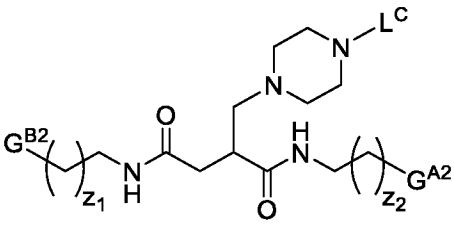
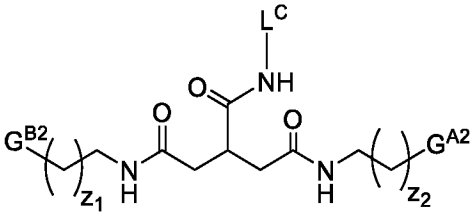
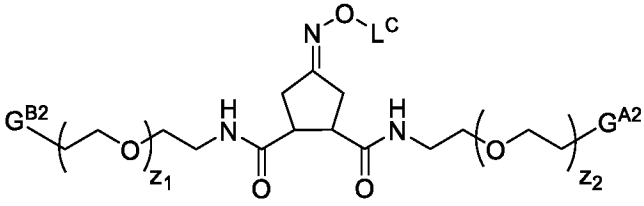
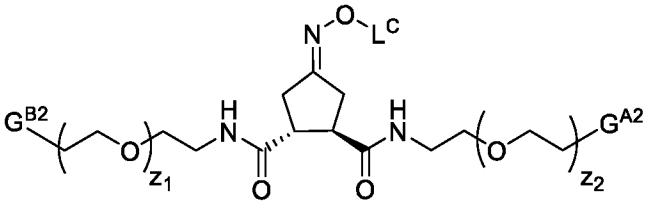
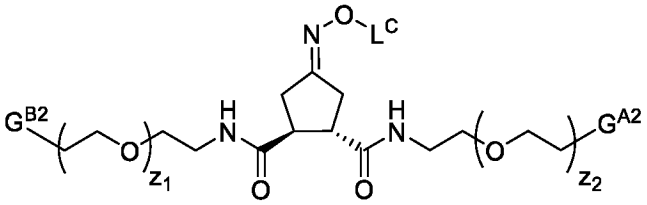
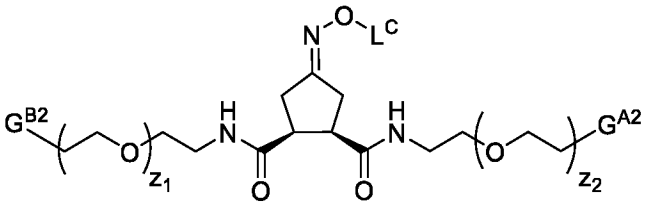
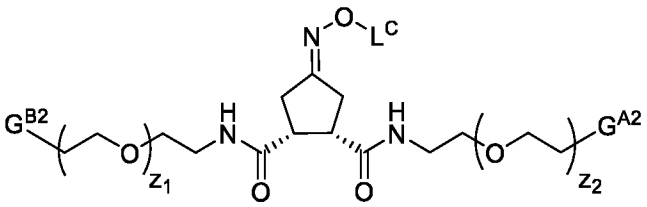

,

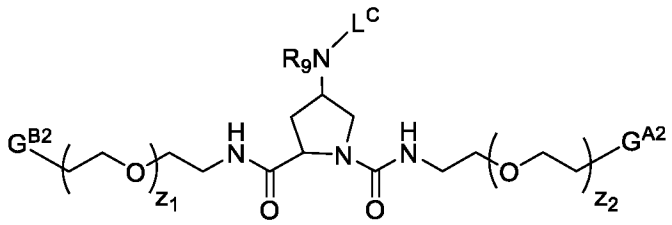
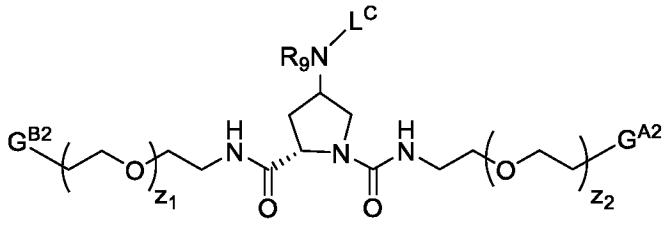
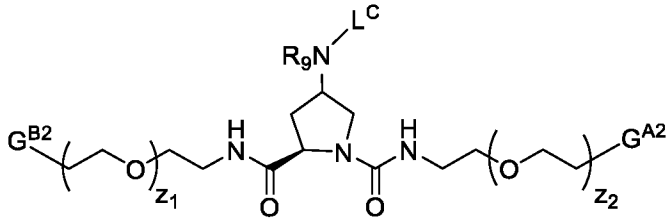
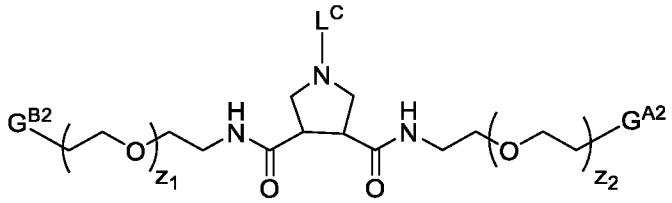
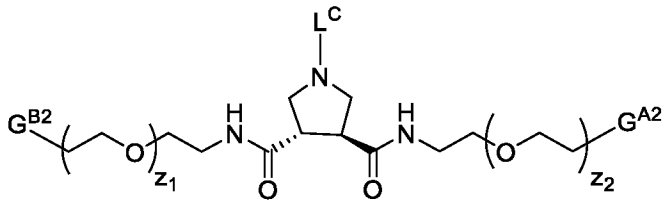
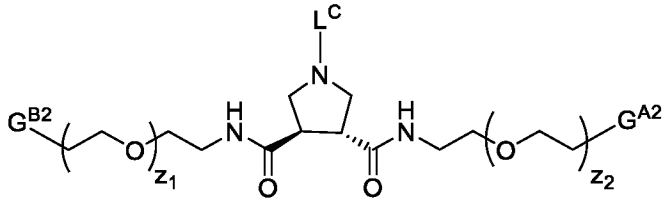
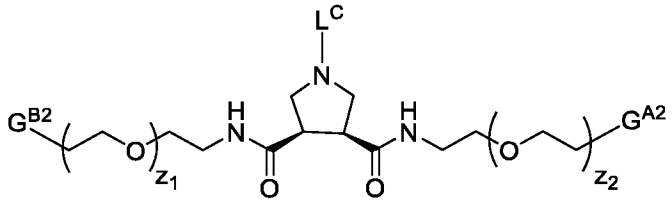
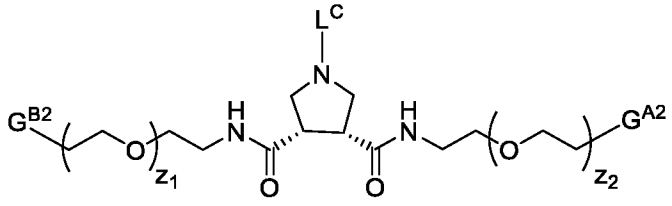

,

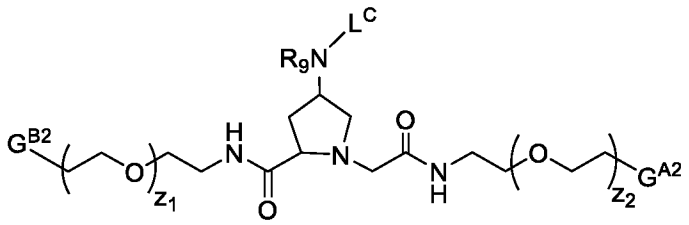
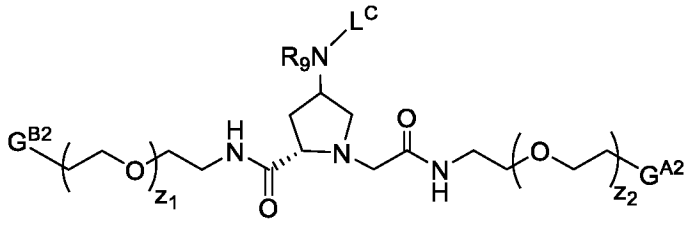
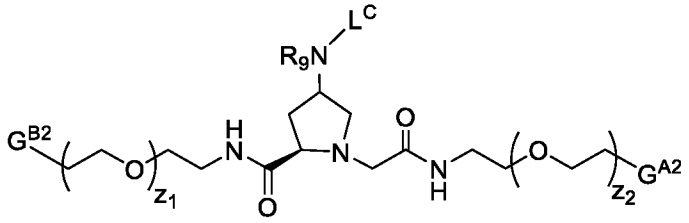
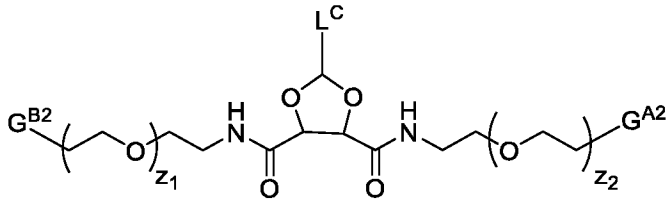
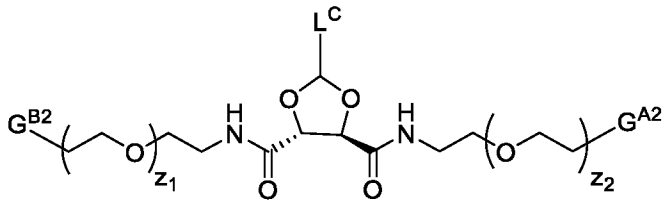
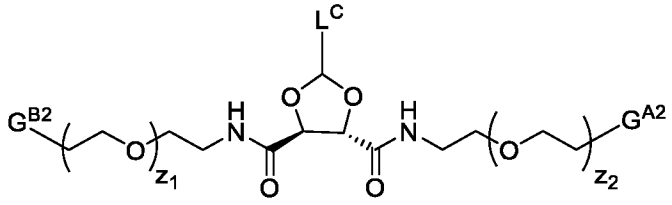
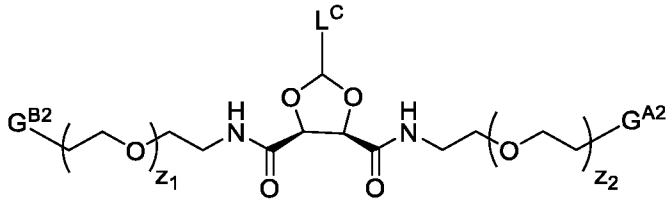
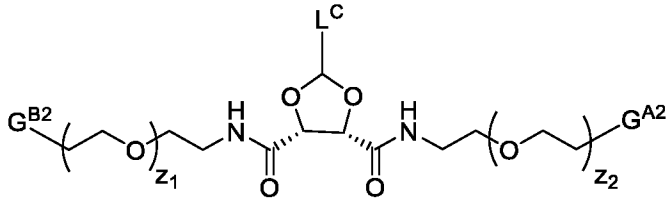

,

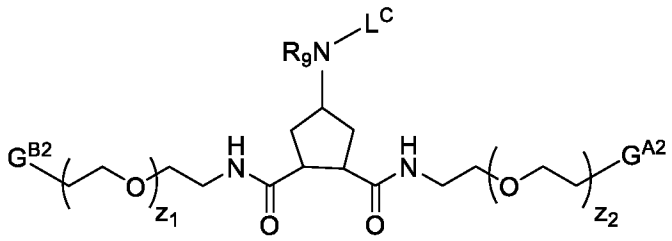

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

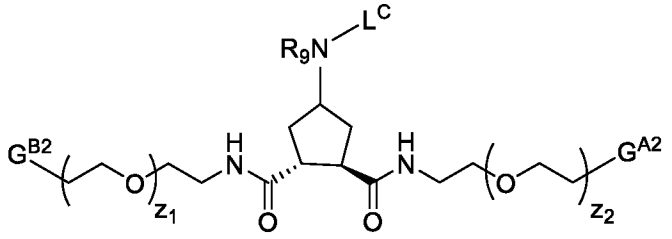

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

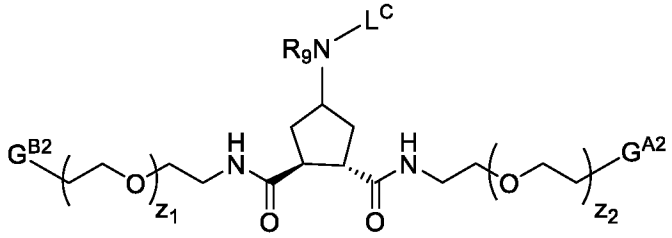

,

,

,

,

,

,

,

,



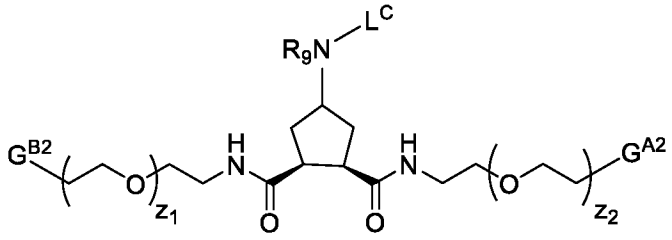
,



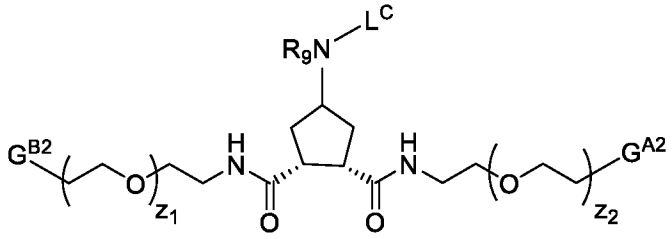
,



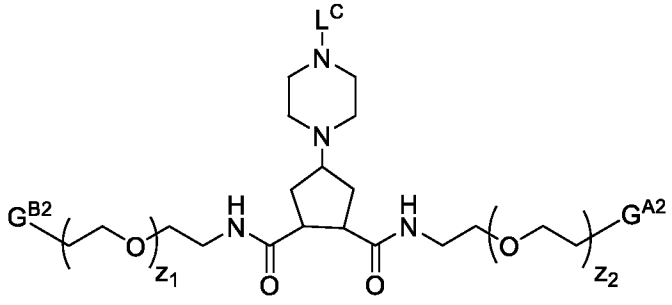
,



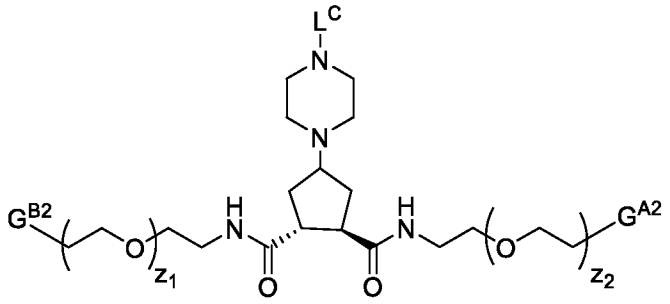
,

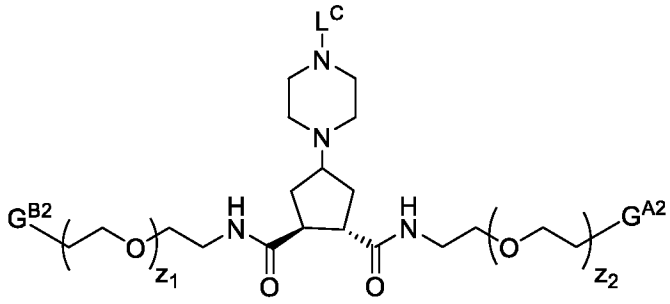


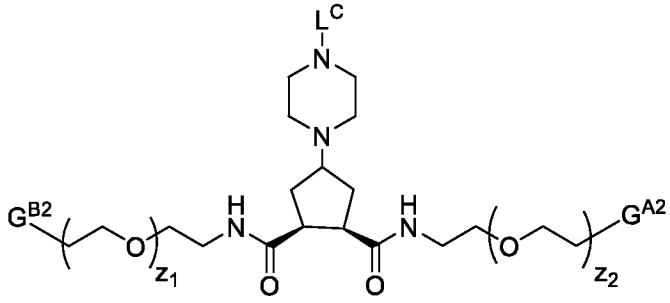
,

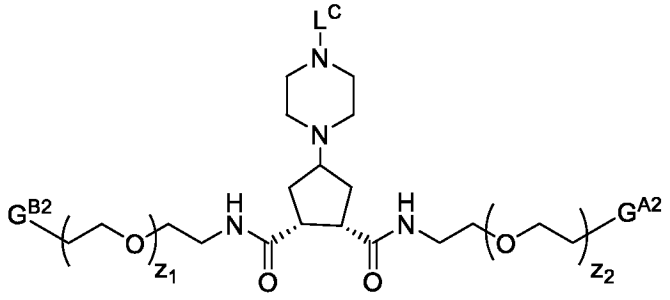


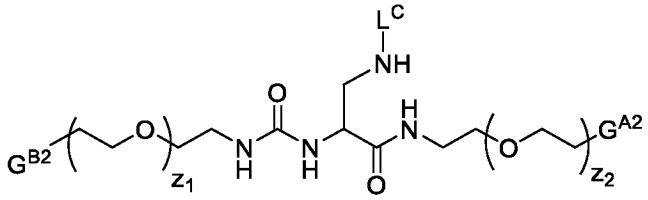
,

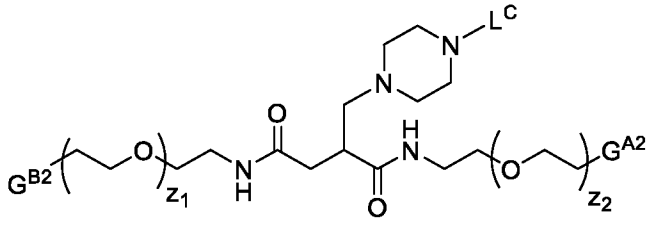

,

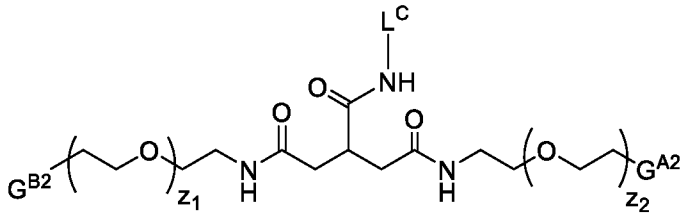

,

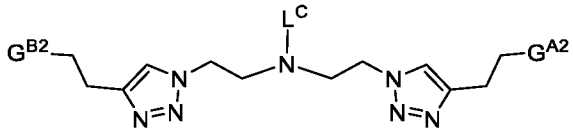

,

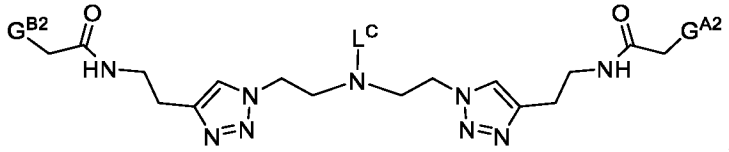

,

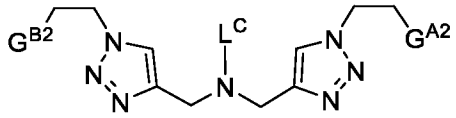

,

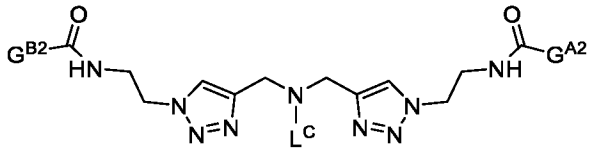

,

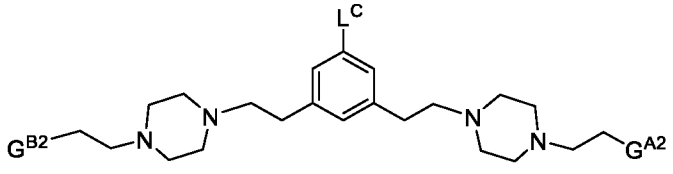

,

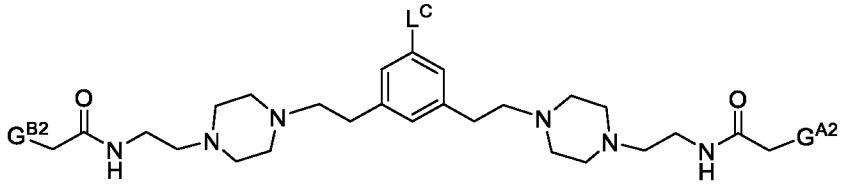

,

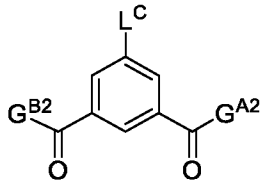

,

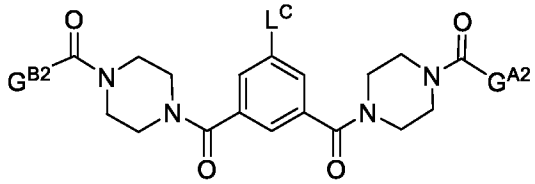

,

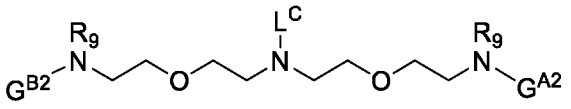

,

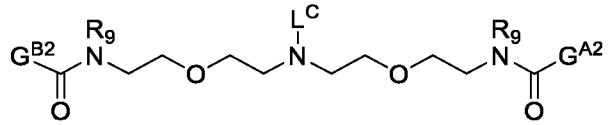

,

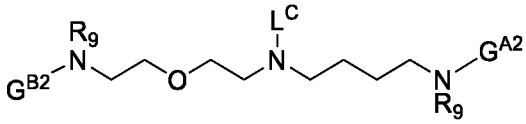

,

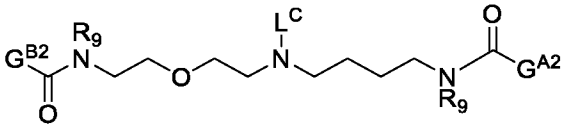
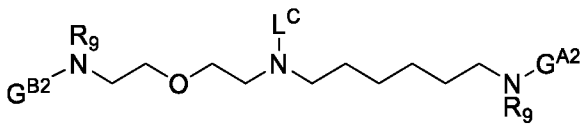
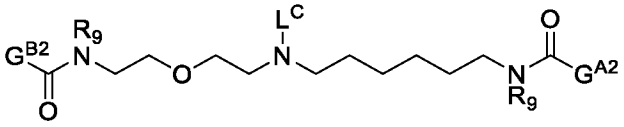
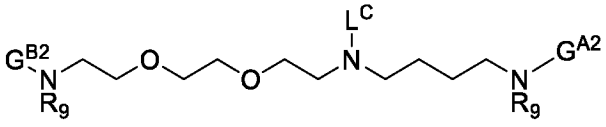
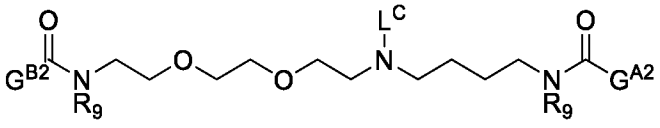
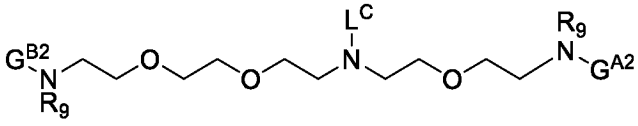
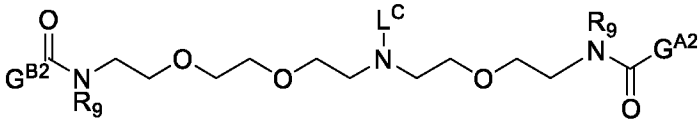
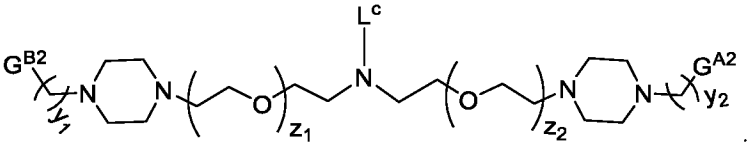
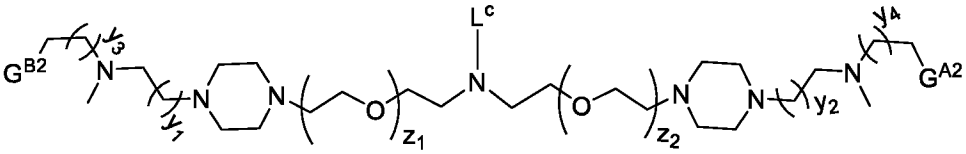
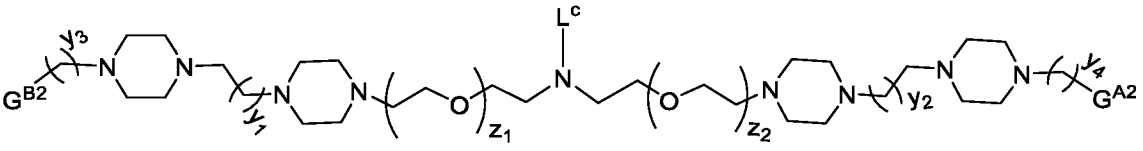

,


,


,

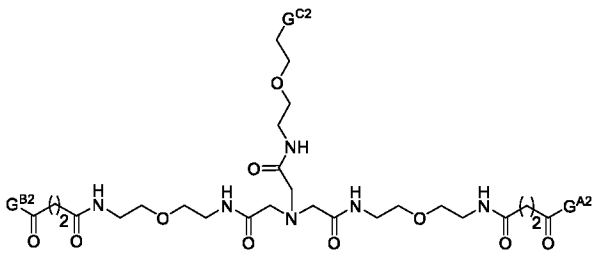

;

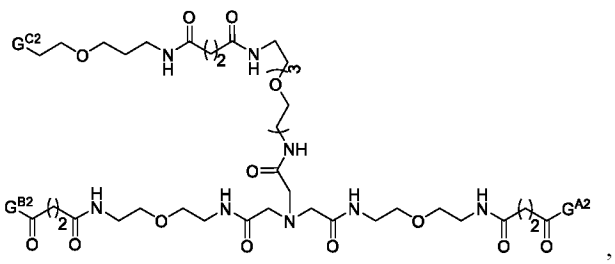
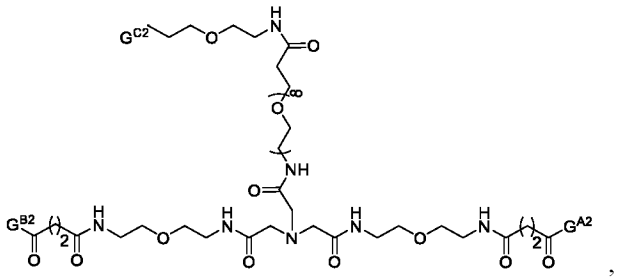
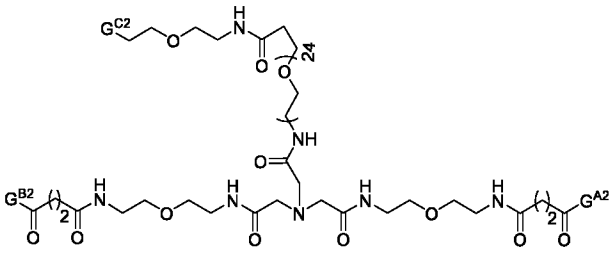
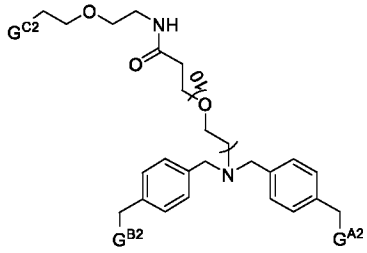
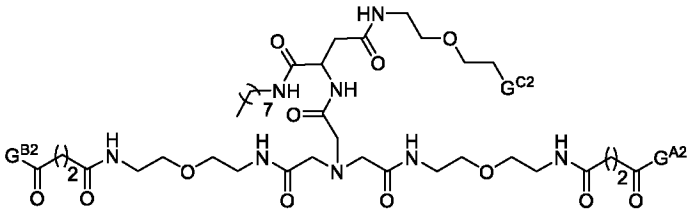
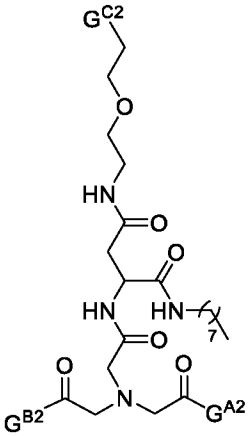
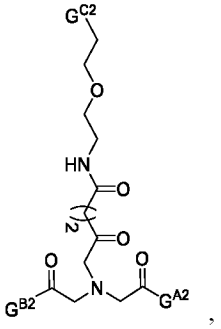
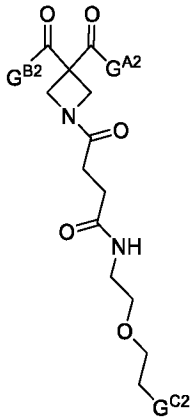
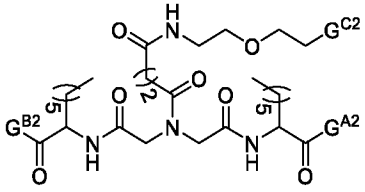
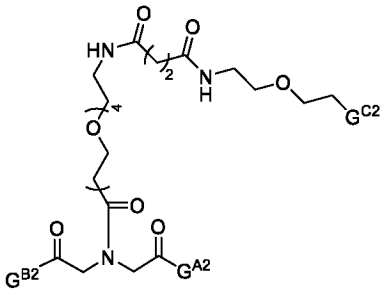
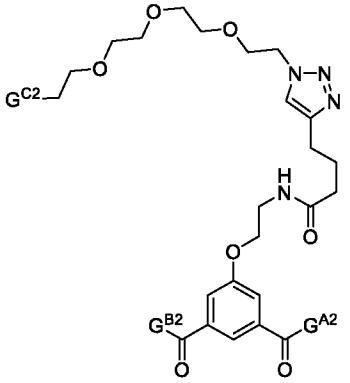
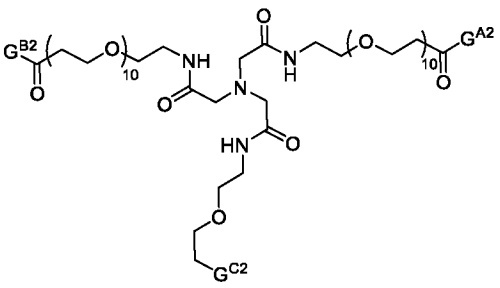
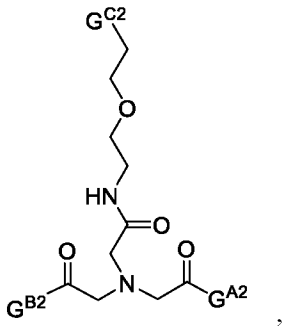

;

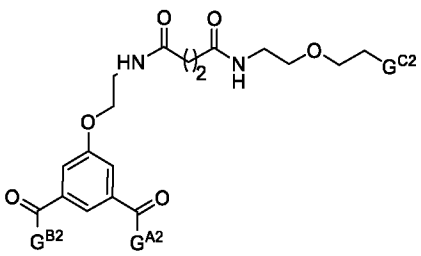
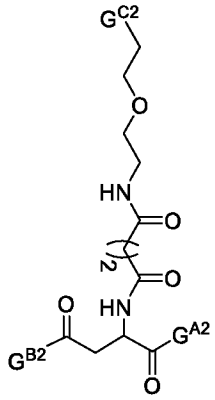
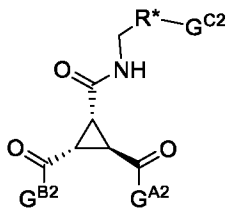
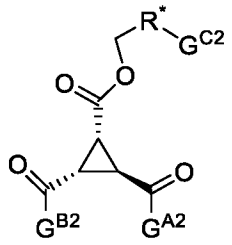
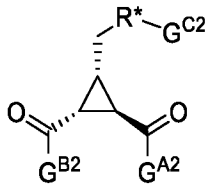
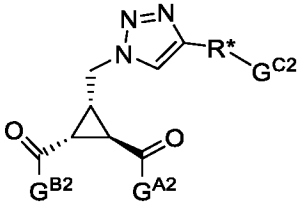
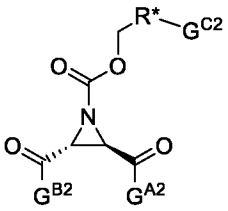
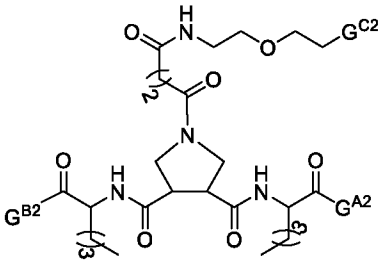
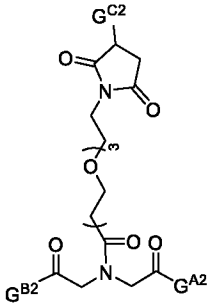
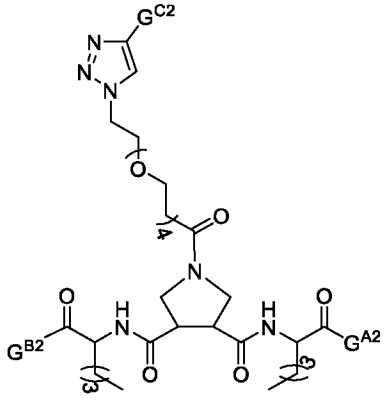
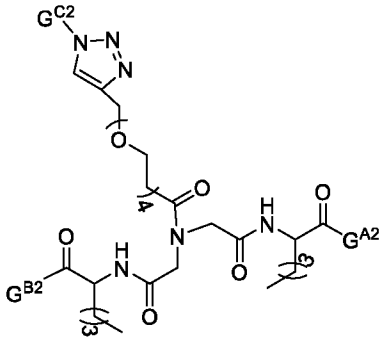
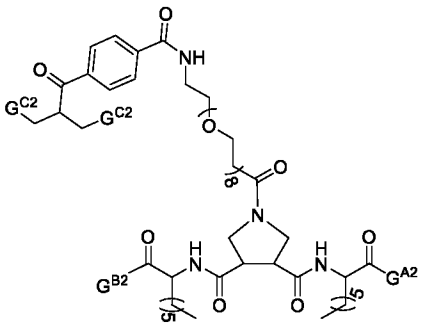
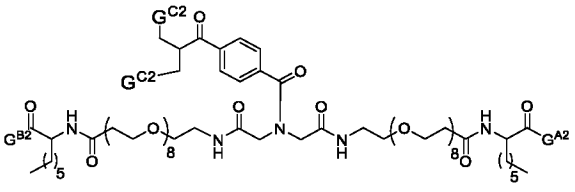
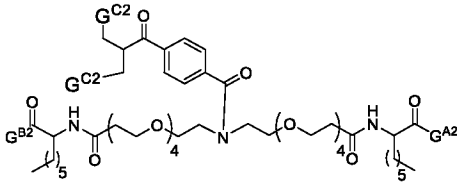
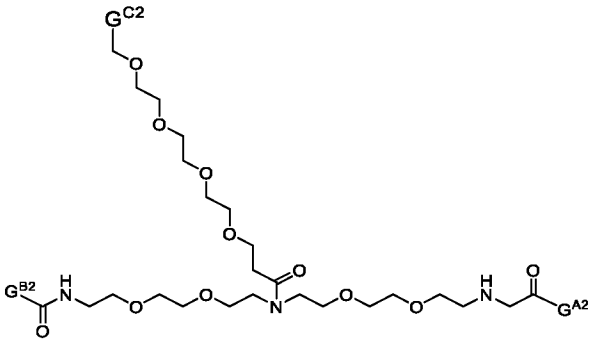

;

;

;

;

;

;

;

;

; или

;

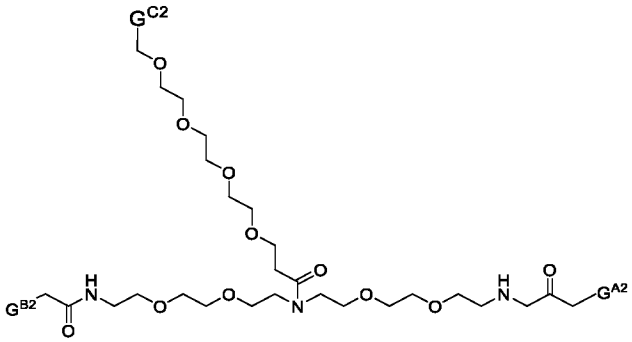
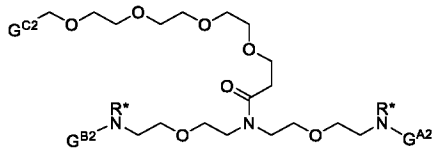
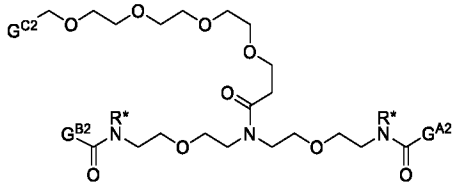
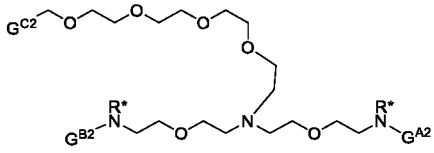
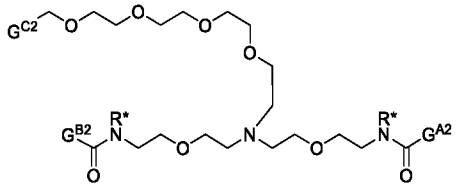
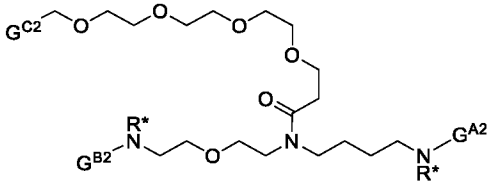
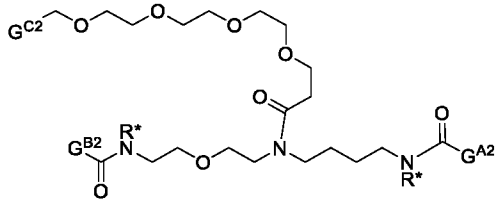
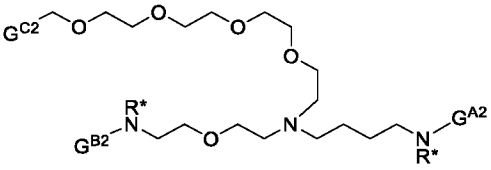
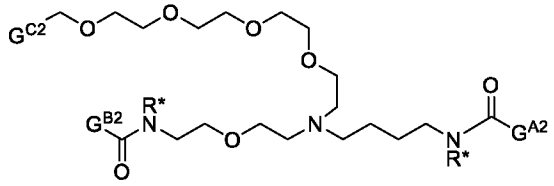
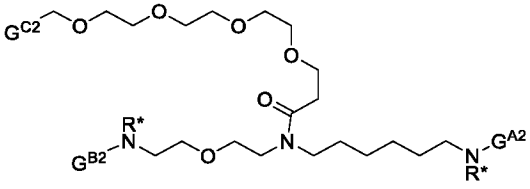
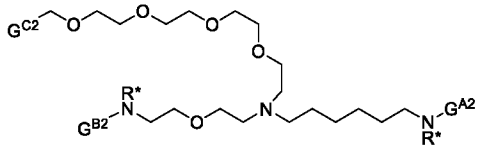
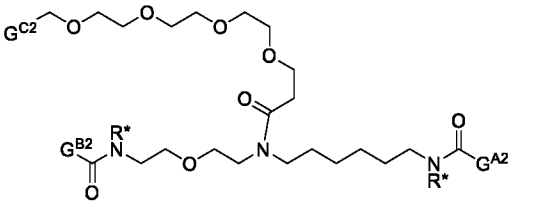
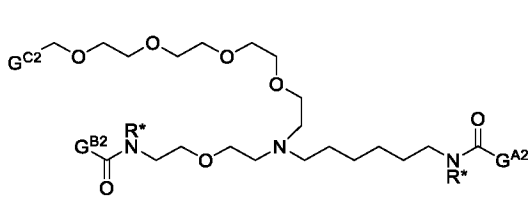
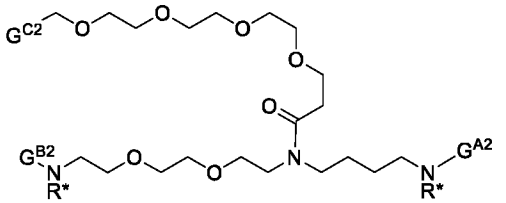
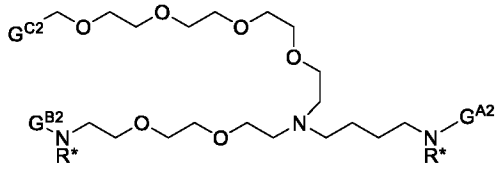
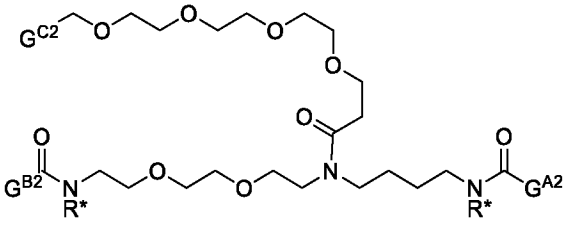
где z_1 и z_2, каждое независимо, представляет собой целое число от 1 до 20; и R_9 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила.

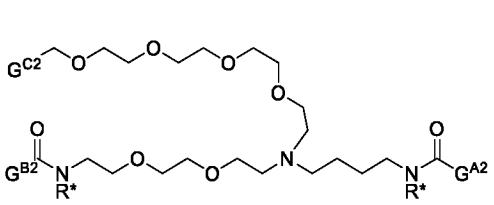
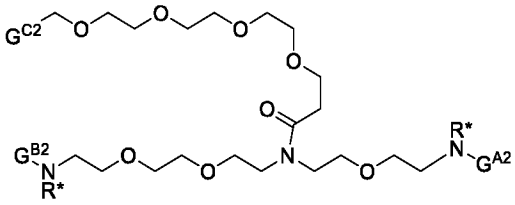
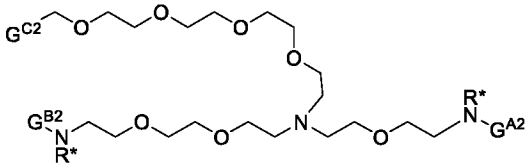
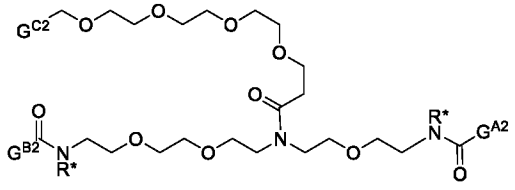
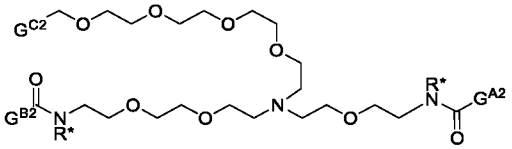
В некоторых вариантах осуществления L представляет собой.


,

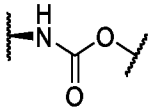
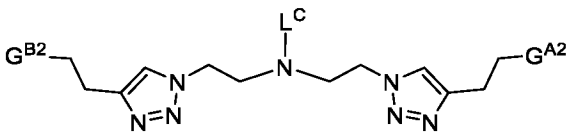

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

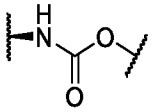
















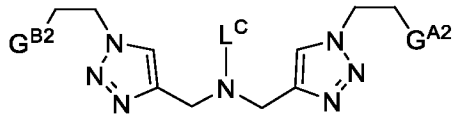

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

;

,

;

,

;

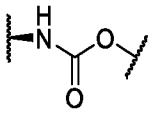
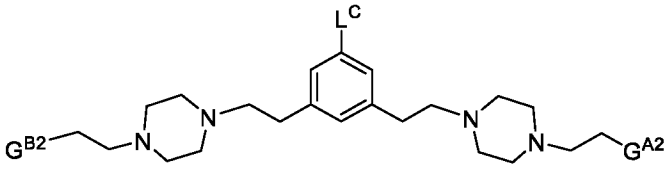

,

;

,

или


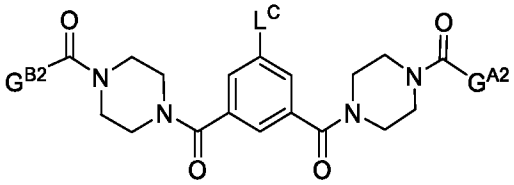
где R* представляет собой связь или включает один или более необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен, необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен, O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат и имино, и где R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил.

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой:  (-NH(C=O)O-) и L представляет собой:  .

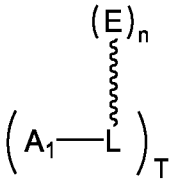
В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой:  (-NH(C=O)O-) и L

представляет собой:  .

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой:  (-NH(C=O)O-) и L представляет собой:  .

В некоторых вариантах осуществления Y представляет собой: (-O-) и L представляет собой:  .

В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (M-I):

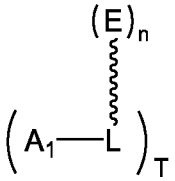


(M-I)

где каждый A_1 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII);

каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), пептид, связывающий белок альбумин, или связывающий Fc пептид; n равно 1 или 2; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, T равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); и L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к каждому из E, A_1, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), каждый A_1 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII). В некоторых вариантах осуществления каждый A_1 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), или (A-VII). В других вариантах осуществления каждый A_1 может быть независимо выбран из формулы (A-I).

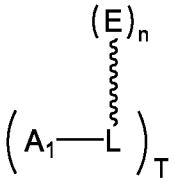
В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (M-I):



(M-I)

где каждый A_1 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-V); каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), пептид, связывающий белок альбумин, или связывающий Fc пептид; n равно 1 или 2; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, T равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); и L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к каждому из E, A_1, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), каждый A_1 может быть независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-V).

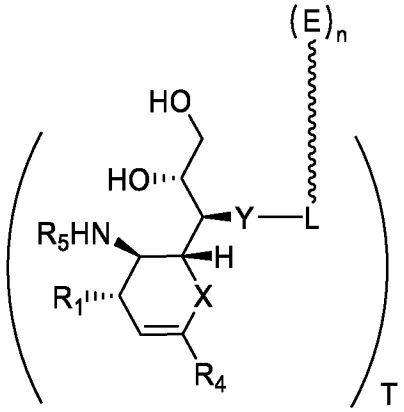
В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (M-I):



(M-I)

где каждый A_1 независимо выбран из любой из формул (A-VI)-(A-IX); каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), пептид, связывающий белок альбумин, или связывающий Fc пептид; n равно 1 или 2; T представляет собой целое число от 1 до 20 (например, T равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20); и L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к каждому из E, A_1, или его фармацевтически приемлемая соль. Когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), каждый A_1 может быть независимо выбран из любой из формул (A-VI)-(A-IX).

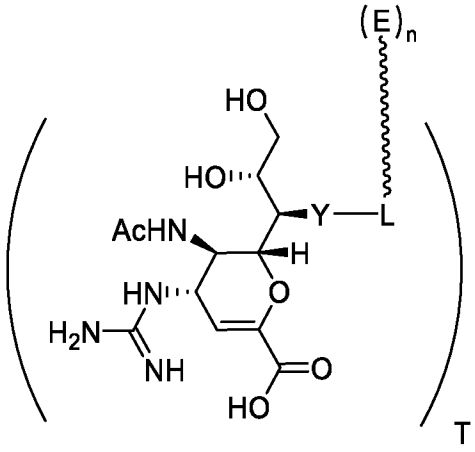
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II):



(M-II)

или его фармацевтически приемлемая соль.

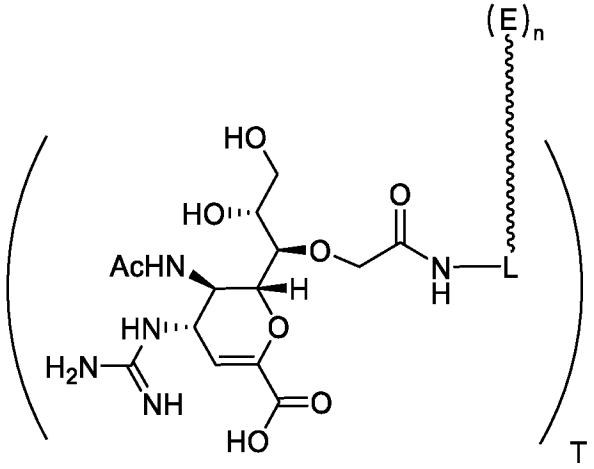
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II-1):



(M-II-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

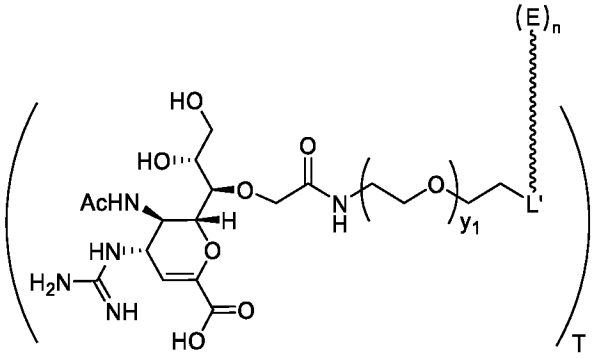
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II-2):



(M-II-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

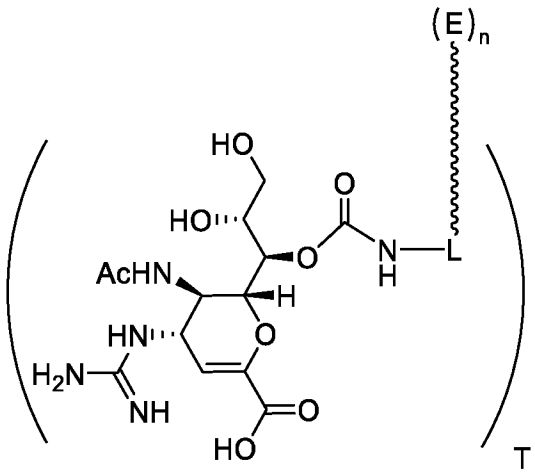
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II-3):



(M-II-3)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

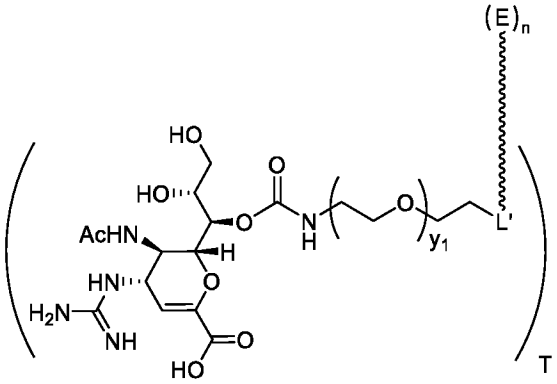
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II-4):



(M-II-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

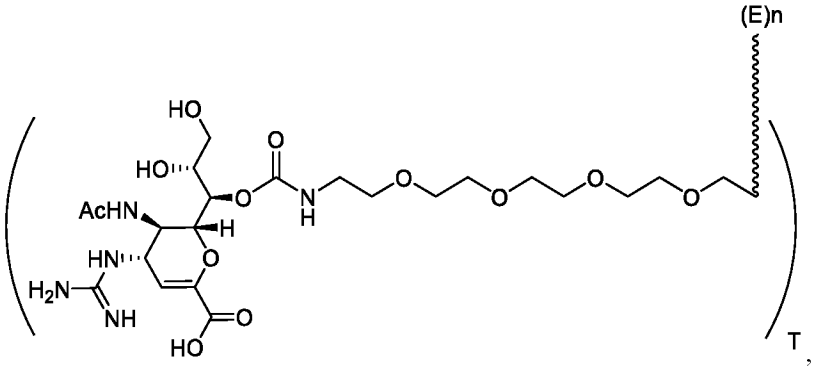
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II-5):



(M-II-5)

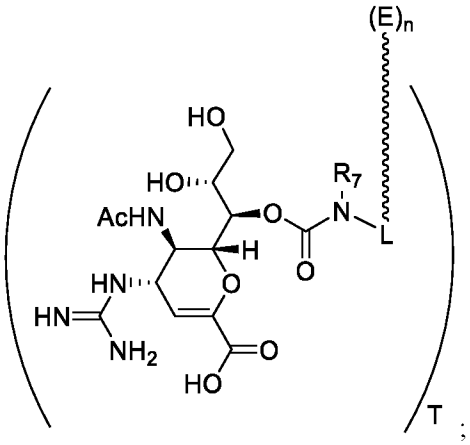
где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

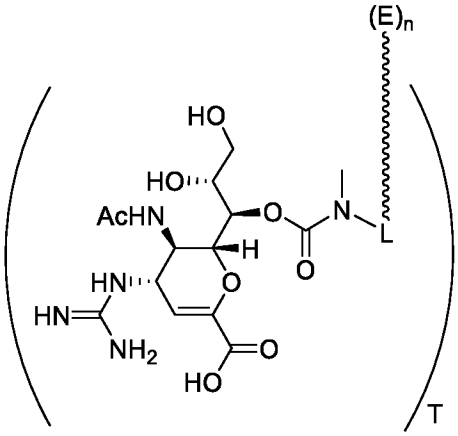
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II-6):



(M-II-6)

где R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила или их фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления R_7 выбран из C1-C20 алкила (например, метила, этила, пропила или бутила).

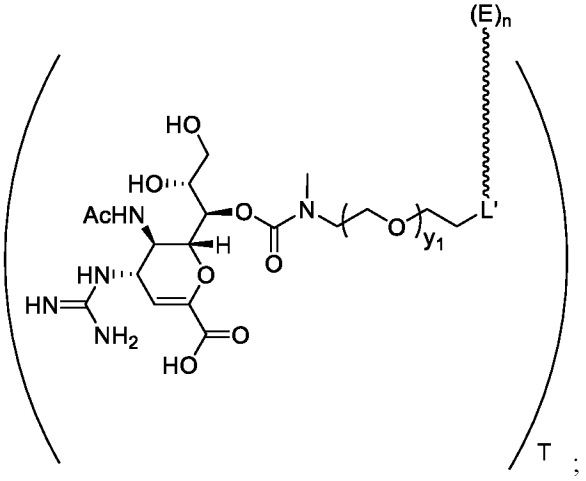
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II-7):



(M-II-7)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II-8):

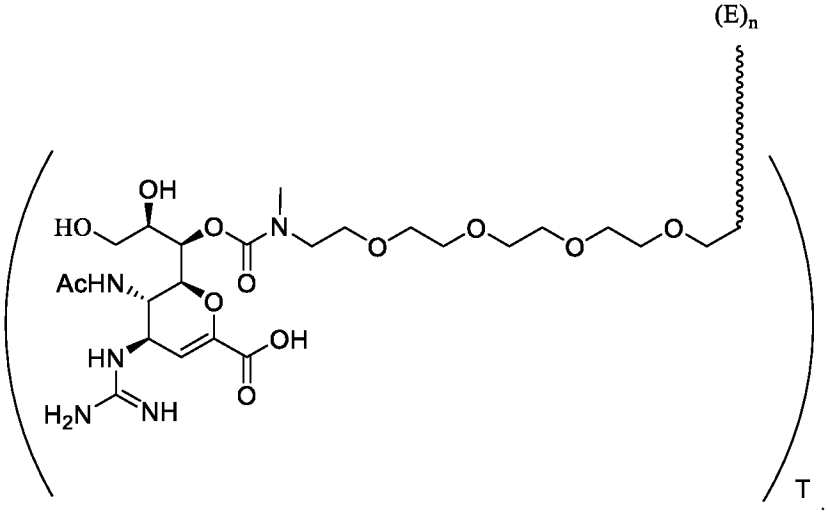


(M-II-8)

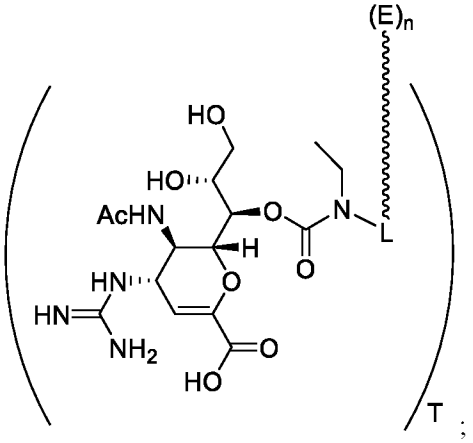
где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру:



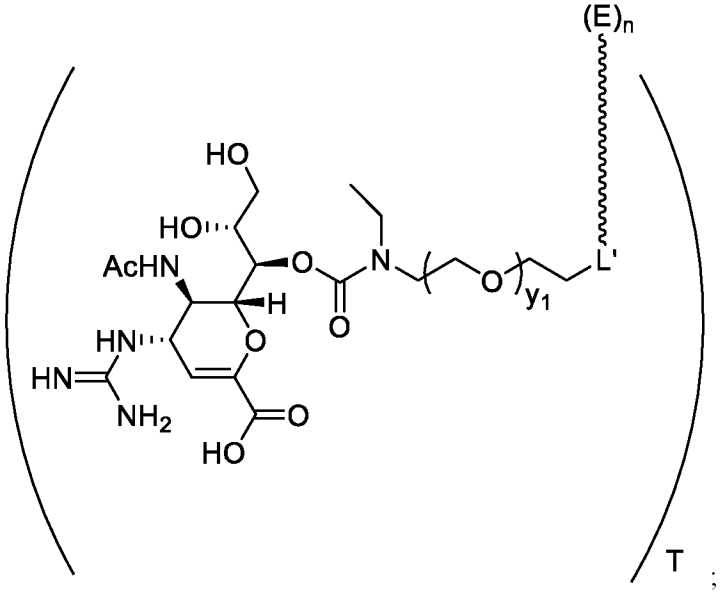
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II-9):



(M-II-9)

или его фармацевтически приемлемая соль.

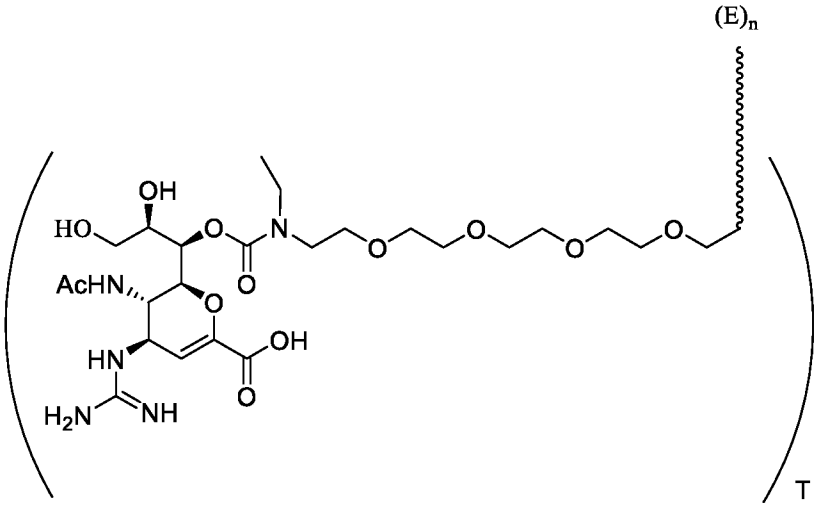
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-II-10):



(M-II-10)

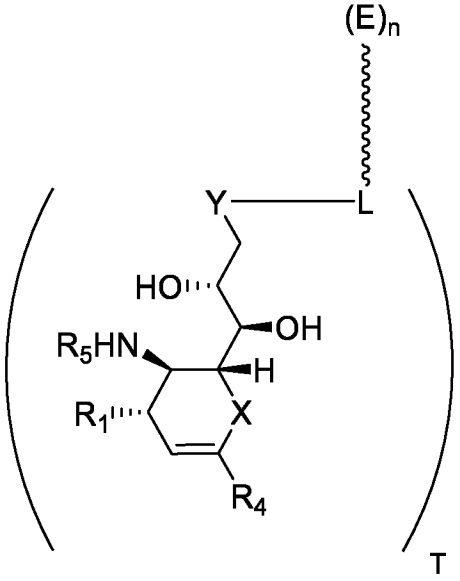
где L' представляет собой остаток L, а y1 является целым числом от 1 до 20 (например, y1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемой солью.

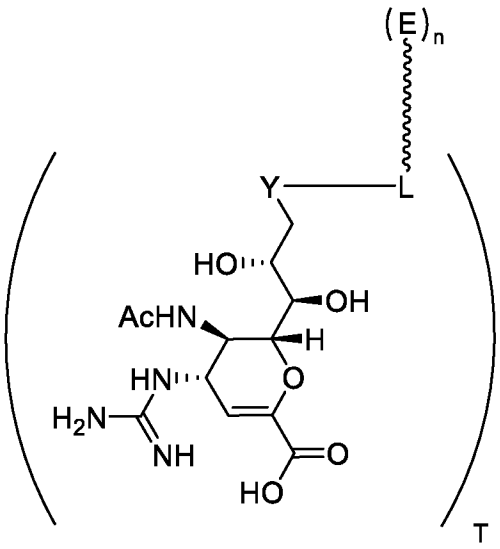
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-III):



(M-III)

или его фармацевтически приемлемая соль.

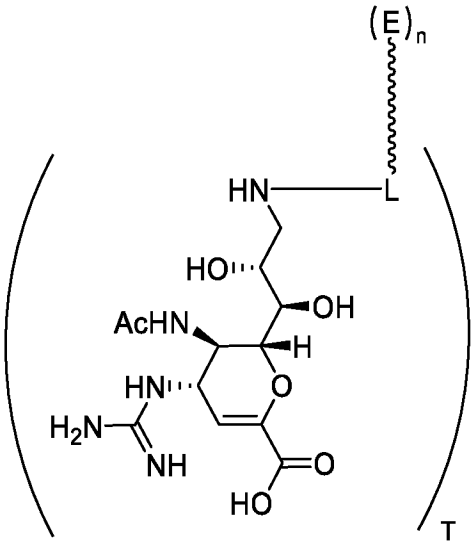
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-III-1):



(M-III-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

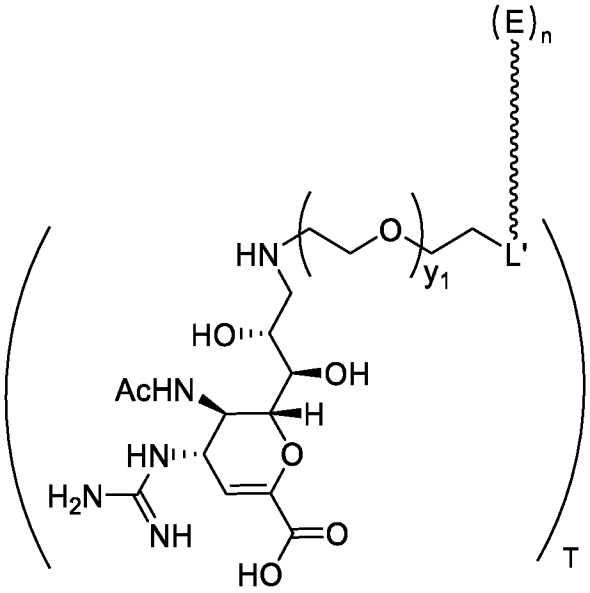
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-III-2):



(M-III-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

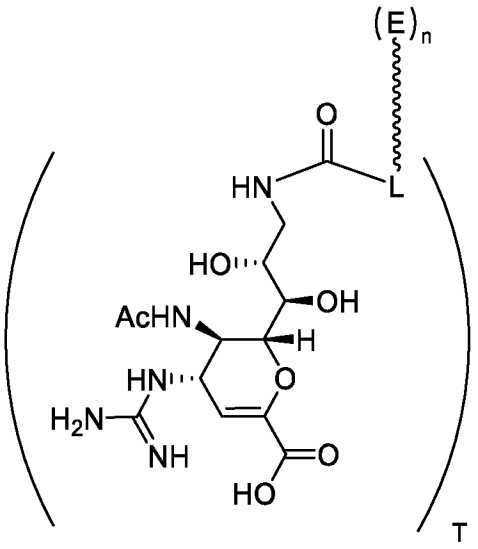
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-III-3):



(M-III-3)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

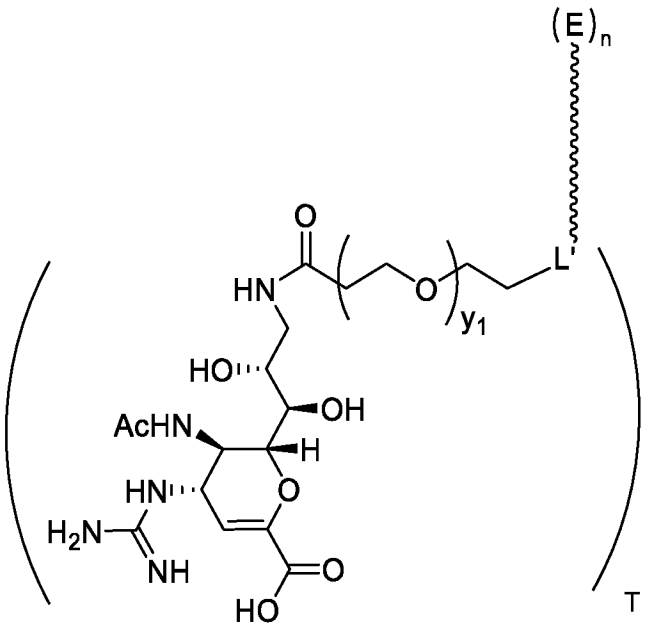
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-III-4):



(M-III-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

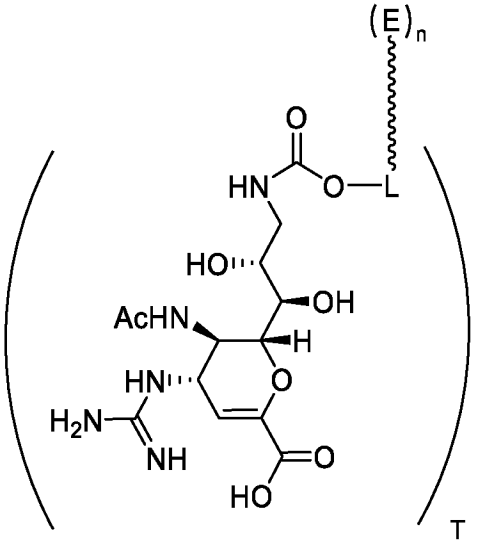
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-III-5):



(M-III-5)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

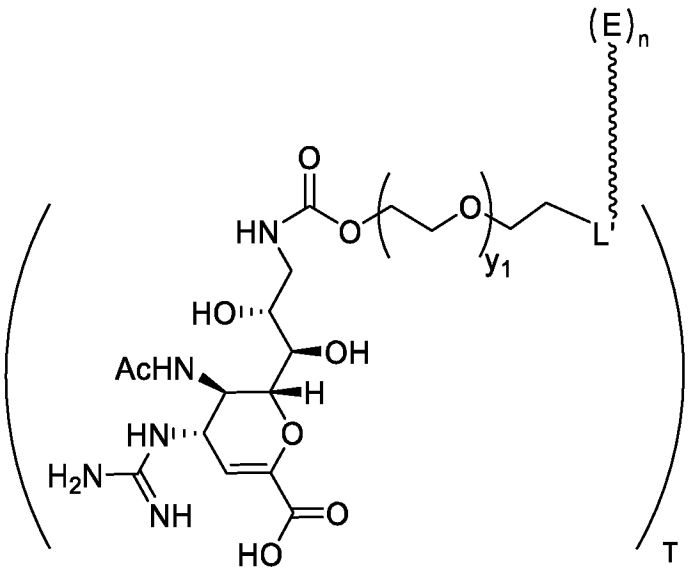
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-III-6):



(M-III-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

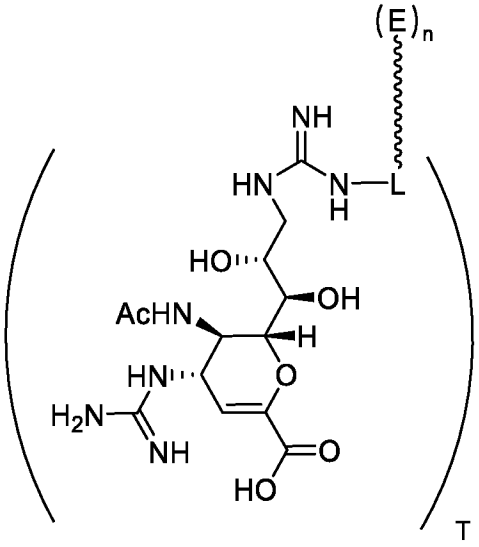
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-III-7):



(M-III-7)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

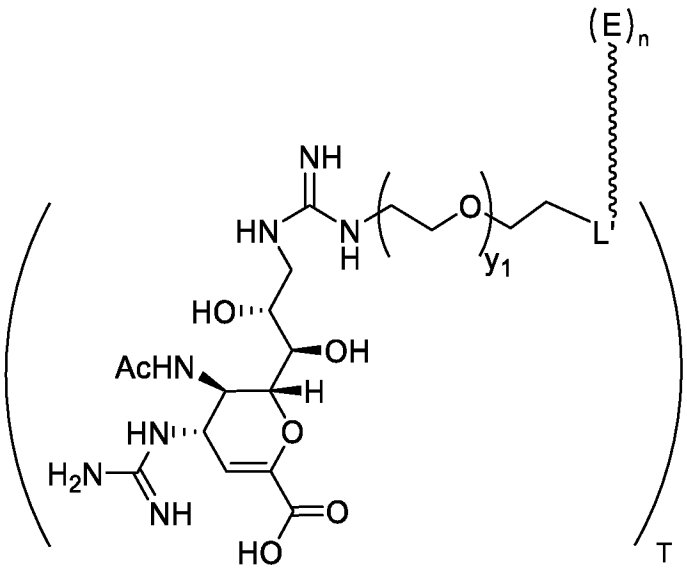
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-III-8):



(M-III-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

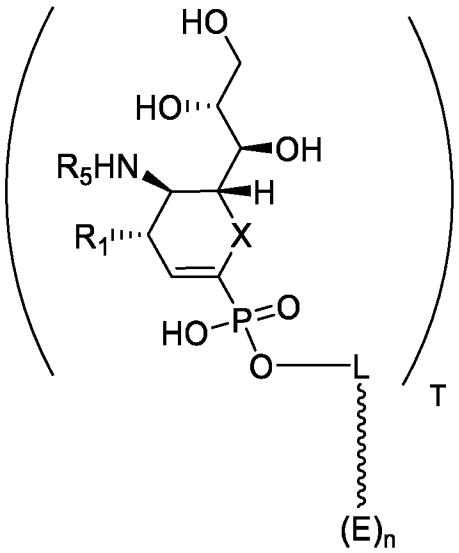
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-III-9):



(M-III-9)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

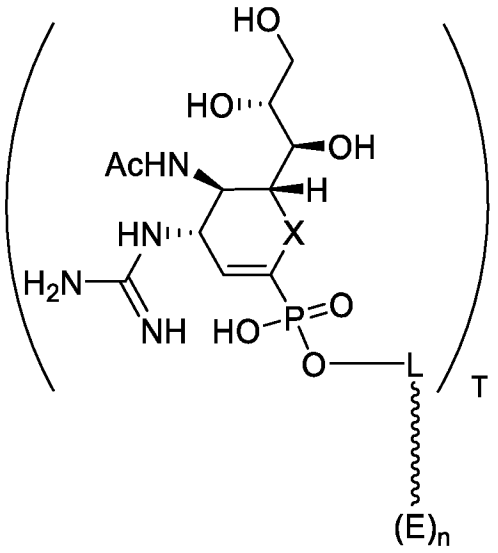
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-IV):



(M-IV)

или его фармацевтически приемлемая соль.

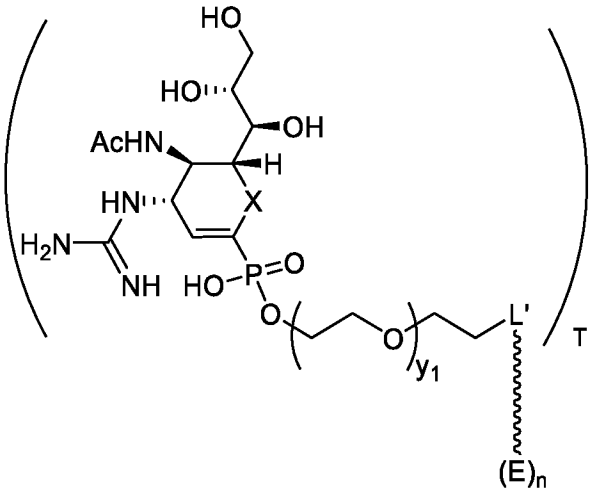
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-IV-1):



(M-IV-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

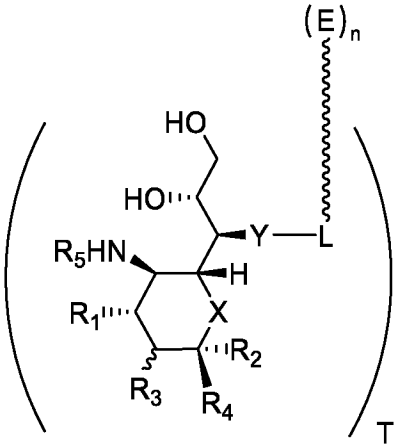
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-IV-2):



(M-IV-2)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

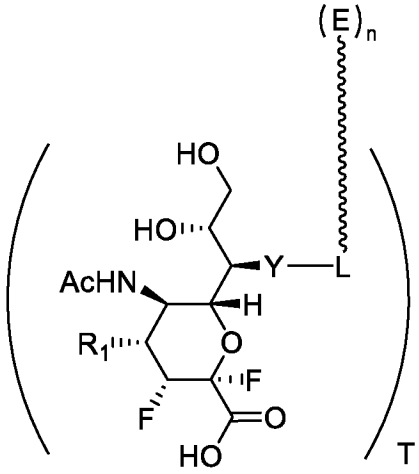
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V):



(M-V)

или его фармацевтически приемлемая соль.

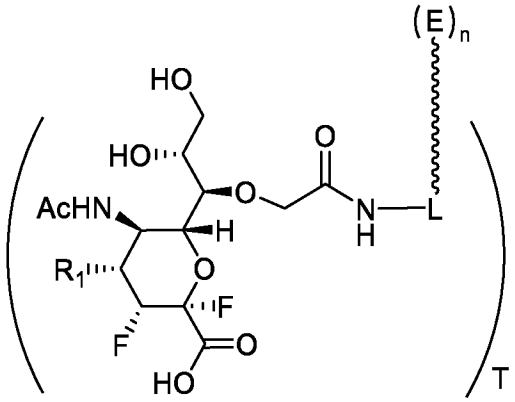
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V-1):



(M-V-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

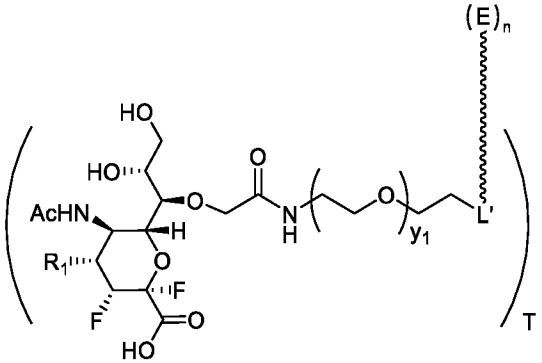
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V-2):



(M-V-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

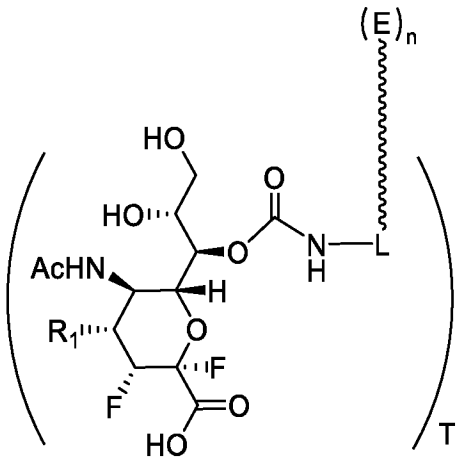
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V-3):



(M-V-3)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

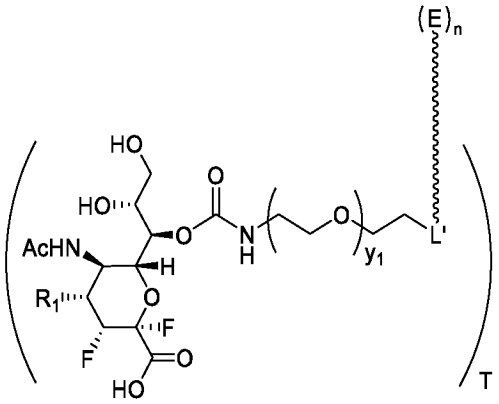
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V-4):



(M-V-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

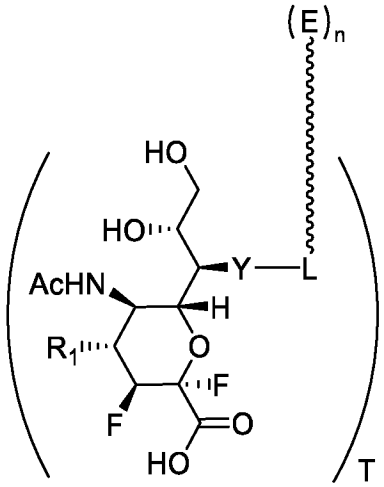
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V-5):



(M-V-5)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

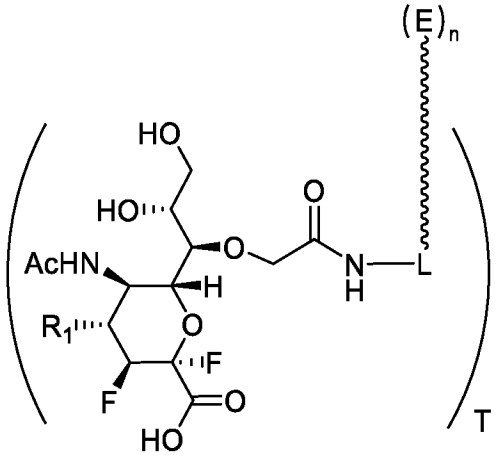
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V-6):



(M-V-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

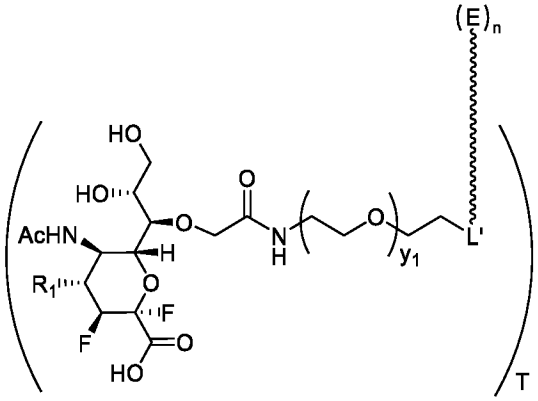
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V-7):



(M-V-7)

или его фармацевтически приемлемая соль.

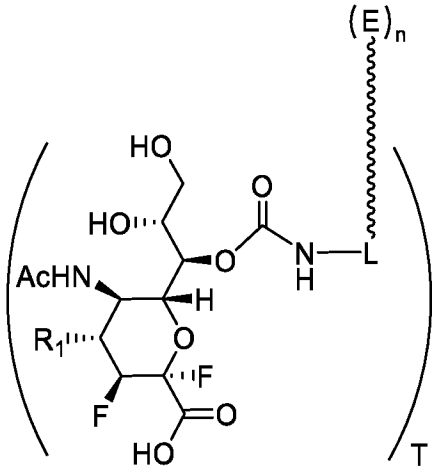
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V-8):



(M-V-8)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

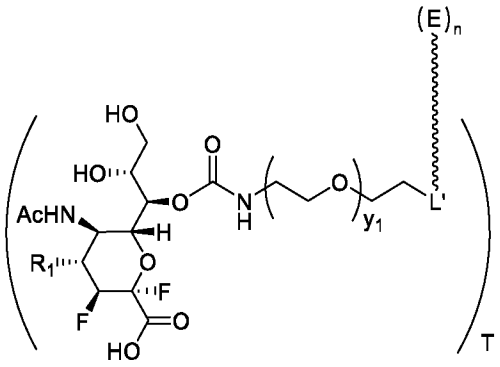
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V-9):



(M-V-9)

или его фармацевтически приемлемая соль.

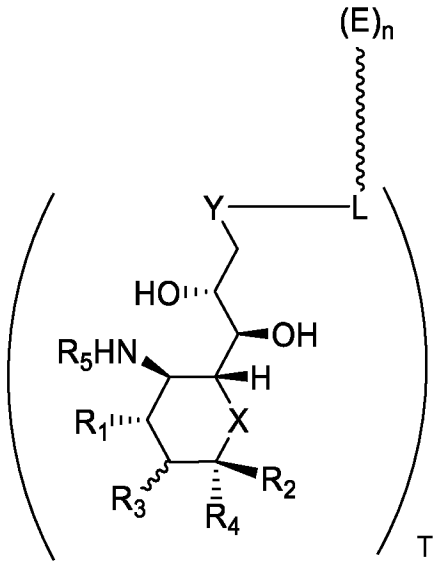
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-V-10):



(M-V-10)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

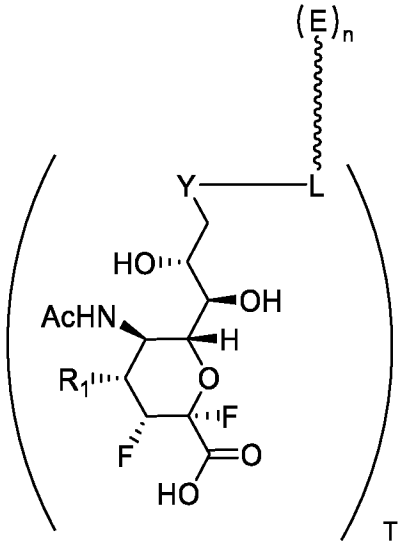
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VI):



(M-VI)

или его фармацевтически приемлемая соль.

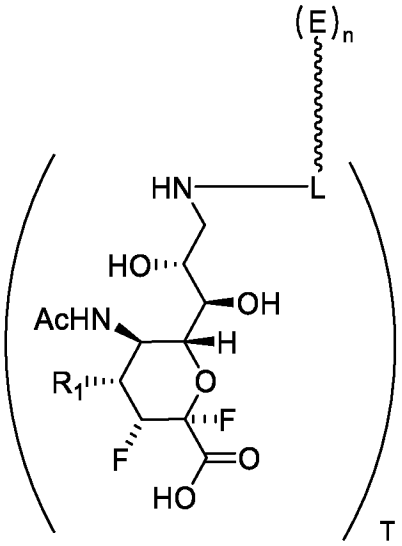
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VI-1):



(M-VI-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

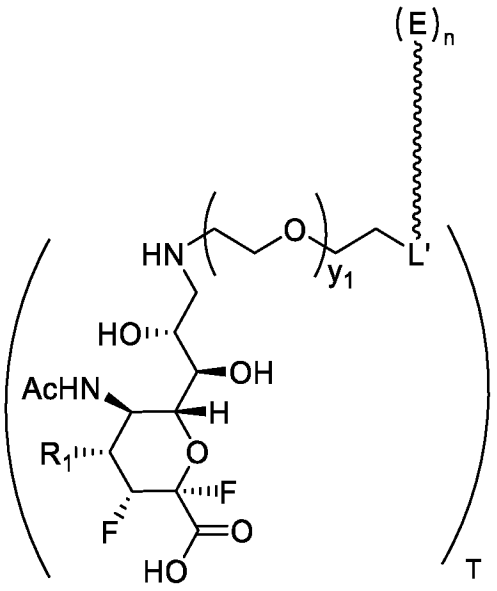
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VI-2):



(M-VI-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

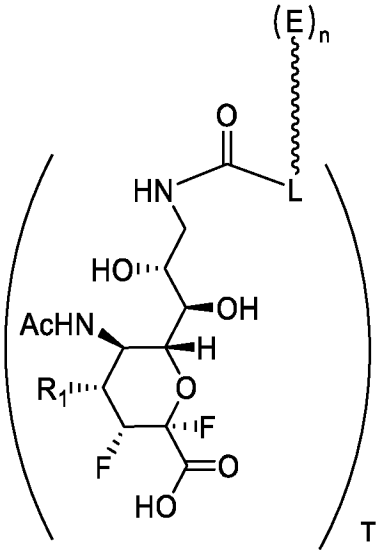
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VI-3):



(M-VI-3)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

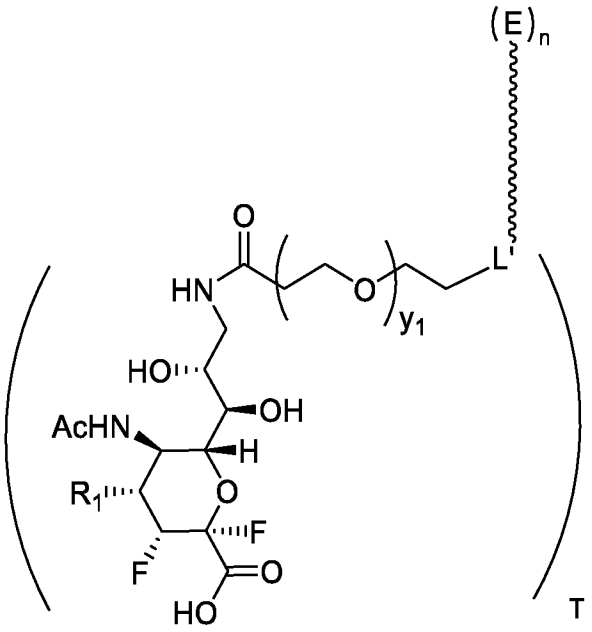
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VI-4):



(M-VI-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

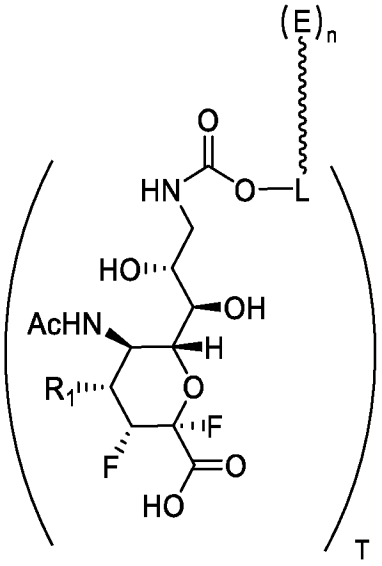
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VI-5):



(M-VI-5)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

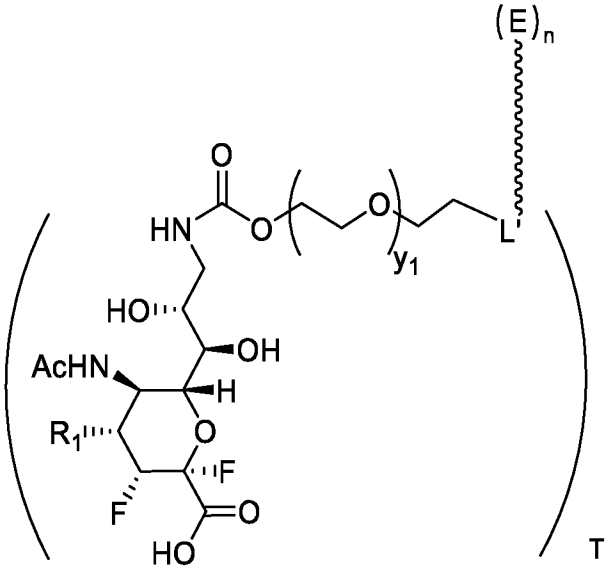
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VI-6):



(M-VI-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

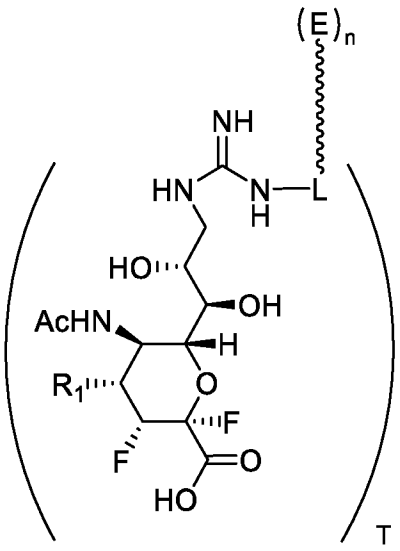
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VI-7):



(M-VI-7)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

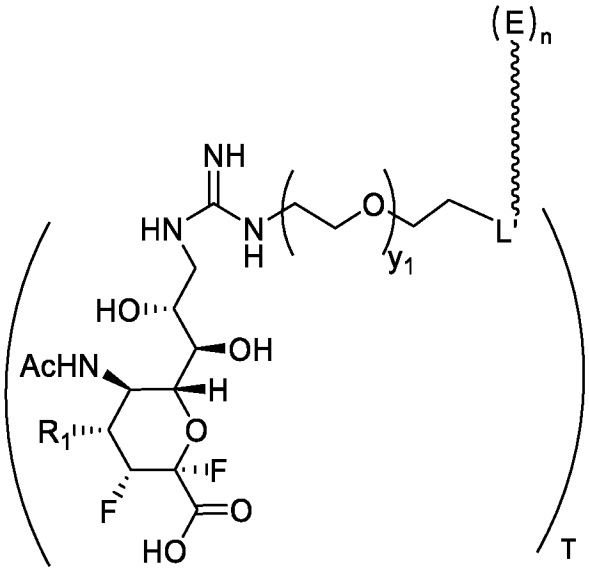
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VI-8):



(M-VI-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

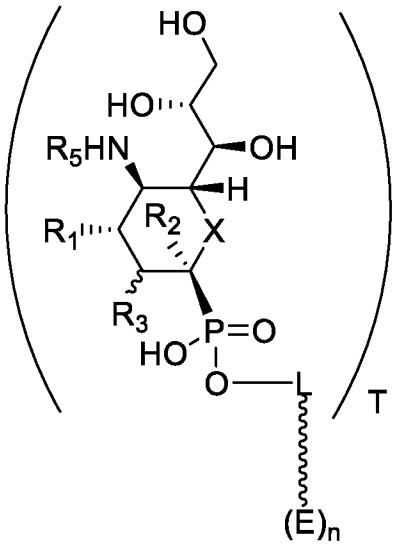
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VI-9):



(M-VI-9)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VII):

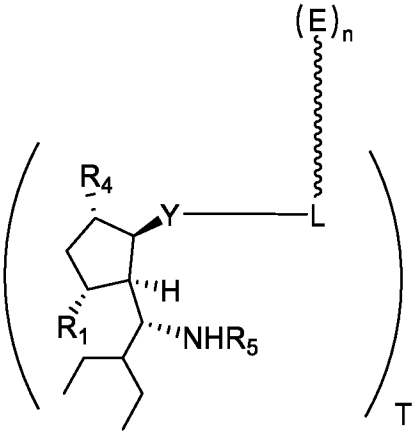


(M-VII)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_1 представляет собой OH. В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_1 представляет собой NH_2.. В некоторых осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_1 представляет собой -NHC(=NH)NH_2.

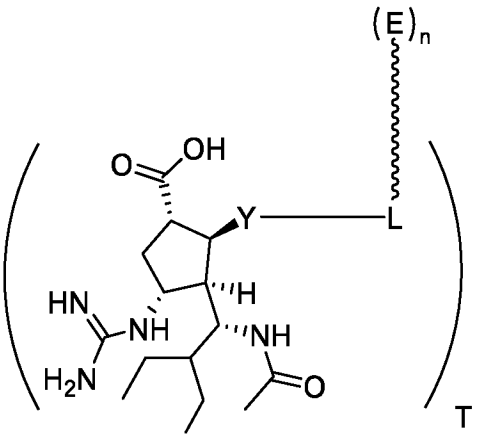
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII):



(M-VIII)

или его фармацевтически приемлемая соль.

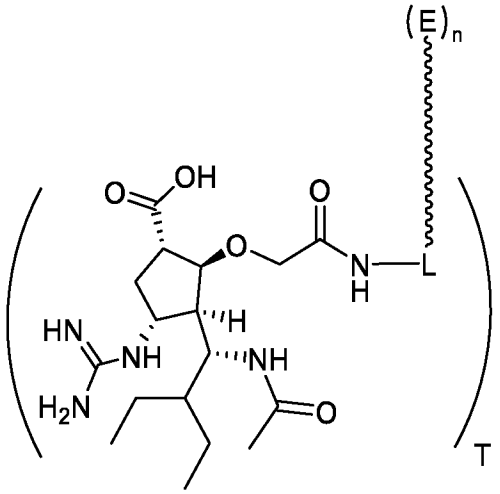
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII-1):



(M-VIII-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

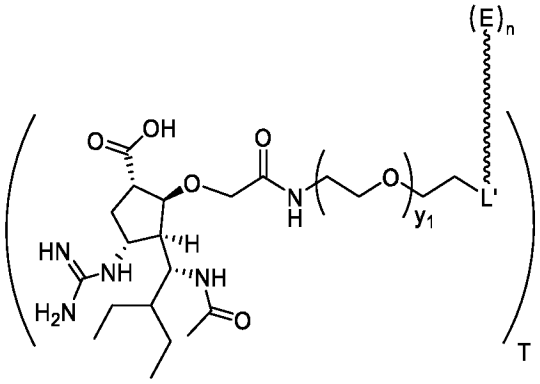
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан (M-VIII-2):



(M-VIII-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

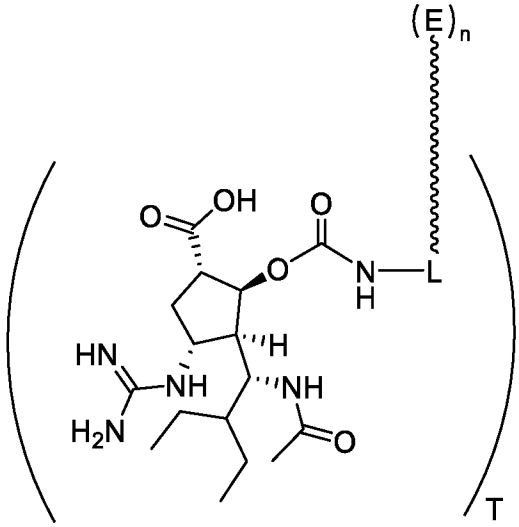
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII-3):



(M-VIII-3)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

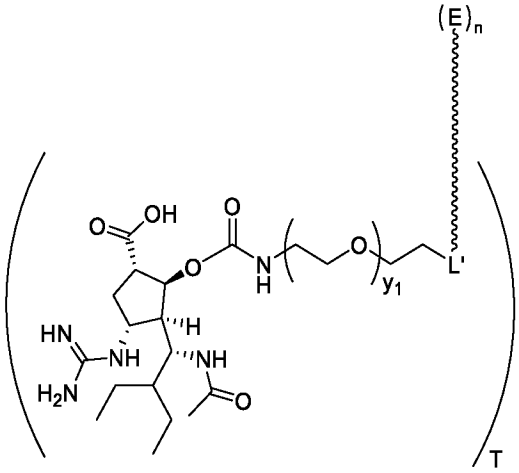
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII-4):



(M-VIII-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

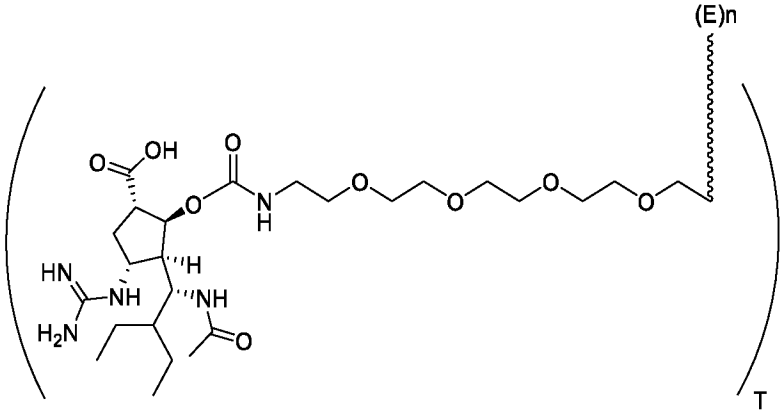
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII-5):



(M-VIII-5)

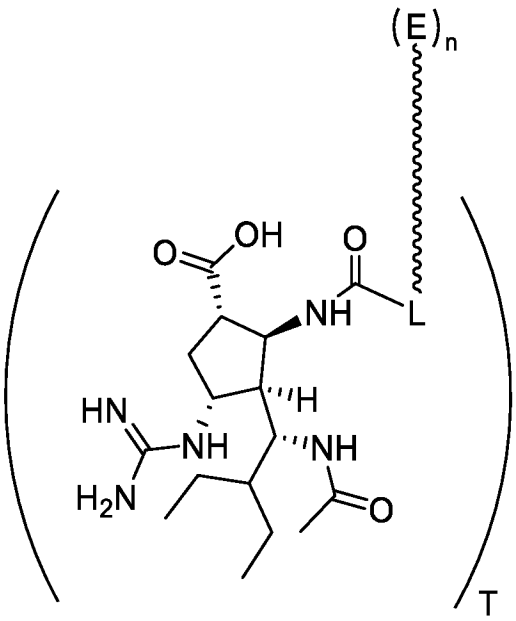
где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемой солью.

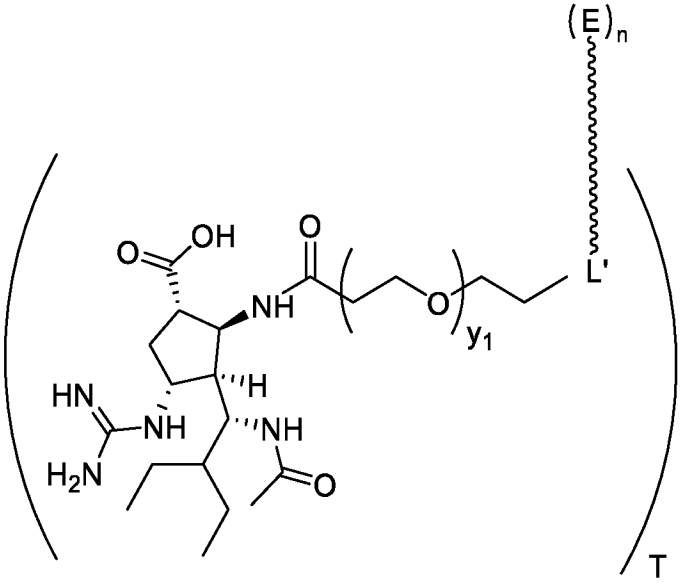
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII-6):



(M-VIII-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

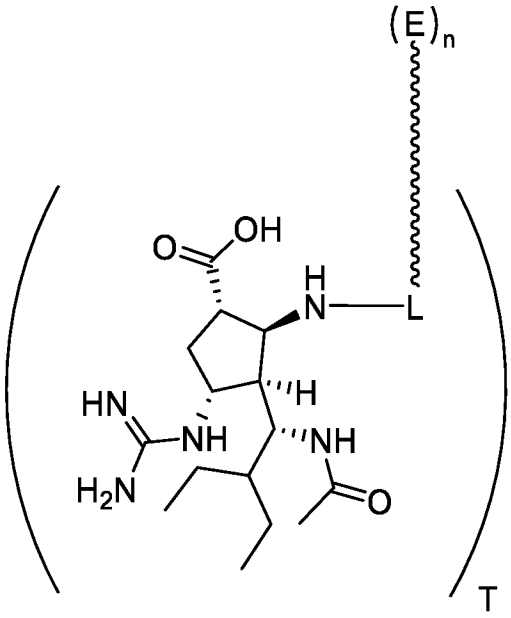
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII-7):



(M-VIII-7)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

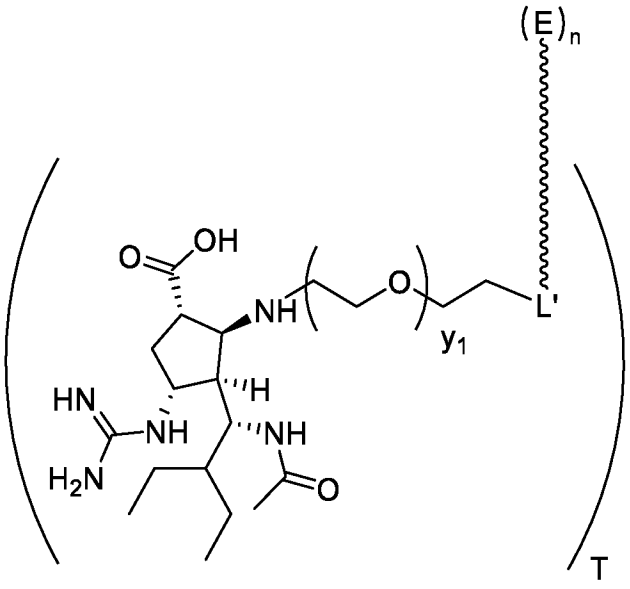
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII-8):



(M-VIII-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

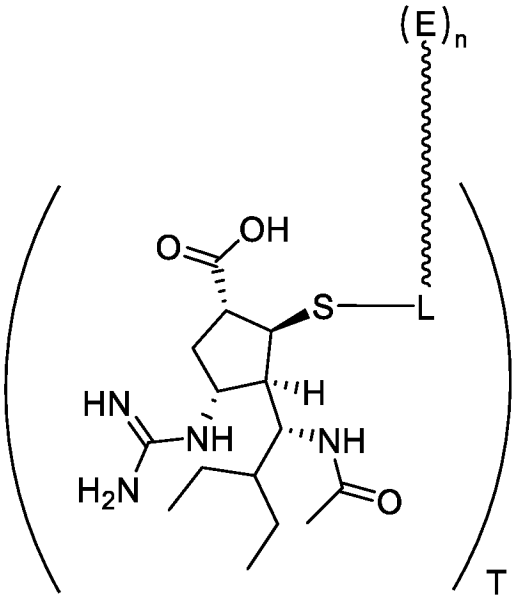
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII-9):



(M-VIII-9)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

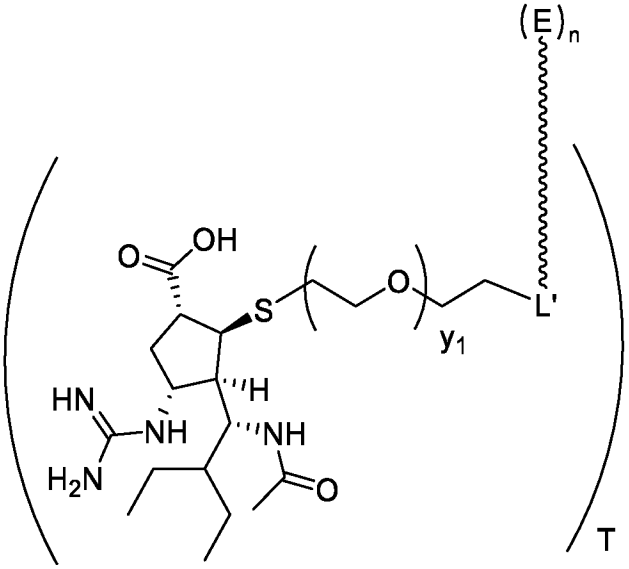
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII-10):



(M-VIII-10)

или его фармацевтически приемлемая соль.

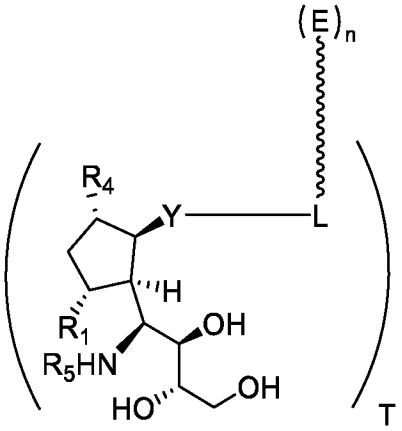
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-VIII-11):



(M-VIII-11)

где L' представляет собой остаток L, а y_1 является целым числом от 1 до 20 (например, y_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

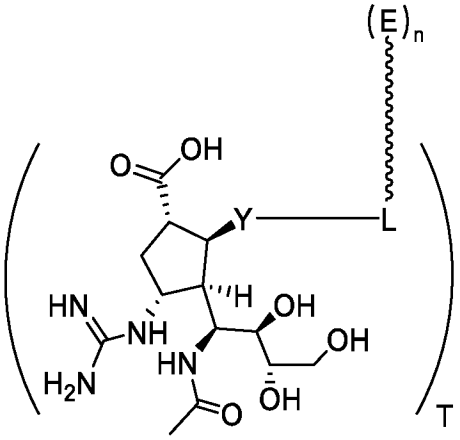
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-IX):



(M-IX)

или его фармацевтически приемлемая соль.

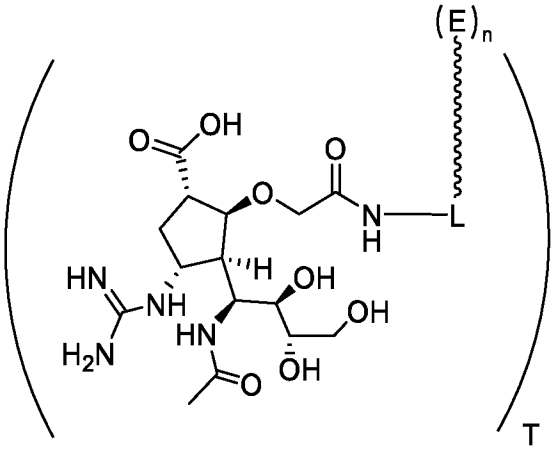
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-IX-1):



(M-IX-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

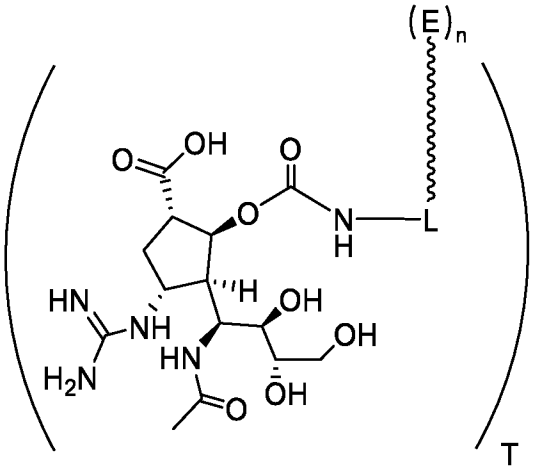
В некотором вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-IX-2):



(M-IX-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

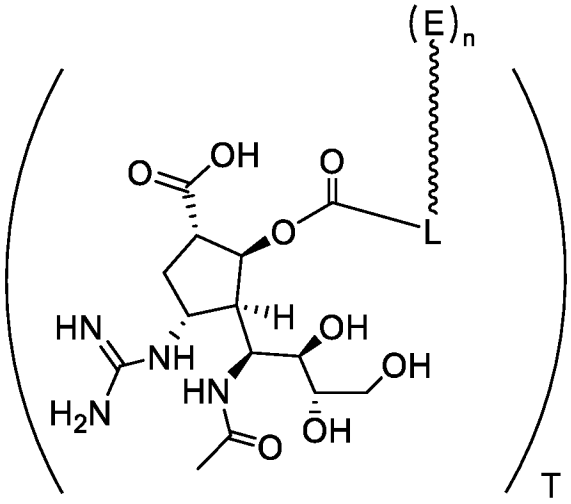
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-IX-3):



(M-IX-3)

или его фармацевтически приемлемая соль.

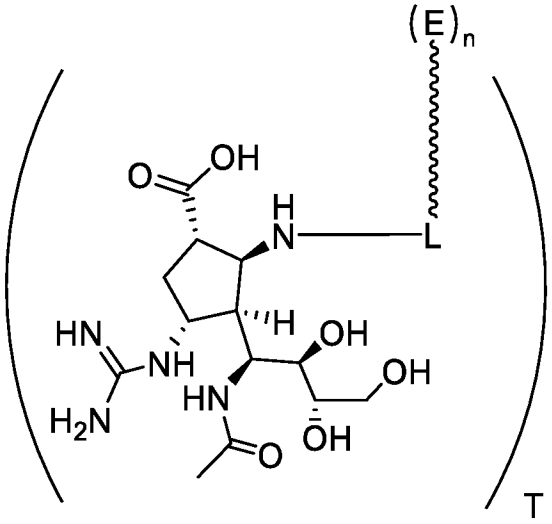
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-IX-4):



(M-IX-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

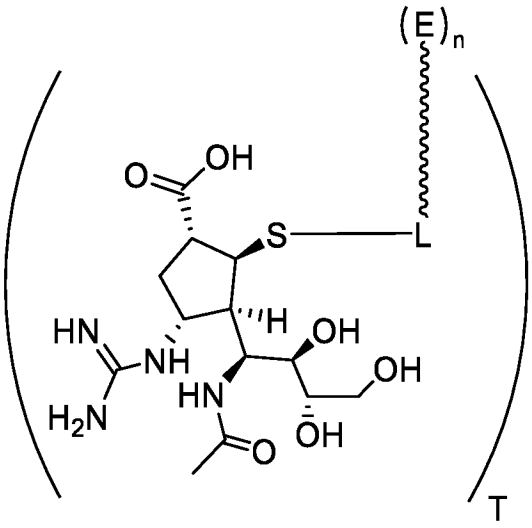
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-IX-5):



(M-IX-5)

или его фармацевтически приемлемая соль.

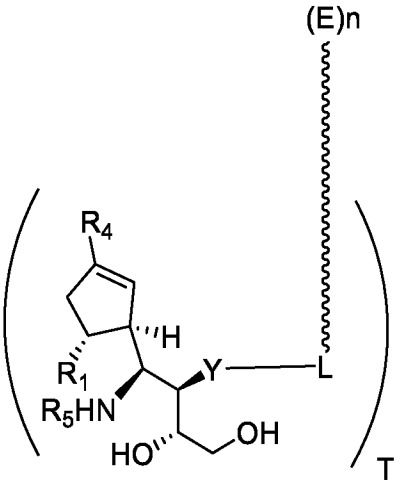
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-IX-6):



(M-IX-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

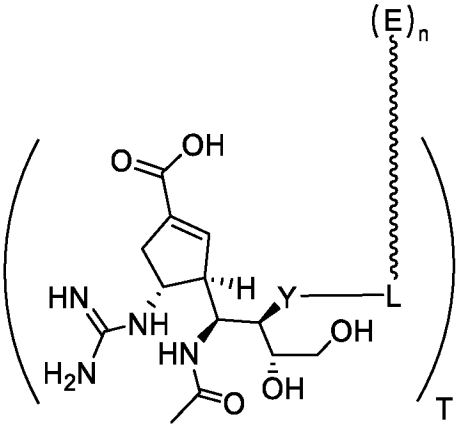
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-X):



(M-X)

или его фармацевтически приемлемая соль.

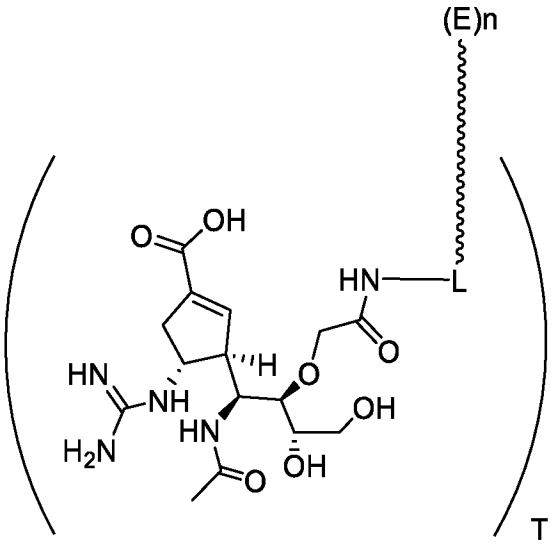
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-X-1):



(M-X-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

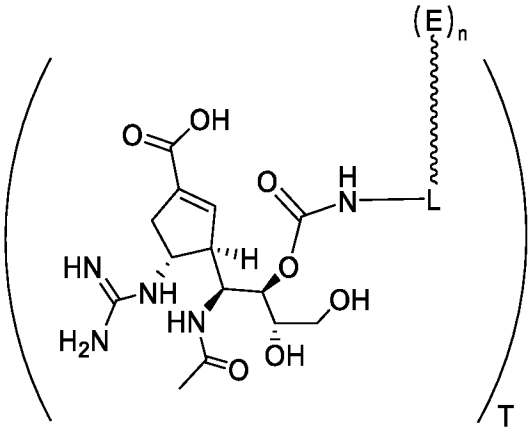
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-X-2):



(M-X-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-X-3):



(M-X-3)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, L или L' содержит один или более необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен, необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен, O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино, где R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил,

необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, остов L или L' содержит один или более необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен, необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен, O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино, где R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, L или L' является оксозамещенным. В некоторых вариантах осуществления остов L или L' содержит не более 250 атомов. В некоторых вариантах осуществления L или L' способен образовывать амидную, карбаматную, сульфонильную или карбамидную связь. В некоторых вариантах осуществления L или L' представляет собой связь. В некоторых вариантах осуществления L или L' представляет собой атом. В некоторых вариантах осуществления L' представляет собой атом азота.

В некоторых вариантах осуществления каждый L описан формулой (M-L-1):

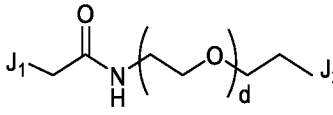
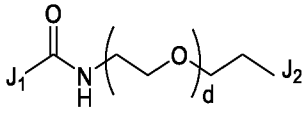
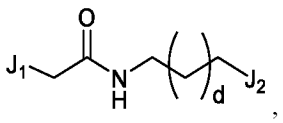
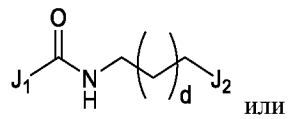
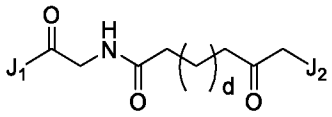
J^1-$(Q^1)_g$-$(T^1)_h$-$(Q^2)_i$-$(T^2)_j$-$(Q^3)_k$-$(T^3)_l$-$(Q^4)_m$-$(T^4)_n$-$(Q^5)_o$-J^2

где: J^1 представляет собой связь, присоединенную к A1; J^2 представляет собой связь, присоединенную к E, или функциональную группу, способную вступать в реакцию с функциональной группой, конъюгированной с E (например, малеимид и цистеин, амин и активированная карбоновая кислота, тиол и малеимид, активированная сульфоновая кислота и амин, изоцианат и амин, азид и алкин, алкен и тетразин); каждый из Q^1, Q^2, Q^3, Q^4 и Q^5, независимо, представляет собой необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен или необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен; каждый из T^1, T^2, T^3, T^4, независимо, представляет собой O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино; R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил,

необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил; и каждое из g, h, i, j, k, l, m, n и o независимо равно 0 или 1; или их фармацевтически приемлемую соль.

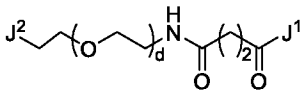
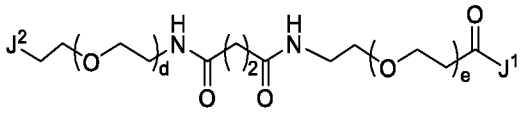
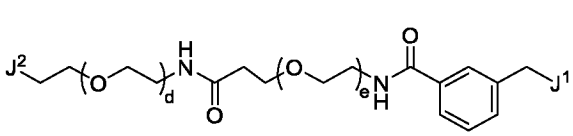
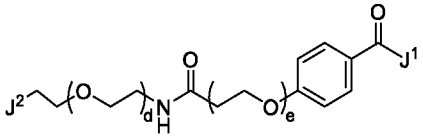
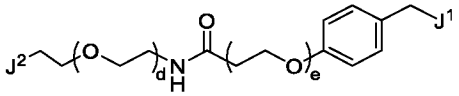
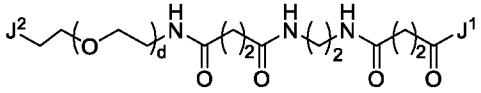
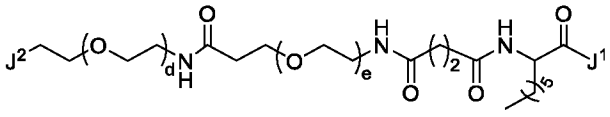
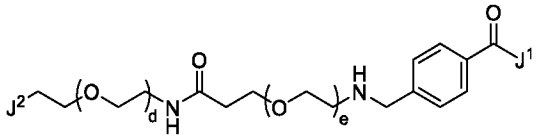
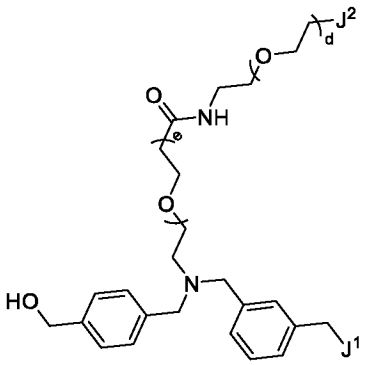
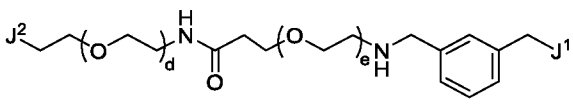
В некоторых вариантах осуществления J^2 может иметь две точки присоединения к Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду (например, два J^2).

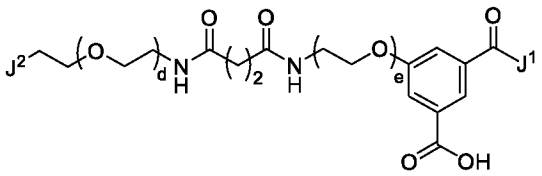
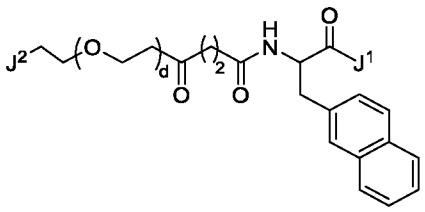
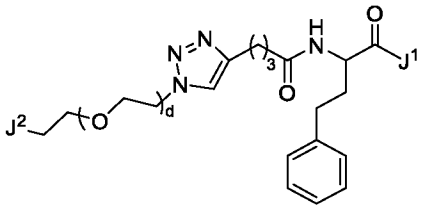
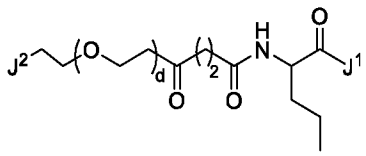
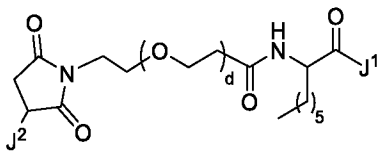
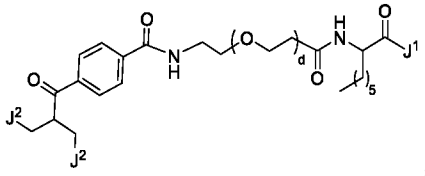
В некоторых вариантах осуществления L представляет собой.





или


где d является целым числом от 1 до 20 (например, d равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20).

В некоторых вариантах осуществления L представляет собой.


,

,

,

,

,

или ,

где каждый из d и e независимо представляет собой целое число от 1 до 26; или их фармацевтически приемлемую соль.

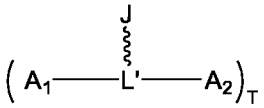
В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, L включает полиэтиленгликолевый (ПЭГ) линкер. ПЭГ линкер включает линкер, имеющий структуру повторяющегося элемента $(-CH_2CH_2O-)_n$, где n является целым числом от 2 до 100. Полиэтиленгликолевый линкер может ковалентно соединять ингибитор нейраминидазы и E (например, в конъюгате любой из формул (M-I)-(M-XI)). Полиэтиленгликолевый линкер может ковалентно соединять первый ингибитор нейраминидазы и второй ингибитор нейраминидазы (например, в конъюгате любой из формул (D-I)-(D-XI)). Полиэтиленгликолевый линкер может ковалентно соединять димер ингибитора нейраминидазы и E (например, в конъюгате любой из формул (D-I)-(D-XI)). Полиэтиленгликолевый линкер может быть выбран из любого из $ПЭГ_2$ -$ПЭГ_{100}$ (например, $ПЭГ_2$, $ПЭГ_3$, $ПЭГ_4$, $ПЭГ_5$, $ПЭГ_5$-$ПЭГ_{10}$, $ПЭГ_{10}$-$ПЭГ_{20}$, $ПЭГ_{20}$-$ПЭГ_{30}$, $ПЭГ_{30}$-$ПЭГ_{40}$, $ПЭГ_{50}$-$ПЭГ_{60}$, $ПЭГ_{60}$-$ПЭГ_{70}$, $ПЭГ_{70}$-$ПЭГ_{80}$, $ПЭГ_{80}$-$ПЭГ_{90}$, $ПЭГ_{90}$-$ПЭГ_{100}$). В некоторых вариантах осуществления L^C включает ПЭГ линкер, где L^C ковалентно присоединен к каждому из Q и E.

В некоторых осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_1 представляет собой $-NHC(=NH)NH_2$. В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_2 представляет собой -F. В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_3 представляет собой -F. В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_4 представляет собой $–CO_2H$. В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, R_5 представляет собой $–COCH_3$.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, L ковалентно присоединен к атому азота доступного на поверхности лизина E или L ковалентно присоединен к атому серы доступного на поверхности цистеина E.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E представляет собой мономер Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления n равно 2, и каждый E димеризуется с образованием Fc-домена.

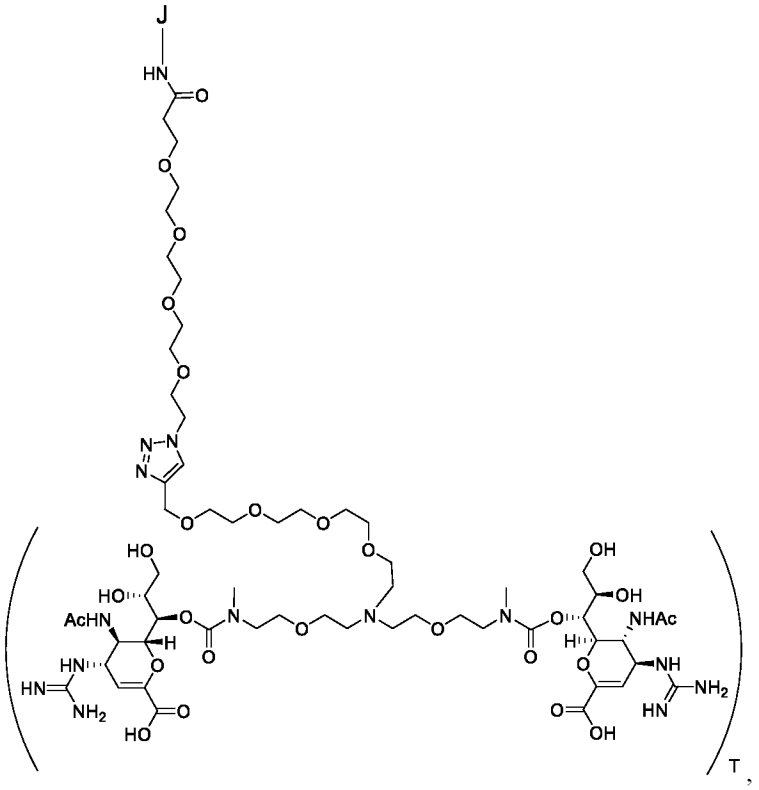
В некоторых вариантах осуществления n равно 2, каждый E представляет собой мономер Fc-домена, каждый E димеризуется с образованием Fc-домена, а конъюгат описан формулой (D-I-1):



(D-I-1)

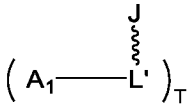
где J представляет собой Fc-домен; а T является целым числом от 1 до 20 (например, T равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления n равно 2, каждый E представляет собой мономер Fc-домена, каждый E димеризуется с образованием Fc-домена, а конъюгат описан формулой (M-I-1):



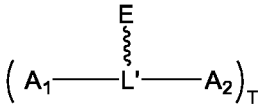
(M-I-1)

где J представляет собой Fc-домен; а является целым числом от 1 до 20 (например, T равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E имеет последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E представляет собой белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид. В некоторых вариантах осуществления, где E представляет собой белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид, n равно 1.

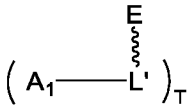
В некоторых вариантах осуществления n равно 1, E представляет собой белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид, а конъюгат описан формулой (D-I-2):



(D-I-2)

где E представляет собой белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид; и T является целым числом от 1 до 20, или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления n равно 1, E представляет собой белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид, а конъюгат описан формулой (M-I-2):



(M-I-2)

где E представляет собой белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид; и T является целым числом от 1 до 20, или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E представляет собой белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, T равно 1, 2, 3, 4 или 5.

В другом аспекте в изобретении представлена популяция конъюгатов, имеющих структуру любого из конъюгатов, описанных в данном документе (например, популяцию конъюгатов, имеющих формулу любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)), где среднее значение T составляет от 1 до 20 (например, среднее значение T составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5). В некоторых вариантах среднее значение T составляет около 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5 или 20.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления E может быть конъюгирован с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различными фрагментами A_1-L-A_2. В некоторых вариантах осуществления E конъюгирован с первым фрагментом A_1-L-A_2 и со вторым фрагментом A_1-L-A_2. В некоторых вариантах осуществления A_1 и A_2 первого фрагмента A_1-L-A_2 независимо выбраны из любой из формул (A-III)-(A-V), а A_1 и A_2 второго фрагмента A_1-L-A_2 независимо выбраны из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII) и (A-IX).

В некоторых вариантах осуществления каждый из первых фрагментов A_1-L-A_2 специфически конъюгирован с остатком лизина E (например, атомом азота доступного на поверхности остатка лизина E), и каждый из вторых фрагментов A_1-L-A_2 специфически конъюгирован с остатком цистеина E (например, с атомом серы доступного на поверхности остатка цистеина E). В некоторых вариантах осуществления каждый из первых фрагментов A_1-L-A_2 специфически конъюгирован с остатком цистеина E (например, атомом серы доступного на поверхности остатка цистеина E), и каждый из вторых фрагментов A_1-L-A_2 специфически конъюгирован с остатком лизина E (например, с атомом азота доступного на поверхности остатка лизина E).

В некоторых вариантах осуществления количество первых фрагментов A_1-L-A_2, конъюгированных с

E, равно целому числу от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10). В некоторых вариантах осуществления количество вторых фрагментов A_1-L-A_2, конъюгированных с E, равно целому числу от 1 до 10 (например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

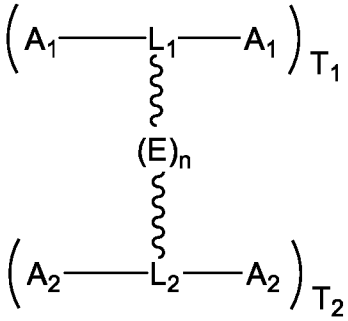
В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления E может быть конъюгирован с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различными фрагментами A_1-L . В некоторых вариантах осуществления E конъюгирован с первым фрагментом A_1-L и со вторым фрагментом A_1-L. В некоторых вариантах осуществления A_1 первого фрагмента A_1-L независимо выбран из любой из формул (A-III)-(A-V),

а A_1 второго фрагмента A_1-L независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII) или (A-IX).

В некоторых вариантах осуществления каждый из первых фрагментов A_1-L специфически конъюгирован с остатком лизина E (например, атомом азота доступного на поверхности остатка лизина E), и каждый из вторых фрагментов A_1-L специфически конъюгирован с остатком цистеина E (например, с атомом серы доступного на поверхности остатка цистеина E). В некоторых вариантах осуществления каждый из первых фрагментов A_1-L специфически конъюгирован с остатком цистеина E (например, атомом серы доступного на поверхности остатка цистеина E), и каждый из вторых фрагментов A_1-L специфически конъюгирован с остатком лизина E (например, с атомом азота доступного на поверхности остатка лизина E).

В некоторых вариантах осуществления количество первых фрагментов A_1, конъюгированных с E, равно целому числу от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10). В некоторых вариантах осуществления количество вторых фрагментов A_1, конъюгированных с E, равно целому числу от 1 до 10 (например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (D'-I):



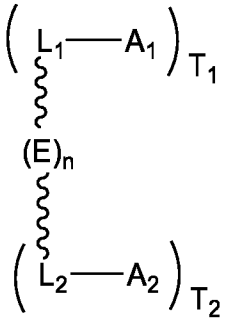
(D'-I)

где каждый A_1 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII); где каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII) и (A-IX); каждый E содержит мономер Fc-домена (например, мономер Fc-домена, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид; n равно 1 или 2; T_1 является целым числом от 1 до 10 (например, T_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); и L_1 представляет собой линкер, ковалентно конъюгированный с E и с каждым A_1; T_1 является целым числом от 1 до 10 (например, T_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); L_2 представляет собой линкер, ковалентно конъюгированный с E и с каждым A_2; T_2 является целым числом от 1 до 10 (например, T_2 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), или их фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первых фрагментов A_1-L-A_1 специфически

конъюгирован с остатком лизина E (например, атомом азота доступного на поверхности остатка лизина E), а каждый A_2-L-A_2 специфически конъюгирован с остатком цистеина E (например, с атомом серы доступного на поверхности остатка цистеина E). В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент A_1-L-A_1 специфически конъюгирован с остатком цистеина E (например, атомом серы доступного на поверхности остатка цистеина E), а каждый фрагмент A_2-L-A_2 специфически конъюгирован с остатком лизина E (например, с атомом азота доступного на поверхности остатка лизина E).

В другом аспекте в изобретении представлен конъюгат, описанный формулой (M'-I):



(M'-I)

где каждый A_1 независимо выбран из любой (M-IX) из формул (A-I)-(A-XII); где каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII) и (A-IX); каждый E содержит мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138), белок альбумин (например, белок альбумин, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 139-141), связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид; n равно 1 или 2; T_1 является целым числом от 1 до 10 (например, T_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); и L_1 представляет собой линкер, ковалентно конъюгированный с E и A_1; T_1 является целым числом от 1 до 10 (например, T_1 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10); L_2 представляет собой линкер, ковалентно конъюгированный с E и A_2; T_2 является целым числом от 1 до 10 (например, T_2 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), или их фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первых фрагментов A_1-L специфически конъюгирован с остатком лизина E (например, атомом азота доступного на поверхности остатка лизина E), а каждый A_2-L специфически конъюгирован с остатком цистеина E (например, с атомом серы доступного на поверхности остатка цистеина E). В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент A_1-L специфически конъюгирован с остатком цистеина E (например, атомом серы доступного на поверхности остатка цистеина E), а каждый фрагмент A_2-L специфически конъюгирован с остатком лизина E (например, с атомом азота доступного на поверхности остатка лизина E).

В другом аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиции, содержащая любой из конъюгатов, описанных в данном документе (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В другом аспекте в изобретении предложен способ лечения субъекта, страдающего вирусной инфекцией или предположительно имеющего вирусную инфекцию, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества любого из конъюгатов или композиций, описанных в данном документе (например, конъюгата по любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)).

В другом аспекте в изобретении предложен способ профилактического лечения вирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества любого из

конъюгатов или композиций, описанных в данном документе (например, конъюгата по любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)).

В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызвана вирусом гриппа или вирусом парагриппа. В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция представляет собой вирус гриппа A, B или C или вирус парагриппа.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта ослаблен иммунитет.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностирован гуморальный иммунный дефицит, дефицит Т-клеток, нейтропения, аспления или дефицит комплемента.

В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат или собираются лечить с применением иммуносупрессивной терапии.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностировано заболевание, вызывающее иммуносупрессию. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак или синдром приобретенного иммунодефицита. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

В некоторых вариантах осуществления субъекту была проведена или планируется проведение трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

В некоторых вариантах осуществления субъекту была проведена или планируется проведение трансплантации органа.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подвергается риску развития вторичной инфекции. В некоторых вариантах осуществления вторичная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию (например, устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* и/или *Haemophilus influenzae*), вирусную инфекцию или грибковую инфекцию. В конкретных вариантах осуществления вторичная инфекция представляет собой MRSA. В определенных вариантах осуществления вторичная инфекция представляет собой *S. pneumoniae*. В некоторых вариантах осуществления вторичная инфекция представляет собой респираторную инфекцию (например, инфекцию дыхательных путей). В некоторых вариантах осуществления вторичная инфекция ассоциирована (например, вызывает) с пневмонией (например, бактериальной или вирусной пневмонией). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подвергается риску развития пневмонии.

В другом аспекте в описании представлен способ предотвращения вторичной инфекции у субъекта, у которого диагностирована инфекция гриппа, причем указанный способ включает введение субъекту конъюгата или композиции, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту конъюгата 45 или фармацевтической композиции, включающей конъюгат 45.
В некоторых вариантах осуществления введение конъюгата или композиции по настоящему изобретению субъекту, у которого диагностирована гриппозная инфекция, снижает вероятность развития вторичной инфекции, например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% или более (например, по сравнению с субъектом, страдающим гриппом, которого не лечили конъюгатом или композицией). Например, введение конъюгата или композиции по настоящему изобретению субъекту, у которого диагностирована инфекция гриппа, снижает вероятность развития вторичной бактериальной инфекции (например, MRSA, *Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* и/или *Haemophilus influenzae*), например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% и более. В некоторых вариантах осуществления конъюгат или композицию вводят внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутриочагово, внутричерепно,

внутрисуставно, интрапростатически, внутриплеврально, интратрахеально, интраназально, интравитреально, интравагинально, интраректально, наружно, внутриопухолево, перитонеально, подкожно, субконъюнктивально, интравезикулярно, через слизистую оболочку, интраперикардиально, внутрипуповинно, внутриглазно, перорально, местно, путем ингаляции, инъекции или инфузии.

В некоторых вариантах осуществления субъекта лечат вторым терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой противовирусное средство. В некоторых вариантах осуществления противовирусное средство выбрано из пимовидира, осельтамивира, занамивира, перамивира, ланинамивира, амантадина или римантадина. В конкретных вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой пимовидир. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой вирусных вакцину. В некоторых вариантах осуществления вирусная вакцина вызывает у субъекта иммунный ответ против вируса гриппа A, B или C или вируса парагриппа.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят в комбинации с противовирусным агентом, где противовирусным агентом является балоксавир. В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-6). В других вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-7). В некоторых вариантах осуществления каждый E включает домен Fc, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95 % идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 63-138. В конкретных вариантах осуществления каждый E включает домен Fc, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86. В конкретных вариантах осуществления каждый E включает домен Fc, который имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86. В предпочтительных вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 45 (например, конъюгат 45a или 45b) или конъюгат 46.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат и балоксавир вводят последовательно. В других вариантах осуществления конъюгат и балоксавир вводят одновременно.

В одном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения или профилактики вирусной инфекции у субъекта путем введения субъекту: a) эффективного количества конъюгата или композиции по любому из пп. 1-215; и b) второго терапевтического агента. В определенных вариантах осуществления конъюгат вводят субъекту после того, как субъект перенес вирусную инфекцию, предположительно имеет вирусную инфекцию или подвергся воздействию вируса. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят субъекту профилактически. В определенных вариантах осуществления второй терапевтический агент вводят субъекту после того, как субъект перенес вирусную инфекцию, предположительно имеет вирусную инфекцию или подвергся воздействию вируса. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент вводят субъекту профилактически. В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент вводят в течение 30 дней, в течение 14 дней, в течение 7 дней, в течение 2 дней или в течение 24 часов после введения конъюгата. В конкретных вариантах осуществления второй терапевтический агент вводят в течение 2 дней после введения конъюгата. В определенных вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой противовирусный агент (например, пимовидир, осельтамивир, занамивир, перамивир, ланинамивир, амантадин, балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту, римантадин или их фармацевтически приемлемую соль). В конкретных вариантах осуществления противовирусный агент

представляет собой балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их фармацевтически приемлемую соль. В определенных вариантах осуществления балоксавир марбоксил вводят в количестве от 20 до 90 мг (например, от 25 до 50 мг, от 45 до 70 мг или от 65 до 90 мг). В некоторых вариантах осуществления балоксавир марбоксил вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления балоксавир марбоксил вводят в виде однократной дозы. В других вариантах осуществления балоксавир марбоксил вводят в виде более чем одной дозы. В конкретных вариантах осуществления балоксавир марбоксил вводят в количестве от 20 до 40 мг. В других вариантах осуществления балоксавир марбоксил вводят в количестве от 30 до 80 мг. В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-6). В других вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-II-7). В определенных вариантах осуществления каждый E имеет последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 63-138. В конкретных вариантах осуществления каждый E включает домен Fc, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86. В конкретных вариантах осуществления каждый E включает домен Fc, который имеет аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85 или SEQ ID NO: 86. В определенных вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 45 (например, конъюгат 45a или конъюгат 45b) или конъюгат 46. В конкретных вариантах осуществления конъюгат вводят внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутриочагово, внутричерепно, внутрисуставно, интрапростатически, внутриплеврально, интратрахеально, интраназально, интравитреально, интравагинально, интраректально, наружно, внутриопухолево, перитонеально, подкожно, субконъюнктивально, интравезикулярно, через слизистую оболочку, интраперикардиально, внутрипуповинно, внутриглазно, перорально, местно, путем ингаляции, инъекции или инфузии. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызывается вирусом гриппа или вирусом парагриппа. В определенных вариантах осуществления вирус представляет собой вирус гриппа A, B или C или вирус парагриппа.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая Fc-домен, может быть заменена на Fc-домен, а композиция, содержащая мономер Fc-домена, может быть заменена на мономер Fc-домена в любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I) (например, любой из формул (1), (2), (3), (4), (5), (D-I), (D-II), (D-II-1), (D-II-2), (D-II-3), (D-II-4), (D-II-5), (D-II-6), (D-II-7), (D-II-8), (D-II-9), (D-II-10), (D-III), (D-III-1), (D-III-2), (D-III-3), (D-III-4), (D-III-5), (D-III-6), (D-III-7), (D-III-8), (D-III-9), (D-IV), (D-IV-1), (D-IV-2), (D-V), (D-V-1), (D-V-2), (D-V-3), (D-V-4), (D-V-5), (D-V-6), (D-V-7), (D-V-8), (D-V-9), (D-V-10), (D-VI), (D-VI-1), (D-VI-2), (D-VI-3), (D-VI-4), (D-VI-5), (D-VI-6), (D-VI-7), (D-VI-8), (D-VI-9), (D-VII), (D-VIII), (D-VIII-1), (D-VIII-2), (D-VIII-3), (D-VIII-4), (D-VIII-5), (D-VIII-6), (D-VIII-7), (D-VIII-8), (D-VIII-9), (D-VIII-10), (D-VIII-11), (D-IX), (D-IX-1), (D-IX-2), (D-IX-3), (D-IX-4), (D-IX-5), (D-IX-6), (D-X), (D-X-1), (D-X-2), (D-X-3), (D-XI), (D-XI-1), (D'-I), (M-I), (M-II), (M-II-1), (M-II-2), (M-II-3), (M-II-4), (M-II-5), (M-II-6), (M-II-7), (M-II-8), (M-II-9), (M-II-10), (M-III), (M-III-1), (M-III-2), (M-III-3), (M-III-4), (M-III-5), (M-III-6), (M-III-7), (M-III-8), (M-III-9), (M-IV), (M-IV-1), (M-IV-2), (M-V), (M-V-1), (M-V-2), (M-V-3), (M-V-4), (M-V-5), (M-V-6), (M-V-7), (M-V-8), (M-V-9), (M-V-10), (M-VI), (M-VI-1), (M-VI-2), (M-VI-3), (M-VI-4), (M-VI-5), (M-VI-6), (M-VI-7), (M-VI-8), (M-VI-9), (M-VII), (M-VIII), (M-VIII-1), (M-VIII-2), (M-VIII-3), (M-VIII-4), (M-VIII-5), (M-VIII-6),

(M-VIII-7), (M-VIII-8), (M-VIII-9), (M-VIII-10), (M-VIII-11), (M-IX), (M-IX-1), (M-IX-2), (M-IX-3), (M-IX-4), (M-IX-5), (M-IX-6), (M-X), (M-X-1), (M-X-2), (M-X-3), (M-XI), (M-XI-1) или (M'-I)). В любой из описанных в данном документе формул (например, любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)), когда n равно 1, E представляет собой композицию, содержащую мономер Fc-домена. В любой из описанных в данном документе формул (например, любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)), когда n равно 2, E представляет собой композицию, содержащую Fc-домен.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая Fc-домен, представляет собой антитело или фрагмент антитела. Антитело может включать любую форму иммуноглобулина, антитела тяжелой цепи, антитела легкой цепи, антитела на основе LRR или другого белкового каркаса с антителоподобными свойствами, а также любую другую иммунологический связывающий фрагмент, известный в данной области, включая фрагменты антител (например, Fab, Fab', Fab'2, F(ab')2, Fd, Fv, Feb, scFv или SMIP). Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов антител известны в данной области. Фрагмент антитела может включать связывающий фрагмент, который включает часть, полученную из антитела или имеющую значимую гомологию с антителом, такую как антиген-определяющая область антитела. Иллюстративные фрагменты антител включают Fab, Fab', Fab'2, F(ab')2, Fd, Fv, Feb, scFv и SMIP.

В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело или фрагмент антитела человека, мыши, представителей семейства верблюжьи (например, ламы, альпаки или верблюда), козы, овцы, кролика, курицы, морской свинки, хомяка, лошади или крысы. В конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой IgG, IgA, IgD, IgE, IgM или интрателo. В определенных вариантах осуществления фрагмент антитела включает scFv, sdAb, dAb, Fab, Fab', Fab'2, F(ab')2, Fd, Fv, Feb или SMIP.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая Fc-домен (например, антитело или фрагмент антитела), придает специфичность связывания одной или более мишеням (например, антигену).

В некоторых вариантах осуществления одна или более мишеней (например, антиген), связанные с композицией, содержащей Fc-домен (например, антитело или фрагмент антитела), представляют собой вирусный белок (например, гриппа), такой как нейраминидаза или гемагглютинин. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела распознает поверхностный антиген вируса. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела нацелены на гемагглютинин. Нацеленные на гемагглютинин антитела включают моноклональные антитела, такие как CR6261, CR8020, MEDI8852, MHAA4549A и VIS410. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела представляет собой нейтрализующее антитело широкого спектра действия или фрагмент антитела, нацеленный на гемагглютинин гриппа (например, антитело или фрагмент антитела, описанные в Wu et al., J. Mol. Biol. 429:2694–2709 (2017)). В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела нацелены на матриксный белок вируса (например, матриксный белок 2). TCN032 представляет собой моноклональное антитело, нацеленное на матриксный белок 2.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая Fc-домен (например, антитело или фрагмент антитела), включает одно или более однодоменных антител (sdAbs). В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая Fc-домен, представляет собой антитело или фрагмент антитела, включающий sdAb с реактивностью против гриппа A, такой как sdAb, который связывается с гемагглютинином вируса гриппа A (например, SD36 или SD38, описанный в Laursen et al. Science. 362:598-602 (2018)). В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая Fc-домен, представляет собой

антитело или фрагмент антитела, включающий sdAb с реактивностью против гриппа B, такой как sdAb, который связывается с гемагглютинином вируса гриппа B (например, SD83 или SD84, описанный в Laursen et al. Science. 362:598-602 (2018)).

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая Fc-домен, представляет собой мультидоменное антитело (MDAb) или фрагмент мультидоменного антитела, включающий 2 или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более) sdAb. В некоторых вариантах осуществления MDAb или его фрагмент включают один или более sdAB, которые связываются с гемагглютинином гриппа A, и один или более sdAb, которые связываются с гемагглютинином гриппа B. В некоторых вариантах осуществления MDAb представляет собой JNJ-7445 (также известный как MD3606), который описан в Laursen et al. Science. 362:598-602 (2018). Вкратце, JNJ-7445 представляет собой MDAb, который включает два sdAb, которые связываются с гемагглютинином гриппа A (SD36 и SD38), и два sdAb, которые связываются с гемагглютинином гриппа B (SD83 и SD84), которые связаны с Fc-доменом (IgG1). SdAb получали путем иммунизации лам вакциной против гриппа и рекомбинантным гемагглютинином H7 и H2.

В другом аспекте изобретение включает конъюгат, описанный любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I) (например, любой из формул (1), (2), (3), (4), (5), (D-I), (D-II), (D-II-1), (D-II-2), (D-II-3), (D-II-4), (D-II-5), (D-II-6), (D-II-7), (D-II-8), (D-II-9), (D-II-10), (D-III), (D-III-1), (D-III-2), (D-III-3), (D-III-4), (D-III-5), (D-III-6), (D-III-7), (D-III-8), (D-III-9), (D-IV), (D-IV-1), (D-IV-2), (D-V), (D-V-1), (D-V-2), (D-V-3), (D-V-4), (D-V-5), (D-V-6), (D-V-7), (D-V-8), (D-V-9), (D-V-10), (D-VI), (D-VI-1), (D-VI-2), (D-VI-3), (D-VI-4), (D-VI-5), (D-VI-6), (D-VI-7), (D-VI-8), (D-VI-9), (D-VII), (D-VIII), (D-VIII-1), (D-VIII-2), (D-VIII-3), (D-VIII-4), (D-VIII-5), (D-VIII-6), (D-VIII-7), (D-VIII-8), (D-VIII-9), (D-VIII-10), (D-VIII-11), (D-IX), (D-IX-1), (D-IX-2), (D-IX-3), (D-IX-4), (D-IX-5), (D-IX-6), (D-X), (D-X-1), (D-X-2), (D-X-3), (D-XI), (D-XI-1), (D'-I), (M-I), (M-II), (M-II-1), (M-II-2), (M-II-3), (M-II-4), (M-II-5), (M-II-6), (M-II-7), (M-II-8), (M-II-9), (M-II-10), (M-III), (M-III-1), (M-III-2), (M-III-3), (M-III-4), (M-III-5), (M-III-6), (M-III-7), (M-III-8), (M-III-9), (M-IV), (M-IV-1), (M-IV-2), (M-V), (M-V-1), (M-V-2), (M-V-3), (M-V-4), (M-V-5), (M-V-6), (M-V-7), (M-V-8), (M-V-9), (M-V-10), (M-VI), (M-VI-1), (M-VI-2), (M-VI-3), (M-VI-4), (M-VI-5), (M-VI-6), (M-VI-7), (M-VI-8), (M-VI-9), (M-VII), (M-VIII), (M-VIII-1), (M-VIII-2), (M-VIII-3), (M-VIII-4), (M-VIII-5), (M-VIII-6), (M-VIII-7), (M-VIII-8), (M-VIII-9), (M-VIII-10), (M-VIII-11), (M-IX), (M-IX-1), (M-IX-2), (M-IX-3), (M-IX-4), (M-IX-5), (M-IX-6), (M-X), (M-X-1), (M-X-2), (M-X-3) или (M'-I)), где E представляет собой антитело или фрагмент антитела. В предпочтительных вариантах осуществления, где E представляет собой антитело или фрагмент антитела, n равно 1. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела включает любое антитело или фрагмент антитела, описанные в данном документе, такие как моноклональное антитело, которое связывается с вирусным гемагглютинином (например, CR6261, CR8020, MEDI8852, MHAA4549A или VIS410); нейтрализующее антитело широкого спектра действия или фрагмент антитела, нацеленный на вирусный гемагглютинин (например, антитела или фрагменты антител, описанные в Wu et al., J. Mol. Biol. 429:2694–2709 (2017)); sdAb, нацеленный на вирусный гемагглютинин (например, SD36, SD38, SD83 или SD84); или MDAb или его фрагмент, нацеленные на вирусный гемаглютинин (например, JNJ-7445).

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E

(например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей

мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых

вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E

(например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей

мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 69.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70. В некоторых

вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 78.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 80.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E

(например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 89.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 90.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей

мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 101.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 102.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 103.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 104.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 107.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых

вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 113.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 116.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 118.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 119.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 120.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 121.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 122. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 123.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 126.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 127.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 128.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E

(например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 129.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 130.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 131. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 131.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 132.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей

мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, E (например, каждый E) включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145. В некоторых вариантах осуществления E включает аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 141.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, где E включает мономер Fc-домена, мономер Fc-домена (например, мономер Fc-домена, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138) включает тройную мутацию, соответствующую M252Y/S254T/T256E (YTE). В контексте данного документа следует понимать, что аминокислота, «соответствующая» конкретному аминокислотному остатку (например, конкретной SEQ ID NO.), включает любой аминокислотный остаток, как будет понятно специалисту в данной области, для выравнивания с конкретным остатком (например, конкретной последовательности). Например, любая из SEQ ID NO: 1-138 может быть мутирована с включением мутации YTE.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, где E включает мономер Fc-домена, мономер Fc-домена (например, мономер Fc-домена, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138) включает двойной мутант, соответствующий M428L/N434S (LS). В контексте данного документа следует понимать, что аминокислота, «соответствующая» конкретному аминокислотному остатку (например, конкретной SEQ ID NO.), включает любой аминокислотный остаток, как будет понятно специалисту в данной области, для выравнивания с конкретным остатком (например, конкретной последовательности). Например, любая из SEQ ID NO: 1-138 может быть мутирована с включением мутации LS.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, где E включает мономер Fc-домена, мономер Fc-домена (например, мономер Fc-домена, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138) включает мутант, соответствующий N434H. В контексте данного документа следует понимать, что аминокислота, «соответствующая» конкретному аминокислотному

остатку (например, конкретной SEQ ID NO.), включает любой аминокислотный остаток, как будет понятно специалисту в данной области, для выравнивания с конкретным остатком (например, конкретной последовательности). Например, любая из SEQ ID NO: 1-138 может быть мутирована с включением мутации N434H.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, где E включает мономер Fc-домена, мономер Fc-домена (например, мономер Fc-домена, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138) включает мутант, соответствующий C220S. В контексте данного документа следует понимать, что аминокислота, «соответствующая» конкретному аминокислотному остатку (например, конкретной SEQ ID NO.), включает любой аминокислотный остаток, как будет понятно специалисту в данной области, для выравнивания с конкретным остатком (например, конкретной последовательности). Например, любая из SEQ ID NO: 1-138 может быть мутирована с включением мутации C220S.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, мономер домена Fc (например, мономер домена Fc, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-95) включает тройную мутацию, соответствующую V309D/Q311H/N434S (DHS). В контексте данного документа следует понимать, что аминокислота, «соответствующая» конкретному аминокислотному остатку (например, конкретной SEQ ID NO.), включает любой аминокислотный остаток, как будет понятно специалисту в данной области, для выравнивания с конкретным остатком (например, конкретной последовательности). Например, любая из SEQ ID NO: 1-95 может быть мутирована с включением мутации DHS.

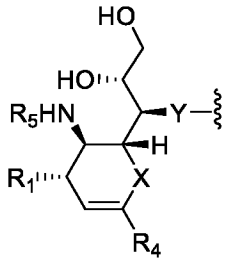
В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, где E включает мономер Fc-домена, мономер Fc-домена (например, мономер Fc-домена, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138) представляет собой фрагмент мономера Fc-домена (например, фрагмент длиной по меньшей мере 25 (например, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или более), по меньшей мере 50 (например, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 или более), по меньшей мере 75 (например, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 или более) последовательных аминокислот из SEQ ID NO: 1-138.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)), один или более атомов азота одного или более экспонированных на поверхности остатков лизина E или один или более атомов серы одного или более экспонированных на поверхности цистеинов E ковалентно конъюгированы с линкером (например, $ПЭГ_2$-$ПЭГ_{20}$ линкером). Линкер, конъюгированный с E, может быть функционализирован таким образом, что он может вступать в реакцию с образованием ковалентной связи с L любого A_1-L или любого A_2-L-A_1, описанных в данном документе. В предпочтительных вариантах осуществления E конъюгирован с линкером, функционализированным азидогруппой, а L из A_1-L или любого A_2-L-A_1 функционализирован алкиновой группой. Конъюгирование (например, посредством клик-химии) линкер-азидо E и линкер-алкин A_1-L или A_2-L-A_1 образует конъюгат по изобретению, например конъюгат, описанный любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I). В еще других вариантах осуществления E конъюгирован с линкером, функционализированным алкиновой группой, и L любого A_1-L или любого A_2-L-A_1 функционализирован азидогруппой. Конъюгация (например, с помощью клик-химии, см., например, Фиг. 103) линкер-алкина E и линкер-азидо A_1-L или A_2-L-A_1 образует конъюгат по изобретению, например, конъюгат, описанный формулой (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M XI) или (M'-I).

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, волнистая линия любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I) может представлять собой ковалентную связь между E и L в A_1-L или A_2-L-A_1.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, волнистая линия любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I) может представлять одну или более боковых цепей аминокислот E (например, один или более атомов азота одного или более экспонированных на поверхности остатков лизина E или один или более атомов серы одного или более экспонированных на поверхности цистеинов в E) были конъюгированы с линкером (например, $ПЭГ_2$-$ПЭГ_{20}$ линкером), где линкер функционализирован реакционноспособным фрагментом таким образом, что реакционноспособный фрагмент образует ковалентную связь с L любого A_1-L или любого A_2-L-A_1, описанных в данном документе (например, посредством клик-химии между линкером, функционализированным азидо, и линкером, функционализированным алкином, как описано выше; см., например, фиг. 103).

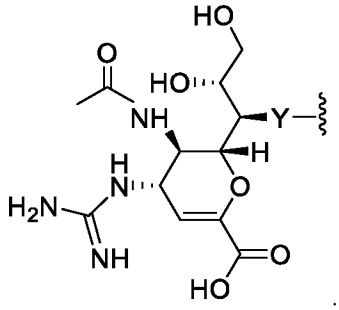
В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-I):



(A-I).

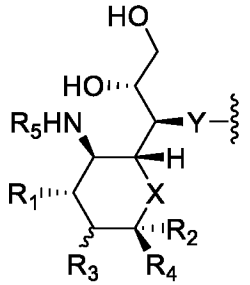
В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-I): R_1 представляет собой

$-NHC(=NH)NH_2$, R_4 представляет собой $-CO_2H$, R_5 представляет собой $-COCH_3$ и/или X представляет собой -O-. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру занамивира, описанную:



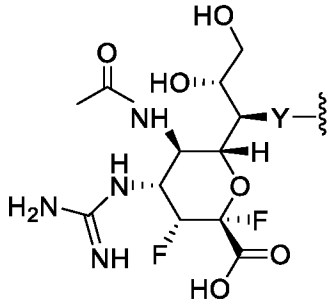
.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-I):

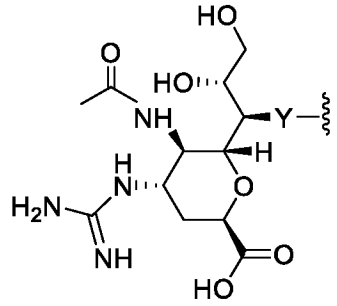


(A-II).

В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-II): R_1 представляет собой -NHC(=NH)NH_2, R_2 представляет собой H или F, R_3 представляет собой H или F, R_4 представляет собой -CO_2H, R_5 представляет собой -$COCH_3$ и/или X представляет собой -O-. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную:

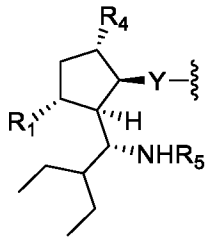


или



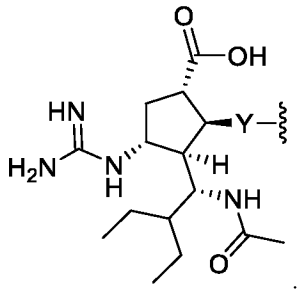
.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-III):



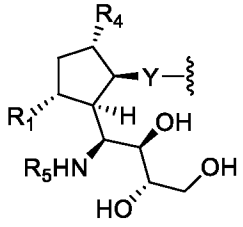
(A-III).

В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-III): R_1 представляет собой -NHC(=NH)NH_2, R_4 представляет собой -CO_2H и/или R_5 представляет собой -$COCH_3$. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру перамивира, описанную:



.

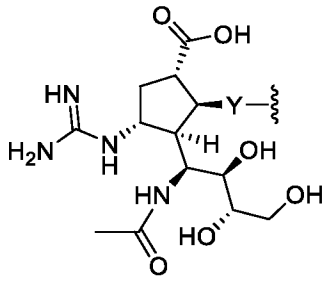
В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-IV):



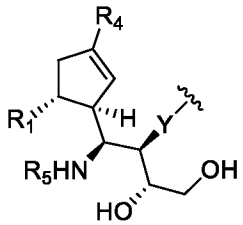
(A-IV).

В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-IV): R_1 представляет собой

-NHC(=NH)NH_2, R_4 представляет собой -CO_2H и/или R_5 представляет собой -$COCH_3$. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную:



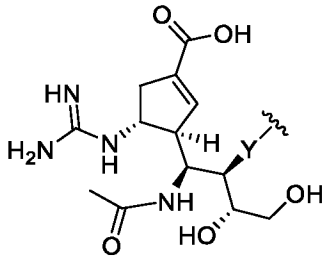
В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-V):



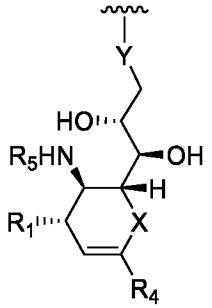
(A-V).

В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-V): R_1 представляет собой

-NHC(=NH)NH_2, R_4 представляет собой -CO_2H и/или R_5 представляет собой -$COCH_3$. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную:



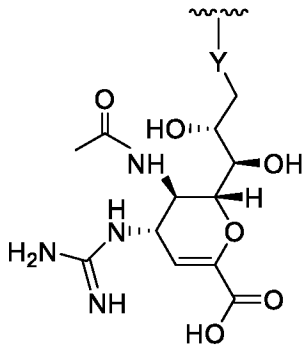
В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-VI):



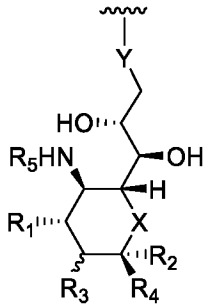
(A-VI).

В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A- VI): R_1 представляет собой

-NHC(=NH)NH_2, R_4 представляет собой -CO_2H, R_5 представляет собой -$COCH_3$ и/или X представляет собой -O-. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру занамивира, описанную:

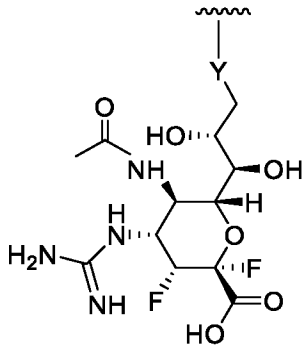


В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-VII):

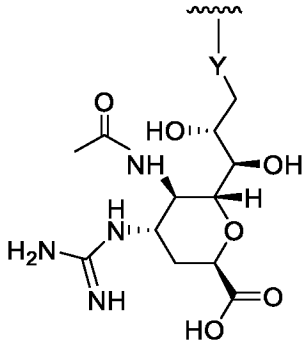


(A-VII).

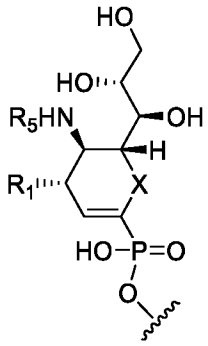
В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-VII): R_1 представляет собой -NHC(=NH)NH_2, R_2 представляет собой H или F, R_3 представляет собой H или F, R_4 представляет собой -CO_2H, R_5 представляет собой -$COCH_3$ и/или X представляет собой -O-. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную:



или



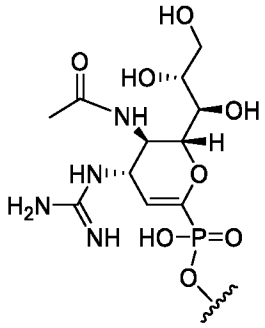
В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-VIII):



(A-VIII).

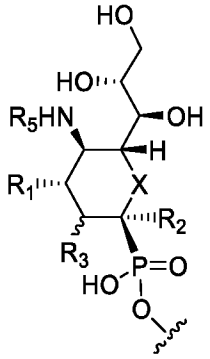
В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-VIII): R_1 представляет собой

-NHC(=NH)NH_2, R_5 представляет собой -$COCH_3$ и/или X представляет собой -O-. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную:



.

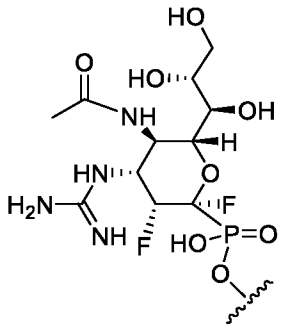
В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-IX):



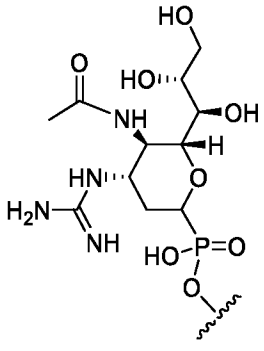
(A-IX).

В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-IX): R_1 представляет собой

-NHC(=NH)NH_2, R_2 представляет собой H или F, R_3 представляет собой H или F, R_5 представляет собой -$COCH_3$ и/или X представляет собой -O-. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную:

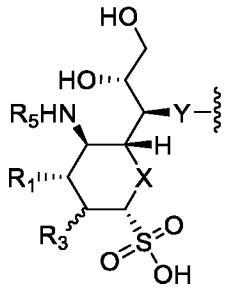


или



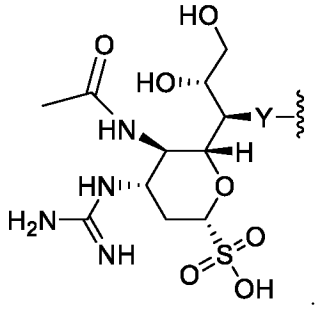
.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-X):

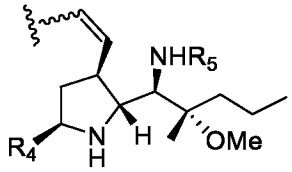


(A-X).

В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-X): R_1 представляет собой -NHC(=NH)NH_2, R_3 представляет собой H, R_5 представляет собой -$COCH_3$ и/или X представляет собой -O-. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру сульфозанамивира, описанную:

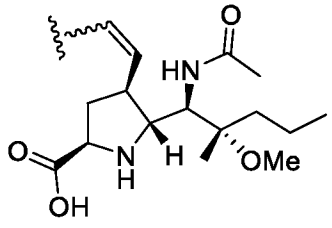


В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-XI):

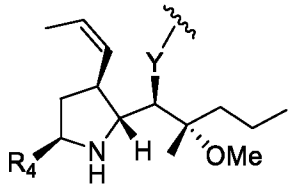


(A-XI).

В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A- XI): R_4 представляет собой -CO_2H и/или R_5 представляет собой -$COCH_3$. В предпочтительных вариантах осуществления алкен представляет собой (E), (Z) или рацемическую смесь (E)/(Z). В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру A-315675 (Abbott), описанную:

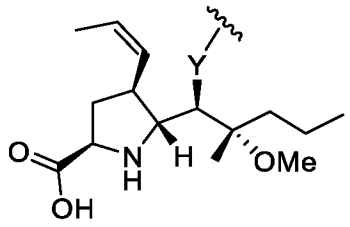


В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-XII):



(A-XII).

В предпочтительных вариантах осуществления, где A_1 и/или A_2 имеют структуру, описанную (A-XII): R_4 представляет собой $-CO_2H$. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 имеют структуру A-315675 (Abbott), описанную:



В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 1 или любой его региоизомер, а соотношение лекарственного средства к антителу (DAR) (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 1, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 2 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3 ,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 2, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 3 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 3, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 4 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 4, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 5 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 5, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 6 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 6, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 7 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 7, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15

до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 8 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 8, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 9 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 9, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 10 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 10, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 11 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность

конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 11, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 12 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 12, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 13 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 13, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 14 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 14, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 15 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4,

9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 15, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 16 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 16, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 17 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 17, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 18 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 18, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 19 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,

4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 19, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 20 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 20, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 21 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 21, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 22 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 22, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 23 или любой его

региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 23, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 24 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 24, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 25 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 25, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 26 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 26, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5

до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 27 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 27, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 28 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 28, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 29 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 29, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 30 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 30, где среднее значение DAR (например,

Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 31 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 31, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 32 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 32, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 33 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 33, где среднее значение DAR (например, Т) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 34 или любой его региоизомер, а DAR (например, Т) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до

4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 34, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 35 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 35, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 36 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 36, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 37 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 37, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 38 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7,

6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 38, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 39 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 39, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 40 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 40, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 41 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 41, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 42 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2,

1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 42, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 43 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 43, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 44 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 44, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 45 (например, конъюгат 45a или конъюгат 45b), или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 45 (например, конъюгата 45a или конъюгата 45b), где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5

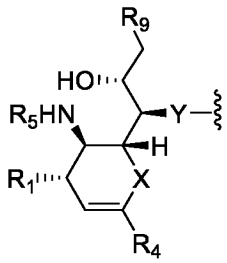
до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 46 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 46, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 47 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 47, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

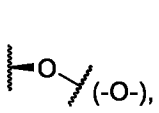
В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат 48 или любой его региоизомер, а DAR (например, T) составляет от 0,5 до 10,0, например, около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6 , 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 , 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет от 0,5 до 2,0, от 2,0 до 4,0, от 4,0 до 6,0, от 6,0 до 8,0 или от 8,0 до 10,0. В еще одном аспекте изобретение обеспечивает совокупность конъюгатов, причем каждый конъюгат имеет структуру конъюгата 48, где среднее значение DAR (например, T) совокупности конъюгатов составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5 или от 8,5 до 10,5.

В некоторых вариантах осуществления любого из аспектов, описанных в данном документе, изобретение включает конъюгат, описанный любой из формул (D-I), (M-I), (1) или (2): где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбраны из любой одной из формул (A-XIII):

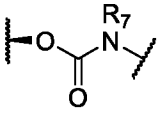
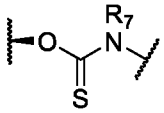
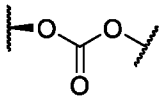
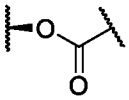
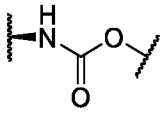
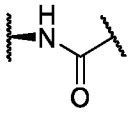
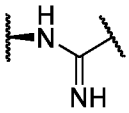
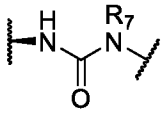
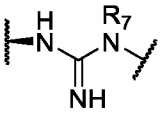
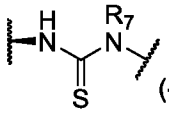
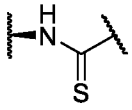
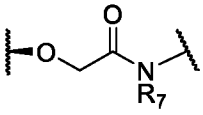
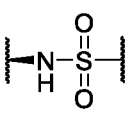
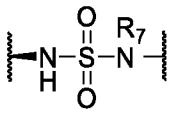
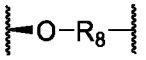
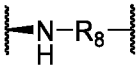
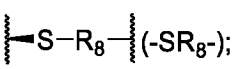


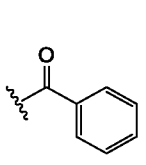
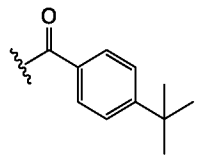
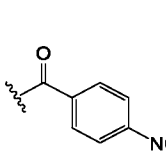
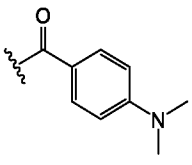
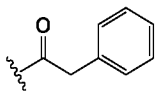
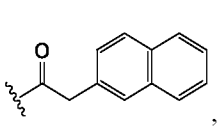
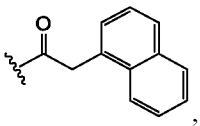
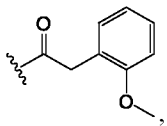
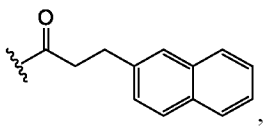
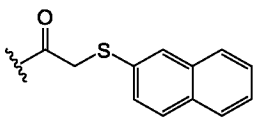
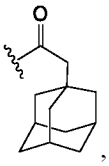
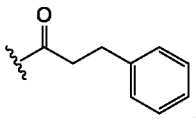
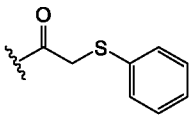
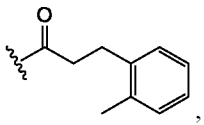
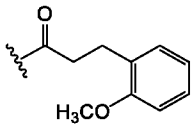
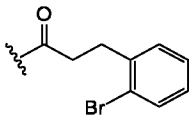
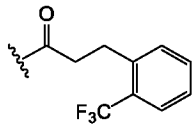
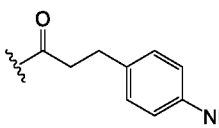
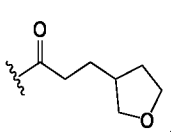
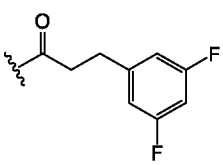
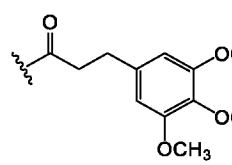
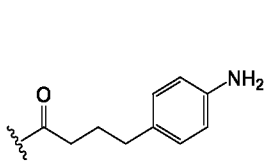
(A-XIII)

где R_1 выбран из -OH, $-NH_2$, -NHC(=NH)NH_2 и -NHC(=NH)NHR_6; R_4 выбран из $-CO_2H$, $-P(=O)(OH)_2$, $-SO_3H$; R_5 выбран из $-COCH_3$, $-COCF_3$, $-SO_2CH_3$; X выбран из -O- и -S-; Y выбран из

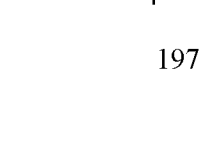

(-O-),

(-S-),

($-NR_7$-),

(-O(C=O)NR_7-),

(-O(C=S)NR_7-),

(-O(C=O)O-),

(-O(C=C)-),

(-NH(C=O)O-),

(-NH(C=O)-),

(-NH(C=NH)-),

(-NH(C=O)NR_7-),

(-NH(C=NH)NR_7-),

(-NH(C=S)NR_7-),

(-NH(C=S)-),

(-OCH_2(C=O)NR_7-),

(-NH(SO_2)-),

(-NH(SO_2)NR_7-),

(-OR_8-),

(-NR_8-), и

(-SR_8-);

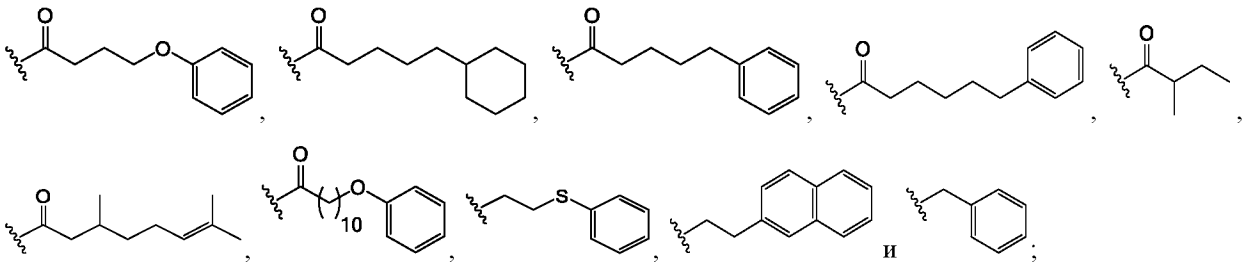
R_6 выбран из

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,



R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

R_8 выбран из C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

R_9 выбран из -H, галогена (например, Cl или F), $-OR_{10}$, $-NHC(=O)R_7$, необязательно замещенного C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

R_{10} выбран из C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

n равно 1 или 2;

каждый E содержит мономер Fc-домена, белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид;

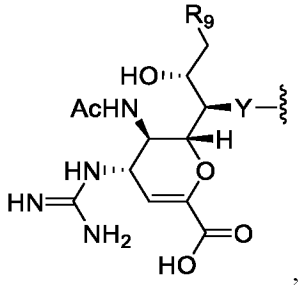
L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к E и к каждому Y каждого A_1 или каждого A_1 и A_2;

T является целым числом от 1 до 20, и

каждая волнистая линия в формулах (D-I), (M-I), (1) или (2) указывает, что L ковалентно присоединен к каждому E;

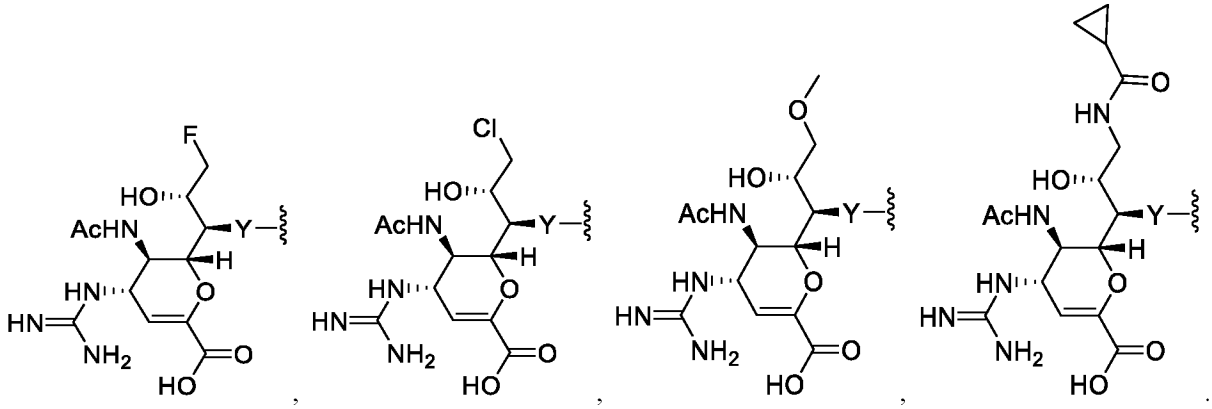
или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления каждый A_1 и каждый A_2 описывается формулой (A-XIII-1):



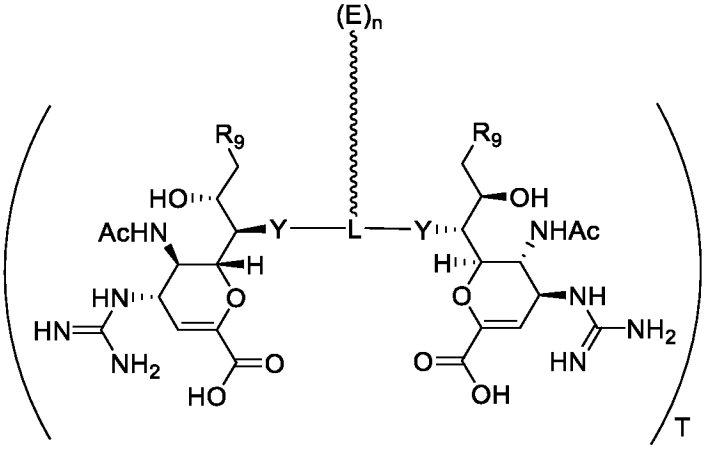
(A-XIII-1)

В некоторых вариантах осуществления каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-XIII-1a)-(A-XIII-1d):



(A-XIII-1a) (A-XIII-1b) (A-XIII-1c) (A-XIII-1d)

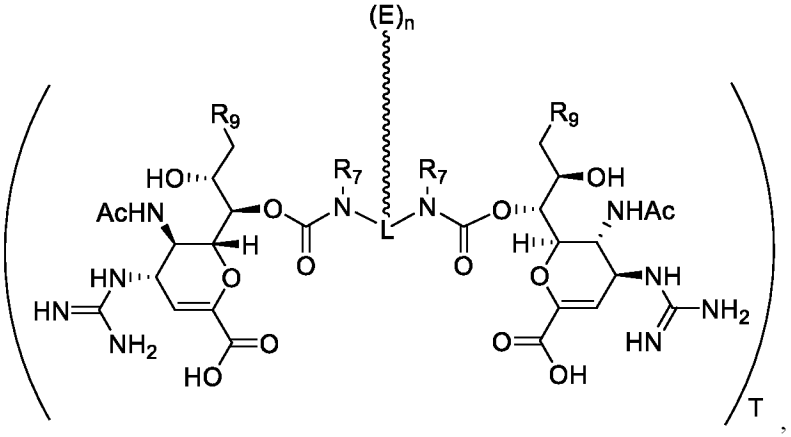
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-XI):



(D-XI)

или его фармацевтически приемлемая соль.

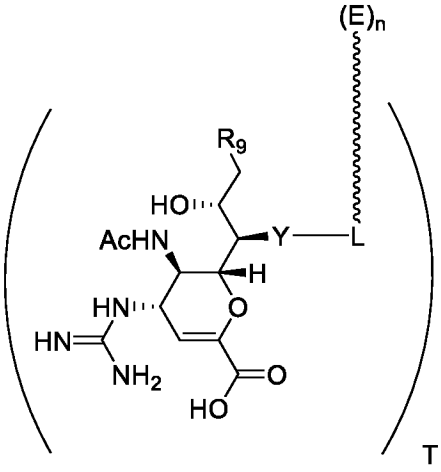
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (D-XI-1):



(D-XI-1)

где R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила или их фармацевтически приемлемой соли.

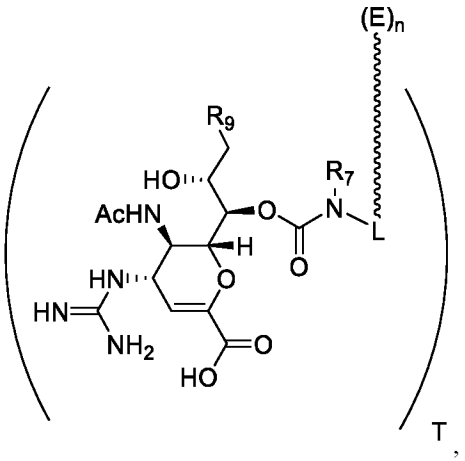
В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-XI):



(M-XI)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат описан формулой (M-XI-1):



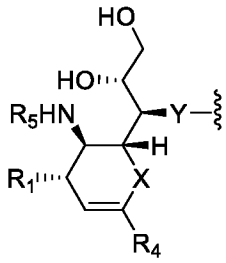
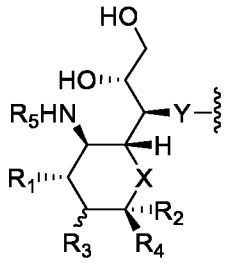
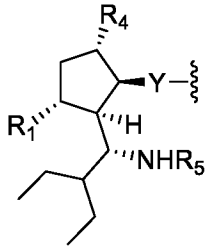
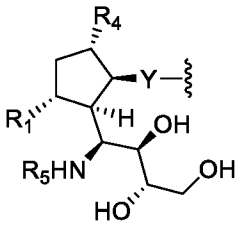
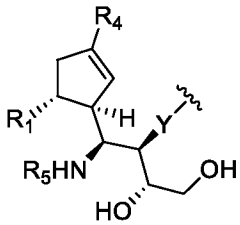
(M-XI-1)

где R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила или их фармацевтически приемлемой соли.

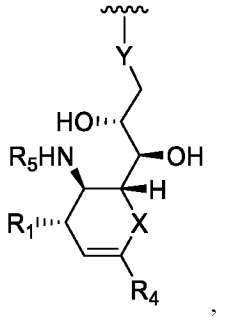
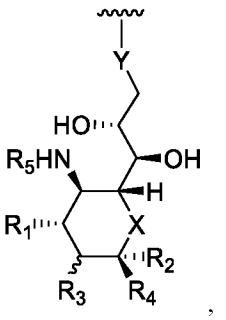
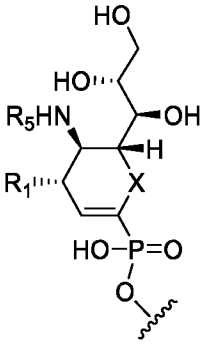
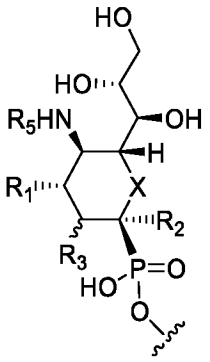
Определения

Для облегчения понимания данного изобретения ниже приведены определения для ряда терминов. Определенные в данном документе термины имеют значения, которые обычно понятно специалисту в данной области, в отношении к настоящему изобретению. Термины, употребляемые в единственном числе не предназначены для обозначения только единственного объекта, но включают общий класс, конкретный пример которого может использоваться в целях иллюстрации. Терминология в данном документе используется для описания конкретных вариантов осуществления изобретения, но использование данных терминов не ограничивает изобретение, за исключением случаев, приведенных в формуле изобретения.

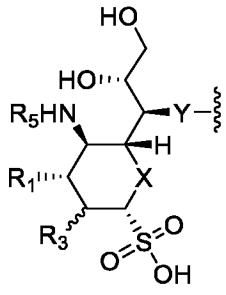
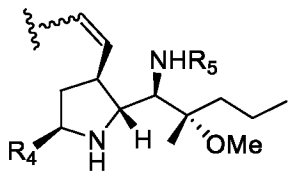
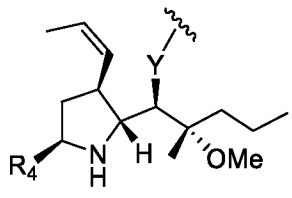
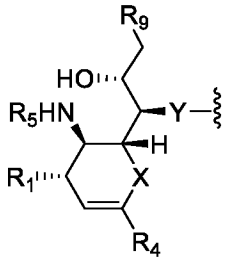
Термин «ингибитор нейраминидазы» или «ингибитор вирусной нейраминидазы» в контексте данного документа относится к соединениям, которые снижают активность фермента нейраминидаза вируса гриппа (например, из вируса гриппа A, B или C). Ингибитор нейраминидазы может быть идентифицирован способами, известными специалистам в данной области, например, путем уменьшения репликации вируса в анализе уменьшения количества бляшек вируса гриппа, например, при концентрациях менее 20 мкМ (например, менее 10 мкМ, 5 мкМ, 2 мкМ, 1 мкМ, 500 нМ или 100 нМ). Ингибиторы вирусной нейраминидазы, известные специалистам в данной области, включают занамивир, сульфозанамивир, перамивир и A-315675 (Abbott) (см., например, Hadházi et al. A sulfozanamivir analogue has potent anti-influenza virus activity. *ChemMedChem Comm.* 13:785-789 (2018) и In vitro characterization of A-315675, a highly potent inhibitor of A and B strain of influenze virus neuraminidases and influenza virus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(4):1014-1021 (2002)). Ингибиторы вирусной нейраминидазы по изобретению включают занамивир, сульфозанамивир, перамивир, A-315675 и их аналоги, такие как ингибиторы вирусной нейраминидазы формул (A-I)-(A-XIII):

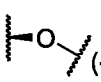
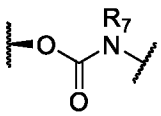
(A-I) (A-II) (A-III) (A-IV) (A-V)

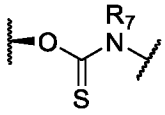
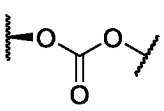
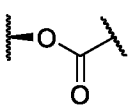





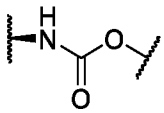
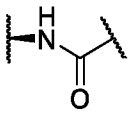
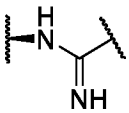
(A-VI) (A-VII) (A-VIII) (A-IX)

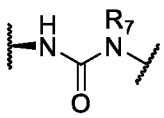
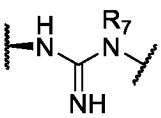
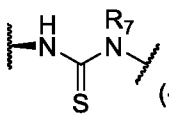





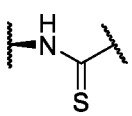
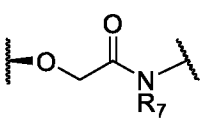
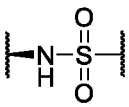
(A-X) (A-XI) (A-XII) (A-XIII)

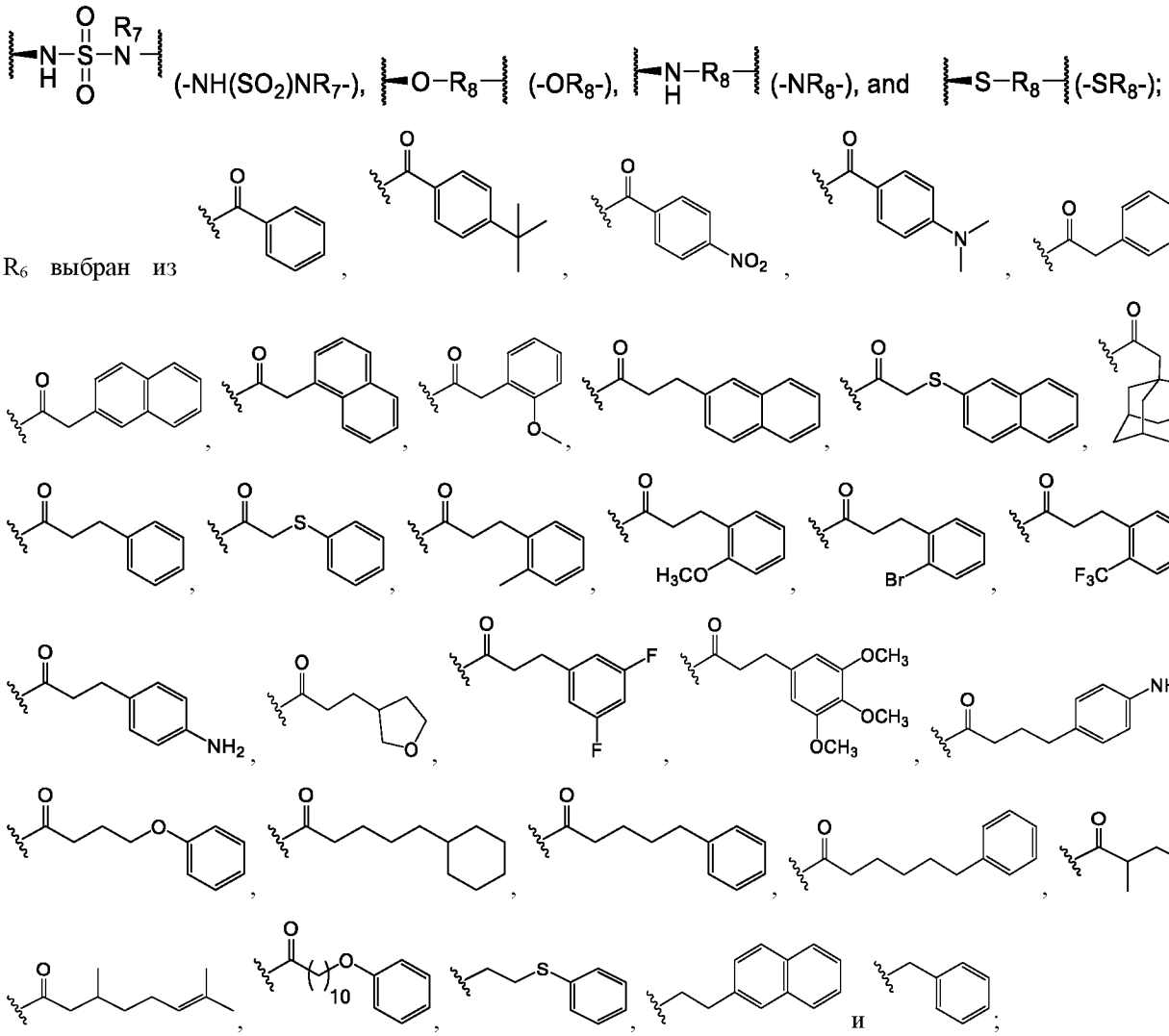
где R_1 выбран из -OH, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$ и $-NHC(=NH)NHR_6$; R_2 и R_3, каждый независимо, выбран из -H, -OH, -F, -Cl и -Br; R_4 выбран из $-CO_2H$, $-P(=O)(OH)_2$, $-SO_3H$; R_5 выбран из $-COCH_3$, $-COCF_3$, $-SO_2CH_3$; X выбран из -O- и -S-; Y выбран из  (-O-), (-S-), ($-NR_7$-),  ($-O(C=O)NR_7$-),

 ($-O(C=S)NR_7$-),  (-O(C=O)O-),  (-O(C=O)-),

 (-NH(C=O)O-),  (-NH(C=O)-),  (-NH(C=NH)-),

 ($-NH(C=O)NR_7$-),  ($-NH(C=NH)NR_7$-),  ($-NH(C=S)NR_7$-),

 (-NH(C=S)-),  ($-OCH_2(C=O)NR_7$-),  ($-NH(SO_2)$-),



R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила; и R_8 выбран из C3-C20 гетероциклоалкила, C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила; R_9 выбран из -H, галогена (например, Cl, F или Br), $-OR_{10}$, $-NHC(=O)R_7$, необязательно замещенного C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила; и R_{10} выбран из C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила.

В контексте данного документа термин «ингибирует активность нейраминидазы» относится к IC_{50} менее или равной 1000 нМ, например, как измерено в соответствии с анализом ингибирования нейраминидазы в примере 2, приведенном в данном документе. Конкретно, IC_{50} представляет собой концентрацию ингибитора нейраминидазы вируса гриппа, которая необходима для 50% ингибирования in vitro. В некоторых аспектах IC_{50} меньше или равная 100 нМ или меньше или равная 10 нМ в соответствии с анализом ингибирования нейраминидазы указывает на соединение, ингибирующее активность нейраминидазы.

Под «вирусной инфекцией» подразумевается патогенный рост вируса (например, вируса гриппа) в организме-хозяине (например, у человека). Вирусной инфекцией может быть любая ситуация, в которой присутствие вирусной популяции(-ий) наносит вред организму-хозяину. Таким образом, субъект «страдает» от вирусной инфекции, когда чрезмерное количество вирусной популяции присутствует в теле субъекта или на нем, или когда присутствие вирусной популяции(-ий) повреждает клетки или другую ткань субъекта.

В контексте данного документа термин «мономер Fc-домена» относится к полипептидной цепи, которая включает по меньшей мере шарнирный домен и второй и третий константные домены антитела (C_H2

и C_H3) или их функциональные фрагменты (например, фрагменты, которые способны к (i) димеризации с другим мономером Fc-домена с образованием Fc-домена и к (ii) связыванию с Fc-рецептором. Мономером Fc-домена может быть любой изотип иммуноглобулинового антитела, включая IgG, IgE, IgM, IgA или IgD (например, IgG). Кроме того, мономер Fc-домена может быть мономером подтипа IgG (например, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4) (например, IgG1). Мономер Fc-домена не включает какую-либо часть иммуноглобулина, которая способна действовать как область распознавания антигена, например, вариабельный домен или определяющая комплементарность область (CDR). В контексте данного документа мономеры Fc-домена в конъюгатах могут содержать одно или более изменений по сравнению с последовательностью мономера Fc-домена дикого типа (например, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4 аминокислотные замены, добавления или делеции), которые изменяют взаимодействие между Fc-доменом и Fc-рецептором. Примеры подходящих изменений известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления мономер домена Fc человека (например, тяжелая цепь IgG, такая как IgG1) содержит область, которая простирается от любого из Asn208, Glu216, Asp221, Lys222 или Cys226 до карбоксиконца тяжелой цепи в Lys447. С-концевой Lys447 Fc-области может присутствовать, а может и не присутствовать, не оказывая влияния на структуру или стабильность Fc-области. С-концевой Lys 447 может быть протеолитически расщеплен при экспрессии полипептида. В некоторых вариантах осуществления любого из мономеров домена Fc, описанных в данном документе, С-концевой Lys 447 необязательно присутствует или отсутствует. В изобретении конкретно рассматривается любая из SEQ ID NO: 1-4, 11, 16, 19, 20, 32-37, 48-53 и 60-68, которые не включают С-концевой Lys, соответствующий Lys447. N-концевой N (Asn) области Fc (например, любой из SEQ ID NO: 60-77) может присутствовать или отсутствовать, не влияя на структуру стабильности области Fc. N-концевой Asn может дезамидироваться при экспрессии полипептида. В некоторых вариантах осуществления любого из мономеров домена Fc, описанных в данном документе, N-концевой Asn необязательно присутствует или отсутствует. В изобретении конкретно рассматривается любая из SEQ ID NO: 60-77, которые не включают N-концевой Asn. Если в данном документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в мономере домена IgG или Fc соответствует системе нумерации EU для антител, также называемой индексом EU по Kabat, как описано, например, в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

В контексте данного документа термин «Fc-домен» относится к димеру двух мономеров Fc-домена, который способен связывать Fc-рецептор. В Fc-домене дикого типа два мономера Fc-домена димеризуются за счет взаимодействия между двумя константными доменами C_H3 антитела, в некоторых вариантах осуществления одна или более дисульфидных связей образуются между шарнирными доменами двух димеризующихся мономеров Fc-домена.

Термин «ковалентно присоединенный» относится к двум частям конъюгата, которые связаны друг с другом ковалентной связью, образованной между двумя атомами в двух частях конъюгата.

В контексте данного документа термин «Fc-связывающий пептид» относится к полипептиду, имеющему аминокислотную последовательность длиной от 5 до 50 (например, от 5 до 40, от 5 до 30, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, от 10 до 50, от 10 до 30 или от 10 до 20) аминокислотных остатков, которые имеют аффинность и функции для связывания Fc-домена, такого как любой из Fc-доменов, описанных в данном документе. Связывающий Fc пептид может иметь различное происхождение, например, синтетическое, человеческое, мышиное или крысиное. Fc-связывающие пептиды по изобретению включают Fc-связывающие пептиды, которые были сконструированы с возможностью включения одного или более (например, двоих, троих, четырех или пяти) остатков цистеина или лизина, подвергающихся воздействию

растворителя, которые могут обеспечивать сайт для конъюгации с соединение по изобретению (например, конъюгации с мономером или димером ингибитора нейраминидазы, в том числе посредством линкера). Наиболее предпочтительно, Fc-связывающий пептид будет содержать единственный цистеин или лизин, подвергающийся воздействию растворителя, что делает возможной сайт-специфическую конъюгацию соединения по изобретению. Fc-связывающие пептиды могут включать только встречающиеся в природе аминокислотные остатки или могут включать один или более не встречающихся в природе аминокислотных остатков. В случаях включения не встречающийся в природе аминокислотный остаток (например, боковая цепь не встречающегося в природе аминокислотного остатка) может использоваться в качестве точки присоединения для соединения по изобретению (например, мономера или димера ингибитора нейраминидазы, в том числе посредством линкера). Fc-связывающие пептиды по изобретению могут быть линейными или циклическими. Fc-связывающие пептиды по изобретению включают любые Fc-связывающие пептиды, известные специалисту в данной области.

В контексте данного документа термин «белок альбумин» относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, соответствующую встречающемуся в природе белку альбумину (например, сывороточному альбумину человека) или его варианту, такому как сконструированный вариант встречающегося в природе белка альбумина. Варианты белков альбуминов включают полиморфизмы, фрагменты, такие как домены и субдомены, и слитые белки (например, белок альбумин, имеющий слияние с С-концом или N-концом, такой как полипептидный линкер). Предпочтительно белок альбумин имеет аминокислотную последовательность сывороточного альбумина человека (HSA) или его вариант или фрагмент, наиболее предпочтительно функциональный вариант или его фрагмент. Белки альбумина по изобретению включают белки, имеющие по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность с любой из SEQ ID NO: 139-141. Белки альбумины по изобретению включают белки альбумины, которые были сконструированы с возможностью включения одного или более (например, двоих, троих, четырех или пяти) остатков цистеина или лизина, подвергающихся воздействию растворителя, которые могут обеспечивать сайт для конъюгации с соединение по изобретению (например, конъюгации с мономером или димером ингибитора нейраминидазы, в том числе посредством линкера). Наиболее предпочтительно, белок альбумин будет содержать единственный цистеин или лизин, подвергающийся воздействию растворителя, что делает возможной сайт-специфическую конъюгацию соединения по изобретению. Белки альбумины могут включать только встречающиеся в природе аминокислотные остатки или могут включать один или более не встречающихся в природе аминокислотных остатков. В случаях включения не встречающийся в природе аминокислотный остаток (например, боковая цепь не встречающегося в природе аминокислотного остатка) может использоваться в качестве точки присоединения для соединения по изобретению (например, мономера или димера ингибитора нейраминидазы, в том числе посредством линкера).

В контексте данного документа термин «связывающий белок альбумин пептид» относится к полипептиду, имеющему аминокислотную последовательность длиной от 5 до 50 (например, от 5 до 40, от 5 до 30, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, 10 до 50, от 10 до 30 или от 10 до 20) аминокислотных остатков, который имеет аффинность и функции связывания белка альбумина, как любой из белков альбуминов, описанных в данном документе. Предпочтительно, связывающий белок альбумин пептид связывается с встречающимся в природе сывороточным альбумином, наиболее предпочтительно с сывороточным альбумином человека. Связывающий белок альбумин пептид, может иметь различное происхождение, например синтетическое, человеческое, мышиное или крысиное. Связывающие белки альбумины пептиды

по изобретению включают связывающие белки альбумины пептиды, которые были сконструированы с возможностью включения одного или более (например, двоих, троих, четырех или пяти) остатков цистеина или лизина, подвергающихся воздействию растворителя, которые могут обеспечивать сайт для конъюгации с соединение по изобретению (например, конъюгации с мономером или димером ингибитора нейраминидазы, в том числе посредством линкера). Наиболее предпочтительно, связывающий белок альбумин пептид будет содержать единственный цистеин или лизин, подвергающийся воздействию растворителя, что делает возможной сайт-специфическую конъюгацию соединения по изобретению. Связывающие белки альбумины пептиды могут включать только встречающиеся в природе аминокислотные остатки или могут включать один или более не встречающихся в природе аминокислотных остатков. В случаях включения не встречающийся в природе аминокислотный остаток (например, боковая цепь не встречающегося в природе аминокислотного остатка) может использоваться в качестве точки присоединения для соединения по изобретению (например, мономера или димера ингибитора нейраминидазы, в том числе посредством линкера). Связывающие белок альбумин пептиды по изобретению могут быть линейными или циклическими. Связывающий белок альбумин пептид по изобретению включает любые связывающие белок альбумин пептиды, известные специалисту в данной области, примеры которых представлены в данном документе. Дополнительные иллюстративные связывающие белок альбумин пептиды представлены в заявке на патент США № 2005/0287153, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

В контексте данного документа термин «экспонированная на поверхности аминокислота» или «аминокислота, подвергающаяся действию растворителя», такая как экспонированный на поверхности цистеин или экспонированный на поверхности лизин, относится к аминокислоте, которая доступна для растворителя, окружающего белок. экспонированная на поверхности аминокислота может представлять собой встречающийся в природе или модифицированный вариант (например, замену или вставку) белка. В некоторых вариантах осуществления экспонированная на поверхности аминокислота представляет собой аминокислоту, которая при замене по существу не изменяет трехмерную структуру белка.

В контексте данного документа термины «линкер», «L» и «L'» относятся к ковалентной связи или соединению между двумя или более компонентами в конъюгате (например, между двумя ингибиторами нейраминидазы в конъюгате, описанном в данном документе, между ингибитором нейраминидазы и Fc-доменом или белком альбумином в конъюгате, описанном в данном документе, и между димером двух ингибиторов нейраминидазы и Fc-доменом или белком альбумином в описанном в данном документе конъюгате). В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе конъюгат может содержать линкер, который имеет трехвалентную структуру (например, трехвалентный линкер). Трехвалентный линкер имеет три плеча, в котором каждое плечо ковалентно связано с компонентом конъюгата (например, первое плечо, конъюгированное с первым ингибитором нейраминидазы, второе плечо, конъюгированное со вторым ингибитором нейраминидазы, и третье плечо, конъюгированное с Fc-доменом или белком альбумином).

Молекулы, которые можно использовать в качестве линкеров, включают по меньшей мере две функциональные группы, которые могут быть одинаковыми или разными, например, две группы карбоновой кислоты, две аминогруппы, две группы сульфоновой кислоты, группу карбоновой кислоты и малеимидную группу, группу карбоновой кислоты и алкиновую группу, группа карбоновой кислоты и аминогруппу, группу карбоновой кислоты и группу сульфоновой кислоты, аминогруппу и малеимидную группу, аминогруппу и алкиновую группу, или аминогруппу и группу сульфоновой кислоты. Первая функциональная группа может образовывать ковалентную связь с первым компонентом в конъюгате, а вторая функциональная группа может

образовывать ковалентную связь со вторым компонентом в конъюгате. В некоторых вариантах осуществления трехвалентного линкера два плеча линкера могут содержать две дикарбоновые кислоты, в которых первая карбоновая кислота может образовывать ковалентную связь с первым ингибитором нейраминидазы в конъюгате, а вторая карбоновая кислота может образовывать ковалентную связь со вторым ингибитором нейраминидазы в конъюгате и третье плечо линкера может обеспечивать ковалентное связывание с Fc-доменом или белком альбумином в конъюгате. Примеры дикарбоновых кислот описаны ниже в данном документе. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая одну или более малеимидных групп, может быть использована в качестве линкера, в котором малеимидная группа может образовывать связь углерод-сера с цистеином в компоненте (например, Fc-домене или белке альбумине) в конъюгате. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая одну или более алкиновых групп, может использоваться в качестве линкера, в котором алкиновая группа может образовывать 1,2,3-триазольную связь с азидом в компоненте (например, Fc-домене или белке альбумине) в конъюгате. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая одну или более азидных групп, может использоваться в качестве линкера, в котором азидная группа может образовывать 1,2,3-триазольную связь с алкином в компоненте (например, Fc-домене или белке альбумине) в конъюгате. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая одну или более бис-сульфоновых групп, может быть использована в качестве линкера, в котором бис-сульфоновая группа может образовывать связь с аминогруппой в компоненте (например, Fc-домене или белке альбумине) в конъюгате. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая одну или более групп сульфоновой кислоты, может использоваться в качестве линкера, в котором группа сульфоновой кислоты может образовывать сульфонамидную связь с компонентом в конъюгате. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая одну или более изоцианатных групп, может использоваться в качестве линкера, в котором изоцианатная группа может образовывать карбамидную связь с компонентом в конъюгате. В некоторых вариантах осуществления в качестве линкера может быть использована молекула, содержащая одну или более галоалкильных групп, в которых галоалкильная группа может образовывать ковалентную связь, например, связи C-N и C-O, с компонентом в конъюгате.

В некоторых вариантах осуществления линкер обеспечивает пространство, жесткость и/или гибкость между двумя или более компонентами. В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой связь, например, ковалентную связь. Термин «связь» относится к химической связи, например, амидной связи, дисульфидной связи, связь C-O, связь C-N, связь N-N, связь C-S или связи любого типа, созданной в результате химической реакции, например, химической конъюгации. В некоторых вариантах осуществления линкер включает не более 250 атомов. В некоторых вариантах осуществления линкер включает не более 250 неводородных атомов. В некоторых вариантах осуществления остов линкера включает не более 250 атомов. «Остов» линкера относится к атомам в линкере, которые вместе образуют кратчайший путь от одной части конъюгата к другой части конъюгата (например, кратчайший путь, связывающий первый ингибитор нейраминидазы и второй ингибитор нейраминидазы). Атомы в остове линкера непосредственно задействованы в связывании одной части конъюгата с другой частью конъюгата (например, в связывании первого ингибитора нейраминидазы и второго ингибитора нейраминидазы). Например, атомы водорода, присоединенные к атомам углерода в остове линкера, не рассматриваются как непосредственно задействованные в связывании одной части конъюгата с другой частью конъюгата.

В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать синтетическую группу, полученную, например, из синтетического полимера (например, полимера полиэтиленгликоля (ПЭГ)). В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать один или более аминокислотных остатков, таких как D-

или L-аминокислотные остатки. В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой остаток аминокислотной последовательности (например, последовательности 1-25 аминокислот, 1-10 аминокислот, 1-9 аминокислот, 1-8 аминокислот, 1-7 аминокислот, 1-6 аминокислот, 1-5 аминокислот, 1-4 аминокислот, 1-3 аминокислот, 1-2 аминокислот или 1 аминокислоты). В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать один или более, например, 1-100, 1-50, 1-25, 1-10, 1-5 или 1-3, необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный гетероалкилен (например, ПЭГ элемент), необязательно замещенный алкенилен, необязательно замещенный гетероалкенилен, необязательно замещенный алкинилен, необязательно замещенный гетероалкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный гетероциклоалкилен, необязательно замещенный циклоалкенилен, необязательно замещенный гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный циклоалкинилен, необязательно замещенный гетециклоалкинилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен (например, пиридин), O, S, NR^i (R^i представляет собой H, необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный гетероалкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный гетероалкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гетероалкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, необязательно замещенный циклоалкенил, необязательно замещенный гетероциклоалкенил, необязательно замещенный циклоалкинил, необязательно замещенный гетероциклоалкинил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил), P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино. Например, линкер может содержать один или более необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен (например, ПЭГ элемент), необязательно замещенный C2-C20 алкенилен (например, C2 алкенилен), необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен (например, циклопропилен, циклобутилен), необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен (например, C6 арилен), необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен (например, имидазол, пиридин), O, S, NR^i (R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил), P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино.

В контексте данного документа термины «алкил», «алкенил» и «алкинил» включают одновалентные заместители с прямой и разветвленной цепью, а также их комбинации, содержащие только C и H в незамещенном виде. Когда алкильная группа включает по меньшей мере одну двойную углерод-углеродную связь или тройную углерод-углеродную связь, алкильная группа может называться «алкенильной» или «алкинильной» группой, соответственно. Моновалентность алкильной, алкенильной или алкинильной группы не включает необязательные заместители в алкильной, алкенильной или алкинильной группе.

Например, если алкильная, алкенильная или алкинильная группа присоединена к соединению, одновалентность алкильной, алкенильной или алкинильной группы относится к ее присоединению к соединению и не включает никаких дополнительных заместителей, которые могут присутствовать в алкиле, алкенильная или алкинильная группа. В некоторых вариантах осуществления алкильная или гетероалкильная группа может содержать, например, 1-20. 1-18, 1-16, 1-14, 1-12, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4, или 1-2 атомы углерода (например, C1-C20, C1-C18, C1-C16, C1-C14, C1-C12, C1-C10, C1-C8, C1-C6, C1-C4, или C1-C2). В некоторых вариантах осуществления алкенильная, гетероалкенильная, алкинильная или гетероалкинильная группа может содержать, например, 2-20, 2-18, 2-16, 2-14, 2-12, 2-10, 2-8, 2-6, или 2-4 атомы углерода (например, C2-C20, C2-C18, C2-C16, C2-C14, C2-C12, C2-C10, C2-C8, C2-C6, или C2-C4). Примеры включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, 2-пропенил и 3-бутинил.

В контексте данного документа термин «циклоалкил» представляет собой одновалентную насыщенную или ненасыщенную неароматическую циклическую алкильную группу. Циклоалкил может иметь, например, от трех до двадцати атомов углерода (например, C3-C7, C3-C8, C3-C9, C3-C10, C3-C11, C3-C12, C3-C14, C3-C16, C3-C18 или C3-C20 циклоалкил). Примеры циклоалкилов включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и циклогептил. Когда циклоалкильная группа включает по меньшей мере одну двойную углерод-углеродную связь, циклоалкильная группа может называться «циклоалкенильной» группой. Циклоалкенил может иметь, например, от четырех до двадцати атомов углерода (например, C4-C7, C4-C8, C4-C9, C4-C10, C4-C11, C4-C12, C4-C14, C4-C16, C4-C18 или C4-C20 циклоалкенил). Иллюстративные циклоалкенильные группы включают, но не ограничиваются ими, циклопентенил, циклогексенил и циклогептенил. Когда циклоалкильная группа включает по меньшей мере одну тройную углерод-углеродную связь, циклоалкильная группа может называться «циклоалкинильной» группой. Циклоалкинил может иметь, например, от восьми до двадцати атомов углерода (например, C8-C9, C8-C10, C8-C11, C8-C12, C8-C14, C8-C16, C8-C18 или C8-C20 циклоалкинил). Термин «циклоалкил» также включает циклическое соединение, имеющее мостиковую полициклическую структуру, в которой один или более атомов углерода связывают два несмежных члена моноциклического кольца, например, бицикло[2.2.1.]гептил и адамантан. Термин «циклоалкил» также включает бициклические, трициклические и тетрациклические конденсированные кольцевые структуры, например, декалин и спироциклические соединения.

В контексте данного документа термин «арил» относится к любой моноциклической или конденсированной кольцевой бициклической или трициклической системе, которая имеет характеристики ароматичности с точки зрения распределения электронов по всей кольцевой системе, например, фенил, нафтил или фенантрен. В некоторых вариантах осуществления кольцевая система содержит 5-15 атомов в кольце или 5-10 атомов в кольце. Арильная группа может иметь, например, от пяти до пятнадцати атомов углерода (например, C5-C6, C5-C7, C5-C8, C5-C9, C5-C10, C5-C11, C5-C12, C5-C13, C5-C14, или C5-C15 арил). Термин «гетероарил» также относится к таким моноциклическим или конденсированным бициклическим системам колец, содержащим один или более, например, 1-4, 1-3, 1, 2, 3 или 4 гетероатома, выбранных из O, S и N. Гетероарильная группа может иметь, например, от двух до пятнадцати атомов углерода (например, C2-C3, C2-C4, C2-C5, C2-C6, C2-C7, C2-C8, C2-C9. C2-C10, C2-C11, C2-C12, C2-C13, C2-C14, или C2-C15 гетероарил). Включение гетероатома позволяет рассматривать включение 5-членных колец как ароматических, так и 6-членных колец. Таким образом, типичные гетероарильные системы включают, например, пиридил, пиримидил, индолил, бензимидазолил, бензотриазолил, изохинолил, хинолил, бензотиазолил, бензофуранил, тиенил, фурил, пирролил, тиазолил, оксазолил, изоксазолил, бензоксазолил,

изоксазолил и бензоксазолил. Поскольку возможны таутомеры, такая группа, как фталимидо, также считается гетероарильной. В некоторых вариантах осуществления арильная или гетероарильная группа представляет собой 5- или 6-членную систему ароматических колец, необязательно содержащую 1-2 атома азота. В некоторых вариантах осуществления арильная или гетероарильная группа представляет собой необязательно замещенный фенил, пиридил, индолил, пиримидил, пиридазинил, бензотиазолил, бензимидазолил, пиразолил, имидазолил, изоксазолил, тиазолил или имидазопиридинил. В некоторых вариантах осуществления арильная группа представляет собой фенил. В некоторых вариантах осуществления арильная группа может быть необязательно замещена заместителем, таким как арильный заместитель, например, бифенилом.

Термин «алкарил» относится к арильной группе, которая связана с алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой группой. Как правило, если соединение присоединено к алкарильной группе, к соединению присоединяется алкиленовая, алкениленовая или алкиниленовая часть алкарила. В некоторых вариантах осуществления алкарил представляет собой C6-C35 алкарил (например, C6-C16, C6-C14, C6-C12, C6-C10, C6-C9, C6-C8, C7 или C6 алкарил), в котором количество атомов углерода указывает на общее количество атомов углерода как в арильной части, так и в алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой части алкарила. Примеры алкарилов включают, но не ограничиваются ими, (C1-C8)алкилен (C6-C12)арил, (C2-C8)алкенилен(C6-C12)арил или (C2-C8)алкинилен(C6-C12)арил. В некоторых вариантах осуществления алкарил представляет собой бензил или фенетил. В гетероалкариле один или более гетероатомов, выбранных из N, O и S, могут присутствовать в алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой части алкарильной группы и/или могут присутствовать в арильной части алкарильной группы. В необязательно замещенном алкарил заместитель может присутствовать в алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой части алкарильной группы и/или может присутствовать в арильной части алкарильной группы.

В контексте данного документа термин «амино» представляет собой $–N(R^x)_2$ или $–N^+(R^x)_3$, где каждый R^x независимо представляет собой H, алкил, алкенил, алкинил, арил, алкарил, циклоалкил или два R^x объединяются с образованием гетероциклоалкила. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа представляет собой $-NH_2$.

В контексте данного документа термин «алкамино» относится к описанной в данном документе аминогруппе, которая присоединена к алкиленовой (например, C1-C5 алкилен), алкениленовой (например, C2-C5 алкенилен) или алкиниленовой группе (например, C2-C5 алкенилен). Как правило, если соединение присоединено к алкаминогруппе, к соединению присоединяется алкиленовая, алкениленовая или алкиниленовая часть алкамино. Аминочасть алкамино относится к $–N(R^x)_2$ или $–N^+(R^x)_3$, где каждый R^x независимо представляет собой H, алкил, алкенил, алкинил, арил, алкарил, циклоалкил или два R^x объединяются с образованием гетероциклоалкила. В некоторых вариантах осуществления аминогруппа алкамино представляет собой $-NH_2$. Примером алкаминогруппы является C1-C5 алкамино, например, C2 алкамино (например, $CH_2CH_2NH_2$ или $CH_2CH_2N(CH_3)_2$). В гетероалкаминогруппе один или более, например, 1-4, 1-3, 1, 2, 3 или 4 гетероатома, выбранных из N, O и S, могут присутствовать в алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой части гетероалкаминогруппе. В некоторых вариантах осуществления алкаминогруппа может быть необязательно замещенной. В замещенной алкаминогруппе заместитель может присутствовать в алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой части алкаминогруппы и/или может присутствовать в аминочасти алкаминогруппы.

В контексте данного документа термин «алкамид» относится к описанной в данном документе амидной группе, которая присоединена к алкиленовой (например, C1-C5 алкилен), алкениленовой (например, C2-C5

алкенилен) или алкиниленовой (например, C2-C5 алкенилен) группе. Как правило, если соединение присоединено к алкамидной группе, к соединению присоединяется алкиленовая, алкениленовая или алкиниленовая часть алкамида. Амидная часть алкамида относится к $–C(O)-N(R^x)_2$, где каждый R^x независимо представляет собой H, алкил, алкенил, алкинил, арил, алкарил, циклоалкил, или два R^x объединяются с образованием гетероциклоалкила. В некоторых вариантах осуществления амидная часть алкамида представляет $-C(O)NH_2$. Алкамидная группа может представлять собой $-(CH_2)_2-C(O)NH_2$ или $-CH_2-C(O)NH_2$. В гетероалкамидной группе один или более, например, 1-4, 1-3, 1, 2, 3 или 4 гетероатома, выбранных из N, O и S, могут присутствовать в алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой части гетероалкамидной группе. В некоторых вариантах осуществления алкамидная группа может быть необязательно замещенной. В замещенной алкамидной группе заместитель может присутствовать в алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой части алкамидной группы и/или может присутствовать в аминочасти алкамидной группы.

В контексте данного документа термины «алкилен», «алкенилен» и «алкинилен» относятся к двухвалентным группам, имеющим определенный размер. В некоторых вариантах осуществления алкилен может содержать, например, 1-20, 1-18, 1-16, 1-14, 1-12, 1-10, 1-8, 1-6, 1-4 или 1-2 атома углерода (например, C1-C20, C1-C18, C1-C16, C1-C14, C1-C12, C1-C10, C1-C8, C1-C6, C1-C4 или C1-C2). В некоторых вариантах осуществления алкенилен или алкинилен может содержать, например, 2-20, 2-18, 2-16, 2-14, 2-12, 2-10, 2-8, 2-6 или 2-4 атомов углерода (например, C2-C20, C2-C18, C2-C16, C2-C14, C2-C12, C2-C10, C2-C8, C2-C6, или C2-C4). Алкилен, алкенилен и/или алкинилен включают формы с прямой и разветвленной цепью, а также их комбинации. Двухвалентность алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой группы не включает необязательные заместители в алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой группе. Например, два ингибитора нейраминидазы могут быть присоединены друг к другу посредством линкера, который включает алкилен, алкенилен и/или алкинилен или их комбинации. Каждая из алкиленовых, алкениленовых и/или алкиниленовых групп в линкере считается двухвалентной по отношению к двум присоединениям на любом конце алкиленовой, алкениленовой и/или алкиниленовой группы. Например, если линкер включает -(необязательно замещенный алкилен)-(необязательно замещенный алкенилен)-(необязательно замещенный алкилен)-, алкенилен считается двухвалентным по отношению к его присоединениям к двум алкиленам на концах линкера. Необязательные заместители в алкенилене не включены в двухвалентность алкенилена. Двухвалентная природа алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой группы (например, алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой группы в линкере) относится к обоим концам группы и не включает необязательные заместители, которые могут присутствовать в алкиленовой, алкениленовой или алкиниленовой группе. Поскольку они являются двухвалентными, они могут связывать вместе несколько (например, две) частей конъюгата, например, первый ингибитор нейраминидазы и второй ингибитор нейраминидазы. Алкиленовые, алкениленовые и/или алкиниленовые группы могут быть замещены группами, как правило подходящими в качестве заместителей для алкильных, алкенильных и алкинильных групп, как указано в данном документе. Например, C=O представляет собой C1 алкилен, замещенный оксо (=O). Например, -HCR-C≡C- может рассматриваться как необязательно замещенный алкинилен и считается двухвалентной группой, даже если он имеет необязательный заместитель, R. Гетероалкиленовые, гетероалкениленовые и/или гетероалкиниленовые группы относятся к алкиленовым, алкениленовым и/или алкиниленовым группам, включая один или более, например, 1-4, 1-3, 1, 2, 3 или 4 гетероатома, например, N, O и S. Например, полиэтиленгликолевый (ПЭГ) полимер или ПЭГ звено $-(CH_2)_2-O-$ в ПЭГ полимере считается гетероалкиленом, содержащим один или более атомов кислорода.

Используемый в данном документе термин «комбинированная терапия» или «вводимый в

комбинации» означает, что описанный в данном документе конъюгат (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) и одно (или более) различных агентов или средств для лечения вводят субъекту в виде части определенной схемы лечения вирусной инфекции. Схема лечения определяет дозы и периодичность введения каждого агента, так что эффекты отдельных агентов на субъекта перекрываются. В некоторых вариантах осуществления доставка конъюгата и одного или более агентов является одновременной или сопутствующей, и конъюгат и один или более агентов могут быть включены в состав совместно. В некоторых вариантах осуществления конъюгат и один или более агентов не входят в состав одной лекарственной формы и вводятся последовательно в виде части предписанной схемы. В некоторых вариантах осуществления введение конъюгата и одного или более агентов или методов лечения в комбинации таково, что уменьшение симптома или другого параметра, связанного с расстройством, больше, чем то, что наблюдалось бы с одним агентом или лечением, проводимым отдельно или в отсутствие другого. Эффект конъюгата и одного или более агентов может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным (например, синергетическим). Последовательное или практически одновременное введение каждого терапевтического агента могут осуществляется любым подходящим путем, включая, помимо прочего, пероральные пути, внутривенные пути, внутримышечные пути и прямое всасывание через ткани слизистой оболочки. Терапевтические агенты можно вводить одним и тем же путем или разными путями. Например, описанный в данном документе конъюгат можно вводить путем внутривенной инъекции, в то время как второй терапевтический агент из комбинации можно вводить перорально.

В контексте данного документа термин «циклоалкилен» относится к двухвалентной циклической группе, связывающей вместе две части соединения. Например, один атом углерода в циклоалкиленовой группе может быть связан с одной частью соединения, в то время как другой атом углерода в циклоалкиленовой группе может быть связан с другой частью соединения. Циклоалкиленовая группа может включать насыщенные или ненасыщенные неароматические циклические группы. Циклоалкилен может иметь, например, от трех до двадцати атомов углерода в циклической части циклоалкилена (например, C3-C7, C3-C8, C3-C9, C3-C10, C3-C11, C3-C12, C3-C14, C3-C16, C3-C18 или C3-C20 циклоалкилен). Когда циклоалкиленовая группа включает по меньшей мере одну двойную углерод-углеродную связь, циклоалкиленовая группа может называться «циклоалкениленовой» группой. Циклоалкенилен может иметь, например, от четырех до двадцати атомов углерода в циклической части циклоалкенилена (например, C4-C7, C4-C8, C4-C9, C4-C10, C4-C11, C4-C12, C4-C14, C4-C16, C4-C18 или C4-C20 циклоалкенилен). Когда циклоалкиленовая группа включает по меньшей мере одну тройную углерод-углеродную связь, циклоалкиленовая группа может называться «циклоалкиниленовой» группой. Циклоалкинилен может иметь, например, от четырех до двадцати атомов углерода в циклической части циклоалкинилена (например, C4-C7, C4-C8, C4-C9, C4-C10, C4-C11, C4-C12, C4-C14, C4-C16, C4-C18, или C8-C20 циклоалкинилен). Циклоалкиленовая группа может быть замещена группами, как правило подходящими в качестве заместителей для алкильных, алкенильных и алкинильных групп, как указано в данном документе. Гетероциклоалкилен относится к циклоалкиленовой группе, включающей один или более, например, 1-4, 1-3, 1, 2, 3 или 4 гетероатома, например, N, O и S. Примеры циклоалкиленов включают, но не ограничиваются ими, циклопропилен и циклобутилен. Тетрагидрофуран можно рассматривать как гетероциклоалкилен.

В контексте данного документа термин «арилен» относится к поливалентной (например, двухвалентной или трехвалентной) арильной группе, связывающей вместе несколько (например, две или три) части соединения. Например, один атом углерода в ариленовой группе может быть связан с одной частью соединения, в то время как другой атом углерода в ариленовой группе может быть связан с другой частью

соединения. Арилен может иметь, например, от пяти до пятнадцати атомов углерода в арильной части арилена (например, C5-C6, C5-C7, C5-C8, C5-C9. C5-C10, C5-C11, C5-C12, C5-C13, C5-C14, или C5-C15 арилен). Ариленовая группа может быть замещена группами, как правило, подходящими в качестве заместителей для алкильных, алкенильных и алкинильных групп, как указано в данном документе. Гетероарилен относится к ароматической группе, включающей один или более, например, 1-4, 1-3, 1, 2, 3, или 4, гетероатома, например N, O и S. Гетероариленовая группа может иметь, например, от двух до пятнадцати атомов углерода (например, C2-C3, C2-C4, C2-C5, C2-C6, C2-C7, C2-C8, C2-C9. C2-C10, C2-C11, C2-C12, C2-C13, C2-C14, или C2-C15 гетероарилен).

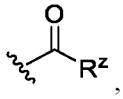
В контексте данного документа термин «необязательно замещенный» относится к наличию 0, 1 или более заместителей, таких как 0-25, 0-20, 0-10 или 0-5 заместителей. Заместители включают, но не ограничиваются ими, алкил, алкенил, алкинил, арил, алкарил, ацил, гетероарил, гетероалкил, гетероалкенил, гетероалкинил, гетероалкарил, галоген, оксо, циано, нитро, амино, алкамино, гидрокси, алкокси, алканоил, карбонил, карбамоил, гуанидинил, уреидо, амидинил, любую из групп или фрагментов, описанных выше, и гетеро-версии любой из групп или фрагментов, описанных выше. Заместители включают, но не ограничиваются ими, F, Cl, метил, фенил, бензил, OR, NR_2, SR, SOR, SO_2R, OCOR, NRCOR, $NRCONR_2$, NRCOOR, $OCONR_2$, RCO, COOR, алкил-OOCR, SO_3R, $CONR_2$, SO_2NR_2, $NRSO_2NR_2$, CN, CF_3, OCF_3, SiR_3 и NO_2, где каждый R независимо представляет собой H, алкил, алкенил, арил, гетероалкил, гетероалкенил или гетероарил, и где два из необязательных заместителей на одном или смежных атомах могут быть соединены с образованием конденсированного, необязательно замещенного ароматического или неароматического, насыщенного или ненасыщенного кольца, которое содержит 3-8 членов, или два из необязательных заместителей на одном и том же атоме могут быть соединены с образованием необязательно замещенного ароматического или неароматического, насыщенного или ненасыщенного кольца, которое содержит 3–8 членов.

Необязательно замещенная группа или фрагмент относится к группе или фрагменту (например, к любой из групп или фрагментов, описанных выше), в которых один из атомов (например, атом водорода) необязательно заменен другим заместителем. Например, необязательно замещенный алкил может представлять собой необязательно замещенный метил, в котором атом водорода метильной группы заменен, например, OH. В качестве другого примера, заместитель в гетероалкиле или его двухвалентном аналоге, гетероалкилене, может заменить водород на углероде или водород на гетероатоме, таком как N. Например, атом водорода в группе -R-NH-R- может быть замещен алкамидным заместителем, например, $-R-N[(CH_2C(O)N(CH_3)_2]-R$.

Как правило, необязательный заместитель представляет собой неинтерферирующий заместитель. «Неинтерферирующий заместитель» относится к заместителю, который оставляет способность конъюгатов, описанных в данном документе (например, конъюгатов любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), или (M'-I)) либо для связывания с вирусной нейраминидазой, либо для ингибирования пролиферации вируса гриппа. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления заместитель может изменять степень такой активности. Однако до тех пор, пока конъюгат сохраняет способность связываться с вирусной нейраминидазой или ингибировать вирусную пролиферацию, заместитель будет классифицироваться как «неинтерферирующий». Например, неинтерферирующий заместитель оставит способность соединения обеспечивать противовирусную эффективность на основе значения IC50 10 мкМ или менее в анализе уменьшения количества вирусных бляшек, таком как приведен в примере 2, на основе значения IC50 против нейраминидазы вируса гриппа менее чем 500 нМ. Таким образом, заместитель может изменять степень

ингибирования на основе уменьшения количества бляшек или ингибирования нейраминидазы вируса гриппа. Однако, если соединения в данном документе, такие как соединения формул (A-I), (A-II), (A-III), (A-IV), (A-V), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), (A-XI), (A-XII), и (A-XIII) сохраняют способность ингибировать активность нейраминидазы вируса гриппа, заместитель будет классифицирован как «неинтерферирующий». Ряд анализов для определения уменьшения количества вирусных бляшек или способности любого соединения ингибировать нейраминидазу вируса гриппа доступен в данной области техники, и некоторые из них проиллюстрированы в примерах ниже.

Термин «гетеро», когда он используется для описания химической группы или фрагмента, относится к наличию по меньшей мере одного гетероатома, который не является углеродом или водородом, например, N, O и S. Любая из групп или фрагментов, описанных выше, может называться гетеро, при условии содержания по меньшей мере одного гетероатома. Например, гетероциклоалкильная, гетероциклоалкенильная или гетероциклоалкинильная группа относится к циклоалкильной, циклоалкенильной или циклоалкинильной группе, которая имеет один или более гетероатомов, независимо выбранных, например, из N, O и S. Примером гетероциклоалкенильной группы является малеимидо. Например, гетероарильная группа относится к ароматической группе, которая имеет один или более гетероатомов, независимо выбранных, например, из N, O и S. Один или более гетероатомов также могут быть включены в заместитель, который заменяет атом водорода в группе или фрагмент, как описано в данном документе. Например, в необязательно замещенной гетероарильной группе, если один из атомов водорода в гетероарильной группе заменен заместителем (например, метилом), заместитель также может содержать один или более гетероатомов (например, метанол).

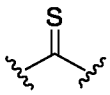
В контексте данного документа термин «ацил» относится к группе, имеющей структуру:  , где R^z представляет собой необязательно замещенный алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкенил, циклоалкинил, арил, алкарил, алкамино, гетероалкил, гетероалкенил, гетероалкинил, гетероциклоалкил, гетероциклоалкенил, гетероциклоалкинил, гетероарил, гетероалкарил или гетероалкамино.

Используемый в данном документе термин «галоген» относится к любому атому галогена, например, F, Cl, Br или I. Любая из групп или фрагментов, описанных в данном документе, может называться «фрагментом галогена», при условии содержания по меньшей мере одного атома галогена, например, галогеналкила.

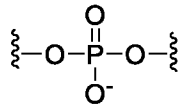
Используемый в данном документе термин «гидроксил» представляет группу -OH.

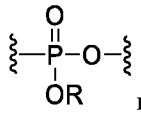
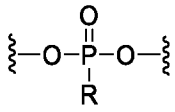
В контексте данного документа термин «оксо» относится к заместителю, имеющему структуру =O, где имеется двойная связь между атомом и атомом кислорода.

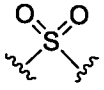
Используемый в данном документе термин «карбонил» относится к группе, имеющей структуру: .

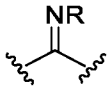
В контексте данного документа термин «тиокарбонил» относится к группе, имеющей структуру: 

Используемый в данном документе термин «фосфат» представляет собой группу, имеющую

структуру:  .

В контексте данного документа термин «фосфорил» представляет группу, имеющую структуру:  или  .

Используемый в данном документе термин «сульфонил» представляет собой группу, имеющую структуру:  .

Используемый в данном документе термин «имино» представляет собой группу, имеющую структуру:  , где R представляет собой необязательный заместитель.

В контексте данного документа термин «*N*-защитная группа» представляет собой те группы, которые предназначены для защиты аминогруппы от нежелательных реакций во время применения методик синтеза. Обычно используемые *N*защитные группы раскрыты в Greene, «Protective Groups in Organic Synthesis», 5-е издание (John Wiley & Sons, New York, 2014), которая включена в данный документ посредством ссылки. *N*-защитные группы включают, например, ацильные, арилоильные и карбамильные группы, такие как формил, ацетил, пропионил, пивалоил, трет-бутилацетил, 2-хлорацетил, 2-бромацетил, трифторацетил, трихлорацетил, фталил, о-нитрофеноксиацетил, α-хлорбутирил, бензоил, карбоксибензил (CBz), 4-хлорбензоил, 4-бромбензоил, 4-нитробензоил и хиральные вспомогательные вещества, такие как защищенные или незащищенные D, L или D, L-аминокислотные остатки, такие как аланин, лейцин, фенилаланин; сульфонилсодержащие группы, такие как бензолсульфонил и п-толуолсульфонил; группы, образующие карбамат, такие как бензилоксикарбонил, п-хлорбензилоксикарбонил, п-метоксибензилоксикарбонил, п-нитробензилоксикарбонил, 2-нитробензилоксикарбонил, п-бромбензилоксикарбонил, 3,4-диметоксибензилоксикарбонил, 3,5-диметоксибензилоксикарбонил, 2,4-диметоксибензилоксикарбонил, 4-метоксибензилоксикарбонил, 2-нитро-4,5-диметоксибензилоксикарбонил, 3,4,5-триметоксибензилоксикарбонил, 1-(п-бифенил)-1-метилэтоксикарбонил, α,α-диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил, бензгидрилоксикарбонил, трет-бутилоксикарбонил (BOC), диизопропилметоксикарбонил, изопропилоксикарбонил, этоксикарбонил, метоксикарбонил, аллилоксикарбонил, 2,2,2-трихлорэтоксикарбонил, феноксикарбонил, 4-нитрофеноксикарбонил, флуоренил-9-метоксикарбонил (Fmoc), циклопентилоксикарбонил, адамантилоксикарбонил, циклогексилоксикарбонил и фенилтиокарбонил; алкарильные группы, такие как бензил, трифенилметил и бензилоксиметил; и силильные группы, такие как триметилсилил.

В контексте данного документа термин «аминокислота» означает встречающиеся в природе аминокислоты и не встречающиеся в природе аминокислоты.

В контексте данного документа термин «встречающиеся в природе аминокислоты» означает аминокислоты, включая Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr и Val.

Используемый в данном документе термин «не встречающаяся в природе аминокислота» означает альфа-аминокислоту, которая не продуцируется естественным путем или не встречается у млекопитающих.

Примеры не встречающихся в природе аминокислот включают D-аминокислоты; аминокислоту, имеющую ацетиламинометильную группу, присоединенную к атому серы цистеина; пегилированную аминокислоту; омега-аминокислоты формулы $NH_2(CH_2)_nCOOH$, где n равно 2-6, нейтральные неполярные аминокислоты, такие как саркозин, трет-бутилаланин, трет-бутилглицин, N-метилизолейцин и норлейцин; оксиметионин; фенилглицин; цитруллин; сульфоксид метионина; цистеиновую кислоту; орнитин; диаминомасляную кислоту; 3-аминоаланин; 3-гидрокси-D-пролин; 2,4-диаминомасляную кислоту; 2-аминопентановую кислоту; 2-аминооктановую кислоту, 2-карбоксипиперазин; пиперазин-2-карбоновую кислоту, 2-амино-4-фенилбутановую кислоту; 3-(2-нафтил)аланин и гидроксипролин. Другими аминокислотами являются α-аминомасляная кислота, α-амино-α-метилбутират, аминоциклопропанкарбоксилат, аминоизомасляная кислота, аминонорборнилкарбоксилат, L-циклогексилаланин, циклопентилаланин, L-N-метиллейцин, L-N-метилметионин, L-N-метилнорвалин, L-N-метилфенилаланин, L-N-метилпролин, L-N-метилсерин, L-N-метилтриптофан, D-орнитин, L-N-метилэтилглицин, L-норлейцин, α-метиламиноизобутират, α-метилциклогексилаланин, D-α-метилаланин, D-α-метиларгинин, D-α-метиласпарагин, D-α-метиласпартат, D-α-метилцистеин, D-α-метилглутамин, D-α-метилгистидин, D-α-метилизолейцин, D-α-метиллейцин, D-α-метиллизин, D-α-метилметионин, D-α-метилорнитин, D-α-метилфенилаланин, D-α-метилпролин, D-α-метилсерин, D-N-метилсерин, D-α-метилтреонин, D-α-метилтриптофан, D-α-метилтирозин, D-α-метилвалин, D-N-метилаланин, D-N-метиларгинин, D-N-метиласпарагин, D-N-метиласпартат, D-N-метилцистеин, D-N-метилглутамин, D-N-метилглутамат, D-N-метилгистидин, D-N-метилизолейцин, D-N-метиллейцин, D-N-метиллизин, N-метилциклогексилаланин, D-N-метилорнитин, N-метилглицин, N-метиламиноизобутират, N-(1-метилпропил)глицин, N-(2-метилпропил)глицин, D-N-метилтриптофан, D-N-метилтирозин, D-N-метилвалин, γ-аминомасляная кислота, L-трет-бутилглицин, L-этилглицин, L-гомофенилаланин, L-α-метиларгинин, L-α-метиласпартат, L-α-метилцистеин, L-α-метилглутамин, L-α-метилгистидин, L-α-метилизолейцин, L-α-метиллейцин, L-α-метилметионин, L-α-метилнорвалин, L-α-метилфенилаланин, L-α-метилсерин, L-α-метилтриптофан, L-α-метилвалин, N-(N-(2,2-дифенилэтил)карбамилметилглицин, 1-карбокси-1-(2,2-дифенилэтиламино)циклопропан, 4-гидроксипролин, орнитин, 2-аминобензоил (антранилоил), D-циклогексилаланин, 4-фенилфенилаланин, L-цитруллин, α-циклогексилглицин, L-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота, L-тиазолидин-4-карбоновая кислота, L-гомотирозин, L-2-фурилаланин, L-гистидин (3-метил), N-(3-гуанидинопропил)глицин, O-метил-L-тирозин, O-гликан-серин, метатирозин, нортирозин, L-N,N′,N″-триметиллизин, гомолизин, норлизин, N-гликан аспарагин, 7-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-4-фторфенилаланин, 4-метилфенилаланин, бис-(2-пиколил)амин, пентафторфенилаланин, индолин-2-карбоновая кислота, 2-аминобензойная кислота, 3-амино-2-нафтойная кислота, асимметричный диметиларгинин, L-тетрагидроизохинолин-1-карбоновая кислота, D-тетрагидроизохинолин-1-карбоновая кислота, 1-аминоциклогексануксусная кислота, D/L-аллилглицин, 4-аминобензойная кислота, 1-аминоциклобутанкарбоновая кислота, 2- или 3-, или 4-аминоциклогексанкарбоновая кислота, 1-амино-1-циклопентанкарбоновая кислота, 1-аминоиндан-1-карбоновая кислота, 4-аминопирролидин-2-карбоновая кислота, 2-аминотетралин-2-карбоновая кислота, азетидин-3-карбоновая кислота, 4-бензилпирролидин-2-карбоновая кислота, трет-бутилглицин, b-(бензотиазолил-2-ил)-аланин, b-циклопропилаланин, включая 1-аминоциклогексануксусную кислоту, D / L-аллилглицин, 5,5-диметил-1,3-тиазолидин-4-карбоновая кислота, (2R,4S)4-гидроксипиперидин-2-карбоновая кислота, (2S,4S) и (2S,4R)-4-(2-нафтилметокси)-пирролидин-2-карбоновая кислота, (2S,4S) и (2S,4R)4-феноксипирролидин-2-карбоновая кислота, (2R,5S) и (2S,5R)-5-фенилпирролидин-2-карбоновая кислота, (2S, 4S)-4-амино-1-бензоилпирролидин-2-карбоновая кислота, трет-бутилаланин, (2S,5R)-5-фенилпирролидин-2-карбоновая кислота, 1-аминометилциклогексануксусная

кислота, 3,5-бис-(2-амино)этоксибензойная кислота, 3,5-диаминобензойная кислота, 2-метиламинобензойная кислота, N-метилантраниловая кислота, L-N-метилаланин, L-N-метиларгинин, L-N-метиласпарагин, L-N-метиласпарагиновая кислота, L-N-метилцистеин, L-N-метилглутамин, L-N-метилглутаминовая кислота, L-N-метилгистидин, L-N-метилизолейцин, L-N-метиллизин, L-N-метилнорлейцин, L-N-метилорнитин, L-N-метилтреонин, L-N-метилтирозин, L-N-метилвалин, L-N-метил-трет-бутилглицин, L-норвалин, α-метил-γ-аминобутират, 4,4′-бифенилаланин, α-метилцилкопентилаланин, α-метил-α-нафтилаланин, α-метилпеницилламин, N-(4-аминобутил)глицин, N-(2-аминоэтил)глицин, N-(3-аминопропил)глицин, N-амино-α-метилбутират, α-нафтилаланин, N-бензилглицин, N-(2-карбамилэтил)глицин, N-(карбамилметил)глицин, N-(2-карбоксиэтил)глицин, N-(карбоксиметил)глицин, N-циклобутилглицин, N-циклодецилглицин, N-циклогептилглицин, N-циклогексилглицин, N-циклодецилглицин N-циклооктилглицин, N-циклопропилглицин, N-циклоундецилглицин, N-(2,2-дифенилэтил)глицин, N-(3,3-дифенилпропил)глицин, N-(3-гуанидинопропил)глицин, N-(1-гидроксиэтил)глицин, N-(гидроксиэтил))глицин, N-(имидазолилэтил))глицин, N-(3-индолилиэтил)глицин, N-метил-γ-аминобутират, D-N-метилметионин, N-метилциклопентилаланин, D-N-метилфенилаланин, D-N-метилпролин, D-N-метилтреонин, N-(1-метилэтил)глицин, N-метил-нафтилаланин, N-метилпеницилламин, N-(п-гидроксифенил)глицин, N-(тиометил)глицин, пеницилламин, L-α-метилаланин, L-α-метиласпарагин, L-α-метил-трет-бутилглицин, L-метилэтилглицин, L-α-метилглутамат, L-α-метилгомофенилаланин, N-(2-метилтиоэтил)глицин, L-α -метиллизин, L-α-метилнорлейцин, L-α-метилорнитин, L-α-метилпролин, L-α-метилтреонин, L-α-метилтирозин, L-N-метилгомофенилаланин, N-(N-(3,3-дифенилпропил)карбамилметилглицин, L-пироглутаминовая кислота, D-пироглутаминовая кислота, O-метил-L-серин, O-метил-L-гомосерин, 5-гидроксилизин, α-карбоксиглутамат, фенилглицин, L-пипеколиновая кислота (гомопролин), L-гомолейцин, L-лизин (диметил), L-2-нафтилаланин, L-диметилдопа или L-диметоксифенилаланин, L-3-пиридилаланин, L-гистидин (бензоилоксиметил), N-циклогептилглицин, L-дифенилаланин, O-метил-L-гомотирозин, L-β-гомолизин, O-гликантреоин, ортотирозин, LN, N′-диметиллизин, L-гомоаргинин, неотриптофан, 3-бензотиенилаланин, изохинолин-3-карбоновая кислота, диаминопропионовая кислота, гомоцистеин, 3,4-диметоксифенилаланин, 4-хлорфенилаланин, L-1,2,3,4-тетрагидроноргарман-3-карбоновая кислота, адамантилаланил, симметричный диметиларгинин, 3-карбокситиоморфолин, D-1,2,3,4-тетрагидроноргарман-3-карбоновая кислота, 3-аминобензойная кислота, 3-амино-1-карбоксиметилпиридин-2-он, 1-амино-1-циклогексанкарбоновая кислота, 2-аминоциклопентанкарбоновая кислота, 1-амино-1-циклопропанкарбоновая кислота, 2-аминоиндан-2-карбоновая кислота, 4-аминотетрагидротиопиран-4-карбоновая кислота, азетидин-2-карбоновая кислота, b-(бензотиазол-2-ил)-аланин, неопентилглицин, 2-карбоксиметилпиперидин, b-циклобутилаланин, аллилглицин, диаминопропионовая кислота, гомоциклогексилаланин, (2S,4R)-4-гидроксипиперидин-2-карбоновая кислота, октагидроиндол-2-карбоновая кислота, (2S,4R) и (2S,4S)-4-(2-нафтил), пирролидин-2-карбоновая кислота, нипекотиновая кислота, (2S,4R) и (2S,4S)-4-(4-фенилбензил)пирролидин-2-карбоновая кислота, (3S)-1-пирролидин-3-карбоновая кислота, (2S,4S)-4-тритилмеркаптопирролидин-2-карбоновая кислота, (2S,4S)-4-меркаптопролин, трет-бутилглицин, N,N-бис(3-аминопропил)глицин, 1-аминоциклогексан-1-карбоновая кислота, N-меркаптоэтилглицин и селеноцистеин. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки могут быть заряженными или полярными. Заряженные аминокислоты включают аланин, лизин, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту или их не встречающиеся в природе аналоги. Полярные аминокислоты включают глутамин, аспарагин, гистидин, серин, треонин, тирозин, метионин или триптофан или их не встречающиеся в природе аналоги. Конкретно

предполагается, что в некоторых вариантах осуществления концевая аминогруппа в аминокислоте может быть амидогруппой или карбаматной группой.

В контексте данного документа термин «процент (%) идентичности» относится к проценту аминокислотных остатков кандидатной последовательности, например, Fc-IgG или его фрагмента, которые идентичны аминокислотным остаткам эталонной последовательности после выравнивание последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности (т.е. гэпы могут быть введены в одну или обе из кандидатных последовательностей и эталонных последовательностей для оптимального выравнивания, а негомологичные последовательности можно не принимать во внимание для целей сравнения). Выравнивание в целях определения процента идентичности можно осуществлять различными способами, находящимися в компетенции специалиста в данной области, например, с помощью общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить нужные параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности аминокислотной последовательности данной кандидатной последовательности с данной эталонной последовательностью, с или против данной эталонной последовательности (которую можно альтернативно сформулировать как данную кандидатную последовательность, которая имеет или включает в себя определенный процент идентичности аминокислотной последовательности с, или относительно заданной эталонной последовательности) рассчитывается следующим образом:

100 x (доля A/B)

где A представляет собой количество аминокислотных остатков, оцениваемых как идентичные при выравнивании кандидатной последовательности и эталонной последовательности, и где B представляет собой общее количество аминокислотных остатков в эталонной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, где длина кандидатной последовательности не равна длине эталонной последовательности, процент идентичности аминокислотной последовательности кандидатной последовательности с эталонной последовательностью не будет равен проценту идентичности аминокислотной последовательности эталонной последовательности с кандидатной последовательностью.

Две полинуклеотидные или полипептидные последовательности называются «идентичными», если последовательность нуклеотидов или аминокислот в двух последовательностях является одинаковой при выравнивании для максимального соответствия, как описано выше. Сравнения двух последовательностей обычно выполняются путем сравнивания последовательностей в окне сравнения для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. В контексте данного документа «окно сравнения» относится к сегменту из по меньшей мере около 15 смежных положений, около 20 смежных положений, около 25 смежных положений или более (например, от около 30 до около 75 смежных положений или от около 40 до около 50 смежных положений), в котором последовательность может сравниваться с эталонной последовательностью с таким же количеством смежных положений после того, как две последовательности были оптимально выровнены.

Термин «процесс лечения» или «лечить» в контексте данного документа относится к терапевтическому лечению вирусной инфекции (например, вирусной инфекции, такой как инфекция гриппа) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое лечение может замедлить прогрессирование вирусной инфекции, улучшить исход для пациента и/или устранить инфекцию. В

некоторых вариантах осуществления терапевтическое лечение вирусной инфекции у субъекта может уменьшить или облегчить один или более симптомов или состояний, ассоциированных с вирусной инфекцией, уменьшить степень распространения вируса, стабилизировать (т.е. не ухудшить) состояние по поводу вирусной инфекции, предотвратить распространение вирусной инфекции и/или задержать или замедлить прогрессирование вирусной инфекции, сравнивая состояние пациента и/или состояние по поводу вирусной инфекции при отсутствии терапевтического лечения.

Термин «среднее значение T» в контексте данного документа относится к среднему количеству мономеров ингибитора нейраминидазы или димеров ингибиторов нейраминидазы, конъюгированных с Fc-доменом или белком альбумином в популяции конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления в популяции конъюгатов среднее количество мономеров ингибиторов нейраминидазы или димеров ингибиторов нейраминдазы, конъюгированных с мономером домена Fc, может составлять от 1 до 20 (например, среднее значение T составляет от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4,5, от 3,5 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 5,5 до 7,5, от 6,5 до 8,5, от 7,5 до 9,5, или от 8,5 до 10,5). В некоторых вариантах осуществления среднее значение T составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

В контексте данного документа термин «субъект» может означать человека, отличного от человека примата или другое млекопитающее, такое как, но не ограничиваясь ими, собака, кошка, лошадь, корова, свинья, индейка, коза, рыба, обезьяна, курица, крыса, мышь и овца.

Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, например фармацевтической дозе, эффективной для индукции желаемого эффекта у субъекта или для лечения субъекта, имеющего состояние или расстройство, описанное в данном документе (например, вирусную инфекцию, например, инфекцию гриппа). В данном документе также следует понимать, что «терапевтически эффективное количество» можно интерпретировать как количество, дающее желаемый терапевтический и/или профилактический эффект, принимаемое в одной или более дозах или в любой дозировке или с использованием любого пути, и/или принимаемое отдельно или в комбинация с другими лекарственными средствами (например, противовирусным средством, описанным в данном документе). Например, в контексте введения конъюгата, описанного в данном документе (например, конъюгата любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)), который используется для лечения вирусной инфекции, эффективное количество конъюгата представляет собой, например, количество, достаточное для предотвращения, замедления или обращения прогрессирования вирусной инфекции по сравнению с ответом, полученным без введения конъюгата.

В контексте данного документа термин «фармацевтическая композиция» относится к лекарственному или фармацевтическому составу, который содержит по меньшей мере один активный ингредиент (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)), а также один или более наполнителей и разбавителей для активации активного ингредиента, подходящего для способа введения. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению включает фармацевтически приемлемые компоненты, которые совместимы с конъюгатом, описанным в данном документе (например, конъюгатом любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)).

В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к наполнителю или разбавителю в фармацевтической композиции. Например, фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой носитель, способный суспендировать или растворять активный конъюгат (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI) или (M-I)-(M-VI)). Фармацевтически приемлемый

носитель должен быть совместим с другими ингредиентами препарата и не нести вреда для реципиента. В настоящем описании фармацевтически приемлемый носитель должен обеспечивать адекватную фармацевтическую стабильность описанному в данном документе конъюгату. Характер носителя зависит от режима введения. Например, для перорального введения предпочтителен твердый носитель; для внутривенного введения обычно используется носитель в виде водного раствора (например, ВДИ и/или забуференный раствор).

Термин «фармацевтически приемлемая соль» в контексте данного документа представляет собой соли конъюгатов, описанных в данном документе (например, конъюгатов любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)), которые в рамках обоснованного медицинского заключения подходят для использования в описанных в данном документе способах без чрезмерной токсичности, раздражения и/или аллергической реакции. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, фармацевтически приемлемые соли описаны в: *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use* (Eds. P.H. Stahl и C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008. Соли могут быть получены in situ во время окончательного выделения и очистки конъюгатов, описанных в данном документе, или по отдельности путем введения группы свободного основания в реакцию с подходящей органической кислотой.

Термин «отношение лекарственного средства к антителу» или «DAR» относится к среднему количеству низкомолекулярных фрагментов лекарственного средства (например, среднему количеству мономеров или димеров низкомолекулярного лекарственного средства), конъюгированных с описанным антителом, Fc-доменом или белком альбумином, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, DAR представлен буквой «T» (например, в формулах (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), или (M'-I)). В контексте данного документа каждый мономерный фрагмент (например, каждый мономер занамивира или перамивира) или каждый димерный фрагмент (например, каждый димер занамивира или димер перамивира), конъюгированные с Fc-доменом, антителом или белком альбумином, соответствуют значению DAR, равному 1,0 (например, значению «T», равному 1,0). Например, Fc-домен, конъюгированный с 4 мономерами занамивира, будет иметь DAR 4,0 (например, «T» 4,0). Fc-домен, конъюгированный с 4 димерами занамивира (например, всего 8 молекулами занамивира), также будет иметь DAR 4,0 (например, «T» 4,0). Значение DAR также может быть вычислено как среднее DAR для популяции молекул, такой как популяция Fc-доменов, антител или белков альбуминов. Значения DAR могут влиять на эффективность, активность, фармакокинетику или токсичность препарата.

Термин «вторичная инфекция», используемый в данном документе, относится к инфекции, которая возникает у субъекта во время или после другой (называемой первичной) инфекции у этого субъекта (например, во время или после первичной инфекции гриппа). Вторичные инфекции могут быть вызваны первичной инфекцией или могут быть вызваны лечением первичной инфекции. В некоторых случаях первичные инфекции изменяют иммунную систему, делая субъекта более восприимчивым к вторичной инфекции. В некоторых случаях лечение первичной инфекции делает субъекта более восприимчивым к вторичной инфекции. Например, вирус гриппа был связан с вторичными инфекциями (например, повышенный риск развития вторичной инфекции), такими как вторичные бактериальные инфекции, например, дыхательных путей. Вторичные инфекции, связанные с инфекцией гриппа, увеличивают заболеваемость и смертность от гриппа. Вторичные инфекции включают коинфекции. Термины «вторичная инфекция» и «коинфекция» используются в данном документе взаимозаменяемо.

Используемый в данном документе термин «около» означает отклонение до ±5%. Например, около 10% означает от 9,5% до 10,5%.

Любые значения, представленные в диапазоне значений, включают как верхнюю, так и нижнюю границы, а также любые значения, содержащиеся в верхней и нижней границах.

Используемый в данном документе термин "(1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), или (M'-I)", представляет собой формулы любой из (1), (2), (3), (4), (5), (D-I), (D-II), (D-II-1), (D-II-2), (D-II-3), (D-II-4), (D-II-5), (D-II-6), (D-II-7), (D-II-8), (D-II-9), (D-II-10), (D-III), (D-III-1), (D-III-2), (D-III-3), (D-III-4), (D-III-5), (D-III-6), (D-III-7), (D-III-8), (D-III-9), (D-IV), (D-IV-1), (D-IV-2), (D-V), (D-V-1), (D-V-2), (D-V-3), (D-V-4), (D-V-5), (D-V-6), (D-V-7), (D-V-8), (D-V-9), (D-V-10), (D-VI), (D-VI-1), (D-VI-2), (D-VI-3), (D-VI-4), (D-VI-5), (D-VI-6), (D-VI-7), (D-VI-8), (D-VI-9), (D-VII), (D-VIII), (D-VIII-1), (D-VIII-2), (D-VIII-3), (D-VIII-4), (D-VIII-5), (D-VIII-6), (D-VIII-7), (D-VIII-8), (D-VIII-9), (D-VIII-10), (D-VIII-11), (D-IX), (D-IX-1), (D-IX-2), (D-IX-3), (D-IX-4), (D-IX-5), (D-IX-6), (D-X), (D-X-1), (D-X-2), (D-X-3), (D-XI), (D-XI-1), (D'-I), (M-I), (M-II), (M-II-1), (M-II-2), (M-II-3), (M-II-4), (M-II-5), (M-II-6), (M-II-7), (M-II-8), (M-II-9), (M-II-10), (M-III), (M-III-1), (M-III-2), (M-III-3), (M-III-4), (M-III-5), (M-III-6), (M-III-7), (M-III-8), (M-III-9), (M-IV), (M-IV-1), (M-IV-2), (M-V), (M-V-1), (M-V-2), (M-V-3), (M-V-4), (M-V-5), (M-V-6), (M-V-7), (M-V-8), (M-V-9), (M-V-10), (M-VI), (M-VI-1), (M-VI-2), (M-VI-3), (M-VI-4), (M-VI-5), (M-VI-6), (M-VI-7), (M-VI-8), (M-VI-9), (M-VII), (M-VIII), (M-VIII-1), (M-VIII-2), (M-VIII-3), (M-VIII-4), (M-VIII-5), (M-VIII-6), (M-VIII-7), (M-VIII-8), (M-VIII-9), (M-VIII-10), (M-VIII-11), (M-IX), (M-IX-1), (M-IX-2), (M-IX-3), (M-IX-4), (M-IX-5), (M-IX-6), (M-X), (M-X-1), (M-X-2), (M-X-3), (M-XI), (M-XI-1), или (M'-I)).

Другие признаки и преимущества описанных в данном документе конъюгатов будут очевидны из следующего подробного описания и из формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 представлено изображение, демонстрирующее иллюстративные способы конъюгирования мономера или димера ингибитора нейраминидазы, например, посредством линкера, с мономером Fc-домена, Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумина или связывающим белок альбумин пептидом.

На фиг. На 2 показан невосстанавливающий и восстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез и представлена схематическая иллюстрация Fc-домена, образованного из мономеров Fc-домена, имеющих последовательность SEQ ID NO: 1.

На фиг. На 3 показан невосстанавливающий и восстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез и представлена схематическая иллюстрация Fc-домена, образованного из мономеров Fc-домена, имеющих последовательность SEQ ID NO: 3.

На фиг. На 4 показан невосстанавливающий и восстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез и представлена схематическая иллюстрация Fc-домена, образованного из мономеров Fc-домена, имеющих последовательность SEQ ID NO: 5.

На фиг. На 5 показан невосстанавливающий и восстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез и представлена схематическая иллюстрация Fc-домена, образованного из мономеров Fc-домена, имеющих последовательность SEQ ID NO: 7.

На фиг. На 6 показан невосстанавливающий и восстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез и представлена схематическая иллюстрация Fc-домена, образованного из мономеров Fc-домена, имеющих последовательность SEQ ID NO: 9.

На фиг. На 7 показан невосстанавливающий и восстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез и представлена схематическая иллюстрация Fc-домена, образованного из мономеров Fc-домена, имеющих последовательность SEQ ID NO: 12.

На фиг. На 8 показан невосстанавливающий и восстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез и представлена схематическая иллюстрация Fc-домена, образованного из мономеров Fc-домена, имеющих последовательность SEQ ID NO: 14.

На фиг. 9 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 1.

На фиг. 10 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 2.

На фиг. 11 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 3.

На фиг. 12 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 4.

На фиг. 13 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 5.

На фиг. 14 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 6.

На фиг. 15 представлен график, демонстрирующий значения IC50 из анализа ингибирования нейраминидазы H1N1 для ПС-2 и конъюгата 1.

На фиг. 16 представлен график, демонстрирующий значения IC50 из анализа ингибирования нейраминидазы H1N1 для конъюгатов 1-6.

На фиг. 17 представлен график, демонстрирующий значения IC50 из анализа ингибирования нейраминидазы H3N2 для конъюгатов 1-6.

На фиг. 18A-18C представлена серия графиков, показывающих жизнеспособность клеток A549, обработанных конъюгатом 3 (фиг. 18A), конъюгатом 4 (фиг. 18B) или конъюгатом 6 (фиг. 18C).

На фиг. 19A-19E представлена серия графиков, показывающих способность конъюгата 3 ингибировать рост патогенных штаммов вируса гриппа A/WSN/33 H1N1 (фиг. 19A), A/Wyoming/3/03 H3N2 (фиг. 19B), A/California/04/09 H1N1 pdm (фиг. 19C), A/Vietnam/1203/04 H5N1 HALo (фиг. 19D) или B/Lee/40 Victoria (фиг. 19E) в эпителиальных клетках человека.

На фиг. 20A-20E представлена серия графиков, показывающих способность конъюгата 4 ингибировать рост патогенных штаммов вируса гриппа A/WSN/33 H1N1 (фиг. 20A), A/Wyoming/3/03 H3N2 (фиг. 20B), A/California/04/09 H1N1 pdm (фиг. 20C), A/Vietnam/1203/04 H5N1 HALo (фиг. 20D) или B/Lee/40 Victoria (фиг. 20E) в эпителиальных клетках человека.

На фиг. 21A-21E представлена серия графиков, показывающих способность конъюгата 6 ингибировать рост патогенных штаммов вируса гриппа A/WSN/33 H1N1 (фиг. 21A), A/Wyoming/3/03 H3N2 (фиг. 21B), A/California/04/09 H1N1 pdm (фиг. 21C), A/Vietnam/1203/04 H5N1 HALo (фиг. 21D) или B/Lee/40 Victoria (фиг. 21E) в эпителиальных клетках человека.

На фиг. 22A-22E представлена серия графиков, показывающих способность конъюгата 6 ингибировать рост патогенных штаммов вируса гриппа A/WSN/33 H1N1 (фиг. 22A), A/Wyoming/3/03 H3N2 (фиг. 22B), A/California/04/09 H1N1 pdm (фиг. 22C), B/Lee/40 Victoria (фиг. 22D) или A/Vietnam/1203/04 (фиг. 22E) в эпителиальных клетках человека по сравнению с осельтамивиром.

На фиг. 23 представлен график, показывающий относительную концентрацию конъюгата 6 в сыворотке крови мышей по сравнению с одним только Fc (hIgG1).

На фиг. 24 представлен график, показывающий влияние конъюгата 6 на вес мыши на мышиной модели летального гриппа. Исследование проводили, как описано в примере 29.

На фиг. 25 представлен график, показывающий влияние конъюгата 6 на выживаемость на мышиной модели летального гриппа. Исследование проводили, как описано в примере 29.

На фиг. 26 представлен график, показывающий влияние конъюгата 6 на вес мыши на мышиной модели летального гриппа. Исследование проводили, как описано в примере 30.

На фиг. 27 представлен график, показывающий влияние конъюгата 6 на выживаемость на мышиной

модели летального гриппа. Исследование проводили, как описано в примере 30.

На фиг. 28 представлено изображение, демонстрирующее способ конъюгирования мономера или димера ингибитора нейраминидазы, например, посредством линкера, с мономером Fc-домена, Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумина или связывающим белок альбумин пептидом путем конъюгации оксима с аминокислотным остатком, например с атомом азота доступного на поверхности лизина.

На фиг. 29 представлено изображение, демонстрирующее способ конъюгирования мономера или димера ингибитора нейраминидазы, например, посредством линкера, с мономером Fc-домена, Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумина или связывающим белок альбумин пептидом путем конъюгации тиоэфира с аминокислотным остатком, например, с атомом азота доступного на поверхности лизина.

На фиг. 30 представлено изображение, демонстрирующее способ конъюгирования мономера или димера ингибитора нейраминидазы, например, посредством линкера, с мономером Fc-домена, Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумина или связывающим белок альбумин пептидом путем повторной мостиковой конъюгации цистеина, например, повторной мостиковой конъюгации цистеина с парой атомов серы двух шарнирных цистеинов в мономере Fc-домена или Fc-домене.

На фиг. 31A-31F представлена серия графиков, показывающих выживаемость мышей, получавших конъюгат 6, на мышиной модели летального гриппа. Мышей обрабатывали либо контрольным осельтамивиром (Тамифлю™), 20 мг/кг, 2 раза в день, начиная через 8 часов после инфицирования (фиг. 31A); конъюгатом 6, 50 мг/кг, 1 доза за 28 дней до инфицирования (фиг. 31B); конъюгатом 6, 10 мг/кг, 1 доза за 28 дней до инфицирования (фиг. 31C); конъюгатом 6, 5 мг/кг, 1 доза за 28 дней до инфицирования (фиг. 31D); конъюгатом 6, 2,5 мг/кг, 1 доза за 28 дней до инфицирования (фиг. 31E); или конъюгатом 6, 1,25 мг/кг, 1 доза за 28 дней до инфицирования (фиг. 31F). Это исследование проводили, как описано в примере 33.

На фиг. 32A-32F представлена серия графиков, показывающих, что конъюгат 6 расширяет терапевтическое окно по сравнению с осельтамивиром (Тамифлю™), что определяется выживаемостью на мышиной модели летального гриппа. Мышам вводили либо носитель (ФСБ), только Fc 10 мг/кг, либо конъюгат 6, за 4 часа до заражения (фиг. 32A); Конъюгат 6 или осельтамивир (Тамифлю™) через 8 часов после инфицирования (фиг. 32B); Конъюгат 6 или осельтамивир (Тамифлю™) через 24 часа после инфицирования (фиг. 32C); Конъюгат 6 или осельтамивир (Тамифлю™) через 48 часов после инфицирования (фиг. 32D); Конъюгат 6 или осельтамивир (Тамифлю™) через 72 часа после инфицирования (фиг. 32E); Конъюгат 6 или осельтамивир (Тамифлю™) через 96 часов после инфицирования (фиг. 32F). Исследование проводили, как описано в примере 34.

На фиг. 33 представлен график, показывающий, что после введения конъюгата 6 в 14-дневном исследовании токсичности с определением диапазона доз для крыс не наблюдалось значимого эффекта увеличения массы тела. Исследование проводили, как описано в примере 35.

На фиг. 34A-34D представлена серия графиков, показывающих, что конъюгат 6 расширяет терапевтическое окно по сравнению с осельтамивиром (Тамифлю™), что определяется выживаемостью на мышиной модели летального гриппа. Мышей обрабатывали либо контрольным осельтамивиром (Тамифлю™), 20 мг/кг, 2 раза в день, начиная через 8 часов после инфицирования (фиг. 34A); конъюгатом 6, 10 мг/кг, 1 доза за 4 часа до инфицирования (фиг. 34B); конъюгатом 6, 2 мг/кг, 1 доза за 4 часа до инфицирования (фиг. 34C); или конъюгатом 6, 0,4 мг/кг, 1 доза за 4 дня до инфицирования (фиг. 34D). Исследование проводили, как описано в примере 37.

На фиг. 35 представлен график, показывающий влияние конъюгата 6 на вес мыши на мышиной модели летального гриппа. Исследование проводили, как описано в примере 37.

На фиг. 36 представлен график, показывающий 7-дневное исследование фармакокинетики на крысах после внутривенного введения конъюгата 6. Исследование проводили, как описано в примере 38.

На фиг. 37 представлен график, показывающий 14-дневное исследование фармакокинетики на крысах после внутривенного введения конъюгата 6. Исследование проводили, как описано в примере 39.

На фиг. 38 представлен график, показывающий 28-дневное исследование фармакокинетики на крысах, сравнивающее внутривенное и подкожное введение конъюгата 6. Исследование проводили, как описано в примере 40.

На фиг. 39 представлен график, показывающий 28-дневное исследование фармакокинетики на отличных от человека приматах после внутривенного введения конъюгата 6. Исследование проводили, как описано в примере 41.

На фиг. 40 представлен график, показывающий исследование фармакокинетики распределения в легких мышей после внутривенного введения конъюгата 6. Исследование проводили, как описано в примере 42.

На фиг. 41 представляет собой график, показывающий 5-дневное исследование фармакокинетики на мышах, сравнивающее внутривенное, подкожное и внутримышечное введение конъюгата 6. Исследование проводили, как описано в примере 43.

На фиг. 42 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 8.

На фиг. 43 показана структура конъюгата 6.

На фиг. 44 представлен график, показывающий 24-часовое исследование стабильности в плазме мышей *in vitro,* сравнивающее конъюгат 6, инкубированный при 37°C в течение 24 часов с контрольным и чистым соединением.

На фиг. 45 представлен график, показывающий 24-часовое исследование стабильности в плазме человека *in vitro,* сравнивающее конъюгат 6, инкубированный при 37°C в течение 24 часов с контрольным и чистым соединением.

На фиг. 46 представлен график, показывающий 24-часовое исследование микросомальной стабильности печени мыши, сравнивающее конъюгат 6, инкубированный при 37 °C в течение 24 часов в микросомальных клетках печени мыши и микросомальных клетках печени мыши, убитых нагреванием, в качестве контроля.

На фиг. 47 представлен график, показывающий 24-часовое исследование микросомальной стабильности печени человека, сравнивающее конъюгат 6, инкубированный при 37 °C в течение 24 часов в микросомальных клетках печени человека и микросомальных клетках печени мыши, убитых нагреванием, в качестве контроля.

На фиг. 48 представлен график, показывающий % изменения массы тела мышей в течение 15 дней после заражения вирусом. Исследование проводили, как описано в примере 66.

На фиг. 49 представлен график, показывающий % выживаемости у мышей в течение 15 дней после заражения вирусом. Исследование проводили, как описано в примере 66.

На фиг. 50 представлен график, показывающий связывание конъюгата 6 и конъюгата 12 по сравнению с Fc hIgG1 (ДТ) и Fc hIgG1 (N297A) с Fcγ-рецептором IIIA. Исследование проводили, как описано в примере 67.

На фиг. 51 представлен график, показывающий связывание конъюгата 6 и конъюгата с Fcγ-

рецептором IIIA. Исследование проводили, как описано в примере 67.

На фиг. 52 представлен график, показывающий 7-дневное исследование токсикинетики на отличных от человека приматах после внутривенного введения конъюгата 6. Исследование проводили, как описано в примере 68.

На фиг. 53 представлен график, показывающий 28-дневное исследование фармакокинетики на отличных от человека приматах, сравнивающее внутривенное и подкожное введение конъюгата 6. Исследование проводили, как описано в примере 68.

На фиг. 54 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 12.

На фиг. 55 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 13, имеющего разные значения отношения лекарственного средства к антителу (DAR) (конъюгат 13a, конъюгат 13b, конъюгат 13c, конъюгат 13d, конъюгат 13e, конъюгат 13f и конъюгат 13g).

На фиг. 56 представлен график, показывающий % выживаемости у мышей с ослабленным иммунитетом в течение 35 дней после заражения вирусом. Группа обработки конъюгатом 6 в дозе 0,3 мг/кг сохранила 100% выживаемость, но для ясности на графике немного смещена. Исследование проводили, как описано в примере 95

На фиг. 57 представлен график, показывающий % изменения массы тела у мышей с ослабленным иммунитетом в течение 35 дней после заражения вирусом. Исследование проводили, как описано в примере 95.

На фиг. 58 представлен график, показывающий, что введение конъюгата 6 приводит к дозозависимому клиренсу вируса в легких мышиной модели, инфицированной гриппом A (H1N1), и что данный клиренс вируса является большим, чем при контроле ФСБ, контроле только Fc или контроле осельтамивиром. Это исследование проводили, как описано в примере 96.

На фиг. 59 представлен собой график, показывающий, что введение конъюгата 6 приводит к дозозависимому снижению воспалительных цитокинов в легких на мышиной модели, инфицированной гриппом A (H1N1). Это исследование проводили, как описано в примере 97.

На фиг. 60 представлен график, показывающий фармакокинетику конъюгата 6 у мышей линии BALB/c SCID (с ослабленным иммунитетом) и мышей CD-1 (иммунокомпетентных). Это исследование проводили, как описано в примере 98.

На фиг. 61 представлено изображение, демонстрирующее конъюгат 33.

На фиг. 62A-62B представлены графики, показывающие изменение массы тела (%) у мышей линии BALB/c, интраназально зараженных 3-кратной LD_{95} адаптированного для мышей гриппа A.PR/8/1934 (H1N1). Это исследование проводили, как описано в примере 133.

На фиг. 63A представлен график, показывающий вирусную нагрузку на день 4 после инфицирования. Это исследование проводили, как описано в примере 133.

На фиг. 63B представлен график, показывающий снижение логарифма вирусной нагрузки на день 4 после инфицирования. Это исследование проводили, как описано в примере 133.

На фиг. 64A представлен график, показывающий, что введение конъюгата 33 приводит к дозозависимому снижению вирусной нагрузки в мышиной модели, инфицированной гриппом A (H1N1), по сравнению с контролем ФСБ или контролем только Fc. Это исследование проводили, как описано в примере 133.

На фиг. 64B представлен график, показывающий снижение логарифма вирусной нагрузки на день 4 после инфицирования. Это исследование проводили, как описано в примере 133.

На фиг. 65A-65E представлена серия гистограмм, показывающих, что введение конъюгата 33 приводит к дозозависимому кратному снижению уровней цитокинов для TNF-α (фиг. 65A), IL-6 (фиг. 65B), INF-γ (фиг. 65C), MCP-1 (фиг. 65D) и MIP-1α (фиг. 65E). Это исследование проводили, как описано в примере 133.

На фиг. 66 представлен хроматограф, показывающий стабильность ПС 80 по сравнению с ПС 4 на день 7 инкубации при 37 °C и 60 °C. Это исследование проводили, как описано в примере 142.

На фиг. 67 представлен график, показывающий серийный пассаж A/CA/09 pdm в присутствии конъюгата 6, осельтамивира, балоксавира или контроля ФСБ в клетках A549 для оценки возможности развития устойчивых к лекарственным средствам мутантных вирусных штаммов под давлением отбора с вирусными ингибиторами. Это исследование проводили, как описано в примере 147.

На фиг. 68 представлен график, показывающий серийный пассаж A/WSN/1933 присутствии конъюгата 6, конъюгата 33, осельтамивира, балоксавира или контроля ФСБ в клетках MDCK для оценки возможности развития устойчивых к лекарственным средствам мутантных вирусных штаммов под давлением отбора с вирусными ингибиторами. Это исследование проводили, как описано в примере 147.

На фиг. 69 представлен график, показывающий зависимое от MOI увеличение ADCC при помощи конъюгата 6 против гриппа A H1N1. Это исследование проводили, как описано в примере 152.

На фиг. 70 представлен график, показывающий дозозависимое увеличение ADCC конъюгатом 6 против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) при MOI, равной 1. Это исследование проводили, как описано в примере 152.

На фиг. 71A-71C представлены графики, показывающие зависимое от MOI увеличение в отношении конъюгата 33 против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1, Фиг. 71A), гриппа A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (Фиг. 71B) и гриппа A/HK/1/1968 (H3N2, Фиг. 71C). Это исследование проводили, как описано в примере 152.

На фиг. 72 представлен график, показывающий зависимое от MOI увеличение ADCC при помощи конъюгата 33 против гриппа B/Malaysia/2506/2004 (Victoria). Это исследование проводили, как описано в примере 152.

На фиг. 73A-73B представлены графики, показывающие дозозависимое увеличение ADCC при помощи конъюгата 33 против гриппа A/PR/8/1934 при MOI, равной 1 (Фиг. 73A) и MOI, равной 10 (Фиг. 73B). Это исследование проводили, как описано в примере 152.

На фиг. 74 представлен график, показывающий зависимое от MOI увеличение ADCC под действием контрольного полноразмерного моноклонального антитела гедивумаба (Genentech) против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1). Это исследование проводили, как описано в примере 152.

На фиг. 75A-75B представлены графики, показывающие дозозависимое увеличение ADCC под действием контрольного полноразмерного моноклонального антитела гедивумаба (Genentech) против гриппа A/PR/8/1934 при MOI, равной 1 (Фиг. 75A) и MOI, равной 10 (Фиг. 75B). Это исследование проводили, как описано в примере 152.

На фиг. 76 представлен график, показывающий зависимое от MOI увеличение ADCP конъюгатом 6 против гриппа A H1N1. Это исследование проводили, как описано в примере 153.

На фиг. 77A-77B представлены графики, показывающие дозозависимое увеличение ADCP при помощи конъюгата 6 против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) при MOI, равной 1 (Фиг. 77A) и MOI, равной 10 (Фиг. 77B). Это исследование проводили, как описано в примере 153.

На фиг. 78A-78C представлены графики, показывающие зависимое от MOI увеличение в отношении конъюгата 33 против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1, Фиг. 78A), гриппа A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (Фиг. 78B) и

гриппа A/HK/1/1968 (H3N2, Фиг. 78C). Это исследование проводили, как описано в примере 153.

На фиг. 79 представлен график, показывающий зависимое от MOI увеличение ADCP конъюгатом 33 против гриппа B/Malaysia/2506/2004 (Victoria). Это исследование проводили, как описано в примере 153.

На фиг. 80A-80B представлены графики, показывающие дозозависимое увеличение ADCP при помощи конъюгата 33 против гриппа A/PR/8/1934 при MOI, равной 1 (Фиг. 80A) и MOI, равной 10 (Фиг. 80B). Это исследование проводили, как описано в примере 153.

На фиг. 81 представлен график, показывающий зависимое от MOI увеличение ADCP под действием контрольного полноразмерного моноклонального антитела гедивумаба (Genentech) против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1). Это исследование проводили, как описано в примере 153.

На фиг. 82A-82B представлены графики, показывающие дозозависимое увеличение ADCP под действием контрольного полноразмерного моноклонального антитела гедивумаба (Genentech) против гриппа A/PR/8/1934 при MOI, равной 1 (Фиг. 82A) и MOI, равной 10 (Фиг. 82B). Это исследование проводили, как описано в примере 153.

На фиг. 83 представлен график, показывающий серийный пассаж A/Ca/07/2009 (H1N1)pdm в присутствии конъюгата 45b, осельтамивира, балоксавира или контроля ФСБ в клетках MDCK для оценки возможности развития устойчивых к лекарственным средствам мутантных вирусных штаммов под давлением отбора с вирусными ингибиторами. Это исследование проводили, как описано в примере 165.

На фиг. 84 представлен график, показывающий уровни конъюгата 45b в плазме в исследовании фармакокинетики мышей, сравнивающем внутривенное, подкожное и внутримышечное введение. Уровни концентрации в плазме определяли по захвату NA. Это исследование проводили, как описано в примере 173.

На фиг. 85 представлен график, показывающий уровни конъюгата 45b в плазме в исследовании фармакокинетики мышей, сравнивающем внутривенное, подкожное и внутримышечное введение. Уровни концентрации в плазме определяли по захвату Fc hIgG. Это исследование проводили, как описано в примере 173.

На фиг. 86 представлен график, показывающий линейность дозы в уровнях конъюгата 45b в плазме по захвату NA. Это исследование проводили, как описано в примере 174.

На фиг. 87 представлен график, показывающий линейность дозы в уровнях конъюгата 45b в плазме по захвату hIgG. Это исследование проводили, как описано в примере 174.

На фиг. 88 представлен график, показывающий концентрацию конъюгата 45b в плазме при подкожном введении 50 мг/кг и 5 мг/кг в исследовании фармакокинетики на крысах. Концентрации в плазме определяли с помощью ИФА с использованием планшета, покрытого нейраминидазой. Это исследование проводили, как описано в примере 175.

На фиг. 89 представлен график, показывающий концентрации конъюгата 45b в плазме при сравнении внутривенного и подкожного введения конъюгата 45b в дозе 5 мг/кг. Концентрации в плазме определяли с помощью ИФА с использованием планшета, покрытого нейраминидазой. Это исследование проводили, как описано в примере 175.

На фиг. 90 представлен график, показывающий концентрации конъюгата 45b в плазме у отличных от человека приматов, яванских макаков. Концентрации в плазме определяли с помощью ИФА с использованием планшета, покрытого нейраминидазой. Это исследование проводили, как описано в примере 176.

На фиг. 91 представлен график, показывающий концентрации конъюгата 45b в плазме у отличных от человека приматов, яванских макаков. Концентрации в плазме определяли по захвату Fc hIgG. Это

исследование проводили, как описано в примере 176.

На фиг. 92 представлен график, показывающий концентрации конъюгата 45b в плазме с 1 по 14 день у отличных от человека приматов, яванских макак. Концентрации в плазме определяли по захвату нейраминидазой (NA) и захвату Fc. Это исследование проводили, как описано в примере 176.

На фиг. 93 представлен график, показывающий уровни в плазме конъюгата 45b (3 мг/кг в/в) в исследованиях фармакокинетики на хорьках, определяемые по захвату нейраминидазой (NA) и захвату Fc. Это исследование проводили, как описано в примере 183.

На фиг. 94 представлен график, показывающий уровни конъюгата 45b в назальных смывах в исследованиях фармакокинетики на хорьках, определенных по захвату нейраминидазой (NA) H1N1. Это исследование проводили, как описано в примере 186.

На фиг. 95 представлен график, показывающий уровни конъюгата 45b в назальных смывах в исследованиях фармакокинетики хорьков, определяемых по захвату Fc hIgG. Это исследование проводили, как описано в примере 186.

На фиг. 96 представлен график, показывающий сравнение клинических наблюдений после введения конъюгата 45b (0,3 мг/кг, однократно) по сравнению с осельтамивиром (10 мг/кг, два раза в день x5) или носителем. Это исследование проводили, как описано в примере 182.

На фиг. 97 представлен график, показывающий уровни в плазме конъюгата 45b (2 мг/кг в/в) по сравнению с конъюгатом 46 (2 мг/кг в/в) в исследованиях фармакокинетики отличных от человека приматов, определяемых по захвату Fc. Это исследование проводили, как описано в примере 189.

На фиг. 98 представлен график, показывающий уровни концентрации конъюгата 45b в плазме по сравнению с уровнями конъюгата 45b в жидкости эпителиальной выстилки (ELF) у мышей. Это исследование проводили, как описано в примере 191.

На фиг. 99 представлен график, показывающий уровни конъюгата 45b в плазме в исследованиях фармакокинетики мышей SCID, определяемых по захвату Fc H1N1. Это исследование проводили, как описано в примере 192.

На фиг. 100 представлен график, показывающий уровни конъюгата 45b в плазме в исследованиях фармакокинетики мышей SCID, определяемых по захвату нейраминидазой (NA). Это исследование проводили, как описано в примере 192.

На фиг. 101 представлен график, показывающий уровни конъюгата 45b в плазме по сравнению с конъюгатом 46 в

исследованиях фармакокинетики мышей, определенных по захвату нейраминидазой (NA). Это исследование проводили, как описано в примере 193.

На фиг. 102 представлено изображение, на котором показан конъюгат 45 и конъюгат 46.

На фиг. 103 представлено изображение, иллюстрирующее иллюстративную клик-химию конъюгации азидофункционализированного мономера домена Fc или домена Fc с промежуточным соединением перед конъюгацией (ПС).

На фиг. 104 представлено изображение, иллюстрирующее экспериментальную процедуру для модели вторичной бактериальной инфекции с метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA), как описано в Примере 200.

На фиг. 105A-105B представлены графики, показывающие процент выживаемости (Фиг. 105A) и КОЕ/г легкого (Фиг. 105B) мышиной модели вторичной инфекции после лечения конъюгатом 45b. Это исследование проводили, как описано в примере 200.

На фиг. 106 представлено изображение, иллюстрирующее экспериментальную процедуру для модели вторичной бактериальной инфекции со *Staphylococcus aureus*, как описано в Примере 200.

На фиг. 107 представлен график, показывающий процент выживаемости мышей в модели вторичного инфицирования *S. pneumoniae* после лечения конъюгатом 45b. Это исследование проводили, как описано в примере 200.

На фиг. 108A-108B представлены графики, показывающие выживаемость мышей (Фиг. 108A) и среднюю массу тела (Фиг. 108B) после однократного применения конъюгата 45a за 7 дней до заражения вирусом гриппа A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). После заражения и лечения конъюгатом 45a 100% защита наблюдалась для дозы 10 мг/кг, 80% защита для доз 0,3 и 3,0 мг/кг и 70% защита для дозы 1 мг/кг (Фиг. 108A). 30% выживаемость в группе плацебо является необычной, поэтому доза 1 мг/кг не обеспечила значительной защиты. Кроме того, все дозы обеспечивали значительную защиту от потери массы (Фиг. 108B). (**P*<0,05, ***P*<0,01, *****P*<0,0001). Это исследование проводили, как описано в примере 201.

На фиг. 109A-109B представлены графики, показывающие выживаемость мышей (Фиг. 109A) и среднюю массу тела (Фиг. 109B) после однократного применения конъюгатом 45a через 4 часа после заражения вирусом гриппа A/Vietnam/1203/2004 (H5N1). После контрольного инфицирования и лечения конъюгатом 45a 100% защита наблюдалась для доз 1, 3 и 10 мг/кг и 70% защита для дозы 0,3 мг/кг (Фиг. 109A). 30% выживаемость в группе плацебо является необычной, поэтому доза 0,3 мг/кг не обеспечила значительной защиты. Кроме того, все дозы обеспечивали значительную защиту от потери массы (Фиг. 109B). (**P*<0,05, ***P*<0,01, *****P*<0,0001). Это исследование проводили, как описано в примере 201.

На фиг. 110A представлено изображение, иллюстрирующее представление кристаллической структуры тетрамерного занамивира (показанного в виде шарика и палочки) в комплексе с нейраминидазой H1N1 (NA) A/California/04/2009 (код PDB 3TI5). Показаны линейные расстояния между соседними активными центрами NA внутри тетрамера. Положение C7 на занамивире, которое было выбрано для присоединения к носителю Fc (через сложный эфир NHS), выделено. C7 на занамивире подвергается воздействию растворителя и не имеет стерических ограничений, что позволяет конъюгировать с C7 с минимальным влиянием на аффинность связывания. Это исследование проводили, как описано в примере 203.

На фиг. 110B представлено изображение полупрозрачной молекулярной поверхности, представляющей структуру полноразмерного hIgG1 (код PDB 1HZH), отредактированное, чтобы показать только границы конструкции Fc, используемые в конъюгате 45b. Положения лизинов, которые были предпочтительно конъюгированы в конъюгате 45b, показаны зеленым цветом. Конъюгат 45b представляет собой мультивалентный конъюгат димеров занамивира (ПС-83, структура показана справа), который стабильно конъюгирован с лизином на N-концевом удлиненном Fc hIgG1 со средним соотношением лекарственное средство-антитело (DAR) 4,5:1. Пространственное расположение конъюгированного лизина на поверхности домена Fc, а также длина и гибкость линкеров ПЭГ приводят к образованию констелляций димеров ПС.83 на конъюгате 45b, где существует достаточное расстояние (>90 A) между димерами занамивира, чтобы обеспечить одновременное взаимодействие нескольких активных сайты внутри тетрамера NA, между соседними тетрамерами NA на одной и той же вирусной частице или между тетрамерами NA на разных вирусных частицах одной конъюгированной молекулой 45b. Это исследование проводили, как описано в примере 203.

На фиг. 111A-111J представлены графики, показывающие связывание конъюгата 45b с рецепторами Fcγ и индуцировать ADCC. На фиг. 111A-111D показано, что конъюгат 45b связывается с Fcγ RI человека

(Фиг. 111A), RIIa (Фиг. 111B), RIIb (Фиг. 111C), и RIIIa (Фиг. 111D), как определено с помощью ИФА. На фиг. 111E-111H показывают, что конъюгат 45b связывается с мышиным Fcγ RI (Фиг. 111E), RIII (Фиг. 111F), RIIb (Фиг. 111G), и RIV (Фиг. 111H), как определено с помощью ИФА. На фиг. 111I-111J показано, что конъюгат 45b индуцирует антителозависимую клеточную токсичность в зависимости от дозы (Фиг. 111I) и MOI (Фиг. 111J) при использовании репортерных клеток. Это исследование проводили, как описано в примере 203.

На фиг. 112A-112M представлены графики, показывающие эффективность конъюгата 45b против летального заражения гриппом у мышей Balb/C. На фиг. 112A представлен собой график, показывающий зависимость доза-ответ конъюгата 45b в диапазоне от 0,01 до 1 мг/кг подкожно через 2 часа после инфицирования против летального заражения гриппом A/PR/8/1934 (H1N1) при выживании. На фиг. 112B-112H представлены графики, показывающие эффективность минимальной защитной дозы конъюгата 45b, вводимого подкожно, против гриппа A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (Фиг. 112B), A/WSN/1933 (H1N1) (Фиг. 112C), A/CA/12/2012 (H1N1)pdm09 (Фиг. 112D), A/Texas/23/2012 (H1N1)pdm09 H275Y (Фиг. 112E), A/ Hong Kong/1/1968 (H3N2) (Фиг. 112F), B/Florida/4/2006 (Yamagata) (Фиг. 112G), и B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) (Фиг. 112H). На фиг. 112I представлен график, показывающий эффективность конъюгата 45 против штамма BSL-3 A/Vietnam/1203/2005 (H5N1). На фиг. 112J представлена гистограмма, показывающая вирусную нагрузку в легких на 4-й день после заражения. На фиг. 112K-112L представлены графики, изображающие уровни легочных цитокинов ИЛ-6 (Фиг. 112K) и MCP-1 (Фиг. 112L). На фиг. 112M представлен график, показывающий минимальную защитную дозу конъюгата 45b, вводимого подкожно, против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1). Это исследование проводили, как описано в примере 203.

На фиг. 113A-113J представлены графики, показывающие эффективность конъюгата 45b против летального заражения гриппом у мышей Balb/C в виде процентного изменения массы тела. На фиг. 113A представлен собой график, показывающий зависимость доза-ответ для конъюгата 45b в диапазоне от 0,01 до 1 мг/кг подкожно через 2 часа после инфицирования против летального заражения гриппом A/PR/8/1934 (H1N1). На фиг. 113B-113H представлен график, показывающий зависимость доза-ответ для конъюгата 45b при подкожном введении против летального заражения гриппом A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (Фиг. 113B), A/WSN/1933 (H1N1) (Фиг. 113C), A/CA/12/2012 (H1N1)pdm09 (Фиг. 113D), A/Texas/23/2012 (H1N1)pdm09 H275Y (Фиг. 113E), A/ Hong Kong/1/1968 (H3N2) (Фиг. 113F), B/Florida/4/2006 (Yamagata) (Фиг. 113G), и B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) (Фиг. 113H). На фиг. 113I представлен график, показывающий эффективность конъюгата 45b против штамма BSL-3 A/Vietnam/1203/2005 (H5N1). На фиг. 113J представлен график, показывающий изменение массы тела при подкожном введении минимальной защитной дозы конъюгата 45b против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1). Это исследование проводили, как описано в примере 203.

На фиг. 114A-114B представлена пара графиков, показывающих эффективность осельтамивира в эквивалентной дозе для человека, 5 мг/кг (дважды в день x 5 дней) или в 10-кратной эквивалентной дозе для человека, равной 50 мг/кг (два раза в день x 5 дней), в летальной мышиной модели A/PR/8/1934 (H1N1) в выживаемости (Фиг. 114A) и изменении массы тела (Фиг. 114B).

На фиг. 115A-115C представлены гистограммы, показывающие уровни легочных цитокинов для NF-α (Фиг. 115A), KC (Фиг. 115B), MIP-1α (Фиг. 115C) на 4-й день после летального заражения A/PR/8/1934 (H1N1).

На фиг. 116A-116B представлены графики, изображающие эффективность конъюгата 45b после однократного введения подкожной, внутримышечной или внутривенной дозы против гриппа A/CA/07/2009 (H1N1)pdm в процентах выживаемости (Фиг. 111A) и процентах изменения массы тела (Фиг. 116B).

На фиг. 116C-116D представлены графики, изображающие уровень конъюгата 45b в плазме после однократного введения подкожной, внутримышечной или внутривенной дозы мышам в течение 168 ч, определяемый по захвату NA (Фиг. 116C) или захвату Fc (Фиг. 116D).

На фиг. 117A-117C представлены графики, демонстрирующие сравнимый характер связывания FcRn в качестве Fc hIgG1 или изотипического контроля полноразмерного IgG1 у человека (Фиг. 117A), яванского макака (Фиг. 117B), и мыши (Фиг. 117C) с более сильным связыванием при pH 5,8 и пониженным связыванием при pH 7,4.

На фиг. 118A-118F представлены графики, изображающие большую продолжительность действия конъюгата 45b. На фиг. 118A представлены график, показывающий зависимость уровней конъюгата 45b в плазме от дозы от 1 до 100 мг/кг после подкожного введения мышам. На фиг. 118B представлен график, изображающий уровни конъюгата 45b после подкожного введения в плазме, ELF и легких мышей. На фиг. 118C-F показана защита, обеспечиваемая конъюгатом 45b, введенным за 28 дней до летального заражения против гриппа A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (Фиг. 118C), A/HK/1/1968 (H3N2) (Фиг. 118D), B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) (Фиг. 118E), и B/Florida/4/2006 (Yamagata) (Фиг. 118F) в процентах выживаемости.

На фиг. 119 представлен график, изображающий кривую выживаемости в группах с меньшей дозой конъюгата 45a. Это исследование проводили, как описано в примере 209.

На фиг. 120 представляет собой график, изображающий кривую выживаемости Каплана-Мейера для контролей и конъюгата 45a при 0,3 и 0,03 мг/кг. Это исследование проводили, как описано в примере 210.

На фиг. 121 представлен график, изображающий кривую выживаемости Каплана-Мейера для контролей и конъюгата 45a (колонка с белком A, очищенная) и *конъюгата 45a (прошедший через колонку белка A) при 0,1 мг/кг. Это исследование проводили, как описано в примере 215.

На фиг. 122 представлен график, изображающий кривую выживаемости Каплана-Мейера для контролей и конъюгатов 45a и 46 при 0,1 мг/кг. Это исследование проводили, как описано в примере 216.

Подробное описание сущности изобретения

В раскрытии представлены конъюгаты, композиции и способы лечения вирусных инфекций (например, вирусных инфекций гриппа). Раскрытые в данном документе конъюгаты включают мономеры или димеры вирусных ингибиторов нейраминидазы (например, занамивир, перамивир или их аналоги), конъюгированные с Fc-мономерами, Fc-доменами, Fc-связывающими пептидами, белками альбуминами или связывающими белок альбумин пептидами. Ингибитор нейраминидазы (например, занамивир, перамивир или их аналоги) в конъюгатах нацеливается на нейраминидазу на поверхности вирусной частицы. Fc-мономеры или Fc-домены в конъюгатах связываются с FcγR (например, FcRn, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb) на иммунных клетках, например, нейтрофилах, для активации фагоцитоза и эффекторных функций, таких как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), что приводит к поглощению и разрушению вирусных частиц иммунными клетками и дальнейшему усилению противовирусной активности конъюгатов. Альбумин или связывающий альбумин пептид может увеличивать период полувыведения конъюгата, например, за счет связывания альбумина с рециркулирующим неонатальным Fc-рецептором. Такие композиции применимы в способах ингибирования роста вирусов и в способах лечения вирусных инфекций, таких как инфекции, вызываемые вирусом гриппа A, вирусом гриппа B и вирусом гриппа C.

I. Вирусные инфекции

Описанные в данном документе соединения и фармацевтические композиции (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) можно использовать для лечения вирусной инфекции (например, вирусной инфекции гриппа, такой как грипп A, B, C или парагрипп).

Вирусная инфекция относится к патогенному росту вируса (например, вируса гриппа) в организме-хозяине (например, у человека). Вирусной инфекцией может быть любая ситуация, в которой присутствие вирусной популяции(-ий) наносит вред организму-хозяину. Таким образом, субъект страдает от вирусной инфекции, когда чрезмерное количество вирусной популяции присутствует в теле субъекта или на нем, или когда присутствие вирусной популяции(-ий) повреждает клетки или другую ткань субъекта.

Грипп представляет собой инфекционное заболевание, вызываемое вирусом гриппа. Симптомы могут быть от легких до тяжелых. К наиболее частым симптомам относятся: высокая температура тела, насморк, боль в горле, боль в мышцах, головная боль, кашель и чувство усталости. Эти симптомы, как правило, возникают через два дня после контакта с вирусом и длятся менее недели. Однако кашель может длиться более двух недель. У детей могут возникать тошнота и рвота, но у взрослых они встречаются реже. Осложнения гриппа могут включать вирусную пневмонию, вторичную бактериальную пневмонию, инфекции носовых пазух и ухудшение состояния по поводу уже имеющихся проблем со здоровьем, таких как астма или сердечная недостаточность. Тяжелые осложнения могут возникнуть у субъектов с ослабленной иммунной системой, таких как молодые, пожилые люди с заболеваниями, ослабляющими иммунную систему, и те, кто проходит терапевтическое лечение, приводящее к ослаблению иммунной системы.

Субъекты, инфицированные гриппом, также подвержены повышенному риску развития вторичных инфекций (например, вторичных бактериальных, вирусных или грибковых инфекций), в частности бактериальных инфекций, таких как метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, и/или *Haemophilus influenzae*. Бактериальные вторичные инфекции еще больше увеличивают заболеваемость и смертность от инфекции гриппа.

Три типа вирусов гриппа поражают людей: тип A, тип B и тип C. Обычно вирус распространяется по воздуху при кашле или чихании. Считается, что это происходит в основном на относительно небольших расстояниях. Он также может передаваться при прикосновении к поверхностям, зараженным вирусом, а затем при прикосновении ко рту или глазам. Человек может заразить других как до, так и во время появления симптомов. Инфекция может быть подтверждена, проверкой наличия вируса в горле, мокроте или носу. Доступен ряд экспресс-тестов; тем не менее, у людей все же может быть инфекция, несмотря на отрицательные результаты. Тип полимеразной цепной реакции, которая обнаруживает РНК вируса, может использоваться для диагностики инфекции гриппа.

II. Конъюгаты по раскрытию

В данном документе предложены синтетические конъюгаты, применимые для лечения вирусных инфекций (например, инфекций гриппа). Описанные в данном документе конъюгаты включают Fc-домен или белок альбумин, конъюгированный с одним или более мономерами ингибиторов нейраминидазы или одним или более димерами двух ингибиторов нейраминидазы (например, ингибиторов нейраминидазы, выбранных из занамивира, сульфозанамивира, перамивира, A-315675 или их аналогов). Димеры двух ингибиторов нейраминидазы включают ингибитор нейраминидазы (например, первый ингибитор нейраминидазы формулы (A-I), (A-II), (A-III), (A-IV), (A-V), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), (A-XI), (A-XII) или (A-XIII)) и второй ингибитор нейраминидазы (например, второй ингибитор нейраминидазы формулы (A-I), (A-II), (A-III), (A-IV), (A-V), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), (A-XI), (A-XII) или (A-XIII)). Первый и

второй ингибиторы нейраминидазы связаны друг с другом посредством линкера.

Не ограничиваясь теорией, в некоторых аспектах описанные в данном документе конъюгаты связываются с поверхностью вирусной частицы (например, связываются с ферментом вирусной нейраминидазы на поверхности вирусной частицы гриппа) посредством взаимодействий между фрагментами ингибитора нейраминидазы в конъюгатах и белками на поверхности вирусной частицы. Ингибитор нейраминидазы разрушает нейраминидазу, гликопротеин оболочки, который отщепляет сиаловые кислоты, то есть концевые остатки нейраминовой кислоты, от гликановых структур на поверхности инфицированных клеток-хозяев, высвобождая потомственные вирусы и позволяя вирусу распространяться от клетки-хозяина к неинфицированным окружающим клеткам.

Конъюгаты по изобретению включают мономеры и димеры ингибитора нейраминидазы, конъюгированные с Fc-доменом, Fc-мономером или Fc-связывающим пептидом. Fc-домен в описанных в данном документе конъюгатах связывается с FcγR (например, FcRn, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb) на иммунных клетках. Связывание Fc-домена в описанных в данном документе конъюгатах с FcγR на иммунных клетках активирует фагоцитоз и эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), что приводит к поглощению и разрушению вирусных частиц иммунными клетками и дальнейшему усилению противовирусной активности конъюгатов.

Конъюгаты по изобретению включают мономеры и димеры ингибитора нейраминидазы, конъюгированные с белком альбумином или связывающим белок альбумин пептидом. Белок альбумин или связывающий белок альбумин пептид может увеличивать период полувыведения конъюгата, например, за счет связывания альбумина с рециркулирующим неонатальным Fc-рецептором.

Предложенные в данном документе конъюгаты описаны любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конъюгаты включают один или более мономеров ингибиторов нейраминидазы, конъюгированных с Fc-доменом или белком альбумином. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конъюгаты включают один или более димеров ингибиторов нейраминидазы, конъюгированных с Fc-доменом или белком альбумином. В некоторых вариантах осуществления, когда n равно 2, E (мономер Fc-домена) димеризуется с образованием Fc-домена.

Описанные в данном документе конъюгаты могут быть синтезированы с использованием доступных в данной области методов химического синтеза. В случаях, когда функциональная группа недоступна для конъюгации, молекула может быть дериватизирована с использованием обычных методов химического синтеза, которые хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конъюгаты содержат один или более хиральных центров. Конъюгаты включают каждую из выделенных стереоизомерных форм, а также смеси стереоизомеров с различной степенью хиральной чистоты, включая рацемические смеси. Они также включают различные диастереомеры, энантиомеры и таутомеры, которые могут быть образованы.

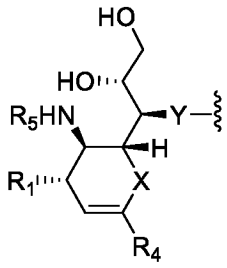
Ингибиторы нейраминидазы

Компонент описанных в данном документе конъюгатов представляет собой фрагмент ингибитора нейраминидазы вируса гриппа. Ингибитор нейраминидазы вируса гриппа разрушает нейраминидазу, гликопротеин оболочки, который отщепляет сиаловые кислоты, то есть концевые остатки нейраминовой кислоты, от гликановых структур на поверхности инфицированных клеток-хозяев, высвобождая потомственные вирусы и позволяя вирусу распространяться от клетки-хозяина к неинфицированным

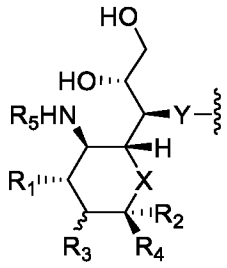
окружающим клеткам. Примеры ингибитора нейраминидазы вируса гриппа включают занамивир (Relenza), сульфозанамивир, A-315675 и перамивир. Кроме того, производные занамивира, сульфозанамивира, A-315675 и перамивира, такие как те, что описаны в литературе, обладают активностью ингибитора нейраминидазы и могут быть использованы в качестве ингибиторных фрагментов нейраминидазы соединений, описанных в данном документе (см., например, Hadházi et al. A sulfozanamivir analogue has potent anti-influenza virus activity. *ChemMedChem Comm.* 13:785-789 (2018) и In vitro characterization of A-315675, a highly potent inhibitor of A and B strain of influenze virus neuraminidases and influenza virus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(4):1014-1021 (2002)).

Описанные в данном документе конъюгаты делятся на два типа: (1) один или более димеров ингибиторов нейраминидазы, конъюгированных с Fc-доменом или белком альбумином, и (2) один или более мономеров ингибиторов нейраминидазы, конъюгированных с Fc-доменом или белком альбумином. Димеры ингибиторов нейраминидазы связаны друг с другом посредством линкера, такого как линкеры, описанные в данном документе.

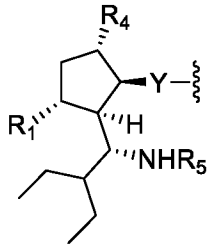
Ингибиторы вирусной нейраминидазы по изобретению включают занамивир, сульфозанамивир, A-315675, перамивир и их аналоги, такие как ингибиторы вирусной нейраминидазы формул (A-I)-(A-XIII):



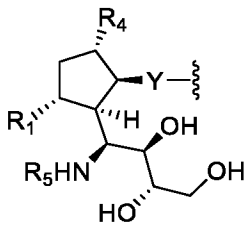
(A-I)



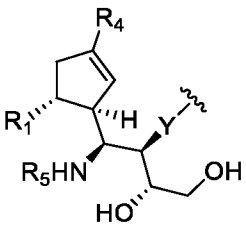
(A-II)



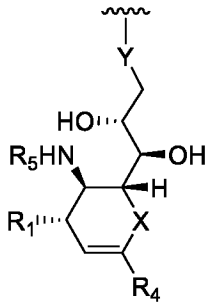
(A-III)



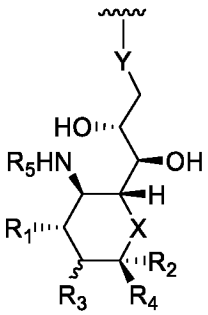
(A-IV)



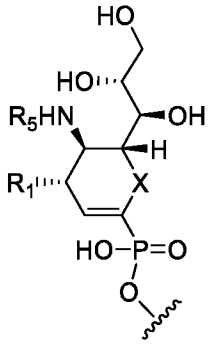
(A-V)



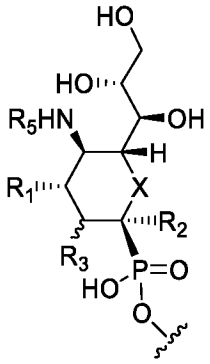
(A-VI)



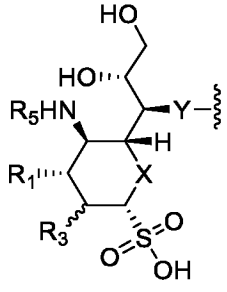
(A-VII)



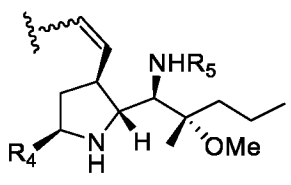
(A-VIII)



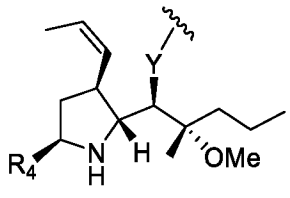
(A-IX)



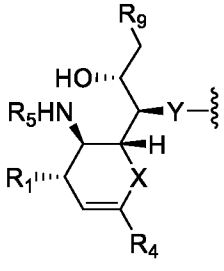
(A-X)



(A-XI)

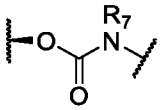


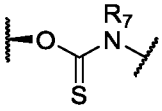
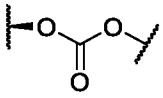
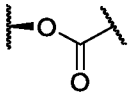
(A-XII)

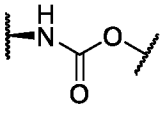
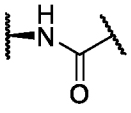
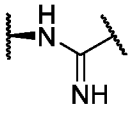


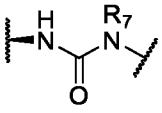
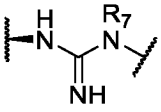
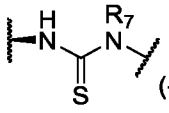
(A-XIII)

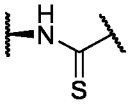
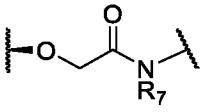
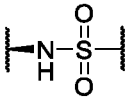
где R_1 выбран из -OH, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$ и $-NHC(=NH)NHR_6$; R_2 и R_3, каждый независимо, выбран из -H,

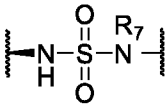
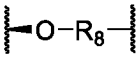
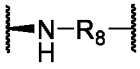
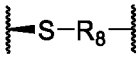
-OH, -F, -Cl и -Br; R_4 выбран из $-CO_2H$, $-P(=O)(OH)_2$, $-SO_3H$; R_5 выбран из $-COCH_3$, $-COCF_3$, $-SO_2CH_3$; X выбран из -O- и -S-; Y выбран из (-O-), (-S-), ($-NR_7$-),  ($-O(C=O)NR_7$-),

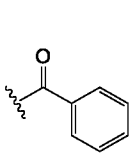
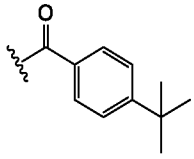
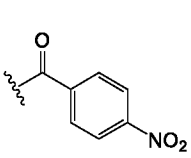
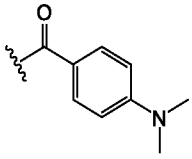
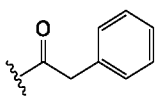
 ($-O(C=S)NR_7$-),  (-O(C=O)O-),  (-O(C=O)-),

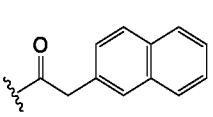
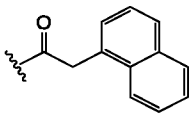
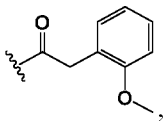
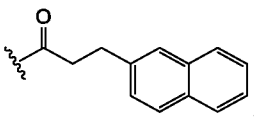
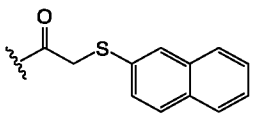
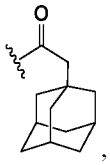
 (-NH(C=O)O-),  (-NH(C=O)-),  (-NH(C=NH)-),

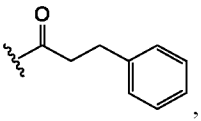
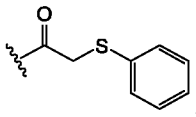
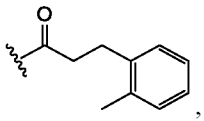
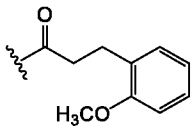
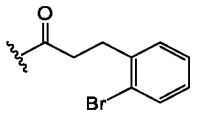
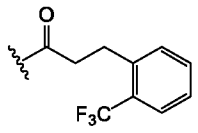
 ($-NH(C=O)NR_7$-),  ($-NH(C=NH)NR_7$-),  ($-NH(C=S)NR_7$-),

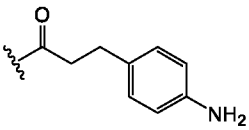
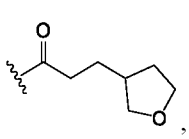
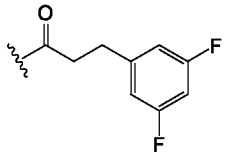
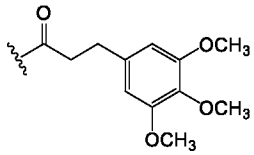
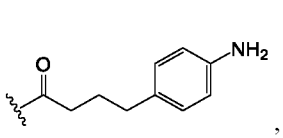
 (-NH(C=S)-),  ($-OCH_2(C=O)NR_7$-),  ($-NH(SO_2)$-),

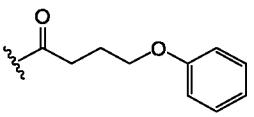
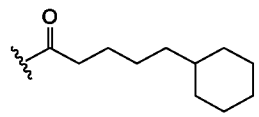
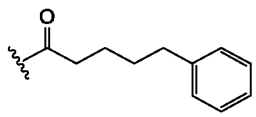
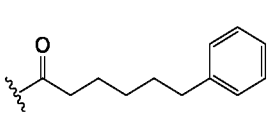
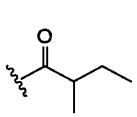
 ($-NH(SO_2)NR_7$-),  ($-OR_8$-),  ($-NR_8$-), и  ($-SR_8$-);

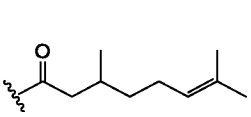
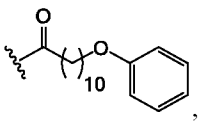
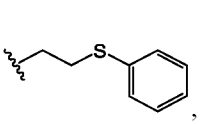
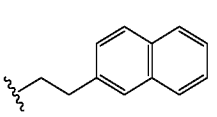
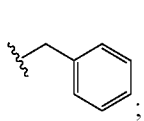
R_6 выбран из  ,  ,  ,  ,  ,

 ,  ,  ,  ,  ,  ,

 ,  ,  ,  ,  ,  ,

 ,  ,  ,  ,  ,

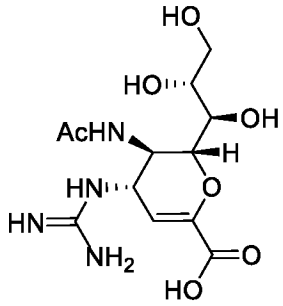
 ,  ,  ,  ,  ,

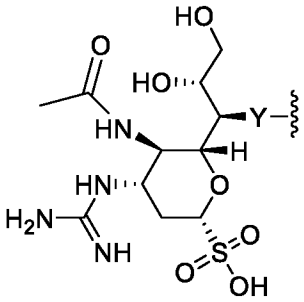
 ,  ,  ,  и  ;

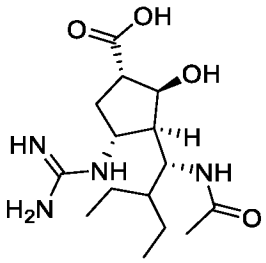
R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила, и C2-C15 гетероарила; R_8 выбран из C3-C20 гетероциклоалкила, C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила; R_9 выбран из -H, галогена (например, Cl, F или Br), $-OR_{10}$, $-NHC(=O)R_7$, необязательно замещенного C1-C20 алкила, C3-C20

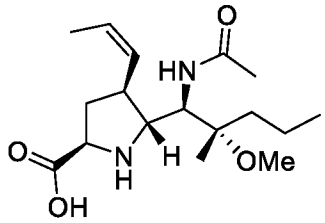
циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила; и R_{10} выбран из C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила. Наиболее предпочтительно ингибитор вирусной нейраминидазы формулы (A-I), (A-II), (A-III), (A-IV), (A-V), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), (A-XI), (A-XII) или (A-XIII) ковалентно присоединен к конъюгату через Y.

Предпочтительно ингибитор вирусной нейраминидазы выбран из занамивира, сульфозанамивира, перамивира или A-315675:



,


,


,


.

Занамивир, сульфозанамивир, перамивир, A-315675

Конъюгаты димеров ингибиторов нейраминидазы, связанных с Fc-доменом или белком альбумином

Описанные в данном документе конъюгаты включают Fc-домен и мономер Fc-домена, Fc-связывающий пептид и белок альбумин или пептид, связывающий белок альбумин, ковалентно связанный с одним или более димерами ингибиторов нейраминидазы. Димеры двух ингибиторов нейраминидазы включают первый ингибитор нейраминидазы (например, первый ингибитор вирусной нейраминидазы формул (A-I)-(A-XIII)) и второй ингибитор нейраминидазы (например, второй ингибитор вирусной нейраминидазы формул (A-I)-(A-XIII)). Первый и второй ингибиторы нейраминидазы связаны друг с другом посредством линкера, такого как линкер, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления димеров ингибиторов нейраминидазы первый и второй ингибиторы нейраминидазы являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый и второй ингибиторы нейраминидазы отличаются.

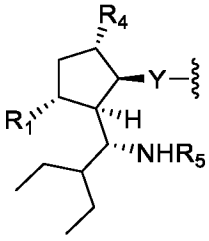
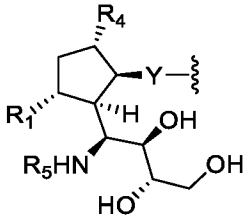
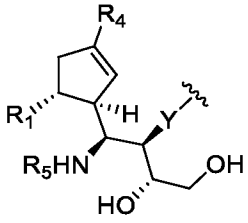
Димеры ингибиторов нейраминидазы включают гомодимеры занамивира или его аналогов (например, (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X) или (A-XIII)). Например, димеры ингибиторов нейраминидазы по изобретению включают димеры, имеющие структуру A_1-L-A_2, где каждый A_1 и каждый A_2 выбран из (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X) и (A-XIII).

Димеры ингибиторов нейраминидазы включают гомодимеры перамивира или его аналогов (например, (A-III), (A-IV) или (A-V)). Например, димеры ингибиторов нейраминидазы по изобретению включают димеры, имеющие структуру A_1-L-A_2, где каждый A_1 и каждый A_2 выбран из (A-III), (A-IV) и (A-V).

Димеры ингибиторов нейраминидазы включают гетеродимеры, включая занамивир или его аналоги, и перамивир или его аналоги (например, (A-I)-(A-XIII)). Например, димеры ингибиторов нейраминидазы по изобретению включают димеры, имеющие структуру A_1-L-A_2, где каждый A_1 выбран из (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), и (A-XIII), а каждый A_2 выбран из (A-III), (A-IV) и (A-V).

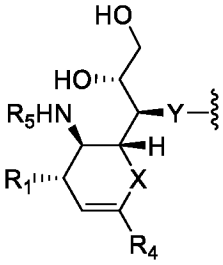
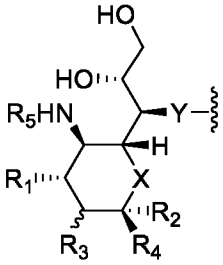
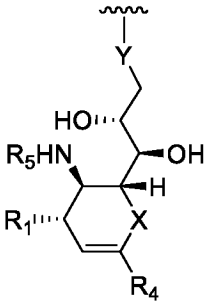
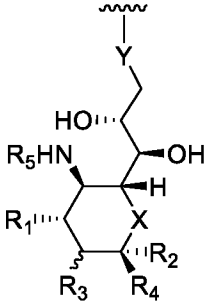
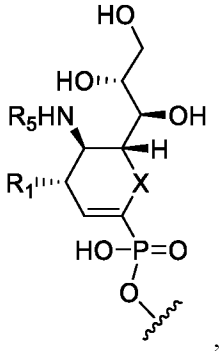
В некоторых вариантах осуществления, когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) каждый A_1-L-A_2 может быть независимо выбран (например, независимо выбран из любой из структур A_1-L-A_2, описанных в данном документе). В некоторых вариантах осуществления E может быть конъюгирован с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различными фрагментами

A_1-L-A_2. В некоторых вариантах осуществления E конъюгирован с первым фрагментом A_1-L-A_2 и со вторым фрагментом A_1-L-A_2. В некоторых вариантах осуществления A_1 и A_2 первого фрагмента A_1-L-A_2 независимо выбраны из любой из формул (A-III)-(A-V):

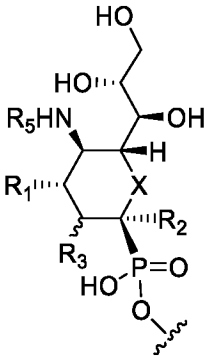
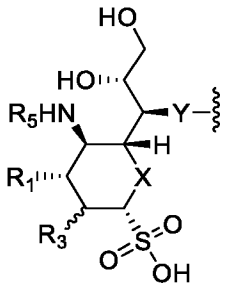
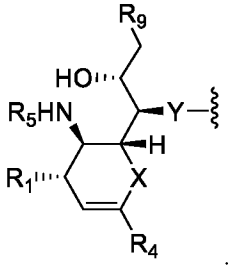




(A-III) (A-IV) (A-V)

и A_1 и A_2 второго фрагмента A_1-L-A_2 независимо выбраны из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), или (A-XIII):

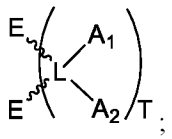
(A-I) (A-II) (A-VI) (A-VII) (A-VIII)

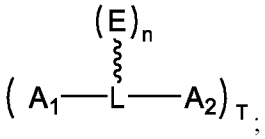
(A-IX) (A-X) (A-XIII)

В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент A_1-L-A_2 специфически конъюгирован с остатками лизина E (например, атомами азота экспонированных на поверхности остатков лизина E), а второй фрагмент A_1-L-A_2 специфически конъюгирован с остатками цистеина E (например, с атомами серы экспонированных на поверхности остатков цистеина E). В некоторых вариантах осуществления из первого фрагмента A_1-L-A_2 специфически конъюгирован с остатками цистеина E (например, атомами серы экспонированных на поверхности остатков цистеина E), а второй фрагмент A_1-L-A_2 специфически конъюгирован с остатками лизина E (например, с атомами азота экспонированных на поверхности остатков лизина E).

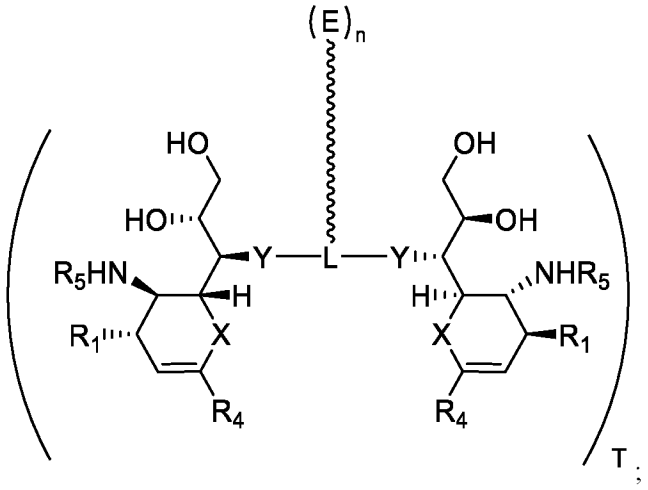
В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложен конъюгат или его фармацевтически приемлемая соль, описанные приведенными ниже формулами:



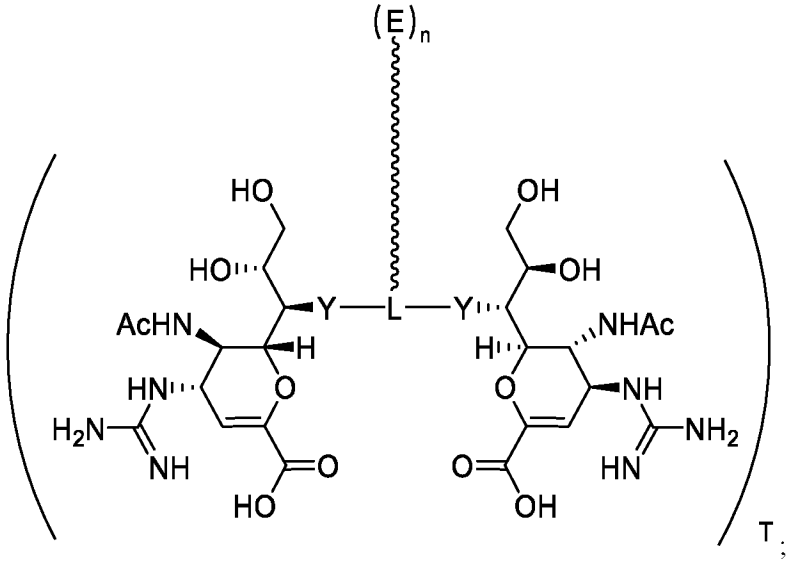
(1)



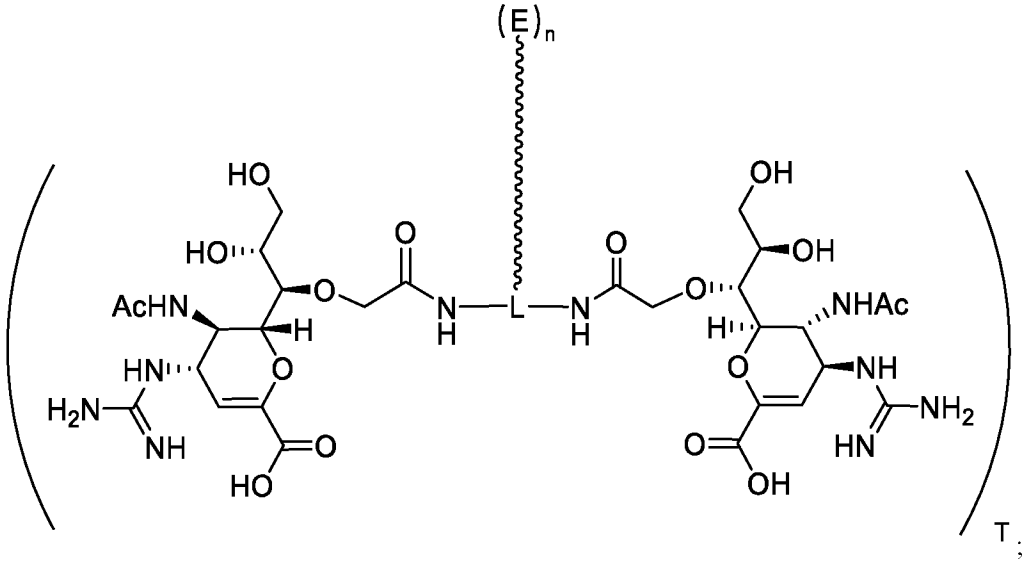
(D-I)



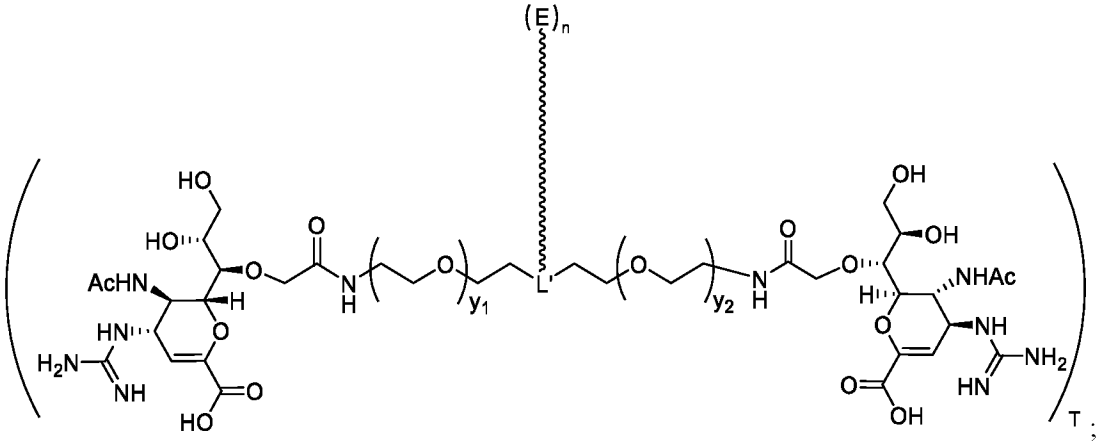
(D-II)



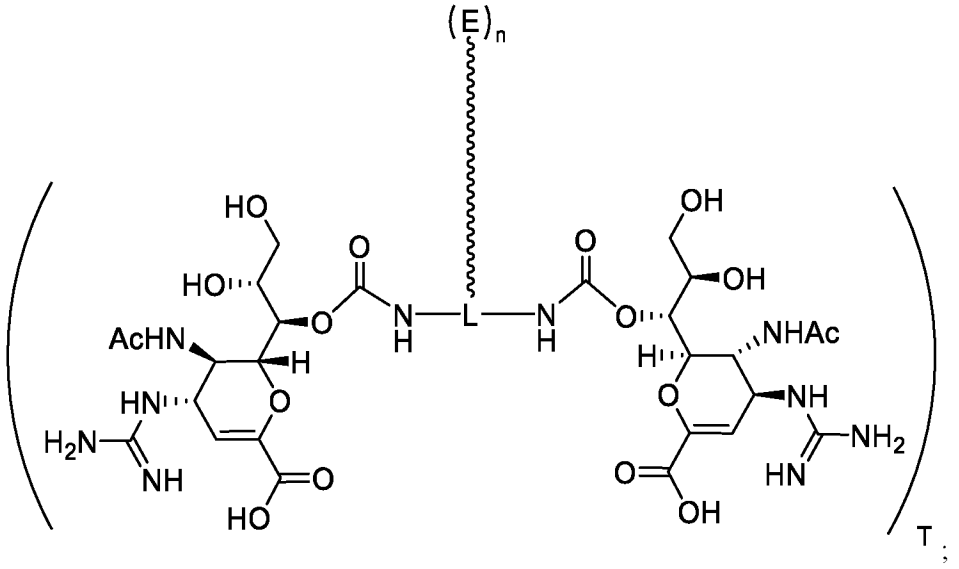
(D-II-1)



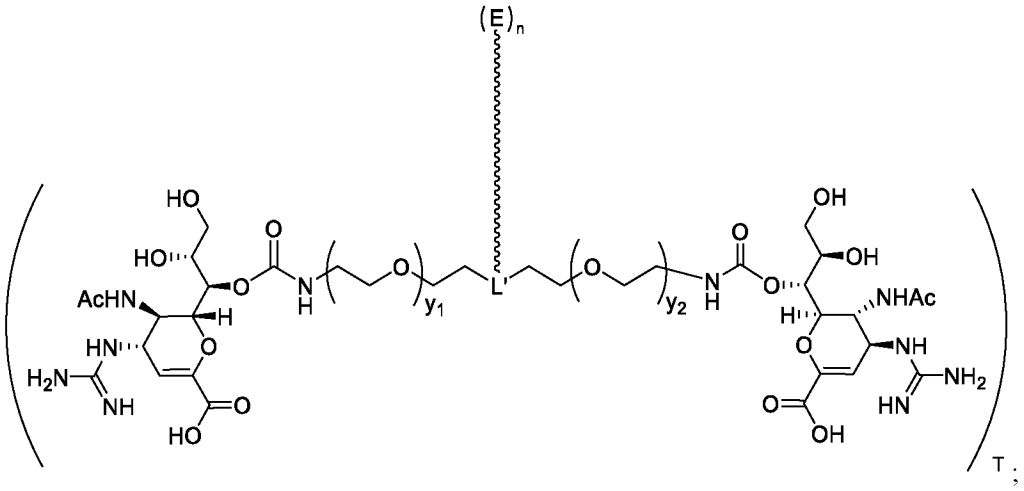
(D-II-2)



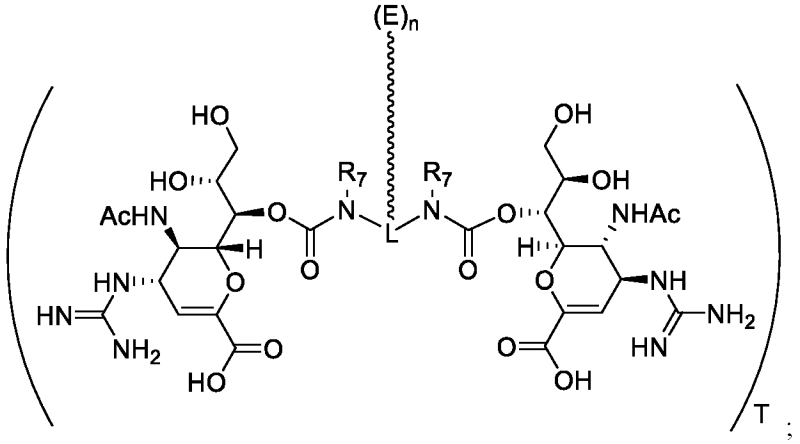
(D-II-3)



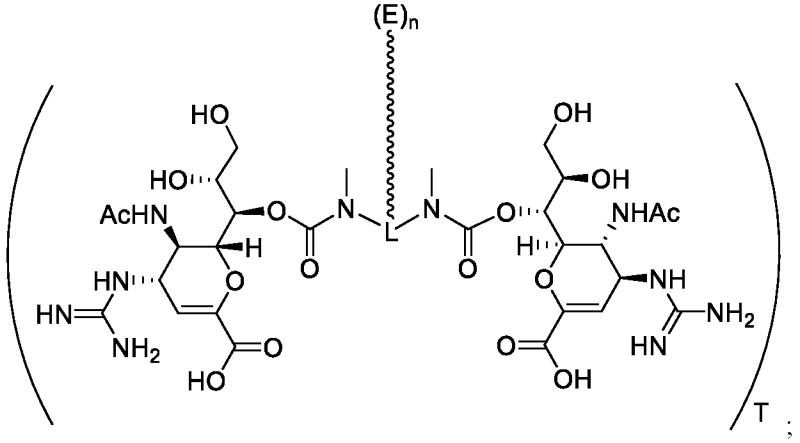
(D-II-4)



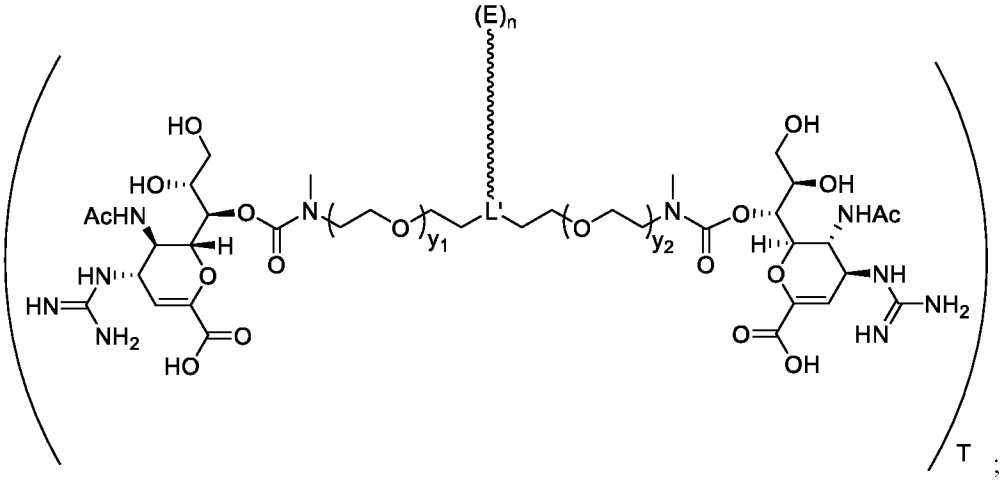
(D-II-5)



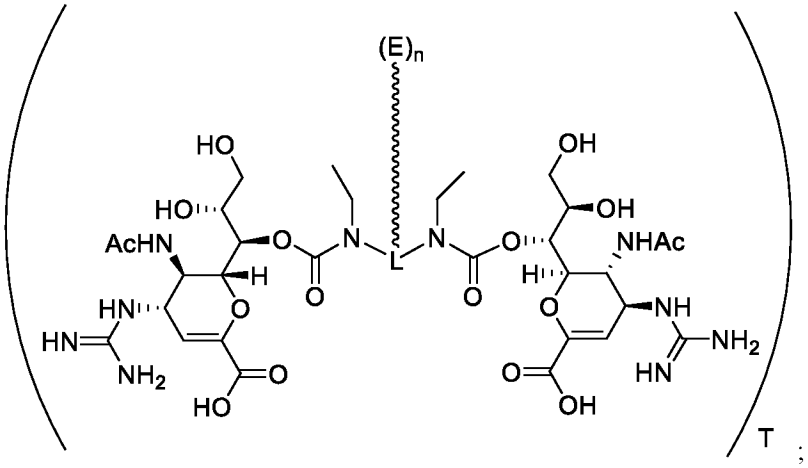
(D-II-6)



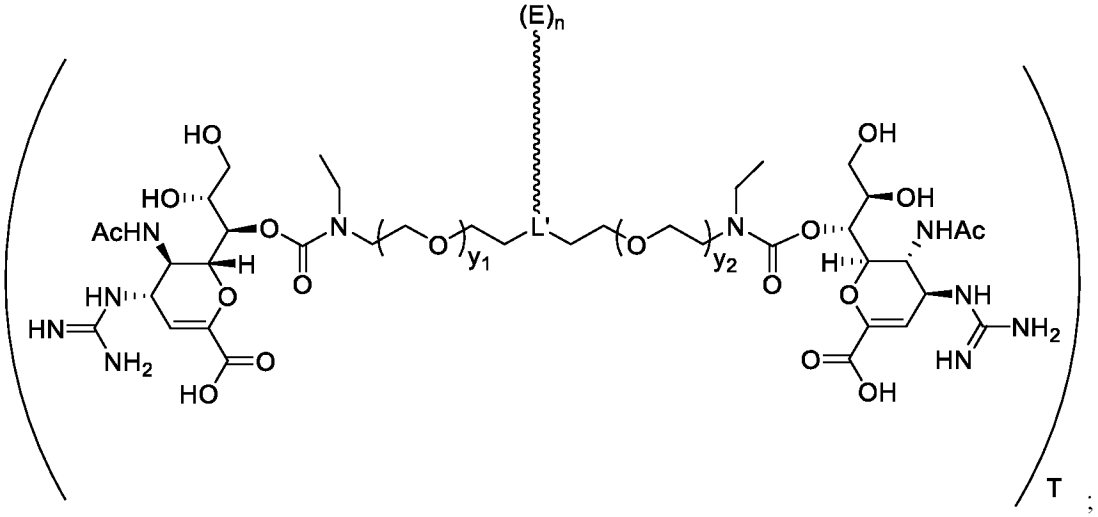
(D-II-7)



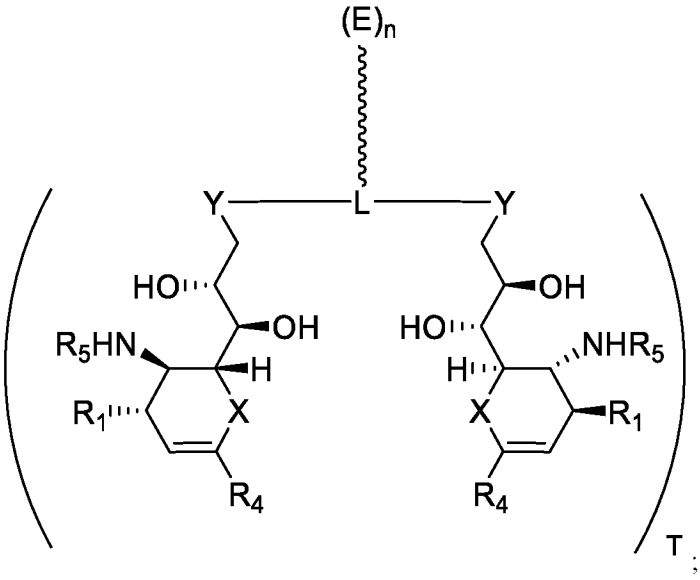
(D-II-8)



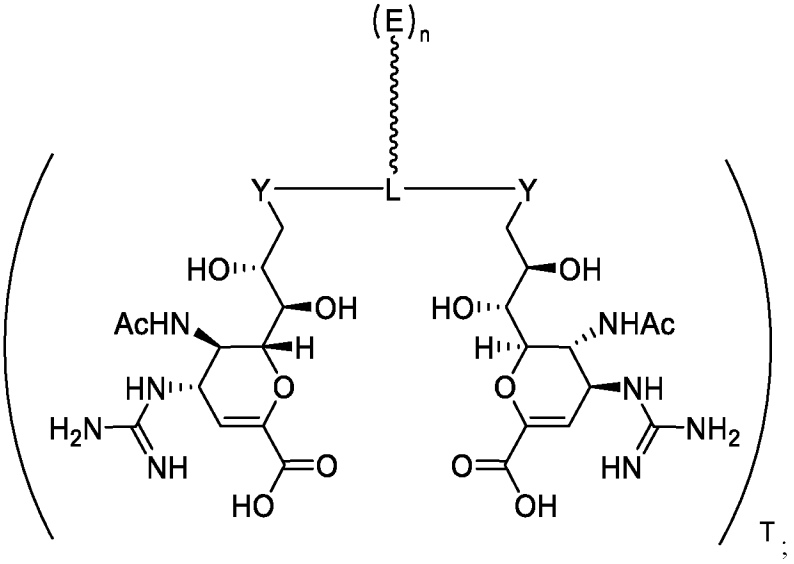
(D-II-9)



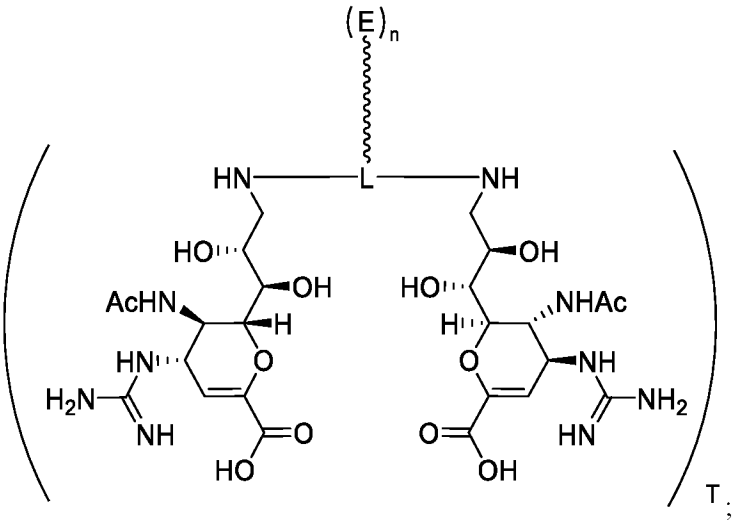
(D-II-10)



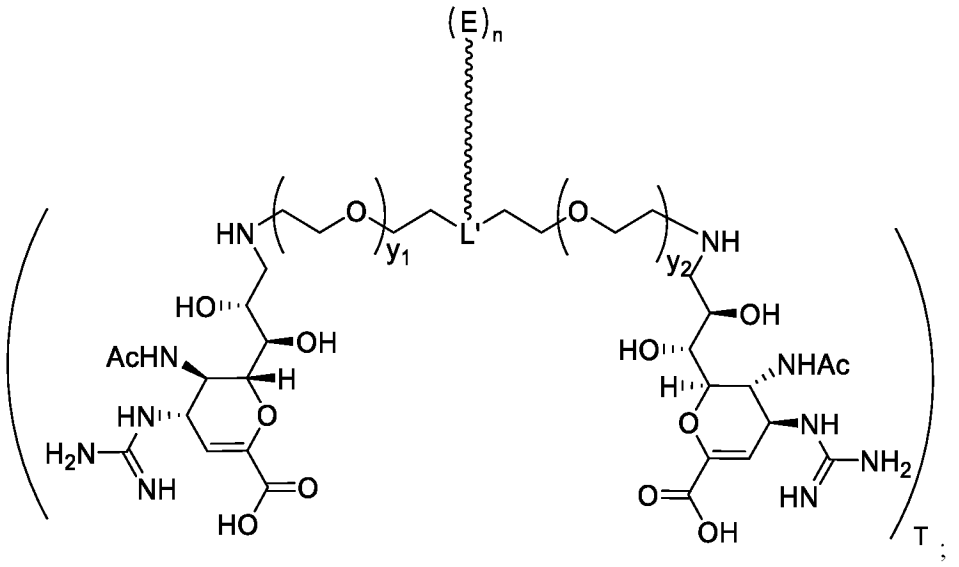
(D-III)



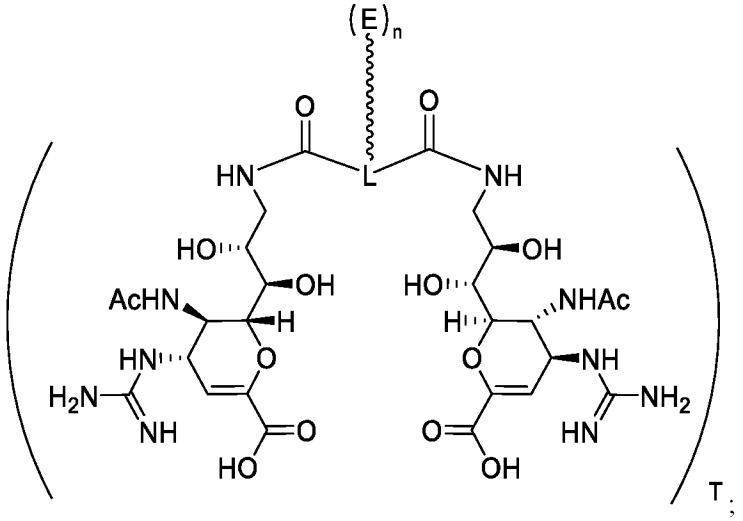
(D-III-1)



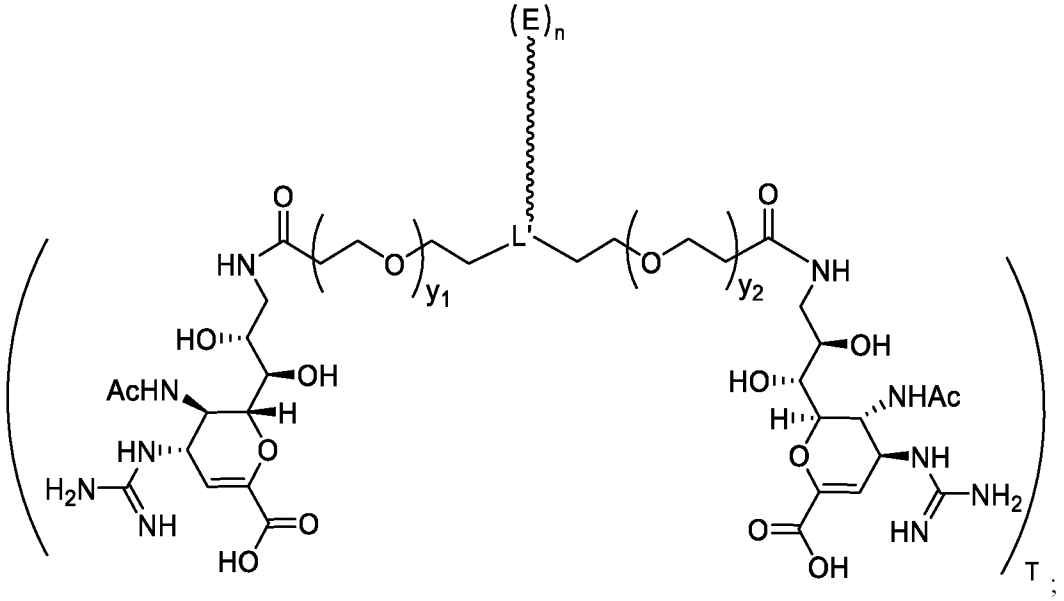
(D-III-2)



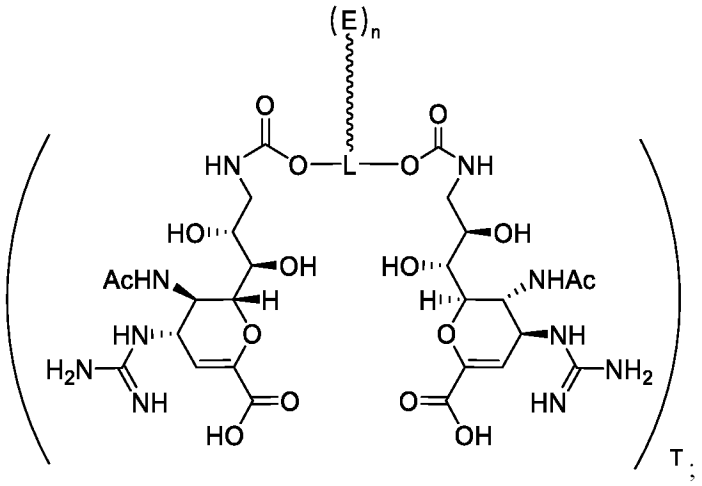
(D-III-3)



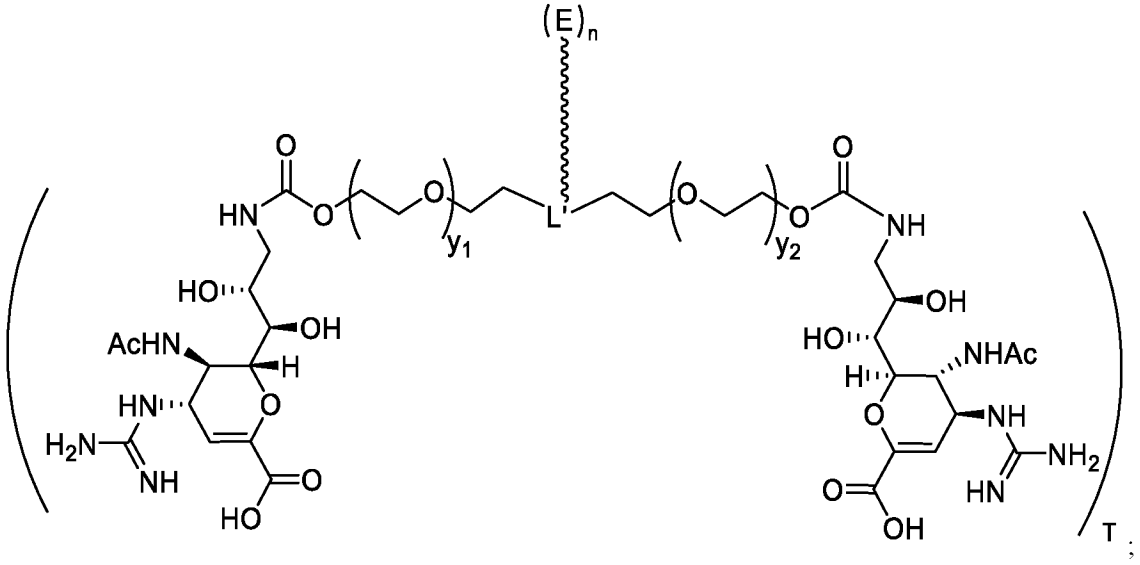
(D-III-4)



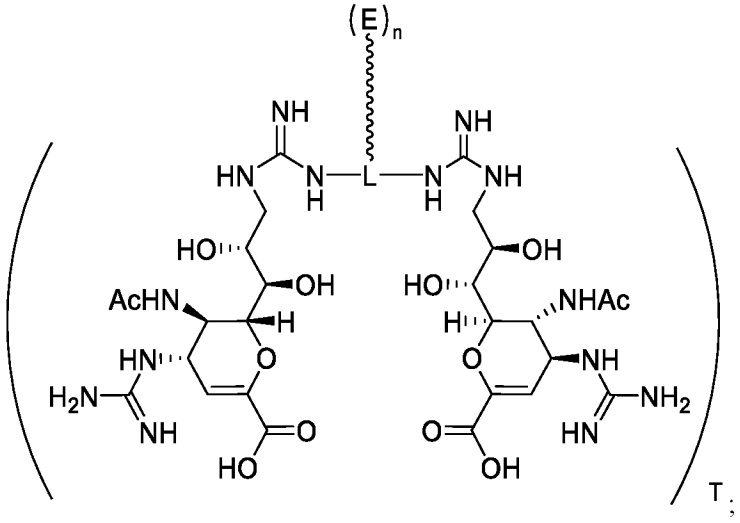
(D-III-5)



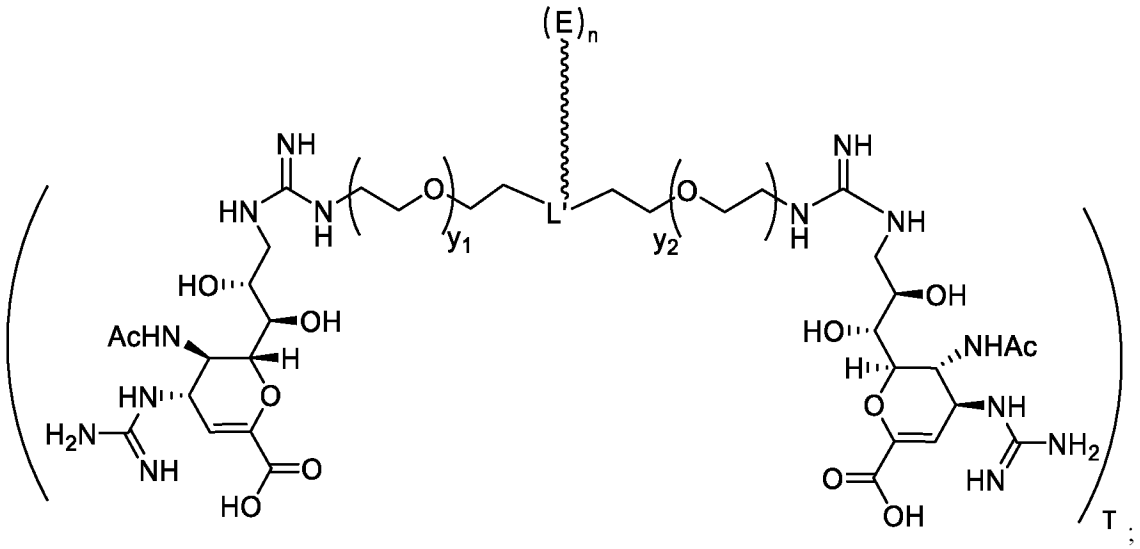
(D-III-6)



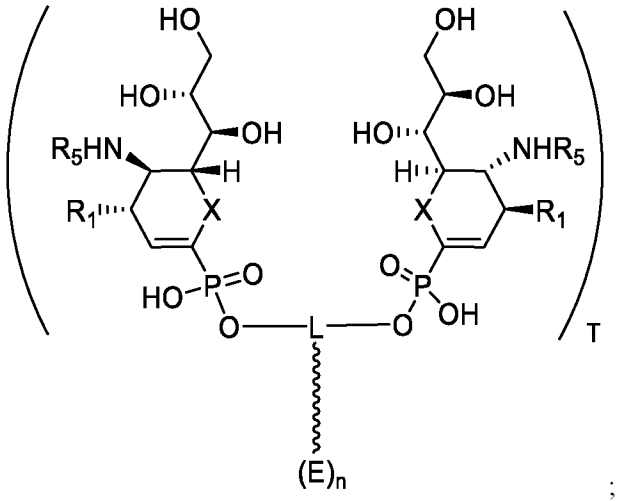
(D-III-7)



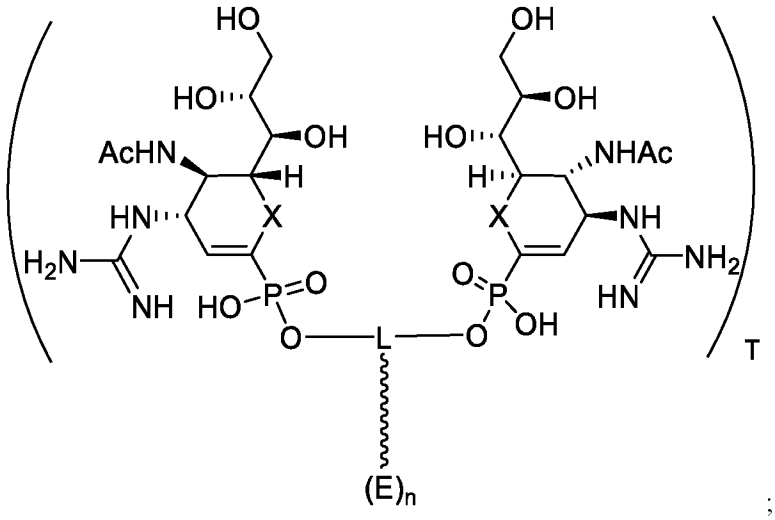
(D-III-8)



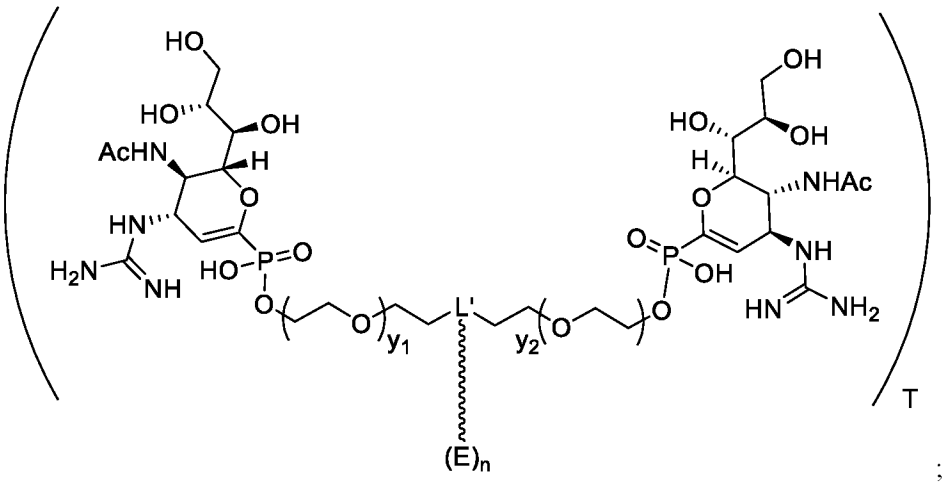
(D-III-9)



(D-IV)

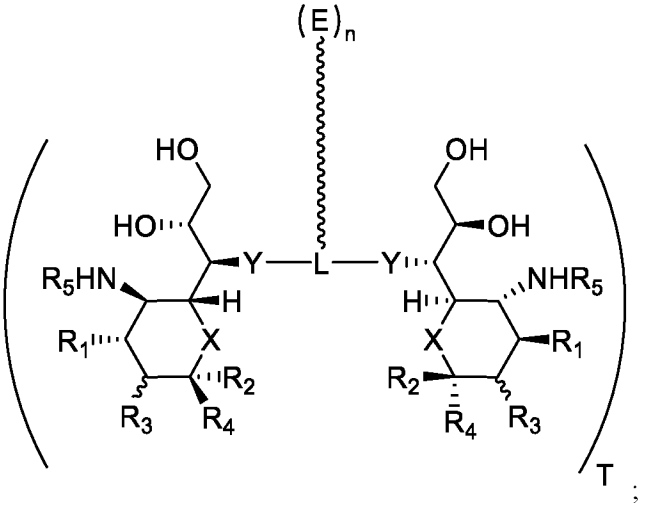


(D-IV-1)



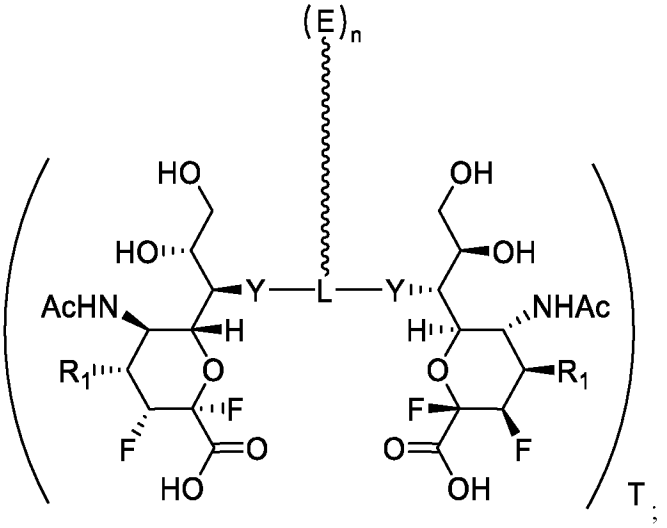
;

(D-IV-2)



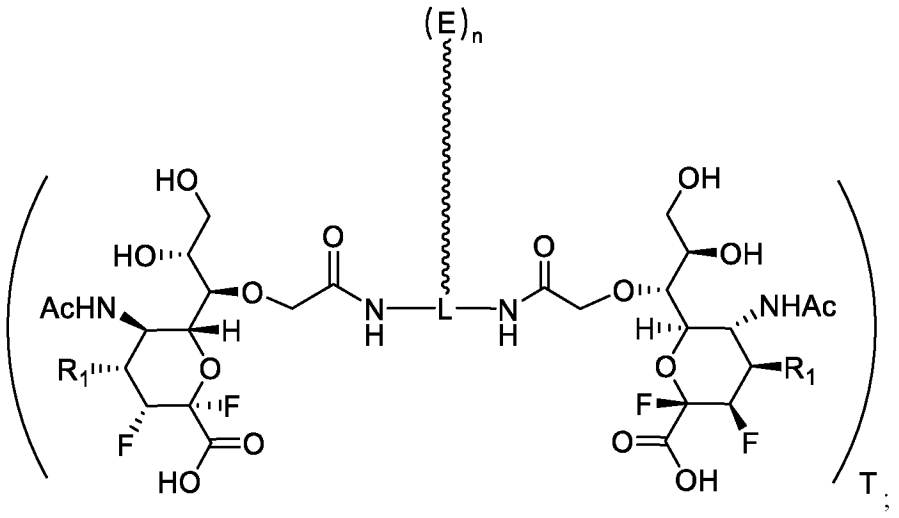
;

(D-V)

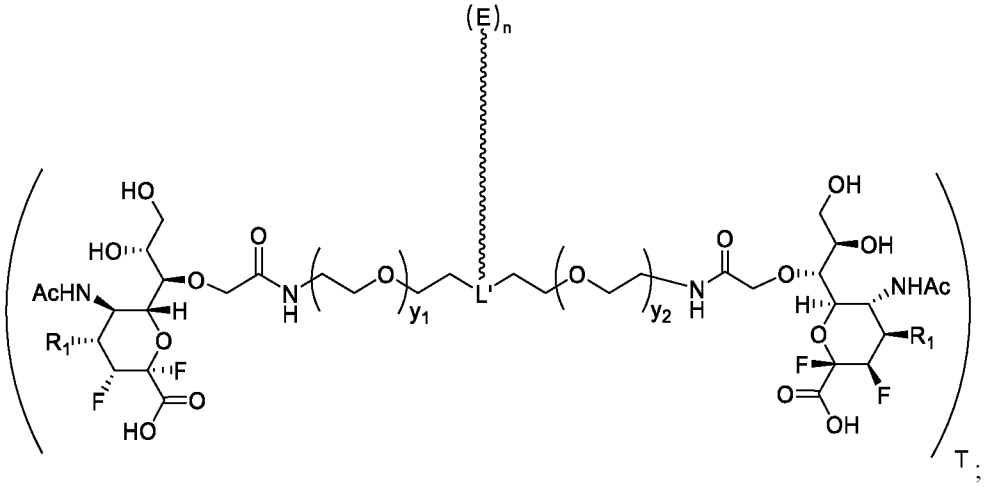


;

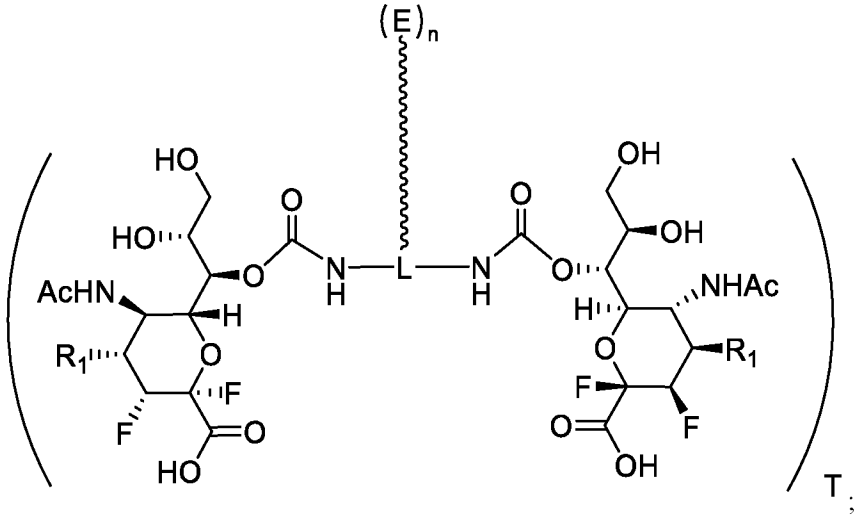
(D-V-1)



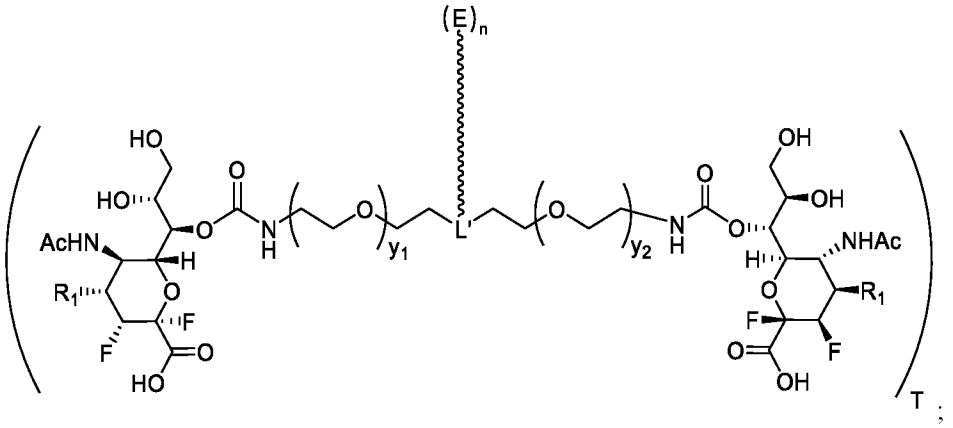
(D-V-2)



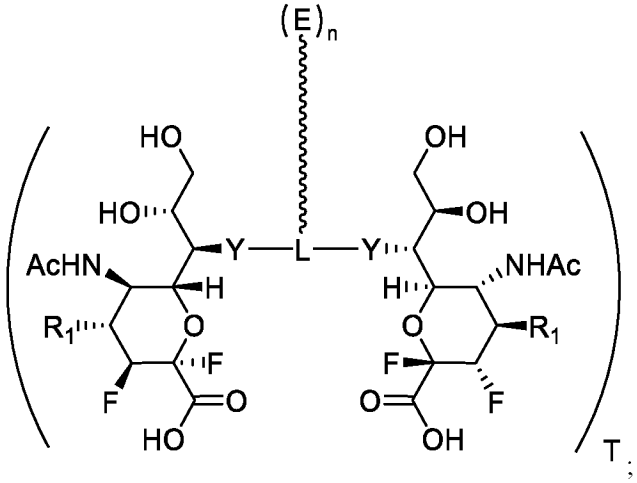
(D-V-3)



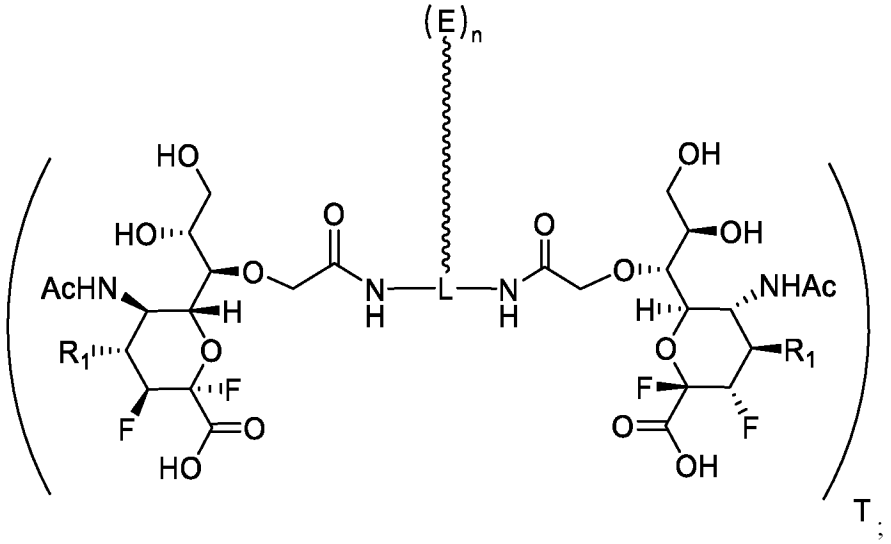
(D-V-4)



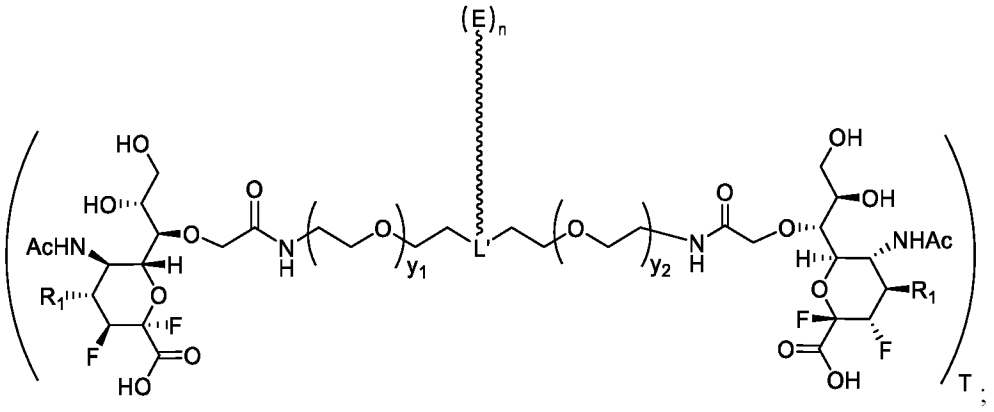
(D-V-5)



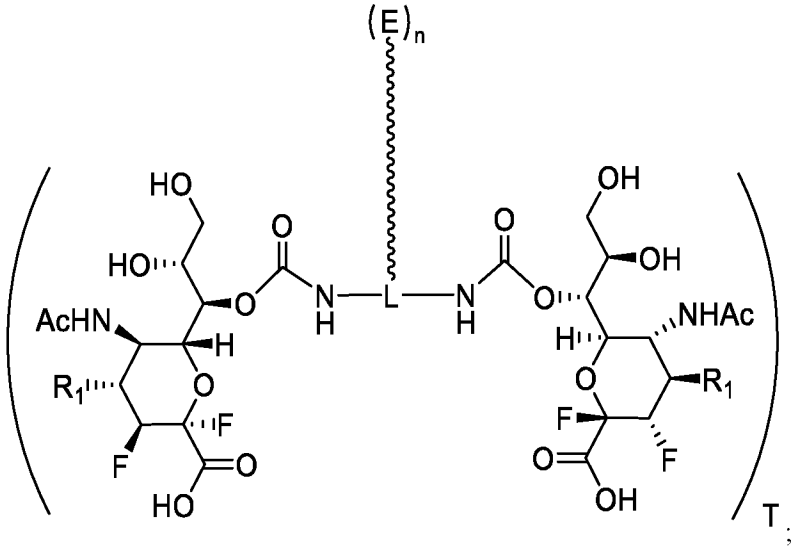
(D-V-6)



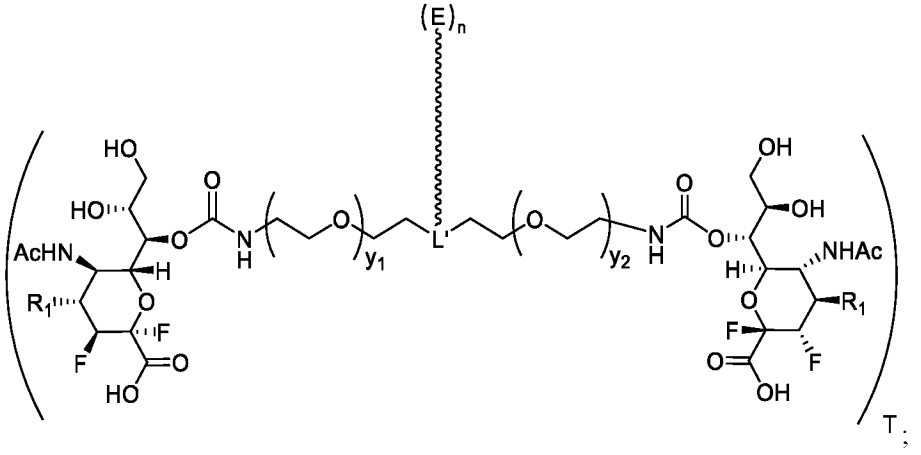
(D-V-7)



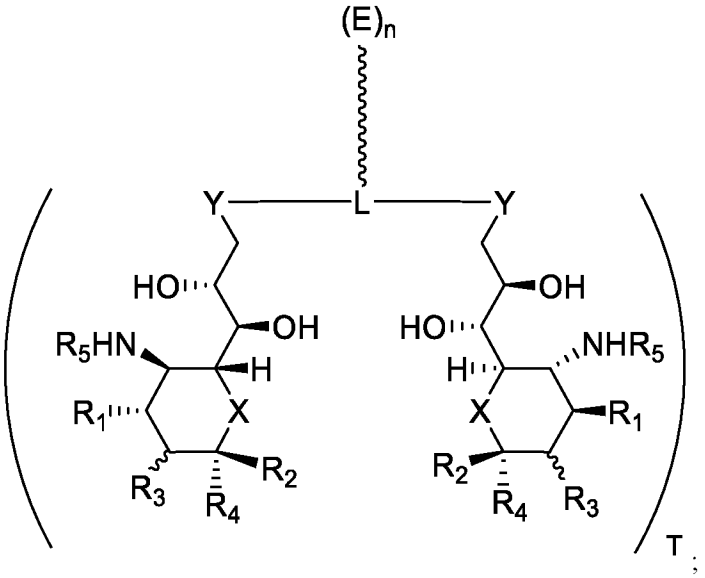
(D-V-8)



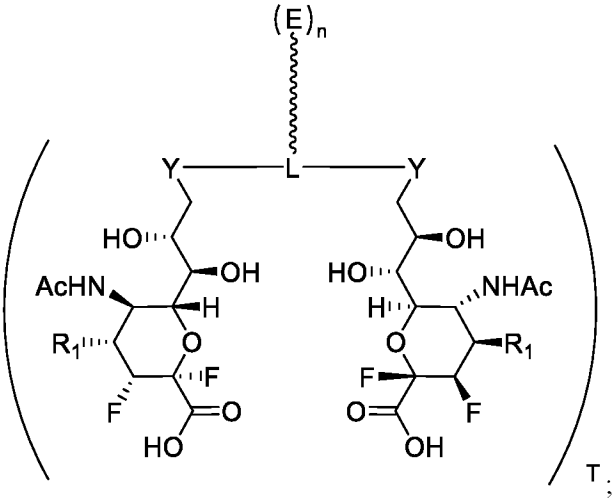
(D-V-9)



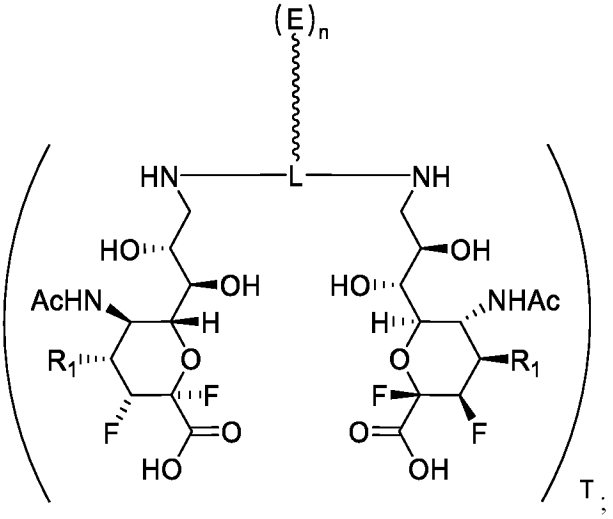
(D-V-10)



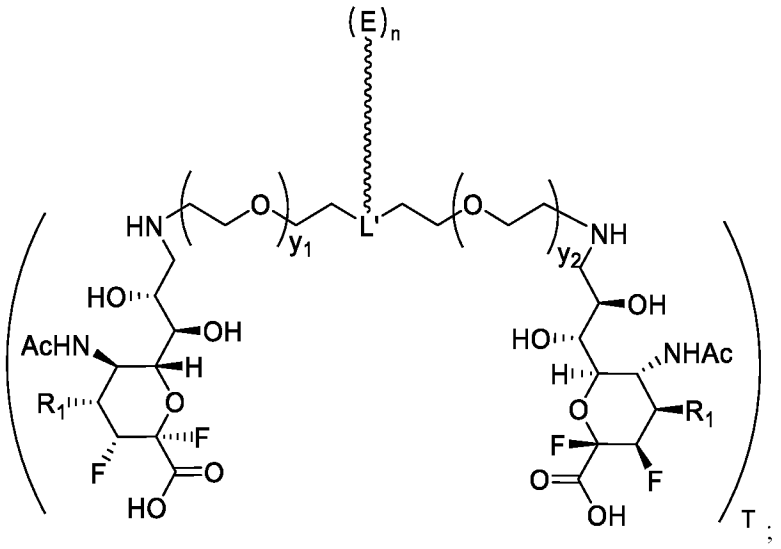
(D-VI)



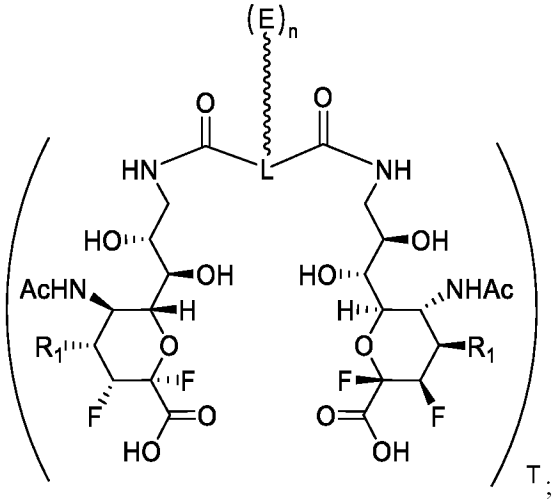
(D-VI-1)



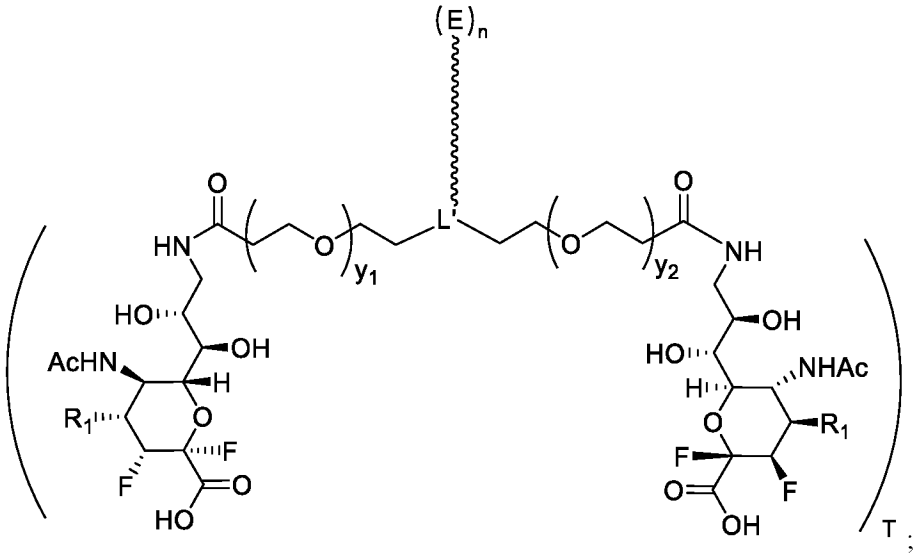
(D-VI-2)



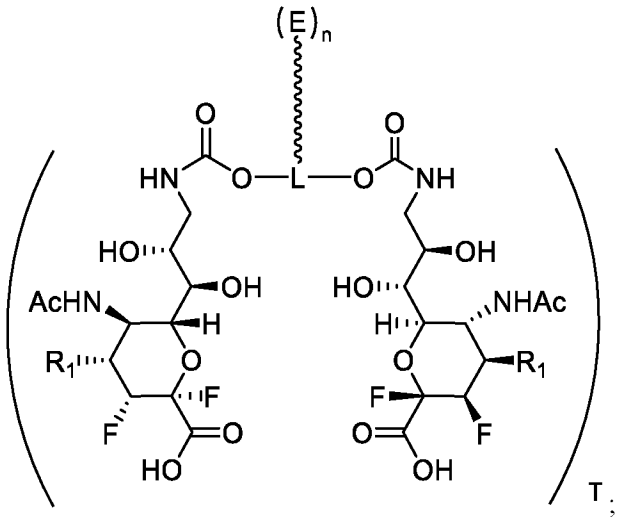
(D-VI-3)



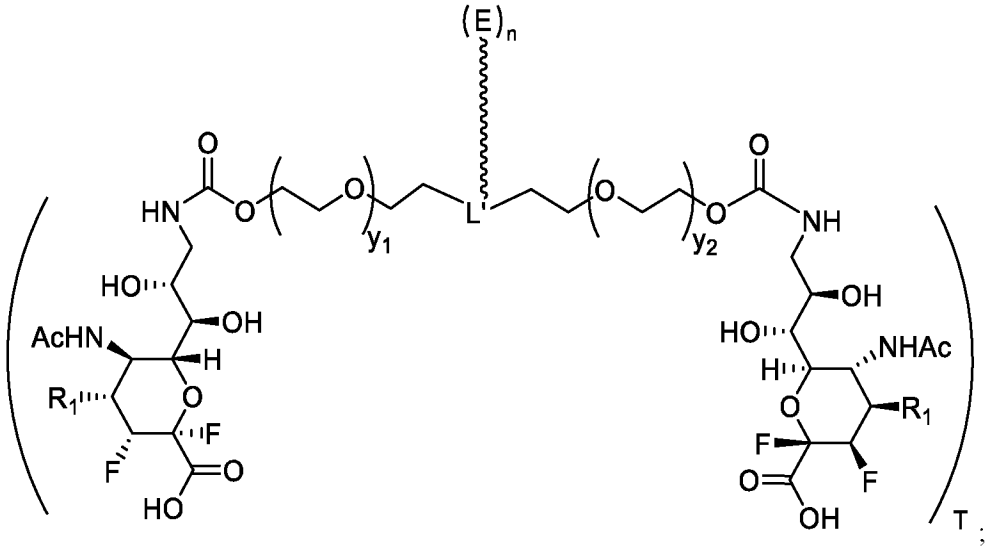
(D-VI-4)



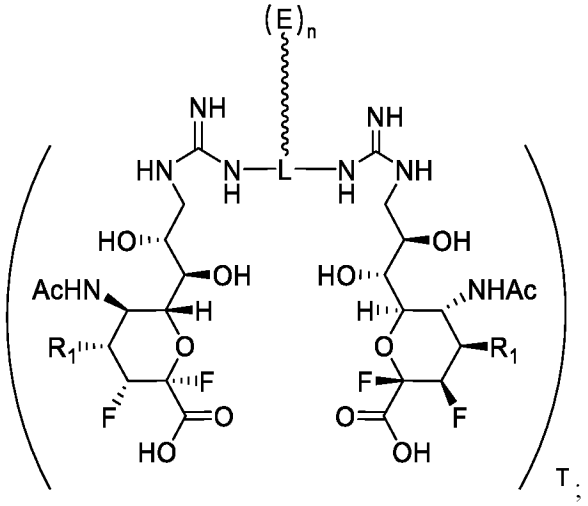
(D-VI-5)



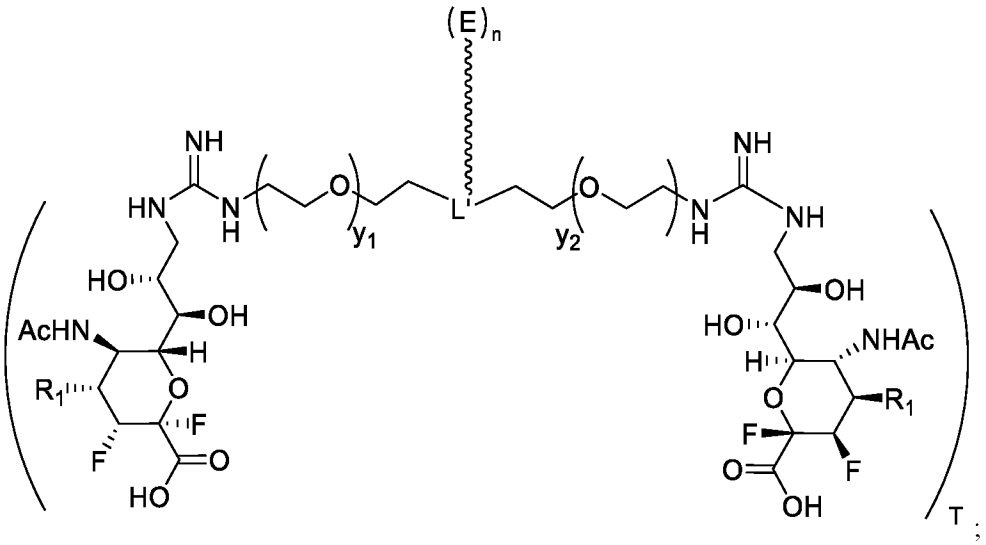
(D-VI-6)



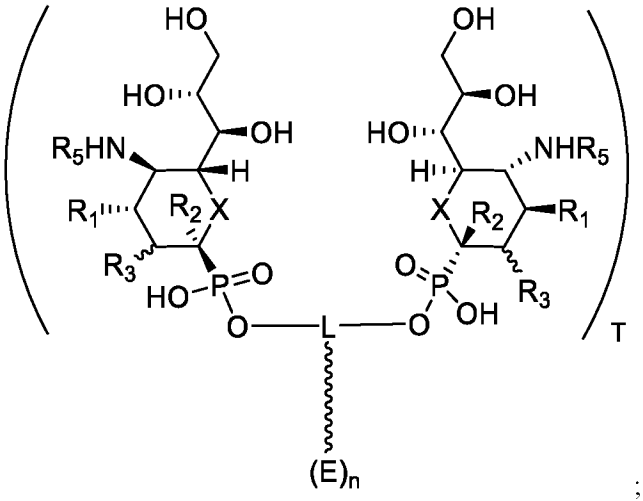
(D-VI-7)



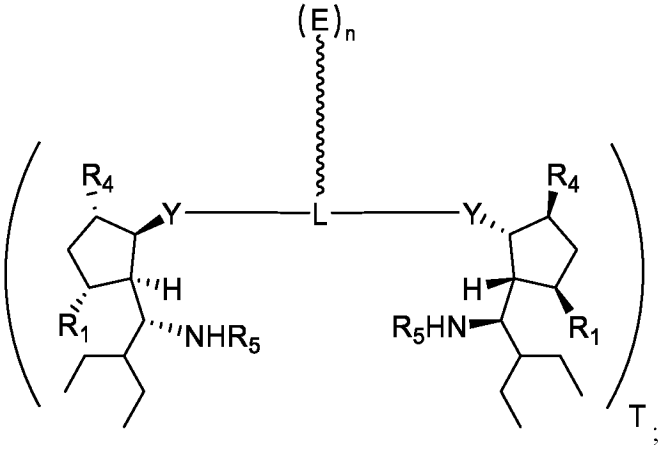
(D-VI-8)



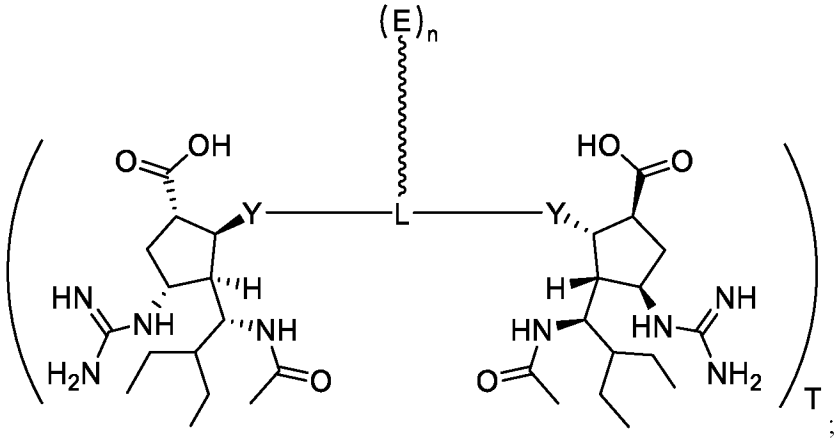
(D-VI-9)



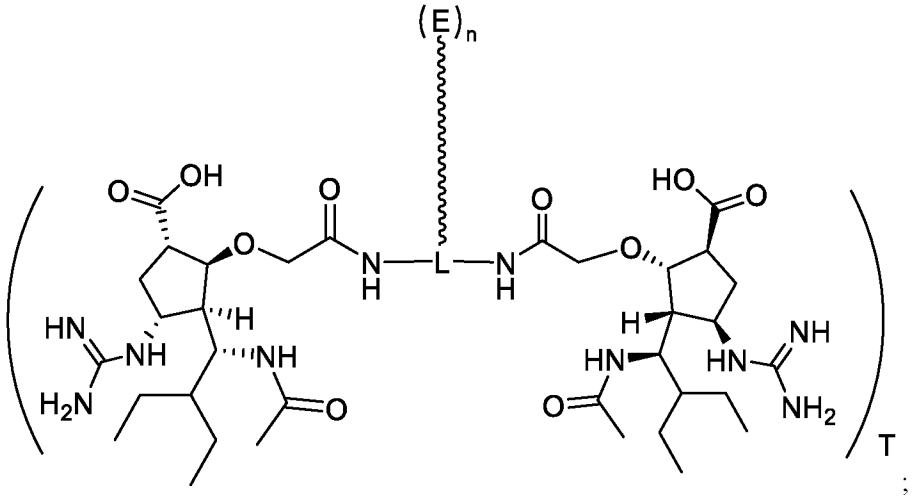
(D-VII)



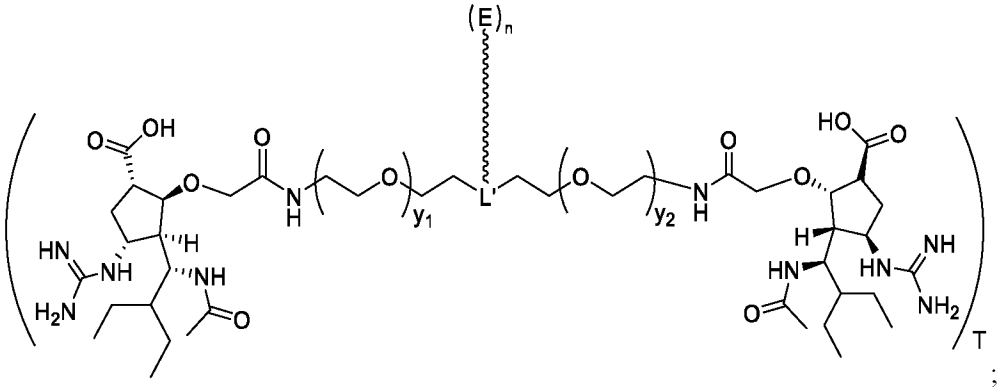
(D-VIII)



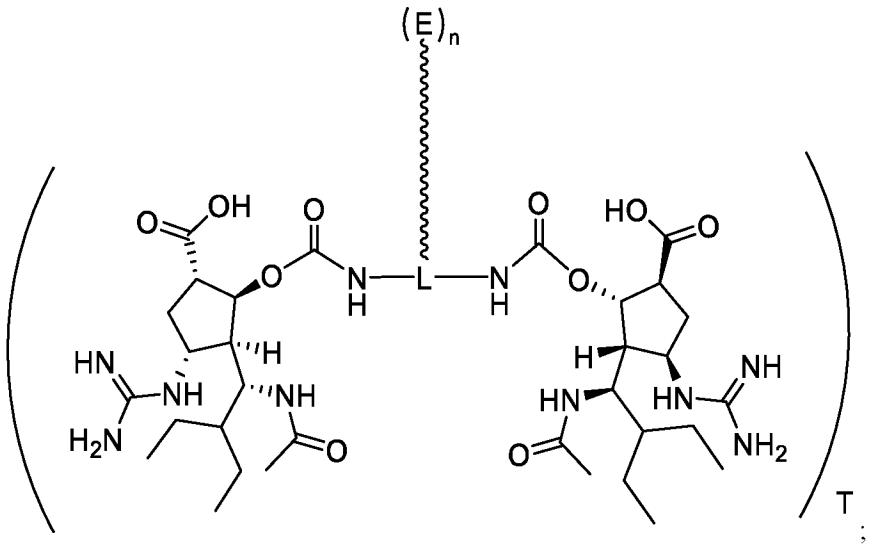
(D-VIII-1)



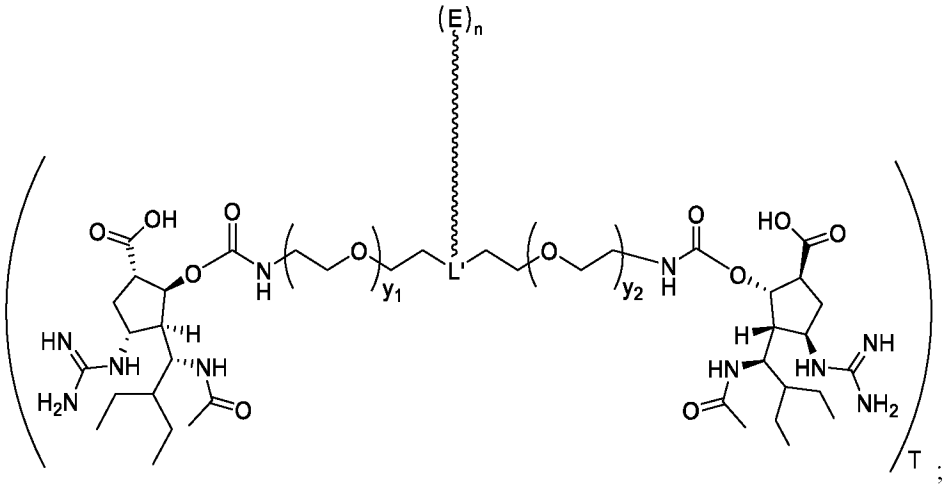
(D-VIII-2)



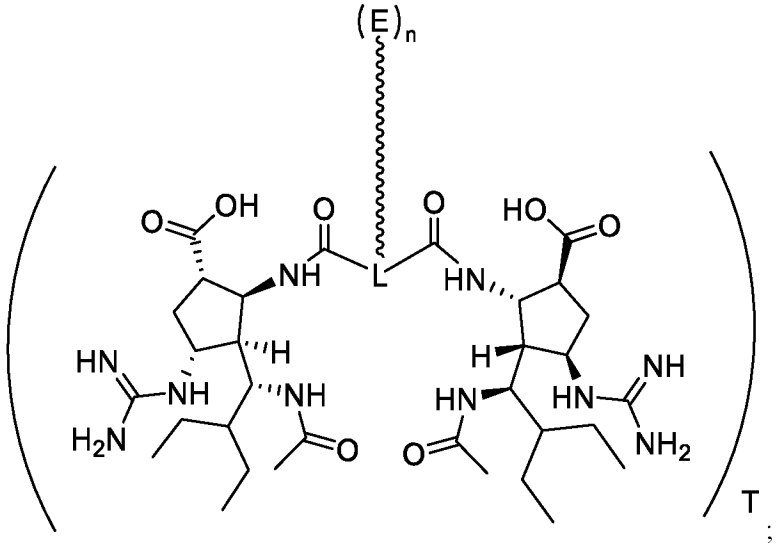
(D-VIII-3)



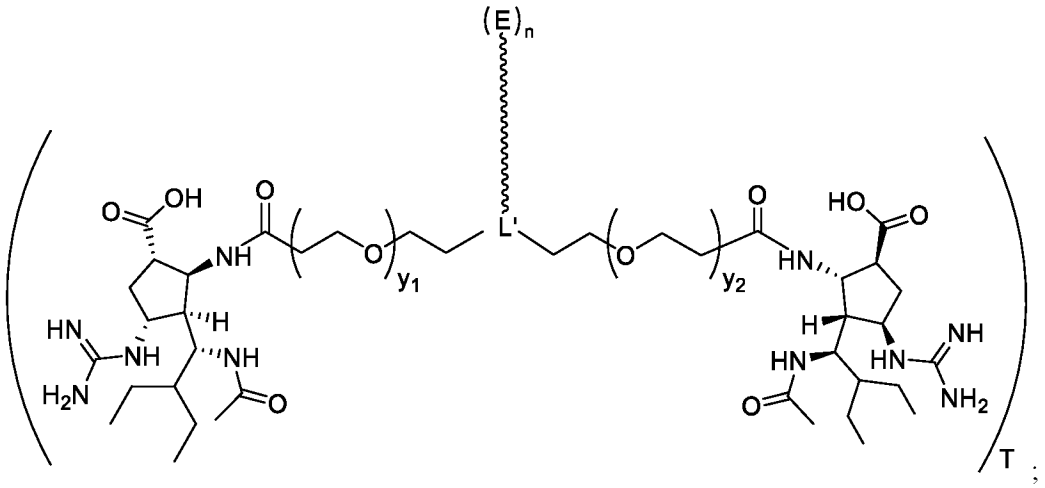
(D-VIII-4)



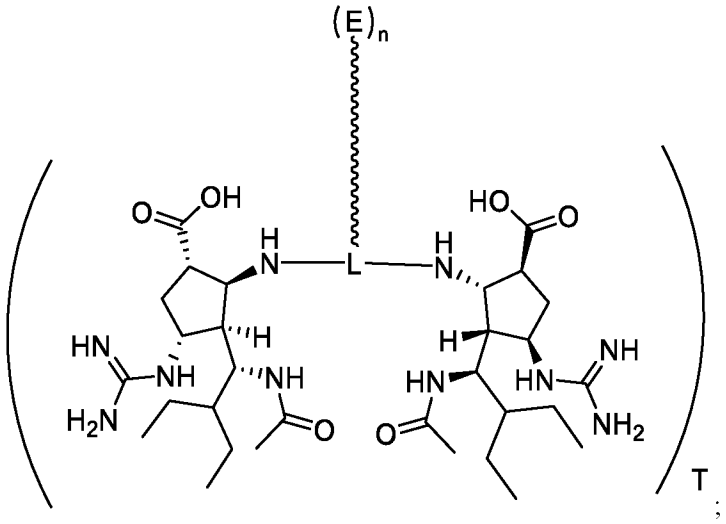
(D-VIII-5)



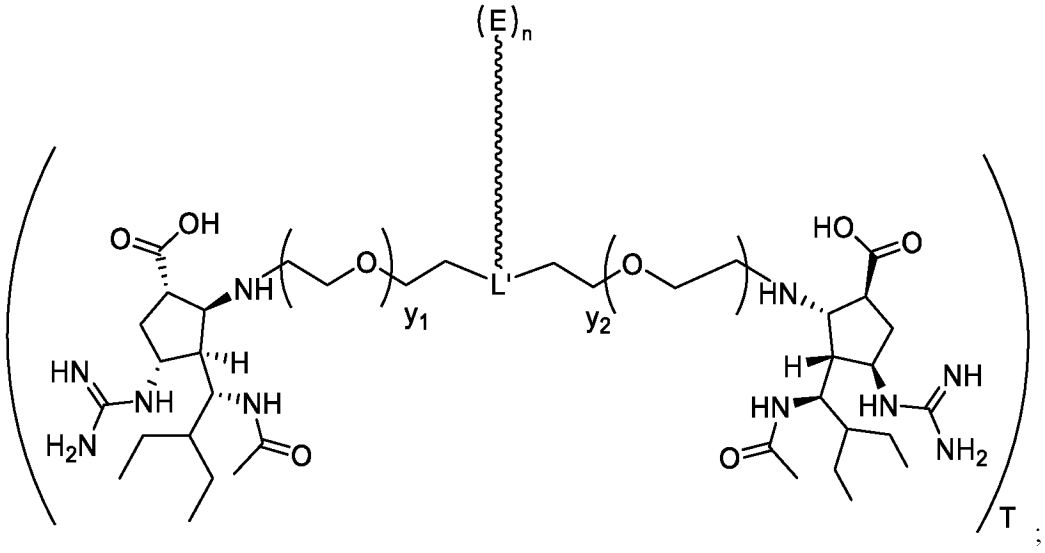
(D-VIII-6)



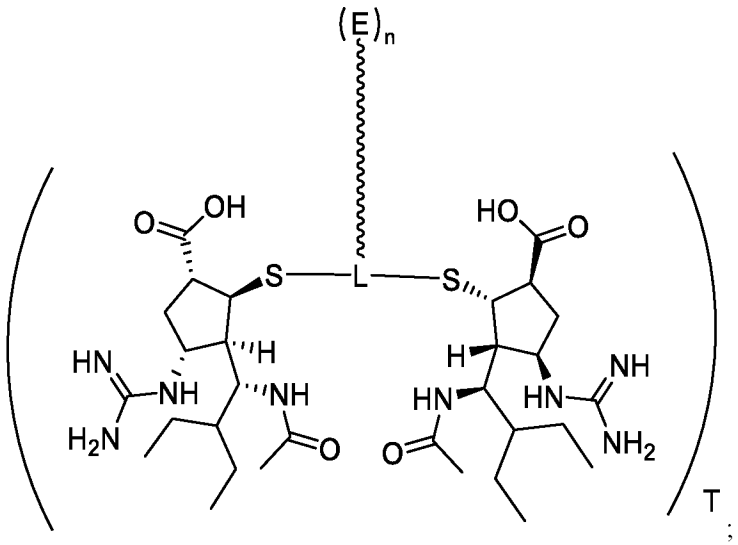
(D-VIII-7)



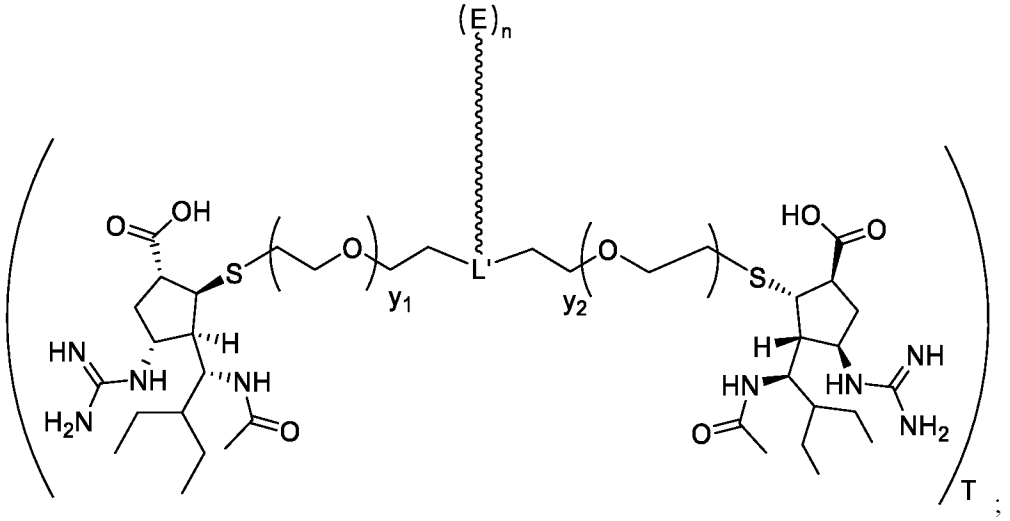
(D-VIII-8)



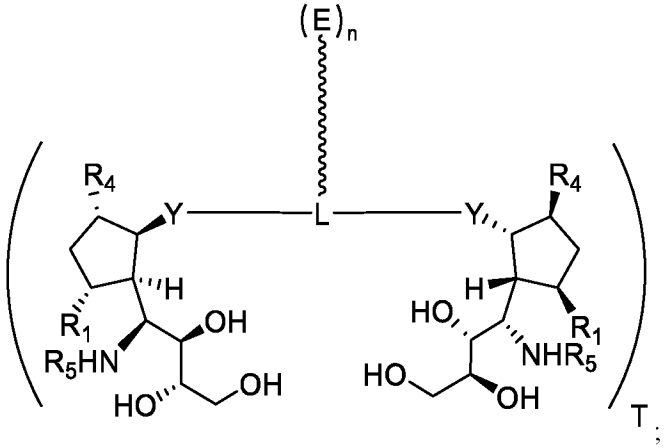
(D-VIII-9)



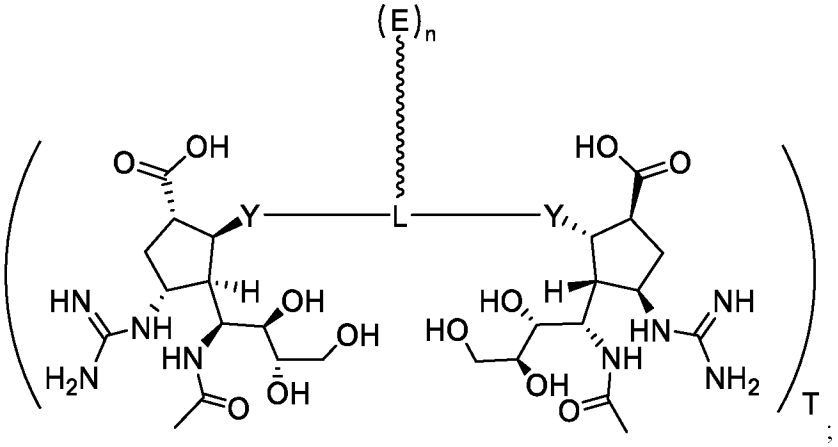
(D-VIII-10)



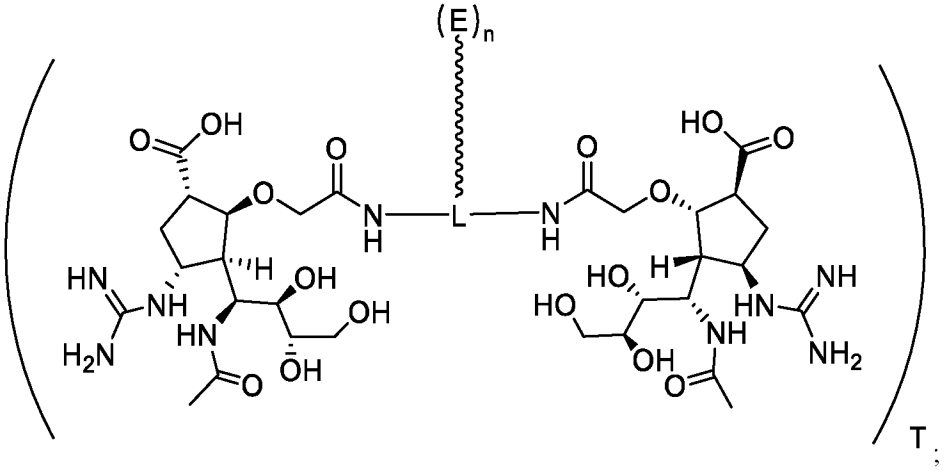
(D-VIII-11)



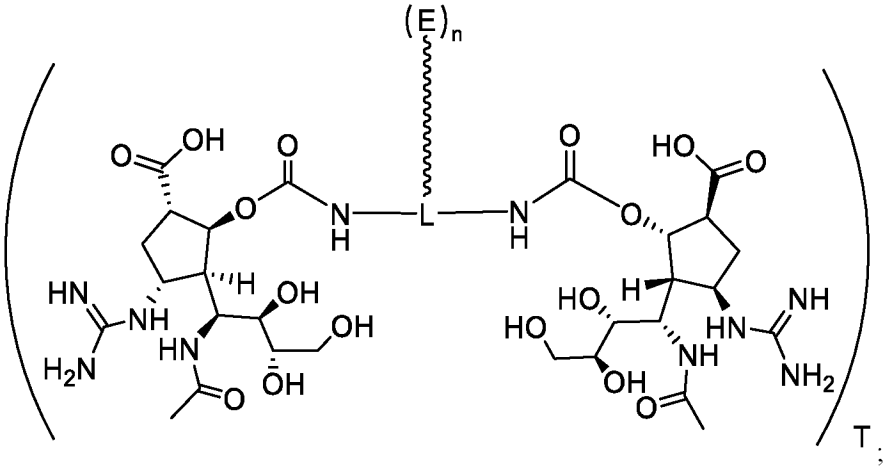
(D-IX)



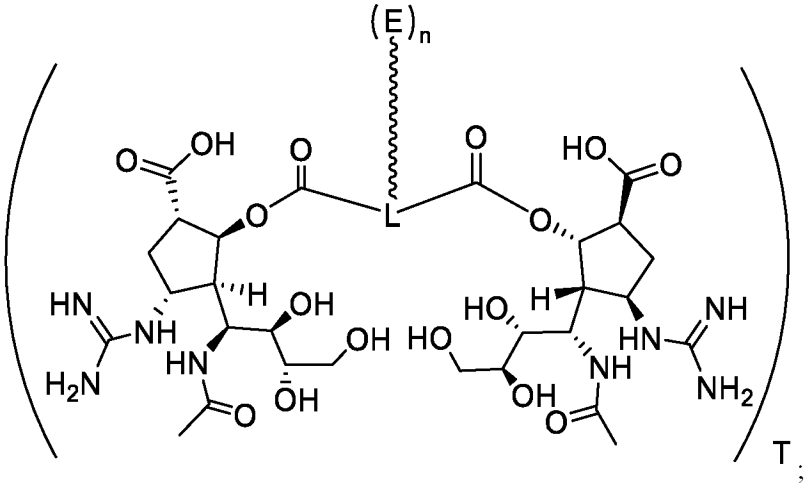
(D-IX-1)



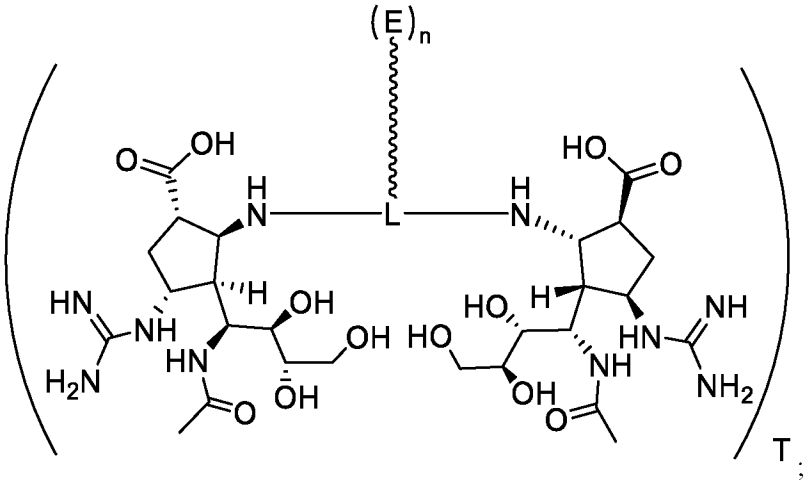
(D-IX-2)



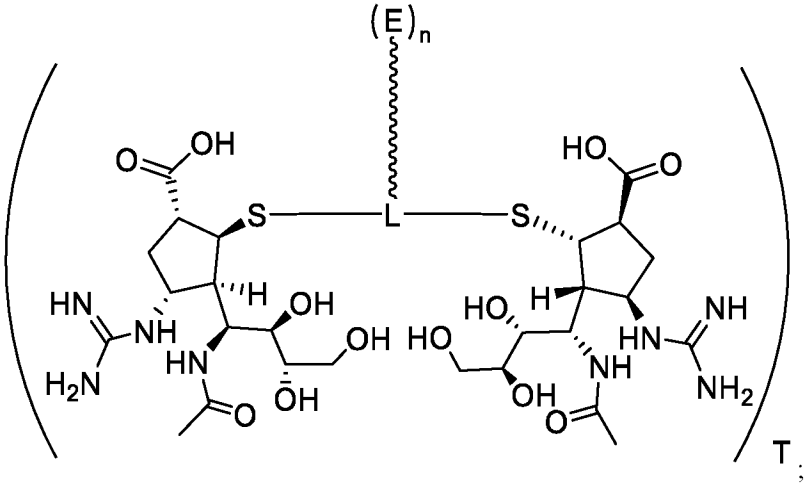
(D-IX-3)



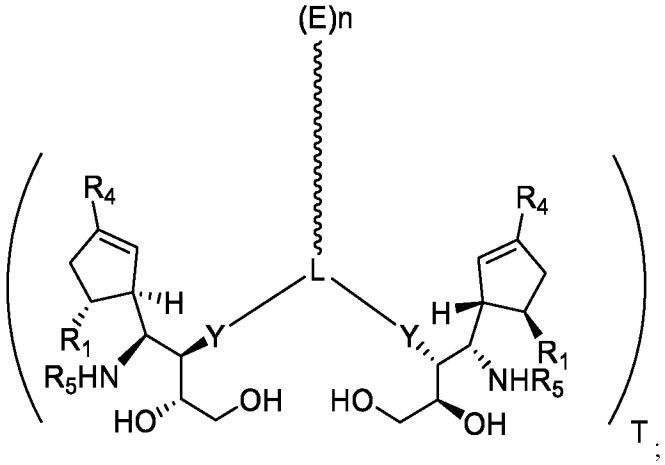
(D-IX-4)



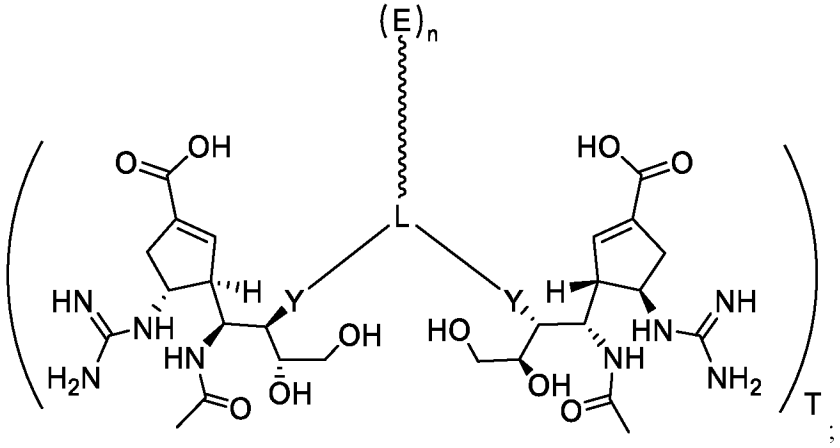
(D-IX-5)



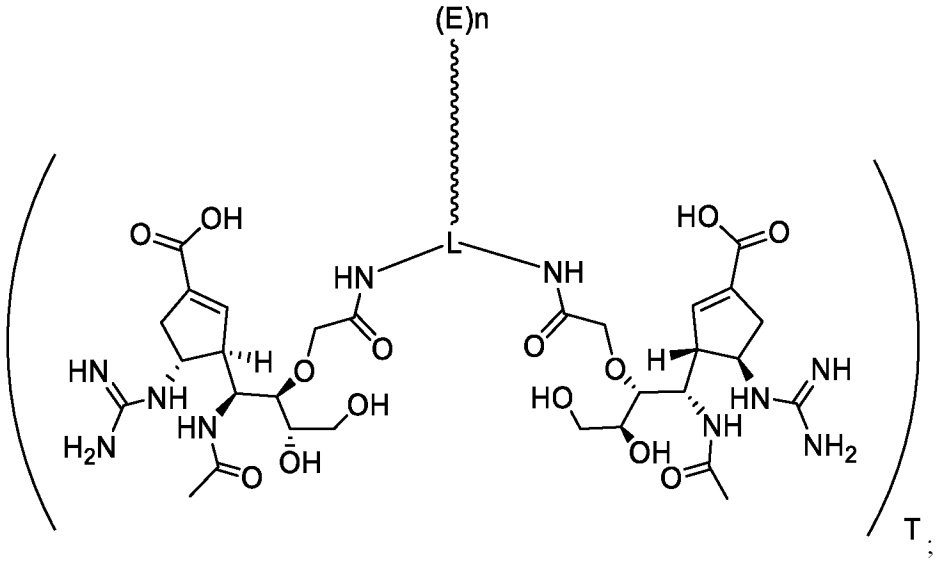
(D-IX-6)


(E)n
L
Y
Y
H
H
R4
R4
R1
R1
R5HN
NHR5
HO
OH
HO
OH
T

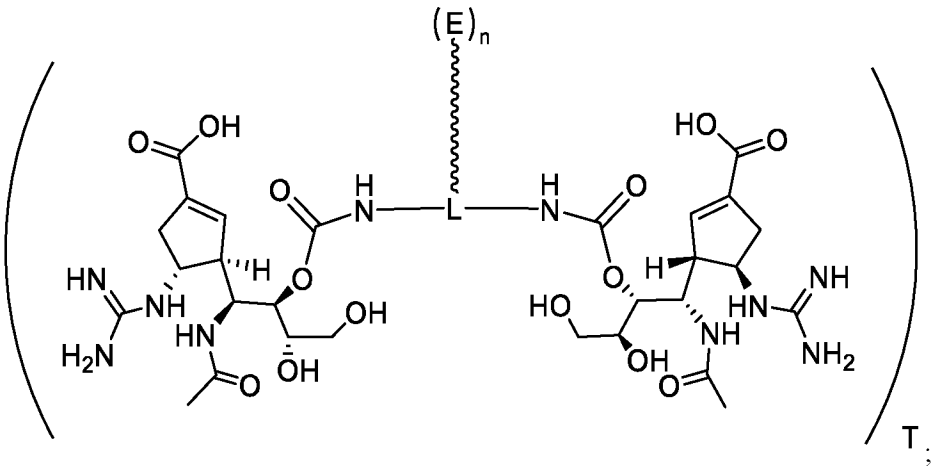
(D-X)


(E)n
L
Y
Y
H
H
O
OH
HO
O
HN
NH
H2N
HN
O
OH
HO
OH
HN
NH
NH2
O
T

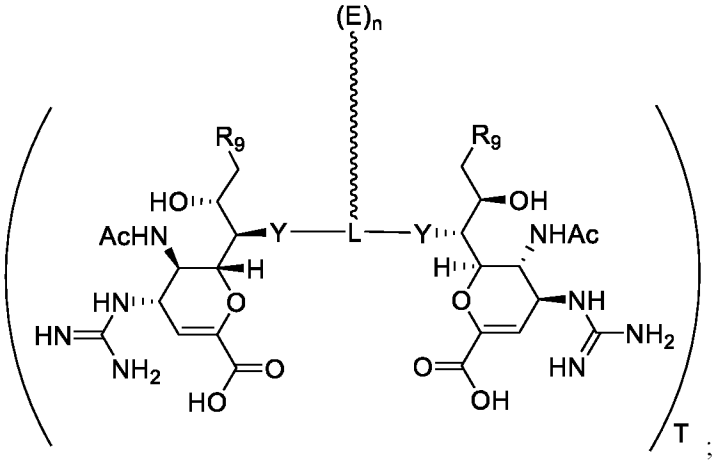
(D-X-1)


(E)n
L
HN
NH
O
O
H
H
O
O
O
OH
HO
O
HN
NH
H2N
HN
O
OH
HO
OH
HN
NH
NH2
O
T

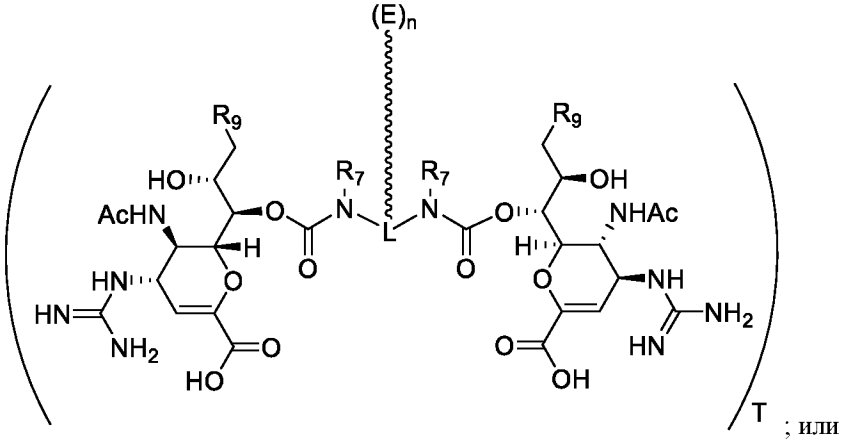
(D-X-2)



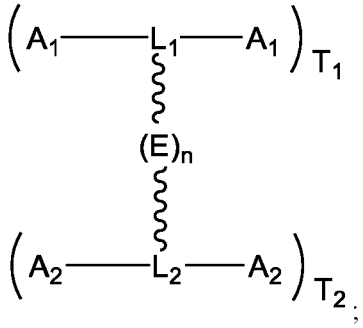
(D-X-3)



(D-XI)



(D-XI-1)



(D'-I)

или его фармацевтически приемлемой солью.

В описанных в данном документе конъюгатах волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) димеров ингибиторов нейраминидазы могут быть присоединены к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду. В некоторых вариантах осуществления, когда n равно 1, один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) димеров ингибиторов нейраминидазы могут быть присоединены к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду. В некоторых вариантах осуществления, когда n равно 2, один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 , 19 или 20) димеров ингибиторов нейраминидазы могут быть присоединены к Fc-домену. Волнистая линия в описанных в данном документе конъюгатах не должна рассматриваться как одинарная связь между одним или более димерами ингибиторов нейраминидазы и атомом в Fc-домене или белке альбумине. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 1, один димер ингибиторов нейраминидазы может быть присоединен к атому в мономере Fc-домена, Fc-домене, Fc-связывающем пептиде, белке альбумине или связывающем белок альбумин пептиде. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, два димера ингибиторов нейраминидазы могут быть присоединены к атому в мономере Fc-домена, Fc-домене, Fc-связывающем пептиде, белке альбумине или связывающем белок альбумин пептиде.

Как описано далее в данном документе, линкер в описанном в данном документе конъюгате (например, L или L') может быть разветвленной структурой. Как описано далее в данном документе, линкер в описанном в данном документе конъюгате (например, L или L') может быть поливалентной структурой, например, двухвалентной или трехвалентной структурой, имеющей два или три плеча, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, когда линкер имеет три плеча, два плеча могут быть присоединены к первому и второму ингибиторам нейраминидазы, а третье плечо может быть присоединено к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду.

В конъюгатах, имеющих Fc-домен, ковалентно связанный с одним или более димеров ингибиторов нейраминидазы, как представлено формулами выше, когда n равно 2, два мономера Fc-домена (каждый мономер Fc-домена обозначен буквой E) димеризуются с образованием Fc-домена.

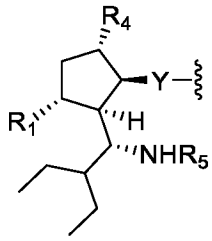
Конъюгаты мономеров ингибиторов нейраминидазы, связанных с Fc-доменом или белком альбумином

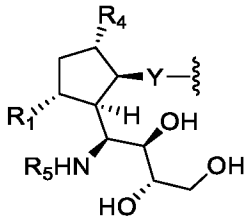
В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, описанные в данном документе, включают мономер Fc-домена, Fc-домен, Fc-связывающий пептид, белок альбумин или связывающий белок альбумин пептид, ковалентно связанный с одним или более мономерами ингибиторов нейраминидазы. Конъюгаты мономера Fc-домена или белка альбумина и одного или более мономеров ингибиторов нейраминидазы могут быть образованы путем связывания Fc-домена или белка альбумина с каждым из мономеров ингибиторов нейраминидазы через линкер, такой как любой из линкеров, описанных в данном документе.

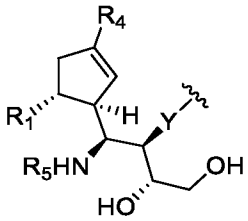
В конъюгатах, имеющих Fc-домен или белок альбумин, ковалентно связанный с одним или более мономерами ингибиторов нейраминидазы, описанных в данном документе, волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) мономеров ингибиторов нейраминидазы могут быть присоединены к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду. В некоторых вариантах осуществления, когда n равно 1, один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) мономеров

ингибиторов нейраминидазы могут быть присоединены к мономеру Fc-домена или белку альбумину. В некоторых вариантах осуществления, когда n равно 2, один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 , 19 или 20) мономеров ингибиторов нейраминидазы могут быть присоединены к Fc-домену. Волнистая линия в описанных в данном документе конъюгатах не должна рассматриваться как одинарная связь между одним или более мономерами ингибиторов нейраминидазы и атомом мономера Fc-домена, Fc-домена, Fc-связывающего пептида, белка альбумина или связывающего белок альбумин пептида. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 1, один мономер ингибитора нейраминидазы может быть присоединен к атому в мономере Fc-домена, Fc-домене, Fc-связывающем пептиде, белке альбумине или связывающем белок альбумин пептиде. В некоторых вариантах осуществления, когда T равно 2, два мономера ингибиторов нейраминидазы могут быть присоединены к атому в мономере Fc-домена, Fc-домене, Fc-связывающем пептиде, белке альбумине или связывающем белок альбумин пептиде.

В некоторых вариантах осуществления, когда T больше 1 (например, T равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, или 20), каждый A_1-L может быть выбран независимо (например, независимо выбран из любой из описанных в данном документе структур A_1-L). В некоторых вариантах осуществления E может быть конъюгирован с 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различными фрагментами A_1-L . В некоторых вариантах осуществления E конъюгирован с первым фрагментом A_1-L и со вторым фрагментом A_1-L. В некоторых вариантах осуществления A_1 первого фрагмента A_1-L выбран из любой из формул (A-III)-(A-V):



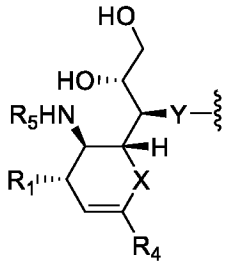
,


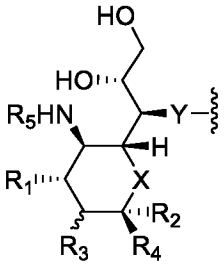
,


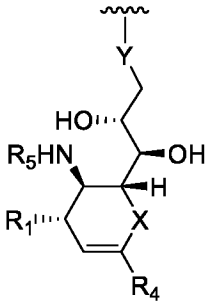
;

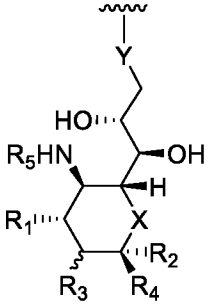
(A-III) (A-IV) (A-V)

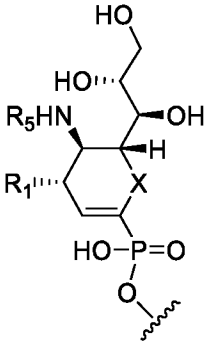
и A_1 второго фрагмента A_1-L выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X), или (A-XIII):



,


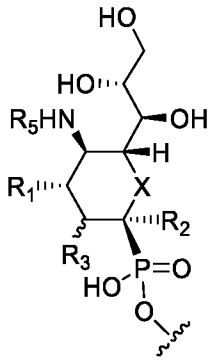
,


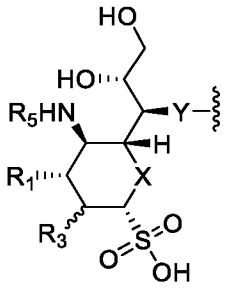
,


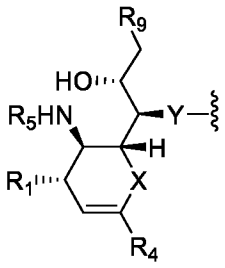
,


,

(A-I) (A-II) (A-VI) (A-VII) (A-VIII)



;


;


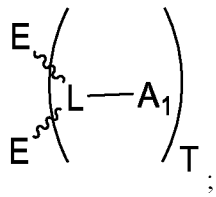
.

(A-IX) (A-X) (A-XIII)

В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент A_1-L специфически конъюгирован с остатками лизина E (например, атомами азота экспонированных на поверхности остатков лизина E), а второй фрагмент A_1-L специфически конъюгирован с остатками цистеина E (например, с атомами серы экспонированных на поверхности остатков цистеина E). В некоторых вариантах осуществления первый фрагмент A_1-L конъюгирован специфически с остатками цистеина E (например, атомы серы остатков цистеина, экспонированных на поверхности E), а второй фрагмент A_1-L конъюгирован специфически с остатками лизина E (например, атомы азота на поверхности экспонированы остатками лизина E).

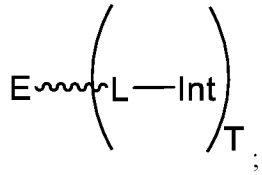
Как описано далее в данном документе, линкер в конъюгате, имеющем мономер Fc-домена, Fc-домен, Fc-связывающий пептид, белок альбумин или связывающий белок альбумин пептид, ковалентно связанный с одним или более мономерами ингибиторов нейраминидазы, описанных в данном документе (например, L или L') может представлять собой двухвалентную структуру, имеющую два плеча. Одно плечо двухвалентного линкера может быть присоединено к мономеру ингибитора нейраминидазы, а другое плечо может быть присоединено к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат, содержащий мономер Fc-домена, Fc-домен, Fc-связывающий пептид, белок альбумин или связывающий белок альбумин пептид, ковалентно связанный с одним или более мономерами ингибиторов нейраминидазы, представленных в данном документе, описан любой из следующих формул:



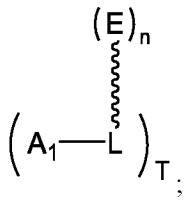
;

(2)

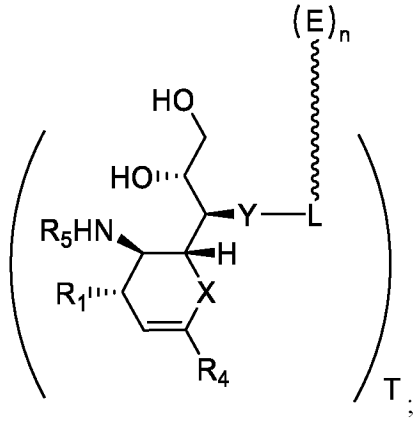


;

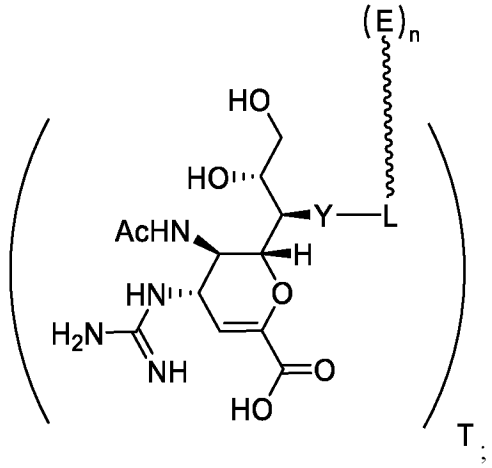
(5)



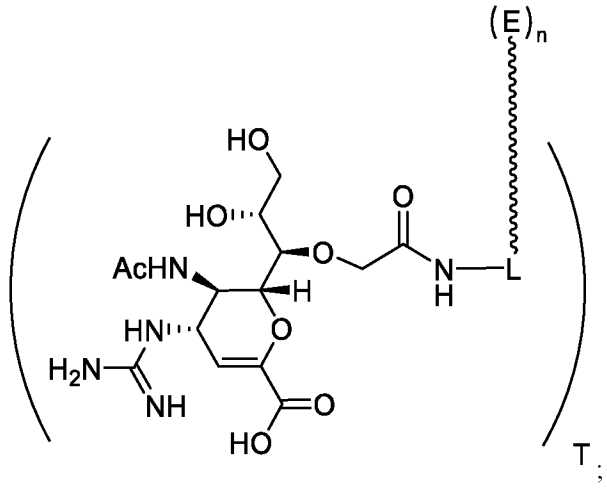
(M-I)



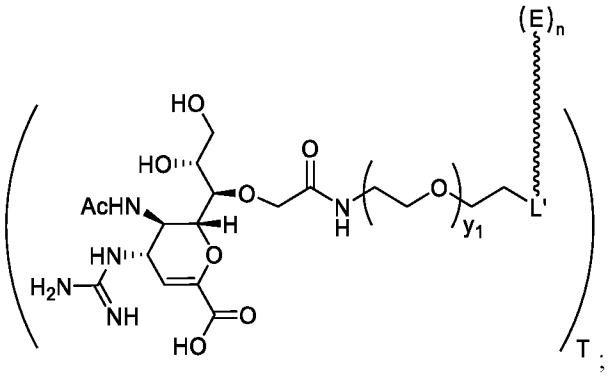
(M-II)



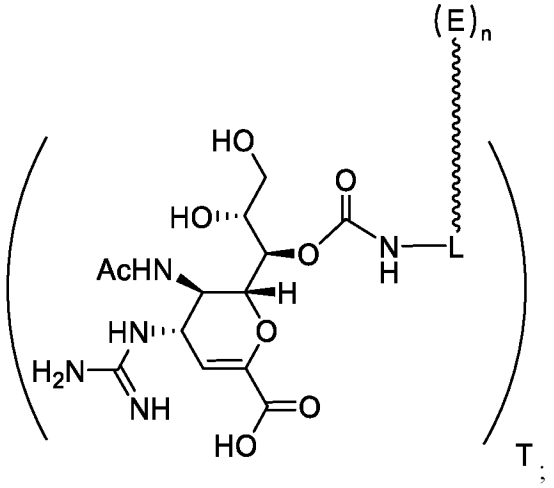
(M-II-1)



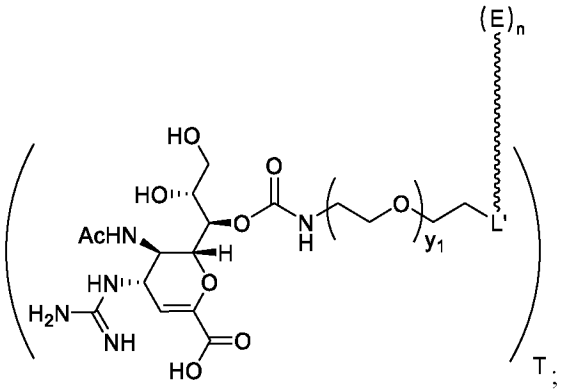
(M-II-2)



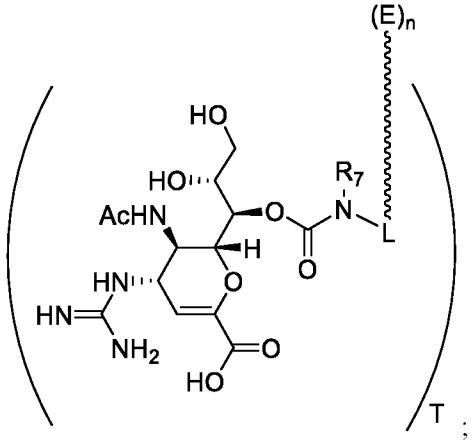
(M-II-3)



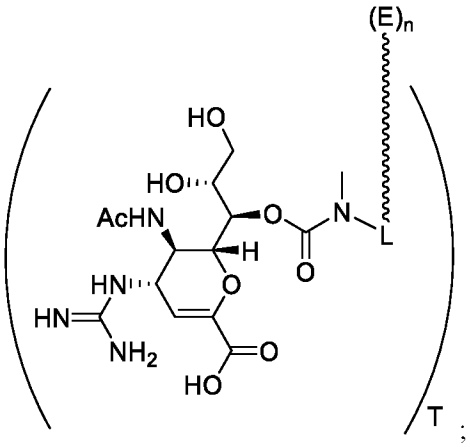
(M-II-4)



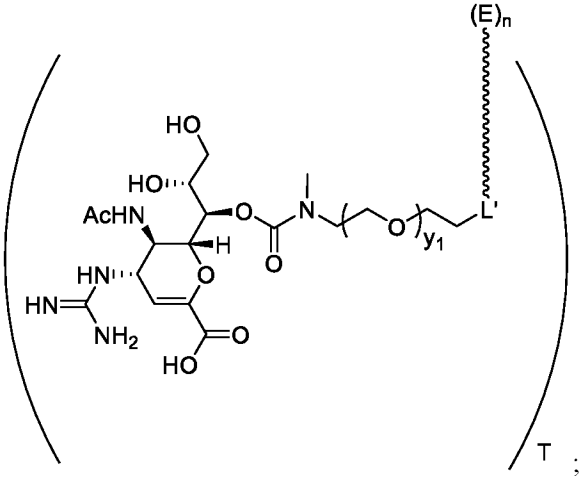
(M-II-5)



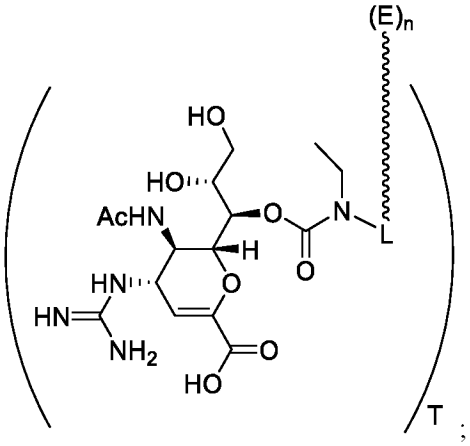
(M-II-6)



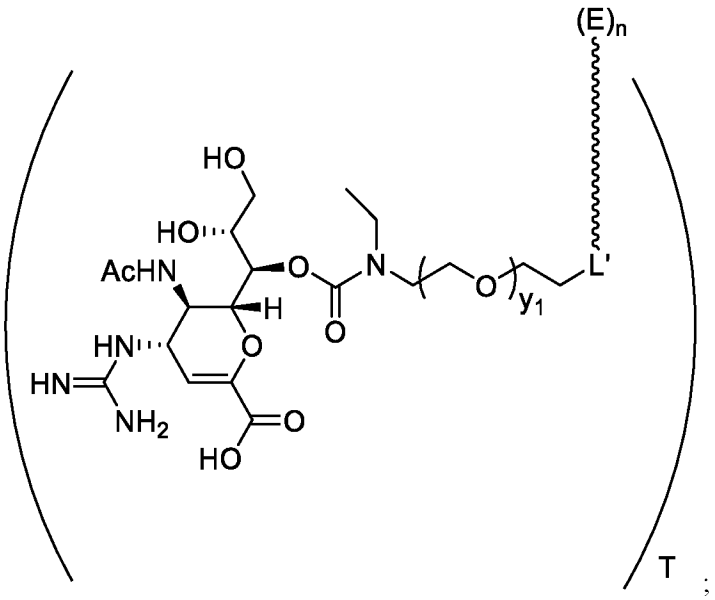
(M-II-7)



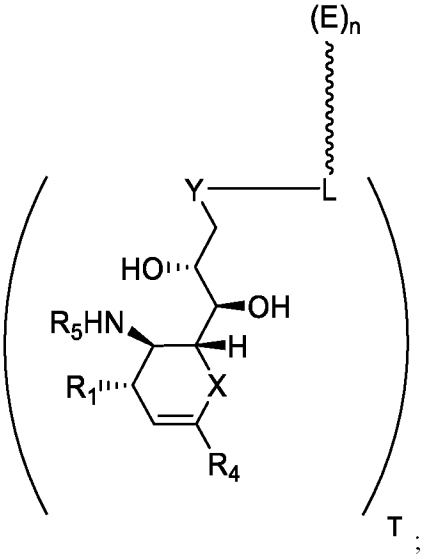
(M-II-8)



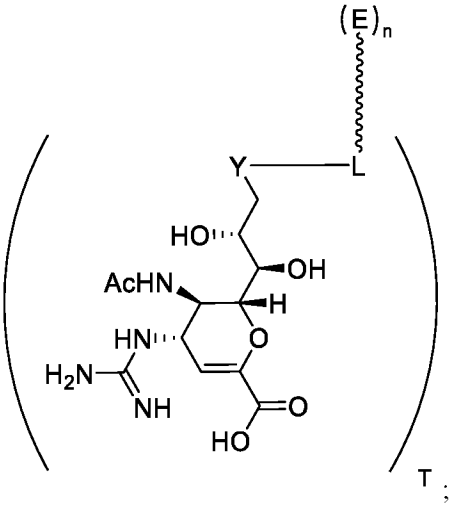
(M-II-9)



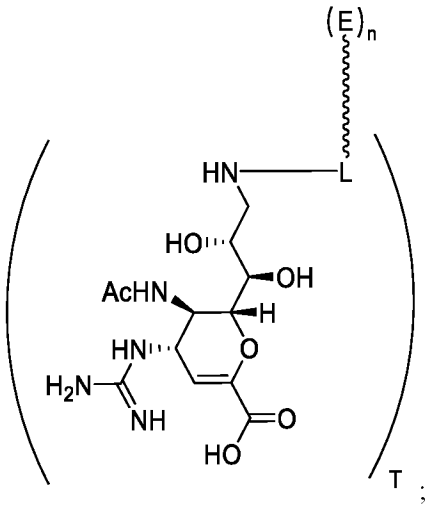
(M-II-10)



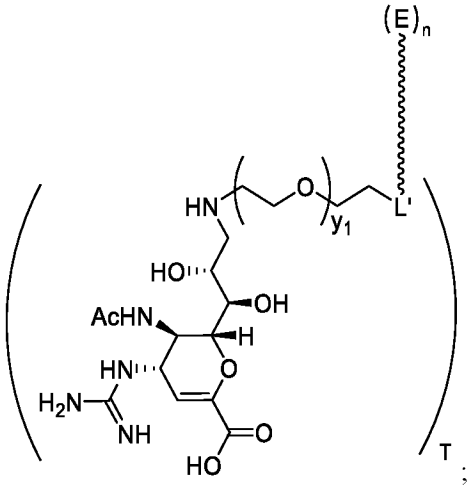
(M-III)



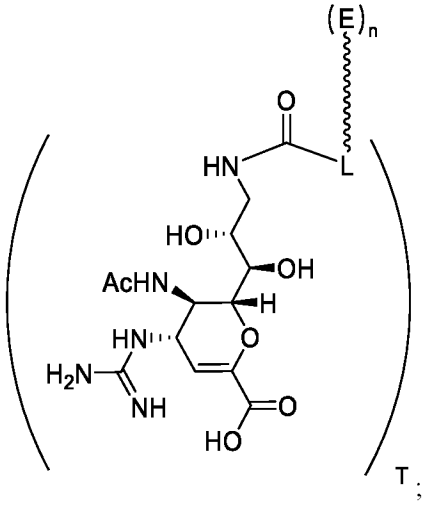
(M-III-1)



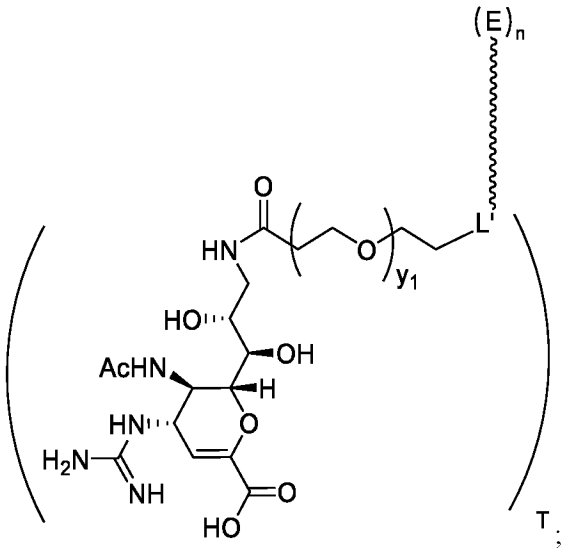
(M-III-2)



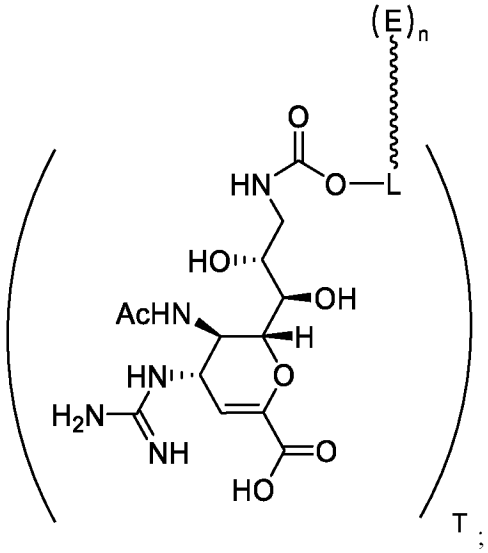
(M-III-3)



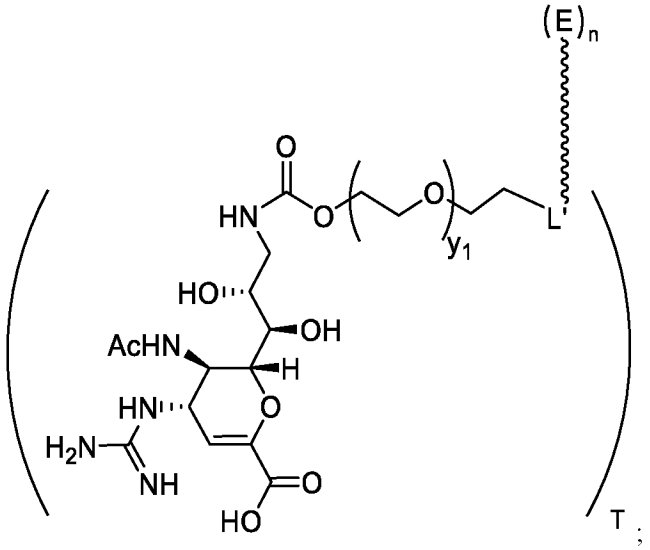
(M-III-4)



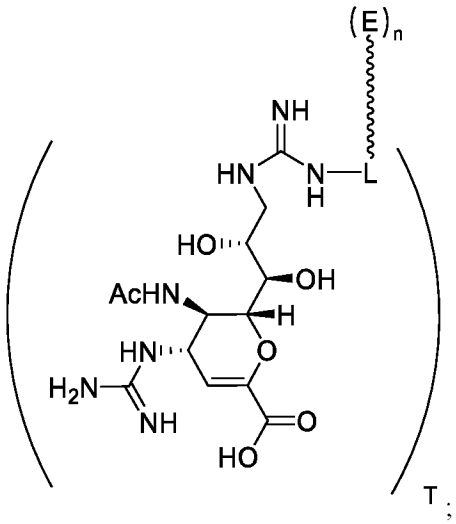
(M-III-5)



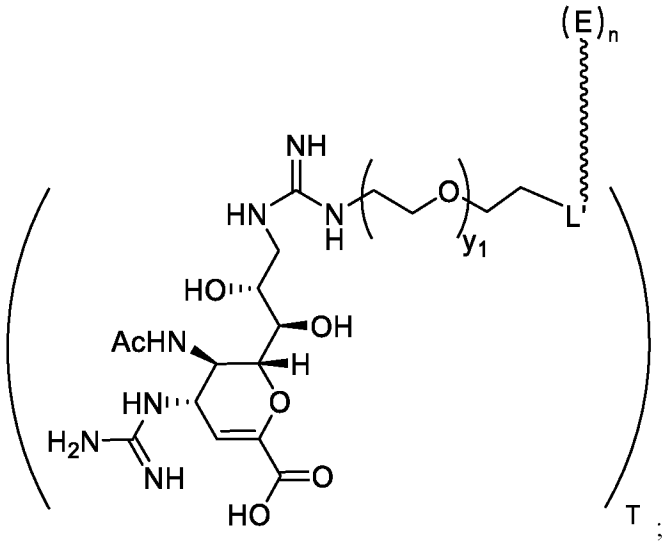
(M-III-6)



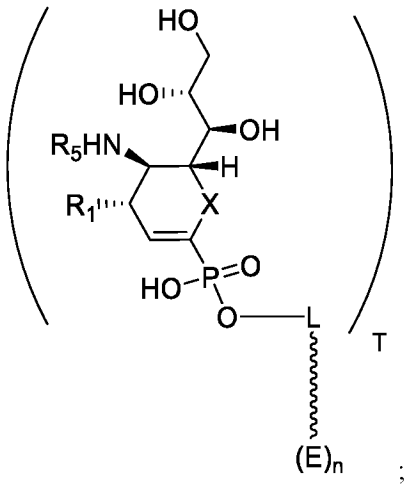
(M-III-7)



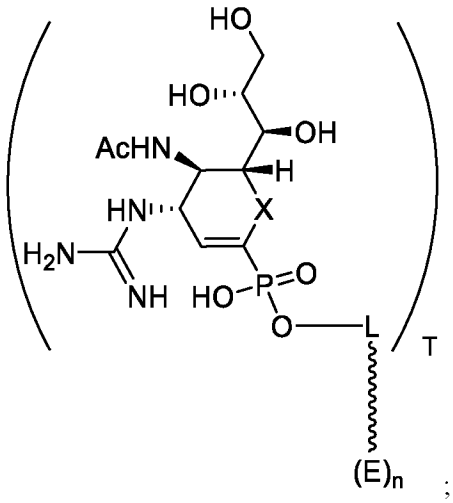
(M-III-8)



(M-III-9)

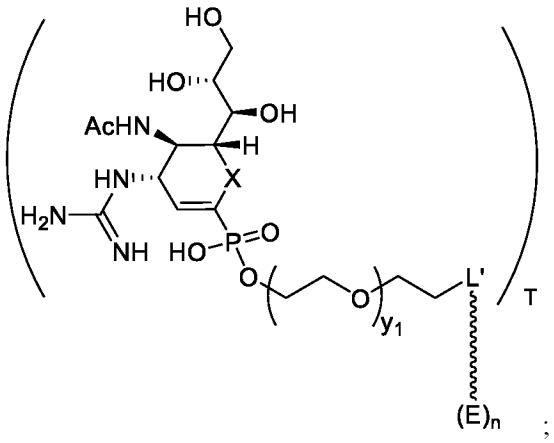


(M-IV)



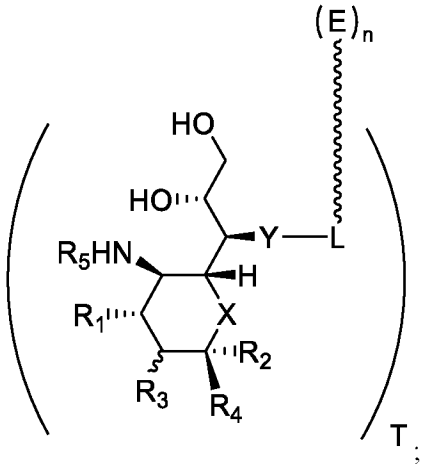
;

(M-IV-1)



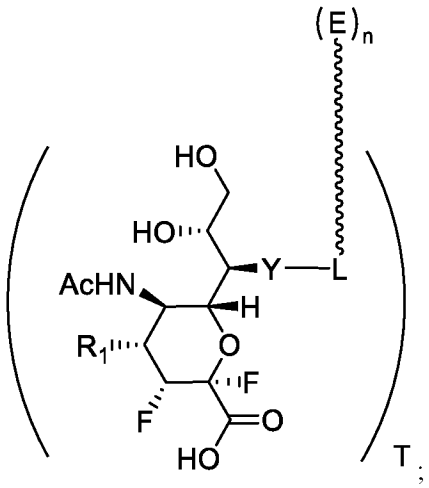
;

(M-IV-2)

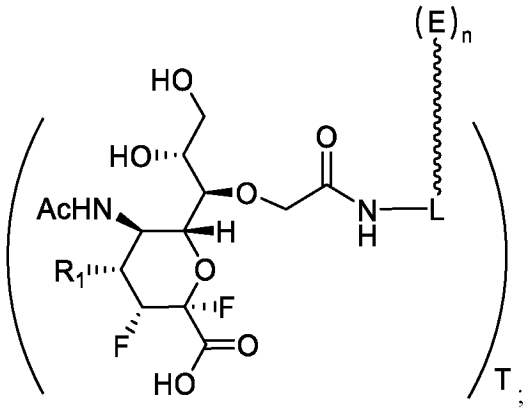


;

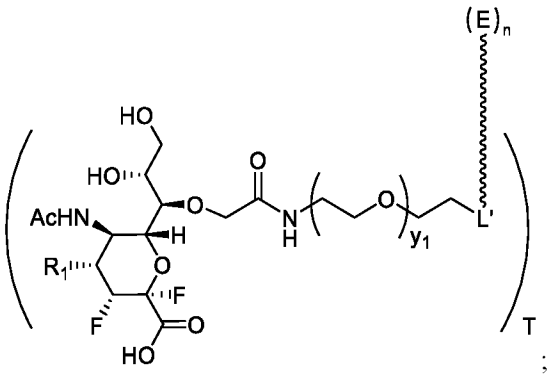
(M-V)



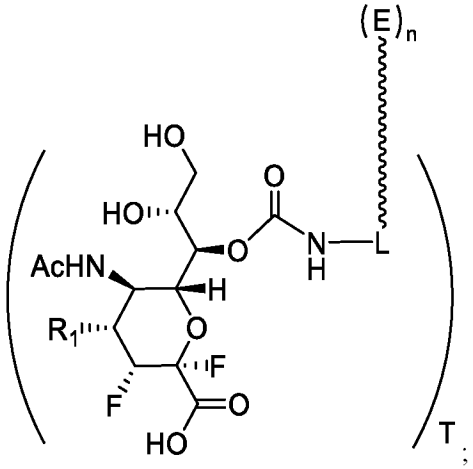
(M-V-1)



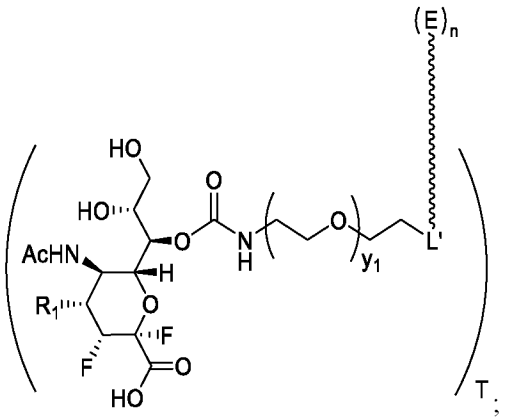
(M-V-2)



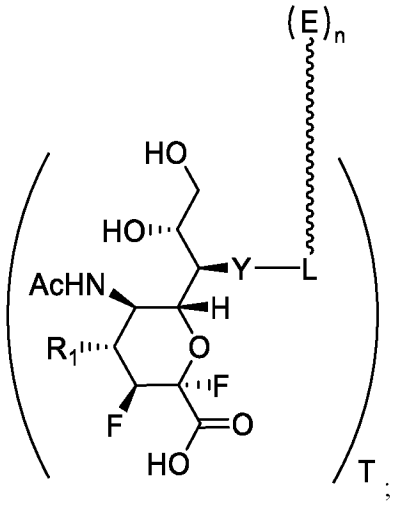
(M-V-3)



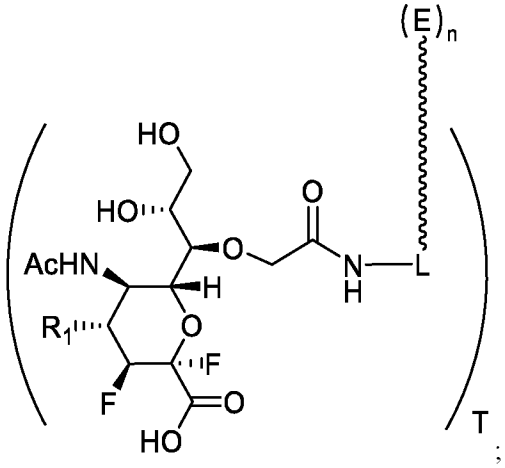
(M-V-4)



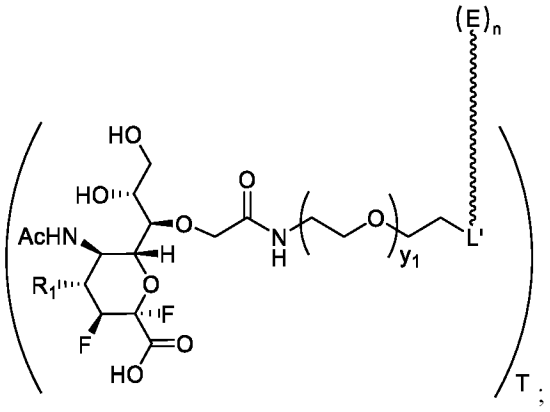
(M-V-5)



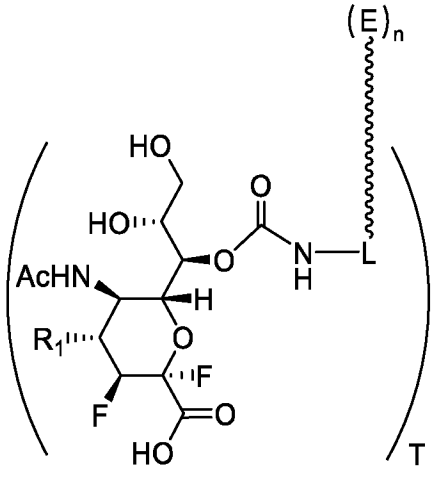
(M-V-6)



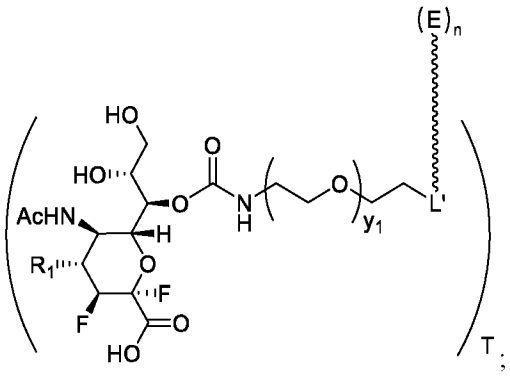
(M-V-7)



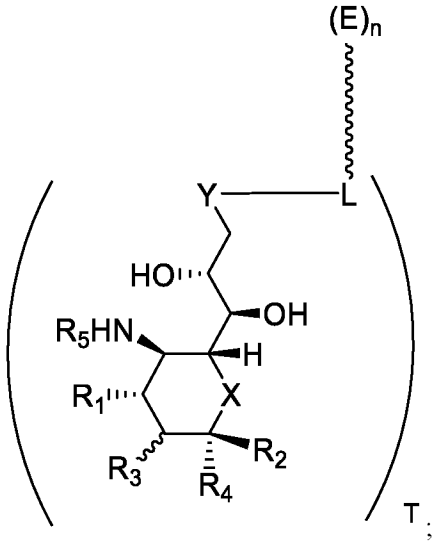
(M-V-8)



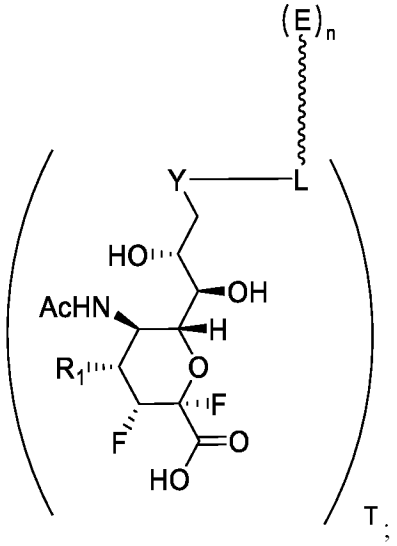
(M-V-9)



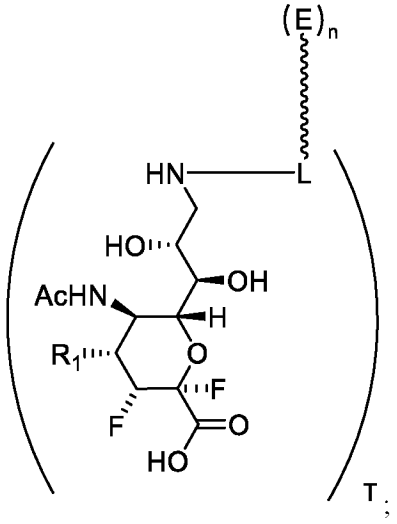
(M-V-10)



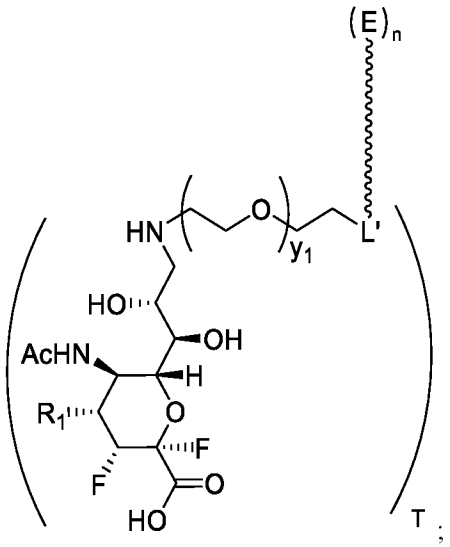
(M-VI)



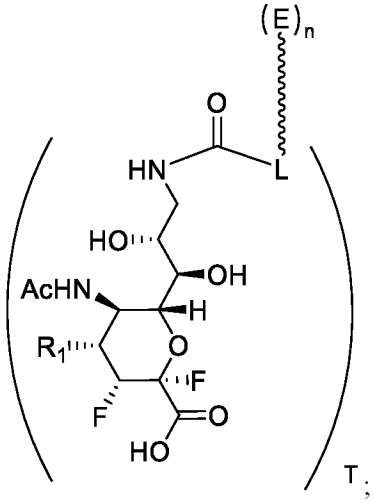
(M-VI-1)



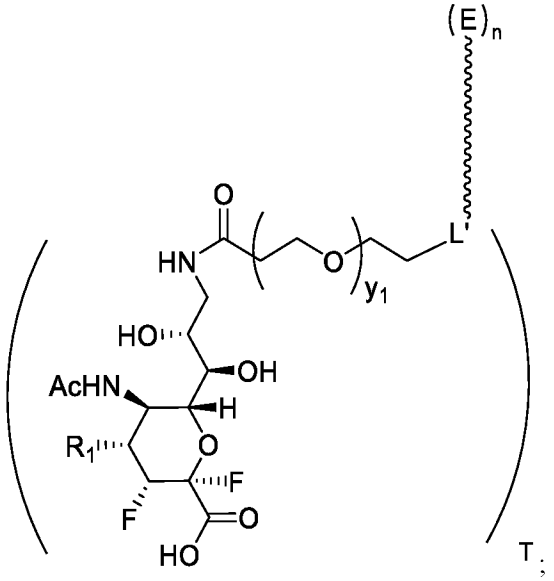
(M-VI-2)



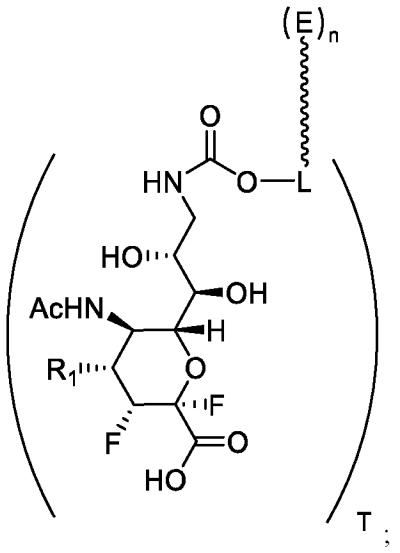
(M-VI-3)



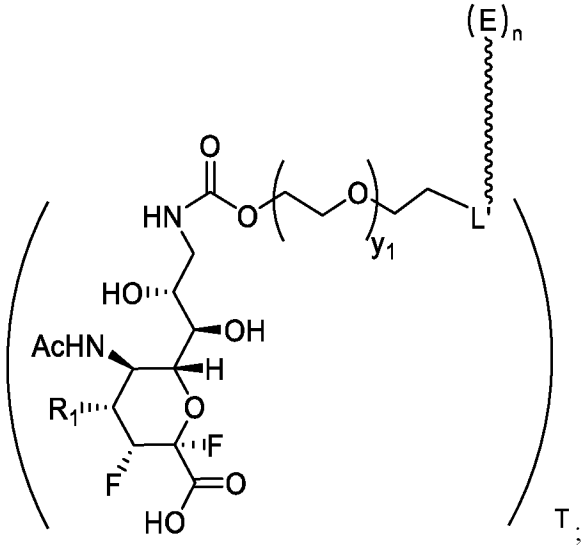
(M-VI-4)



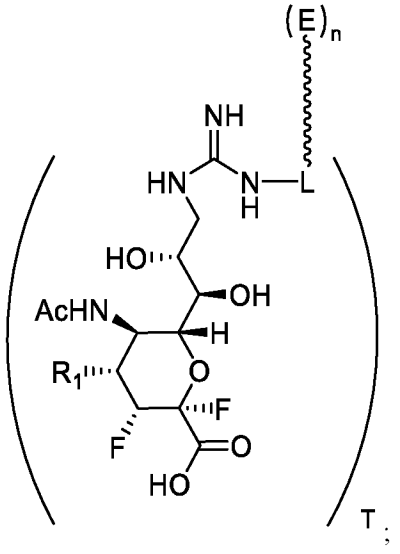
(M-VI-5)



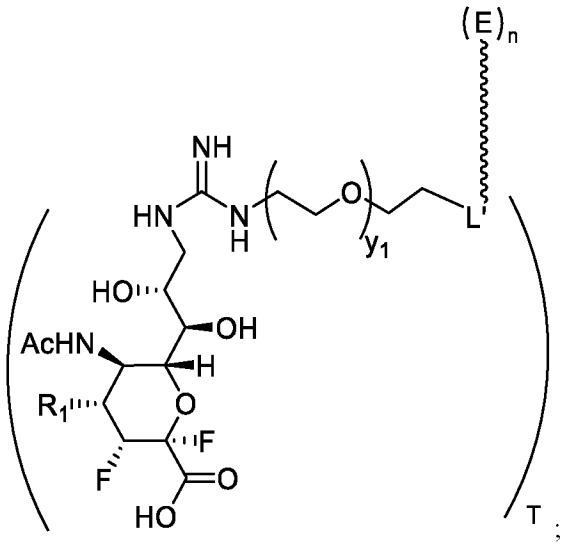
(M-VI-6)



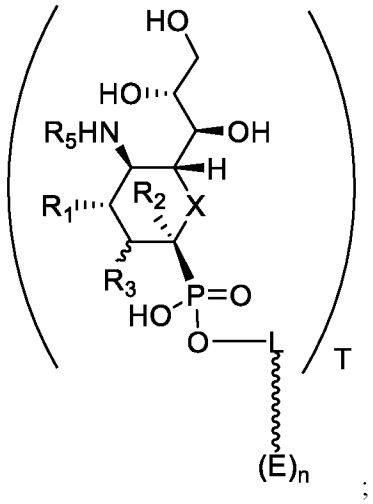
(M-VI-7)



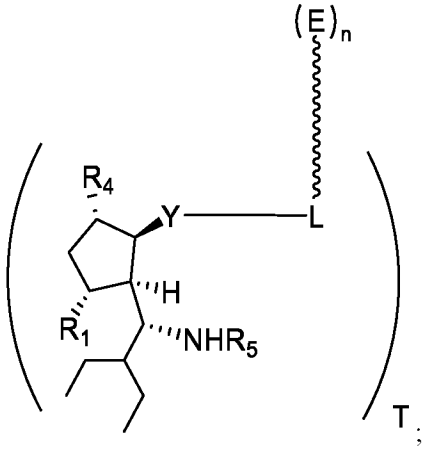
(M-VI-8)



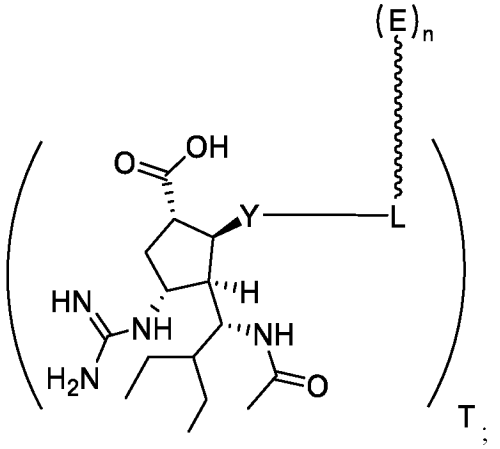
(M-VI-9)



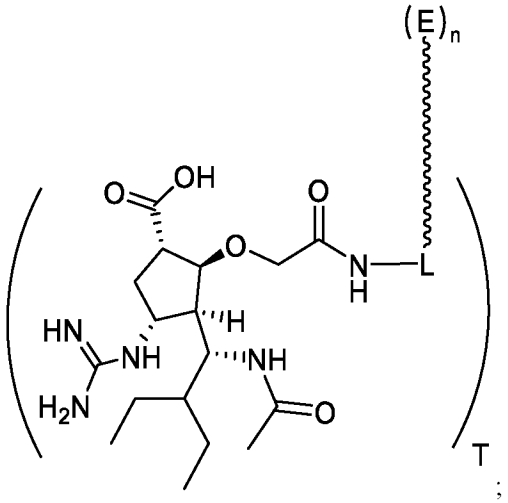
(M-VII)



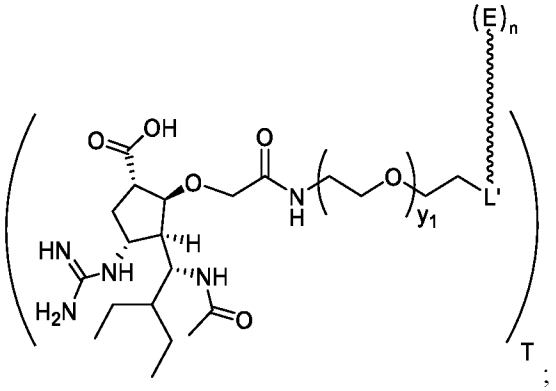
(M-VIII)



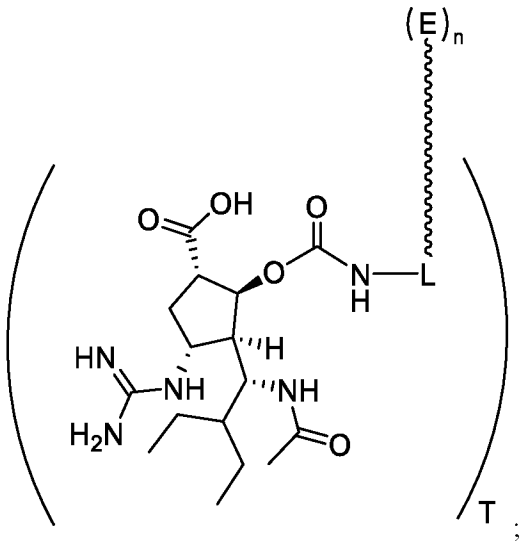
(M-VIII-1)



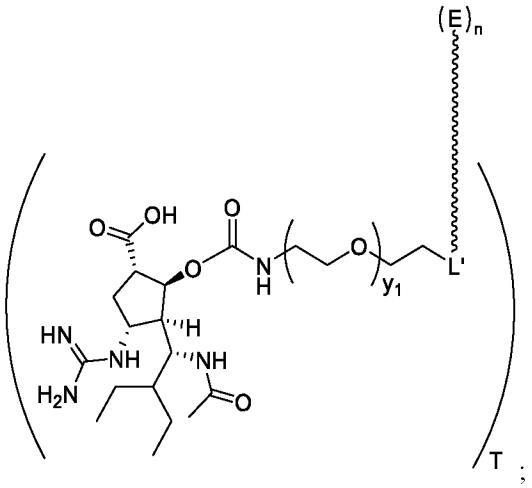
(M-VIII-2)



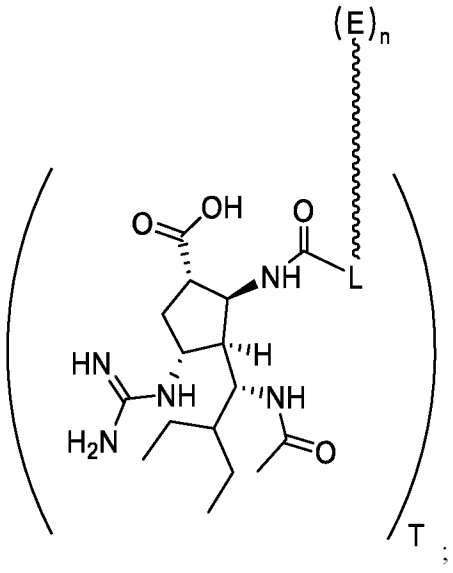
(M-VIII-3)



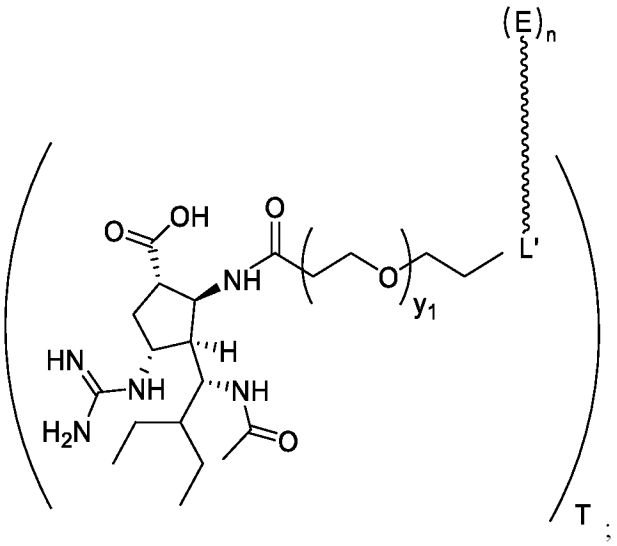
(M-VIII-4)



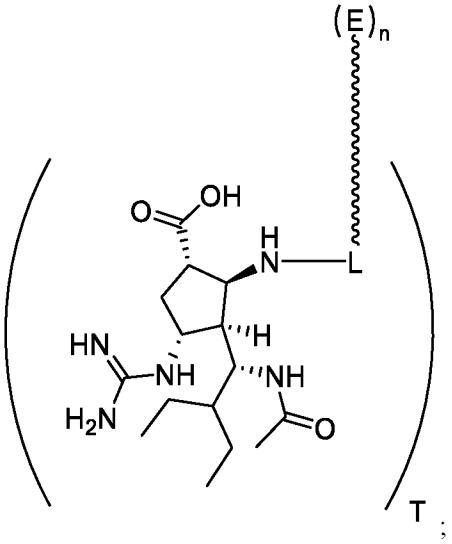
(M-VIII-5)



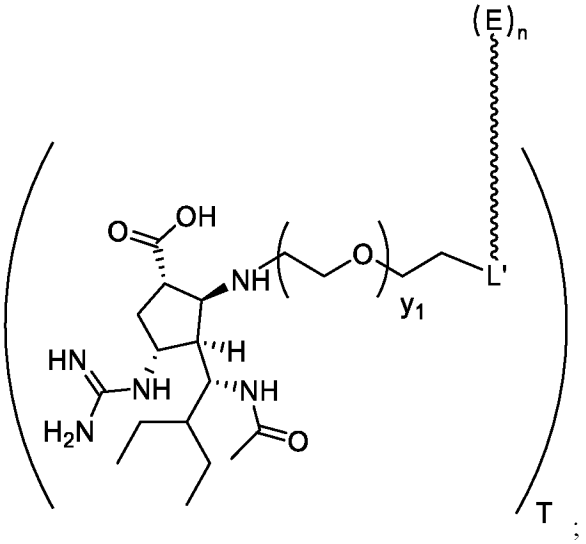
(M-VIII-6)



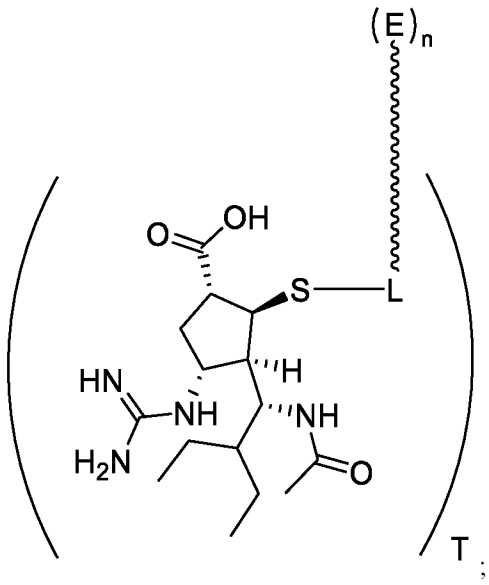
(M-VIII-7)



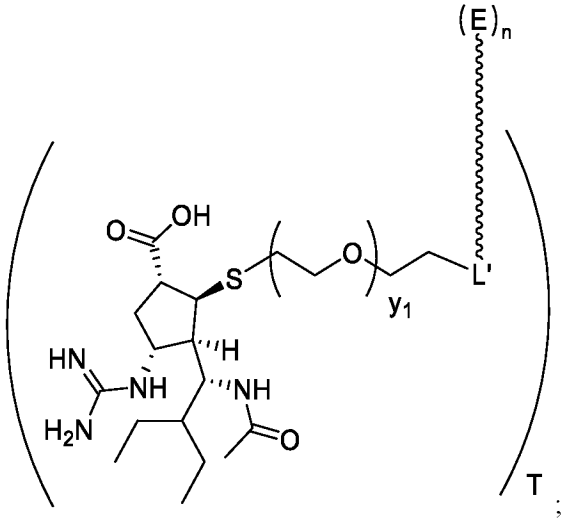
(M-VIII-8)



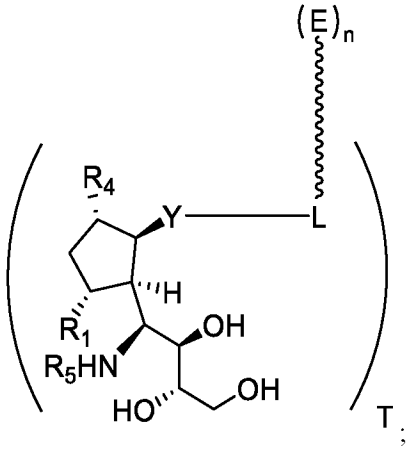
(M-VIII-9)



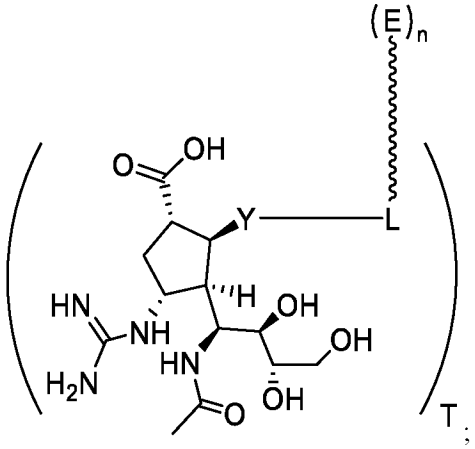
(M-VIII-10)



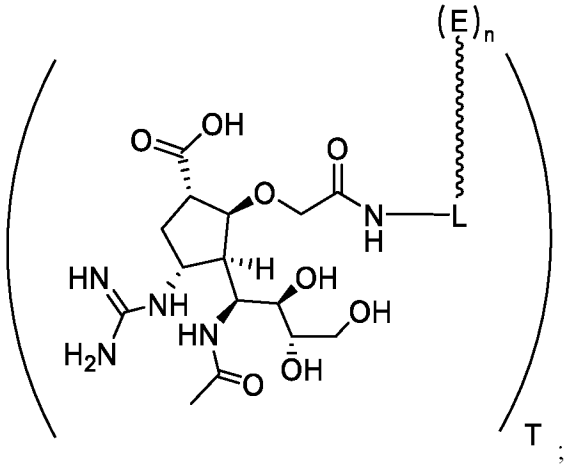
(M-VIII-11)



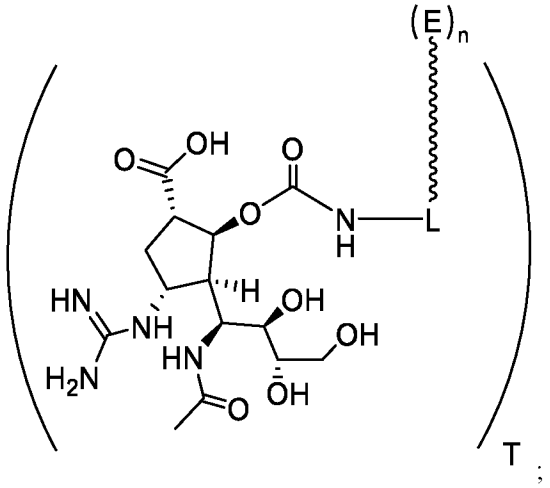
(M-IX)



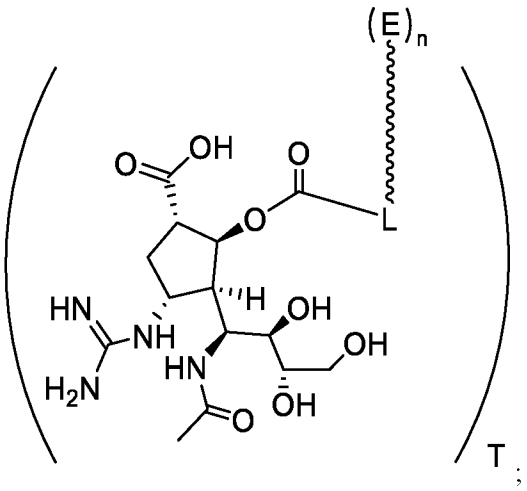
(M-IX-1)



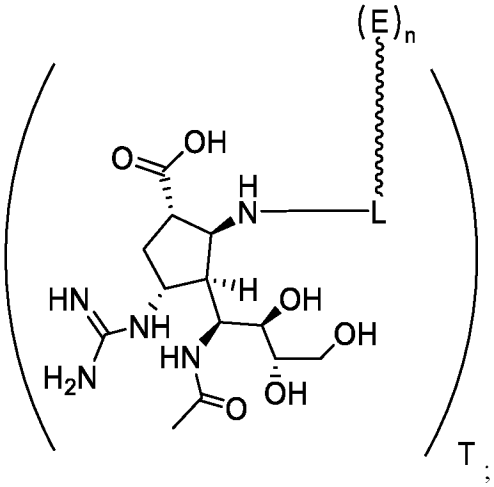
(M-IX-2)



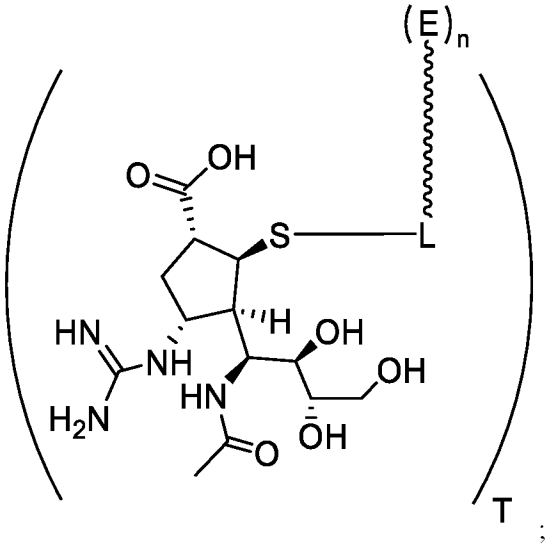
(M-IX-3)



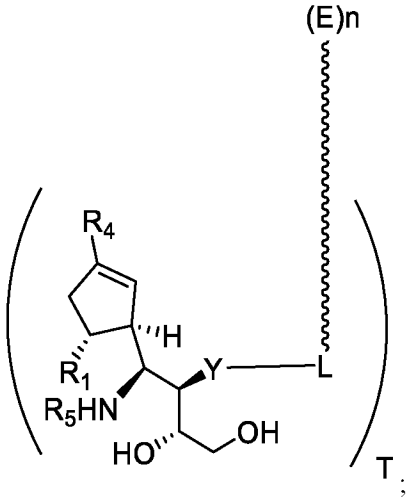
(M-IX-4)



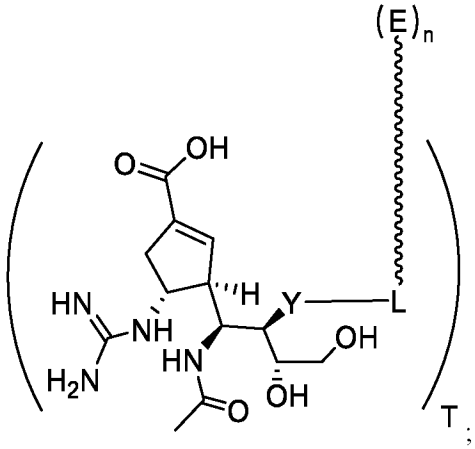
(M-IX-5)



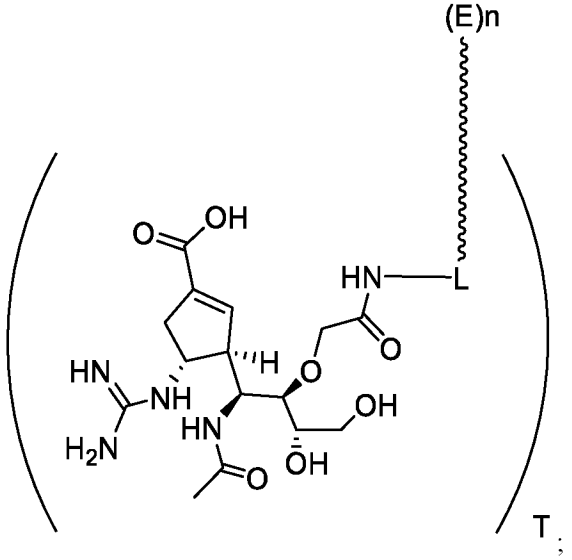
(M-IX-6)


(E)n
R4
H
R1
Y
L
R5HN
HO
OH
T

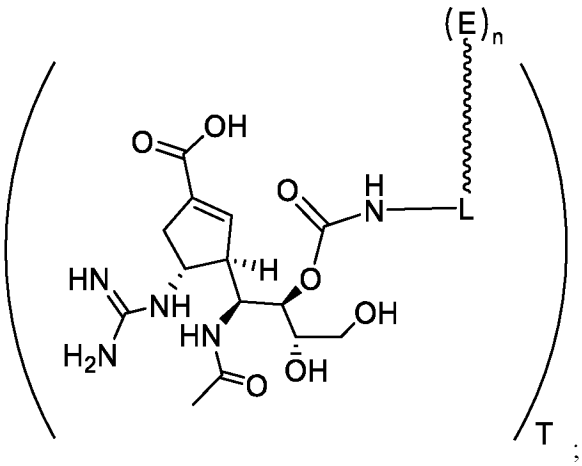
(M-X)


(E)n
O
OH
HN
NH
H2N
H
Y
L
HN
OH
O
OH
T

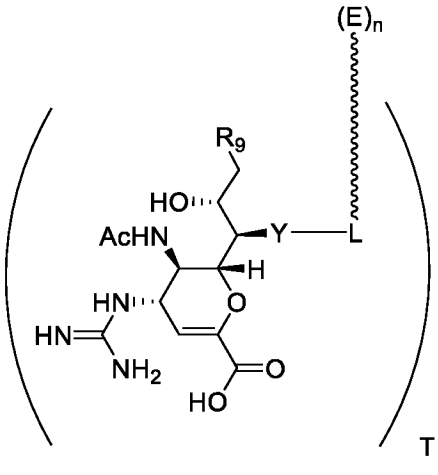
(M-X-1)


(E)n
O
OH
HN
L
O
HN
NH
H2N
H
O
OH
HN
O
OH
T

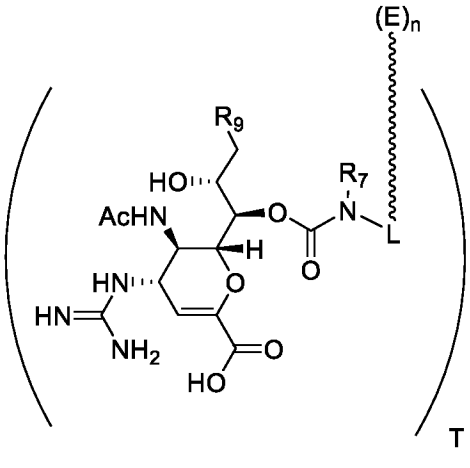
(M-X-2)



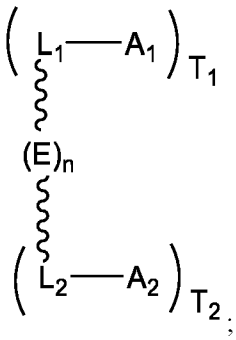
(M-X-3)



(M-XI)



(M-XI-1)



(M'-I)

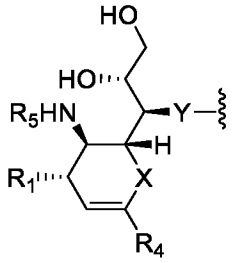
или его фармацевтически приемлемой солью.

В конъюгатах, имеющих Fc-домен, ковалентно связанный с одним или более мономеров ингибиторов нейраминидазы, как представлено формулами выше, когда n равно 2, два мономера Fc-домена (каждый мономер Fc-домена обозначен буквой E) димеризуются с образованием Fc-домена.

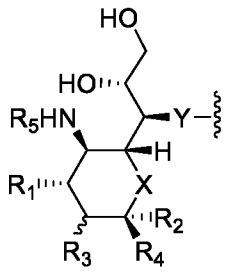
Региоизомеры конъюгатов, включая занамивир или его аналоги

Конъюгаты (например, мономерные или димерные конъюгаты, как подробно описано в данном документе) могут быть получены в виде смеси или региоизомеров. Конкретный региоизомер или смесь региоизомеров могут быть предпочтительными по таким причинам, как простота синтеза, термостабильность, окислительная стабильность, фармакокинетика (например, метаболическая стабильность или биодоступность), связывание эффектора или терапевтическая эффективность.

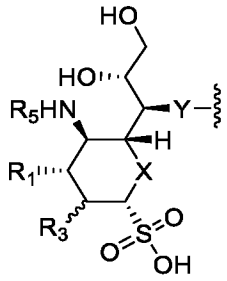
В некоторых вариантах осуществления конъюгат по изобретению включает занамивир или его аналог (например, любой из (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X) или (A-XIII)). Занамивир или его аналог могут быть конъюгированы с Fc-доменом или белком альбумином (например, посредством линкера), например, через положение C7 (см., например, (A-I), (A-II), (A-X) или (A-XIII)) или через положение C9 (см., например, (A-VI) или (A-VII)):



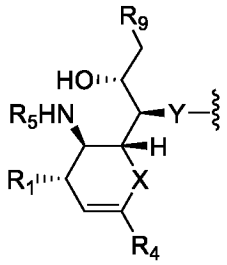
(A-I), конъюгация C7,



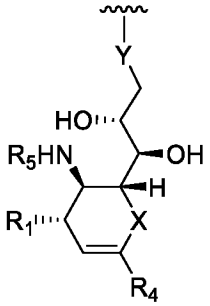
(A-II), конъюгация C7,



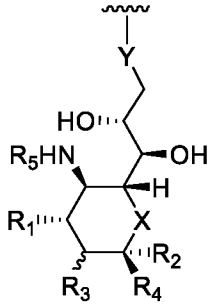
(A-X), конъюгация C7,



(A-XIII), конъюгация C7



(A-VI), конъюгация C9,



(A-VII), конъюгация C9,

Настоящее раскрытие включает популяцию мономерных конъюгатов (например, популяцию конъюгатов формулы (M-I)), где популяция конъюгатов включает любой из мономерных конъюгатов, описанных в данном документе, и один или более из его соответствующих региоизомеров. Например, популяция конъюгатов может включать (1) занамивир или его аналог, конъюгированный (например, посредством линкера) в положении C7 с Fc-доменом или белком альбумина, и (2) занамивир или его аналог, конъюгированный (например, посредством линкера) в положении C9 с Fc-доменом или белком альбумином. Популяция мономерных конъюгатов может иметь указанное отношение C7-связанного конъюгата к C9-связанному конъюгату. Например, популяция конъюгатов может иметь по существу 100% C7-связанного конъюгата, и по существу 0% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 95% C7-связанного конъюгата, и около 5% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 90% C7-связанного конъюгата, и около 10% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 85% C7-связанного конъюгата, и около 15% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 80% C7-связанного конъюгата, и около 20% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 75% C7-связанного конъюгата, и около 25% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 70% C7-связанного конъюгата, и около 30% C9-связанного конъюгата. Популяция

конъюгатов может иметь около 65% C7-связанного конъюгата, и около 35% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 60% C7-связанного конъюгата, и около 40% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 55% C7-связанного конъюгата, и около 45% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 50% C7-связанного конъюгата, и около 50% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 45% C7-связанного конъюгата, и около 55% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 40% C7-связанного конъюгата, и около 60% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 35% C7-связанного конъюгата, и около 65% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 30% C7-связанного конъюгата, и около 70% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 25% C7-связанного конъюгата, и около 75% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 20% C7-связанного конъюгата, и около 80% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 15% C7-связанного конъюгата, и около 85% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь около 10% C7-связанного конъюгата, и около 90% C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может иметь по существу 0% C7-связанного конъюгата и по существу 100% C9-связанного конъюгата.

Популяция конъюгатов может иметь более 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60%, 65%, 60%, 55% или 50% C7-связанного конъюгата.

Популяция конъюгатов может иметь менее 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% C9-связанного конъюгата.

Настоящее раскрытие также включает популяцию димерных конъюгатов (например, популяцию конъюгатов формулы (D-I)), где популяция конъюгатов включает любой из димерных конъюгатов, описанных в данном документе, и один или более из его соответствующих региоизомеров. Например, популяция конъюгатов может включать (1) C7-C7 димер (например, части димера занамивира или его аналога конъюгированы (например, посредством линкера) в их соответствующих положениях C7 с Fc-доменом или белком альбумином), (2) C9-C9 димер (например, обе части димера занамивира или его аналога конъюгированы (например, посредством линкера) в своих соответствующих положениях C9 с Fc-доменом или белком альбумином), и/или (3) C7-C7 димер (например, одна часть занамивира или его аналога конъюгирована (например, посредством линкера) с Fc-доменом или белком альбумином через его положение C7, а другой занамивир или аналог его фрагмента конъюгирован (например, посредством линкера) с Fc-доменом или белком альбумином через его положение C9).

Популяция димерных конъюгатов может иметь определенное отношение C7-C7-связанного конъюгата к C7-C9-связанному конъюгату, и C9-C9-связанному конъюгату. Например, популяция конъюгатов может содержать по существу 100% C7-C7-связанного конъюгата и по существу 0% C7-C9- или C9-C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может содержать по существу 100% C9-C9-связанного конъюгата и по существу 0% C7-C7- или C7-C9-связанного конъюгата. Популяция конъюгатов может содержать по существу 100% C7-C9-связанного конъюгата и по существу 0% C7-C7- или C9-C9-связанного конъюгата.

Популяция конъюгатов может иметь более 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60%, 65%, 60%, 55% или 50% C7-C7-связанного конъюгата.

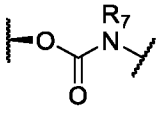
Популяция конъюгатов может иметь менее 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% C9-C9-связанного конъюгата.

Популяция конъюгатов может иметь менее 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или

1% C7-C9-связанного конъюгата.

Для любой из описанных выше популяций региоизомеров A_1 и/или A_2 (например, из (MI) или (DI)) могут быть выбраны из занамивира или любого из аналогов занамивира, описанных в данном документе (например, любого из (A-I), (A-II), (A-VI), (A-VII), (A-VIII), (A-IX), (A-X) или (A-XIII)). В частности, C7-связанный занамивир или его аналоги описаны (AI), (A-II), (A-X) и (A-XIII), а C9-связанный занамивир или его аналоги описаны (A-VI) или (A-VII). Иллюстративные способы получения региоизомеров, например, C7, C9, C7-C7, C7-C9 и C9-C9-связанных региоизомеров, описаны в примерах 100-103, 123 и 124. В некоторых случаях может быть предпочтительным наличие 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более или по существу 100% C7-связанных конъюгатов мономеров или C7-C7-связанных конъюгатов димеров. В этих случаях может быть предпочтительным получить промежуточное соединение с помощью способа, который образует по существу C7-связанное мономерное или C7-C7-связанное димерное промежуточное соединение, таких как способы, описанные, например, в примерах 103 и 123. Способ примера 103 является примером способов, используемых в первую очередь для получения C7- или C7-C7-связанного промежуточного соединения и может использоваться для получения любого промежуточного соединения, описанного в данном документе.

Аналоги занамивира, имеющие модификацию (например, заместитель, отличный от OH) в положении C9 (например, аналоги занамивира, описанные в (A-XIII)) могут увеличивать соотношение занамивира, связанного с C7, к занамивиру, связанному с C9, путем предотвращения миграции из C7-связанного занамивира к C9-связанному занамивиру. Примеры аналогов C9-модифицированных занамивира описаны в данном документе (см., например, конъюгаты, описанные D-XI или M-XI, например, конъюгат 47 (ПС-91) или конъюгат 48 (ПС-92).

В предпочтительных вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат любой из формул (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I), где A_1 и/или A_2 описаны формулой (AI), (A-II), (A-X) или (A-XIII), а Y представляет собой  (-O(C=O)NR$_7$-), где R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила. В предпочтительных вариантах осуществления A_1 и/или A_2 описаны формулой (A-I) (например, занамивир). В предпочтительных вариантах осуществления R_7 представляет собой C1-C20 алкил (например, -CH_3, -CH_2CH_3, -$CH_2CH_2CH_3$). Было показано, что такие конъюгаты проявляют повышенную стабильность связи C7, что приводит к меньшей миграции C7 в C9 (см., например, конъюгаты, описанные D-II-6 или D-II-7, такие как конъюгат 45 (ПС-83) или конъюгат 46 (ПС-83)). Поэтому ожидается, что полученный продукт будет более гомогенным и покажет повышенную эффективность. Предпочтительный конъюгат является более гомогенным, имеет повышенную долю (например, по существу чистый, такой как чистота более 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) C7-связанного занамивира и сохраняет эффективность против гриппа.

III. Мономеры Fc-домена и Fc-домены

Мономер Fc-домена включает шарнирный домен, константный домен антитела C_H2 и константный домен антитела C_H3. Мономер Fc-домена может представлять собой иммуноглобулиновое антитело изотипа IgG, IgE, IgM, IgA или IgD. Мономер Fc-домена также может быть любого изотипа иммуноглобулинового антитела (например, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4). Мономер Fc-домена может быть любого аллотипа иммуноглобулинового антитела (например, IGHG1*01 (т. е., G1m(za)), IGHG1*07 (т. е., G1m(zax)), IGHG1*04

(т. е., G1m(zav)), IGHG1*03 (G1m(f)), IGHG1*08 (т. е., G1m(fa)), IGHG2*01, IGHG2*06, IGHG2*02, IGHG3*01, IGHG3*05, IGHG3*10, IGHG3*04, IGHG3*09, IGHG3*11, IGHG3*12, IGHG3*06, IGHG3*07, IGHG3*08, IGHG3*13, IGHG3*03, IGHG3*14, IGHG3*15, IGHG3*16, IGHG3*17, IGHG3*18, IGHG3*19, IGHG2*04, IGHG4*01, IGHG4*03 или IGHG4*02) (как описано, например, в Vidarsson et al. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector function. *Frontiers in Immunology*. 5(520):1-17 (2014)). Мономер Fc-домена также может иметь происхождение из любого вида, например, человека, представителя подсемейства мышиных или мыши. Димер мономеров Fc-домена представляет собой Fc-домен, который может связываться с Fc-рецептором, который является рецептором, расположенным на поверхности лейкоцитов.

В некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена в описанных в данном документе конъюгатах может содержать одну или более аминокислотных замен, добавлений и/или делеций по отношению к мономеру Fc-домена, имеющему последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138. В некоторых вариантах осуществления Asn в мономере Fc-домена в конъюгатах, как описано в данном документе, может быть заменен на Ala для предотвращения N-связанного гликозилирования (см., например, SEQ ID NO: 12-15, где замена Asn на Ala помечена *). В некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена в конъюгатах, описанных в данном документе, также может содержать дополнительные добавления Cys (см., например, SEQ ID NO: 9, 10 и 11, где добавления Cys помечены *).

В некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена в конъюгатах, как описано в данном документе, включает дополнительную часть, например, альбумин-связывающий пептид, очищающий пептид (например, гексагистидиновый пептид (HHHHHH (SEQ ID NO: 146)) или сигнальную последовательность (например, сигнальную последовательность IL2 MYRMQLLSCIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 147)), присоединенную к N- или C-концу мономера Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена в конъюгате не содержит вариабельной области антитела любого типа, например, V_H, V_L, определяющей комплементарность области (CDR) или гипервариабельной области (HVR).

В некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена в конъюгатах, описанных в данном документе, может иметь последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична (например, на 97%, 99% или 99,5% идентична) последовательности любой из SEQ ID NO: 1-138, показанной ниже. В некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена в конъюгатах, описанных в данном документе, может иметь последовательность любой из SEQ ID NO: 1-138, показанной ниже.

SEQ ID NO: 1: мышиный Fc-IgG2a с сигнальной последовательностью IL2 на N-конце (жирным шрифтом)
MYRMQLLSCIALSLALVTNSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSE
DDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKP
KGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS
KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO: 2: зрелый мышиный Fc-IgG2a
PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT
QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTK
KQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH
EGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO: 3: Fc-IgG1 человека с сигнальной последовательностью IL2 на N-конце (жирным шрифтом) и

добавленными N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто)

MYRMQLLSCIALSLALVTNSMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 4: зрелый Fc-IgG1 человека с добавленными N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто)

MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 5: мышиный Fc-IgG2a с сигнальной последовательностью IL2 (жирным шрифтом) на N-конце и гексагистидиновым пептидом (выделено курсивом) на C-конце

MYRMQLLSCIALSLALVTNSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSE
DDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKP
KGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS
KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 6: зрелый мышиный Fc-IgG2a с гексагистидиновым пептидом (выделено курсивом) на C-конце

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT
QTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTK
KQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVH
EGLHNHHTTKSFSRTPGK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 7: Fc-IgG1 человека с сигнальной последовательностью IL2 (жирным шрифтом) на N-конце, добавленными N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто) и гексагистидиновым пептидом (выделено курсивом) на C-конце

MYRMQLLSCIALSLALVTNSMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 8: зрелый Fc-IgG1 человека с гексагистидиновым пептидом (выделено курсивом) на C-конце и добавленными N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто)

MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 9: Fc-IgG1 человека с сигнальной последовательностью IL2 (жирным шрифтом) на N-конце,

добавленными N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто), двумя дополнительными цистеинами в шарнирной области (*) и гексагистидиновым пептидом (выделено курсивом) на С-конце

MYRMQLLSCIALSLALVTNSMVRSDKTHTCPPCPPC*KC*PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 10: зрелый Fc-IgG1 человека с добавленными N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто), двумя дополнительными цистеинами в шарнирной области (*) и гексагистидиновым пептидом (выделено курсивом) на С-конце

MVRSDKTHTCPPCPPC*KC*PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 11: зрелый Fc-IgG1 человека с добавленными N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто) и двумя дополнительными цистеинами в шарнирной области (*)

MVRSDKTHTCPPCPPC*KC*PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 12: мышиный Fc-IgG2a с сигнальной последовательностью IL2 (жирным шрифтом) на N-конце, заменой Asn на Ala (*) и гексагистидиновым пептидом (выделено курсивом) на С-конце.

MYRMQLLSCIALSLALVTNSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSE
DDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYA*STLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISK
PKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYS
KLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 13: зрелый мышиный Fc-IgG2a с заменой Asn на Ala (*) и гексагистидиновым пептидом (выделено курсивом) на С-конце

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT
QTHREDYA*STLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMT
KKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVV
HEGLHNHHTTKSFSRTPGK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 14: Fc-IgG1 человека с сигнальной последовательностью IL2 (жирным шрифтом) на N-конце, добавленными N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто), заменой Asn на Ala (*) и гексагистидиновым пептидом (выделено курсивом) на С-конце

MYRMQLLSCIALSLALVTNSMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY

SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 15: зрелый Fc-IgG1 человека с заменой Asn на Ala (*), N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто) и гексагистидиновым пептидом (выделено курсивом) на С-конце
MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYA*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH*

SEQ ID NO: 16: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце и добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто)
MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 17: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто), С-концевым линкером G4S (выделено курсивом) и С-концевой меткой c-Myc (подчеркнуто, выделено курсивом)
MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGG*G*SEQKLISEEDL*

SEQ ID NO: 18: зрелый Fc IgG1 человека с добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто), С-концевым линкером G4S (выделено курсивом) и С-концевой меткой c-Myc (подчеркнуто, выделено курсивом)
ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGG*G*SEQKLISEEDL*

SEQ ID NO: 19: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом), добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто) и модификацией лизина на серин (*) для предотвращения конъюгации лизина в этом сайте
MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPS*DTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 20: зрелый Fc IgG1 человека с добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто) и модификацией лизина на серин (*) для предотвращения конъюгации лизина в этом сайте

ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPS*DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто), модификацией лизина на серин (*) для предотвращения конъюгации лизина в этом сайте, C-концевым линкером G4S (выделено курсивом) и C-концевой меткой C-Myc (подчеркнуто, выделено курсивом)

MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPS(*)DTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGSEQKLISEEDL*

SEQ ID NO: 22: зрелый Fc IgG1 человека с добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто), модификацией лизина на серин (*) для предотвращения конъюгации лизина в этом сайте, C-концевым линкером G4S (выделено курсивом) и C-концевой меткой C-Myc (подчеркнуто, выделено курсивом)

ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPS(*)DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGSEQKLISEEDL*

SEQ ID NO: 23: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто), заменой Asn на Ala (*), C-концевым линкером G4S (выделено курсивом) и C-концевой меткой C-myc (подчеркнуто, выделено курсивом)

MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGSEQKLISEEDL*

SEQ ID NO: 24: зрелый Fc IgG1 человека с добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто), заменой Asn на Ala (*), C-концевым линкером G4S (курсивом) и C-концевой меткой C-myc (подчеркнуто, выделено курсивом)

ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF

SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGS*EQKLISEEDL

SEQ ID NO: 25: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто), мутациями H310A (*) и H435A (*), препятствующими связыванию FcRn, C-концевым G4S (выделено курсивом) и C-концевой меткой C-myc (подчеркнуто, выделено курсивом)
MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLA(*)QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKA(*)KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPG*GGGGSEQKLISEEDL*

SEQ ID NO: 26: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто) с мутациями H310A (*) и H435A (*) для предотвращения связывание FcRn, C-концевым G4S (курсив) и C-концевой меткой C-myc (подчеркнуто, выделено курсивом)
ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLA(*)QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA(*)KGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPG*GGGGSEQKLISEEDL*

SEQ ID NO: 27: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто), C-концевым линкером G4S (выделено курсивом) и мутированной на C-конце (лизин на фенилаланин, жирным шрифтом) меткой C-myc (подчеркнуто, выделено курсивом)
MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGSEQ**F***LISEEDL*

SEQ ID NO: 28: зрелый Fc IgG1 с добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто), C-концевым линкером G4S (выделено курсивом) и мутированной на C-конце (лизин на фенилаланин, жирным шрифтом) меткой C-myc (подчеркнуто, выделено курсивом)
ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGSEQ**F***LISEEDL*

SEQ ID NO: 29: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (подчеркнуто), заменой Asn на Ala (*), C-концевым линкером G4S (выделено курсивом) и C-концевой мутированной (лизин на фенилаланин, жирным шрифтом) меткой C-myc (подчеркнуто, выделено курсивом)
MKWVTFISLLFLFSSAYSISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGG*G*S*EQ**F**LISEEDL

SEQ ID NO: 30: зрелый Fc IgG1 с добавленными N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто), заменой Asn на Ala (*), С-концевым линкером G4S (выделено курсивом) и мутированной на С-конце (лизин на фенилаланин, жирным шрифтом) меткой С-myc (подчеркнуто, выделено курсивом)
ISAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGG*G*SEQ**F***LISEEDL*

SEQ ID NO: 31: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом), С-концевым линкером G4S (выделено курсивом) и мутированной на С-конце (лизин на фенилаланин, жирным шрифтом) меткой С-myc (подчеркнуто)
MKWVTFISLLFLFSSAYSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGS*EQFLISEEDL

SEQ ID NO: 32: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
MKWVTFISLLFLFSSAYSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 33: зрелый Fc IgG1 человека с тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто) с добавленными N-концевыми аминокислотными остатками MVRS (подчеркнуто)
MVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 34: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, содержит остатки EPKSS, включающие полную шарнирную область на N-конце зрелого Fc IgG1 человека (подчеркнутой), замену Cys на Ser (#), аллотип G1m(fa) (жирным курсивом)
MKWVTFISLLFLFSSAYSEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 35: Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью мышиного IgG (жирным шрифтом) на N-конце, с удалением шарнирных остатков EPKSSD с N-конца зрелого Fc IgG1 человека, аллотип G1m(fa) (жирным курсивом)

MGWSCIILFLVATATGVHSKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 36: зрелый Fc IgG1 человека с тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто) с удалением шарнирных остатков EPKSSD с N-конца зрелого Fc IgG1 человека, аллотип G1m(fa) (жирным курсивом)

KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 37: зрелый Fc IgG1 человека с двойной мутацией LS (жирным шрифтом и подчеркнуто) с удалением шарнирных остатков EPKSSD с N-конца зрелого Fc IgG1 человека, аллотип G1m(fa) (жирным курсивом)

KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**
HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 38: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью сывороточного альбумина человека (жирным шрифтом) на N-конце, тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом), C-концевым линкером G4S (выделено курсив) и C-концевой меткой C-myc (подчеркнуто)

MKWVTFISLLFLFSSAYSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGS*EQKLISEEDL

SEQ ID NO: 39: зрелый Fc IgG1 человека, где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asp или Glu, и X_5 представляет собой Leu или Met, X_6 представляет собой Met или Leu, и X_7 представляет собой Asn или Ser

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X**$_1$I**X**$_2$R**X**$_3$PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_4$E**X**$_5$T
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X**$_6$H
EALH**X**$_7$HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 40: зрелый Fc IgG1 человека, где X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_4$E**X**$_5$TKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 41: зрелый Fc IgG1 человека с тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), где X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**<u>Y</u>**I**<u>T</u>**R**<u>E</u>**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_4$E**X**$_5$TKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 42: зрелый Fc IgG1 человека с тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**<u>Y</u>**I**<u>T</u>**R**<u>E</u>**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 43: зрелый Fc IgG1 человека с тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**<u>Y</u>**I**<u>T</u>**R**<u>E</u>**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 44: зрелый Fc IgG1 человека с двойной мутацией LS (жирным шрифтом и подчеркнуто), где X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_4$E**X**$_5$TKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**<u>L</u>**HEAL
H**<u>S</u>**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 45: зрелый Fc IgG1 человека с двойной мутацией LS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**<u>L</u>**HEALH
<u>S</u>HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 46: зрелый Fc IgG1 человека с двойной мутацией LS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEAL H**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 47: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), заменой Cys на Ser (#) и, где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asp или Glu, и X_5 представляет собой Leu или Met, X_6 представляет собой Met или Leu, и X_7 представляет собой Asn или Ser

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT L**X$_1$**I**X$_2$**R**X$_3$**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X$_6$**HEALH**X$_7$**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 48: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), заменой Cys на Ser (#), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 49: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), заменой Cys на Ser (#), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 50: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), аллотип G1m(fa) (жирным курсивом)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 51: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT

LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 52: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
L**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 53: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)

MGWSCIILFLVATATGVHSNVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
L**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 54: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (выделено курсивом), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), линкером G4S (выделено курсивом) и C-концевой меткой C-myc (подчеркнуто), аллотипом G1m (f) (жирным курсивом)

MGWSCIILFLVATATGVHS*ISAMVRS*DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG*GGGGS*EQKLISEEDL

SEQ ID NO: 55: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (выделено курсивом), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), линкером G4S (выделено курсивом), C-концевой меткой C-myc (подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)

MGWSCIILFLVATATGVHS*ISAMVRS*DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG*GGGGS*EQKLISEEDL

SEQ ID NO: 56: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (выделено курсивом), тройным мутантом YTE (жирным шрифтом/подчеркнуто), линкером G4S (выделено курсивом) и C-концевой меткой C-myc (подчеркнуто), аллотипом G1m (f) (жирным курсивом)

MGWSCIILFLVATATGVHS*ISAMVRS*DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGS*EQKLISEEDL

SEQ ID NO: 57: зрелый Fc IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG Vh тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), добавленными N-концевыми аминокислотными остатками ISAMVRS (выделено курсивом), тройным мутантом YTE (жирным шрифтом/подчеркнуто), линкером G4S (выделено курсивом), C-концевой меткой C-myc (подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
MGWSCIILFLVATATGVHS*ISAMVRS*DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGS*EQKLISEEDL

SEQ ID NO: 58: зрелый IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG1 тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), заменой Cys на Ser (#), C-концевым G4S (выделено курсивом) и C-концевым пептидом IgA (подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
MGWSCIILFLVATATGVHSEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*GGGGS*QRNPRLRLIRRHPTLRIPPI

SEQ ID NO: 59: зрелый IgG1 человека с сигнальной последовательностью MIgG1 тяжелой цепи мыши (жирным шрифтом), заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), C-концевым G4S (выделено курсивом) и C-концевым пептидом IgA (подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
MGWSCIILFLVATATGVHSEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG*GGGGS*QRNPRLRLIRRHPTLRIPPI

SEQ ID NO: 60: зрелый Fc IgG1 человека, Z_1 представляет собой Cys или Ser, и где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met, X_6 представляет собой Met или Leu, а X_7 представляет собой Asn или Ser
NVNHKPSNTKVDKKVEPKS**Z$_1$**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X$_1$**I**X$_2$**R**X$_3$**PEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X$_6$**HEALH**X$_7$**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 61: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#) и, где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asp или Glu, и

X_5 представляет собой Leu или Met, X_6 представляет собой Met или Leu, и X_7 представляет собой Asn или Ser
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X_1IX_2RX_3**PEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSR**X_4EX_5**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X_6**HEALH**X_7**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 62: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR**X_4EX_5**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 63: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 64: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 65: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), аллотип G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 66: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 67: зрелый IgG1 Fc человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHED

PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 68: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**<u>Y</u>**I**<u>T</u>**R**<u>E</u>**PEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 69: зрелый Fc IgG1 человека, Z_1 представляет собой Cys или Ser, и где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met, X_6 представляет собой Met или Leu, а X_7 представляет собой Asn или Ser
NVNHKPSNTKVDKKVEPKS**Z$_1$**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X$_1$**I**X$_2$**R**X$_3$**PEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X$_6$**HEALH**X$_7$**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 70: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#) и, где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asp или Glu, и X_5 представляет собой Leu или Met, X_6 представляет собой Met или Leu, и X_7 представляет собой Asn или Ser
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X$_1$**I**X$_2$**R**X$_3$**PEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X$_6$**HEALH**X$_7$**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 71: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 72: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 73: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 74: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), аллотип G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 75: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 76: зрелый IgG1 Fc человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 77: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 78: зрелый Fc IgG1 человека, Z_1 представляет собой Cys или Ser, и где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met, X_6 представляет собой Met или Leu, а X_7 представляет собой Asn или Ser
VNHKPSNTKVDKKVEPKS**Z**$_1$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X**$_1$I**X**$_2$R**X**$_3$PEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR**X**$_4$E**X**$_5$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSV**X**$_6$HEALH**X**$_7$HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 79: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#) и, где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asp или Glu, и X_5 представляет собой Leu или Met, X_6 представляет собой Met или Leu, и X_7 представляет собой Asn или Ser
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X$_1$**I**X$_2$**R**X$_3$**PEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X$_6$**HEALH**X$_7$**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 80: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 81: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 82: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 83: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), аллотип G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 84: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 85: зрелый IgG1 Fc человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией YTE (жирным шрифтом

и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**<u>Y</u>**I**<u>T</u>**R**<u>E</u>**PEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 86: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**<u>Y</u>**I**<u>T</u>**R**<u>E</u>**PEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 87: зрелый Fc IgG1 человека, Z_1 представляет собой Cys или Ser, и где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met, X_6 представляет собой Met или Leu, а X_7 представляет собой Asn или Ser
VNHKPSNTKVDKKVEPKS**Z$_1$**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X$_1$**I**X$_2$**R**X$_3$**PEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSV**X$_6$**HEALH**X$_7$**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 88: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#) и, где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asp или Glu, и X_5 представляет собой Leu или Met, X_6 представляет собой Met или Leu, и X_7 представляет собой Asn или Ser
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X$_1$**I**X$_2$**R**X$_3$**PEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X$_6$**HEALH**X$_7$**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 89: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), X_4 представляет собой Asp или Glu, а X_5 представляет собой Leu или Met
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR**X$_4$**E**X$_5$**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 90: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 91: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 92: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), аллотип G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 93: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), мутациями M428L, N434S (жирным шрифтом/подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 94: зрелый IgG1 Fc человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 95: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией YTE (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 96: зрелый Fc IgG1 человека, J_1 представляет собой Asn или отсутствует, J_2 представляет собой Lys или отсутствует, Z_1 представляет собой Cys или Ser, и где X_1 представляет собой Met или Tyr, X_2 представляет собой Ser или Thr, X_3 представляет собой Thr или Glu, X_4 представляет собой Asn или Ala, X_5 представляет собой Leu или Asp, X_6 представляет собой Gln или His, X_7 представляет собой Asp или Glu, и X_8 представляет собой Leu или Met, X_9 представляет собой Met или Leu, а X_{10} представляет собой Asn или Ser
J$_1$VNHKPSNTKVDKKVEPKS**Z**$_1$DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**X**$_1$I**X**$_2$R**X**$_3$PEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X**$_4$STYRVVSVLTV**X**$_5$H**X**$_6$DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_7$E**X**$_8$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**X**$_9$HEALH**X**$_{10}$HYTQKSLSLSPG**J**$_2$

SEQ ID NO: 97: зрелый человеческий Fc IgG1, замена Cys на Ser (#), J_1 представляет собой Asn или отсутствует, J_2 представляет собой Lys или отсутствует, и где X_4 представляет собой Asn или Ala, X_5 представляет собой Leu или Asp, X_6 представляет собой Gln или His, X_7 представляет собой Asp или Glu, а X_8 представляет собой Leu или Met, а X_{10} представляет собой Asn или Ser
J$_1$VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X**$_4$STYRVVSVLTV**X**$_5$H**X**$_6$DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_7$E**X**$_8$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**X**$_{10}$HYTQKSLSLSPG**J**$_2$

SEQ ID NO: 98: зрелый Fc IgG1 человека, замена Cys на Ser (#), тройная мутация DHS (выделена жирным шрифтом и подчеркнута), J_1 представляет собой Asn или отсутствует, J_2 представляет собой Lys или отсутствует, где X_4 представляет собой Asn или Ala, X_7 представляет собой Asp или Glu, и X_8 представляет собой Leu или Met
J$_1$VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X**$_4$STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR**X**$_7$E**X**$_8$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG**J**$_2$

SEQ ID NO: 99: зрелый человеческий Fc IgG1, замена Cys на Ser (#), тройная мутация DHS (выделена жирным шрифтом и подчеркнута), где X_4 представляет собой Asn или Ala, X_7 представляет собой Asp или Glu, а X_8 представляет собой Leu или Met
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X**$_4$STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR**X**$_7$E**X**$_8$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 100: зрелый человеческий Fc IgG1, замена Cys на Ser (#), тройная мутация DHS (выделена жирным шрифтом и подчеркнута), где X_7 представляет собой Asp или Glu, а X_8 представляет собой Leu или Met
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR**X**$_7$E**X**$_8$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 101: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT

VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 102: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 103: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 104: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 105: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 106: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 107: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV

DKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 108: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 109: зрелый человеческий Fc IgG1, замена Cys на Ser (#), замена Asn на Ala (*), тройная мутация DHS (выделено жирным шрифтом и подчеркнуто), где X_7 представляет собой Asp или Glu, а X_8 представляет собой Leu или Met
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSR**X**$_7$E**X**$_8$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 110: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 111: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 112: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 113: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK

AKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 114: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 115: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 116: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 117: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Cys на Ser (#), заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSS(#)DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 118: зрелый человеческий Fc IgG1, J_1 представляет собой Asn или отсутствует, J_2 представляет собой Lys или отсутствует, и где X_4 представляет собой Asn или Ala, X_5 представляет собой Leu или Asp, X_6 представляет собой Gln или His, X_7 представляет собой Asp или Glu, а X_8 представляет собой Leu или Met, а X_{10} представляет собой Asn или Ser
J_1VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X_4**STYRVVSVLTV**X_5**H**X_6**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR**X_7**E**X_8**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**X_{10}**HYTQKSLSLSPG**J_2**

SEQ ID NO: 119: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделена жирным шрифтом и подчеркнута), J_1 представляет собой Asn или отсутствует, J_2 представляет собой Lys или отсутствует, и где X_4

представляет собой Asn или Ala, X_7 представляет собой Asp или Glu, а X_8 представляет собой Leu или Met

J_1VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X_4**STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR**X_7**E**X_8**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG**J_2**

SEQ ID NO: 120: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделена жирным шрифтом и подчеркнута), где X_4 представляет собой Asn или Ala, X_7 представляет собой Asp или Glu, а X_8 представляет собой Leu или Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**X_4**STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR**X_7**E**X_8**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 121: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделено жирным шрифтом и подчеркнуто), где X_7 представляет собой Asp или Glu, а X_8 представляет собой Leu или Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSR**X_7**E**X_8**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 122: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделены жирным шрифтом и подчеркнуты), аллотип G1m(fa) (жирный курсив)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 123: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделены жирным шрифтом и подчеркнуты), аллотип G1m(f) (жирный курсив)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 124: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделены жирным шрифтом и подчеркнуты), аллотип G1m(fa) (жирный курсив)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 125: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделены жирным шрифтом и подчеркнуты), аллотип G1m(f) (жирный курсив)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 126: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделены жирным шрифтом и подчеркнуты), аллотип G1m(fa) (жирный курсив)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 127: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделены жирным шрифтом и подчеркнуты), аллотип G1m(f) (жирный курсив)

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 128: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделены жирным шрифтом и подчеркнуты), аллотип G1m(fa) (жирный курсив)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 129: зрелый человеческий Fc IgG1, тройная мутация DHS (выделены жирным шрифтом и подчеркнуты), аллотип G1m(f) (жирный курсив)

VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 130: зрелый человеческий Fc IgG1, замена Asn на Ala (*), тройная мутация DHS (выделена жирным шрифтом и подчеркнута), где X_7 представляет собой Asp или Glu, а X_8 представляет собой Leu или Met

NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR**X**$_7$E**X**$_8$TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 131: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 132: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 133: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 134: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 135: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 136: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 137: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(fa) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***D***E***L***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 138: зрелый Fc IgG1 человека с заменой Asn на Ala (*), тройной мутацией DHS (жирным шрифтом и подчеркнуто), аллотипом G1m(f) (жирным курсивом)
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA(*)STYRVVSVLTV**D**H**H**DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSR***E***E***M***TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**S**HYTQKSLSLSPG

Как определено в данном документе Fc-домен включает два мономера Fc-домена, которые димеризуются за счет взаимодействия между двумя константными доменами C_H3 антитела, а также одну или более дисульфидных связей, которые образуются между шарнирными доменами двух димеризующихся мономеров Fc-домена. Fc-домен образует минимальную структуру, которая связывается с Fc-рецептором, например, рецепторами Fc-гамма (т.е. рецепторами Fcγ (FcγR)), рецепторами Fc-альфа (т.е. рецепторами Fcα (FcαR)), рецепторами Fc-эпсилон (т.е., рецепторами Fcε (FcεR)) и/или неонатальным Fc-рецептором (FcRn). В некоторых вариантах осуществления Fc-домен по настоящему изобретению связывается с рецептором Fcγ (например, FcRn, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), FcγRIIb (CD32), FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIIb (CD16b)) и/или FcγRIV, и/или неонатальным рецептором Fc (FcRn).

В некоторых вариантах осуществления мономер Fc-домена или Fc-домен по настоящему изобретению представляет собой агликозилированный мономер Fc-домена или Fc-домен (например, мономер Fc-домена или Fc-домен, который поддерживает взаимодействие с Fc-рецептором (например, FcRn). Например, Fc-домен представляет собой агликозилированный вариант IgG1, который поддерживает взаимодействие с Fc-рецептором (например, IgG1, имеющим аминокислотную замену в N297 и/или T299 мотива гликозилирования). Примеры агликозилированных Fc-доменов и способы получения агликозилированных Fc-доменов известны в данной области, например, как описано в Sazinsky S.L. et al., Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors, PNAS, 2008, 105(51):20167-20172, которая полностью включена в данный документ.

В некоторых вариантах осуществления Fc-домен или мономер Fc-домена по изобретению сконструирован для усиления связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Например, домен Fc может включать тройную мутацию, соответствующую M252Y/S254T/T256E (YTE) (например, IgG1, такой как человеческий или гуманизированный IgG1, имеющий мутацию YTE, например, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 57). Домен Fc может включать двойной мутант, соответствующий M428L/N434S (LS) (например, IgG1, такой как человеческий или гуманизированный IgG1, имеющий мутацию LS, такую как SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 59). Fc-домен может включать

единственный мутант, соответствующий N434H (например, IgG1, такой как человеческий или гуманизированный IgG1, имеющий мутацию N434H). Домен Fc может включать единственный мутант, соответствующий C220S (например, IgG1, такой как человеческий или гуманизированный IgG1, имеющий мутацию C220S, такую как SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95). Домен Fc может включать четверной мутант, соответствующий C220S/L309D/Q311H/N434S (CDHS) (например, IgG1, такой как человеческий или гуманизированный IgG1, имеющий мутацию DHS, такую как SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 117). Домен Fc может включать тройной мутант, соответствующий L309D/Q311H/N434S (DHS) (например, IgG1, такой как человеческий или гуманизированный IgG1, имеющий мутацию DHS, такую как SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137 и SEQ ID NO: 138). Fc-домен может включать комбинацию одной или более описанных выше мутаций, которые усиливают связывание с FcRn. Усиленное связывание с FcRn может увеличивать период полувыведения конъюгата, содержащего Fc-домен. Например, включение одной или более аминокислотных мутаций, которые увеличивают связывание с FcRn (например, мутация YTE, мутация LS или мутация N434H), может увеличить время полужизни конъюгата на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. 100%, 200%, 300%, 400%, 500% или более относительно конъюгата, имеющего соответствующий домен Fc без мутации, усиливающей связывание FcRn. Примеры Fc-доменов с усиленным связыванием с FcRN и способы создания Fc-доменов с усиленным связыванием с FcRN известны в данной области, например, как описано в Maeda, A. et al., Identification of human IgG1 variant with enhanced FcRn binding and without increased binding to rheumatoid factor autoantibody, MABS, 2017, 9(5):844-853, , которая полностью включена в данный документ.

В контексте данного документа следует понимать, что аминокислота, «соответствующая» конкретному аминокислотному остатку (например, конкретной SEQ ID NO.), включает любой аминокислотный остаток, как будет понятно специалисту в данной области, для выравнивания с конкретным остатком (например, конкретной последовательности). Например, любая из SEQ ID NO: 1-138 может быть мутирована для включения мутации YTE, мутации LS и/или мутации N434H, путем мутирования «соответствующих остатков» аминокислотной последовательности.

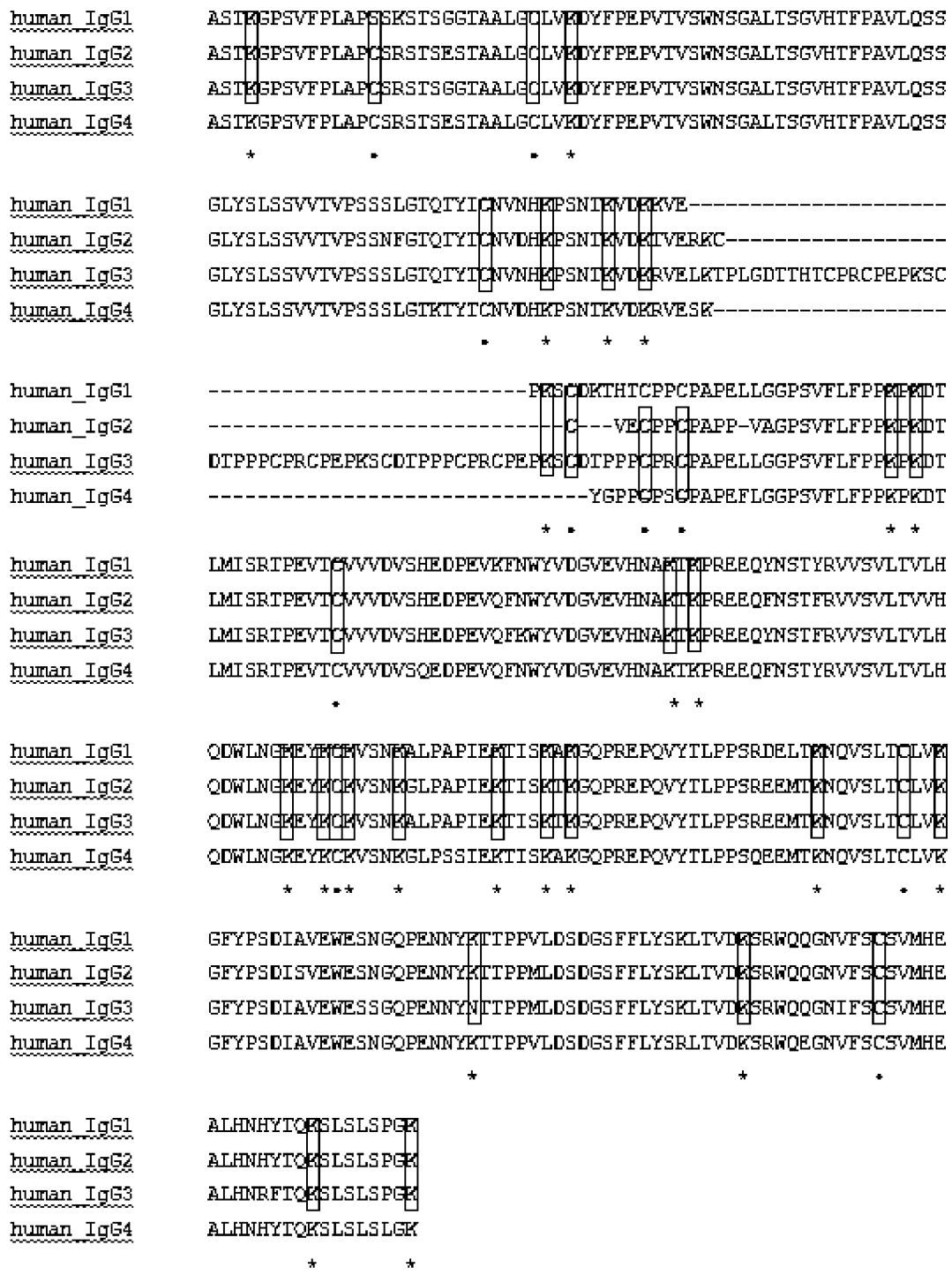
В контексте данного документа следует понимать, что атом серы, «соответствующий» конкретному остатку цистеина конкретной SEQ ID NO включает атом серы любого остатка цистеина, как будет понятно специалисту в данной области, для выравнивания с конкретным цистеином конкретной последовательности. Выравнивание белковых последовательностей IgG1 человека (UniProtKB: P01857; SEQ ID NO: 142), IgG2 человека (UniProtKB: P01859; SEQ ID NO: 143), IgG3 человека (UniProtKB: P01860; SEQ ID NO: 144) и IgG4

человека (UniProtKB: P01861; SEQ ID NO: 145) приведено ниже (выравнено посредством множественного попарного выравнивания в программе Clustal Omega). Выравнивание указывает на остатки цистеина (например, атомы серы остатков цистеина), которые «соответствуют» друг другу (в прямоугольниках и обозначены символом). Специалист в данной области легко сможет выполнить такое выравнивание с любым вариантом IgG по изобретению, чтобы определить атом серы цистеина, который соответствует любому атому серы конкретного цистеина конкретной SEQ ID NO, описанной в данном документе (например, любой из SEQ ID NO: 1-138). Например, специалист в данной области легко сможет определить, что Cys10 SEQ ID NO: 10 (первый цистеин консервативного мотива CPPC шарнирной области Fc-домена) соответствует, например, Cys109 IgG1, Cys106 IgG2, Cys156 IgG3, Cys29 SEQ ID NO: 1, Cys9 SEQ ID NO: 2, Cys30 SEQ ID NO: 3 или Cys10 SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления домен Fc или мономер домена Fc по изобретению, которые имеют последовательность любой из SEQ ID NO: 39-138, могут дополнительно включать дополнительные аминокислоты на N-конце (Xaa)x и/или дополнительные аминокислоты на C-конце (Xaa)z, где Xaa представляет собой любую аминокислоту, x и z являются целыми числами большими чем или равными нулю, предпочтительно меньше 100, предпочтительно меньше 10 и более предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления дополнительные аминокислоты по меньшей мере на 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичны к одной или более последовательным аминокислотам SEQ ID NO: 81. Например, дополнительные аминокислоты могут представлять собой одну аминокислоту на C-конце, соответствующую Lys330 IgG1 (SEQ ID NO: 119).

В контексте данного документа следует понимать, что атом азота, «соответствующий» конкретному остатку лизина конкретной SEQ ID NO включает атом азота любого остатка лизина, как будет понятно специалисту в данной области, для выравнивания с конкретным лизином конкретной последовательности. Выравнивание белковых последовательностей IgG1 человека (UniProtKB: P01857; SEQ ID NO: 142), IgG2 человека (UniProtKB: P01859; SEQ ID NO: 143), IgG3 человека (UniProtKB: P01860; SEQ ID NO: 144) и IgG4 человека (UniProtKB: P01861; SEQ ID NO: 145) приведено ниже (выравнено посредством множественного попарного выравнивания в программе Clustal Omega). Выравнивание указывает на остатки лизина (например, атомы азота остатков лизина), которые «соответствуют» друг другу (в прямоугольниках и обозначены символом *). Специалист в данной области легко сможет выполнить такое выравнивание с любым вариантом IgG по изобретению, чтобы определить атом азота цистеина, который соответствует любому атому азота конкретного лизина конкретной SEQ ID NO, описанной в данном документе (например, любой из SEQ ID NO: 1-138). Например, специалист в данной области легко сможет определить, что Lys35 SEQ ID NO: 10 соответствует, например, Lys129 IgG1, Lys126 IgG2, Lys176 IgG3, Lys51 SEQ ID NO: 1, Lys31 SEQ ID NO: 2, Lys50 SEQ ID NO: 3 или Lys30 SEQ ID NO: 10.

Выравнивание последовательностей белков IgG1 (SEQ ID NO: 142), IgG2 (SEQ ID NO: 143), IgG3 (SEQ ID NO: 144) и IgG4 (SEQ ID NO: 145)



Активация иммунных клеток

Рецепторы Fc-гамма (FcγR) связывают Fc-часть иммуноглобулина G (IgG) и играют важную роль в активации и регуляции иммунной системы. Например, Fc-домены IgG в иммунных комплексах (IC) взаимодействуют с FcγR с высокой авидностью, тем самым запуская сигнальные каскады, которые регулируют активацию иммунных клеток. Семейство FcγR человека содержит несколько активирующих рецепторов (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и один ингибирующий рецептор (FcγRIIb). Передача сигналов FcγR опосредуется внутриклеточными доменами, которые содержат иммунные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM) для активации FcγR и иммунные тирозиновые ингибирующие мотивы (ITIM) для ингибирующего рецептора FcγRIIb. В некоторых вариантах осуществления связывание FcγR Fc-доменами приводит к фосфорилированию ITAM киназами семейства Src; это активирует киназы семейства

Syk и индуцирует нисходящие сигнальные сети, которые включают в себя пути PI3K и Ras.

В описанных в данном документе конъюгатах часть конъюгатов, включающая мономеры или димеры ингибиторов нейраминидазы, связывается и ингибирует вирусную нейраминидазу, что приводит к ингибированию вирусной репликации, в то время как часть конъюгатов Fc-домена связывается с FcγR (например, FcRn, FcγRI, FcγRIIa , FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb) на иммунных клетках и активирует фагоцитоз и эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ), что приводит к поглощению и разрушению вирусных частиц иммунными клетками и дальнейшему усилению противовирусной активности конъюгатов. Примеры иммунных клеток, которые могут быть активированы описанными в данном документе конъюгатами, включают, но не ограничиваются ими, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты, фолликулярные дендритные клетки, естественные клетки-киллеры и тучные клетки.

Распределение в тканях

После того, как терапевтический агент попадает в системный кровоток, оно распределяется по тканям организма. Распределение, как правило, неравномерно из-за различной перфузии крови, связывания с тканями, регионального pH и проницаемости клеточных мембран. Скорость поступления лекарственного средства в ткань зависит от скорости притока крови к ткани, массы ткани и характеристик распределения между кровью и тканью. Равновесие распределения (когда скорость входа и выхода одинакова) между кровью и тканью достигается быстрее в областях с богатой васкуляризацией, если только диффузия через клеточные мембраны не является фактором, ограничивающим скорость. Размер, форма, заряд, связывание с мишенью, FcRn и механизмы связывания с мишенью, способ введения и состав влияют на распределение в тканях.

В некоторых случаях описанные в данном документе конъюгаты могут быть оптимизированы для распределения в легочной ткани. В некоторых случаях коэффициент распределения конъюгатов в жидкости эпителиальной выстилки составляет по меньшей мере 30% от концентрации конъюгатов в плазме в течение 2 часов после введения. В некоторых вариантах соотношение концентрации составляет по меньшей мере 45% в течение 2 часов после введения. В некоторых вариантах соотношение концентрации составляет по меньшей мере 55% в течение 2 часов после введения. В частности, соотношение концентрации составляет по меньшей мере 60% в течение 2 часов после введения. Как показано в Примере 190 и на Фиг. 98, через 2 часа после инъекции конъюгат, содержащий домен Fc (SEQ ID NO: 73) уровни ELF неожиданно составляют ~60% от уровней экспозиции в плазме, измеренных по AUC в течение остального времени, что указывает на почти немедленное выделение конъюгата из плазмы в ELF в легких. Это демонстрирует, что конъюгат, содержащий Fc, быстро распределяется в легких и поддерживает высокие концентрации в легких по сравнению с уровнями в плазме.

IV. Белки альбумины и связывающие белок альбумин пептиды

Белки альбумины

Белок альбумин по изобретению может представлять собой природный альбумин или его вариант, такой как сконструированный вариант природного белка альбумина. Варианты включают полиморфизмы, фрагменты, такие как домены и субдомены и слитые белки. Белок альбумин может включать последовательность белка альбумина, полученного из любого источника. Предпочтительно источником является млекопитающее, такое как человек или крупный рогатый скот. Наиболее предпочтительно белок

альбумин представляет собой сывороточный альбумин человека (HSA) или его вариант. Сывороточные альбумины человека включают любой белок альбумин, имеющий аминокислотную последовательность, встречающуюся в природе у человека, и его варианты. Кодирующую последовательность белка альбумина можно получить известными специалистам способами выделения и секвенирования кДНК, соответствующей генам человека. Белок альбумина по изобретению может включать аминокислотную последовательность сывороточного альбумина человека (HSA), представленную в SEQ ID NO: 139 или SEQ ID NO: 140, или аминокислотную последовательность сывороточного альбумина мыши (MSA), представленную в SEQ ID NO: 141, или его вариант или фрагмент, предпочтительно функциональный вариант или его фрагмент. Фрагмент или вариант могут быть функциональными или не функциональными, или могут сохранять функцию альбумина до некоторой степени. Например, фрагмент или вариант могут сохранять способность связываться с рецептором альбумина, таким как HSA или MSA по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%. , 90%, 100% или 105% способности исходного альбумина (например, исходного альбумина, из которого происходит фрагмент или вариант). Относительная связывающая способность может быть определена способами, известными в данной области, такими как поверхностный плазмонный резонанс.

Белок альбумина может быть природным полиморфным вариантом белка альбумина, таким как сывороточный альбумин человека. Как правило, варианты или фрагменты сывороточного альбумина человека будут иметь по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или 70%, а предпочтительно 80%, 90%, 95%. %, 100% или 105% или более активности связывания лиганда сывороточного альбумина человека или сывороточного альбумина мыши.

Белок альбумин может включать аминокислотную последовательность бычьего сывороточного альбумина. Белки бычьи сывороточные альбумины включают любой альбумин, имеющий аминокислотную последовательность, встречающуюся в природе у коров, например, как описано под номером доступа в Swissprot P02769, и его варианты, как определено в данном документе. Белки бычьи сывороточные альбумины также включают фрагменты полноразмерного бычьего сывороточного альбумина или его варианты, как определено в данном документе.

Белок альбумин может содержать последовательность альбумина, полученного из одного из сывороточного альбумина собаки (например, номер доступа в Swissprot P49822-1), свиньи (например, номер доступа в Swissprot P08835-1), козы (например, продукт Sigma номер A2514 или A4164), кошки (например, номер доступа в Swissprot P49064-1), курицы (например, номер доступа в Swissprot P19121-1), овальбумина (например, овальбумина курицы) (например, номер доступа в Swissprot P01012-1), овальбумина индейки (например, номер доступа в Swissprot O73860-1), осла (например, номер доступа в Swissprot Q5XLE4-1), морской свинки (например, номер доступа в Swissprot Q6WDN9-1), хомяка (например, как описано в DeMarco et al. International Journal for Parasitology 37(11): 1201-1208 (2007)), лошади (например, номер доступа в Swissprot P35747-1), макака-резуса (например, номер доступа в Swissprot Q28522-1), мыши (например, номер доступа в Swissprot P07724-1), голубя (например, как определено Khan et al. Int. J. Biol. Macromol. 30(3-4),171-8 (2002)), кролика (например, номер доступа в Swissprot P49065-1), крысы (например, номер доступа в Swissprot P02770-1) или овцы (например, номер доступа в Swissprot P14639-1), и включает их варианты и фрагменты, как определено в данном документе.

Многие встречающиеся в природе мутантные формы альбумина известны специалистам в данной области. Встречающиеся в природе мутантные формы альбумина описаны, например, в Peters, et al. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications,* Academic Press, Inc., San Diego, Calif., p.170-181 (1996).

Белки альбумины по изобретению включают варианты встречающихся в природе белков альбуминов.

Вариант альбумина относится к белку альбумину, имеющему по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, такую как аминокислотная мутация, вызванная вставкой, делецией или заменой, консервативной или неконсервативной, при условии, что такие изменения приводят к получению белка альбумина, у которого по меньшей мере одно базовое свойство не было существенно изменено (например, не было изменено более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40%). Примеры свойств, которые могут определять активность белка альбумина, включают связывающую активность (например, включая специфичность связывания или аффинность к билирубину или жирной кислоте, такой как длинноцепочечная жирная кислота), осмолярность или поведение в определенном диапазоне pH.

Как правило, вариант белка альбумина будет иметь по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% и предпочтительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности аминокислотной последовательности с природным белком альбумином, таким как белок альбумина по любой из SEQ ID NO: 139-141.

Способы получения и очистки рекомбинантных альбуминов человека хорошо известны (Sleep et al. Biotechnology, 8(1):42-6 (1990)) и включают получение рекомбинантного альбумина человека для фармацевтического применения (Bosse et al. J Clin Pharmacol 45(1):57-67 (2005)). Трехмерная структура HSA была выяснена с помощью рентгеновской кристаллографии (Carter et al. Science. 244(4909): 1195-8(1998)); Sugio et al. Protein Eng. 12(6):439-46 (1999)). Полипептидная цепь HSA имеет 35 остатков цистеина, которые образуют 17 дисульфидных связей, и один неспаренный (например, свободный) цистеин в положении 34 зрелого белка. Cys-34 HSA был использован для конъюгации молекул с альбумином (Leger et al. Bioorg Med Chem Lett 14(17):4395-8 (2004); Thibaudeau et al. Bioconjug Chem 16(4):1000-8 (2005)) и обеспечивает сайт для сайт-специфической конъюгации.

SEQ ID NO: 139 (сывороточный альбумин человека (HSA), вариант 1)
DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLF
GDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL
YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECC
EKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRL
AKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVST
PTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSA
LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCK
ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 140 (сывороточный альбумин человека (HSA), вариант 2)
RGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCD
KSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEET
FLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASL
QKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISS
KLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKK
VPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVN

RRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAF
VEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

SEQ ID NO: 141 (Мышиный сывороточный альбумин (MSA))
RGVFRREAHKSEIAHRYNDLGEQHFKGLVLIAFSQYLQKCSYDEHAKLVQEVTDFAKTCVADESAANCDK
SLHTLFGDKLCAIPNLRENYGELADCCTKQEPERNECFLQHKDDNPSLPPFERPEAEAMCTSFKENPTTF
MGHYLHEVARRHPYFYAPELLYYAEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSM
QKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADFAEITKLATDLTKVNKECCHGDLLECADDRAELAKYMCENQATISS
KLQTCCDKPLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEVCKNYAEAKDVFLGTFLYEYSRRHPDYSV
SLLLRLAKKYEATLEKCCAEANPPACYGTVLAEFQPLVEEPKNLVKTNCDLYEKLGEYGFQNAILVRYTQ
K

APQVSTPTLVEAARNLGRVGTKCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCCSGSLVER
RPCFSALTVDETYVPKEFKAETFTFHSDICTLPEKEKQIKKQTALAELVKHKPKATAEQLKTVMDDFAQFL
DTCCKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALA

Конъюгация белков альбуминов

Белок альбумин по изобретению может быть конъюгирован (например, посредством ковалентной связи) с любым соединением по изобретению (например, с помощью линкерной части мономера или димера ингибитора нейраминидазы). Белок альбумин можно конъюгировать с любым соединением по изобретению любым способом, хорошо известным специалистам в данной области, для получения низкомолекулярных белковых конъюгатов. Это может включать ковалентную конъюгацию с аминокислотой, подвергающейся воздействию растворителя, такой как цистеин или лизин, подвергающийся воздействию растворителя. Например, сывороточный альбумин человека может быть конъюгирован с соединением по настоящему изобретению путем ковалентной связи с атомом серы, соответствующим или Cys34 SEQ ID NO: 139 или Cys40 SEQ ID NO: 140.

Белок альбумина по изобретению может быть конъюгирован с любым соединением по изобретению посредством аминокислоты, расположенной в пределах 10 аминокислотных остатков С-конца или N-конца белка альбумина. Белок альбумин может включать С-концевое или N-концевое полипептидное слияние 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более аминокислот. С-концевое или N-концевое полипептидное слияние может включать один или более остатков цистеина или лизина, подвергающихся воздействию растворителя, которые можно использовать для ковалентной конъюгации соединения по изобретению (например, конъюгации с мономером или димером ингибитора нейраминидазы, в том числе посредством линкера).

Белки альбумины по изобретению включают любой белок альбумин, который был сконструирован с возможностью включения одного или более остатков цистеина или лизина, подвергающихся воздействию растворителя, которые могут обеспечивать сайт для конъюгации с соединение по изобретению (например, конъюгации с мономером или димером ингибитора нейраминидазы, в том числе посредством линкера). Наиболее предпочтительно, белок альбумин будет содержать единственный цистеин или лизин, подвергающийся воздействию растворителя, что делает возможной сайт-специфическую конъюгацию соединения по изобретению.

Иллюстративные способы получения сконструированных вариантов белков альбуминов, которые включают один или более подходящих для конъюгации остатков цистеина, представлены в заявке на патент США № 2017/0081389, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Вкратце,

предпочтительными вариантами белка альбумина являются те, которые содержат один, подвергающийся воздействию растворителем, неспаренный (например, свободный) остаток цистеина, что делает возможным сайт-специфическую конъюгацию линкера с остатком цистеина.

Белки альбумины, которые были сконструированы для обеспечения химической конъюгации с непарным остатком цистеина, подвергающимся воздействию растворителя, включают следующие варианты белка альбумина:

(a) белок альбумин, имеющий замену нецистеинового аминокислотного остатка на цистеин в аминокислотном остатке, соответствующем любому из L585, D1, A2, D562, A364, A504, E505, T79, E86, D129, D549, A581, D121, E82, S270, Q397 и A578 SEQ ID NO: 139;

(b) белок альбумин, имеющий вставку цистеина в положении, прилегающем к N- или C-концевой стороне аминокислотного остатка, соответствующего любому из L585, D1, A2, D562, A364, A504, E505, T79, E86, D129, D549, A581, D121, E82, S270, Q397 и A578 SEQ ID NO: 139;

(c) белок альбумин, сконструированный таким образом, чтобы он содержал неспаренный цистеин, имеющий свободную тиольную группу на остатке, соответствующем любому из C369, C361, C91, C177, C567, C316, C75, C169, C124 или C558 SEQ ID NO: 96 и, который может или не может быть образован посредством удаления или замены остатка, соответствующего C360, C316, C75, C168, C558, C361, C91, C124, C169 или C567 в SEQ ID NO: 139; и/или

(d) добавление цистеина к N- или C-концу белка альбумина.

В некоторых вариантах осуществления чистым результатом событий замены, делеции, добавления или вставки (a), (b), (c) и/или (d) является то, что количество компетентных для конъюгации цистеиновых остатков полипептидной последовательности увеличено по сравнению с исходной последовательностью альбумина. В некоторых вариантах осуществления чистым результатом событий замены, делеции, добавления или вставки (a), (b), (c) и/или (d) является то, что количество компетентных для конъюгации цистеиновых остатков полипептидной последовательности является равно одному, что обеспечивает возможность сайт-специфической конъюгации.

Предпочтительные варианты белка альбумина также включают белки альбумины, имеющие один подвергающийся воздействию растворителя остаток лизина, что позволяет осуществлять сайт-специфическую конъюгацию линкера с остатком лизина. Такие варианты могут быть созданы путем конструирования белка альбумина, включая любой из ранее описанных способов (например, вставку, делецию, замену или слияние с C-концом или N-концом).

Связывающие белок альбумин пептиды

Конъюгация биологически активного соединения со связывающим белок альбумин пептидом может изменять фармакодинамику биологически активного соединения, включая изменение поглощения тканями, проникновения и диффузии. В предпочтительном варианте осуществления конъюгация связывающего белок альбумина пептида с соединением по изобретению (например, мономером или димером ингибитора нейраминидазы посредством линкера) увеличивает эффективность или снижает токсичность соединения по сравнению с соединением отдельно.

Связывающие белок альбумин пептиды по изобретению включают любой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность длиной от 5 до 50 (например, от 5 до 40, от 5 до 30, от 5 до 20, от 5 до 15, от 5 до 10, от 10 до 50, от 10 до 30 или от 10 до 20) аминокислотных остатков, которые имеют аффинность и функции связывания белка альбумина, как любой из белков альбуминов, описанных в данном документе.

Предпочтительно, связывающий белок альбумин пептид связывается с встречающимся в природе сывороточным альбумином, наиболее предпочтительно с сывороточным альбумином человека. Связывающий белок альбумин пептид, может иметь различное происхождение, например синтетическое, человеческое, мышиное или крысиное. Связывающие белки альбумины пептиды по изобретению включают связывающие белки альбумины пептиды, которые были сконструированы с возможностью включения одного или более (например, двоих, троих, четырех или пяти) остатков цистеина или лизина, подвергающихся воздействию растворителя, которые могут обеспечивать сайт для конъюгации с соединение по изобретению (например, конъюгации с мономером или димером ингибитора нейраминидазы, в том числе посредством линкера). Наиболее предпочтительно, связывающий белок альбумин пептид будет содержать единственный цистеин или лизин, подвергающийся воздействию растворителя, что делает возможной сайт-специфическую конъюгацию соединения по изобретению. Связывающие белки альбумины пептиды могут включать только встречающиеся в природе аминокислотные остатки или могут включать один или более не встречающихся в природе аминокислотных остатков. В случаях включения не встречающийся в природе аминокислотный остаток (например, боковая цепь не встречающегося в природе аминокислотного остатка) может использоваться в качестве точки присоединения для соединения по изобретению (например, мономера или димера ингибитора нейраминидазы, в том числе посредством линкера). Связывающие белок альбумин пептиды по изобретению могут быть линейными или циклическими. Связывающие белок альбумин пептиды по изобретению включают любые связывающие белок альбумин пептиды, известные специалисту в данной области, примеры которых представлены в данном документе.

Связывающий белок альбумин пептид и конъюгаты, включающие связывающий белок альбумин пептид, предпочтительно связывают белок альбумин (например, сывороточный альбумин человека) с аффинностью, характеризующейся константой диссоциации, Kd, которая составляет менее около 100 мкМ, предпочтительно около 100 нМ и наиболее предпочтительно по существу не связывают другие белки плазмы. Конкретными примерами таких соединений являются линейные или циклические пептиды, предпочтительно длиной от около 10 до 20 аминокислотных остатков, необязательно модифицированные на N-конце или C-конце, или на обоих.

Пептиды, связывающиеся с белком альбумином, включают линейные и циклические пептиды, содержащие следующие общие формулы, где Xaa представляет собой любую аминокислоту:

SEQ ID NO: 148
Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Cys-Xaa-Xaa-Phe-Cys-Xaa-Asp-Trp-Pro-Xaa-Xaa-Xaa-Ser-Cys

SEQ ID NO: 149
Val-Cys-Tyr-Xaa-Xaa-Xaa-Ile-Cys-Phe

SEQ ID NO: 150
Cys-Tyr-Xaa-Pro-Gly-Xaa-Cys

SEQ ID NO: 151
Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp

SEQ ID NO: 152

Trp-Cys-Asp-Xaa-Xaa-Leu-Xaa-Ala-Xaa-Asp-Leu-Cys

SEQ ID NO: 153
Asp-Leu-Val-Xaa-Leu-Gly-Leu-Glu-Cys-Trp

Связывающие белок альбумин пептиды по изобретению дополнительно включают любую из следующих пептидных последовательностей, которые могут быть линейными или циклическими:

SEQ ID NO: 154 DLCLRDWGCLW
SEQ ID NO: 155 DICLPRWGCLW
SEQ ID NO: 156 MEDICLPRWGCLWGD
SEQ ID NO: 157 QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
SEQ ID NO: 158 QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
SEQ ID NO: 159 QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
SEQ ID NO: 160 EDICLPRWGCLWEDD
SEQ ID NO: 161 RLMEDICLPRWGCLWEDD
SEQ ID NO: 162 MEDICLPRWGCLWEDD
SEQ ID NO: 163 MEDICLPRWGCLWED
SEQ ID NO: 164 RLMEDICLARWGCLWEDD
SEQ ID NO: 165 EVRSFCTRWPAEKSCKPLRG
SEQ ID NO: 166 RAPESFVCYWETICFERSEQ
SEQ ID NO: 167 EMCYFPGICWM

Связывающие белок альбумин пептиды SEQ ID NO: 154-167 могут дополнительно включать дополнительные аминокислоты на N-конце (Xaa)x и/или дополнительные аминокислоты на C-конце (Xaa)z, где Xaa представляет собой любую аминокислоту, x и z являются целыми числами большими или равными нулю, предпочтительно меньше 100, предпочтительно меньше 10 и более предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

Дополнительные иллюстративные связывающие белок альбумин пептиды представлены в заявке на патент США № 2005/0287153, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Конъюгация связывающих белок альбумин пептидов

Связывающий белок альбумин пептид по изобретению может быть конъюгирован (например, посредством ковалентной связи) с любым соединением по изобретению (например, с помощью линкерной части мономера или димера ингибитора нейраминидазы). Связывающий белок альбумин пептид может быть конъюгирован с любым соединением по изобретению любым способом, известным специалистам в данной области, для получения низкомолекулярных пептидных конъюгатов. Это может включать ковалентную конъюгацию с группой боковой цепи аминокислотного остатка, такого как цистеин, лизин или неприродная аминокислота. Альтернативно, ковалентная конъюгация может происходить на C-конце (например, с C-концевой карбоновой кислотой или с группой боковой цепи C-концевого остатка) или на N-конце (например, с N-концевой аминогруппой или другой группой боковой цепи N-концевой аминокислоты).

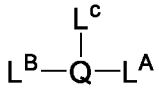
V. Линкеры

Линкер относятся к связи или соединению между двумя или более компонентами в конъюгате, описанном в данном документе (например, между двумя ингибиторами нейраминидазы в конъюгате, описанном в данном документе, между ингибитором нейраминидазы и Fc-доменом или белком альбумином в конъюгате, описанном в данном документе, и между димером двух ингибиторов нейраминидазы и Fc-доменом или белком альбумином в описанном в данном документе конъюгате).

Линкеры в конъюгатах, имеющие Fc-домен или белок альбумин, ковалентно связанный с димерами ингибиторов нейраминидазы

В конъюгате, содержащем мономер Fc-домена, Fc-домен, Fc-связывающий пептид, белок альбумин или связывающий белок альбумин пептид, ковалентно связанный с одним или более димерами ингибиторов нейраминидазы, как описано в данном документе, линкер в конъюгате (например, L или L') может представлять собой разветвленную структуру. Как описано далее в данном документе, линкер в описанном в данном документе конъюгате (например, L или L') может быть поливалентной структурой, например, двухвалентной или трехвалентной структурой, имеющей два или три плеча, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, когда линкер имеет три плеча, два плеча могут быть присоединены к первому и второму ингибиторам нейраминидазы, а третье плечо может быть присоединено к мономеру Fc-домена и Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду. В некоторых вариантах осуществления, когда линкер имеет два плеча, одно плечо может быть присоединено к Fc-домену или белку альбумину, а другое плечо может быть присоединено к одному из двух ингибиторов нейраминидазы. В других вариантах осуществления линкер с двумя плечами можно использовать для присоединения двух ингибиторов нейраминидазы к конъюгату, содержащему Fc-домен или белок альбумина, ковалентно связанный с одним или более димерами ингибиторов нейраминидазы.

В некоторых вариантах осуществления линкер в конъюгате, имеющем Fc-домен или белок альбумин, ковалентно связанный с одним или более димерами ингибиторов нейраминидазы, описан формулой (D-L-I):



(L-I)

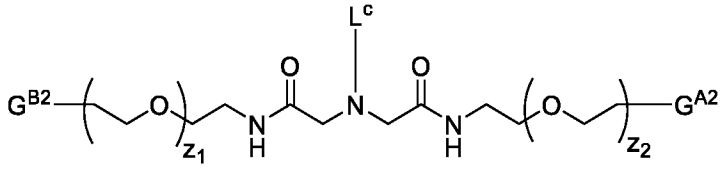
где L^A описан формулой G^{A1}-$(Z^{A1})_{g1}$-$(Y^{A1})_{h1}$-$(Z^{A2})_{i1}$-$(Y^{A2})_{j1}$-$(Z^{A3})_{k1}$-$(Y^{A3})_{l1}$-$(Z^{A4})_{m1}$-$(Y^{A4})_{n1}$-$(Z^{A5})_{o1}$-G^{A2}; L^B описан формулой G^{B1}-$(Z^{B1})_{g2}$-$(Y^{B1})_{h2}$-$(Z^{B2})_{i2}$-$(Y^{B2})_{j2}$-$(Z^{B3})_{k2}$-$(Y^{B3})_{l2}$-$(Z^{B4})_{m2}$-$(Y^{B4})_{n2}$-$(Z^{B5})_{o2}$-G^{B2}; L^C описан формулой G^{C1}-$(Z^{C1})_{g3}$-$(Y^{C1})_{h3}$-$(Z^{C2})_{i3}$-$(Y^{C2})_{j3}$-$(Z^{C3})_{k3}$-$(Y^{C3})_{l3}$-$(Z^{C4})_{m3}$-$(Y^{C4})_{n3}$-$(Z^{C5})_{o3}$-G^{C2}; G^{A1} представляет собой связь, присоединенную к Q в формуле (D-L-I) G^{A2} представляет собой связь, присоединенную к первому ингибитору нейромидазы (например, A_1; G^{B1} представляет собой связь, присоединенную к Q в формуле (D-L-I); G^{B2} представляет собой связь, присоединенную ко второму ингибитору нейромидазы (например, A_2); G^{B2} представляет собой связь, присоединенную к Q в формуле (D-L-I); G^{C2} представляет собой связь, присоединенную к мономеру домена Fc, домену Fc, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду, или функциональной группе, способной вступать в реакцию с функциональной группой, конъюгированной с мономером домена Fc, доменом Fc, Fc-связывающим пептидом, белком альбумином или связывающим белок альбумин пептидом (например, малеимид и цистеин, амин и активированная карбоновая кислота, тиол и малеимид, активированная сульфоновая кислота и амин, изоцианат и амин, азид и алкин, алкен и тетразин); каждый из Z^{A1}, Z^{A2}, Z^{A3}, Z^{A4}, Z^{A5}, Z^{B1}, Z^{B2}, Z^{B3}, Z^{B4}, Z^{B5}, Z^{C1}, Z^{C2}, Z^{C3}, Z^{C4}, и Z^{C5} независимо представляет собой необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно

замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен или необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен; каждый из YY^{A1}, Y^{A2}, Y^{A3}, Y^{A4}, Y^{B1}, Y^{B2}, Y^{B3}, Y^{B4}, Y^{C1}, Y^{C2}, Y^{C3}, и Y^{C4} независимо представляет собой O, S, NRi, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино; Ri представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил, необязательно замещенный C2-C15 гетероарил; каждое из g1, h1, i1, j1, k1, l1, m1, n1, o1, g2, h2, i2, j2, k2, l2, m2, n2, o2, g3, h3, i3, j3, k3, l3, m3, n3 и o3 независимо равно 0 или 1; Q представляет собой атом азота, необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен или необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен.

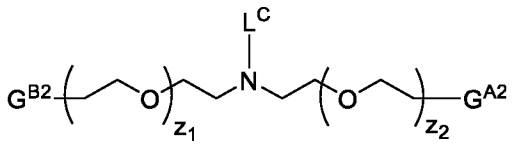
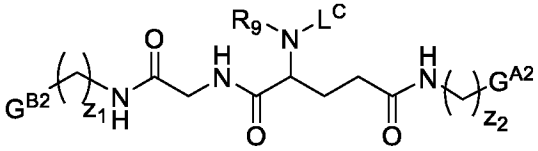
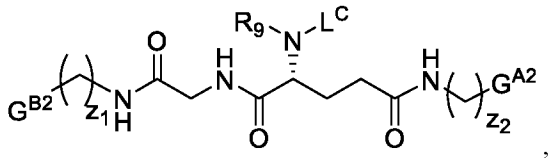
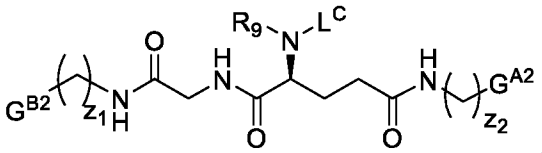
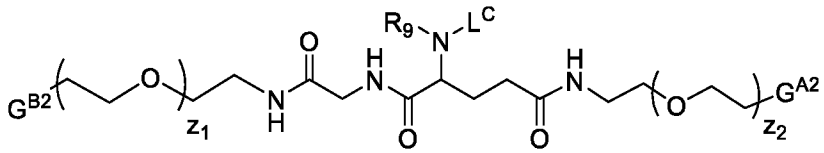
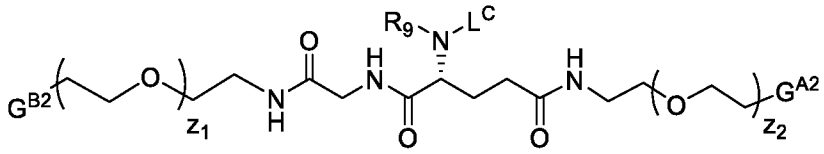
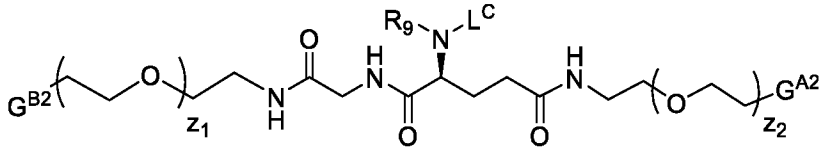
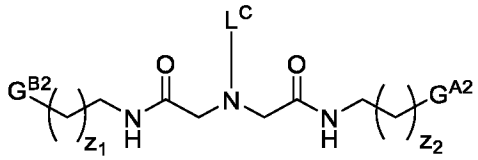
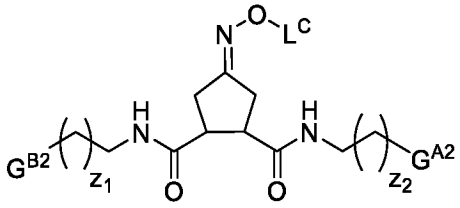
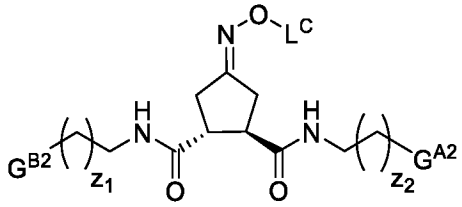
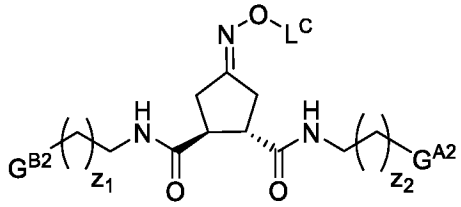
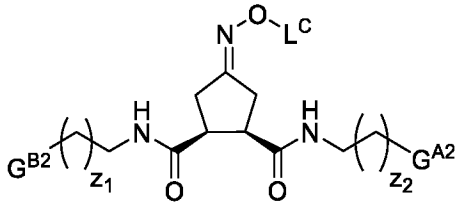
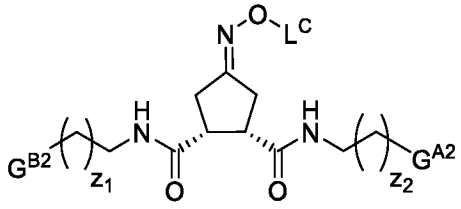
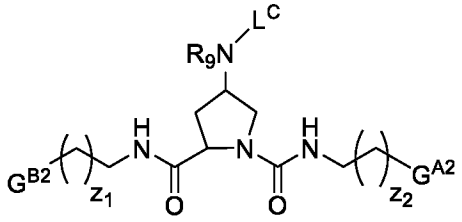
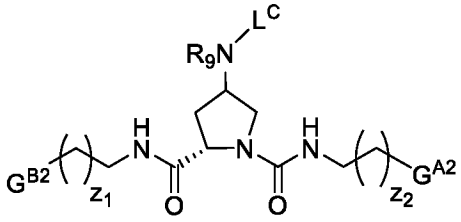
В некоторых вариантах осуществления L^C может иметь две точки присоединения к Fc-домену (например, два G^{C2}).

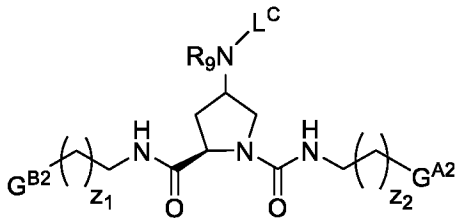
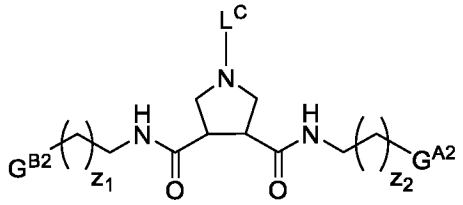
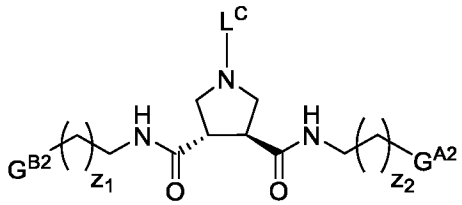
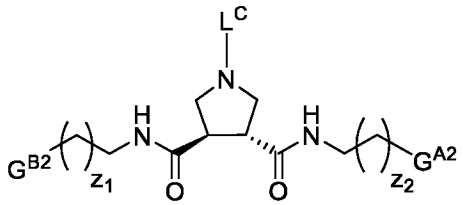
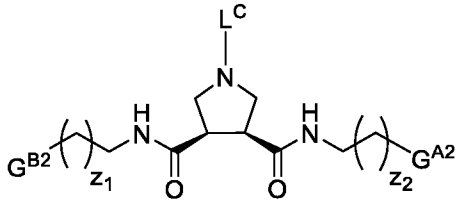
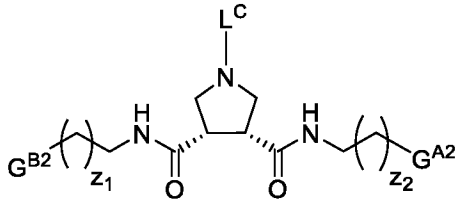
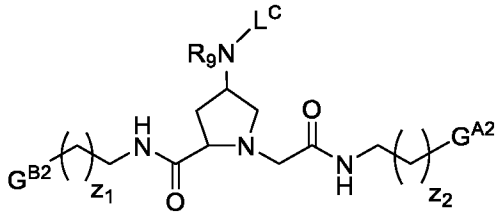
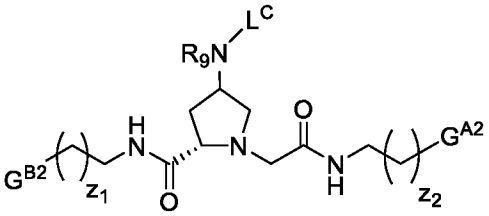
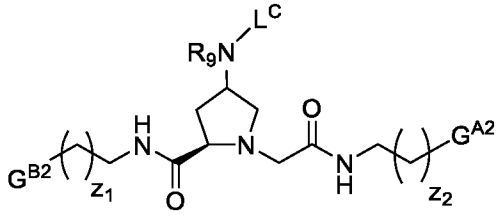
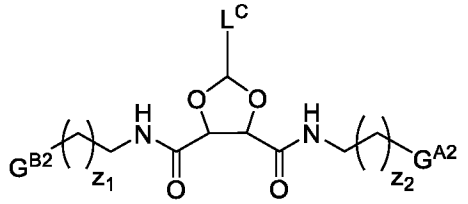
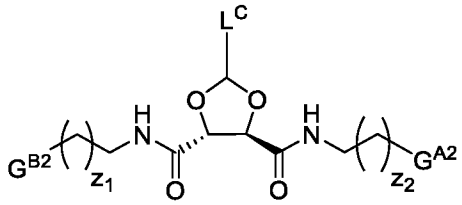
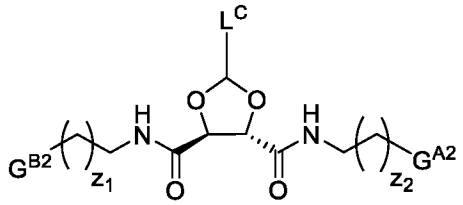
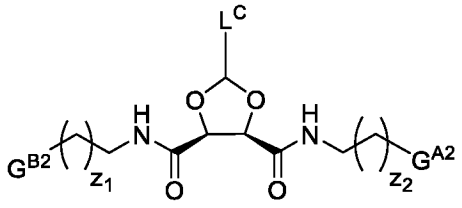
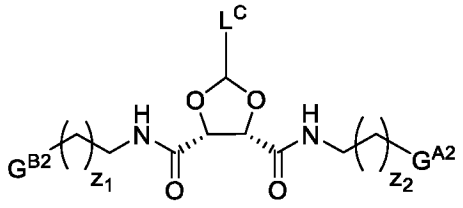
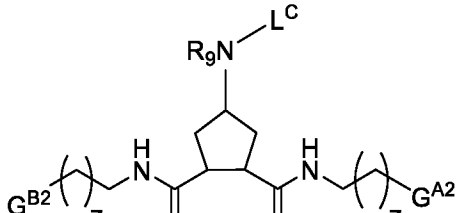
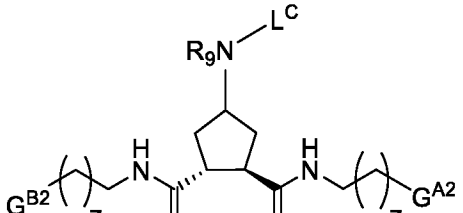
В некоторых вариантах осуществления L включает полиэтиленгликолевый (ПЭГ) линкер. ПЭГ линкер включает линкер, имеющий структуру повторяющегося элемента $(-CH_2CH_2O-)_n$, где n является целым числом от 2 до 100. Полиэтиленгликолевый линкер может ковалентно соединять ингибитор нейраминидазы и E (например, в конъюгате любой из формул (M-I)-(M-XI)). Полиэтиленгликолевый линкер может ковалентно соединять первый ингибитор нейраминидазы и второй ингибитор нейраминидазы (например, в конъюгате любой из формул (D-I)-(D-XI)). Полиэтиленгликолевый линкер может ковалентно соединять димер ингибитора нейраминидазы и E (например, в конъюгате любой из формул (D-I)-(D-XI)). Полиэтиленгликолевый линкер может быть выбран из любого из $ПЭГ_2$-$ПЭГ_{100}$ (например, $ПЭГ_2$, $ПЭГ_3$, $ПЭГ_4$, $ПЭГ_5$, $ПЭГ_5$-$ПЭГ_{10}$, $ПЭГ_{10}$-$ПЭГ_{20}$, $ПЭГ_{20}$-$ПЭГ_{30}$, $ПЭГ_{30}$-$ПЭГ_{40}$, $ПЭГ_{50}$-$ПЭГ_{60}$, $ПЭГ_{60}$-$ПЭГ_{70}$, $ПЭГ_{70}$-$ПЭГ_{80}$, $ПЭГ_{80}$-$ПЭГ_{90}$, $ПЭГ_{90}$-$ПЭГ_{100}$). В некоторых вариантах осуществления L^c включает ПЭГ линкер, где L^C ковалентно присоединен к каждому из Q и E.

Линкеры формулы (D-L-I), которые можно использовать в конъюгатах, описанных в данном документе, включают, но не ограничиваются ими:



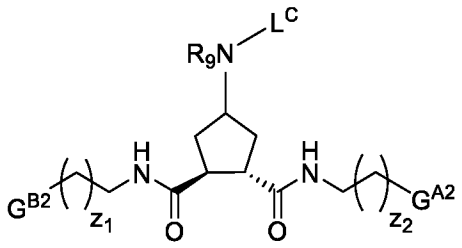
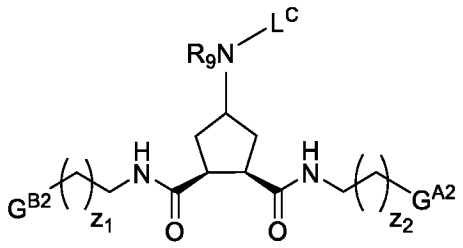
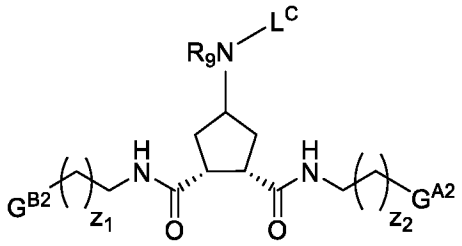
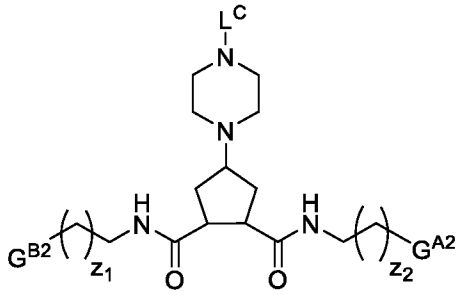
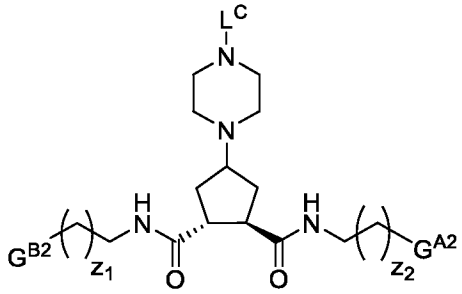
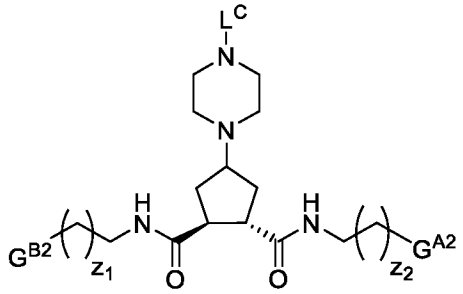
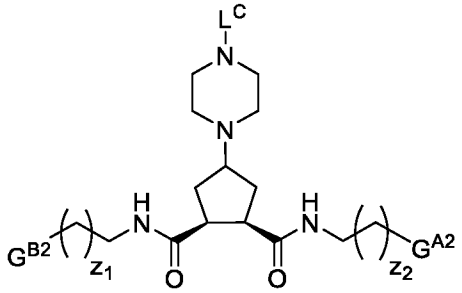
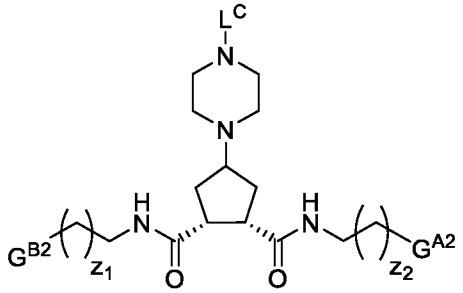
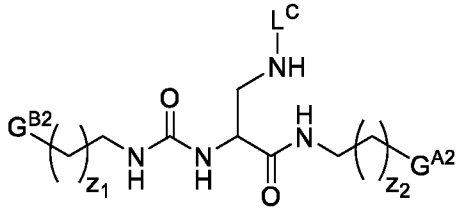
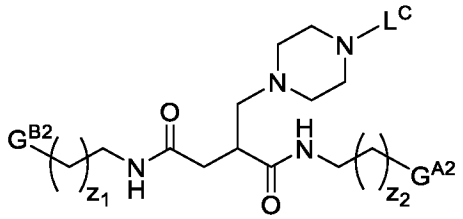
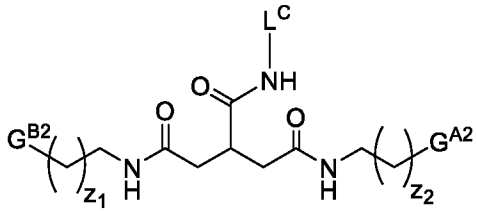
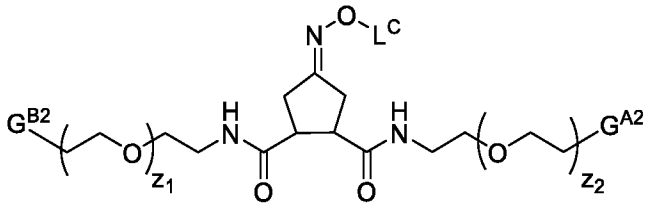
,

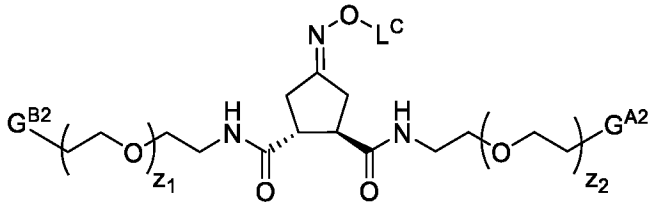
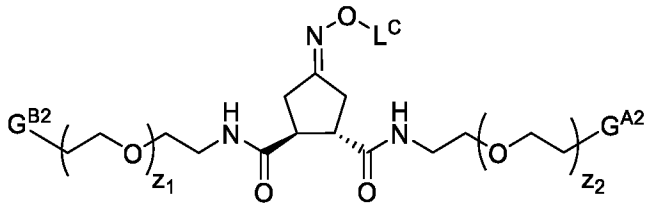
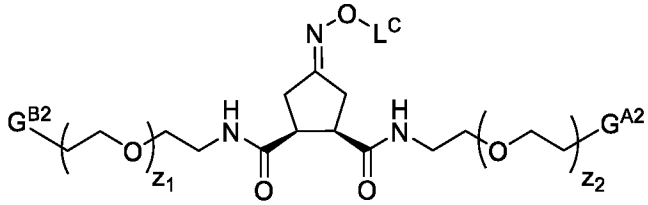
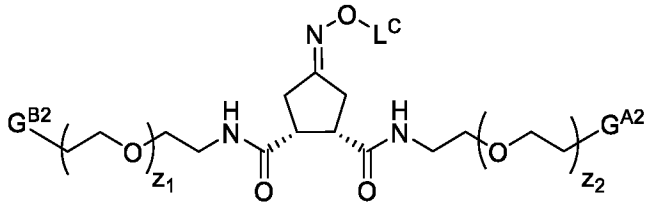
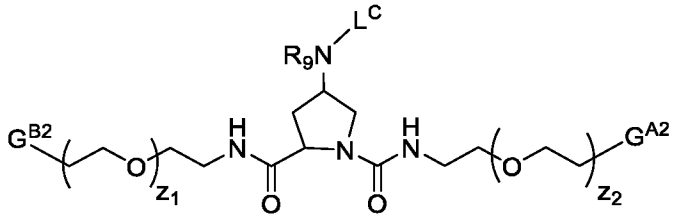
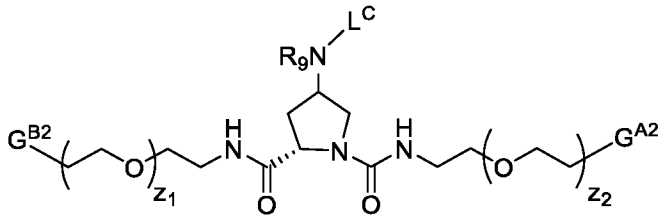
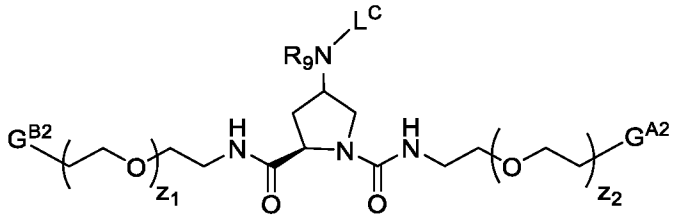
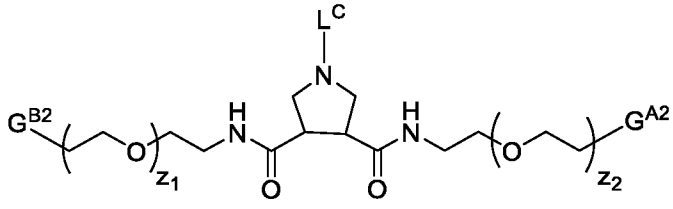

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

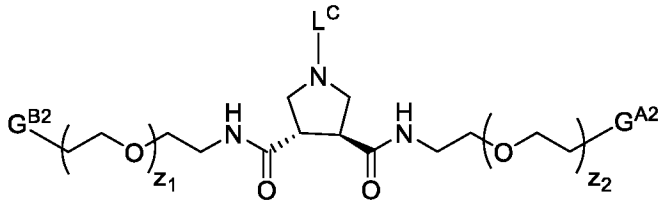

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

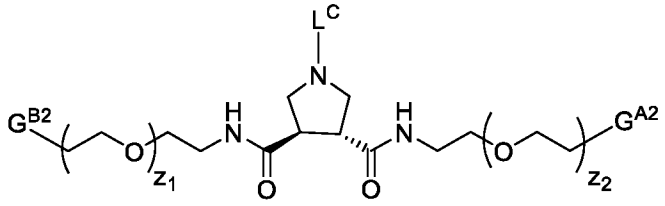
,

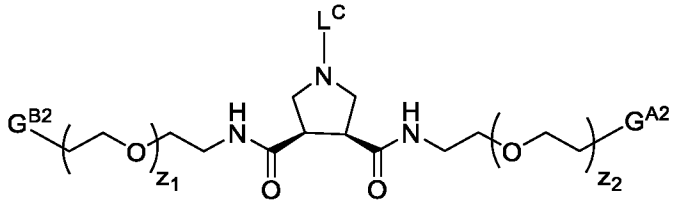
,

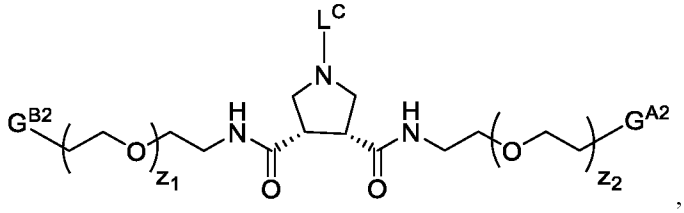

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

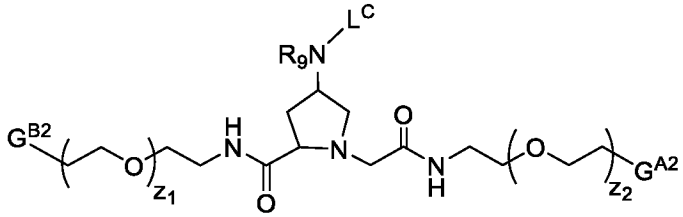

,

,

,

,

,

,

,

,

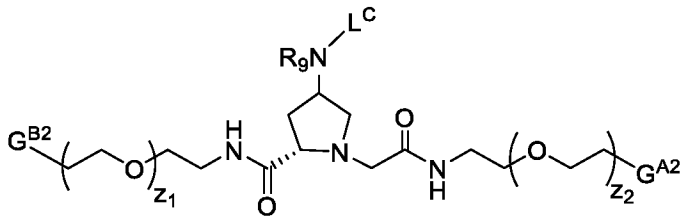

,

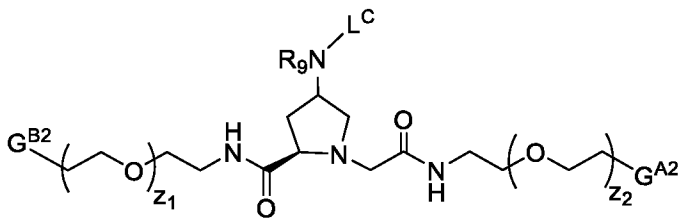

,

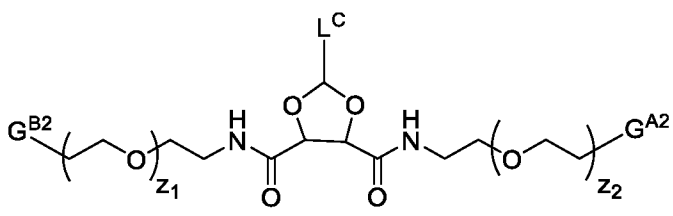

,

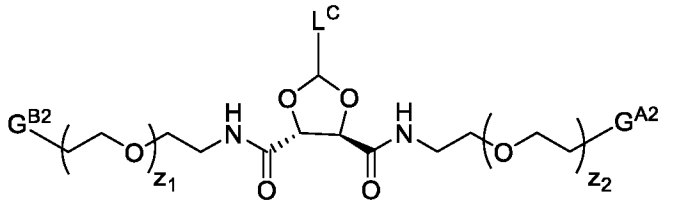
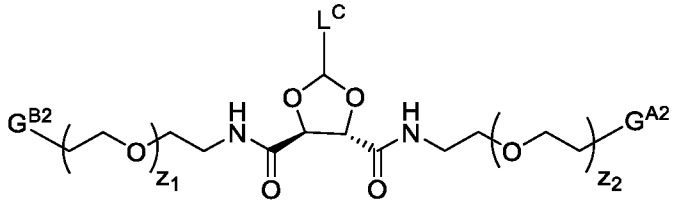
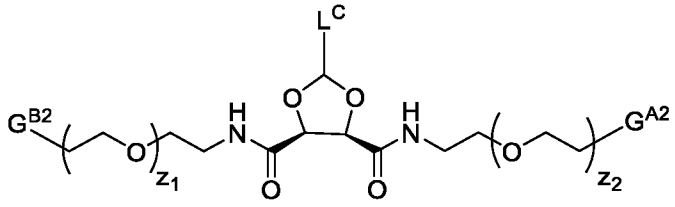
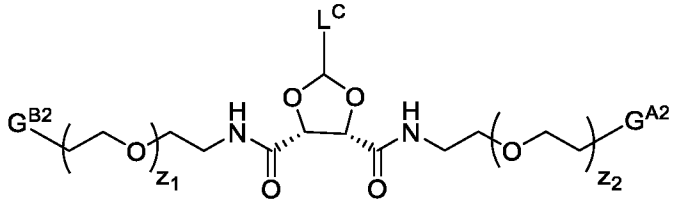
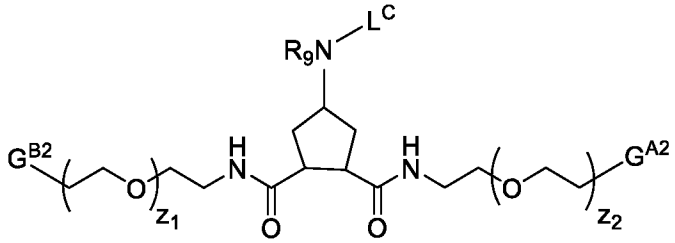
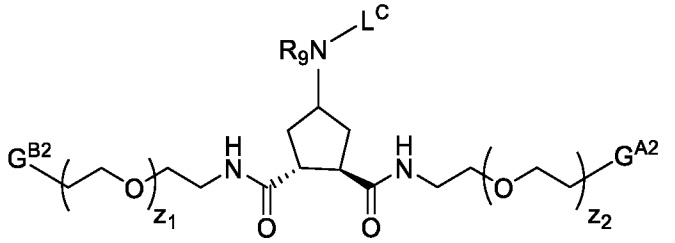
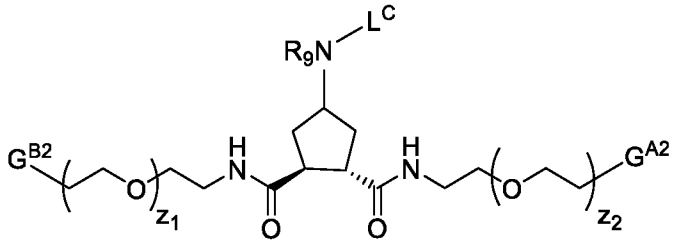

,

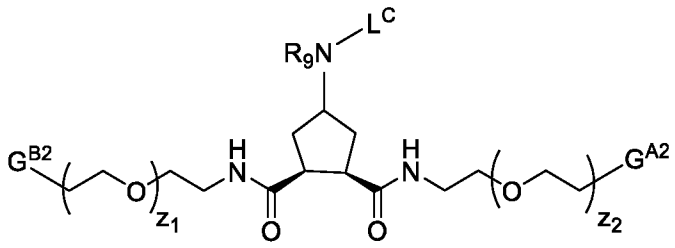

,

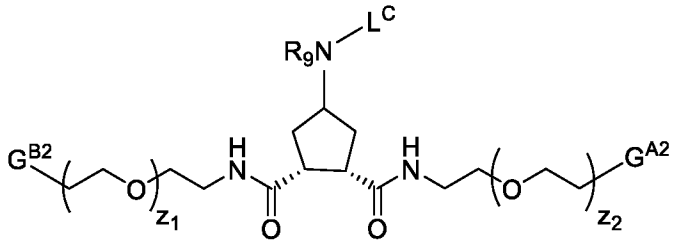

,

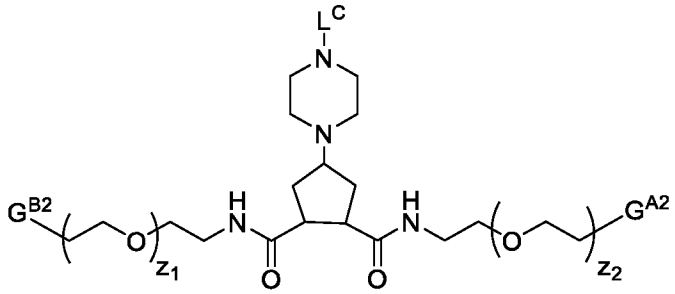

,

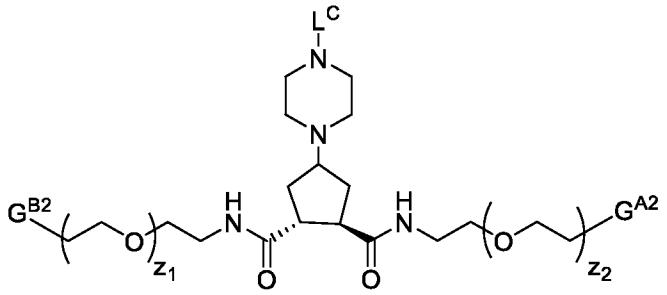

,

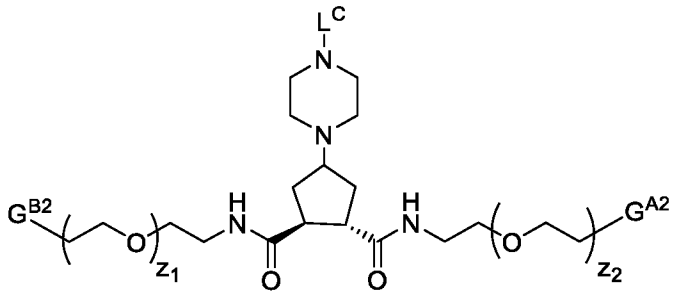

,

,

,

,

,

,

,

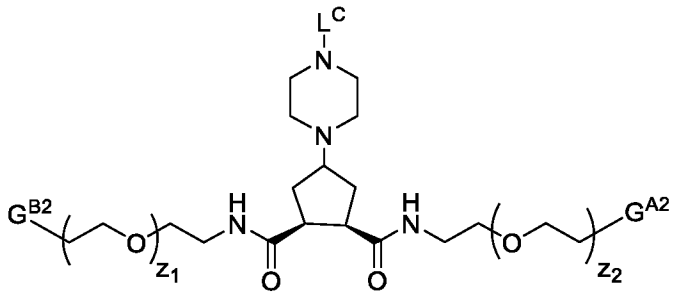

R9N
LC
GB2
GA2
H
N
O
z1
z2
,

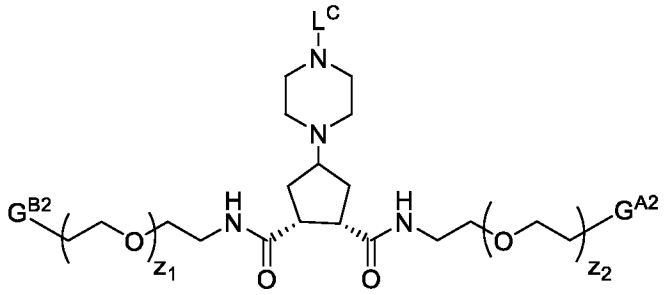

R9N
LC
GB2
GA2
H
N
O
z1
z2
,


LC
N
GB2
GA2
H
N
O
z1
z2
,

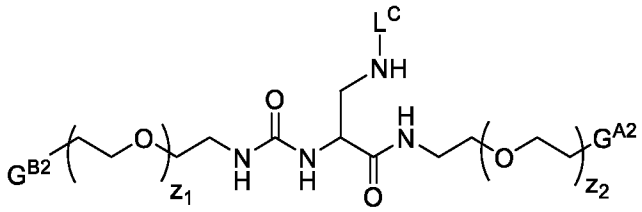

LC
N
GB2
GA2
H
N
O
z1
z2
,


LC
N
GB2
GA2
H
N
O
z1
z2
,

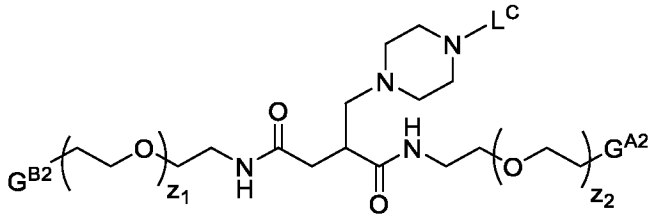

LC
N
GB2
GA2
H
N
O
z1
z2
,



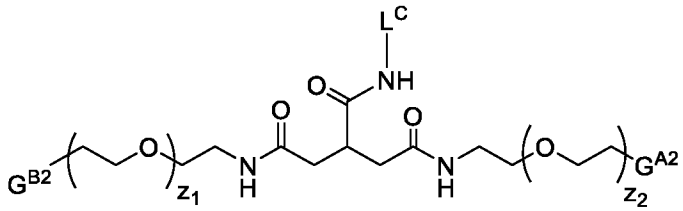
,



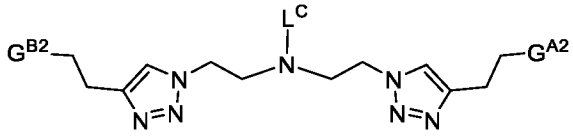
,



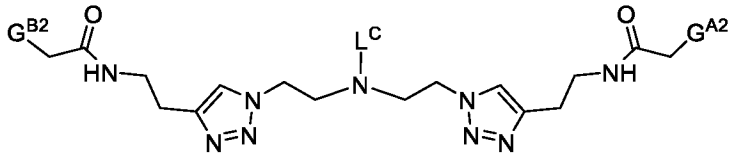
,



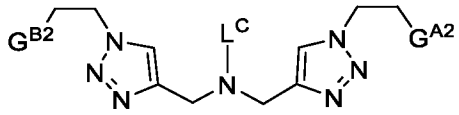
,



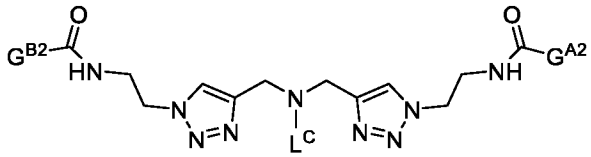
,



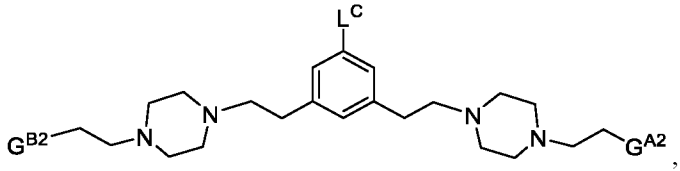
,



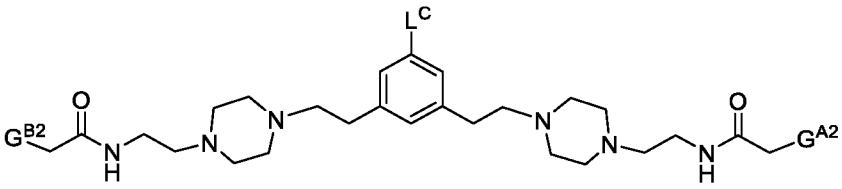
,

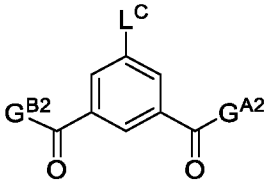


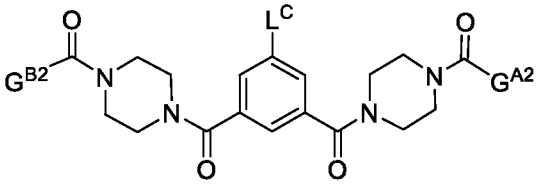
,

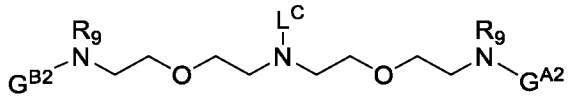


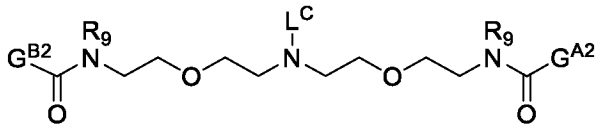
,

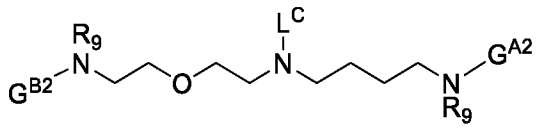

,

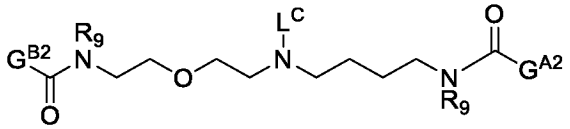

,

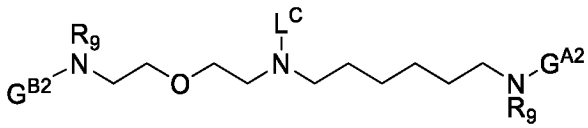

,

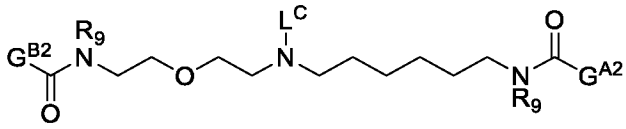

,

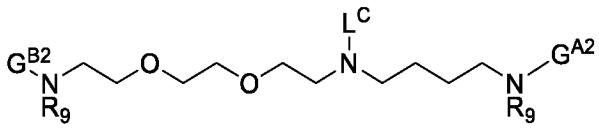

;

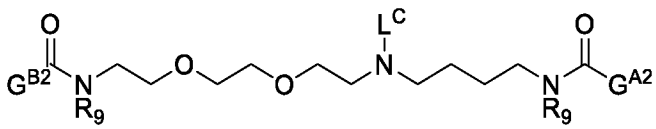

;

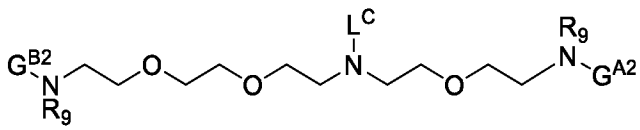

;

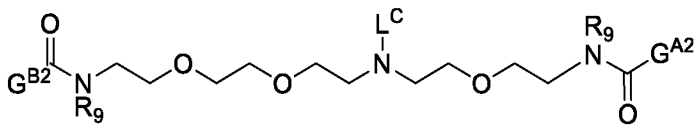

;


;


;


;

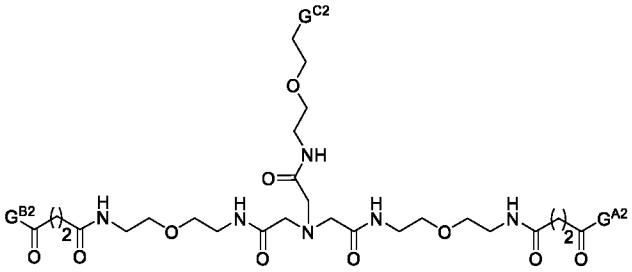
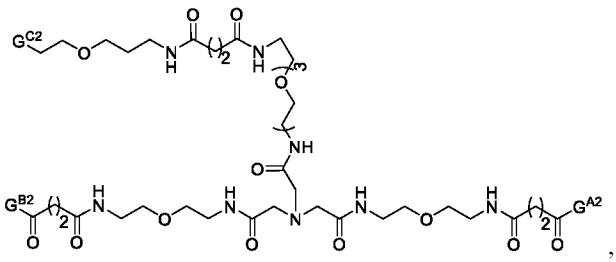
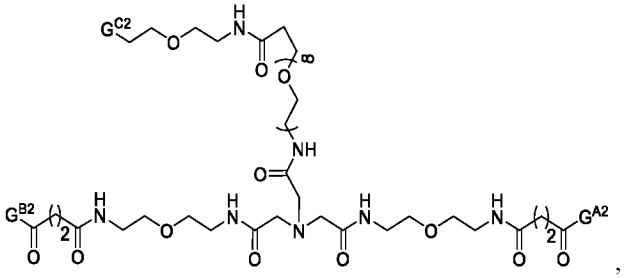
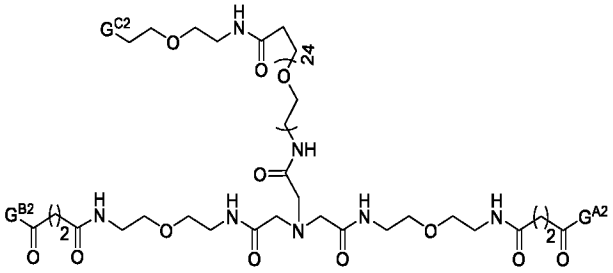
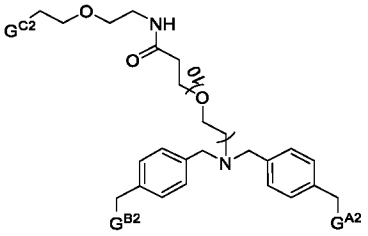
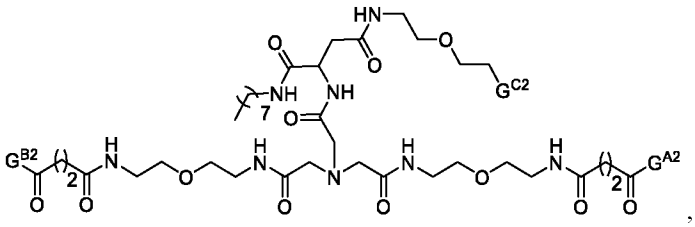
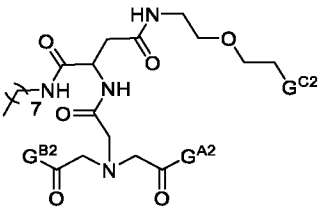
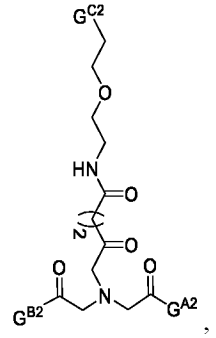
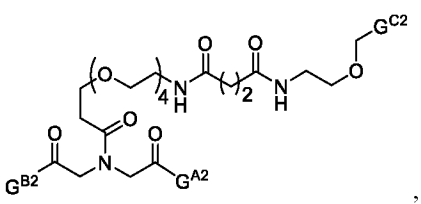
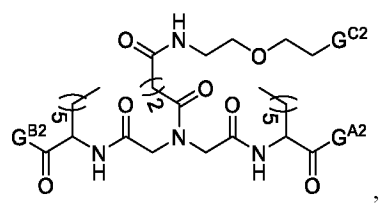
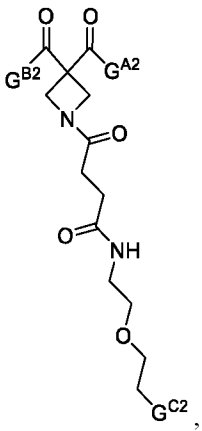
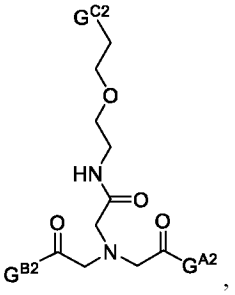

;

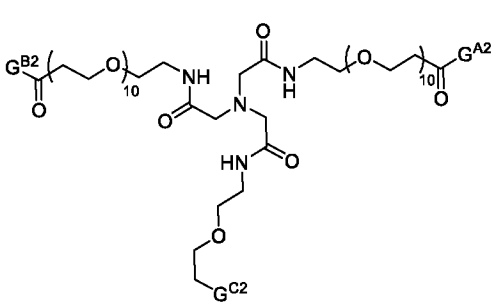
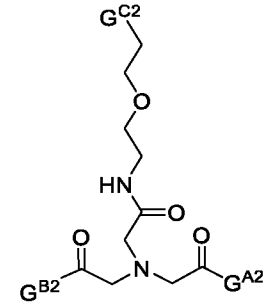
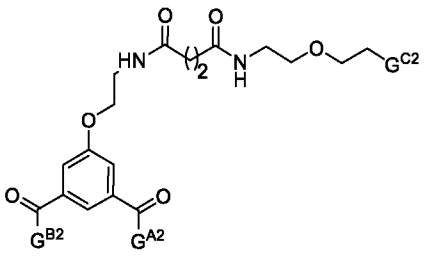
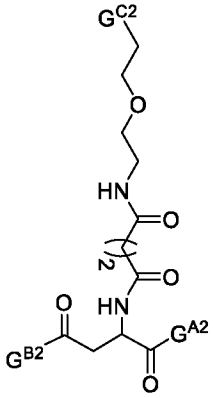
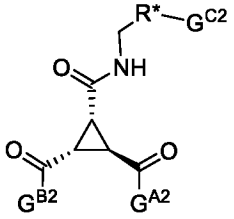
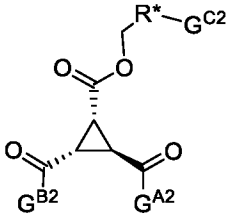
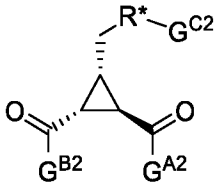
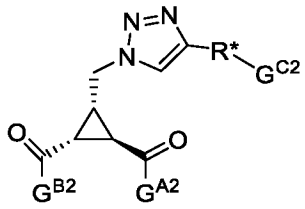
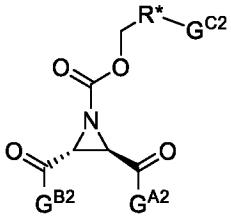
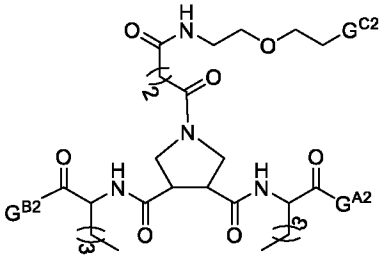
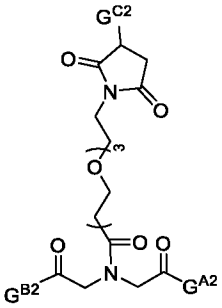
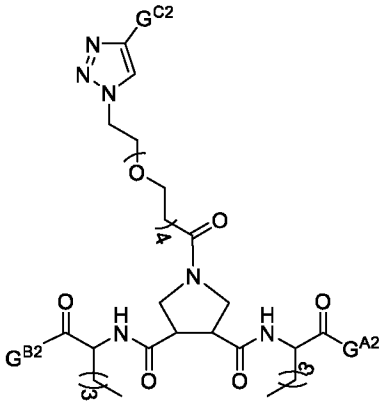
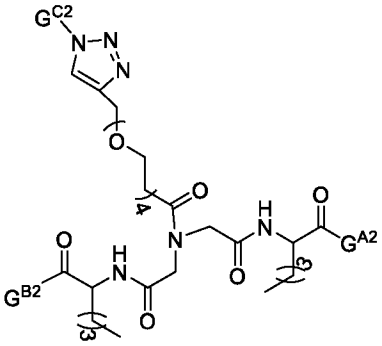
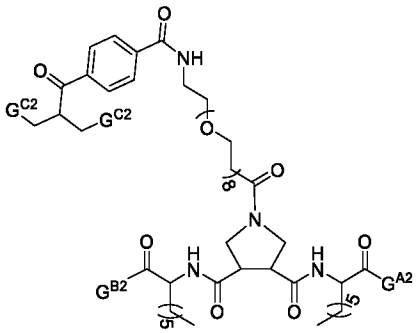
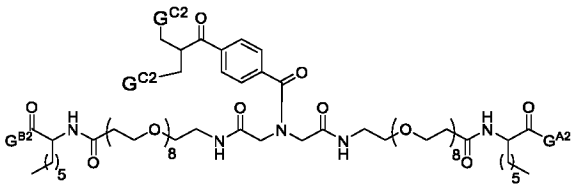
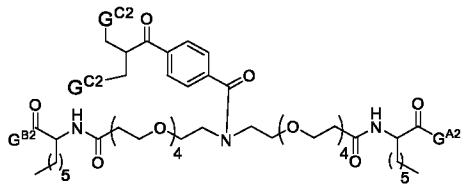

; или

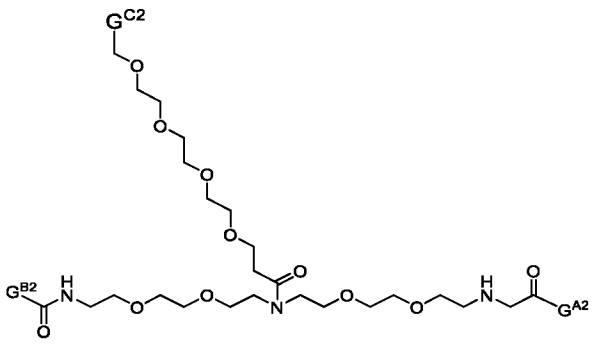
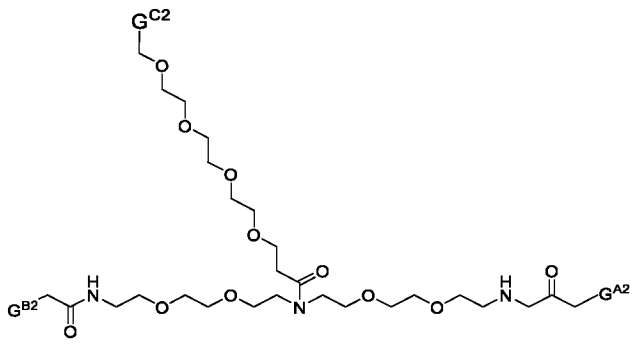
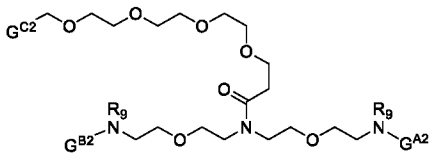
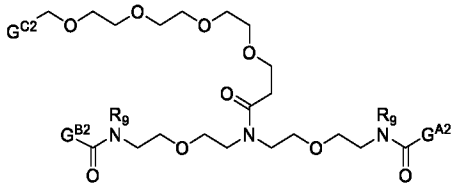
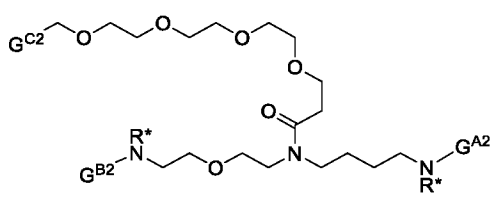
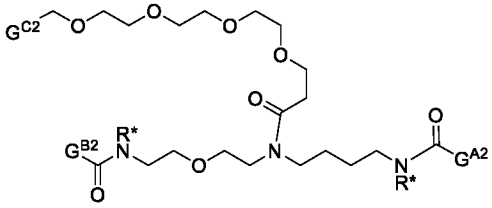
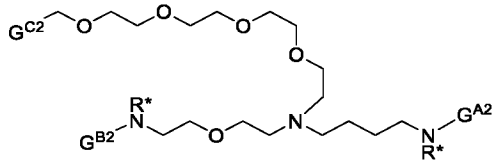
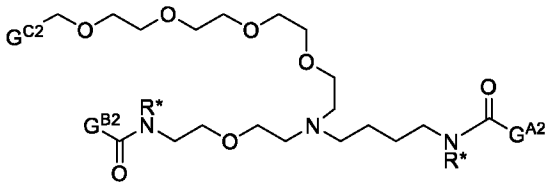
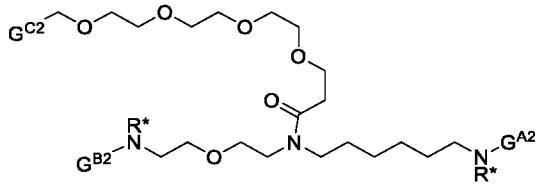
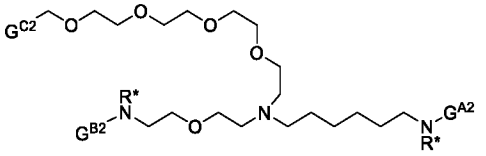
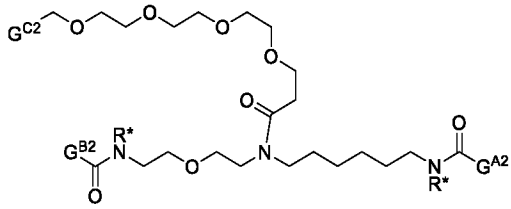
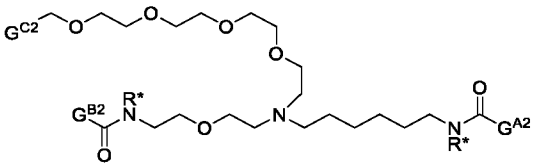
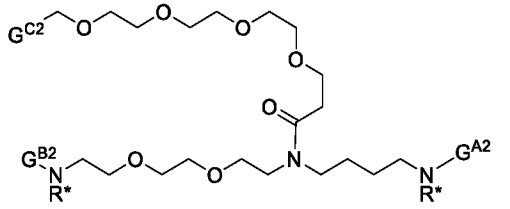
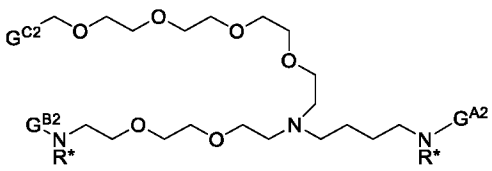
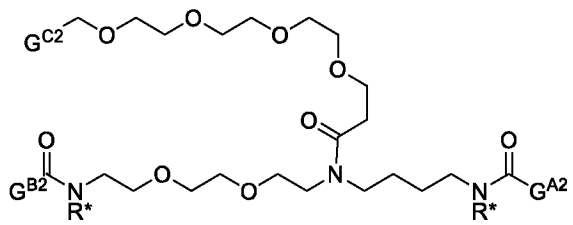
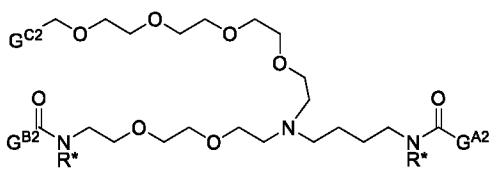
,

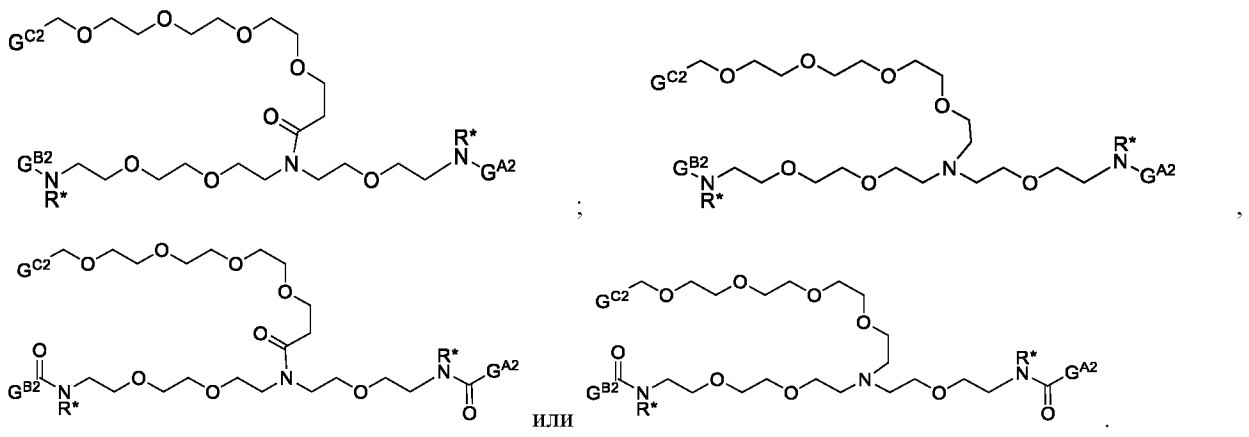
где z_1 и z_2, каждое независимо, представляет собой целое число от 1 до 20; и R_9 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила.

Линкеры формулы (D-L-I) могут также включать любой из


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

;

,

;

,

;

,



Линкеры в конъюгатах, имеющие Fc-домен или белок альбумин, ковалентно связанный с мономерами ингибиторов нейраминидазы

В конъюгате, содержащем мономер Fc-домена, Fc-домен, Fc-связывающий пептид, белок альбумин или связывающий белок альбумин пептид, ковалентно связанный с одним или более мономерами ингибиторов нейраминидазы, как описано в данном документе, линкер в конъюгате (например, L или L') может представлять собой двухвалентную структуру имеющую два плеча. Одно плечо двухвалентного линкера может быть присоединено к мономеру ингибитора нейраминидазы, а другое плечо может быть присоединено к мономеру Fc-домена и Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду. В некоторых вариантах осуществления один или более мономеров ингибиторов нейраминидазы в описанных в данном документе конъюгатах могут быть независимо связаны с атомом в мономере Fc-домена и Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумином или связывающим белок альбумин пептидом.

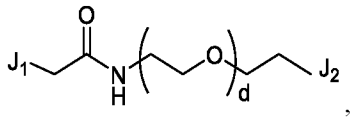
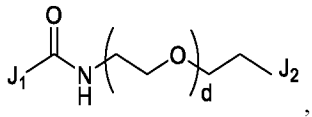
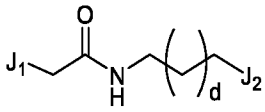
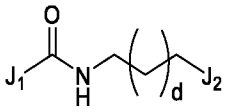
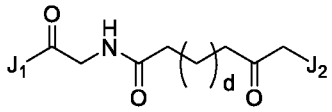
В некоторых вариантах осуществления линкер описан формулой (M-L-I):

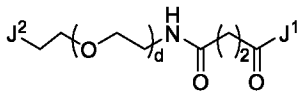
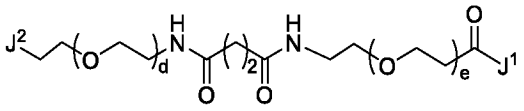
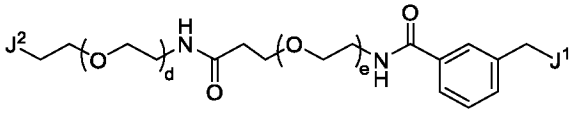
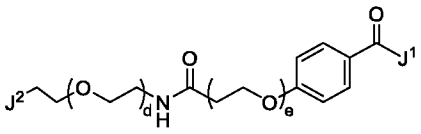
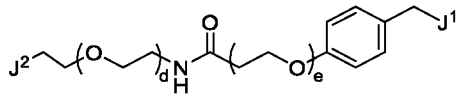
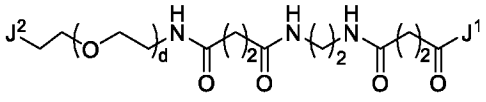
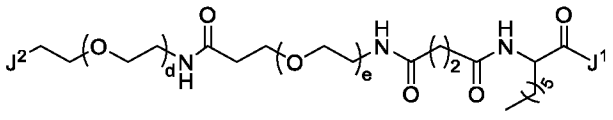
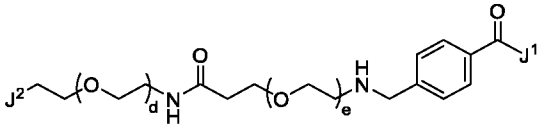
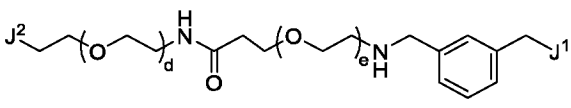
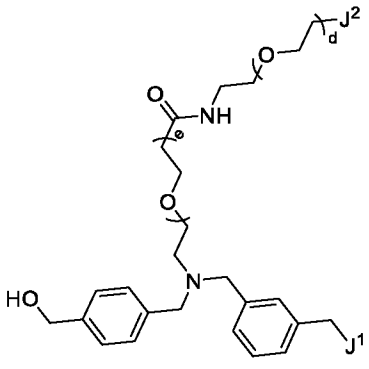
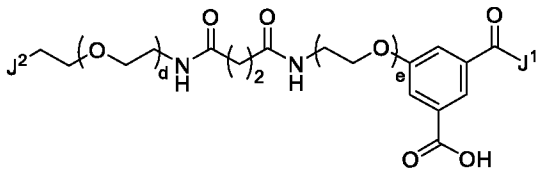
J^1-$(Q^1)_g$-$(T^1)_h$-$(Q^2)_i$-$(T^2)_j$-$(Q^3)_k$-$(T^3)_l$-$(Q^4)_m$-$(T^4)_n$-$(Q^5)_o$-J^2

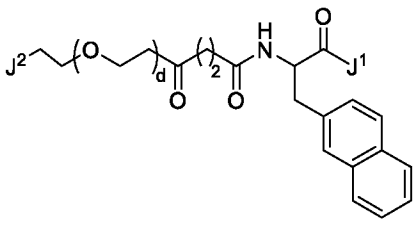
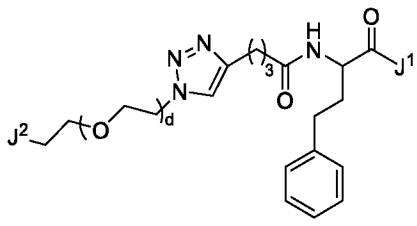
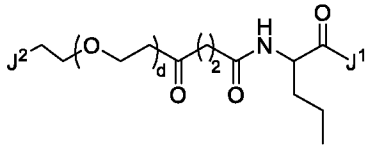
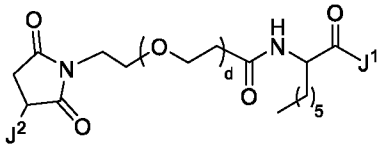
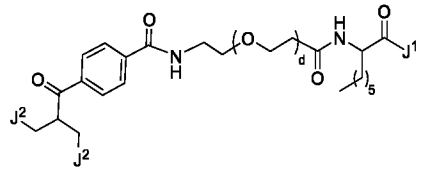
где J^1 представляет собой связь, присоединенную к ингибитору нейраминидазы; J^2 представляет собой связь, присоединенную к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду, или функциональной группе, способной вступать в реакцию с функциональной группой, конъюгированной с мономером Fc-домена, Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумином или связывающим белок альбумин пептидом (например, малеимид и цистеин, амин и активированная карбоновая кислота, тиол и малеимид, активированная сульфоновая кислота и амин, изоцианат и амин, азид и алкин, алкен и тетразин); каждый из Q^1, Q^2, Q^3, Q^4 и Q^5, независимо, представляет собой необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен или необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен; каждый из T^1, T^2, T^3, T^4, независимо, представляет собой O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино; R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил,

необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил; и каждое из g, h, i, j, k, l, m, n и o независимо равно 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления J^2 может иметь две точки присоединения к мономеру Fc-домена и Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду (например, два J^2).

Линкеры формулы (M-L-I), которые можно использовать в конъюгатах, описанных в данном документе, включают, но не ограничиваются ими:  ,  ,  ,  или  , где d является целым числом от 1 до 20 (например, d равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20).

Линкеры формулы (MLI), которые можно использовать в конъюгатах, описанных в данном документе, включают, но не ограничиваются ими,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  .


,

,

,

и

, где каждый из d и e независимо представляет собой целое число от 1 до 26.

Связывающие группы

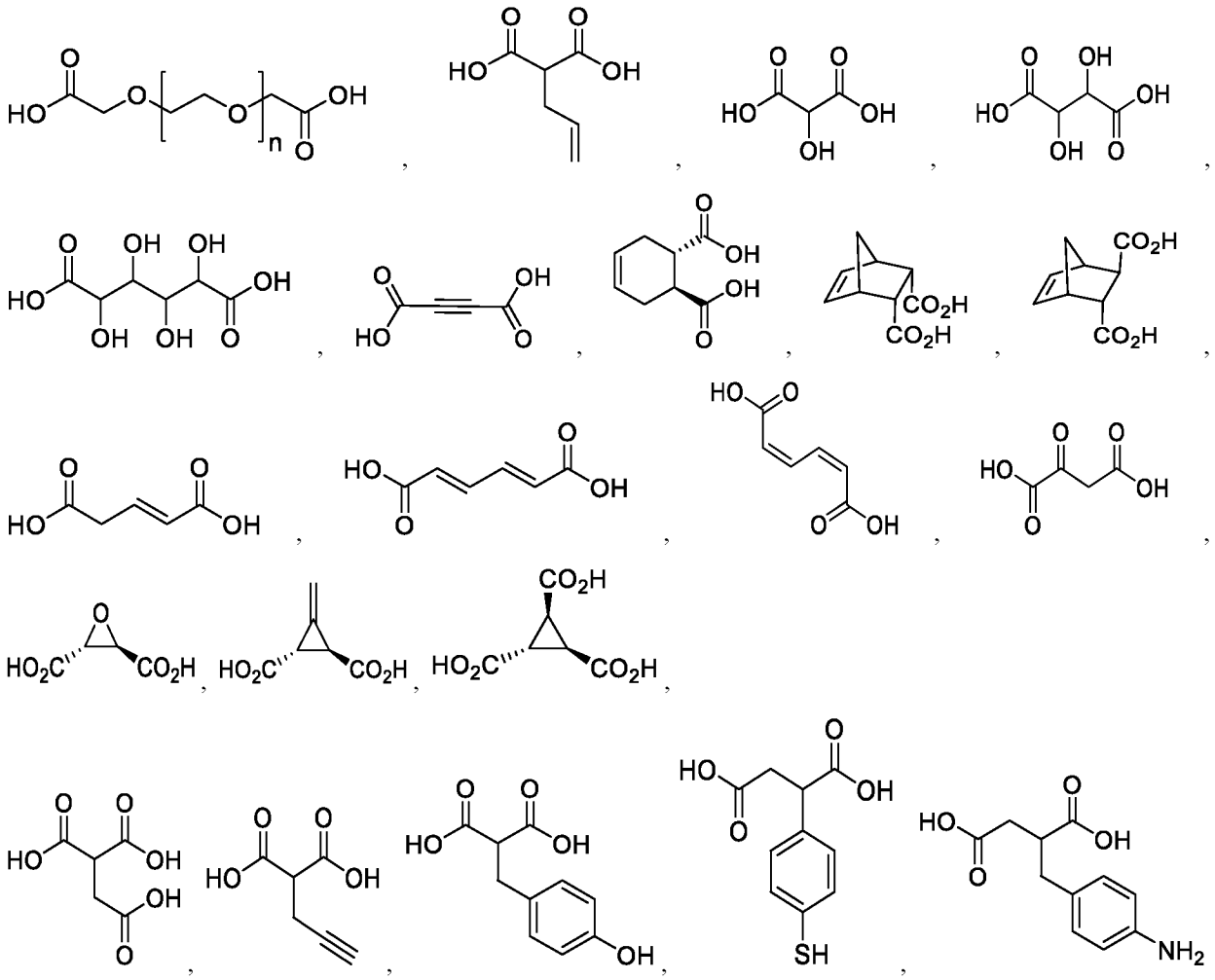
В некоторых вариантах осуществления линкер обеспечивает пространство, жесткость и/или гибкость между ингибиторами нейраминидазы и мономером Fc-домена и Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумина или связывающим белок альбумин пептидом в описанных в данном документе конъюгатах или между двумя ингибиторами нейраминидазы в описанных в данном документе конъюгатах. В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой связь, например, ковалентную связь, например, амидную связь, дисульфидную связь, связь C-O, связь C-N, связь N-N, связь C-S или связь любого типа, созданную в результате химической реакции, например, химической конъюгации. В некоторых вариантах осуществления линкер (L или L', как показано в любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) включает не более 250 атомов (например, 1-2, 1-4, 1-6, 1-8, 1-10, 1-12, 1-14, 1-16, 1-18, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55, 1-60, 1-65, 1-70, 1-75, 1-80, 1-85, 1-90, 1-95, 1-100, 1-110, 1-120, 1-130, 1-140, 1-150, 1-160, 1-170, 1-180, 1-190, 1-200, 1-210, 1-220, 1-230, 1-240 или 1-250 атомов; 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 атом). В некоторых вариантах осуществления линкер (L или L') включает не более 250 неводородных атомов (например, 1-2, 1-4, 1-6, 1-8, 1-10, 1-12, 1-14, 1-16, 1-18, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55, 1-60, 1-65, 1-70, 1-75, 1-80, 1-85, 1-90, 1-95, 1-100, 1-110, 1-120, 1-130, 1-140, 1-150, 1-160, 1-170, 1-180, 1-190, 1-200, 1-210, 1-220, 1-230, 1-240 или 1-250 неводородных атомов; 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 неводородный атом(-ов)). В некоторых вариантах осуществления остов линкера (L или L') включает не более 250 атомов (например, 1-2, 1-4, 1-6, 1-8, 1-10, 1-12, 1-14, 1-16, 1-18, 1-20, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45, 1-50, 1-55, 1-60, 1-65, 1-70, 1-75, 1-80, 1-85, 1-90, 1-95, 1-100, 1-110, 1-120, 1-130, 1-140, 1-150, 1-160, 1-170, 1-180, 1-190, 1-200, 1-210, 1-220, 1-230, 1-240 или 1-250 атомов; 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 атом). «Остов» линкера относится к атомам в линкере, которые вместе образуют кратчайший путь от одной части конъюгата к другой части конъюгата. Атомы водорода в остове линкера непосредственно задействованные в связывании одной части конъюгата с другой частью конъюгата. Например, атомы водорода, присоединенные к атомам углерода в остове линкера, не рассматриваются как непосредственно задействованные в связывании одной части конъюгата с другой частью конъюгата.

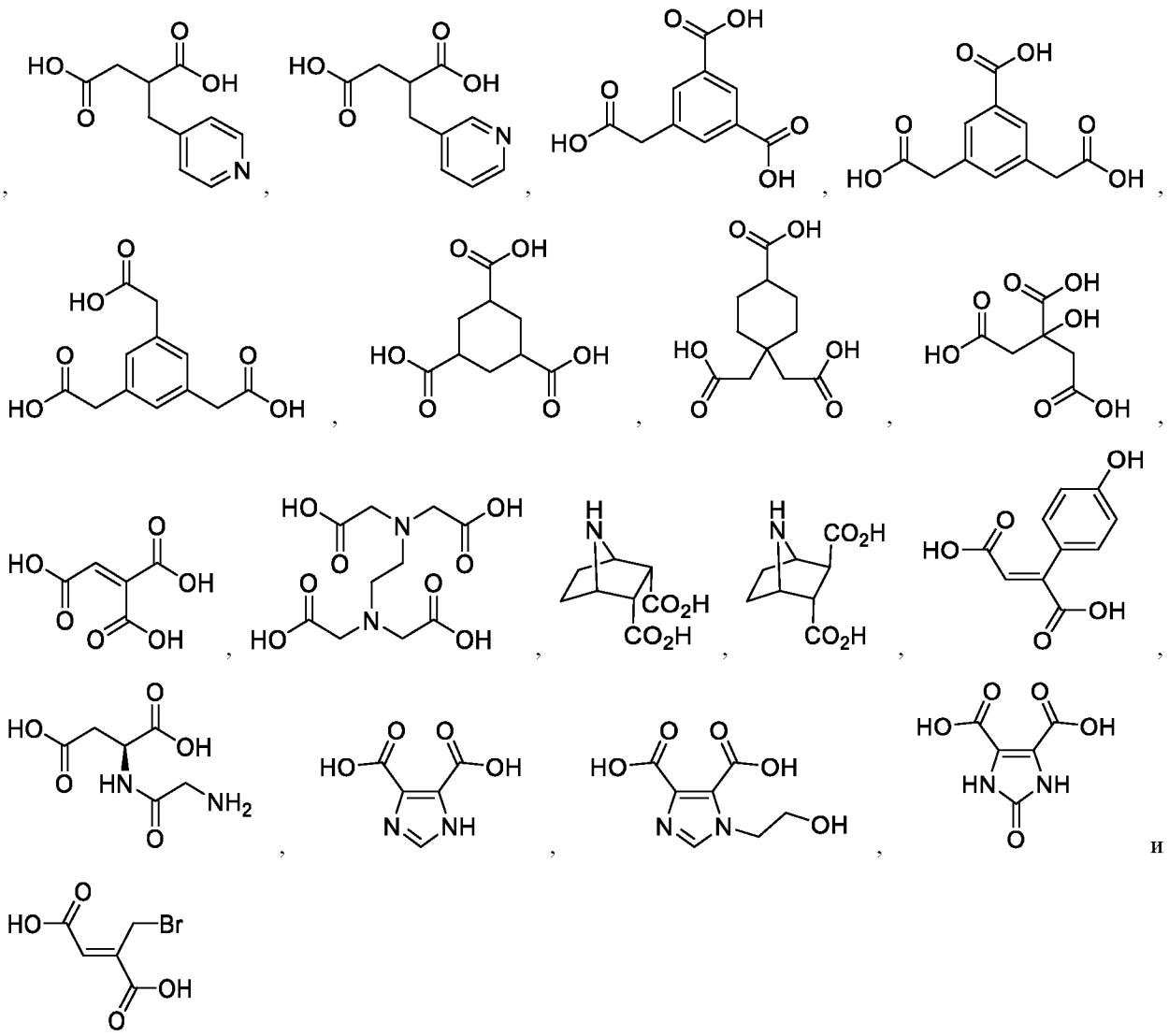
Молекулы, которые можно использовать для получения линкеров (L или L'), включают по меньшей мере две функциональные группы, например, две группы карбоновых кислот. В некоторых вариантах

осуществления трехвалентного линкера два плеча линкера могут содержать две дикарбоновые кислоты, в которых первая карбоновая кислота может образовывать ковалентную связь с первым ингибитором нейраминидазы в конъюгате, а вторая карбоновая кислота может образовывать ковалентную связь (например, связь C-O) с мономером Fc-домена, Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумином или связывающим белок альбумин пептидом в конъюгате. В некоторых вариантах осуществления двухвалентного линкера двухвалентный линкер может содержать две карбоновые кислоты, в которых первая карбоновая кислота может образовывать ковалентную связь с одним компонентом (например, ингибитором нейраминидазы) в конъюгате, а вторая карбоновая кислота может образовывать ковалентную связь (например, связь C-S или связь C-N) с другим компонентом (например, мономером Fc-домена, Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумином или связывающим белок альбумин пептидом) в конъюгате.

В некоторых вариантах осуществления в качестве линкеров можно использовать молекулы дикарбоновой кислоты (например, линкер дикарбоновой кислоты). Например, в конъюгате, содержащем мономер Fc-домена, Fc-домен, Fc-связывающий пептид, белок альбумин или связывающий белок альбумин пептид, ковалентно связанный с одним или более димерами ингибиторов нейраминидазы, первая карбоновая кислота в молекуле дикарбоновой кислоты может образовывать ковалентную связь с гидроксильной или аминогруппой первого ингибитора нейраминидазы, а вторая карбоновая кислота может образовывать ковалентную связь с гидроксильной или аминогруппой второго ингибитора нейраминидазы.

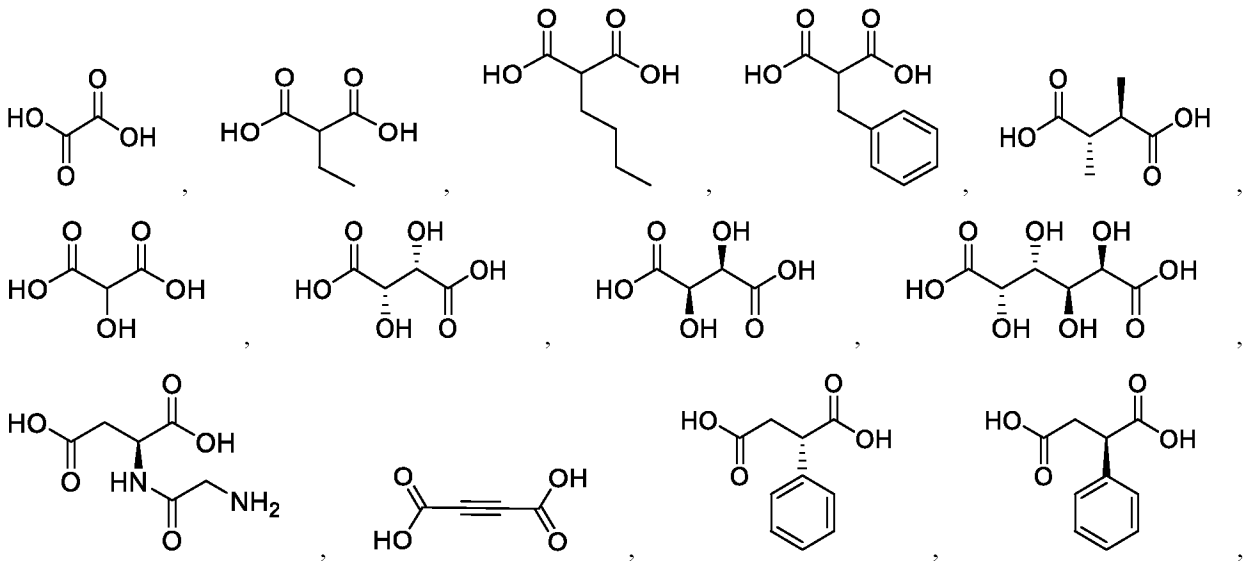
Примеры молекул дикарбоновых кислот, которые можно использовать для образования линкеров, включают, но не ограничиваются ими,

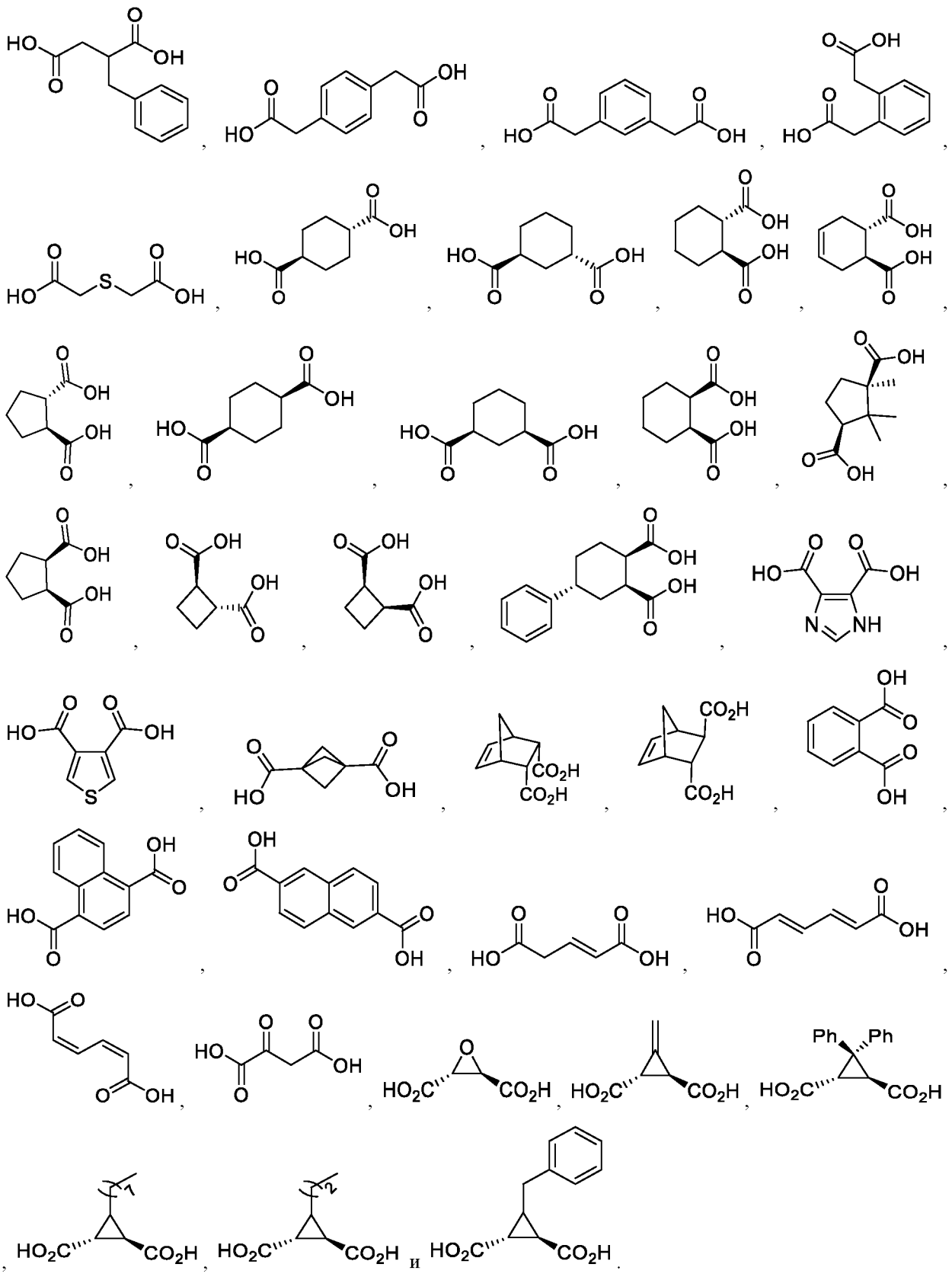




где n является целым числом от 1 до 20 (например, n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20).

Другие примеры молекул дикарбоновых кислот, которые можно использовать для образования линкеров, включают, но не ограничиваются ими,

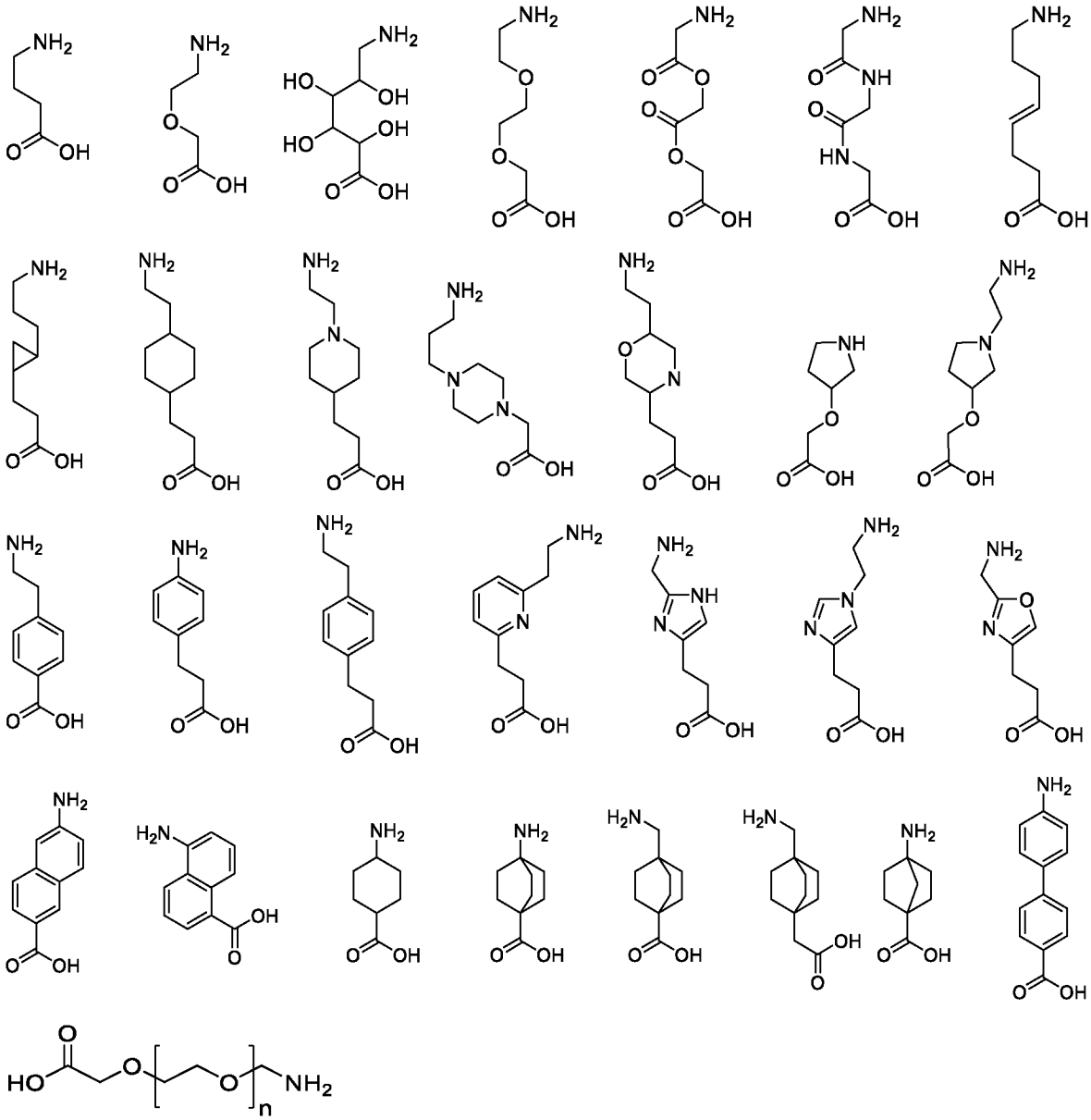




В некоторых вариантах осуществления молекулы дикарбоновой кислоты, такие как описанные в данном документе, могут быть дополнительно функционализированы для включения одной или более дополнительных функциональных групп. Дикарбоновые кислоты могут быть дополнительно функционализированы, например, для обеспечения точки присоединения к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду (например,

посредством линкера, такого как ПЭГ линкер).

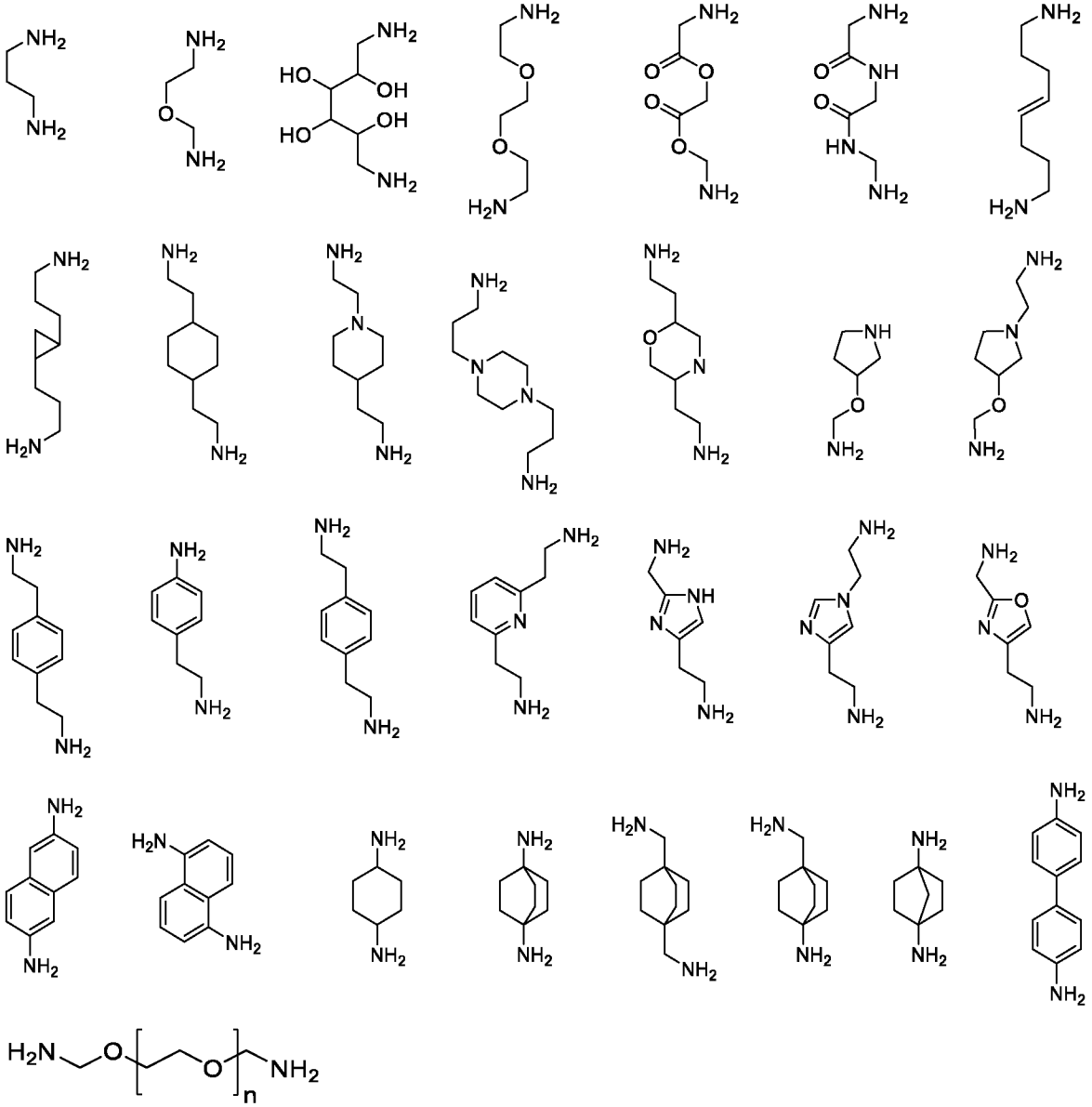
В некоторых вариантах осуществления, когда ингибитор нейраминидазы присоединен к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду, связывающая группа может включать фрагмент, содержащий фрагмент карбоновой кислоты и амино-фрагмент, расположенный на расстоянии от 1 до 25 атомов. Примеры таких связывающих групп включают, но не ограничиваются ими,



где n является целым числом от 1 до 20 (например, n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20).

В некоторых вариантах осуществления связывающая группа может включать фрагмент, включающий фрагмент карбоновой кислоты, и фрагмент аминогруппы, такие как описанные в данном документе, может быть дополнительно функционализирован для включения одной или более дополнительных функциональных групп. Такие связывающие группы могут быть дополнительно функционализированы, например, для обеспечения точки присоединения к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду (например, посредством линкера, такого как ПЭГ линкер).

В некоторых вариантах осуществления, когда ингибитор нейраминидазы присоединен к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду, связывающая группа может включать фрагмент, содержащий две или амино-фрагменты (например, диамино-фрагмент), которые расположены на расстоянии от 1 до 25 атомов. Примеры таких связывающих групп включают, но не ограничиваются ими,



где n является целым числом от 1 до 20 (например, n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20).

В некоторых вариантах осуществления связывающая группа может включать диамино-фрагмент, такой как описано в данном документе, может быть дополнительно функционализирован для включения одной или более дополнительных функциональных групп. Такие диамино-связывающие группы могут быть дополнительно функционализированы, например, для обеспечения точки присоединения к мономеру Fc-домена, Fc-домену, Fc-связывающему пептиду, белку альбумину или связывающему белок альбумин пептиду (например, посредством линкера, такого как ПЭГ линкер).

В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая азидную группу, может быть использована для образования линкера, в котором азидная группа может подвергаться циклоприсоединению

с алкином с образованием 1,2,3-триазольной связи. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая алкиновую группу, может быть использована для образования линкера, в котором алкиновая группа может подвергаться циклоприсоединению с азидом с образованием 1,2,3-триазольной связи. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая малеимидную группу, может быть использована для образования линкера, в котором малеимидная группа может вступать в реакцию с цистеином с образованием связи C-S. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая одну или более групп сульфоновой кислоты, может быть использована для образования линкера, в котором группа сульфоновой кислоты может образовывать сульфонамидную связь со связывающим азотом в ингибиторе нейраминидазы. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая одну или более изоцианатных групп, может быть использована для образования линкера, в котором изоцианатная группа может образовывать карбамидную связь со связывающим азотом в ингибиторе нейраминидазы. В некоторых вариантах осуществления молекула, содержащая одну или более галогеналкильных групп, может быть использована для образования линкера, в котором галогеналкильная группа может образовывать ковалентную связь, например, связи C-N и C-O, с ингибитором нейраминидазы.

В некоторых вариантах осуществления линкер (L или L') может содержать синтетическую группу, полученную, например, из синтетического полимера (например, полимера полиэтиленгликоля (ПЭГ)). В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать один или более аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления линкер может представлять собой аминокислотную последовательность (например, последовательность из 1-25 аминокислот, 1-10 аминокислот, 1-9 аминокислот, 1-8 аминокислот, 1-7 аминокислот, 1-6 аминокислот, 1-5 аминокислот, 1-4 аминокислот, 1-3 аминокислот, 1-2 аминокислот или 1 аминокислоты). В некоторых вариантах осуществления линкер (L или L') может включать один или более необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен (например, ПЭГ элемент), необязательно замещенный C2-C20 алкенилен (например, C2 алкенилен), необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен (например, циклопропилен, циклобутилен), необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен (например, C6 арилен), необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен (например, имидазол, пиридин), O, S, NR^i (R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил), P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино.

Химические способы конъюгации

Мономер или димеры ингибитора нейраминидазы (например, в конъюгате любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) могут быть конъюгированы с мономером Fc-домена, Fc-доменом,

Fc-связывающим пептидом, белком альбумином или связывающим белок альбумин пептидом, например, посредством линкера, с помощью любых известных стандартных химических способов конъюгации, известным специалистам в данной области. Следующие химические способы конъюгации специально предусмотрены, например, для конъюгации ПЭГ линкера (например, функционализированного ПЭГ линкера) с мономером Fc-домена, Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумином или связывающим белок альбумин пептидом.

Ковалентная конъюгация двух или более компонентов в конъюгате с использованием линкера может быть выполнена с использованием хорошо известных методик и способов органического химического синтеза. Дополнительные функциональные группы двух компонентов могут вступать в реакцию друг с другом с образованием ковалентной связи. Примеры комплементарных реакционноспособных функциональных групп включают, но не ограничиваются ими, например, малеимид и цистеин, амин и активированную карбоновую кислоту, тиол и малеимид, активированную сульфоновую кислоту и амин, изоцианат и амин, азид и алкин, а также алкен и тетразин. Сайт-специфическая конъюгация с полипептидом (например, мономером Fc-домена, Fc-доменом, Fc-связывающим пептидом, белком альбумином или связывающим белок альбумин пептидом) может осуществляться с использованием методов, известных в данной области. Иллюстративные методы сайт-специфической конъюгации малой молекулы с Fc-доменом представлены в Agarwall. P., et al. Bioconjugate Chem. 26:176-192 (2015).

Другие примеры функциональных групп, способных вступать в реакцию с аминогруппами, включают, например, алкилирующие и ацилирующие агенты. Типичные алкилирующие агенты включают: (i) α-галогенацетильную группу, например, XCH_2CO- (где X = Br, Cl или I); (ii) N-малеимидную группу, которая может вступать в реакцию с аминогруппами либо посредством реакции по Михаэлю, либо посредством ацилирования путем присоединения к карбонильной группе кольца; (iii) арилгалогенид, например нитрогалогенароматическую группу; (iv) алкилгалогенид; (v) альдегид или кетон, способный к образованию основания Шиффа с аминогруппами; (vi) эпоксид, например, эпихлоргидрин и бисоксиран, которые могут вступать в реакцию с амино, сульфгидрильными или фенольными гидроксильными группами; (vii) хлорсодержащий s-триазин, который является реакционноспособным по отношению к нуклеофилам, таким как амино, суфгидрильные и гидроксильные группы; (viii) азиридин, который является реакционноспособным по отношению к нуклеофилами, таким как аминогруппы, за счет раскрытия кольца; (ix) диэтиловый эфир скварановой кислоты; и (x) α-галогеналкиловый эфир.

Примеры амино-реактивных ацилирующих групп включают, например, (i) изоцианат и изотиоцианат; (ii) сульфонилхлорид; (iii) галогенангидрид; (iv) активный сложный эфир, например, сложный нитрофениловый эфир или N-гидроксисукцинимидиловый эфир или их производные (например, сложный эфир азидо-$ПЭГ_2$-$ПЭГ_{40}$-NHS); (v) ангидрид кислоты, например, смешанный, симметричный или N-карбоксиангидрид; (vi) ацилазид; и (vii) сложный имидоэфир. Альдегиды и кетоны могут вступать в реакцию с аминами с образованием оснований Шиффа, которые можно стабилизировать посредством восстановительного аминирования.

Следует понимать, что определенные функциональные группы могут быть преобразованы в другие функциональные группы перед реакцией, например, для придания дополнительной реакционноспособности или селективности. Примеры способов, применимых для этой цели, включают превращение аминов в карбоксилы с использованием таких реагентов, как ангидриды дикарбоновых кислот; превращение аминов в тиолы с использованием таких реагентов, как N-ацетилгомоцистеина тиолактон, S-ацетилмеркаптоянтарный ангидрид, 2-иминотиолан или тиолсодержащие сукцинимидильные производные; превращение тиолов в

карбоксилы с использованием таких реагентов, как α-галогенацетаты; превращение тиолов в амины с использованием таких реагентов, как этиленимин или 2-бромэтиламин; превращение карбоксилов в амины с использованием таких реагентов, как карбодиимиды с последующим использованием диаминов; и превращение спиртов в тиолы с использованием реагентов, таких как тозилхлорид, с последующей переэтерификацией тиоацетатом и гидролизом до тиола ацетатом натрия.

В некоторых вариантах осуществления линкер по изобретению (например, L или L', такой как L^C D-L-I) конъюгирован (например, любым из способов, описанных в данном документе) с E (например, Fc-доменом или белком альбумином). В предпочтительных вариантах осуществления линкер конъюгирован посредством: (a) тиокарбамидной связи (т.е. -NH(C=S)NH-) с лизином E; (b) карбаматной связи (т.е. -NH(C=O)-O) с лизином E; (c) аминовой связи посредством восстановительного аминирования (т.е. $-NHCH_2$) между лизином и E; (d) амида (т.е. $-NH-(C=O)CH_2$) с лизином E; (e) цистеин-малеимидного конъюгата между малеимидом линкера и цистеином E; (f) аминовой связи посредством восстановительного аминирования (т.е. $-NHCH_2$) между линкером и углеводом E (например, гликозильной группой мономера Fc-домена или Fc-домена); (g) повторной мостиковой конъюгации цистеина, где линкер конъюгирован с двумя цистеинами E; (h) оксимной связи между линкером и углеводом E (например, гликозильной группы мономера Fc-домена или Fc-домена); (i) оксимной связи между линкером и аминокислотным остатком E; (j) азидо-связи между линкером и E; (k) прямого ацилирования линкера до E; или (l) тиоэфирной связи между линкером и E.

В некоторых вариантах осуществления линкер конъюгирован с E, причем связь включает структуру -NH(C=NH)X-, где X представляет собой O, HN или связь. В некоторых вариантах осуществления линкер конъюгирован с E, причем связь между остатком линкера и E включает структуру-NH(C=O)NH-.

В некоторых вариантах осуществления линкер (например, активный сложный эфир, например, сложный нитрофениловый эфир или N-гидроксисукцинимидиловый эфир или их производные (например, функционализированный ПЭГ линкер (например, сложный эфир азидо-$ПЭГ_2$-$ПЭГ_{40}$-NHS) конъюгирован с E, с T (например, DAR) от 0,5 до 10,0, например 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8,0, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10,0. В этих случаях E-($ПЭГ_2$-$ПЭГ_{40}$)-азид может вступать в реакцию с Int, имеющим концевой алкиновый линкер (например, L или L', такой как L^C D-L-I) посредством клик-конъюгации. Во время клик-конъюгации катализируемая медью реакция азида (например, Fc-($ПЭГ_2$-$ПЭГ_{40}$)-азида) с алкином (например, Int, имеющим концевой алкиновый линкер (например, L или L', такой как L^C D-L-I) протекает с образованием 5-членного гетероатомного кольца. В некоторых вариантах осуществления линкер, конъюгированный с E, представляет собой концевой алкин и конъюгирован с Int, имеющим концевой азид. Иллюстративные способы получения препаратов E-($ПЭГ_2$-$ПЭГ_{40}$)-азида описаны в примерах 7, 8, 61, 84, 88 и 124. Иллюстративные конъюгаты, полученные с помощью клик-конъюгации, изображены на Фиг. 43, 61, и 102. Процедура клик-химии конъюгации изображена на Фиг. 103. Специалисту в данной области будет легко понятен конечный продукт, полученный в результате конъюгации с применением клик-химии.

Иллюстративные стратегии связывания (например, способы связывания мономера или димера ингибитора нейраминидазы с E, например, посредством линкера) дополнительно изображены на фиг. 1, 28, 29, 30, 43 и 61.

VI. Комбинированная терапия

Противовирусные средства

В некоторых вариантах осуществления один или более противовирусных агентов можно вводить в комбинации (например, вводить по существу одновременно (например, в одной и той же фармацевтической композиции или в отдельных фармацевтических композициях) или вводить отдельно в разное время) с конъюгатом, описанным в данном документе (например, конъюгатом любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)).

Противовирусное средство может вводиться практически одновременно (например, в той же фармацевтической композиции или в отдельных фармацевтических композициях), что и конъюгаты, или может вводиться до или после конъюгатов (например, в течение периода, составляющего 1 день, 2 дня, 5 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев или 12 месяцев или более). В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят путем инъекции (например, внутримышечно, внутрикожно, интраназально или подкожно), а противовирусный агент вводят перорально. Наиболее предпочтительно конъюгат вводят внутривенно, а противовирусный агент вводят перорально.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят профилактически (например, до того, как субъект вступит в контакт с вирусом), а противовирусный агент вводят после того, как субъект перенес вирусную инфекцию, предположительно имеет вирусную инфекцию или подвергся воздействию вируса. В некоторых вариантах осуществления и конъюгат, и противовирусный агент вводят после того, как субъект перенес вирусную инфекцию, предположительно имеет вирусную инфекцию или подвергся воздействию вируса. В некоторых вариантах осуществления и конъюгат, и противовирусный агент вводят профилактически.

Конъюгат и противовирусный агент могут быть включены в одну и ту же фармацевтическую композицию или в отдельные фармацевтические композиции. В предпочтительных вариантах осуществления конъюгат и противовирусный агент входят в состав отдельных фармацевтических композиций (например, в составы для разных путей введения). В некоторых вариантах осуществления конъюгат и противовирусный агент вводят одновременно (например, по существу в одно и то же время, например, в течение 5 минут, 30 минут, 1-6 часов, 1-12 часов или 1 дня) или последовательно (например, в разное время, например, с интервалом более 1 дня). При условии, что противовирусный агент и конъюгат вводят последовательно, противовирусный агент вводят 1-50 (например, 1-15, 10-25, 20-35, 30-45 или 35-50) раз после введения конъюгата (например, через 1 день, 2 дня, 5 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев или 12 месяцев или более после введения конъюгата).

В некоторых случаях противовирусный агент вводят субъекту, нуждающемуся в этом, один или более раз (например, 1-10 раз или более; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз) ежедневно, еженедельно, ежемесячно, раз в два года, ежегодно или по медицинским показаниям после введения конъюгата, описанного в данном документе (например, конъюгата по любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI), или (M'-I)).

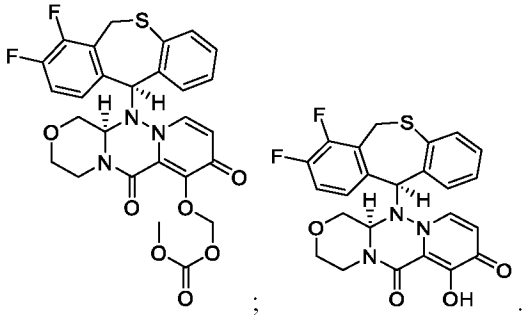
В некоторых вариантах осуществления противовирусный агент представляет собой противовирусный агент для лечения вируса гриппа. Например, противовирусный агент может представлять собой блокатор ионных каналов M2, ингибитор нейраминидазы (например, ингибитор нейраминидазы длительного действия), ингибитор полимеразы, ингибитор гемагглютинина, ингибитор слитого белка, ингибитор COX-2 или агонист PPAR. Противовирусный агент может быть нацелен либо на вирус, либо на субъект-хозяин. Противовирусный агент для лечения вируса гриппа, используемый в комбинации с конъюгатом, описанным в данном документе (например, конъюгатом любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) может быть выбран из пимовидира, осельтамивира, занамивира, перамивира,

ланинамивира, CS-8958, амантадина, римантадина, циановирина-N, кэп-зависимого ингибитора эндонуклеазы (например, балоксавира марбоксила), ингибитора полимеразы (например, T-705), ингибитора PB2 (например, JNJ-63623872), конъюгированной сиалидаза (например, DAS181), тиазолида (например, нитазоксанида), ингибитора ЦОГ, агониста PPAR, нацеленного на гемагглютинин антитела (например, моноклонального антитела, такого как CR6261, CR8020, MEDI8852, MHAA4549A или VIS410) или siRNA, нацеленного на хозяин или вирусный ген, или их пролекарств, или их фармацевтически приемлемых солей.

Предпочтительно противовирусный агент направлен на другую терапевтическую мишень, чем конъюгат, например, блокатор ионных каналов M2, ингибитор полимеразы, ингибитор гемагглютинина, ингибитор вирусной репликации (например, ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы), ингибитор слитого белка, ингибитор COX-2 или агонист PPAR. Наиболее предпочтительно противовирусный агент представляет собой ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы (например, балоксавир марбоксил). В некоторых вариантах осуществления противовирусный агент вводят в комбинации с конъюгатом, описанным формулой (D-II-6). В некоторых вариантах осуществления противовирусный агент вводят в комбинации с конъюгатом, описанным формулой (D-II-7). В предпочтительных вариантах осуществления противовирусный агент (например, балоксавир марбоксил) вводят в комбинации с конъюгатом, описанным формулой (D-II-6). Наиболее предпочтительно противовирусный агент (например, балоксавир марбоксил) вводят в комбинации с конъюгатом, описанным формулой (D-II-7). Более предпочтительно, конъюгат представляет собой конъюгат 45 или конъюгат 46.

Балоксавир

В некоторых вариантах осуществления балоксавир марбоксил (BXM, пролекарственная форма) или балоксавировую кислоту (BXA, активная форма) или любую их соль (Omoto et al. *Scientific Reports*. 8:9633, 2018; Japic CTI-153090; Japic CTI-163417; каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки) можно вводить в комбинации (например, вводить по существу одновременно (например, в одной и той же фармацевтической композиции или в отдельных фармацевтических композициях) или вводить отдельно в разное время) с конъюгатом, описанным в данном документе (например, конъюгатом любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)).



(балоксавир марбоксил) (балоксавировая кислота)

В некоторых вариантах осуществления балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их соль вводят в дозе от около 0,1 до около 3000 мг, предпочтительно от около 0,1 до около 1000 мг, наиболее предпочтительно от около 10 до около 100 мг (например, около 10 мг, около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг или около 100 мг) на взрослого человека в сутки, при необходимости, путем разделения. В некоторых вариантах осуществления балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их соль вводят в уменьшенной дозе или с меньшей частотой по сравнению со стандартным лечением при введении в комбинации с конъюгатом. Конъюгат можно вводить в дозе,

описанной в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их соль вводят чаще, чем конъюгат. Например, конъюгат можно вводить один раз каждые 12 месяцев, 6 месяцев, 3 месяца, 2 месяца, 1 месяц, каждые 3 недели, каждые 2 недели или еженедельно. Балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их соль можно вводить три раза в день, два раза в день, один раз в день, один раз каждые 2-6 дней, один раз в неделю или один раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их соли вводят один или более раз (например, 1-10 раз или более; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз или более) после (например, в течение 6 месяцев, 3 месяцев, 2 месяцев, 1 месяца, 3 недель, 2 недель или 1 недели) введения описанного в данного документе конъюгата.

В некоторых вариантах осуществления балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их соль вводят перорально.

В некоторых вариантах осуществления балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их соль вводят, например, перорально, в дозе от около 0,01 мг до около 1000 мг, предпочтительно от около 0,05 мг до около 500 мг в день. Дозированные формы и дозы балоксавира марбоксила (XOFLUZA™) хорошо известны: однократная пероральная доза 40 мг для взрослых от 40 до <80 кг и однократная пероральная доза 80 мг для взрослых ≥80 кг. Лекарственные формы и дозы балоксавира марбоксила (XOFLUZA™) для детей (например, для детей ≥12 лет и ≥40 кг) хорошо известны: однократная пероральная доза 40 мг для детей от 40 до <80 кг и однократная пероральная доза 80 мг для субъектов детского возраста ≥80 кг.

При введении в комбинации с конъюгатом по настоящему изобретению эффективность балоксавира (например, балоксавира марбоксила, балоксавировой кислоты или их соли) может повышаться, например, за счет синергетического взаимодействия балоксавира и конъюгата. Это может позволить вводить балоксавир в сниженной дозе (например, по сравнению с существующими клиническими стандартами лечения) без какой-либо потери эффективности. Преимущество этого заключается в уменьшении нежелательных явлений, связанных с введением балоксавира. В некоторых вариантах осуществления балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их соль вводят в сниженной или субклинической дозе (например, вводят в дозе ниже, чем без конъюгата, описанного в данном документе, и/или ниже, чем настоящий клинический стандарт лечения (например, доза ниже 40 мг пероральной дозы (например, доза в диапазоне от 0,01 мг до 40 мг (например, 0,5 мг, 1,0 мг, 1,5 мг, 2,0 мг, 2,5 мг, 5,0 мг, 7,5 мг, 10 мг, 15 мг, 18 мг, 20 мг, 23 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг или 38 мг перорально))). Балоксавир марбоксил (XOFLUZA™) может быть предоставлен в любом количестве, достаточном для лечения вирусной инфекции гриппа у субъекта, которому ранее вводили любой описанный в данном документе конъюгат.

Противовирусные вакцины

В некоторых вариантах осуществления любые из конъюгатов, описанные в данном документе (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) вводят в комбинации с противовирусной вакциной (например, композицией, которая вызывает у субъекта иммунный ответ, направленный против вируса). Противовирусная вакцина может вводиться практически одновременно (например, в той же фармацевтической композиции или в отдельных фармацевтических композициях), что и конъюгаты, или может вводиться до или после конъюгатов (например, в течение периода, составляющего 1 день, 2 дня, 5 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев или 12 месяцев или более).

В некоторых вариантах осуществления вирусная вакцина содержит иммуноген, который вызывает у субъекта иммунный ответ против вируса гриппа A, B, C или вируса парагриппа. В некоторых вариантах

осуществления иммуноген представляет собой инактивированный вирус (например, вакцина представляет собой трехвалентную вакцину против гриппа, которая содержит очищенный и инактивированный материал вируса гриппа A, B, C или вируса парагриппа или любую их комбинацию). В некоторых вариантах осуществления вакцину вводят внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой живую вирусную вакцину, которая содержит аттенуированные (ослабленные) живые вирусы. В некоторых вариантах осуществления вакцину вводят в виде назального спрея.

VII. Способы

Способы, описанные в данном документе, включают, например, способы защиты от вирусной инфекции или лечения вирусной инфекции (например, вирусной инфекции гриппа) у субъекта и способы предотвращения, стабилизации или ингибирования роста вирусных частиц. Способ лечения вирусной инфекции (например, вирусной инфекции гриппа) у субъекта включает введение субъекту конъюгата, описанного в данном документе (например, конъюгата любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) или его фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызвана вирусом гриппа (например, вирусом гриппа A, B, C или вирусом парагриппа). В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызвана устойчивым штаммом вируса. Способ предотвращения, стабилизации или ингибирования роста вирусных частиц или предотвращения репликации и распространения вируса включает приведение в контакт вируса или сайта, чувствительного к росту вируса, с конъюгатом, описанным в данном документе (например, конъюгатом любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) или его фармацевтической композиции.

В изобретении также предложен способ защиты или лечения вирусной инфекции (например, вызванной вирусом гриппа инфекции) у субъекта, имеющего или подверженного риску развития вторичной инфекции (например, вторичной бактериальной инфекции, вторичной вирусной инфекции или вторичной инфекции, грибковой инфекции), где указанный способ включает введение субъекту конъюгата или композиции, описанных в данном документе. В изобретении дополнительно предложен способ предотвращения вторичной инфекции у субъекта, у которого диагностирована инфекция гриппа, причем способ включает введение субъекту конъюгата или композиции, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вторичная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию (например, устойчивый к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* и/или *Haemophilus influenzae*), вирусную инфекцию или грибковую инфекцию. В конкретных вариантах осуществления вторичная инфекция представляет собой MRSA. В определенных вариантах осуществления вторичная инфекция представляет собой *S. pneumoniae*. В некоторых вариантах осуществления вторичная инфекция представляет собой респираторную инфекцию (например, инфекцию дыхательных путей). В некоторых вариантах осуществления вторичная инфекция ассоциирована (например, вызывает) с пневмонией (например, бактериальной или вирусной пневмонией). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подвергается риску развития пневмонии.

Более того, описанные в данном документе способы также включают способы защиты от вирусной инфекции или лечения у субъекта путем введения субъекту конъюгата, описанного в данном документе (например, конъюгата любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту противовирусного агента или противовирусной вакцины.

Способы, описанные в данном документе, также включают способы защиты от вирусной инфекции

или лечения у субъекта путем введения указанному субъекту (1) конъюгата, описанного в данном документе (например, конъюгата любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) и (2) противовирусного агента или противовирусной вакцины. Способы, описанные в данном документе, также включают способы предотвращения, стабилизации или ингибирования роста вирусных частиц или предотвращения репликации или распространения вируса путем приведения в контакт вируса или сайта, чувствительного к росту вируса, с (1) конъюгатом, описанным в данном документе (например, конъюгатом любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) и (2) противовирусного агента или противовирусной вакцины.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе конъюгат (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) вводят первым с последующим введением только противовирусного агента или противовирусной вакцины. В некоторых вариантах осуществления сначала вводят противовирусный агент или противовирусную вакцину, а затем вводят только конъюгат, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе конъюгат и противовирусный агент или противовирусную вакцину вводят по существу одновременно (например, в одной фармацевтической композиции или в отдельных фармацевтических композициях). В некоторых вариантах осуществления сначала вводят конъюгат, описанный в данном документе, или противовирусный агент, или противовирусную вакцину, а затем вводят конъюгат, описанный в данном документе, и противовирусный агент или противовирусную вакцину по существу одновременно (например, в одной фармацевтической композиции или в отдельных фармацевтических композициях). В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе конъюгат и противовирусный агент или противовирусную вакцину вводят по существу одновременно (например, в одной фармацевтической композиции или в отдельных фармацевтических композициях) с последующим введением конъюгата, описанного в данном документе, или только противовирусного агента или противовирусной вакцины. В некоторых вариантах осуществления, когда конъюгат, описанный в данном документе (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) и противовирусный агент или противовирусную вакцину вводят вместе (например, по существу одновременно в одной или отдельных фармацевтических композициях или отдельно в одной и той же схеме лечения), ингибирование вирусной репликации каждого из конъюгатов и противовирусного агента или противовирусной вакцины может быть больше (например, происходить при более низкой концентрации), чем ингибирование вирусной репликации каждого из конъюгата и противовирусного агента или противовирусной вакцины, когда каждый из них используется отдельно в схеме лечения.

VIII. Фармацевтические композиции и их получение

Описанный в данном документе конъюгат может быть включен в фармацевтическую композицию для использования в описанных в данном документе способах. В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе конъюгат может быть составлен отдельно в виде фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе конъюгат может быть составлен в комбинации с противовирусным агентом или противовирусной вакциной в фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат, описанный в данном документе (например, конъюгат, описанный любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)), и фармацевтически приемлемые носители и наполнители.

Приемлемые носители и наполнители в фармацевтических композициях являются нетоксичными для

реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Приемлемые носители и наполнители могут включать буферы, такие как фосфат, цитрат, HEPES и TAE, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и метионин, консерванты, такие как гексаметония хлорид, октадецилдиметилбензиламмония хлорид, резорцин и бензалкония хлорид, белки, такие как сывороточный альбумин человека, желатин, декстран и иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислотные остатки, такие как глицин, глутамин, гистидин и лизин, и углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза и сорбитол.

Примеры других наполнителей включают, но не ограничиваются ими, антиадгезивные вещества, связующие вещества, покрытия, вспомогательные добавки для прессования, разрыхлители, красители, смягчающие вещества, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, вкусоароматические добавки, ароматизаторы, вещества, способствующие скольжению (усилители сыпучести), смазывающие вещества, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие агенты или подсластители. Иллюстративные вспомогательные средства включают, без ограничения, следующие: бутилированный гидрокситолуол (BHT), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция, кросскармелозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, цитрат натрия, натрий-гликолят крахмала, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

Конъюгаты, представленные в данном документе, могут иметь ионизируемые группы, чтобы их можно было получать в виде фармацевтически приемлемых солей. Эти соли могут являться кислотно-аддитивными солями с участием неорганических или органических кислот, в случае кислотных форм конъюгатов, представленных в данном документе, конъюгаты могут быть получены из неорганических или органических оснований. Часто конъюгаты получают или применяют в виде фармацевтически приемлемых солей, полученных в виде продуктов присоединения фармацевтически приемлемых кислот или оснований. Подходящие фармацевтически приемлемые кислоты и основания хорошо известны в данной области, такие как хлористоводородная, серная, бромистоводородная, уксусная, молочная, лимонная или винная кислоты для образования кислотно-аддитивных солей, а также гидроксид калия, гидроксид натрия, гидроксид аммония, кофеин, различные амины и т.п. для образования основных солей. Способы получения соответствующих солей хорошо известны в данной области.

Типичные соли присоединения кислот включают, но не ограничиваются ими, ацетатную, адипатную, альгинатную, аскорбатную, аспартатную, бензолсульфонатную, бензоатную, бисульфатную, боратную, бутиратную, камфоратную, камфорсульфонатную, цитратную, циклопентанпропионатную, диглюконатную, додецилсульфатную, этансульфонатную, фумаратную, глюкогептонатную, глицерофосфатную, гемисульфатную, гептонатную, гексаноатную, гидробромидную гидрохлоридную, гидроиодидную, 2–гидрокси–этансульфонатную, лактобионатную, лактатную, лауратную, лаурилсульфатную, малатную, малеатную, малонатную, метансульфонатную, 2-нафталинсульфонатную, никотинатную, нитратную, олеатную, оксалатную, пальмитатную, памоатную, пектинатную, персульфатную, 3-фенилпропионатную, фосфатную, пикратную, пивалатную, пропионатную, стеаратную, сукцинатную, сульфатную, тартратную, тиоцианатную, толуолсульфонатную, ундеканоатную и валератную соли. Типичные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают, но не ограничиваются ими, соли натрия, лития, калия, кальция и магния, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но не

ограничиваясь этим, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин и этиламин.

В зависимости от пути введения и дозировки конъюгат или его фармацевтическая композиция, используемые в способах, описанных в данном документе, будут составлены в подходящие фармацевтические композиции для обеспечения легкой доставки. Конъюгат (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) или его фармацевтическая композиция могут быть составлены для внутримышечного, внутривенного (например, в виде стерильного раствора и в системе растворителей, подходящей для внутривенного применения), внутрикожного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутриочагового, внутричерепного, внутрисуставного, интрапростатического, внутриплеврального, интратрахеального, интраназального, интравитреального, интравагинального, интраректального, наружного, внутриопухолевого, перитонеального, подкожного, субконъюнктивального, внутрипузырного, мукозального, интраперикардиального, внутрипуповинного, внутриглазного, перорального (например, в виде таблетки, капсулы, капсуловидной таблетки, желатиновой капсулы или сиропа), наружного (например, в виде крема, геля, лосьона или мази), местного введения, путем ингаляции, путем инъекции или инфузии (например, непрерывной инфузии, посредством локализованной перфузии с непосредственным омыванием клеток-мишеней, через катетер, через лаваж, в виде кремов или в виде липидных композиций). В зависимости от пути введения конъюгат по настоящему изобретению или его фармацевтическая композиция могут находиться в форме, например, таблеток, капсул, пилюль, порошков, гранулятов, суспензий, эмульсий, растворов, гелей, включая гидрогели, пасты, мази, кремы, пластыри, жидкие лекарственные формы для перорального введения, устройства для осмотической доставки, суппозитории, клизмы, инъекционные лекарственные формы, имплантаты, спреи, препараты, подходящие для ионтофоретической доставки или аэрозоли. Композиции могут быть составлены в соответствии с обычной фармацевтической практикой.

Описанный в данном документе конъюгат может быть составлен различными способами, известными в данной области. Для применения в качестве лечения людей и животных описанный в данном документе конъюгат может быть составлен в виде фармацевтических или ветеринарных композиций. В зависимости от субъекта (например, человека), подлежащего лечению, способа введения и типа желаемого лечения, например, профилактики или терапии, конъюгат, описанный в данном документе, составляют способами, соответствующими этим параметрам. Краткое изложение таких способов можно найти в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Edition, Lippincott Williams & Wilkins (2012); и Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 4th Edition, J. Swarbrick and J. C. Boylan, Marcel Dekker, New York (2013), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

Составы могут быть приготовлены способом, подходящим для системного введения или наружного или местного введения. Системные составы включают составы, предназначенные для инъекции (например, внутримышечной, внутривенной или подкожной инъекции), или могут быть приготовлены для трансдермального, трансмукозального или перорального введения. Состав, как правило, включает разбавитель, а также, в некоторых случаях, адъюванты, буферы и консерванты. Конъюгаты можно также вводить в липосомальных композициях или в виде микроэмульсий. Системное введение может также включать относительно неинвазивные способы, такие как использование суппозиториев, трансдермальных пластырей, трансмукозальная доставка и интраназальное введение. Для конъюгатов, представленных в данном документе, также подходит пероральное введение. Подходящие формы включают сиропы, капсулы и таблетки, как известно в данной области.

Фармацевтические композиции можно вводить парентерально в виде инъекционной композиции.

Фармацевтические композиции для инъекций могут быть составлены с использованием стерильного раствора или любой фармацевтически приемлемой жидкости в качестве носителя. Составы могут быть приготовлены в виде твердых форм, подходящих для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, стерильную воду, физиологический раствор и среды для культивирования клеток (например, среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), α-модифицированную среду Игла (α-MEM), среду F-12). Такие композиции для инъекций могут также содержать количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные агенты для поддержания pH, такие как ацетат натрия и монолаурат сорбитана. Способы составления препаратов известны в данной области, см., например, Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2nd Edition, M. Gibson, Taylor & Francis Group, CRC Press (2009).

Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в форме состава для перорального применения. Составы для перорального применения включают таблетки, содержащие активный(-ые) ингредиент(-ы) в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми наполнителями. Эти наполнители могут представлять собой, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахароза, сорбит, сахар, маннит, микрокристаллическая целлюлоза, крахмалы, включая картофельный крахмал, карбонат кальция, хлорид натрия, лактоза, фосфат кальция, сульфат кальция или фосфат натрия); гранулирующие и дезинтегрирующие агенты (например, производные целлюлозы, включая микрокристаллическую целлюлозу, крахмалы, включая картофельный крахмал, кроскармеллозу натрия, альгинаты или альгиновую кислоту); связывающие агенты (например, сахароза, глюкоза, сорбит, гуммиарабик, альгиновая кислота, альгинат натрия, желатин, крахмал, прежелатинизированный крахмал, микрокристаллическая целлюлоза, алюмосиликат магния, натрия карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, поливинилпирролидон) или поливинилпирролидон; и смазывающие агенты, вещества, способствующие скольжению, и антиадгезивы (например, стеарат магния, стеарат цинка, стеариновая кислота, диоксид кремния, гидрогенизированные растительные масла или тальк). Составы для перорального применения также могут быть представлены в виде жевательных таблеток или твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем (например, картофельным крахмалом, лактозой, микрокристаллической целлюлозой, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином) или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водой или масляной средой, например, арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом. Порошки, гранулы и пеллеты могут быть приготовлены с использованием ингредиентов, упомянутых выше в разделе таблетки и капсулы, обычным способом с использованием, например, миксера, аппарата с псевдоожиженным слоем или оборудования для распылительной сушки.

Другие фармацевтически приемлемые наполнители для составов для перорального применения включают, но не ограничиваются ими, красители, ароматизаторы, пластификаторы, увлажнители и буферные агенты. Составы для перорального применения также могут быть представлены в виде жевательных таблеток или твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем (например, картофельным крахмалом, лактозой, микрокристаллической целлюлозой, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином) или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водой или масляной средой, например, арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом. Порошки, гранулы и пеллеты могут быть приготовлены с использованием ингредиентов, упомянутых выше в разделе таблетки и капсулы, обычным способом с использованием, например, миксера, аппарата с псевдоожиженным слоем или оборудования для распылительной сушки.

Растворение или контролируемое диффузией высвобождение конъюгата, описанного в данном документе (например, конъюгата любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) или его фармацевтическая композиция может быть получена путем соответствующего покрытия таблетки, капсулы, пеллеты или гранулированного состава конъюгата или путем включения конъюгата в соответствующую матрицу. Покрытие с контролируемым высвобождением может включать одно или более веществ для покрытия, упомянутых выше, и/или, например, шеллак, пчелиный воск, гликовакс, касторовый воск, карнаубский воск, стеариловый спирт, моностеарат глицерина, дистеарат глицерина, пальмитостеарат глицерина, этилцеллюлозу, акриловые смолы, dl-полимолочную кислоту, бутират ацетата целлюлозы, поливинилхлорид, поливинилацетат, винилпирролидон, полиэтилен, полиметакрилат, метилметакрилат, 2-гидроксиметакрилат, метакрилатные гидрогели, 1,3-бутиленгликоль, этиленгликольметакрилат или полиэтиленгликольметакрилат и/или полиэтиленгликольметакрилат или полиэтиленгликоль. В матричном составе с контролируемым высвобождением материал матрицы также может включать, например, гидратированную метилцеллюлозу, карнаубский воск и стеариловый спирт, карбопол 934, силикон, глицерилтристеарат, метилакрилат-метилметакрилат, поливинилхлорид, полиэтилен и/или галогенированный фторуглерод.

При необходимости фармацевтическая композиция может быть приготовлена в форме стандартной дозы. Количество активного компонента, например конъюгата, описанного в данном документе (например, конъюгата любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)), включенного в фармацевтические композиции соответствует необходимому для обеспечения подходящей дозы в указанном диапазоне (например, дозы в диапазоне 0,01-100 мг/кг массы тела).

IX. Способы введения и дозировки

В любом из описанных в данном документе способов конъюгаты могут быть введены любым подходящим путем для лечения или защиты от вирусной инфекции (например, инфекции гриппа) или для предотвращения, стабилизации или ингибирования пролиферации или распространения вируса (например, вируса гриппа). Описанные в данном документе конъюгаты можно вводить людям, домашним животным, домашнему скоту или другим животным с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. В некоторых вариантах осуществления введение включает введение любого из конъюгатов, описанных в данном документе (например, конъюгатов любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) или композиции внутримышечно, внутривенно (например, в виде стерильного раствора и в системе растворителей, подходящей для внутривенного применения), внутрикожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутриочагово, внутричерепно, внутричерепно, внутрисуставно, интрапростатически, внутриплеврально, интратрахеально, интраназально, интравитреально, интравагинально, интраректального, наружно, внутриопухолево, перитонеально, подкожно, субконъюнктивально, внутрипузырно, мукозально, интраперикардиально, внутрипуповинно, внутриглазно, перорально (например, в виде таблетки, капсулы, капсуловидной таблетки, желатиновой капсулы или сиропа), наружно (например, в виде крема, геля, лосьона или мази), местно, путем ингаляции, путем инъекции или инфузии (например, непрерывной инфузии, посредством локализованной перфузии с непосредственным омыванием клеток-мишеней, через катетер, через лаваж, в виде кремов или в виде липидных композиций). В некоторых вариантах осуществления, если противовирусный агент также вводят в дополнение к конъюгату, описанному в данном документе, противовирусный агент или его фармацевтическая композиция также может быть введена любым из способов введения, описанных в данном документе.

Дозировка конъюгата, описанного в данном документе (например, конъюгата любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) или их фармацевтических композиций зависит от факторов, включая путь введения, заболевание, подлежащее лечению (например, степень заражения и/или состояние по поводу вирусной инфекции), и физических характеристик, например, возраста, массы тела, общего состояния здоровья субъекта. Как правило, количество конъюгата или его фармацевтической композиции, содержащейся в однократной дозе, может представлять собой количество, которое эффективно предотвращает, задерживает или лечит вирусную инфекцию, не вызывая значимой токсичности. Фармацевтическая композиция может включать дозировку описанного в данном документе конъюгата в диапазоне от 0,01 до 500 мг/кг (например, 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мг/кг) и, в более конкретном варианте осуществления, от около 0,1 до около 30 мг/кг и, в более конкретном варианте осуществления, от около 1 до около 30 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, когда конъюгат, описанный в данном документе (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) и противовирусный агент или противовирусную вакцину вводят в комбинации (например, по существу одновременно в одной или отдельных фармацевтических композициях или отдельно в одной и той же схеме лечения), необходимая доза конъюгата, описанного в данном документе, может быть ниже, чем доза, необходимая для конъюгата, если конъюгат использовали отдельно в схеме лечения.

Описанный в данном документе конъюгат (например, конъюгат любой из формул (1)-(5), (D-I)-(D-XI), (D'-I), (M-I)-(M-XI) или (M'-I)) или его фармацевтическая композиция могут быть введены нуждающемуся в этом субъекту, например, один или несколько раз (например, 1-10 раз или более; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 , 9 или 10 раз) ежедневно, еженедельно, ежемесячно, два раза в год, ежегодно или по медицинским показаниям. Дозировки могут быть предоставлены в виде схем однократного или многократного введения. Время между введениями может уменьшаться по мере улучшения состояния здоровья или увеличиваться по мере ухудшения состояния здоровья пациента. Дозировка и частота введения могут быть адаптированы врачом в соответствии с общепринятыми факторами, такими как степень заражения и различные параметры субъекта.

ПРИМЕРЫ

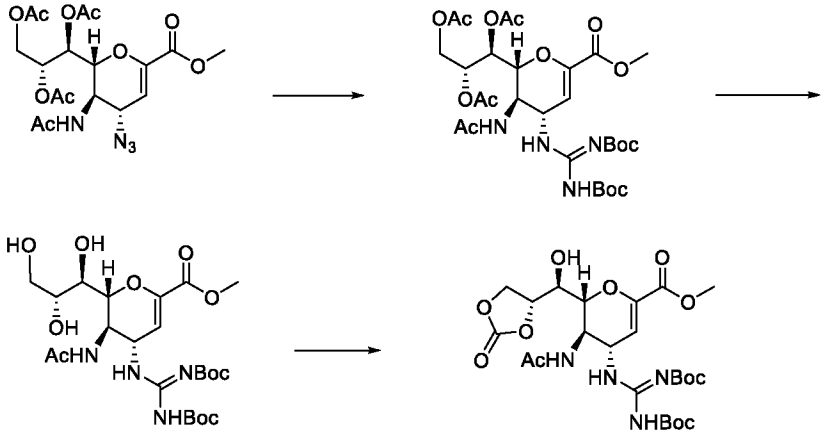
Следующие примеры представлены для того, чтобы продемонстрировать рядовым специалистам в данной области описание того, как композиции и способы, описанные в данном документе, могут быть использованы, изготовлены и оценены, и предназначены для того, чтобы быть исключительно иллюстративными для изобретения и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением.

Пример 1: Получение Fc-конструкций

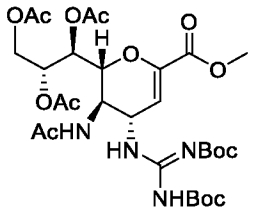
Обратные трансляции аминокислот, содержащие белковые конструкции (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 12 и 14), были синтезированы путем твердофазного синтеза. Олигонуклеотидные матрицы были клонированы в pcDNA3.1 (Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния, США) в сайтах клонирования BamHI и XhoI (New England Biolabs, Ипсвич, штат Массачусетс, США) и включали сигнальные последовательности, полученные из человеческого интерлейкина-2 или человеческого альбумина. Плазмиды pcDNA3.1 трансформировали в клетки *E. coli* Top10 (LifeTech). ДНК амплифицировали, экстрагировали и очищали с использованием набора PURELINK® HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (LifeTech). Плазмидную ДНК доставляют с использованием

набора для трансфекции ExpiFectamine™ 293 (LifeTech) в клетки HEK-293 в соответствии с протоколом производителя. Клетки центрифугировали, фильтровали и супернатанты очищали с использованием смолы MabSelect Sure (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс, США). Очищенные молекулы анализировали с использованием 4-12% бис-трис гелей для ДСН-ПААГ-электрофореза путем загрузки 1-2 мкг каждой молекулы в гель и окрашивания с использованием мгновенного окрашивания синим. Каждый гель включал маркер молекулярной массы с указанными стандартами молекулярной массы (фиг. 2-8). Восстановленные и невосстановленные дорожки обозначены буквами «В» и «НВ». На фиг. 2-8 показан ДСН-ПААГ-электрофорез в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях домена Fc, образованного из мономеров домена Fc, имеющих последовательности SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 12 и 14, соответственно.

Пример 2. Синтез промежуточного соединения занамивира



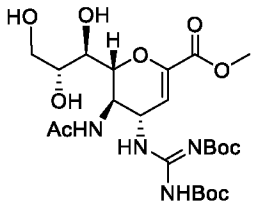
Стадия a.



Метил 5-ацетамидо-7,8,9-О-триацетил-2,6-ангидро-4-азидо-3,4,5-тридеокси-D-глицеро-D-галактонон-2-енонат (4,56 г, 10,0 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (15 мл), и раствор охлаждали до около 13°C. Трифенилфосфин (2,89 г, 11 ммоль) порциями добавляли в течение 20 минут. Полученную смесь перемешивали при температуре около 13°C до комнатной температуры в течение 2 часов, затем по каплям добавляли раствор LiOH (24 мг, 1 ммоль) в воде (1,5 мл). После перемешивания в течение 28 часов к реакционной смеси добавляли N,N'-бис-boc-1-гуанилпиразол (3,26 г, 10,5 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (244,4 мг, 2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1,5 дня. Затем его разбавляли смесью 1:1 этилацетат:гексаны (100 мл) и экстрагировали водой (30 мл). Водный слой повторно экстрагировали этилацетатом (30 мл). Объединенные органические слои упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали обращенно-фазовой колоночной хроматографией C18 (150 г, от 25 до 70% ацетонитрила и воды). Собранные фракции упаривали на роторном испарителе при комнатной температуре. В результате получали мутный водный раствор, и большая часть продукта оседала на колбу в виде геля. Затем раствор экстрагировали этилацетатом (150 мл). Органический слой использовали для повторного растворения гелевого материала. Затем его сушили над Na_2SO_4, упаривали на роторном испарителе и дополнительно

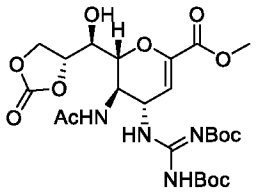
сушили в условиях высокого вакуума с получением указанного в заголовке соединения в виде белой пены. Выход: 6,24 г, 92,8%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 673,2$.

Стадия b.



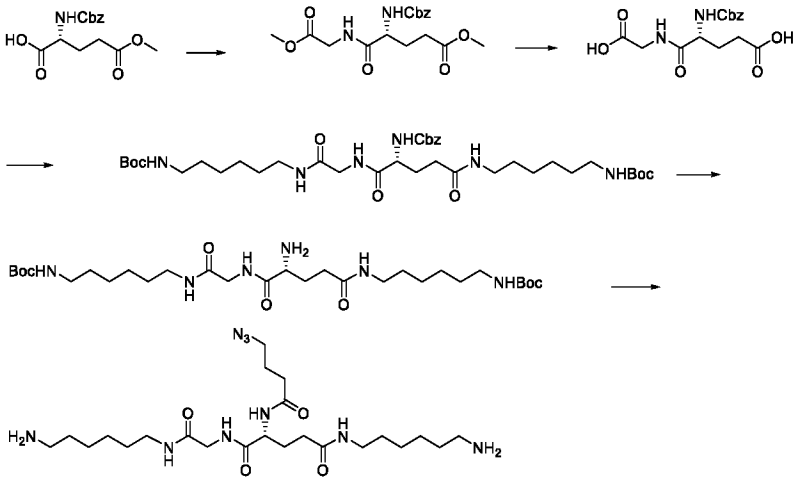
Раствор продукта со стадии a (6,24 г, 9,28 ммоль) в безводном MeOH (20 мл) охлаждали на бане с ледяной водой и медленно добавляли 0,5 М раствор метоксида натрия в MeOH (26 мл, 13 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа, затем ее pH осторожно доводили до 7-7,5 путем добавления по каплям 4 н. раствора HCl в диоксане (3 мл). Растворитель удаляли а роторном испарителе при температуре не выше комнатной. Остаток разбавляли смесью 2:1 этилацетата и гексанов (150 мл), и полученный раствор экстрагировали водой (20 мл). Водный слой повторно экстрагировали этилацетатом (30 мл). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4, упаривали на роторном испарителе, а затем сушили в условиях высокого вакуума. Продукт переносили на следующую стадию без дополнительной очистки. Выход: 5,03 г, 99,2%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 547,2$.

Стадия c.

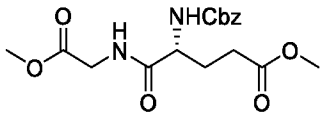


Продукт стадии b (713 мг, 1,3 ммоль) в безводном ДХМ (6 мл) охлаждали на бане с ледяной водой и добавляли 4-диметиламинопиридин (159,8 мг, 1,3 ммоль) и DIPEA (520 мг, 4 ммоль). Затем к смеси по каплям добавляли раствор 4-нитрофенилхлорформиата (356,6 мг, 2,2 ммоль) в безводном ДХМ (2 мл). Затем удаляли баню с ледяной водой и реакционную смесь перемешивали в течение 3 часов и контролировали с помощью ЖХМС (при необходимости можно добавить дополнительное количество 4-нитрофенилхлорформиата). После завершения реакции ее гасили водой (10 мл), а органический слой экстрагировали и упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали посредством обращенно-фазовой колоночной хроматографии C18 (100 г, от 20 до 70% ацетонитрила и воды). Ацетонитрил из собранных фракций удаляли на роторном испарителе при комнатной температуре. Затем водный слой экстрагировали смесью 1:1 этилацетата и гексана (120 мл). Водный слой повторно экстрагировали этилацетатом (30 мл). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4, упаривали на роторном испарителе и дополнительно сушили в условиях высокого вакуума с получением указанного в заголовке соединения в виде белой пены. Выход: 520 мг, 70%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 573,2$.

Пример 3. Синтез линкера-1

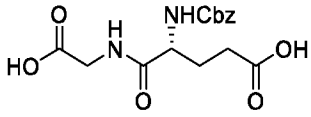


Стадия a.



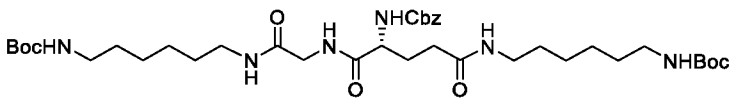
К смеси Z-D-глутаминового γ-метилового эфира (2,0 г, 6,77 ммоль) и метилового эфира глицина HCl (1,282 г, 10,2 ммоль) в безводном ДМФ (7 мл) добавляли DIPEA (2,02 г, 15,57 ммоль), а затем HATU (2,66 г, 7,0 ммоль) порциями в течение 25 минут. После растворения HATU добавляли дополнительное количество DIPEA (1,15 г, 8,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1,5 часов, затем экстрагировали 5% водной HCl (100 мл) и EtOAc (100 мл x 2). Органический слой упаривали на роторном испарителе. Остаток повторно экстрагировали водой (100 мл) и EtOAc/гексанами (2:1, 150 мл). Органический слой сушили над Na_2SO_4, упаривали на роторном испарителе, а затем сушили в условиях высокого вакуума до получения белого твердого вещества. Неочищенный продукт переносили на следующую стадию без дополнительной очистки. Выход: 2,3 г, 93%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 367$.

Стадия b.



Продукт стадии a (2,3 г, 6,29 ммоль) растворяли в смеси 1:1 MeOH и ТФУ (10 мл). После охлаждения раствора на бане с ледяной водой порциями в течение 1,5 часов добавляли раствор моногидрата LiOH (630 мг, 15 ммоль) в воде (9 мл). После перемешивания в течение 2 дополнительных часов реакционную смесь нейтрализовали с использованием 4 н. HCl в диоксане (3,7 мл). Органический растворитель частично удаляли на роторном испарителе при комнатной температуре. Оставшийся материал очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (150 г, от 0 до 39% ацетонитрила и воды). Выход 2,03 г, 88,7% за две стадии. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 339,2$.

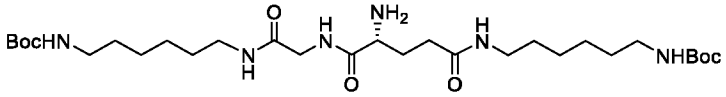
Стадия c.



К смеси продукта стадии b (1,41 г, 4,17 ммоль) и N-Boc-1,6-диаминогексана (1,99 г, 9,2 ммоль) в

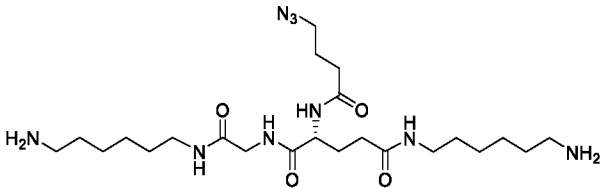
безводном ДМФ (6 мл) и DIPEA (1,3 г, 10 ммоль) добавляли раствор HATU (3,5 г, 9,2 ммоль) в ДМФ (10 мл) с помощью шприцевого насоса со скоростью 11 мл/час. После завершения добавления HATU реакционную смесь перемешивали в течение еще 30 минут и очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (150 г, от 10 до 50% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 1,3 г, 42,4%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 735$, [M – Boc + H]+ = 635,4.

Стадия d.



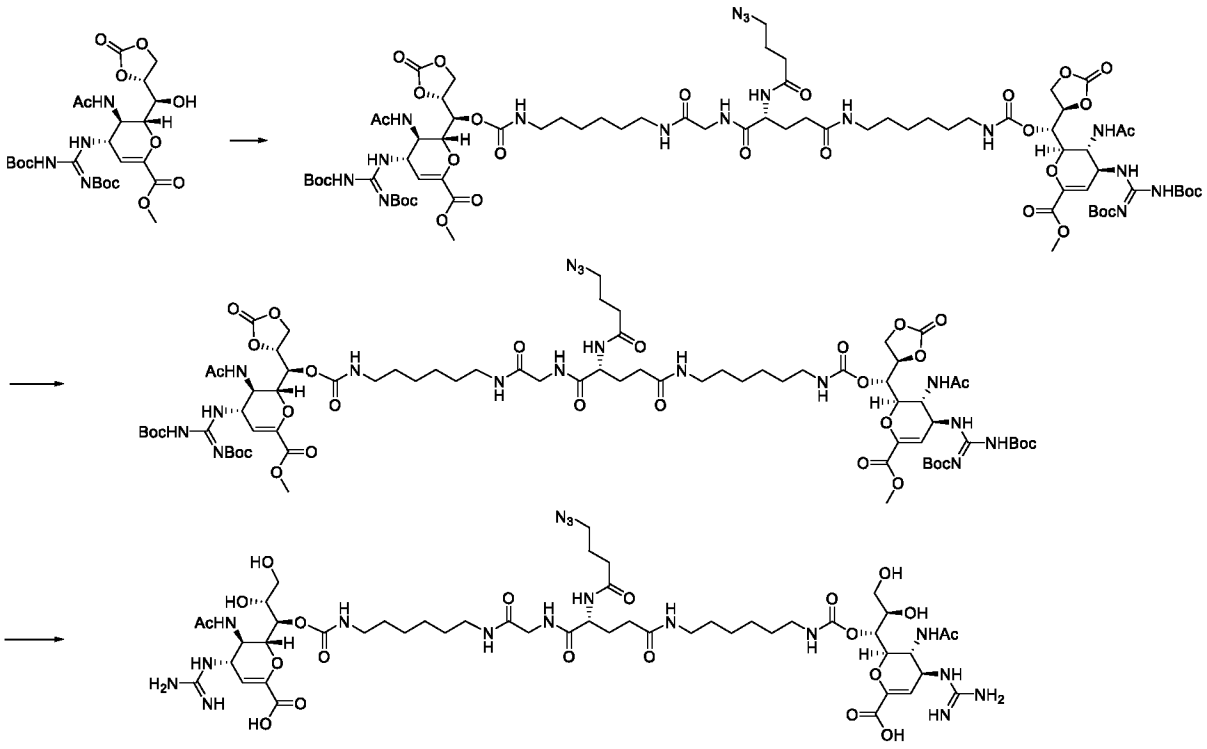
Продукт стадии c (1,3 г, 1,77 ммоль) растворяли в MeOH (20 мл) и к раствору добавляли Pd/C. Смесь перемешивали в атмосфере водорода в течение 4 часов. Pd/C отфильтровывали, а фильтрат упаривали на роторном испарителе и затем сушили в условиях высокого вакуума. Выход: 1,03 г, 96,9%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 601$.

Стадия e.

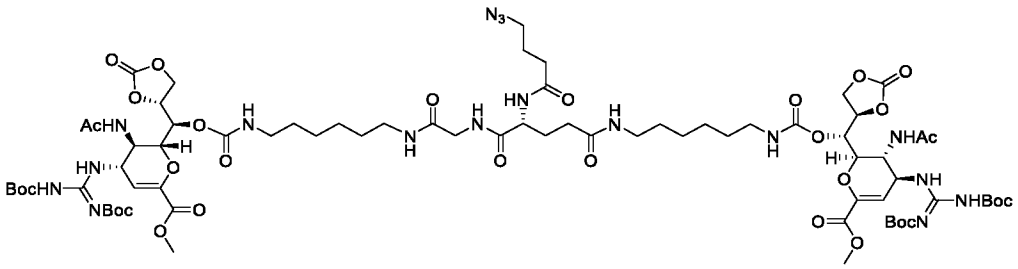


Высушенную пламенем реакционную колбу продували азотом и загружали 4-азидомасляную кислоту (77 мг, 0,6 ммоль), N-гидроксисукцинимид (92 мг, 0,8 ммоль) и безводный ДМФ (0,5 мл). Смесь перемешивали для растворения твердых веществ, а затем добавляли DCC (125,5 мг, 0,608 ммоль). После перемешивания в течение одного часа к реакционной смеси добавляли продукт стадии d (300 мг, 0,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов и очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (150 г, от 10 до 70% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Собранные фракции лиофилизировали до белого твердого вещества (ЖХМС: $[M + H]^+ = 712$, [M – Boc $^+$ H]+ = 612). Материал повторно растворяли в ДХМ (~ 2 мл) и ТФУ (~ 1 мл) и перемешивали в течение 15 минут. Затем его упаривали на роторном испарителе и остаток очищали с помощью ОФЖХ (50 г, от 0 до 40% ацетонитрила и воды). Выход: 255 мг, 68. 9%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 512$, $[(M + 2H)/2]^+ = 256$.

Пример 4. Синтез ПС-1

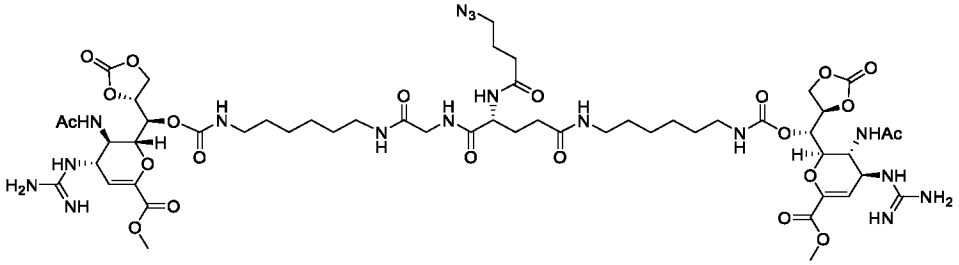


Стадия a.



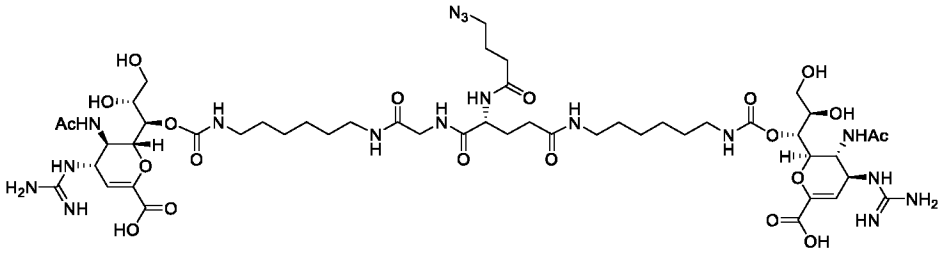
К раствору промежуточного соединения занамивира (пример 2) (532,5 мг, 0,93 ммоль) в безводном ТГФ (2 мл) добавляли ДМАП (490 мг, 4 ммоль), а затем бис(пентафторфенил)карбонат (385 мг, 0,911 ммоль). После перемешивания в течение ночи к реакционной смеси добавляли раствор линкера-1 (пример 3) (245,6 мг, 0,332 ммоль) в безводном ДМФ (1 мл) и DIPEA (91 мг, 0,3 ммоль). Реакция продолжалась в течение 2 часов, затем проводили очистку с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 67% ацетонитрила и воды). Выход: 135 мг, 23,8%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 845,9$.

Стадия b.



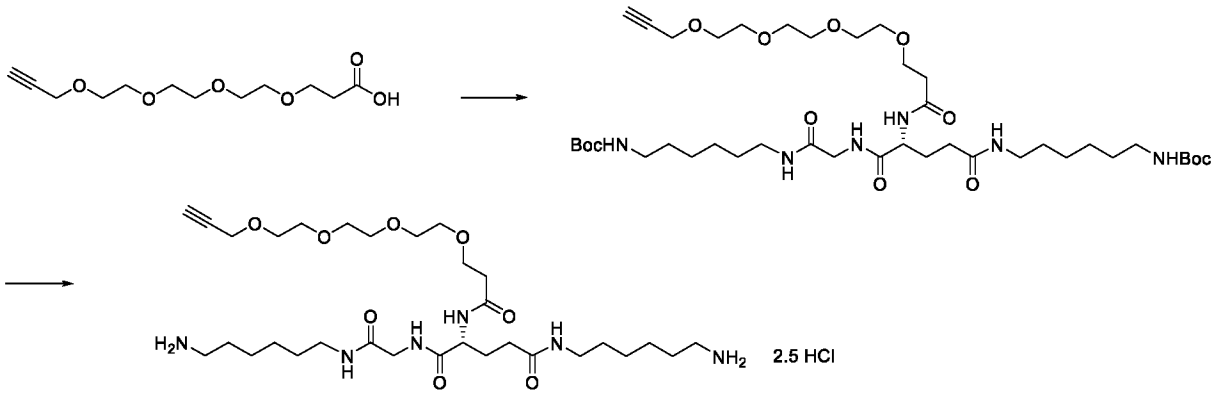
Продукт стадии a (135 мг, 0,079 ммоль) растворяли в ТФУ (0,5 мл) и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем его непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (50 г, от 5 до 32% ацетонитрила и воды). Выход: 88 мг, 85,1%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 654,8$.

Стадия c.

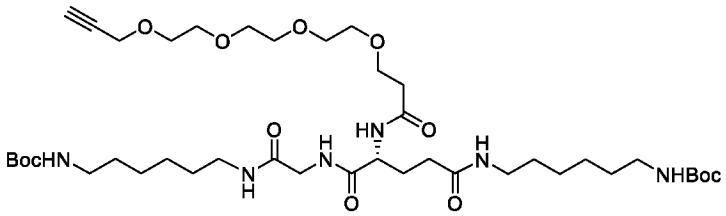


Раствор продукта стадии b (88 мг, 0,0673 ммоль) в MeOH (1,5 мл) охлаждали на бане с ледяной водой и добавляли LiOH (5 мг, 0,2 ммоль) в воде (0,5 мл). После перемешивания смеси в течение 5 часов ее подкисляли раствором 4 н. HCl в диоксане (0,1 мл) и очищали с помощью ВЭЖХ (от 5 до 20% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 76,4 мг, 78%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 614,8$.

Пример 5. Синтез линкера-2

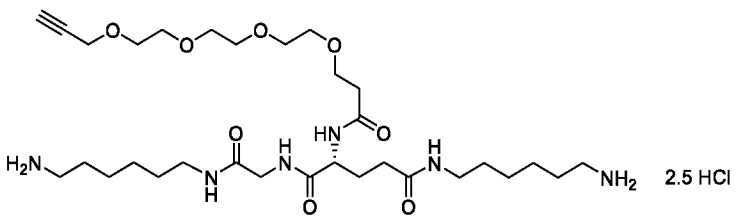


Стадия a.



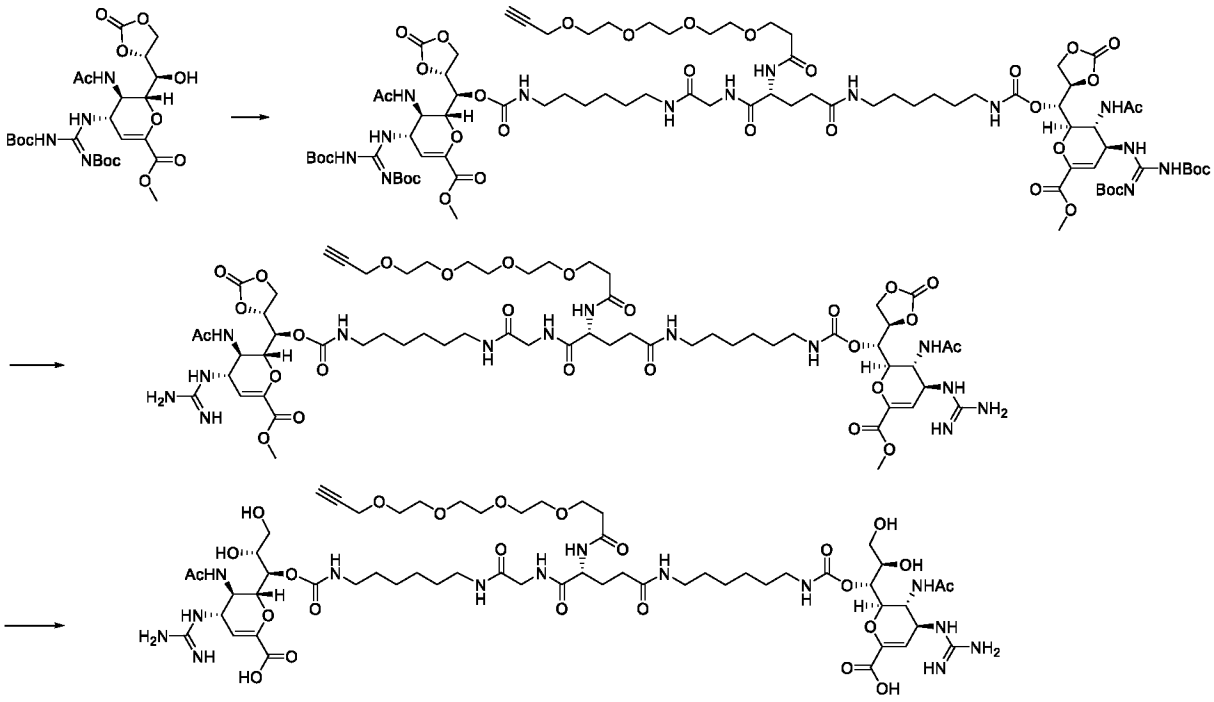
К раствору пропаргил-ПЭГ4-кислоты (364,4 мг, 1,4 ммоль) в безводном ДМФ (2 мл) добавляли HATU (558,9 мг, 1,47 ммоль). После перемешивания до растворения всего связывающего реагента добавляли DIPEA (390 мг, 3 ммоль) и перемешивали в течение 10 минут. Добавляли раствор продукта линкера-1, продукта стадии-d (пример 3, стадия d) (701,1 мг, 1,167 ммоль) в безводном ДМФ (1 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 30 минут и непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 60% ацетонитрила и воды). Выход: 830 мг, 84,4%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 843$.

Стадия b.

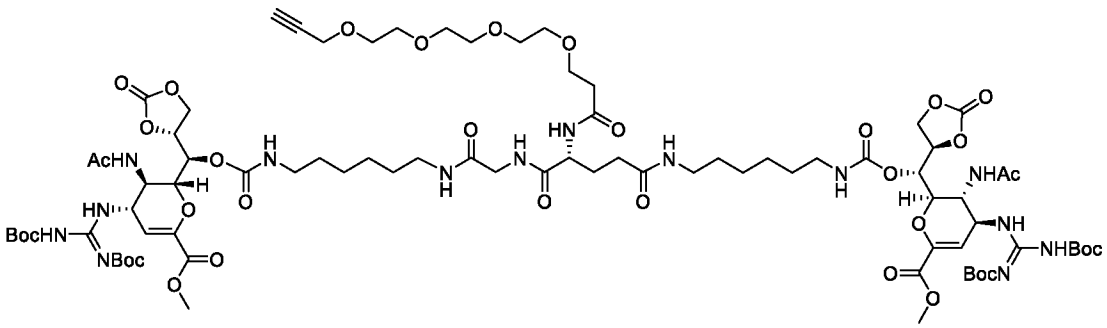


Продукт стадии а растворяли в ТГФ (5 мл) и обрабатывали раствором 4 н. HCl в диоксане (2,5 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи реакционную смесь упаривали на роторном испарителе. Остаток повторно растворяли в ацетонитриле/воде (1:1, 16 мл) и раствор лиофилизировали. Неочищенный продукт переносили на следующую стадию без дополнительной очистки. Выход: 761,8 мг, 100%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 643,8$.

Пример 6. Синтез ПС-2



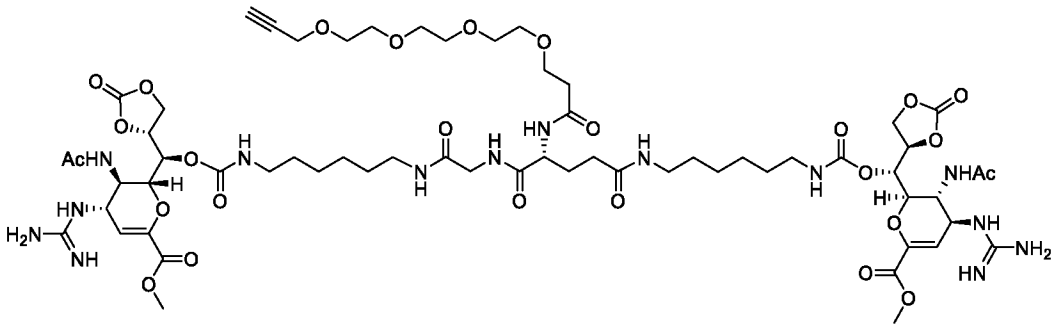
Стадия а.



Высушенную пламенем реакционную колбу продували азотом и загружали промежуточное соединение занамивир (пример 2) (533,6 мг, 0,812 ммоль), ДМАП (99,8 мг, 0,81 ммоль) и безводный ДХМ (1 мл). После перемешивания для растворения исходного материала раствор охлаждали на бане с ледяной водой и добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (242 мг, 1,2 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 5 часов, затем добавляли к раствору линкера-2 (пример 5) (228,4 мг, 0,319 ммоль) в безводном ДМФ (1 мл) и

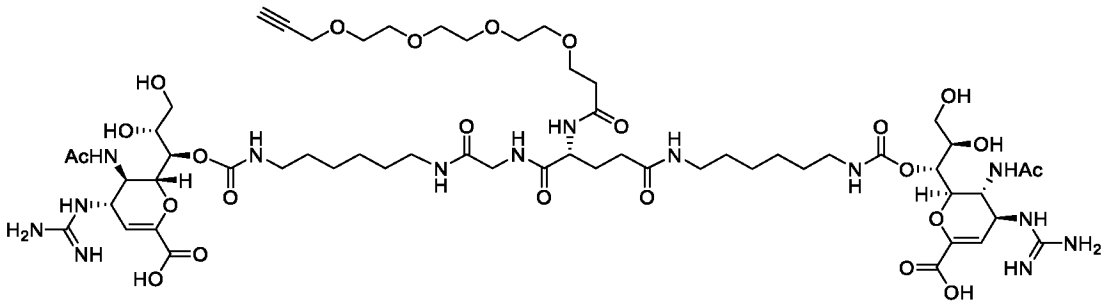
DIPEA (130 мг, 1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи и очищали с помощью ОФЖХ (150 г, от 20 до 65% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Собранные фракции лиофилизировали. Выход: 178,3 мг, 30,4%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 920,5$, $[(M + 3H)/3]^+ = 614,2$.

Стадия b.



Продукт стадии a (178,3 мг, 0,0969 ммоль) растворяли в ТФУ (0,5 мл). Раствор перемешивали в течение 20 минут, затем очищали непосредственно с помощью ВЭЖХ (от 0 до 25% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 91,8 мг, 56,8%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 720,4$, $[(M + 3H)/3]^+ = 480,6$.

Стадия c.



Продукт стадии b (91,8 мг, 0,055 ммоль) растворяли в MeOH (1 мл) и раствор охлаждали на бане с ледяной водой. Моногидрат LiOH (21 мг, 0,5 ммоль) в воде (1 мл) порциями добавляли в течение 1 часа. После перемешивания в течение еще 2 часов реакционную смесь подкисляли раствором 4 н. HCl в диоксане (0,3 мл) и очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 20% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 36,2 мг, 59,4%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 680,3$, $[(M + 3H)/3]^+ = 454,0$.

Пример 7. Синтез h-IgG1 Fc-ПЭГ4-азида

Сложный эфир ПЭГ4-азидо-NHS (98%, 180 мкмоль, 9,5 эквивалентов, 71,4 мг в 0,5 мл ДМФ и разбавленный до 3,60 мл буферным раствором ФСБ 1x с pH 7,4) добавляли к раствору Fc h-IgG1 (SEQ ID NO: 4) (1103 мг в 70,0 мл ФСБ с pH 7,4, ММ ~ 58000 Да, 19,0 мкмоль), и смесь осторожно встряхивали в течение 12 часов при температуре окружающей среды. Раствор упаривали с использованием центробежного концентратора (30 000 MWCO) до объема ~1,5 мл. Неочищенную смесь разбавляли 1:10 в ФСБ с pH 7,4 и снова упаривали. Эту процедуру промывки повторяли в общей сложности три раза. Низкомолекулярный реагент с помощью этой процедуры промывки. Концентрированный Fc-ПЭГ4-азид разбавляли до 70,0 мл буфером ФСБ 1x с pH 7,4 и он был готов для клик-конъюгации. Очищенный материал количественно

определяли с использованием УФ-спектрофотометра Nanodrop™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности h-IgG1). Выход является количественным после очистки. DAR = 4,3, определено с помощью MALDI. Значение DAR можно коррегировать, изменяя эквиваленты сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS в почти линейной зависимости. Например, при использовании 7,0 эквивалентов сложного эфира ПЭГ4-азида NHS значение DAR будет равно 3,0.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для любого описанного в данного документе конъюгата, может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Fc, включая аминокислоту Lys447 (например, С-концевой лизиновый остаток). При экспрессии С-концевой лизин Fc протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность, в которой отсутствует Lys447 (например, отсутствует С-концевой остаток лизина). Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 8. Синтез рекомбинантного сывороточного альбумина мыши (MSA)-ПЭГ4-азида.

ПЭГ4-азидо-NHS эфир (98%, 81,7 мкмоль, 4,5 эквивалента, 32,4 мг в 0,3 мл ДМФ и разбавленный до 1,63 мл буферным раствором ФСБ 1х pH 7,4) добавляли к раствору рекомбинантного мышиного сывороточного альбумина (SEQ ID NO: 80) (1200 мг в 75,0 мл ФСБ с pH 7,4, ММ ~ 66000 Да, 18,2 мкмоль), и смесь осторожно встряхивали в течение 12 часов при температуре окружающей среды. Раствор упаривали с использованием центробежного концентратора (30 000 MWCO) до объема ~1,5 мл. Неочищенную смесь разбавляли 1:10 в ФСБ с pH 7,4 и снова упаривали. Эту процедуру промывки повторяли в общей сложности три раза. Низкомолекулярный реагент с помощью этой процедуры промывки. Концентрированный азид MSA-ПЭГ4 разбавляли до 75,0 мл буфером ФСБ 1х с pH 7,4 и он был готов для клик-конъюгации. Очищенный материал количественно определяли с использованием УФ-спектрофотометра Nanodrop™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности h-IgG1). Выход является количественным после очистки. DAR = 3,5, определено с помощью MALDI. Значение DAR можно коррегировать путем изменения эквивалентов сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS аналогично Fc h-IgG1 (пример 7).

Пример 9. Синтез конъюгата 1

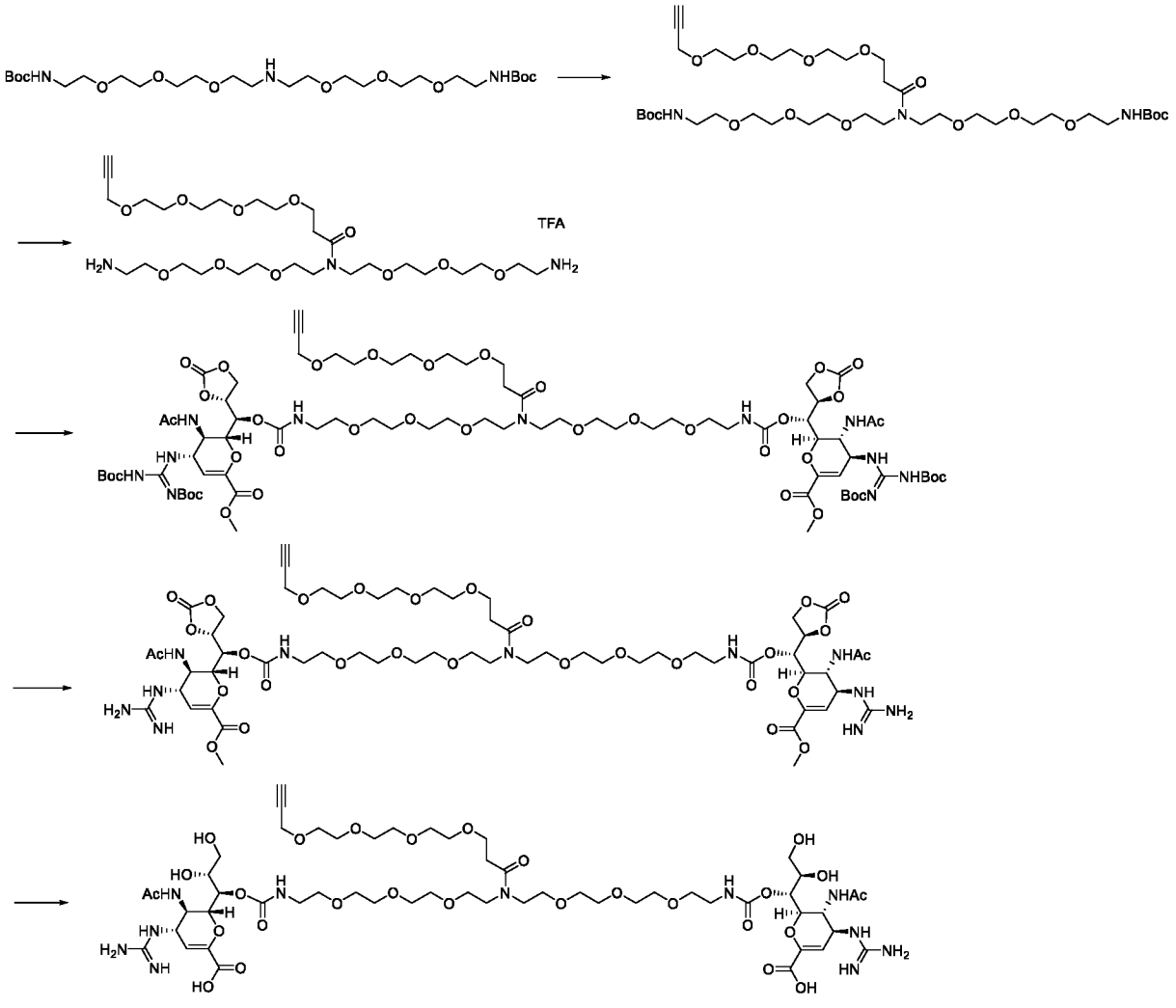
Раствор ФСБ h-IgG1 Fc-ПЭГ4-азида (пример 7) (50 мг, 2,815 мл, 0,8591 мкмоль) добавляли в центрифужную пробирку на 15 мл, содержащую ПС 2 (пример 6) (35,2 мг, 0,02217 ммоль). После того, как смесь осторожно встряхивали для растворения всего ПС 2, 344 мкл раствора натриевой соли L-аскорбиновой кислоты (59,4 мг, 0,3 ммоль), добавляли сульфат мед (II) (10 мг, 0,05 ммоль) и THPTA (23 мг 0,05 ммоль) в буфере ФСБ 7,4 (1 мл). Полученную смесь осторожно встряхивали в течение ночи. Проводили очистку методом аффинной хроматографии на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии, как описано в примере 8. Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 63797 Да (DAR = 3,4). Выход 27,39 мг, выход 55%. На фиг. 9 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 1.

Пример 10. Очистка конъюгатов

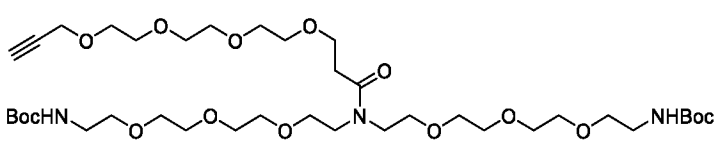
Неочищенную смесь разбавляли 1:10 в ФСБ с pH 7,4 и очищали с использованием смолы MabSelect Sure (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс, США) с последующей эксклюзионной хроматографией. (HiLoad

26/600 Superdex200 pg, GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс, США). Фракции, содержащие очищенный конъюгат, объединяли и упаривали до около 20 мг/мл с использованием центробежного концентратора (30 000 MWCO). Очищенный материал количественно определяли с использованием УФ-спектрофотометра Nanodrop™ в видимой области спектра с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности Fc(myc) hIgG1. Очищенные молекулы анализировали с использованием 4-12% бис-трис гелей для ДСН-ПААГ-электрофореза путем загрузки 1 мкг каждой молекулы в гель и окрашивания с использованием мгновенного окрашивания синим (Expedeon, Сан-Диего, штат Калифорния, США). Каждый гель включал маркер молекулярной массы с указанными стандартами молекулярной массы. Выходы рассчитывали, а чистоту определяли с помощью аналитической ВЭЖХ Agilent. Пик продукта и ММ были найдены с помощью Maldi MS, а также рассчитано итоговое DAR.

Пример 11. Синтез ПС 3



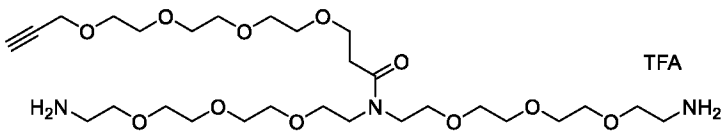
Стадия a.



К раствору пропаргил-ПЭГ4-кислоты (260 мг, 1 ммоль) и HATU (380,2 мг, 1 ммоль) в безводном ДМФ (1 мл) добавляли DIPEA (130 мг). После перемешивания в течение 5 минут добавляли NH-бис (ПЭГ3-

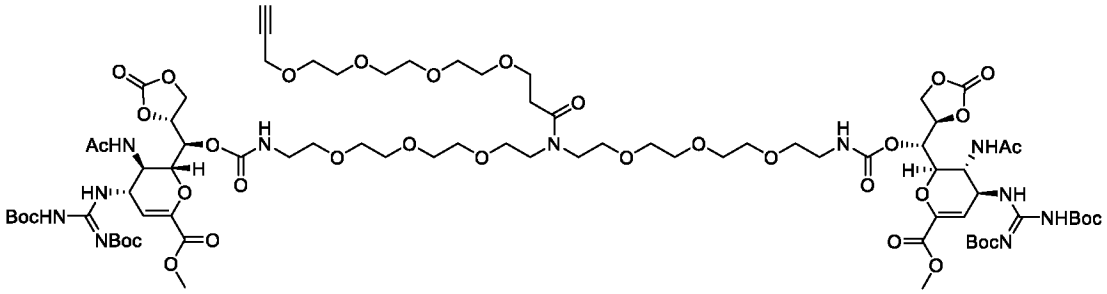
Boc) (500 мг, 0,881 ммоль) и продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение ночи. Затем его непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (9100 г, от 5 до 50% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 683 мг, 95,8%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[M + H]^+$ = 810,4, $[M - Boc + H]^+$ = 710,4, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+$ = 305,8.

Стадия b.



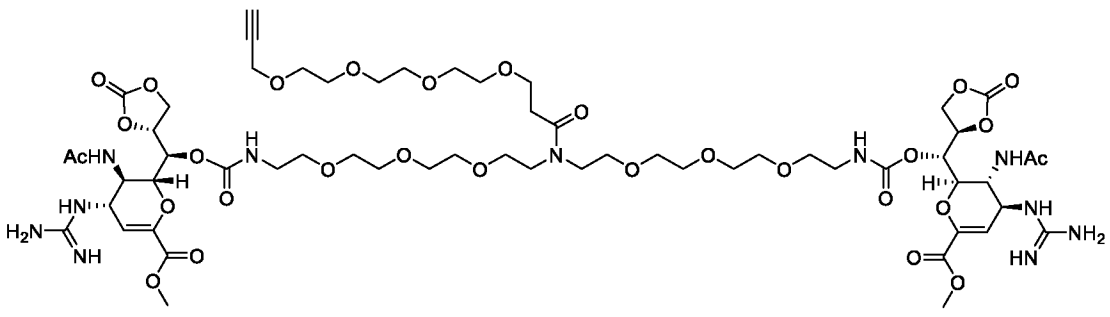
Продукт стадии a растворяли в ТФУ (1 мл). Раствор перемешивали в течение 2 часов, а затем проводили очистку непосредственно с помощью ОФЖХ (100 г, от 0 до 30% ацетонитрила и воды). Выход: 589 мг, 98,7%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 305,8.

Стадия c.



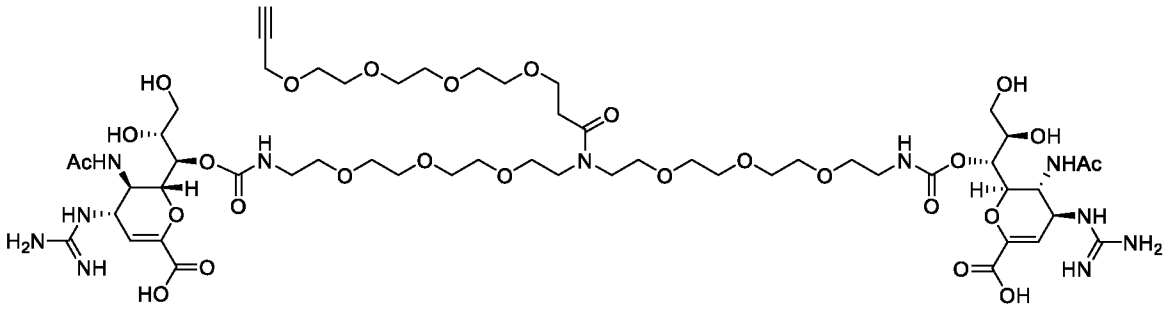
Высушенную пламенем реакционную колбу продували азотом и загружали промежуточное соединение занамивир (пример 2) (572 мг, 1 ммоль) и безводный ДХМ (1 мл). После перемешивания для растворения исходного материала раствор охлаждали на бане с ледяной водой и добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (302,4 мг, 1,5 ммоль) после DMAP (22,4 мг, 0,2 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 5 часов, затем добавляли воду(0,2 мл), чтобы погасить реакцию. После перемешивания в течение 10 минут добавляли продукт стадии b (256,7 мг, 0,355 ммоль) в безводном ДМФ (1 мл) и DIPEA (163,8 мг, 1,26 ммоль). Перемешивание продолжали в течение 2 часов, а затем реакционную смесь очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (150 г, от 20 до 65% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Собранные фракции лиофилизировали. Выход 422,8 мг желаемого продукта, который был загрязнен некоторыми примесями, выход <69%. Материал переносили на следующую стадию без дополнительной очистки. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 903,9, $[(M + 3H)/3]^+$ = 603,2.

Стадия d.



Продукт стадии c (422,8 мг, < 0,245 ммоль) растворяли в ТФУ (1 мл). Раствор перемешивали в течение 20 минут, затем очищали непосредственно с помощью ВЭЖХ (от 5 до 25% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход 169,7 мг, 29,2% за две стадии. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 704,0, $[(M + 3H)/3]^+$ = 469,6.

Стадия e.

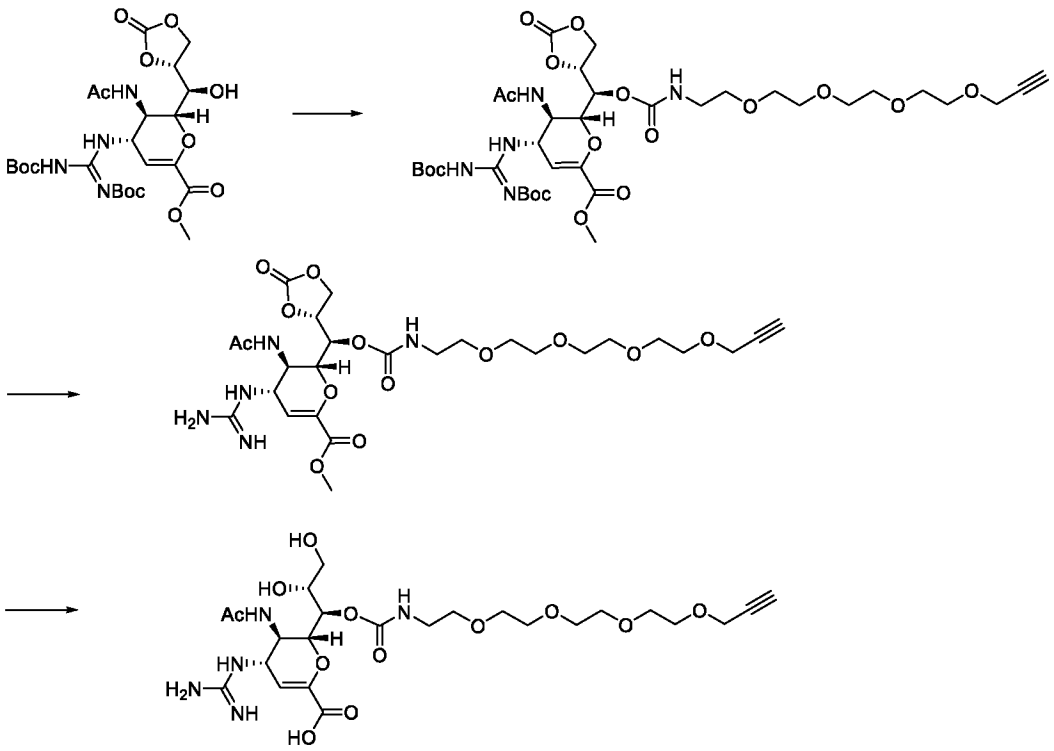


Продукт стадии d (169,7 мг, 0,0923 ммоль) растворяли в MeOH (1,5 мл) и раствор охлаждали на бане с ледяной водой. Моногидрат LiOH (21 мг, 0,5 ммоль) в воде (1 мл) порциями добавляли в течение 1 часа. После перемешивания в течение ночи реакционную смесь подкисляли водородной формой Dowex 50W x 8 и очищали с помощью ОФЖХ (от 0 до 30% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 107,9 мг, 66,9%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 663,8, $[(M + 3H)/3]^+$ = 442,9.

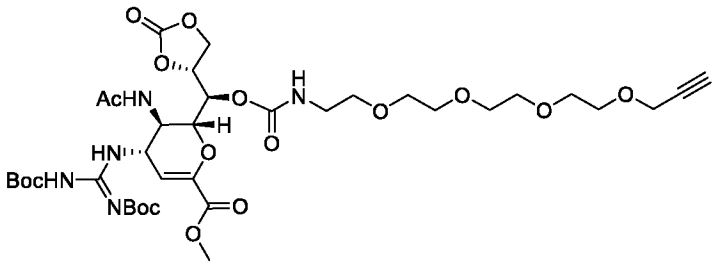
Пример 12. Синтез конъюгата 2

Указанный в заголовке конъюгат получали аналогично конъюгату 1 (пример 9) с использованием ПС 3 (пример 11). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 63561 Да (DAR = 3,3). Выход 43,4 мг, выход 43%. На фиг. 10 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 2.

Пример 13. Синтез ПС 4

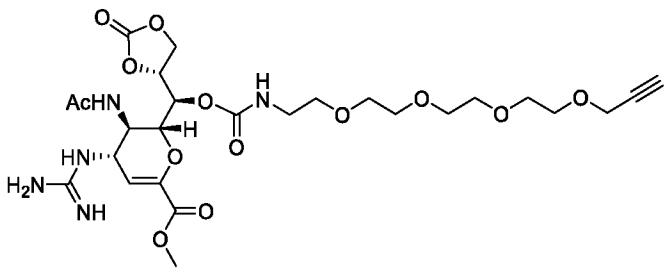


Стадия a.



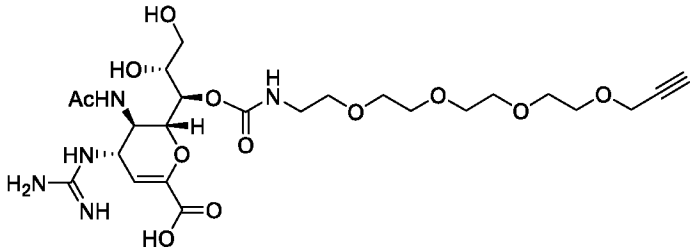
Высушенную пламенем реакционную колбу продували азотом и загружали промежуточное соединение занамивир (пример 2) (343,2 мг, 0,6 ммоль) и безводный ДХМ (1,5 мл). Раствор охлаждали на бане с ледяной водой и добавляли DIPEA (234 мг, 1,8 ммоль), затем 4-нитрофенилхлорформиат (121 мг, 0,6 ммоль) и DMAP (67,4 мг, 0,6 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 15 минут, затем добавляли дополнительное количество 4-нитрофенилхлорформиата (121 мг, 0,6 ммоль). После перемешивания в течение 2 часов добавляли воду (0,2 мл) для гашения непрореагировавшего хлорформиата. После перемешивания в течение 10 минут к реакционной смеси добавляли раствор пропаргил-ПЭГ4-амина (185 мг, 0,8 ммоль) в безводном ДМФ (0,5 мл). Реакцию продолжали в течение 1 часа, а затем непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 60% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Собранные фракции лиофилизировали. Выход: 355 мг, 71,3%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 830,2$.

Стадия b.



Продукт стадии a (355 мг, 0,428 ммоль) растворяли в ТФУ (1 мл). Раствор перемешивали в течение ночи, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (от 5 до 25% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход 260,2 мг, 70,9% за две стадии. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 630,2$.

Стадия c.

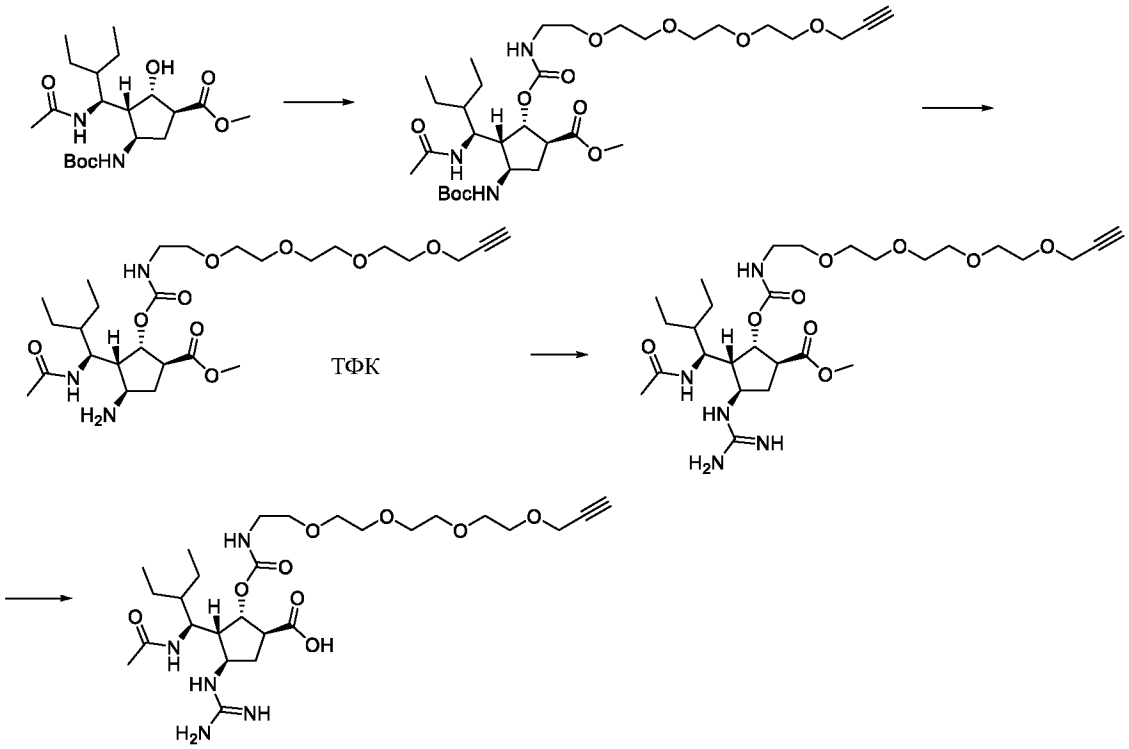


Продукт стадии b (260,2 мг, 0,303 ммоль) растворяли в MeOH (1,5 мл). После охлаждения раствора на бане с ледяной водой порциями в течение 1 часа добавляли раствор моногидрата LiOH (42 мг, 1 ммоль) в воде (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, затем подкисляли водородной формой Dowex 50W x 8 и очищали с помощью ОФЖХ (от 0 до 50% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 78,1 мг, 99%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 590,2$.

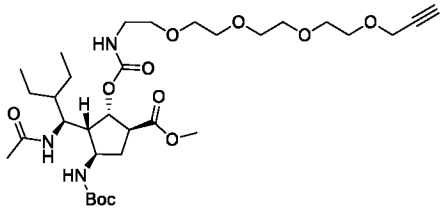
Пример 14. Синтез конъюгата 3

Указанный в заголовке конъюгат получали аналогично конъюгату 1 (пример 9) с использованием ПС 4 (пример 13). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 61182 Да (DAR = 3,4). Выход 50,89 мг, выход 51%. На фиг. 11 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 3.

Пример 15. Синтез ПС 5

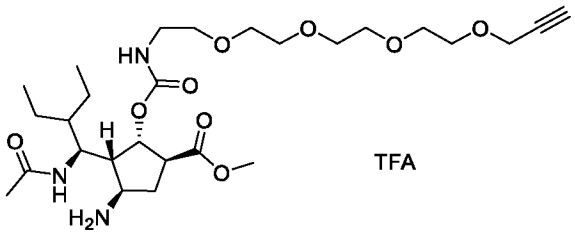


Стадия a.



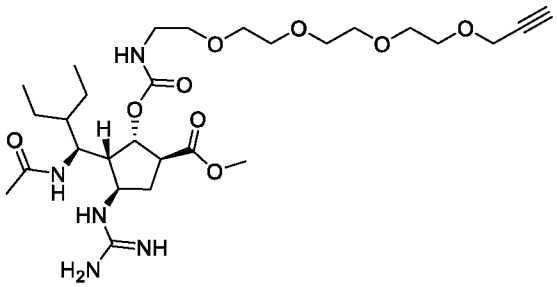
Высушенную пламенем реакционную колбу продували азотом и загружали (1S, 2S, 3R, 4R)-метил-3-((S)-1-ацетамидо-2-этилбутил)-4-(трет-бутоксикарбониламино)-2-гидроксициклопентанкарбоксилат (320,4 мг, 0,8 ммоль) и безводный ДХМ (2 мл). Раствор охлаждали на бане с ледяной водой и добавляли DIPEA (312 мг, 2,4 ммоль), затем 4-нитрофенилхлорформиат (161,3 мг, 0,8 ммоль) и DMAP (98 мг, 0,8 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 15 минут, затем добавляли дополнительное количество 4-нитрофенилхлорформиата (161,3 мг, 0,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов, затем добавляли воду (0,2 мл), чтобы погасить непрореагировавший хлорформиат. После перемешивания в течение 10 минут добавляли раствор пропаргил-ПЭГ4-амина (259 мг, 1,12 ммоль) в безводном ДМФ (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа, а затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 60% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Собранные фракции лиофилизировали. Выход: 391,2 мг, 74,4%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 658,3$, $[M – Boc + H]^+ = 558,3$.

Стадия b.



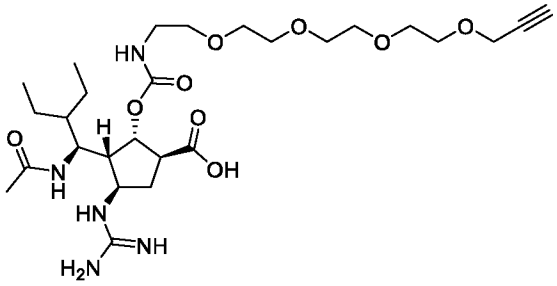
Продукт стадии a (391,2 мг, 0,595 ммоль) растворяли в ТФУ (0,8 мл) и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем его непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 60% ацетонитрила и воды). Выход: 323,2 мг, 81%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 558,3$.

Стадия c.



К раствору продукта стадии b (323,2 мг, 0,482 ммоль) в ТГФ (2 мл) добавляли N,N'-бис-Boc-1-гуанилпиразол (224,4 мг, 0,723 ммоль) и PIPEA (260 мг, 2 мл ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 дня, а затем экстрагировали водой (3 мл) и EtOAc/гексанами (1:1, 8 мл). Органический слой сушили над Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Остаток повторно растворяли в ТФУ (~ 1 мл) и раствор перемешивали в течение ночи. Затем его непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (100 г, от 0 до 30% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Собранные фракции лиофилизировали. Выход: 254,2 мг, 83,2%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 600,3$, $[M – Boc + H]^+ = 300,6$.

Стадия d.



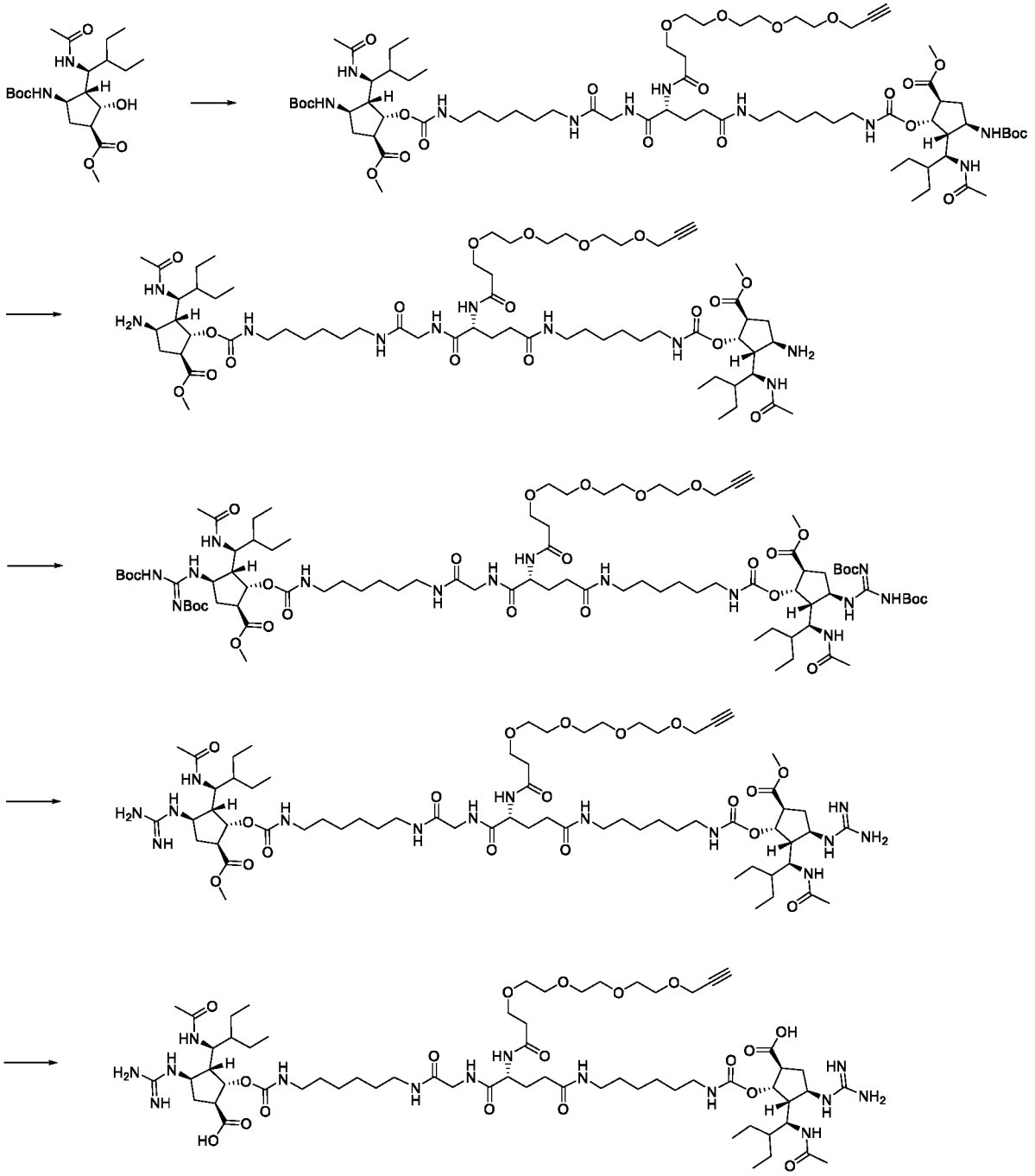
Продукт стадии c (254,2 мг, 0,356 ммоль) растворяли в ТГФ (1,5 мл) и раствор охлаждали на бане с ледяной водой. Добавляли дигидрат $CaCl_2$ (419 мг, 2,85 ммоль), затем добавляли 1,8 мл КОН (112 мг, 2 ммоль) в воде (2 мл) порциями в течение 1 часа. После перемешивания в течение еще 3 часов реакционную смесь подкисляли водородной формой Dowex 50W x 8 и очищали с помощью ОФЖХ (от 0 до 30% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 102 мг, 49,8%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 586,4$, $[(M + 2H)/2]^+ = 293,8$.

Пример 16. Синтез конъюгата 4

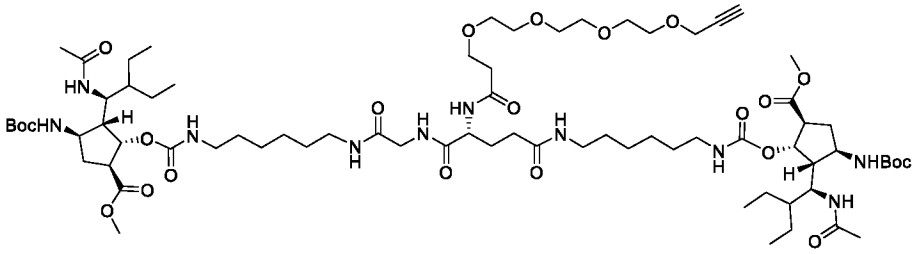
Указанный в заголовке конъюгат получали аналогично конъюгату 1 (пример 9) с использованием ПС 5 (пример 15). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 63002 Да (DAR =

3,4). Выход 49,315 мг, выход 49%. На фиг. 12 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 4.

Пример 17. Синтез ПС 6



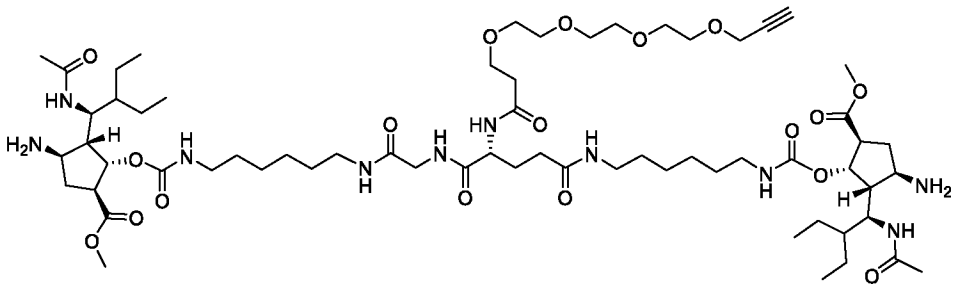
Стадия a.



Высушенную пламенем реакционную колбу продували азотом и загружали (1S, 2S, 3R, 4R)-метил-3

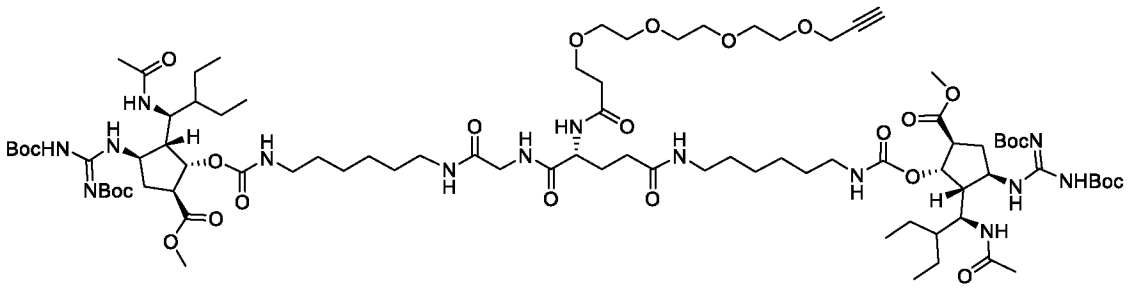
-((S)-1-ацетамидо-2-этилбутил)-4-(трет-бутоксикарбониламино)-2-гидроксициклопентанкарбоксилат (280,4 мг, 0,7 ммоль) и безводный ДХМ (1 мл). После перемешивания для растворения исходного материала к раствору добавляли DMAP (85,7 мг, 0,7 ммоль), а затем бис(пентафторфенил)карбонат (295,6 мг, 0,75 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа, затем добавляли к раствору линкера-2 (пример 5) (157,5 мг, 0,22 ммоль) в безводном ДМФ (1 мл) и DIPEA (130 мг, 1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи и очищали с помощью ОФЖХ (50 г, от 5 до 90% ацетонитрила и воды). Собранные фракции лиофилизировали. Выход: 134,1 мг, 40,7%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 748,6$.

Стадия b.



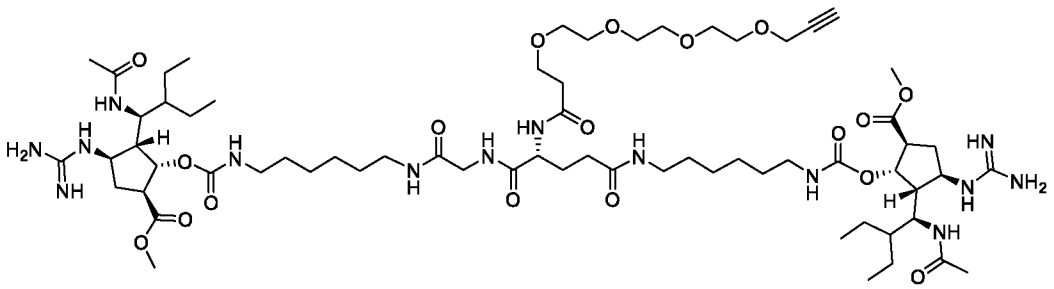
Продукт стадии a (134,1 мг, 0,0896 ммоль) растворяли в ТФУ (0,5 мл). Раствор перемешивали в течение 20 минут, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (50 г, от 5 до 60% ацетонитрила и воды). Выход: 108,4 мг, 93,4%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 648,3$, $[(M + 3H)/3]^+ = 432,8$.

Стадия c.



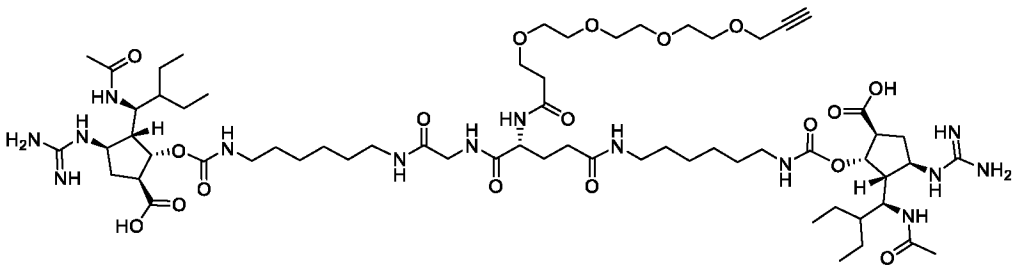
К раствору продукта стадии-b (108,4 мг, 0,0837 ммоль) в безводном ТГФ (1 мл) добавляли N,N'-бис-boc-1-гуанилпиразол (81,3 мг, 0,285 ммоль) и DIEPA (65 мг, 0,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 дней, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (100 г, от 40 до 75% ацетонитрила и воды). Выход: 73,6 мг, 49,4%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 3H)/3]^+ = 594,2$.

Стадия d.



Продукт стадии c (73,6 мг, 0,041 ммоль) растворяли в ТФУ (0,5 мл). Раствор перемешивали в течение 20 минут, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (50 г, от 5 до 60% ацетонитрила и воды). Выход: 62,1 мг, 94,1%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 690,4$, $[(M + 3H)/3]^+ = 460,8$.

Стадия e.

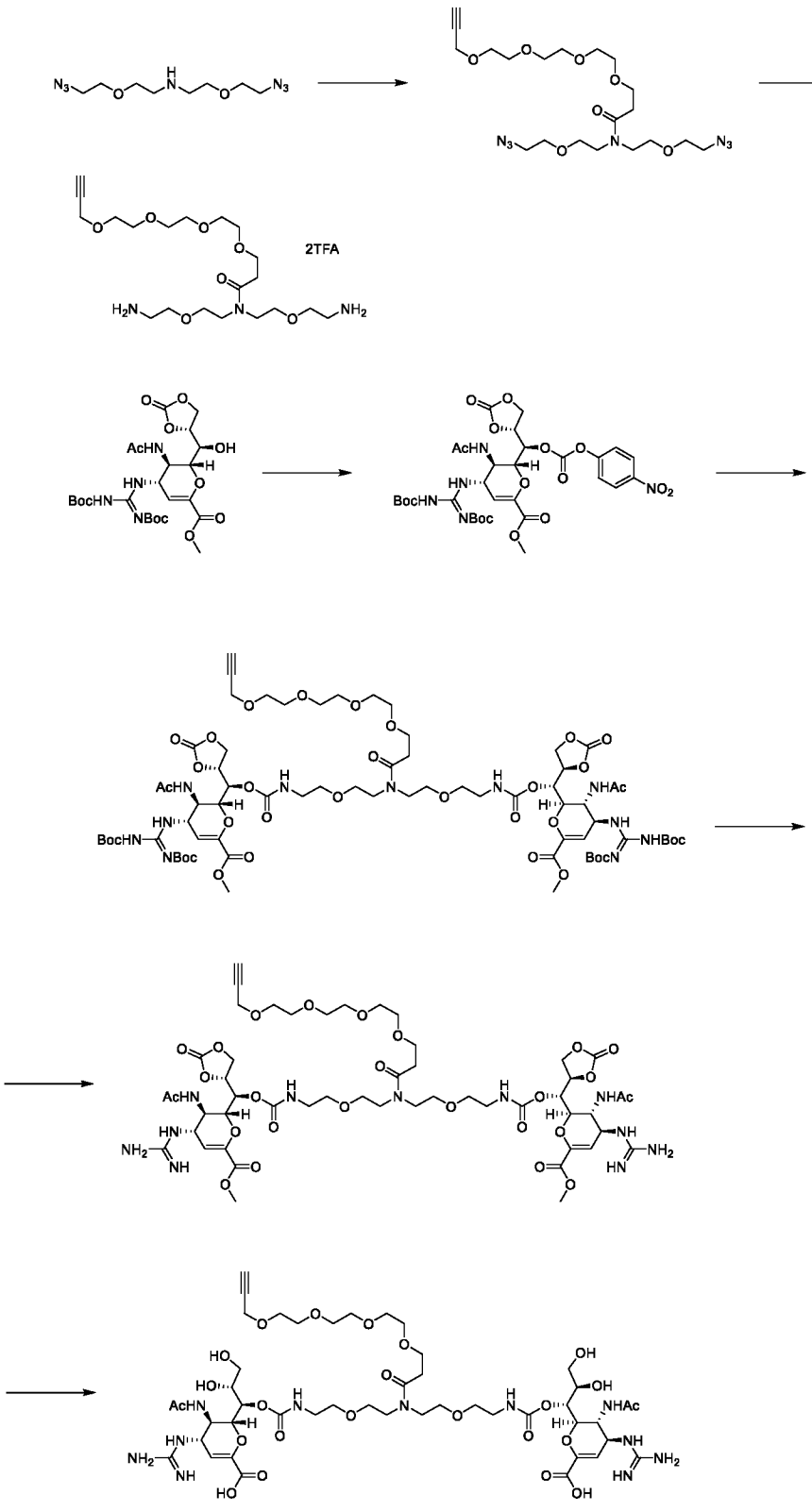


Продукт стадии d (62,1 мг, 0,0386 ммоль) в ТГФ (3 мл) охлаждали на бане с ледяной водой и порциями добавляли 45% масс./масс. раствор КОН (0,2 мл) в течение 1 часа. Реакционную смесь перемешивали в течение еще 2 часов, затем подкисляли раствором 4 н. HCl в диоксане (0,8 мл) и экстрагировали гексаном (10 мл) и водой (1,5 мл). Водный слой очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 20% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 36,2 мг, 59,4%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 676,5$, $[(M + 3H)/3]^+ = 451,4$.

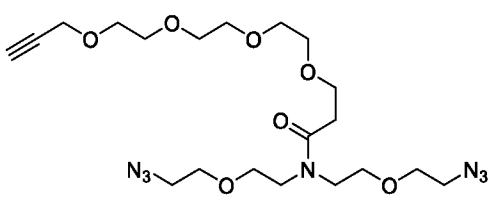
Пример 18. Синтез конъюгата 5

Указанный в заголовке конъюгат получали аналогично конъюгату 1 (пример 9) с использованием ПС 6 (пример 17). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 63561 Да (DAR = 3,3). Выход 43,4 мг, выход 43%. На фиг. 13 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 5.

Пример 19. Синтез ПС 7



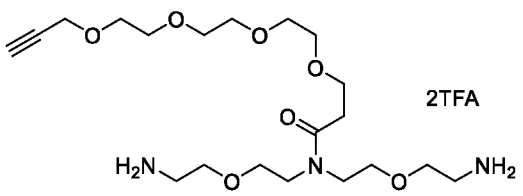
Стадия a.



К раствору пропаргил-ПЭГ4-кислоты (609 мг, 2,34 ммоль) и NH-бис (ПЭГ1-азид) (500 мг, 2,055 ммоль) в безводном ДМФ (2 мл) порциями добавляли HATU (889,7 мг, 2,34 ммоль) в течение 5 минут. После

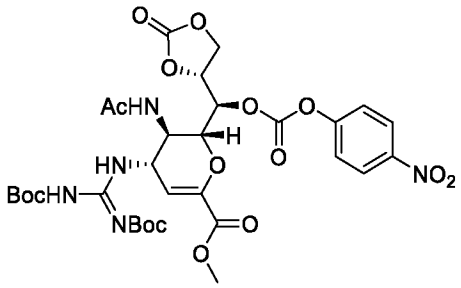
перемешивания для растворения всего связывающего реагента добавляли DIPEA (390 мг, 3 ммоль) и перемешивание продолжали в течение 1 часа. Затем его очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 40% ацетонитрила и воды). Выход: 918 мг, 92%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 486,2$.

Стадия b.



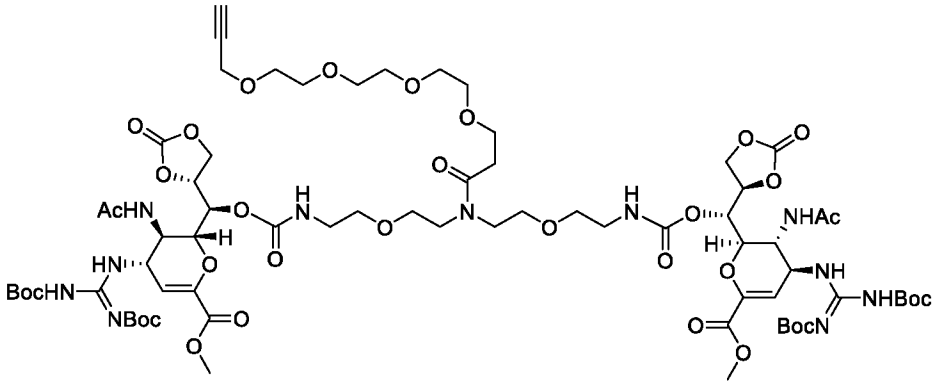
Продукт стадии a (918 мг, 1,89 ммоль) растворяли в ТГФ и раствор охлаждали до ~ 13 °C. Трифенилфосфин (1,141 г, 4,35 ммоль) порциями добавляли в течение 10 минут. Полученную смесь перемешивали при температуре от ~ 13 °C до комнатной температуры в течение 2 часов. Добавляли раствор моногидрата LiOH (42 мг, 1 ммоль) в воде (2 мл) и MeOH (1 мл). После перемешивания в течение 20 часов реакционную смесь очищали с помощью ОФЖХ (100 г, от 0 до 30% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 825 мг, 65,9%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 434,4$.

Стадия c.



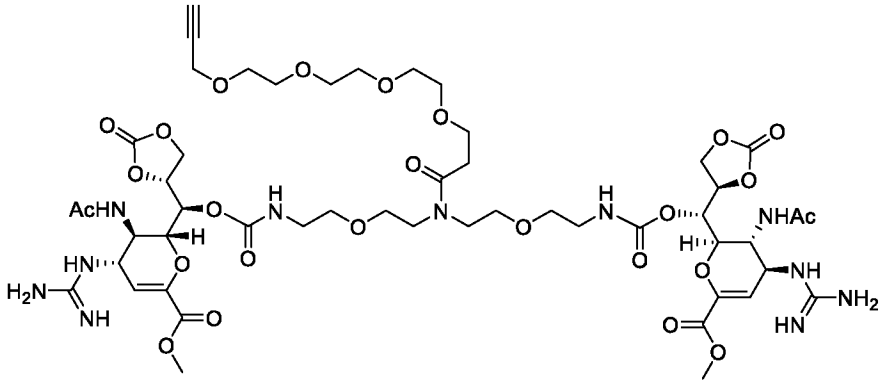
Высушенную пламенем реакционную колбу продували азотом и загружали промежуточное соединение занамивир (пример 2) (865 мг, 1,51 ммоль) и безводный ДХМ (5 мл). После перемешивания для растворения исходного материала раствор охлаждали на бане с ледяной водой и добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (365,3 мг, 1,81 ммоль) после DMAP (152,2 мг, 0,755 ммоль). Баню с ледяной водой удаляли и смесь перемешивали в течение 3 часов. Добавляли дополнительное количество 4-нитрофенилхлорформиата (304,4 мг, 1,51 ммоль) и перемешивание продолжали в течение 1 часа. Затем реакцию гасили водой (1 мл). После интенсивного перемешивания в течение 1 часа реакционную смесь экстрагировали водой (20 мл × 2) и ДХМ (20 мл). Органический слой перемешивали в течение ночи, сушили над Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Материал переносили на следующую стадию без дополнительной очистки. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 738,2$.

Стадия d.



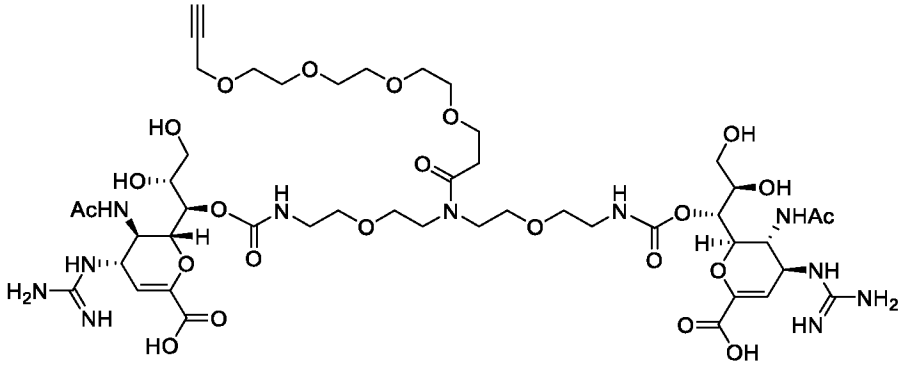
К продукту стадии c по каплям добавляли раствор смеси продукта стадии b (429,7 мг, 0,65 ммоль) и DIPEA (260 мг, 2 ммоль) в безводном ТГФ (1 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 2 часов, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (100 г, от 10 до 65% ацетонитрила и воды). Ацетонитрил из собранных фракций удаляли на роторном испарителе при комнатной температуре. Гетерогенный водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (200 мл), затем снова экстрагировали с помощью EtOAc (50 мл). Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4 и упаривали досуха на роторном испарителе. Выход: 442 мг, 41,7%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 815,8$, $[(M - Boc + 2H)/2]^+ = 765,8$, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+ = 716$.

Стадия e.



Продукт стадии d (441 мг, 0,271 ммоль) растворяли в ТФУ (1 мл). Раствор перемешивали в течение 20 минут, затем очищали непосредственно с помощью ВЭЖХ (от 5 до 20% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 308 мг, 77,9%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 615,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 411$.

Стадия f.

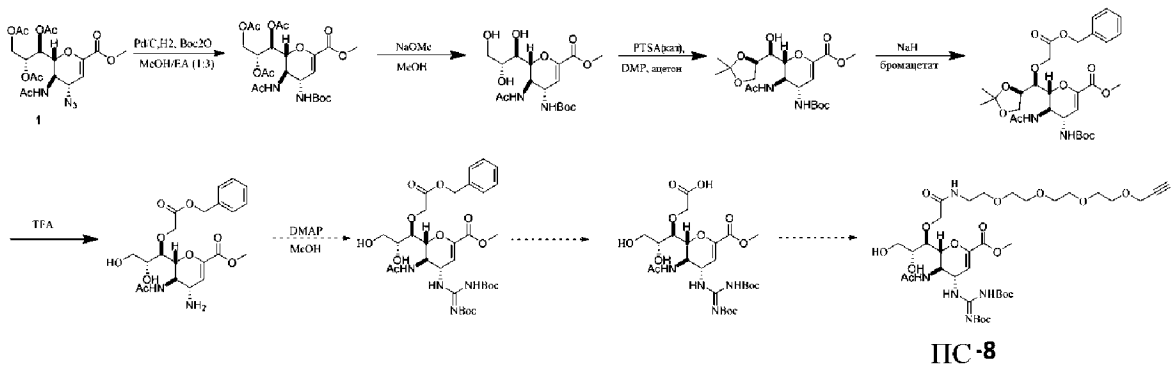


Продукт стадии e (308 мг, 0,211 ммоль) растворяли в MeOH (1 мл) и воде (0,5 мл), и раствор охлаждали на бане с ледяной водой. Раствор моногидрата LiOH (42 мг, 1 ммоль) в воде (1 мл) порциями добавляли в течение 1 часа. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, подкисляли раствором 4 н. HCl в диоксане (0,25 мл) и очищали с помощью ОФЖХ (от 0 до 20% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 198 мг, 64%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 575,8, $[(M + 3H)/3]^+$ = 384,2.

Пример 20. Синтез конъюгата 6

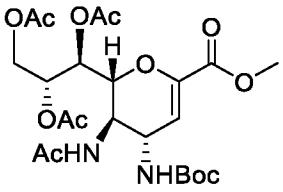
Указанный в заголовке конъюгат получают аналогично конъюгату 1 (Пример 9) с использованием ПС-7 (Пример 19) (SEQ ID NO: 18). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 62854 Да (DAR = 3,1). Выход 175,4 мг, выход 50%. На фиг. 14 показан невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 6. Полученный конъюгат изображен на Фиг. 43.

Пример 21. Синтез ПС 8



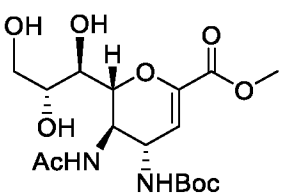
ПС-8

Стадия a.



Метил 5-ацетамидо-7,8,9-О-триацетил-2,6-ангидро-4-азидо-3,4,5-тридеокси-D-глицеро-D-галакто-нон-2-енонат (1,8 г, 4,0 ммоль) растворяли в 40 мл метанола, а затем обрабатывали 400 мг 5% Pd/C и 1,1 г Boc-ангидрида (5,0 ммоль), затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 1 часа. Палладированный уголь удаляли фильтрацией. Фильтрат упаривали и использовали на следующей стадии без очистки.

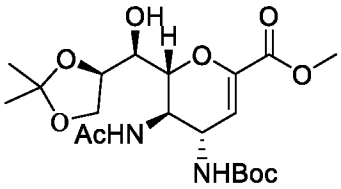
Стадия b.



Продукт с предыдущей стадии растворяли в 20 мл сухого метанола, а затем обрабатывали 2 мл метоксида натрия в метаноле (0,5 М) по каплям при охлаждении на бане с ледяной водой. Через 2 часа ход

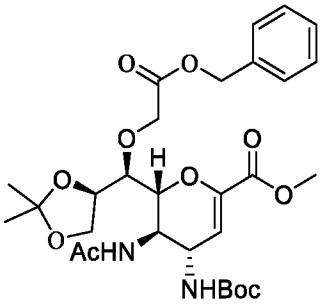
реакции определяли с помощью ЖХМС. Реакцию гасили 1 н. HCl до pH 5-6. Полученный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 5% до 100% ацетонитрилом и водой, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $(M+H)^+$ =405

Стадия c.



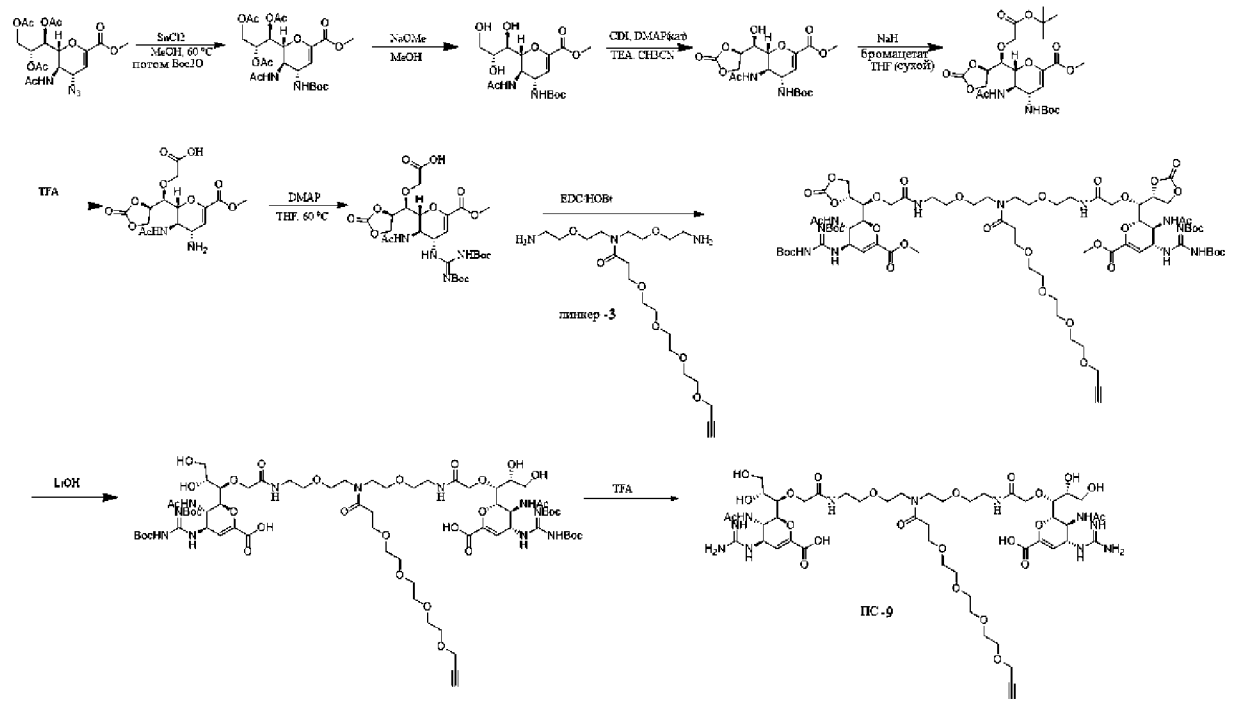
Метил 5-ацетамидо-2,6-ангидро-4-[(трет-бутоксикарбонил)амино]-3,4,5-тридезокси-D-эритронон-2-енонат (0,4 г, 1 ммоль) растворяли в 10 мл ацетона, 4 мл 2,2-диметоксипропана и 20 мг гидрата п-толуолсульфоновой кислоты (0,1 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем гасили 1 мл насыщенного $NaHCO_3$. Смесь упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 5% до 100% ацетонитрилом и водой без модификатора. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $(M+H)^+$ =445.

Стадия d.

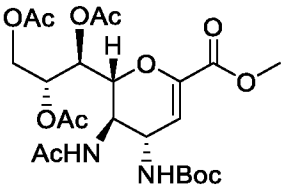


Гидрид натрия (40 мг, 60% в масле, 1,0 ммоль) добавляли к метил-5-ацетамидо-2,6-ангидро-4-[(трет-бутоксикарбонил)амино]-3,4,5-тридеокси-8,9-O-(1-метилэтилиден)-D-эритро-нон-2-енонат (0,25 г, 0,50 ммоль) в 5 мл сухого ТГФ при охлаждении на бане с ледяной водой. Полученный раствор перемешивали в течение 0,5 часа, затем добавляли бензилбромацетат (0,23 г, 1,0 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 2 часов и гасили добавлением 5 мл 10% хлорида аммония в воде. Затем раствор разбавляли 50 мл этилацетата. Органический слой отделяли и сушили сульфатом натрия. Высушенный органический раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 5% до 100% ацетонитрилом и водой без модификатора. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $(M+H)^+$ =593.

Пример 22. Синтез ПС 9

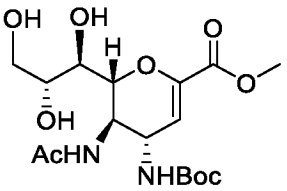


Стадия a.



Метил 5-ацетамидо-7,8,9-О-триацетил-2,6-ангидро-4-азидо-3,4,5-тридезокси-D-глицеро-D-галакто-нон-2-енонат (10 г, 22 ммоль) растворяли в 100 мл метанола, а затем нагревали до 60 °С на масляной бане, добавляли $SnCl_2$ (5,7 г, 20 ммоль) к раствору 3 порциями (осторожно, выделяется газ). Реакционную смесь перемешивали в течение 10 минут, после чего по данным ВЭЖХ реакция была завершена. Реакционный раствор медленно добавляли к раствору 50 мл насыщенного $NaHCO_3$ и 50 г целита при интенсивном перемешивании. Полученную суспензию фильтровали. Фильтрат обрабатывали Boc_2O (6,6 г, 30 ммоль, 1,5 экв.). Через 2 часа при комнатной температуре раствор упаривали для удаления большей части метанола, растворяли в 200 мл ДХМ и дважды экстрагировали 100 мл ДХМ. Объединенные экстракты сушили сульфатом натрия, фильтровали и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Выход неочищенного продукта 12 г, 100%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =531.

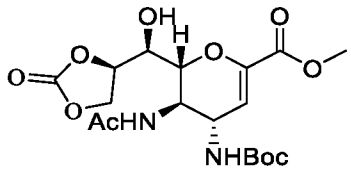
Стадия b.



Материал с предыдущей стадии растворяли в 60 мл сухого метанола, затем обрабатывали 10 мл метоксида натрия в метаноле (0,5 М) при охлаждении на бане с ледяной водой. За ходом реакции следили с помощью ЖХМС, которая завершалась через 2 часа. Реакцию гасили 1 н. HCl до pH 5-6. Полученный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием

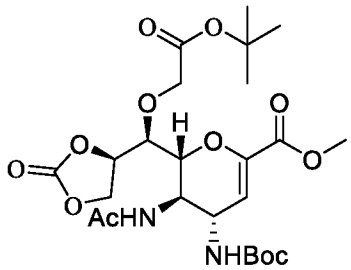
жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 30% ацетонитрилом и водой, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продуктов 7,2г, 80%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =405.

Стадия c.



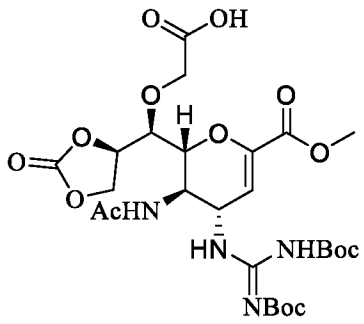
Раствор продукта с предыдущей стадии (3,5 г, 8,5 ммоль), CDI (2,8 г, 2 эквив.), триметиламин (4,2 мл, 30 ммоль) и DMAP (240 мг, 2 ммоль) нагревали в ацетонитриле (50 мл) в течение ночи, затем упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 30% ацетонитрилом и водой без модификатора. Выход желаемого продукта 2,3 г, 60%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =431.

Стадия d.



Гидрид натрия (400 мг, 60% в масле, 10 ммоль) добавляли к продукту с предыдущей стадии (1,45 г, 3,3 ммоль) в 50 мл сухого ТГФ (чувствительная к влаге реакция) на бане с ледяной водой. Полученный раствор перемешивали в течение 0,5 часа, затем к вышеуказанному раствору добавляли трет-бутилбромацетат (2 г, 10 ммоль), полученный раствор нагревали до 60 °C в течение ночи и гасили уксусной кислотой. Полученный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 50% ацетонитрилом и водой с ТФУ в качестве модификатора. Выход 1г, 57%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =593.

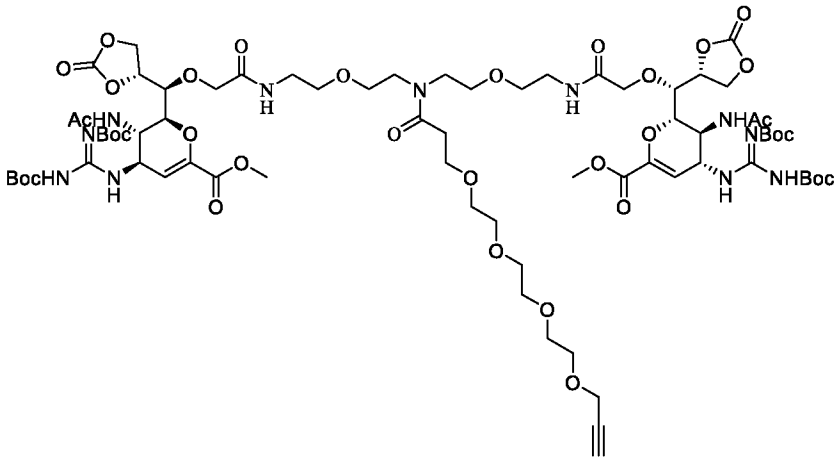
Стадия e.



Продукт с предыдущей стадии (1,2 г, 2,2 ммоль) перемешивали с 10 мл ТФУ при комнатной температуре в течение ночи, и за ходом снятия защиты следили с помощью ЖХМС. Полученный раствор упаривали и использовали на следующей стадии без очистки. Остаток повторно растворяли в 20 мл ТГФ,

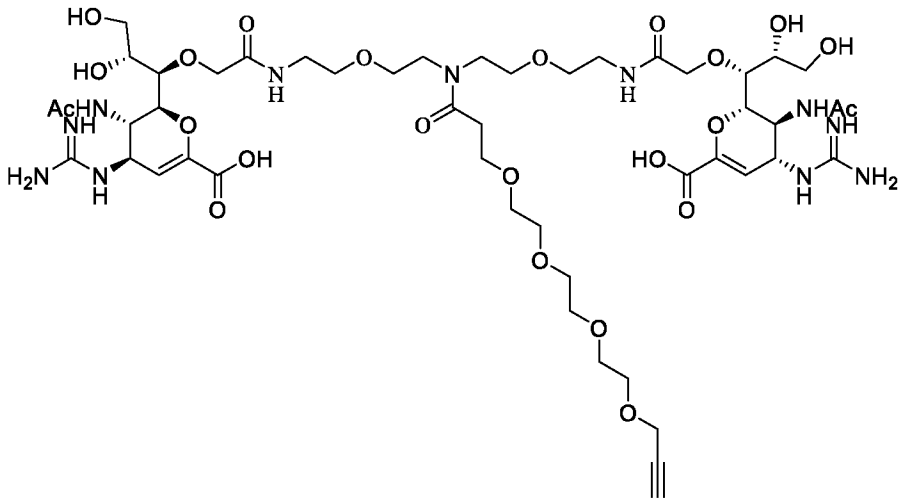
затем к раствору добавляли N,N'-бис-boc-1-гуанилпиразол (1 г, 3,3 ммоль), 4-диметиламинопиридин (120 мг, 1 ммоль) и триэтиламин (0,7 мл, 5 ммоль), и полученный раствор нагревали до 60°C в течение 2 часов. Полученный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 50% ацетонитрилом и водой без модификатора. Выход 700мг, 84%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =631.

Стадия f.



К раствору линкера-3 (полученного, как описано в примере 19) (73 мг, 0,14 ммоль) и продукта предыдущей стадии (200 мг, 0,32 ммоль, 2,2 экв.) в ДМФ (30 мл) добавляли EDC (100 мг, 0,5 ммоль), HOAt (65 мг, 3 ммоль) и DIEA (0,14 мл, 1 ммоль) при комнатной температуре. Раствор перемешивали в течение ночи. Полученный раствор упаривали и очищали с помощью жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 50% ацетонитрилом и водой без модификатора. Выход 120мг, 52%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=830.

Стадия g.



Гидроксид лития (24 мг, 1 ммоль) в 2 мл H2O добавляли к раствору продукта с предыдущей стадии (120 мг, 0,07 ммоль) в 2 мл ТГФ и 1 мл MeOH. Ход реакции контролировали с помощью ЖХМС. После завершения в раствор добавляли ионообменную смолу AMBERLITE® IRN-77 для доведения pH до 1, затем полученный раствор фильтровали, а фильтрат упаривали и использовали на следующей стадии без очистки.

Полученное соединение обрабатывали 2 мл ТФУ при комнатной температуре, раствор перемешивали в течение ночи при 40 °C, затем упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ, элюировали от 0% до 20% ацетонитрилом и водой, используя ТФУ в качестве модификатора. Выход: 60 мг, выход 74%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: [M/2]+1=589,8.

Пример 23. Анализ ингибирования нейраминидазы

Анализ ингибирования нейраминидазы с использованием субстрата 2'-(4-метилумбеллиферил)-альфа-D-N-ацетилнейраминовой кислоты (MUNANA) проводили, как описано ниже. Вкратце, 50 мкл очищенной нейраминидазы рекомбинантного вируса гриппа (0,1 нг/мкл, 50 мМ Трис, 5 мМ CaCl2, 200 мМ NaCl, pH 7,5) смешивали с 50 мкл ингибитора и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Для каждой повторности использовали не менее 5 концентраций каждого ингибитора в соответствующем диапазоне. После инкубации к раствору добавляли 50 мкл 400 мкМ MUNANA в 50 мМ Трис, 5 мМ CaCl2, 200 мМ NaCl (pH 7,5), чтобы начать реакцию, используя пипетку с 12 наконечниками (Eppendorf). Положительный и отрицательный контроль были включены в каждую 12-луночную дорожку. После запуска реакции для каждой дорожки на планшете реакционную смесь немедленно загружали в SpectraMax M5 (Molecular Devices), где флуоресценцию определяли количественно в течение 25 минут при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны излучения 445 нм. Были выбраны единичные моменты времени, когда положительный контроль давал сигнал флуоресценции около 1000. Все анализы проводили в трех повторностях, а значения IC50 для каждого ингибитора рассчитывали с помощью сигмоидального подбора логарифма[ингибитора] против процента ингибирования с использованием GraphPad Prism. На фиг. 15 показан график кинетических данных в виде RFU/мин в линейном диапазоне для конъюгата 1 и ПС 2, демонстрирующий большую эффективность конъюгата 1 в качестве ингибитора нейраминидазы. На фиг. 16 и фиг. 17 показаны результаты анализа конъюгатов 1-6 против нейраминидазы rH1N1 и нейраминидазы rH3N2, соответственно (таблица 2).

Таблица 2: Значения IC50 для конъюгатов против нейраминидазы H1N1 и H3N2

Номер конъюгата	**H1N1 IC50 (нМ)**	**H3N2 IC50 (нМ)**
Конъюгат 1	3,9	32,5
Конъюгат 2	3,7	17,6
Конъюгат 3	3,6	38
Конъюгат 4	1,9	17,2
Конъюгат 5	1,1	14,3
Конъюгат 6	4,1	29,8

Пример 24: Анализ цитотоксичности

Конъюгаты 1, 2, 3 и 6 были протестированы на цитотоксичность. Десять двукратных серийных разведений каждого конъюгата, начиная с 10 мкМ, готовили в трех повторностях для инокуляции клетками MDCK в 96-луночных планшетах для культивирования. Жизнеспособность клеток определяли через четыре дня после обработки с использованием набора CellTiter-GLO. 50% концентрации цитотоксичности (CC_{50}) рассчитывали с использованием модели доза-ответ XLfit (таблица 3). Для всех протестированных соединений цитотоксичность не наблюдалась вплоть до 10 мкМ, за исключением конъюгата 3. В случае конъюгата 3 EC_{50} в анализе цитопатического эффекта (CPE) (см. пример 23) является в 725 раз ниже, чем CC_{50} в этом анализе.

Таблица 3: Тест на цитотоксичность

Номер конъюгата	**CC50 (мкМ)**
Конъюгат 1	>10
Конъюгат 2	>10
Конъюгат 3	7,98
Конъюгат 6	>10
ФСБ	>10
Занамивир	>10

Пример 25. Анализ цитопатического эффекта

Анализ микронейтрализации на основе CPE №1

Для измерения способности конъюгатов нейраминидазы защищать клетки млекопитающих от инфекции и разрушения вирусом гриппа, были проведены анализы микронейтрализации на основе цитопатического эффекта (CPE). Вкратце, двадцатидвухкратные серийные разведения каждого конъюгата, начиная с 0,25 мкМ, готовили в двух повторностях для одночасовой инокуляции клетками MDCK, высеянными в 96-луночные планшеты. Вирус INFV CA/09 добавляли к клеткам при множественности заражения (MOI) 0,001 для инкубации в течение одного часа. На четвертый день после инкубации клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым и считывали оптическую плотность для расчета 50-процентной эффективной концентрации (EC50) каждого ТА с использованием модели доза-ответ XLfit. Занамивир использовали в качестве препарата сравнения и положительного контроля, Fc человека был включен в качестве отрицательного контроля. Все конъюгаты 1, 2, 3 и 6 продемонстрировали большую эффективность по сравнению с контролем занамивира, демонстрируя EC50 в 42–227 раз ниже, чем у занамивира (таблица 4).

Таблица 4: Анализ микронейтрализации на основе CPE №1

Номер конъюгата	**EC50 (нМ)**
1	2,0574
2	4,1487
3	11,007
6	5,2167
ФСБ	H/P
Fc человека	H/P
Занамивир†	468,7

H/P: не поддается расчету

† Начальная концентрация 10 000 нМ

Анализ микронейтрализации на основе CPE №2

Дополнительный анализ микронейтрализации на основе CPE был проведен для дальнейшей оценки активности in vitro конъюгата 6 и конъюгата 7. Вкратце, исследуемые препараты были приготовлены при начальной концентрации 160 нМ, и всего было сделано десять 2-кратных разведений. Затем разведения исследуемого препарата предварительно смешивали с вирусом гриппа A (INFV CA/09) при множественности заражения 0,001 относительно монослоя. Через один час смесь исследуемого препарата и вируса добавляли

к клеткам Мадин-Дарби почек собаки (MDCK), выросшим до 70-80% слияния в стандартных условиях в 96-луночном планшете. Контроль занамивира обрабатывали так же, за исключением того, что исходная концентрация составляла 9600 нМ, поскольку ожидалось, что он будет менее активным, чем тестируемые конъюгаты. После четырех дней инкубации монослой окрашивали кристаллическим фиолетовым и определяли оптическую плотность (отражающую состояние монослоя) для расчета 50% эффективной концентрации (EC50) с использованием модели доза-ответ XLfit (idbs; https://www.idbs.com).

Как показано в таблице 5, занамивир в концентрации 496 нМ снижал опосредованные вирусом цитопатические эффекты наполовину. Напротив, конъюгат 6 был в около 100 раз активнее со значением EC50 всего лишь 4,64 нМ. Конъюгат 7 дополнительно повысил активность примерно в 15 раз, снизив EC50 до уровня ниже нМ.

Таблица 5: Анализ микронейтрализации на основе CPE №2

Номер конъюгата	**EC50 (нМ)**
6	4,64
7	0,31
Занамивир	496

Пример 26. Анализ жизнеспособности клеток

Клетки A549 высевали в 96-луночные планшеты за день до обработки соединением. Клетки обрабатывали конъюгатом 3 (фиг. 18A), конъюгатом 4 (фиг. 18B) или конъюгатом 6 (фиг. 18C) в концентрациях 1 мкМ – 10 нМ в течение 24 часов. Затем измеряли жизнеспособность клеток с использованием Celltiter Glo (Promega). Результаты представляют собой среднее значение и стандартное отклонение трех биологических повторностей. Никакого влияния на жизнеспособность клеток не наблюдалось ни для одного из конъюгатов в любых концентрациях при любой из концентраций, использованных в анализе роста вируса (Пример 27).

Пример 27. Анализ роста вирусов

Для измерения способности конъюгатов нейраминидазы ингибировать рост представляющих интерес патогенных штаммов вируса гриппа в эпителиальных клетках человека были проведены анализы уменьшения количества вирусных бляшек. Вкратце, клетки A549 высевали в 24-луночные планшеты за день до обработки соединением. Клетки обрабатывали соединениями в концентрациях 1 мкМ – 10 нМ в течение 2 часов и заражали указанными вирусными штаммами при MOI 0,01 для инкубации в течение одного часа. Вирус удаляли, клетки промывали и повторно наносили соединения в концентрациях 1 мкМ – 10 нМ. Супернатанты собирали в указанные моменты времени и титровали с использованием метода анализа бляшек в клетках MDCK. Результаты представляют собой среднее значение и стандартное отклонение трех биологических повторностей. Осельтамивир использовали в качестве препарата сравнения и положительного контроля. Конъюгат 3 (фиг. 19A-19E), конъюгат 4 (фиг. 20A-E) или конъюгат 6 (фиг. 21A-21E и фиг. 22A-22E) продемонстрировали большую эффективность по сравнению с контролем осельтамивира, демонстрируя аналогичные или (как правило) большее уменьшение количества бляшек по сравнению с осельтамивиром при в 100 раз более низких концентрациях. Эффекты соединений (для оценки испытуемых веществ на потенциальную цитотоксичность) на клетки A549 оценивали для каждого исследуемого препарата с использованием анализа жизнеспособности клеток (Пример 26). Вкратце, клетки A549 высевали в 96-

луночные планшеты за день до обработки соединением. Клетки обрабатывали соединениями в концентрациях 1 мкМ – 10 нМ в течение 24 часов. Затем измеряли жизнеспособность клеток с использованием Celltiter Glo (Promega). Результаты представляют собой среднее значение и стандартное отклонение трех биологических повторностей.

Пример 28. Период полувыведения из мышиной сыворотки

В фармакокинетических (ФК) исследованиях использовали самок мышей линии CD-1 (Charles River Laboratories) массой от 20 до 22 граммов. Мышам в/в через хвостовую вену вводили 50 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 10 мл/кг). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из ретроорбитальной, щечной или хвостовой вены) в пробирки с ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь центрифугировали (2000 x g в течение 10 минут) и отбирали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени.

Плазменные концентрации конъюгата 6 или Fc hIgG1 в каждый момент времени измеряли с помощью сэндвич-анализа ELISA следующим образом: молекулы конъюгата 6 захватывали на планшеты, покрытые нейраминидазой, или планшеты, покрытые антитела против hIgG1, а затем определяли с помощью конъюгированного с HRP антитела против IgG-Fc человека. hIgG1 был захвачен с использованием антитела против Fc hIgG1. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 6 (или Fc hIgG1). Более подробное описание способа приведено ниже.

Планшеты Qiagen Ni-NTA HisSorb (номер по каталогу 35061, Qiagen) покрывали либо нейраминидазой из A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Bio), либо антителом против Fc IgG1 в 1X KPL покрывающем буфере (5150-0041, SeraCare). В случаях, когда антитело против Fc IgG1 использовали для захвата исследуемого препарата, отбирали захватывающие и детектирующие антитела против Fc IgG1, которые связываются с различными эпитопами. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Серийные разведения образцов плазмы высевали на планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов (разбавитель образца: 0,5% обезжиренного сухого молока + 3% козьей сыворотки в ФСБ с 0,05% Tween20; конечная концентрация в плазме необработанных мышей 1:900). Стандартные кривые конъюгата 6 или Fc hIgG1 в диапазоне 500–0,230 нг/мл в двух повторностях анализировали на каждом планшете.

После 2-часовой инкубации планшеты промывали 5 раз с использованием 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween20. Конъюгат 6, связанный с нейраминидазой на планшетах (или антитело против Fc hIgG1), затем зондировали конъюгированным с HRP антителом против Fc F(ab')2 IgG человека (Jackson 709-036-098), разбавленным 1:2000 в разбавителе в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 8 раз с использованием 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween20 и проявляли субстратом TMB в течение 7 минут. Реакцию останавливали при помощи 1 н. H2SO4. Поглощение считывали при 450 нм. Аналогичный протокол использовали для Fc hIgG1, где для захвата использовали только антитело против Fc hIgG1. Количества конъюгата 6, измеренные в разные моменты времени с использованием либо нейраминидазы, либо захватывающего антитела против Fc hIgG1, были сходными в пределах экспериментальной ошибки, что позволяет предположить, что интактный конъюгат является стабильным *in vivo*.

Общее количество конъюгата 6 (или Fc hIgG1) в тестируемых образцах было интерполировано с использованием программы GraphPad Prism версии 6 после нелинейного регрессионного анализа

(сигмоидальный, 4PL-анализ) стандартных кривых конъюгата 6 (или Fc hIgG1). ФК параметры рассчитывали с помощью программного обеспечения WinNonlin. Кривые сравнения конъюгата 6 и Fc hIgG1 показаны на фиг. 23, а резюме по ключевым ФК параметрам представлено в таблице 6. Неожиданно оказалось, что экспозиция в плазме и конечный период полувыведения были значительно лучшими для конъюгата 6, чем для Fc hIgG1 дикого типа. AUC за 8 дней в 3 раза выше для конъюгата 6, чем для Fc hIgG1, а конечный период полувыведения для конъюгата 6 составляет 214 часов по сравнению с 52 часами для Fc IgG1 человека.

Таблица 6: Таблица ФК конъюгата 6 у мышей по сравнению с Fc hIgG1

	Период полувыведения (часы)	**AUClast (ч*мг/мл)**
Конъюгат 6	214	33100
hIgG1	51,8	10600

Пример 29. Эффективность конъюгата 6 на мышиной модели летального гриппа: исследование №1

Конъюгат 6 оценивали против летальной инфекции гриппа INFV A H1N1 у самок мышей линии BALB/c. В эксперименте было задействовано 7 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали 1xLD90 H1N1 A/Texas/36/91. Группы 1-6 получали лечение в/в за 4 часа до заражения (таблица 7). IgG1 человека (только Fc) был включен в качестве дополнительного отрицательного контроля. Группа 7 получала осельтамивира фосфат перорально через 8 часов после заражения дважды в день в течение 5 дней. За всеми мышами проводили мониторинг на предмет потери веса (фиг. 24, таблица 8) и выживаемость (фиг. 25, таблица 9) в течение 15 дней после заражения.

Мыши, получавшие конъюгат 6, показали 100% выживаемость при однократных дозах во всех испытанных концентрациях по сравнению с выживаемостью 20% и 0% в контрольной группе с применением носителя и контрольной группе hIgG1, соответственно. Результаты были статистически значимыми по сравнению с группой применения носителя ($p = 0,0135$), несмотря на небольшой размер группы ($n = 5$). По сравнению с группой применения осельтамивира фосфата конъюгат 6 продемонстрировал аналогичную эффективность при в 500 раз более низкой кумулятивной дозе (в мг/кг). Мыши, получавшие все дозы конъюгата 6, сохраняли свою массу на протяжении всего эксперимента, что превосходило показатели контрольной группы осельтамивира.

Таблица 7: Дизайн исследования

Группа n=5	**Заражение День 0**	**Соединение**	**Доза (мг/кг)**	**Лечение Путь/Схема**
1	Вирус гриппа А, штамм H1N1 A/Texas/36/91 с применением интраназального пути введения.	Носитель (ФСБ)	Н/П	в/в, один раз в день за 4 часа до заражения
2		Только Fc	50	
3		Конъюгат 6	50	
4		Конъюгат 6	10	
5		Конъюгат 6	2	
6		Конъюгат 6	0,4	

7		Осельтамивир (Тамифлю™)	20	п/о, два раза в день через 8 часов после заражения в течение 5 дней

Таблица 8: Среднесуточная масса

Дней после инфицирования	**Среднесуточная масса (количество мышей добавляется только для групп 1 и 2)**						
	Носитель (ФСБ)	**Только Fc**	**Конъюгат 6**				**Осельтамивира фосфат**
		50 мг/кг	**50 мг/кг**	**10 мг/кг**	**2 мг/кг**	**0,4 мг/кг**	**20 мг/кг**
0	17,9 (5)	17,9 (5)	18,7	19,3	18,5	18,8	18,8
1	18,0 (5)	18,0 (5)	18,8	19,36	18,6	18,8	18,9
2	18,5 (5)	18,8 (5)	19,2	19,6	19,4	18,8	19,2
3	17,7 (5)	17,7 (5)	18,9	19,5	19,1	18,9	19,1
4	17,2 (5)	17,0 (5)	19,5	19,9	19,3	18,9	18,9
5	16,3 (5)	15,8 (5)	19,2	19,8	19,5	18,7	18,8
6	15,6 (4)	15,0 (5)	19,1	19,9	19,5	18,7	18,4
7	15,5 (2)	14,0 (2)	18,8	19,6	19,2	18,9	17,3
8	17,2 (1)		19,1	20,0	19,7	19,2	17,1
9	20,1 (1)		18,7	19,3	19,1	18,8	17,8
10	20,0 (1)		19,1	20,1	19,5	19,3	18,9
11	20,4 (1)		19,0	19,8	19,2	19,2	18,7
12	20,6 (1)		19,6	20,3	19,8	19,3	19,2
13	20,3 (1)		19,2	20,4	19,7	19,7	19,3
14	20,7 (1)		19,5	20,6	19,9	19,8	19,6

Таблица 9: Выживаемость мышей

Соединение	**Дозировка**	**Средняя выживаемость**	**% выживаемости**	**Значимость для носителя (p)**
Носитель (ФСБ)	Н/П	7	20	Н/П
Только Fc	50 мг/кг	7	0	0,8335
Конъюгат 6	50 мг/кг	15	100	0,0135
Конъюгат 6	10 мг/кг	15	100	0,0135
Конъюгат 6	2 мг/кг	15	100	0,0135

Конъюгат 6	0,4 мг/кг	15	100	0,0135
Осельтамивира фосфат	20 мг/кг два раза в день	15	100	0,0135

Пример 30. Эффективность конъюгата 6 на мышиной модели летального гриппа: исследование №2

Конъюгат 6 оценивали против летальной инфекции гриппа INFV A H3N2 у самок мышей линии BALB/c. В эксперименте было задействовано 11 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали 1xLD90 H3N2 A/Hong Kong/1/68. Группы 1-10 получали лечение в/в за 4 часа до заражения (таблица 10). IgG1 человека (только Fc) был включен в качестве дополнительного отрицательного контроля. Группа 11 получала осельтамивира фосфат перорально через 8 часов после заражения дважды в день в течение 5 дней. За всеми мышами проводили мониторинг на предмет потери веса (фиг. 26) и выживаемость (фиг. 27, таблица 11) в течение 15 дней после заражения.

Мыши, обработанные конъюгатом 6, показали 100% выживаемость при однократных дозах до 0,4 мг/кг и 80% выживаемость при однократной дозе 0,2 мг/кг по сравнению с 0% выживаемости в контрольной группе с применением носителя и контрольной группе hIgG1, соответственно. 80% мышей выжили в контрольной группе с применением осельтамивира. Результаты были статистически значимыми по сравнению с группой применения носителя ($p = 0,0128$), несмотря на небольшой размер группы ($n = 5$). По сравнению с группой применения осельтамивира фосфата конъюгат 6 продемонстрировал аналогичную эффективность при в 1000 раз более низкой кумулятивной дозе (в мг/кг). Мыши, получавшие все дозы конъюгата 6, поддерживали снижение массы до дозы 0,4 мг/кг в пределах 5%, что превосходило показатели контрольной группы осельтамивира.

Таблица 10: Дизайн исследования

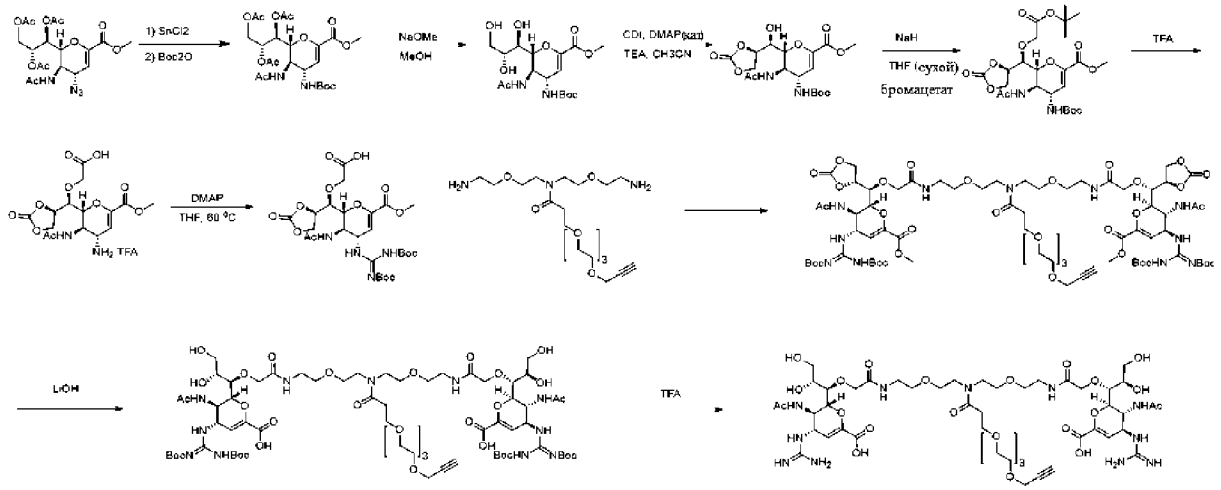
Группа n=5	**Заражение День 0**	**Исследуемый препарат**	**Доза (мг/кг)**	**Лечение Путь/Схема**	**Считывание данных/Конечная точка**
1	H3N2 A/Hong Kong/1/68 с применением предполагаемого пути введения	Носитель (ФСБ)	Н/П	в/в, один раз в день за 4 часа до заражения	Ежедневный мониторинг массы и состояния здоровья в течение 15 дней после заражения % выживаемости
2		Только Fc	50		
3		Конъюгат 6	50		
4			2		
5			0,4		
6			0,2		
7			0,1		
8			0,05		
9			0,025		
10			0,0125		
11		Осельтамивир (Тамифлю™)	20	п/о, два раза в день 8 часов после заражения в течение	

				5 дней	

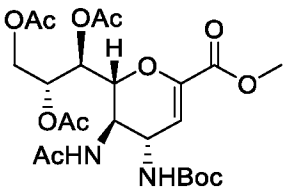
Таблица 11: Выживаемость мышей

Соединение	**Дозировка**	**Средняя выживаемость (дней)**	**% выживаемости**	**Значимость для носителя (p-значения)**
Носитель (ФСБ)	Н/П	9	0	Н/П
Контроль Fc	50 мг/кг	8	0	0,2498
Конъюгат 6	50 мг/кг	15	100	0,002
	2 мг/кг	15	100	0,002
	0,4 мг/кг	15	100	0,002
	0,2 мг/кг	15	80	0,0128
	0,1 мг/кг	9	20	0,8264
	0,05 мг/кг	9	20	0,5769
	0,025 мг/кг	8	20	>0,9999
	0,0125 мг/кг	11	0	0,4703
Осельтамивира фосфат (два раза в день в течение 5 дней)	20 мг/кг	15	80	0,0052

Пример 31. Синтез ПС 10



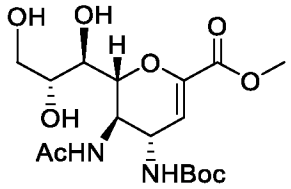
Стадия a.



Метил 5-ацетамидо-7,8,9-О-триацетил-2,6-ангидро-4-азидо-3,4,5-тридезокси-D-глицеро-D-галакто-нон-2-енонат (SM-1, 10 г, 22 ммоль) растворяли в 100 мл метанола, а затем нагревали до 60 °C на масляной

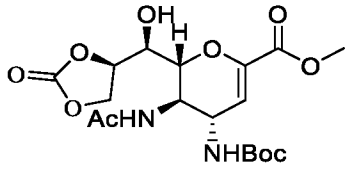
бане, добавляли $SnCl_2$ (5,7 г, 20 ммоль) к раствору 3 порциями (осторожно, выделяется газ). Реакционную смесь перемешивали в течение 10 минут, после чего по данным ВЭЖХ реакция была завершена. Реакционный раствор медленно добавляли к раствору 50 мл насыщенного $NaHCO_3$ и 50 г целита при интенсивном перемешивании. Полученную суспензию фильтровали. Фильтрат обрабатывали Boc_2O (6,6 г, 30 ммоль, 1,5 экв.). Через 2 часа при комнатной температуре раствор упаривали для удаления большей части метанола, растворяли в 200 мл ДХМ и дважды экстрагировали 100 мл ДХМ. Объединенные экстракты сушили сульфатом натрия, фильтровали и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Выход неочищенного продукта 12 г, 100%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =531.

Стадия b.



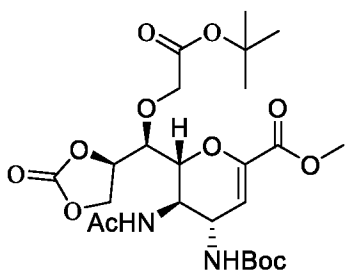
Материал с предыдущей стадии растворяли в 60 мл сухого метанола, затем обрабатывали 10 мл метоксида натрия в метаноле (0,5 М) при охлаждении на бане с ледяной водой. За ходом реакции следили с помощью ЖХМС, которая завершалась через 2 часа. Реакцию гасили 1 н. HCl до pH 5-6. Полученный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 30% ацетонитрилом и водой, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продуктов 7,2г, 80%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =405.

Стадия c.



Раствор промежуточного соединения предыдущей стадии (3,5 г, 8,5 ммоль), CDI (2,8 г, 2 эквив.), триметиламин (4,2 мл, 30 ммоль) и DMAP (240 мг, 2 ммоль) нагревали 60 °C в ДМФ (50 мл) в течение ночи, затем упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 30% ацетонитрилом и водой без модификатора. Выход желаемого продукта 2,3 г, 60%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =431.

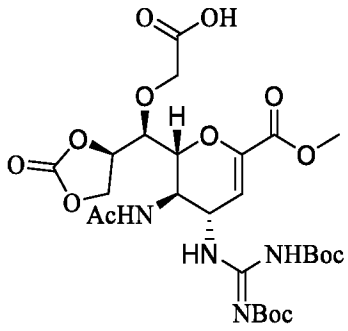
Стадия d.



Гидрид натрия (400 мг, 60% в масле, 10 ммоль) добавляли к ПС 4 (1,45 г, 3,3 ммоль) в 50 мл сухого

ТГФ (чувствительная к влаге реакция) на бане с ледяной водой. Полученный раствор перемешивали в течение 0,5 часа, затем к вышеуказанному раствору добавляли трет-бутилбромацетат (2 г, 10 ммоль). Полученный раствор нагревали до 60 °С в течение ночи и гасили уксусной кислотой, упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 50% ацетонитрилом и водой с ТФУ в качестве модификатора. Выход 1г, 57%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =593. (Реакция довольно чистая по данным ВЭЖХ, но низкий фактический выход)

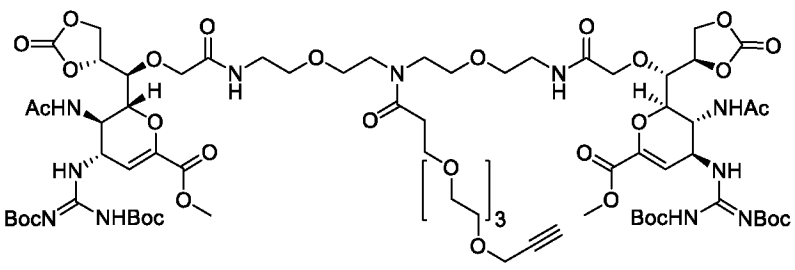
Стадия f.



Промежуточное соединение с предыдущей стадии (1,2 г, 2,2 ммоль) перемешивали с 10 мл ТФУ при комнатной температуре в течение ночи. За ходом снятия защиты наблюдали с помощью ЖХМС. Полученный раствор упаривали и использовали на следующей стадии без очистки.

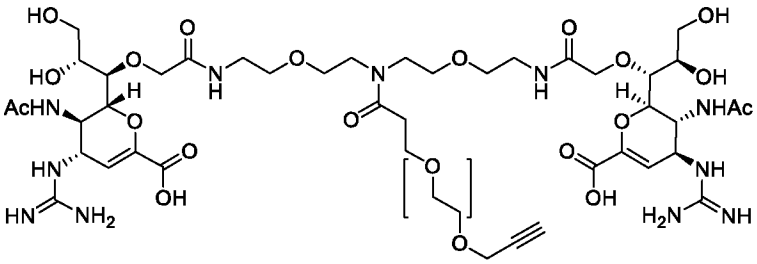
Остаток от предыдущей реакции растворяли в 20 мл ТГФ, затем к раствору добавляли N,N'-бис-boc-1-гуанилпиразол (1 г, 3,3 ммоль), 4-диметиламинопиридин (120 мг, 1 ммоль) и триэтиламин (0,7 мл, 5 ммоль), и полученный раствор нагревали до 60 °С в течение 2 часов. Полученный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 50% ацетонитрилом и водой без модификатора. Выход 700мг, 84%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =631.

Стадия g.



К раствору линкера-3 (полученного, как описано в примере 19) (73 мг, 0,14 ммоль) и промежуточного соединения из предыдущей стадии (200 мг, 0,32 ммоль, 2,2 экв.) в ДМФ (30 мл) добавляли EDC (100 мг, 0,5 ммоль), HOAt (65 мг, 3 ммоль) и DIEA (0,14 мл, 1 ммоль) при комнатной температуре. Раствор перемешивали в течение ночи. Полученный раствор упаривали и очищали с помощью жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 50% ацетонитрилом и водой без модификатора. Выход 120мг, 52%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=830.

Стадия h.



Гидроксид лития (24 мг, 1 ммоль) в 2 мл воды добавляли к раствору промежуточного соединения с предыдущей стадии (120 мг, 0,07 ммоль) в 2 мл ТГФ и 1 мл МеОН. После завершения реакции по данным ЖХ-МС раствор гасили ионообменной смолой AMBERLITE® IRN-77 для доведения pH до 1, затем раствор фильтровали и фильтрат концентрировали и на следующей стадии без дополнительной очистки.

Промежуточное соединение из предыдущей стадии обрабатывали 2 мл ТФУ при комнатной температуре в течение ночи при 40 °C. Неочищенную реакционную смесь упаривали и очищали с помощью ВЭЖХ с использованием от 0% до 20% ацетонитрила и воды, используя ТФУ в качестве модификатора. Выход: 60 мг, выход 74%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: [M/2]+1=589,8.

Пример 32. Синтез конъюгата 7

Раствор Fc-ПЭГ4-азида (каждый мономер Fc-домена, имеющий последовательность SEQ ID NO: 38) в буферном растворе ФСБ x1 (100 мг, 1,28 мкмоль, 6,1 мл, ММ = 57260 Да, DAR = 3,6) добавляли к ПС 10 (получено, как описано в примере 31) (соль ТФУ, 44 мг, 0,031 ммоль) и свежеприготовленные растворы ФСБ с pH 7,4 $CuSO_4$ (0,7 мл, 50,0 мМ, 20 экв.), трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)-амина (THPTA,0,7 мл 50,0 мМ, 20 экв.) и аскорбата натрия (1,05 мл 50,0 мМ, 30 экв.). Полученный гомогенный раствор перемешивали на встряхивателе-качалке в течение 12 часов. Неочищенные растворы разбавляли ФСБ с pH 7,4 до конечной концентрации 1 мг/мл и дважды подвергали ультрафильтрации (10000 MWCO) до объема 1 мл. Затем неочищенные смеси разбавляли 1:10 в ФСБ pH 7,4 и очищали с использованием смолы MabSelect Sure (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс, США) с последующим проведением эксклюзионной хроматографии. Очищенный материал количественно определяли с использованием УФ-спектрофотометра NANODROP™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции, основанного на аминокислотной последовательности Fc, используемого при конъюгации, и упаривали до около 10 мг/мл с использованием центробежного концентратора (10 000 MWCO). Очищенные молекулы анализировали с использованием 4-12% бис-трис гелей для ДСН-ПААГ-электрофореза путем загрузки 1-2 мкг каждой молекулы в гель и окрашивания с использованием мгновенного окрашивания синим. Каждый гель включал маркер молекулярной массы с указанными стандартами молекулярной массы. Выходы, как правило, составляют 40-60%. Анализ МАЛДИ-МС показал диапазон масс (60 000-90 000) со средней массой 63 633. Среднее DAR = 4,5.

Пример 33. Эффективность конъюгата 6 на мышиной модели летального гриппа: исследование №3

Конъюгат 6 оценивали против летальной инфекции гриппа INFV A H1N1 у самок мышей линии BALB/c. В эксперименте было задействовано 7 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали 1xLD90 H1N1 A/Texas/36/91. Группы 1-6 получали лечение в/в за 28 дней до заражения (таблица 12). Носитель (ФСБ) был включен в качестве дополнительного отрицательного контроля. Группа 7 получала осельтамивира фосфат перорально через 8 часов после заражения дважды в день в течение 5 дней. За всеми мышами

проводили мониторинг на предмет выживаемости (фиг. 31A-31F) в течение 15 дней после заражения.

Мыши, получавшие конъюгат 6, показали 100% выживаемость при однократных дозах во всех концентрациях вплоть до 2,5 мг/кг и 80% выживаемость при дозе 1,25 мг/кг по сравнению с 0% выживаемостью в контрольной группе с применением носителя. Все мыши в контрольной группе с применением осельтамивира фосфата выжили. По сравнению с группой осельтамивира фосфата, конъюгат 6 продемонстрировал аналогичную с осельтамивиром эффективность в 20 раз более низкой кумулятивной дозе (в мг/кг), несмотря на то, что во всех группах с применением конъюгата 6 вводили однократную дозу, за 28 дней до заражения.

Таблица 12: Дизайн исследования

Группа n=5	**Заражение День 0**	**Соединение**	**Доза (мг/кг)**	**Лечение Путь/Схема**
1	Вирус гриппа A, штамм H1N1 A/Texas/36/91 с применением интраназального пути введения.	Носитель (ФСБ)	Н/П	в/в, один раз в день за 28 дней до заражения
2		Конъюгат 6	50	
3		Конъюгат 6	10	
4		Конъюгат 6	5	
5		Конъюгат 6	2,5	
6		Конъюгат 6	1,25	
7		Осельтамивир (Тамифлю™)	20	п/о, два раза в день через 8 часов после заражения в течение 5 дней

Пример 34. Эффективность конъюгата 6 на мышиной модели летального гриппа: исследование №4

Конъюгат 6 оценивали против летальной инфекции гриппа INFV A H1N1 у самок мышей линии BALB/c. В эксперименте было задействовано 13 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали 1xLD90 H1N1 A/Texas/36/91. Все группы конъюгата 6 (8-13) получали однократные внутривенные дозы 10 мг/кг в разное время до и после заражения, как показано в таблице 13. Носитель (ФСБ) и только Fc были включены в качестве отрицательного контроля. Группы 3-7 получали осельтамивира фосфат (20 мг/кг) перорально, начиная с разных временных точек после заражения два раза в день в течение 5 дней, как показано в таблице 13. За всеми мышами проводили мониторинг на предмет выживаемости (фиг. 32A-32F) в течение 15 дней после заражения.

Мыши, получавшие конъюгат 6, показали 100% выживаемость при однократной дозе 10 мг/кг при обработке в период за 24 часа после инфицирования и 60 и 80% выживаемость через 48 и 72 часов после заражения, соответственно. В группе, получавшей осельтамивира фосфат, выживаемость резко упала до 0% и 20%, соответственно, в группах, в которых лечение было начато через 48 и 72 часа после заражения. Эти результаты позволяют предположить, что конъюгат 6 потенциально обладает лучшими терапевтическими возможностями по сравнению с осельтамивиром при лечении инфекций гриппа A.

Таблица 13: Дизайн исследования

Группа (N=5)	**Штамм гриппа А**	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Время между введением доз (часы)**
1	A/Texas/36/91 (H1N1) интраназально	Носитель (ФСБ)	в/в, однократная доза	---	T-4
2		Только Fc	в/в, однократная доза	10	T-4
3		Осельтамивир	перорально, два раза в день в течение 5 дней	20	T+8
4		Осельтамивир	перорально, два раза в день в течение 5 дней	20	T+24
5		Осельтамивир	перорально, два раза в день в течение 5 дней	20	T+48
6		Осельтамивир	перорально, два раза в день в течение 5 дней	20	T+72
7		Осельтамивир	перорально, два раза в день в течение 5 дней	20	T+96
8		Конъюгат 6	в/в, однократная доза	10	T-4
9		Конъюгат 6	в/в, однократная доза	10	T+8
10		Конъюгат 6	в/в, однократная доза	10	T+24
11		Конъюгат 6	в/в, однократная доза	10	T+48
12		Конъюгат 6	в/в, однократная доза	10	T+72
13		Конъюгат 6	в/в, однократная доза	10	T+96

Пример 35. Исследование токсичности конъюгата 6

Безопасность конъюгата 6 оценивали в 14-дневном исследовании токсичности с определением диапазона доз на крысах. Крысам вводили 5, 20 или 50 мг/кг конъюгата 6 внутривенно в дни 0 и 7 исследования. По сравнению с контролями носителями при любой исследуемой дозе не наблюдалось

значительного воздействия на прибавку массы тела (фиг. 33), массу органов, потребление пищи. Экспозиции в плазме (измеряемые по AUC) увеличивались пропорционально дозе. Эти результаты доклинических исследований безопасности соответствуют высокому терапевтическому индексу. Сводные данные наблюдений представленыв таблице 14.

Таблица 14. Сводные данные 14-дневного исследования токсичности с определением диапазона доз на крысах

Параметр	**Результаты при максимальной дозе (50 мг/кг), по сравнению с носителем**
Клинические наблюдения	Результаты отсутствуют
Гематология	Без изменений по сравнению с носителем
Клинический биохимический анализ	Без изменений по сравнению с носителем
Коагуляция	Без изменений по сравнению с носителем
Анализ мочи	Без изменений по сравнению с носителем
Гистопатология	Ничего не наблюдается

Пример 36. Эффективность конъюгата 6 на мышиной модели летального гриппа при введении тремя различными путями: исследование №5

Конъюгат 6 оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Texas/36/91) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 15 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 1x LD90 путем интраназальной инокуляции в объеме 50 мкл после легкой анестезии изофлураном. Группы 1-14 получали лечение однократной дозой за 4 часа до заражения (таблица 15). Для определения активности конъюгата 6 соответствующие концентрации конъюгата (10, 2, 0,4 и 0,1 мг/кг) вводили различными путями, в/в, в/м или п/к. В дополнение к группе только носителя (ФСБ) IgG1 человека (только Fc) был включен в качестве дополнительного отрицательного контроля (группа 2). Группа 15 получала осельтамивира фосфат перорально через 8 часов после заражения дважды в день в течение 5 дней. Проводили мониторинг всех мышей на предмет выживаемости (Таблица 15) в течение 14 дней.

Мыши, получавшие конъюгат 6, показали 100% выживаемость на день 14 по сравнению с заражением гриппом (H1N1) при однократных дозах 10, 2 или 0,4 мг/кг, независимо от пути введения. Только при самой низкой концентрации исследуемого препарата наблюдались различия у отдельных мышей между в/в, в/м и п/к введением доз (таблица 16; 60, 80 и 100% выживаемость, соответственно). Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что защитные концентрации конъюгата 6 в легких являются достижимыми с помощью нескольких путей введения.

Таблица 15: Дизайн исследования

Группа n=5	**Заражение День 0**	**Соединение**	**Доза (мг/кг)**	**Путь введения**	**Лечение Путь/Схема**
1	Вирус гриппа A (H1N1)	Носитель (ФСБ)	Н/П		Однократная доза, за 4 часа до заражения вирусом
2		Только Fc	50	в/в	

3	A/Texas/36/91 интраназально	Конъюгат 6	10	в/в	
4		Конъюгат 6	2		
5		Конъюгат 6	0,4		
6		Конъюгат 6	0,1		
7		Конъюгат 6	10	ВМ	
8		Конъюгат 6	2		
9		Конъюгат 6	0,4		
10		Конъюгат 6	0,1		
11		Конъюгат 6	10	п/к	
12		Конъюгат 6	2		
13		Конъюгат 6	0,4		
14		Конъюгат 6	0,1		
15		Осельтамивир (Тамифлю™)	20	Перорально	два раза в день через 8 часов после заражения в течение 5 дней

Таблица 16: Выживаемость мышей

Исследуемый препарат	**мг/кг**	**Путь введения**	**% выживаемости (день 14)**
Носитель (ФСБ)	нд	в/в	0
hIgG1 (только Fc)	10	в/в	0
Конъюгат 6	10	в/в	100
	2		100
	0,4		100
	0,1		60
Конъюгат 6	10	ВМ	100
	2		100
	0,4		100
	0,1		80

Конъюгат 6	10	п/к	100
	2		100
	0,4		100
	0,1		100
осельтамивир	20	Перорально	100

Пример 37. Эффективность конъюгата 6 по сравнению с изолятом, устойчивым к осельтамивиру, на модели летального гриппа мышей: исследование №6

Конъюгат 6 оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провакационного заражения (A/Perth/261/2009) представляет собой адаптированный для мышей изолят, несущий мутацию H275Y, приводящую к устойчивости к ингибитору нейраминидазы осельтамивиру.

В эксперименте было задействовано 10 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали A/Perth/261/2009 (H1N1) 1x LD90 путем интраназальной инокуляции в объеме 50 мкл после легкой анестезии изофлураном. Группы 1-9 получали лечение однократной дозой в/в за 4 часа до заражения (таблица 17). В дополнение к группе только носителя (ФСБ) IgG1 человека (только Fc) был включен в качестве дополнительного отрицательного контроля. Группа 10 получала осельтамивира фосфат перорально через 8 часов после заражения дважды в день в течение 5 дней. За всеми мышами проводили мониторинг на предмет выживаемости (фиг. 34A-34D, таблица 18) и потери массы тела (фиг. 35, таблица 19) в течение 15 дней после заражения.

Мыши, получавшие конъюгат 6, показали 100% выживаемость по сравнению с заражением гриппом (A/Perth/261/2009) при однократных дозах 50, 10 и 2 мг/кг. Кроме того, несмотря на небольшой размер группы (n=5), эти результаты были статистически значимыми по сравнению с контролем носителем (таблица 18).

При концентрациях конъюгата 6 0,4, 0,2 или 0,1 мг/кг выживаемость составила 60%, в то время как ни одна мышь не выжила до конца исследования, если им вводили только носитель (ФСБ) или hIgG1 (только Fc). В группе осельтамивира выжило только одно животное (эффективность 20%), несмотря на лечение дозой, которая, как было показано, ранее защищала от чувствительных к осельтамивиру изолятов (20 мг/кг, 2 раза в день x 5 дней). Эти результаты подтверждают, что вирус провокационного заражения является устойчивым к осельтамивиру и чувствительным к конъюгату 6.

Активность конъюгата 6 против мутантов, содержащих мутацию H275Y, дополнительно подтверждается данными по массе тела (фиг. 35, таблица 19). Группы, получавшие однократную дозу конъюгата 6 в концентрациях 2 мг/кг или более, продемонстрировали 5% или временную потерю массы.

Таблица 17: Дизайн исследования

Группа n=5	**Заражение День 0**	**Соединение**	**Доза (мг/кг)**	**Лечение Путь/Схема**
1	Вирус гриппа (H1N1) A/Perth/261/2009 с применением интраназального пути	Носитель (ФСБ)	Н/П	в/в, один раз в день за 4 часа до заражения
2		Только Fc	50	

Группа n=5	**Заражение День 0**	**Соединение**	**Доза (мг/кг)**	**Лечение Путь/Схема**
3	введения.	Конъюгат 6	50	
4		Конъюгат 6	10	
5		Конъюгат 6	2	
6		Конъюгат 6	0,4	
7		Конъюгат 6	0,2	
8		Конъюгат 6	0,1	
9		Конъюгат 6	0,05	
10		Осельтамивир (Тамифлю™)	20	п/о, два раза в день через 8 часов после заражения в течение 5 дней

Таблица 18: Выживаемость мышей

Соединение	**Дозировка**	**Медиана выживаемости**	**% выживаемости**	**Значимость для носителя (p)**
Носитель (ФСБ)	Н/П	7	0	Н/П
Только Fc	50 мг/кг	6	0	нзнач.
Конъюгат 6	50 мг/кг	Неопред.	100	**0,0027**
Конъюгат 6	10 мг/кг	Неопред.	100	**0,0027**
Конъюгат 6	2 мг/кг	Неопред.	100	**0,0027**
Конъюгат 6	0,4 мг/кг	Неопред.	60	0,1167
Конъюгат 6	0,2 мг/кг	Неопред.	60	**0,0185**
Конъюгат 6	0,1 мг/кг	Неопред.	60	0,1047

Соединение	Дозировка	Медиана выживаемости	% выживаемости	Значимость для носителя (p)
Конъюгат 6	0,05 мг/кг	7	0	0,9241
Осельтамивира фосфат	20 мг/кг два раза в день	7	20	0,3470

Таблица 19: Среднесуточная масса

Дней после инфицирования	Среднесуточный масса (количество мышей, указано в скобках, если меньше 5)									
	Носитель (ФСБ)	Только Fc	Конъюгат 6							Осельтамивира фосфат
		50 мг/кг	50 мг/кг	10 мг/кг	2 мг/кг	0,4 мг/кг	0,2 мг/кг	0,1 мг/кг	0,05 мг/кг	20 мг/кг
0	100 (5)	100 (5)	100	100	100	100	100	100	100	100
1	103 (5)	104 (5)	101	101	102	102	103	105	102	105
2	102 (5)	105 (5)	103	101	103	100	102	102	101	102
3	93 (5)	97 (5)	101	101	98	92	98	95	94	95
4	88 (5)	90 (5)	95	98	99	91	98	92	90	93
5	85 (5)	85 (5)	94	98	98	91	98	92	89	92
6	83 (4)	88 (3)	100	100	99	88	95	85	84 (4)	86
7	79 (3)	90 (2)	103	99	95	90 (3)	94	83 (4)	77 (1)	86 (3)
8	75 (2)	81 (1)	102	99	97	93 (3)	94 (4)	87 (3)	78 (1)	85 (2)
9			106	104	104	101 (3)	101 (4)	95 (3)		86 (2)
10			105	102	103	100 (3)	99 (4)	97 (3)		95 (1)
11			106	102	104	102 (3)	104 (4)	102 (3)		97 (1)
12			108	104	105	102 (3)	105 (3)	107 (3)		104 (1)
13			107	103	105	102 (3)	105 (3)	107 (3)		104 (1)
14			107	103	105	102 (3)	106 (3)	108 (3)		104 (1)
15			100	100	100	100 (3)	100 (3)	100 (3)		100 (1)

Пример 38. 7-дневное исследование ФК на крысах после в/в введения исследуемого препарата.

Фармакокинетические (ФК) исследования на крысах были выполнены лабораторией Seventh Wave Laboratories (Мэриленд-Хайтс, штат Миссури) с использованием самцов крыс линии Спрег-Доули в возрасте 46-49 дней. Крысам в/в через хвостовую вену вводили 75 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 5 мл/кг). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из ретроорбитальной, щечной или хвостовой вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь

центрифугировали (2000 x *g* в течение 10 минут) и отбирали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени.

Плазменные концентрации конъюгата 6 или Fc hIgG1 в каждый момент времени измеряли с помощью сэндвич-анализа ELISA следующим образом: молекулы конъюгата 6 захватывали на планшеты, покрытые нейраминидазой, или планшеты, покрытые антитела против hIgG1, а затем определяли с помощью конъюгированного с HRP антитела против IgG-Fc человека. hIgG1 был захвачен с использованием антитела против Fc hIgG1. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 6 (или Fc hIgG1). Более подробное описание способа приведено ниже.

96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (номер по каталогу 12-565-136, ThermoFisher) покрывали либо нейраминидазой из A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological), либо антителом против Fc IgG1 в 1X KPL покрывающем буфере (5150-0041, SeraCare). В случаях, когда антитело против Fc IgG1 использовали для захвата исследуемого препарата, отбирали захватывающие и детектирующие антитела против Fc IgG1, которые связываются с различными эпитопами. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Серийные разведения образцов плазмы высевали на планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов (разбавитель образца: 1% БСА в ФСБ 0,05% Tween 20 + конечная концентрация в плазме необработанных крыс 1:900). Стандартные кривые конъюгата 6 или Fc hIgG1 в диапазоне 500–0,230 нг/мл в двух повторностях анализировали на каждом планшете.

После 2-часовой инкубации планшеты промывали 5 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20. Конъюгат 6, связанный с нейраминидазой на планшетах (или антитело против Fc hIgG1), затем зондировали конъюгированным с HRP антителом против Fc F(ab')2 IgG человека (709-036-098, Jackson), разбавленным 1:1000 в разбавителе в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20 и проявляли субстратом TMB в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали при помощи 1 н. H_2SO_4. Поглощение считывали при 450 нм. Аналогичный протокол использовали для Fc hIgG1, где для захвата использовали только антитело против Fc hIgG1. Количества конъюгата 6, измеренные в разные моменты времени с использованием либо нейраминидазы, либо захватывающего антитела против Fc hIgG1, были сходными в пределах экспериментальной ошибки, что позволяет предположить, что интактный конъюгат является стабильным *in vivo*.

Общее количество конъюгата 6 (или Fc hIgG1) в тестируемых образцах было интерполировано с использованием программы GraphPad Prism версии 6 после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный, 4PL-анализ) стандартных кривых конъюгата 6 (или Fc hIgG1). Кривые сравнения конъюгата 6 и Fc hIgG1 показаны на фиг. 36. Количества конъюгата 6, измеренные в разные моменты времени с использованием либо нейраминидазы, либо захватывающего антитела против Fc hIgG1, были сходными в пределах экспериментальной ошибки, что позволяет предположить, что интактный конъюгат является стабильным *in vivo*.

Пример 39. 14-дневное исследование ФК на крысах после в/в введения исследуемого препарата.

ФК исследования на крысах были выполнены лабораторией Seventh Wave Laboratories (Мэриленд-Хайтс, штат Миссури) с использованием самцов крыс линии Спрег-Доули в возрасте 46-49 дней. Крысам в/в через хвостовую вену вводили 5, 20 или 50 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 5 мл/кг) в дни 1 и 8. Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие

нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из ретроорбитальной, щечной или хвостовой вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь центрифугировали (2000 x *g* в течение 10 минут) и отбирали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени.

Плазменные концентрации конъюгата 6 в каждый момент времени измеряли с помощью сэндвич-анализа ELISA следующим образом: молекулы конъюгата 6 захватывали на планшеты, покрытые нейраминидазой, а затем определяли с помощью конъюгированного с HRP антитела против IgG-Fc человека. hIgG1 был захвачен с использованием антитела против Fc hIgG1. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 6. Более подробное описание способа приведено ниже.

96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (номер по каталогу 12-565-136, ThermoFisher) покрывали нейраминидазой из A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) в 1X KPL покрывающем буфере (5150-0041, SeraCare). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Серийные разведения образцов плазмы высевали на планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов (разбавитель образца: 1% БСА в ФСБ 0,05% Tween 20 + конечная концентрация в плазме необработанных крыс 1:900). Стандартные кривые конъюгата 6 в диапазоне 500–0,230 нг/мл в двух повторностях анализировали на каждом планшете.

После 2-часовой инкубации планшеты промывали 5 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20. Конъюгат 6, связанный с нейраминидазой на планшетах затем зондировали конъюгированным с HRP антителом против Fc F(ab')2 IgG человека (709-036-098, Jackson), разбавленным 1:1000 в разбавителе в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20 и проявляли субстратом TMB в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали при помощи 1 н. H_2SO_4. Поглощение считывали при 450 нм.

Общее количество конъюгата 6 (или Fc hIgG1) в тестируемых образцах было интерполировано с использованием программы GraphPad Prism версии 6 после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный, 4PL-анализ) стандартных кривых конъюгата 6. Кривые сравнения конъюгата 6, показанные на фиг. 37 демонстрируют линейную пропорциональность дозе.

Пример 40. 28-дневное исследование ФК на крысах, сравнивающее в/в и п/к введение исследуемого препарата

ФК исследования на крысах были выполнены лабораторией Seventh Wave Laboratories (Мэриленд-Хайтс, штат Миссури) с использованием самцов крыс линии Спрег-Доули в возрасте 46-49 дней. Крысам в/в или п/к вводили 5 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 5 мл/кг). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из ретроорбитальной, щечной или хвостовой вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь центрифугировали (2000 x *g* в течение 10 минут) и отбирали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени.

Плазменные концентрации конъюгата 6 или Fc hIgG1 в каждый момент времени измеряли с помощью сэндвич-анализа ELISA следующим образом: молекулы конъюгата 6 захватывали на планшеты, покрытые нейраминидазой, а затем определяли с помощью конъюгированного с HRP антитела против IgG-Fc человека. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 6. Более подробное описание способа приведено ниже.

96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (номер по каталогу 12-565-136, ThermoFisher) покрывали нейраминидазой из A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) в 1X KPL покрывающем буфере (5150-0041, SeraCare). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Серийные разведения образцов плазмы высевали на планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов (разбавитель образца: 1% БСА в ФСБ 0,05% Tween 20 + конечная концентрация в плазме необработанных крыс 1:900). Стандартные кривые конъюгата 6 в диапазоне 500–0,230 нг/мл в двух повторностях анализировали на каждом планшете.

После 2-часовой инкубации планшеты промывали 5 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20. Конъюгат 6, связанный с нейраминидазой на планшетах затем зондировали конъюгированным с HRP антителом против Fc F(ab')2 IgG человека (709-036-098, Jackson), разбавленным 1:1000 в разбавителе в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20 и проявляли субстратом TMB в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали при помощи 1 н. H_2SO_4. Поглощение считывали при 450 нм.

Общее количество конъюгата 6 (или Fc hIgG1) в тестируемых образцах было интерполировано с использованием программы GraphPad Prism версии 6 после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный, 4PL-анализ) стандартных кривых конъюгата 6. Кривые сравнения конъюгата 6 на фиг. 38 показывают, что уровни в плазме при п/к и в/в введении сходились через 24 часа и были схожими в пределах экспериментальной ошибки до 336 часов.

Пример 41. 28-дневное исследование ФК на отличных от человека приматах после в/в введения исследуемого препарата.

ФК исследования приматов (NHP) были выполнены компанией BTS Research (Сан-Диего, штат Калифорния) с использованием самцов и самок яванского макака в возрасте 4,5-8 лет с массой тела 2,5-6,5 кг. NHP в/в через подкожную или головную вену вводили 5 или 20 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 5 мл/кг). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из бедренной или головной вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь центрифугировали (2000 x *g* в течение 10 минут) и отбирали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени.

Плазменные концентрации конъюгата 6 в каждый момент времени измеряли с помощью сэндвич-анализа ELISA следующим образом: молекулы конъюгата 6 захватывали на планшеты, покрытые нейраминидазой, а затем определяли с помощью конъюгированного с HRP антитела против IgG-Fc человека. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 6. Более подробное описание способа приведено ниже.

96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (номер по каталогу 12-565-136, ThermoFisher) покрывали нейраминидазой из A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) в 1X KPL покрывающем буфере (5150-0041, SeraCare). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Серийные разведения образцов плазмы высевали на планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов (разбавитель образца: 1% БСА в ФСБ 0,05% Tween 20 + конечная концентрация в плазме необработанных яванских макак 1:2500). Стандартные кривые конъюгата 6 в диапазоне 500–0,230 нг/мл в двух повторностях анализировали на каждом планшете.

После 2-часовой инкубации планшеты промывали 5 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20. Конъюгат

6, связанный с нейраминидазой на планшетах затем зондировали конъюгированным с HRP антителом против Fc F(ab')2 IgG человека (709-036-098, Jackson), разбавленным 1:1000 в разбавителе в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20 и проявляли субстратом TMB в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали при помощи 1 н. H_2SO_4. Поглощение считывали при 450 нм.

Общее количество конъюгата 6 в тестируемых образцах было интерполировано с использованием программы GraphPad Prism версии 6 после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный, 4PL-анализ) стандартных кривых конъюгата 6 (или Fc hIgG1). ФК параметры рассчитывали с помощью программного обеспечения WinNonlin. Кривые сравнения конъюгата 6 показаны на фиг. 39, а резюме по ключевым ФК параметрам представлено в таблице 20. Дозозависимый ответ является линейным между 5 и 20 мг/кг в/в, что приводит к периоду полувыведения около 9 дней для обеих доз (сравнимо с мышью/крысой).

Таблица 20: ФК конъюгата 6 у яванских макак

Конъюгат 6	**Период полувыведения (часы)**	**AUClast (ч*мг/мл)**
5 мг/кг в/в	230	6240
20 мг/кг в/в	197	25400

Пример 42. ФК исследование распределения по легким у мышей после в/в введения исследуемого препарата

ФК исследования на мышах проводили на самцах мышей линии CD-1 в возрасте 6 недель. Мышам в/в через хвостовую вену вводили 10 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 5 мл/кг). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В указанные моменты времени животных умерщвляли для сбора крови (путем пункции сердца) в пробирки с K_2ЭДТА и забора легких. Кровь центрифугировали (2000 x *g*, 10 минут) для получения плазмы. Легкие взвешивали и гомогенизировали в пробирках объемом 1,5 мл стерильным одноразовым пестиком (Z359947, Sigma) в 100 мкл буфера для гомогенизации, состоящего из 11,64 мл реагента для экстракции тканевого белка (78510, Thermo Scientific), 0,24 мл смеси ингибиторов протеазы (78410, Thermo Scientific) и 0,12 мл ЭДТА. После 1-2 мин гомогенизации объем доводили до 1 мл буфером для гомогенизации и образцы инкубировали на льду в течение 20 минут с периодическим перемешиванием путем осторожного перемешивания на вортексе. Гомогенаты центрифугировали при 8000 x *g* в течение 10 мин, а супернатант сохраняли для анализа концентраций исследуемого вещества с течением времени.

Концентрации конъюгата 6 в плазме и легких в каждый момент времени измеряли с помощью сэндвич-анализа ELISA следующим образом: молекулы конъюгата 6 захватывали на планшеты, покрытые нейраминидазой и определяли с помощью конъюгированного с HRP антитела против IgG-Fc человека. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 6. Более подробное описание способа приведено ниже.

96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (номер по каталогу 12-565-136, ThermoFisher) покрывали нейраминидазой из A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) в 1X KPL покрывающем буфере (5150-0041, SeraCare). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Серийные разведения образцов плазмы высевали на планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов (разбавитель образца: 1% БСА в ФСБ 0,05% Tween 20 + конечная концентрация в плазме необработанных крыс 1:100). Стандартные кривые

конъюгата 6 в диапазоне 500–0,230 нг/мл в двух повторностях анализировали на каждом планшете.

После 2-часовой инкубации планшеты промывали 5 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20. Конъюгат 6, связанный с нейраминидазой на планшетах затем зондировали конъюгированным с HRP антителом против Fc F(ab')2 IgG человека (709-036-098, Jackson), разбавленным 1:1000 в разбавителе в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20 и проявляли субстратом TMB в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали при помощи 1 н. H_2SO_4. Поглощение считывали при 450 нм.

Общее количество конъюгата 6 в тестируемых образцах было интерполировано с использованием программы GraphPad Prism версии 6 после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный, 4PL-анализ) стандартных кривых конъюгата 6. Кривые, сравнивающие концентрации конъюгата 6 в плазме и легких, показаны на фиг. 40. Неожиданно C_{max} легких была достигнута через t = 1 час (19,5 мкг/г в ткани легких, ~ 310 нМ). Воздействие конъюгата 6 на легкие составляло приблизительно 10% по сравнению с плазмой.

Пример 43. 5-дневное исследование ФК на мышах, сравнивающее в/в и п/к введение исследуемого препарата

ФК исследования на мышах проводили на самцах мышей линии CD-1 в возрасте 6 недель. Мышам в/в через хвостовую вену вводили 5 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 5 мл/кг). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из ретроорбитальной, щечной или хвостовой вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь центрифугировали (2000 x *g* в течение 10 минут) и отбирали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени.

Плазменные концентрации конъюгата 6 в каждый момент времени измеряли с помощью сэндвич-анализа ELISA следующим образом: молекулы конъюгата 6 захватывали на планшеты, покрытые нейраминидазой, а затем определяли с помощью конъюгированного с HRP антитела против IgG-Fc человека. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 6 (или Fc hIgG1). Более подробное описание способа приведено ниже.

96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (номер по каталогу 12-565-136, ThermoFisher) покрывали нейраминидазой из A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) в 1X KPL покрывающем буфере (5150-0041, SeraCare). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Серийные разведения образцов плазмы высевали на планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов (разбавитель образца: 1% БСА в ФСБ 0,05% Tween 20 + конечная концентрация в плазме необработанных крыс 1:100). Стандартные кривые конъюгата 6 в диапазоне 500–0,230 нг/мл в двух повторностях анализировали на каждом планшете.

После 2-часовой инкубации планшеты промывали 5 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20. Конъюгат 6, связанный с нейраминидазой на планшетах затем зондировали конъюгированным с HRP антителом против Fc F(ab')2 IgG человека (709-036-098, Jackson), разбавленным 1:1000 в разбавителе в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20 и проявляли субстратом TMB в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали при помощи 1 н. H_2SO_4. Поглощение считывали при 450 нм.

Общее количество конъюгата 6 в тестируемых образцах было интерполировано с использованием программы GraphPad Prism версии 6 после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный, 4PL-

анализ) стандартных кривых конъюгата 6. Кривые сравнения конъюгата 6 показаны на фиг. 41. Уровни воздействия для в/в, в/м и п/к введения были аналогичными с AUC 2082, 1944 и 2500, соответственно.

Пример 44. Эффективность у мышей и многовидовая ФК подтверждают возможность нечастого профилактического дозирование у людей.

Аллометрическое масштабирование эффективности дозирования у мышей на основе ФК исследований на мышах, крысах и приматах использовали для прогнозирования дозирования и параметров ФК у людей. Аллометрическое масштабирование основывалось на площади под фармакокинетической кривой (AUC) при эффективной дозе 2,5 мг/кг в 28-дневном профилактическом исследовании на мышах (см. пример 33).

Для аллометрического масштабирования только яванского макака клиренс (CL) человека рассчитывали на основе данных ФК (пример 41) только яванского макака с использованием простого аллометрического уравнения: CL(человека) = Cl(обезьяны) • [BW(человека)/BW(обезьяны)]^{w}, где BW = масса тела, а w представляет собой экспоненту масштабирования, установленную на 0,85. Результаты масштабирования только для яванских макак представлены в таблице 21.

Для аллометрического масштабирования мыши-крысы-яванского макака клиренс (CL) человека от видов животных наносили на график зависимости от массы тела (BW) животного в логарифмической шкале в соответствии со следующим аллометрическим уравнением: CL = a•BW^{x}, где a представляет собой коэффициент, а x представляет собой экспоненту аллометрического уравнения. Коэффициент a и экспонента x были рассчитаны из точки пересечения и наклона линии линейной регрессии, соответственно. Результаты масштабирования мышь-крыса-яванский макак представлены в таблице 22.

Значения клиренса человека, рассчитанные с помощью соответствующих алгоритмов, описанных выше, затем использовали для расчета соответствующей дозы для человека, необходимой для достижения целевого значения AUC эффективности 3700 мкг-час/мл (из мышиной дозы 2,5 мг/кг, пример 33), используя следующее уравнение: доза = CL•AUC.

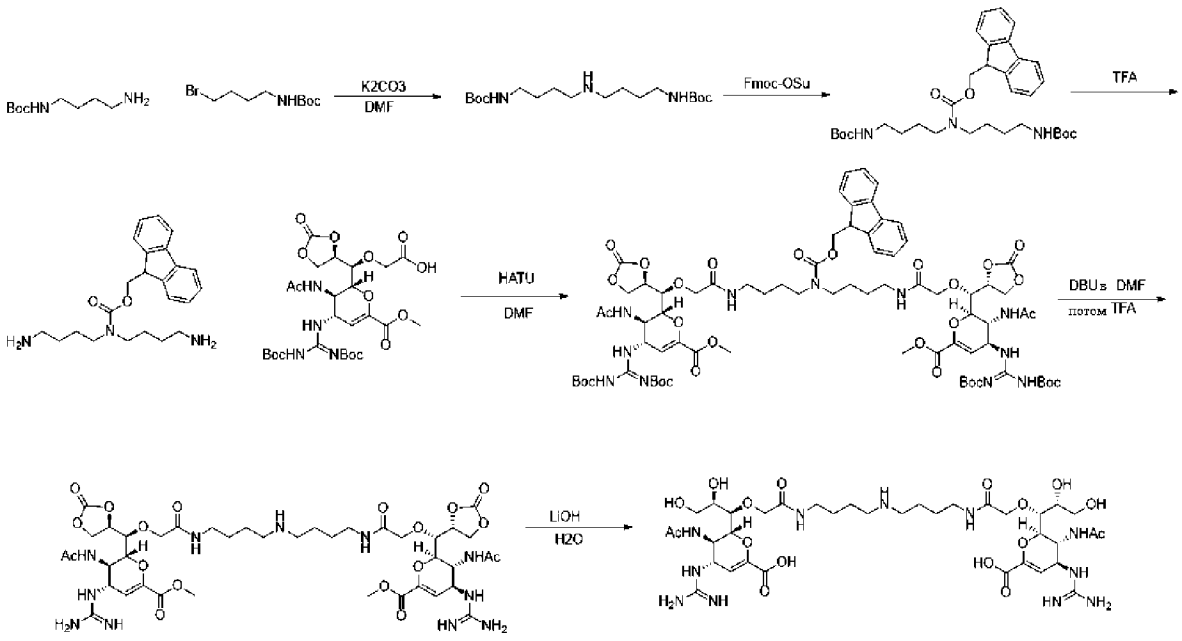
Таблица 21: Аллометрическое масштабирование только для яванских макак (β = 0,85)

Площадь под фармакокинетической кривой эффективности (AUC)	3700 мкг-час/мл
Клиренс человека (CL)	0,43 мл/мин
Доза для человека	95,46 мг, 1,4 мг/кг

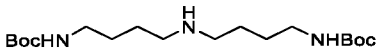
Таблица 22. Аллометрическое масштабирование мышь-крыса-яванский макак (β = 0,97)

Площадь под фармакокинетической кривой эффективности (AUC)	3700 мкг-час/мл
Клиренс человека (CL)	0,59 мл/мин
Доза для человека	130,98 мг, 1,9 мг/кг

Пример 45. Синтез ПС 11

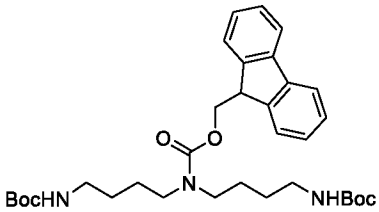


Стадия a.



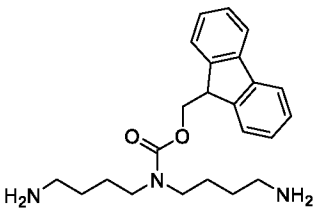
Раствор трет-бутил(4-бромбутил)карбамата (11,2 г, 60 ммоль) и трет-бутил(4-аминобутил)карбамата (10 г, 40 ммоль), растворенных в ДМФ (150 мл), обрабатывали карбонатом калия (16,4 г, 120 ммоль), затем перемешивали при 80 °C в течение 6 часов. Реакционную смесь разделяли между ДХМ (500 мл) и солевым раствором (100 мл). Органический слой отделяли и промывали солевым раствором, затем сушили сульфатом натрия. Раствор фильтровали, упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой с 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продукта 11,0 г, 77%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =360,4

Стадия b.



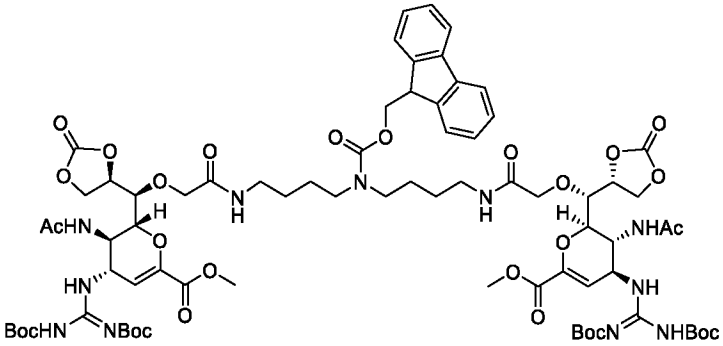
Продукт с предыдущей стадии (0,4 г, 1,11 ммоль) и Fmoc-OSu (0,45 мг, 1,3 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл), затем обрабатывали N-метилморфолином (0,22 мл, 2 ммоль) и перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой без 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продуктов 450 мг, 69%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=582,4.

Стадия c.



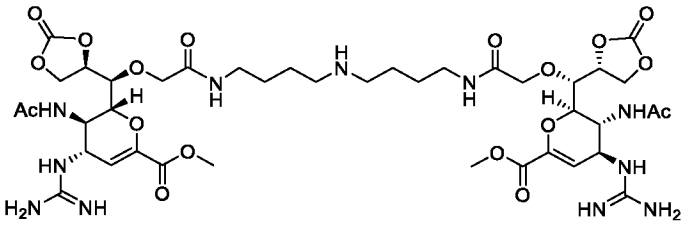
Продукт с предыдущей стадии (0,4 г, 0,7 ммоль) обрабатывали ТФУ (5 мл) при комнатной температуре в течение 0,5 часа, затем упаривали досуха и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Выход на этой стадии был количественным. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=382,3.

Стадия d.



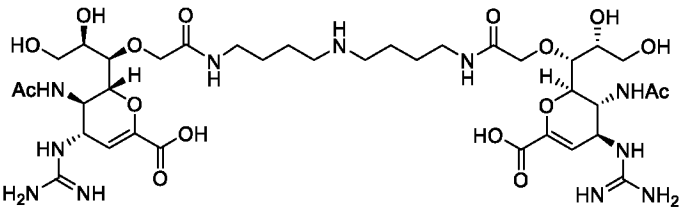
Fmoc-диамин (24 мг, 0,063 ммоль) из предыдущей стадии добавляли к раствору карбоновой кислоты (80 мг, 0,126 ммоль, описанной в синтезе ПС 10, стадия f) в ДМФ (5 мл), затем обрабатывали HATU (50 мг, 0,13 ммоль), с последующей обработкой N-метилморфолином (0,06 мл, 0,50 ммоль). После перемешивания в течение 1 часа полученный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой без ТФУ в качестве а модификатора. Выход продуктов 80 мг, 79%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=803,9.

Стадия e.



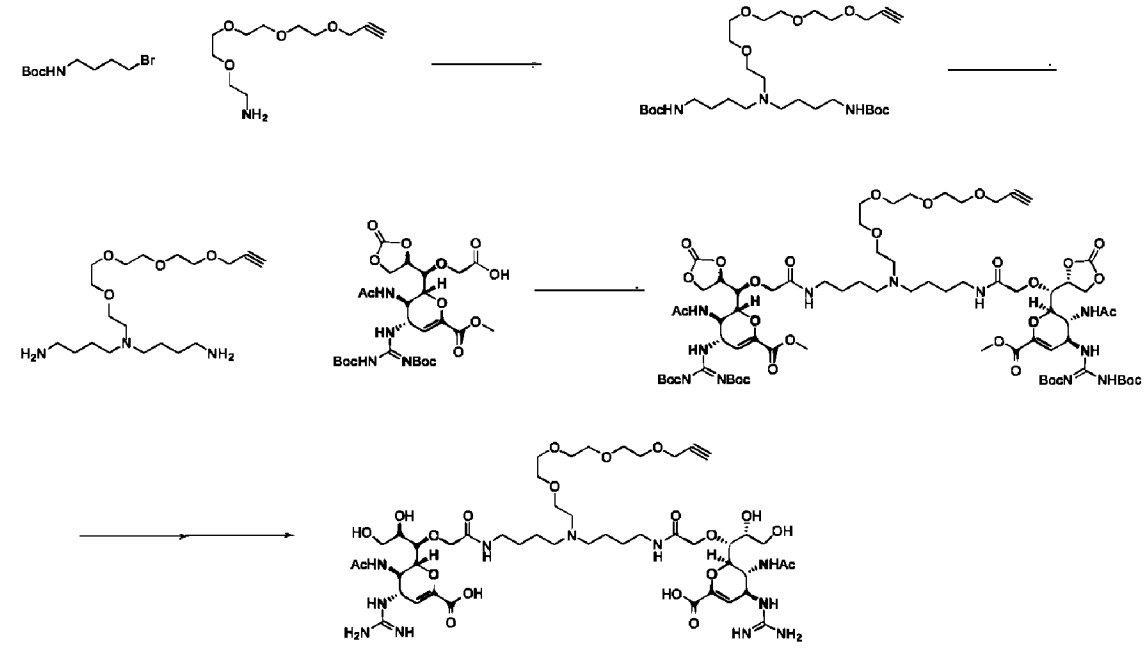
Продукт с предыдущей стадии (80 мг, 0,050 ммоль) обрабатывали 1% DBU (1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен) в ДМФ (2 мл) и перемешивали при комнатной температуре. Когда реакция была завершена с помощью ЖХМС (15 минут), реакционную смесь упаривали, затем обрабатывали ТФУ (2 мл) и перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Реакционный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продукта в виде соли ТФУ составил 52 мг. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=492,7.

Стадия f.

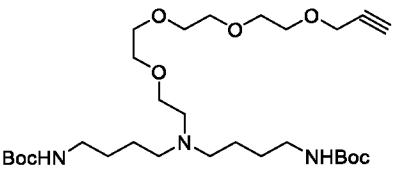


Продукт с предыдущей стадии растворяли в воде (2 мл), затем обрабатывали раствором гидроксида лития (12 мг, 0,50 ммоль, в 1 мл воды). Протекающую реакцию отслеживали посредством ЖХМС. После перемешивания в течение 10 минут реакцию гасили 0,1 мл уксусной кислоты. Полученный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 30% ацетонитрилом и водой, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продукта: 30 мг в виде соли ТФУ, 66%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=452,7. M/3+H=302,1.

Пример 46. Синтез ПС 12

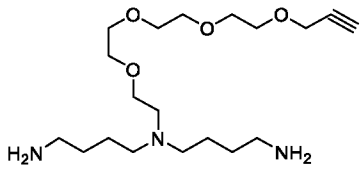


Стадия a.



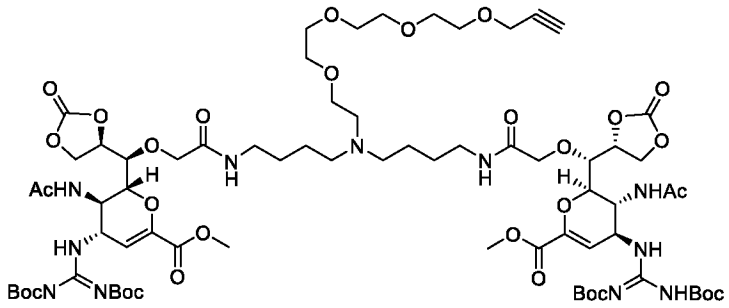
К раствору трет-бутил(4-бромбутил)карбамата (4,8 г, 19 ммоль) и пропаргил-ПЭГ4 амина (2 г, 8,6 ммоль) в ДМФ (50 мл) добавляли карбонат калия (3,6 г, 26 ммоль). Раствор перемешивали при 80 °C в течение 6 часов, затем разделяли между ДХМ (200 мл) и солевым раствором (50 мл). Органический слой отделяли, промывали солевым раствором, сушили сульфатом натрия, фильтровали и упаривали, затем очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой с 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продукта 3,5 г, 70%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=574,4.

Стадия b.



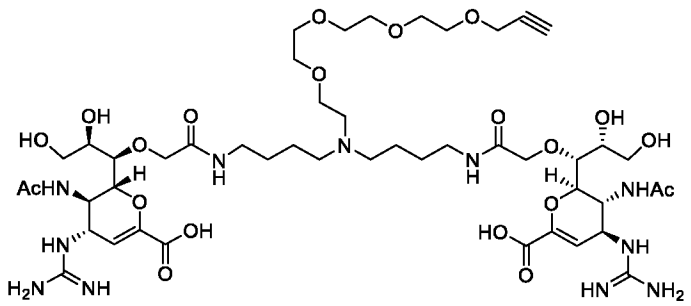
Продукт с предыдущей стадии (3,5 г, 8,6 ммоль) обрабатывали ТФУ (20 мл) при комнатной температуре в течение 0,5 часа, затем упаривали досуха, растворяли в воде, замораживали, лиофилизировали и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Выход на этой стадии был количественным. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=374,3.

Стадия c.



Диаминовую соль ТФУ из предыдущей стадии (37 мг, 0,1 ммоль) добавляли к раствору карбоновой кислоты (130 мг, 0,2 ммоль, описанной в синтезе ПС 10, стадия f) в 10 мл ДМФ, затем обрабатывали HATU (80 мг, 0,2 ммоль) и N-метилморфолином (0,25 мл, 2 ммоль). Полученный раствор перемешивали в течение 1 часа, упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой с 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продукта 120 мг, 75%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=799,9.

Стадия d.



Продукт с предыдущей стадии (120 мг, 0,075 ммоль) обрабатывали 2 мл трифторуксусной кислоты и перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Полученный раствор упаривали, повторно растворяли в воде (2 мл), затем обрабатывали раствором гидроксида лития (12 мг, 0,5 ммоль), растворенным в воде (1 мл). Полученный раствор перемешивали в течение 10 минут, затем слегка подкисляли 0,1 мл уксусной кислоты, упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 30% ацетонитрилом и водой, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продуктов 48 мг в виде соли ТФУ, 57%. Ион(-

ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=559,757. M/3+H=373,5.

Пример 47. Синтез конъюгата 8

К раствору h-IgG1 Fc-ПЭГ4-азида в буферном растворе ФСБ x1 (100 мг, 1,71 мкмоль, 7,011 мл, ММ = 58200 Да, DAR = 3,7) добавляли малую молекулу, дериватизированную алкином (соль ТФУ ПС 12, 45 мг, 0,031 ммоль), и свежеприготовленные растворы ФСБ с pH 7,4 CuSO4 (0,7 мл, 50,0 мМ, 20 экв.), трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)-амина (THPTA, 0,7 мл, 50,0 мМ, 20 экв.) и аскорбата натрия (1,05 мл 50,0 мМ, 30 экв.). Полученный гомогенный раствор перемешивали на встряхивателе-качалке в течение 12 часов. Неочищенные растворы разбавляли ФСБ с pH 7,4 до конечной концентрации 1 мг/мл и дважды подвергали ультрафильтрации (10 000 MWCO) до объема 1 мл. Затем неочищенные смеси разбавляли 1:10 в ФСБ pH 7,4 и очищали с использованием смолы MabSelect Sure (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс, США) с последующим проведением эксклюзионной хроматографии. Очищенный материал количественно определяли с использованием УФ-спектрофотометра NANODROP™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции, основанного на аминокислотной последовательности Fc, используемого при конъюгации, и упаривали до около 10 мг/мл с использованием центробежного концентратора (10 000 MWCO). Очищенные молекулы анализировали с использованием 4-12% бис-трис гелей для ДСН-ПААГ-электрофореза путем загрузки 1-2 мкг каждой молекулы в гель и окрашивания с использованием мгновенного окрашивания синим. Каждый гель включал маркер молекулярной массы с указанными стандартами молекулярной массы (фиг. 42). Выходы, как правило, составляют 40-60%. Анализ МАЛДИ-МС показал диапазон масс (60 000-90 000) со средней массой 62358. Среднее DAR = 3.

Пример 48. Сравнение активности выбранных ингибиторов *in vitro* и *in vivo* с их Fc-конъюгатами в анализах CPE и на мышиной модели летального гриппа

Чтобы продемонстрировать, что конъюгация описанных в данном документе ингибиторов нейраминидазы с Fc усиливает их активность в анализах репликации вируса и на моделях эффективности *in vivo*, мы сравнили активность выбранных неконъюгированных ингибиторов с их Fc-конъюгатами в анализах цитопатического эффекта (CPE) и на мышиной модели заражения летальным гриппом. Для анализа микронейтрализации CPE десять двукратных серийных разведений каждого исследуемого препарата (ИП), начиная с 160 нМ или 400 нМ (9600 нМ для контролей занамивира и осельтамивира), готовили в двух экземплярах для одночасовой инокуляции с применением IINFV A (A/CA/09 H1N1) при множественности заражения (MOI) 0,001 и INFV B при MOI 0,01 за один час инкубации. Затем смесь ИП-вируса добавляли к клеткам MDCK, высеянным в 96-луночные планшеты, и инкубировали в течение одного часа. На 3-й день после заражения для INFV A и на 5-й день для INFV B (B/Brisbane) клетки фиксировали и окрашивали кристаллическим фиолетовым, и считывали оптическую плотность для расчета 50-процентной эффективной концентрации (EC_{50}) каждого ИП с использованием модели доза-ответ XLfit. Внутреннюю цитотоксичность каждого ИП также оценивали с использованием десяти двукратных серийных разведений каждого ИП, начиная с 160 нМ или 400 нМ, приготовленных в двух повторностях для инокуляции клетками MDCK в 96-луночных планшетах для культивирования. Жизнеспособность клеток определяли через 3 и 5 дней после обработки с помощью набора CellTiter-Glo. 50% концентрации цитотоксичности (CC_{50}) рассчитывали с использованием модели доза-ответ XLfit. Никакой цитотоксичности не наблюдалось ни для одного из ИП в самых высоких протестированных концентрациях. Сводные данные анализа микронейтрализации на основе

CPE показаны в таблице 23.

Таблица 23. Анализ микронейтрализации на основе CPE

	EC_{50} против INFV A (нМ)	**EC_{50} против INFV B (нМ)**
Осельтамивир	390,0	1065,0
Занамивир	264,8	382,6
ПС 7 (Нацеливающий фрагмент, соответствующий конъюгату 6)	665,7	106,6
ПС 12 (Нацеливающий фрагмент, соответствующий конъюгату 8)	15,4	0,6
Конъюгат 6	4,0	52,1
Конъюгат 8	0,6	0,3

Данные, обобщенные в таблице 23, демонстрируют, что Fc-конъюгированные формы димеров нейраминидазы обладают более высокой активностью в анализе микронейтрализации CPE, чем их неконъюгированные аналоги. При сравнении конъюгата 6 с ПС 7 наблюдали 166-кратное и 2-кратное увеличение по сравнению с INFV A и INFV B, соответственно. При сравнении конъюгата 8 с ПС 12 наблюдали 26-кратное и 2-кратное увеличение по сравнению с INFV A и INFV B, соответственно.

Конъюгат 6 сравнивали с наиболее активным димером ингибитора нейраминидазы из исследования, обобщенного в таблице 23 (ПС 11, только димер, соответствующий ПС 12 без тримерного линкера, позволяющего осуществлять конъюгацию с Fc) на мышиной модели летальной инфекции гриппа IAV H1N1 с использованием самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/08/1934, также известный как PR8) представляет собой адаптированный для мышей изолят с LD_{90} приблизительно 30 бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мышь.

В эксперименте было задействовано 8 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей инфицировали с помощью PR8 при 10-кратном превышении LD_{90} путем интраназальной инокуляции в объеме 50 мкл мышам, анестезированным смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Группы получали однократную обработку носителем, только Fc hIgG1, конъюгатом 6 или ПС 11 в/в, через 2 часа после заражения (таблица 24; группы 1-6). Группа 7 получала ПС 11 (15 мг/кг) два раза в день (2 р/день) в течение 5 дней, также в/в. Группа 8 получала осельтамивир (15 мг/кг) перорально (п/о) 2 р/день в течение 5 дней. За всеми мышами проводили мониторинг на предмет выживаемости (таблица 25) и потери массы тела (данные не показаны) в течение 10 дней после заражения вирусом.

Как и ожидалось, мыши, обработанные носителем или Fc hIgG1, умерли от инфекции к дню 7 (таблица 25). Мыши, получавшие 10 доз (всего 150 мг/мышь) осельтамивира, продемонстрировали статистически значимую задержку смерти, но только одно животное выжило до дня 10. Все мыши, получавшие однократную дозу конъюгата 6 в дозе 0,3 или 3 мг/кг, выжили до конца исследования и продемонстрировали чистую прибавку в массе в ходе эксперимента. Важно отметить, что все мыши, получавшие ПС 11 в дозе 0,3 или 3 мг/кг, умерли в ходе исследования всего лишь с минимальной задержкой смерти (2 дня или меньше) по сравнению с контрольными группами с применением носителя и только Fc

hIgG1. Поскольку Fc hIgG1 не обладает присущей ему противовирусной активностью (группа 2), это предполагает, что значительно улучшенная активность конъюгата 6 является результатом улучшенной авидности в результате поливалентного отображения на Fc, что также подтверждается результатами, представленными в таблице 23, а также улучшенной фармакокинетикой и вкладом Fc-опосредованного иммунного взаимодействия. Разница в активности между одним димером ингибитора и конъюгатом 6 была статистически значимой при обеих концентрациях доз (сравните группы 3 и 6 и группы 4 и 5; таблица 25). В пересчете на массу потребовалась в 500 раз большая кумулятивная доза ПС 11 для наблюдения эффективности, эквивалентной конъюгату 6.

Таблица 24: Дизайн исследования

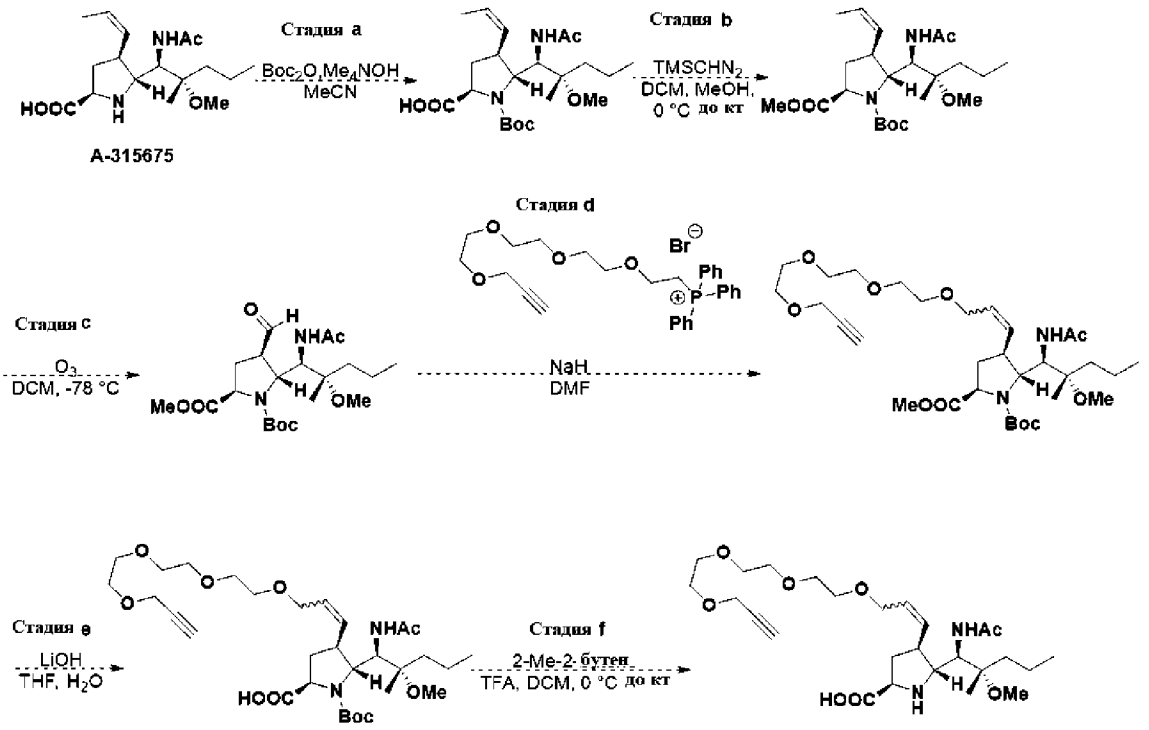
Группа n=5	**Заражение День 0**	**Соединение**	**Доза (мг/кг)**	**Лечение Путь/Схема**
1	Вирус гриппа (H1N1) A/Puerto Rico/08/1934 с применением интраназального пути введения.	Носитель (ФСБ)	Н/П	в/в, однократная доза через 2 часа после заражения
2		только Fc hIgG1	3	
3		Конъюгат 6	3	
4		Конъюгат 6	0,3	
5		ПС 11	0,3	
6		ПС 11	3	
7		ПС 11	15	в/в, **2 р/день в течение 5 дней** через 2 часа после заражения
8		Осельтамивир (Тамифлю™)	20	п/о, **2 р/день в течение 5 дней** через 2 часа после заражения

Таблица 25: Выживаемость мышей

Группа	**Исследуемый препарат**	**Доза (мг/кг)**	**Схема дозирования**	**% выживаемости**	**Значимость для носителя**	**Значимость для ПС 11 0,3 мг/кг* или 3 мг/кг^**
1	Носитель (ФСБ)		в/в, однократная доза	0		

Группа	Исследуемый препарат	Доза (мг/кг)	Схема дозирования	% выживаемости	Значимость для носителя	Значимость для ПС 11 0,3 мг/кг* или 3 мг/кг^
2	только Fc hIgG1	3	в/в, однократная доза	0	NS	
3	Конъюгат 6	3	в/в, однократная доза	100	0,0027	0,0035^
4	Конъюгат 6	0,3	в/в, однократная доза	100	0,0027	0,0027*
5	ПС 11	0,3	в/в, однократная доза	0	0,0027	
6	ПС 11	3	в/в, однократная доза	0	0,0027	
7	ПС 11	15	в/в, два раза в день в течение 5 дней	100	0,0027	
8	Осельтамивир	15	перорально, два раза в день в течение 5 дней	20	0,0027	

Пример 49. Синтез ПС 13 ((5R)-((1R)-Ацетиламино-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(4S)-E/Z-[3-(пропаргил-ПЭГ4)-пропенил]-пирролидин-(2R)-карбоновая кислота)



Стадия a. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-Ацетиламино-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-карбокси-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты.

К перемешиваемой смеси (5R)-((1R)-ацетиламино(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(4S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-карбоновой кислоты, соли HCl (полученная согласно справочному материалу *JACS*, 2002, *124*, 4716-4721; 1,0 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) добавляют гидроксид триметиламмония (1,5 ммоль). После перемешивания в течение 3 ч при комнатной температуре добавляют ди-трет-бутилдикарбонат (4 моль экв.). По завершении реакции все летучие компоненты выпаривают вакуумными методами. Остаток разводят водой (10 мл). Добавляют этилацетат (10 мл) и добавляют 1 М водный раствор серной кислоты до тех пор, пока водный слой не достигнет pH ~ 3. Водный слой промывают двумя дополнительными аликвотами этилацетата (10 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия b. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-Ацетиламино-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-карбоксиметил-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты.

К перемешиваемой при 0 °C смеси трет-бутилового эфира (2R)-((1R)-ацетиламино(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-карбокси-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты (1,0 ммоль) в дихлорметане (5,0 мл) и метаноле (1,0 мл) медленно добавляют (триметилсилил)диазометан (1,1 ммоль). Смесь перемешивают до завершения реакции, температуре позволяют достичь температуры окружающей среды. Все летучие вещества выпаривают вакуумными методами. При необходимости остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия c. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-Ацетиламино-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-карбоксиметил-(3S)-формилпирролидин-1-карбоновой кислоты.

Смесь трет-бутилового эфира (2R)-((1R)-ацетиламино-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-

карбоксиметил-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты (1 ммоль) в дихлорметане (15 мл) комнатной температуры охлаждают до -78 °C. Через раствор барботируют озон до тех пор, пока растворенный озон не приобретет синеватый оттенок. Через раствор барботируют азот до исчезновения синего цвета, затем добавляют диметилсульфид (4,0 ммоль), колбу переносят в морозильную камеру (-20 °C) и оставляют на 1 час. Раствор упаривают, а остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия d. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-Ацетиламино-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-карбоксиметил-(3S)-E/Z-[3-(пропаргил-ПЭГ4)-пропенил]пирролидин-1-карбоновой кислоты.

К перемешиваемой при температуре 0 °C смеси пропаргил-ПЭГ4-фосфония бромида (1,0 ммоль) в ДМФ (5,0 мл) добавляют гидрид натрия (1,1 ммоль) и через 10 минут температуру повышают до температуры окружающей среды. Перемешивание продолжают в течение 1 ч, затем трет- бутиловый эфир (2R)-((1R)-Ацетиламино-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-карбоксиметил-(3S)-формилпирролидин-1-карбоновой кислоты (1,0 ммоль) добавляют в ДМФ (1,0 мл). По завершении реакцию гасят насыщенным раствором хлорида аммония. Водный раствор несколько раз экстрагируют этилацетатом и объединенные органические фазы промывают солевым раствором, сушат и упаривают. Остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия e. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-Ацетиламино-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-карбокси-(3S)-E/Z-[3-(пропаргил-ПЭГ4)-пропенил]пирролидин-1-карбоновой кислоты.

К перемешиваемой при 0 °C смеси трет-бутилового эфира (2R)-((1R)-Ацетиламино(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-карбоксиметил-(3S)-E/Z-[3-(пропаргил-ПЭГ4)пропенил]пирролидин-1-карбоновой кислоты (1,0 ммоль) в тетрагидрофуране (12,0 мл) и воде (3,0 мл) и добавляют гидроксид лития (1,1 ммоль). Перемешивание продолжают, и через 15 минут температуру повышают до температуры окружающей среды. По завершении реакции раствор доводят до кислого pH за счет избыточного добавления смолы AMBERLITE® IRN-77. Смесь фильтруют и фильтрат упаривают вакуумными методами с получением указанного в заголовке соединения. При необходимости остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия f. (5R)-((1R)-Ацетиламино-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(4S)-E/Z-[3-(пропаргил-ПЭГ4)-пропенил]-пирролидин-(2R)-карбоновая кислота.

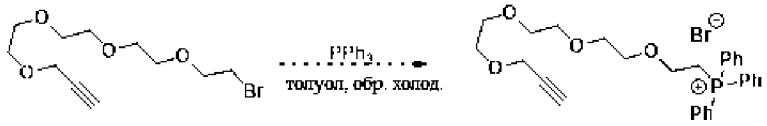
К перемешиваемой при 0 °C смеси трет-бутилового эфира (2R)-((1R)-Ацетиламино(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-карбоксиметил-(3S)-E/Z-[3-(пропаргил-ПЭГ4)пропенил]пирролидин-1-карбоновой кислоты (1,0 ммоль) и 2-метил-2-бутена (0,5 мл) в дихлорметане (8,0 мл) добавляют трифторуксусную кислоту (4,0 мл). Через 10 минут температуру повышают до температуры окружающей среды. По завершении реакции все летучие компоненты выпаривают вакуумными методами. Остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Пример 50. Синтез конъюгата 9

Раствор Fc hIgG1-ПЭГ4-азида в буферном растворе ФСБ x 1 с pH 7,4 (100 мг, 1,71 мкмоль, 7,011 мл, ММ = 58 200 Да, DAR = 3,7) добавляют к буферному раствору ФСБ x 1 с pH 7,4 (2,45 мл) ПС 13 ((5R)-((1R)-Ацетиламино-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(4S)-E/Z-[3-(пропаргил-ПЭГ4)-пропенил]-пирролидин-(2R)-

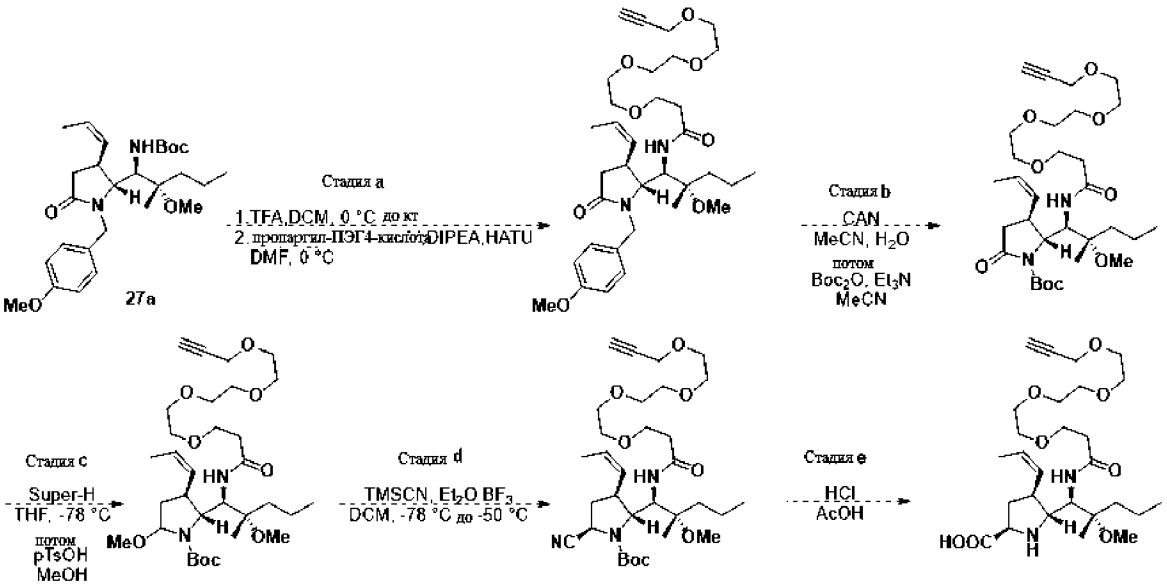
карбоновая кислота) (0,031 ммоль), сульфату меди (0,62 ммоль), трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амину (0,62 ммоль) и аскорбату натрия (0,93 ммоль). Полученный гомогенный раствор осторожно встряхивают на встряхивателе-качалке в течение 12 часов. Неочищенный раствор разбавляют ФСБ с pH 7,4 до конечной концентрации 1 мг/мл и дважды подвергают ультрафильтрации (10 000 MWCO) до объема 1 мл. Затем неочищенную смесь разбавляли 1:10 в ФСБ pH 7,4 и очищали с использованием смолы MabSelect Sure (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс, США) с последующим проведением эксклюзионной хроматографии. Очищенный материал количественно определяют с использованием УФ-спектрофотометра NANODROP™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции, основанного на аминокислотной последовательности Fc, используемого при конъюгации, и упаривают до около 10 мг/мл с использованием центробежного концентратора (10 000 MWCO). Очищенные молекулы анализируют с использованием 4-12% бис-трис гелей для ДСН-ПААГ-электрофореза путем загрузки 1-2 мкг каждой молекулы в гель и окрашивания с использованием мгновенного окрашивания синим. Каждый гель включает маркер молекулярной массы с указанными стандартами молекулярной массы. Анализ МАЛДИ-МС используют для определения среднего DAR.

Пример 51. Синтез бромида пропаргил-ПЭГ4-фосфония.



Смесь пропаргил-ПЭГ4-бромида (1,0 ммоль) и трифенилфосфина (1,2 ммоль) в толуоле (10 мл) кипятят с обратным холодильником. После завершения смесь охлаждают до температуры окружающей среды. Твердые вещества фильтруют и используют на следующей стадии без дополнительной очистки.

Пример 52. Синтез ПС 14 ((5R)-[(1R)-(пропаргил-ПЭГ4-карбоксиамид)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил]-(4S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-карбоновой кислоты, соль HCl)



Стадия a. N-{(2.S)-метокси-((1R)-[1-(4-метоксибензил)-5-оксо-(3S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-ил]-(2S)-метилпентил}-(пропаргил-ПЭГ4)-карбоксиамид.

К перемешиваемой при 0 °C смеси трет-бутилового эфира {(2S)-Метокси-(1R)-[1-(4-метоксибензил)-5-оксо-(3S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-ил]-(2S)-метилпентил}-карбаминовой кислоты (его получают согласно справочному материалу *JACS*, 2002, *124*, 4716-4721; 1,0 ммоль) в сухом дихлорметане (5 мл) добавляют трифторуксусную кислоту (10 ммоль), и температуру повышают до температуры окружающей среды. По завершении растворитель удаляют при пониженном давлении. Полученный остаток растворяют в дихлорметане (20 мл) и экстрагируют насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяют, сушат (сульфат натрия), фильтруют и упаривают. Неочищенный амин растворяют в ДМФ (5 мл) и обрабатывают при 0 °C при перемешивании пропаргил-ПЭГ4-кислотой (1,1 ммоль), диизопропилэтиламином (3,0 ммоль) и HATU (1,1 ммоль). По завершении реакции все летучие компоненты выпаривают вакуумными методами. Остаток помещают в этилацетат (15 мл) и промывают насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл), затем 1 М водным раствором серной кислоты (10 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия b. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-(пропаргил-ПЭГ4-карбоксиамид)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-оксо-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты.

К перемешиваемому раствору N-{(2.S)-метокси-(1R)-[1-(4-метоксибензил)-5-оксо-(3S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-ил]-(2S)-метилпентил}-(пропаргил-ПЭГ4)-карбоксиамида (1,0 ммоль) в смеси ацетонитрила и воды (10:1, 5 мл) добавляют нитрат церия-аммония (2,0 ммоль) небольшими порциями при 45 °C в течение 1 часа, и перемешивание продолжают до завершения. Реакцию гасят насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (5 мл). Водный слой экстрагируют EtOAc (3 × 10 мл), объединенные органические слои сушат (сульфат натрия) и выпаривают с получением неочищенного продукта, который используют на следующей стадии без дополнительной очистки. Материал растворяют в ацетонитриле (5 мл), добавляют ди-трет-бутилкарбонат (1,5 ммоль), затем триэтиламин (2,0 ммоль) и DMAP (каталитический). По завершении реакцию гасят насыщенным раствором хлорида аммония (5 мл). Водный слой экстрагируют EtOAc (3 × 10 мл), и объединенные органические слои сушат (сульфат натрия). Все летучие вещества удаляют вакуумными методами. При необходимости остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия c. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-(пропаргил-ПЭГ4-карбоксиамид)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R/S)-метокси-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты.

К перемешиваемому при -78 °C раствору трет-бутилового эфира (2R)-((1R)-(пропаргил-ПЭГ4-карбоксиамид)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-оксо-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты (1,0 ммоль) в ТГФ (8 мл) добавляют SUPER-HYDRIDE® (1 М в ТГФ, 2,2 ммоль). Через 30 мин реакционную смесь гасят насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (4 мл) и 30% пероксида водорода (5 капель). Смесь нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение еще 30 мин, а водный слой экстрагируют EtOAc (3 × 10 мл). Объединенные органические слои сушат (сульфат натрия) и растворитель выпаривают с получением гемиаминаля, который используют без дополнительной очистки. К раствору указанного выше продукта в метаноле (16 мл) добавляют гидрат п-толуолсульфоновой кислоты (0,1 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают в течение ночи и гасят насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл). Метанол удаляют при пониженном давлении, к полученному остатку добавляют воду (10 мл) и экстрагируют EtOAc (3 × 10 мл). Органические слои отделяют и сушат

солевым раствором и сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. При необходимости остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия d. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-(пропаргил-ПЭГ4-карбоксиамид)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-циано-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты.

К перемешиваемому при -78 °C раствору трет-бутилового эфира (2R)-((1R)-(пропаргил-ПЭГ4-карбоксиамид)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R/S)-метокси-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты (1,0 ммоль) в дихлорметане (20 мл) добавляют триметилсилилцианид (2,0 ммоль), а затем эфират трифторида бора (1,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре от -78 °C до -50 °C в течение 3 часов. Добавляют насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (40 мл) и водный слой экстрагируют EtOAc (3 x 15 мл). Объединенные органические слои сушат (сульфат натрия), фильтруют и упаривают при пониженном давлении. Полученный остаток, состоящий из смеси эпимерных цианопроизводных, очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

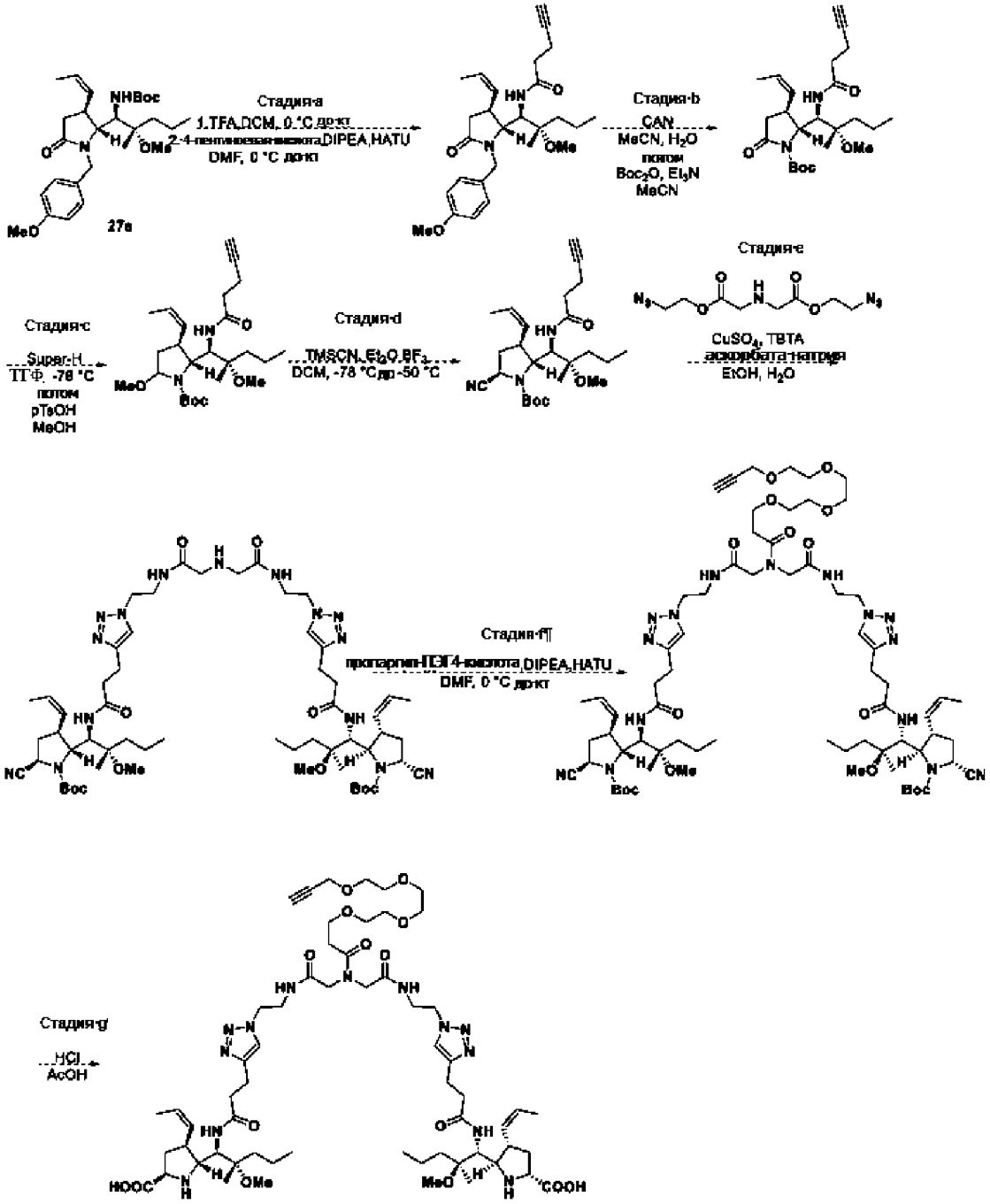
Стадия e. (5R)-[(1R)-(пропаргил-ПЭГ4-карбоксиамид)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил]-(4S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-карбоновая кислота, соль HCl.

К раствору трет-бутилового эфира (2R)-((1R)-(пропаргил-ПЭГ4-карбоксиамид)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-циано-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты (1,0 ммоль) в AcOH (10 мл) добавляют 12 н. HCl (10 мл) при комнатной температуре. Раствор перемешивают при комнатной температуре до завершения, растворитель выпаривают при пониженном давлении. При необходимости остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Пример 53. Синтез конъюгата 10

Раствор Fc hIgG1-ПЭГ4-азида в буферном растворе ФСБ x 1 с pH 7,4 (100 мг, 1,71 мкмоль, 7,011 мл, ММ = 58 200 Да, DAR = 3,7) добавляют к буферному раствору ФСБ x 1 с pH 7,4 (2,45 мл) ПС 14 ((5R)-[(1R)-(пропаргил-ПЭГ4-карбоксиамид)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил]-(4S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-карбоновой кислоты, соль HCl) (0,031 ммоль), сульфату меди (0,62 ммоль), трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амину (0,62 ммоль) и аскорбату натрия (0,93 ммоль). Полученный гомогенный раствор осторожно встряхивают на встряхивателе-качалке в течение 12 часов. Неочищенный раствор разбавляют ФСБ с pH 7,4 до конечной концентрации 1 мг/мл и дважды подвергают ультрафильтрации (10 000 MWCO) до объема 1 мл. Затем неочищенную смесь разбавляли 1:10 в ФСБ pH 7,4 и очищали с использованием смолы MabSelect Sure (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс, США) с последующим проведением эксклюзионной хроматографии. Очищенный материал количественно определяют с использованием УФ-спектрофотометра NANODROP™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции, основанного на аминокислотной последовательности Fc, используемого при конъюгации, и упаривают до около 10 мг/мл с использованием центробежного концентратора (10 000 MWCO). Очищенные молекулы анализировали с использованием 4-12% бис-трис гелей для ДСН-ПААГ-электрофореза путем загрузки 1-2 мкг каждой молекулы в гель и окрашивания с использованием мгновенного окрашивания синим. Каждый гель включает маркер молекулярной массы с указанными стандартами молекулярной массы. Анализ МАЛДИ-МС используют для определения среднего DAR.

Пример 54. Синтез ПС 15, соль HCl



Стадия a. N-{(2.S)-метокси-((1R)-[1-(4-метоксибензил)-5-оксо-(3S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-ил]-(2S)-метилпентил}-(3-бутинил)-карбоксиамид.

К перемешиваемой при 0 °C смеси трет-бутилового эфира {(2S)-Метокси-(1R)-[1-(4-метоксибензил)-5-оксо-(3S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-ил]-(2S)-метилпентил}-карбаминовой кислоты (его получают согласно справочному материалу *JACS*, 2002, *124*, 4716-4721; 1,0 ммоль) в сухом дихлорметане (5 мл) добавляют трифторуксусную кислоту (10 ммоль), и температуру повышают до температуры окружающей среды. По завершении растворитель удаляют при пониженном давлении. Полученный остаток растворяют в дихлорметане (20 мл) и экстрагируют насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяют, сушат (сульфат натрия), фильтруют и упаривают. Неочищенный амин растворяют в ДМФ (5

мл) и обрабатывают при 0 °C при перемешивании 4-пентиновой кислотой (1,1 ммоль), диизопропилэтиламином (3,0 ммоль) и HATU (1,1 ммоль). По завершении реакции все летучие компоненты выпаривают вакуумными методами. Остаток помещают в этилацетат (15 мл) и промывают насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл), затем 1 М водным раствором серной кислоты (10 мл). Объединенные органические слои сушат над сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. Остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия b. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-(4-пентиноил)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-оксо-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты.

К перемешиваемому раствору N-{(2.S)-метокси-(1R)-[1-(4-метоксибензил)-5-оксо-(3S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-ил]-(2S)-метилпентил}-(3-бутинил)-карбоксиамида (1,0 ммоль) в смеси ацетонитрила и воды (10:1, 5 мл) добавляют нитрат церия-аммония (2,0 ммоль) небольшими порциями при 45 °C в течение 1 часа, и перемешивание продолжают до завершения. Реакцию гасят насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (5 мл). Водный слой экстрагируют EtOAc (3 × 10 мл), объединенные органические слои сушат (сульфат натрия) и выпаривают с получением неочищенного продукта, который используют на следующей стадии без дополнительной очистки. Материал растворяют в ацетонитриле (5 мл), добавляют ди-трет-бутилкарбонат (1,5 ммоль), затем триэтиламин (2,0 ммоль) и DMAP (каталитический). По завершении реакцию гасят насыщенным раствором хлорида аммония (5 мл). Водный слой экстрагируют EtOAc (3 × 10 мл), и объединенные органические слои сушат (сульфат натрия). Все летучие вещества удаляют вакуумными методами. При необходимости остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия c. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-(4-пентиноил)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R/S)-метокси-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты.

К перемешиваемому при -78 °C раствору трет-бутилового эфира (2R)-((1R)-(2R)-((1R)-(4-пентиноил)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-оксо(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты (1,0 ммоль) в ТГФ (8 мл) добавляют SUPER-HYDRIDE® (1 М в ТГФ, 2,2 ммоль). Через 30 мин реакционную смесь гасят насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (4 мл) и 30% пероксида водорода (5 капель). Смесь нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение еще 30 мин, а водный слой экстрагируют EtOAc (3 × 10 мл). Объединенные органические слои сушат (сульфат натрия) и растворитель выпаривают с получением гемиаминаля, который используют без дополнительной очистки. К раствору указанного выше продукта в метаноле (16 мл) добавляют гидрат п-толуолсульфоновой кислоты (0,1 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивают в течение ночи и гасят насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл). Метанол удаляют при пониженном давлении, к полученному остатку добавляют воду (10 мл) и экстрагируют EtOAc (3 × 10 мл). Органические слои отделяют и сушат солевым раствором и сульфатом натрия, фильтруют и упаривают. При необходимости остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия d. Трет-бутиловый эфир (2R)-((1R)-(4-пентиноил)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R)-циано-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты.

К перемешиваемому при -78 °C раствору трет-бутилового эфира (2R)-((1R)-(4-пентиноил)-(2S)-метокси-(2S)-метилпентил)-(5R/S)-метокси-(3S)-Z-пропенилпирролидин-1-карбоновой кислоты (1,0 ммоль) в

дихлорметане (20 мл) добавляют триметилсилилцианид (2,0 ммоль), а затем эфират трифторида бора (1,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при температуре от -78 °C до -50 °C в течение 3 часов. Добавляют насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (40 мл) и водный слой экстрагируют EtOAc (3 x 15 мл). Объединенные органические слои сушат (сульфат натрия), фильтруют и упаривают при пониженном давлении. Полученный остаток, состоящий из смеси эпимерных цианопроизводных, очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия e.

К перемешиваемой смеси N-{(2.S)-метокси-((1R)-[1-(4-метоксибензил)-5-оксо-(3S)-Z-пропенилпирролидин-(2R)-ил]-(2S)-метилпентил}-(3-бутинил)-карбоксиамида (1,0 ммоль), бис-[N'-(2-азидоэтил)]-иминодиуксусного амида (0,5 ммоль), 1H-1,2,3-триазол-4- метанамина, 1-(фенилметил)-N,N-бис[1-(фенилметил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил]метила]- (0,1 ммоль) и аскорбата натрия (1,0 ммоль) в этаноле (5 мл) и воде (5 мл) добавляют сульфат меди (0,1 ммоль). По завершении реакционную смесь обрабатывали SiliaMetS TAAcONa (0,3 ммоль) в течение 30 минут. Реакционную смесь фильтруют, и все летучие компоненты выпаривают с помощью вакуумного метода. Остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия f.

К перемешиваемому при 0 °C раствору промежуточного соединения со стадии e (1,0 ммоль), пропаргил-ПЭГ4-кислоте (1,05 ммоль) и DIPEA (3,0 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют HATU (2,0 ммоль). Все летучие вещества выпаривают вакуумными методами, а остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия g. ПС 15, соль HCl

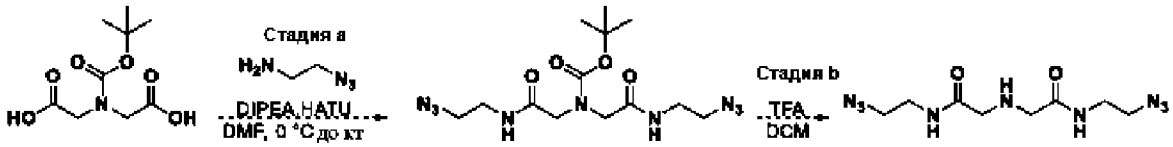
К раствору промежуточного соединения со стадии f (1,0 ммоль) в AcOH (10 мл) добавляют 12 н. HCl (10 мл) при комнатной температуре. Раствор перемешивают при комнатной температуре до завершения, растворитель выпаривают при пониженном давлении. При необходимости остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Пример 55. Синтез конъюгата 11

Раствор Fc hIgG1-ПЭГ4-азида в буферном растворе ФСБ x 1 с pH 7,4 (100 мг, 1,71 мкмоль, 7,011 мл, ММ = 58 200 Да, DAR = 3,7) добавляют к буферному раствору ФСБ x 1 с pH 7,4 (2,45 мл) ПС 15 соли HCl (0,031 ммоль), сульфату меди (0,62 ммоль), трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амину (0,62 ммоль) и аскорбату натрия (0,93 ммоль). Полученный гомогенный раствор осторожно встряхивают на встряхивателе-качалке в течение 12 часов. Неочищенный раствор разбавляют ФСБ с pH 7,4 до конечной концентрации 1 мг/мл и дважды подвергают ультрафильтрации (10 000 MWCO) до объема 1 мл. Затем неочищенную смесь разбавляли 1:10 в ФСБ pH 7,4 и очищали с использованием смолы MabSelect Sure (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс, США) с последующим проведением эксклюзионной хроматографии. Очищенный материал количественно определяют с использованием УФ-спектрофотометра NANODROP™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции, основанного на аминокислотной последовательности Fc, используемого при конъюгации, и упаривают до около 10 мг/мл с использованием центробежного концентратора (10 000 MWCO). Очищенные молекулы анализировали с использованием 4-

12% бис-трис гелей для ДСН-ПААГ-электрофореза путем загрузки 1-2 мкг каждой молекулы в гель и окрашивания с использованием мгновенного окрашивания синим. Каждый гель включает маркер молекулярной массы с указанными стандартами молекулярной массы. Анализ МАЛДИ-МС используют для определения среднего DAR.

Пример 56. Синтез бис-[N'-(2-азидоэтил)]-иминодиуксусного амида.



Стадия a. Бис-[N'-(2-азидоэтил)]-N-Boc-иминодиуксусный амид.

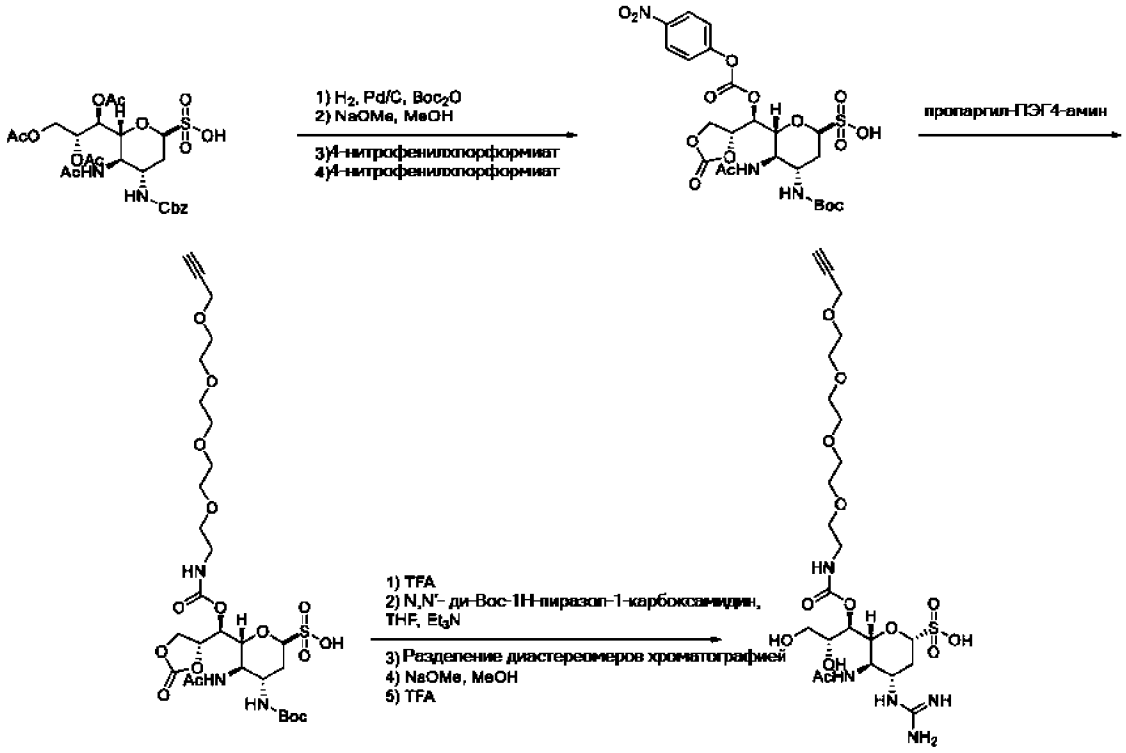
К перемешиваемому при 0 °C раствору N-Boc-иминодиуксусной кислоты (1,0 ммоль), гидрохлорида 2-азидоэтан-1-амина (2,0 ммоль) и DIPEA (6,0 ммоль) в ДМФ (10 мл) добавляют HATU (2,0 ммоль). Все летучие вещества выпаривают вакуумными методами, а остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

Стадия b. Бис-[N'-(2-азидоэтил)]-иминодиуксусный амид.

К перемешиваемой при 0°C смеси бис-[N'-(2-азидоэтил)]-N-Boc-иминодиуксусного амида (1,0 ммоль) и 2-метил-2-бутена (0,5 мл) в дихлорметане (8,0 мл) добавляют трифторуксусную кислоту (4,0 мл). Через 10 минут температуру повышают до температуры окружающей среды. По завершении реакции все летучие компоненты выпаривают вакуумными методами. Остаток очищают хроматографическими методами с получением желаемого продукта.

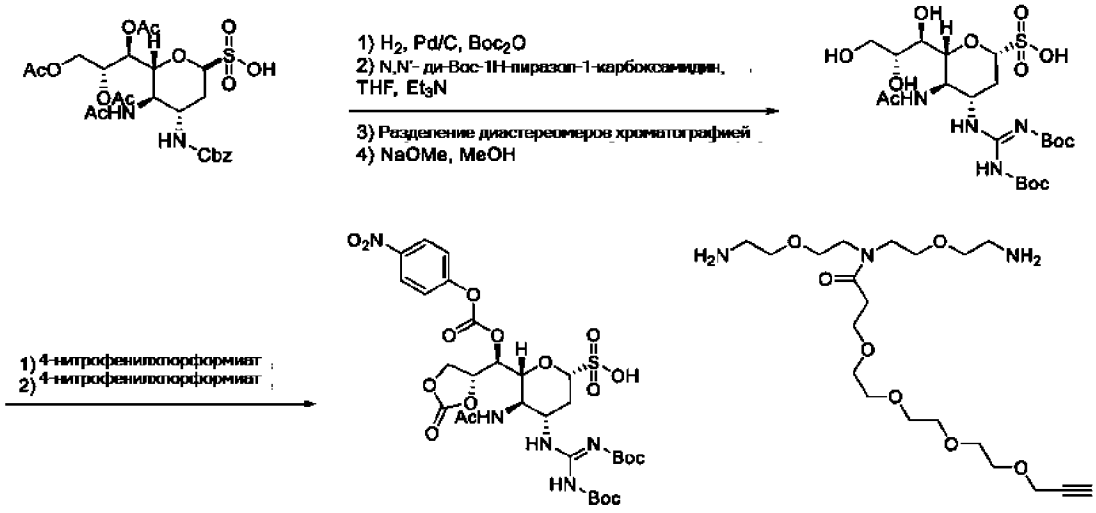
Пример 57. Синтез ПС 16

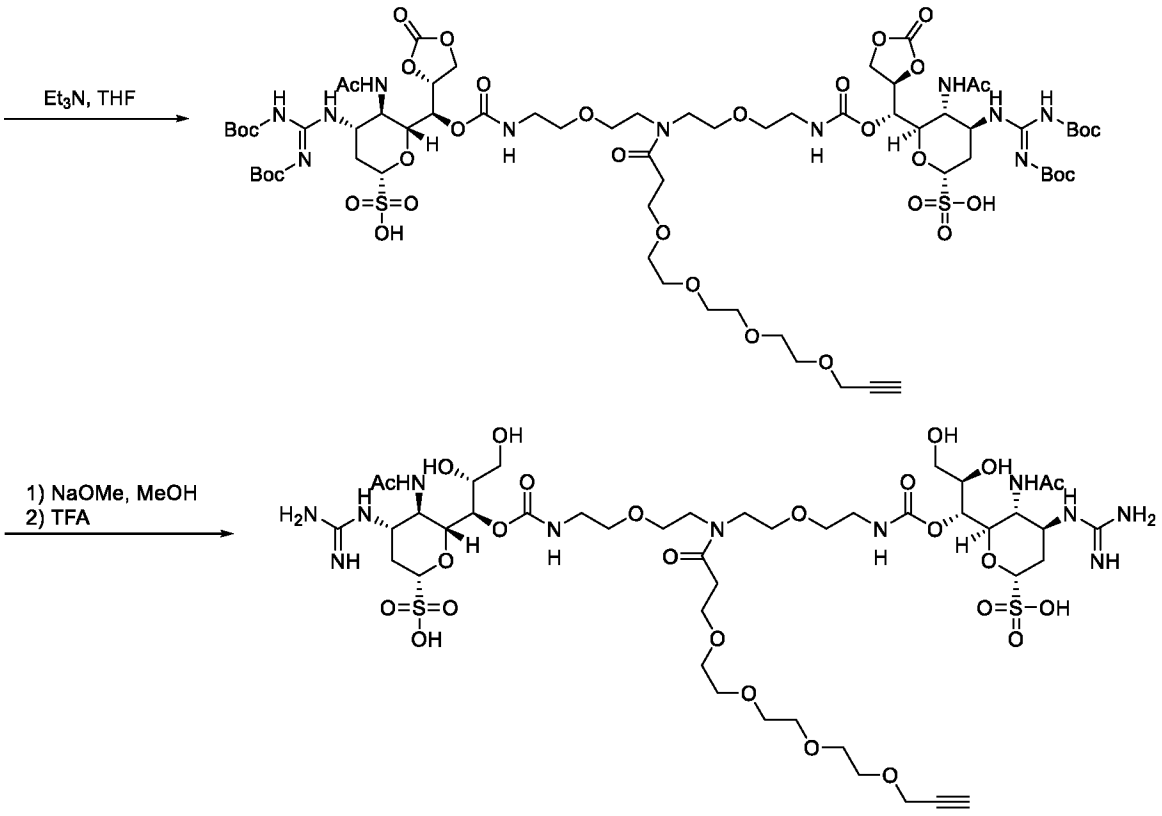
Мономер сульфозанамивира, конъюгированный с $ПЭГ_4$-алкиновым линкером и который может быть дополнительно конъюгирован с Fc-доменом или белком альбумином, получают в соответствии со следующей схемой синтеза. Исходный продукт сульфозанамивир получают согласно Hadházi et al. A sulfozanamivir analogue has potent anti-influenza virus activity. *ChemMedChem Comm.* 13:785-789 (2018).



Пример 58. Синтез ПС 17

Димер сульфозанамивира, конъюгированный с ПЭГ$_4$-алкиновым линкером и который может быть дополнительно конъюгирован с Fc-доменом или белком альбумином, получают в соответствии со следующей схемой синтеза. Исходный продукт сульфозанамивир получают согласно Hadházi et al. A sulfozanamivir analogue has potent anti-influenza virus activity. *ChemMedChem Comm.* 13:785-789 (2018).

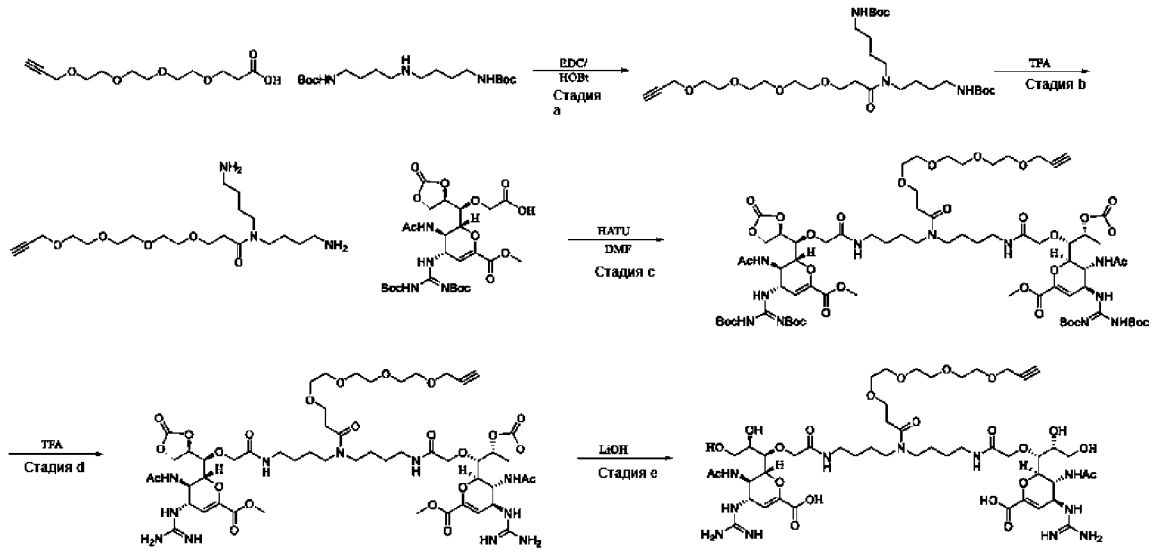




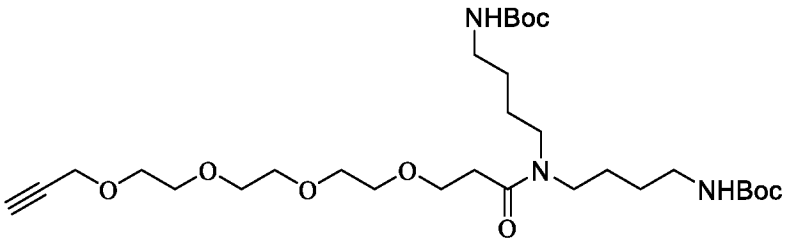
Пример 59. Синтез конъюгата 12

Раствор азидофункционализированного агликозилированного Fc (70 мг, 4,7 мл, 1,3709 мкмоль) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином (29,8 мг, 0,0216 ммоль, ПС 7). После осторожного встряхивания для растворения всех твердых веществ в смесь добавляли 206 мкл раствора смеси натриевой соли L-аскорбиновой кислоты (59,4 мг, 0,3 ммоль), сульфата меди (II) (15,9 мг, 0,1 ммоль) и THPTA (43,5 мг, 0,1 ммоль) в буфере ФСБ 7,4 (1 мл). Полученную смесь осторожно встряхивали в течение ночи. Проводили очистку методом аффинной хроматографии на колонке с протеином A с последующим проведением эксклюзионной хроматографии, как описано в примере 8. Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 56177 Да (DAR = 3,6). Выход 10,1 мг, выход 14%. Невосстанавливающий ДСН-ПААГ-электрофорез конъюгата 12 представлен на фиг. 54.

Пример 60. Синтез ПС 18

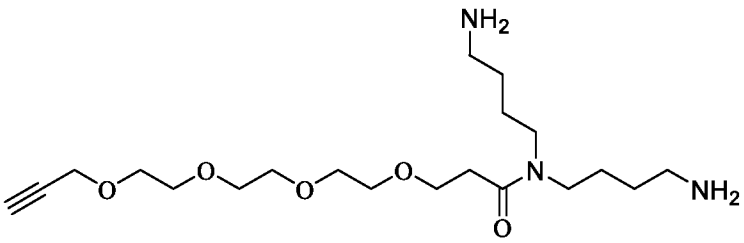


Стадия a. Синтез трет-бутил-(17-{4-[(трет-бутоксикарбонил)амино]бутил}-16-оксо-4,7,10,13-тетраокса-17-азахеникос-1-ин-21-ил)карбамата



К раствору ди-трет-бутил[азандиилди(бутан-4,1-диил)]бискарбамата (1,5 г, 4,17 ммоль из примера 45, стадия a) и пропаргил-ПЭГ4-кислоты (1,08 г, 4,17 ммоль) в ДХМ (40 мл) добавляли EDC (1,0 г, 5 ммоль), HOBt (650 мг, 5 ммоль) и DIEA (1,4 мл, 10 ммоль) при комнатной температуре, затем перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученный раствор упаривали и очищали с помощью жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой без модификатора. Выход 1,9 г, 76%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =602,4.

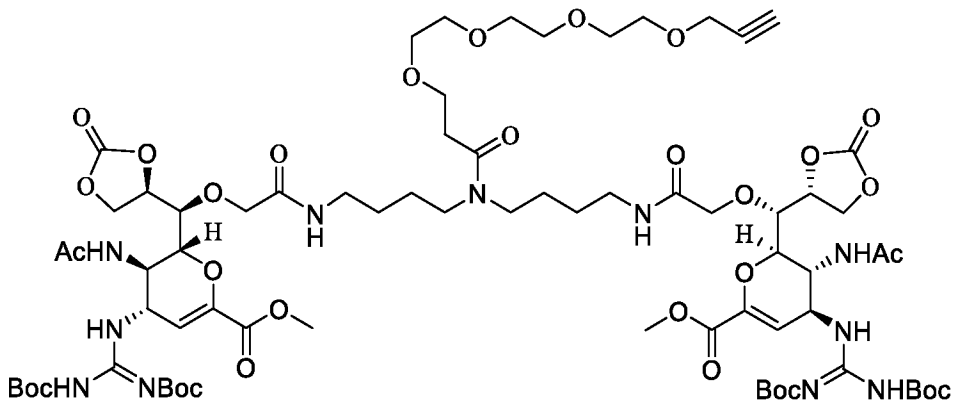
Стадия b. Синтез N,N-бис(4-аминобутил)-4,7,10,13-тетраоксагексадек-15-ин-1-амида



Трет-бутил(17-{4-[(трет-бутоксикарбонил)амино]бутил}-16-оксо-4,7,10,13-тетраокса-17-азахеникос-1-ин-21-ил)карбамат (1,90, 3,1 ммоль) обрабатывали 20 мл ТФУ при комнатной температуре в течение 0,5 часа, затем упаривали досуха и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Выход на

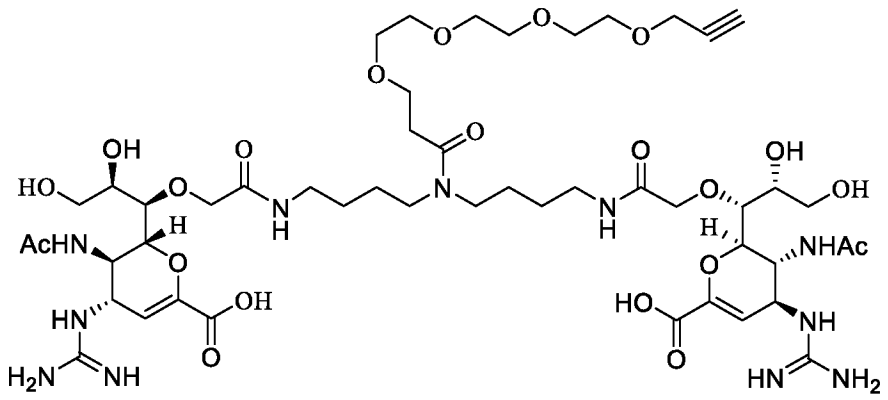
этой стадии является количественным. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=402,3.

Стадия c. Синтез полностью защищенного ПС 18



N,N-бис(4-аминобутил)-4,7,10,13-тетраоксагексадек-15-ин-1-амид (0,150 г, 0,32 ммоль) добавляли к раствору связанному с эфиром кислоты занамивира (0,400 г 0,63 ммоль, описанный в примере 31, стадия f) в ДХМ (10 мл), затем обрабатывали EDC (0,200 г, 1,0 ммоль), HOBt (0,135 г, 1,00 ммоль) и DIEA (0,14 мл, 1,00 ммоль) при комнатной температуре в течение ночи. Полученный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой без 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продуктов 310 мг, 60,3%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=813,9.

Стадия d. Синтез ПС 18



Продукт с предыдущей стадии (300 мг, 0,18 ммоль) обрабатывали трифторуксусной кислотой (2 мл) и перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Полученный раствор упаривали, повторно растворяли в воде (2 мл), затем обрабатывали раствором гидроксида лития (24 мг, 1 ммоль), растворенным в воде (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 10 минут, затем реакцию гасили 0,1 мл уксусной кислоты, упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 50% ацетонитрилом и водой, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продуктов 140 мг, 52%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H =573,8, M/3+H =382,9.

Пример 61. Синтез ПЭГ4-азидо Fc для конъюгата 13a

Получение 0,05 М раствора сложного эфира ПЭГ4-азидоNHS в ДМФ/ФСБ.

Сложный эфир ПЭГ4-азидо NHS (80,5 мг) растворяли в ДМФ (0,50 мл) при 0 °С и разбавляли до 4,063 мл, добавляя 3,50 мл буфера ФСБ 1х при 0 °С. Этот раствор использовали для получения другого ПЭГ4-азидо Fc с различными значениями отношения лекарственного средства к антителу (DAR) путем корректировки эквивалентов этого раствора ФСБ х1 сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS.

Получение ПЭГ4-азидо Fc

ФСБ буферный раствор х1 0,05 М сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS (0,0984 мл, 4,92 мкмоль, 2,5 эквивалента) добавляли к раствору Fc h-IgG1 (105 мг в 5,031 мл ФСБ с pH 7,4, ММ ~ 53 360 Да, 1,968 мкмоль) и смесь осторожно встряхивали в течение 12 часов при температуре окружающей среды. Раствор упаривали с использованием центробежного концентратора (30 000 MWCO) до объема ~1,5 мл. Неочищенную смесь разбавляли 1:10 в ФСБ с pH 7,4 и снова упаривали. Эту процедуру промывки повторяли в общей сложности три раза. Непрореагировавший азидо-реагент удаляли с помощью этой процедуры. Концентрированный Fc-ПЭГ4-азид разбавляли до 5,03 мл буфером ФСБ 1х с pH 7,4 и он был готов для клик-конъюгации. Очищенный материал количественно определяли с использованием УФ-спектрофотометра NANODROP™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности h-IgG1). Выход был количественным после замены буфера/очистки.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для любого конъюгата, описанного в данном документе, может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность Fc, включая Lys447 (например, С-концевой лизиновый остаток) и/или N-концевую сигнальную последовательность мышиного IgG. При экспрессии С-концевой лизин и, если она присутствует, N-концевая сигнальная последовательность мышиного Fc IgG протеолитически расщепляются, в результате чего Fc имеет аминокислотную последовательность, в которой отсутствует Lys447 (например, отсутствует С-концевой лизиновый остаток) и, если она присутствует в конструкции экспрессии, N-концевая сигнальная последовательность мышиного IgG. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 62. Синтез конъюгата 13а

Получение раствора реагента для клик-реакции: 0,0050М $CuSO_4$ в буферном растворе ФСБ: 20,0 мг $CuSO_4$ растворяли в 25,0 мл ФСБ х1, затем брали 22,0 мл указанного выше раствора $CuSO_4$ и добавляли 189,4 мг BTTAA и 1090 мг аскорбата натрия с получением прозрачного раствора (0,0050 М CuSO4, 0,020 М BTTAA и 0,25 М аскорбата натрия).

Раствор азидофункционализированного Fc (100 мг, 4,79 мл, 1,87 мкмоль, SEQ ID NO: 35) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином, ПС-18 (11,2 мг, 0,00750 ммоль, полученную в Примере 60). После осторожного встряхивания для растворения всех твердых веществ раствор обрабатывали 3,00 мл указанного выше раствора реагента для клик-реакции. Полученный бесцветный гомогенный раствор осторожно встряхивали в течение ночи. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. Общий протокол очистки конъюгата в примере 10). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 55913 Да (DAR = 1,7). Выход 54,0 мг, выход 54%.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 13а, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, который включает С-концевой

остаток лизина и N-концевую сигнальную последовательность мышиного IgG. После экспрессии С-концевой лизин и N-концевая сигнальная последовательность Fc мышиного IgG конъюгата 13a протеолитически расщепляются, в результате чего образуется Fc, имеющая последовательность, в которой отсутствует Lys447 (например, отсутствует С-концевой лизиновый остаток), и N-концевая сигнальная последовательность мышиного IgG. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 63. Синтезы конъюгата 13b, конъюгата 13c, конъюгата 13d, конъюгата 13e, конъюгата 13f и конъюгата 13g

ПЭГ4-азидо Fc для конъюгата 13b, конъюгата 13c, конъюгата 13d, конъюгата 13e, конъюгата 13f и конъюгата 13g получали аналогично ПЭГ4-азидо Fc конъюгата 13a (пример 61), корригируя количество эквивалентов сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS, как описано в таблице ниже. Конъюгат 13b, конъюгат 13c, конъюгат 13d, конъюгат 13e, конъюгат 13f и конъюгат 13g получали аналогично конъюгату 13a в примере 62, где количество эквивалентов нацеливающего фрагмента (ПС 18) коррегировали на основе желаемого значения DAR (таблица 26), и объем использованного раствора реагента для клик-реакции был таким же, как и использованный в процедуре для примера 62. Значения DAR, молекулярные массы и выходы приведены в таблице ниже. Конъюгаты продукта очищали аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующей эксклюзионной хроматографией, как описано в Примере 8. ДСН-ПААГ-электрофорез в невосстанавливающих условиях конъюгатов 13a-13g представлен на Фиг. 55.

Таблица 26: Выходы конъюгатов 13a-13g

Название образца	**Эквиваленты сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS**	**DAR (среднее значение)**	**МАЛДИ масса Да (среднее значение)**	**Нацеливающий фрагмент (ТМ)**	**Эквиваленты ТМ**	**Тип белка**	**Выход (%)**
Конъюгат 13a	2,5	1,7	55913	ПС 18	4	Fc hIgG1	54%
Конъюгат 13b	4,5	2,7	57278	ПС 18	6	Fc hIgG1	50%
Конъюгат 13c	6,5	3,8	58908	ПС 18	8	Fc hIgG1	60%
Конъюгат 13d	8,5	4,7	60149	ПС 18	10	Fc hIgG1	54%
Конъюгат 13e	11	5,8	61726	ПС 18	12	Fc hIgG1	55%
Конъюгат 13f	18	8,2	65146	ПС 18	16	Fc hIgG1	53%
Конъюгат 13g	25	10,3	68153	ПС 18	20	Fc hIgG1	45%

Пример 64. Стабильность конъюгата 6 in vitro.

Для демонстрации стабильности конъюгата 6 in vitro с использованием свежих плазмы и микросом печени, обработанных K_2EDTA, как мыши, так и человека. Стабильность в плазме мыши и человека in vitro определяли путем сравнения диаграммы отношения лекарственного средства к антителу (DAR) после 24-часовой инкубации в плазме при 37 °C с помощью масс-спектрометрического обнаружения ВП-МАЛДИ. Микросомальную стабильность печени с использованием микросом мышей и человека также оценивали после инкубации в течение 24 часов при 37 °C с помощью масс-спектрометрического обнаружения ВП-МАЛДИ. Это должно было идентифицировать потенциальные метаболически лабильные сайты на Fc-белке, линкере или целевом фрагменте.

64.1 Подготовка образца для определения стабильности в плазме

Сначала 60 мкл конъюгата 6 в концентрации 3 мг/мл смешивали с 120 мкл плазмы. Плазма каждого типа была разделена на аликвоты в 2 пробирки. По одной аликвоте каждого типа плазмы немедленно замораживали. Оставшуюся аликвоту помещали на водяную баню (37°C) на 24 часа. Гранулы MAGNE® Protein A (Promega) уравновешивали путем осторожного встряхивания гранул до получения суспензии. В двух повторностях для обоих типов плазмы 50 мкл суспензии шариков добавляли в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и помещали на магнитный штатив на 10 секунд. Через 10 секунд буфер для хранения удаляли и выбрасывали. 500 мкл буфера для связывания/промывки (0,1% БСА в 1X ФБС pH 7,4) добавляли в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую шарики. Гранулы перемешивали (на вортексе) и помещали на магнитный штатив на 10 секунд. Через 10 секунд буфер для связывания/промывки удаляли и выбрасывали. 50 мкл буфера (1x ФСБ, pH 7,4) добавляли в микроцентрифужную пробирку, содержащую шарики. К шарикам добавляли 50 мкл смеси плазмы и осторожно встряхивали на вортексе для перемешивания. Используя встряхиватель для пробирок, образец перемешивали при комнатной температуре в течение 60 минут, чтобы шарики оставались в суспензии. После перемешивания пробирку помещали на магнитный штатив на 10 секунд и удаляли супернатант. Добавляли 500 мкл буфера (1x ФСБ, pH 7,4) и осторожно встряхивали на вортексе для перемешивания. После перемешивания пробирку помещали на магнитный штатив на 10 секунд, после чего удалили и выбрасывали промывочный буфер. Этап промывки повторяли в общей сложности 2 раза. После 2 промывок 500 мкл буфера (1x ФСБ, pH 7,4) были выполнены 3 промывания 500 мкл, 200 мкл и 100 мкл воды, соответственно. В пробирку добавляли соответствующий объем воды и осторожно встряхивали на вортексе для хорошего перемешивания, а затем помещали на магнитный штатив на 10 секунд перед удалением и сливом воды. После третьей промывки водой к шарикам добавляли 30 мкл буфера для элюирования (90:10:0,4 вода:ацетонитрил:ТФУ). Используя шейкер для пробирок, буфер для элюирования и образец смешивали в течение 30 минут при комнатной температуре. После перемешивания пробирку помещали на магнитный штатив на 10 секунд, буфер для элюирования, содержащий образец, удаляли и хранили. 2 мкл образца смешивали с 2 мкл матрицы МАЛДИ (20 мг/мл синаповой кислоты в 70:30:0,1 вода:ацетонитрил:ТФУ) и наносили на целевой планшет МАЛДИ, используя двухслойную технику. Затем образец анализировали масс-спектрометрией ВП-МАЛДИ.

64.2 Подготовка образца микросом печени

10-кратный буфер готовили с 500 мМ трис-HCl при pH 7,5 и 50 мМ гексагидрата хлорида магния. ACV-006 разбавляли до 50 мкМ в 1x ФСБ, pH 7,4. Микросомы печени размораживали и встряхивали на вортексе. Аликвоту каждого вида микросом печени (человека и мыши) убивали нагреванием при 70°C в течение 15 минут для использования в качестве контроля. Реакционные смеси были приготовлены для обоих

видов в соответствии с таблицей 27. Пробирки инкубировали на водяной бане (37 °C) в течение 24 часов. Образцы были извлечены для анализа с использованием гранул MAGNE® Protein A (Promega) в соответствии с протоколом из 59.1.

Таблица 27: Конечная концентрация микросом 0,5 мг/мл с 5 мкМ конъюгата 6

	Убитые нагреванием	**Живые**
Всего	400 мкл	400 мкл
Вода	286 мкл	286 мкл
10х буфер	40 мкл	40 мкл
Микросомы (20 мг/мл)	10 мкл	10 мкл
Соединение (50 мкМ)	40 мкл	40 мкл
Регенерирующий раствор A NADPH	20 мкл	20 мкл
Регенерирующий раствор B NADPH	4 мкл	4 мкл

64.3 Анализ выборки и данных

Образцы получали с использованием Bruker Compass Flex Control версии 3.4 для получения масс-спектров ВП-МАЛДИ полного сканирования (таблица 28). БСА использовали в качестве внутреннего калибранта для диапазона измеряемого диапазона масс. Данные были дополнительно проанализированы с помощью программного обеспечения Bruker Compass Flex Analysis версии 3.4. Кроме того, паттерн DAR контроля сравнивали с паттерном DAR тестируемого образца.

Таблица 28: Параметры масс-спектрометра (МС)

Масс-спектрометр	**Bruker Microflex LT**
Камера	
Диапазон масс	17-141 кДа
Настройки частоты дискретизации и преобразователя	0,5
Коэффициент усиления детектора	2.05x
Регулировка смещения базовой линии	0%
Аналоговое смещение	0,5 мВ
Частота лазера	60 Гц
Спектрометр	
Источник ионов 1 (IS1)	20,03 кВ
Источник ионов 2 (IS2)	18,12 кВ (90,5% IS1)
Линза	7,17 кВ (35,8% IS1)
Импульсное извлечение ионов	1010 нс
Носитель образцов	
Случайное блуждание	Частичный образец
Лазерные импульсы	100/отсек

Всего лазерных импульсов	500
Импульсы в растре	20
Предел диаметра растрового снимка	2000 мкм
Настройка	
Глобальное смещение лазерного аттенюатора	0%
Смещение лазерного аттенюатора	20%
Диапазон лазерного аттенюатора	30%
Чувствительность аналого-цифрового преобразователя (полномасштабная)	100 мВ
Линейное аналоговое смещение аналого-цифрового преобразователя	0,5 мВ
Линейное цифровое смещение аналого-цифрового преобразователя	0 cnt
Коэффициент усиления детектора - линейная основа	2500 V
Коэффициент усиления детектора - линейное усиление	0 V
Калибровка	
Бычий сывороточный альбумин	[M+2H], [M+H], [2M+H]

64.4. Результаты

Исследуемое соединение, конъюгат 6 (фиг. 43), тестировали на стабильность in vitro в свежих плазме и микросомах печени, обработанных K_2EDTA, как мыши, так и человека.

Конъюгат 6 добавляли в свежую плазму мыши и человека, обработанные K_2EDTA, до конечной концентрации 1 мг/мл. Плазму разделяли на 2 аликвоты, одну немедленно замораживали, а другую инкубировали на водяной бане при 37 °C в течение 24 часов. В конце инкубации образцы экстрагировали из матрицы плазмы с помощью магнитных шариков MAGNE® Protein A. После инкубаций в плазме образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии ВП-МАЛДИ на предмет изменений в DAR. Было обнаружено, что конъюгат 6 в плазме мышей (фиг. 44) или человека (фиг. 45) не вызывает каких-либо изменений в DAR.

Стабильность микросом конъюгата 6 в печени тестировали при конечной концентрации 5 мкМ в буферном растворе трис-HCl 50 мМ, pH 7,5, который содержал либо активные, либо убитые нагреванием микросомы печени в конечной концентрации 0,5 мг/мл и $MgCl_2$ в конечной концентрации 5 мМ. Все образцы инкубировали при постоянной температуре 37 °C, и регенерирующий раствор никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) использовали для обеспечения постоянной доступности кофактора во время инкубации. Инкубации проводили в течение 24 часов. В конце инкубации образцы экстрагировали из микросомальной матрицы с помощью магнитных шариков с протеином А. После инкубаций микросом печени образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии ВП-МАЛДИ на предмет изменений в DAR. Было обнаружено, что конъюгат 6 при инкубации микросом печени мыши (фиг. 46) или человека (фиг. 47) не вызывал каких-либо изменения в DAR.

Стабильность в плазме in vitro после инкубации при 37 °C в течение 24 часов предполагает отсутствие деградации Fc конъюгата 6, линкера или нацеливающего фрагмента у мыши или у человека. Аналогичным образом отсутствие деградации наблюдали после инкубации в микросомах печени как мыши, так и человека, что свидетельствует об отсутствии метаболитов. Результаты этих исследований стабильности in vitro подтверждают, что это стабильное соединение с продуктами разложения, которые могут иметь биологические потенциалы.

Пример 65. Эффективность конъюгата 13 при различных отношениях лекарственного средства к антителу (DAR) против гриппа A (H1N1) на летальной мышиной модели

Конъюгат 13 оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/8/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 13 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно).

Группы 1-13 получали однократную в/в обработку исследуемым препаратом или носителем (ФСБ) через 2 часа после заражения. В исследовании оценивали 4 различных конструкции DAR конъюгата 13, соответствующих конъюгату 13a, конъюгату 13c, конъюгату 13d и конъюгату 13g (DAR 1,7, 3,8, 5,8 и 10,3 соответственно). Синтез конъюгата 13a, конъюгата 13c, конъюгата 13d и конъюгата 13g описан в примерах 61-63. Каждую конструкцию оценивали в дозе 0,03, 0,1 и 0,3 мг/кг. Общий дизайн исследования для каждого конъюгата представлен в таблице 29.

Таблица 29: Общий дизайн исследования сканирования DAR

Группа	**Конъюгат**	**DAR**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Объем дозы (мг/кг)**
1	Конъюгат 13a	1,7	в/в, T+2 часа	0,3	5
2	Конъюгат 13a	1,7	в/в, T+2 часа	0,1	5
3	Конъюгат 13a	1,7	в/в, T+2 часа	0,03	5
4	Конъюгат 13c	3,8	в/в, T+2 часа	0,3	5
5	Конъюгат 13c	3,8	в/в, T+2 часа	0,1	5
6	Конъюгат 13c	3,8	в/в, T+2 часа	0,03	5
7	Конъюгат 13d	5,8	в/в, T+2 часа	0,3	5
8	Конъюгат 13d	5,8	в/в, T+2 часа	0,1	5
9	Конъюгат 13d	5,8	в/в, T+2 часа	0,03	5
10	Конъюгат 13g	10,3	в/в, T+2 часа	0,3	5
11	Конъюгат 13g	10,3	в/в, T+2 часа	0,1	5
12	Конъюгат 13g	10,3	в/в, T+2 часа	0,03	5
13	Носитель (ФСБ)	Н/П	в/в, T+2 часа	нд	5

Все конструкции полностью оказывали защитное действие при 0,3 мг/кг, напротив, ни одна конструкция не была активной при 0,03 мг/кг (0% выживаемость для всех групп), что указывает на то, что низкая доза была ниже пороговой эффективной дозы. Однако группы, получавшие 0,1 мг/кг конъюгатов, можно было различить (таблица 30). При этом уровне дозы конъюгаты с DAR 1,7, 3,8 и 5,8 оказывали значительное большее защитное действие, чем у мышей, обработанных только носителем (p = 0,0027). Однако, конструкция с высоким уровнем DAR (10,3) не оказывала значительно большее защитное действие, чем у мышей, обработанных только носителем (p = 0,091). Механизм, лежащий в основе потери активности конструкции с высоким уровнем DAR, в настоящее время неизвестен, но может быть обусловлен несколькими факторами, включая вмешательство в рециркуляцию антител, что приводит к более короткому периоду полужизни.

Таблица 30: Исследование диапазона DAR (группы с дозой 0,1 мг/кг)

Конъюгат	**DAR**	**% выживаемости**	**Значимость***
Конъюгат 13a	1,7	60	p=0,0027
Конъюгат 13c	3,8	40	p=0,0027
Конъюгат 13d	5,8	80	p=0,0027
Конъюгат 13g	10,3	0	p=0,091**
* = Значимость в отношении мышей, получавших только носитель (ФСБ) посредством применения логрангового критерия (Мантеля — Кокса). ** = Незначимо			

Пример 66. Эффективность конъюгата 6 и конъюгата 12 *in vivo*

Конъюгат 6 и конъюгат 12, аналог с мутацией Fc в N297A оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/8/34) представляет собой адаптированный для мышей изолят. В эксперименте было задействовано по 5 мышей на группу. Мышей анестезировали кетамином/ксилазином (150/10 мг/кг) и заражали вирусом гриппа при 3-5-кратный превышении LD_{95} путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл. Однократную 1 дозу для лечения вводили в/в через 2 часа после заражения. ФСБ использовали в качестве отрицательного контроля. За всеми мышами проводили мониторинг на предмет % потери массы тела (фиг. 48) и выживаемости (фиг. 49) в течение 15 дней после заражения.

Пример 67. Связывание конъюгата 6 и конъюгата 12 с Fcγ-рецептором IIIA *in vitro*

Связывание конъюгата 6 и конъюгата 12, аналога с мутацией Fc в N297A, оценивали против FcγRIIIA с помощью ELISA. На планшет наносили 1 мкг/мл рекомбинантного человеческого FcγRIIIA и оставляли в течение ночи. На следующий день планшет блокировали 1% раствором БСА в течение 1 ч. Конъюгаты добавляли в планшет в зависимости от дозы от 0,01 до 1000 нМ и инкубировали в течение 2 часов. Связывание детектировали путем инкубации с конъюгированным с пероксидазой античеловеческим Fc в течение 1 ч и последующей инкубацией с реагентом субстрата TMB в течение 10-15 мин.

Связывание определяли путем считывания оптической плотности при 450 нм (фиг. 50 и фиг. 51).

Пример 68. Анализ образца плазмы конъюгата 6 *in vivo*

Конъюгат 6 в образцах плазмы определяли количественно с помощью ELISA для обнаружения нейраминидазы. Вкратце, молекулы захватывали на планшетах, покрытых нейраминидазой, а затем обнаруживали с использованием конъюгированного с HRP античеловеческого человеческого антитела IgG-Fc. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 6. Более подробное описание способа приведено ниже.

96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (номер по каталогу 12-565-136, ThermoFisher) покрывали 0,1 ед./лунку нейраминидазы из A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) в 1X KPL покрывающем буфере (5150-0041, SeraCare). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Серийные разведения образцов плазмы высевали на планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов (разбавитель образца: 0,5% БСА в ФСБ 0,025% Tween 20 + конечная концентрация в плазме необработанных яванских макак 1:2500). Стандартные кривые конъюгата 6 в диапазоне 0,230–500 нг/мл в двух повторностях анализировали на каждом планшете. После 2-часовой инкубации планшеты промывали 5 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20. Конъюгат, связанный с нейраминидазой на планшетах затем зондировали конъюгированным с HRP антителом против Fc F(ab')2 IgG человека (709-036-098, Jackson), разбавленным 1:1000 в разбавителе в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20 и проявляли субстратом TMB в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали при помощи 1 н. H_2SO_4. Поглощение считывали при 450 нм. Количество конъюгата 6 в образцах плазмы было интерполировано с использованием программы GraphPad Prism версии 6 после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный, 4PL-анализ) стандартных кривых.

Полученные средние концентрации в плазме затем использовали для расчета фармакокинетических параметров с помощью некомпартментного анализа с использованием Phoenix WinNonlin 7.0.

Токсикокинетика (ТК), группы 2 (в/в, 5 мг/кг) и 3 (в/в, 20 мг/кг)

Концентрации были сопоставимыми между самцами и самками животных в группе с одинаковой дозой в день 1 (таблица 31) и день 8 (таблица 32) после введения. Среднее воздействие в плазме увеличивалось приблизительно пропорционально дозе в течение обоих дней. После введения 2-й дозы было отмечено небольшое накопление около 30% в группах с применением разных доз. График средних концентраций в плазме в день 1 и день 8 для групп с применением разных доз показан на фиг. 52.

Таблица 31: Токсикокинетика, день 1

Доза (мг/кг)	**Способ введения**	**Пол**	**Конц. (мкг/мл) в момент времени (ч)**									**Tmax (час)**	**Cmax (мкг/мл)**	**AUC0-t (мкг•ч/мл)**
			0,083	**1**	**2**	**4**	**8**	**24**	**72**	**120**	**168**			
5	в/в	F	112	78,8	85,8	71,0	75,1	52,5	38,6	18,5	22,3	0,083	112	6190
	в/в	M	101	84,6	107	75,3	72,5	38,1	29,8	35,3	15,8	2	107	5970
		Среднее	107	81,7	96,5	73,2	73,8	45,3	34,2	26,9	19,0	1,04	110	6080

		значение												
20	в/в	F	449	510	353	331	303	134	105	63,6	46,6	1	510	18800
	в/в	M	448	422	485	373	329	160	96,0	76,2	53,4	2	485	20500
		Среднее значение	449	466	419	352	316	147	100	69,9	50,0	1,50	497	19600

Таблица 32: Токсикокинетика, день 8

Доза (мг/кг)	**Способ введения**	**Пол**	**Конц. (мкг/мл) в момент времени (ч)**									**Tmax (час)**	**Cmax (мкг/мл)**	**AUC0-t (мкг•ч/мл)**
			0,083	**1**	**2**	**4**	**8**	**24**	**72**	**120**	**168**			
5	в/в	F	111	111	99,3	82,3	100	52,2	46,7	35,0	33,9	1	111	7970
	в/в	M	113	114	113	78,4	74,4	54,7	35,2	47,1	28,2	1	114	7700
		Среднее значение	112	112	106	80,4	87,3	53,5	41,0	41,1	31,0	1	112	7830
20	в/в	F	398	359	319	315	298	190	126	99,3	85,5	0,083	398	23900
	в/в	M	391	443	354	435	263	219	143	142	83,8	1	443	27800
		Среднее значение	394	401	337	375	280	205	134	120	84,7	0,542	420	25800

Фармакокинетика (ФК), группы 4 (в/в, 10 мг/кг) и 5 (п/к, 10 мг/кг)

После внутривенного введения концентрации в плазме самцов и самок были сопоставимыми. После в/в введения наблюдался очень низкий клиренс, приводящий к длительному конечному периоду полувыведения (таблица 33A и таблица 33B).

Таблица 33A: Концентрации в плазме самцов и самок животных

Доза (мг/кг)	**Способ введения**	**Пол**	**Конц. (мкг/мл) в момент времени (ч)**											
			0,083	**1**	**2**	**4**	**8**	**24**	**72**	**120**	**168**	**336**	**504**	**672**

5	в/в	F	166	174	220	153	144	58,6	40,6	21,2	20,7	14,7	н/д	2,7
5	в/в	M	191	135	258	161	154	71	43,7	47,6	32	22,9	н/д	5,3

Таблица 33B: ФК параметры для самцов и самок животных

T_{max} (час)	**C0 (мкг/мл)**	**C_{max} (мкг/мл)**	**AUClast (ч*мкг/мл)**	**AUCINF_obs (ч*мкг/мл)**	**Период полувыведения (час)**	**Cl_obs (мл/мин/кг)**	**Vss_obs (мл/кг)**	**Vz_obs (мл/кг)**
1	166	220	13700	14400	170	0,00579	68,9	85,1
1	204	258	19400	20800	183	0,004	56,6	63,2

После п/к введения время до достижения максимальных концентраций было достигнуто через 72 часа после введения дозы, но концентрации можно было измерить через 672 часа после введения дозы (таблица 34A и таблица 34B). Биодоступность после п/к введения была высокой и составляла около 139%. Сравнение концентрации в плазме с течением времени при в/в и п/к введении 10 мг/кг показано на фиг. 53.

Таблица 34A: Концентрации в плазме самцов и самок животных

Способ введения	**Доза (мг/кг)**	**Пол**	**Конц. (мкг/мл) в момент времени (ч)**											
			0,083	**0,5**	**1**	**4**	**8**	**24**	**72**	**120**	**168**	**336**	**504**	**672**
п/к	10	F	н/д	1,9	5,3	23,1	39,5	54	58,6	66,9	54	28,4	18,9	6,4
п/к	10	M	н/д	0,3	2,1	19,9	28,1	46,8	64,9	54,7	57,2	26,8	25,5	8,6

Таблица 34B: ФК параметры для самцов и самок животных

T_{max}	**C_{max}**	**AUC_{0-t}**	**F**
(час)	**(мкг/мл)**	**(мкг×ч/мл)**	**(%)**
120	66,9	22600	137%
72	64,9	23300	141%

Пример 69. Эффективность конъюгата 6 против гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) на мышиной летальной модели

Конъюгат 6 оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/8/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 7 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Смертность и массу тела регистрировали ежедневно, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

Испытуемые группы получали однократное в/в введение конъюгата 6, контроля Fc hIgG1 или носителя (ФСБ)

через 2 часа после вирусного заражения. Животным, получавшим осельтамивир, вводили дозы перорально дважды в день в течение 5 дней, начиная с 2 часов после вирусного заражения. Дизайн исследования обобщен в таблице 35.

Таблица 35: Дизайн исследования гриппа A/PR/8/34 (h1N1)

Группа	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Объем дозы (мг/кг)**	**Количество мышей**
1	Носитель	в/в, T+2 часа	нд	5	5
2	Fc hIgG1	в/в, T+2 часа	10	5	5
3	Осельтамивир	п/о, два раза в день x5, T+2 часа	20	5	5
4	Осельтамивир	п/о, два раза в день x5, T+2 часа	5	5	5
5	Конъюгат 6	в/в, T+2 часа	10	5	5
6	Конъюгат 6	в/в, T+2 часа	2	5	5
7	Конъюгат 6	в/в, T+2 часа	0,4	5	5

Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель или Fc hIgG1, умерли от инфекции к дню 6. Аналогичным образом мыши, получавшие осельтамивир в низкой дозе (5 мг/кг; два раза в день в течение 5 дней), умерли к дню 8 (таблица 36). Однако мыши, получавшие осельтамивир в дозе 20 мг/кг по той же схеме дозирования, были полностью защищены ($p = 0,0027$). В отличие от осельтамивира, мыши, получавшие конъюгат 6, были полностью защищены при всех уровнях доз (10, 2 и 0,4 мг/кг) от однократной в/в дозы ($p = 0,0027$).

Таблица 36: Исследование выживаемости при гриппе A/PR/8/34 (H1N1) (день 14)

Исследуемый препарат	**Доза**	**% выживаемости**	**Значимость***
Fc hIgG1	10	0	p=0,85**
Осельтамивир	20	100	p=0,0027
Осельтамивир	5	0	p=0,091**
Конъюгат 6	10	100	p=0,0027
Конъюгат 6	2	100	p=0,0027
Конъюгат 6	0,4	100	p=0,0027
* = Значимость в отношении мышей, получавших только носитель (ФСБ) посредством применения логрангового критерия (Мантеля — Кокса). ** = Незначимо			

Активность конъюгата 6 дополнительно подтверждали ежедневными измерениями массы тела. Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель или Fc hIgG1, демонстрировали устойчивое снижение массы тела до тех пор, пока оно не превысила 20%, после чего они были засчитаны как умершие (таблица 37). Группа,

получавшая осельтамивир в дозе 5 мг/кг, также продемонстрировала последовательную потерю массы до смерти на 8-й день. Мыши, получавшие осельтамивир в высокой дозе (20 мг/кг), продемонстрировали стабильную, но сниженную потерю массы тела, которая достигла 14% на 8-й день до выздоровления.

В отличие от контрольных мышей и мышей, получавших осельтамивир, те группы, которые получали конъюгат 6, сохраняли здоровую массу тела на протяжении всего исследования даже при самой низкой концентрации дозы (0,4 мг/кг) (таблица 37). Наибольшая временная потеря массы среди мышей, обработанных конъюгатом 6, составила только 2% в день 14 в группе, получавшей дозу 2 мг/кг. По результатам измерений выживаемости и массы тела конъюгат 6 продемонстрировал надежную защиту от гриппа A/Puerto Rico/8/1934 с однократной в/в дозой всего 0,4 мг/кг.

Таблица 37: Данные по массе тела мышей (% МТ относительно дня 0). В среднем 5 мышей; *данные не включаются, когда первое животное в группе умирает

День после заражения	**Носитель (ФСБ)**	**Fc hIgG1 (мг/кг)**	**Осельтамивир (мг/кг)**		**Конъюгат 6 (мг/кг)**		
		10	**20**	**5**	**10**	**2**	**0,4**
0	100	100	100	100	100	100	100
1	99	99	102	99	103	102	101
2	102	102	103	96	104	102	103
3	96	96	102	95	102	102	100
4	89	88	100	90	103	100	100
5	82	81	95	89	102	99	99
6	77	77	98	90	102	100	101
7			90	84	103	101	102
8			86	78	105	101	102
9			91		101	102	102
10			95		102	101	103
11			97		102	101	102
12			97		101	99	102
13			97		103	100	102
14			96		104	98	101

Пример 70. Синтез конъюгата 14

Указанный в заголовке конъюгат получали аналогично конъюгату 13a (пример 62) с использованием ПЭГ-азидо-Fc (SEQ ID NO: 35) и ПС 7 (пример 19). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 56502 Да (DAR = 2,1). Выход: 43,4 мг, 43,4%.

Пример 71. Синтез конъюгата 15

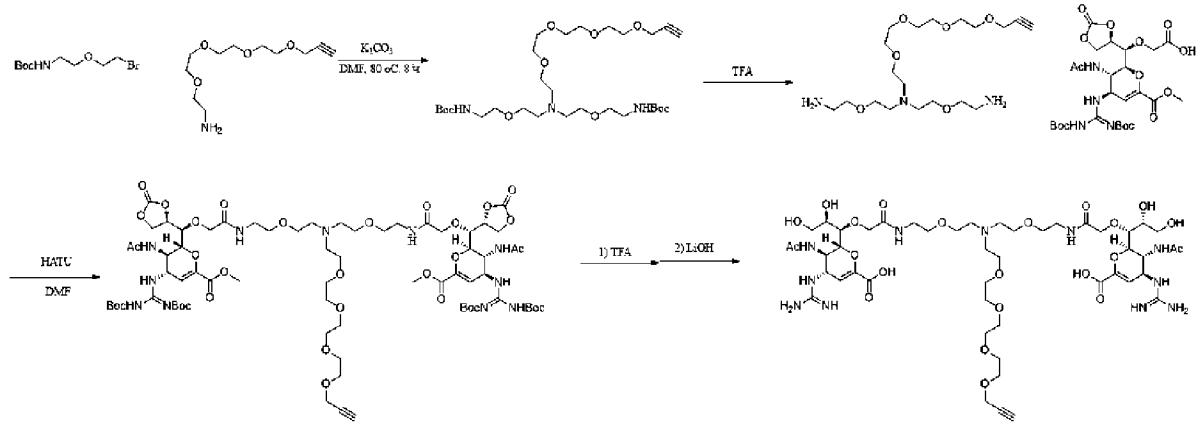
Этот конъюгат получали аналогично примеру 62 (конъюгат 13a) с помощью ПЭГ4-азидо-Fc (SEQ ID

NO: 35, пример 61) и ПС 12 (пример 46). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 56528 Да (DAR = 2,2). Выход: 40,0 мг, 40,0%.

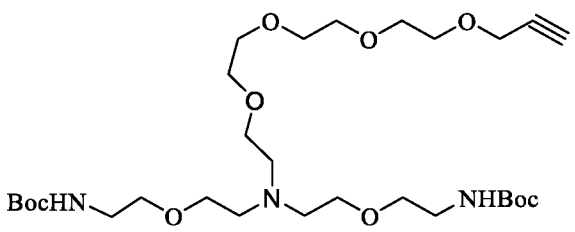
Пример 72. Синтез конъюгата 16

Этот конъюгат получали аналогично примеру 62 (конъюгат 13a) с помощью ПЭГ4-азидо-Fc (SEQ ID NO: 35, пример 61) и ПС 10 (пример 31). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 56507 Да (DAR = 2,1). Выход: 41,7 мг, 42%.

Пример 73. Синтез ПС 19

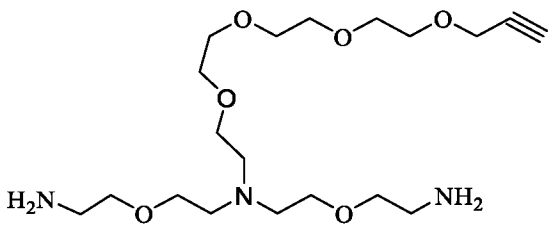


Стадия a.



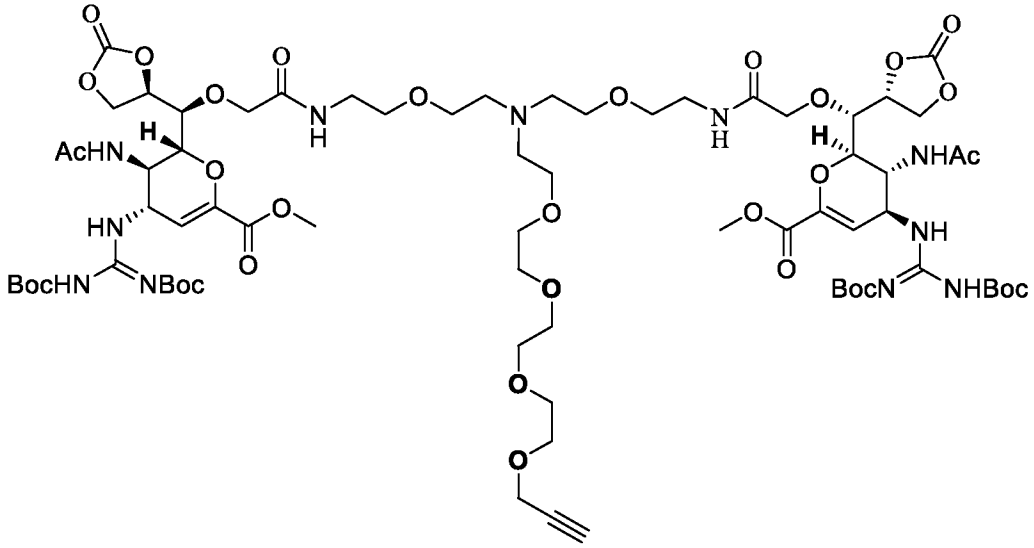
К раствору трет-бутил[2-(2-бромэтокси)этил]карбамата (1,8 г, 6,6 ммоль) и пропаргил-ПЭГ4-амина (0,7 г, 3,0 ммоль) в 30 мл ДМФ добавляли карбонат калия (1,2 г, 9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 80 ˚C в течение 6 часов, а затем разделяли между ДХМ (200 мл) и солевым раствором (50 мл). Органический слой отделяли и промывали солевым раствором, и сушили безводным сульфатом натрия. После фильтрации полученный фильтрат упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой с 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продуктов 1,0 г, 65%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=606,4.

Стадия b.



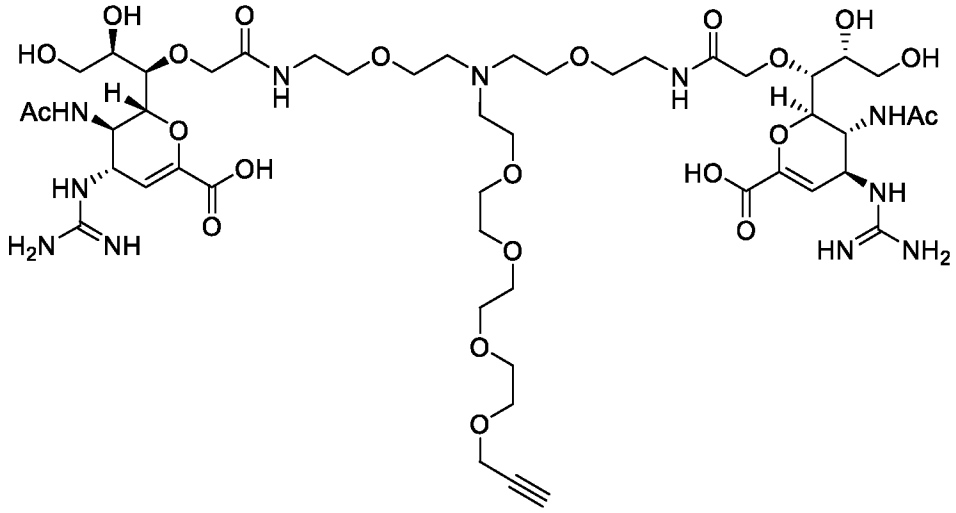
Продукт с предыдущей стадии (1,0 г, 1,6 ммоль) обрабатывали ТФУ (10 мл) при комнатной температуре в течение 0,5 часа, затем упаривали досуха и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Выход на этой стадии был количественным. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=406,3.

Стадия c.



Продукт с предыдущей стадии (120 мг, 0,17 ммоль) обрабатывали раствором простого эфира кислоты занамивира (230 мг, 0,38 ммоль, пример 31) в 10 мл ДМФ. К этому раствору добавляли EDC (100 мг, 0,5 ммоль), HOBt (65 мг, 0,5 ммоль) и DIEA (0,14 мл, 1 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем очищали с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой без ТФУ в качестве модификатора. Выход продуктов 180 мг, 60,2%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H=816,9.

Стадия d.

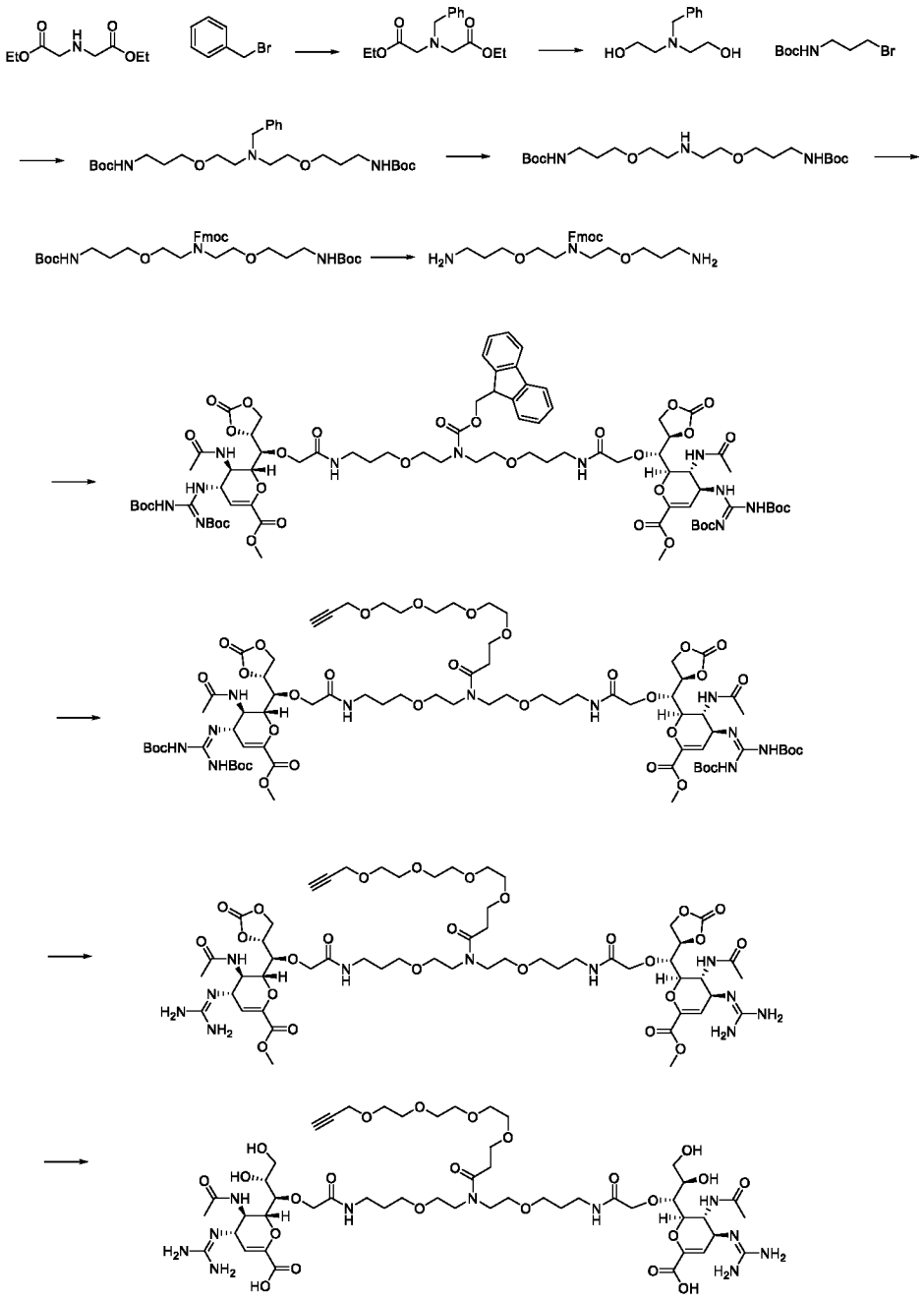


Продукт с предыдущей стадии (180 мг, 0,11 ммоль) обрабатывали трифторуксусной кислотой (2 мл) в течение 30 минут при комнатной температуре. Полученный раствор упаривали и растворяли в воде (2 мл), затем обрабатывали раствором гидроксида лития (24 мг, 1 ммоль), растворенным в H_2O (1 мл). Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин, затем гасили 0,1 мл уксусной кислоты. Раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 50% ацетонитрилом и водой, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продукта 140 мг, 52%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M/2+H =575,8, M/3+H =384,2.

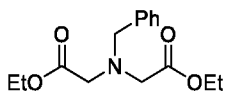
Пример 74. Синтез конъюгата 17

Этот конъюгат получали аналогично примеру 62 (конъюгат 13a) с помощью ПЭГ4-азидо-Fc (SEQ ID NO: 35, пример 61) и ПС 19 (пример 73). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 56672 Да (DAR = 2,2). Выход: 36,7 мг, 36,7%.

Пример 75. Синтез ПС 20

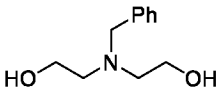


Стадия a.



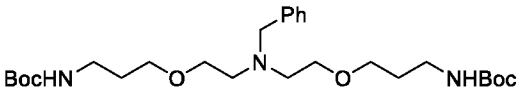
К раствору диэтилинодиацетата (3,1 г, 16,06 ммоль) в безводном ДМФ (36 мл) добавляли бензилбромид (2,38 мл, 19,64 ммоль) и карбонат калия (6,44 г, 46,46 ммоль). Полученную смесь нагревали при 70°C в течение 16 часов. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали третичным бутилметиловым эфиром (3 x 100 мл). Органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na_2SO_4 и фильтровали, затем упаривали. Остаток очищали нормально-фазовой хроматографией на силикагеле (Isco, от 0 до 10% этилацетата и гексана). Выход: 3,13 г, 69,8%. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 280,2.

Стадия b.



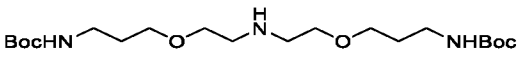
Раствор диэтилового эфира со стадии a (3,2 г, 11,2 ммоль) в безводном ТГФ (5 мл) медленно добавляли в круглодонную колбу, содержащую $LiALH_4$ (425 мг, 14,2 ммоль) в ТГФ (2 мл) в атмосфере азота при 0°C. Шприц промывали ТГФ (2 × 5 мл). Полученную смесь медленно нагревали до комнатной температуры в течение ночи. Медленно добавляли метанол (2 мл), чтобы погасить реакцию, после чего добавляли водный NaOH (1 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа, затем фильтровали под вакуумом. Фильтрат упаривали и использовали на следующей стадии без очистки. Выход: 2,4 г, 109%. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 196,2.

Стадия c.



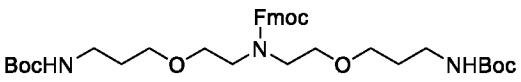
Продукт с предыдущей стадии (1,02 г, 5,24 ммоль) в безводном ТГФ (4 мл) медленно добавляли в колбу, содержащую NaH (чистота 60%, 2,09 г, 52,4 ммоль) и ТГФ (5 мл), при 0°C в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа с последующим добавлением по каплям 3-(Boc-амино)пропилбромида (3,8 г, 15,7 ммоль) в ТГФ (20 мл). Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 дней. Реакционную смесь охлаждали до 0°C, затем гасили водой (6 мл) и перемешивали в течение 1 часа. Полученный в результате раствор экстрагировали этилацетатом (2 x 100 мл). Объединенные органические слои промывали 1 н. водной HCl и солевым раствором. Ее сушили над Na_2SO_4, фильтровали и упаривали. Остаток очищали нормально-фазовой хроматографией (Isco, от 0 до 5% метанола и дихлорметана). Выход: 984 мг, 37%. Ион, найденный методом ЖХМС [M+H]+ = 510,0.

Стадия d.



Гидроксид палладия (543 мг, 0,77 ммоль) добавляли в колбу, содержащую продукт стадии c (985,3 мг, 1,93 ммоль) в безводном метаноле (19,5 мл), в атмосфере H_2. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Затем фильтровали через слой целита, промывали метанолом и упаривали. Остаток переносили на следующую стадию без очистки. Выход: 828,6 мг, 102%. Ион, найденный методом ЖХМС [M+H]+ = 420,0.

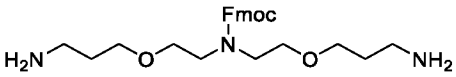
Стадия e.



Продукт стадии d (829 мг, 1,97 ммоль) в H_2O:ТГФ (1:1, 16 мл) охлаждали до 0°C. К этому раствору добавляли Na_2CO_3 (314 мг, 2,96 ммоль) с последующим добавлением сложного эфира Fmoc N-гидроксисукцинимида (826 мг, 2,37 ммоль). Полученную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали до завершения с помощью ЖХМС, затем экстрагировали этилацетатом. Органический слой промывали солевым раствором и сушили над Na_2SO_4, фильтровали и упаривали. Остаток очищали нормально-фазовой хроматографией (Isco, от 0 до 60% этилацетата и гексана). Выход: 784 мг, 62%. Ион, найденный

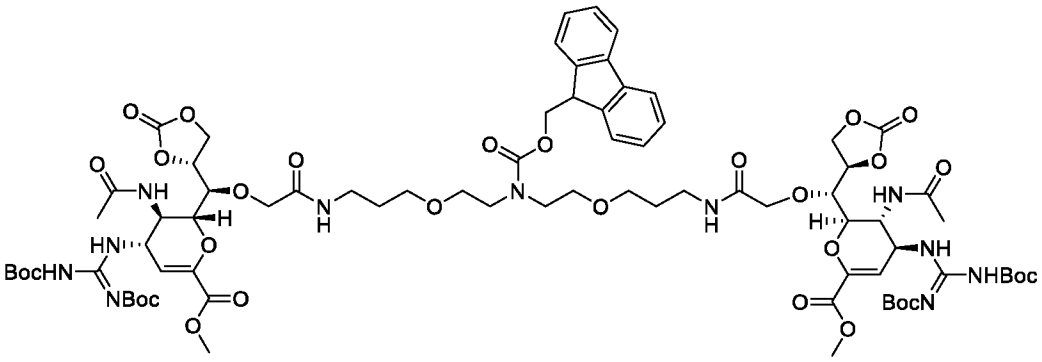
методом ЖХМС [M+H-Boc]+ = 542,0.

Стадия f.



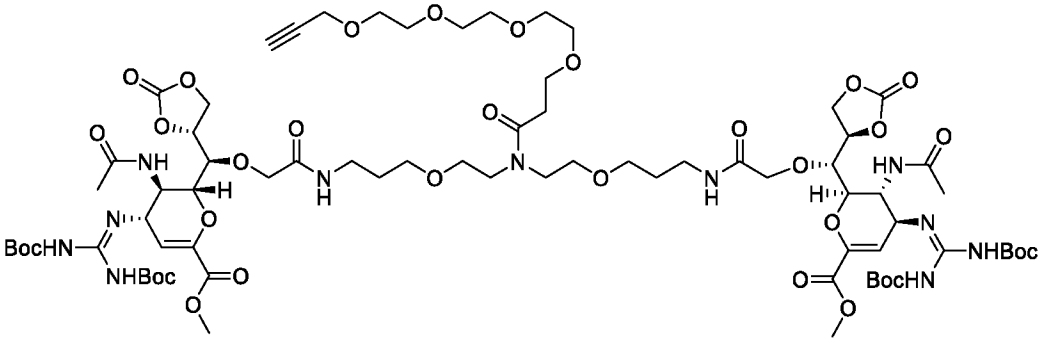
Продукт стадии e (1,01 г, 1,57 ммоль) перемешивали в ТФУ (5 мл) и CH_2Cl_2 (9 мл) при комнатной температуре в течение 1 часа, затем упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью ОФЖХ (Isco, от 5 до 100% метанола и воды без модификатора). Выход: 903 мг, 86%. Ион, найденный методом ЖХМС [M+H]+ = 442,2.

Стадия g.



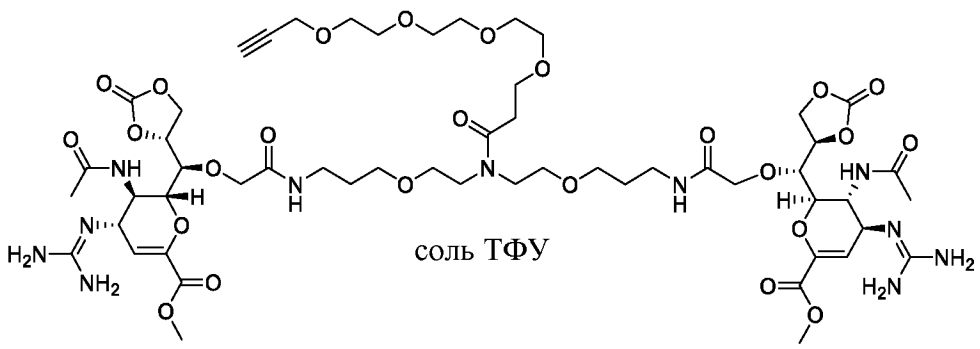
К смеси простого эфира кислоты занамивира (340 мг, 0,49 ммоль), продукта стадии f (111 мг, 0,25 ммоль, пример 31) и HATU (206 мг, 0,53 ммоль) в безводном ДМФ (3 мл) добавляли DIEA (162 мг, 1,23 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (Isco, от 30 до 100% метанола и воды без модификатора). Выход: 249 мг, 61%. Ион, найденный методом ЖХМС [(M+2H)/2]+ = 833,8.

Стадия h.



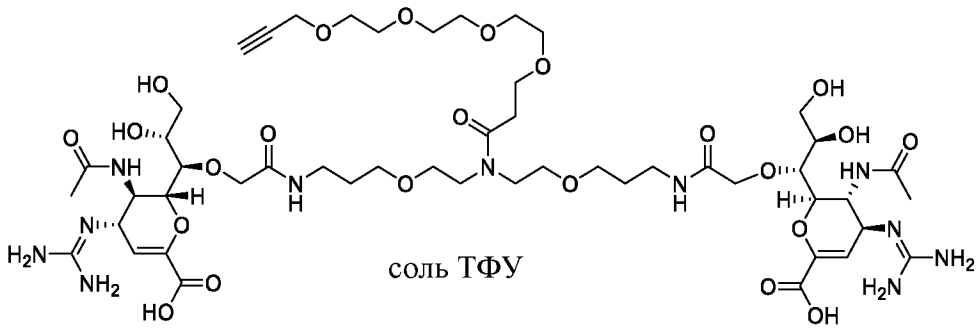
К раствору продукта стадии g (249 мг, 0,15 ммоль) в безводном ДМФ (0,5 мл) добавляли SilaMetS Thiol (1,2 г, 1,47 ммоль) и 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (12 мг, 0,07 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 1,5 часов, затем фильтровали непосредственно во флакон, содержащий HATU (69 мг, 0,18 ммоль), пропаргил-ПЭГ4-кислоту (43 мг, 0,16 ммоль) и DIEA (43 мг, 0,33 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (Isco, от 30 до 100% метанола и воды без модификатора). Выход: 298 мг, 118%. Ион, найденный методом ЖХМС [(M+2H-Boc)/2]+ = 843,9.

Стадия i.



Продукт стадии h (298 мг, 0,18 ммоль) растворяли в ТФУ (3 мл) и CH_2Cl_2 (3 мл), и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Затем его упаривали при пониженном давлении и очищали с помощью ВЭЖХ (ACCQ Isco, от 0 до 25% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 112 мг, 44%. Ионы, найденные методом ЖХМС [(M+2H)/2]+ = 643,8 и [(M+3H)/3]+ = 429,6.

Стадия j.



К раствору продукта стадии i (112 мг, 0,072 ммоль) в MeOH (4 мл) и воде (2 мл) добавляли LiOH (10,6 мг, 0,43 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем подкисляли ТФУ и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью ВЭЖХ (ACCQ Isco, от 0 до 25% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 37 мг, 36%. Ионы, найденные методом ЖХМС [(M+2H)/2]+ = 603,8, [(M+3H)/3]+ = 402,9.

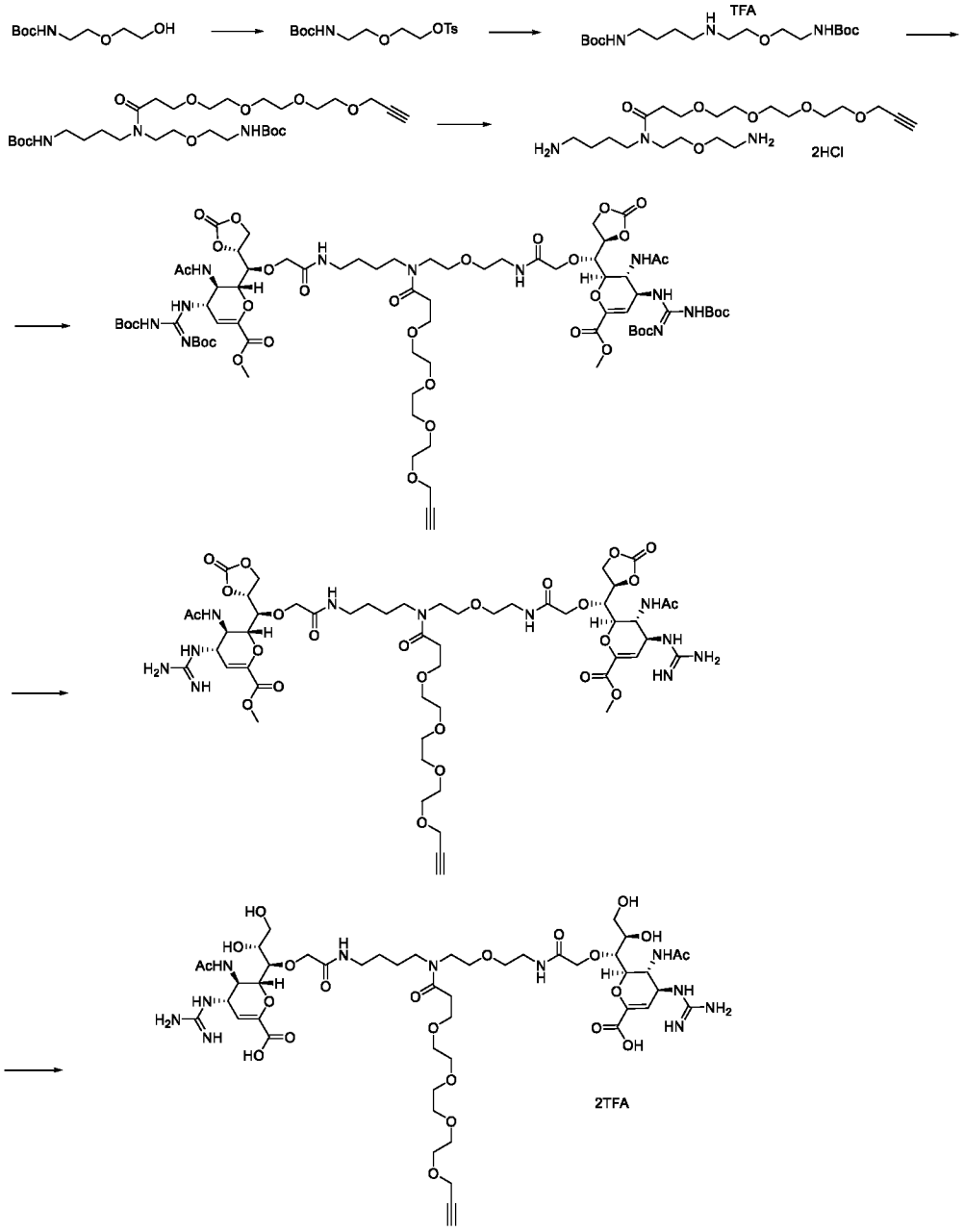
Пример 76. Синтез конъюгата 18

Раствор азидофункционализированного агликозилированного Fc (100 мг, 5,4 мл, 1,87 мкмоль, SEQ ID NO: 35) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином (16,1 мг, 0,011 ммоль, ПС 20). После осторожного встряхивания для растворения всех твердых веществ смесь добавляли к 3 мл предварительно перемешанного раствора натриевой соли L-аскорбиновой кислоты (149 мг, 0,75 ммоль, 0,25 М), сульфата меди (II) (2,4 мг, 0,015 ммоль, 0,005 М) и BTTAA (25,8 мг, 0,6 ммоль, 0,02 М) в буфере ФСБ 7,4. Полученный раствор осторожно встряхивали в течение ночи. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. Общий протокол очистки конъюгата в примере 10). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 56826 Да (DAR 2,2). Выход: 36,64 мг, 37%.

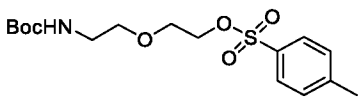
Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 18, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, который включает С-концевой

остаток лизина и N-концевую сигнальную последовательность мышиного IgG. После экспрессии С-концевая лизиновая и N-концевая сигнальные последовательности IgG мыши Fc конъюгата 18 протеолитически расщепляются, в результате чего образуется Fc, имеющий последовательность, в которой отсутствует Lys447 (например, отсутствует С-концевой лизиновый остаток), и N -концевая сигнальная последовательность мышиного IgG. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 77. Синтез ПС 21



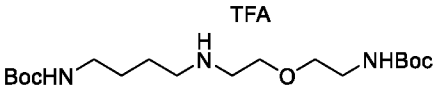
Стадия a.



К раствору 2-(2-Boc-аминоэтокси)этанола (6,15 г, 30 ммоль) в безводном ДХМ (60 мл) добавляли

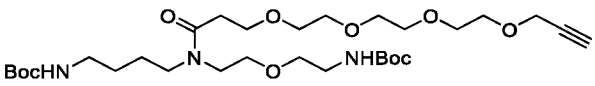
DIPEA (7,8 г, 60 ммоль) и DMAP (366,6 мг, 3 ммоль). Затем порциями в течение 30 минут добавляли п-толуолсульфонилхлорид (6,86 г, 36 ммоль). После перемешивания полученной смеси в течение 3 дней ее упаривали на роторном испарителе и очищали с помощью ОФЖХ (от 20% до 70% ацетонитрила/воды без модификатора). Выход: 3,71 г, 34,4%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M - Boc + H]^+ = 260$.

Стадия b.



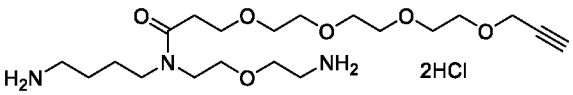
К раствору продукта стадии a (2,1 г, 5,83 ммоль) в безводном ТГФ (10 мл) добавляли карбонат натрия (1,24 г, 11,7 ммоль) и моно-N-Boc-1,4-диаминобутан (1,32 г, 7 ммоль). Полученную смесь нагревали при 60°C в течение 1 дня. Затем соль отфильтровывали и фильтрат упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 50% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 1,94 г, 88,6%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 376,0$.

Стадия c.



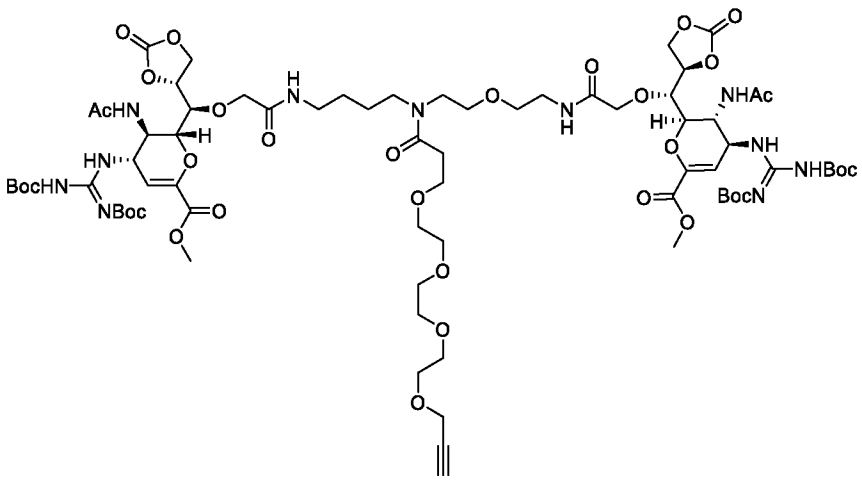
К раствору ПЭГ-4 пропаргиловой кислоты (781 мг, 3 ммоль) и HATU (1,14 г, 3 ммоль) в безводном ДМФ (3 мл) добавляли DIPEA (390 мг, 3 ммоль) с последующим добавлением раствора продукта стадии a (940 мг, 2,5 ммоль) и DIPEA (390 мг, 3 ммоль) в безводном ДМФ (3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 80% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 960,2 мг, 65,3%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 618,3$, $[M - Boc + H]^+ = 518,3$.

Стадия d.



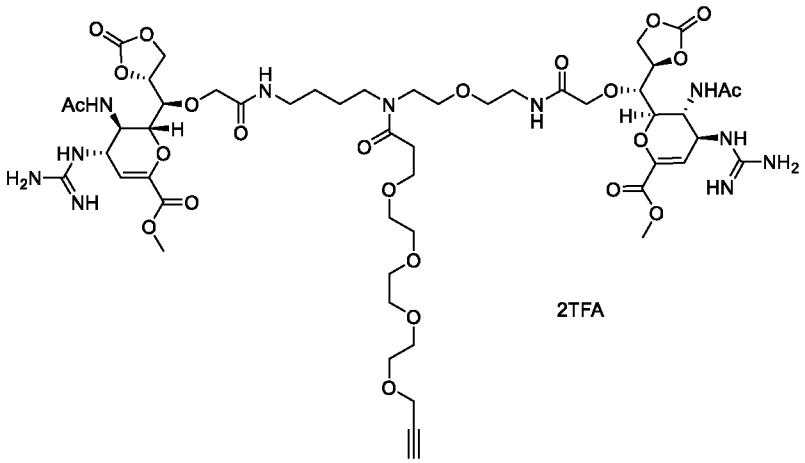
Продукт стадии c (960,2 мг, 1,63 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (6 мл). Добавляли раствор 4н HCl в диоксане (4 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Его упаривали на роторном испарителе. Остаток экстрагировали водой (3 мл × 3) и этилацетатом (10 мл). Объединенные водные слои лиофилизировали. Выход: 760 мг, 95,1%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 418,0$.

Стадия e.



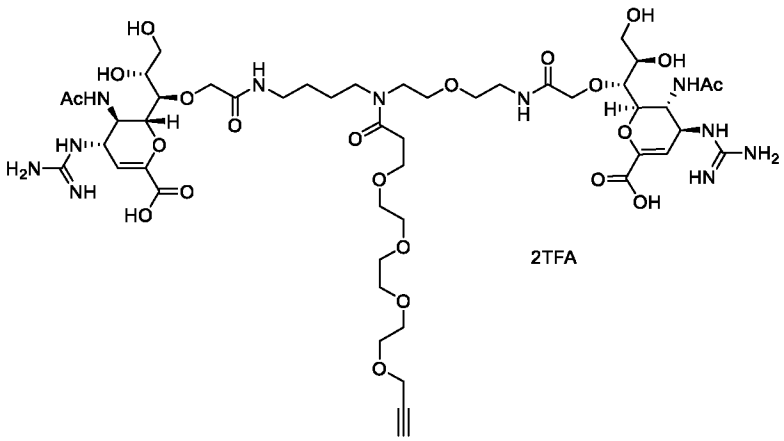
К смеси простого эфира кислоты занамивира (315 мг, 0,5 ммоль) и HATU (190 мг, 0,5 ммоль) в безводном ДМФ (1 мл) порциями добавляли раствор диаминового продукта стадии d (148 мг, 0,3 ммоль) и DIPEA (165 мг, 1,5 ммоль) в безводном ДМФ (1 мл) в течение 20 минут. После добавления реакционную смесь перемешивали в течение еще 30 минут и очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (50 г, от 30 до 90% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 233 мг, 56,7%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 821,3$.

Стадия f.



Продукт стадии e (233 мг, 0,142 ммоль) растворяли в ТФУ (1,5 мл) и раствор нагревали при 30°C в течение 30 минут. Затем его упаривали и непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (от 0 до 30% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 120 мг, 57,4%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 621,4$, $[(M + 3H)/3]^+ = 414,7$.

Стадия g.

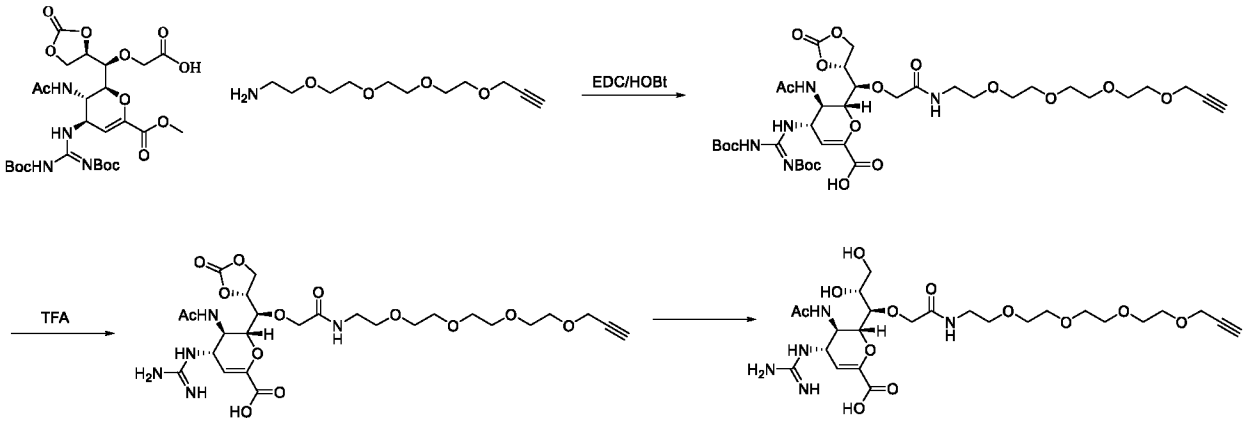


К раствору продукта стадии f (120 мг, 0,0816 ммоль) в MeOH (2 мл) добавляли раствор моногидрата LiOH (63 мг, 1,5 ммоль) в воде (2 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 1,5 часов, а затем упаривали на роторном испарителе. Остаток подкисляли раствором 4 н.HCl в диоксане (0,5 мл) и очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 15% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 98,2 мг, 86,6%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 581,8, $[(M + 3H)/3]^+$ = 388,2.

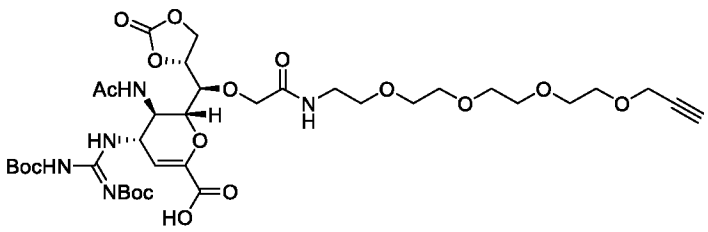
Пример 78. Синтез конъюгата 19

Этот конъюгат получали аналогично примеру 62 (конъюгат 13a) с помощью ПЭГ4-азидо-Fc (SEQ ID NO: 35, пример 61) и ПС 21 (пример 78). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 56548 Да (DAR = 2,1). Выход: 39,7 мг, 39,7%.

Пример 79. Синтез ПС 22



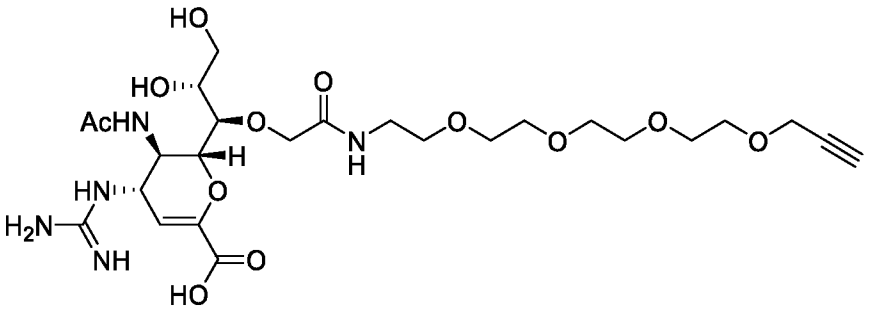
Стадия a.



К смеси простого эфира кислоты занамивира (1,8 г, 2,8 ммоль, пример 31) и пропаргил-ПЭГ4-амина (0,82 г, 3,5 ммоль, 1,2 экв.) в дихлорметане (50 мл) добавляли EDC (1,0 г, 5 ммоль), HOBt (0, 65 г, 5 ммоль) и

DIEA (1,4 мл, 10 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой с 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продуктов 1,35 г, 50,2%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =830,4.

Стадия b.

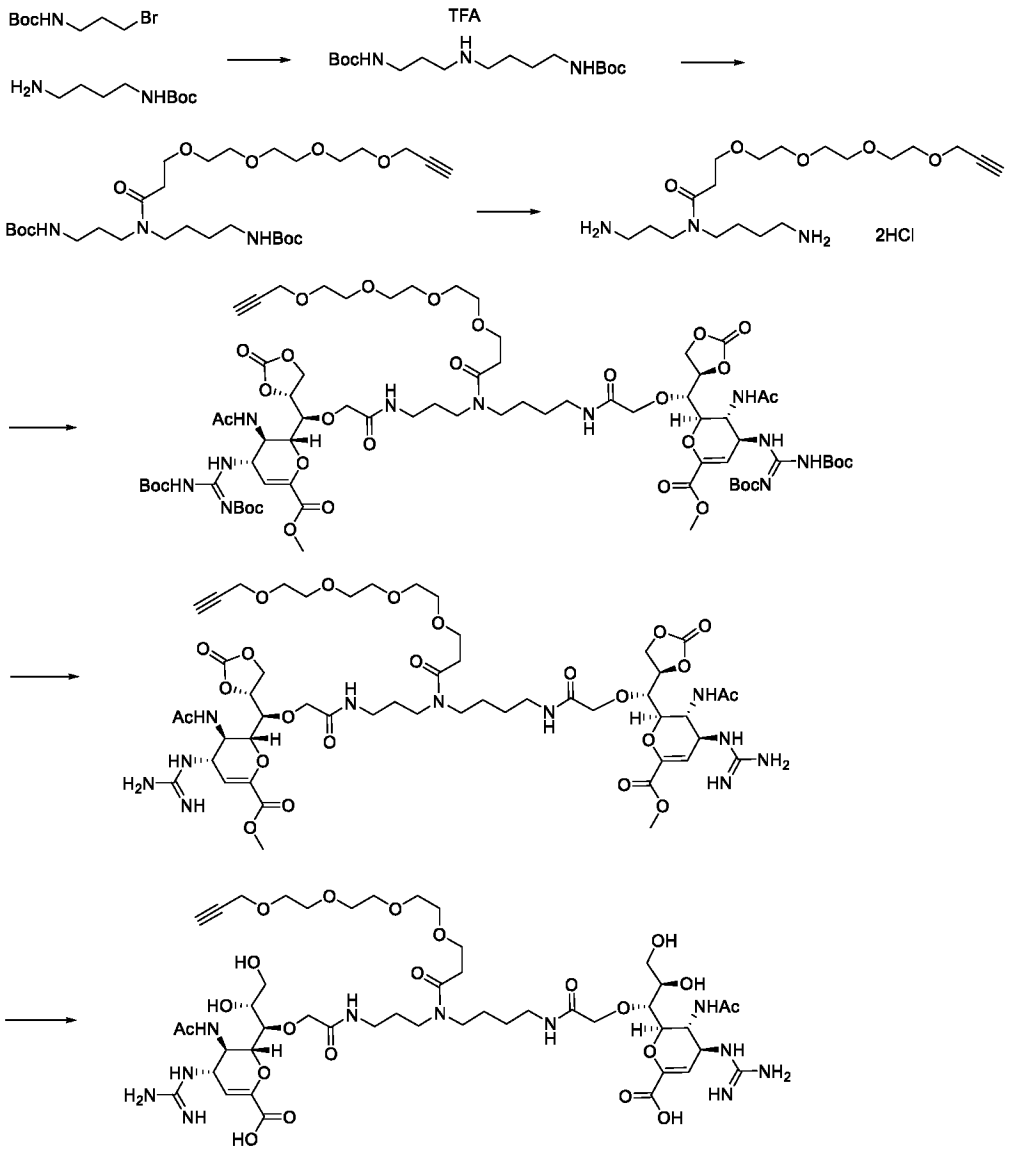


Продукт с предыдущей стадии (1,35 г, 1,6 ммоль) обрабатывали трифторуксусной кислотой (20 мл) в течение 30 минут при комнатной температуре. Полученный раствор упаривали, растворяли в воде (10 мл) и MeOH (10 мл), затем обрабатывали раствором гидроксида лития (120 мг, 5 ммоль) в воде (10 мл). Реакционный раствор перемешивали 10 мин, затем гасили 0,5 мл уксусной кислоты. Реакционную смесь упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 50% ацетонитрилом и водой, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход продуктов 510 мг, 52,8%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =604,3.

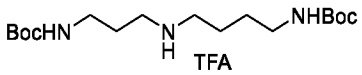
Пример 80. Синтез конъюгата 20

Этот конъюгат получали аналогично примеру 62 (конъюгат 13a) с помощью ПЭГ4-азидо-Fc (SEQ ID NO: 35, пример 61) и ПС 22 (пример 79). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 55508 Да (DAR = 2,3). Выход: 37,0 мг, 37,0%.

Пример 81. Синтез ПС 23

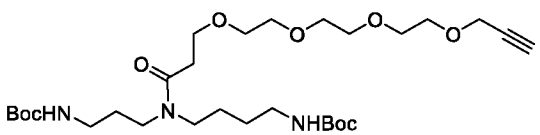


Стадия a.



К раствору N-Boc-1,4-диаминобутана (941,5 мг, 5 ммоль) в безводном ТГФ (10 мл) добавляли карбонат натрия (1,06 г, 10 ммоль) и 3-(Boc-амино)пропилбромид (1,43 г, 6 ммоль). Полученную смесь нагревали при 50°C в течение 1 дня. Затем соль фильтровали и упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 50% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 1,35 г, 58,8%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 346,0$.

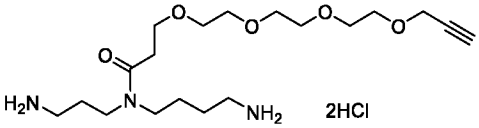
Стадия b.



К раствору ПЭГ-4 пропаргиловой кислоты (781 мг, 3 ммоль) и HATU (1,14 г, 3 ммоль) в безводном

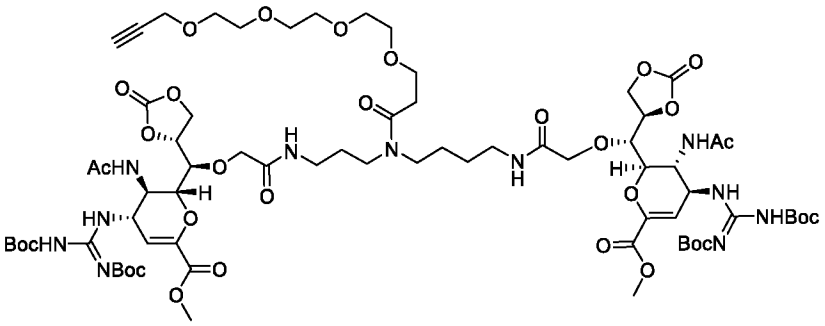
ДМФ (3 мл) добавляли DIPEA (390 мг, 3 ммоль) с последующим добавлением раствора продукта стадии a (863,8 мг, 2,5 ммоль) и DIPEA (390 мг, 3 ммоль) в безводном ДМФ (3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 80% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 1,19 г, 81%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 588,3$.

Стадия c.



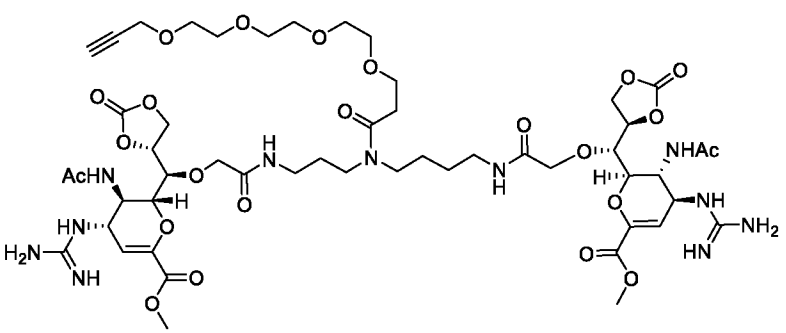
Продукт стадии b (1,19 г, 2,02 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (6 мл). Добавляли раствор 4н HCl в диоксане (4,5 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 дня. Его упаривали на роторном испарителе. Остаток экстрагировали водой (3 мл × 3) и этилацетатом (15 мл). Объединенные водные слои лиофилизировали. Выход 940 мг, количественный выход. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 388,3$.

Стадия d.



К смеси простого эфира кислоты занамивира (315 мг, 0,5 ммоль, пример 31) и HATU (209,1 мг, 0,55 ммоль) в безводном ДМФ (1 мл) добавляли DIPEA (65 мг, 0,5 ммоль). Через 5 минут раствор продукта стадии c (170 мг, 0,439 ммоль) и DIPEA (130 мг, 1 ммоль) в безводном ДМФ (1 мл) порциями добавляли в течение 20 минут. Реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных 30 минут, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (50 г, от 30 до 90% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 208 мг, 51,6%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 806,7$.

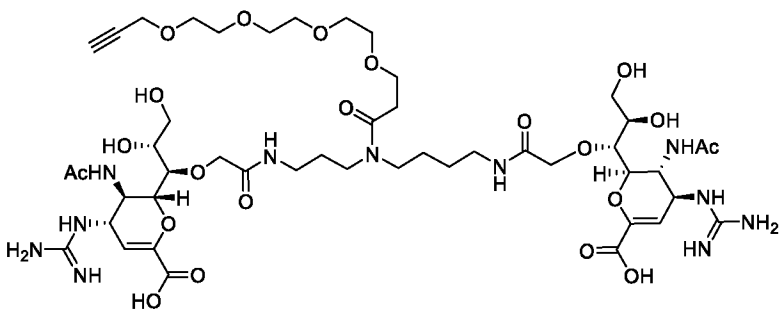
Стадия e.



Продукт стадии d (208 мг, 0,129 ммоль) растворяли в ТФУ (1,5 мл) и раствор нагревали при 30°C в течение 30 минут. Затем его непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (100 г, от 0 до 30% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 134 мг, 72%. Ион(-ы), найденный(-ые)

методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 606,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 405,0$.

Стадия f.



К раствору продукта стадии e (134 мг, 0,093 ммоль) в MeOH (2 мл) добавляли раствор моногидрата LiOH (63 мг, 1,5 ммоль) в воде (2 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 1,5 часов, а затем упаривали на роторном испарителе. Остаток подкисляли раствором 4 н.HCl в диоксане (0,5 мл) и очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 15% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 78,4 мг, 62%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 566,4$, $[(M + 3H)/3]^+ = 378,4$.

Пример 82. Синтез конъюгата 21

Этот конъюгат получали аналогично примеру 62 (конъюгат 13a) с помощью ПЭГ4-азидо-Fc (SEQ ID NO: 35, пример 61) и ПС 23 (пример 81). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 56503 Да (DAR = 2,2). Выход: 34,4 мг, 34%.

Пример 83. Активность конъюгатов 13-21 против высокопатогенного штамма вируса гриппа A H7N9 и двух изолятов вируса гриппа в анализе цитопатических эффектов (CPE)

Всего 9 конъюгатов (таблица 38) были обработаны при концентрациях 100, 10, 1 и 0,1 нМ и сравнивались с рибавирином в анализе CPE. Анализ CPE был проведен с соблюдением стандартной методологии, но вкратце в ходе него использовали 80-100% конфлюэнтных монослоев клеток MDCK в 96-луночном планшете. К ним добавляли исследуемые препараты в трех повторностях и инкубировали при 37°C (+ 5% CO_2) до тех пор, пока эффекты CPE не стали визуально очевидными. Как только CPE был отмечен, слои клеток окрашивали 0,011% нейтральным красным в течение приблизительно 2 часов. После этого добавляли смесь цитратного буфера Соренсена/этанола 50:50 и оставляли для инкубации в течение 30 минут, затем A_{540} считывали на спектрофотометре и значения EC_{50}/CC_{50} рассчитывали с помощью регрессионного анализа.

Все конъюгаты обладали значительной активностью против изолята гриппа B/Florida/4/2006 со значениями EC_{50} в диапазоне от 3,05 до 33,5 нм (таблица 39). В среднем конъюгаты продемонстрировали 275-кратное преимущество в активности по сравнению с рибавирином (EC_{50} 3250 нМ). Активность конъюгатов против гриппа B/Brisbane/60/2008 была очень похожа на активность конъюгата против гриппа B/Florida, за исключением конъюгата 14, который имел EC_{50} более 100 нМ.

Важно отметить, что все конъюгаты также были высокоактивными в отношении изолята высокопатогенного штамма вируса гриппа A/Anhui/1/2013 (H7N9). Среднее значение EC_{50} для всех конъюгатов составляло 21,2 нМ против этого изолята (от 12 до 28,5 нМ) по сравнению с 14 000 нМ для рибавирина. Наконец, не было обнаружено прямого цитотоксического действия конъюгатов на монослои MDCK при тестируемых концентрациях.

Таблица 38: Конъюгаты и свойства

Конъюгат	**Промежут. соед.**	**Fc-домен**	**DAR**	**Линкер**	**Примечания**
13	18	SEQ ID NO: 35	2,2	15 атом	простой эфир, димер
14	7	SEQ ID NO: 35	2,1	15 атом	карбамат, димер
15	12	SEQ ID NO: 35	2,2	15 атом	простой эфир, димер
16	9	SEQ ID NO: 35	2,1	17 атом	простой эфир, димер
17	19	SEQ ID NO: 35	2,2	17 атом	простой эфир, димер
18	20	SEQ ID NO: 35	2,2	19 атом	простой эфир, димер
19	21	SEQ ID NO: 35	2,1	16 атом	простой эфир, димер
20	22	SEQ ID NO: 35	2,3	нд	простой эфир, мономер
21	23	SEQ ID NO: 35	2,2	14 атом	простой эфир, димер

Таблица 39: Активность конъюгатов в анализе CPE против подтипов гриппа

Конъюгат	**EC50 (нМ)***		
	A/Anhui/1/2013 (H7N9)	**B/Brisbane/60/2008**	**B/Florida/4/2006**
	(зоонозный птичий)	(линия Виктория)	(линия Ямагата)
Рибавирин	14000	3300	3250
13	24	21	33,5
14	12	>100	18,5
15	21,5	5,95	4,6
16	28,5	14,5	11
17	28**	11	13
18	31	4,35	3,05
19	14,5	6,8	4,55
20	20,5	12,5	14,5
21	17,5	4,05	3,05
*Среднее 2 значений (VIS + NR)			
**EC50 из 28 по VIS, > 100 по NR			

Пример 84. Синтезы конъюгата 22

Стадия a. Синтез ПЭГ4-азидо IVIG

Получение 0,05 М раствора сложного эфира ПЭГ4-азидоNHS в ДМФ/ФСБ: 6,05 мг ПЭГ4-азидо NHS эфира растворяли в 0,050 мл ДМФ при 0 °C и разбавляли до 0,305 мл добавлением 0,250 мл 1x буфера ФСБ при 0 °C. Этот раствор использовали для получения другого ПЭГ4-азидо IVIG с различными значениями DAR путем корректировки эквивалентов этого раствора ПЭГ4-азидо NHS эфира и ФСБ

Получение ПЭГ4-азидо IVIG: 0,05 М ПЭГ4-азидо-NHS-эфирный буферный раствор ФСБ (0,301 мл, 15,0 мкмоль, 5,5 эквивалента) добавляли к раствору IVIG (внутривенный иммунный глобулин, Baxter)) (407 мг в 9,25 мл ФСБ с pH 7,4, ММ ~ 148 863 Да, 1,968 мкмоль) и смесь осторожно встряхивали в течение 12 часов при температуре окружающей среды. Раствор упаривали с использованием центробежного концентратора

(100 000 MWCO) до объема ~1,5 мл. Неочищенную смесь разбавляли 1:10 в ФСБ с pH 7,4 и снова упаривали. Эту процедуру промывки повторяли в общей сложности три раза. Низкомолекулярный реагент с помощью этой процедуры промывки. Концентрированный IVIG-ПЭГ4-азид разбавляли до 9,25 мл буфером ФСБ 1x с pH 7,4 и он был готов для клик-конъюгации. Очищенный материал количественно определяли с использованием УФ-спектрофотометра NANODROP™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности IVIG). Выход является количественным после очистки.

Стадия b. Синтез конъюгатов

Получение раствора реагента для клик-реакции: 0,0050M $CuSO_4$ в буферном растворе ФСБ: 10,0 мг $CuSO_4$ растворили в 12,53 мл ФСБ x1, затем взяли 6,00 мл 0,0050M раствора $CuSO_4$ и добавили 57,7 мг BTTAA (номер CAS 1334179-85-9) и 297,6 мг аскорбата натрия с получением раствора реагента для клик-реакции (0,0050 M CuSO4, 0,020 M BTTAA и 0,25 M аскорбата натрия).

Раствор азидофункционализированного IVIG (140 мг, 3,17 мл, 0,936 мкмоль, IVIG-линкер-1-азид) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, модифицированную алкином (8,4 мг, 0,00618 ммоль, 6,6 экв., описано в пример 60). После осторожного встряхивания для растворения всех твердых веществ 1,50 мл указанного выше раствора реагента для клик-реакции (натриевая соль L-аскорбиновой кислоты, 0,25 M, 74,2 мг, 0,374 ммоль, сульфат меди (II) 0,0050 M, 1,2 мг, 0,0075 ммоль и BTTAA 0,020 M, 12,9 мг, 0,0300 ммоль). Полученную смесь осторожно встряхивали в течение ночи. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином A с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. протокол очистки конъюгата в примере 10). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 151873 Да (DAR = 2,7). Выход 51,0 мг, выход 36%.

Пример 85. Синтезы конъюгата 23

Конъюгат 23 получали аналогично конъюгату 22, заменяя подходящую функционализированную алкином малую молекулу (ПС 23, описанное в примере 81) на стадии клик-конъюгации.

Пример 86. Синтезы конъюгата 24

Конъюгат 24 получали аналогично конъюгату 22, заменяя подходящую функционализированную алкином малую молекулу (описано в примере 19) на стадии клик-конъюгации.

Пример 87. Эффективность конъюгатов 13, 14 и 21 против гриппа B на летальной мышиной модели

Конъюгаты оценивали против летальной инфекции гриппа B у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (B/Malaysia/2506/04) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 11 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл (приблизительно 1E4 на мышь), после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно).

Все группы получали однократную в/в обработку исследуемым препаратом или носителем (ФСБ), или контролем только Fc (Fc hIgG1) через 2 часа после заражения. В исследовании оценивали ПС 18, ПС 7 и ПС 23, конъюгированные с идентичными Fc-мономерами (конъюгаты 13, 14 и 21, соответственно), исследуемые при дозах 3,0, 1,0 и 0,3 мг/кг. За мышами осуществляли наблюдение в течение 2 недель, и

животных, у которых потеря массы тела превышала 20% или, которые были обнаружены в агональном состоянии, засчитывали как умершие.

Все мыши, получавшие носитель или контроль только Fc, умерли к дню 7. Напротив, мыши, получавшие конъюгаты 13, 14 и 21, были полностью защищены после получения однократной в/в дозы 0,3 мг/кг (таблица 40). Как и ожидалось, группы, получавшие конъюгаты в дозе 1,0 или 3,0 мг/кг, также были полностью защищены. Эффективность всех конъюгатов против гриппа B дополнительно подтверждается ежедневными измерениями массы тела (таблица 41), которые показывают временное падение менее чем на 5% в течение всего исследования для любой группы, обработанной конъюгатом. Активность конъюгатов 13, 14 и 21 является сопоставимой по дозе с активностью конъюгата 6 против подтипов H1N1 и H3N2 гриппа A. Поскольку конъюгаты 6 и 14 имеют идентичные нацеливающие фрагменты (соответствующие ПС 7), один конъюгат может быть активен против доминирующих типов сезонного гриппа (гриппа A (H1N1), гриппа A (H3N2) и гриппа B).

Таблица 40. Данные по смертности в конце исследования (день 14). В среднем 5 мышей; p-значения, рассчитанные посредством применения логрангового критерия (Мантеля — Кокса)

Соединение	**Дозировка (мг/кг)**	**% выживаемости**	**Значимость для носителя (p-значения)**
Носитель (ФСБ)	нд	0	нд
Только Fc	3,0	0	p=1
Конъюгат 13	0,3	100	(0,0027)
	1,0	100	(0,0027)
	3,0	100	(0,0027)
Конъюгат 14	0,3	100	p=0,0027
	1,0	100	p=0,0027
	3,0	100	p=0,0027
Конъюгат 21	0,3	100	(0,0027)
	1,0	100	(0,0027)
	3,0	100	(0,0027)

Таблица 41: Данные по массе тела мышей (% МТ относительно дня 0). В среднем 5 мышей; *данные не включаются, когда первое животное в группе умирает

День после	**Носитель (ФСБ)**	**Только Fc**	**Конъюгат 14 (мг/кг)**

заражения		3,0	0,3	1,0	3,0
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	98,1	98,1	99,3	99,1	96,5
2	99,6	96,7	98,6	98,6	98,3
3	96,4	94,9	96,8	97,0	98,7
4	89,8	87,8	98,4	97,5	97,8
5	83,6	80,8	97,4	97,8	98,0
6	79,0	76,1	96,9	98,3	99,7
7	*	*	99,2	100,5	100,6
8	*	*	100,3	101,9	101,1
9	*	*	102,5	100,4	100,6
10	*	*	100,6	102,0	101,2
11	*	*	100,9	100,9	100,9
12	*	*	101,8	101,7	101,8
13	*	*	101,4	101,7	101,4
14	*	*	102,2	102,6	102,2

Пример 88. Синтез ПЭГ4-азидо Fc для конъюгата 25, конъюгата 26, конъюгата 27 и конъюгата 28

Получение 0,05 М раствора сложного эфира ПЭГ4-азидоNHS в ДМФ/ФСБ x1: 27,40 мг ПЭГ4-азидо NHS эфира растворяли в 0,155 мл ДМФ при 0 °C и разбавляли добавлением 1,200 мл 1x буфера ФСБ при 0 °C. Этот раствор использовали для получения других ПЭГ4-азидо-Fc с различными значениями DAR путем корректировки эквивалентов этого раствора сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS и x1 ФСБ.

Получение ПЭГ4-азидо Fc (SEQ ID NO: 48): раствор 0,05 М сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS и x1 ФСБ (0,0984 мл, 4,92 мкмоль, 2,5 эквивалента) добавляли к раствору Fc h-IgG1 (SEQ ID NO: 48) (234 мг в 13,605 мл ФСБ с pH 7,4, ММ ~ 57976 Да, 4,036 мкмоль), и смесь осторожно встряхивали в течение 2 часов при температуре окружающей среды. Раствор упаривали с использованием центробежного концентратора (30 000 MWCO) до объема ~ 2 мл. Неочищенную смесь разбавляли 1:7 в ФСБ с pH 7,4 и снова упаривали. Эту процедуру промывки повторяли в общей сложности три раза. Низкомолекулярный реагент с помощью этой процедуры промывки. Концентрированный Fc(SEQ ID NO: 48)-ПЭГ4-азид разбавляли до 13,60 мл буфером ФСБ 1x с pH 7,4 и он был готов для клик-конъюгации. Очищенный материал количественно определяли с использованием УФ-спектрофотометра NANODROP™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности h-IgG1).

Получение ПЭГ4-азидо Fc (SEQ ID NO: 50) аналогично полученному выше ПЭГ4-азидо Fc (SEQ ID NO: 48).

Пример 89. Синтез конъюгата 25

Получение раствора реагента для клик-реакции: 0,0050M $CuSO_4$ в буферном растворе ФСБ x1: 10,0 мг $CuSO_4$ растворяли в 12,53 мл ФСБ x1, затем брали 10,0 мл данного раствора $CuSO_4$ и добавляли 86,1 мг BTTAA и 495,3 мг аскорбата натрия с получением раствора реагента для клик-реакции (0,0050 М CuSO4,

0,020 M BTTAA и 0,25 M аскорбата натрия). Этот раствор реагента для клик-реакции будет использоваться для конъюгата 25 и конъюгата 26.

Раствор азидофункционализированного Fc (78,0 мг, 4,535 мл, 1,35 мкмоль, SEQ ID NO: 48-ПЭГ4-азид) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином (13,2 мг, 8,88 мкмоль, ПС 23). После осторожного встряхивания для растворения всех твердых веществ к смеси добавляли 2,153 мл указанного выше раствора реагента для клик-реакции (натриевая соль L-аскорбиновой кислоты, 0,25 M, 106,6 мг, 0,538 ммоль, сульфат меди (II) 0,0050 M, 1,72 мг, 0,0107 ммоль и BTTAA 0,020M, 18,5 мг, 0,0431 ммоль). Полученную смесь осторожно встряхивали в течение 6 часа при температуре окружающей среды. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. протокол очистки конъюгата в примере 10). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 60973 Да (DAR = 2,1). Выход 50,3 мг, выход 64%.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 25, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, который включает С-концевой остаток лизина и N-концевую сигнальную последовательность мышиного IgG. После экспрессии С-концевая лизиновая и N-концевая сигнальные последовательности IgG мыши Fc конъюгата 25 протеолитически расщепляются, в результате чего образуется Fc, имеющий последовательность, в которой отсутствует Lys447 (например, отсутствует С-концевой лизиновый остаток), и N -концевая сигнальная последовательность мышиного IgG. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 90. Синтез конъюгата 26

Получение конъюгата 26 было аналогично получению конъюгата 25 с использованием той же серии ПЭГ4-азидо Fc (SEQ ID NO: 48) и небольшой молекулы, дериватизированной алкином (ПС 7). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 61068 Да (DAR = 2,2). Выход 49,5 мг, выход 63%.

Пример 91. Синтез конъюгата 27

Получение раствора реагента для клик-реакции: 0,0050M $CuSO_4$ в буферном растворе ФСБ x1: 10,0 мг $CuSO_4$ растворяли в 12,53 мл ФСБ x1, затем брали 12,0 мл данного раствора $CuSO_4$ и добавляли 103,3 мг BTTAA и 594,3 мг аскорбата натрия с получением раствора реагента для клик-реакции (0,0050 M CuSO4, 0,020 M BTTAA и 0,25 M аскорбата натрия). Этот раствор реагента для клик-реакции будет использоваться для конъюгата 28.

Раствор азидофункционализированного Fc (80,0 мг, 4,535 мл, 1,38 мкмоль, SEQ ID NO: 50-ПЭГ4-азид) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином (13,5 мг, 9,10 мкмоль, ПС 23). После осторожного встряхивания для растворения всех твердых веществ к смеси добавляли 2,21 мл вышеуказанного раствора реагента для клик-реакции (натриевая соль L-аскорбиновой кислоты, 0,25 M, 109,3 мг, 0,552 ммоль, сульфат меди (II) 0,0050 M, 1,76 мг, 0,0110 ммоль и BTTAA 0,020M, 19,0 мг, 0,0441 ммоль). Полученную смесь осторожно встряхивали в течение 6 часа при температуре окружающей среды. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. протокол очистки конъюгата в примере 10). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 61447 Да

(DAR = 2,5). Выход 37,1 мг, выход 46%.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 27, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50, который включает C-концевой остаток лизина и N-концевую сигнальную последовательность мышиного IgG. После экспрессии C-концевая лизиновая и N-концевая сигнальные последовательности IgG мыши Fc конъюгата 27 протеолитически расщепляются, в результате чего образуется Fc, имеющий последовательность, в которой отсутствует Lys447 (например, отсутствует C-концевой лизиновый остаток), и N -концевая сигнальная последовательность мышиного IgG. Наличие или отсутствие C-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 92. Синтез конъюгата 28

Получение конъюгата 28 было аналогично получению конъюгата 27 с использованием той же серии ПЭГ4-азидо Fc (SEQ ID NO: 50) и небольшой молекулы, дериватизированной алкином (ПС 7). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 61388 Да (DAR = 2,4). Выход 44,6 мг, выход 56%.

Пример 93. Активность конъюгата 6 и конъюгата 21 против высокопатогенного штамма вируса гриппа A (H5N1, H7N9) в анализе цитопатических эффектов (CPE)

Анализ in vitro для определения активности конъюгатов по изобретению проводили против BSL-3 (высокопатогенный штамм) гриппа A и, как правило, с соблюдением стандартных процедур. Вкратце, различные концентрации конъюгатов смешивали с вирусом (приблизительно 250 TC_{ID50}) и позволяли инкубации при 35 °C в течение одного часа. После инкубации смесь добавляли к 80-90% конфлюэнтному монослою клеток MDCK. После 90-минутной инкубации клетки промывали и повторно наносили конъюгаты. Затем монослой покрывали карбоксиметилцеллюлозой, чтобы минимизировать распространение вируса, и оставляли инкубироваться в течение двух дней. Через два дня культивирования клетки промывали ФСБ и фиксировали 10% формалином. После фиксации монослой MDCK подвергали проницаемости с помощью Triton X-100 и иммуноокрашивали мышиным mAb против нуклеопротеина гриппа. Монослои считывали и рассчитывали площадь окрашивания на лунку для определения значений $EC_{50/100}$.

Результаты исследования обобщены в таблице 42 и демонстрируют активность конъюгата 6 и конъюгата 21 против высокопатогенных штаммов с пандемическим потенциалом. Важно отметить, что оба конъюгата генерировали значения EC_{100} на уровне 15 нМ или ниже по сравнению с четырьмя изолятами H5N1 и одним изолятом H7N9. Напротив, осельтамивир имел EC_{100} приблизительно 15 нМ только против одного изолята (A/Vietnam/1194/2004) и значения колебались в диапазоне от 125 до >1000 нМ против других высокопатогенных штаммов. Эти результаты свидетельствуют о том, что потенциал конъюгата 6 и конъюгата 21 для лечения во время пандемий, вызванных высоковирулентным гриппом, превосходит потенциал осельтамивира.

Таблица 42: Активность конъюгата 6 и конъюгата 12 in vitro против изолятов высокопатогенных штаммов вируса гриппа

Высокопатогенный штамм гриппа	**EC100 (нМ) (CPE в клетках MDCK)**			
H5N1	**Носитель**	**Конъюгат 6**	**Конъюгат 21**	**Осельтамивир**
A/Indonesia/5/2005 (клада 2.1)	Н/П	~15	<15	~200 - 500
A/Vietnam/1194/2004 (клада 1)	Н/П	~15	<15	~15
A/turkey/Turkey/1/2005 (клада 2.2)	Н/П	<15	<15	~125 - 250
A/Hong Kong/156/1997 (клада 0)	Н/П	~15	<15	>1000
H7N9				
A/Anhui/01/2013	Н/П	<15	<15	~500 - 1000
H1N1 (положительный контроль)				
A/Netherlands/602/2009	Н/П	<15	<15	~1000

Пример 94. Активность конъюгата 6 и конъюгата 21 против вируса гриппа A (H1N1) при разной множественности заражения (MOI) в анализе цитопатических эффектов (CPE)

Клетки MDCK высевали из расчета 4 × 10^4 клеток/лунку в среду MEM в 96-луночный планшет (обработанный TC) и инкубировали при 37 °C, 5% CO_2 в течение 18-24 часов. Исследуемые препараты (занамивир, осельтамивир, балоксавир, конъюгат 6 и конъюгат 21) в диапазоне доз от 1,93 до 10000 нМ инкубировали с гриппом A/WSN/1933 при множественности заражения (MOI) вируса:клетки от 0,001 до 1 в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Через 1 час предварительно инкубированный вирус и исследуемый препарат добавляли к 90-100% конфлюэнтному монослою клеток MDCK и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре.

Через 1 час в лунки добавляли среду MEM с добавлением L-глутамина и пенициллина/стрептомицина. Инфицированные клетки инкубировали при 37 °C, 5% CO_2 в течение 72 часов. CPE определяли после фиксации и окрашивания клеток кристаллическим фиолетовым. EC50 рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6. Результаты анализа CPE, представленные в таблице 43, показывают, что конъюгат 6 и конъюгат 21 превосходят стандартные средства *in vitro*, в частности при высоких значениях MOI.

Таблица 43: Активность конъюгата 6 и конъюгата 12 против гриппа A (H1N1) in vitro при различной множественности заражения

EC_{50} (нМ) H1N1 A/WSN/1933 (CPE в клетках MDCK)

	MOI 0,001	MOI 0,01	MOI 0,1	MOI 1
Занамивир	137	938	>10000	>10000
Осельтамивир	525	1896	>10000	>10000
Балоксавир	5	4	79	>100
Конъюгат 6	9	15	>100	>100
Конъюгат 12	0,6	2	7	10

Пример 95. Эффективность конъюгата 6 против гриппа A (H1N1) на мышиной модели летального тяжелого комбинированного иммунодефицита

Конъюгаты оценивали против летальной инфекции гриппа A у самцов мышей линии BALB/c с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) (Stock #001803; Jackson Laboratories; Jackson Laboratories, возраст 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/08/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 5 групп по 5 мышей в каждой. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл (приблизительно 1E3 на мышь) после анестезии смесью кетамина и ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Все группы получали однократную в/в обработку конъюгатом 6 через 2 часа после заражения вирусом исследуемым препаратом или носителем (ФСБ), или контролем только Fc (Fc hIgG1). В исследовании оценивали 3 различные концентрации доз конъюгата 6 (0,3, 1,0 или 3,0 мг/кг). За мышами осуществляли наблюдение в течение 5 недель, и животных, у которых потеря массы тела превышала 20% или, которые были обнаружены в агональном состоянии, засчитывали как умершие. Также регистрировали массу тела, чтобы контролировать общее состояние здоровья животных.

Все мыши, получавшие носитель или контроль только Fc, умерли к неделе 2. Напротив, мыши, получавшие конъюгат 6, были полностью защищены после получения однократных внутривенных доз 1 или 3 мг/кг в течение всего исследования (фиг. 56, таблица 44). Когда доза конъюгата 6 была снижена до 0,3 мг/кг, выживаемость упала до 20% к концу исследования. Доза 0,3 мг/кг была полностью защищена в течение 3 недель. Эффективность конъюгата 6 в этой модели тяжелого иммунодефицита дополнительно подтверждается данными по массе тела (фиг. 57, таблица 45). Группы, получавшие конъюгат 6 в дозах 1 или 3 мг/кг, продемонстрировали не более чем временную потерю массы тела менее 3% в течение всего исследования. Кроме того, к концу исследования обе группы дозирования продемонстрировали чистую прибавку в массе (7,5 и 2,2%, соответственно). Группа, получавшая самую низкую концентрацию конъюгата 6 (0,3 мг/кг), имела менее чем 4% временную потерю массы тела в течение первых 3 недель исследования до появления признаков инфекции на неделе 4, что в конечном итоге привело к смерти четырех из пяти животных.

В совокупности эти данные демонстрируют активность конъюгата 6 в плане защиты мышей, которые были подвергнуты заражению летальным вирусом, с однократными в/в дозами конъюгата всего лишь 1 мг/кг. Кроме того, эта защита была длительной и, ее действие продолжалось в течение более 5 недель исследования. Это было достигнуто на экстремальной модели иммунодефицита у мышей, полностью лишенных иммунных Т- и В-клеток, которые необходимы для избавления от инфекций гриппа. Эти данные подтверждают возможность применения конъюгата 6 для лечения как иммунокомпетентных популяций пациентов, так и пациентов с ослабленным иммунитетом.

Таблица 44: Смертность в группах исследуемых доз в неделю

Исследуемый препарат	**% Выживаемости (день после заражения вирусом)**				
	7	**14**	**21**	**28**	**35**
Носитель	80	0	0	0	0
Только Fc	80	0	0	0	0
Конъюгат 6 (3 мг/кг)	100	100	100	100	100
Конъюгат 6 (1 мг/кг)	100	100	100	100	100
Конъюгат 6 (0,3 мг/кг)	100	100	100	80	20

Таблица 45: Средняя групповая масса тела для исследуемых животных через 35 дней или до первой смерти в группе

День	**Носитель**	**Только Fc**	**Доза конъюгата 6**		
			3 мг/кг	1 мг/кг	0,3 мг/кг
0	100	100	100	100	100
1	99,5	99,8	99,6	99,4	98,6
2	98,8	99,2	99,9	99,1	98,9
3	97,7	96,8	101	100,6	97,9
4	94,4	95,4	99,4	98,4	98,5
5	93,7	90,7	100,6	97,9	99,3
6	88,7	83,9	101,2	98,7	98,1
7	81,1	77,6	101,8	98	96,9
8			101,3	99,7	98,9
9			102,6	100,7	98,8
10			101,6	99,8	99,4
11			101,6	99,7	100,3
12			101,8	100,2	100,7
13			102,3	101	100,7
14			103,9	100,5	99,9
15			104,3	101,8	102,3
16			104,3	102	101,3
17			104,3	100,6	102
18			105,4	103,9	100,5
21			105,7	105,9	96,8
22			105,5	103,4	93,9
23			105,6	106,9	91
24			108,4	102,9	
25			106,4	102,7	
26			108,4	103,9	
27			108,6	103,5	

День	Носитель	Только Fc	Доза конъюгата 6		
28			109,1	104,7	
29			108,96	104,5	
30			109	105,8	
31			108,2	104,9	
35			107,5	102,2	

Пример 96. Вирусный клиренс в легких в зависимости от дозы конъюгата 6

Исследования эффективности проводили на самках мышей линии BALB/c возрастом 6-8 недель (Charles River), которым интраназально вводили 3×10^2 БОЕ/мышь (3x LD_{95}) адаптированного для мышей вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Конъюгат 6 или контрольный Fc IgG1 человека вводили в виде однократной внутривенной (в/в) дозы через 2 часа после заражения в дозе 0,1–3 мг/кг. Осельтамивир вводили перорально два раза в день в течение 4 дней, начиная через 2 часа после заражения, в дозе 5 или 15 мг/кг. Массу тела (МТ) регистрировали в течение 4 дней. Через 4 дня после заражения мышей умерщвляли с помощью CO_2 и собирали обе доли легких. Легкие гомогенизировали с помощью шариками из диоксида кремния 1 мм в 1 мл ФСБ с использованием MagNA Lyser (Roche). Гомогенизацию проводили при 6000 об/мин в течение 60 сек и охлаждали на льду в течение 5 минут между циклами. После гомогенизации легких пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 600 x g и супернатант переносили в новую пробирку.

Для определения вирусной нагрузки в легких (измеряемой в бляшкообразующих единицах (БОЕ)) супернатанты гомогената легких разбавляли в инфекционном буфере в диапазоне от 10-1 до 10-6. 100 мкл разведенного вируса добавляли к конфлюэнтному монослою клеток MDCK в 24-луночных планшетах и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с покачиванием каждые 15 мин. После удаления вируса жидкую среду, содержащую Avicel, добавляли к клеткам MDCK. Клетки инкубировали при 37 °C, 5% CO_2 в течение 40 часов. После инкубации среду удаляли и клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым для подсчета количества бляшек. БОЕ рассчитывали относительно массы легкого (БОЕ/г легкого).

Результаты этого исследования демонстрируют, что низкие дозы конъюгата 6 быстро снижают вирусную нагрузку на несколько порядков лучше, чем осельтамивир (ТАМИФЛЮ®) (фиг. 58, таблица 46). Данное наблюдение имеет клиническую значимость, поскольку тяжелые инфекции гриппа вызваны переносом вируса из начальной инфекции верхних дыхательных путей в легкие.

Таблица 46: Вирусная нагрузка на день 4 после заражения

Исследуемый препарат [мг/кг]	**Логарифмическое уменьшение (БОЕ/мл)**	**Логарифмическое уменьшение (БОЕ/г)**
ФСБ [0]	0,00	0,00
Fc hIgG1 [3]	-0,04	0,26
Осельтамивир [5]	0,24	0,43
Осельтамивир [15]	0,52	0,75
Конъюгат 6 [0,1]	0,60	0,79
Конъюгат 6 [0,3]	1,33	1,55
Конъюгат 6 [1]	2,25	2,34

Исследуемый препарат [мг/кг]	Логарифмическое уменьшение (БОЕ/мл)	Логарифмическое уменьшение (БОЕ/г)
Конъюгат 6 [3]	3,20	3,40

Пример 97. Снижение воспалительных цитокинов в легких в зависимости от дозы конъюгата 6

Исследования эффективности проводили на самках мышей линии BALB/c возрастом 6-8 недель (Charles River), которым интраназально вводили 3×10^2 БОЕ/мышь (3x LD_{95}) адаптированного для мышей вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Конъюгат 6 или контрольный Fc IgG1 человека вводили в виде однократной внутривенной (в/в) дозы через 2 часа после заражения в дозе 0,1–3 мг/кг. Осельтамивир вводили перорально два раза в день в течение 4 дней, начиная через 2 часа после заражения, в дозе 5 или 15 мг/кг. Массу тела (МТ) регистрировали в течение 4 дней. Через 4 дня после заражения мышей умерщвляли с помощью CO_2 и собирали обе доли легких. Легкие гомогенизировали с помощью шариками из диоксида кремния 1 мм в 1 мл ФСБ с использованием MagNA Lyser (Roche). Гомогенизацию проводили при 6000 об/мин в течение 60 сек и охлаждали на льду в течение 5 минут между циклами. После гомогенизации легких пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 600 x g и супернатант переносили в новую пробирку.

Для анализа цитокинов супернатанты гомогената легких серийно разводили 2 раза в 96-луночном планшете. Уровни цитокинов для INF-γ, TNF-α, IL-6, MIP-1α и MCP-1 определяли с помощью ELISA в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems).

Заболеваемость и смертность от тяжелой формы гриппа в конечном итоге вызваны вирусным притоком провоспалительных цитокинов в легкие. Одна из потенциальных проблем, связанных с использованием Fc-конъюгата для лечения гриппа, заключается в том, может ли Fc-фрагмент усугубить вызванное цитокином воспаление. Результаты модели летальной инфекции H1N1 показывают прямо противоположное: снижение провоспалительных цитокинов (например, TNFα и IL-6) в зависимости от дозы конъюгата 6 в инфицированных тканях легких (фиг. 59, таблица 47).

Таблица 47: Цитокиновый ответ на день 4 после заражения

	Кратность сдвига по сравнению с незараженным контролем				
Исследуемый препарат [мг/кг]	**INFy**	**TNFa**	**IL-6**	**MCP-1**	**MIP-1a**
ФСБ [0]	0,4	2,2	4,6	16,3	16,4
Fc hIgG1 [3]	0,5	2,2	6,2	20,2	16,8
Осельтамивир [5]	0,2	1,7	4,0	11,7	7,5
Осельтамивир [15]	0,2	1,8	3,5	10,5	6,1
Конъюгат 6 [0,1]	0,3	1,5	3,0	10,8	7,9
Конъюгат 6 [0,3]	0,2	1,2	1,9	6,7	7,4
Конъюгат 6 [1]	0,2	1,1	1,9	6,1	3,6
Конъюгат 6 [3]	0,8	1,1	1,4	2,8	2,6
Неинфицированные	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Пример 98. Анализ образца плазмы конъюгата 6 *in vivo*. Сравнение ФК у мышей линий CD-1 и BALB/c

с тяжелым комбинированным иммунодефицитом.

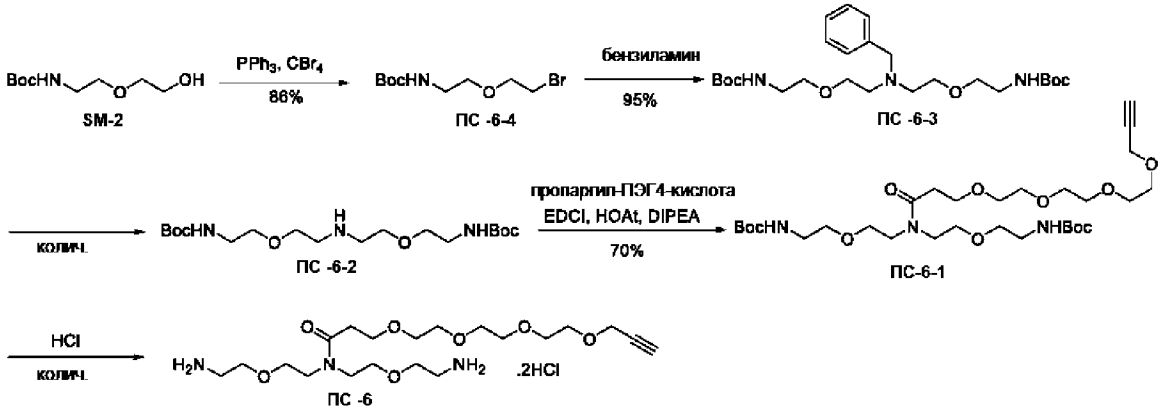
Конъюгат 6 в образцах плазмы определяли количественно с помощью ELISA для обнаружения нейраминидазы. Вкратце, молекулы захватывали на планшетах, покрытых нейраминидазой, а затем обнаруживали с использованием конъюгированного с HRP античеловеческого человеческого антитела IgG-Fc. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 6. Более подробное описание способа приведено ниже.

96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (номер по каталогу 12-565-136, ThermoFisher) покрывали 0,1 ед./лунку нейраминидазы из A/California/04/2009 (H1N1) (11058-VNAHC, Sino Biological) в 1X KPL покрывающем буфере (5150-0041, SeraCare). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Серийные разведения образцов плазмы высевали на планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов (разбавитель образца: 0,5% БСА в ФСБ 0,025% Tween 20 + конечная концентрация в плазме необработанных крыс 1:2 500). Стандартные кривые конъюгата 6 в диапазоне 0,230–500 нг/мл в двух повторностях анализировали на каждом планшете. После 2-часовой инкубации планшеты промывали 5 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20. Конъюгат, связанный с нейраминидазой на планшетах затем зондировали конъюгированным с HRP антителом против Fc F(ab')2 IgG человека (709-036-098, Jackson), разбавленным 1:1000 в разбавителе в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20 и проявляли субстратом TMB в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали при помощи 1 н. H_2SO_4. Поглощение считывали при 450 нм. Количество конъюгата 6 в образцах плазмы было интерполировано с использованием программы GraphPad Prism версии 6 после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный, 4PL-анализ) стандартных кривых.

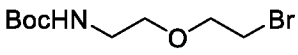
ФК профили, мыши SCID линии CD-1 против линии BALB/c

Конъюгат 6, вводимый внутривенно мышам линий SCID и CD-1 (иммунокомпетентным) в дозе 5 мг/кг, демонстрировал аналогичные ФК профили (фиг. 60). Концентрации были сопоставимыми во время отбора проб. Двухфазные ФК профили включают 24-часовые фазы распределения, за которыми следует фаза поверхностного удаления. Уровни конъюгата 6 в плазме оставались высокими (~ 10 мкг/мл) относительно уровней C_{max} в течение однонедельного исследования.

Пример 99. Синтез центрального линкера пропаргилдиамина

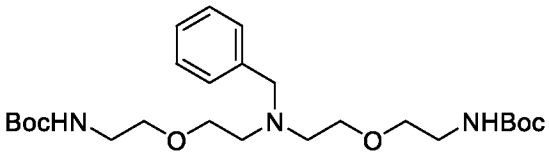


Стадия a.



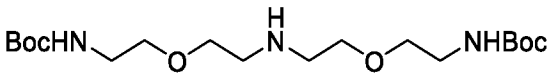
Раствор 2-(2-Boc-аминоэтокси)этанола (16,0 г, 78,0 ммоль) и CBr_4 (31,0 г, 93,5 ммоль) в ДХМ (100 мл) при 0 °C медленно обрабатывали PPh_3 (24,5 г, 93,5 ммоль) в течение более 15 минут (экзотермический). Во ходе добавления внутреннюю температуру поддерживали на уровне ниже 30 °C. После добавления PPh_3 реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Неочищенную реакционную смесь упаривали до масла, затем очищали нормально-фазовой хроматографией, элюировали от 10% этилацетатом/гексанами до 80% этилацетатом/гексанами. Фракции, содержащие капли масла внутри пробирок для сбора, объединяли и упаривали до бесцветного масла. Выход: 18,1 г, 86%.

Стадия b.



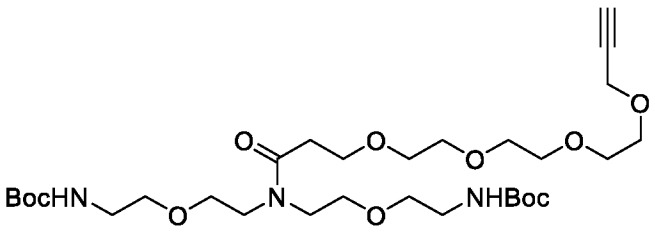
Раствор продукта стадии a (10 г, 37,3 ммоль), бензиламина (1,60 г, 14,9 ммоль) и K_2CO_3 (6,19 г, 44,8 ммоль) в ДМФ (20 мл) нагревали на масляной бане при 75 °C в течение 8 часов. Смесь фильтровали, упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (5% ACN/вода до 100% ACN). Выход: 6,8 г, 95%.

Стадия c.



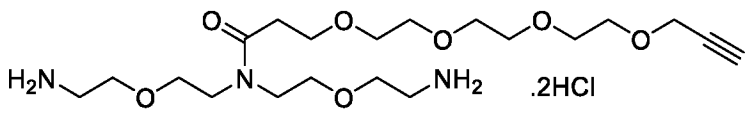
К раствору продукта стадии b (5,35 г, 8,98 ммоль) в $CHCl_3$/EtOH (1:20, 100 мл) добавляли 20% $Pd(OH)_2$/C (1,26 г, 1/80 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи под действием баллона с водородом при температуре окружающей среды. Реакционную смесь фильтровали через слой целита. Растворители удаляли и переносили на следующую стадию без очистки.

Стадия d.



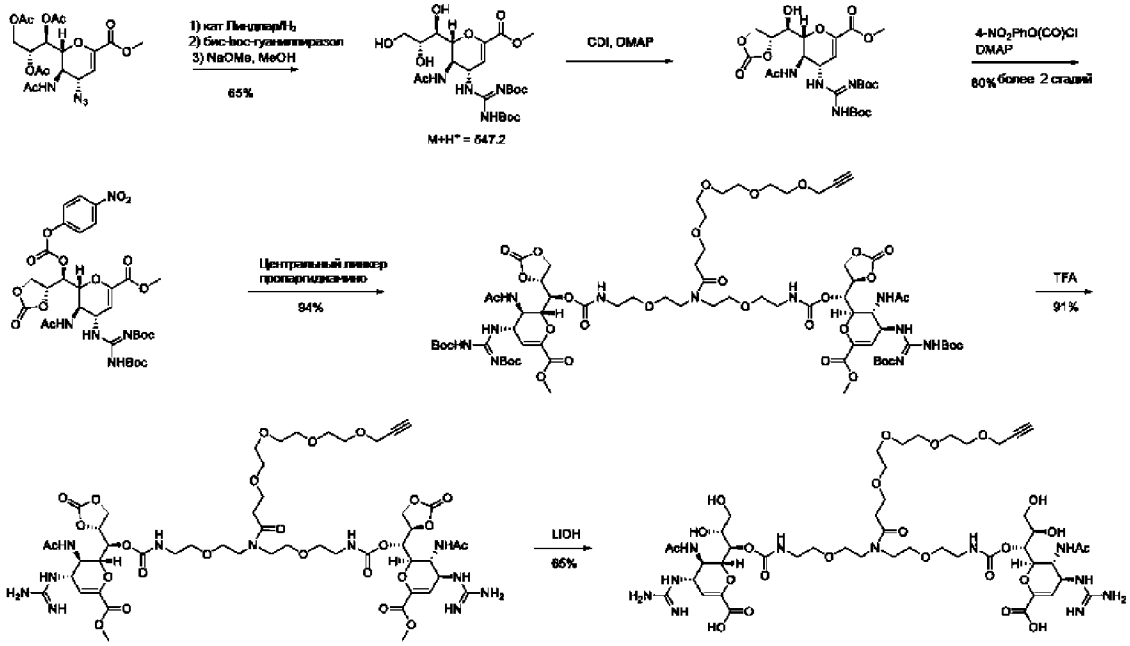
Продукт стадии c повторно растворяли в 20 мл ДМФ/дихлорметана (1:5). К этому раствору свободного амина добавляли ПЭГ4 пропаргиловую кислоту (2,36 г, 8,98 ммоль), EDCI (2,57 г, 13,5 ммоль), HOAt (1,83 г, 13,5 ммоль) и основание Хунига (3,13 мл, 18,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение четырех часов, затем упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (от 10% ACN/вода до 60% ACN/вода. Выход 4,00 г, 70% за две стадии. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[M - Boc + H]^+ = 534,2$, $[M + H]^+ = 634,2$.

Стадия e.

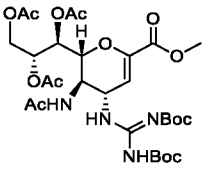


Продукт стадии d (4,00 г, 6,31 ммоль) обрабатывали 4 н. HCl в диоксане (30 мл) в течение 2 часов. Избыток HCl и диоксан удаляли на роторном испарителе, а оставшийся дополнительно сушили в условиях высокого вакуума с получением ПС 10 в виде соли 2HCl. Выход: 3,15 г, 99%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 434,2$.

Пример 100. Синтез ПС 7a (C7-C7 изомер)



Стадия a.



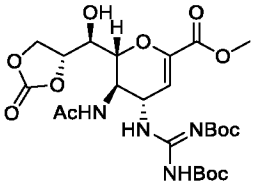
Метил 5-ацетамидо-7,8,9-O-триацетил-2,6-ангидро-4-азидо-3,4,5-тридеокси-D-глицеро-D-галакто-нон-2-енонат (30 г, 65,7 ммоль) растворяли в метаноле (100 мл) и объединяли с катализатором Линдлара (15 г). Полученную смесь промывали водородом и перемешивали в течение 5 часов, продувая водород через свободное пространство над водородом каждые 30 минут. После завершения реакции, как определено с помощью ВЭЖХ, катализатор фильтровали через целит. Фильтрат использовали на следующей стадии.

Неочищенный амин с предыдущей стадии (18,9 г, 43,8 ммоль) обрабатывали N,N'-бис-boc-1-гуанилпиразолом (14,3 г, 46,0 ммоль) и DIEA (9,9 мл, 57,0 ммоль) в метаноле (100 мл). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока весь исходный материал не израсходовался, как определено с помощью ЖХМС (~30 мин). Раствор упаривали до пены и хранили в условиях высокого вакуума в течение ночи, затем использовали без дополнительной очистки на следующей стадии.

Неочищенный триацетат с предыдущей стадии (43,8 ммоль) растворяли в 100 мл сухого метанола, затем обрабатывали метоксидом натрия в метаноле (1,9 мл, 25% раствор в метаноле, 8,76 ммоль) при

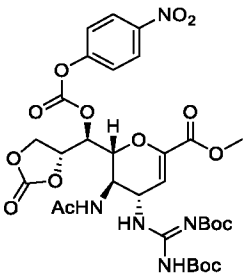
комнатной температуре. За ходом реакции следили с помощью ЖХМС, которая завершалась через 10 минут. Реакцию гасили 1 н. HCl до pH ~7. Полученный раствор упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 10% до 100% ацетонитрилом и водой. Для этой очистки не использовали ТФУ в качестве модификатора. Выход продукта 15,6 г, 65%.

Стадия b.



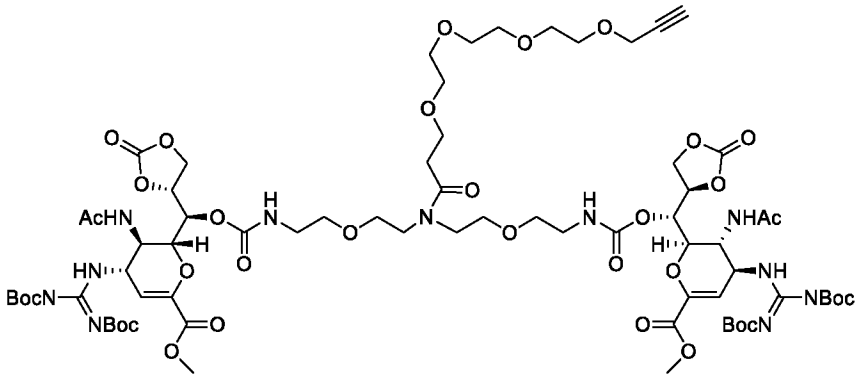
Смесь продукта стадии a (5,47 г, 10 ммоль) и DMAP (1,222 г, 10 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (30 мл). После охлаждения на бане с ледяной водой раствор медленно обрабатывали 1,1'-карбонилдиимидазолом (2,6 г, 16 ммоль), затем перемешивали в течение 30 минут при 0 °C с последующим нагреванием при 60 °C в течение 2 часов. Затем его охлаждали до комнатной температуры и экстрагировали водой (50 мл) и EtOAc/гексаном (1:1, 100 мл). Органический слой промывали водой (50 мл × 3), сушили над Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе. Белый пенообразный продукт дополнительно сушили в условиях высокого вакуума и переносили на следующую стадию без дополнительной очистки. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 573,2$.

Стадия c.



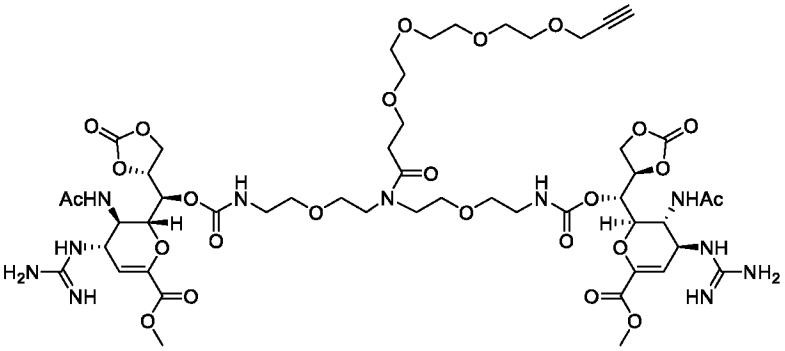
Реакционную колбу, содержащую продукт стадии b, продували азотом в вакууме и растворяли в безводном ДХМ (50 мл), затем охлаждали на бане с ледяной водой. К охлажденному раствору добавляли DMAP (4,89 г, 40 ммоль), а затем порциями добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (6,05 г, 30 ммоль) в течение 20 минут. Раствор перемешивали при 0 °C , затем нагревали до комнатной температуры в течение 1 часа. ЖХМС демонстрирует исходный материал в течение 1 часа, поэтому было добавлены дополнительные количества DMAP (1,22 г, 10 ммоль) и 4-нитрофенилхлорформиата (1 г, 5 ммоль). Реакция продолжалась в течение 4 часов, затем проводили очистку на двух колонках с силикагелем (220 г, предварительно смоченные 20% EtOAc и гексаном) и элюировали от 20% до 80% EtOAc и гексаном. Выход 4,42 г, 59,9% за две стадии. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 738,2$.

Стадия d.



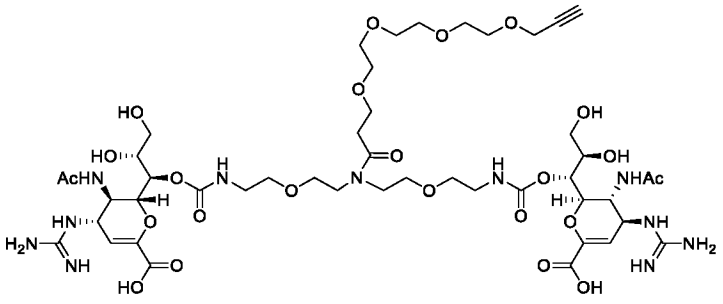
К раствору продукта стадии c (3,2 г, 4,34 ммоль) в безводном ДХМ (3 мл) в течение 30 минут порциями добавляли смесь центрального линкера пропаргилдиамина (1,26 г, 2,5 ммоль, описанного в примере 99) и DIPEA (1,68 г, 13 ммоль) в безводном ДМФ (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (от 30% до 90% ацетонитрила и воды, без ТФУ в качестве модификатора). Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 815,8, $[(M - Boc + 2H)/2]^+$ = 765,8, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+$ = 716. Выход: 3,33 г, 94,2%.

Стадия e.



Продукт стадии d (3,33 г, 2,04 ммоль) растворяли в ДХМ (5 мл) и ТФУ (5 мл), затем перемешивали при 35 °C в течение ~6 часов. Реакцию отслеживали посредством ЖХМС. По завершении раствор упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (от 5 до 30% ацетонитрила и воды, без ТФУ). Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 615,8, $[(M + 3H)/3]^+$ = 411. Выход: 2,29 г, 91,3%.

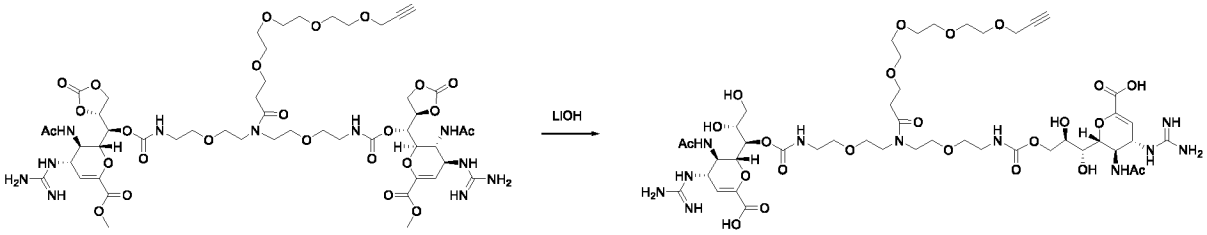
Стадия f.



Продукт стадии e (61,5 мг, 0,05 ммоль) растворяли в MeOH/воде (1:1, 0,6 мл). После охлаждения раствора до -6 °C (на солевой/ледяной бане) по каплям добавляли 1,0 M LiOH (0,3 мл, 0,3 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут. Затем его гасили до pH ~7,0 с помощью 4 н. HCl в

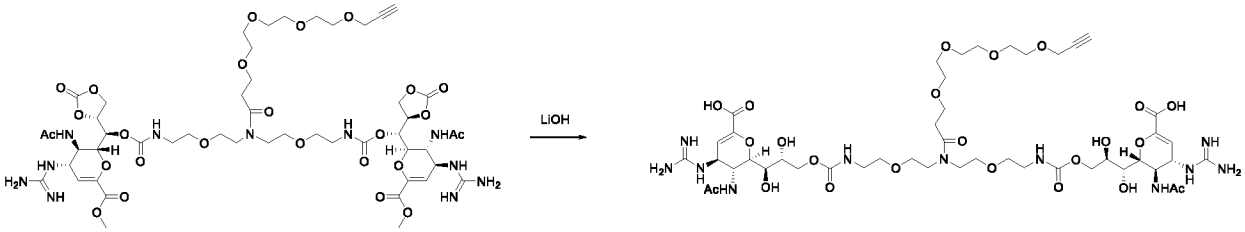
растворе диоксана (75 мкл) и непосредственно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (Isco ACCQ prepare, Luna 5 мкм C18(2) 100 колонка ЖХ 100 мм x 30 мм; градиент: 0% ацетонитрила/воды в течение 2 минут, затем от 0% до 15% ацетонитрила/воды в течение 12 минут, затем изократический при 15% ацетонитриле в течение 10 минут с использованием 0,1% ТФУ). Выход: 45 мг, 65,3%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 575,8, $[(M + 3H)/3]^+$ = 384,2. Аналитическое время удерживания: 6,013 мин. Условия: колонка Phenomenex Gemini для ВЭЖХ, 3 мкм WX-C18 110 Å, 100 мм x 3 мм, элюировали в течение 25 минут 5-95% ацетонитрилом и градиентом воды с использованием 0,1% ТФУ.

Пример 101. Синтез ПС 7b (C7-C9 изомер)



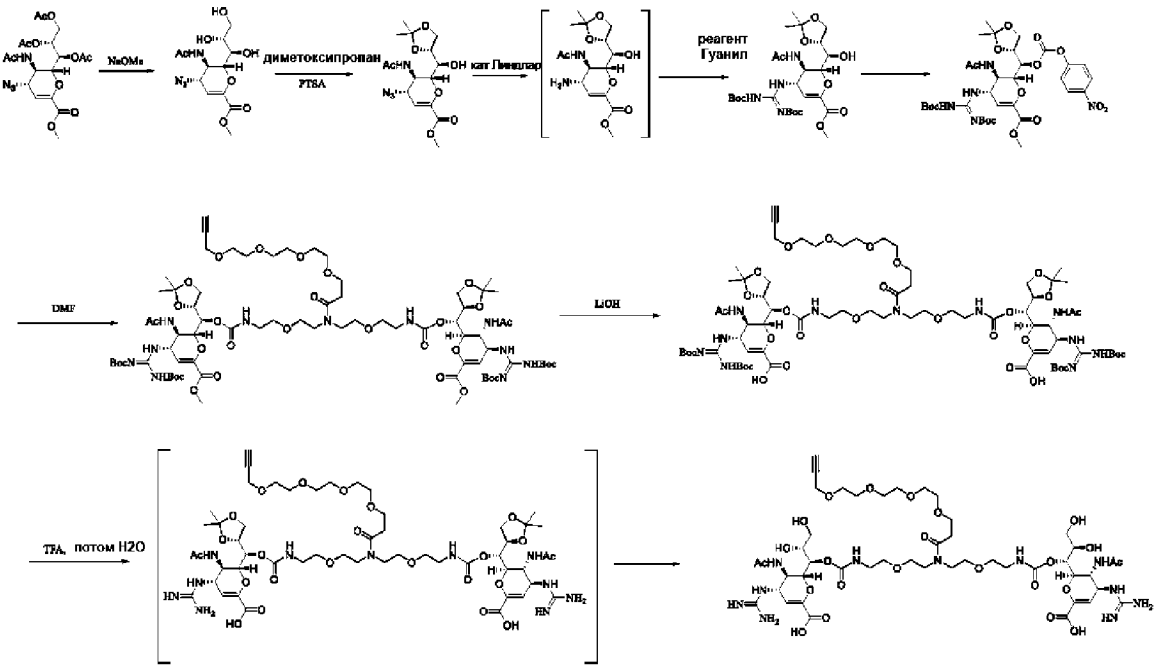
C7-C9 гетеродимер (ПС 7b) получали аналогично ПС 7a (C7-C7 изомер, пример 100), за исключением того, что реакцию проводили при 0 °C и контролировали с помощью ВЭЖХ (время удерживания: 6,112 мин. Условия: см. пример 100, синтез ПС 7a и останавливали, когда стал преобладать изомер C7-C9 (~3 часа). Этот изомер выделяют в тех же условиях, которые использовались для выделения ПС 7a. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 575,8, $[(M + 3H)/3]^+$ = 384,2.

Пример 102. Синтез ПС 7c (C9-C9 изомер)

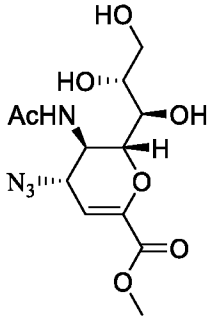


ПС 7c (C9-C9 изомер) получали аналогично ПС 7a (C7-C7 изомер, пример 100), за исключением того, что реакцию проводили при 0 °C и контролировали с помощью ВЭЖХ (время удерживания: 6,232 мин. Условия: см. пример 100, синтез ПС 7a и останавливали, когда стал преобладать C9-C9 изомер (~6 часов). Этот изомер выделяют в тех же условиях, которые использовались для выделения ПС 7a. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 575,8, $[(M + 3H)/3]^+$ = 384,2.

Пример 103. Синтез ПС 7 (путь ацетонида)

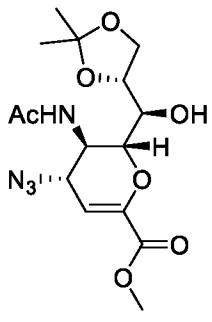


Стадия a.



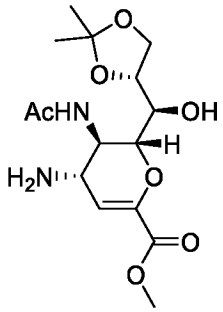
Метил 5-ацетамидо-7,8,9-О-триацетил-2,6-ангидро-4-азидо-3,4,5-тридеокси-D-глицеро-D-галакто-нон-2-енонат (10,0 г, 22 ммоль) растворяли в 60 мл сухого метанола, затем обрабатывали 20 мл метоксида натрия в метаноле (0,5 М в метаноле, 10 ммоль) при охлаждении на бане с ледяной водой. За ходом реакции следили с помощью ЖХМС, которая завершалась через 2 часа. Затем pH реакционного раствора доводили до значения от 5 до 6 с использованием ионообменной смолы Amberlite IRN-77. Смесь фильтровали для удаления смолы и упаривали досуха в вакууме. Полученное масло использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =331,1.

Стадия b.



К раствору продуктов с предыдущей стадии в 70 мл ацетона добавляли 30 мл 2,2-диметоксипропана и 1 гидрата п-толуолсульфоновой кислоты (400 мг, 2,0 ммоль), полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. По истечении этого времени добавляли бикарбонат натрия (170 мг, 2,0 ммоль) и смесь упаривали досуха. Полученный остаток использовали на следующей стадии без очистки. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =371,2.

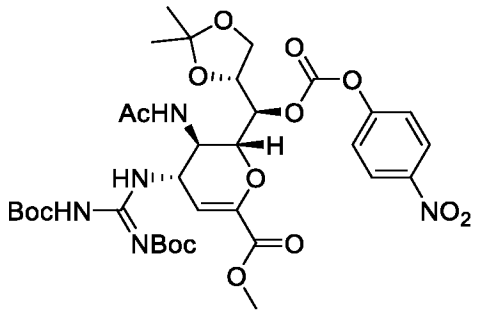
Стадия c.



К раствору материала с предыдущей стадии в 60 мл метанола добавляли 5,0 г катализатора Линдлара. Полученную смесь продували водородом каждые 30 минут и перемешивали в течение 5 часов. После завершения реакции, как определено с помощью ВЭЖХ, катализатор отфильтровывали через целит. Фильтрат упаривали и использовали на следующей стадии без очистки.

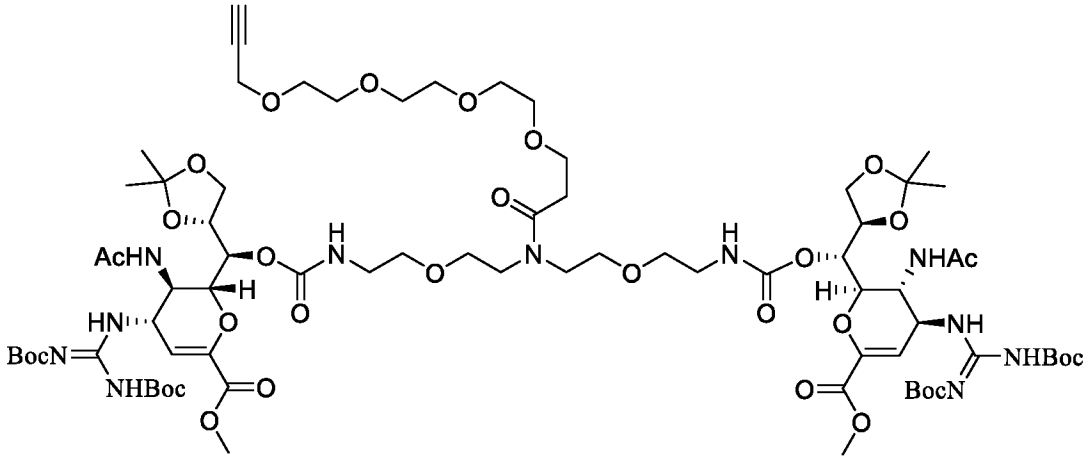
Неочищенный продукт с предыдущей стадии в 60 мл ТГФ обрабатывали N,N'-бис-boc-1-гуанилпиразолом (9,3 г, 30,0 ммоль) и DIEA (9,9 мл, 57,0 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока весь исходный материал не израсходовался, как определено с помощью ЖХМС (4 ч). Раствор упаривали и очищали флэш-хроматографией, элюировали от 20% до 80% этилацетатом/дихлорметаном. Выход 8,8 г, 59,0% за четыре стадии. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H 587,3.

Стадия d.



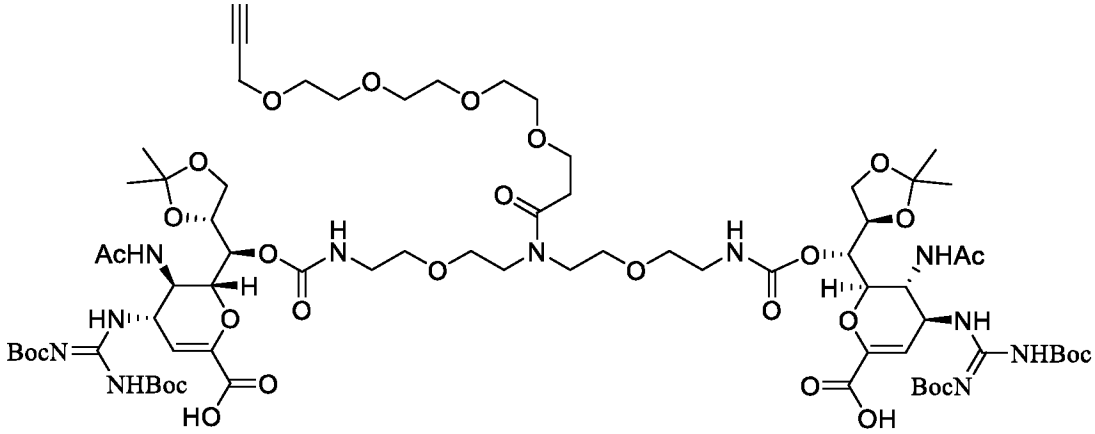
Реакционную колбу, содержащую продукт с предыдущей стадии (6,5 г, 11 ммоль), продували азотом в вакууме и растворяли в безводном дихлорметане (100 мл). После охлаждения раствора на бане с ледяной водой, добавляли DMAP (4,89 г, 40 ммоль) и перемешивали до растворения, затем порциями добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (5,58 г, 28 ммоль) при перемешивании при температуре от 0 °C до комнатной температуры в течение 1 часа. ЖХМС демонстрирует исходный материал в течение 1 часа, поэтому было добавлены дополнительные количества DMAP (1,22 г, 10 ммоль) и 4-нитрофенилхлорформиата (1,0 г, 5 ммоль). Реакция продолжалась в течение еще 4 часов, затем раствор упаривали и очищали флэш-хроматографией, элюируя от 20% до 80% этилацетатом/дихлорметаном. Выход: 5,1 г, 59,9%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 752,2$.

Стадия e.



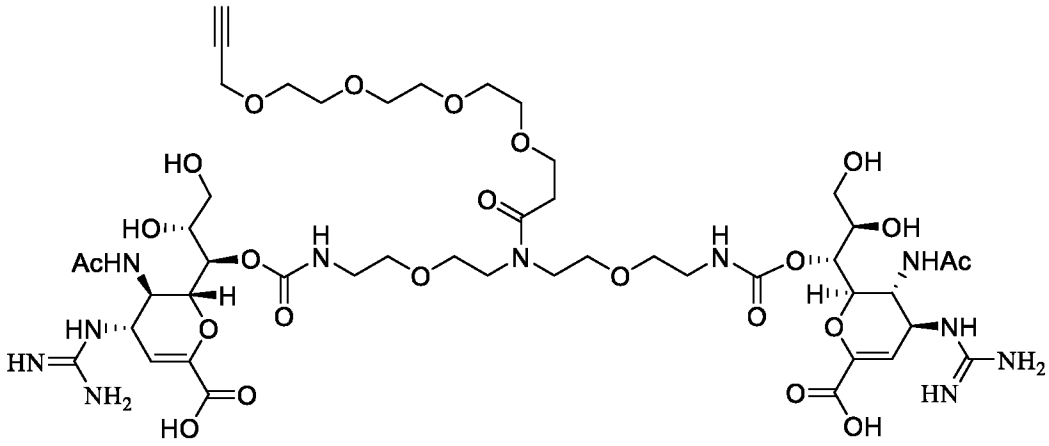
К раствору нитрофенилкарбоната с предыдущей стадии (1,8 г, 2,3 ммоль) в безводном дихлорметане (20 мл) добавляли смесь центрального линкера (0,51 г, 1,0 ммоль, порциями добавляли в течение 30 минут) и DIPEA (1,4 мл, 10 ммоль) в безводном ДМФ (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, затем упаривали и очищали флэш-хроматографией, элюируя от 0 % до 10% метанолом/дихлорметаном. Выход: 1,35 г, 80%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 830,4, $[(M - Boc + 2H)/2]^+$ = 780,4, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+$ = 730,4.

Стадия f.



Продукт с предыдущей стадии (200 мг, 0,2 ммоль) растворяли в 2 мл MeOH и 2 мл ТГФ, затем обрабатывали раствором гидроксида лития (24 мг, 1 ммоль), растворенным в 2 мл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 минут при комнатной температуре, и в это время, по данным ВЭЖХ, реакция была завершена. pH реакционного раствора доводили до значения от 5 до 6 с использованием ионообменной смолы Amberlite IRN-77, затем отфильтровывали для удаления смолы. Неочищенный продукт упаривали досуха под вакуумом и использовали на следующей стадии очистки. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 815,4, $[(M - Boc + 2H)/2]^+$ = 765,4, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+$ = 715,4.

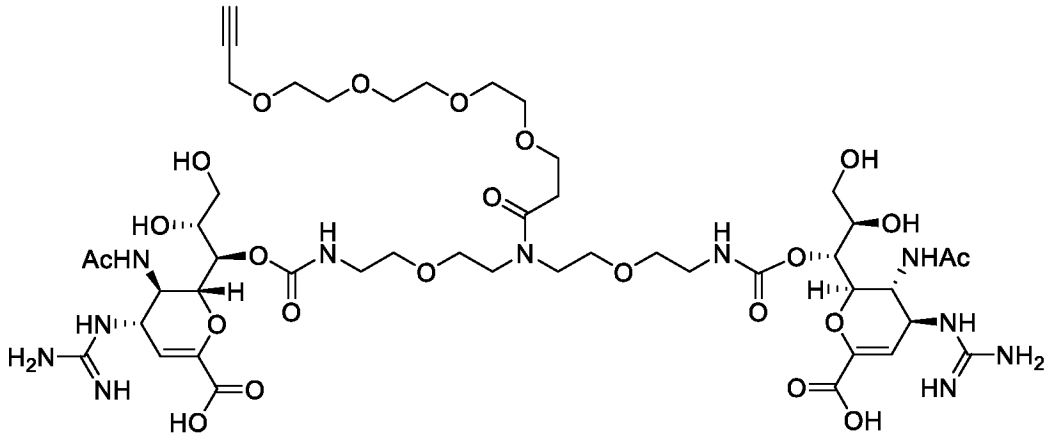
Стадия g.



Продукт со стадии g (400 мг, 0,25 ммоль) растворяли в 5 мл дихлорметана и 5 мл ТФУ, и полученный реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре. За протеканием реакции наблюдали с помощью ЖХМС. После завершения реакции (6 ч) раствор упаривали досуха, а затем растворяли в 4 мл воды и 4 мл ацетонитрила. Полученный раствор перемешивали в течение еще 2 часов при комнатной температуре, при которой ЖХМС показывала полное снятие защиты с ацетонидных защитных групп. Данную смесь упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 5% до 40% ацетонитрилом/водой с 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход: 270 мг, 68,0%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 575,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 384,2$.

Пример 104. Результаты ЯМР для ПС 7a, ПС 7b и ПС 7c

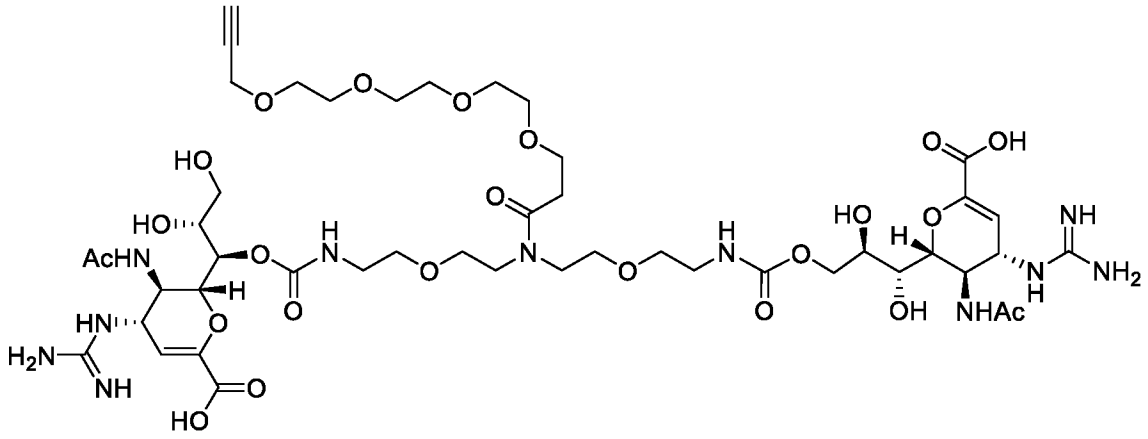
ЯМР ПС 7a



^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол-d_4) δ 5,91-5,89 (м, 2H), 5,00-4,96 (м, 2H), 4,58-4,53 (м, 2H), 4,42-4,37 (м, 2H), 4,20-4,17 (м, 6H), 4,02-3,97 (м, 2H), 3,78-3,49 (м, 28H), 3,29-3,18 (м, 4H), 2,86 (т, J = 2,6 Гц, 1H), 2,85-2,72 (м, 2H), 1,96 (с, 3H), 1,95 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD) δ 171,73, 170,80, 170,29, 161,95, 156,06, 155,08, 154,99, 144,07, 143,93, 116,41, 114,10, 106,03, 105,86, 77,71, 74,46, 73,22, 68,62, 68,54, 68,50, 68,38, 68,12 , 68,00, 67,94, 67,67, 67,64, 67,53, 67,20, 66,96, 65,44, 61,53, 56,17, 49,74, 49,64, 47,37, 45,17, 39,16, 39,06, 31,73, 19,96, 19,92.

ЯМР ПС 7b

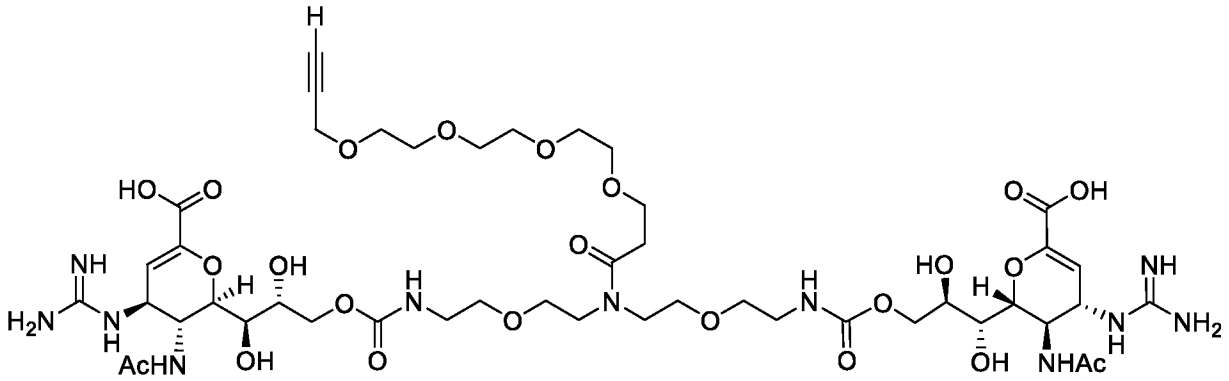


^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол-d_4) δ 5,91-5,87 (м, 2H), 5,04-4,95 (м, 1H), 4,58-4,48 (м, 2H), 4,45-4,37 (м, 3H), 4,20-4,10 (м, 5H), 4,08-3,98 (м, 2H), 3,79-3,44 (м, 29H), 3,29-3,18 (м, 4H), 2,88-2,70 (м, 3H), 2,02 (с, 3H), 1,96-1,94 (м, 3H).

^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6) δ: 8,28 (д, J = 8,4 Гц, 2H, -NH), 7,98 (д, J = 11,5 Гц, 2H, -NH), 7,78 (д, J = 8,7 Гц, 2H, -NH), 7,60 (т, J = 8,5 Гц, 2H, -NH), 7,20 (уш. с, 2H, -NH), 7,06 (уш. с, 2H, -NH), 5,69 (уш. с, 1H), 5,67 (д, J = 2,4 Гц, 1H), 4,83 (дд, J = 9,2, 2,2 Гц, 1H), 4,45 (дт, J = 9, 2,5 Гц, 1H), 4,37 (д, J = 2,2 Гц, 1H), 4,33-4,24 (м, 2H), 4,13 (д, J = 2,5 Гц, 2H), 4,05-4,32 (м, 41H), 3,23 (м, 1H), 3,15-3,09 (м, 2H), 3,06-3,02 (м, 2H), 2,59 (т, J = 6,7 Гц, 2H), 1,91 (с, 3H), 1,78 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD) δ: 173,19, 172,98, 172,25, 171,75, 164,26, 163,82, 157,88, 157,55, 156,51, 146,09, 107,21, 106,93, 106,59, 79,22, 76,19, 75,92, 74,72, 74,68, 70,12, 70,08, 70.03, 69,99, 69,92, 69,88, 69,66, 69,48, 69,12, 69,01, 68,94, 68,73, 68,69, 68,50, 68,19, 67,08, 66,93, 66,79, 63,04, 57,68, 51,24, 51,15, 50,13, 48,87, 48,72, 46,72, 46,58, 46,23, 40,64, 40,41, 33,21, 21,49, 21,45, 21,40.

ЯМР ПС 7c

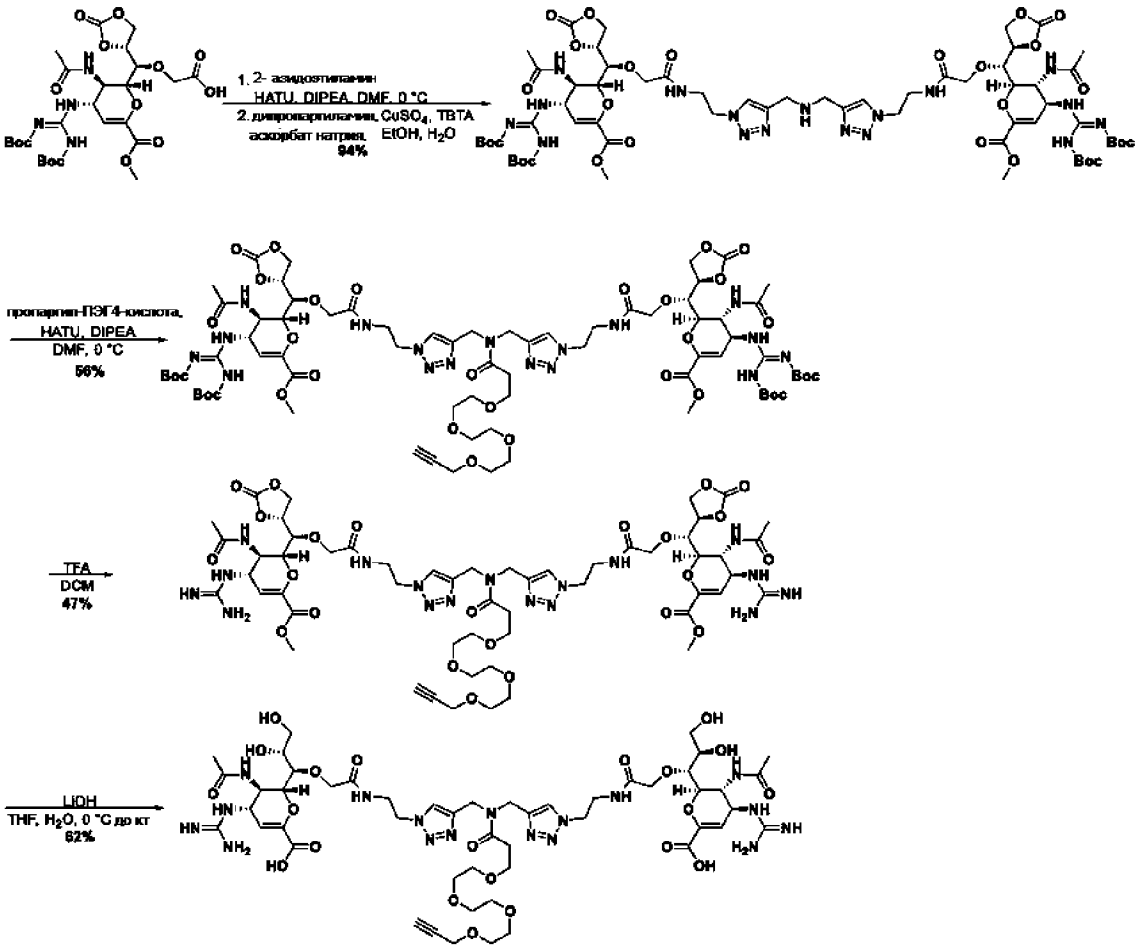


^{1}H ЯМР (500 МГц, Метанол-d_4) δ: 5,88 (д, J = 2,6 Гц, 2H), 4,50 (дт, J = 8,5, 2,7 Гц, 2H), 4,43 (ддд, J = 9,7, 3,9, 1,5 Гц, 2H), 4,39 (дд, J = 11,5, 2,4 Гц, 2H), 4,25–4,16 (м, 2H), 4,19 (д, J = 2,4 Гц, 2H), 4,13 (дт, J = 11,5, 5,9 Гц, 2H), 4,05 (м, 2H), 3,77 (т, J = 6,2 Гц, 2H), 3,72–3,55 (м, 22H), 3,51 (м, 4H), 3,35–3,23 (м, 4H), 2,86 (т, J = 2,4 Гц, 1H), 2,74 (т, J = 6,2 Гц, 2H), 2,02 (с, 6H).

^{13}C ЯМР (125 МГц, MeOD) δ:173,03, 163,76, 157,89, 157,54, 145,60, 107,21, 79,28, 76,29, 74,70, 70,11, 70,07,

70,03, 69,92, 69,70, 69,47, 68,96, 68,89, 68,72, 68,54, 68,19, 67,05, 66,75, 57,69, 50,09, 48,69, 48,08, 46,10, 40,44, 40,38, 33,23, 21,42.

Пример 105. Синтез ПС 60



Стадия a.

К перемешиваемому при 0 °C раствору предварительно приготовленного простого эфира кислоты занамивира (1,00 г, 1,586 ммоль, пример 31), гидрохлорида 2-азидоэтиламина (213 мг, 1,744 ммоль) и DIPEA (1,105 мл, 6,343 ммоль) в ДМФ (8,0 мл) добавляли HATU (615 мг, 1,618 ммоль). Температуру повышали до комнатной и перемешивание продолжали до завершения. Все летучие вещества удаляли вакуумными методами. Остаток помещали в этилацетат, промывали 1 М водным раствором серной кислоты (1 х 50 мл), затем насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (3 х 20 мл) и солевым раствором (1 х 50 мл). Полученные органические слои сушили сульфатом магния, фильтровали и все летучие вещества удаляли вакуумными методами. Таким образом было получено 816 мг желаемого промежуточного азида с высокой чистотой и использовано на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки. (Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 699,2). К перемешиваемому раствору описанного неочищенного материала (816 мг, 1,168 ммоль), дипропаргиламина (54 мг, 0,584 ммоль), трис((1-бензил-4-триазолил)метил)амина (31 мг, 0,058 ммоль) и аскорбата натрия (58 мг, 0,292 ммоль) в этаноле (10 мл) и воде (5 мл), добавляли сульфат меди (10 мг, 0,061 ммоль). По завершении добавляли поглотитель меди SiliaMetS TAAcONa (300 мг, загрузочное количество 0,45 ммоль/г) и продолжали перемешивание в течение 1 часа. Смесь фильтровали с помощью

дихлорметана. Смесь фильтровали с помощью дихлорметана. Фильтрат промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Водный слой дополнительно промывали дихлорметаном (3 раза). Объединенные органические слои сушили сульфатом магния, фильтровали и упаривали. Остаток очищали на колонке с диоксидом кремния, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH®, элюировали от 0% до 100% гексанами и этилацетатом, затем от 0% до 30% дихлорметаном и. Выход: 817 мг, выход 94%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 745,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 497,5$.

Стадия b.

К перемешиваемому при 0 °C раствору стадии a добавляли продукт (817 мг, 0,548 ммоль), ПЭГ4 пропаргиловую кислоту (185 мг, 0,712 ммоль) и DIPEA (286 мкл, 1,644 ммоль) в ДМФ (7,0 мл), HATU (212 мг, 0,544 ммоль). Температуру повышали до комнатной и перемешивание продолжали до завершения. Все летучие вещества удаляли вакуумными методами. Остаток очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 90% метанола и воды). Выход: 520 мг, 56%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 866,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 578,4$.

Стадия c.

Перемешиваемый раствор соединения стадии b (520 мг, 0,300 ммоль) в 2-метил-2-бутене (0,25 мл), дихлорметане (4,0 мл) и ТФУ (2,0 мл) перемешивали до прекращения выделения газа. Все летучие вещества удаляли вакуумными методами. Остаток очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 30% метанола и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 221 мг, 47%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 666,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 444,8$.

Стадия d.

К перемешиваемому при 0 °C раствору продукта стадии c (221 мг, 0,142 ммоль) в воде (3,0 мл) добавляли гидроксид лития (20 мг, 0,850 ммоль). Реакцию гасили уксусной кислотой (120 мкл) и все летучие вещества удаляли вакуумными методами. Остаток очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 20% метанола и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 130 мг, 62%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 626,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 418,2$.

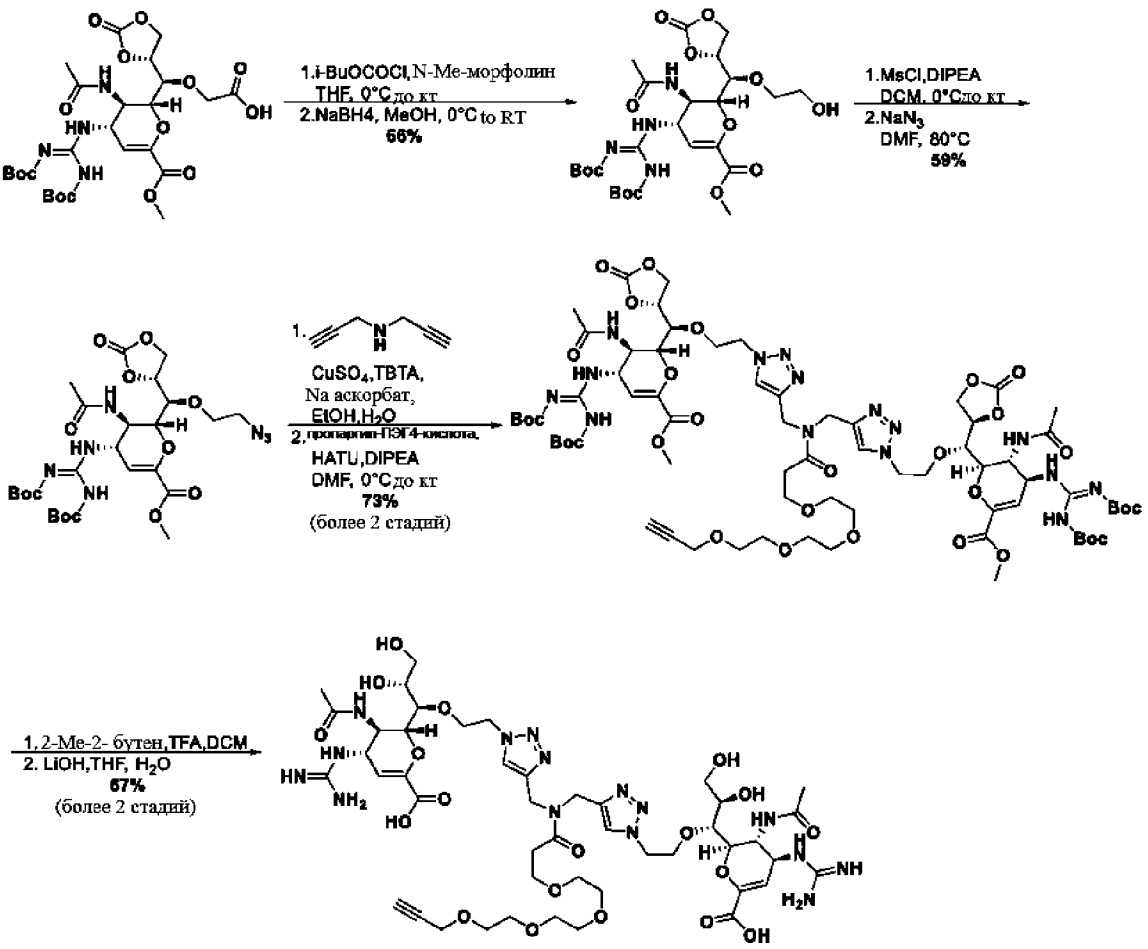
Пример 106. Синтез конъюгата 29

Раствор азидофункционализированного агликозилированного Fc (SEQ ID NO: 35) в буферном растворе ФСБ x 1 с pH 7,4 (100 мг, 10 мл, 1,874 мкмоль) добавляют в центрифужную пробирку, содержащую буферный раствор ФСБ x 1 с pH 7,4 (10,50 мл) малой молекулы, дериватизированной алкином (17 мг, 0,0112 ммоль; пример 105, ПС 60), сульфата меди (4 мг, 0,0225 ммоль), трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)-амина (39 мг, 0,0900 ммоль) и аскорбата натрия (7,4 мг, 0,375 ммоль). Полученную смесь осторожно встряхивали в течение ночи. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином A с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. примере 10). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 56938 Да (DAR = 2,3). Выход 49,9 мг, выход 49%.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 29, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, который включает C-концевой остаток лизина и N-концевую сигнальную последовательность мышиного IgG. После экспрессии C-концевая лизиновая и N-концевая сигнальные последовательности IgG мыши Fc конъюгата 29 протеолитически

расщепляются, в результате чего образуется Fc, имеющий последовательность, в которой отсутствует Lys447 (например, отсутствует С-концевой лизиновый остаток), и N -концевая сигнальная последовательность мышиного IgG. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 107. Синтез ПС 65



Стадия a.

К перемешиваемому при 0 °C раствору предварительно приготовленного простого эфира кислоты занамивира (2,00 г, 3,172 ммоль, пример 31) и 4-метилморфолина (0,628 мл, 5,709 ммоль) в тетрагидрофуране (30 мл) добавляли изобутилхлорформиат (0,617 мл, 4,7574 ммоль). Через 10 минут температуру повышали до комнатной и продолжали перемешивание в течение 20 минут. Температуру снова снижали до 0 °C и добавляли борогидрид натрия (360 мг, 9,515 ммоль) одной порцией с последующим добавлением по каплям (10 мл) в течение 5 минут. По завершении реакцию гасили уксусной кислотой (2,860 мл, 50 ммоль), и через 5 минут температуру повышали до комнатной, при этом перемешивание продолжали до прекращения выделения газа. Все летучие вещества выпаривали, остаток суспендировали в дихлорметане и фильтровали. Фильтрат упаривали и остаток очищали на колонке с диоксидом кремния с использованием жидкостной хроматографии Isco COMBIFLASH®, элюировали от 20% до 100% гексанами и этилацетатом, используя 3% метанол в качестве модификатора. Выход: 1,302 г, выход 66%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: [(M + H)]+ = 617,2.

Стадия b.

К перемешиваемому при 0 °C раствору продукта стадии a (1,25 г, 2,027 ммоль) и DIPEA (1,095 мл, 6,284 ммоль) в дихлорметане (15 мл) добавляли метансульфонилхлорид (0,314 ммоль, 4,054 ммоль). По завершении реакционную смесь обрабатывали водой (15 мл). Слои разделяли, и слой дихлорметана сушили солевым раствором, затем сульфатом магния и фильтровали. Раствор упаривали, остаток растворяли в ДМФ (10 мл) и добавляли азид натрия (264 мг, 4,054 ммоль) при повышении температуры до 50 °C. Завершение реакции наблюдалось через 18 часов, и все летучие вещества выпаривали вакуумными методами. Остаток очищали на колонке с диоксидом кремния с использованием жидкостной хроматографии Isco COMBIFLASH®, элюировали от 20% до 100% гексанами и этилацетатом, используя 3% метанол в качестве модификатора. Выход 767 мг, выход 59%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: [(M + H)]+ = 642,2.

Стадия c.

К перемешиваемому раствору продукта стадии b (496 мг, 0,773 ммоль), дипропаргиламина (36 мг, 0,386 ммоль), трис((1-бензил-4-триазолил)метил)амина (41 мг, 0,077 ммоль) и аскорбата натрия (115 мг, 0,580 ммоль) в этаноле (16 мл) и воде (8 мл) добавляли сульфат меди (13 мг, 0,081 ммоль). По завершении добавляли поглотитель меди SiliaMetS TAAcONa (600 мг, загрузочное количество 0,45 ммоль/г) и продолжали перемешивание в течение 1 часа. Смесь фильтровали с помощью дихлорметана. Смесь фильтровали с помощью дихлорметана. Фильтрат промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Водный слой дополнительно промывали дихлорметаном (3 раза). Объединенные органические слои сушили сульфатом магния, фильтровали и все летучие вещества упаривали вакуумными методами. К перемешиваемому при 0 °C раствору остатка, пропаргил-ПЭГ4-кислоты (151 мг, 0,580 ммоль)) и DIPEA (337 мкл, 1,933 ммоль) в ДМФ (10,0 мл) добавляли HATU (220 мг, 0,580 ммоль). Температуру повышали до комнатной и перемешивание продолжали до завершения. Все летучие вещества удаляли вакуумными методами. Остаток очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 90% метанола и воды). Выход: 457 мг, 73%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: [(M + 2H)/2]+ = 809,8, [(M + 2H - Boc)/2]+ = 759,8.

Стадия d.

Перемешиваемый раствор соединения стадии c (451 мг, 0,279 ммоль) в 2-метил-2-бутене (0,25 мл), дихлорметане (4,0 мл) и ТФУ (2,0 мл) перемешивали до прекращения выделения газа. Все летучие вещества удаляли вакуумными методами. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: [(M + 2H)/2]+ = 609,8, [(M + 3H)/3]+ = 407,0. К перемешиваемому при 0 °C раствору остатка в тетрагидрофуране (6 мл) и воде (6 мл) добавляли гидроксид лития (240 мг, 10,03 ммоль). По завершении реакцию гасили уксусной кислотой (0,638 мл, 11,14 ммоль) и все летучие вещества удаляли с помощью вакуумных методов. Остаток очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 90% метанола и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 209 мг, 67%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: [(M + 2H)/2]+ = 569,8, [(M + 2H - Boc)/2]+ = 380,3.

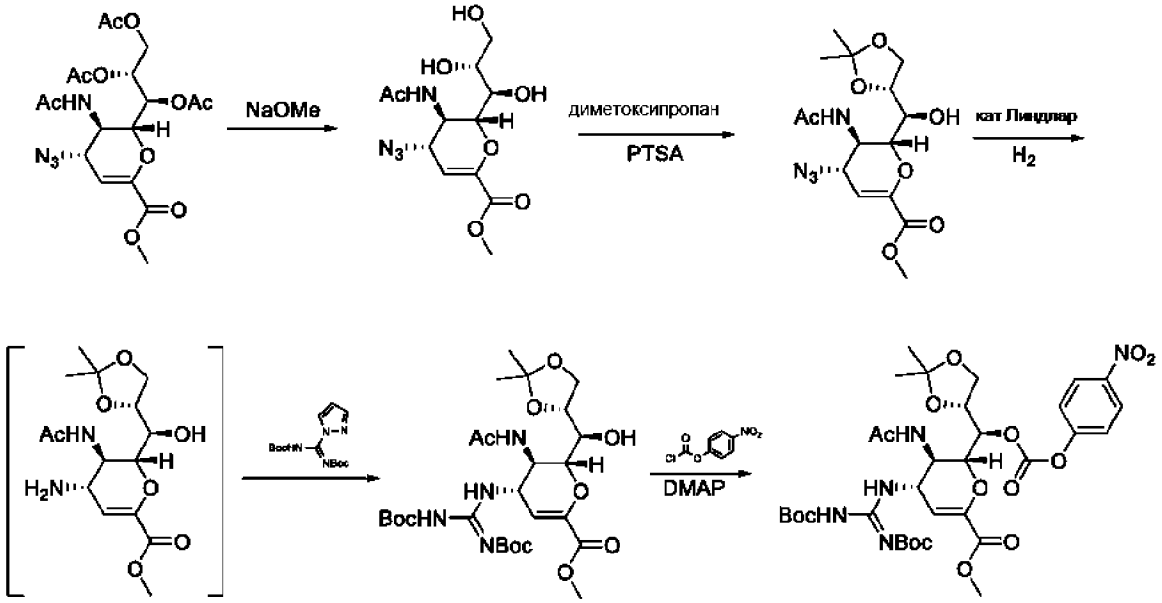
Пример 108. Синтез конъюгата 30

Раствор азидофункционализированного агликозилированного Fc (Пример 7, SEQ ID NO: 35) в буферном растворе ФСБ x 1 с pH 7,4 (50 мг, 5 мл, 1,874 мкмоль) добавляют в центрифужную пробирку, содержащую буферный раствор ФСБ x 1 с pH 7,4 (9,50 мл) малой молекулы, дериватизированной алкином (8,7 мг, 0,0064 ммоль, ПС 65), сульфата меди (2 мг, 0,013 ммоль), трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)-

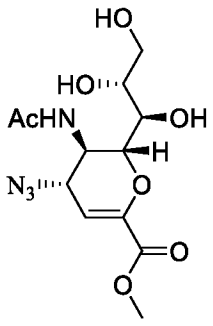
амина (22 мг, 0,0508 ммоль) и аскорбата натрия (25 мг, 0,127 ммоль). Полученную смесь осторожно встряхивали в течение ночи. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. примере 10). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 61548 Да (DAR = 2,4). Выход 32,33 мг, выход 67%.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 30, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, который включает С-концевой остаток лизина и N-концевую сигнальную последовательность мышиного IgG. После экспрессии С-концевая лизиновая и N-концевая сигнальные последовательности IgG мыши Fc конъюгата 30 протеолитически расщепляются, в результате чего образуется Fc, имеющий последовательность, в которой отсутствует Lys447 (например, отсутствует С-концевой лизиновый остаток), и N -концевая сигнальная последовательность мышиного IgG. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 109: Синтез промежуточного соединения занамивира п-нитрофенилкарбоната.



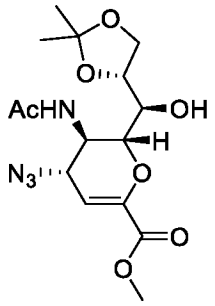
Стадия а.



Промежуточное соединение триацетокси-азидо занамивир (10,0 г, 22 ммоль) растворяли в 60 мл сухого метанола, затем обрабатывали 20 мл метоксида натрия в метаноле (0,5 М в метаноле, 10 ммоль) при охлаждении на бане с ледяной водой. За ходом реакции следили с помощью ЖХМС, которая завершалась через 2 часа. Затем pH реакционного раствора доводили до значения от 5 до 6 с использованием ионообменной

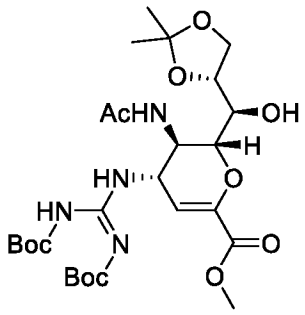
смолы Amberlite IRN-77. Смесь фильтровали для удаления смолы и упаривали досуха в вакууме. Полученное масло использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =331,1.

Стадия b.



К раствору продуктов с предыдущей стадии в 70 мл ацетона добавляли 30 мл 2,2-диметоксипропана и 1 гидрата п-толуолсульфоновой кислоты (400 мг, 2,0 ммоль), полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. По истечении этого времени добавляли бикарбонат натрия (170 мг, 2,0 ммоль) и смесь упаривали досуха. Полученный остаток использовали на следующей стадии без очистки. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =371,2.

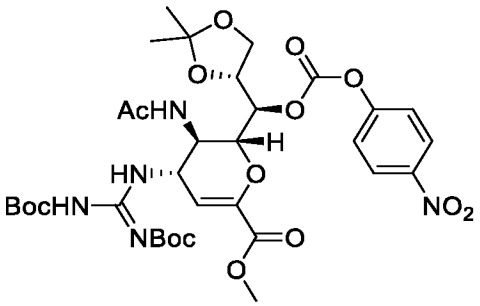
Стадии c и d.



К раствору материала с предыдущей стадии в 60 мл метанола добавляли 5,0 г катализатора Линдлара. Полученную смесь продували водородом каждые 30 минут и перемешивали в течение 5 часов. После завершения реакции, как определено с помощью ВЭЖХ, катализатор отфильтровывали через целит. Фильтрат упаривали и использовали на следующей стадии без очистки.

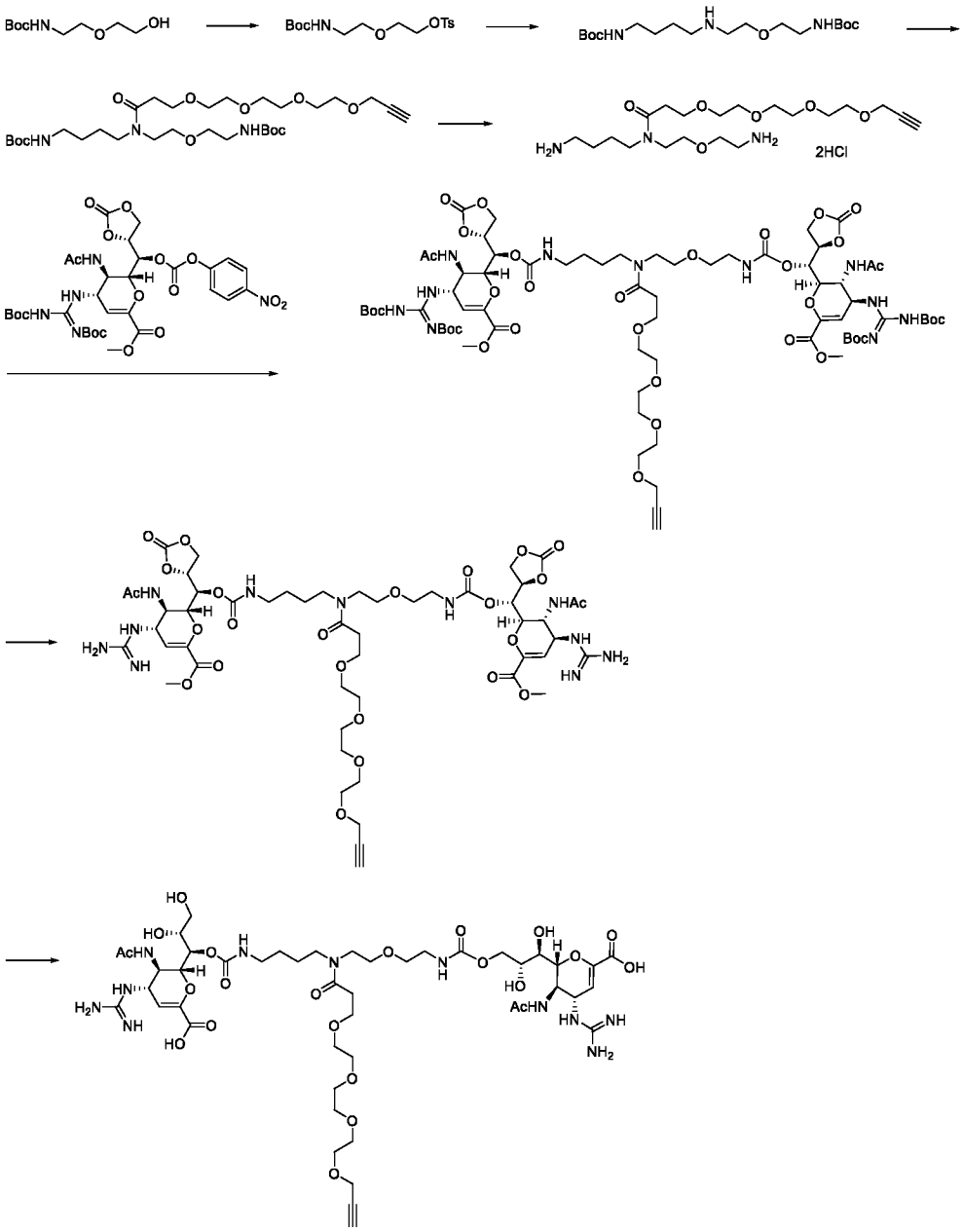
Неочищенный продукт с предыдущей стадии в 60 мл ТГФ обрабатывали N,N'-бис-boc-1-гуанилпиразолом (9,3 г, 30,0 ммоль) и DIEA (9,9 мл, 57,0 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока весь исходный материал не израсходовался, как определено с помощью ЖХМС (4 ч). Раствор упаривали и очищали флэш-хроматографией, элюировали от 20% до 80% этилацетатом/дихлорметаном. Выход 8,8 г, 59,0% за четыре стадии. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H 587,3.

Стадия e.

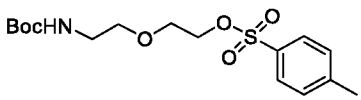


Реакционную колбу, содержащую продукт с предыдущей стадии (6,5 г, 11 ммоль), продували азотом в вакууме и растворяли в безводном дихлорметане (100 мл). После охлаждения раствора на бане с ледяной водой, добавляли DMAP (4,89 г, 40 ммоль) и перемешивали до растворения, затем порциями добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (5,58 г, 28 ммоль) при перемешивании при температуре от 0 °C до комнатной температуры в течение 1 часа. ЖХМС демонстрирует исходный материал в течение 1 часа, поэтому было добавлены дополнительные количества DMAP (1,22 г, 10 ммоль) и 4-нитрофенилхлорформиата (1,0 г, 5 ммоль). Реакция продолжалась в течение еще 4 часов, затем раствор упаривали и очищали флэш-хроматографией, элюируя от 20% до 80% этилацетатом/дихлорметаном. Выход: 5,1 г, 59,9%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 752,2$.

Пример 110. Синтез ПС 71

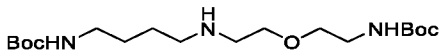


Стадия a.



К раствору 2-(2-Boc-аминоэтокси)этанола (6,15 г, 30 ммоль) в безводном ДХМ (60 мл) добавляли DIPEA (7,8 г, 60 ммоль) и DMAP (366,6 мг, 3 ммоль). Затем порциями в течение 30 минут добавляли п-толуолсульфонилхлорид (6,86 г, 36 ммоль). После перемешивания полученной смеси в течение 3 дней ее упаривали на роторном испарителе и очищали с помощью ОФЖХ (от 20% до 70% ацетонитрила/воды). Выход: 3,71 г, 34,4%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M - Boc + H]^+ = 260$.

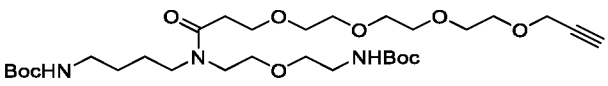
Стадия b.



К раствору продукта стадии a (2,1 г, 5,83 ммоль) в безводном ТГФ (10 мл) добавляли карбонат натрия (1,24 г, 11,7 ммоль) и N-Boc-1,4-диаминобутан (1,32 г, 7 ммоль). Полученную смесь нагревали при 60°C в

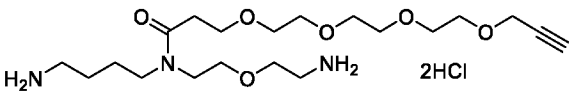
течение 1 дня. Затем соль отфильтровывали и фильтрат упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 50% ацетонитрила и воды). Выход: 1,94 г, 88,6%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 376,0$.

Стадия c.



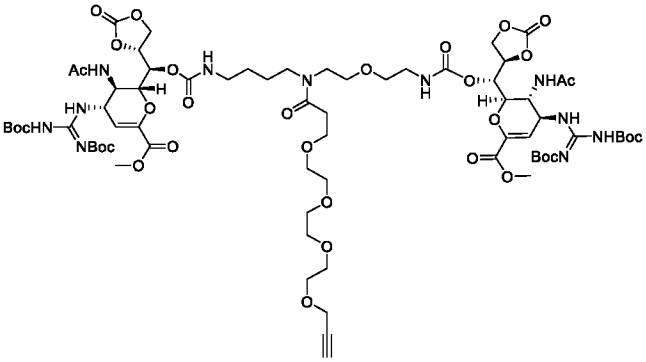
К раствору ПЭГ-4 пропаргиловой кислоты (781 мг, 3 ммоль) и HATU (1,14 г, 3 ммоль) в безводном ДМФ (3 мл) добавляли DIPEA (390 мг, 3 ммоль) с последующим добавлением раствора продукта стадии a (940 мг, 2,5 ммоль) и DIPEA (390 мг, 3 ммоль) в безводном ДМФ (3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (от 5 до 80% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 960,2 мг, 65,3%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 618,3$, $[M - Boc + H]^+ = 518,3$.

Стадия d.



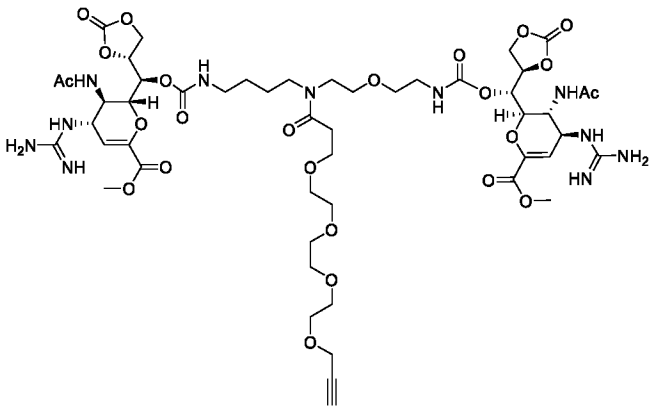
Продукт стадии c (960,2 мг, 1,63 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (6 мл). Добавляли раствор 4н HCl в диоксане (4 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Его упаривали на роторном испарителе. Остаток экстрагировали водой (3 × 3 мл) и этилацетатом (10 мл). Объединенные водные слои лиофилизировали. Выход: 760 мг, 95,1%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 418,0$.

Стадия e.



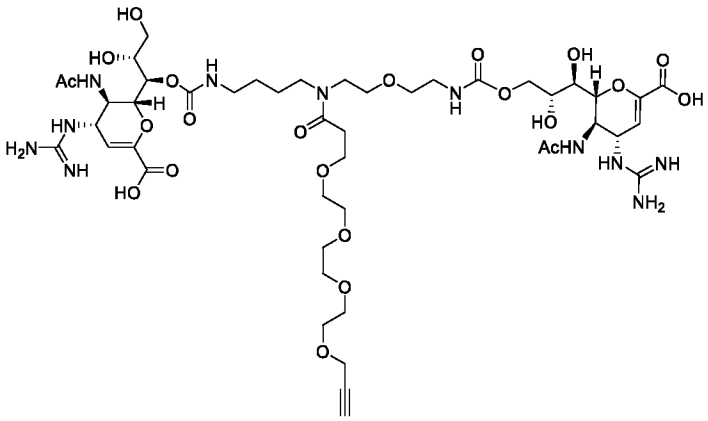
К смеси продукта стадии d (556,2 мг, 1,13 ммоль) и DIPEA (741 мг, 5,7 ммоль) в безводном ДМФ (3 мл) порциями добавляли п-нитрофенилкарбонат занамивира (1,67 г, 2,26 ммоль, как описано в примере 109) в течение 20 минут. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (от 30% до 90% ацетонитрила/воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 1,35 г, 74%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 807,9$.

Стадия f.



Продукт стадии e (1,35 г, 0,836 ммоль) растворяли в ТФУ (5 мл). Реакционную смесь нагревали при 30 °C в течение 1 часа, очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (от 0% до 35% ацетонитрила/воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 1,00 г, 82,9%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 607,8.

Стадия g.



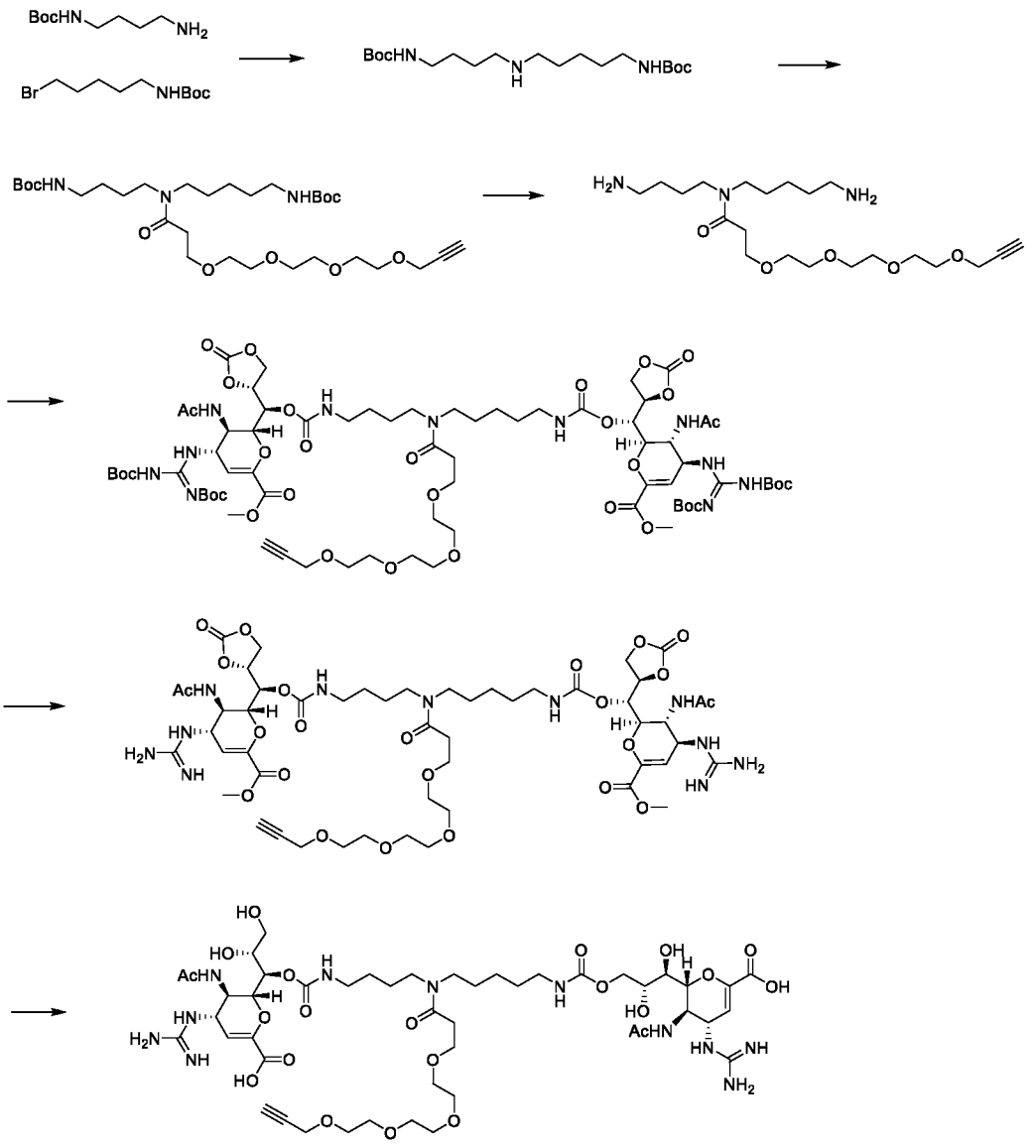
Продукт стадии f (1,00 г, 0,693 ммоль) растворяли в MeOH (12 мл), затем охлаждали на бане с ледяной водой. Затем обрабатывали раствором моногидрата LiOH (286 мг, 6,6 ммоль) в воде (9 мл). Полученную смесь перемешивали в течение ночи, а затем подкисляли раствором 4 н. HCl в диоксане (2 мл). После удаления органических растворителей на роторном испарителе остаток очищали препаративной ВЭЖХ (Isco ACCQ Prep, Luna 5 мкм C18 (2) 100 Å LC колонка 100 мм x 30 мм; градиент: 0% ацетонитрила/воды в течение 2 минут, затем от 0% до 15% ацетонитрила/воды в течение 12 минут, затем изократический при 15% ацетонитриле в течение 10 минут с использованием 0,1% ТФУ). Выход: 275,9 мг, 29,2%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 567,8, $[(M + 3H)/3]^+$ = 378,9.

Пример 111. Синтез конъюгата 31

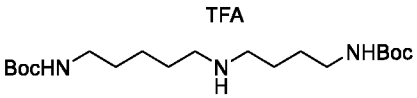
В стерильную центрифужную пробирку объемом 15 мл загружали аскорбат натрия (68,1 мг, 0,344 ммоль), THPTA (14,9 мг, 0,0344 ммоль), малую молекулу, дериватизированную алкином (17,5 мг, 0,00953 ммоль, описанную в примере 110) и буфер ФСБ 7,4 (1 мл). После перемешивания на вортексе для растворения всего добавляли ПЭГ4-азидо Fc (50 мг, 0,0008588 ммоль, описанный в примере 7 SEQ ID No. 18), а затем раствор CuSO4 (2,05 мг, 0,0129 ммоль) в ФСБ (0,5 мл). Смесь осторожно вращали в течение 20 часов, затем очищали аффинной хроматографией на колонке с протеином A с последующей эксклюзионной хроматографией. Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 63586 Да (DAR =

3,8). Выход: 32,8 мг, выход 66%.

Пример 112. Синтез ПС 72

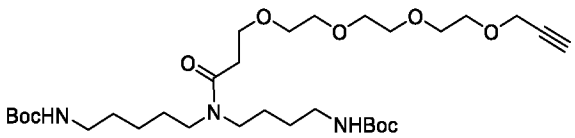


Стадия a.



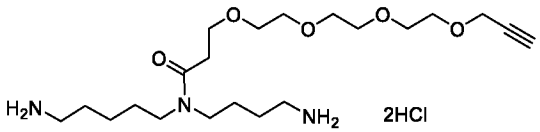
К раствору N-Boc-1,4-диаминобутана (1,56 г, 8,28 ммоль) в безводном ДМФ (7 мл) добавляли карбонат натрия (742 мг, 7 ммоль) и 5-(Boc-амино)-1-пентилбромид (1,73 г, 6,5 ммоль). Полученную смесь нагревали при 50°C в течение 24 часов. Затем соль отфильтровывали и фильтрат упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали с помощью ОФЖХ (от 5 до 50% ацетонитрила/воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 2 г, 63,2%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 374,4$.

Стадия b.



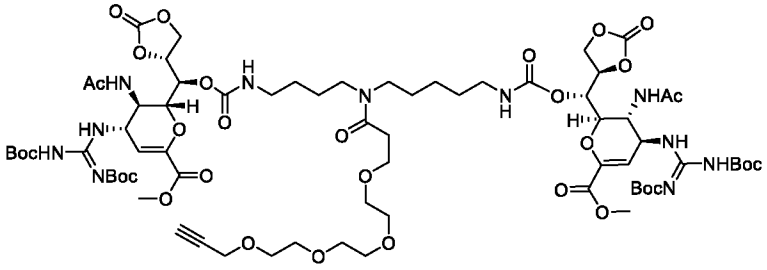
К раствору пропаргил-ПЭГ4-кислоты (1,3 г, 5 ммоль) и HATU (2,1 г, 5,5 ммоль) в безводном ДМФ (6 мл) добавляли DIPEA (1,3 г, 10 ммоль). Через 5 минут реакционную смесь добавляли к продукту стадии a (2 г, 4,1 ммоль) и перемешивали в течение 1 часа. Затем его непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (от 5 до 80% ацетонитрила/воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 2,34 г, 95%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+$ = 616,4, $[M - Boc + H]^+$ = 516,4.

Стадия c.



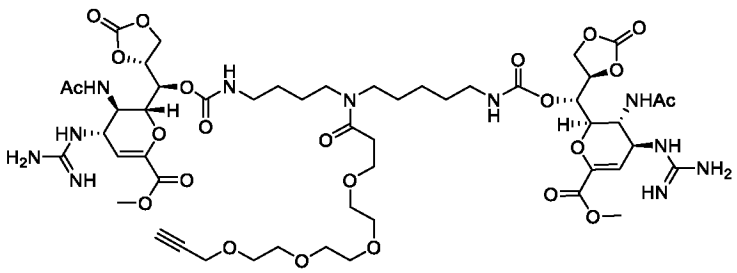
Продукт стадии b (2,34 г, 3,8 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (12 мл). Добавляли раствор 4н HCl в диоксане (10 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Его упаривали на роторном испарителе. Остаток повторно растворяли в ацетонитриле/воде (1:1, ~16 мл) и раствор лиофилизировали. Неочищенный продукт переносили на следующую стадию без дополнительной очистки. Выход 1,91 г, количественный выход. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+$ = 416,4.

Стадия d.



К раствору п-нитрофенилкарбоната занамивира (2,25 г, 3,05 ммоль, описанного в примере 109) в безводном ДХМ (3 мл) порциями добавляли смесь продукта стадии c (610 мг, 1,249 ммоль) и DIPEA (1,05 г, 8,1 ммоль) в безводном ДМФА (4 мл) в течение 20 минут. После перемешивания в течение 1 часа реакционную смесь упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (от 30 до 80% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 1,73 г, 85,9%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 806,8, $[(M - Boc + 2H)/2]^+$ = 756,8.

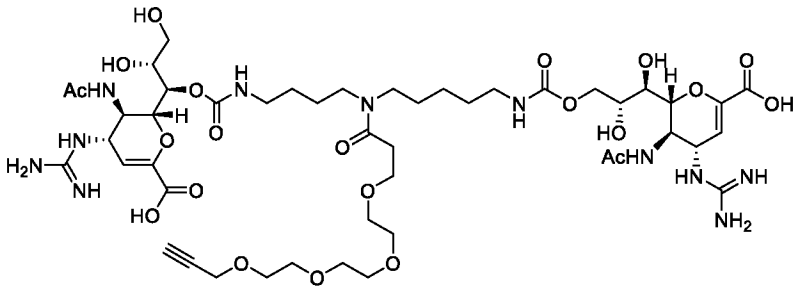
Стадия e.



Продукт стадии d (1,73 г, 1,073 ммоль) растворяли в ТФУ (5 мл). После нагревания раствора при 30

°C в течение 3 часов, его непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (от 0% до 35% ацетонитрила/воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 1,176 г, 76,1%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 606,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 405$.

Стадия f.



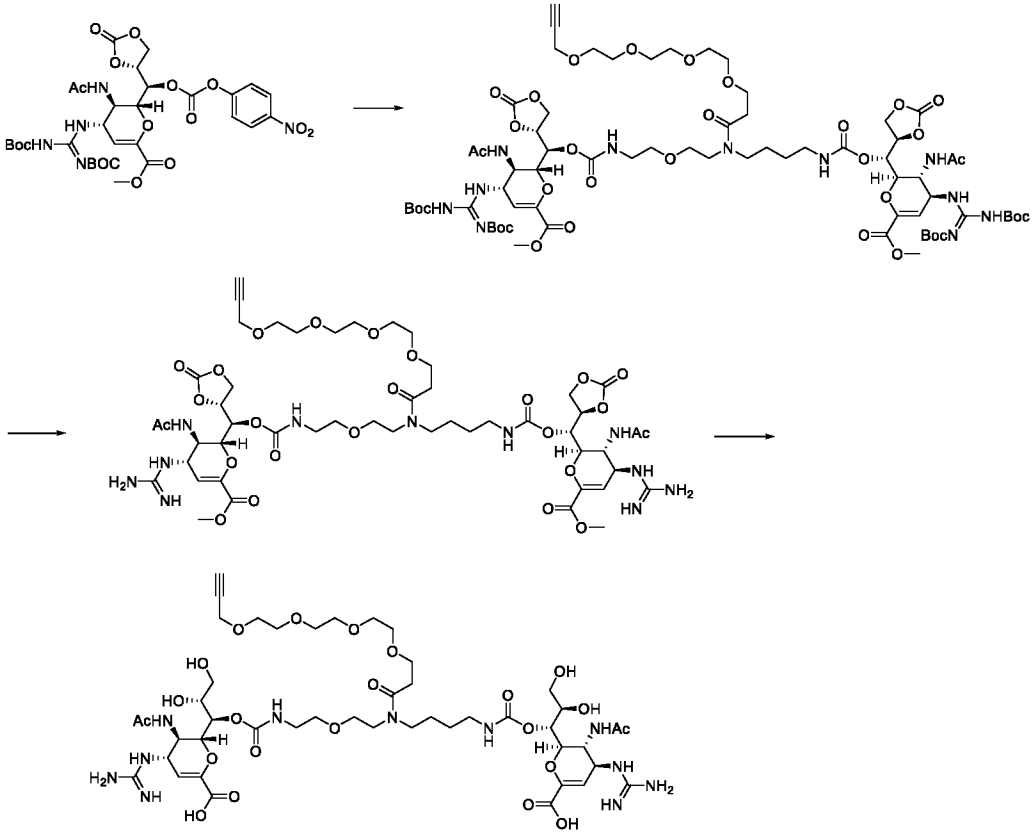
Продукт стадии e (1,176 г, 0,817 ммоль) растворяли в MeOH (12 мл) и раствор охлаждали на бане с ледяной водой. Обрабатывали по каплям раствором моногидрата LiOH (344,4 мг, 8,2 ммоль) в воде (9 мл). Полученную смесь перемешивали в течение ночи, а затем подкисляли раствором 4 н. HCl в диоксане (2 мл). После удаления органических растворителей на роторном испарителе остаток очищали препаративной ВЭЖХ (Isco ACCQ Prep, Luna 5 мкм C18 (2) 100 Å LC колонка 100 мм x 30 мм; градиент: 0% ацетонитрила/воды в течение 2 минут, затем от 0% до 15% ацетонитрила/воды в течение 12 минут, затем изократический при 15% ацетонитриле в течение 10 минут с использованием 0,1% ТФУ). Выход: 108 мг, 9,7%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 566,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 378,2$.

Пример 113. Синтез конъюгата 32

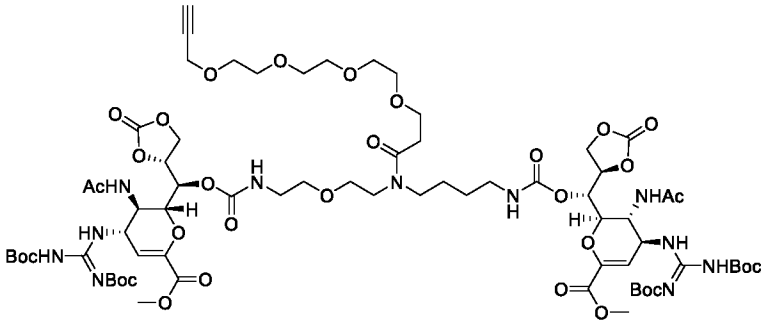
В стерильную центрифужную пробирку объемом 15 мл загружали аскорбат натрия (68,1 мг, 0,344 ммоль), THPTA (14,9 мг, 0,0344 ммоль), продукт из примера 112, ПС 72 (17,5 мг, 0,00953 ммоль) и ФСБ 7,4 (1 мл). После перемешивания на вортексе для растворения всего добавляли азидо Fc (50 мг, 0,0008588 ммоль, описанный в примере 7 с SEQ ID NO: 4), а затем раствор CuSO4 (2,05 мг, 0,0129 ммоль) в ФСБ (0,5 мл). Смесь вращали в течение 20 часов. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином A с последующим проведением эксклюзионной хроматографии. Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 63588 Да (DAR = 3,8). Выход 30,9 мг, выход 62%.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 32, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, которая включает C-концевой остаток лизина. При экспрессии C-концевой лизин Fc конъюгата 32 протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность, в которой отсутствует Lys447 (например, отсутствует C-концевой остаток лизина). Наличие или отсутствие C-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 114. Синтез ПС 73

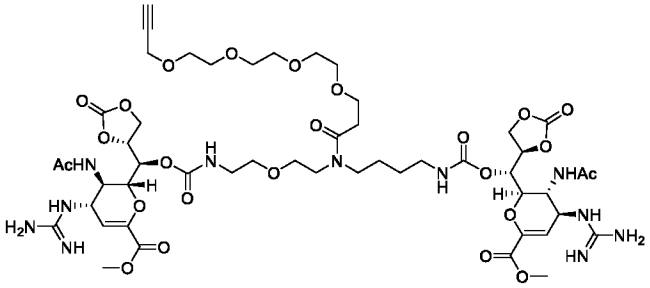


Стадия a.



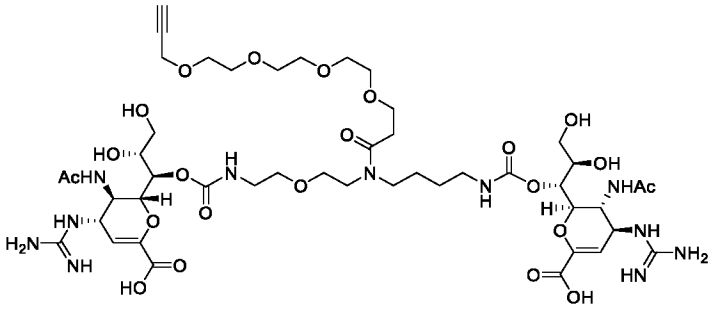
К раствору п-нитрофенилкарбоната занамивира (698,4 мг, 0,95 ммоль, описанного в примере 109) в безводном ДХМ (2 мл) порциями в течение 10 минут добавляли смесь центрального линкера пропаргилдиамина (209 мг, 0,426 ммоль как описано в примере 110) и DIPEA (330,8 мг, 2,56 ммоль) в безводном ДМФ (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (от 30% до 85% ацетонитрила/воды, без ТФУ в качестве модификатора). Выход: 531 мг, 69,2%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+$ = 807,8, $[(M - Boc + 2H)/2]^+$ = 757,8.

Стадия b.



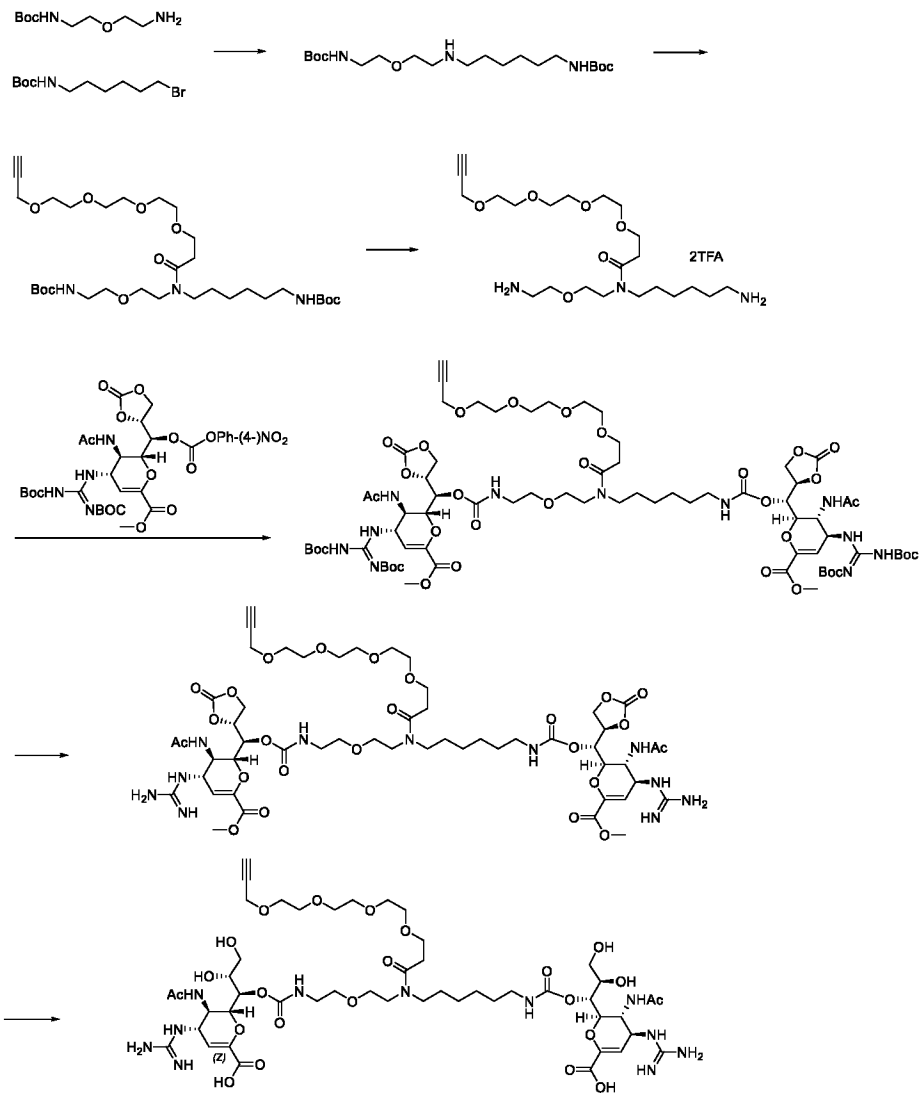
Продукт стадии b (531 мг, 0,329 ммоль) растворяли в ДХМ (1,5 мл) и ТФУ (1,5 мл), затем перемешивали при 35 °C в течение 3 часов. Его упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (от 5% до 30% ацетонитрила/воды, без ТФУ в качестве модификатора). Выход: 387 мг, 97,1%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 607,6$, $[(M + 3H)/3]^+ = 405,4$.

Стадия c.

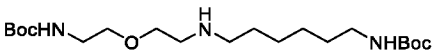


Продукт стадии b (121,4 мг, 0,1 ммоль) растворяли в 1,0 М растворе NaCl (3 мл) и ацетонитриле (1 мл). После охлаждения раствора до -8 °C (на солевой/ледяной бане) по каплям добавляли 1,0 М NaOH (0,4 мл, 0,4 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при температуре от -14°C до -8 °C в течение 6 часов. Затем его нейтрализировали с помощью 4 н. HCl в растворе диоксана (100 мкл) и непосредственно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (Isco ACCQ prepare, Luna 5 мкм C18(2) 100 колонка ЖХ 100 мм x 30 мм; градиент: 0% ацетонитрила/воды в течение 2 минут, затем от 0% до 17,8% ацетонитрила/воды в течение 12 минут, затем изократический при 17,8% ацетонитриле в течение 10 минут с использованием 0,1% ТФУ). Выход: 85,5 мг, 62,8%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 567,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 378,9$.

Пример 115. Синтез ПС 74

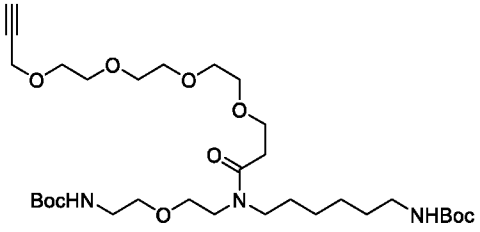


Стадия a.



К раствору N-Boc-2-(2-аминоэтокси)этиламина (1,2 г, 5 ммоль) в безводном ДМФ (5 мл) добавляли карбонат натрия (691 мг, 5 ммоль) и N-Boc-6-бром-гексиламин (1,4 г, 5 ммоль). Полученную смесь нагревали при 70°C в течение 24 часов. Затем соль отфильтровывали и фильтрат упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали с помощью ОФЖХ (от 5 до 50% ацетонитрила/воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 444 мг, 22%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 404,3$.

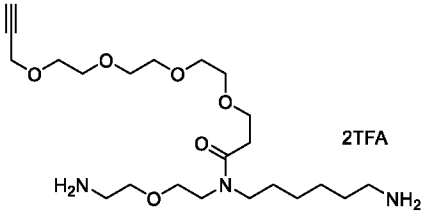
Стадия b.



К раствору пропаргил-ПЭГ4-кислоты (342,6 г, 1,32 ммоль) и HATU (601,5 мг, 1,58 ммоль) в безводном ДМФ (2 мл) добавляли DIPEA (258 мг, 2 ммоль). Через 5 минут реакционную смесь добавляли к

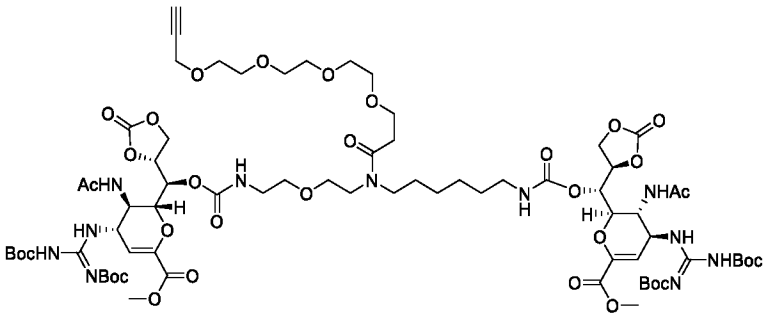
продукту стадии a (444,3 мг, 0,858 ммоль) и перемешивали в течение 1 часа. Затем его непосредственно очищали с помощью ОФЖХ (от 5 до 80% ацетонитрила/воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 297,1 мг, 53,6%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 646,2$, $[M – Boc + H]^+ = 546,2$.

Стадия c.



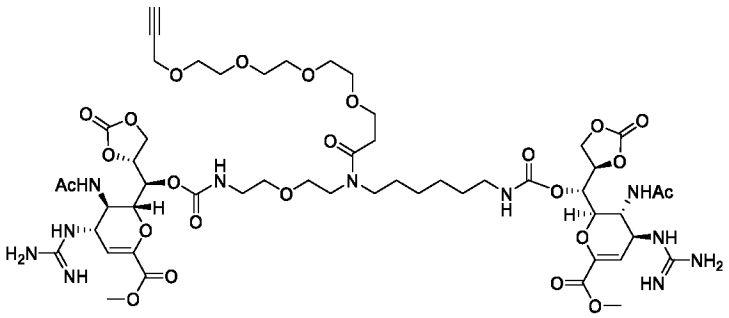
Продукт стадии b (297,1 мг, 0,46 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (2 мл). Добавляли раствор 4н HCl в диоксане (4 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Затем ее упаривали на роторном испарителе и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (от 5% до 50% ацетонитрила/воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 239,6 мг, 77,3%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 446,2$.

Стадия d.



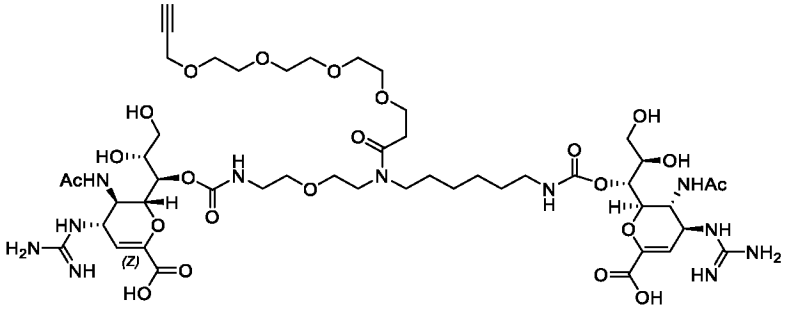
К раствору п-нитрофенилкарбоната занамивира (523,8 мг, 0,71 ммоль, описанного в примере 109) в безводном ДХМ (2 мл) в течение 10 минут порциями добавляли смесь продукта стадии c (239,6 мг, 0,356 ммоль) и DIPEA (245,5 мг, 1,9 ммоль) в безводном ДМФ (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (от 30% до 85% ацетонитрила/воды, без ТФУ в качестве модификатора). Выход: 553 мг, 96,5%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 821,8$, $[(M - Boc + 2H)/2]^+ = 771,8$.

Стадия e.



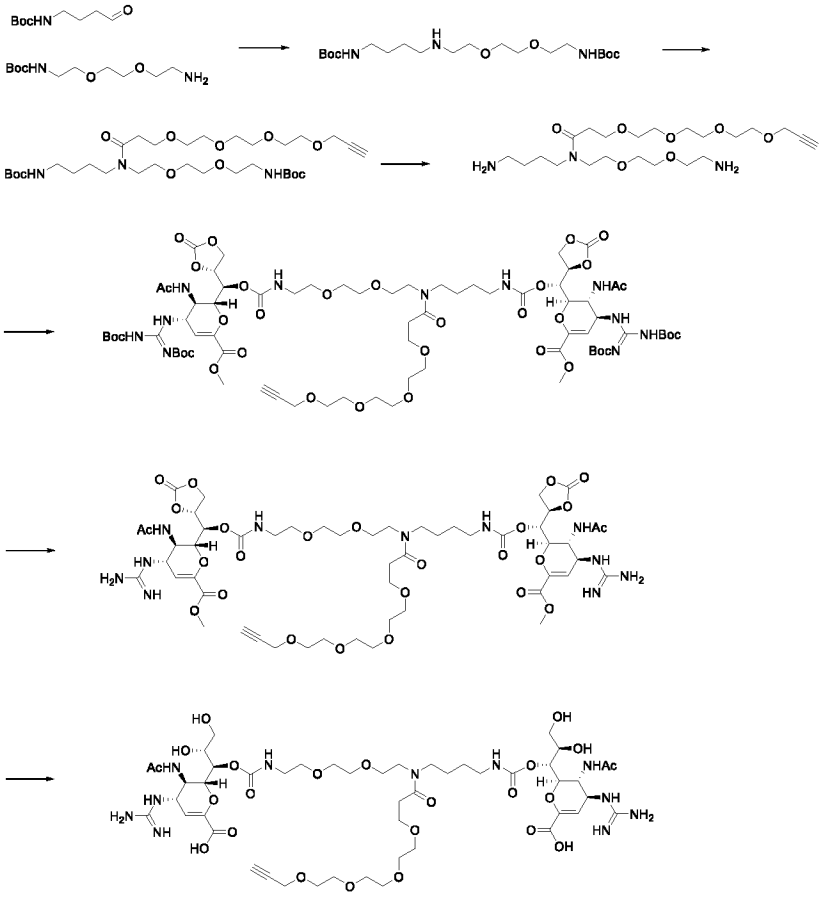
Продукт стадии d (553 мг, 0,343 ммоль) растворяли в ДХМ (1,5 мл) и ТФУ (1,5 мл), затем перемешивали при 35 °C в 3 часов. Его упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (от 5% до 30% ацетонитрила/воды, без ТФУ в качестве модификатора). Выход: 424,6 мг, 99,6%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 621,6$, $[(M + 3H)/3]^+ = 415,0$.

Стадия f.

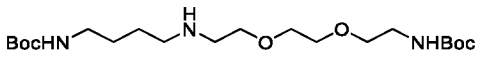


Продукт стадии e (424,6 мг, 0,342 ммоль) растворяли в 1,0 М растворе NaCl (4 мл) и ацетонитриле (4 мл). После охлаждения раствора до -11 °C (на соляной/ледяной бане) по каплям добавляли 1,0 М NaOH (1,53 мл, 1,53 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при температуре от -14 °C до -8 °C в течение 6 часов. Затем его гасили с помощью 4 н. HCl в растворе диоксана (375 мкл) и непосредственно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (Isco ACCQ prepare, Luna 5 мкм C18(2) 100 колонка ЖХ 100 мм x 30 мм; градиент: 0% ацетонитрила/воды в течение 2 минут, затем от 0% до 20,9% ацетонитрила/воды в течение 13,6 минут, затем изократический при 20,9% ацетонитриле в течение 10 минут с использованием 0,1% ТФУ). Выход: 439 мг, 92,3%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 581,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 388,2$.

Пример 116. Синтез ПС 75

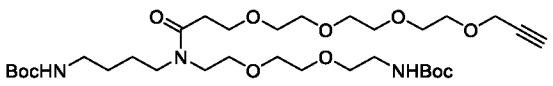


Стадия a.



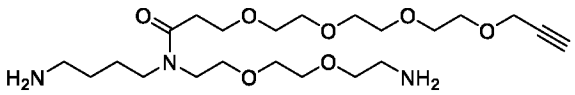
Растворяли смесь трет-бутил(4-оксобутил)карбамата (850 мг, 4,54 мг) и трет-бутил N-{2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил}карбамата (1,99 г, 8 ммоль) в ДХМ (30 мл) и сушили над Na_2SO_4. После фильтрации и упаривания остаток повторно растворяли в безводном ДХМ (20 мл). Порциями добавляли уксусную кислоту (641 мг, 11 ммоль), а затем триацетоксиборгидрид натрия (3,4 г, 16 ммоль) в течение 1 часа. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, затем гасили AcOH (3 мл) и MeOH (10 мл). Смесь фильтровали, и фильтрат упаривали на роторном испарителе и очищали с помощью ОФЖХ (от 5% до 45% ацетонитрила и воды). Выход: 618 мг, 32,5%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 420,4$.

Стадия b.



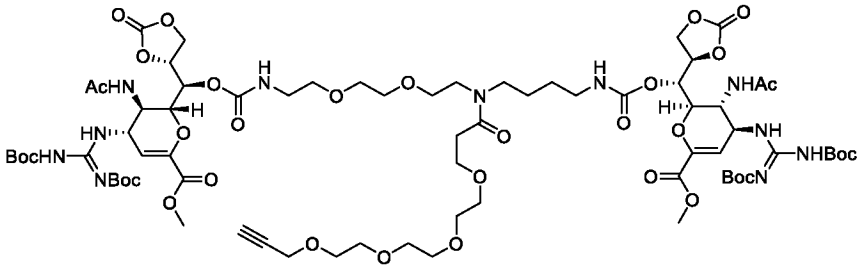
Это соединение получали аналогично продукту стадии b примера 115. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 662,4$, $[M – Boc + H]+ = 562,4$.

Стадия c.



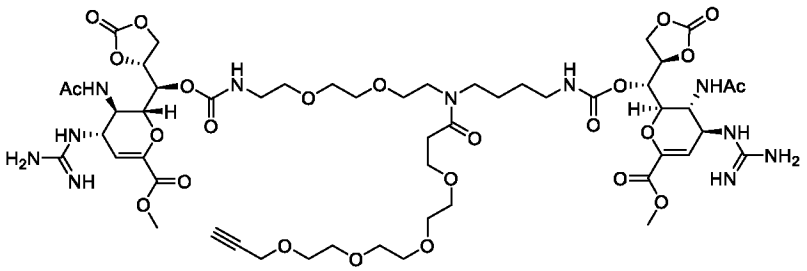
Это соединение получали аналогично продукту стадии c примера 115. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 462,4$.

Стадия d.



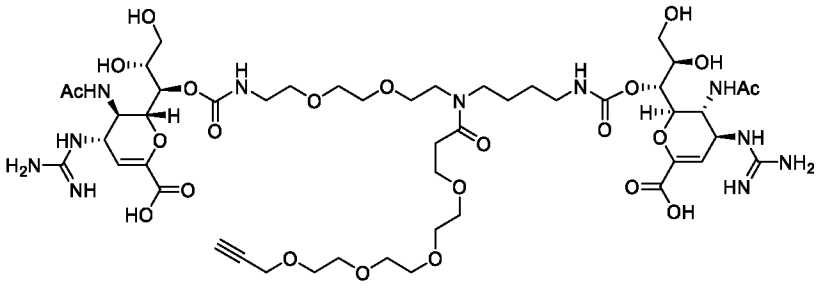
Это соединение получали аналогично продукту стадии d примера 115. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 829,8$, $[(M - Boc + 2H)/2]^+ = 779,8$.

Стадия e.



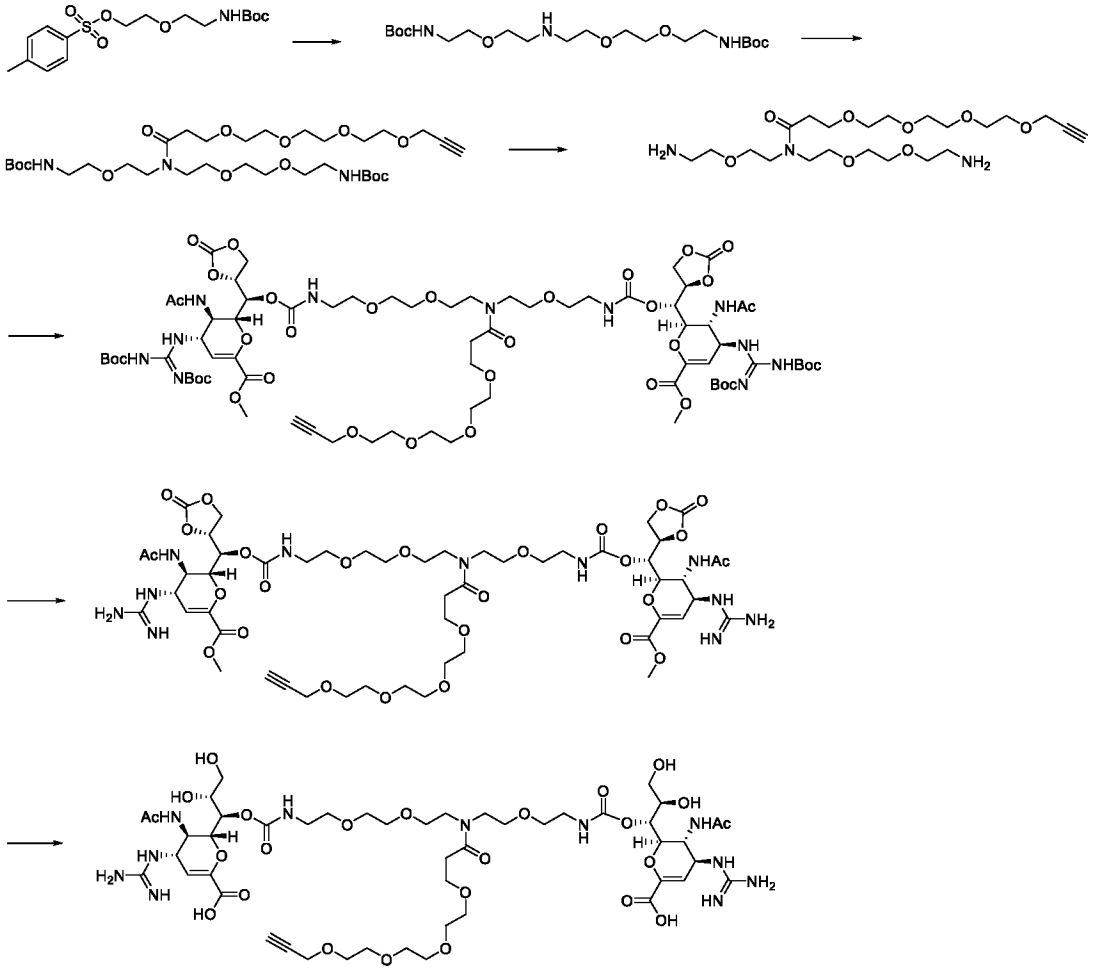
Это соединение получали аналогично продукту стадии e примера 115. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 629,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 420,2$.

Стадия f.

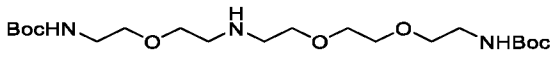


Это соединение получали аналогично продукту стадии f примера 115. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 598,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 393,6$.

Пример 117. Синтез ПС 76

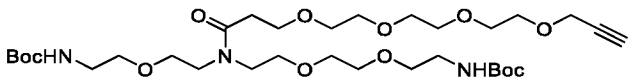


Стадия a.



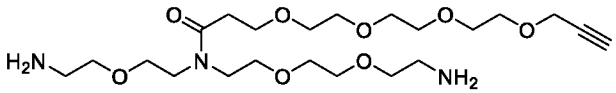
К раствору тозилата N-Boc-ПЭГ-1 (1,54 г, 4,28 ммоль, описанного в примере 110) в безводном ТГФ (8 мл) добавляли трет-бутил-N-2{2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этил}карбамат (1,59 г, 6,42 ммоль) и карбонат натрия (453,7 мг, 4,28 ммоль). Полученную смесь нагревали при 50°C в течение 24 часов. Твердое вещество фильтровали и промывали ацетонитрилом. Фильтрат упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (100 г, от 5 до 90% ацетонитрила и воды). Выход: 1,15 г, 61,7%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 436,4$.

Стадия b.



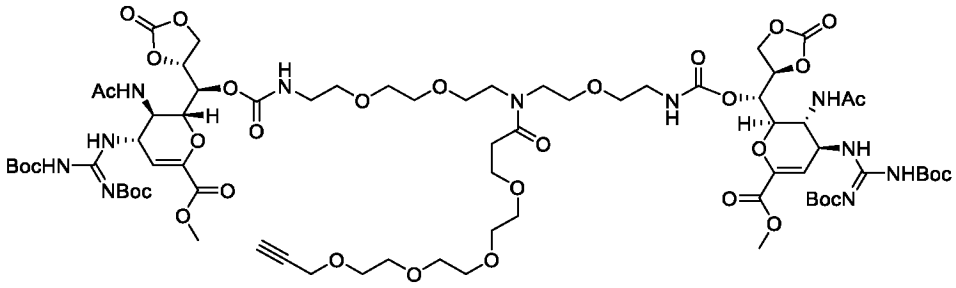
Это соединение получали аналогично продукту стадии b примера 115. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 678,2$, $[M – Boc + H]^+ = 578,2$.

Стадия c.



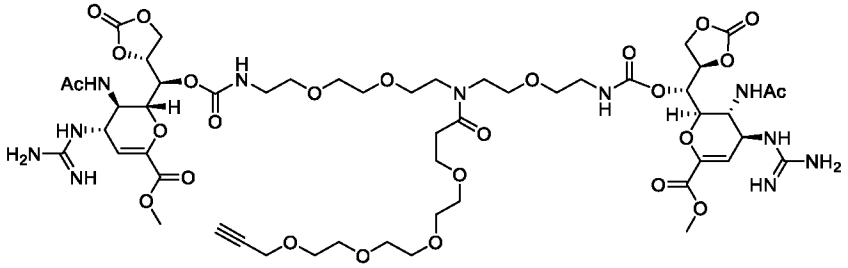
Это соединение получали аналогично продукту стадии c примера 115. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 478,2$.

Стадия d.



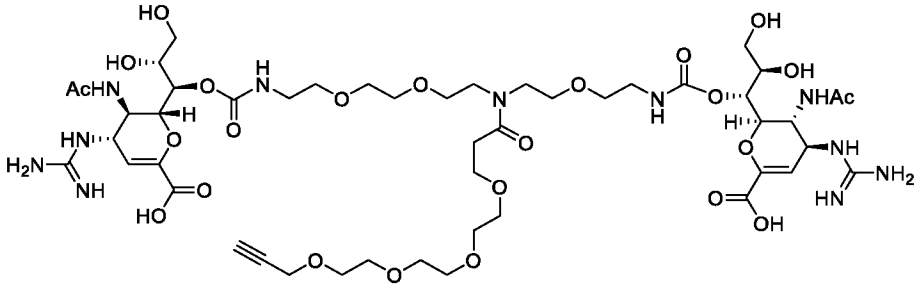
Это соединение получали аналогично продукту стадии d примера 115. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 837,6$, $[(M - Boc + 2H)/2]^+ = 767,8$.

Стадия e.



Это соединение получали аналогично продукту стадии e примера 115. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 637,5$, $[(M + 3H)/3]^+ = 425,6$.

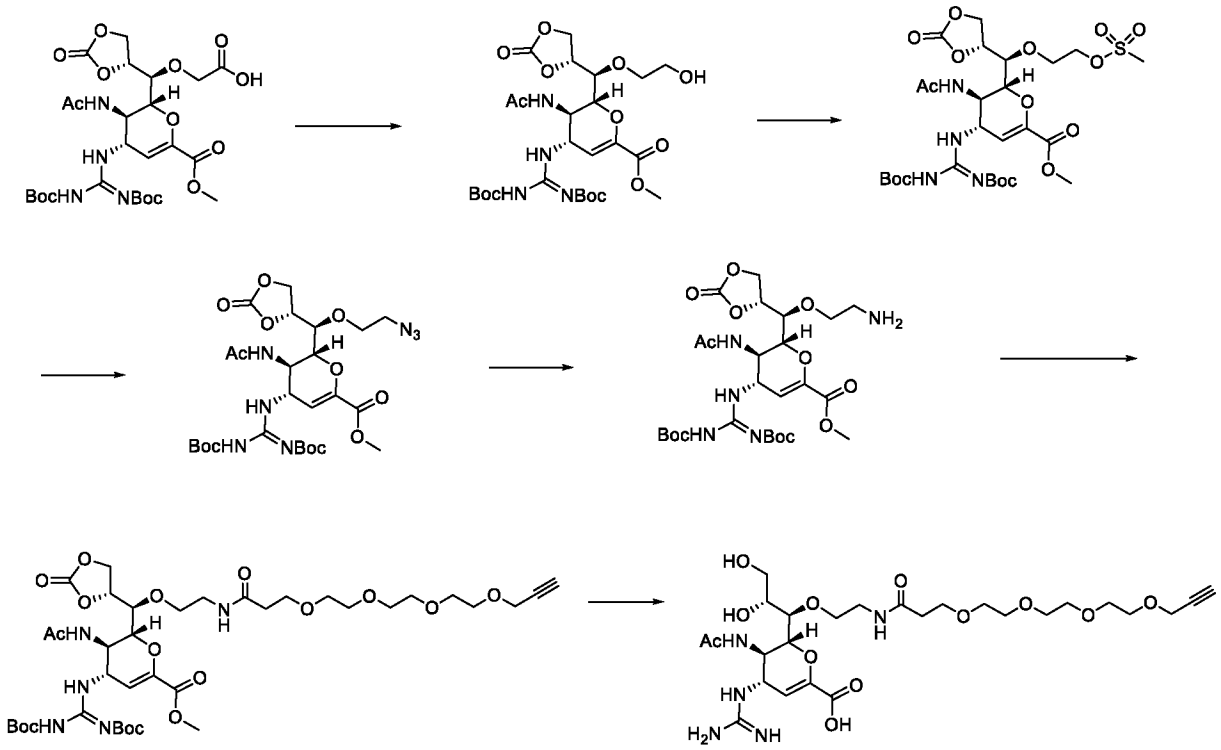
Стадия f.



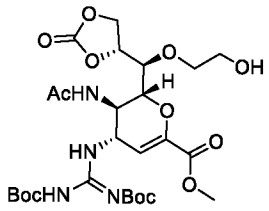
Это соединение получали аналогично продукту стадии f примера 115. Ион(-ы), найденный(-ые)

методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 597,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 399,0$.

Пример 118. Синтез ПС 67

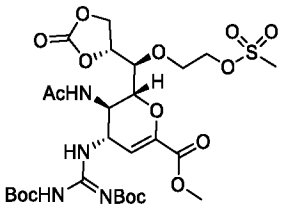


Стадия a.



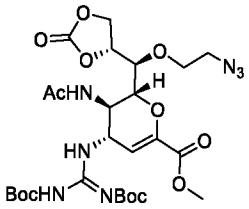
Предварительно приготовленный исходный материал в виде простого эфира кислоты занамивира (0,90 г, 1,43 ммоль, описанный в примере 22) и N-метилморфолин (0,23 мл, 2,14 ммоль) растворяли в ТГФ (35 мл) и охлаждали до 0 °C (баня с ледяной водой) в атмосфере азота. Изобутилхлорформиат (0,24 мл, 1,85 ммоль, в 2 мл ДХМ) добавляли по каплям с помощью шприца в течение 5-минутного периода. Смесь перемешивали при 0 °C в течение 30 минут, затем 15 минут при температуре окружающей среды, а затем охлаждали до 0 °C, куда по каплям добавляли боргидрид натрия (540 мг, 14,3 ммоль, растворенный в 5 мл метанола) в течение 5 минут. Реакционную смесь перемешивали в течение 15 минут, после чего весь исходный материал был израсходован (по данным ЖХ/МС). Несколько капель (~ 1 мл) ледяной уксусной кислоты добавляли для подкисления смеси (pH ~5). Смесь разбавляли этилацетатом и водой, и экстрагировали в этилацетат (3x). Органический слой промывали солевым раствором, органические экстракты сушили над сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Неочищенный материал очищали с помощью хроматографии на силикагеле, сначала сушили на целите, а затем элюировали от 0% до 10% метанолом в ДХМ в течение 30 минут. Выход 0,66 г, 75%. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 617,2.

Стадия b.



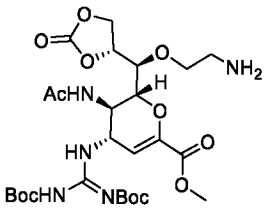
К перемешиваемой смеси продукта с предыдущей стадии (0,66 г, 1,10 ммоль) в 20 мл ДХМ добавляли триэтиламин (0,30 мл, 1,3 ммоль). Смесь охлаждали до 0 °С (баня с ледяной водой) в атмосфере азота, затем обрабатывали мезилхлоридом (0,15 г, 1,3 ммоль) по каплям в течение 5 минут с помощью шприца. Ледяную баню удаляли и реакционную смесь перемешивали в течение 45 минут. Реакцию гасили насыщенным водным бикарбонатом натрия, затем экстрагировали ДХМ (3х). Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Выход: 0,74 г, 99%. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 695,2. Промежуточное соединение использовали на следующей стадии без очистки.

Стадия c.



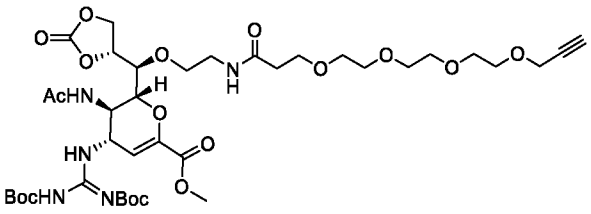
Мезилат из предыдущей стадии (0,74 г, 1,1 ммоль) перемешивали в ДМФ (5 мл) при 80°С с 3 экв. азида натрия (0,21 г, 3,3 ммоль) в течение 5 часов. Смесь разбавляли водой, экстрагировали ДХМ (3х). Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и упаривали. Выход: 0,67 г, 95%. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 642,4. Азид переносили на следующую стадию без очистки.

Стадия d.



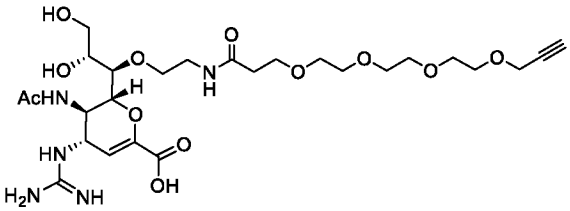
Азид с предыдущей стадии (0,67 г, 1,04 ммоль) перемешивали в метаноле (20 мл) в присутствии катализатора Линдлара (300 мг) в атмосфере газообразного водорода в течение 12 часов. Смесь фильтровали через целит и упаривали с получением указанного в заголовке соединения в виде прозрачного масла. Амин переносили на следующую стадию без очистки. Выход 0,37 г, 54%, 3 стадии. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 616,2.

Стадия e.



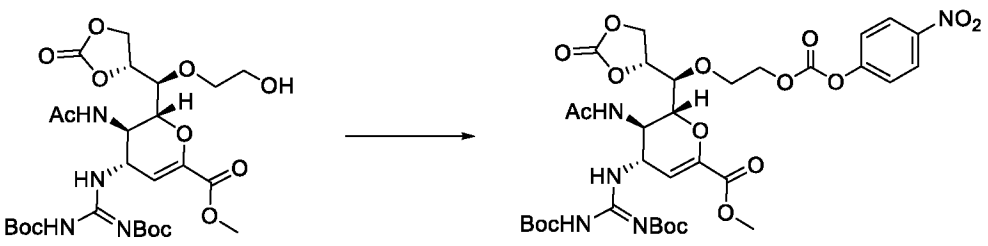
EDC (150 мг, 0,78 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору амина с предыдущей стадии (370 мг, 0,60 ммоль), пропаргил-ПЭГ4-карбоновой кислоты (188 мг, 0,72 ммоль) и триэтиламина (0,100 мл, 0,72 ммоль), растворенных в ДМФ (4 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов при температуре окружающей среды, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (10-95% ацетонитрила/воды, без модификатора, 30-минутный градиент). Чистые фракции объединяли, лиофилизировали и отправляли непосредственно на следующую стадию. Выход: 490 мг, 80%. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[M+H]^+$ = 858,2.

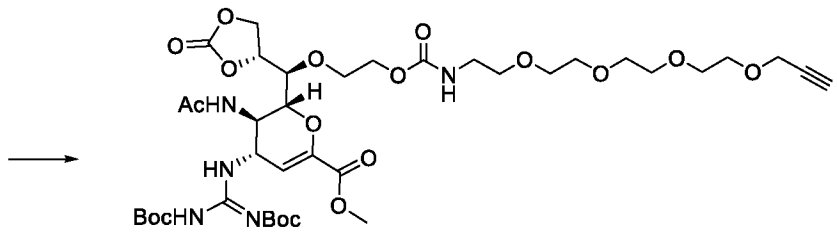
Стадия f.

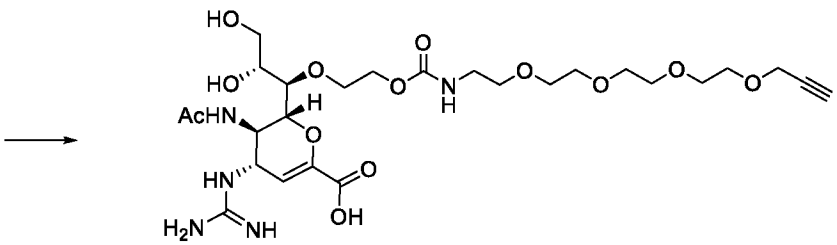


Продукт с предыдущей стадии (490 мг, 0,57 ммоль) перемешивали в ТФУ (4 мл) в течение 45 минут, затем упаривали и подвергали азеотропной перегонке с метанолом (3x) на роторном испарителе. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[M+H]^+$ = 658,2. Остаток перемешивали в смеси метанол/вода 1/1, содержащей LiOH (43 мг, 1,8 ммоль), в течение 30 минут. Реакцию нейтрализовали несколькими каплями ледяной уксусной кислоты, и объем уменьшали вдвое на роторном испарителе. Неочищенный продукт очищали полупрепаративной ВЭЖХ (0%-75% ацетонитрила/воды, 0,1% ТФУ, 30-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали с получением указанного в заголовке соединения. Выход 105 мг, 29%, 3 стадии. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[M+H]^+$ = 618,2.

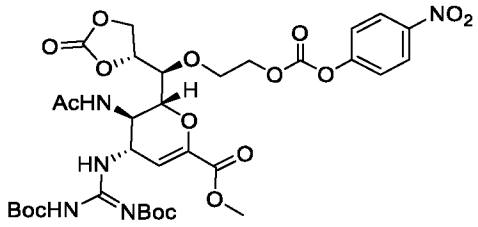
Пример 119. Синтез ПС 68





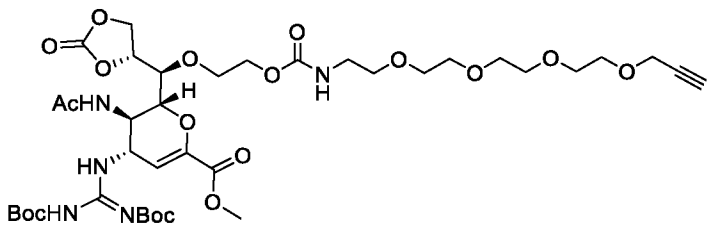


Стадия a.



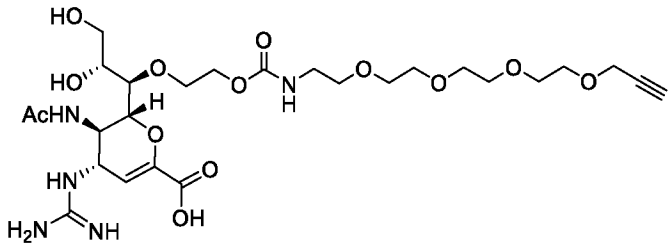
п-Нитрофенилхлорформиат (0,23 г, 1,14 ммоль) добавляли к перемешиваемой смеси первичного спирта (0,47 г, 0,76 ммоль, описанного в примере 118) и триэтиламина (0,21 мл, 1,52 ммоль), растворенных в ДХМ (15 мл, безводный). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа, затем добавляли дополнительное количество триметиламина (0,21 мл) и п-нитрофенилхлорформиата (230 мг) и перемешивание продолжали в течение еще часа, после чего смесь разбавляли водой и экстрагировали ДХМ (3х). Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором и сушили над сульфатом натрия. Растворитель удаляли на роторном испарителе. Неочищенный остаток растворяли в ДХМ (3 мл), наносили на целит и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (от 0% до 70% этилацетата/гексанов, 30-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и упаривали с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества. Выход: 525 мг, 88%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 782,2$.

Стадия b.



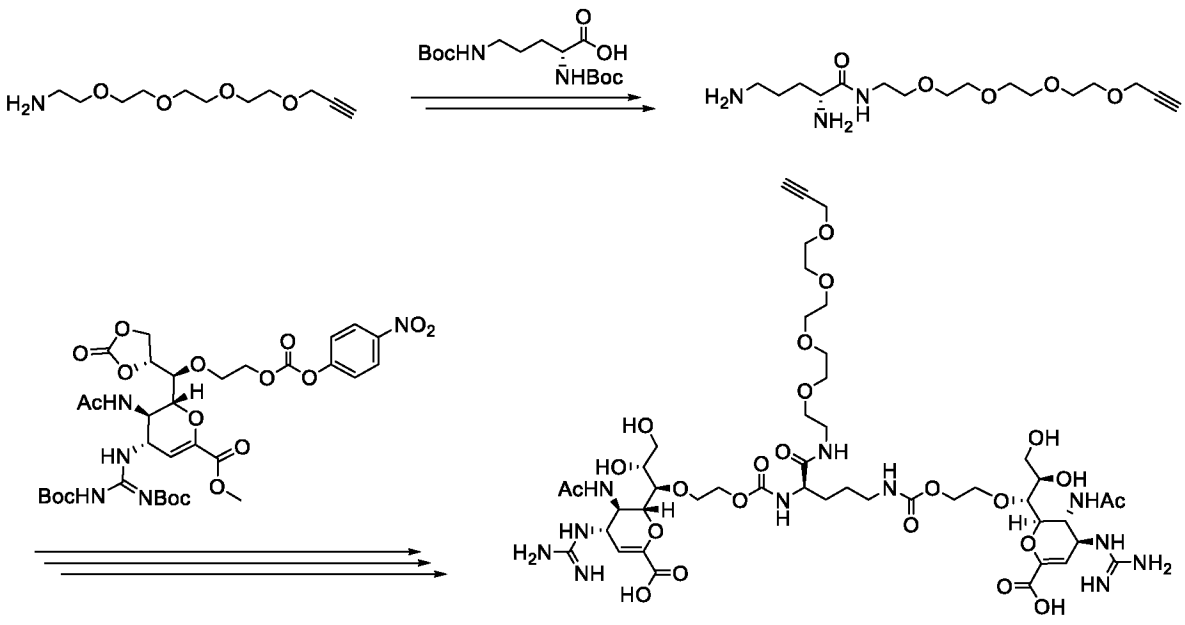
Триэтиламин (0,14 мл, 0,97 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору пропаргил-ПЭГ4-амина (181 мг, 0,78 ммоль) в 1 мл ацетонитрила. Смесь триэтиламин/пропаргил-ПЭГ4-амина добавляли к продукту с предыдущей стадии (510 мг, 0,65 ммоль, в 2 мл ацетонитрила) и перемешивали в течение 1 часа, после чего все исходные материалы были израсходованы. Растворитель удаляли на роторном испарителе. Неочищенный остаток очищали с помощью ОФЖХ (20-95% ацетонитрила/воды, 30-минутный градиент, без модификатора). Выход: 475 мг, 83%. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[M+H]^+$ = 874,2.

Стадия c.

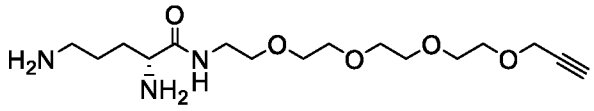


Продукт с предыдущей стадии (475 мг, 0,54 ммоль) перемешивали в ТФУ (5 мл) в течение 2 часов, а затем упаривали и подвергали азеотропной перегонке с метанолом (3x) на роторном испарителе. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[M+H]^+$ = 674,2. Остаток перемешивали в смеси метанол/вода 1:1, содержащей LiOH (49 мг, 1,6 ммоль), в течение 30 минут. Реакцию нейтрализовали ледяной уксусной кислотой, а затем упаривали на роторном испарителе. Продукт очищали полупрепаративной ВЭЖХ (0%-75% ацетонитрила/воды, 0,1% ТФУ, 30-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали. Выход: 204 мг, 59%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M+H]^+$ = 634,2.

Пример 120. Синтез ПС 77



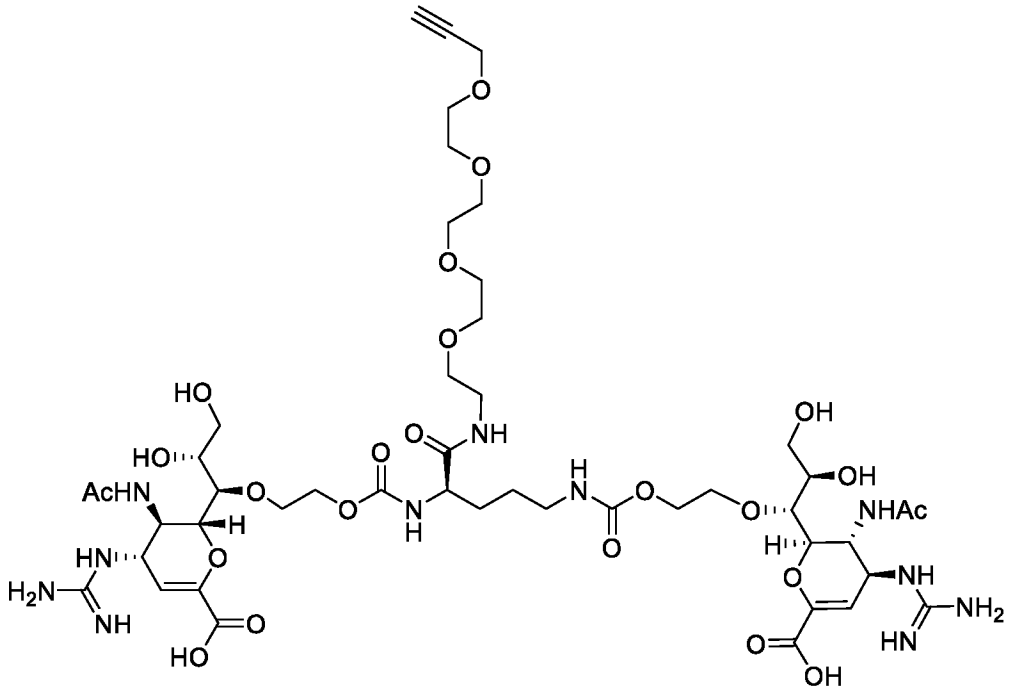
Стадия a.



HATU (0,44 г, 1,16 ммоль, в 1,5 мл ДМФ) по каплям добавляли к перемешиваемому раствору пропаргил-ПЭГ4-амина (0,24 г, 1,05 ммоль), бис-Boc-D-орнитина (0,35 г, 1,05 ммоль) и триэтиламина (0,59 мл, 4,21 ммоль) в ДМФ (2 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при температуре окружающей среды, затем очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (5%-90% ацетонитрила/воды, 0,1% ТФУ, 35-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали с получением продукта в виде вязкого прозрачного масла. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[M+H]^+ = 546,2$.

Boc-защищенное промежуточное соединение перемешивали в 4 н. HCl в диоксане (10 мл) в течение 45 минут при температуре окружающей среды. Растворитель удаляли на роторном испарителе, затем полученный остаток растворяли в деионизированной воде (20 мл), замораживали и лиофилизировали с получением продукта в виде прозрачного масла. Выход 310 мг, 70%, 2 стадии. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M+H]^+ = 346,2$.

Стадия b.

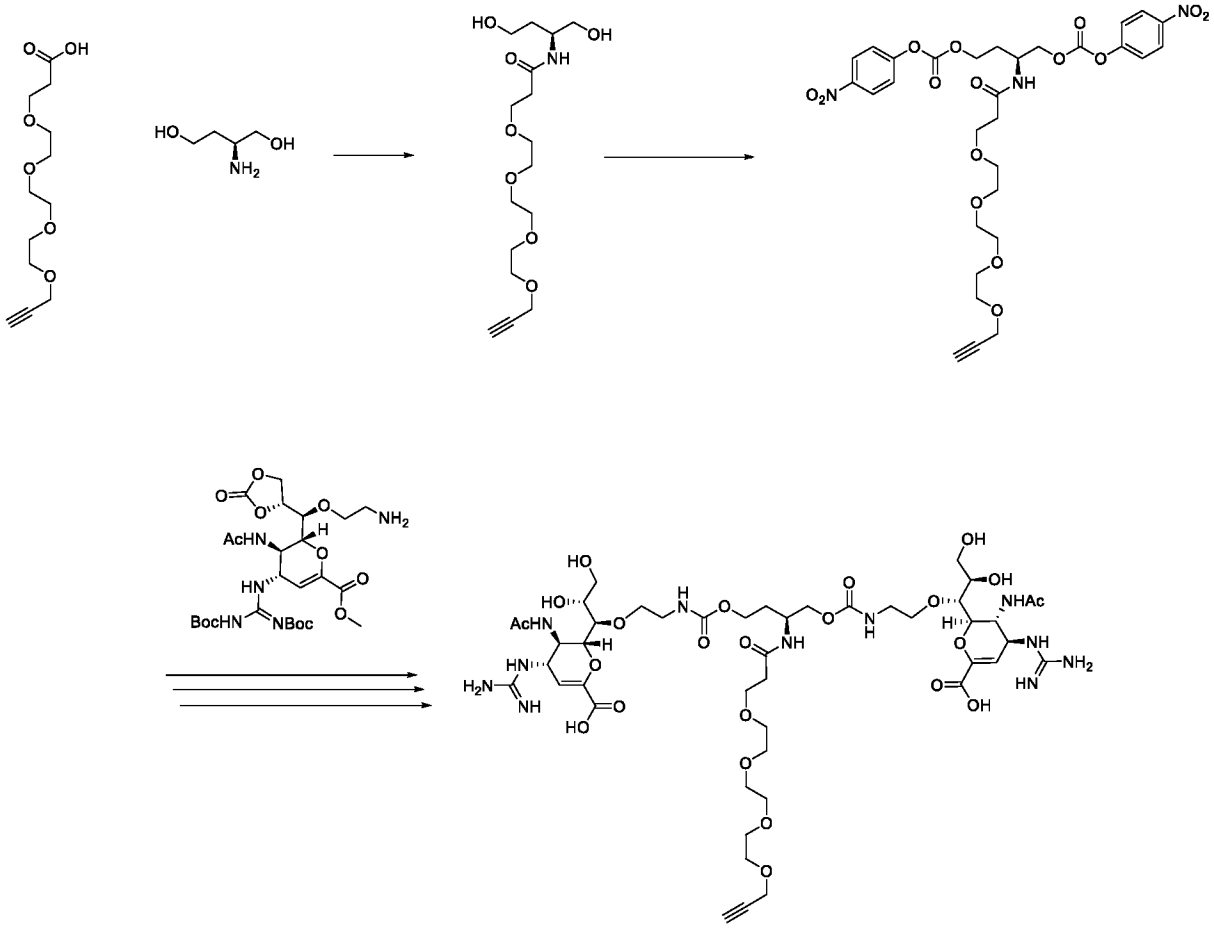


Продукт с предыдущей стадии (96 мг, 0,28 ммоль) и триэтиламин (0,15 мл, 1,11 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) добавляли к перемешиваемому раствору п-нитрофенилкарбоната занамивира (435 мг, 0,56 ммоль, описанному в пример 118, в 6 мл ацетонитрила), и перемешивали в течение 12 часов при температуре окружающей среды, затем в течение 2 часов при 80 °C. Растворитель удаляли и неочищенный остаток очищали с помощью ОФЖХ (10-95% ацетонитрила/воды, без модификатора, 35-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и упаривали на роторном испарителе. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[(M+2H)/2]^+ = 815,8$.

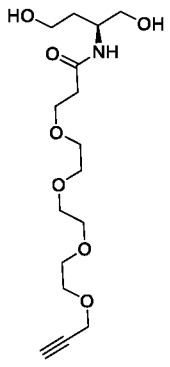
Это промежуточное соединение перемешивали в ТФУ (5 мл) в течение 45 минут, затем упаривали и сушили в условиях высокого вакуума. Ион, найденный методом ЖХ/МС $[(M+2H)/2]^+ = 615,8$.

Эту соль ТФУ перемешивали в (1/1) MeOH/деионизированной воде (5 мл), содержащей LiOH (27 мг, 1,11 ммоль), в течение 30 минут при 0 °C. Смесь подкисляли (pH ~ 5) ледяной уксусной кислотой. Метанол удаляли на роторном испарителе и полученный остаток очищали полупрепаративной ВЭЖХ (5%-70% ацетонитрила/воды, 0,1% ТФУ, 35-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали. Выход 35 мг, 11%, 3 стадии. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[(M+2H)/2]^+ = 575,8$.

Пример 121. Синтез ПС 78

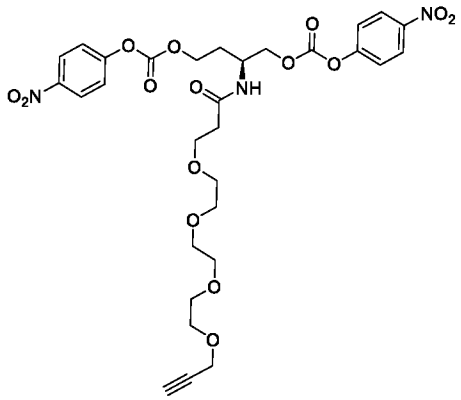


Стадия a.



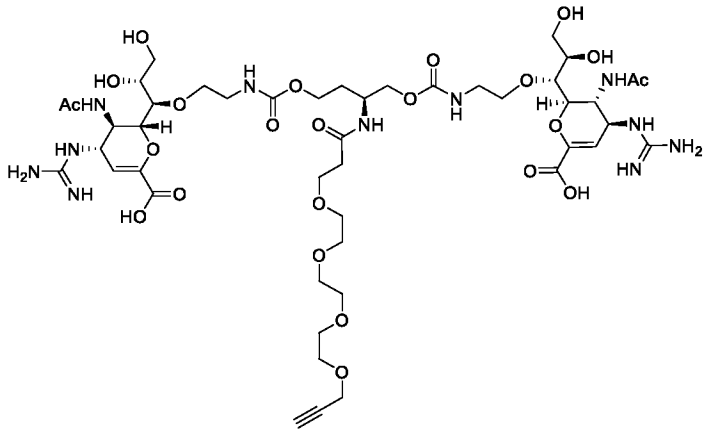
Пропаргил-ПЭГ4-кислоту (640 мг, 2,46 ммоль), соль диол-HCl (350 мг, 2,46 ммоль), EDC (471 мг, 2,46 ммоль), HOBt (377 мг, 2,46 ммоль) и триэтиламин (249 мг, 2,46 ммоль) перемешивали в ДМФ (3 мл) при температуре окружающей среды в течение 4 часов. Смесь очищали непосредственно с помощью ОФЖХ (0%-80% ацетонитрила/воды, без модификатора, 35-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и упаривали с получением продукта в виде прозрачного масла. Выход: 580 мг, 68%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M+H]^+ = 348,4$.

Стадия b.



п-Нитрофенилхлорформиат (1,23 г, 1,25 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору продукта с предыдущей стадии (530 мг, 6,10 ммоль) и триэтиламина (925 мг, 9,15 ммоль) в ДХМ (25 мл), затем охлаждали до 0 °C в атмосфере азота. Смесь перемешивали в течение 15 минут при 0 °C, а затем при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли деионизированной водой и экстрагировали ДХМ (3 × 20 мл). Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором и сушили над сульфатом натрия. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (10%-100% этилацетата/гексанов, 25-минутный градиент) с получением продукта в виде белого твердого вещества. Выход 250 мг, 24%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M+H]^+ = 678,2$.

Стадия c.



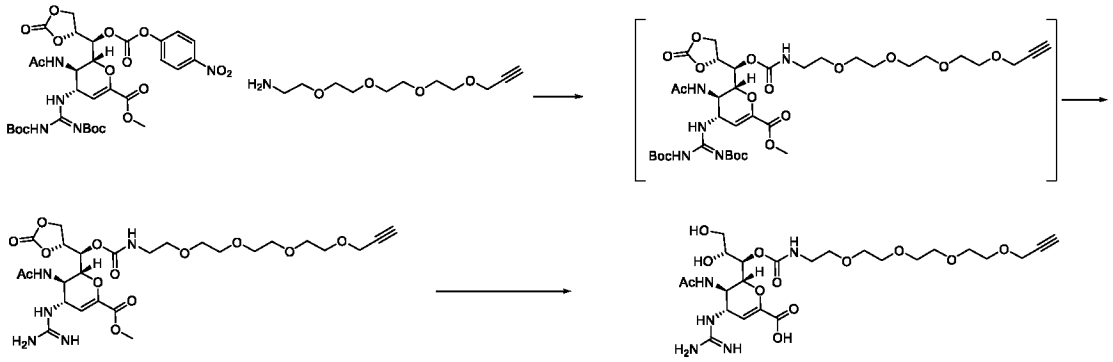
Занамивир, функционализированный амином (505 мг, 0,82 ммоль, описанный в примере 118) и триэтиламин (0,15 мл, 1,11 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) добавляли к перемешиваемому раствору продукта предыдущей стадии (220 мг, 0,37 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) и перемешивали в течение 4 часов при температуре окружающей среды. Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе. Полученный

остаток очищали с помощью ОФЖХ (15%-95% ацетонитрила/воды, без модификатора, 35-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и упаривали на роторном испарителе. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[(M+2H)/2]^+ = 815,2$.

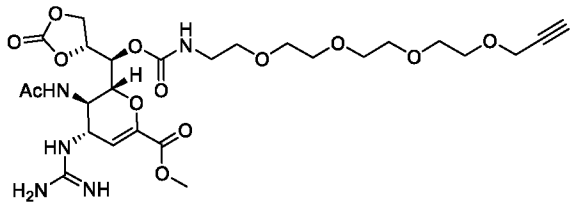
Это промежуточное соединение перемешивали в ТФУ (5 мл) в течение 45 минут, затем упаривали и сушили в условиях высокого вакуума. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[(M+2H)/2]^+ = 615,2$.

Полученную соль ТФУ перемешивали в (1/1) MeOH/деионизированной воде (5 мл), содержащей LiOH (71 мг, 2,98 ммоль), в течение 30 минут при 0 °C. Смесь подкисляли (pH ~ 5) ледяной уксусной кислотой. Метанол удаляли на роторном испарителе и проводили очистку с помощью полупрепаративной ВЭЖХ (5%-70% ацетонитрила/воды, 0,1% ТФУ, 35-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали. Выход 125 мг, 29% за 3 стадии. Ион, найденный методом ЖХ/МС: $[(M+2H)/2]^+ = 575,8$.

Пример 122. Синтез ПС-4а



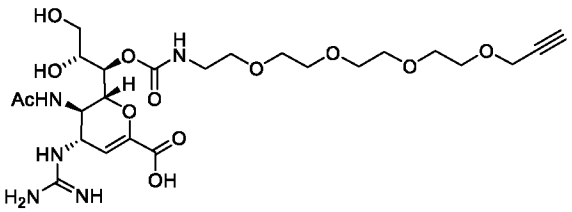
Стадия а.



Пропаргил-ПЭГ4-амин (165 мг, 0,71 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору п-нитрофенилкарбоната занамивира (350 мг, 0,47 ммоль, описанный в примере 109) в ацетонитриле (20 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа при температуре окружающей среды, затем растворитель удаляли на роторном испарителе. Остаток очищали с помощью ОФЖХ (10%-95% ацетонитрила/воды, без модификатора, 30-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали с получением boc-защищенного промежуточного соединения в виде белого твердого вещества. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M+H]^+ = 830,2$.

Промежуточное соединение перемешивали в ТФУ (5 мл) при температуре окружающей среды в течение 30 минут. Растворитель удаляли на роторном испарителе и остаток очищали с помощью ВЭЖХ (10%-95% ацетонитрила/воды, 0,1% ТФУ, 30-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали с получением продукта в виде белого твердого вещества. Выход 155 мг, 52%, 2 стадии. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M+H]^+ = 630,2$.

Стадия b.

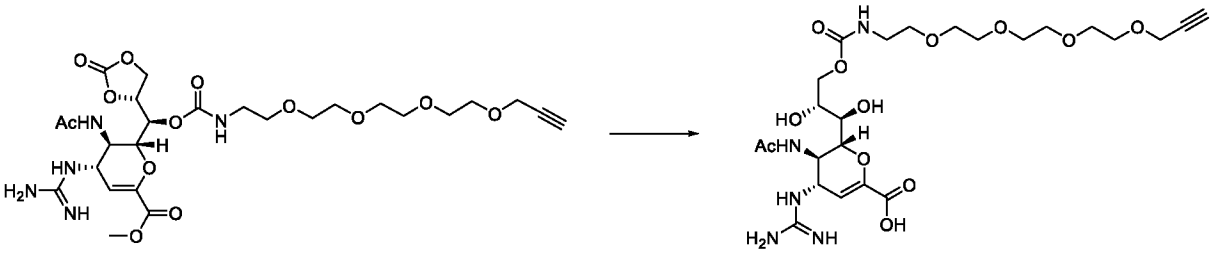


Продукт с предыдущей стадии (140 мг, 0,22 ммоль) перемешивали в смеси метанол:вода 1:3 (8 мл), содержащей LiOH (21 мг, 0,89 ммоль), при 0 °C в течение 20 минут. Смесь подкисляли несколькими каплями ледяной уксусной кислоты и упаривали на роторном испарителе. Неочищенный материал очищали полупрепаративной ВЭЖХ (5%-95% ацетонитрила/воды, 0,1% ТФУ, 30-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали с получением продукта в виде белого твердого вещества. Выход: 60 мг, 45%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M+H]^+$ = 590,2.

^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол-d_4) δ 5,86 (д, J = 2,6 Гц, 1H), 4,99 (дд, J = 9,0, 2,7 Гц, 1H), 4,55 (дд, J = 9,7, 2,7 Гц, 1H) , 4,38 (дд, J = 8,6, 2,6 Гц, 1H), 4,24–4,14 (м, 1H), 4,19 (д, J = 2,6 Гц, 2H), 4,02-3,98 (м, 1H), 3,74–3,59 (м, 13H), 3,54 (т, J = 5,6 Гц, 2H), 3,52-3,48 (м, 1H), 3,29-3,22 (м, 2H), 2,84 (т, J = 2,4 Гц, 1H), 1,96 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (126 МГц, MeOD) δ 172,33, 163,68, 157,54, 156,58, 106,80, 79,23, 75,91, 74,56, 70,18, 70,13, 69,96, 69,87, 69,59, 69,51, 69,14, 68,74, 62,98, 57,67, 51,11, 40,54, 21,37.

Пример 123. Синтез ПС 4b



Промежуточное соединение, функционализированное ПЭГ (100 мг, 0,13 ммоль, описанное в примере 122), перемешивали в смеси метанол:вода 1:3 (5 мл), содержащей LiOH (12 мг, 0,52 ммоль), при температуре окружающей среды в течение 2 часов. Смесь подкисляли ледяной уксусной кислотой и упаривали на роторном испарителе. Неочищенный материал очищали с помощью ОФЖХ (5-95% ацетонитрила в деионизированной воде, 0,1% ТФУ, 30-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали с получением продукта в виде белого твердого вещества. Выход: 21 мг, 31%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M+H]^+$ = 590,2.

^{1}H ЯМР (Метанол-d_4) δ: 5,86 (д, J = 2,6 Гц, 1H), 4,48 (дд, J = 8,6, 2,7 Гц, 1H), 4,42 (дд, J = 9,6, 1,4 Гц, 1H), 4,38. (д, J = 12 Гц, 1H), 4,22–4,19 (м, 1H), 4,19 (д, J = 2,4 Гц, 2H), 4,16-4,12 (дд, J = 11,5, 6 Гц, 1H), 4,09–4,02 (м, 1H), 3,75–3,58 (м, 13H), 3,55 (т, J = 5,5 Гц, 2H), 3,33-3,29 (м, 2H), 2,84 (т, J = 2,4 Гц, 1H), 2,02 (с, 3H).

^{13}C ЯМР (126 МГц, MeOD) δ 172,94, 163,82, 157,90, 157,53, 106,80, 79,23, 76,18, 74,55, 70,19, 70,13, 69,96, 69,90, 69,61, 68,96, 68,74, 68,17, 66,69, 57,67, 50,11, 40,43, 21,33.

Пример 124. Общая процедура синтеза азидо-Fc

Получение раствора сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS (0,050 М) в ДМФ/ФСБ: 16,75 мг сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS растворяли в 0,100 мл ДМФ при 0 °C и разбавляли до 0,837 мл путем добавления буфера ФСБ 1x при 0 °C. Этот раствор использовали для получения другого ПЭГ4-азидо Fc с различными значениями DAR путем корректировки эквивалентов этого раствора ФСБ сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для любого конъюгата, описанного в данном документе, может включать нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность Fc, включающую С-концевой остаток лизина и/или N-концевую сигнальную последовательность мышиного IgG (например, любую из SEQ ID NO: 48-53). После экспрессии С-концевая лизиновая и N-концевая сигнальные последовательности IgG мыши Fc конъюгата протеолитически расщепляются, в результате чего образуется Fc, имеющий последовательность, в которой отсутствует Lys447 (например, отсутствует С-концевой лизиновый остаток), и N-концевая сигнальная последовательность мышиного IgG. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Предварительная обработка Fc h-lgG1, SEQ ID NO: 48 (107,2 мг в 8,800 мл ФСБ с pH 7,4, ММ ~ 57891 Да, 1,852 мкмоль): Раствор Fc переносили в четыре центрифужных концентратора (30 000 MWCO, 15 мл) и разбавляли до 15 мл с помощью буфера ФСБ x1 и упаривали до объема ~1,5 мл. Остаток разбавляли 1:10 в ФСБ с pH 7,4 и снова упаривали. Эту процедуру промывки повторяли в общей сложности четыре раза с последующим разведением до 8,80 мл.

Получение ПЭГ4-азидо Fc: ФСБ буферный раствор 0,05 М сложного эфира ПЭГ4-азидо NHS (0,593 мл, 29,6 мкмоль, 16 эквивалентов) добавляли к раствору Fc h-IgG1 (SEQ ID NO: 48) и смесь встряхивали и вращали в течение 2 часов при температуре окружающей среды. Раствор упаривали с использованием четырех центробежных концентраторов (30 000 MWCO, 15 мл) до объема ~1,5 мл. Неочищенную смесь разбавляли 1:10 в ФСБ с pH 7,4 и снова упаривали. Эту процедуру промывки повторяли в общей сложности три раза. Концентрированный Fc-ПЭГ4-азид разбавляли до 8,80 мл буфером ФСБ с pH 7,4 и он был готов для клик-конъюгации. Очищенный материал количественно определяли с использованием УФ-спектрофотометра NANODROP™ в видимой области спектра (с использованием рассчитанного коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности h-IgG1). Выход был количественным после очистки.

Пример 125. Синтез конъюгата 34

Раствор азидофункционализированного Fc (40 мг, 2,5 мл, 0,69 мкмоль, описанный в разделе общей процедуры получения азидо Fc, пример 124, SEQ ID No. 18) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином (6,0 мг, 8,23 мкмоль, ПС 67, пример 118). После осторожного перемешивания для растворения всех твердых веществ смесь добавляли к раствору натриевой соли L-аскорбиновой кислоты (54 мг, 0,27 ммоль), сульфата меди (II) (0,88 мг, 5,5 мкмоль) и BTTA (9,4 мг, 22 мкмоль) в буфере ФСБ 7,4 (1,09 мл). Полученную смесь осторожно вращали в течение ночи. Затем проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. Общий протокол очистки конъюгата). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 64678 Да (DAR = 7,2). Выход 24 мг, выход 54%.

Пример 126. Синтез конъюгата 35

Раствор азидофункционализированного Fc (40 мг, 2,5 мл, 0,69 мкмоль, описанный в разделе общей процедуры получения азидо Fc, пример 124, SEQ ID No. 18) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином (6,1 мг, 8,23 мкмоль, ПС 68, пример 119). После осторожного перемешивания для растворения всех твердых веществ смесь добавляли к раствору натриевой соли L-аскорбиновой кислоты (54 мг, 0,27 ммоль), сульфата меди (II) (0,88 мг, 5,5 мкмоль) и BTTA (9,4 мг, 22 мкмоль) в буфере ФСБ 7,4 (1,09 мл). Полученный раствор осторожно вращали в течение ночи. Затем проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. Общий протокол очистки конъюгата). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 64830 Да (DAR = 7,3). Выход 23 мг, выход 52%.

Пример 127. Синтез конъюгата 36

Раствор азидофункционализированного Fc (50 мг, 2,5 мл, 0,86 мкмоль, описанный в разделе общей процедуры получения азидо Fc, пример 124, SEQ ID No. 18) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином (7,1 мг, 5,2 мкмоль, ПС 77, пример 120). После осторожного перемешивания для растворения всех твердых веществ смесь добавляли к раствору натриевой соли L-аскорбиновой кислоты (68 мг, 0,34 ммоль), сульфата меди (II) (1,1 мг, 6,9 мкмоль) и BTTA (12 мг, 27 мкмоль) в буфере ФСБ 7,4 (1,37 мл). Полученную смесь осторожно вращали в течение ночи. Затем проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. Общий протокол очистки конъюгата). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 63300 Да (DAR = 3,6). Выход 37 мг, выход 73%.

Пример 128. Синтез конъюгата 37

Раствор азидофункционализированного Fc (70 мг, 2,5 мл, 1,2 мкмоль, описанный в разделе общего получении азидо Fc, пример 124, SEQ ID No. 18) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином (13,3 мг, 9,6 мкмоль, ПС 78, пример 121). После осторожного перемешивания для растворения всех твердых веществ смесь добавляли к раствору натриевой соли L-аскорбиновой кислоты (96 мг, 0,48 ммоль), сульфата меди (II) (1,6 мг, 10 мкмоль) и BTTA (17 мг, 38 мкмоль) в буфере ФСБ 7,4 (1,92 мл). Полученную смесь осторожно встряхивали в течение ночи. Затем проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. Общий протокол очистки конъюгата). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 63574 Да (DAR = 3,6). Выход 42 мг, выход 61%.

Пример 129. Синтез конъюгата 33

Получение раствора реагента для клик-реакции: 0,0050M $CuSO_4$ в буферном растворе ФСБ: 10,0 мг $CuSO_4$ растворяли в 12,53 мл ФСБ, затем взяли 5,00 мл данного раствора $CuSO_4$ и добавили 43,1 мг BTTAA (номер CAS 1334179-85-9) и 247,5 мг аскорбата натрия с получением раствора реагента для клик-реакции (0,0050 M CuSO4, 0,020 M BTTAA и 0,25 M аскорбата натрия).

К раствору азидофункционализированного Fc (104,9 мг, 8,60 мл, 18,1 мкмоль; пример 124, SEQ ID NO: 73) в центрифужной пробирке объемом 15 мл добавляли малую молекулу, дериватизированную алкином (29,7 мг, 19,9 мкмоль, описанную в примере 100, 2,5 эквивалента для каждого азидо на Fc). После

осторожного перемешивания для растворения всех твердых веществ смесь обрабатывали раствором реагента для клик-реакции (4,34 мл) (натриевая соль L-аскорбиновой кислоты, 0,25 М, 1086 мкмоль, сульфат меди (II) 0,0050 М, 21,7 мкмоль и BTTAA 0,020 М, 86,9 мкмоль). Полученную смесь осторожно вращали в течение 6 часа при температуре окружающей среды. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. Общий протокол очистки конъюгата). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 64550 Да (DAR = 4,6). Выход 90,7 мг при чистоте 98%. Полученный конъюгат изображен на Фиг. 61.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 33, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, которая включает С-концевой остаток лизина. После экспрессии С-концевой лизин Fc конъюгата 33 протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 73. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 130. Эффективность конъюгата 33 против гриппа B/Brisbane/60/2008 на мышиной летальной модели

Исследуемые препараты оценивали против летальной инфекции гриппа В у самок мышей линии BALB/c (Jackson Laboratories, возрастом 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (B/Brisbane/60/2008) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 10 групп по 5 мышей в каждой. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 50 мкл (прибл. 1E5 вируса на мышь) после анестезии изофлураном.

Все группы получали однократную в/в обработку конъюгатом 33 (пример 129), носителя (ФСБ) или контроля только Fc (Fc hIgG1) через два часа после заражения вирусом. Дополнительную группу обрабатывали осельтамивиром (20 мг/кг, 2 раза в день в течение 5 дней) путем перорального введения, начиная с 8 часов после заражения вирусом.

В исследовании оценивали 7 различных концентраций доз конъюгата 33 (10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 и 0,01 мг/кг). За мышами осуществляли наблюдение в течение 2 недель, и животных, у которых потеря массы тела превышала 20% или, которые были обнаружены в агональном состоянии, засчитывали как умершие. Также регистрировали массу тела, чтобы контролировать общее состояние здоровья животных.

Все мыши, обработанные носителем или контролем только Fc, умерли к дню 8, как и ожидалось. Напротив, все мыши, получавшие конъюгат 33, были полностью защищены после получения однократных в/в доз от 10 до 0,3 мг/кг в течение всего исследования (таблица 48). Напротив, в группе, получавшей осельтамивир, наблюдалась всего лишь 40% выживаемости, хотя кумулятивная доза, которую получили эти мыши, составляла 200 мг/кг в ходе эксперимента. Активность конъюгата 33 дополнительно подтверждалась ежедневными измерениями массы тела (таблица 49; данные показаны только до первой смерти в группе). Мыши, получавшие конъюгат 33 в дозе 0,3 мг/кг, продемонстрировали только временную потерю массы тела, достигающую максимум 7%, в течение одного дня. В совокупности данное исследование демонстрирует активность конъюгата 33, измеряемую двумя параметрами, указывающими на инфекцию гриппа В (выживаемость и масса тела), против штамма гриппа линии Ямагата.

Таблица 48: % выживаемости

Дней после инфицирования	**ФСБ**	**Fc**	**Конъюгат 33**				**Осельтамивир**
		(10 мг/кг)	(от 10 до 0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/кг)	(0,01 мг/кг)	
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	60	100	100	100	100	100	100
5	40	40	100	100	60	80	40
6	0	0	100	60	60	40	0
7	0	0	100	60	60	0	0
8	0	0	100	60	60	0	0
9	0	0	100	60	60	0	0
10	0	0	100	60	60	0	0
11	0	0	100	60	60	0	0
12	0	0	100	60	60	0	0
13	0	0	100	60	60	0	0
14	0	0	100	60	60	0	0

Таблица 49: Показатели массы тела (г)

Дней после инфицирования	**ФСБ**	**Fc**	**Конъюгат 33**							**Осельтамивир**
		(10 мг/кг)	(10 мг/кг)	(3 мг/кг)	(1 мг/кг)	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/кг)	(0,01 мг/кг)	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99	101	103	98	98	98	98	99	98	98
2	95	97	100	99	97	101	97	97	97	97
3	87	90	101	98	96	97	93	95	92	89
4	82	84	104	99	99	97	93	93	88	85
5	78	79	102	99	99	97	92		84	79
6			98	96	98	93			79	
7			102	98	100	96				

8			101	98	98	97				
9			104	101	102	101				
10			103	100	101	101				
11			104	102	101	101				
12			104	101	102	102				
13			103	102	102	102				
14			103	102	102	101				

Пример 131. Характеристики региоизомеров

Промежуточные продукты мономеров и димеров могут быть получены в виде конкретного региоизомера или смеси региоизомеров. Примеры 100-102 показывают процесс получения региоизомеров ПС 7 (C7-C7, пример 100; C7-C9, пример 101; C9-C9, пример 102; оптимизированный C7-C7, пример 103). Описанные в данном документе способы можно использовать для разделения смесей региоизомеров любого промежуточного соединения, описанного в данном документе. В таблице 50 представлена характеристика относительных процентов (%) количеств C7- и C9-связанных мономеров и C7-C7-, C7-C9- и C9-C9-связанных димеров в ранее описанных синтезах промежуточного соединения для предварительной конъюгации.

Таблица 50: Анализ региоизомеров

Промежут. соед.	**Пример**	**Мономер (M) или димер (D)**	**%C7**	**%C7-C9**	**%C9**
ПС 2	Пример 6	D	95	5	
ПС 3	Пример 11	D	70	30	
ПС 4	Пример 13	M	58		42
ПС 4a	Пример 122	M			97
ПС 7	Пример 19	D	3	2	95
ПС 7a	Пример 100	D	100		
Промеж. соед.-7b	Пример 101	D	5	95	
Промеж. соед.-7c	Пример 102	D			100
ПС 25	Н/П	D		5	95
ПС 26	Н/П	D	25	50	25
ПС 27	Н/П	D	29	35	36
ПС 28	Н/П	D	5	28	67
ПС 31	Н/П	D	90		
ПС 34	Н/П	D	12	6	82
ПС 37	Н/П	M			95
ПС 71	Пример 110	D	3	97	
ПС 72	Пример 112	D		100	

Пример 132. Эффективность конъюгата 33 при подкожном введении против гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) на мышиной летальной модели

Конъюгат 33 оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/8/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 6 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD_{95} путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Смертность и массу тела регистрировали ежедневно, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

Все исследуемые группы получали однократную подкожную (п/к) обработку конъюгатом 33, контрольным Fc hIgG1 или носителем (ФСБ) через 2 часа после вирусного заражения. Дизайн исследования обобщен в таблице 51.

Таблица 51: Дизайн исследования гриппа A/PR/8/34 (H1N1)

Группа	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Объем дозы (мг/кг)**	**Количество мышей**
1	Носитель	п/к, T+2 часа	нд	10	5
2	Fc hIgG1	п/к, T+2 часа	1	10	5
3	Конъюгат 33	п/к, T+2 часа	1	10	5
4	Конъюгат 33	п/к, T+2 часа	0,3	10	5
5	Конъюгат 33	п/к, T+2 часа	0,1	10	5
6	Конъюгат 33	п/к, T+2 часа	0,03	10	5

Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель или контрольный Fc hIgG1, умерли от инфекции в дни 6-7 (таблица 52). Однако мыши, получавшие конъюгат 33, были полностью защищены при уровнях доз 1, 0,3 и 0,1 мг/кг. Смертность при применении конъюгата 33 наблюдалась только при самой низкой концентрации дозы 0,03 мг/кг.

Таблица 52: Выживаемость в процентах по дням исследования (n=5)

Дней после инфицирования	**Носитель**	**Fc hIgG1**	**Конъюгат 33**			
		(1,0 мг/кг)	(1,0 мг/кг)	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/кг)
0	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100

6	40	60	100	100	100	100
7	0	0	100	100	100	60
8	0	0	100	100	100	0
9	0	0	100	100	100	0
10	0	0	100	100	100	0
11	0	0	100	100	100	0
12	0	0	100	100	100	0
13	0	0	100	100	100	0
14	0	0	100	100	100	0

Активность конъюгата 33 дополнительно подтверждали ежедневными измерениями массы тела. Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель или Fc hIgG1, демонстрировали устойчивое снижение массы тела до тех пор, пока оно не превысила 20%, после чего они были засчитаны как умершие (таблица 53).

В отличие от контрольных мышей, те группы, которые получали конъюгат 33 в дозах 1, 0,3 и 0,1 мг/кг, сохраняли здоровую массу тела на протяжении всего исследования и никогда не демонстрировали более чем временное снижение массы тела менее чем на 8% (группа с дозой 0,1 мкг/кг, день 8; таблица 53). По результатам измерений выживаемости и массы тела конъюгат 33 продемонстрировал надежную защиту от заражения летальным гриппом A/Puerto Rico/8/1934 с однократной п/к дозой, составляющей всего 0,1 мг/кг.

Таблица 53: Данные по массе тела (г)

Дней после инфицирования	**Носитель**	**Fc hIgG1**	**Конъюгат 33**			
		(1,0 мг/кг)	(1,0 мг/кг)	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/кг)
0	100	100	100	100	100	100
1	98,1	97,6	98	98,6	98,7	98,5
2	100,9	99	100,3	101,3	101,6	99,9
3	94,1	92,6	98,4	100,5	96,5	93,9
4	86	85,7	102,6	99,2	93,5	88,6
5	79,8	79,1	98,2	97,7	94,9	86,5
6	75,3	75,2	102,2	102,3	99,4	84,6
7			103,5	102,9	95,2	78,4
8			101,8	103,2	92,4	
9			101,2	102,9	95,4	
10			101,3	102,5	98,8	
11			102,8	102,6	98,7	
12			102,4	100,7	98,6	
13			102,2	101,1	98,3	
14			100,2	102	99,6	

Пример 133. Эффективность конъюгата 33 против A/PR/8/1934 (H1N1), нагрузки БОЕ в легких и уровней цитокинов

Исследования эффективности конъюгата 33 проводили на самках мышей линии BALB/c возрастом 6-8 недель (Charles River), которым интраназально вводили 3E2 БОЕ/мышь (3x LD_{95}) адаптированного для мышей вируса гриппа A/ ЧО/8/1934 (H1N1). Конъюгат 33 или контрольные Fc IgG1 человека вводили в виде однократной подкожной (п/к) дозы через 2 часа после заражения в дозе 0,1–3 мг/кг. Осельтамивир вводили перорально два раза в день в течение 4 дней, начиная через 2 часа после заражения, в дозе 5 или 50 мг/кг. Балоксавир ресуспендировали в 0,5% метилцеллюлозе и вводили перорально два раза в день в течение 4 дней, начиная через 2 часов после заражения, в дозе 30 мг/кг (таблица 54). Массу тела (МТ) регистрировали в течение 4 дней (ФИГ. 62A-62B). Через 4 дня после заражения мышей умерщвляли с помощью CO_2 и собирали обе доли легких. Легкие гомогенизировали с помощью шариками из диоксида кремния 1 мм в 1 мл ФСБ с использованием MagNA Lyser (Roche). Гомогенизацию проводили при 6000 об/мин в течение 60 сек и охлаждали на льду в течение 5 минут между циклами. После гомогенизации легких пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 600 x g и супернатант переносили в новую пробирку.

Таблица 54: Дизайн исследования

Исследуемый препарат (DAR)	Путь/Схема	Доза [мг/кг]
ФСБ	в/в, T+2 ч.	Н/П
Fc hIgG1	в/в, T+2 ч.	3
Осельтамивир	п/о, 2 р/день x 4	5
Осельтамивир	п/о, 2 р/день x 4	50
Балоксавир	п/к, 2 р/день x 4	30
Конъюгат 33 (4,7)	п/к, T+2 ч.	0,1
Конъюгат 33 (4,7)	п/к, T+2 ч.	0,3
Конъюгат 33 (4,7)	п/к, T+2 ч.	1
Конъюгат 33 (4,7)	п/к, T+2 ч.	3
неинфицированные	Н/П	Н/П

Для определения БОЕ супернатанты гомогената легких разводили в инфекционном буфере в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-6}. 100 мкл разведенного вируса добавляли к конфлюэнтному монослою клеток MDCK в 24-луночных планшетах и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с покачиванием каждые 15 мин. После удаления вируса жидкую среду, содержащую Avicel, добавляли к клеткам MDCK. Клетки инкубировали при 37 °C, 5% CO_2 в течение 40 часов. После инкубации среду удаляли и клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым для подсчета бляшек и рассчитывали количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) относительно массы легкого (БОЕ/г легкого).

Для анализа цитокинов супернатанты гомогената легких серийно разводили 2 раза в 96-луночном планшете. Уровни цитокинов для INF-γ, TNF-α, IL-6, MIP-1α и MCP-1 определяли с помощью ELISA в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems). После летального заражения гриппом на мышиной модели нагрузка БОЕ в легких (фиг. 63A-63B) и уровни цитокинов в легких были определены в день 4 после инфицирования (таблица 55 и таблица 56, соответственно). Конъюгат 33 продемонстрировал дозозависимое логарифмическое снижение вирусной нагрузки, которое составило 0,7 при 0,1 мг/кг, 1,88 при 0,3 мг/кг, 3 при 1 мг/кг и 3,8 при 3 мг/кг. Осельтамивир в дозе 5 мг/кг и 50 мг/кг оказал умеренное влияние

на вирусную нагрузку, что привело к снижению на 0,86 и 2 log, соответственно. Балоксавир снизил вирусную нагрузку ниже предела обнаружения, 1e2 БОЕ/мл, тем самым снизив вирусную нагрузку на > 5,99 log по сравнению с контролем ФСБ.

Как и ожидалось, не наблюдалось биологически значимой разницы между отрицательными контролями, ФСБ и Fc hIgG1.

Конъюгат 33 снижает вирусную нагрузку в зависимости от дозы на день 4 после заражения гриппом А на мышиной модели (таблица 55, фиг. 64A-64B). Точно так же конъюгат 33 продемонстрировал дозозависимое кратное снижение уровней цитокинов для TNF-α, IL-6, INF-γ, MCP-1 и MIP-1α (фиг. 65A-65E, соответственно) по сравнению с неинфицированным контролем на день 4 после заражения гриппом А на мышиной модели (таблица 56).

Таблица 55: Нагрузка БОЕ

Исследуемый препарат [мг/кг]	**БОЕ/г**	**Логарифмическое уменьшение**
ФСБ [0]ФСБ	3,26E+07	0,0
Fc hIgG1 [3]	1,74E+07	0,364
Осельтамивир [5]	4,78E+06	0,86
Осельтамивир [50]	3,81E+05	2
Балоксавир [30]	<1,00E+02*	>5,99*
конъюгат 33 [0,1]	6,85E+06	0,715
конъюгат 33 [0,3]	5,31E+05	1,88
конъюгат 33 [1]	3,69E+04	2,99
конъюгат 33 [3]	5,84E+03	3,77

* Балоксавир снижал вирусную нагрузку ниже предела обнаружения.

Таблица 56: Уровни цитокинов в легких

Исследуемый препарат [мг/кг]	**INF-γ**	**TNF-α**	**IL-6**	**MCP-1**	**MIP-1α**
ФСБ [0]	1,6	1,4	4,2	38,6	18,1
Fc hIgG1 [3]	1,7	1,2	3,3	36,3	15,9
Осельтамивир [5]	1,0	0,8	1,8	24,0	6,3
Осельтамивир [50]	0,8	0,8	1,4	16,2	4,0
Балоксавир [30]	1,2	1,0	1,0	1,0	0,8
конъюгат 33 [0,1]	1,1	0,7	0,8	19,1	5,6
конъюгат 33 [0,3]	1,1	0,9	0,8	9,6	3,9
конъюгат 33 [1]	0,9	0,7	1,1	5,7	1,7
конъюгат 33 [3]	0,8	0,7	1,1	1,8	1,0
Неинфицированные	1	1	1	1	1

Самая высокая исследованная концентрация конъюгата 33 в дозе 3 мг/кг продемонстрировала отсутствие потери массы на протяжении всего течения инфекции, аналогично неинфицированным

контрольным мышам (таблица 57).

Таблица 57: Данные по массе тела (% снижения)

Исследуемый препарат [мг/кг]	**День 0**	**День 1**	**День 2**	**День 3**	**День 4**
ФСБ [0]	0	-3,5	-2,86	-10,96	-17,32
Fc hIgG1 [3]	0	-2,6	-1,3	-9,58	-15,6
Осельтамивир [5]	0	-2,86	-2,42	-8,16	-13,88
Осельтамивир [50]	0	-3,78	-2,12	-3,22	-5,74
Балоксавир [30]	0	-2,38	-2,82	-2,6	-0,18
конъюгат 33 [0,1]	0	-3,24	-2,32	-10,12	-11,46
конъюгат 33 [0,3]	0	-2,16	1,34	-3,4	-4,36
конъюгат 33 [1]	0	-1,5	-0,9	-1,98	-0,9
конъюгат 33 [3]	0	-1,7	-1,6	-1,9	0,52
Неинфицированные	0	1,02	-0,14	-0,16	2,8

Пример 134. Эффективность конъюгата 33 против гриппа A (H1N1) на мышиной модели летального тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID)

Исследуемые препараты оценивали против летальной инфекции гриппа A у самок мышей линии BALB/c (Jackson Laboratories, возрастом 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/8/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 11 групп по 5 мышей в каждой. В день 0 всех мышей заражали провокационным вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл (приблизительно 1E3 вируса на мышь), после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно).

Группы получали однократную п/к обработку носителем (ФСБ), контролем Fc hIgG1 или конъюгатом 33 (3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 мг/кг) через два часа после заражения вирусом. Отдельная группа исследования состояла из 3 групп мышей, получавших балоксавир марбоксил (DC Chemicals, Шанхай, Китай) перорально два раза в день в течение 1 дня; также через 2 часа после заражения вирусом. За мышами осуществляли наблюдение в течение 2 недель, и животных, у которых потеря массы тела превышала 20% или, которые были обнаружены в агональном состоянии, засчитывали как умершие.

В конце исследования (день 14) мыши, получавшие конъюгат 33, были полностью защищены при всех концентрациях доз от 3 до 0,1 мг/кг (таблица 58). Конъюгат 33 не смог защитить от летального заражения вирусом только при самой низкой исследуемой концентрации 0,03 мг/кг. Как и ожидалось, группы, получавшие носитель или Fc hIgG1, не были защищены. Мыши, получавшие балоксавир, также были защищены, но при значительно более высоких кумулятивных дозах 60 и 20 мг/кг, при общей дозе 6 мг/кг только 40% мышей дожили до дня 14.

Таблица 58: % выживаемости на день 14.

Носитель	**Fc hIgG1**	**Балоксавир**	**Конъюгат 33**

(ФСБ)	(3,0 мг/кг)	(30 мг/кг)	(10 мг/кг)	(3,0 мг/кг)	(3,0 мг/кг)	(1,0 мг/кг)	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/кг)
0	0	100	100	40	100	100	100	100	0

Активность конъюгата 33 в этой модели тяжелого иммунодефицита также очевидна на основании данных по массе тела (таблица 59). Самая низкая концентрация конъюгата, обеспечивающая полную защиту на основании величины смертности, составляла 0,1 мг/кг. На этом уровне дозы наибольшая средняя потеря массы тела для группы была временной и привела к снижению менее чем на 5% (произошедшему на день 2). Кроме того, разница в массе тела для групп с уровнями доз 1 и 3 мг/кг продемонстрировала разницу менее 2% на день 14 по сравнению с неинфицированными мышами.

В совокупности эти данные демонстрируют активность конъюгата 33 в плане защиты мышей, которые были подвергнуты заражению летальным вирусом, с однократными п/к дозами конъюгата всего лишь 0,1 мг/кг. Это было достигнуто на модели тяжелой формы иммунодефицита у мышей, полностью лишенных иммунных Т- и В-клеток, которые необходимы для избавления от инфекций гриппа. Эти данные подтверждают возможность использования конъюгата 33 для лечения популяций пациентов с иммунодефицитом.

Таблица 59: % Средняя масса тела по дням. (мг/кг). Данные показаны только до первого случая смерти в группе.

Дней после инфицирования	**Носитель**	**Fc hIgG1**	**Балоксавир**			**Конъюгат 33**					**Неинфицированные**
	(ФСБ)	(3 мг/кг)	(30 мг/кг)	(10 мг/кг)	(3 мг/кг)	(3 мг/кг)	(1 мг/кг)	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/кг)	
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	100,0	99,0	98,9	91,5	97,3	99,0	99,6	98,8	97,6	99,7	99,5
2	99,0	100,8	99,1	97,3	100,1	100,1	99,9	100,7	95,8	98,6	99,8
3	94,0	93,0	97,0	96,4	97,4	100,0	98,9	97,6	97,0	96,7	98,8
4	93,0	89,7	99,1	95,9	99,0	101,0	99,8	99,2	97,8	94,4	99,9
5	87,0	84,4	99,1	97,5	96,6	99,0	98,6	96,3	97,4	93,0	100,9
6	82,0	80,1	97,9	97,9	97,0	100,6	99,7	99,9	98,7	91,6	100,2
7	78,0		98,6	97,0	97,2	101,9	99,6	99,6	98,1	87,0	101,0
8			98,6	96,4	95,4	100,	98,2	99,2	98,3	82,2	100,4

						9					
9			99,6	95,1	93,1	100,6	98,4	100,0	97,0		100,7
10			96,0	95,9	90,5	98,8	98,8	98,5	95,8		100,2
11			97,3	97,3		99,0	99,3	98,3	96,0		99,7
12			98,7	95,8		99,1	99,4	98,1	96,3		100,4
13			98,6	96,8		98,4	99,0	97,9	97,3		99,7
14			97,9	95,9		99,3	99,3	98,1	97,8		100,5

Пример 135. Эффективность подкожно введенного конъюгата 33 против гриппа A/California/07/2009 (H1N1) pdm на мышиной летальной модели.

Конъюгат 33 оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/California/07/2009 (H1N1) pdm) представляет собой пандемический изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 6 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Смертность и массу тела регистрировали ежедневно, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

Все исследуемые группы получали однократную подкожную (п/к) обработку конъюгатом 33, контрольным Fc hIgG1 или носителем (ФСБ) через 2 часа после вирусного заражения. Дизайн исследования и уровни доз обобщены в таблице 60.

Таблица 60: Дизайн исследования по изучению гриппа A/California/07/2009 (H1N1) pdm

Группа	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Объем дозы (мг/кг)**	**Количество мышей**
1	Носитель	п/к, T+2 часа	нд	10	5
2	Fc hIgG1	п/к, T+2 часа	1	10	5
3	конъюгат 33	п/к, T+2 часа	1	10	5
4	конъюгат 33	п/к, T+2 часа	0,3	10	5
5	конъюгат 33	п/к, T+2 часа	0,1	10	5
6	конъюгат 33	п/к, T+2 часа	0,03	10	5

Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель или контрольный Fc hIgG1, умерли от инфекции в дни 6-7 (таблица 61). Однако мыши, получавшие конъюгат 33, были полностью защищены при уровнях доз 1 мг/кг, и почти 0,3 (80% выживаемости). Значимый уровень смертности при применении конъюгата 33 наблюдался только при низких концентрациях доз 0,1 и 0,03 мг/кг.

Таблица 61: Выживаемость в процентах по дням. (мг/кг)

День	**Носитель**	**Fc hIgG1**	**конъюгат 33**			
		(1,0 мг/кг)	(1,0 мг/кг)	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/кг)
0	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100
5	40	20	100	100	60	80
6	0	20	100	80	20	20
7	0	0	100	80	0	0
8	0	0	100	80	0	0
9	0	0	100	80	0	0
10	0	0	100	80	0	0
11	0	0	100	80	0	0
12	0	0	100	80	0	0
13	0	0	100	80	0	0
14	0	0	100	80	0	0

Активность конъюгата 33 дополнительно подтверждали ежедневными измерениями массы тела. Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель или Fc hIgG1, демонстрировали устойчивое снижение массы тела до тех пор, пока оно не превысила 20%, после чего они были засчитаны как умершие (таблица 62).

В отличие от контрольных мышей, мыши, получавшие конъюгат 33 в дозе 1 мг/кг, демонстрировали только временное снижение массы тела приблизительно на 10% с пиком на день 3 (таблица 62). По результатам измерений выживаемости и массы тела конъюгат 33 продемонстрировал надежную защиту от летального заражения гриппом A/California/07/2009 (H1N1) pdm с однократной п/к дозой, составляющей всего 1 мг/кг. Активность против клинически значимого пандемического штамма, используемого в этом исследовании, подтверждает применимость конъюгата 33 при лечении серьезных инфекций гриппа.

Таблица 62: % Средняя масса тела по дням. (мг/кг). Данные показаны только до первого случая смерти в группе.

Дней после инфицирования	**Носитель**	**Fc hIgG1**	**Конъюгат 33**			
		(1,0 мг/кг)	(1,0 мг/кг)	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/кг)
0	100	100	100	100	100	100
1	99,5	97,9	96,8	96,7	98	98,7
2	97,1	97,2	99,5	99,2	98	98,4
3	86,5	86,0	89,7	89,6	87,6	88,8
4	80,3	80,3	91,6	88,5	81,3	81,9
5	76,2	76,6	92,9	91,0	76,8	77,9

Дней после инфицирования	Носитель	Fc hIgG1	Конъюгат 33			
		(1,0 мг/кг)	(1,0 мг/кг)	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/кг)
6			94,7	90,5		
7			94,2			
8			95,4			
9			98,0			
10			96,8			
11			98,8			
12			97,7			
13			100,1			
14			100,5			

Пример 136. Эффективность конъюгата 33 при внутривенном (в/в) введении против гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) на мышиной летальной модели отсроченного лечения.

Конъюгат 33 оценивали против летальной инфекции гриппа A (H1N1) у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/8/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Смертность и массу тела регистрировали ежедневно, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

Дизайн исследования подробно описан в таблице 63 и состоит из нескольких групп. Контрольная группа включает подгруппы с применением только носителя (ФСБ) и Fc hIgG1, в которых дозу вводили через 24 часа после заражения вирусом (неинфицированная подгруппа также входила в эту группу). Во второй группе применяли осельтамивир, вводимый в дозе, в 4 раза превышавшей гуманизированную дозу, с отсрочкой начала лечения на 24, 48 или 72 часа. В последних 3 группах применяли конъюгат 33, вводимый в виде однократных в/в доз 10, 3 или 1 мг/кг; в каждой из групп введение проводили по той же схеме, что и в описанной выше группе применения осельтамивира.

Как и ожидалось, носитель и Fc hIgG1 не оказывали защитного действия при введении через 24 часа после заражения вирусом и приводили к полной смертности к дню 7. Осельтамивир даже в 4-кратной гуманизированной дозе (кумулятивная доза 200 мг/кг) был только частично эффективен, если дозирование было отложено на 24 часа (таблица 64; 40% выживаемость). Однако конъюгат 33 полностью оказывал защитное действие при всех концентрациях (10, 3 и 1 мг/кг) при той же 24-часовой схеме дозирования.

Когда дозирование было отложено на полные 48 часов после заражения вирусом, осельтамивир больше не был эффективен (0% выживаемости), в то время как конъюгат 33 оказывал 80% защитное действие при дозах 10 и 3 мг/кг. Когда дозирование было отложено на период до 72 часов, только доза конъюгата 33 10 мг/кг продемонстрировала частичную защиту (40%). Эффективность конъюгата 33 также была очевидна на основании ежедневных измерений массы тела (таблица 65). Это было особенно значимо в группах T+24 часа, где для любой группы конъюгата 33 наблюдалось снижение менее чем на 3%, которое было временным и произошло в день 1. В этом исследовании конъюгат 33 более эффективен, чем осельтамивир, являющийся

одобренным препаратом для лечения гриппа.

Таблица 63: Дизайн исследования

Группа	**Штамм гриппа А**	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема**	**Первая доза (часы)**	**Доза (мг/кг)**	**Объем дозы (мг/кг)**	**N (balb/c)**
1	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 БОЕ/мышь	ФСБ	в/в, однократная доза	T+24	---	5	5
2		Fc hIgG1	в/в, однократная доза	T+24	10	5	5
3		Осельтамивир	перорально, два раза в день в течение 5 дней	T+24	20	10	5
4				T+48			
5				T+72			
6		Конъюгат 33	в/в, однократная доза	T+24	10	5	5
7				T+48			
8				T+72			
9		Конъюгат 33	в/в, однократная доза	T+24	3	5	5
10				T+48			
11				T+72			
12		Конъюгат 33	в/в, однократная доза	T+24	1	5	5
13				T+48			
14				T+72			
15	Неинфицированный контроль МТ						

Таблица 64: % выживаемости по дням. Исследуемый препарат/Доза/Время начала лечения

Day post infection	Vehicle	hIgG1 Fc	Oseltamivir			Conjugate 33			Conjugate 33			Conjugate 33			Uninfected
	na	10 mpk	20 mpk, bid x 5	20 mpk, bid x 5	20 mpk, bid x 5	10 mpk, single	10 mpk, single	10 mpk, single	3 mpk, single	3 mpk, single	3 mpk, single	1 mpk, single	1 mpk, single	1 mpk, single	na
	T+24 hrs.	T+24 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	na
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	80	100	100
6	60	100	100	100	100	100	100	60	100	100	80	100	80	80	100
7	0	0	100	100	20	100	100	40	100	80	0	100	60	40	100
8	0	0	100	100	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
9	0	0	60	60	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
10	0	0	40	0	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
11	0	0	40	0	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
12	0	0	40	0	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
13	0	0	40	0	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100
14	0	0	40	0	0	100	80	40	100	80	0	100	40	0	100

Таблица 65: Данные по массе тела (г). mpk = мг/кг. Данные показаны только до первого случая смерти в группе Исследуемый препарат/Доза/Время начала лечения

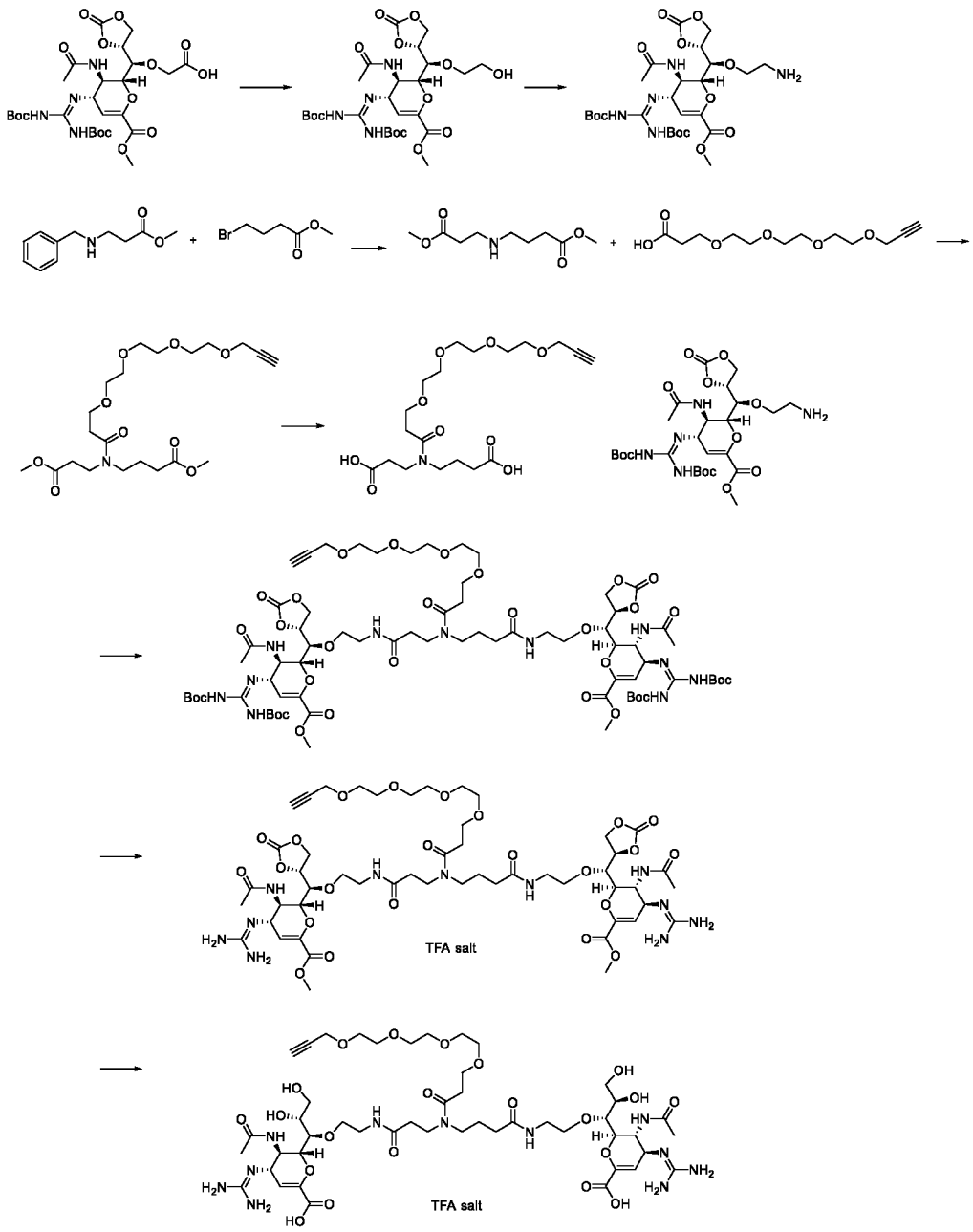
Day post infection	Vehicle	hIgG1 Fc	Oseltamivir			Conjugate 33			Conjugate 33			Conjugate 33			Uninfected
	na	10 mpk	20 mpk, bid x 5	20 mpk, bid x 5	20 mpk, bid x 5	10 mpk, single	10 mpk, single	10 mpk, single	3 mpk, single	3 mpk, single	3 mpk, single	1 mpk, single	1 mpk, single	1 mpk, single	na
	T+24 hrs.	T+24 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	T+24 hrs.	T+48 hrs.	T+72 hrs.	na
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99.3	98.8	96.4	97.5	98.2	97.6	97.7	98.5	97.1	98.3	98.7	98.3	99.4	99.4	99.5
2	103.9	101	100.7	101.2	102.6	102.1	101.7	100.1	102	102.5	99.4	104.2	102	101.4	101.7
3	96.9	97.4	95.5	97.5	95.6	102.3	96.2	95.1	100.6	95.9	97.6	102.3	96.9	98.6	105.8
4	88.7	90.1	92.6	89.7	87.7	102.3	88.4	88.8	100	87.8	88.6	100	89.2	89.7	105
5	81.7	83.9	92.2	88.6	81.6	101.5	88.1	82.7	99	85.3	81.7	101.2	83.7	83.2	105.5
6	77.3	79.3	91.8	86	78.6	102.6	91.1	80.4	101.4	87.1	77.5	103.3		78.7	104.9
7			87.8	81		101.9	91.1		102.3	86.1		102.1			103.5
8			83.5	75.8		101.5	91.3		101.1			103.2			102.9
9			81.1			102.2			102.1			104.1			102.9
10						102.5			101.6			105			103.3
11						102.4			102.1			103.9			104.3
12						100.9			101.6			103.4			102.5
13						101			101.8			103.5			102.5
14						102.2			103.6			104			103.1

Пример 137. Синтез конъюгата 38 (ПС 73), конъюгата 39 (ПС 74), конъюгата 40 (ПС 75) и конъюгата 41 (ПС 76)

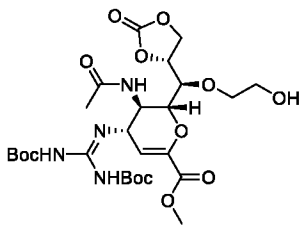
В стерильную центрифужную пробирку объемом 15 мл загружают аскорбат натрия (68,3 мг, 0,345 ммоль), BTTAA (11,9 мг, 0,0276 ммоль), продукт из примеров 114 (ПС 73), 115 (ПС 74), 116 (ПС 75) или 117 (ПС 76) (0,00953 ммоль) и ФСБ 7,4 (1 мл). Реагенты перемешивали на вортексе до гомогенности, затем смешивали с азидо Fc (50 мг, 0,0008624 ммоль, описанный в примере 124, SEQ ID NO: 73), а затем с раствором CuSO4 (1,1 мг, 0,0069 ммоль) в воде (0,5 мл). Смесь вращают в течение 12 часов, затем очищали аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующей эксклюзионной хроматографией. Конъюгаты охарактеризовывают по данным анализа ВП-МАЛДИ (как правило, DAR = 4,5). Выходы, как правило, составляют 50%.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 38-41, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, которая включает С-концевой остаток лизина. После экспрессии С-концевой лизин Fc конъюгата 38-41 протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 73. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 138. Синтез ПС 79



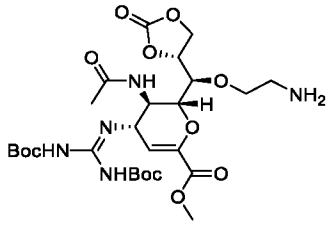
Стадия a.



Простой эфир занамивира (0,90 г, 1,43 ммоль, примере 31) и N-метилморфолин (0,23 мл, 2,14 ммоль) растворяли в ТГФ (35 мл) и охлаждали до 0 °C (баня с ледяной водой) в атмосфере азота. Изобутилхлорформиат (0,24 мл, 1,85 ммоль, в 2 мл ДХМ) добавляли по каплям с помощью шприца в течение 5-минутного периода. Смесь перемешивали при 0 °C в течение 30 минут, затем 15 минут при температуре окружающей среды, а затем охлаждали до 0 °C. По каплям добавляли боргидрид натрия (540 мг, 14,3 ммоль, растворенный в 5 мл метанола) в течение 5 минут. Реакционную смесь перемешивали в течение 15 минут, после чего весь исходный материал был израсходован (по данным ЖХ/МС). Несколько капель (~ 1 мл)

ледяной уксусной кислоты добавляли для подкисления смеси (pH ~5). Смесь разбавляли этилацетатом и водой, и экстрагировали в этилацетат (3x). Органический слой промывали солевым раствором, органические экстракты сушили над сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Неочищенный материал очищали с помощью хроматографии на силикагеле (сначала наносили на целит) (0-10% метанол в ДХМ, 30 мин). Выход: 0,66 г, 75%. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 617,2.

Стадия b.

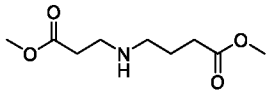


К перемешиваемой смеси спирта (0,66, 1,1 моль, в 20 мл CH_2Cl_2) добавляли триэтиламин (0,30 мл, 1,3 ммоль). Смесь охлаждали до 0 °C (баня с ледяной водой) в атмосфере азота, и по каплям добавляли мезилхлорид (150 мг, 1,3 ммоль) в течение 5 минут с помощью шприца. Ледяную баню удаляли и реакционную смесь перемешивали в течение 45 минут. Смесь разбавляли насыщенным водным бикарбонатом натрия, экстрагировали в ДХМ (3x). Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 695,2. Промежуточное соединение переносили на следующую стадию без очистки.

Мезилат занамивира перемешивали в ДМФ при 80 °C с 3 экв. азида натрия в течение 5 часов. Смесь разбавляли водой, экстрагировали ДХМ (3x). Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и упаривали. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 695,2. Азид переносили на следующую стадию без очистки.

Азид с занамивира (670 мг, 1,04 ммоль) перемешивали в метаноле (20 мл) в присутствии катализатора Линдлара (300 мг) в атмосфере газообразного водорода в течение 12 часов. Смесь фильтровали через целит и упаривали с получением указанного в заголовке соединения в виде прозрачного масла. Амин переносили на следующую стадию без очистки. Выход 0,37 г, 54%, 3 стадии. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 616,2.

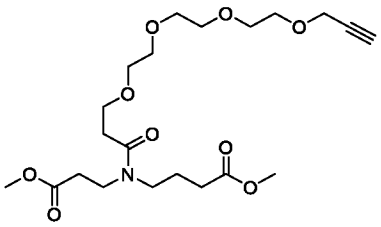
Стадия c.



Метил 3-(бензиламино)пропаноат (1 г, 5,2 ммоль), метил-4-бромбутаноат (1,2 г, 6,2 ммоль) и диизопропилэтиламин (1,34 мл, 7,8 ммоль) перемешивали в ДМФ (5 мл) при 65 °C в течение 4 часов. Большую часть растворителя удаляли на роторном испарителе, а неочищенный материал очищали с помощью хроматографии на силикагеле (Isco, от 0 до 9% метанола в ДХМ, 30-минутный градиент) с получением защищенного бензилом промежуточного соединения в виде прозрачного масла. Защищенное бензилом промежуточное соединение перемешивали в метаноле (20 мл) в 1 атмосфере газообразного водорода в присутствии 20% гидроксида палладия на угле (300 мг) в течение 12 часов. Смесь фильтровали через целит

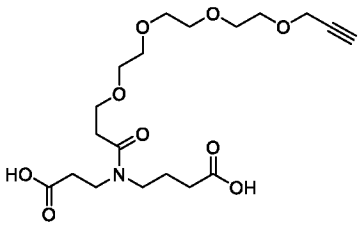
и упаривали с получением указанного в заголовке соединения в виде прозрачного масла. Выход: 0,72 г, 69%. Ион, найденный методом ЖХМС: [M + H]+ = 204,2.

Стадия d.



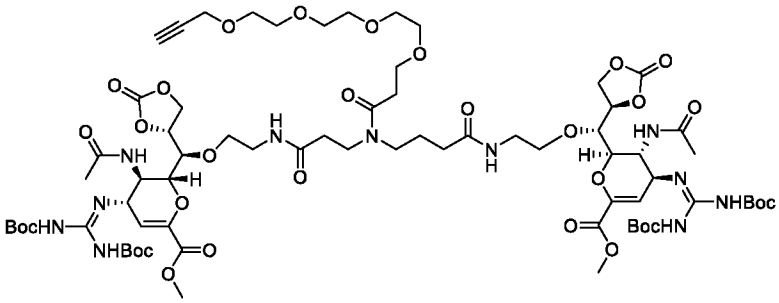
Продукт стадии c (0,70 г, 2,16 ммоль), пропаргил-ПЭГ-4 кислота (0,63 мг, 2,38 ммоль) HATU (1,26 г, 3,24 ммоль) в ДМФ (2 мл) перемешивали при комнатной температуре с последующим добавлением DIEA (1,15 мл, 6,49 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов, затем очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (Isco, от 5 до 50% ацетонитрила и воды с 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 840 мг, 87%. Ион, найденный методом ЖХМС [M+H]+ = 446,2.

Стадия e.



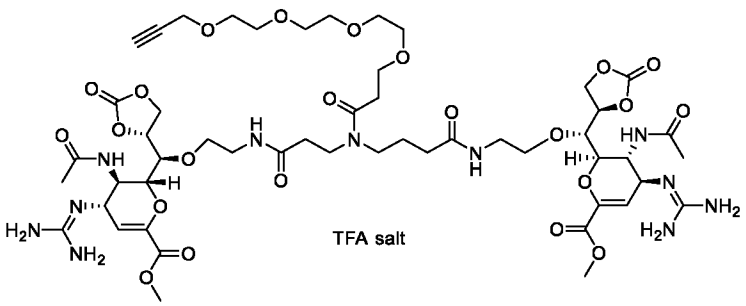
Раствор продукта стадии d (840 мг, 1,85 ммоль) и LiOH (113,1 мг, 4,72 ммоль) в H_2O:MeOH (1:2, 9 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем реакционную смесь подкисляли ТФУ. Полученный раствор упаривали, затем очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (Isco, от 0% до 20% ацетонитрила и воды). Выход: 454,5 мг, 59%. Ион, найденный методом ЖХМС [M+H]+ = 418,2.

Стадия f.



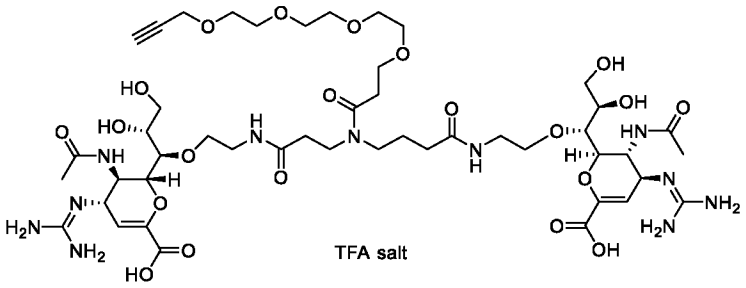
К раствору продукта стадии b (334,7 мг, 0,52 ммоль), продукта стадии e (102 мг, 0,24 ммоль) и HATU (273,25 мг, 0,704 ммоль) в безводном ДМФ (3 мл) при комнатной температуре добавляли DIEA (217 мг, 16,4 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа, затем очищали с помощью ОФЖХ (от 20% до 100% метанола и воды без модификатора). Выход: 206,5 мг, 55%. Ион, найденный методом ЖХМС [(M+2H)/2]+ = 806,8.

Стадия g.



Продукт стадии f (206,5 мг, 0,128 ммоль) и ТФУ (3 мл) в CH_2Cl_2 (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали полупрепаративной ВЭЖХ (от 0% до 30% ацетонитрила и воды с 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 144,5 мг, 69%. Ион, найденный методом ЖХМС [(M+2H)/2]+ = 606,8.

Стадия h.

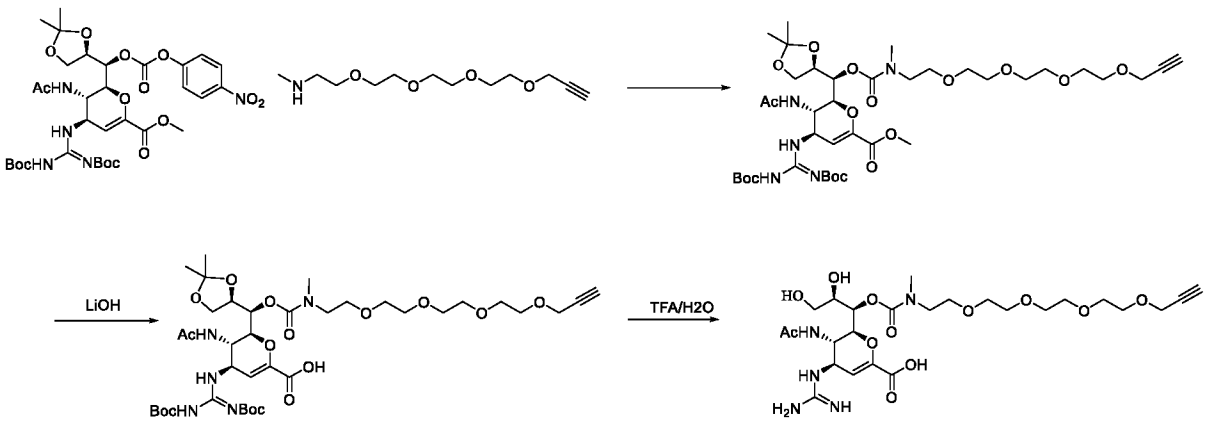


К раствору продукта стадии g (144,5 мг, 0,119 ммоль) в MeOH (9 мл) и воде (3 мл) добавляли LiOH (18 мг, 0,75 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем подкисляли ТФУ и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью полупрепаративной ВЭЖХ (от 0% до 25% ацетонитрила и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 45 мг, 28%. Ионы, найденные методом ЖХМС [(M+2H)/2]+ = 566,8.

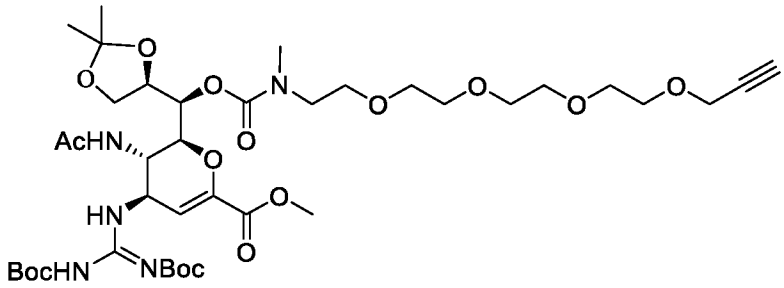
Пример 139. Синтез конъюгата 42

Раствор азидофункционализированного Fc (50 мг, 5,4 мл, 0,859 мкмоль, пример 124, SEQ ID NO: 18) добавляли в центрифужную пробирку объемом 10 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином (7,87 мг, 0,057 ммоль, пример 138). После осторожного встряхивания для растворения всех твердых веществ смесь добавляли к 3 мл предварительно перемешанного раствора натриевой соли L-аскорбиновой кислоты (0,68 мг, 0,34 ммоль, 0,25 М), сульфата меди (II) (1,1 мг, 0,0069 ммоль, 0,005 М) и BTTAA (11,8 мг, 0,027 ммоль, 0,02 М) в буфере ФСБ 7,4. Полученный раствор осторожно вращали в течение ночи. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. Общий протокол очистки конъюгата). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 63623 Да (DAR 3,8). Выход: 36,01 мг, 72%.

Пример 140. Синтез ПС 80

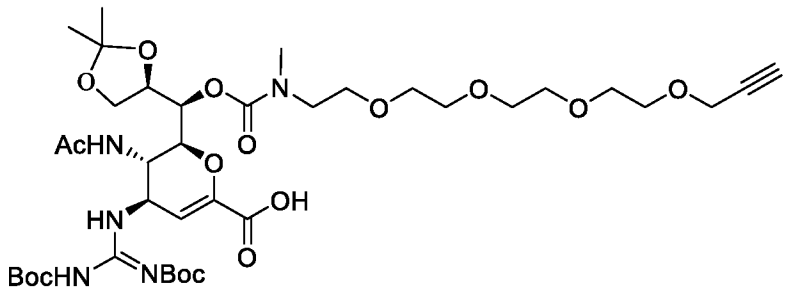


Стадия a.



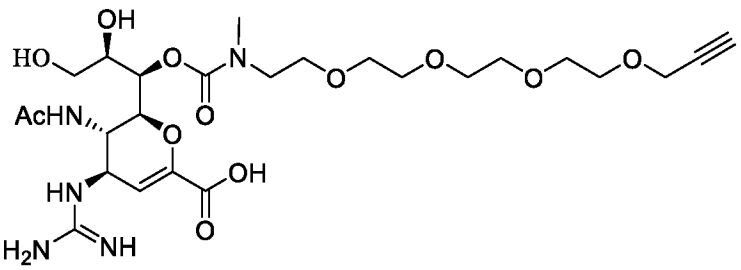
К раствору п-нитрофенилкарбоната занамивира (0,3 г, 0,4 ммоль, пример 103) в безводном дихлорметане (5 мл) добавляли пропаргил-ПЭГ4-метиламин (0,11 г, 0,44 ммоль) и DIPEA (0,14 мл, 1,0 ммоль) в безводном ДМФ (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, затем упаривали и очищали флэш-хроматографией, элюируя от 0 % до 10% метанолом/дихлорметаном. Выход: 0,28 г, 81%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $(M + H)^+$ = 858,4, $(M - Boc)+H^+$ = 758,4.

Стадия b.



Продукт с предыдущей стадии (280 мг, 0,2 ммоль) растворяли в 2 мл MeOH и 2 мл ТГФ, затем обрабатывали раствором гидроксида лития (24 мг, 1 ммоль), растворенным в 2 мл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 минут при комнатной температуре, и в это время, по данным ВЭЖХ, реакция была завершена. pH реакционного раствора доводили до значения от 5 до 6 с использованием ионообменной смолы Amberlite IRN-77, затем отфильтровывали для удаления смолы. Неочищенный продукт выпаривали досуха под вакуумом и использовали на следующей стадии очистки, а выход был количественным. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $(M + H)^+$ = 844,4, $(M - Boc + H)^+$ = 744,4.

Стадия c.



Продукт стадии b растворяли в 2 мл дихлорметана и 2 мл ТФУ и перемешивали при комнатной температуре. За протеканием реакции наблюдали с помощью ЖХМС. После завершения реакции (6 ч) раствор упаривали досуха, а затем растворяли в 2 мл воды и 2 мл ацетонитрила. Полученный раствор перемешивали в течение еще 2 часов при комнатной температуре, в это время ЖХМС показывала полное снятие защиты с ацетонидных защитных групп. Данную смесь упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 5% до 40% ацетонитрилом/водой с 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход: 180 мг, 78,0%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $(M + H)^+ = 604,2$.

Пример 141. Данные по стабильности ПС 80 по сравнению с ПС 4

ПС 80 (пример 140) и ПС 4 (пример 13) солюбилизировали до 10 мг/мл в деионизированной воде, а затем разбавляли 1:10 в 1X ФСБ до конечной концентрации 1 мг/мл. Образцы инкубировали при 37 °C или 60 °C в течение 1 недели. Аликвоту 25 мкл разбавляли 75 мкл воды для анализа методом ВЭЖХ. Используя СВЭЖХ Waters Acquity H-класса с колонкой Phenomenex Biozen PS-C18 (150x2,1 мм, 1,6 мкм), градиент от 0,1% муравьиной кислоты в воде до 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле был выполнен следующим образом: 5% B в течение 0 -1 мин, 5-20% B в течение 1-20 мин. Обнаружение осуществляли при 240 нм с использованием диодно-матричного детектора. ПС-80 продемонстрировало менее 1% деградации за неделю при 60 °C, в то время как ПС-4 продемонстрировало 15% деградации за тот же период времени (Фиг. 66)

Пример 142. Синтез конъюгата 43

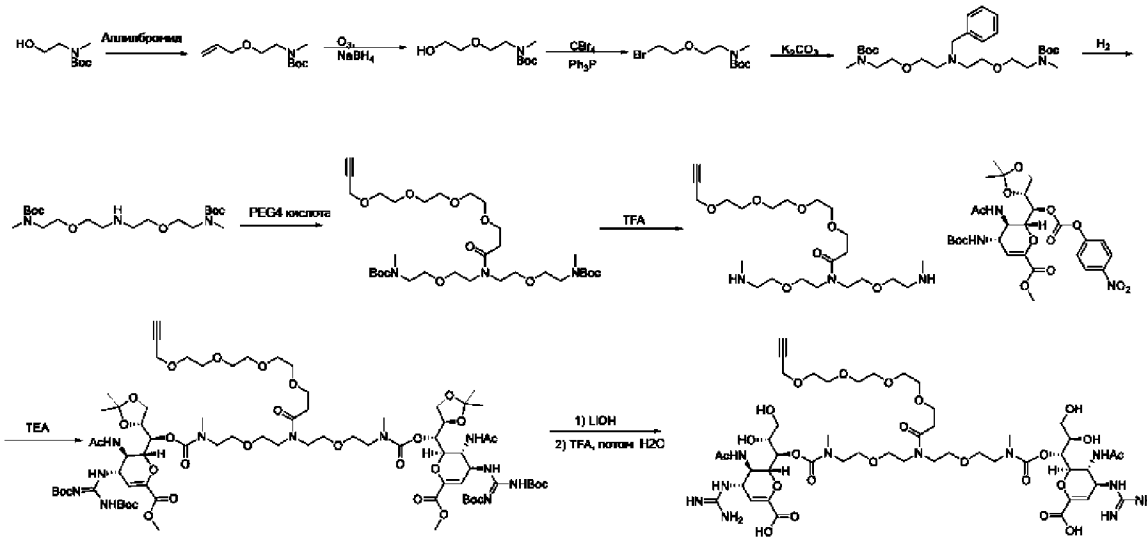
Получение раствора реагента для клик-реакции: 0,0050M CuSO4 в буферном растворе ФСБ x1: 10,0 мг CuSO4 растворяли в 12,53 мл ФСБ x1, затем брали 10,0 мл данного раствора CuSO4 и добавляли 86,1 мг BTTAA и 495,3 мг аскорбата натрия с получением раствора реагента для клик-реакции (0,0050 M CuSO4, 0,020 M BTTAA и 0,25 M аскорбата натрия).

Раствор азидофункционализированного Fc (78,0 мг, 4,535 мл, 1,35 мкмоль, пример 124, SEQ ID NO: 73) добавляли в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую малую молекулу, дериватизированную алкином (13,2 мг, 8,88 мкмоль, ПС 80, пример 140). После осторожного встряхивания для растворения всех твердых веществ к смеси добавляли 2,153 мл указанного выше раствора реагента для клик-реакции (натриевая соль L-аскорбиновой кислоты, 0,25 M, 106,6 мг, 0,538 ммоль, сульфат меди (II) 0,0050 M, 1,72 мг, 0,0107 ммоль и BTTAA 0,020M, 18,5 мг, 0,0431 ммоль). Полученную смесь осторожно вращали в течение 6 часа при температуре окружающей среды. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином A с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. Протокол очистки конъюгата). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 64012 Да (DAR = 7,0). Выход 50,3 мг, выход 62%.

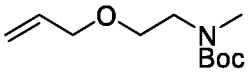
Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 43, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, которая включает C-концевой

остаток лизина. После экспрессии С-концевой лизин Fc конъюгата 43 протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 73. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 143. Синтез ПС 81

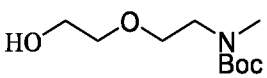


Стадия a.



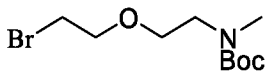
К хорошо перемешиваемому раствору N-Boc-N-Me-глицинола (3,5 г, 20 ммоль) в ДМСО (20 мл), охлажденному на бане с ледяной водой, добавляли аллилбромид (3,6 г, 30,0 ммоль) с последующим добавлением мелко измельченного порошка КОН (3,5 г, 30,0 ммоль) в течение 15 минут. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь разделяли между 5% водн. НОАс (50 мл) и этилацетатом (200 мл). Органический слой отделяли, промывали солевым раствором, сушили сульфатом натрия, фильтровали и упаривали, затем очищали флэш-хроматографией, элюируя смесью от 10% до 80% этилацетатом/гексаном. Выход продукта 4,1 г, 95%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =216,3.

Стадия b.



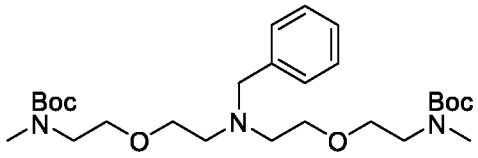
Озон барботировали через раствор соединения со стадии a (8,0 г, 37 ммоль) в MeOH (50 мл) и ДХМ (50 мл) при -78 °С до появления голубого цвета. Непрореагировавший озон удаляли барботированием кислородом в течение 10 минут перед добавлением $NaBH_4$ (1,6 г, 40 ммоль) небольшой порцией в течение 10 минут. После добавления всего $NaBH_4$ смесь постепенно нагревали до комнатной температуры. Полученный раствор разделяли между этилацетатом (100 мл) и солевым раствором (50 мл). Органический слой отделяли, промывали солевым раствором, сушили сульфатом натрия, фильтровали, упаривали до масла, а затем очищали флэш-хроматографией, элюируя от 10% до 80% этилацетатом/дихлорметаном. Выход продукта 5,0 г, 62%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =220,2.

Стадия c.



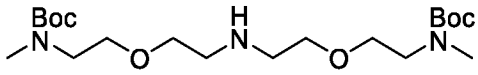
К раствору продукта (4,4 г, 20 ммоль) из предыдущей стадии и CBr_4 (10,0 г, 30,0 ммоль) в ДХМ (50 мл) при 0 °C медленно в течение 15 минут добавляли PPh_3 (8,0 г, 30 ммоль) (экзотермический). Во ходе добавления внутреннюю температуру поддерживали на уровне ниже 30 °C. После добавления PPh_3 реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Неочищенную реакционную смесь упаривали до масла, затем очищали нормально-фазовой хроматографией, элюировали от 10% этилацетатом/гексанами до 80% этилацетатом/гексанами. Фракции, содержащие капли масла внутри пробирок для сбора, объединяли и упаривали до бесцветного масла. 4,0 г, 70,5%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =282,1.

Стадия d.



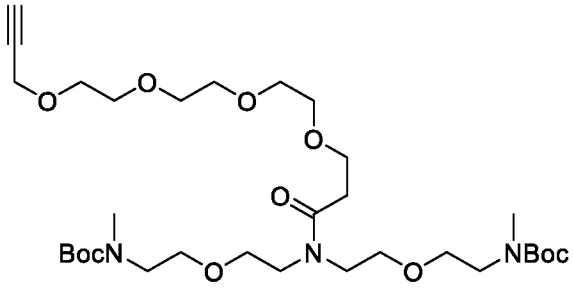
Раствор продукта стадии c (4 г, 14 ммоль), бензиламина (0,60 г, 5,7 ммоль) и K_2CO_3 (2,35 г, 17 ммоль) в ДМФ (20 мл) нагревали на масляной бане при 75 °C в течение 8 часов. Смесь фильтровали, упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (5% ACN/вода до 100% ACN). Выход: 2,1 г, 72,7%.

Стадия e.



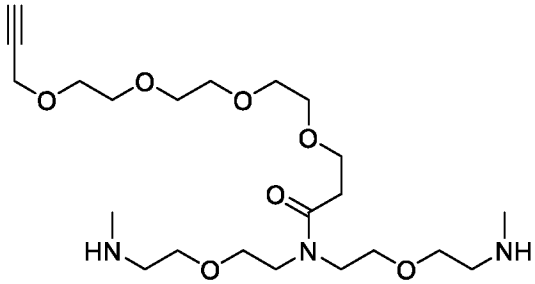
К раствору продукта стадии d (1,3 г, 2,0 ммоль), растворенного в $CHCl_3$/EtOH (1:20, 20 мл), добавляли 20% $Pd(OH)_2$/C (0,50 г). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи под действием водорода из баллона при температуре окружающей среды. Реакционную смесь фильтровали через слой целита, затем упаривали на роторном испарителе и переносили на следующую стадию без дополнительной очистки.

Стадия f.



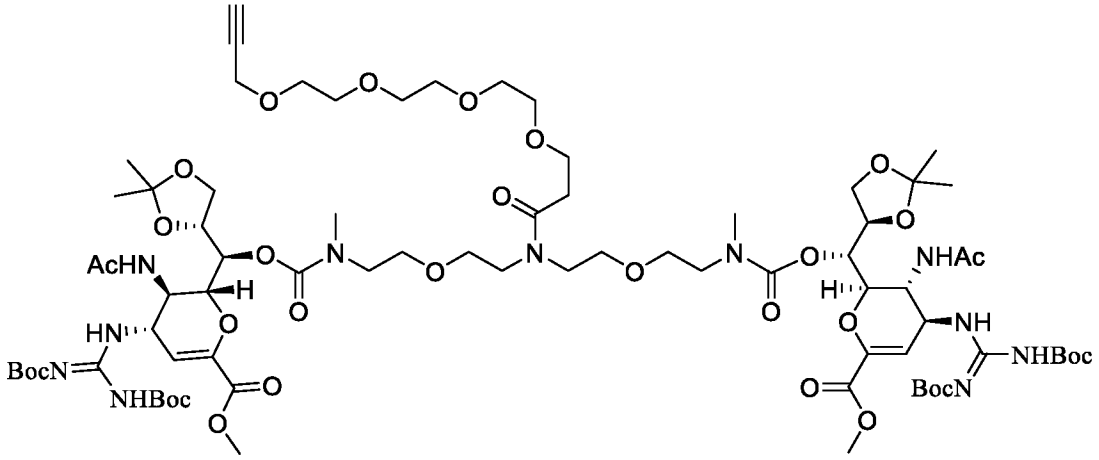
Продукт стадии e растворяли в 10 мл ДМФ, затем обрабатывали пропаргил-ПЭГ4-кислотой (0,52 г, 2,0 ммоль), EDCI (0,6 г, 3,0 ммоль), HOAt (0,45 г, 3 моль) и основанием Хунига (0,7 мл, 5,0 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение четырех часов, затем упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (от 10% ACN/воды до 60% ACN/воды). Выход 0,43 г, 65% за две стадии. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[M - Boc + H]^+ = 562,4$, $[M + H]^+ = 662,4$.

Стадия g.



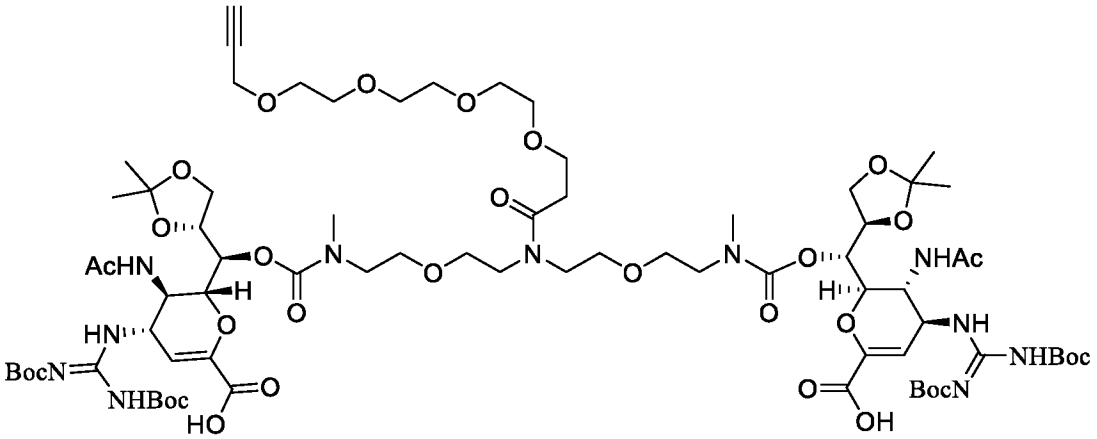
Продукт стадии d (70 мг, 0,1 ммоль) обрабатывали ТФУ (2 мл) в течение 2 часов при комнатной температуре. ТФУ удаляли на роторном испарителе, а оставшееся масло дополнительно сушили в условиях высокого вакуума в течение 12 часов с получением желаемого продукта в виде соли бис-ТФУ. Выход был количественным. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 462,4$.

Стадия h.



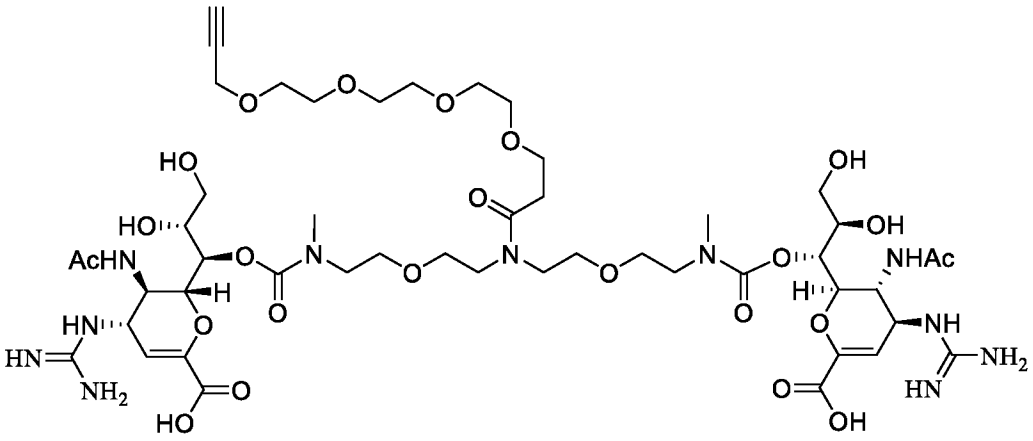
К раствору нитрофенилкарбоната, описанного в примере 109 (0,72 г, 0,95 ммоль), в безводном ДМФ (5 мл) добавляли смесь диамина стадии g (0,3 г, 0,43 ммоль, порциями добавляли в течение 30 минут) и DIPEA (0,28 мл, 2 ммоль) в безводном ДМФ (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, затем упаривали и очищали флэш-хроматографией, элюируя от 0 % до 10% метанолом/дихлорметаном. Выход: 0,63 г, 86%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 844,4$, $[(M - Boc + 2H)/2]^+ = 794,4$, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+ = 744,4$.

Стадия i.



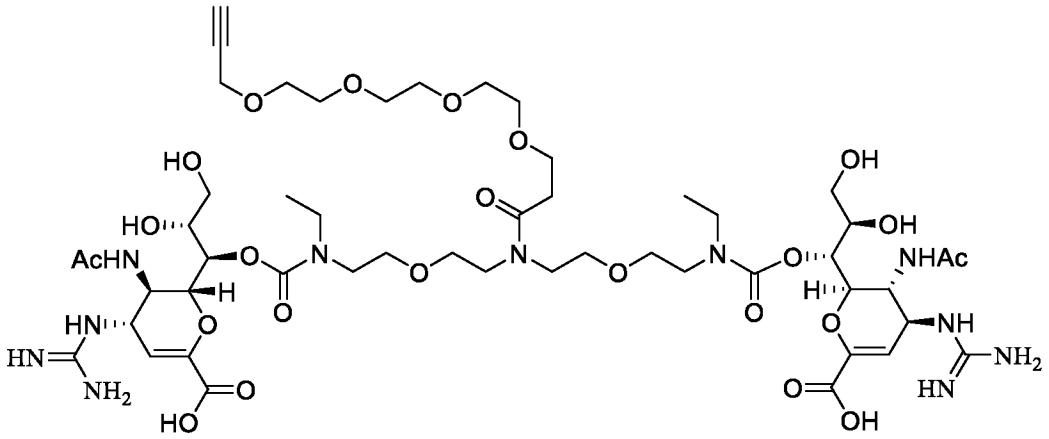
Продукт с предыдущей стадии (600 мг, 0,35 ммоль) растворяли в 5 мл MeOH и 5 мл ТГФ, затем обрабатывали раствором гидроксида лития (48 мг, 2 ммоль), растворенным в 2 мл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 минут при комнатной температуре, и в это время, по данным ВЭЖХ, реакция была завершена. pH реакционного раствора доводили до значения от 5 до 6 с использованием ионообменной смолы Amberlite IRN-77, затем отфильтровывали для удаления смолы. Неочищенный продукт упаривали досуха на роторном испарителе и использовали на следующей стадии очистки. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 829,9$, $[(M - Boc + 2H)/2]^+ = 779,4$, $[(M - 2Boc + 2H)/2]^+ = 729,4$.

Стадия j.



Продукт со стадии i растворяли в 5 мл дихлорметана и 5 мл ТФУ и перемешивали при комнатной температуре. За протеканием реакции наблюдали с помощью ЖХМС. После завершения реакции (6 ч) раствор упаривали досуха, а затем растворяли в 4 мл воды и 4 мл метанола. Полученный раствор перемешивали в течение еще 2 часов при комнатной температуре, при которой ЖХМС показывала полное снятие защиты с ацетонидных защитных групп. Данную смесь упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco CombiFlash, элюировали от 5% до 40% ацетонитрилом/водой с 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход: 380 мг, 71,0%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 589,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 392,5$.

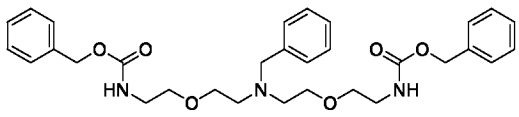
Пример 144. Синтез ПС 82



Указанное в заголовке соединение получали аналогично примеру 143, ПС 81, где N-Boc-N-Me-глицинол был замещен N-Boc-N-этилглицинолом на стадии a. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: [M/2]+1 = 603,8, [M/3]+1 = 402,9.

Пример 145. Синтез ПС 83

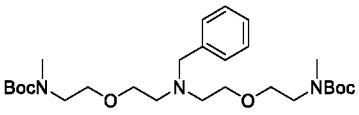
Стадия a.



CBZ-защищенный-амино-ПЭГ1-бромид (7,6 г, 25,2 ммоль), бензиламин (1,1 г, 10,1 ммоль) и карбонат калия (2,8 г, 2,8 ммоль) перемешивали в ДМФ (10 мл) при 60 °C в течение 12 часов. Раствор упаривали на роторном испарителе и очищали с помощью хроматографии на силикагеле (0-10% метанола в ДХМ, 30-

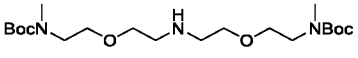
минутный градиент) с получением продукта в виде прозрачного вязкого масла. Выход 3,2 грамма, 57%. Ион, найденный методом ЖХ/МС [M+H]+ = 550,2.

Стадия b.



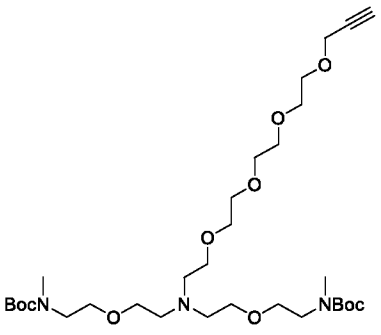
Продукт стадии a (1,9 г, 3,5 ммоль) растворяли в ТГФ (20 мл) и охлаждали до 0 °C на бане с ледяной водой в атмосфере азота. LAH (6,9 мл, 13,8 ммоль, 2M в ТГФ) добавляли по каплям с помощью шприца в течение 10 минут. Смесь перемешивали при кипячении с обратным холодильником в течение 2 часов, затем охлаждали до 0 °C на бане с ледяной водой. По каплям добавляли 1 мл воды, а затем по каплям добавляли 1 мл водного (15% по массе) раствора NaOH. Добавляли 3 мл воды и смесь перемешивали в течение 15 минут, за это время добавляли 2 г сульфата магния. Смесь перемешивали в течение 10 минут, затем фильтровали через целит, промывали 2 дополнительными 10 мл порциями ТГФ и объединенные фильтраты упаривали на роторном испарителе. Остаток помещали в ацетонитрил (20 мл), добавляли триэтиламин (1,4 г, 13,8 ммоль) и boc-ангидрид (3,0 г, 13,8 ммоль). Смесь перемешивали в течение 45 минут, упаривали и очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95% ацетонитрила/деионизированной воды, 0,1% ТФУ в качестве модификатора, 30-минутный градиент). Выход: 1,4 г, 79%. Ион, найденный методом ЖХ/МС [M+H]+ = 510,2.

Стадия c.



Продукт из стадии b (1 г, 1,9 ммоль) этого примера перемешивали в метаноле (25 мл) в присутствии гидроксида палладия (200 мг) в атмосфере водорода в течение 2 часов. Смесь фильтровали через целит и упаривали с получением продукта в виде прозрачного масла, которое использовали без дополнительной очистки. Выход: 0,73 г, 89%. Ион, найденный методом ЖХ/МС [M+H]+ = 420,4.

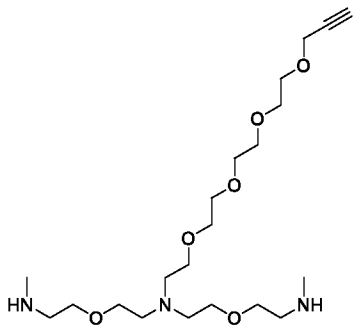
Стадия d.



Продукт со стадии c (0,73 г, 1,7 ммоль), пропаргил-ПЭГ4-тозилат (0,91 г, 2,4 ммоль) и диизопропилэтиламин (0,76 г, 5,9 ммоль) перемешивали в ДМФ (5 мл) при 85 °C в течение 4 часов. Смесь упаривали на роторном испарителе, затем очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95% ацетонитрила/деионизированной воды, 0,1% ТФУ в качестве модификатора, 30-минутный градиент) с получением продукта в виде прозрачного вязкого масла. Выход: 0,89 г, 82%. Ион, найденный методом

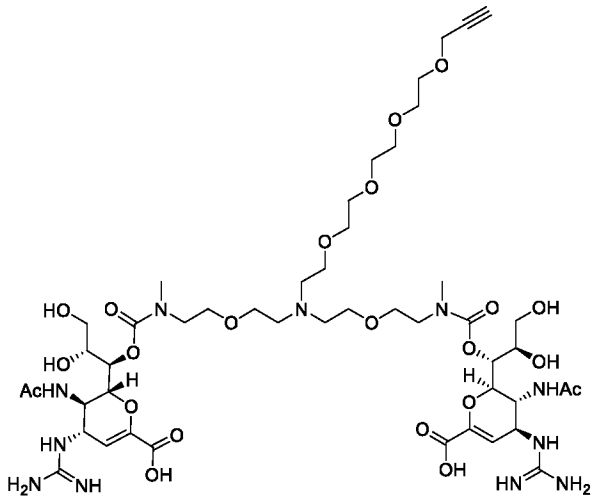
ЖХ/МС [M+H]+ = 634,4.

Стадия e.



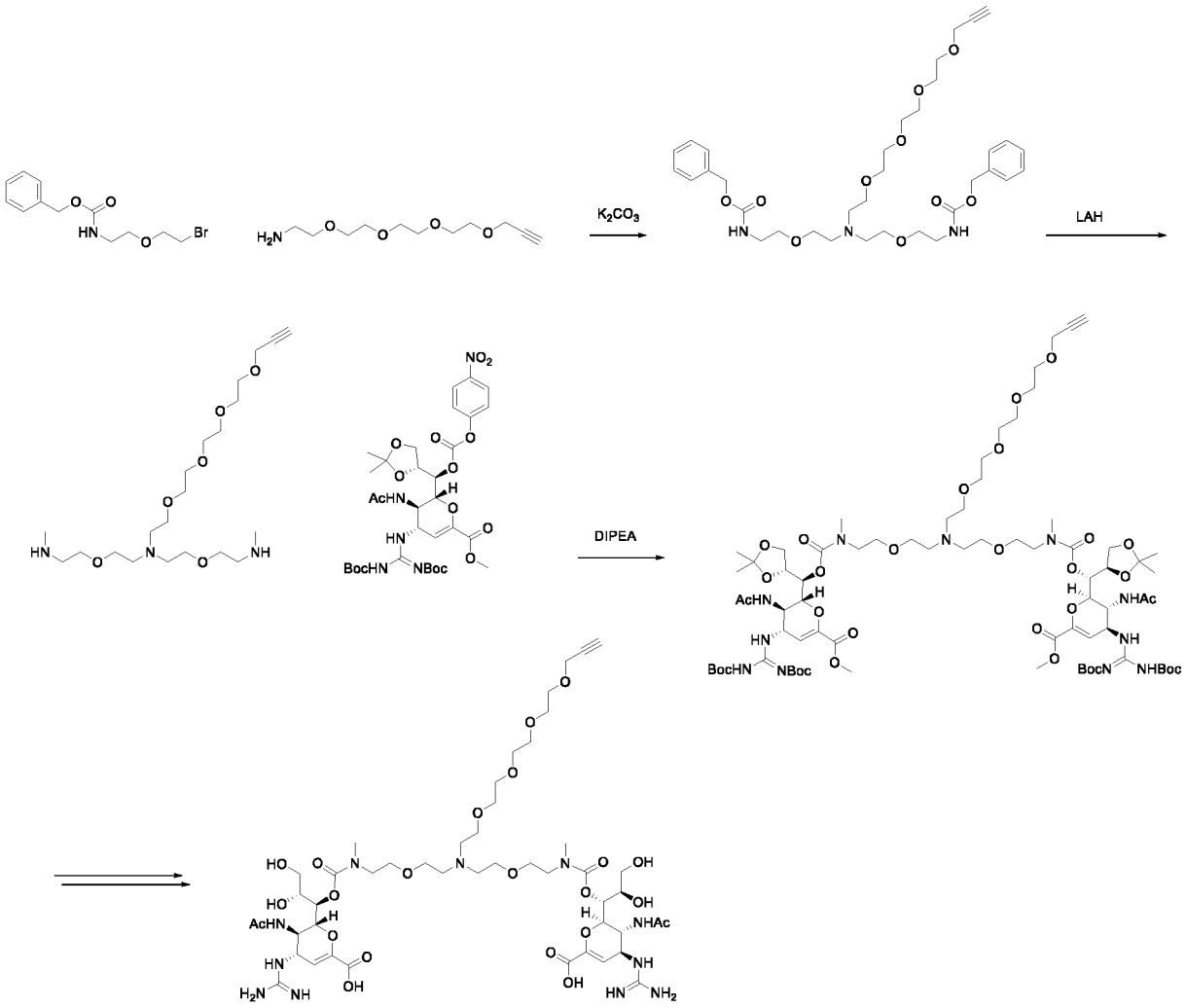
Продукт со стадии d (0,89 г, 1,4 ммл) перемешивали в 4 н. HCl (в диоксане) в течение 45 минут при температуре окружающей среды. Смесь упаривали на роторном испарителе и подвергали азеотропной перегонке (3x) с бензолом. Полученный остаток помещали в деионизированную воду (15 мл), замораживали и лиофилизировали с получением продукта в виде прозрачного масла, соли бис-HCl. Выход: 0,65 г, 91%. Ион, найденный методом ЖХ/МС [M+H]+ = 434,4.

Стадия f.



Остальные четыре стадии синтеза данного соединения были аналогичны тем, которые использовали в синтезе примера 143, ПС 81. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: (M+2H)/2 =575,8

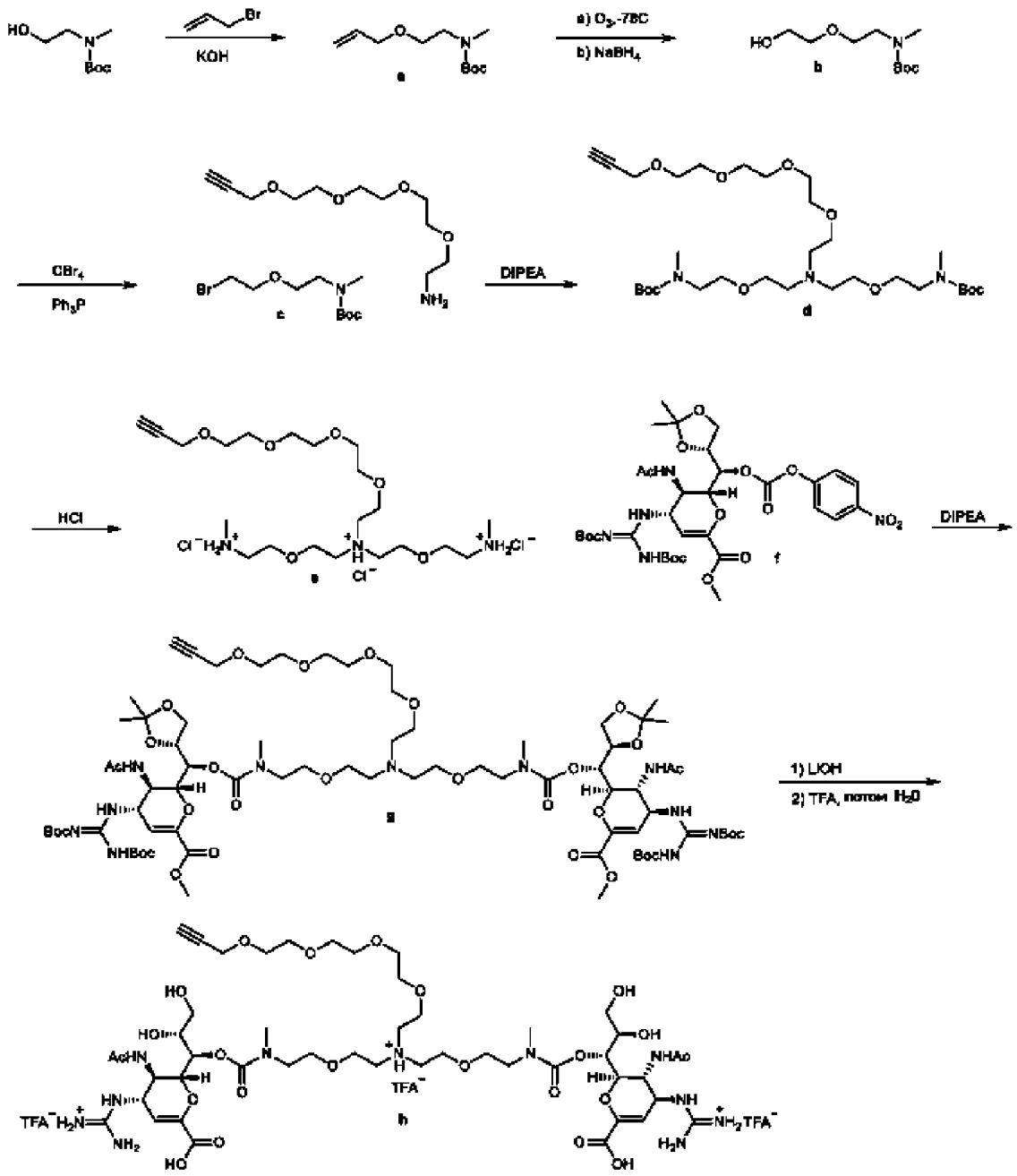
Пример 146a. Альтернативный синтез I ПС 83



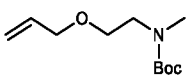
Продукт, описанный в примере 145, ПС 83, может быть получен альтернативным способом с применением приведенной выше схемы реакции специалистом в данной области с использованием способов, описанных в данном патенте.

Пример 146b. Альтернативный синтез II ПС 83

Продукт, описанный в примере 145, ПС-83, может быть получен альтернативным способом с использованием приведенной ниже схемы реакции специалистом в данной области техники с использованием способов, описанных в данном патенте.

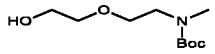


Синтез a.



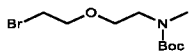
К хорошо перемешиваемому раствору N-Boc-N-Me-глицинола (3,5 г, 20 ммоль) в ДМСО (20 мл), охлажденному на бане с ледяной водой, добавляли аллилбромид (3,6 г, 30,0 ммоль) с последующим добавлением мелко измельченного порошка КОН (3,5 г, 30,0 ммоль) в течение 15 минут. Полученный раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Полученную смесь разделяли между 5% водн. НОАс (50 мл) и этилацетатом (200 мл). Органический слой отделяли, промывали солевым раствором, сушили сульфатом натрия, фильтровали и упаривали, затем очищали флэш-хроматографией, элюируя смесью от 10% до 80% этилацетатом/гексаном. Выход продукта 4,1 г, 95%. Ион, найденный методом ЖХМС: M+H =216,3.

Синтез b.



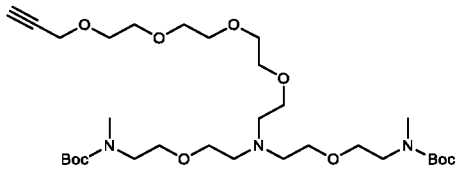
Озон барботировали через раствор a (8,0 г, 37 ммоль) в MeOH (50 мл) и ДХМ (50 мл) при -78°C до появления светло-голубой окраски. Непрореагировавший озон удаляли барботированием кислородом в течение 10 минут перед добавлением $NaBH_4$ (1,6 г, 40 ммоль) небольшой порцией в течение 10 минут. После добавления всего $NaBH_4$ смесь постепенно нагревали до комнатной температуры. Полученный раствор разделяли между этилацетатом (100 мл) и солевым раствором (50 мл). Органический слой отделяли, промывали солевым раствором, сушили сульфатом натрия, фильтровали, упаривали до масла, а затем очищали флэш-хроматографией, элюируя от 10% до 80% этилацетатом/дихлорметаном. Выход продукта 5,0 г, 62%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =220,2.

Синтез c.



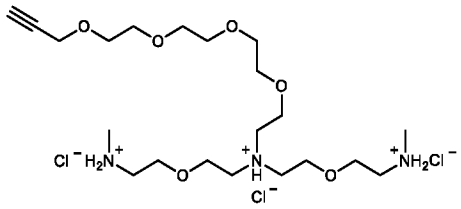
К раствору b (4,4 г, 20 ммоль) и CBr_4 (10,0 г, 30,0 ммоль) в ДХМ (50 мл), охлажденному на бане со льдом, медленно добавляли PPh_3 (8,0 г, 30 ммоль) в течение 15 минут (экзотермический процесс). Во ходе добавления внутреннюю температуру поддерживали на уровне ниже 30 °C. После добавления PPh_3 реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Неочищенную реакционную смесь упаривали до масла, затем очищали нормально-фазовой хроматографией, элюировали от 10% этилацетатом/гексанами до 80% этилацетатом/гексанами. Фракции, содержащие капли масла внутри пробирок для сбора, объединяли и упаривали до бесцветного масла, 4,0 г, 70,5%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: M+H =282,1.

Синтез d.



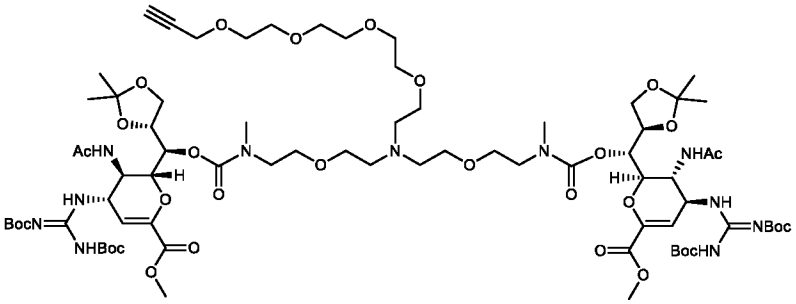
Раствор c (4,4 г, 15,5 ммоль), пропаргил-ПЭГ4-амина (1,5 г, 6,4 ммоль) и DIPEA (3,3 г, 25,8 ммоль) в ДМФ (20 мл) нагревали на масляной бане при 75 °C в течение 18 часов. Смесь фильтровали, упаривали и очищали с помощью ОФЖХ (5% ACN/вода до 100% ACN). Выход: 3,85 г, 92%. ЖХ/МС: [M + H] = 634,2.

Синтез e.



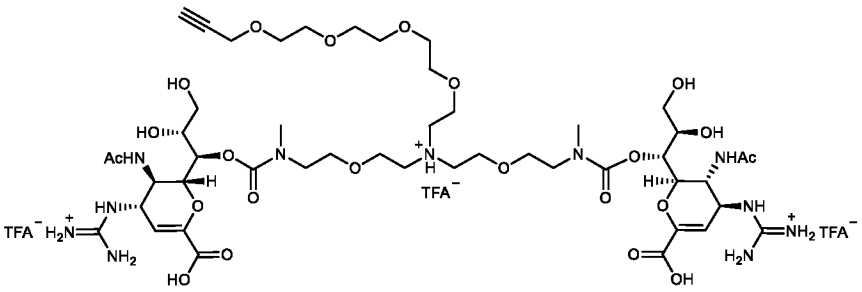
Продукт d (3,85, 6,1 ммоль) обрабатывали HCl (4 н. в диоксане, 15 мл) в течение 2 часов при комнатной температуре. Растворитель удаляли на роторном испарителе, а оставшееся масло растворяли в деионизированной воде (20 мл), замораживали и лиофилизировали с получением продукта в виде масла светло-желтого цвета. Выход был количественным. Ион, найденный методом ЖХМС: $[M + H]^+ = 434,2$.

Синтез f.



К раствору f (0,68 г, 1,34 ммоль) и DIPEA (0,87 г, 6,7 ммоль), растворенных в безводном ДМФ (5 мл), добавляли f (2,1 г, 2,8 ммоль) порциями в течение 1 часа. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, затем упаривали и очищали флэш-хроматографией, элюируя от 0 % до 10% метанолом/дихлорметаном. Выход: 1,45 г, 67%. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 829,8$.

Синтез g.



Продукт f (1,45 г, 0,87 ммоль) растворяли в 3 мл MeOH, затем обрабатывали раствором гидроксида лития (90 мг, 3,8 ммоль), растворенного в деионизированной воде (6 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 15 минут при комнатной температуре, и в это время, по данным ЖХМС, реакция была завершена. pH реакционного раствора доводили до значения от 5 до 6 с использованием ионообменной смолы Amberlite IRN-77, затем отфильтровывали для удаления смолы. Фильтрат концентрировали досуха на роторном испарителе и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Ион, найденный методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 815,9$.

Продукт гидролиза растворяли в дихлорметане (5 мл) и ТФУ (10 мл) и перемешивали при комнатной температуре. За протеканием реакции наблюдали с помощью ЖХМС. После полного удаления Boc (~4 часа) раствор концентрировали досуха на роторном испарителе, а затем растворяли в 8 мл воды. Полученный раствор перемешивали еще 2 часа при комнатной температуре, после чего ЖХ-МС показала полное удаление ацетонидных защитных групп. Данную смесь упаривали и очищали обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ) с использованием жидкостного хроматографа Isco COMBIFLASH®, элюировали от 5% до 40% ацетонитрилом/водой с 0,1% ТФУ в качестве модификатора. Выход за три стадии 780 мг, 65,0 %.

Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + 2H)/2]^+ = 575,8$, $[(M + 3H)/3]^+ = 384,8$.

Пример 147. Эксперименты с серийным пассажем для отбора устойчивых вирусов гриппа

Чтобы оценить потенциал развития лекарственно-устойчивых мутантных штаммов вируса под давлением отбора с вирусными ингибиторами, были проведены исследования серийных пассажей с конъюгатами 6 и 33 по сравнению с препаратами сравнения осельтамивиром и балоксавиром. Исследования серийных пассажей проводили с использованием клеток A549 или MDCK. Пассажи проводили следующим образом: 150 000 клеток A549 или MDCK высеивали на лунку (12-луночный) в 500 мкл DMEM, 10% ФБС, 1% PS, 1% NaPyr и 1% HEPES, и инкубировали в течение приблизительно 24 часов. Как только клетки достигли приблизительно 80% конфлюэнтности, их один раз промывали ФСБ и инкубировали в течение 2 часов в присутствии соединений или только ФСБ в нормальных условиях культивирования. Концентрации исследуемых препаратов были оптимизированы в соответствии с требованиями для максимального ингибирования вируса при сохранении достаточной продукции вируса для последующих пассажей. Концентрации исследуемых препаратов, использованных в экспериментах с серийным пассажем, показаны на фиг. 67 и 68. Затем клетки инфицировали при MOI 0,01 или 0,05 (клетки MDCK и A549, соответственно; 150 мкл, разведенные в инфекционном буфере) в течение 1 часа при комнатной температуре в буфере, содержащем ФСБ, бычий альбумин 35% и Ca^{2+}/Mg^{2+}, , с последующим удалением инокулята и однократной промывкой клеток DMEM 1% PS, 1% NaPyr и 1% HEPES (без ФБС). Затем клетки инкубировали в течение 24 часов в присутствии исследуемых препаратов, разведенных в DMEM 1% PS, 1% NaPyr, 1% HEPES и 1 мкг/мл трипсина, обработанного TPCK. После инкубации собирали вирусные супернатанты, а клетки и дебрис удаляли центрифугированием (5 мин, 4 °C, 1400 × g). Затем супернатанты использовали для:

i количественного определения вирусного титра с помощью анализа бляшек;

ii проведения анализа гемагглютинации, чтобы определить, ускользнул ли вирус от ингибирования соединения;

iii повторного инфицирования только что высеянных клеток A549 или MDCK в присутствии соединений.

Процесс повторяли для 10 пассажей или до тех пор, пока не наблюдалась резистентность к осельтамивиру и балоксавиру в контроле. Как только повышенные титры в присутствии лекарственных препаратов обнаруживаются при двух последовательных пассажах, вирусы могут быть очищены от бляшек. После очистки от бляшек все 8 сегментов генома можно секвенировать и сравнивать с контрольным вирусом, обработанным ФСБ, для обнаружения ускользающих мутаций. Сводные данные по двум различным экспериментам с серийным пассажем показаны на фиг. 67 и 68. В эксперименте, представленном на фиг. 67, конъюгат 6 сравнивали с осельтамивиром и балоксавиром с использованием клеток A549, инфицированных A/California/04/09/ H1N1 pdm. Конъюгат 6, балоксавир и осельтамивир использовали при 0,5, 0,5 и 200 нМ, соответственно. В случае конъюгата 6 в течение 11 пассажей не наблюдалось увеличения вирусного титра (что свидетельствует об отсутствии появления резистентных мутантов), тогда как титры балоксавира и осельтамивира увеличивались до уровней, аналогичных тем, которые наблюдались в контроле ФСБ после пассажей 5 и 11, соответственно. В эксперименте, представленном на фиг. 68. конъюгаты 6 и 33 сравнивали с осельтамивиром и балоксавиром с использованием клеток MDCK, инфицированных A/WSN/1933 H1N1. Конъюгат 6, конъюгат 33, балоксавир и осельтамивир использовали при 4 нМ, 2 нМ, 4 нМ и 50 нМ, соответственно. В случае конъюгата 6 или 33 в течение 10 пассажей не наблюдалось увеличения вирусного титра (что свидетельствует об отсутствии появления резистентных мутантов), тогда как титры балоксавира и

осельтамивира увеличивались до уровней, аналогичных тем, которые наблюдались в контроле ФСБ после пассажей 5 и 10, соответственно.

Пример 148. Синтез конъюгата 6a

Указанный в заголовке конъюгат получают аналогично конъюгату 6 (пример 20) с использованием ПС 7a (пример 100). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 62063 Да (DAR = 2,7). Выход 175,4 мг, выход 50%.

Пример 149. Синтез конъюгата 6b

Указанный в заголовке конъюгат получают аналогично конъюгату 6 (пример 20) с использованием ПС 7b (пример 101). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 62063 Да (DAR = 2,8). Выход 175,4 мг, выход 50%.

Пример 150. Синтез конъюгата 6c

Указанный в заголовке конъюгат получают аналогично конъюгату 6 (пример 20) с использованием ПС 7c (пример 102). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 62782 Да (DAR = 3,2). Выход 175,4 мг, выход 50%.

Пример 151. Синтез конъюгата 44

Этот конъюгат получали аналогично примеру 80 (конъюгат 20) с помощью ПЭГ4-азидо-Fc (SEQ ID NO: 73, приготовленный, как в Примере 124), и ПС-22 (Пример 79). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 62882 Да (DAR = 5,6).

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 44, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, которая включает C-концевой остаток лизина. После экспрессии C-концевой лизин Fc конъюгата 44 протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 73. Наличие или отсутствие C-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 152. Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности

Конъюгат 6 и конъюгат 33 тестировали на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Монослой клеток MDCK инфицировали штаммами гриппа A или гриппа B при MOI 0,001–10 и инкубировали в течение 18–24 ч при 37 °C в 5% CO_2. ADCC определяли с использованием коммерческой клеточной линии (PROMEGA) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, испытуемые образцы добавляли в концентрации от 1 до 10000 нМ в соответствующие лунки и инкубировали в течение 15 минут при 37 °C в 5% CO_2. ADCC количественно определяли по люминесценции. Конъюгат 6 тестировали против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1), показывая зависимое от MOI увеличение ADCC (Фиг. 69), и дозозависимое увеличение ADCC при MOI, равной 1 (Фиг. 70). Конъюгат 33 тестировали против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1), гриппа A/CA/07/2009 (H1N1) и гриппа A/HK/1/1968 (H3N2). На Фиг. 71A-71C, и грипп B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, Фиг. 72), демонстрирующие зависимое от MOI увеличение ADCC с помощью конъюгата 33. Конъюгат 33 также показал дозозависимое увеличение ADCC против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) при MOI, равной 1 (Фиг. 73A) и MOI, равной 10 (Фиг. 73B). Моноклональное антитело гедивумаб (Genentech) использовали в качестве положительного контроля для сравнения связывания рецептора полноразмерным

антителом со связыванием Fc-конъюгатом. Гедивумаб также показал зависимое от MOI увеличение ADCC при тестировании против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1, Фиг. 74) и дозозависимое увеличение ADCC против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) при MOI, равной 1 (Фиг. 75A) и MOI, равной 10 (Фиг. 75B).

Пример 153. Анализ антителозависимого клеточного фагоцитоза

Конъюгат 6 и конъюгат 33 тестировали на клеточный фагоцитоз. Монослой клеток MDCK инфицировали штаммами гриппа A или гриппа B при MOI 0,001–10 и инкубировали в течение 18–24 ч при 37 °C в 5% CO_2. ADCP определяли с использованием коммерческой клеточной линии (PROMEGA) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, испытуемые образцы добавляли в концентрации от 1 до 10000 нМ в соответствующие лунки и инкубировали в течение 15 минут при 37 °C в 5% CO_2. ADCP количественно определяли по люминесценции. Конъюгат 6 тестировали против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1), показывая зависимое от MOI увеличение ADCP (Фиг. 76), и дозозависимое увеличение ADCP при MOI, равной 1 (Фиг. 77A) и MOI, равной 10 (Фиг. 77B). Конъюгат 33 тестировали против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1), гриппа A/CA/07/2009 (H1N1) и гриппа A/HK/1/1968 (H3N2) (Фиг. 78A-78C, соответственно) и грипп B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, Фиг. 79), показывая зависимое от MOI увеличение ADCP с помощью конъюгата 33. Конъюгат 33 также показал дозозависимое увеличение ADCP против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) при MOI, равной 1, (Фиг. 80A) и MOI, равной 10, (FIG. 80B). Гедивумаб (Genentech) использовали в качестве положительного контроля для сравнения связывания рецептора полноразмерным антителом со связыванием Fc-конъюгатом. Гедивумаб также продемонстрировал зависимое от MOI увеличение ADCP при тестировании против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1, Фиг. 81) и дозозависимое увеличение ADCP против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) при MOI, равной 1 (Фиг. 82A) и MOI, равной 10 (Фиг. 82B).

Пример 154. Ингибирование нейраминидазы живым вирусом гриппа A или лизатами устойчивых к нейраминидазе мутантов

Ингибирование нейраминидазы (NAI). Исследуемые образцы инкубировали с нейраминидазой (Sino Biological) или с живыми вирусами в течение 20 мин при 37 °C, 5% CO_2. Субстрат 2'-(4-метилумбеллиферил)-α-D-N ацетилнейраминовой кислоты добавляли в соответствующие лунки и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, 5% CO_2. NAI определяли путем считывания флуоресценции при возбуждении 355 нм/испускании 460 нм. Ингибирование нейраминидазы определяли для устойчивых к нейраминидазе мутантов и для живого вируса гриппа (таблица 66, таблица 67, таблица 68 и таблица 69).

Таблица 66: Ингибирование нейраминидазы лизатами устойчивых к нейраминидазе мутантов

					H1N1 ДТ	**H1N1 H275Y**	**H3N2 ДТ**	**H3N2 E119V**	**H3N2 R292K**	**H5N1 ДТ**	**H7N9 ДТ**
	TM	**DAR**	**Центральный линкер**	**Fc**	**IC_{50} [нМ]**	**IC_{50} [нМ]**	**IC_{50} [нМ]**	**IC_{50} [нМ]**	**IC_{50} [нМ]**	**IC_{50} [нМ]**	**IC_{50} [нМ]**
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	3,80	743,90	2,18	455,70	8015,00	15,44	2,95

Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	2,15	1,93	4,27	112,60	116,50	2,05	11,11
ПС 7a	Н/П	Н/П	15 атомов	Н/П	22,58	9,42	21,11	679,40	993,60	17,06	49,04
Промеж. соед.-7b	Н/П	Н/П	15 атомов	Н/П	34,82	13,84	32,07	1079,00	1584,00	29,56	87,54
Промеж. соед.-7b	Н/П	Н/П	15 атомов	Н/П	2002,00	872,40	2914,00	>10000	>10000	2706,00	3325,00
Конъюгат 6a	ПС 7a	2,7	15 атомов	SEQ ID NO: 18	0,37	0,43	4,14	4,66	4,85	0,59	1,18
Конъюгат 6b	Промеж. соед.-7b	2,8	15 атомов	SEQ ID NO: 18	0,24	0,30	2,05	3,67	7,41	0,54	0,98
Конъюгат 6c	Промеж. соед.-7c	3,2	15 атомов	SEQ ID NO: 18	0,98	0,66	35,60	4423,00	1451,00	1,25	10,41
Конъюгат 33	ПС 7a	4,5	15 атомов	SEQ ID NO: 73	1,39	2,61	13,09	13,21	17,69	3,51	5,66

Таблица 67: Ингибирование нейраминидазы живым вирусом гриппа A

					A/PR/8/1934 (H1N1)	**A/Ca/7/2009 (H1N1)**	**A/HK/1/1968 (H3N2)**	**B/Brisbane 60/2008 (Victoria)**	**B/Florida/4/2006 (Yamagata)**
	TM	**DAR**	**Центральный линкер**	**Fc**	**IC_{50} [нМ]**	**IC_{50} [нМ]**	**IC_{50} [нМ]**	**IC_{50} [нМ]**	**IC_{50} [нМ]**
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	3,76	0,88	0,16	36,61	24,65
Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,35	0,28	0,43	6,74	3,60
ПС 7a	Н/П	Н/П	15 атомов	Н/П	0,45	2,10	3,62	13,54	25,54
Промеж.	Н/П	Н/	15	Н/П	0,98	3,78	5,57	16,03	17,26

соед.-7b		П	атомов						
Промеж. соед.-7c	Н/П	Н/П	15 атомов	Н/П	150,90	399,40	467,50	1942,00	5512,00
Конъюгат 6a	ПС 7a	2,7	15 атомов	SEQ ID NO: 18	0,22	0,56	0,41	2,24	4,65
Конъюгат 6b	Промеж. соед.-7b	2,8	15 атомов	SEQ ID NO: 18	0,14	0,25	0,30	1,39	2,30
Конъюгат 6c	Промеж. соед.-7c	3,2	15 атомов	SEQ ID NO: 18	0,29	0,35	0,60	99,08	44,37
Конъюгат 33	ПС 7a	4,5	15 атомов	SEQ ID NO: 73	1,12	2,05	1,71	7,75	16,47

Таблица. 68: Ингибирование нейраминидазы против H3N2 ДТ, мутанта E119V или живого гриппа A/Ca/07/2009

Молекула	**TM**	**DAR**	**Fc**	**Центральный линкер**	**H3N2 ДТ IC_{50} [нМ]**	**H3N2 E119V IC_{50} [нМ]**	**A/Ca/07/2009pdm IC_{50} [нМ]**
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	2,873	150,1	0,7411
Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	6,302	35,68	0,8452
ПС 3	Н/П	Н/П	Н/П	27 атом	31,25	108,3	1,172
ПС 4a	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	32,94	147,1	7,102
ПС 7a	Н/П	Н/П	Н/П	15 атом	33,62	185,9	3,825
Промеж. соед.-7c	Н/П	Н/П	Н/П	15 атом	4428	13972	470,5

ПС 22	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	13,25	23,23	1,295
ПС 73	Н/П	Н/П	Н/П	14 атом	33,63	174,3	4,605
ПС 74	Н/П	Н/П	Н/П	16 атом	32,89	157,9	1,551
ПС 75	Н/П	Н/П	Н/П	17 атом	34,51	164	1,759
ПС 76	Н/П	Н/П	Н/П	18 атом	32,95	166,4	2,07
ПС 80	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	80,97	628,9	21,89
ПС 91	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	95,7	529	46
Конъюгат 6	ПС 7	3,3	SEQ ID NO: 18	15 атом	206,5	3610	1,366
Конъюгат 33	ПС 7a	6,1	SEQ ID NO: 73	15 атом	3,051	2,913	0,2656
Конъюгат 33	ПС 7a	6,8	SEQ ID NO: 73	15 атом	6,197	86,06	0,1007
Конъюгат 43	ПС 80	7,0	SEQ ID NO: 73	Н/П	11,28	11,64	1,231
Конъюгат 44	ПС 22	5,6	SEQ ID NO: 73	Н/П	6,815	5,816	0,7677

Таблица 69: Анализ ингибирования нейраминидазы [нМ] с ответом на лизат NA

Исследуемый препарат	**ТМ**	**DAR**	**Центральный линкер**	**Лизат NA IAV H1N1**		
				0,1 Ед/мл	**1 Ед/мл**	**10 Ед/мл**
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	2,162	19,45	729,9
Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	0,6719	7,765	76,53
ПС 7	Н/П	Н/П	15 атомов	1958	12987	>10000
ПС 23	Н/П	Н/П	14 атомов	0,2684	2,625	27,78
Конъюгат 6	ПС 7	3,3	15 атомов	16,28	13214	>10000
Конъюгат 21	ПС 7	2,2	14 атомов	0,5004	2,65	9,101

Пример 155. Анализ цитопатического эффекта

Для измерения способности конъюгата 6 и конъюгата 33 защищать клетки млекопитающих от инфекции и разрушения вирусом гриппа проводили анализы микронейтрализации на основе цитопатического

эффекта (CPE), как описано в Примере 25, с небольшими вариациями. Вкратце, монослой клеток MDCK инфицировали штаммами гриппа A или B при соответствующей MOI, варьирующей от 0,001 до 1. Исследуемые образцы добавляли в концентрациях в диапазоне от 0,1 до 10 000 нМ и инкубировали в течение 3 дней для гриппа A или 5 дней для гриппа B при 37 °C, 5% CO_2. CPE определяли окрашиванием кристаллическим фиолетовым путем измерения поглощения при 595 нм. Результаты показаны в таблице 70, таблице 71, таблице 72 и таблице 73 ниже.

Таблица 70: CPE против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1)

Молекула	**TM**	**DAR**	**Fc**	**Центральный линкер**	**MOI 0,01**	**MOI 0,1**	**MOI 1**
					EC_{50} [нМ]		
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	3005	>10000	>10000
Балоксавир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,4466	5,126	7,993
Конъюгат 6	ПС 7	3,3	SEQ ID NO: 18	15 атом	0,3561	35,52	1802
Конъюгат 33	ПС 7a	4,5	SEQ ID NO: 73	15 атом	0,2669	2,458	77,97

Таблица 71: CPE против гриппа A/Ca/07/2009 (H1N1)pdm

Молекула	**TM**	**DAR**	**Fc**	**Центральный линкер**	**MOI 0,01**	**MOI 0,1**	**MOI 1**
					EC_{50} [нМ]		
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	288,2	>10000	>10000
Балоксавир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	1,439	3,186	11,3
Конъюгат 6	ПС 7	3,3	SEQ ID NO: 18	15 атом	18,13	513,4	>1000
Конъюгат 33	ПС 7a	4,5	SEQ ID NO: 73	15 атом	1,845	39,66	>1000

Таблица 72: CPE против гриппа A/WSN/1933 (t = -1 ч)

Молекула	**TM**	**DAR**	**Fc**	**Центральный линкер**	**MOI 0,001**	**MOI 0,01**	**MOI 0,1**	**MOI 1**	**MOI 10**
					EC_{50} [нМ]				
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	3911	>10000	>10000	>10000	>10000
Балоксавир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	1,261	3,64	8,306	8,266	17,1
ПС 7a	Н/П	Н/П	Н/П	15 атом	8,704	13,22	2758	>10000	>10000

Конъюгат 33	ПС 7a	4,5	SEQ ID NO: 73	15 атом	3,097	2,754	8,147	868,1	>10000

Таблица 73. CPE против гриппа B (t = -1 ч)

Молекула	**TM**	**DAR**	**Fc**	**Центральный линкер**	**B/Brisbane**	**B/Florida**	**B/Malaysia**
					EC_{50} [нМ]		
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	969,1	>10000	5694
Балоксавир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	240,4	30,57	2294
ПС 7a	Н/П	Н/П	Н/П	15 атом	<1,93	<1,93	0,8237
Конъюгат 33	ПС 7a	4,5	SEQ ID NO: 73	15 атом	3,699	0,1946	10,48

Пример 156. Синтез конъюгата 45

Конъюгат 45 получали аналогично конъюгату 33 (пример 129) с использованием ПЭГ4-азидо-Fc (либо SEQ ID NO: 72 (конъюгат 45a) или SEQ ID NO: 73 (конъюгат 45b), полученный, как в Примере 124), и ПС-83 (Пример 145). Анализ МАЛДИ-ВП очищенного препарата конъюгата 45b дал среднюю массу 62 927 Да (DAR = 4,2). В данном документе также описано получение конъюгата 45a, имеющего различные DAR (Пример 199). При использовании термина «конъюгат 45» его не следует рассматривать как ограничивающий какой-либо конкретный DAR. Полученный конъюгат изображен на Фиг. 102.

Термин «конъюгат 45», используемый в данном документе, охватывает как конъюгат 45a, так и конъюгат 45b. Заявитель отмечает, что SEQ ID NO: 72 (конъюгат 45a) и SEQ ID NO: 73 (конъюгат 45b) отличаются только аллотипом Fc, G1m(f) и G1m(fa), соответственно. Ожидается, что различные аллотипы будут вести себя одинаково в отношении описанных в данном документе свойств.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 45a, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, которая включает C-концевой остаток лизина. После экспрессии C-концевой лизин Fc конъюгата 45a протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 72. Аналогичным образом, конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 45b, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, тогда как полученный Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 73. Наличие или отсутствие C-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 157. Эффективность конъюгата 45b против гриппа A (H1N1) на мышиной модели летального тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID).

Исследуемые препараты оценивали против летальной инфекции гриппа A у самок мышей линии BALB/c (Jackson Laboratories, возрастом 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto

Rico/8/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 10 групп по 5 мышей в каждой. В день 0 всех мышей заражали провокационным вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл (приблизительно 1E3 вируса на мышь), после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно).

Группы получали однократную п/к обработку носителем (ФСБ), контролем Fc hIgG1 или конъюгатом 45b через два часа после заражения вирусом. Отдельная группа исследования состояла из 3 групп мышей, получавших балоксавир марбоксил (DC Chemicals, Шанхай, Китай) перорально два раза в день в течение 1 дня; также через 2 часа после заражения вирусом. Дизайн исследования представлен в Таблице 74. За мышами осуществляли наблюдение в течение 4 недель, и животных, у которых потеря массы тела превышала 20% или, которые были обнаружены в агональном состоянии, засчитывали как умершие.

Таблица 74: Дизайн исследования SCID

Группа	**Штамм гриппа**	**Исследуемый препарат**	**Путь/ Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Объем дозы (мг/кг)**	**N (balb/c)**
1	A/PR/8/34 2E2 БОЕ/мышь	ФСБ	SC, T+2 ч	---	10	5
2		hIgG1	SC, T+2 ч	3	10	5
3		Балоксавир	п/о, два раза в день в течение 1 дня	10	10	5
4		Балоксавир	п/о, два раза в день в течение 1 дня	3	10	5
5		Конъюгат 45b	п/к, T+2 ч	10	10	5
6			п/к, T+2 ч	3	10	5
7			п/к, T+2 ч	1	10	5
8			п/к, T+2 ч	0,3	10	5
9			п/к, T+2 ч	0,1	10	5
10	Неинфицированный контроль МТ					5

В конце исследования (день 28) мыши, получавшие конъюгат 45b, были полностью защищены при всех концентрациях доз от 10 до 0,3 мг/кг (таблица 75). Конъюгат 45b не смог защитить от летального заражения вирусом только при самой низкой исследуемой концентрации 0,1 мг/кг. Как и ожидалось, группы, получавшие носитель или Fc hIgG1, не были защищены. Мыши, получавшие балоксавир, также были защищены, но при значительно более высоких кумулятивных дозах 20 мг/кг (80% выживаемости) при общей дозе 6 мг/кг только 60% мышей дожили до 28 дня.

Таблица 75: Процент выживаемости

	Носитель	Fc hIgG1	Балоксавир (20)	Балоксавир (6)	Конъюгат 45b (мг/кг)					
День					10	3	1	0,3	0,1	Контроль
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	80	80	100	100	100	100	100	100	60	100
7	20	20	100	100	100	100	100	100	100	100
8	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
9	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
10	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
11	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
12	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
13	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100
14	0	0	100	80	100	100	100	100	100	100
15	0	0	100	80	100	100	100	100	100	100
16	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
17	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
18	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
19	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
20	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
21	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
22	0	0	100	60	100	100	100	100	100	100
23	0	0	100	60	100	100	100	100	80	100
24	0	0	80	60	100	100	100	100	40	100
25	0	0	80	60	100	100	100	100	20	100
26	0	0	80	60	100	100	100	100	20	100
27	0	0	80	60	100	100	100	100	0	100
28	0	0	80	60	100	100	100	100	0	100

Контроль = незараженный

Активность конъюгата 45b в этой модели тяжелого иммунодефицита также очевидна на основании данных по массе тела (таблица 76). Самая низкая концентрация конъюгата, обеспечивающая полную защиту на основании величины смертности, составляла 0,3 мг/кг. На этом уровне дозы наибольшая средняя потеря массы тела для группы была временной и привела к снижению менее чем на 3% (произошедшему на день 4). Кроме того, разница в массе тела для всех полностью защищенных групп была незначительной по сравнению с неинфицированными мышами.

Таблица 76: Процентное изменение массы тела

День	**Носитель**	**Fc hIgG1**	**Балоксавир (20)**	**Балоксавир (6)**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**					**Контроль**
					10	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,2	97,6	93,8	96,9	95,8	97,4	98	99	98	101,8
2	101,3	98,7	98,3	98,1	96,7	99,5	96,3	98,3	102,6	100,8
3	95,4	94,9	100,3	98,3	100,6	97,9	100,9	99,6	101	101
4	92,3	90,1	103,3	100,8	100,8	101,3	102,4	97,5	99,2	104,6
5	86,5	84,9	103,2	100,5	102,2	102	102,7	99,8	99,2	103,3
6	78,8	78	100,6	99,7	101,5	101,5	101,4	102	99,2	103,3
7			103,6	100	103,5	101,8	100,5	100,7	101,6	103,7
8			104,2	100,2	103,7	103,1	100,4	103,3	102,7	101,7
9			101,4	97,3	103,6	101,5	100,5	103,1	102,9	102,1
10			100,9	96	102,8	100,8	101,8	104,2	102,7	101,7
11			102,3	98,3	104,2	103,7	102,4	104,5	103,3	103,8
12			103	95,3	105,4	105,9	103	105,4	103,8	103,9
13			103,5	93,4	103,6	105,1	104,1	105,2	104	103,9
14			102,3	91,8	103,3	103,6	103,2	104,8	102,6	103,1
15			102,2		104,2	105,8	102,5	104,8	104,7	103,1
16			102,3		102	101,9	104	104,6	100,1	102,1
17			103,3		102	103,3	104,4	103,8	101,4	102,8
18			103,3		106,4	105,3	105,8	105,1	100,4	104,1
19			105,4		106,6	103,6	106,5	105,6	96,7	103,5
20			105,9		105,1	102,1	105,5	106,3	92,9	103,8

21			106,6		108,6	102,8	106,5	107,6	90,6	106
22			103,8		109,1	103,1	105,7	107,3	86,7	102,1
23			102,1		106,3	101,8	105,5	105,3		99,3
24			100		107,9	104	106	104,8		103,7
25					108,6	105,3	104,9	106,1		104,8
26					110	107,3	107,9	105,4		105,2
27					109	106,8	106	102,1		104
28					108,2	106,2	106,7	101,2		104,4

Контроль = незараженный

В совокупности эти данные демонстрируют активность конъюгата 45b в плане защиты мышей, которые были подвергнуты заражению летальным вирусом, с однократными п/к дозами конъюгата всего лишь 0,3 мг/кг. Это было достигнуто на модели тяжелой формы иммунодефицита у мышей, полностью лишенных иммунных Т- и В-клеток, которые необходимы для избавления от инфекций гриппа. Эти данные поддерживают применение конъюгата 45b для лечения пациентов с иммунодефицитом.

Пример 158. Эффективность конъюгата 45b при подкожном введении против гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) на мышиной летальной модели

Конъюгат 45b оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/8/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 7 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Смертность и массу тела регистрировали ежедневно в течение 14 часов, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

Исследуемые группы получали однократное подкожное (п/к) введение конъюгата 45b (1, 0,3, 0,1, 0,03 или 0,01 мг/кг), контроля Fc hIgG1 или носителя (ФСБ) через 2 часа после заражения вирусом. Дизайн исследования обобщен в таблице 77.

Таблица 77: Дизайн исследования гриппа A/PR/8/34 (H1N1)

Группа	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Объем дозы (мг/кг)**	**Количество мышей**
1	Носитель	п/к, Т+2 часа	нд	10	5

2	Fc hIgG1	п/к, T+2 часа	1	10	5
3	Конъюгат 45b	п/к, T+2 часа	1	10	5
4		п/к, T+2 часа	0,3	10	5
5		п/к, T+2 часа	0,1	10	5
6		п/к, T+2 часа	0,03	10	5
7		п/к, T+2 часа	0,01	10	5

Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель или контрольный Fc hIgG1, умерли от инфекции на 6 день (таблица 78). Однако мыши, получавшие конъюгат 45b, были полностью защищены при уровнях доз 1, 0,3 и 0,1 мг/кг. Смертность при применении конъюгата 45b наблюдалась только при самых низких концентрациях дозы, равной 0,03 и 0,01 мг/кг.

Таблица 78: Процент выживаемости

			Конъюгат 45b (мг/кг)				
День	**Носитель**	**Fc hIgG1**	**1**	**0,3**	**0,1**	**0,03**	**0,01**
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	60	40	100	100	100	100	100
6	0	0	100	100	100	100	60
7	0	0	100	100	100	80	0
8	0	0	100	100	100	0	0
9	0	0	100	100	100	0	0
10	0	0	100	100	100	0	0
11	0	0	100	100	100	0	0
12	0	0	100	100	100	0	0
13	0	0	100	100	100	0	0
14	0	0	100	100	100	0	0

Активность конъюгата 45b дополнительно подтверждали ежедневными измерениями массы тела. Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель или Fc hIgG1, демонстрировали устойчивое снижение массы тела до тех пор, пока оно не превысила 20%, после чего они были засчитаны как умершие (таблица 78).

В отличие от контрольных мышей, те группы, которые получали конъюгат 45b в дозах 1, 0,3 и 0,1 мг/кг, сохраняли здоровую массу тела на протяжении всего исследования и никогда не демонстрировали более чем временное снижение массы тела менее чем на 7% (группа с дозой 0,1 мкг/кг, день 7; таблица 79). По результатам измерений выживаемости и массы тела конъюгат 45b продемонстрировал надежную защиту от заражения летальным гриппом A/Puerto Rico/8/1934 с однократной п/к дозой, составляющей всего 0,1 мг/кг.

Таблица 79: Процентное изменение массы тела

			Конъюгат 45b (мг/кг)				
День	**Носитель**	**Fc hIgG1**	**1**	**0,3**	**0,1**	**0,03**	**0,01**
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	97,0	98,0	97,7	96,7	98,2	98,8	96,2
2	98,6	99,9	100,8	101,9	101,0	100,5	100,4
3	90,7	92,4	98,8	98,9	96,7	93,3	92,0
4	82,1	83,4	97,7	97,5	95,1	87,5	84,7
5	76,2	76,9	98,4	96,3	94,7	87,6	79,3
6			102,1	102,4	99,7	84,1	76,8
7			101,8	103,1	93,8	78,8	
8			100,1	102,3	98,3		
9			103,4	103,7	104,3		
10			103,9	104,6	102,2		
11			101,8	102,5	101,7		
12			100,9	101,0	102,3		
13			106,0	104,8	105,6		
14			106,6	104,0	105,0		

Пример 159. Эффективность подкожно введенного конъюгата 45b против гриппа A/California/07/2009 (H1N1) pdm на мышиной летальной модели.

Конъюгат 45b оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/California/07/2009 (H1N1) pdm) представляет собой пандемический изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 5 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Смертность и массу тела регистрировали ежедневно, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

Исследуемые группы получали однократное подкожное (п/к) введение конъюгата 45b или носителя (ФСБ) через 2 часа после заражения вирусом. Дизайн исследования и уровни доз обобщены в таблице 80.

Таблица 80: Дизайн исследования по изучению гриппа A/California/07/2009 (H1N1) pdm

Группа	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Объем дозы (мг/кг)**	**Количество мышей**
1	Носитель	п/к, T+2 часа	нд	10	5
2	Конъюгат 45b	п/к, T+2 часа	3	10	5
3	Конъюгат 45b	п/к, T+2 часа	1	10	5
4	Конъюгат 45b	п/к, T+2 часа	0,3	10	5
5	Конъюгат 45b	п/к, T+2 часа	0,1	10	5

Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель, погибали от инфекции на 7-й день (таблица 81). Однако мыши, получавшие конъюгат 45b, были полностью защищены при таких низких концентрациях, как 0,3 мг/кг, и частично при 0,1 мг/кг (60% выживаемости). Достижение полной защиты от высоковирулентного пандемического штамма при однократной дозе менее 1 мг/кг демонстрирует эффективность конъюгата 45b против клинически значимого гриппа А.

Таблица 81: Процент выживаемости

День	**Носитель**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**			
		3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	80	100	100	100	80
6	40	100	100	100	80
7	0	100	100	100	60
8	0	100	100	100	60
9	0	100	100	100	60
10	0	100	100	100	60
11	0	100	100	100	60
12	0	100	100	100	60
13	0	100	100	100	60
14	0	100	100	100	60

Активность конъюгата 45b дополнительно подтверждали ежедневными измерениями массы тела. Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель, демонстрировали устойчивое снижение массы тела до тех пор, пока оно не превысила 20%, после чего они были засчитаны как умершие (таблица 82).

В отличие от контрольных мышей, у мышей, получавших конъюгат 45b в дозе 3, 1 или 0,3 мг/кг, наблюдалось только временное снижение массы тела приблизительно на 10% с пиком на 3-5 день (таблица 82). К концу исследования (14-й день) эти мыши в значительной степени восстановили (или превысили) свой начальный вес. По результатам измерений выживаемости и массы тела конъюгат 45b продемонстрировал надежную защиту от летального заражения гриппом A/California/07/2009 (H1N1) pdm с однократной п/к дозой, составляющей 0,3 мг/кг. Активность против клинически значимого пандемического штамма, используемого в этом исследовании, подтверждает применимость конъюгата 45b при лечении тяжелой формы гриппа.

Таблица 82: Процентное изменение массы тела

День	**Носитель**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**			
		3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100

День	Носитель	Конъюгат 45b (мг/кг)			
1	96,9	95,9	97,1	96,3	96,1
2	99,8	98,2	99,2	100,3	101,5
3	90	94,2	91,1	91,7	90,1
4	81	91,2	89,7	88,1	83,2
5	77,8	94,2	93,2	90,4	82,1
6		97,8	97,4	92,1	
7		97,6	96,3	90,3	
8		98,6	96,4	91,4	
9		101,3	98,9	94	
10		99,3	98,9	92,8	
11		100,4	101,7	95,3	
12		99,5	100,8	96,7	
13		100,1	100,9	97,3	
14		103,3	103,3	99,9	

Пример 160. Эффективность конъюгата 45b, вводимого подкожно, против гриппа A/Hong Kong/1/1968 (H3N2) на летальной мышиной модели.

Конъюгат 45b оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H3N2 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Hong Kong/1/1968) представляет собой адаптированный к мышам изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 3 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Смертность и массу тела регистрировали ежедневно, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

Исследуемые группы получали однократное подкожное (п/к) введение конъюгата 45b или носителя (ФСБ) через 2 часа после заражения вирусом. Дизайн исследования обобщен в таблице 83.

Таблица 83: Дизайн исследования гриппа A/Hong Kong/1/1968 (H3N2)

Группа	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Объем дозы (мг/кг)**	**Количество мышей**
1	Носитель	п/к, T+2 часа	нд	10	5
2	Конъюгат 45b	п/к, T+2 часа	1	10	5
3	Конъюгат 45b	п/к, T+2 часа	0,3	10	5

Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель, погибали от инфекции на 7-й день (таблица 84). Однако мыши, получавшие конъюгат 45b, были полностью защищены при дозах 1 и 0,3 мг/кг. В этом исследовании дозу конъюгата 45b не превышали 0,3 мг/кг.

Таблица 84: Процент выживаемости

День	**Носитель**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**	
		1	0,3
0	100	100	100
1	100	100	100
2	100	100	100
3	100	100	100
4	100	100	100
5	40	100	100
6	20	100	100
7	0	100	100
8	0	100	100
9	0	100	100
10	0	100	100
11	0	100	100
12	0	100	100
13	0	100	100
14	0	100	100

Активность конъюгата 45b дополнительно подтверждали ежедневными измерениями массы тела. Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель, демонстрировали устойчивое снижение массы тела до тех пор, пока оно не превысила 20%, после чего они были засчитаны как умершие (таблица 85).

В отличие от контрольных мышей, группы, получавшие конъюгат 45b в дозе 1 и 0,3 мг/кг, сохраняли практически здоровую массу тела на протяжении всего исследования и никогда не демонстрировали более чем преходящее снижение массы тела менее чем на 11% до восстановления почти исходной массы тела к концу исследования (таблица 85). По измерениям выживаемости и массы тела конъюгат 45b продемонстрировал надежную защиту от летального заражения гриппом A (H3N2) при однократной подкожной дозе, составляющей всего 0,3 мг/кг.

Таблица 85: Процентное изменение массы тела

День	Носитель	Конъюгат 45b (мг/кг)	
		1	0,3
0	100	100	100
1	99,2	96	98,1
2	94,1	94,2	94,4
3	89,5	91	89,1
4	88,6	94,1	90,5
5	84,1	93,1	89,1
6		96,3	90,6
7		95	90,2
8		97,3	92,8
9		96,7	93,2
10		97,8	94,6
11		99,9	97,5
12		98,3	97,4
13		98,9	99,5
14		98,6	100,2

Пример 161. Эффективность конъюгата 45b против гриппа B (штамм Victoria) на летальной мышиной модели

Конъюгат 45b оценивали в отношении летальной инфекции, вызванной гриппом B, у самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (B/Malaysia/8/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 6 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл (приблизительно 1E4 на мышь), после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно).

Все группы получали однократное п/к введение исследуемым препаратом или носителем (ФСБ), или контролем только Fc (Fc hIgG1) через 2 часа после заражения. В исследовании оценивали концентрации конъюгата 45b на уровне 1, 0,3, 0,1 и 0,03 мг/кг. За мышами осуществляли наблюдение в течение 2 недель, и животных, у которых потеря массы тела превышала 20% или, которые были обнаружены в агональном состоянии, засчитывали как умершие.

Все мыши, получавшие носитель или контроль только Fc, умерли к дню 7. Напротив, мыши, получавшие 1, 0,3 или 0,1 мг/кг конъюгата 45b, были полностью защищены после однократного п/к введения (таблица 86). Активность конъюгата 45b в отношении гриппа B дополнительно подтверждается ежедневными измерениями тела (таблица 87), которые демонстрируют кратковременное снижение менее чем на 5% при дозе 0,3 мг/кг.

Таблица 86: Процент выживаемости

День	Носитель	Fc hIgG1 (1)	Конъюгат 45b (мг/кг)			
			1	0,3	0,1	0,03

День	Носитель	Fc hIgG1 (1)	Конъюгат 45b (мг/кг)			
0	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100
6	100	80	100	100	100	100
7	0	0	100	100	100	20
8	0	0	100	100	100	0
9	0	0	100	100	100	0
10	0	0	100	100	100	0
11	0	0	100	100	100	0
12	0	0	100	100	100	0
13	0	0	100	100	100	0
14	0	0	100	100	100	0

Таблица 87: Процентное изменение массы тела

День	Носитель	Fc hIgG1 (1)	Конъюгат 45b (мг/кг)			
			1	0,3	0,1	0,03
0	100	100	100	100	100	100
1	98,1	97	98,1	98,2	97,8	98,7
2	98,7	99,7	101,7	100,6	101,5	102,7
3	97,8	97,7	102,1	98,4	101,6	101,3
4	88	87,7	99,8	96,9	96,8	92
5	78,3	80,6	99,6	95,4	94,5	83,8
6	77,9	77,6	102,5	100,1	90,7	80
7			103,5	100,7	86,1	75,3
8			103	100,3	86,3	
9			103,2	101,1	91,5	
10			102,8	101	94	
11			101,2	99,7	94,1	
12			101,9	99,9	96,1	
13			102,9	101,6	97,6	
14			102,5	99,9	98,6	

Пример 162. Эффективность конъюгата 45b против гриппа B (штамм Yamagata) на летальной мышиной модели

Конъюгат 45b оценивали в отношении летальной инфекции, вызванной гриппом B, у самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (B/Florida/4/2006) представляет собой адаптированный к мышам изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В

эксперименте было задействовано 7 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл (приблизительно 3E4 на мышь), после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно).

Все группы получали однократное п/к введение исследуемым препаратом или носителем (ФСБ), или контролем только Fc (Fc hIgG1) через 2 часа после заражения. В исследовании оценивали концентрации конъюгата 45b от 3 до 0,03 мг/кг. За мышами осуществляли наблюдение в течение 2 недель, и животных, у которых потеря массы тела превышала 20% или, которые были обнаружены в агональном состоянии, засчитывали как умершие.

Все мыши, получавшие носитель, достигли смертности к 8 дню, в то время как контрольная группа Fc hIgG1 имела 80% смертности. Напротив, мыши, получавшие конъюгат 45b, были полностью защищены после однократного подкожного введения дозы во всех тестируемых концентрациях (таблица 88).

Таблица 88: Процент выживаемости

День	**Носитель**	**Fc hIgG1 (1)**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**				
			3	1	0,3	0,1	0,03
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100	100
7	40	60	100	100	100	100	100
8	0	40	100	100	100	100	100
9	0	20	100	100	100	100	100
10	0	20	100	100	100	100	100
11	0	20	100	100	100	100	100
12	0	20	100	100	100	100	100
13	0	20	100	100	100	100	100
14	0	20	100	100	100	100	100

Активность конъюгата 45b в отношении гриппа B (Yamagata) дополнительно подтверждается ежедневными измерениями тела (таблица 89), которые демонстрируют временное снижение менее чем на 4% при 0,03 мг/кг, самой низкой протестированной концентрации.

Таблица 89: Процентное изменение массы тела

День	**Носитель**	**Fc hIgG1 (1)**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**				
			3	1	0,3	0,1	0,03
0	100	100	100	100	100	100	100
1	98,7	100,5	97,8	99,2	99,1	98,7	96,8
2	99,6	99,8	99,1	98,4	98,9	99,4	98,6

3	98,7	99,3	100,8	101,2	101,2	103,8	100,9
4	89,8	91	100,4	99,3	98,3	98,5	97,3
5	84,6	87,6	99,2	97,5	98	98,2	96,2
6	80,2	86,6	103,4	100,7	100,9	101,8	100,4
7	75,5	79,9	101,3	102,3	100,8	101,4	96,9
8			102,7	103	103	102,7	99,2
9			100,2	101,9	101,7	100	99
10			102,6	102,8	101,7	101,3	100,7
11			103	105,1	104,1	102,3	101,9
12			101	103,2	101,8	100,2	100,1
13			103,3	104,9	103,9	103,7	104,2
14			101,8	104,6	103,1	101,6	102,1

Пример 163. Эффективность конъюгата 45b против гриппа H1N1, H3N2 и B (Victoria) в 28-дневной модели профилактики на мышах

Конъюгат 45b оценивали в отношении летального заражения подтипами сезонного гриппа (H1N1, H3N2 и B (линия Victoria)) у самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Эксперимент включал 13 групп по 5 мышей, за исключением группы 6 (носитель, заражение A/HK/1/68), которая состояла из 4 животных. На 0 день мышам подкожно (п/к) вводили конъюгат 45b в дозе 3, 1 или 0,3 мг/кг в разовой дозе. Контрольным мышам также вводили таким же образом носитель (ФСБ) или только Fc hIgG1. Через двадцать восемь дней после введения исследуемого препарата мышам интраназально вводили 3-кратную LD_{95} одного из следующих подтипов сезонного гриппа:

A/California/07/2009	(H1N1)
A/Hong Kong/1/1968	(H3N2)
B/Malaysia/8/1934	(B; штамм Victoria)

Для заражения вирусом мышей анестезировали смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно) и вводили вирус в объеме 30 мкл. Смертность и массу тела регистрировали ежедневно, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

В группе исследования H1N1 все мыши, получавшие носитель, умирали от инфекции только к 7-му дню. Контроль, содержащий только Fc, также не был защитным, с выживаемостью только 20% в конце исследования (42 день, 14 дней после заражения вирусом). Однако конъюгат 45b полностью защищал в течение месяца от этого пандемического изолята после однократного подкожного введения в дозе 1 мг/кг (P=0,0020; таблица 90). Даже при самой низкой тестируемой концентрации (0,3 мг/кг) к концу исследования доживало 80% мышей. Ежедневные измерения процентного изменения массы тела (МТ) дополнительно подтверждают эффективность конъюгата 45b в этой модели (таблица 91), при дозе 1 мг/кг у мышей наблюдалась временная потеря 12,1%, что типично для этого высокопатогенного штамма, которая в основном восстановилась к концу исследования (96,5% от исходного значения).

Таблица 90: Процент выживаемости при H1N1

День	**Носитель**	**Fc hIgG1 (3)**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**		
			3	1	0,3
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	100	40	100	100	100
6	20	40	100	100	80
7	0	20	100	100	80
8	0	20	100	100	80
9	0	20	100	100	80
10	0	20	100	100	80
11	0	20	100	100	80
12	0	20	100	100	80
13	0	20	100	100	80
14	0	20	100	100	80

Таблица 91: Процентное изменение массы тела при H1N1*

День	**Носитель**	**Fc hIgG1 (3)**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**		
			3	1	0,3
0	100	100	100	100	100
1	100,2	93,6	99,6	93	97
2	97,1	93	99,5	93	97,7
3	89,1	87	92,7	88,1	90,9
4	82,3	80,6	89,8	89,1	89,4
5	77,7	77,4	89	88	87,2
6			88,9	87,9	87
7			90,9	90,7	
8			92,1	90,5	
9			92,9	90,4	
10			96	92,2	
11			95,1	94,5	
12			94,7	94,3	
13			96,2	96,2	
14			97	96,5	

* Обратите внимание, что МТ даются только до тех пор, пока не произойдет первая смерть в группе

В группе исследования H3N2 (A/Hong Kong/1/1968) все мыши, получавшие носитель, умирали от

инфекции только к 8-му дню. В отличие от введения только носителя, все концентрации конъюгата 45b были полностью защитными, даже при уровне дозы 0,3 мг/кг (P=0,0007; таблица 92). Как видно из группы исследования H1N1, ежедневные измерения массы тела дополнительно подтверждают эффективность конъюгата 45b против подтипа H3N2 (таблица 93), при дозе 0,3 мг/кг у мышей наблюдалась временная потеря менее 11%, при этом масса тела в значительной степени восстанавливалась к концу исследования (98,4% от исходного значения).

Таблица 92: Процент выживаемости при H3N2

День	**Носитель**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**		
		3	1	0,3
0	100	100	100	100
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
4	100	100	100	100
5	100	100	100	100
6	100	100	100	100
7	75	100	100	100
8	0	100	100	100
9	0	100	100	100
10	0	100	100	100
11	0	100	100	100
12	0	100	100	100
13	0	100	100	100
14	0	100	100	100

Таблица 93: Процентное изменение массы тела при H3N2

День	**Носитель**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**		
		3	1	0,3
0	100	100	100	100
1	98,4	99,2	99,1	100
2	93,7	98,5	97,7	99,1
3	88,2	96,7	94,6	95,3
4	88,5	97,3	93,4	95,6
5	86,2	95,8	94	92,6
6	81,4	96,8	94,6	89,3
7	77	99,8	97,1	89,6
8		100,3	97,8	91,5
9		98,2	96,9	91,7
10		101,3	101,2	96,8
11		100,5	100,8	97,9

12		98,6	99,7	96,5
13		99,3	98,3	97
14		99,7	100,1	98,4

В последней группе исследования определяли эффективность конъюгата 45b против вируса гриппа B линии Victoria. Как и в других группах этого исследования, мыши, получавшие только носитель, умерли от инфекции к 7 дню. Подобно результатам против подтипа H1N1, однократная подкожная доза 1 мг/кг полностью защищала от летального заражения гриппом B (таблица 94; P=0,0031) через месяц после введения конъюгата 45b. При самой низкой тестируемой концентрации (0,1 мг/кг) выжило 60% мышей. Как и в других группах исследования, данные МТ подтверждают активность конъюгата 45b. По сравнению с животными штамма B/Malaysia, которым вводили дозу 1 мг/кг, временная потеря МТ составила менее 6%, которая восстановилась к концу исследования (таблица 95; 100,2%).

Таблица 94: Процент выживаемости при гриппе B

День	**Носитель**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**		
		3	1	0,3
0	100	100	100	100
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	100	100	100	100
4	100	100	100	100
5	100	100	100	100
6	60	100	100	100
7	0	100	100	100
8	0	100	100	40
9	0	100	100	40
10	0	100	100	40
11	0	100	100	40
12	0	100	100	40
13	0	100	100	40
14	0	100	100	40

Таблица 95: Процентное изменение массы тела при гриппе B

День	Носитель	Конъюгат 45b (мг/кг)		
		3	1	0,3
0	100	100	100	100
1	97,3	98,7	97,2	98,6
2	97,1	98,8	98,9	99,2
3	96,4	99,2	98,6	98,6
4	88,5	99,6	98,3	96,8
5	80,8	96,2	95,8	90
6	77	96,5	94,5	86,2
7		97,8	95,5	82,8
8		100,5	97	81,6
9		100,1	97,3	
10		102,3	99,7	
11		102,3	100,3	
12		100,7	98,7	
13		98,7	98,3	
14		101,6	100,2	

Пример 164. Анализ снижения количества бляшек in vitro

Анализы снижения количества бляшек проводили в клетках Мадин-Дарби почек собак (MDCK), высеянных в 24-луночные планшеты. 500000 клеток MDCK высевали в 0,5 мл среды (DMEM), содержащей 10% FBS, и инкубировали в течение приблизительно 24 часов. Разведения тестируемых изделий и тестируемых вирусов, H1N1 WT (A/California/12/2012) и H275Y (A/Texas/23/2012), H3N2 ДТ (A/Washington/12/2007) и E119V (A/Texas/12/2007), и B (B/Malaysia/2506/2004), выполняли в буфере, содержащем ФСБ, 35%-ном бычьем альбумине и Ca^{2+}/Mg^{2+}. Конъюгат 45b и препараты для сравнения балоксавир, занамивир осельтамивир предварительно инкубировали с вирусом в течение 30 минут при комнатной температуре перед добавлением их в монослои клеток MDCK после удаления среды и одной промывки ФСБ. MOI для каждой комбинации лекарственное средство-вирус выбирали так, чтобы нацеливаться на 30 бляшек в контрольной лунке с ФСБ. Адсорбцию проводили в течение 1 ч, смесь вирус-исследуемый препарат удаляли и инфицированные клетки инкубировали в течение 48 ч в присутствии тест-образца, разведенного в смеси 1,25 % Avicel, DMEM, 0,01% DEAE-декстрана и 2 мкг/мл трипсина TPCK. Через 48 часов смесь Avicel удаляли, клетки фиксировали параформальдегидом и окрашивали 1% кристаллическим фиолетовым для подсчета бляшек. Все лекарственные средства тестировали в шести концентрациях от 0,3 до 100 нМ. Значения EC_{50} (нМ) рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Результаты обобщены в таблице 96.

Таблица 96: Сводные данные для значений EC_{50} анализа уменьшения количества бляшек для конъюгата 45b в отношении мутантных штаммов гриппа ДТ и NA

Молекула	EC_{50} (нМ)

	A/CA/12/2012 (H1N1)	A/TX/23/2012 (H1N1) H275Y	A/WA/12/2007 (H3N2)	A/TX/12/2007 (H3N2) E119V	B/Malaysia/2506/2004
конъюгат 45b	1	1,2	≤0,3	1,2	4,1
балоксавир	4	1,6	4,8	3,2	8,4
занамивир	35	93,8	>100	74	17,3
осельтамивир	>100	>100	29,6	>100	22,1

Конъюгат 45b продемонстрировал свою сильную активность в анализах уменьшения образования бляшек в отношении всех протестированных штаммов H1N1, H3N2 и B, обеспечив более низкие значения EC_{50}, чем для всех трех агентов сравнения (таблица 96). Кроме того, на активность конъюгата 45b минимально влияло наличие мутаций NA E119V и H275Y, придающих устойчивость к осельтамивиру

Пример 165. Эксперименты с серийным пассажем для отбора устойчивых вирусов гриппа

Чтобы оценить потенциал развития лекарственно-устойчивых мутантных штаммов вируса под давлением отбора с вирусными ингибиторами, были проведены исследования серийных пассажей с конъюгатом 45b по сравнению с препаратами сравнения осельтамивиром и балоксавиром. Исследования серийных пассажей проводили с использованием клеток MDCK. Пассажи проводили следующим образом: 500000 клеток MDCK высеивали на лунку (24-луночный) в 500 мкл DMEM, 10% FBS, 1% PS, 1% NaPyr и 1% HEPES, и инкубировали в течение приблизительно 24 часов. Как только клетки достигли приблизительно 80% конфлюэнтности, их один раз промывали ФСБ и инкубировали в течение 2 часов в присутствии соединений или только ФСБ в нормальных условиях культивирования. Концентрации селективного агента были оптимизированы в соответствии с требованиями для максимального ингибирования вируса при сохранении достаточной продукции вируса для последующих пассажей. Концентрации конъюгата 45b, балоксавира и осельтамивира, используемые в экспериментах с серийными пассажами, составляли 4 нМ, 4 нМ и 200 нМ, соответственно. Клетки инфицировали при MOI 0,01 с помощью A/California/07/2009 H1N1 pdm в течение 1 часа при комнатной температуре в буфере, содержащем ФСБ, 35% бычий альбумин и Ca^{2+}/Mg^{2+}, с последующим удалением инокулята и однократной промывкой клеток DMEM 1% PS, 1% NaPyr и 1% HEPES (без FBS). Затем клетки инкубировали в течение 24 часов в присутствии селективных агентов, разведенных в DMEM 1% PS, 1% NaPyr, 1% HEPES и 2 мкг/мл трипсина, обработанного TPCK. После инкубации собирали вирусные супернатанты, а клетки и дебрис удаляли центрифугированием (5 мин, 4 °C, 1400 × g). Затем супернатанты использовали для:

i количественного определения вирусного титра с помощью анализа бляшкообразования; ii проведения анализа гемагглютинации, чтобы определить, ускользнул ли вирус от ингибирования соединения

iii повторного инфицирования только что высеянных клеток MDCK в присутствии

Процесс повторяли в течение 10 пассажей. При обнаружении повышенных титров в присутствии лекарственных средств, вирусы могут быть очищены от бляшек. После очистки от бляшек все 8 сегментов генома можно секвенировать и сравнивать с контрольным вирусом, обработанным ФСБ, для обнаружения ускользающих мутаций. Краткое описание для серийного пассирования показано на Фиг. 83. В случае конъюгата 45b в течение 10 пассажей не наблюдалось увеличения вирусного титра (что свидетельствует об отсутствии появления резистентных мутантов), тогда как титры балоксавира и осельтамивира увеличивались

до уровней, аналогичных тем, которые наблюдались в контроле ФСБ после пассажей 6 и 8, соответственно.

Пример 166. Анализ цитопатического эффекта

Для измерения способности конъюгата 45b защищать клетки млекопитающих от инфекции и разрушения вирусом гриппа проводили анализы микронейтрализации на основе цитопатического эффекта (CPE), как описано в Примере 25, с небольшими вариациями. Вкратце, монослой клеток MDCK инфицировали штаммами гриппа A или B при соответствующей MOI, варьирующей от 0,001 до 1. Исследуемые образцы добавляли в концентрациях в диапазоне от 0,1 до 10 000 нМ и инкубировали в течение 3 дней для гриппа A или 5 дней для гриппа B при 37 °C, 5% CO_2. CPE определяли окрашиванием кристаллическим фиолетовым путем измерения поглощения при 595 нм. Результаты показаны в таблице 97 и таблице 98 ниже.

Таблица 97: CPE конъюгата 45b против гриппа A H1N1 при MOI 0,01 или MOI 0,001 (CPE [нМ])

Молекула	**TM**	**DAR**	**Fc**	**Центральный линкер**	**A/WSN/1933**	**A/CA/07/2009pdm**	**Мутант A/CA/12/2012 H275**	**Мутант A/Texas/23/2012 H275Y**
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	>10000	34,2	107,6	>10000
Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	33,16	54,59	327,7
Конъюгат 45b	ПС 83	4,2	SEQ ID NO: 73	15 атом	3,676	2,964	0,7043	2,101
Балоксавир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	11,35	2,216	3,718	3,318

Таблица 98: CPE конъюгата 45b против гриппа A H3N2 при MOI 0,01 или MOI 0,001 (CPE [нМ])

Молекула	**TM**	**DAR**	**Fc**	**Центральный линкер**	**A/HK/1/1968**	**A/Wisconsin/04/2018**	**Мутант A/Bethesda/956/2006 R293K**	**A/Washington/12/2007**	**Мутант A/Texas/12/2007 E119V**
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,7444	151,1	>10000	1,908	351,4
Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	<0,3	308	9591	1,968	2,096
Конъюгат 45b	ПС 83	4,2	SEQ ID NO: 73	15 атом	<0,3	8,99	54,01	0,04449	0,6594
Балоксавир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	2,596	4,916	17,15	0,5252	5,602

Пример 167. Ингибирование нейраминидазы живым вирусом гриппа А или лизатами устойчивых к нейраминидазе мутантов

Ингибирование нейраминидазы (NAI). Исследуемые образцы инкубировали с нейраминидазой (Sino Biological) или с живыми вирусами в течение 20 мин при 37 °C, 5% CO_2. Субстрат 2'-(4-метилумбеллиферил)-α-D-N ацетилнейраминовой кислоты добавляли в соответствующие лунки и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, 5% CO_2. NAI определяли путем считывания флуоресценции при возбуждении 355 нм/испускании 460 нм. Ингибирование нейраминидазы определяли для устойчивых к нейраминидазе мутантов и для живого вируса гриппа (таблица 99, таблица 100, таблица 101, таблица 102 и таблица 103).

Таблица 99: NAI против живых вирусов гриппа А (H1N1)

Молекула	**TM**	**DAR**	**Fc**	**Центральный линкер**	**A/Ca/07/2009 (H1N1)pdm IC_{50} [нМ]**	**A/PR/8/1934 (H1N1) IC_{50} [нМ]**	**A/California/12/2012 (H1N1)pdm09 IC_{50} [нМ]**	**A/Texas/23/2012 (H1N1)pdm09 H275Y, IC_{50} [нМ]**
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,9103	2,427	1,28	367,9
Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,5634	0,6041	0,8891	0,8505
ПС 83	Н/П	Н/П	Н/П	15 атом	28,59	4,231	45,08	26,47
Конъюгат 45b	ПС 83	4,8	SEQ ID NO: 73	15 атом	0,8124	0,07184	2,527	1,471

* Все живые вирусы протестированы при 1е6 БОЕ.

Таблица 100: NAI против живых вирусов гриппа А (H3N2)

Молекула	**TM**	**DAR**	**Fc**	**Центральный линкер**	**A/Wash/1/2007 (H3N2) IC_{50} [нМ]**	**E119V A/Texas/12/2007 (H3N2) IC_{50} [нМ]**	**A/Texas/71/2017 (H3N2) IC_{50} [нМ]**	**A/Bethesda/956/2006 (H3N2) R292K* IC_{50} [нМ]**
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,2086	114,2	0,9502	4667
Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	4,845	3,085	2,321	31,59
ПС 83	Н/П	Н/П	Н/П	15 атом	99,05	50,22	301,1	1147
Конъюгат 45b	ПС 83	4,8	SEQ ID NO: 73	15 атом	0,0233	2,79	11,3	23,55

* Все живые вирусы тестировались при 1e6 БОЕ (кроме R292K, который тестировался при 1e5 БОЕ)

Таблица 101: NAI против живых вирусов гриппа A (H1N1)pdm09

Молекула	**TM**	**DAR**	**Fc**	**Центральный линкер**	**A/Illinois/08/2018 (H1N1)pdm09 I38 ДТ IC_{50} [нМ]**	**A/Illinois/37/2018 (H1N1)pdm09 I38L IC_{50} [нМ]**	**A/Illinois/08/2018 (H1N1)pdm09 I38T IC_{50} [нМ]**
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,43	0,71	0,58
Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,37	0,47	0,50
ПС 83	Н/П	Н/П	Н/П	15 атом	5,90	6,16	4,81
Конъюгат 45b	ПС 83	4,8	SEQ ID NO: 73	15 атом	0,04	0,10	0,01

* Все живые вирусы протестированы при 1e7 БОЕ.

Таблица 102: NAI против живых вирусов гриппа A (H3N2)

Молекула	ТМ	DAR	Fc	Центральный линкер	A/Louisiana/50/2017 (H3N2) I38 ДТ IC_{50} [нМ]	A/Louisiana/49/2017 (H3N2) I38M IC_{50} [нМ]
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,26	0,19
Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,48	0,37
ПС 83	Н/П	Н/П	Н/П	15 атом	47,72	26,09
Конъюгат 45b	ПС 83	4,8	SEQ ID NO: 73	15 атом	4,58	5,13

* Все живые вирусы протестированы при 1e7 БОЕ.

Таблица 103: NAI против вирусов гриппа B

Молекула	ТМ	DAR	Fc	Центральный линкер	B/Florida/4/2006 (Yamagata), IC_{50} [нМ]	B/Malaysia/2506/2004 (Victoria), IC_{50} [нМ]	B/Colorado/6/2017 (Victoria), IC_{50} [нМ]
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	14,37	32,02	35,03
Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	4,755	4,147	5,112
ПС 83	Н/П	Н/П	Н/П	15 атом	275,3	273,1	124,8
Конъюгат 45b	ПС 83	4,8	SEQ ID NO: 73	15 атом	2,888	1,514	19,83

* Все живые вирусы протестированы при 1e6 БОЕ.

Пример 168. Анализ антителозависимого клеточного фагоцитоза

Конъюгат 45b тестировали на антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Монослой клеток MDCK инфицировали штаммами гриппа A или гриппа B при MOI 0,001–10 и инкубировали в течение 18–24 ч при 37 °C в 5% CO_2. ADCP определяли с использованием коммерческой клеточной линии (PROMEGA) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, испытуемые образцы добавляли в концентрации от 1 до 10000 нМ в соответствующие лунки и инкубировали в течение 15 минут при 37 °C в 5% CO_2. ADCP количественно определяли по люминесценции. Конъюгат 45b и только Fc (SEQ ID NO: 73, приготовлен аналогично Примеру 124) тестировали против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1), гриппа A/CA/07/2009 (H1N1) и гриппа A/HK/1/1968 (H3N2) (таблицы 104-106, соответственно) и грипп B/Malaysia/2506/2004 (Victoria,

таблица 107), демонстрирующие зависимое от MOI увеличение ADCP с помощью конъюгата 45b. Конъюгат 45b также продемонстрировал дозозависимое увеличение ADCP против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1), гриппа A/CA/07/2009 (H1N1) и гриппа A/HK/1/1968 (H3N2) при MOI 10 (таблицы 108-110, соответственно) и грипп B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, таблица 111).

Таблица 104: Зависимое от MOI увеличение ADCP (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A

Грипп A/PR/8/1934 (H1N1) MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45b [1 мкМ]**
0	1	1
0,1	1,13	1,8
0,3	1,21	9,95
1	0,96	13,77
3	1,1	14,94
10	1,05	13,76

Таблица 105: Зависимое от MOI увеличение ADCP (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A

Грипп A/CA/7/2009 (H1N1)pdm MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45b [1 мкМ]**
0	0,98	1,02
0,1	1,14	6,33
0,3	1,03	22,16
1	0,99	18,27
3	0,93	19,61
10	1,05	21,11

Таблица 106: Зависимое от MOI увеличение ADCP (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A

Грипп A/HK/1/1968 (H3N2) MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45b [1 мкМ]**
0	1,02	0,98
0,1	1,07	1,48
0,3	1,05	2,63
1	1,18	2,74

Грипп A/HK/1/1968 (H3N2) MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45b [1 мкМ]**
3	1,01	4,3
10	1,06	4,39

Таблица 107: Зависимое от MOI увеличение ADCP (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против B

Грипп B/Malaysia/2506/2004 MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45b [1 мкМ]**
0	1,07	0,93
0,1	0,98	1,67
0,3	0,99	6,93
1	1,14	25,86
3	1,11	34,29
10	1	30,38

Таблица 108: Дозозависимое увеличение ADCP (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A при MOI 10

Грипп A/PR/8/1934 (H1N1) [нМ]	**Только Fc**	**Конъюгат 45b**
0	0,96	1,04
100	1,22	3,44
300	1,56	7
1000	1,91	17,04
3000	2,22	28,54
10000	3,08	44,93

Таблица 109: Дозозависимое увеличение ADCP (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A при MOI 10

Грипп A/CA/7/2009 (H1N1)pdm [нМ]	**Только Fc**	**Конъюгат 45b**
0	0,98	1,02
100	1,64	2,32
300	1,74	5,41

Грипп A/CA/7/2009 (H1N1)pdm [нМ]	Только Fc	Конъюгат 45b
1000	2,15	10,04
3000	2,13	24,28
10000	2,24	33,87

Таблица 110: Дозозависимое увеличение ADCP (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A при MOI 10

Грипп A/HK/1/1968 (H3N2) [нМ]	Только Fc	Конъюгат 45b
0	1,01	0,99
100	1,03	1,81
300	1,48	3,33
1000	2,29	6,09
3000	2,87	9,01
10000	2,11	9,96

Таблица 111: Дозозависимое увеличение ADCP (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа B/Malaysia/2506/2004 при MOI 10

Грипп B/Malaysia/2506/2004 MOI	Только Fc	Конъюгат 45b
0	1,15	0,85
100	1,3	6,67
300	2,09	26,21
1000	2,32	61,43
3000	3,26	96,95
10000	3,91	104,49

Пример 169. Анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности

Конъюгат 45b тестировали на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Монослой клеток MDCK инфицировали штаммами гриппа A или гриппа B при MOI 0,001–10 и инкубировали в течение 18–24 ч при 37 °C в 5% CO_2. ADCC определяли с использованием коммерческой клеточной линии (PROMEGA) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, испытуемые образцы добавляли в концентрации от 1 до 10000 нМ в соответствующие лунки и инкубировали в течение 15 минут при 37 °C в 5% CO_2. ADCC количественно определяли по люминесценции. Конъюгат 45b и только Fc (SEQ ID NO: 73,

приготовлен аналогично Примеру 124) тестировали против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1), гриппа A/CA/07/2009 (H1N1) и гриппа A/HK/1/1968 (H3N2) (таблицы 112-114, соответственно) и грипп B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, таблица 115), демонстрирующие зависимое от MOI увеличение ADCC с помощью конъюгата 45b. Конъюгат 45b также продемонстрировал дозозависимое увеличение ADCC против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1), гриппа A/CA/07/2009 (H1N1) и гриппа A/HK/1/1968 (H3N2) при MOI 10 (таблицы 116-118, соответственно) и грипп B/Malaysia/2506/2004 (Victoria, таблица 119).

Таблица 112: Зависимое от MOI увеличение ADCC (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A

Грипп A/PR/8/1934 (H1N1) MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45b [1 мкМ]**
0	0,97	1,03
0,1	1,22	1,54
0,3	1,27	2,27
1	1,47	4,03
3	1,92	6,14
10	2,34	11,46

Таблица 113: Зависимое от MOI увеличение ADCC с помощью конъюгата 45b против гриппа A

Грипп A/CA/7/2009 (H1N1)pdm MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45b [1 мкМ]**
0	1,02	0,98
0,1	1,23	1,48
0,3	1,4	2,21
1	1,62	3,74
3	1,74	6,08
10	2,14	9,59

Таблица 114: Зависимое от MOI увеличение ADCC (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A

Грипп A/HK/1/1968 (H3N2) MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45b [1 мкМ]**
0	0,99	1,01
0,1	1,31	1,46
0,3	1,66	2,17

Грипп A/HK/1/1968 (H3N2) MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45b [1 мкМ]**
1	2,48	3,4
3	1,43	2,74
10	0,89	2,34

Таблица 115: Зависимое от MOI увеличение ADCC (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против B

Грипп B/Malaysia/2506/2004 MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45b [1 мкМ]**
0	0,97	1,03
0,1	1,27	3,6
0,3	1,64	9,38
1	2,36	22,09
3	2,65	26,21
10	2,87	34,46

Таблица 116: Дозозависимое увеличение ADCC (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A при MOI 10

Грипп A/PR/8/1934 (H1N1) [нМ]	**Только Fc**	**Конъюгат 45b**
0	0,93	1,07
100	1,12	1,78
300	1,25	3,8
1000	1,4	5,16
3000	1,19	7,09
10000	1,03	5,68

Таблица 117: Дозозависимое увеличение ADCC (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A при MOI 10

Грипп A/CA/7/2009 (H1N1)pdm [нМ]	**Только Fc**	**Конъюгат 45b**
0	0,91	1,09
100	1,16	3,44
300	1,02	5,53

1000	1,21	6,18
3000	1,17	6,05
10000	1,15	5,48

Таблица 118: Дозозависимое увеличение ADCC (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа A при MOI 10

Грипп A/HK/1/1968 (H3N2) [нМ]	**Только Fc**	**Конъюгат 45**
0	0,97	1,03
100	1,11	1,42
300	1,15	2,24
1000	1,11	2,93
3000	1,11	3,08
10000	1,09	2,67

Таблица 119: Дозозависимое увеличение ADCC (кратная индукция) с помощью конъюгата 45b против гриппа B/Malaysia/2506/2004 при MOI 10

Грипп B/Malaysia/2506/2004 MOI	**Только Fc**	**Конъюгат 45**
0	0,96	1,04
100	1,18	4,16
300	1,11	5,34
1000	1,18	15,21
3000	1,04	14,84
10000	1,02	12,11

Пример 170. Эффективность конъюгата 45b в мышиной модели летального гриппа: Исследование №58

Конъюгат 45b оценивали против летального гриппа A/PR/8/1934 (3E2 БОЕ) у самок мышей BALB/c (возраст 6-8 недель, n=5/группа). Дизайн исследования показан в таблице 120. Мышам вводили исследуемые препараты через t=+2 ч (п/к) после заражения однократной дозой конъюгата 45b или два раза в день в течение 4 дней для контрольных агентов. У всех мышей ежедневно контролировали массу тела. Мышей умерщвляли на 4-й день после заражения и собирали обе доли легкого. Легкие гомогенизировали для определения вирусной нагрузки и иммунного ответа. Данные приведены в таблицах 121-123.

Таблица 120: Дизайн исследования эффективности № 58

Группа	Исследуемый препарат (DAR)	Путь/Схема	Доза [мг/кг]	Доза/день [мг/кг]
1	ФСБ	п/к, Т+2 ч.	Н/П	Н/П
2	Fc hIgG1	п/к, Т+2 ч.	3	3
3	Осельтамивир	п/о, 2 р/день х 4	5	10
4	Осельтамивир	п/о, 2 р/день х 4	50	100
5	Балоксавир	п/о, 2 р/день х 4	15	30
6	Конъюгат 45b (4,8)	п/к, Т+2 ч.	0,1	0,1
7	Конъюгат 45b (4,8)	п/к, Т+2 ч.	0,3	0,3
8	Конъюгат 45b (4,8)	п/к, Т+2 ч.	1	1
9	Конъюгат 45b (4,8)	п/к, Т+2 ч.	3	3
10	неинфицированные	Н/П	Н/П	Н/П

Таблица 121: Вирусная нагрузка на 4-й день после заражения в БОЕ/г

Группа	Исследуемый препарат [мг/кг]	БОЕ/г	Логарифмическое уменьшение БОЕ/г
1	ФСБ [0]	1,92E+07	0,00
2	Fc hIgG1 [3]	5,12E+07	-0,43
3	Осельтамивир [5]	2,86E+06	0,83
4	Осельтамивир [50]	2,66E+06	0,86
5	Балоксавир [15]	BLD (<10)	N/A (>6)
6	Конъюгат 45b [0,1]	1,50E+06	1,11
7	Конъюгат 45b [0,3]	1,26E+05	2,18
8	Конъюгат 45b [1]	1,32E+04	3,16
9	Конъюгат 45b [3]	5,00E+03	3,58
10	Неинфицированные	BLD	Н/П

Таблица 122: Уровни цитокинов на 4-й день после заражения

Исследуемый препарат [мг/кг]	TNF-α [пг/мл]	IL-6 [пг/мл]	MCP-1 [пг/мл]	MIP-1α [пг/мл]	KC [пг/мл]
ФСБ [0]	1077,2	1446,6	21219,9	3750,8	8090,4

Исследуемый препарат [мг/кг]	**TNF-α [пг/мл]**	**IL-6 [пг/мл]**	**MCP-1 [пг/мл]**	**MIP-1α [пг/мл]**	**KC [пг/мл]**
Fc hIgG1 [3]	958,6	1129,5	20534,7	3545,1	7730,8
Осельтамивир [5]	861,6	714,2	5301,6	1439,8	3466,4
Осельтамивир [50]	501,7	467,1	4572,8	948,2	2705,5
Балоксавир [15]	522,5	308,7	338,7	185,6	392,0
Конъюгат 45b [0,1]	515,3	470,5	6807,3	1506,5	2954,1
Конъюгат 45b [0,3]	521,7	424,9	2957,5	820,1	1788,5
Конъюгат 45b [1]	460,0	329,8	2005,2	451,7	1262,8
Конъюгат 45b [3]	464,8	309,2	739,4	246,4	678,8
Неинфицированные	488,0	312,6	423,9	177,8	444,6

Таблица 123: Уровни цитокинов на 4-й день после заражения кратно изменились по сравнению с неинфицированным контролем

Исследуемый препарат [мг/кг]	**TNF-α**	**IL-6**	**MCP-1**	**MIP-1α**	**KC**
ФСБ [0]	2,21	4,63	50,06	21,10	18,20
Fc hIgG1 [3]	1,96	3,61	48,44	19,94	17,39
Осельтамивир [5]	1,77	2,28	12,51	8,10	7,80
Осельтамивир [50]	1,03	1,49	10,79	5,33	6,09
Балоксавир [15]	1,07	0,99	0,80	1,04	0,88
Конъюгат 45b [0,1]	1,06	1,51	16,06	8,48	6,65
Конъюгат 45b [0,3]	1,07	1,36	6,98	4,61	4,02
Конъюгат 45b [1]	0,94	1,05	4,73	2,54	2,84
Конъюгат 45b [3]	0,95	0,99	1,74	1,39	1,53
Неинфицированные	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Пример 171. Эффективность конъюгата 45b в мышиной модели летального гриппа: Исследование №55

Конъюгат 45b оценивали против летального гриппа A/CA/07/2009 (3E4 БОЕ) у самок мышей BALB/c (возраст 6-8 недель, n=5/группа). Дизайн исследования показан в таблице 124. Мышам вводили исследуемые препараты через t=+2 ч (п/к) после заражения однократной дозой конъюгата 45b или два раза в день в течение 4 дней для контрольных агентов. У всех мышей ежедневно контролировали массу тела. Мышей умерщвляли на 4-й день после заражения и собирали обе доли легкого. Легкие гомогенизировали для определения

вирусной нагрузки и иммунного ответа. Данные показаны в таблицах 125 и 126A-126B.

Таблица 124: *Исследование эффективности № 58:* Дизайн исследования

Группа	**Исследуемый препарат (DAR)**	**Путь/Схема**	**Доза [мг/кг]**	**Доза/день [мг/кг]**
1	ФСБ	п/к, Т+2 ч.	Н/П	Н/П
2	Fc hIgG1	п/к, Т+2 ч.	30	30
3	Осельтамивир	п/о, 2 р/день x 4	5	10
4	Балоксавир	п/о, 2 р/день x 4	15	30
4	Конъюгат 45b (4,8)	п/к, Т+2 ч.	0,3	0,3
6	Конъюгат 45b (4,8)	п/к, Т+2 ч.	1	1
7	Конъюгат 45b (4,8)	п/к, Т+2 ч.	3	3
8	Конъюгат 45b (4,8)	п/к, Т+2 ч.	30	30
9	неинфицированные	Н/П	Н/П	Н/П

Таблица 125: Вирусная нагрузка на 4-й день после заражения в БОЕ/г

Группа	**Исследуемый препарат [мг/кг]**	**БОЕ/г**	**Логарифмическое уменьшение БОЕ/г**
1	ФСБ [0]	1,71E+07	0,00
2	Fc hIgG1 [30]	1,08E+07	0,20
3	Осельтамивир [5]	2,05E+07	-0,08
4	Балоксавир [15]	1,51E+02	5,06
5	Конъюгат 45b [0,1]	8.81E+06	0,29
6	Конъюгат 45b [0,3]	4,25E+06	0,60
7	Конъюгат 45b [1]	1.24E+05	2,14
8	Конъюгат 45b [3]	3,72E+03	3,66
9	неинфицированные	0,00	0,00

Таблица 126A: Уровни цитокинов на 4-й день после заражения

Исследуемый препарат [мг/кг]	**TNF-α [пг/мл]**	**IL-6 [пг/мл]**	**MCP-1 [пг/мл]**	**MIP-1α [пг/мл]**	**KC [пг/мл]**
ФСБ [0]	1409,1	728,1	10139,0	2439,6	2542,4
Fc hIgG1 [30]	1489,6	709,6	9414,3	2245,0	2212,8

Исследуемый препарат [мг/кг]	**TNF-α [пг/мл]**	**IL-6 [пг/мл]**	**MCP-1 [пг/мл]**	**MIP-1α [пг/мл]**	**KC [пг/мл]**
Осельтамивир [5]	1260,1	714,2	8891,9	1454,1	2327,7
Балоксавир [15]	586,5	238,5	378,5	175,0	247,7
Конъюгат 45b [0,3]	1211,4	426,2	4059,8	886,7	1530,2
Конъюгат 45b [1]	1069,7	378,9	3874,0	765,3	1759,6
Конъюгат 45b [3]	1069,6	427,6	2457,6	720,0	1478,5
Конъюгат 45b [30]	662,5	284,2	1185,6	406,4	1069,3
Неинфицированные	523,1	227,3	247,5	179,6	293,1

Таблица 126B: Уровень цитокинов на 4-й день после инфицирования кратно изменился по сравнению с неинфицированным контролем

Исследуемый препарат [мг/кг]	**INF-γ**	**TNF-α**	**IL-6**	**MCP-1**	**MIP-1α**	**KC**
ФСБ [0]	3,39	2,69	3,20	40,96	13,59	8,67
Fc hIgG1 [3]	3,06	2,85	3,12	38,03	12,50	7,55
Осельтамивир [5]	2,44	2,41	2,59	35,92	8,10	7,94
Балоксавир [15]	0,94	1,12	1,05	1,53	0,97	0,85
Конъюгат 45b [0,3]	1,98	2,32	1,87	16,40	4,94	5,22
Конъюгат 45b [1]	1,87	2,04	1,67	15,65	4,26	6,00
Конъюгат 45b [3]	1,85	2,04	1,88	9,93	4,01	5,04
Конъюгат 45b [30]	1,18	1,27	1,25	4,79	2,26	3,65
Неинфицированные	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Пример 172. Межвидовое связывание конъюгата 45b с рецептором Fc *in vitro*

Связывание конъюгата 45b с Fc-гамма-рецепторами различных видов осуществляли с использованием метода ИФА, описанного ниже. 96-луночные планшеты Nunc Maxisorp покрывали в течение ночи при 4 °C 1 мкг (100 мкл/лунку) конъюгата 45b в карбонатном буфере. Неконъюгированные Fc IgG1 человека и изотипические контрольные антитела также покрывали в течение ночи в тех же условиях. На следующий день планшеты промывали 5 раз 300 мкл/лунку 1X ФСБ pH 7,4 с добавлением 0,05% Tween-20 (PBST), затем блокировали 200 мкл/лунку 1% BSA в PBST в течение 1 часа при комнатной температуре на орбитальном шейкере для планшетов. Планшеты 5 раз промывали 300 мкл/лунку PBST, затем инкубировали с повторными 2-кратными серийными разведениями рекомбинантного His-меченого Fc-гамма-рецептора (0,5–1000 мкг; 100 мкл/лунку) в разбавителе (0,5% BSA в ФСБ 0,025% Tween-20) в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании. FcγR1/CD64 человека и яванского макака подвергали скринингу

при начальной концентрации 25 нг/100 мкл/лунку. Планшеты 5 раз промывали 300 мкл/лунку PBST, затем инкубировали со 100 мкл/лунку конъюгированного с ПХ мышиного анти-His антитела (кат. № MAB050H, R&D Systems), разбавленного 1:1000 в разбавителе, в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании. Планшеты промывали 8 раз 300 мкл/лунку PBST с 1-минутной инкубацией между промывками и проявляли 100 мкл/лунку реагентом-субстратом TMB в течение 5-10 мин. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл/лунку 1 н. H_2SO_4 и измеряли оптическую плотность при 450 нм с помощью многорежимного планшет-ридера EnSpire (PerkinElmer). Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC_{50}) рассчитывали с помощью GraphPad Prism версии 8 с использованием нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный, 4PL) кривых связывания. Связывание конъюгата 45b с рецепторами FcRn различных видов выполняли по существу так же, как описано для ИФА связывания Fc-гамма со следующей модификацией. После стадии блокирования анализы связывания проводили дважды при pH 5,8, оптимальном pH для связывания FcRn, и pH 7,4.

Конъюгат 45b связывался с Fc-гамма-рецепторами мыши, человека, крысы и яванского макака с авидностью, сравнимой с Fc IgG1 человека (таблица 127). Конъюгат 45b связывался с иммуноактивирующими Fc-гамма-рецепторами с более высокой авидностью по сравнению с иммуноингибирующими Fc-гамма-рецепторами. При pH 5,8 конъюгат 45b связывал рецепторы FcRn всех видов с авидностью, эквивалентной человеческому Fc IgG1. Как и ожидалось, связывание FcRn конъюгата 45b снижалось при pH 7,4 (таблица 127).

Таблица 127: Межвидовое связывание Fc-рецептора для конъюгата 45b

			EC_{50} [нМ]		
Вид	**Fc-рецептор**	**Сигнал/функция**	**Конъюгат 45**	**Fc hIgG1**	**hIgG1**
Мышь	FcγR1/CD64	Активация	12	9	3
	FcγR2B/CD32b	Ингибирование	228	135	153
	FcγR3/CD16	Активация	>455	>455	>455
	FcγR4/CD16-2	Активация	3	0,5	6E-07
	FcRn, pH 5,8	IgG, рециклинг альбумина	6	6	5
	FcRn, pH 7,4	IgG, рециклинг альбумина	80	14	40
Человек	FcγR1/CD64	Активация	12	12	7
	FcγR2A/CD32a (R167)	Ингибирование	334	193	144
	FcγR3A/CD16a	Активация	20	9	2
	FcγR3B/CD16b	Активация	>455	>455	>455
	FcRn, pH 5,8	IgG, рециклинг альбумина	49	49	44
	FcRn, pH 7,4	IgG, рециклинг альбумина	>455	>455	>455
Крыса	FcγR1/CD64	Активация	7	3	2
	FcγR2A/CD32a	Ингибирование	>455	>455	1

	FcγR2B/CD32b	Ингибирование	561	49	208
	FcγR3A/CD16a	Активация	6	3	0,008
	FcRn, pH 5,8	IgG, рециклинг альбумина	25	15	13
	FcRn, pH 7,4	IgG, рециклинг альбумина	104	>230	>230
Яванский макак	FcγR1/CD64	Активация	24	18	0,37
	FcγR2A/CD32a	Ингибирование	1995	688	693
	FγR2B/CD32b	Ингибирование	11	6	1
	FcγR3/CD16	Активация	>320	>320	>320
	FcRn, pH 5,8	IgG, рециклинг альбумина	31	17	28
	FcRn, pH 7,4	IgG, рециклинг альбумина	88	32	78

Пример 173. 7-дневное фармакокинетическое исследование на мышах, сравнивающее в/в, п/к и в/м введение конъюгата 45b

ФК исследования на мышах проводили на самцах мышей линии CD-1 в возрасте 6 недель. Мышам вводили в/в, п/к и в/м 5 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 5 мл/кг). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из ретроорбитальной, щечной или хвостовой вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь центрифугировали (2000 x *g* в течение 10 минут) и отбирали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени. Плазменные концентрации конъюгата 45b в каждый момент времени измеряли с помощью ИФА «сэндвич» типа следующим образом: Молекулы конъюгата 45b захватывают на планшетах, покрытых нейраминидазой, и затем обнаруживают с использованием конъюгированного с ПХ антитела к IgG-Fc человека. Концентрацию белка рассчитывали в GraphPad Prism с использованием нелинейной регрессии 4PL стандартных кривых конъюгата 45b (или Fc hIgG1). Более подробное описание способа приведено выше. Кривые сравнения конъюгата 45b показаны на Фиг. 84, и кривые, сравнивающие Fc hIgG1 (SEQ ID NO: 73) показаны на Фиг. 85. Уровни воздействия конъюгата 45b в плазме при п/к и в/м введении были сопоставимы, и получающаяся в результате биодоступность при п/к или в/м введении составила приблизительно 77% по сравнению с в/в введением (таблицы 128-130). Концентрации конъюгата 45b в плазме были одинаковыми для всех путей примерно через 24 часа после инъекции.

Таблица 128: Мышь, ФК, в/в введение 5 мг/кг

Мышь			**Время (час)**															
			0,0833	**1**	**3**	**5**	**24**	**48**	**72**	**96**	**168**							
До	**Сп**	**Жи**	**конц.**									**T**	**C**	**C**	**A**	**A**	**B**	**Cl**	**Vs**	**V**

за (мг/кг)	особ введения	вотное	(мкг/мл)																
5	в/в	Среднее значение	35,8	30,1	20,8	23	11,1	11,3	6,9	8,08	5,21	0,0833	36,4	35,8	1600	2560	128	0,0325	336	361

Таблица 129: Мышь, ФК, в/м введение 5 мг/кг

			Время												
			(час)												
			0,25	1	3	5	24	48	72	96	168				
Доза (мг/кг)	Способ введения	Животное	конц.									Tmax (час)	Cmax (мкг/мл)	AUClast (ч*мкг/мл)	AUCINF_obs (ч*мкг/мл)
			(мкг/мл)												
5	ВМ	Среднее значение	0,195	1,44	3,69	3,83	8,52	10,9	7,94	7,35	5,56	48	10,9	1240	2720

Таблица 130: Мышь, ФК, п/к введение 5 мг/кг

			Время												
			(час)												
			0,25	1	3	5	24	48	72	96	168				
Доза (мг/кг)	Способ введения	Животное	конц.									Tmax (час)	Cmax (мкг/мл)	AUClast (ч*мкг/мл)	AUCINF_pred (ч*мкг/мл)
			(мкг/мл)												
5	п/к	Среднее значение	0,148	0,387	3,23	2,55	8,89	9,29	9,13	7,49	5,46	48	9,29	1220	2280

Пример 174. 7-дневное фармакокинетическое исследование на мышах, сравнивающее в/в, п/к и в/м введение конъюгата 45b

ФК исследования на мышах проводили на самцах мышей линии CD-1 в возрасте 6 недель. Мышам вводили подкожно 1, 3, 10, 30 или 100 мг/кг исследуемого препарата (5 мл/кг объема дозы). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из ретроорбитальной, щечной или хвостовой вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь центрифугировали (2000 x *g* в течение 10 минут) и отбирали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени. Плазменные концентрации конъюгата 45b в каждый момент времени измеряли с помощью ИФА «сэндвич» типа следующим образом: Молекулы конъюгата 45b захватывают на планшетах, покрытых нейраминидазой, и затем обнаруживают с использованием конъюгированного с ПХ антитела к IgG-Fc человека. Концентрацию белка рассчитывали в GraphPad Prism с использованием нелинейной регрессии 4PL стандартных кривых конъюгата 45b (или Fc hIgG1). Более подробное описание способа приведено выше. Кривые, сравнивающие конъюгат 45b, обнаруженный с помощью захвата NA и Fc, показаны на Фиг. 86 и 87, соответственно. У мышей наблюдалась приемлемая линейная пропорциональность дозы от 1 до 100 мг/кг п/к введения конъюгата 45b (таблица 131).

Таблица 131: Доза ФК мыши пропорциональна от 1 до 100 мг/кг

			Время														
			(час)														
			0,25	**0,5**	**1**	**2**	**4**	**24**	**96**	**120**	**168**						
Доза (мг/кг)	**Способ введения**	**Животное**	**Конц.**									**D**	**Способ введения**	**Доза (мг)**	**Tmax (час)**	**Cmax (ч*мкг/мл)**	**AUClast (ч*мкг/мл)**	**AUCINF_pred (ч*мкг/мл)**
			(мкг/мл)														
1	п/к	1	0,83	Отсутствует	5,9	0,764	9,39	4,11	1,1	2,13	0,317	1	п/к	1	4	9,39	436	465
3	п/к	3	0,355	0,0874	1,02	0,52	5,16	11,4	9,84	8,32	6,84	3	п/к	3	24	11,4	1520	2900
10	п/к	10	1,01	0,879	1,81	4,65	15,5	41,3	18,4	26,7	15	10	п/к	10	24	41,3	4280	6650
30	п/к	30	0,	0,616	5,	7,	5	1	7	8	4	3	п/к	3	24	125	1420	22300

			179		71	6	6	25	5	3,7	9,7	0		0			0	
100	п/к	100	22,4	72,3	313	446	733	657	183	246	160	100	п/к	100	4	733	60700	75300

Пример 175. 14-дневное фармакокинетическое исследование на крысах после в/в или п/к введения конъюгата 45b

ФК исследования на крысах были выполнены лабораторией Seventh Wave Laboratories (Мэриленд-Хайтс, штат Миссури) с использованием самцов крыс линии Спрег-Доули в возрасте 46-49 дней. Крысам внутривенно через хвостовую вену вводили 5 мг/кг конъюгата 45b или подкожно 5 или 50 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 5 мл/кг) (Фиг. 88-89). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из ретроорбитальной, щечной или хвостовой вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь центрифугировали (2000 x g, в течение 10 минут) и брали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени (Таблица 132). Плазменные концентрации конъюгата 45b в каждый момент времени измеряли с помощью ИФА «сэндвич» типа следующим образом: Молекулы конъюгата 45b захватывают на планшетах, покрытых нейраминидазой, а затем обнаруживают с использованием конъюгированного с ПХ антитела к IgG-Fc человека (таблицы 133-134). hIgG1 захватывают с использованием антитела к Fc hIgG1. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 45b. Более подробное описание способа приведено выше. Кривые сравнения конъюгата 45b, показанные на Фиг. 88 демонстрируют линейную пропорциональность дозе. Уровни конъюгата 45b в плазме для внутривенного и подкожного введения сходятся через 24 часа после инъекции (Фиг. 89). Данные представлены в таблицах 135 и 136.

Таблица 132: Дизайн исследования ФК крыс

		Сбор плазмы крови, **Временные точки**								
	Доза/ Способ введения	10 мин в/в; 30 мин п/к	1h	4h	8h	24h	72h	120h	168h	336h
Группа 1 ***(n=3)***	**5 мг/кг в/в**	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Группа 2 ***(n=3)***	**5 мг/кг п/к**	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Группа 3 ***(n=3)***	**50 мг/кг п/к**	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Таблица 133: Захват NA H1N1 (A/CA/04/2009)

	5 мг/кг в/в						5 мг/кг п/к						50 мг/кг п/к					
	g1.1		g1.2		g1.3		g2.1		g2.2		g2.3		g3.1		g3.2		g3.3	
Время (ч)	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
10мин/30мин	139,0184	116,434	128,9835	126,3728	99,90003	96,30608	0,336397	0,352108	0,26567	0,24961	0,259523	0,205043	1,111022	1,021191	2,951729	3,184274	3,78442	3,30374
1	103,0288	107,5882	108,6186	112,708	80,42177	83,55724	0,601405	0,600861	0,50378	0,53983	0,680512	0,48924		2,858977	6,907325	4,617704	7,575	8,21763
4	67,18744	70,49817	65,26259	59,96993	52,09719	60,13481	3,331236	3,577401	3,291326	3,31843	3,942251	3,945549	19,50094	17,82466	17,83342	19,84081	27,2367	27,0064
8	49,96849	56,19489	56,94676	57,68125	48,90448	55,23444	9,120017	8,164349	6,224308	6,16066	7,856424	7,047854	43,56345	44,30664	55,25942	53,41513	58,2069	56,4707
24	33,99514	33,83988	34,76042	33,60106	33,04519	32,52448	24,64741	22,57097	19,34957	21,3297	20,90625	23,61215	156,8759	159,158	210,1323	209,9947	208,024	181,09
72	24,03197	23,99513	26,1422	25,50985	23,92523	24,53129	26,81972	23,95593	19,1652	23,1289	18,91189	16,60657	142,6993	137,0533	152,6497	155,1297	149,881	142,385
120	17,28743	17,88652	18,16672	17,61109	17,14011	16,81636	18,13665	18,07425	15,58847	19,193	16,70847	16,4339	117,7776	112,064	136,8244	141,3221	137,704	132,748
168	16,37894	14,18949	15,0406	14,28349	12,29568	13,27299	16,36903	16,31503	13,37669	14,9629	12,9219	12,3945	100,8302	116,8275	99,00073	118,0093	97,4236	96,2287
336	8,706758	9,475766	8,069783	8,240227	7,314977	7,120923	8,57262	8,694249	6,866837	7,0874	7,635397	7,876635	53,87703	51,16129	57,02179	55,22173	54,121	59,193

Таблица 134: Захват Fc hIgG

	5 мг/кг в/в						5 мг/кг п/к						50 мг/кг п/к					
	g1.1		g1.2		g1.3		g2.1		g2.2		g2.3		g3.1		g3.2		g3.3	
Время (ч)	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2

10мин/30мин	131,8211	132,2644	138,5205	124,2897	92,28536	93,95777	0,301641	0,272994	0,3302	0,58892	0,071346	0,209457	0,85958	2,600291	2,362582	2,417453	3,26701	3,24606
1	105,1676	118,2516	111,4847	110,7111	83,06342	83,13157	0,492532	0,510306	0,372862	0,35967	0,267192	0,28284	2,328096	2,360296	3,618227	3,5931	7,33632	7,4207
4	61,3296	59,41234	59,52775	47,35522	53,9032	61,12485	3,615572	3,792592	3,297844	3,46322	4,157923	4,501974	20,52563	19,67262	19,46794	19,46851	28,6829	31,5564
8		50,28953	48,15108	52,90292	48,1017	48,46983	8,261891	9,08554	6,598579	5,92739	8,778635	7,990053	45,29742	44,30181	54,38999	63,46517	61,1055	70,8567
24	29,91591	30,67022	30,25926	31,29131	28,39885	29,88579	23,96117	19,31521	16,86928	17,6982	17,00515	18,2297	155,7401	138,399	200,935	236,9577	239,536	249,133
72	19,38442	21,26014	20,06189	20,38354	17,46987	18,56471	19,96086	21,67188	15,66477	16,3864	19,15136	19,56853	152,6623	171,8249	181,134	173,9026	186,293	194,744
120	12,13442	13,49033	12,39415	11,80685	13,47915	12,68468	14,71684	15,61295	11,56458	11,8629	14,66388	14,79211	113,865	103,0581	131,7811	129,7576	153,859	149,209
168	14,61786	14,48309	13,2966	13,12374	12,4622	13,06133	13,73621	9,73	11,21421	12,2178	14,54814	12,79694	94,56107	112,0218	105,5593	101,004	104,147	113,431
336	8,33093	8,680053	7,88281	7,805351	6,912784	6,784823	7,736292	7,661658	6,466908	6,00365	7,32696	6,554063	49,96583	43,11898	58,15043	57,84531	54,516	49,5564

Таблица 135: Крыса, ФК, в/в введение 5 мг/кг

Крыса	**Время (час)**																		
	0,167	**1**	**4**	**8**	**24**	**72**	**120**	**168**	**336**										
Доза (мг/кг)	**Конц. (мкг/мл)**									**Tmax (ч)**	**C0 (мкг/мл)**	**Cmax (мкг/м**	**AUClast (ч*мкг/м**	**AUCINF_obs (ч*мкг**	**Период полувыведения**	**Cl_obs (мл/мин/кг)**	**Vss_obs (мл/**	**Vz_obs (мл/**

										а с)		л)	л)	/мл)	(час)		кг)	кг)
5	1 1 8	99, 3	62, 5	54, 2	33, 6	24, 7	17, 5	14, 2	8 , 1 5	0, 1 6 7	12 2	11 8	634 0	869 0	199	0,00 959	14 4	16 6

Таблица 136: Крыса, ФК, п/к введение 5 мг/кг и 50 мг/кг

Крыса			**Время** (час)												
			0,5	**1**	**4**	**8**	**24**	**72**	**120**	**168**	**336**				
Доза (мг/кг)	**Способ введения**	**Животное**	**Конц.** (мкг/мл)									**Tmax (час)**	**Cmax (мкг/мл)**	**AUClast (ч*мкг/мл)**	**AUCINF_obs (ч*мкг/мл)**
5	п/к	Среднее значение	0,278	0,569	3,57	7,43	22,1	21,4	17,4	14,4	7,79	24	22,1	4860	6970
50	п/к	Среднее значение	2,56	6,04	21,5	51,9	188	147	130	105	55,1	24	188	35800	49800

Пример 176. 14-дневное исследование фармакокинетики отличных от человека приматов после подкожного введения конъюгата 45b

ФК исследования отличных от человека приматов (NHP) были выполнены компанией Charles River с использованием самцов и самок яванского макака в возрасте 4,5-8 лет с массой тела 2,5-6,5 кг. NHP вводили подкожно в дозе 5 или 20 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 5 мл/кг) на 1 и 8 дни. Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из бедренной или головной вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения свертывания. Собранную кровь центрифугировали (2000 x g, в течение 10 минут) и брали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени (Таблица 137). Плазменные концентрации конъюгата 45b в каждый момент времени измеряли с помощью ИФА «сэндвич» типа следующим образом: Молекулы конъюгата 45b захватывают на планшетах, покрытых нейраминидазой, и затем обнаруживают с использованием конъюгированного с ПХ антитела к IgG-Fc (Фиг. 90-91). Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 45b. Более подробное описание способа приведено выше. Кривые сравнения конъюгата 45b показаны на Фиг. 92. Зависимость доза-ответ является линейной между 5 и 20 мг/кг подкожно. Накопление конъюгата 45b наблюдали после второго введения конъюгата 45b на 8-й день.

Таблица 137: Высокая экспозиция ФК обезьян после второй еженедельной дозы

				Время								
				(час)								
				0,0833	**1**	**2**	**4**	**8**	**24**	**72**	**120**	**168**
Доза (мг/кг)	**Способ введения**	**Группа**	**Животное**	**Конц. (мкг/мл)**								
5	п/к	D1	Среднее значение	ПКО	1,05	3,62	9,91	17,9	22,2	26,1	23,8	20
		D8	Среднее значение	24,3	19,4	25,7	31	61	47,3	54,1	42,8	33,3
20	п/к	D1	Среднее значение	ПКО	10,9	6,77	28,8	61,9	101	107	71,6	85,1
		D8	Среднее значение	63,4	59,5	70,4	107	150	197	167	139	99,1

Tmax (час)	**Cmax (ч*мкг/мл)**	**AUClast (ч*мкг/мл)**
72	26,1	3800
8	61	7740
72	107	14600
24	197	25400

Пример 177. Эффективность конъюгата 45b по сравнению с изолятом, устойчивым к осельтамивиру, на модели летального гриппа мышей

Конъюгат 45b оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провакационного заражения (A/Perth/261/2009) представляет собой адаптированный для мышей изолят, несущий мутацию H275Y, приводящую к устойчивости к ингибитору нейраминидазы осельтамивиру.

В эксперименте было задействовано 9 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали A/Perth/261/2009 (H1N1) 2x LD90 путем интраназальной инокуляции в объеме 50 мкл после легкой анестезии изофлураном. Группы 1-8 получали однократную п/к введение через 2 часа после заражения. В дополнение к группе только носителя (ФСБ) IgG1 человека (только Fc) был включен в качестве дополнительного отрицательного контроля. Группа 9 получала осельтамивира фосфат перорально, начиная с 8 часов после инфицирования два раза в день в течение 5 дней (таблица 138). Всех мышей контролировали на предмет выживаемости (таблица 139) и потерю веса (таблица 140) в течение 14 дней после заражения.

Мыши, получавшие конъюгат 45b, показали 100% выживаемость по сравнению с заражением гриппом (A/Perth/261/2009) при однократных дозах 10, 3, 1 и 0,3 мг/кг. Кроме того, несмотря на небольшой размер группы (n=5), эти результаты были статистически значимыми по сравнению с контролем носителем

(таблица 139).

Ни одна из мышей не выжила до конца исследования, если им вводили носитель (ФСБ), и только 20% выживали, если им вводили только Fc hIgG1. В группе осельтамивира не было выживших, несмотря на лечение дозой, которая ранее показала защитный эффект против чувствительных к осельтамивиру изолятов (20 мг/кг, два раза в день x 5 дней). Эти результаты подтверждают, что вирус провокационного заражения является устойчивым к осельтамивиру и чувствительным к конъюгату 45b.

Активность конъюгата 45b против гриппа, содержащего мутацию H275Y, дополнительно подтверждалась данными о массе тела (таблица 140). Группы, получавшие однократную дозу конъюгата 45b в концентрациях 1 мг/кг или более, демонстрировали 3% или менее временную потерю веса, которая восстанавливалась к концу исследования.

Таблица 138: Дизайн исследования

Группа n=5	**Заражение День 0**	**Соединение**	**Доза (мг/кг)**	**Лечение Путь/Схема**
1	Вирус гриппа A (H1N1) A/Perth/261/2009 через интраназальный путь введения.	Носитель (ФСБ)	Н/П	п/к, один раз в день через 2 часа после заражения
2		Только Fc	10	
3		Конъюгат 45b	10	
4		Конъюгат 45b	3	
5		Конъюгат 45b	1	
6		Конъюгат 45b	0,3	
7		Конъюгат 45b	0,1	
8		Конъюгат 45b	0,03	
9		Осельтамивир (Тамифлю™)	20	п/о, два раза в день через 8 часов после заражения в течение 5 дней

Таблица 139: Процент выживаемости

		Исследуемый агент (мг/кг)		**Конъюгат 45b (мг/кг)**					
День	**Носитель**	**Fc hIgG1 (10)**	**осельтамивир (200)**	**10**	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**	**0,03**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100

		Исследуемый агент (мг/кг)		Конъюгат 45b (мг/кг)					
День	**Носитель**	**Fc hIgG1 (10)**	**осельтамивир (200)**	**10**	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**	**0,03**
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	80	80	100	100	100	100	100	80
5	100	60	60	100	100	100	100	80	40
6	80	60	0	100	100	100	100	0	0
7	0	40	0	100	100	100	100	0	0
8	0	20	0	100	100	100	100	0	0
9	0	20	0	100	100	100	100	0	0
10	0	20	0	100	100	100	100	0	0
11	0	20	0	100	100	100	100	0	0
12	0	20	0	100	100	100	100	0	0
13	0	20	0	100	100	100	100	0	0
14	0	20	0	100	100	100	100	0	0
Значимость относительно носителя	нд	0,665	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	нзнач.	нзнач.

Таблица 140: Процентное изменение массы тела (граммы)

		Исследуемый агент (мг/кг)		Конъюгат 45b (мг/кг)				
День	**Носитель**	**Fc hIgG1 (10)**	**осельтамивир (200)**	**10**	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	101	101	102	99	97	98	96	97
2	98	100	99	101	99	102	99	98
3	91	93	89	101	95	97	94	89
4	89	88	84	101	95	97	95	84
5	89	89	82	104	100	101	98	83
6	79	85	74	100	94	97	93	74
7	78	83		105	100	102	97	
8		84		105	100	103	98	
9		85		101	98	101	96	
10		90		103	98	101	98	
11		92		102	98	101	97	

12		99		105	103	103	102	
13		101		106	103	103	102	
14		98		104	101	101	101	

Пример 178. Эффективность конъюгата 45b против второго изолята, устойчивого к осельтамивиру, на модели летального гриппа мышей

В исследовании, аналогичном показанному в примере 177, конъюгат 45b тестировали на активность против второго изолята гриппа A (H1N1), несущего мутацию H275Y, придающую устойчивость к осельтамивиру. Для этого исследования мутация была перенесена в A/Texas/23/2012. Как и ранее, использовали мышей BALB/c (Charles River; 6-8 недель) и интраназально заражали 2X LD95 (5E4 БОЕ/мышь). Осельтамивир вводили перорально в дозе 20 мг/кг два раза в день в течение 5 дней, начиная через 2 часа после заражения вирусом. Все другие исследуемые препараты получали п/к, как указано в таблице 141. За животными наблюдали в течение 14 дней и ежедневно регистрировали массу тела (МТ). Если животное достигало 20% потери массы тела, это регистрировалось как гибель.

Таблица 141: Дизайн исследования

Группа	**Штамм гриппа**	**Исследуемый препарат**	**Путь/ Схема**	**Доза (мг/кг)**	**N (balb/c)**
1	A/Texas/23/2012 pdm (H275Y) (H1N1) 5E4 БОЕ/мышь	ФСБ	п/к, T+2 ч	---	5
2		hIgG1	п/к, T+2 ч	3	5
3		Осельтамивир	п/о, два раза на день x 5 (T+2 ч)	20	5
4		Конъюгат 45b	п/к, T+2 ч	3	5
5		Конъюгат 45b	п/к, T+2 ч	1	5
6		Конъюгат 45b	п/к, T+2 ч	0,3	5
7		Конъюгат 45b	п/к, T+2 ч	0,1	5

Как и в предыдущем исследовании, ни носитель, ни Fc hIgG1 (SEQ ID NO: 73) только контроли обеспечивали защиту от летального заражения (выживаемость 20 и 0%, соответственно; таблица 142). Напротив, группы, получавшие конъюгат 45b в концентрациях от 0,3 до 3,0 мг/кг, были полностью защищены от летального заражения. Кроме того, конъюгат 45b в дозе 0,1 мг/кг продемонстрировал частичную защиту с 60% выживаемостью в течение 14 дней исследования. Однако общая доза осельтамивира 200 мг не смогла защитить мышей от заражения вирусом, как и ожидалось. Данные о массе тела (таблица 143; зарегистрированы до первой смерти в группе) отражали результаты выживаемости, при этом в защищенных группах наблюдалась только временная потеря массы (конъюгат 45, от 0,3 до 3,0 мг/кг). Мутация осельтамивира (H275Y), протестированная в этом исследовании, представляет собой клинически значимую мутацию, которая, как показано в этом исследовании, очень чувствительна к конъюгату 45b.

Таблица 142: Процент выживаемости

		Исследуемый агент (мг/кг)		**Конъюгат 45b (мг/кг)**			
День	**Носитель**	**Fc hIgG1 (1)**	**осельтамивир (200)**	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	20	60	20	100	100	100	60
6	20	0	0	100	100	100	60
7	20	0	0	100	100	100	60
8	20	0	0	100	100	100	60
9	20	0	0	100	100	100	60
10	20	0	0	100	100	100	60
11	20	0	0	100	100	100	60
12	20	0	0	100	100	100	60
13	20	0	0	100	100	100	60
14	20	0	0	100	100	100	60

Таблица 143: Процентное изменение массы тела (граммы)

		Исследуемый агент (мг/кг)		**Конъюгат 45b (мг/кг)**			
День	Носитель	Fc hIgG1 (1)	осельтамивир (200)	3	1	0,3	0,1
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	99	97	99	98	97	98
2	95	93	92	96	96	93	94
3	88	85	84	93	90	85	86
4	82	80	78	95	90	84	80
5	78	75		94	90	84	79
6				96	94	85	
7				101	97	89	
8				100	96	88	
9				101	99	91	
10				99	99	91	
11				100	99	92	
12				101	99	94	
13				100	98	94	
14				103	101	99	

Пример 179. Эффективность конъюгата 45b при подкожном введении против гриппа A/WSN/1933 (H1N1) на мышиной летальной модели

Конъюгат 45b оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии

BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/WSN/1933) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 7 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали провокационным вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл (2E3 вируса на мышь), после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Смертность и массу тела регистрировали ежедневно в течение 21 часов, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

Исследуемые группы получали однократное подкожное (п/к) введение конъюгата 45b в дозе 3, 1, 0,3, 0,1 или 0,03 мг/кг, или контроля Fc hIgG1, или носителя (ФСБ) через 2 часа после заражения вирусом в объеме дозы 10 мл/кг. Дизайн исследования обобщен в таблице 144.

Таблица 144: Дизайн исследования

Группа	**Штамм гриппа**	**Исследуемый препарат**	**Путь/ Схема**	**Доза (мг/кг)**	**N (balb/c)**
1	A/WSN/1933 (H1N1) ~ 2E3 БОЕ/мышь	ФСБ	п/к, T+2 ч	---	5
2		hIgG1	п/к, T+2 ч	1	5
3		Конъюгат 45b	п/к, T+2 ч	3	5
4		Конъюгат 45b	п/к, T+2 ч	1	5
5		Конъюгат 45b	п/к, T+2 ч	0,3	5
6		Конъюгат 45b	п/к, T+2 ч	0,1	5
7		Конъюгат 45b	п/к, T+2 ч	0,03	5

Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель или контрольный Fc hIgG1, погибали от инфекции на 7 или 8 день, соответственно (таблица 145). Однако мыши, получавшие конъюгат 45b, были полностью защищены при концентрациях до 0,3 мг/кг и 80% защиты при 0,1. Полная потеря защиты при помощи конъюгата 45b наблюдали только при самой низкой концентрации дозы 0,03 мг/кг.

Таблица 145: Процент выживаемости

День	**Носитель**	**Fc hIgG1**	**Конъюгат 45b (мг/кг)**				
			3	**1**	**0,3**	**0,1**	**0,03**
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100
6	40	60	100	100	100	100	100
7	0	20	100	100	100	100	100
8	0	0	100	100	100	100	40
9	0	0	100	100	100	80	0
10	0	0	100	100	100	80	0

11	0	0	100	100	100	80	0
12	0	0	100	100	100	80	0
13	0	0	100	100	100	80	0
14	0	0	100	100	100	80	0

Ежедневные измерения массы тела согласовывали с наблюдениями за выживаемостью. Как и ожидалось, мыши, получавшие носитель или Fc hIgG1, демонстрировали устойчивое снижение массы тела до тех пор, пока оно не превысила 20%, после чего они были засчитаны как умершие (таблица 146).

В отличие от контрольных мышей, те группы, которые получали конъюгат 45b в дозах 3, 1 и 0,3 мг/кг, сохраняли здоровую массу тела на протяжении всего исследования и никогда не демонстрировали более чем временное снижение массы тела менее чем на 3% (группа с дозой 1 мг/кг, 18 день; таблица 146). По измерениям выживаемости и массы тела конъюгат 45b продемонстрировал надежную защиту от летального заражения гриппом A/WSN/1933 однократной подкожной дозе, составляющей всего 0,3 мг/кг.

Таблица 146: Процентное изменение массы тела

			Конъюгат 45b (мг/кг)				
День	**Носитель**	**Fc hIgG1**	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**	**0,03**
0	100	100	100	100	100	100	100
1	96,8	96,6	98,5	98,9	99	96,9	99,4
2	99,9	98,1	100,9	99,9	100,5	101,2	100,7
3	92	90,8	101,1	100,6	99	97	94,8
4	83,5	85,3	98,4	98,2	96	94,6	92,4
5	79,7	82,3	99	102,5	99,2	94,2	91,5
6	76,1	78,8	101,2	105,4	102,1	90,9	87,3
7			100	102,8	101,6	84,8	82,3
8			98,4	101,9	100,8	81,9	76
9			102,2	102,8	101,6	84,3	
10			101,9	103	101,7		
11			101,3	102,1	99,5		
12			99,5	99,9	99,3		
13			100	101,8	101,7		
14			102,1	102,3	102,7		
15			99,8	101,6	101,6		
16			100,1	102,1	103,1		
17			98,7	98,7	100,5		
18			99,3	97,8	99,4		
19			98,8	98,3	100,2		
20			100,1	100,1	100,8		
21			102,3	100,5	101,1		

Пример 180. Эффективность конъюгата 45b, вводимого внутривенно, против гриппа A/Texas/36/91 (H1N1) на летальной мышиной модели отсроченного лечения.

Конъюгат 45b оценивали против летальной инфекции гриппа A (H1N1) у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Texas/36/91) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В 0 день всех мышей заражали вирусом в 2 раза больше LD95 (~75 вирусов/мышь) путем интраназальной инокуляции в объеме 50 мкл после анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Смертность, клинические признаки и массу тела регистрировали ежедневно в течение 15 дней, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

Дизайн исследования подробно описан в таблице 147 и состоит из нескольких групп. Контрольная группа включает подгруппы с применением только носителя (ФСБ) и Fc hIgG1, в которых дозу вводили через 24 часа после заражения вирусом (неинфицированная подгруппа также входила в эту группу). Во второй группе применяли осельтамивир, вводимый в дозе, в 4 раза превышавшей гуманизированную дозу, с отсрочкой начала лечения на 24, 48, 72 или 96 часа. Последние группы состояли из конъюгата 45b, вводимого в виде однократной внутривенной дозы 1 или 3 мг/кг; каждая из них вводится по той же схеме, что и в описанной выше группы осельтамивира.

Как и ожидалось, носитель и Fc hIgG1 не оказывали защитного действия при введении через 24 часа после заражения вирусом и приводили к полной смертности к дню 6. В данном исследовании осельтамивир в 4-кратной гуманизированной дозе (кумулятивная доза 200 мг/кг) был только частично эффективен, если дозирование было отложено на 24 часа (таблица 148; 80% выживаемость). Через 48 часов после заражения эффективность осельтамивира упала еще ниже, и только 40% мышей дожили до конца исследования. Если лечение осельтамивиром откладывали на 72 или 96 часов, защита отсутствовала.

Напротив, конъюгат 45b полностью защитил при дозах 1 и 3 мг/кг, когда введение дозы откладывали на 24 часа. Через 48 часов после заражения группа 3 мг/кг все еще была полностью защищена, а группа 1 мг/кг была почти такой же, с 80% выживаемостью. Через 72 часа 1 мг/кг также продемонстрировал 80% защиту, однако 3 мг/кг продемонстрировал только 20% защиту. В совокупности обе группы, получавшие конъюгат 45b в дозе 1 и 3 мг/кг, демонстрируют более высокую эффективность по сравнению с осельтамивиром в этой модели отсроченного лечения, что измеряется по выживаемости. Примечательно также, что общая доза конъюгата 45b составляла 1 или 3 мг/кг, в то время как осельтамивир вводили в дозе 200 мг/кг.

Как и ожидалось, данные о весе подтверждают данные о выживаемости (таблица 149) и в целом демонстрируют, что мыши, получавшие конъюгат 45b, лучше сохраняют массу тела. Хотя это не является статистически значимым, масса лучше сохраняется у мышей, получавших конъюгат 45b, даже несмотря на то, что группы, получавшие осельтамивир, получали гораздо более высокую дозу.

Таблица 147: Дизайн исследования

Группа (n=5)	**Заражение (день 0)**	**Исследуемый препарат**	**Лечение**			**Считывание данных**
			Доза (мг/кг)	**Схема (pi)**	**Способ введения**	
1	Вирус гриппа A, штамм H1N1 A/TX/36/91	Носитель (ФСБ)	Н/П	24 часа	Однократное введение в/в	Ежедневный мониторинг массы и
2		Fc hIgG1	3	24 часа		

3	через интраназальный путь	Конъюгат 45b	3	24 часа		показателей здоровья в течение 15 дней. (0 день – 14 день) % выживаемости
4				48 часов		
5				72 часа		
6				96 часов		
7			1	24 часа		
8				48 часов		
9				72 часа		
10				96 часов		
11		Осельтамивира фосфат	20	24 часа	перорально, два раза в день в течение 5 дней	
12				48 часов		
13				72 часа		
14				96 часов		
15	Наивные мыши: неполучавшие лечение и неинфицированные					

Таблица 148: Процент выживаемости

			Конъюгат 45b (мг/кг)				**Конъюгат 45b (мг/кг)**				**Осельтамивир (мг/кг)**			
			1				**3**				**20**			
День	**Носитель**	**FchIgG1**	**24 часа**	**48 часов**	**72 часа**	**96 часов**	**24 часа**	**48 часов**	**72 часа**	**96 часов**	**24 часа**	**48 часов**	**72 часа**	**96 часов**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	80	100	100	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	20	60	100	80	80	40	100	100	20	60	100	100	60	0
6	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	100	100	40	0
7	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	100	60	0	0
8	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
9	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
10	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
11	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
12	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
13	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0
14	0	0	100	80	80	0	100	100	20	0	80	40	0	0

Таблица 149: Процентное изменение массы тела

			Конъюгат 45b (мг/кг)	**Конъюгат 45b (мг/кг)**	**Осельтамивир (мг/кг)**	**Наивны**
			1	**3**	**20**	

День	**Носитель**	**FchIgG1**	**24 часа**	**48 часов**	**72 часа**	**96 часов**	**24 часа**	**48 часов**	**72 часа**	**96 часов**	**24 часа**	**48 часов**	**72 часа**	**96 часов**	**й**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	98	100	98	98	98	100	103	102	100	101	98	101	99	99	99
2	96	102	97	97	99	99	104	103	100	100	99	99	99	99	102
3	88	93	92	90	91	90	99	95	92	92	94	93	89	89	103
4	83	87	93	88	85	85	99	92	85	85	95	92	86	84	101
5	78	81	95	91	83	79	103	96	79	80	94	91	82	78	101
6	73	79	98	93	87	76	105	97	91	80	91	88	83		103
7			100	95	87		106	102	92		88	84	81		103
8			101	99	93		108	105	99		91	88			104
9			98	98	96		103	103	100		97	91			104
10			100	99	98		105	105	100		100	93			105
11			100	98	98		103	105	100		101	91			104
12			101	100	99		104	107	99		102	93			106
13			100	99	100		105	106	99		101	94			105
14			101	100	101		107	107	102		103	96			105

Пример 181. Безопасность конъюгата 45b, оцененная в ходе 14-дневного исследования токсичности с определением диапазона доз у яванских макак

Яванским макакам вводили 5 мг/кг, 20 мг/кг или 50 мг/кг конъюгата 45b путем подкожной инъекции на 0 и 7 дни исследования. По сравнению с контрольными носителями не наблюдалось значительного влияния на прибавку массы тела, массу органов и потребление пищи при любой тестируемой дозе. Экспозиции в плазме (измеряемые по AUC) увеличивались пропорционально дозе. Эти доклинические результаты безопасности согласуются с высоким терапевтическим индексом (54X), основанным на соотношениях AUC от самой высокой дозы в токсикологическом исследовании к AUC, необходимой для 28-дневной защиты от гриппозной инфекции в моделях летального гриппа мышей. Никаких побочных эффектов, связанных с исследуемым препаратом, не наблюдалось ни при какой тестируемой дозе. Сводные данные наблюдений представленыв таблице 150.

Таблица 150: Сводные данные 14-дневного исследования токсичности с определением диапазона доз

Параметр	**Результаты при максимальной дозе (50 мг/кг), по сравнению с носителем**
Клинические наблюдения	Результаты отсутствуют
Гематология	Без изменений по сравнению с носителем
Клинический биохимический анализ	Без изменений по сравнению с носителем
Коагуляция	Без изменений по сравнению с носителем
Анализ мочи	Без изменений по сравнению с носителем
Иммунофенотипирование	Без изменений по сравнению с носителем

Цитокины	Без изменений по сравнению с носителем
Гистопатология	Результаты отсутствуют

Пример 182. Эффективность конъюгата 45b, вводимого подкожно, против гриппа A/California/07/2009 (H1N1) pdm на нелетальной модели хорька.

Обычно считается, что инфекции гриппа А у хорьков имеют сходный патогенез с таковым у людей. Таким образом, конъюгат 45b был протестирован на нелетальной модели хорька, зараженного гриппом A/CA/07/09 и клинически значимым пандемическим штаммом H1N1. Вкратце, хорьки-самцы (возраст 3-5 месяцев) были получены на фермах Triple F и проверены на отсутствие антител к гриппу A H1N1. Каждый хорек получал либо конъюгат 45b, носитель (ФСБ), либо Fc hIgG1 в виде однократной внутривенной (в/в) инъекции за 24 ± 2,0 часа до заражения, либо осельтамивира фосфат (20 мг/кг) перорально через желудочный зонд, начиная за 4 ± 0,5 часа до инокуляции вируса гриппа. Введение осельтамивира продолжалось два раза в день (с интервалом 12 ± 1,5 часа) в течение 5 дней после заражения вирусом. Исследуемые концентрации и дизайн эксперимента подробно описаны в Таблице 151.

Хорьков заражали интраназально 1E6 инфекционными частицами гриппа A/California/07/2009 (H1N1) в объеме 0,5 мл после анестезии кетамином (25 мг/кг) и ксилазином (2 мг/кг). Животных также анестезировали, как указано выше, для введения исследуемых препаратов. Продолжительность исследования составляла 14 дней, и показания включали ежедневное измерение массы тела (МТ), клинические признаки, температуру и назальные смывы (0,5 мл) или мазки из зева во время, указанное в Таблице 151. Вирусную нагрузку в назальных смывах определяли с помощью стандартных анализов бляшкообразования с использованием клеток MDCK. Вирусную нагрузку мазков из зева определяли с использованием стандартных методов количественной ПЦР. Образцы плазмы также получали от животных группы 6 (получивших 3 мг/кг конъюгата 45b) через 5 минут, 2, 24, 72 и 120 часов. Как подробно показано в Таблице 152, контрольные животные, получавшие носитель (ФСБ) или Fc, начали терять МТ только начиная с 1-го дня, достигая пика на 6-й день (10,8 и 10,1%, соответственно). Аналогичное снижение массы тела также наблюдалось при самой низкой дозе конъюгата 45b (0,3 мг/кг). Напротив, у хорьков, получавших конъюгат в дозах от 1 до 30 мг/кг, наблюдалось примерно 50-процентное снижение потери массы тела.

Как и предсказывалось на основе МТ, конъюгат 45b также продемонстрировал снижение вирусной нагрузки в результате назальных смывов, основного очага гриппа у хорьков (таблица 153 и таблица 154). Эффективность конъюгата 45b в наибольшей степени продемонстрирована при нагрузках на 2-й день, когда снижение, близкое к 2-Log, достигается при самой высокой дозе по сравнению с животными, получавшими носитель. Кроме того, снижение титра вируса с помощью конъюгата 45b зависит от дозы от 30 до 1 мг/кг. Эта тенденция в значительной степени повторяется в титрах на 4-й день, хотя и немного снижается, поскольку иммунная система играет большую роль в нелетальных моделях хорьков (о чем свидетельствует снижение титров, при введении носителя между 2-м и 4-м днями).

Основываясь на двух первичных данных исследования (назальные титры и МТ), в совокупности эти данные демонстрируют способность конъюгата 45b достигать верхних дыхательных путей в терапевтических концентрациях на важной модели, отражающей заболевание человека.

Таблица 151: Дизайн исследования и схема дозирования

Группа	N	Тестируемый материал	Способ введения/ Схема	Доза (мг/кг)	Назальные смывы	Мазки из зева
1	5	ФСБ (носитель)	в/в, однократно, Т-24 ч.	---	2,4,6,8	2,4,6,8
2	5	Fc hIgG1	в/в, однократно, Т-24 ч.	30	2,4,6,8	---
3	5	Осельтамивир[1]	п/о, два раза в день в течение 5 дней, -4 ч.	20	2,4,6,8	---
4	5	Конъюгат 45b	в/в, однократно, Т-24 ч.	30	2,4,6,8	2,4,6,8
5	5	Конъюгат 45b	в/в, однократно, Т-24 ч.	10	2,4,6,8	2,4,6,8
6	5	Конъюгат 45b	в/в, однократно, Т-24 ч.	3	2,4,6,8	2,4,6,8
7	5	Конъюгат 45b	в/в, однократно, Т-24 ч.	1	2,4,6,8	2,4,6,8
8	5	Конъюгат 45b	в/в, однократно, Т-24 ч.	0,3	2,4,6,8	---

Таблица 152: Среднее изменение массы тела по дням (% от исходного)

Группа	День													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1	0,08	-4,34	-5,60	-6,15	-7,31	-10,80	-9,77	-7,61	-7,05	-5,67	-5,20	-5,53	-4,36	-4,23
G2	-1,90	-6,35	-7,19	-7,60	-8,02	-10,06	-9,71	-9,54	-7,71	-6,66	-5,94	-6,38	-7,32	-4,99
G3	1,78	-0,39	-0,90	-0,14	-0,90	-1,78	-1,00	-1,19	-2,57	0,04	0,39	0,10	0,22	2,15
G4	-1,59	-4,47	-3,26	-3,10	-3,81	-5,23	-5,34	-5,47	-5,51	-5,14	-5,12	-4,56	-5,23	-4,56
G5	0,41	-3,45	-2,95	-3,33	-2,90	-3,65	-4,03	-4,00	-4,46	-3,29	-3,29	-3,89	-3,06	-2,69
G6	-0,51	-6,03	-4,55	-3,43	-4,19	-5,72	-4,99	-5,90	-4,81	-4,09	-4,23	-2,51	-3,33	-2,69

G7	-0,47	-4,76	-5,29	-4,43	-5,97	-6,10	-5,95	-5,33	-4,98	-4,27	-4,17	-2,85	-4,17	-3,39
G8	0,10	-5,50	-7,74	-8,98	-9,76	-11,52	-9,16	-8,35	-7,73	-6,06	-4,63	-4,84	-4,53	-4,24

Таблица 153: Вирусная нагрузка в назальных смывах (Log10)

	День 2	**День 4**	**День 6**	**День 8**
G1	6,12	4,36	Ниже НПКО	Ниже НПКО
G2	6,31	4,42	Ниже НПКО	Ниже НПКО
G3	5,80	-- --	Ниже НПКО	Ниже НПКО
G4	4,26	3,12	Ниже НПКО	Ниже НПКО
G5	4,34	3,37	Ниже НПКО	Ниже НПКО
G6	5,11	3,44	Ниже НПКО	Ниже НПКО
G7	5,62	3,84	Ниже НПКО	Ниже НПКО
G8	6,07	3,56	Ниже НПКО	Ниже НПКО

Таблица 154: Изменение вирусной нагрузки по сравнению с носителем (G1) (Log 10)

	День 2	**День 4**	**День 6**	**День 8**
G1	0,00	0,00	нд	нд
G2	0,19	0,06	нд	нд
G3	-0,32	-- --	нд	нд
G4	-1,86	-1,24	нд	нд
G5	-1,79	-0,99	нд	нд
G6	-1,01	-0,92	нд	нд
G7	-0,50	-0,52	нд	нд
G8	-0,06	-0,80	нд	нд

Также были зарегистрированы изменения температуры (AM и PM) и перечислены в таблице 155. Изменения температуры в ходе исследования в значительной степени подтверждают эффективность конъюгата 45b, наблюдаемую при заложенности носа и массе тела. Наиболее заметно общее сокращение времени, в течение которого у животных наблюдается повышенная температура при лечении конъюгатом 45b или осельтамивиром по сравнению с хорьками, получавшими носитель.

В этом исследовании животных наблюдали ежедневно и оценивали клинические симптомы гриппа и их тяжесть. В этой нелетальной модели чихание было доминирующим признаком болезни, зарегистрированным лаборантами (таблица 156). По сравнению с хорьками, получавшими носитель, у животных, получавших конъюгат 45b, или в положительном контроле наблюдалось меньше случаев чихания, которые исчезали быстрее по сравнению с группой 1. Для ясности группа лечения 0,3 мг/кг вместе с группами

носителя и осельтамивира представлена на Фиг. 96.

В этом исследовании конъюгат 45b продемонстрировал сильную активность по сравнению с животными, получавшими носитель, по всем показателям (назальная нагрузка, масса тела, температура и клиническая оценка). Важно отметить, что конъюгат 45b был более эффективен, чем значительно более высокие дозы осельтамивира, в снижении вирусной нагрузки в назальных смывах, что является основным показателем этого исследования. Наблюдаемая эффективность конъюгата 45b в важной модели, признанной имитирующей болезнь человека, подтверждает терапевтический потенциал этого кандидата.

Таблица 155: Изменения температуры в течение исследования

	Среднее изменение градусов (°C) по дням и часам (AM/PM)																	
Группа	1 (AM)	1 (PM)	2 (AM)	2 (PM)	3 (AM)	3 (PM)	4 (AM)	4 (PM)	5 (AM)	5 (PM)	6 (AM)	7 (AM)	8 (AM)	9 (AM)	10 (AM)	11 (AM)	12 (AM)	13 (AM)	14 (AM)
G1	0,8	0,9	0,2	0,5	0,8	0,2	0,1	-1,1	0,5	-0,1	0,5	0,6	0,0	0,6	0,2	0,4	0,5	0,3	-0,4
G2	1,2	0,8	-0,3	0,1	-1,1	0,7	0,5	-0,2	0,0	-0,4	0,8	0,6	0,5	0,5	0,0	0,8	0,5	0,5	-0,4
G3	-0,4	-0,1	0,8	0,0	-0,6	-0,3	0,5	-1,7	-0,3	-0,8	0,2	-0,1	-0,2	0,1	-1,2	-0,1	0,4	0,1	-0,1
G4	-0,9	-0,3	0,6	-0,8	-1,4	-0,5	0,2	-1,4	-0,9	-1,2	0,3	0,0	-0,4	0,5	0,3	0,1	0,1	0,3	-0,8
G5	-0,2	-0,1	0,7	-0,7	-0,8	-0,7	-0,4	-1,7	-0,1	-1,1	0,2	0,0	-0,2	0,1	-0,2	0,2	0,1	0,1	-0,4
G6	0,1	0,6	1,1	-0,1	-1,2	-0,8	0,7	-0,5	-0,7	-0,7	0,8	0,3	-0,4	0,2	0,4	0,1	0,1	0,5	-0,5
G7	-0,3	0,0	0,8	-0,5	-1,8	-0,4	-0,3	-1,1	-0,6	-0,9	-0,4	0,6	-0,1	-0,7	-0,2	0,1	0,3	0,5	0,1
G8	-0,1	0,6	0,8	0,1	-1,6	-0,4	0,3	-0,6	-0,2	-1,0	0,0	-0,3	0,1	-0,4	-0,2	0,2	0,1	0,2	-0,1

Таблица 156: Клинические показатели

Группа	**Количество животных с клиническими признаками в сутки**													
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
G1	0	3	2	2	3	2	4	4	2	3	3	0	2	0

G2	0	1	2	1	1	3	2	2	3	3	0	0	0	0
G3	0	0	2	2	1	1	2	1	0	1	0	0	1	0
G4	0	2	1	2	3	1	1	1	1	2	1	0	0	0
G5	0	2	2	2	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0
G6	0	1	1	2	1	0	2	0	0	3	0	0	0	0
G7	0	2	2	1	1	2	3	1	1	1	0	1	0	0
G8	0	1	2	1	1	3	1	1	1	0	1	0	0	0

Пример 183. 5-дневный анализ фармакокинетики конъюгата 45b у хорьков после однократной внутривенной инъекции 3 мг/кг

Исследования фармакокинетики хорьков были проведены Исследовательским институтом IIT (IITRI) на самцах хорьках в возрасте 3-5 месяцев. Хорькам (n = 5) вводили конъюгат 45b путем однократной внутривенной (в/в) инъекции в дозе 3 мг/кг (объем дозы 2 мл) за 24 часа до интраназального заражения 1 x 10^6 бляшкообразующих единиц (БОЕ) вируса гриппа A/California/07/2009 (H1N1). Перед введением дозы и заражением вирусом хорьков анестезировали смесью кетамина (25 мг/кг) и ксилазина (2 мг/кг). Кровь (~0,5-1 мл) собирали через 5 минут, 2, 24, 72 и 120 часов после введения дозы и обрабатывали для получения плазмы. Назальный смыв (0,5 мл в ФСБ) собирали на 2, 4, 6 и 8 дни. Молекулы конъюгата 45b захватывают на планшетах, покрытых нейраминидазой (NA) или Fc, а затем обнаруживают с использованием конъюгированного с ПХ антитела к IgG-Fc человека. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 45b. Средние концентрации в плазме использовали для расчета фармакокинетических параметров с помощью Phoenix WinNonlin 7.0. Более подробное описание способа приведено ниже.

В ИФА с захватом NA 96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (кат. № 12-565-136, ThermoFisher) покрывали 0,1 ед./лунку NA от A/California/04/2009 (H1N1) (кат. № 11058- VNAHC, Sino Biological) в покрывабщем буфере 1X KPL (кат. № 5150-0041, SeraCare). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Последовательные разведения образцов плазмы помещали в планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов при встряхивании (разбавитель образца: 0,5% BSA в ФСБ 0,025% Tween 20 + конечная концентрация в плазме не получавших лечение хорьков 1:100; плазма была исключена из образцов назального смыва). Стандартные кривые конъюгата 45b в диапазоне от 0,230 до 500 нг/мл получали на каждом планшете в двух повторах. После 2-часовой инкубации планшеты промывали 5 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20. Конъюгат, связанный с NA на планшетах затем зондировали конъюгированным с ПХ антителом против Fc F(ab')2 IgG человека (кат. № 709-036-098, Jackson), разбавленным 1:2000 в разбавителе в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл ФСБ с 0,05% Tween 20 и проявляли субстратом TMB в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали при помощи 1 н. H_2SO_4. Поглощение измеряли при 450 нм с помощью многорежимного планшет-ридера EnSpire (PerkinElmer). Количество конъюгата 45b в образцах плазмы было интерполировано с использованием программы GraphPad Prism версии 8 после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный, 4PL-анализ) стандартных кривых. Полученные

средние концентрации в плазме затем использовали для расчета фармакокинетических параметров с помощью некомпартментного анализа с использованием Phoenix WinNonlin 7.0.

В ИФА с захватом Fc 96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (кат. № 12-565-136, ThermoFisher) покрывали в течение ночи при 4 °C 0,1 мкг/100 мкл/лунку мышиного клона R10Z8E9 антитела к IgG человека (домен CH2) (кат. № MCA5748G, BioRad) в карбонатном буфере (кат. № C3041, MilliporeSigma). Планшеты промывали 5 раз 300 мкл/лунка PBST и блокировали 200 мкл/лунку 5% обезжиренного сухого молока (кат. № 9999S, Cell Signaling Technology) в PBST в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Последовательные разведения образцов плазмы помещали в планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов при встряхивании (разбавитель образца: 2,5% обезжиренного сухого молока в ФСБ 0,025% Tween 20 + конечная концентрация в плазме не получавших лечение хорьков 1:100; плазма была исключена из образцов назального смыва). Стандартные кривые конъюгата 45b в диапазоне от 0,03 до 55 нг/мл получали на каждом планшете в двух повторах. После 2-часовой инкубации планшеты 5 раз промывали 300 мкл/лунку PBST. Затем конъюгат, связанный с Fc на планшетах, исследовали с помощью 100 мкл/лунку конъюгированного с ПХ антитела к IgG человека Fc F(ab')2 (кат. № 709-036-098, Jackson Immunoresearch), разбавленного 1:2000 в разбавителе образца в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл/лунку PBST и проявляли 100 мкл/лунку реагентом субстрата TMB (кат. № 555214, BD) в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл/лунку 1 н. H_2SO_4 и измеряли оптическую плотность при 450 нм с помощью многорежимного планшет-ридера EnSpire (PerkinElmer). Конъюгат 45b в образцах плазмы интерполировали с использованием нелинейного регрессионного анализа, и параметры ФК рассчитывали, как описано выше.

Профили ФК, сравнивающие уровни конъюгата 45b в плазме и назальных смывах, показаны на Фиг. 93 и 94, соответственно. Подобные уровни экспозиции конъюгата 45b в плазме наблюдались для ИФА для NA- и Fc-захвата. Средняя концентрация конъюгата 45b в плазме хорька составляла ~10 мкг/мл на 5-й день после однократного внутривенного введения дозы 3 мг/кг. Уровни в назальных смывах составляли примерно 3-5% от уровней в плазме в соответствующие моменты времени.

Пример 184. Эффективность конъюгата 45b, вводимого подкожно, против гриппа A/PR/8/34 (H1N1) в летальной модели мышей с высокой вирусной нагрузкой

Конъюгат 45b оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/PR/8/34) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. Эксперимент включал 10 групп по 5 мышей в 2 экспериментальных группах. На 0 день мышей заражали вирусом в 2-кратной LD95 (1x; группы 1-5) путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл или 50-кратной LD95 (25x; группы 6-10) после анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Смертность и массу тела регистрировали ежедневно в течение 14 часов, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее. Исследуемые группы получали однократное подкожное (п/к) введение конъюгата 45b в дозах 3, 1, 0,3 или 0,1 мг/кг через 2 часа после заражения вирусом в объеме дозы 10 мл/кг. Дизайн исследования обобщен в таблице 157.

В группе исследования 1x мыши, получавшие носитель, умерли от контрольного вируса на 6 день. Конъюгат 45b, напротив, продемонстрировал исключительную эффективность и полностью защитил 1x зараженных вирусом мышей при самой низкой дозе (таблица 158A). Данные о массе тела (таблица 159A)

показали временную потерю массы тела, которая в значительной степени восстановилась к концу исследования для всех мышей, получавших конъюгат 45b.

В группах, зараженных в 25 раз большим количеством вируса (в 50 раз выше LD95), мыши погибали от инфекции быстрее, при этом смертность достигала 80% к 5-му дню и 100% смертности к 6-му дню (таблица 158B). Мыши, получавшие лечение конъюгатом 45b, были полностью защищены при дозах 1 или 3 мг/кг, в то время как в группе 0,3 мг/кг выживаемость составила 60%. Удивительно, но даже при большей вирусной нагрузке лечение 1 и 3 мг/кг показало лишь незначительное снижение массы тела и завершило исследование чистым увеличением массы тела (таблица 159B).

Это исследование демонстрирует исключительную активность конъюгата 45b даже при заражении очень высокими титрами вируса.

Таблица 157: Общий дизайн исследования

Группа	**Штамм гриппа А**	**Исследуемый препарат**	**Путь, схема (T+2 часа)**	**Доза (мг/кг)**	**N**
1	A/PR/8/34 (H1N1) **3E2** БОЕ/мышь через интраназальный путь введения	Носитель (ФСБ)	п/к, однократная доза	---	5
2		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	3	5
3		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	1	5
4		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,3	5
5		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,1	5
6	A/PR/8/34 (H1N1) **7,5E3** БОЕ/мышь через интраназальный путь введения	Носитель (ФСБ)	п/к, однократная доза	---	5
7		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	3	5
8		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	1	5
9		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,3	5
10		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,1	5

Таблица 158A: Процент выживаемости (1x заражение)

		Конъюгат 45b (мг/кг)			
День	**Носитель**	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**
0	100	100	100	100	100

		Конъюгат 45b (мг/кг)			
День	**Носитель**	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100
6	0	100	100	100	100
7	0	100	100	100	100
8	0	100	100	100	100
9	0	100	100	100	100
10	0	100	100	100	100
11	0	100	100	100	100
12	0	100	100	100	100
13	0	100	100	100	100
14	0	100	100	100	100

Таблица 158B: Процент выживаемости (25x заражение)

		Конъюгат 45b (мг/кг)			
День	**Носитель**	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	20	100	100	80	60
6	0	100	100	60	0
7	0	100	100	60	0
8	0	100	100	60	0
9	0	100	100	60	0
10	0	100	100	60	0
11	0	100	100	60	0
12	0	100	100	60	0
13	0	100	100	60	0
14	0	100	100	60	0

Таблица 159A: Процентное изменение массы тела (1x заражение)

		Конъюгат 45b (мг/кг)			
День	**Носитель**	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**
0	100	100	100	100	100
1	98,5	97,5	96,1	96,6	98,2
2	99,6	98,2	99,9	97,5	100
3	92,8	97,4	98,6	95,8	96,8
4	85,7	98,7	98,9	93,7	90,4
5	79	98,4	100,1	95,6	92,4
6		99,5	99,2	96,7	91,4
7		100,7	101,3	98,9	88,5
8		97,8	99,2	96,9	н/в
9		102,9	103,2	100,7	92,1
10		101,4	101,4	99,7	95,9
11		100,9	101,5	99,6	96,7
12		102,1	104,5	100,9	98,8
13		102,7	102,6	101,8	99,3
14		101,9	103,4	101,1	98,6

н/в= не выполнено

Таблица 159B: Процентное изменение массы тела (25x заражение)

		Конъюгат 45b (мг/кг)			
День	**Носитель**	**3**	**1**	**0,3**	**0,1**
0	100	100	100	100	100
1	97,2	96,6	97,4	97,6	98,6
2	95	99,6	100,9	98	98,7
3	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
4	79,9	98,5	90,3	82,8	82,5
5	75,7	100,3	91,5	82,7	76,7
6		100,2	96,4		
7		102,2	99,1		
8		99,5	97,5		
9		104,3	103		
10		103,5	102,2		
11		102,9	103,4		
12		105,5	106,1		
13		105,8	105,1		
14		103,9	106		

н/в= не выполнено

Пример 185. Активность конъюгата 45b против высокопатогенного штамма вируса гриппа A (H5N1, H7N9) в анализе цитопатических эффектов (CPE)

Анализ in vitro для определения активности конъюгата 45b проводили против BSL-3 (высокопатогенный штамм) гриппа A и, как правило, с соблюдением стандартных процедур. Вкратце, различные концентрации исследуемых препаратов смешивали с вирусом (приблизительно 250 TC_{ID50}) и позволяли инкубации при 35 °C в течение одного часа. После инкубации смесь добавляли к 80-90% конфлюэнтному монослою клеток MDCK. После 90-минутной инкубации клетки промывали и повторно наносили исследуемый препарат. Затем монослой покрыли карбоксиметилцеллюлозой, чтобы свести к минимуму распространение вируса, и оставляли инкубироваться в течение двух дней. Через два дня культивирования клетки промывали ФСБ и фиксировали 10% формалином. После фиксации монослой MDCK подвергали проницаемости с помощью Triton X-100 и иммуноокрашивали мышиным mAb против нуклеопротеина гриппа. Монослои считывали и рассчитывали площадь окрашивания на лунку для определения значений $EC_{50/100}$.

Результаты исследования обобщены в таблице 160 и демонстрируют активность конъюгата 45b в отношении высокопатогенных штаммов с пандемическим потенциалом. Важно отметить, что конъюгат 45b генерировал значения IC_{50} на уровне 17 нМ или ниже против четырех изолятов H5N1 и одного изолята H7N9. Напротив, осельтамивир и занамивир продемонстрировали неполный охват штаммов с высокой степенью распространения в этой панели. Наиболее заметным было отсутствие их активности против важного изолята H7N9. Однако конъюгат 45b обладал высокой эффективностью против этого изолята (0,5 нМ). Эти результаты демонстрируют, что потенциал конъюгата 45b для лечения пандемий, вызванных высоковирулентным гриппом, превосходит потенциал осельтамивира и занамивира и примерно равен балоксавиру.

Таблица 160: Активность конъюгата 45b in vitro в отношении изолятов высокопатогенного вируса гриппа.

		IC50 для репликации вируса (в нМ)				
Тип гриппа	**Тип HA/NA**	**Конъюгат 45b**	**Конъюгат 6**	**Осельтамивир**	**Балоксавир**	**Занамивир**
A/Vietnam/1194/2004	H5N1 (клада 1)	5,3	0,5	168,7	1,7	16,9
A/Indonesia/05/2005	H5N1 (клада 2.1)	16,9	0,5	≥ 300	1,7	16,9
A/Turkey/turkey/1/2005	H5N1 (клада 2,2)	1,7	0,5	168,7	1,7	5,3
A/Hong Kong/156/	H5N1 (клада 0)	0,5	1,7	≥ 300	1,7	53,3
A/Anhui/1/2013	H7N9	0,5	0,2	≥ 300	5,3	≥ 300
A/Netherlands/602/2009	H1N1*	1,7	0,5	≥ 300	1,7	≥ 300
***: Препарат для сравнения**						

против сезонного гриппа					

Пример 186. 8-дневный анализ фармакокинетики конъюгата 45b в назальных смывах хорьков после однократной внутривенной инъекции в дозах 30, 10, 3, 1 или 0,3 мг/кг

Исследования фармакокинетики хорьков были проведены Исследовательским институтом IIT (IITRI) на самцах хорьках в возрасте 3-5 месяцев. Хорькам (n = 5) вводили конъюгат 45b путем однократной внутривенной (в/в) инъекции в дозе 30, 10, 3, 1 или 0,3 мг/кг (объем дозы 2 мл) за 24 часа до интраназального заражения 1 x 10^6 бляшкообразующих единиц (БОЕ) вируса гриппа A/California/07/2009 (H1N1). Перед введением дозы и заражением вирусом хорьков анестезировали смесью кетамина (25 мг/кг) и ксилазина (2 мг/кг). Назальные смывы собирали на 2, 4, 6 и 8 день после заражения путем анестезии животных кетамином (25 мг/кг) и ксилазином (2 мг/кг), вводя 0,5 мл стерильного ФСБ с добавлением пенициллина (100 ЕД/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и гентамицина (50 мкг/мл) в каждую ноздрю и сбор выделенной жидкости в стакан для образцов. Регистрировали объем выделенного назального смыва и определяли концентрацию конъюгата 45b с помощью ИФА с захватом Fc. Молекулы конъюгата 45b захватывали на планшеты, покрытые нейраминидазой, или планшеты, покрытые антителом против hIgG1, а затем определяли с помощью конъюгированного с ПХ антитела против IgG-Fc человека. hIgG1 был захвачен с использованием антитела против Fc hIgG1.

Вкратце, 96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (кат. № 12-565-136, ThermoFisher) покрывали в течение ночи при 4 °C 0,1 мкг/100 мкл/лунку мышиного клона R10Z8E9 антитела к IgG человека (домен CH2) (кат. № MCA5748G, BioRad) в карбонатном буфере (кат. № C3041, MilliporeSigma). Планшеты промывали 5 раз 300 мкл/лунку PBST и блокировали 200 мкл/лунку 5% обезжиренного сухого молока (кат. № 9999S, Cell Signaling Technology) в PBST в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании на орбитальном шейкере для планшетов (500 об/мин). Образцы назального смыва сначала разбавляли 1:10 в разбавителе, соответствующем матрице (разведение 1:10 назального смыва от интактных животных в ФСБ с 0,5% BSA и 0,025% Tween 20), затем серийно разбавляли в 3 раза и добавляли 100 мкл на лунку в планшеты и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов при встряхивании. Стандартные кривые для конъюгата 45b в диапазоне от 0,03 до 55 нг/мл были построены на каждом планшете в двух повторах. После 2-часовой инкубации планшеты 5 раз промывали 300 мкл/лунку PBST. Затем конъюгат 45b связанный с Fc на планшетах, исследовали с помощью 100 мкл/лунку конъюгированного с ПХ антитела к IgG человека Fc F(ab')2 (кат. № 709-036-098, Jackson Immunoresearch), разбавленного 1:2000 в разбавителе образца в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Затем планшеты промывали 8 раз в 300 мкл/лунку PBST и проявляли 100 мкл/лунку реагентом субстрата TMB (кат. № 555214, BD) в течение 7-8 минут. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл/лунку 1 н. H_2SO_4 и измеряли оптическую плотность при 450 нм с помощью многорежимного планшет-ридера ENSPIRE® (PerkinElmer). Конъюгат 45b в образцах назального смыва хорька интерполировали с использованием GraphPad Prism Version 8 после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальный анализ, 4PL-анализ) стандартных кривых. Профили фармакокинетики, сравнивающие конъюгат 45b в назальных смывах хорьков, показаны на Фиг. 94 и фиг. 95. Пропорциональное дозе увеличение уровней конъюгата 45b в назальном смыве хорьков наблюдали между 0,3 и 30 мг/кг при внутривенном введении. 8-дневный момент времени для когорты с дозой 0,3 мг/кг был ниже предела обнаружения захвата Fc (1 нг/мл).

Пример 187. Эффективность конъюгата 45b против гриппа A (H1N1) в летальной мышиной модели гриппа при дозировании тремя различными путями

Конъюгат 45b оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус для провокационного заражения (A/California/07/2009) представляет собой пандемический изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 10 групп по 5 мышей. На 0 день всех мышей заражали вирусом в 3-кратной дозе LD_{95} (~3E4 вирус/мышь) путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл после легкой анестезии кетамином/ксилазином (100 и 10 мг/кг, соответственно). Группы получали однократное введение конъюгатом 45b или носителем (ФСБ) через 2 часа после заражения либо внутривенно (в/в), внутримышечно (в/м), либо подкожно (п/к) (таблица 160). Смертность и массу тела (МТ) контролировали ежедневно в течение 14 дней. Любую мышь, потерявшая более 20% МТ, засчитывали как умершую.

Таблица 160: Общий дизайн исследования

Группа	**Штамм гриппа A**	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема (T+2 ч)**	**Доза (мг/кг)**	**N**
1	A/CA/07/09 (H1N1) 3E4 БОЕ/мышь через интраназальный путь введения	Носитель (ФСБ)	в/в, однократная доза	---	5
2		Конъюгат 45b	в/в, однократная доза	1	5
3		Конъюгат 45b	в/в, однократная доза	0,3	5
4		Конъюгат 45b	в/в, однократная доза	0,1	5
5		Конъюгат 45b	в/м, однократная доза	1	5
6		Конъюгат 45b	в/м, однократная доза	0,3	5
7		Конъюгат 45b	в/м, однократная доза	0,1	5
8		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	1	5
9		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,3	5
10		Конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,1	5

Для определения активности конъюгата 45b соответствующие концентрации конъюгата (1, 0,3 и 0,1 мг/кг) вводили различными путями, в/в, в/м или п/к. При измерении выживаемости все способы дозирования были 100% эффективными при любом способе введения дозы в дозе 0,1 мг/кг, которая ранее была определена как самая низкая эффективная доза при подкожном введении конъюгата 45b (таблица 161). Однако у мышей, получавших носитель, к 6 дню смертность достигала 80%. При измерении выживаемости эти данные демонстрируют эквивалентную эффективность конъюгата 45b независимо от пути введения дозы.

Таблица 161: Процент выживаемости

	Носитель	Конъюгат 45b (путь введения дозы) (мг/кг)								
		в/в			ВМ			п/к		
День		**1**	**0,3**	**0,1**	**1**	**0,3**	**0,1**	**1**	**0,3**	**0,1**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
11	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
13	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100
14	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Данные о массе тела убедительно подтверждают данные о выживаемости, демонстрирующие, что конъюгат 45b обладает высокой эффективностью при любом способе введения дозы (таблица 162). Как обычно для этого высоковирулентного пандемического изолята, у мышей наблюдалась потеря МТ примерно на 10% примерно на 3-й или 4-й день. Поразительно, что разница в МТ между одинаковыми концентрациями дозы лишь минимально менялась в зависимости от пути введения дозы (см. курсив, таблица 162). Данные МТ из этого исследования дополнительно подтверждают вывод о том, что конъюгат 45b эффективен независимо от пути введения дозы.

Таблица 162: Процент массы тела*

	Носитель	**Конъюгат 45b (путь введения дозы) (мг/кг)**								
		в/в			**ВМ**			**п/к**		
День		**1**	**0,3**	**0,1**	**1**	**0,3**	**0,1**	**1**	**0,3**	**0,1**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	96,3	96,6	98,5	96,9	97,6	98	100	100,3	99,9	101,1
2	96,8	100,7	100,7	100,3	101,8	100,2	100,9	101,9	101,3	101,4
3	87,7	91,4	*90,8*	91,9	92,3	91,3	90,4	93,1	90,8	90,7
4	82,8	94,3	91,1	89,8	94,5	91,4	*89*	91,3	*88*	88,4
5	80,8	97,5	94,2	92,2	96,6	93,5	93,1	95,1	90	89,5
6	78,9	97,4	95,5	93,2	96,8	95,2	94,8	96,8	90,6	90,1
7		100,1	97,5	96,8	99,7	96,7	96,7	96,9	95	92,9

	Носитель	Конъюгат 45b (путь введения дозы) (мг/кг)								
		в/в			ВМ			п/к		
День		1	0,3	0,1	1	0,3	0,1	1	0,3	0,1
8		98,5	97	95,1	98,4	94,9	96,4	97,1	94,8	93,2
9		99,8	96,8	95,7	98,5	94,8	95,7	96,6	93,8	93,3
10		99,3	97,3	95,5	98,7	94,8	97,7	95,2	94,8	93,9
11		103,4	100,8	101,4	103,3	100,1	101,1	100,2	99,4	98,1
12		102,3	100,4	100,3	101,7	99,4	100,5	99,1	98,2	98
13		102,2	100	99,8	101,4	99,5	101,1	99	98,7	98,4
14		103,6	101,8	100,4	102,5	101,2	102,7	101,9	100,4	99,9

*Данные являются средними по группе до первого летального исхода в группе

По двум различным показателям было обнаружено, что конъюгат 45b одинаково эффективен при внутривенном, подкожном или внутримышечном введении. Гибкость в отношении пути введения дозы конъюгата 45b является значительным преимуществом, позволяющим при необходимости использовать различные составы и пути введения дозы для больничных и амбулаторных условий.

Пример 188 Синтез конъюгата 46

Получение раствора реагента для клик-реакции: 0,0050M $CuSO_4$ в буферном растворе ФСБ: 10,0 мг $CuSO_4$ растворяли в 12,53 мл ФСБ, затем взяли 5,00 мл данного раствора $CuSO_4$ и добавили 43,1 мг BTTAA (номер CAS 1334179-85-9) и 247,5 мг аскорбата натрия с получением раствора реагента для клик-реакции (0,0050 M CuSO4, 0,020 M BTTAA и 0,25 M аскорбата натрия).

К раствору азидофункционализированного Fc (65,5 мг, 10,0 мл, 1,13 мкмоль, азидо-DAR~5,9, SEQ ID NO: 76) в центрифужную пробирку объемом 15 мл добавляли малую молекулу, дериватизированную алкином (22,7 мг, 15,2 мкмоль, описанную в ПС-83. Пример 145, 3,0 эквивалента на каждый азидо Fc). После осторожного перемешивания для растворения всех твердых веществ смесь обрабатывали раствором реагента для клик-реакции (1,80 мл). Полученную смесь осторожно вращали в течение 12 часа при температуре окружающей среды. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. Общий протокол очистки конъюгата). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 66420 Да (DAR = 5,8). Выход 57 мг при чистоте 98%. Полученный конъюгат изображен на Фиг. 102.

Заявитель отмечает, что конъюгат 46 может быть альтернативно получен с использованием домена Fc, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, что соответствует разнице в аллотипе Fc. Ожидается, что различные аллотипы будут вести себя одинаково в отношении описанных в данном документе свойств.

Заявитель также отмечает, что конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 46, включает нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67, которая включает С-концевой остаток лизина. После экспрессии С-концевой лизин Fc конъюгата 46 протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 76. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 189. 30-дневное сравнительное исследование фармакокинетики отличных от человека

приматов после внутривенного введения конъюгата 45b и конъюгата 46

Исследования фармакокинетики приматов (NHP) были выполнены компанией BTS Research (Сан-Диего, штат Калифорния) на самцах и самках яванского макака в возрасте 5-9 лет с массой тела 3,5-8,5 кг. NHP вводили внутривенно в количестве 2 мг/кг исследуемого препарата (0,4 мл/кг объема дозы). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из бедренной или головной вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения свертывания. Собранную кровь центрифугировали (2000 x g, в течение 10 минут) и брали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени (Таблица 163). Концентрации конъюгата 45b и конъюгата 46 в плазме в каждый момент времени измеряли с помощью ИФА «сэндвич» типа. Вкратце, исследуемые препараты помещали на планшеты, покрытые Fc, а затем обнаруживали с помощью конъюгированного с ПХ антитела к IgG-Fc человека. Концентрации белка рассчитывали в GraphPad Prism с использованием нелинейной регрессии 4PL стандартных кривых конъюгата 45b или конъюгата 46. Более подробное описание способа приведено выше. Кривые сравнения конъюгата 45b и конъюгата 46 показаны на фиг. 97. Конъюгат 46 демонстрирует значительно улучшенный конечный период полужизни, составляющий ~45 дней, по сравнению с ~10 днями для конъюгата 45b. AUC для конъюгата 46 в 2 раза выше, чем AUC для конъюгата 45b (таблица 163).

Таблица 163: ФК обезьяны, конъюгат 45b и конъюгат 46

				Время (ч)												
				0,25	**4**	**8**	**24**	**72**	**120**	**168**	**240**	**336**	**672**			
Доза (мг/кг)	**Способ введения**	**Конъюгат**		**Конц.**										**Tmax**	**Cmax**	**AUClast**	**Период полувыведения**
				(мкг/мл)										**(час)**	**(мкг/мл)**	**(ч*мкг/мл)**	**(час)**
2	в/в	Конъюгат 45b	Среднее значение	32,6	24,8	20,1	14,1	9,97	7,61	6,33	4,47	3,62	1,47	0,25	32,6	3450	249
2	в/в	Конъюгат 46	Среднее значение	35,4	29	25,7	20,5	15,1	13	11,2	10,4	8,71	7,97	0,25	35,4	7210	1080

Пример 190. Активность конъюгата 45b и препаратов сравнения стандарта лечения против сезонных, пандемических и устойчивых к лекарственным средствам штаммов гриппа A в анализе цитопатических эффектов (CPE)

Анализ in vitro для определения эффективности конъюгата 45b по сравнению с контролями

осельтамивира, занамивира и балоксавира проводили, как описано в примере 166, и, как правило, следовали стандартным процедурам. Данные приведены в таблицах 164-167.

Таблица 164: CPE против гриппа A/CA/07/2009 (H1N1)pdm в клетках MDCK SIAT1

Молекула	**MOI 0,001 EC_{50} [нМ]**	**MOI 0,01 EC_{50} [нМ]**
Осельтамивир	18,54	34,2
Занамивир	16,321	33,16
Конъюгат 45b	0,8355	2,964
Балоксавир	<0,3	2,216

Таблица 165: CPE против гриппа A ДТ и мутанта H275Y (H1N1) в клетках MDCK SIAT1

EC_{50} [нМ]	**Грипп A/California/12/2012 (H1N1)**		**Грипп A/Texas/23/2012 (H1N1) H275Y**	
Молекула	MOI 0,001	MOI 0,01	MOI 0,001	MOI 0,01
Осельтамивир	107,6	1653	>10000	>10000
Занамивир	54,59	558,1	327,7	>10000
Конъюгат 45b	0,7043	20,1	2,101	81,86
Балоксавир	3,718	4,924	3,318	21,24

Таблица 166: CPE против гриппа A ДТ и мутанта E119V (H3N2) в клетках MDCK SIAT1

EC_{50} цитопатического эффекта [нМ]	**Грипп A/Washington/12/2007 (H3N2)**		**Грипп A/Texas/12/2007 (H3N2) E119V**	
Молекула	MOI 0,001	MOI 0,01	MOI 0,001	MOI 0,01
Осельтамивир	Н/П	12,39	96,04	>10000
Занамивир	Н/П	29,57	50,17	940,1
Конъюгат 45b	Н/П	0,0637	1,193	43,12
Балоксавир	Н/П	0,9758	5,196	27,87

Таблица 167: CPE [нМ] против гриппа B при MOI 0,01

Молекула	TM	DAR	Fc	Центральный линкер	B/Florida/4/2006	B/Brisbane/60/2008	B/Malaysia/2506/2004	B/Colorado/6/2017
Осельтамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	1203	1568	735,7	>10000

Занамивир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	61,57	607,9	360,7	2746
Конъюгат 45b	ПС 83	4,2	SEQ ID NO: 73	15 атом	10,78	7,291	6,252	25,93
Балоксавир	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	20,95	46,84	61,33	100,9

Пример 191. 14-Дневное исследование фармакокинетики на мышах, сравнивающее концентрации конъюгата 45b в плазме и жидкости эпителиальной выстилки (ELF)

Самкам мышей BALB/c из Charles River Laboratories давали возможность акклиматизироваться в течение 5 дней до начала исследования. Животных содержали по 3-6 в клетке со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры были выполнены в соответствии с правилами и рекомендациями NeoSome IACUC. Мышам вводили подкожно (п/к) 20 мг/кг исследуемого препарата (10 мл/кг объема дозы). В выбранные моменты времени 3 мыши были подвергнуты эвтаназии с помощью ингаляции CO_2. Кровь собирали путем пункции сердца в пробирки с K_2EDTA для сохранения плазмы. После сбора крови выполняли бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), обнажая трахею, вставляя адаптер трубки 23G и выполняя промывки 2 x 0,5 мл стерильным 1X ФСБ при pH 7,4. Выделенный объем жидкости регистрировали и сохраняли. После завершения процедуры БАЛ легкие извлекали, взвешивали и хранили при -80°C. Аликвоты плазмы и жидкости БАЛ (ЖБАЛ) декантировали перед хранением образцов при температуре -80 °C для применения в количественном анализе мочевины. Собранный ЖБАЛ центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре для осаждения альвеолярных макрофагов, при этом осадок и супернатант хранили при -80 °C до отправки спонсору. Концентрации конъюгата 45b в плазме в каждый момент времени измеряли с помощью непрямого ИФА, как подробно описано выше. Вкратце, молекулы конъюгата 45b захватывают на планшетах, покрытых нейраминидазой (NA), и затем обнаруживают с использованием конъюгированного с ПХ Fcγ-специфического $F(ab')_2$ к IgG человека. Такой же ИФА проводили на ЖБАЛ, собранной как описано выше. Концентрации конъюгата 45b в плазме рассчитывали в GraphPad Prism с использованием нелинейной регрессии 4PL стандартных кривых конъюгата 45b. Объем ELF и концентрацию конъюгата 45b в ELF определяли с использованием мочевины в качестве маркера разбавления, как описано ранее (Rennard *et al*., 1986 *J Appl Physiol* 60:532-538). Кривые, сравнивающие конъюгат 45b с уровнями ELF, показаны на Фиг. 98. Через 2 часа после инъекции уровни конъюгата 45b в жидкости эпителиальной выстилки (ELF) составляют ~60% от уровней экспозиции в плазме (AUC) в течение всего остального времени, что указывает на почти немедленное выделение конъюгата 45b из плазмы в ELF в легких (Фиг. 98, таблица 168).

Таблица 168: Уровни конъюгата 45b в плазме и ELF у мышей в течение 2 недель.

	Время												
	(час)												
	1	**2**	**4**	**8**	**24**	**48**	**72**	**120**	**168**	**336**			
Группа	**Конц.**										**Tmax**	**Cmax**	**AUClast**
	(мкг/мл)										**(час)**	**(мкг/мл)**	**(ч*мкг/мл)**
ELF	5,6	29,	70,	98,	14	10	94,	49,	47,	16,	24	149	19000

	1	9	6	4	9	5	2	5	4	1			
Плазма	30,7	63,9	110	180	197	178	144	104	87	29,4	24	197	32500

Пример 192. 7-дневное исследование фармакокинетики на мышах, сравнивающее внутривенное, подкожное и внутримышечное введение конъюгата 45b мышам с SCID.

Исследования фармакокинетики мышей проводили с использованием самцов мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) в возрасте 6 недель, у которых отсутствует адаптивная иммунная система. Мышам вводили внутривенно, подкожно или внутримышечно 5 мг/кг исследуемого препарата (10 мл/кг объема дозы). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из ретроорбитальной, щечной или хвостовой вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь центрифугировали (2000 x *g* в течение 10 минут) и отбирали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени. Концентрации конъюгата 45b в плазме в каждый момент времени измеряли с ИФА, как подробно описано выше. Вкратце, молекулы конъюгата 45b захватывают на планшетах, покрытых нейраминидазой (NA), и затем обнаруживают с использованием конъюгированного с ПХ Fcγ-специфического $F(ab')_2$ к IgG человека. Для ИФА с захватом Fc hIgG1 захватывали с использованием антитела к Fc hIgG1 и затем детектировали с использованием конъюгированного с ПХ Fcγ-специфического $F(ab')_2$ к IgG человека. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 45b. Кривые, сравнивающие фармакокинетические профили конъюгата 45b у мышей с SCID в течение 7 дней, показаны на Фиг. 99-100. Уровни воздействия конъюгата 45b в плазме при п/к и в/м введении были сопоставимы, и получающаяся в В результате биодоступность при п/к или в/м введении составила приблизительно 77% по сравнению с в/в введением. Концентрации конъюгата 45b в плазме были одинаковыми для всех путей введения дозы примерно через 24 часа после инъекции.

Пример 193. 7-дневное исследование фармакокинетики на мышах, сравнивающее подкожное введение конъюгата 45b и конъюгата 46

ФК исследования на мышах проводили на самцах мышей линии CD-1 в возрасте 6 недель. Мышам подкожно инъецировали 10 мг/кг исследуемого препарата (объем дозы 10 мл/кг). Животных содержали в стандартных условиях содержания, одобренных IACUC. В соответствующие нетерминальные моменты времени у животных отбирали образцы крови (из ретроорбитальной, щечной или хвостовой вены) в пробирки с K_2ЭДТА для предотвращения коагуляции. Собранную кровь центрифугировали (2000 x *g* в течение 10 минут) и отбирали плазму для анализа концентраций исследуемого препарата с течением времени. Концентрации конъюгата 45b в плазме в каждый момент времени измеряли с помощью непрямого ИФА, как подробно описано выше. Вкратце, молекулы конъюгата 45b захватывают на планшетах, покрытых нейраминидазой (NA), и затем обнаруживают с использованием конъюгированного с ПХ Fcγ-специфического $F(ab')_2$ к IgG человека. Концентрацию белка рассчитывали в программе GraphPad Prism с использованием 4PL нелинейной регрессии стандартных кривых конъюгата 45b. Кривые, сравнивающие 7-дневные фармакокинетические профили конъюгата 45b и конъюгата 46, показаны на фиг. 101. Уровни экспозиции конъюгата 46 в плазме были примерно на 50% выше, чем для конъюгата 46. Известно, что по сравнению с человеческим IgG1 дикого типа время полужизни варианта Fc IgG1 YTE человека, как известно, снижено у

мышей из-за усиленного связывания мышиного FcRn при нейтральном pH, что сводит на нет улучшенное связывание с мышиным FcRn при кислом pH (Dall' Acqua *et al*. 2002 *J Immunol* 169:5171-5180).

Пример 194. Комбинированное лечение конъюгатом 45b и балоксавиром

Цитопатический эффект (CPE). Монослой клеток MDCK Siat1 инфицировали подтипами гриппа A при соответствующей MOI, варьирующей от 0,01 до 1. Конъюгат 45b тестировали отдельно или в комбинации со стандартным средством для лечения, например, балоксавиром в концентрациях от 1 до 1000 нМ и инкубации в течение 3 дней для гриппа A при 37 °C, 5% CO_2. CPE определяли окрашиванием кристаллическим фиолетовым путем измерения поглощения при 595 нм. Данные приведены в таблицах 169-172. При использовании в комбинации с балоксавиром конъюгат 45b эффективен для ингибирования репликации вируса при значительно более низких концентрациях, чем при использовании отдельно (со снижением EC_{50} более чем в 10 раз), даже когда балоксавир присутствует в концентрациях ниже его EC_{50}.

Таблица 169: Изменение EC_{50} конъюгата 45b в присутствии фиксированных концентраций балоксавира в CPE по сравнению с гриппом A/CA/07/2009(H1N1)pdm в клетках MDCK SIAT при MOI 0,01

Молекула	**Балоксавир [нМ]**	**MOI 0,01, EC_{50} [нМ]**
Конъюгат 45	0	7,369
	1	0,7347
	2	<0,39
	4	<0,39
	8	<0,39
	16	<0,39
	32	<0,39
	64	<0,39

EC_{50} только балоксавира = 2,41 нМ

Таблица 170: Изменение EC_{50} конъюгата 45b в присутствии фиксированных концентраций балоксавира в анализах CPE по сравнению с гриппом A/CA/07/2009(H1N1)pdm в клетках MDCK SIAT при MOI, равной 0,1

Молекула	**Балоксавир [нМ]**	**MOI 0,1, EC_{50} [нМ]**
Конъюгат 45b	0	>100 (405,5)
	1	9,169
	2	4,671
	4	<0,39
	8	<0,39
	16	<0,39
	32	<0,39

Молекула	**Балоксавир [нМ]**	**MOI 0,1, EC_{50} [нМ]**
	64	<0,39

EC_{50} только балоксавира = 7,95 нМ

Таблица 171: Изменение EC_{50} конъюгата 45b в присутствии фиксированных концентраций балоксавира в анализах CPE на грипп A/Texas/71/2017 (H3N2)pdm в клетках MDCK SIAT при MOI, равной 0,01

Молекула	**Балоксавир [нМ]**	**MOI 0,01, EC_{50} [нМ]**
Конъюгат 45b	0	45,93
	1	5,242
	2	2,429
	4	0,8822
	8	0,2175
	16	0,02432
	32	0,04907
	64	0,1346

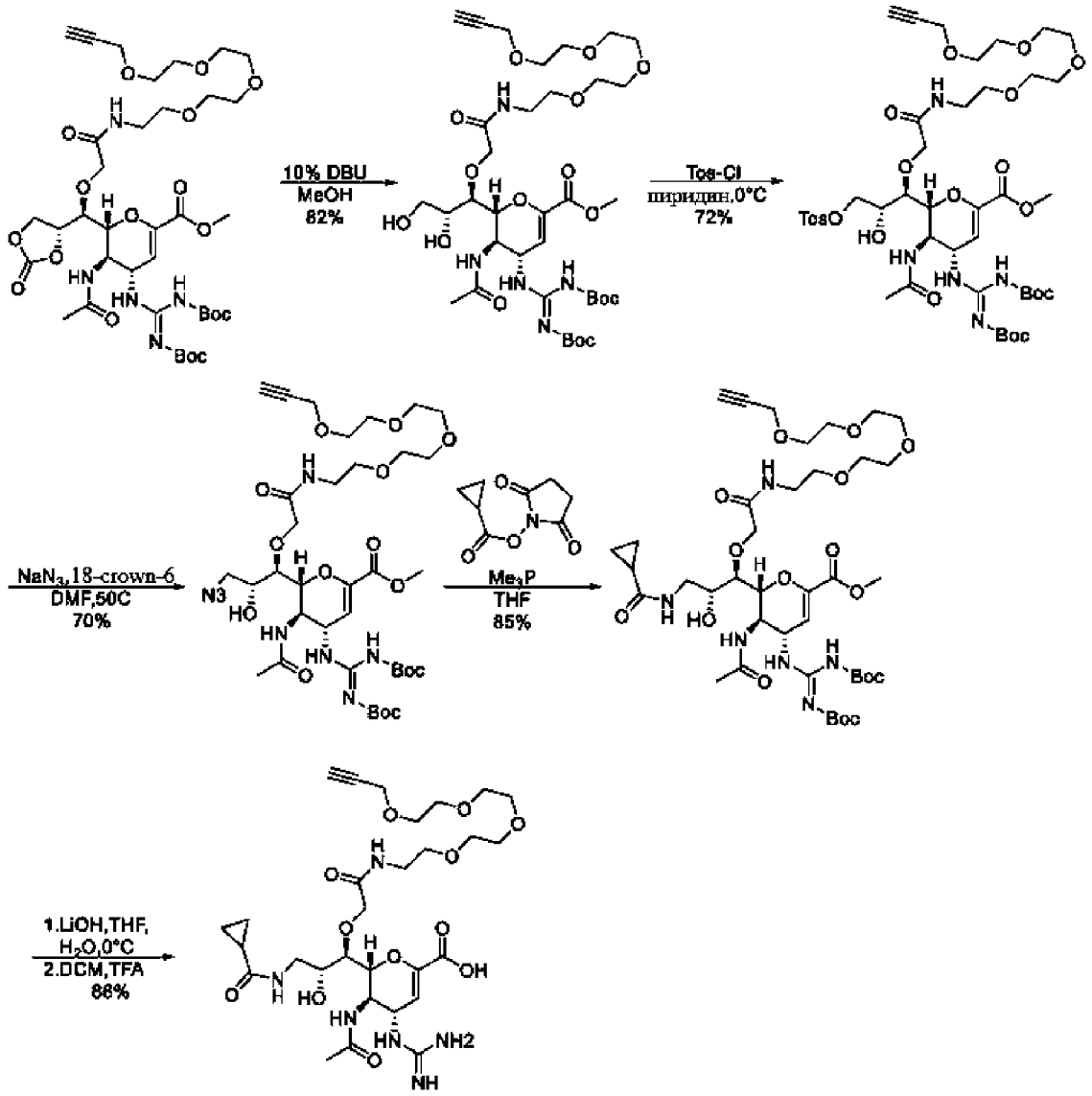
EC_{50} только балоксавира = 8,238 нМ

Таблица 172: Изменение EC50 конъюгата 45b в присутствии фиксированных концентраций балоксавира в анализах CPE по сравнению с гриппом A/Texas/71/2017 (H3N2)pdm в клетках MDCK SIAT при MOI, равной 0,1

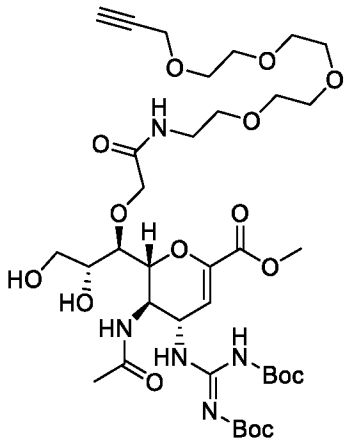
Молекула	**Балоксавир [нМ]**	**MOI 0,1, EC_{50} [нМ]**
Конъюгат 45b	0	30015
	1	105
	2	100,9
	4	10,17
	8	<0,39
	16	<0,39
	32	<0,39
	64	<0,39

EC_{50} только балоксавира = 17,31 нМ

Пример 195. Синтез ПС-91



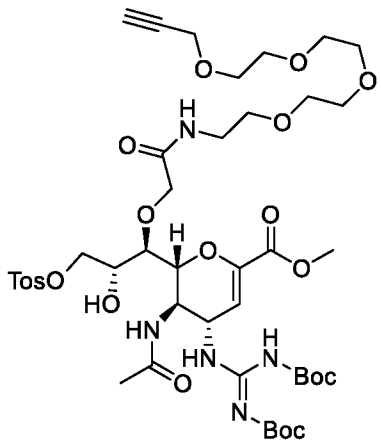
Стадия a.



К перемешиваемому при 0°C раствору ранее полученного производного занамивира (1,993 г, 2,362 ммоль, ПС-22, описанный в Примере 79) в метаноле (30 мл) добавляли DBU (2,4 мл). Температуру повышали до комнатной, и через 1 ч реакция развивалась исключительно до желаемого продукта. Все летучие вещества удаляли на роторном испарителе. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную

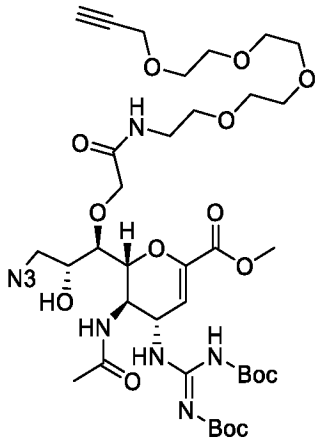
хроматографию Isco CombiFlash, элюируя метанолом от 0% до 30% и дихлорметаном. Выход: 1,584 г, 82%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H + Na)]^+ = 840,0$, $[(M + H)]^+ = 818,2$.

Стадия b.



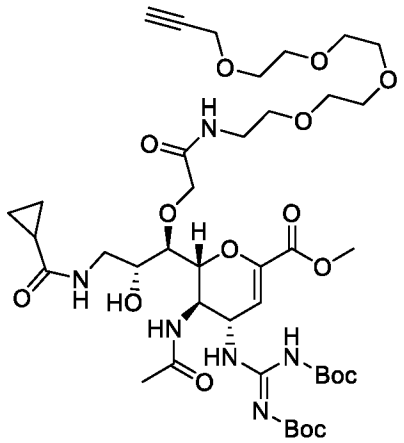
К перемешиваемому при 0 °C раствору продукта стадии a (500 мг, 0,611 ммоль) в пиридине (15,0 мл) добавляли тозилхлорид (146 мг, 0,764 ммоль) в 5,0 мл дихлорметана) в течение 1 часа с помощью шприцевого насоса. После полного израсходования тозилхлорида (мониторинг ВЭЖХ) таким же образом добавляли равную аликвоту тозилхлорида, и это добавление повторяли еще два раза (общее количество эквивалентов тозилхлорида в конце реакции составляло 5). Реакцию гасили метанолом (0,5 мл) и удаляли все летучие вещества на ротарном испарителе. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH® элюируя метанолом от 0% до 30% и дихлорметаном. Выход: 0,429 г, 72%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H)]^+ = 972,2$.

Стадия c.



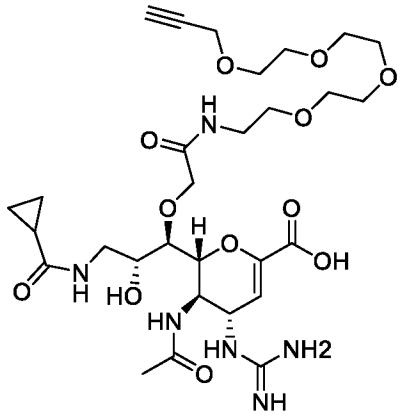
К перемешиваемому раствору продукта стадии b (547 мг, 0,563 ммоль) в ДМФ (5,0 мл) добавляли 18-краун-6 (59 мг, 0,225 ммоль) и азид натрия (183 мг, 2,814 ммоль), затем температуру поднимали до 50°C. После завершения реакции с помощью ЖХ-МС все летучие вещества удаляли на роторном испарителе. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH® элюируя метанолом от 0% до 30% и дихлорметаном. Выход: 0,333 г, 70%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H)]^+ = 843,2$.

Стадия d.



К перемешиваемому раствору продукта стадии c (548 мг, 0,650 ммоль) в ТГФ (8,0 мл) добавляли N-гидроксисукцинимидиловый эфир циклопропановой кислоты (237 мг, 1,300 ммоль) и триметилфосфин (133 мкл, 1,300 ммоль). После завершения ЖХ-МС все летучие вещества удаляли на роторном испарителе. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH® элюируя метанолом от 0% до 50% и дихлорметаном. Выход: 0,488 г, 85%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H)]^+$ = 885,2.

Стадия e.



К перемешиваемому при 0°C раствору продукта стадии d (488 мг, 0,551 ммоль) в тетрагидрофуране и воде (2,0 мл) добавляли гидроксид лития (14 мг, 0,606 ммоль). После завершения ЖХ-МС добавляли амберлит IRN-77 до тех пор, пока pH не становился кислым. Смесь фильтровали с помощью этилацетата и смолу отбрасывали. Все летучие вещества удаляли на роторном испарителе, а неочищенный материал растворяли в дихлорметане (4,0 мл) и ТФУ (2,0 мл). После завершения все летучие вещества выпаривали на роторном испарителе. Остаток очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 40% метанола и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 370 мг, 86%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H)]^+$ = 671,2.

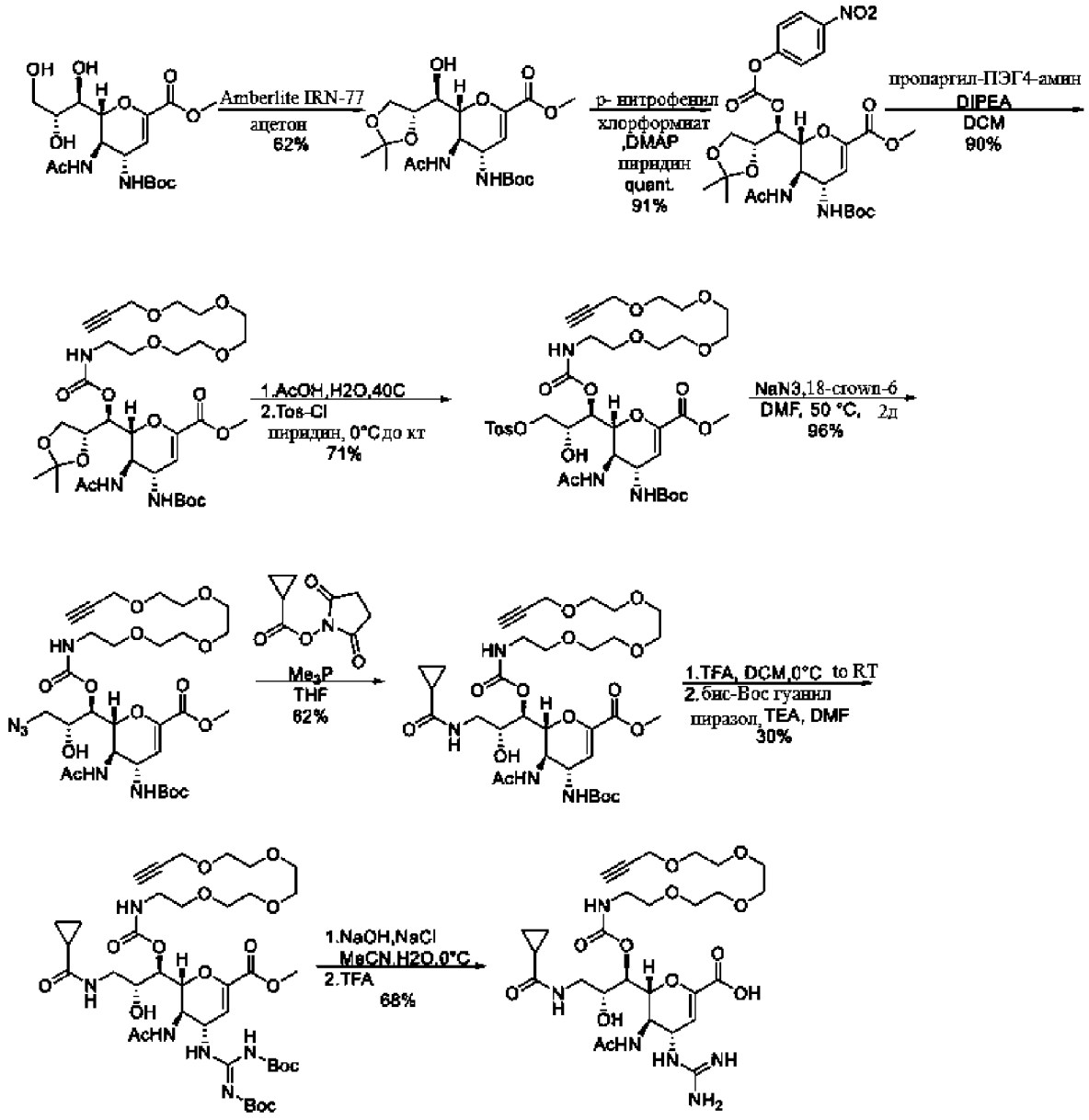
Пример 196. Синтез конъюгата 47

Раствор азидофункционализированного Fc (50 мг, 5,0 мл, 0,862 мкмоль, SEQ ID NO: 73, DAR-7.0) добавляли в центрифужную пробирку объемом 40 мл, содержащую малую молекулу, функционализированную алкином (6,1 мг, 7,760 мкмоль, ПС-91, полученную, как описано в Примере 195). После осторожного встряхивания для растворения всех твердых веществ добавляли раствор L-аскорбиновой кислоты натрия (12,3 мг, 62,08 мкмоль), сульфата меди (II) (2,5 мг, 15,52 мкмоль) и BTTAA (26,7 мг, 62,08

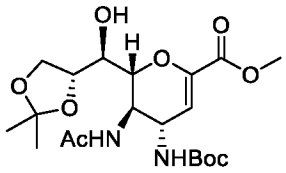
мкмоль) в буфер ФСБ 7,4 (6,984 мл). Полученную смесь осторожно встряхивали в течение ночи. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином А с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. предложенный в данном документе общий протокол очистки конъюгата). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 64423 Да (DAR = 6,9). Выход 35,3 мг, выход 70%.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 47, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, которая включает С-концевой остаток лизина. После экспрессии С-концевой лизин Fc конъюгата 47 протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 73. Наличие или отсутствие С-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 197. Синтез карбамата ПС-92

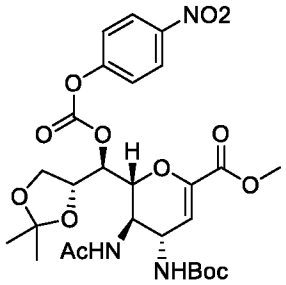


Стадия a.



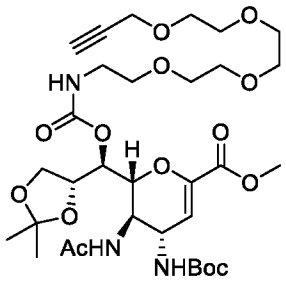
Промежуточное соединение, приготовленное, как описано в примере 21 (5,15 г, 12,74 ммоль), растворяли в ацетоне (100 мл). Добавляли кислую смолу амберлит IRN-77, доводя pH до ~4 при измерении индикаторной бумагой для определения pH. Реакционную смесь нагревали до тех пор, пока не было израсходовано все исходное вещество. При охлаждении реакционную смесь фильтруют и фильтрат концентрируют на роторном испарителе. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH® элюируя метанолом от 0% до 30% и дихлорметаном. Выход: 3,535 г, 62%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H + Na)]^+ = 467,2$, $[(M + H - t\text{-}Bu)]^+ = 389,2$, $[(M + H - Boc)]^+ = 345,2$.

Стадия b.



К перемешиваемому раствору продукта стадии a (3,258 г, 7,391 ммоль) и п-нитрофенол хлорформиата (2,979 г, 14,78 ммоль) в пиридине (80 мл) добавляли DMAP (1,806 г, 14,78 ммоль). Через 18 часов добавляли дополнительное количество п-нитрофенол хлорформиата (1,490 г, 7,391 ммоль) и DMAP (0,903 г, 7,391 ммоль). После завершения реакции все летучие вещества удаляли на роторном испарителе. Остаток растворяли в ДХМ (250 мл) и фильтровали. Фильтрат промывали 2 н. раствором серной кислоты (3 x 100 мл), затем насыщенным раствором бикарбоната натрия (3 x 100 мл). Органические слои сушили соляным раствором (200 мл), затем сульфатом магния, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH®, элюируя ацетоном от 0% до 100% и гексаном. Выход: 4,122 г, 91%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H + Na)]^+ = 632,1$, $[(M + H)]^+ = 554,0$, $[(M + H - Boc)]^+ = 510,2$.

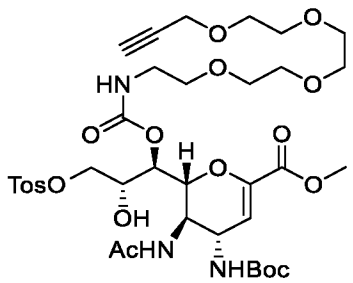
Стадия c.



К перемешиваемому при 0 °C раствору продукта стадии b (4,00 г, 6,562 ммоль) и DIPEA (2,400 мл, 13,78 ммоль) в ДХМ (40 мл) добавляли пропаргил-ПЭГ4-амин. Температуру повышали до температуры окружающей среды и перемешивание продолжали до завершения по данным ЖХ-МС. Все летучие вещества

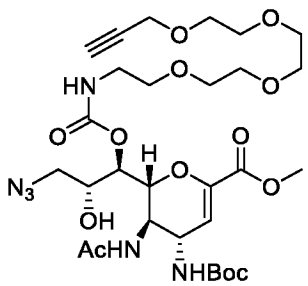
удаляли на роторном испарителе. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH® элюируя метанолом от 0% до 50% и дихлорметаном. Выход: 4,130 г, 90%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H + Na)]^+ = 724,1$, $[(M + H - Boc)]^+ = 602,2$.

Стадия d.



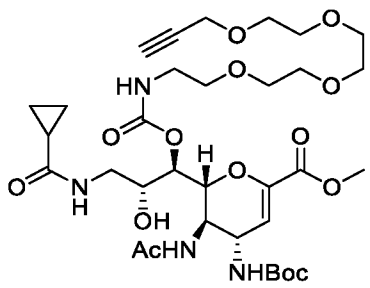
Продукт со стадии c (4,13 г, 5,885 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (24 мл) и воде (12 мл), затем перемешивали до тех пор, пока с помощью ЖХ-МС не наблюдали полную конверсию. Реакционную смесь концентрировали на роторном испарителе. К перемешиваемому раствору этого остатка (4,60 г, 5,340 ммоль) в пиридине (150 мл) с помощью шприцевого насоса медленно добавляли раствор тозил-Cl (1,392 г, 7,299 ммоль) в ДХМ (10 мл). После израсходования тозил-Cl добавляли дополнительное количество (1,392 г, 7,299 ммоль). После полной конверсии исходного материала все летучие вещества удаляли на роторном испарителе. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH® элюируя метанолом от 0% до 50% и дихлорметаном. Выход: 3,380 г, 71%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H + Na)]^+ = 838,0$, $[(M + H - Boc)]^+ = 716,2$.

Стадия e.



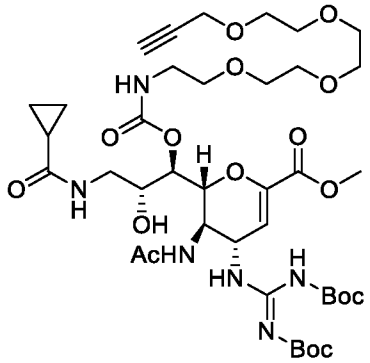
К перемешиваемому раствору тозилата стадии d (3,280 г, 4,020 ммоль) в ДМФ (30 мл) добавляли 18-краун-6 (425 мг, 1,608 ммоль) и азид натрия (1,307 г, 20,10 ммоль), затем температуру поднимали до 50°C. После завершения с помощью ЖХ-МС все летучие вещества выпаривали на роторном испарителе. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH® элюируя метанолом от 0% до 50% и дихлорметаном. Выход: 2,651 г, 96%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H + Na)]^+ = 709,2$, $[(M + H - Boc)]^+ = 587,2$.

Стадия f.



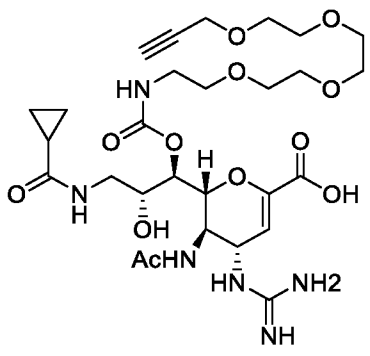
К перемешиваемому раствору продукта стадии e (2,649 мг, 3,858 ммоль) в ТГФ (20 мл) добавляли N-гидроксисукцинимидиловый эфир циклопропановой кислоты (1,413 г, 7,715 ммоль) и триметилфосфин (795 мкл, 7,715 ммоль). После завершения реакции с помощью ЖХ-МС все летучие вещества выпаривали на роторном испарителе. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH® элюируя метанолом от 0% до 50% и дихлорметаном. Выход: 1,744 г, 62%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H)]^+ = 729,2$.

Стадия g.



К перемешиваемому при 0°C раствору продукта стадии f (1,744 г, 2,393 ммоль) в ДХМ (15 мл) добавляли ТФУ (15 мл), затем температуру повышали до комнатной. После израсходования всего исходного материала летучие вещества удаляли на роторном испарителе. Анализ методом ЖХ-МС этого неочищенного материала показал [(M + H)]+ = 629,2. Этот материал помещали в раствор DIPEA (7,502 мл, 43,07 ммоль) в ДХМ (15 мл) при перемешивании при 0 °C и обрабатывали хлорформиатом бис-Boc-п-нитрофенола (817 мг, 2,632 ммоль). После израсходования исходного материала все летучие вещества удаляли на роторном испарителе. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя жидкостную хроматографию Isco COMBIFLASH® элюируя метанолом от 0% до 50% и дихлорметаном. Выход: 631 мг, 30%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H)]^+ = 871,2$.

Стадия h.



К перемешиваемому при 0 °C раствору продукта стадии g (315 мг, 0,362 ммоль) в ацетонитриле (4,0 мл) и 1,0 М раствору NaCl в воде (8 мл) добавляли 1,0 М раствор NaOH в воде (15 мг, 380 мкл, 0,380 ммоль). Перемешивание продолжали в течение ночи, пока температура постепенно не достигла комнатной. Реакцию гасили уксусной кислотой (100 мкл) и все летучие вещества удаляли при помощи роторного испарителя. Остаток суспендировали в ДХМ: MeOH = 9: 1 и фильтровали. Все летучие вещества удаляли на роторном испарителе. Анализ методом ЖХ-МС этого неочищенного материала показал основной пик с желаемым значением [(M + H)]+ = 857,2. Остаток растворяли в ДХМ (3,0 мл) и ТФУ (3,0 мл) для удаления Boc-групп. После завершения ЖХ-МС все летучие вещества удаляли на роторном испарителе. Остаток очищали с помощью ВЭЖХ (от 0 до 40% метанола и воды, используя 0,1% ТФУ в качестве модификатора). Выход: 370 мг, 86%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $[(M + H)]^+$ = 657,2.

Пример 198. Синтез конъюгата 48

Раствор азидофункционализированного Fc (33,3 мг, 3,33 мл, 0,576 мкмоль, SEQ ID NO: 73, DAR-7.0) добавляли в центрифужную пробирку объемом 50 мл, содержащую малую молекулу, функционализированную алкином (6,1 мг, 7,760 мкмоль, ПС-92, полученную, как описано в Примере 197). После осторожного встряхивания для растворения всех твердых веществ этот раствор добавляли к раствору L-аскорбиновой кислоты натрия (8,6 мг, 11,21 мкмоль), сульфата меди (II) (2,5 мг, 15,52 мкмоль) и BTTAA (26,7 мг, 62,08 мкмоль) в буфере ФСБ 7,4 (6,984 мл). Полученный раствор осторожно вращали в течение ночи. Проводили очистку аффинной хроматографией на колонке с протеином A с последующим проведением эксклюзионной хроматографии (см. предложенный в данном документе общий протокол очистки конъюгата). Анализ ВП-МАЛДИ очищенного конечного продукта дал среднюю массу 63734 Да (DAR = 6,2). Выход 35,3 мг, выход 63%.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 48, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, которая включает C-концевой остаток лизина. После экспрессии C-концевой лизин Fc конъюгата 48 протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 73. Наличие или отсутствие C-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 199. Влияние DAR на ингибирование нейраминидазы

Ингибирование нейраминидазы (NAI)

Исследуемые препараты инкубировали с живыми вирусами при указанной БОЕ/мл в течение 20 минут при 37 °C, 5% CO_2. Субстрат NA-Fluor добавляли в соответствующие лунки и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, 5% CO_2. NAI определяли путем считывания флуоресценции при возбуждении 355 нм/испускании 460 нм. % NAI рассчитывали по формуле: %NAI = (1-($FI_{\text{вирус с ТА}} - FI_{\text{без вируса}}$)) / ($FI_{\text{только вирус}} - FI_{\text{без вируса}}$) x 100. IC_{50} рассчитывали с использованием программного обеспечения для нелинейного регрессионного анализа в GraphPad Prism.

Конъюгат 45a продемонстрировал DAR-зависимую повышенную активность, достигающую максимальной активности при DAR 3,3 или выше против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) (таблица 173).

Мутант A/Bethesda/956/2006 (H3N2) R292K продемонстрировал устойчивость к осельтамивиру и продемонстрировал пониженную чувствительность к занамивиру. Конъюгат 45a не изменился в отношении этого мутанта и продемонстрировал DAR-зависимую повышенную активность, достигающую максимальной активности при DAR 3,3 или выше против гриппа (таблица 173).

Таблица 173: Сводные данные по IC_{50} для конъюгата 110 против подтипов гриппа A (H1N1) и (H3N2)

Исследуемый препарат	**DAR**	**IC_{50} [нМ]** A/PR/8/1934 (H1N1)	**IC_{50} [нМ]** A/Bethesda/956/2006 (H3N2) R292K
Осельтамивир	Н/П	5,276	>1000
Занамивир	Н/П	1,072	20,79
ПС 83	Н/П	11,48	510,6
Конъюгат 45a	0,4	23,61	78,79
Конъюгат 45a	1	12,25	29,31
Конъюгат 45a	3,3	2,772	4,166
Конъюгат 45a	4,7	2,706	3,13
Конъюгат 45a	5,1	3,259	3,583
Конъюгат 45a	7,3	3,098	2,509

Пример 200. Модели вторичного заражения мышей

Модель вторичной бактериальной инфекции с MRSA.

Исследования эффективности проводили на самках мышей BALB/c (Charles River) в возрасте 6–8 недель, которым интраназально вводили 3E3 БОЕ/мышь (сублетальный) A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (Virapur, партия № E1020A1). Конъюгат 45b или контроли IgG1 Fc человека вводили однократно подкожно (п/к) через 2 ч после заражения в дозе 0,3–3 мг/кг. На 6-й день после заражения мышам интраназально вводили сублетальную дозу метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) TCH1516 в количестве 5E7 колониеобразующих единиц (КОЕ) (Фиг. 104).

Для определения бактериальной нагрузки на легкие мышей умерщвляли с помощью CO_2 и собирали обе доли легких для определения бактериальной нагрузки через 24 часа после заражения MRSA. Легкие гомогенизировали с помощью шариками из диоксида кремния 1 мм в 1 мл ФСБ с использованием MagNA Lyser (Roche). Гомогенизацию проводили при 6000 об/мин в течение 60 сек и охлаждали на льду в течение 5 минут между циклами. Для определения КОЕ гомогенаты легких серийно разбавляли в 10 раз в ФСБ и высевали на планшеты с LA. КОЕ рассчитывали относительно веса легкого (КОЕ/г легкого). Для исследований выживаемости контролировали общее состояние здоровья животных и ежедневно регистрировали массу тела (МТ) в течение 14 дней. Агонизирующих животных или животных, демонстрирующих потерю массы тела (МТ) >20%, регистрировали как падеж. Выживаемость, кривые МТ и статистический анализ были выполнены с помощью GraphPad Prism (версия 6.07).

Конъюгат 45b продемонстрировал защиту от бактериальной суперинфекции на мышиной модели с сублетальным заражением гриппом A/CA/07/2009 (H1N1)pdm с последующим сублетальной инфекцией MRSA. В совокупности две сублетальные инфекции привели к 100% смертности у мышей, которых лечили Fc hIgG1 (Фиг. 105A). Лечение конъюгатом 45b в дозе 0,3 или 3 мг/кг для предотвращения заболевания гриппом привела к 100% выживаемости мышей. Конъюгат 45b продемонстрировал снижение бактериальной нагрузки в легких по сравнению с Fc hIgG1 через 24 часа после заражения MRSA (Фиг. 105B). Бактериальная нагрузка после лечения конъюгатом 45b была сравнима с нагрузкой, наблюдаемой у мышей, которых заражали только MRSA.

Эти данные демонстрируют потенциал конъюгата 45b в смягчении осложнений инфекции гриппа, таких как суперинфекция *S. aureus*, которые способствуют смертности, связанной с гриппом.

Модель вторичной бактериальной инфекции с Streptococcus pneumoniae

Исследования эффективности проводили на самках мышей BALB/c (Charles River) в возрасте 6–8 недель, которым интраназально вводили 3E1 БОЕ/мышь (сублетальный) A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (Virapur, партия №1512B4) (Фиг. 106). Конъюгат 45b или контроли Fc IgG1 человека вводили однократно подкожно (п/к) через 2 ч после заражения в дозе 0,3 мг/кг. На 6-й день после заражения мышам интраназально вводили сублетальную дозу штамма 6301 *Streptococcus pneumoniae* (SPN) в количестве 1E5 КОЕ. В течение 14 дней ежедневно контролировали общее состояние здоровья животных и регистрировали МТ. Агонизирующих животных, или животных с потерей массы тела >20% и более регистрировали как падеж. Выживаемость, кривые МТ и статистический анализ были выполнены с помощью GraphPad Prism (версия 6.07).

Конъюгат 45b продемонстрировал защиту от бактериальной суперинфекции на мышиной модели с сублетальным заражением гриппом A/CA/07/2009 (H1N1)pdm с последующим сублетальной инфекцией SPN. В совокупности две сублетальные инфекции привели к 100% гибели мышей, которых лечили с помощью Fc hIgG1. Лечение конъюгатом 45b в дозе 0,3 мг/кг — для предотвращения заболевания гриппом — привело к 100% выживаемости мышей, что продемонстрировало потенциал конъюгата 45b в смягчении осложнений, вызванных инфекцией гриппа против наиболее распространенной причины бактериальной суперинфекции, *S. pneumoniae* (Фиг. 107). Бактериальная суперинфекция вносит значительный вклад в смертность, связанную с гриппом.

Пример 201. Исследование оптимизации дозирования конъюгата 45a для лечения вирусной инфекции A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) у мышей BALB/c

Для этого эксперимента из Charles River Laboratories (Уилмингтон, штат Массачусетс) были получены Самки мышей BALB/c массой 18-20 г. Мышей помещали в карантин на 6 дней перед использованием и содержали на диете для грызунов Teklad (Harlan Teklad) и водопроводной воде в Центре исследований лабораторных животных Университета штата Юта.

Высокопатогенный птичий грипп A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) был получен из Центров по контролю за заболеваниями (Атланта, штат Джорджия). Вирусное размножение проводили в клетках почек собак Madin-Darby (MDCK) (Американская коллекция типовых культур, Манассас, штат Вирджиния). Исходный вирус пассировали один раз для получения пула для заражения. Затем пул для заражения титровали в клетках MDCK перед использованием.

Количество животных и исследуемые группы описаны в Таблице 174. Группы мышей лечили путем подкожной (п/к) инъекции конъюгата 45a в дозах 0,3, 1, 3 и 10 мг/кг однократно либо за 7 дней до заражения вирусом, либо через 4 часа после заражения вирусом. Осельтамивир (10 мг/кг), используемый в качестве положительного контроля для контрольной дозы вируса, вводили перорально через желудочный зонд два раза в день, начиная с 4 часов после заражения. Неконъюгированный Fc, используемый в качестве плацебо, вводили аналогично конъюгату 45a. Кроме того, три не получавшие лечение контрольные мыши были сохранены для сравнения массы.

Для заражения вирусом гриппа мышей подвергали анестезии путем внутрибрюшинной инъекции кетамина/ксилазина (50 мг/кг//5 мг/кг) перед заражением интраназальным путем примерно 5 бляшкообразующих единиц (1xLD_{90}) вируса на мышь в объеме инокулята 90 мкл.

Мышей взвешивали до лечения, а затем через день после этого, чтобы оценить влияние лечения на уменьшение потери массы из-за вирусной инфекции. Всех мышей наблюдали на заболеваемость и смертность

в течение 21 дня.

Кривые выживаемости Каплана-Мейера были сгенерированы и сравнены с помощью логарифмического рангового критерия (Мантела-Кокса) с последующим попарным сравнением с использованием теста Гехана-Бреслоу-Вилкоксона в Prism 8.3 (GraphPad Software Inc.). Среднюю массу тела анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующими тестами множественного сравнения Тьюки с использованием Prism 8.3.

Таблица 174: Исследование оптимизации дозирования для определения эффективности

№/ Клетка	**№ группы**	**Инфецированный Y или N**	**Соединение**	**Дозировка**	**Схема лечения**	**Наблюдения/тестирование**
10	1	Да	конъюгат 45a	10 мг/кг	Однократно, за 7 дней до заражения	Наблюдали за потерей массы и смертностью в течение 21 дня
10	3	Да	конъюгат 45a	3 мг/кг		
10	5	Да	конъюгат 45a	1 мг/кг		
10	7	Да	конъюгат 45a	0,3 мг/кг		
10	9	Да	Плацебо (неконъюгированный Fc, SEQ ID NO: 72)	-	Однократно, через 4 часа после заражения	
10	11	Да	конъюгат 45a	10 мг/кг		
10	13	Да	конъюгат 45a	3 мг/кг		
10	15	Да	конъюгат 45a	1 мг/кг		
10	17	Да	конъюгат 45a	0,3 мг/кг		
10	19	Да	Осельтамивир	30 мг/кг/день	два раза в сутки x 5 дней, начиная через 4 часа после заражения	
3	2	Отсутствует	У не получавших лечение мышей наблюдали нормальное увеличение массы			

После лечения конъюгатом 45a за 7 дней до заражения вирусом наблюдалась 100% защита для дозы 10 мг/кг, 80% защита для доз 0,3 и 3 мг/кг и 70% защита для дозы 1 мг/кг (Фиг. 108A). 30% выживаемость в

группе плацебо является необычной, поэтому доза 1 мг/кг не обеспечила значительной защиты. Кроме того, все дозы обеспечивали значительную защиту от потери массы (Фиг. 108B).

После обработки конъюгатом 45a через 4 часа после заражения вирусом наблюдали 100% защиту для доз 1, 3 и 10 мг/кг и 70% защиту для дозы 0,3 мг/кг (Фиг. 109A). Из-за 30% выживаемости, наблюдаемой в группе плацебо, доза 0,3 мг/кг не обеспечивала значительной защиты. Кроме того, все дозы обеспечивали значительную защиту от потери массы (Фиг. 109B).

Пример 202. Лектин-ферментный анализ (ELLA).

Анализ ELLA проводили, как описано в Gao et al. (*J. Vis. Exp.* Doi:10.3791/54573, 2016) с небольшими модификациями. Вкратце, 96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (ThermoFisher) покрывали 2,5 мкг фетуина (Sigma-Aldrich) в 1x покрывающего буфера KPL (SeraCare) в течение ночи при 4 °C. На следующий день планшеты промывали ФСБ при pH 7,4 с добавлением 0,05% Tween-20 (PBST). Исследуемые препараты тестировали при 0,001–1000 нМ и добавляли по 50 мкл/лунку. Вирус гриппа добавляли в количестве 1e5 – 1e6 БОЕ/лунку по 50 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 16-18 ч при 37 °C, 5% CO_2. После промывки планшетов агглютинин арахиса конъюгировали с ПХ (PNA-HRP) в количестве 0,13 мкг в течение 2 ч, снова промывали и проявляли 100 мкл/лунку субстрата TMB (BD) в течение 3–5 мин. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл/лунку 1 н. H_2SO_4. Поглощение измеряли при 450 нм с помощью многорежимного планшет-ридера EnSpire. IC_{50} рассчитывали с помощью GraphPad Prism версии 8 с использованием нелинейного регрессионного анализа (зависимость доза-ответ (ингибирование)).

Конъюгат 45b продемонстрировал повышенную эффективность по сравнению с осельтамивиром или занамивиром в ELLA с IC_{50} между репрезентативными штаммами гриппа A и B (таблица 175).

Таблица 175: Активность конъюгата 45b в лектин-ферментном анализе (ELLA) против гриппа A и B (IC_{50})

Штамм гриппа	Подтип/линия	конъюгат 45b [нМ]	Fc hIgG1 [нМ]	Осельтамивир [нМ]	Занамивир [нМ]
A/PR/8/1934	H1N1	0,11	> 1 000	25,4	3,8
A/CA/7/2009	H1N1pdm	0,02	> 1 000	0,99	0,09
A/Hong Kong/1/1968	H3N2	0,003	> 1 000	0,07	0,24
B/Florida/4/2006	Yamagata	0,02	> 1 000	1,00	0,09
B/Malaysia/2506/2004	Victoria	0,15	> 1 000	3,2	9,3

Пример 203. Свойства конъюгата 45b, которые обеспечивают потенциальное поливалентное связывание с нейраминидазой вируса гриппа

Конъюгат 45b содержит химически и биологически стабильный конъюгат ПС-83 с удлиненным на N-конце доменом Fc hIgG1 (SEQ ID NO: 73). Как показано на Фиг. 110B, ПС-83 включает димеры занамивира, которые симметрично слиты через фрагменты метилкарбамата на C7-гидроксиле занамивира с гибким центральным линкером 15 Å, который разносит мономеры занамивира примерно на 18 Å. Множественные копии ПС-83 конъюгированы с расположенными на поверхности остатками лизина на поверхности домена Fc через 32-атомный гибкий сшивающий линкер на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ), который выступает от

поверхности Fc на 35–40 Å, когда линкер полностью вытянут (Фиг. 110B). Специфические подвергающийся действию растворителя остатки лизина были сайтами для конъюгации (Фиг. 110B). Среднее отношение ПС-83 к Fc, используемому в конъюгате 45b, составляло 4,5:1. Синтез конъюгата 45b описан в Примере 156. Пространственное распределение предпочтительных сайтов для конъюгации (Фиг. 110B) в сочетании с длиной и гибкостью сшивающего линкера в принципе позволяет конъюгату 45b одновременно взаимодействовать с несколькими активными сайтами NA внутри тетрамера (примерно 45 или 70 Å, соответственно, Фиг. 110A). Кроме того, расстояние между ПС-83 в конъюгате 45b позволяет связывать активные сайты NA с соседними тетрамерами NA на одном и том же вирионе (25–30 Å) или на двух вирионах (16 Å).

Универсальная активность и низкий потенциал резистентности конъюгата 45b in vitro

Мы исследовали внутреннюю противовирусную активность конъюгата 45b в отсутствие иммунного взаимодействия с использованием стандартного анализа ингибирования нейраминидазы (NAI), в котором используется низкомолекулярный субстрат. Конъюгат 45b продемонстрировал сильную активность против гриппа A и B со средней IC_{50} 1,7 нМ против штаммов гриппа A H1N1 (n=7, в диапазоне от 1,1 нМ до 4,8 нМ), 4,2 нМ против штаммов гриппа A H3N2 (n=6, в диапазоне от 0,3 нМ до 14,9 нМ) и 4,4 нМ против штаммов гриппа B (n=6, в пределах от 1,0 нМ до 20,7 нМ), соответственно (таблица 176). В целом конъюгат 45b действовал аналогично занамивиру и осельтамивиру, но был более активным, чем осельтамивир, по сравнению со штаммами гриппа B (таблица 176). Важно отметить, что значения IC_{50} конъюгата 45b не изменились по сравнению с клинически значимыми вариантами с пониженной чувствительностью к одобренным ингибиторам нейраминидазы. Активность конъюгата 45b составляла 1,7 нМ против H275Y в подтипе H1N1, 2,6 нМ E119V, 1,2 нМ R292K в подтипе H3N2 или 6,7 нМ R152K в типе B. Осельтамивир или занамивир утратили эффективность более чем в 100 раз или >10 раз соответственно по сравнению с этими вариантами (таблица 177). Конъюгат 45b сохранял высокую активность в отношении клеточных лизатов вирусов H5N1 и H7N9 с IC_{50} 1,9 нМ и 1,2 нМ, соответственно (таблица 178). Осельтамивир и занамивир имели сравнимую активность в отношении H5N1, но осельтамивир и занамивир потеряли активность в отношении H7N9 с IC_{50} >1 мкМ или >100 нМ, соответственно (таблица 178).

Таблица 176: Универсальная активность широкого спектра действия конъюгата 45b против гриппа A (H1N1), (H3N2) и B (линия Yamagata и Victoria) в отношении ингибирования нейраминидазы (медиана IC_{50}) и анализа цитопатического эффекта на клеточной основе (медиана EC_{50}).

Молекула	**тип/подтип**	**IC_{50} [нМ]**	**EC_{50} [нМ]**
Конъюгат 45b	A (H1N1)	1,7	1,9
	A (H3N2)	4,2	0,9
	B	4,4	7,4
Осельтамивир	A (H1N1)	2,2	2414
	A (H3N2)	0,4	8185
	B	37,7	758,5
Занамивир	A (H1N1)	1,0	1093
	A (H3N2)	1,3	>10000

	B	6,3	80,2

Таблица 177: Активность конъюгата 45b в отношении вариантов со сниженной чувствительностью к ингибированию нейраминидазы (IC_{50})

Живой штамм гриппа	**Вариант**	**подтип/линия**	**конъюгат 45b [нМ]**	**Осельтамивир [нМ]**	**Занамивир [нМ]**
A/Texas/23/2012	H275Y	H1N1pdm09	1,7	507,1	1,1
A/Texas/12/2007	E119V	H3N2	2,6	148,9	3,8
A/Bethesda/956/2006	R292K	H3N2	1,2	>1000	22,18
B/Memphis/20/1996	R152K	Yamagata	6,7	>1000	125,5

Таблица 178: Активность конъюгата 45b в отношении клеточного лизата гриппа A H5N1 и H7N9 при ингибировании нейраминидазы (IC_{50})

Клеточный лизат NA из	**подтип/линия**	**Конъюгат 45b [нМ]**	**Осельтамивир [нМ]**	**Занамивир [нМ]**
A/Anhui/1/2005	H5N1	1,9	3,7	0,6
A/Shanghai/1/2013	H7N9	1,2	>1000	100,4

Затем мы проверили активность конъюгата 45b в лектин-ферментном анализе (ELLA), в котором в качестве субстрата использовали крупный гликопротеин. Презентация сиаловой кислоты (Sia) в анализе ELLA больше похоже на презентацию субстрата NA на поверхности клетки. В результате доступ к субстрату более ограничен, и было показано, что на активность NA в анализе ELLA влияют факторы, которые блокируют доступ к активному центру NA (Chen Y. Q., et al., *J. Virol*. 93: doi.10.1128/JVI.01526-18, 2019). Интересно, что по сравнению с результатами ингибирования NA с использованием низкомолекулярного субстрата, как описано выше, активность конъюгата 45b была повышена (>10x) по сравнению с занамивиром и осельтамивиром против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) (таблица 179). В случае конъюгата 45b стерическое затруднение смежных активных участков внутри- или меж-NA тетрамера NA со стороны домена Fc или поливалентное взаимодействие с мишенью, вызывающее агрегацию вируса, могло способствовать усилению активности, наблюдаемому в анализе ELLA.

Таблица 179: Широкий спектр активности конъюгата 45b против гриппа A и B при CPE (EC_{50}).

Штамм гриппа	**подтип Штамм**	**Конъюгат 45b [нМ]**	**Осельтамивир [нМ]**	**Занамивир [нМ]**
A/WSN/1933	H1N1	0,2059	51,36	29,12
A/PR/8/1934	H1N1	0,782	1461	7581
A/PR/8/1934 (адаптировано для мыши)	H1N1	32,49	>10000	не тестировали
A/CA/7/2009	H1N1pdm	2,964	34,2	33,16
A/CA/12/2012	H1N1pdm09	0,4931	>10000	1093
A/Texas/23/2012 H275Y	H1N1pdm09	2,886	>10000	>10000

Штамм гриппа	**подтип Штамм**	**Конъюгат 45b [нМ]**	**Осельтамивир [нМ]**	**Занамивир [нМ]**
A/Illinois/08/2018	H1N1pdm09	9,584	3366	4278
A/Illinois/37/2018 I38L	H1N1pdm09	0,4304	200,4	179,1
A/Illinois/08/2018 I38T	H1N1pdm09	1,35	>10000	>10000
A/Hong Kong/1/1968 (адаптировано для мыши)	H3N2	36,57	6369	не тестировали
A/Texas/71/2017	H3N2	0,3748	>10000	>10000
A/Washington/01/2007	H3N2	0,04449	1,908	1,968
A/Texas/12/2007 E119V	H3N2	0,6594	351,4	2,096
A/Louisiana/50/2017	H3N2	1,41	>10000	>10000
A/Louisiana/49/2017 I38M	H3N2	0,606	>10000	4815
A/Bethesda/956/2006 R292K	H3N2	20,1	1653	558,1
B/Florida/4/2006	Yamagata	12,8	1030	76,89
B/Brisbane/60/2008	Victoria	6,288	487	254,2
B/Malaysia/2506/2004	Victoria	1,512	471,2	83,52
B/Colorado/6/2017	Victoria	8,485	4480	56,98

Еще большее различие между конъюгатом 45b и занамивиром и осельтамивиром наблюдалось в клеточных анализах цитопатического эффекта (CPE). Конъюгат 45b продемонстрировал сильную активность против типов гриппа A и B со средним значением EC_{50} 1,3 нМ для штаммов гриппа A H1N1 (n=6, в диапазоне от 0,43 нМ до 32,4 нМ), 0,9 нМ для штаммов гриппа A H3N2 (n=4, в диапазоне от 0,04 нМ до 36,6 нМ) и 7,4 нМ для штаммов гриппа B (n=4, в пределах от 1,5 нМ до 12,8 нМ), соответственно, в MDCK SIAT1 или для адаптированных к мышам штаммов гриппа в клетках MDCK (таблица 179). Примечательно, что конъюгат 45b был на 3 log более активен, чем осельтамивир и занамивир, в отношении некоторых протестированных штаммов гриппа (таблица 176). Когда конъюгат 45b тестировали против высокопатогенных штаммов в анализах микронейтрализации на основе клеток, EC_{50} для конъюгата 45b составляли 1,7 нМ по сравнению со штаммами H5N1 (n=4) и 5,3 нМ по сравнению со штаммом H7N9 (n=1) (таблица 180). CC_{50} для конъюгата 45b в клетках MDCK-SIAT1 или MDCK составляла >10000 нМ (*данные не показаны*). Таким образом, рассчитанный индекс селективности (SI) для конъюгата 45b в клеточном анализе был >1000x для типов гриппа A и B.

Таблица 180: Широкий спектр активности конъюгата 45b в отношении высокопатогенных вирусов гриппа A (H5N1) и (H7N9) при микронейтрализации (IC_{50}).

Штамм гриппа	**подтип Штамм**	**Конъюгат 45b [нМ]**	**Осельтамивир [нМ]**	**Занамивир [нМ]**
A/Vietnam/1194/2004	H5N1	1,7	168,7	16,9
A/Indonesia/05/2005	H5N1	1,7	>300	16,9
A/turkey/Turkey/1/2005	H5N1	1,7	168,7	5,3

A/Hong Kong/156/97	H5N1	1,7	>300	53,3
A/Anhui/1/ 2013	H7N9	5,3	>300	>300
A/Netherlands/602/2009*	H1N1pdm09	1,7	>300	>300

* Штамм гриппа А для борьбы с пандемией

В дополнение к анализам CPE были проведены эксперименты с серийными пассажами с использованием клеток MDCK, инфицированных вирусом гриппа A/CA/07/2009 (H1N1)pdm, для сравнения потенциала устойчивости конъюгата 45b к двум коммерчески доминирующим противовирусным препаратам против гриппа, осельтамивиру и балоксивиру. Конъюгат 45b имел более высокий профиль устойчивости по сравнению с обоими препаратами сравнения и не продемонстрировал снижения противовирусной активности на протяжении 10 пассажа эксперимента. Противовирусная активность балоксавира и осельтамивира снижалась до уровня контроля без лекарственного средства после 6 и 8 пассажей, соответственно. Секвенирование вирусных геномов из устойчивых к лекарственным препаратам вирусных бляшек в более поздних пассажах осельтамивира показало, что устойчивость была обусловлена мутацией активного сайта NA (E119K), которая наблюдалась в клинике (REF).

Вовлечение иммунных клеток конъюгатом 45b

Домен Fc IgG1 человека был выбран в качестве белка-носителя для конъюгата 45b, поскольку он представляет собой наиболее активирующий изотип человеческого антитела IgG с самым длительным периодом полужизни в кровотоке. Несмотря на использование гетерогенной стратегии конъюгации лизина с конъюгатом 45b, мы наблюдали аналогичное связывание рецептора Fcγ со всеми рецепторами Fcγ человека и мыши, протестированными с конъюгатом 45b, по сравнению с неконъюгированным контролем Fc и человеческим IgG1 (Фиг. 111A-111H). В функциональных анализах конъюгат 45b индуцировал мощную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в зависимости от MOI (Фиг. 111I) и от дозы в отношении клеток MDCK SIat1, инфицированных гриппом A/PR/8/1934 (H1N1) (Фиг. 111J). Таким образом, конъюгат 45b может связываться с рецепторами Fcγ и функционально задействовать иммунные клетки.

Конъюгат 45b высокоэффективен в нескольких моделях летального заражения гриппом

Активность и противовирусный спектр конъюгата 45b, наблюдаемые *in vitro*, переводятся в эффективность на моделях инфекции у животных. Одноразовая доза конъюгата 45b подкожно (п/к) 0,3 мг/кг или ниже оказывала полную защиту в моделях летального заражения мышей против A/CA/07/2009 (H1N1)pdm, A/WSN/1933 (H1N1), A/CA/12/2012 (H1N1)pdm09, A/Texas/23/2012 (H1N1)pdm09 H275Y variant, A/Hong Kong/1/1968 (H3N2), B/Florida/4/2006 (Yamagata) и B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) (Фиг. 112A-112H). Лечение конъюгатом 45b часто приводило к лишь ограниченной временной потере массы тела после минимальной защитной дозы (Фиг. 113A-113H). При тестировании против птичьего пандемического штамма A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) на мышах конъюгат 45b продемонстрировал 70% защиту при 0,3 мг/кг и 100% защиту при 1 мг/кг или выше (Фиг. 112I). Осельтамивир в 6-кратной гуманизированной дозе у мышей защищал только на 90% (Фиг. 112I).

Чтобы лучше количественно оценить эффективность конъюгата 45b и сравнить его эффективность с осельтамивиром, вирусная нагрузка и уровни цитокинов в легких были измерены через 4 дня после заражения после модели летального заражения адаптированным к мышам гриппом A/PR/8/1934 (H1N1). В этой модели

минимальная защитная доза конъюгата 45b составляла 0,1 мг/кг (п/к) (Фиг. 112A) и сопровождалась временной потерей массы тела (МТ) прибл. 5% (Фиг. 113A). Конъюгат 45b продемонстрировал дозозависимое снижение вирусной нагрузки в легких (БОЕ/г легочной ткани) на 1,06 log при дозе 0,1 мг/кг, 2,12 log при дозе 0,3 мг/кг, 3,17 log при дозе 1 мг/кг и 3,63 log при дозе 3 мг/кг, как определено анализом бляшкообразования. Для сравнения, осельтамивир, введенный в дозе, эквивалентной человеческому (5 мг/кг) (два раза в день x 4 дня) или в 10-кратной эквивалентной дозе человека (50 мг/кг) (два раза в день x 4 дня), не показал дозозависимого эффекта и привел к умеренному снижению вирусной нагрузки около 0,8 log. Интересно, что две испытанные дозы осельтамивира привели к разным результатам выживаемости. Осельтамивир в дозе 5 мг/кг или 50 мг/кг в течение 5 дней два раза в сутки приводил к выживанию 0% или 80%, соответственно (Фиг. 114A-114B).

Чтобы понять эффективность конъюгата 45b в снижении потенциально опасного иммунного ответа, который может привести к повреждению легких, в тот же момент времени измеряли уровни специфических цитокинов воспаления и повреждения легких. Конъюгат 45b эффективно снижал уровни дозозависимым образом, при этом все измеренные цитокины приближались к уровням, подобным неинфицированным контролям, при дозе 3 мг/кг (Фиг. 112K-112L и фиг. 115A-115C. В целом величина снижения уровня цитокинов, индуцированная конъюгатом 45b, была более выраженной, чем при лечении эквивалентной для человека дозой осельтамивира для всех протестированных цитокинов, и была выше для KC, MIP-1a, MCP-1 по сравнению с мышами, получавшими 10-кратную человеческую дозу, эквивалентную дозу осельтамивира (Фиг. 112K-112L и фиг. 115A-115C). Эти данные демонстрируют, что конъюгат 45b вызывает мощное дозозависимое снижение вирусной нагрузки, которое коррелирует со снижением уровней цитокинов в легких под действием конъюгата 45b, чего не наблюдалось при применении осельтамивира.

Влияние пути дозирования на эффективность оценивали для конъюгата 45b. В модели летального заражения с использованием мышей против A/CA/07/2009 (H1N1)pdm конъюгат 45b полностью защищал при дозе 0,1 мг/кг после внутривенного (в/в), внутримышечного (в/м) или подкожного введения (Фиг. 116A-116B). При сравнении уровней в плазме у мышей после внутривенного, внутримышечного или подкожного введения, уровни конъюгата 45b в плазме были сопоставимы через 24 часа, как определено с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Следует отметить, что для измерения уровней конъюгата 45b в плазме использовали два разных метода захвата ИФА: в одном использовали захватывающее антитело к Fc человека для измерения уровней Fc, а во втором использовали вирусный NA для захвата для обнаружения интактного конъюгата (Фиг. 116C-116D). Уровни конъюгата 45b в плазме, измеренные обоими методами, были идентичными в пределах ошибки эксперимента, что свидетельствует о том, что конъюгат 45b является стабильным *in vivo* в виде интактного конъюгата.

Конъюгат 45b высокоэффективен у хозяев с ослабленным иммунитетом

Группы высокого риска тяжелых форм гриппа и осложнений от гриппа включают пожилых людей и людей с ослабленным иммунитетом. Чтобы определить эффективность конъюгата 45b на фоне ослабленного иммунитета, мы определили эффективность конъюгата 45b у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID), у которых отсутствуют зрелые Т-клетки и В-клетки и наблюдается дефицит комплемента. Конъюгат 45b продемонстрировал полную защиту при однократной дозе 0,3 мг/кг у мышей SCID, инфицированных A/CA/07/2009 (H1N1)pdm (Фиг. 112M), что является такой же защитной дозой для иммунокомпетентных мышей.

В совокупности эти результаты подчеркивают потенциал конъюгата 45b для обеспечения

универсальной защиты от гриппа среди здоровых групп населения и групп высокого риска.

Конъюгат 45b демонстрирует длительное действие в моделях профилактики

Фармакокинетическое (ФК) профилирование, профилактическая эффективность и доклинические токсикологические исследования еще больше подчеркивают потенциал использования конъюгата 45b в качестве надежного средства длительного действия для универсальной профилактики гриппа. Период полужизни конъюгата 45b определяли после однократного внутривенного введения мышам и яванским макакам и составляет от 5 до 10 дней в 1- и 4-недельных фармакокинетических исследованиях, соответственно. Эти результаты типичны для моноклональных антител и подтверждаются сравнимыми кривыми связывания конъюгата 45b, Fc hIgG1 и полноразмерного изотипического контрольного антитела IgG1 человека с FcRn мыши, яванского макака и человека в зависимости от pH (Фиг. 117A-117C). Конъюгат 45b демонстрирует дозолинейную фармакокинетику у мышей в широком диапазоне доз от 1 до 100 мг/кг (Фиг. 118A). В мышиной модели конъюгат 45b устанавливает быстрое равновесие между плазмой и легкими, обеспечивая быстрое начало действия по показаниям для лечения, и распределяется в жидкости эпителиальной выстилки (ELF) на высоких уровнях (Фиг. 118B). Высокие уровни конъюгата 45b в ELF появлялись быстро и сохранялись около 60% уровней в плазме (Фиг. 118B).

Чтобы оценить эффективность конъюгата 45b в условиях профилактики и определить целевые уровни в плазме, необходимые для защиты в моделях летального заражения гриппом, мышам вводили дозу за 28 дней до заражения. Однократная п/к доза 1 мг/кг обеспечивала полную защиту от гриппа A/CA/07/2009 (H1N1)pdm, A/HK/1/1968 (H3N2), B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) и B/Florida/4/2006 (Yamagata) (Фиг. 118C-118F). Соответствующий уровень конъюгата 45b в плазме, необходимый для защиты, измеренный во время заражения, составлял 0,5 мкг/мл (8 нМ, данные не показаны). Мультивидовая фармакокинетика и целевой уровень конъюгата 45b в плазме, необходимый для защиты, будут использоваться для оценки человеческих доз, необходимых для долгосрочной профилактики у людей, и использовались для оценки терапевтических границ для конъюгата 45b в доклинических токсикологических исследованиях. В двухнедельном исследовании токсичности с определением диапазона доз, проведенном на яванских макаках, не наблюдалось побочных эффектов при самой высокой протестированной дозе (20 мг/кг). Терапевтический индекс (TI), основанный на соотношениях экспозиций в плазме у обезьян, получавших дозу 20 мг/кг, и у мышей, получавших дозу 1 мг/кг, составляет > 50 (таблицы 181 и 182). Этот предел безопасности в сочетании с аллометрическим масштабированием, включающим высокую активность и длительное воздействие конъюгата 45b (данные не показаны), предполагает, что от одной до двух доз конъюгата 45b достижима защита на весь сезон гриппа у людей.

Таблица 181: Пропорциональность дозы конъюгата 45b у мышей

Исследуемый препарат	**Доза [мг/кг]**	**T_{max} [ч]**	**C_{max} [мкг/мл]**	**AUC [ч х мкг/мл]**
Конъюгат 45b	1	4	9,39	436
	3	24	11,4	1520
	10	24	41,3	4280
	30	24	125	14200
	100	4	733	60700

Таблица 182: Пропорциональность дозы конъюгата 45b у яванских макак

Исследуемый препарат	**День**	**Доза [мг/кг]**	**T_{max} [ч]**	**C_{max} [мкг/мл]**	**AUC [ч х мкг/мл]**
Конъюгат 45b	1	5	72	26,1	3800
	8	5	8	61	7740
	1	20	72	107	14600
	8	20	24	197	25400

В токсикологическом исследовании на яванских макаках после 2-недельного подкожного введения доз 5 или 20 мг/кг не наблюдалось неблагоприятного воздействия на МТ, клиническую биохимию, гематологию, коагуляцию, цитокины или анализ мочи (данные не представлены).

Пример 204. Определение оптимального соотношения лекарственное средство-антитело (DAR) конъюгата 45a против гриппа A (H1N1) на мышиной модели летального гриппа.

Варианты DAR конъюгата 45a оценивали на модели летальной инфекции гриппа H1N1 у самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/8/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. Эксперимент состоял из 2 исследовательских групп, всего 25 групп по 5 мышей. На 0 день всех мышей заражали вирусом в дозе 3x LD_{95} (~2E4 вирус/мышь) путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл после легкой анестезии кетамином/ксилазином (100 и 10 мг/кг, соответственно). Группы получали однократное введение конъюгата 45a, варианта DAR конъюгата 45a, только Fc или носителя (ФСБ) через 2 часа после заражения вирусом путем внутримышечного (в/в) введения. Варианты конъюгата 45a тестировали со средними значениями DAR 0,4, 1,0, 3,3, 4,7, 5,1 или 7,3. Смертность и массу тела (МТ) контролировали ежедневно в течение 14 дней. Любую мышь, потерявшая более 20% МТ, засчитывали как умершую. Схема эксперимента для каждой исследовательской группы представлена в таблицах 183 и 184.

Таблица 183: Дизайн исследования руки с низким средним значением DAR

Группа	**Линия гриппа A (интраназальное заражение)**	**Исследуемый препарат**	**DAR**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Получение соединения**			**N**
						Объем дозы мл/кг	**мг/мл**	**Необходимый объем (мл)**	
1	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 БОЕ/мышь	Носитель (ФСБ)	---	в/м, однократно, T+2 ч	---	5	---	1	5
2		Только Fc	---	в/м, однократно, T+2 ч	0,3	5	0,06	1	5
3		Конъюгат 45a	0,4	в/м, однократн	0,3	5	0,06	1	5

Группа	Линия гриппа А (интраназальное заражение)	Исследуемый препарат	DAR	Путь/Схема	Доза (мг/кг)	Получение соединения			N
						Объем дозы мл/кг	мг/мл	Необходимый объем (мл)	
				о, Т+2 ч					
4		Конъюгат 45a	0,4	в/м, однократно, Т+2 ч	0,1	5	0,02	1	5
5		Конъюгат 45a	0,4	в/м, однократно, Т+2 ч	0,03	5	0,006	1	5
6		Конъюгат 45a	1	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5	0,06	1	5
7		Конъюгат 45a	1	в/м, однократно, Т+2 ч	0,1	5	0,02	1	5
8		Конъюгат 45a	1	в/м, однократно, Т+2 ч	0,03	5	0,006	1	5
9		Конъюгат 45a	3,3	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5	0,06	1	5
10		Конъюгат 45a	3,3	в/м, однократно, Т+2 ч	0,1	5	0,02	1	5
11		Конъюгат 45a	3,3	в/м, однократно, Т+2 ч	0,03	5	0,006	1	5
12		Конъюгат 45a	4,7	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5	0,06	1	5
13		Конъюгат 45a	4,7	в/м, однократно, Т+2 ч	0,1	5	0,02	1	5
14		Конъюгат 45a	4,7	в/м, однократно, Т+2 ч	0,03	5	0,006	1	5

Таблица 184: Дизайн исследования группы с высоким DAR

Группа	**Линия гриппа А (интраназальное заражение)**	**Исследуемый препарат**	**DAR**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Получение соединения**			**N**
						Объем дозы мл/кг	**мг/мл**	**Необходимый объем (мл)**	
1	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 БОЕ/мышь	Носитель (ФСБ)	---	в/м, однократно, Т+2 ч	---	5	---	1	5
2		Только Fc	---	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5	0,06	1	5
3		Конъюгат 45a	4,7	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5	0,06	1	5
4		Конъюгат 45a	4,7	в/м, однократно, Т+2 ч	0,1	5	0,02	1	5
5		Конъюгат 45a	4,7	в/м, однократно, Т+2 ч	0,03	5	0,006	1	5
6		Конъюгат 45a	5,1	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5	0,06	1	5
7		Конъюгат 45a	5,1	в/м, однократно, Т+2 ч	0,1	5	0,02	1	5
8		Конъюгат 45a	5,1	в/м, однократно, Т+2 ч	0,03	5	0,006	1	5
9		Конъюгат 45a	7,3	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5	0,06	1	5
10		Конъюгат 45a	7,3	в/м, однократно, Т+2 ч	0,1	5	0,02	1	5
11		Конъюгат	7,3	в/м,	0,03	5	0,006	1	5

Группа	Линия гриппа А (интраназальное заражение)	Исследуемый препарат	DAR	Путь/Схема	Доза (мг/кг)	Получение соединения			N
						Объем дозы мл/кг	мг/мл	Необходимый объем (мл)	
		45a		однократно, T+2 ч					

В первой группе исследования варианты со средним значением DAR 0,4, 1,0, 3,3 или 4,7 применяли при концентрациях 0,03, 0,1 и 0,3 мг/кг (однократное в/м введение в T+2 ч по сравнению с заражением вирусом). В этом исследовании мыши, получавшие носитель (ФСБ), умирали от инфекции к 7-му дню, а мыши, получавшие только Fc (SEQ ID NO: 72) умирали на 6 день (таблица 185). Напротив, варианты конъюгата 45a со средними значениями DAR 1,0, 3,3 и 4,7 были полностью защищены при самой высокой концентрации дозы (0,3 мг/кг). Только конъюгат со средним значением DAR 0,4 не смог обеспечить защиту, при этом мыши достигли смертности к 9-му дню, что указывает на то, что он имел самую низкую среднюю эффективность DAR среди протестированных конъюгатов. При следующей наименьшей дозе конъюгата (0,1 мг/кг) только мыши, получавшие конъюгаты со средним значением DAR 3,3 или 4,7, были полностью защищены. Два более низких средних конъюгата DAR (0,4 и 1,0) при этой дозе достигли смертности на 7 и 9 день, соответственно. В группе с конечной дозой (0,03 мг/кг) только вариант конъюгата 45a со средним значением DAR 4,7 продемонстрировал какую-либо активность (80% выживаемости). Основываясь на данных о смертности, в этой группе исследования была очевидна четкая тенденция: увеличение среднего значения DAR приводило к увеличению эффективности.

Данные о массе тела для групп исследования группы 1 подтверждают тенденции, наблюдаемые в данных о смертности (таблица 186). Например, в группах с дозой 0,3 мг/кг все варианты конъюгата 45a со средним значением DAR 1,0, 3,3 и 4,7 были защитными на основании смертности, но мыши, получавшие вариант DAR со средним значением 1,0, имели большую потерю массы тела, чем конструкции с более высоким средним значением DAR. . Это привело к потере защиты вариантом DAR со средним значением 1,0 при снижении дозы до 0,1 мг/кг. Точно так же при дозе 0,1 мг/кг мыши, получавшие вариант DAR со средним значением 3,3, были защищены от летального заражения на основании смертности, но имели большую потерю массы тела, чем животные, получавшие вариант DAR со средним значением 4,7. По обоим показателям исследования (смертность и масса тела) наблюдалась большая эффективность при увеличении среднего значения DAR.

Таблица 185: Данные о смертности (% выживаемости) для группы 1.

День после заражения	Носитель (ФСБ)	Только Fc	Среднее значение DAR											
			0,4			1,0			3,3			4,7		
		(0,3 мг/кг)	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/	(0,3 мг/кг)	(0,1 мг/кг)	(0,03 мг/

					кг)			кг)			кг)			кг)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	40	0	100	60	80	100	100	80	100	100	100	100	100	100
7	0		40	0	0	100	80	0	100	100	80	100	100	100
8			20			100	20		100	100	60	100	100	100
9			0			100	0		100	100	20	100	100	80
10						100			100	100	0	100	100	80
11						100			100	100		100	100	80
12						100			100	100		100	100	80
13						100			100	100		100	100	80
14						100			100	100		100	100	80

Таблица 186: Данные МТ для группы 1. Средняя масса тела для группы до первой смерти в группе.

День после заражения	**Носитель (ФСБ)**	**Только Fc**	**Среднее значение DAR**											
			0,4			**1,0**			**3,3**			**4,7**		
		(0,3 мг/кг)	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	96,9	98,8	98,2	97,9	97,7	98	97,6	97,9	97	97,1	99,9	97,7	97,8	99,8
2	100	101,9	101,2	100,3	99,8	99,9	99,6	100,9	101,8	99,2	102,9	102,4	100,9	100,7
3	93,1	93,4	96,8	95	98,3	96,3	96,6	94,3	100,1	97,7	98,1	101,3	98,2	99,4
4	83,6	83,3	89	84,7	88,1	91,6	88,8	86,3	99,7	93,9	92	100,9	95	97,2
5	79,9	80	86,3	81,8	84,2	95,6	89,1	82,9	101,1	96,3	91,8	100,4	97,4	98,9
6			81,8	76,9	77,5	95,7	84,5	77,4	102,3	96,6	88,8	103,5	99,9	97,5
7			76,8			91,4	78,9		103,6	92,3	82,4	105	100,8	91,3

8						95,7			104,5	92,9		103,9	101,3	85,3
9						97,2			104,2	96,4		103,9	103,4	83,9
10						98,5			105	98,2		107,8	104,3	
11						98,2			104,7	99,8		106,8	103,5	
12						98,9			105,1	102,9		108,7	104,5	
13						99,7			107,2	104,3		110,5	106,1	
14						99,9			105,8	103,6		109	104,7	

В группе 2 исследования варианты конъюгата 45a со средними значениями DAR 4,7, 5,1 и 7,3 оценивали при тех же уровнях доз, что и в группе 1 (0,3, 0,1 и 0,03 мг/кг). В отличие от результатов, наблюдаемых в группе 1, увеличение среднего DAR выше 4,7 не увеличивало активность конъюгата 45a. Все три варианта DAR имели примерно одинаковую активность на основании показателей смертности и массы тела (таблицы 187 и 188, соответственно). В этих конструкциях с более высоким DAR наблюдались лишь небольшие различия, которые находились в пределах нормальной экспериментальной ошибки, наблюдаемой в моделях эффективности (обратите внимание на немного более быстрое время до гибели для животных, получавших носитель, в группе 2). Более поздняя точка включает наблюдение, что конъюгат DAR со средним значением 4,7 был защитным в первой группе при дозе 0,03 мг/кг, но не во 2 группе. В совокупности результаты обеих групп исследования демонстрируют отчетливое увеличение эффективности до среднего DAR 4,7, но дальнейшее увеличение среднего DAR не приводит к большей эффективности. Таким образом, средний DAR, равный 4,7, является минимальным средним DAR, при котором достигается максимальная активность конъюгата 45a.

Таблица 187: Данные о смертности (% выживаемости) для группы 2

День после заражения	**Носитель (ФСБ)**	**Только Fc**	**Среднее значение DAR**								
			4,7			**5,1**			**7,3**		
		(0,3 мг/кг)	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

5	40	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	0	40	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7		0	100	100	60	100	100	80	100	100	100
8			100	100	60	100	100	40	100	100	80
9			100	100	40	100	100	20	100	100	40
10			100	100	0	100	80	0	100	100	0
11			100	100		100	80		100	100	
12			100	100		100	80		100	100	
13			100	100		100	80		100	100	
14			100	100		100	80		100	100	

Таблица 188: Данные MT для группы 2: Средняя масса тела для группы до первой смерти в группе

День после заражения	**Носитель (ФСБ)**	**Только Fc**	**Среднее значение DAR**								
			4,7			**5,1**			**7,3**		
		(0,3 мг/кг)	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,5	98,4	98,4	98,3	98,2	98,1	98,5	98,6	99,4	96,5	99,4
2	98,7	100,3	99,9	100,5	99,3	97,7	98,5	101,3	100,2	102	99,1
3	93,7	95,8	99,8	100,7	99,3	101,1	99,7	100,8	100,7	100,9	100,3
4	81	84,9	99,6	99	93,2	98	95,4	93,5	100,1	99,9	97,4
5	77,7	81,2	100	98,8	91,5	98,5	97,1	91	96,7	99,7	93,7
6		76,9	100	98,9	86	99,9	95,6	85,9	100,3	99,2	88,6
7			102,5	100,5	81,6	102	88,8	82,9	103,4	97,8	85,3
8			102,8	100,8		103,3	87,8		103,5	98,8	
9			101,9	103,3		104,9	89,4		104,5	102,3	
10			103,6	105,4		105,6	95,3		106,4	105	
11			103,4	104		105,1			106,2	103,9	
12			104	104		104,5			105,4	104,2	
13			103,8	104		105,1			104,9	103,1	
14			102,3	102,5		102,8			103,1	103,1	

Пример 205. Определение активности конъюгата 45a в отношении пандемического штамма гриппа A (A/California/12/2012; H1N1) на летальной мышиной модели.

Конъюгат 45a оценивали на модели летальной формы гриппа H1N1 у самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/CA/12/2012) представляет собой

пандемический изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. Эксперимент состоял из 7 групп по 5 мышей в каждой. На 0 день всех мышей заражали вирусом в дозе 3x LD_{95} (3E4 вирус/мышь) путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл после легкой анестезии кетамином/ксилазином (100 и 10 мг/кг, соответственно). Группы получали однократное введение конъюгата 45a, Fc hIgG1 или носителя (ФСБ) через 2 часа после заражения вирусом путем внутримышечного (в/м) введения (правый бок). Конъюгат 45a тестировали в концентрациях 3, 1, 0,3, 0,1 и 0,03 мг/кг. Смертность и массу тела (МТ) контролировали ежедневно в течение 21 дней. Любую мышь, потерявшая более 20% МТ, засчитывали как умершую. Схема эксперимента представлена в таблице 189.

Таблица 189: Схема исследования

Группа	Исследуемый препарат	Путь/ Схема	Доза (мг/кг)	Объем дозы (мг/кг)	мг/мл	Необходимый объем (мл)	N (balb/c)
1	ФСБ	в/м, T+2 ч	---	5	---	1	5
2	Только Fc	в/м, T+2 ч	3	5	0,6	1	5
3	Конъюгат 45a	в/м, T+2 ч	3	5	0,6	1	5
4		в/м, T+2 ч	1	5	0,2	1	5
5		в/м, T+2 ч	0,3	5	0,06	1	5
6		в/м, T+2 ч	0,1	5	0,02	1	5
7		в/м, T+2 ч	0,03	5	0,006	1	5

В этом исследовании однократное внутримышечное введение конъюгата 45a полностью защищало мышей от летального заражения изолятом пандемического сезонного гриппа (H1N1) в дозах 0,3, 1 и 3 мг/кг (таблица 190). Кроме того, частичная защита наблюдалась (относительно носителя) в двух группах с самой низкой дозой (0,1 и 0,03 мг/кг) с выживаемостью 60 и 20%, соответственно. Напротив, животные, получавшие носитель, умирали от инфекции к 8 дню, в то время как животные, получавшие только Fc hIgG1, достигали 80% смертности. Активность конъюгата 45a также подтверждается данными МТ. У мышей, которым вводили полностью защитные дозы (3, 1 и 0,3 мг/кг), отмечалась временная потеря МТ примерно на 3–5-й день, а затем неуклонно восстанавливалась МТ до конца исследования (21-й день) (таблица 191). В совокупности это исследование продемонстрировало эффективность конъюгата 45a, как по показателям смертности, так и по показателям массы тела, в отношении важного изолята пандемического гриппа.

Таблица 190: Процент выживаемости

День после заражения	**Носитель (ФСБ)**	**Fc hIgG1**	**Конъюгат 45a**				
		(3 мг/кг)	**(3 мг/кг)**	**(1 мг/кг)**	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100

5	40	60	100	100	100	60	20
6	20	20	100	100	100	60	20
7	20	20	100	100	100	60	20
8	0	20	100	100	100	60	20
9		20	100	100	100	60	20
10		20	100	100	100	60	20
11		20	100	100	100	60	20
12		20	100	100	100	60	20
13		20	100	100	100	60	20
14		20	100	100	100	60	20
15		20	100	100	100	60	20
16		20	100	100	100	60	20
17		20	100	100	100	60	20
18		20	100	100	100	60	20
19		20	100	100	100	60	20
20		20	100	100	100	60	20
21		20	100	100	100	60	20

Таблица 191: Средняя потеря массы тела (%), до первой гибели в группе

День после заражения	**Носитель (ФСБ)**	**Fc hIgG1**	**Конъюгат 45a**				
		(3 мг/кг)	**(3 мг/кг)**	**(1 мг/кг)**	**(0,3 мг/кг)**	**(0,1 мг/кг)**	**(0,03 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100	100	100
1	97,8	99	96,8	97,9	97,1	99,8	98,4
2	91,6	92	96	93,8	91,8	90,8	91
3	84,5	86,9	93,5	92,2	87,1	84,7	84,3
4	80,4	82,5	95,8	92,3	88,1	80,1	80,3
5	76,5	77,6	95,2	90,6	86,9	78,2	76,6
6			98,2	94,5	89,7		
7			97,7	92,8	89,9		
8			98,6	94,1	91,4		
9			98,3	96,8	92,7		
10			99,7	98,2	95		
11			102,8	100,3	98,7		
12			99,6	99	96,2		
13			101,4	101,8	97,5		
14			101,5	100,8	96,4		
15			100,8	99,1	96,6		
16			100,4	101,4	97,7		
17			102,7	103,9	100,1		

18			102,4	102,5	98,6		
19			103,9	103,9	100,9		
20			104,6	104,1	100,3		
21			104	103,9	99,5		

Пример 206. Эффективность конъюгата 45b в комбинации с балоксавиром против гриппа A (H1N1) на модели летального мышиного гриппа

Конъюгат 45b оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус для провокационного заражения (A/California/07/2009) представляет собой пандемический изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 11 групп по 5 мышей. На 0 день всех мышей заражали вирусом в 3-кратной дозе LD_{95} (~3E4 вирус/мышь) путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл после легкой анестезии кетамином/ксилазином (100 и 10 мг/кг, соответственно). Группы получали носитель, конъюгат 45b, балоксавир марбоксил (DC Chemicals, кат. № DC11056; суспендирован в 0,5% метилцеллюлозе) или их комбинацию (через 2 часа после заражения). Балоксавир вводили перорально (п/о) два раза в день в течение 3 дней, а конъюгат 45b вводили подкожно (п/к) в виде разовой дозы (таблица 192). Смертность и массу тела (МТ) контролировали ежедневно в течение 14 дней. Любую мышь, потерявшая более 20% МТ, засчитывали как умершую.

Таблица 192: Дизайн исследования

Группа	**Штамм гриппа A**	**Исследуемый препарат**	**Путь, схема (T+2 часа)**	**Доза (мг/кг)**	**N**
1	A/CA/07/09 (H1N1) 3E4 БОЕ/мышь через интраназальный путь введения	Носитель (ФСБ)	п/к, однократная доза	---	5
2		конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,01	5
3		конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,03	5
4		конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,1	5
5		конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,3	5
6		Балоксавир	перорально, два раза в день в течение 3 дней	1	5
7		Балоксавир	перорально, два раза в день в течение 3 дней	3	5
8		Балоксавир	перорально, два раза в день в течение 3 дней	10	5
9		Балоксавир	перорально, два раза в день в течение 3 дней	3	5
		конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,01	5
10		Балоксавир	перорально, два раза в день в течение 3 дней	3	5

Группа	Штамм гриппа А	Исследуемый препарат	Путь, схема (Т+2 часа)	Доза (мг/кг)	N
		конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,03	5
11		Балоксавир	перорально, два раза в день в течение 3 дней	3	5
		конъюгат 45b	п/к, однократная доза	0,1	5

Для определения активности конъюгата 45b и балоксавира по отдельности диапазон доз определяли для каждой молекулы. Для конъюгата 45b дозы 0,1 и 0,3 мг/кг были защитными, в то время как 0,01 и 0,03 не были основаны на выживаемости (таблица 193). Для балоксавира дозы 1 и 3 мг/кг были способны отсрочить, но не предотвратить гибель к 14 дню. Напротив, доза балоксавира 10 мг/кг обеспечивала 80% защитный эффект.

Для комбинированных исследований среднюю дозу балоксавира (3 мг/кг) вводили в комбинации с конъюгатом 45b в количестве 0,01, 0,03 и 0,1 мг/кг (группы 9-11). Как показано в таблице 193, ни конъюгат 45b в дозе 0,03 мг/кг, ни балоксавир в дозе 3 мг/кг по отдельности не обладают защитным действием. Однако важно отметить, что в комбинации они продемонстрировали 80% защиту в ходе исследования (группа 10).

Таблица 193: % выживаемости

День	Носитель	конъюгат 45b (мг/кг) (п/к, однократно)				Балоксавир (мг/кг) (п/о, два раза в сутки х3 дня)			Комбинация конъюгат 45b/балоксавир (мг/кг)		
		0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	10	0,01 / 3	0,03 / 3	0,1 / 3
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	20	60	60	100	100	100	100	100	100	100	100
6	0	20	40	10	10	100	100	100	100	100	100

				0	0						
7	0	20	20	100	100	100	100	100	100	100	100
8	0	0	0	100	100	100	80	100	100	100	100
9	0	0	0	100	100	40	0	100	0	80	100
10	0	0	0	100	100	0	0	80	0	80	100
11	0	0	0	100	100	0	0	80	0	80	100
12	0	0	0	100	100	0	0	80	0	80	100
13	0	0	0	100	100	0	0	80	0	80	100
14	0	0	0	100	100	0	0	80	0	80	100

Данные о массе тела дополнительно иллюстрируют усиленное действие двух молекул, вводимых в комбинации (таблица 194). При дозировке 0,1/3 мг/кг (конъюгат 45b/балоксавир) наблюдается резкое снижение потери массы тела. Конъюгат 45b, введенный в дозе 0,1 мг/кг, сам по себе является защитным, но у животных наблюдается снижение массы тела на 18,8% на 4-й день. Однако эта доза, вводимая с незащитной дозой балоксавира (3 мг/кг), снижает максимальную потерю массы тела до 4,5% (группа 11).

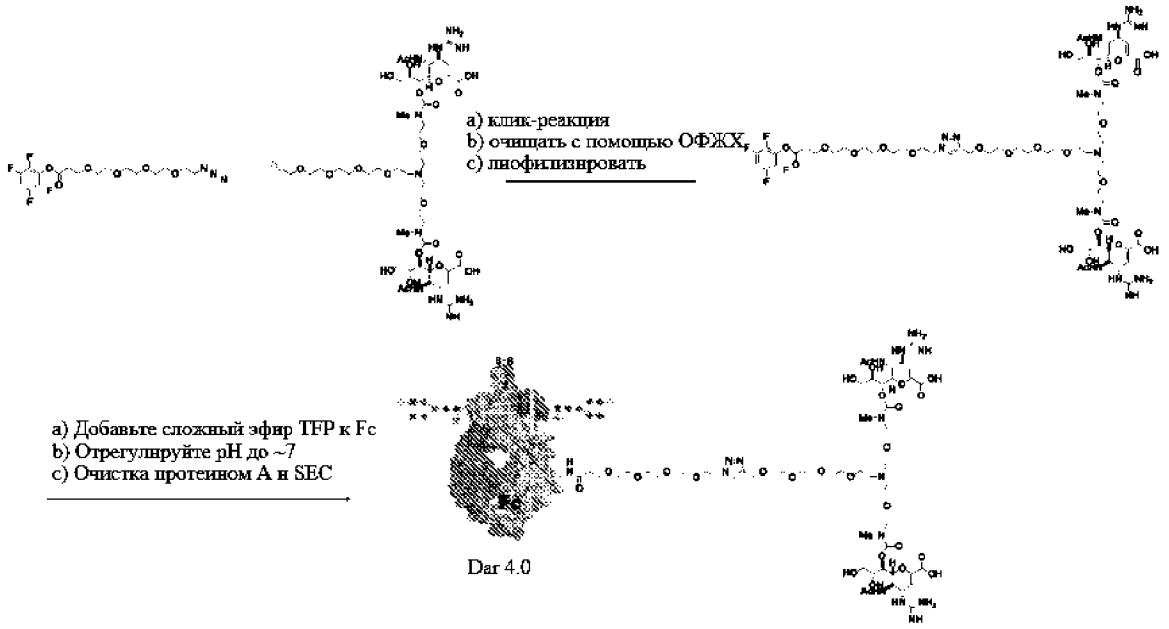
Таблица 194: % массы тела

День	**Носитель**	**конъюгат 45b (мг/кг) (п/к, однократно)**				**Балоксавир (мг/кг) (п/о, два раза в сутки x3 дня)**			**Комбинация конъюгат 45b/балоксавир (мг/кг)**		
		0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	10	0,01 / 3	0,03 / 3	0,1 / 3
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

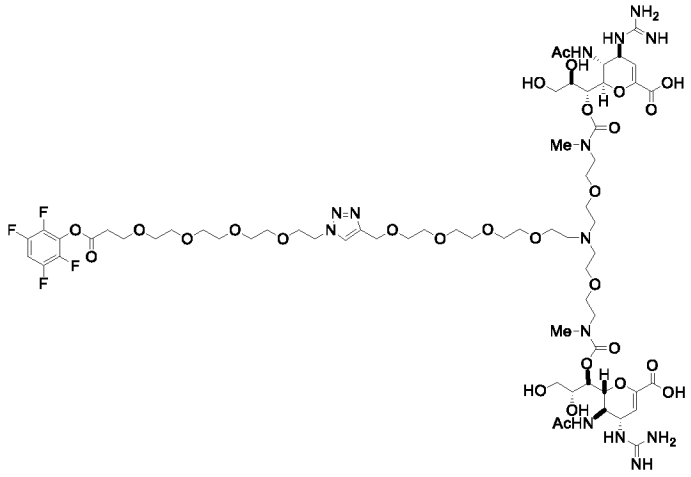
1	96,9	97,9	97	97,7	99,8	99,2	97,1	95,9	97,5	96,7	96,8
2	94,3	96,8	95,2	97,3	99,3	99,8	99	101,8	98,9	95,4	98
3	85,4	86,3	85,5	85,5	88,4	90,3	92,1	97,4	94	93,2	95,5
4	78,9	79,8	79,8	81,2	86	90,5	92,5	98	94,2	92,7	95,5
5	77,2	78,7	79,3	81,6	95,3	94,6	97,3	100,8	99,1	96,9	100
6				83,9	98,6	91,1	89,9	98,9	93,3	94,3	99,2
7				85,8	99,1	84,6	83,3	91,1	85,6	87,8	100,4
8				87,9	99,6	79,5	77,9	86,9	79,4	83,9	99,8
9				90	99,1	75,7		86,4	74,8	85,2	102,4
10				89,2	99,9			88,2			100,4
11				92,8	99,9						101
12				97,7	100,8						100,9
13				98,7	101,8						100,3
14				101	101,4						102,1

В этом важном исследовании две разные группы продемонстрировали повышенную активность конъюгата 45b при одновременном введении балоксавира. Кроме того, нельзя упускать из виду важное наблюдение, что эти два соединения не ингибируют активность друг друга. Наблюдение, что верно обратное, и комбинация более эффективна, является преимуществом, которое, вероятно, отразится в клинике.

Пример 207. Альтернативный синтез конъюгата 45a

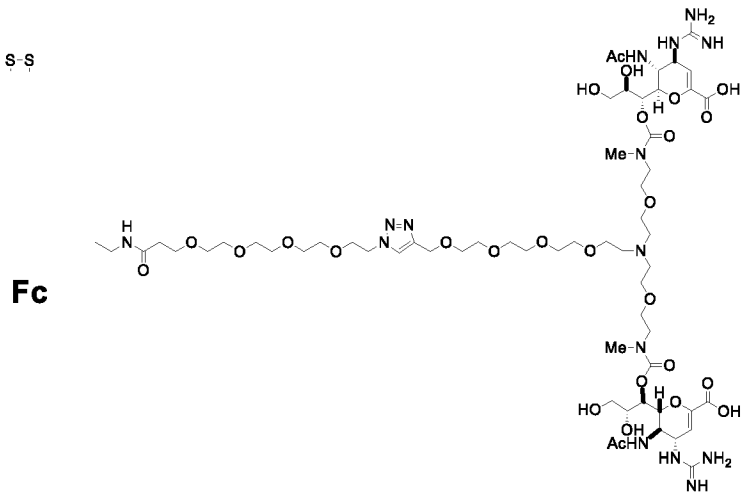


Стадия a.



Раствор азидо-ПЭГ4-TFP эфира (0,1 г, 0,067 ммоль) и димера, функционализированного алкином (0,0383 г, 0,0871 ммоль) в ДМФ (2,0 мл), обрабатывали раствором сульфата меди (II) (0,0027 г, 0,0168 ммоль), аскорбат натрия (0,0133 г, 0,067 ммоль) и THPTA (0,0116 г, 0,027 ммоль) при комнатной температуре в воде (1,5 мл). Затем реакционную смесь продували азотом в вакууме 3 раза и перемешивали в атмосфере азота. ЖХ-МС через 30 мин показывает полное потребление исходного материала. Реакционную смесь подкисляли 400 мкл уксусной кислоты, а затем очищали непосредственно хроматографией с обращенной фазой, элюируя градиентом от 5% до 100% ацетонитрил/вода с 0,1% ТФУ. Фракции, содержащие продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали в течение ночи. Выход тройной соли ТФУ составил 69%. Ион(-ы), найденный(-ые) методом ЖХМС: $(M+2H)^{+2}$ = 795,4, $(M+3H)^{+3}$ = 530,8, $(M+4H)^{+4}$ = 398,4.

Стадия b.



Раствор Fc (0,100 г в 5,2 мл, 1,717 мкмоль, молекулярная масса = 58,218, SEQ ID NO: 72) в буфере ФСБ с pH 7,4 обрабатывали твердым эфиром TFP (0,0273 г, 17,17 мкмоль) с предыдущей стадии. pH доводили до ~7,0 с помощью боратного буфера (120 мкл, 1M, pH 8,5), затем осторожно встряхивали при комнатной температуре. ВП-МАЛДИ через 1,5 часа показывает средний DAR 3,3, который не изменился при дальнейшем смешивании. Через 24 часа добавляли дополнительный эфир TFP (0,0073 г, 4,6 мкмоль) и продолжали встряхивание в течение еще 3 часов. Неочищенный конъюгат очищали с помощью белка A и ЭХ в соответствии с общими методами очистки. Общий выход после белка A составил ~83%, а после ЭХ ~77%. ВП-МАЛДИ очищенного конъюгата показал среднюю массу 63574, что соответствует среднему DAR 4,0.

Альтернативный синтез, описанный в примере 207, имеет преимущество, поскольку он позволяет избежать воздействия на Fc аскорбата меди+2 и натрия, что приводит к получению более чистого неочищенного конъюгата, который имеет чистоту 98,9% по данным аналитической ЭХ только после очистки белком A. При таком уровне чистоты можно исключить очистку ЭХ, которая требует больших затрат времени и средств. Первоначальные попытки с азидо-ПЭГ4-NHS эфиром были лишь частично успешными, потому что NHS эфиром слишком реакционноспособен, чтобы его можно было очистить, и неочищенную реакционную смесь нужно было смешать с Fc, что потребовало удаления меди и удаления агрегатов с высокой молекулярной массой (от воздействия аскорбата натрия). Также этот подход не генерировал DAR выше 2. Последующие попытки использования менее реакционноспособного сложного эфира (тетрафторфенол TFP), который является достаточно стабильным, чтобы выдерживать очистку с обращенной фазой и лиофилизацию, позволяют провести клик-реакцию с азидоэфиром TFP отдельно от Fc, очистить и затем смешать с Fc. В примере 207 было достигнуто среднее значение DAR, равное 4,0, и более высокие значения DAR возможны при добавлении большего количества эфира TFP.

Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая Fc для конъюгата 45a, включала нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, которая включает C-концевой остаток лизина. После экспрессии C-концевой лизин Fc конъюгата 45a протеолитически расщепляется, в результате чего Fc имеет последовательность SEQ ID NO: 72. Наличие или отсутствие C-концевого лизина не меняет свойств Fc или соответствующего конъюгата.

Пример 208. Эффективность конъюгата 45a в комбинации с балоксавиром против гриппа A (H1N1) на мышиной модели гриппа с летальным исходом (подтверждающее исследование)

Конъюгат 45a оценивали в комбинации с балоксавира марбоксилом (BXM) против летальной формы гриппа H1N1 IAV у самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Это было продолжением

примера 206, в котором тестировали ту же комбинацию в начальном эксперименте, но использовали подкожное введение дозы конъюгата 45a вместо внутримышечного (в/м), которое применялось в настоящем исследовании. Вирус для провокационного заражения (A/California/07/2009) представляет собой пандемический изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 8 групп по 5 мышей. На 0 день всех мышей заражали вирусом в дозе 3x LD_{95} (3E4 вирус/мышь) путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл после легкой анестезии кетамином/ксилазином (100 и 10 мг/кг, соответственно). Группы получали носитель, только Fc hIgG1, конъюгат 45a, BXM (DC Chemicals, кат. № DC11056; суспендирован в 0,5% метилцеллюлозе) или их комбинацию (через 2 часа после заражения). BXM вводили перорально (п/о) два раза в день в течение 3 дней, а конъюгат 45a вводили в/м в виде разовой дозы (таблица 195). Смертность и массу тела (МТ) контролировали ежедневно в течение 21 дней. Любую мышь, потерявшую более 20% массы тела в течение 2 дней подряд, засчитывали как умершую.

Таблица 195: Дизайн исследования комбинации конъюгата 45a и BXM

Группа	**Штамм гриппа A**	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема (Т+2 часа)**	**Доза (мг/кг)**	**N**
1	A/CA/07/09 (H1N1) 3E4 БОЕ/мышь через интраназальный путь введения	Носитель (ФСБ)	в/м, однократная доза	---	5
2		Fc hIgG1	в/м, однократная доза	0,1	5
3		Конъюгат 45a	в/м, однократная доза	0,03	5
4		Конъюгат 45a	в/м, однократная доза	0,1	5
5		BXM	перорально, два раза в день в течение 3 дней	3	5
6		BXM	перорально, два раза в день в течение 3 дней	10	5
7		BXM	перорально, два раза в день в течение 3 дней	3	5
		Конъюгат 45a	в/м, однократная доза	0,03	5
8		BXM	перорально, два раза в день в течение 3 дней	3	5
		Конъюгат 45a	в/м, однократная доза	0,1	5

Для определения активности конъюгата 45a и BXM по отдельности диапазон доз определяли для

каждой молекулы. Для конъюгата 45a доза 0,1 мг/кг была защитной, тогда как доза 0,03 мг/кг не была основана на выживаемости (таблица 196). Для BXM группа, получавшая 10 мг/кг (два раза в день x 3 дня), была защищена, в то время как группа, получавшая 3 мг/кг по той же схеме дозирования, не была защищена. Группы, которым вводили только носитель или Fc hIgG1, не были защищены. Комбинация конъюгата 45a (0,1 мг/кг) с BXM (3 мг/кг) также была полностью защищена, как и ожидалось на основании приведенных выше результатов.

Животные группы 7 получали субэффективные уровни как конъюгата 45a (0,03 мг/кг), так и BXM (3 мг/кг) в комбинации. Хотя ни один из исследуемых препаратов не обладал значительной защитой при введении по отдельности, в комбинации они обеспечивали полную защиту (таблица 196). У животных в группе 7 также наблюдалась только временная потеря массы тела, которая не превышала 5,2% (3 день) (таблица 197). К концу исследования эта группа превысила исходную массу тела, достигнув 106,3% исходной массы тела на 21-й день. В дополнение к отсутствию каких-либо антагонистических эффектов между конъюгатом 45a и BXM было обнаружено обратное, что свидетельствует о дополнительной пользе совместного лечения этими двумя терапевтическими средствами.

Таблица 196: % выживаемости для исследуемых групп

	Контроли		**Конъюгат 45a (мг/кг) (в/м, однократно)**		**Балоксавир (мг/кг) (п/о, два раза в сутки x3 дня)**		**Комбинация конъюгат 45a/балоксавир (мг/кг)**	
День	Носитель	Fc hIgG1 (0,1 мг/кг)	0,03	0,1	3	10	0,03 / 3	0,1 / 3
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	80	100	100	100	100	100
5	80	60	60	100	100	100	100	100
6	80	20	20	100	100	100	100	100
7	60	0	20	100	100	100	100	100
8	0		20	100	60	100	100	100
9			20	100	0	100	100	100
10			20	100		100	100	100
11			20	100		100	100	100
12			20	100		100	100	100
13			20	100		100	100	100
14			20	100		100	100	100
15			20	100		100	100	100
16			20	100		100	100	100
17			20	100		100	100	100
18			20	100		100	100	100

19			20	100		100	100	100
20			20	100		100	100	100
21			20	100		100	100	100

Таблица 197: Средняя масса тела по дням (средняя по группе; до 1-й гибели в группе)

	Контроли		**Конъюгат 45a (мг/кг) (в/м, однократно)**		**Балоксавир (мг/кг) (п/о, два раза в сутки x3 дня)**		**Комбинация конъюгат 45a/балоксавир (мг/кг)**	
День	Носитель	Fc hIgG1 (0,1 мг/кг)	0,03	0,1	3	10	0,03 / 3	0,1 / 3
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	102,1	100,2	99,9	99,6	97,9	97,9	100,3	100
2	94,9	94,3	93,3	95	90,5	98,7	99,9	99,6
3	85	84,2	83,1	83,7	88,5	94,6	94,8	94,3
4	81,3	79,6	79,7	81,4	90,7	95,8	96,9	96,1
5	82,4	80,1	82,3	88,3	95,3	99,4	100,9	100,4
6				91,1	87,7	96,7	99	99,2
7				91,7	81	89,6	96,8	98,5
8				96,9	76,7	90,9	101,6	101,9
9				95,7		92,6	99,1	99
10				99,4		98,2	101,7	102,3
11				98,6		95,8	98,7	100,3
12				98,4		96,8	100,7	99,9
13				101		99,5	102,9	101,1
14				102,3		99,2	103,7	103,6
15				101,2		97,8	102,1	100,2
16				102,8		99,5	103,1	102,8
17				101,9		98,3	102,7	101,1
18				102,3		97,1	101,7	100,1
19				103,9		98,9	101,6	100,6
20				103,9		98,9	104,5	102,6
21				107		101,2	106,3	103,8

Пример 209. Определение активности конъюгата 45a в отношении компонента четырехвалентной вакцины для северного полушария 2020-2021 гг. (A/Hawaii/70/2019pdm; H1N1) на летальной мышиной модели.

Конъюгат 45a оценивали на модели летальной формы гриппа H1N1 у самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус для заражения (A/Hawaii/70/2019) представляет собой пандемический изолят H1N1, способный вызывать летальные инфекции у мышей. Это также рекомендуемый компонент

четырехвалентной вакцины для северного полушария 2020–2021 годов.

Эксперимент состоял из 9 групп по 5 мышей в каждой. В день 0 всех мышей заражали вирусом в дозе 2x LD_{95} (вирус 2E3/мышь) путем интраназальной инокуляции в объеме 30 мкл после анестезии кетамином/ксилазином (100 и 10 мг/кг, соответственно). Группы получали однократное введение конъюгата 45a, Fc hIgG1 или носителя (ФСБ) через 2 часа после заражения вирусом путем внутримышечного введения (в/м, объем дозы 5 мл/кг) (правый бок). Конъюгат 45a испытывали в концентрациях 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 и 0,01 мг/кг. Неинфицированная группа также была включена в исследование в качестве контроля. Смертность и массу тела (МТ) контролировали ежедневно в течение 21 дней. Любую мышь, сохраняющую 20%-ную потерю массы тела в течение двух дней подряд, засчитывали как умершую. Схема эксперимента представлена в таблице 198.

В этом исследовании однократное внутримышечное введение конъюгата 45a полностью защищало мышей от летального заражения A/HA/70/2019 (H1N1) в дозах 0,3, 1 и 3 мг/кг (таблица 199). Активность конъюгата 45a при этих уровнях доз была значительной по сравнению с животными, получавшими носитель (P=0,0031). Животные, получавшие носитель и Fc hIgG1, напротив, достигали 100% смертности на 5-й день. Частичная защита также наблюдалась в группах с дозами 0,1 и 0,03 мг/кг (выживаемость 60 и 20%, соответственно), но не была статистически значимой по сравнению с животными, получавшими носитель. В совокупности данные о выживаемости продемонстрировали, что конъюгат 45a эффективен против этого важного изолята гриппа, и в группах с более низкими дозами был очевиден четкий ответ на дозу (Фиг. 119).

Активность конъюгата 45a также подтверждается данными МТ. У мышей, получавших полностью защитные дозы (3, 1 и 0,3 мг/кг), наблюдалась временная потеря массы тела на 3-й день (максимум 12% потери массы тела при дозе конъюгата 45a 0,3 мг/кг), прежде чем устойчиво восстановиться до конца исследования (21 день) (таблица 200). Тенденции МТ отражали результаты исследования по выживаемости и подтверждали эффективность конъюгата против этого изолята H1N1.

В совокупности это исследование продемонстрировало эффективность конъюгата 45a, как по показателям смертности, так и по показателям массы тела, в отношении важного изолята пандемического гриппа. Поскольку документ A/HA/70/2019 был выбран для включения в вакцину для северного полушария 2020 года, он считается клинически значимым изолятом и представляет угрозу для здоровья населения. Активность конъюгата 45a в отношении этого пандемического штамма при однократной внутримышечной дозе 0,3 мг/кг поддерживает его дальнейшую разработку в качестве терапевтического средства против гриппа.

Таблица 198: Обзор активности конъюгата 45a в сравнении с исследованием A/HA/70/2019

Группа	**Линия гриппа A (интраназальное заражение)**	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Объем дозы (мг/кг)**	**Количество мышей**
1	Неинфицированные	Носитель (ФСБ)	в/м, однократно, T+2 ч	---	5	5
2	A/HA/70/2019 (H1N1) ~2E3 БОЕ/мл	Носитель (ФСБ)	в/м, однократно, T+2 ч	---	5	5
3		Fc hIgG1 (SEQ ID NO: 72)	в/м, однократно, T+2 ч	0,3	5	5
4		Конъюгат 45a	в/м, однократно, T+2 ч	3	5	5

5		Конъюгат 45a	в/м, однократно, T+2 ч	1	5	5
6		Конъюгат 45a	в/м, однократно, T+2 ч	0,3	5	5
7		Конъюгат 45a	в/м, однократно, T+2 ч	0,1	5	5
8		Конъюгат 45a	в/м, однократно, T+2 ч	0,03	5	5
9		Конъюгат 45a	в/м, однократно, T+2 ч	0,01	5	5

Таблица 199: % выживаемости животных по группам и датам

	Контроли			**Конъюгат 45a (мг/кг) (в/м, однократно)**					
День	Неинфицированные	Носитель	Fc hIgG1 (0,3 мг/кг) (SEQ ID NO: 72)	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	60	60	100	100	100	100	100	80
5	100	0	0	100	100	100	60	20	60
6	100			100	100	100	60	20	60
7	100			100	100	100	60	20	40
8	100			100	100	100	60	20	0
9	100			100	100	100	60	20	
10	100			100	100	100	60	20	
11	100			100	100	100	60	20	
12	100			100	100	100	60	20	
13	100			100	100	100	60	20	
14	100			100	100	100	60	20	
15	100			100	100	100	60	20	
16	100			100	100	100	60	20	
17	100			100	100	100	60	20	
18	100			100	100	100	60	20	
19	100			100	100	100	60	20	
20	100			100	100	100	60	20	
21	100			100	100	100	60	20	

Таблица 200: % средней массы тела в день (среднее значение по группе; до 1-й смерти в группе)

	Контроли			**Конъюгат 45a (мг/кг) (в/м, однократно)**					
День	Неинфицированные	Носитель	Fc hIgG1 (0,3 мг/кг)	3	1	0,3	0,1	0,03	0,01
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100,8	97,9	97,2	98,6	98,4	98,1	98,5	98,4	99,2
2	103,2	93,9	94,3	100,3	98,9	96,5	96,3	95,9	95,5
3	100,9	84,3	84,8	94,1	92,6	88	85,8	86,2	84,1
4	103,4		78,2	95,1	95,3	88,2	84,1	81,3	81,2
5	103,1			97,5	96,2	91,5	82,7	77	
6	105,5			100,3	99,2	96,3			
7	104,4			99,6	99,1	95,6			
8	105,1			102,2	102,4	100,5			
9	104,7			100,7	100,7	99,9			
10	103,9			101,6	100,9	100,2			
11	106,8			102,3	101,7	100,9			
12	108,7			102,8	103,4	101,9			
13	105,7			102,1	102,3	101,5			
14	108,7			102,9	104,7	103,8			
15	110,15			103,1	104	102,8			
16	106,5			100,9	101,5	99,5			
17	105,5			100,7	101	100,3			
18	106,1			100,6	101,6	100,5			
19	107,7			100,9	103	101,5			
20	107,2			99,9	102,5	101,5			
21	107,6			102,5	102,8	104,2			

Пример 210. Эффективность конъюгата 45a против гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) в модели летального исхода на мышах в течение 4 недель

Конъюгат 45a оценивали против летальной инфекции гриппа IAV H1N1 у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/8/1934) представляет собой адаптированный для мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 7 групп по 5 мышей. В день 0 всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 путем интраназальной (IN) инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Единственным исключением была группа 1, которая состояла из неинфицированных мышей, используемых в качестве контроля массы тела (МТ). Смертность и МТ регистрировали ежедневно в течение 28 дней, и любое животное с кумулятивной 20%-ной потерей массы в течение 2 дней подряд засчитывалось как умершее.

Исследуемые группы получали однократную внутримышечную (в/м) инъекцию через 2 часа после заражения вирусом конъюгата 45a (от 0,01 до 0,3 мг/кг), только Fc hIgG1 (0,3 мг/кг, SEQ ID NO: 72), или носитель (ФСБ). Инъекции производили в мышцу бедра правой задней конечности в объеме дозы 5 мл/кг.

Таблица 201: Схема исследования

Группа	**Грипп А**	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**N**
1	**Неинфицированные**	Носитель (ФСБ)	в/м, однократно, Т+2 ч	---	5
2	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 БОЕ/мышь	Носитель (ФСБ)	в/м, однократно, Т+2 ч	---	5
3		Fc hIgG1	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5
4		Конъюгат 45a	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5
5		Конъюгат 45a	в/м, однократно, Т+2 ч	0,1	5
6		Конъюгат 45a	в/м, однократно, Т+2 ч	0,03	5
7		Конъюгат 45a	в/м, однократно, Т+2 ч	0,01	5

Животные, получавшие носитель, начинали гибнуть только на 5-й день, при этом смертность достигала 100% к 7-му дню. Точно так же мыши, получавшие только Fc hIgG1 (в котором отсутствует противовирусная часть конъюгата), погибли от инфекции на 7-й день (Фиг. 120 и таблица 202). Напротив, группы, получавшие конъюгат 45a в дозах 0,1 и 0,3 мг/кг, были полностью защищены до окончания исследования на 28-й день. По сравнению с мышами, получавшими только носитель, это различие в выживаемости было статистически значимым (P=0,0020 для обеих групп по логарифмическому ранговому критерию (Мантеля-Кокса)). Однако конъюгат 45a, вводимый в дозах 0,01 и 0,03 мг/кг, был субэффективен, при этом смертность мышей достигала 100% на 8 и 7 дни, соответственно (Фиг. 120 и таблица 202).

Таблица 202: % выживаемости исследуемых групп по дням

	Контроли			**Конъюгат 45a (мг/кг)**			
День	**Неинфицированные**	**Носитель**	**Fc hIgG1 (0,3 мг/кг)**	**0,3**	**0,1**	**0,03**	**0,01**
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100

	Контроли			**Конъюгат 45a (мг/кг)**			
День	**Неинфицированные**	**Носитель**	**Fc hIgG1 (0,3 мг/кг)**	**0,3**	**0,1**	**0,03**	**0,01**
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	100	80	100	100	100	100	100
6	100	20	40	100	100	80	80
7	100	0	0	100	100	0	20
8	100			100	100		0
9	100			100	100		
10	100			100	100		
11	100			100	100		
12	100			100	100		
13	100			100	100		
14	100			100	100		
15	100			100	100		
16	100			100	100		
17	100			100	100		
18	100			100	100		
19	100			100	100		
20	100			100	100		
21	100			100	100		
22	100			100	100		
23	100			100	100		
24	100			100	100		
25	100			100	100		
26	100			100	100		
27	100			100	100		

	Контроли			**Конъюгат 45a (мг/кг)**			
День	**Неинфицированные**	**Носитель**	**Fc hIgG1 (0,3 мг/кг)**	**0,3**	**0,1**	**0,03**	**0,01**
28	100			100	100		

В дополнение к выживаемости, МТ также ежедневно контролировали на протяжении всего исследования. У неинфицированных мышей (группа 1) устойчиво увеличивалась масса тела, достигая 108,7% исходной массы тела к концу исследования, что свидетельствует об общем хорошем состоянии здоровья подопытных животных (таблица 203). Напротив, группы отрицательного контроля (2 и 3) начали терять массу тела в 1-й день, пока первое животное в каждой группе не достигло смертности на 5-й и 6-й день, соответственно. После первой смерти внутри группы значения массы тела не регистрировались, поскольку группа становится необъективной популяцией.

У мышей, получавших защитную дозу конъюгата 45a (группы 4 и 5), наблюдалась только временная потеря массы тела менее 5%. К концу исследования обе эти группы превышали исходную МТ (105,9 и 108,7%, соответственно). Как и ожидалось, мыши, получавшие субзащитную дозу конъюгата 45a (группы 6 и 7), демонстрировали устойчивую потерю массы до тех пор, пока животные не начинали умирать.

В совокупности эти данные демонстрируют эффективность конъюгата 45a против летального заражения гриппом A (H1N1). Примечательно, что защита была достигнута при однократной внутримышечной инъекции менее 1 мг/кг. Наконец, за животными наблюдали в течение полных 4 недель после заражения вирусом, что свидетельствует о том, что защищенные животные, скорее всего, полностью избавились от инфекции.

Таблица 203: % средней массы тела в день (среднее значение по группе; до 1-й смерти в группе)

	Контроли			**Конъюгат 45a (мг/кг) (в/м, однократно)**			
День	**Неинфицированные**	**Носитель**	**Fc hIgG1 (0,3 мг/кг)**	**0,3**	**0,1**	**0,03**	**0,01**
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100,5	98,1	97,7	96	98,7	98,5	98,2
2	101,3	97,8	98,3	96,5	99	100,4	98,4
3	102	92,1	92,7	97,2	98,3	94,6	94,4
4	103,2	84,3	85,1	97,4	95,3	89,2	87,7
5	106,5		80,8	101,2	102,3	89,1	83,9
6	104,9		74,7	99,7	98,6	81,4	77,9
7	106,8			102,6	101,3		

8	108,3			102,3	102,7		
9	103,6			99,6	101,7		
10	108,4			103,9	105,4		
11	105,1			100,5	102,4		
12	108			103,8	107,1		
13	107,7			102,9	105,1		
14	106,3			102,9	105,3		
15	106,6			103,4	105,9		
16	104,2			101,2	102,9		
17	104,9			101,2	103,9		
18	107			103,9	106,9		
19	107,3			104,3	106,1		
20	105,6			103	105,7		
21	104,7			103	105,6		
22	108,5			106,8	107,8		
23	106,8			103,5	106		
24	106,4			101,4	107,7		
25	106,1			103,2	107		
26	109,3			106,1	109,4		
27	108			105,1	107,8		
28	108,7			105,9	108,7		

Пример 211. Эффективность конъюгата 45a и осельтамивира против гриппа H1N1 A/CA/12/2012 и A/PR/8/1934 на летальной мышиной модели.

Конъюгат 45a и осельтамивир оценивали в отношении летального заражения двумя подтипами гриппа H1N1 (A/PR/8/34 и A/CA12/12) у самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Эксперимент включал 10 групп по 5 мышей, разделенных на две экспериментальные группы (таблица 204). В T+2ч мышам внутримышечно (в/м) вводили конъюгат 45a в дозе 0,3 мг/кг в однократной дозе. Также в T+2ч мышам перорально вводили осельтамивир в дозе 5 или 50 мг/кг два раза в день в течение 5 дней. Контрольным мышам внутримышечно вводили носитель (ФСБ) или только Fc hIgG1. За два часа до введения

соединения мышам интраназально вводили 3x LD_{95} A/PR/8/34 (3E2 БОЕ) или A/CA/12/12 (3E4 БОЕ). Для заражения вирусом мышей анестезировали смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно) и вводили вирус в объеме 30 мкл. Смертность и массу тела (МТ) регистрировали ежедневно в течение 14 часов, и любое животное с потерей МТ на 20% засчитывалось как умершее.

Против контрольных мышей A/PR/8/34, получавших только носитель или Fc (SEQ ID NO: 72) умирали от инфекции к 7 дню, в то время как мыши, которым вводили конъюгат 45a в дозе 0,3 мг/кг, были полностью защищены (таблица 205). Для животных, получавших осельтамивир, доза 50 мг/кг обеспечивала 80% защитный эффект, в то время как доза 5 мг/кг лишь отсрочивала смерть до 10-го дня. По отношению к носителю A/CA/12/12 и контрольным Fc животные достигали 100% смертности к 6 дню, и снова доза конъюгата 45a 0,3 мг/кг обеспечивала полную защиту. Напротив, осельтамивир не проявлял защитного действия при дозе 5 мг/кг, и даже в группе, получавшей дозу 50 мг/кг, выживаемость составляла всего 40%. Данные о массе тела для обеих групп исследования подтвердили данные о смертности (таблицы 205–208).

В совокупности эти данные показывают, что однократная доза конъюгата 0,3 мг/кг превосходит осельтамивир, даже когда последний принимается в дозе 5 или 50 мг/кг два раза в день в течение 5 дней.

Таблица 204: Дизайн исследования

Группа	**Линия гриппа A (интраназальное заражение)**	**Исследуемый препарат**	**DAR**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**	**Получение соединения**			**N**
						Объем дозы мл/кг	**мг/мл**	**Необходимый объем (мл)**	
1	A/PR/8/34 (H1N1) 3E2 БОЕ/мышь	Носитель (ФСБ)	---	в/м, однократно, T+2 ч	---	**5**	---	1	5
2		Только Fc	---	в/м, однократно, T+2 ч	0,3	**5**	0,06	1	5
3		Конъюгат 45a	4,6	в/м, однократно, T+2 ч	0,3	**5**	0,06	1	5
4		Осельтамивир	---	перорально, два раза в день в течение 5 дней	5	**10**	0,5	14	5
5		Осельтамивир	---	перорально, два раза в день в	50	**10**	5	14	5

				течение 5 дней					
Группа II									
6	A/CA/12/12 (H1N1) 3E4 БОЕ/мышь	Носитель (ФСБ)	---	в/м, однократно, T+2 ч	---	**5**	---	1	5
7		Только Fc	---	в/м, однократно, T+2 ч	0,3	**5**	0,06	1	5
8		Конъюгат 45a	4,6	в/м, однократно, T+2 ч	0,3	**5**	0,06	1	5
9		Осельтамивир	---	перорально, два раза в день в течение 5 дней	5	**10**	0,5	14	5
10		Осельтамивир	---	перорально, два раза в день в течение 5 дней	50	**10**	5	14	5

Таблица 205: % выживаемости A/PR/8/34

День после заражения	**Носитель (ФСБ)**	**Только Fc (0,3 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (0,3 мг/кг)**	**Осельтамивир (5 мг/кг)**	**Осельтамивир (50 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100
6	0	60	100	100	100
7		0	100	100	100
8			100	60	100
9			100	40	100
10			100	0	80

11			100		80
12			100		80
13			100		80
14			100		80

Таблица 206: % выживаемости зараженных A/CA/12/2012 мышей

День после заражения	**Носитель (ФСБ)**	**Только Fc (0,3 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (0,3 мг/кг)**	**Осельтамивир (5 мг/кг)**	**Осельтамивир (50 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100
4	80	100	100	100	100
5	0	20	100	20	40
6		0	100	20	40
7			100	20	40
8			100	0	40
9			100		40
10			100		40
11			100		40
12			100		40
13			100		40
14			100		40

Таблица 207: Средний % МТ мышей, зараженных A/PR/8/34, до первой смерти в группе

День после заражения	**Носитель (ФСБ)**	**Только Fc (0,3 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (0,3 мг/кг)**	**Осельтамивир (5 мг/кг)**	**Осельтамивир (50 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100
1	98,9	100,2	99,6	98,5	98,6
2	102	104,2	102,5	100,7	99,2
3	94,7	97,1	100,6	99,4	100,3

4	85,8	88,8	100,9	93,5	97,9
5	78,9	81,5	99	88,5	90,5
6	74,9	77,6	102	90	96
7			104	84,5	89,7
8			103,9	79,4	84,2
9			104,6		86,3
10			105,4		90,3
11			103,4		
12			103,9		
13			104,3		
14			106,3		

Таблица 208: Средний % МТ мышей, зараженных A/CA/12/2012, до первой смерти в группе

День после заражения	**Носитель (ФСБ)**	**Fc Только (0,3 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (0,3 мг/кг)**	**Осельтамивир (5 мг/кг)**	**Осельтамивир (50 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100
1	99,6	97,6	100,2	98,3	98,9
2	92,2	90,6	91,2	92,9	93,5
3	85,4	83,5	86,7	86,4	86,3
4	78	77,9	85,5	80,9	82,2
5			87,2	76,2	78,7
6			90,7		
7			94,2		
8			96,3		
9			97,8		
10			100		
11			98,6		
12			98,1		
13			98,5		
14			100,4		

Пример 212. Эффективность конъюгата 45a против гриппа B/Florida/4/2006 (Yamagata) в 28-дневной модели профилактики на мышах.

Конъюгат 45a оценивали в отношении летального заражения подтипом сезонного гриппа B (B/Florida/4/2006) у самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). В эксперименте было задействовано 7 групп по 5 мышей. В 0 день мышам подкожно (п/к) вводили конъюгат 45a в дозе 3, 1, 0,3,

0,01 или 0,3 мг/кг в однократной дозе. Контрольным мышам также вводили таким же образом носитель (ФСБ) или только Fc hIgG1. Через двадцать восемь дней после введения исследуемого препарата мышам интраназально вводили 3-кратную LD_{95} B/Florida. Краткое изложение дизайна эксперимента представлено в таблице 209. Для заражения вирусом мышей анестезировали смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно) и вводили вирус в объеме 30 мкл. Смертность и массу тела (МТ) регистрировали ежедневно в течение 21 часов, и любое животное с потерей массы тела на 20% засчитывалось как умершее.

Мыши, которым вводили носитель, умирали только к 7 дню, в то время как мыши, получавшие только отрицательный контроль Fc, погибали от инфекции к 8 дню (таблица 210). Напротив, те, кто получал конъюгат 45a в дозе 1 или 3 мг/кг, были полностью защищены в ходе исследования. Животные группы 4, которых лечили дозой 0,3 мг/кг, также продемонстрировали 80% выживаемость. При концентрации дозы 0,1 мг/кг выживаемость падала до 40%, а при 0,03 мг/кг конъюгат 45a не давал защиты. Данные по МТ (Таблица 211) отражали результаты смертности, и у мышей, получавших полностью защитную дозу (1 и 3 мг/кг), наблюдалось временное снижение МТ менее чем на 5% на 4-й день до восстановления исходной МТ.

В совокупности эти данные подтверждают устойчивую эффективность конъюгата 45a против важного сезонного подтипа гриппа. Это также демонстрирует полезность конъюгата 45a в качестве долгосрочного профилактического средства против гриппа.

Таблица 209: Общий дизайн исследования

Группа	**Линия гриппа B (интраназальное заражение)**	**Исследуемый препарат**	**DAR**	**Путь/Схема**	**Доза (мг/кг)**		**Получение соединения**			**N**
						Время между введением доз	**Объем дозы мл/кг**	**мг/мл**	**Необходимый объем (мл)**	
1	B/FL/4/2006 (Yamagata) 5E4 БОЕ/мышь	Носитель (ФСБ)	---	п/к, однократная доза	---	Т-28 дней	10	---	1,5	5
2		Только Fc	---	п/к, однократная доза	3	Т-28 дней	10	0,3	1,5	5
3		Конъюгат 45a	4,7	п/к, однократная доза	3	Т-28 дней	10	0,3	1,5	5
4		Конъюгат 45a	4,7	п/к, однократная доза	1	Т-28 дней	10	0,1	1,5	5
5		Конъюгат 45a	4,7	п/к, однократная доза	0,3	Т-28 дней	10	0,03	1,5	5
6		Конъюгат 45a	4,7	п/к, однократ	0,1	Т-28 дней	10	0,01	1,5	5

				ная доза						
7		Конъюгат 45a	4,7	п/к, однократная доза	0,03	Т-28 дней	10	0,003	1,5	5

Таблица 210: % выживаемости для исследуемых групп

Дней после инфицирования	**Носитель (ФСБ)**	**Только Fc (3 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (3 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (1 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (0,3 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (0,1 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (0,03 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100
6	60	100	100	100	100	100	100
7	0	20	100	100	80	80	80
8		0	100	100	80	40	0
9			100	100	80	40	
10			100	100	80	40	
11			100	100	80	40	
12			100	100	80	40	
13			100	100	80	40	
14			100	100	80	40	
15			100	100	80	40	
16			100	100	80	40	
17			100	100	80	40	
18			100	100	80	40	
19			100	100	80	40	
20			100	100	80	40	
21			100	100	80	40	

Таблица 211: Средний % дневной массы тела до первой смерти в группе

Дней после инфицирования	**Носитель (ФСБ)**	**Только Fc (3 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (3 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (1 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (0,3 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (0,1 мг/кг)**	**Конъюгат 45a (0,03 мг/кг)**
0	100	100	100	100	100	100	100

1	97	94,9	97,1	98,3	96,9	96,9	97,2
2	97,8	96,3	97,7	98,5	99,5	97,9	98,9
3	93,9	94,3	99,9	100,9	99,7	97,6	98,8
4	84,5	85,3	95,8	95,8	90,9	88,9	89,3
5	81,4	83,1	102	99,4	95,1	90,6	87,5
6	76,5	78,2	101,1	99,8	91,9	85,9	81,9
7			98,7	97,9	87	79,5	76
8			99,6	97,9	88		
9			99,6	99			
10			99,9	100,2			
11			101,9	100,7			
12			99,5	99,4			
13			100	99,4			
14			99,4	101			
15			98	97			
16			100	99,4			
17			97,5	98,2			
18			99,4	100,4			
19			98,8	100,9			
20			100,8	101,9			
21			100	100,1			

Пример 213. Опосредованный Fc иммунный вклад конъюгата 45a

Исследования эффективности проводились на 6-8-недельных самках мышей BALB/c (Charles River) или Fcer1g$^{-/-}$ модель 583 (Taconic), которым интраназально вводили 3E2 БОЕ/мышь (3x LD_{95}) адаптированного к мышам вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) или с 3e4 БОЕ/мышь гриппа A/CA/07/2009 (H1N1)pdm. AVC или контроли, человеческий IgG1 Fc или ФСБ, вводили в виде однократной дозы, вводимой подкожно (п/к) или внутримышечно (в/м), как указано, через 2 часа после заражения в дозе 0,03-3 мг/кг. Массу тела (МТ) регистрировали ежедневно. Смертность определяют при потери массы тела более чем на 20% в течение двух дней подряд или когда животные умирают.

Для анализа вирусной нагрузки и цитокинов через 4 дня после заражения мышей умерщвляли с помощью CO_2 и собирали обе доли легких. Легкие гомогенизировали с помощью шариками из диоксида кремния 1 мм в 1 мл ФСБ с использованием MagNA Lyser (Roche). Гомогенизацию проводили при 6000 об/мин в течение 60 сек и охлаждали на льду в течение 5 минут между циклами. После гомогенизации легких пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 600 x g и супернатант переносили в новую пробирку. Для определения БОЕ супернатанты гомогената легких разводили в инфекционном буфере в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-6}. 100 мкл разведенного вируса добавляли к конфлюэнтному монослою клеток MDCK в 24-луночных планшетах и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с покачиванием каждые 15 мин. После удаления вируса жидкую среду, содержащую Avicel, добавляли к клеткам MDCK. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 40 часов. После инкубации среду удаляли и клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым для подсчета бляшек. А бляшкообразующие единицы (БОЕ) рассчитывали относительно веса

легкого (БОЕ/г легкого). Для анализа цитокинов супернатанты гомогената легких серийно разводили 2 раза в 96-луночном планшете. Уровни цитокинов для IL-6, MIP-1α и MCP-1 определяли с помощью ИФА в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems).

Конъюгат 45a в дозе 0,03 мг/кг или выше полностью защищал от летального заражения гриппом A/CA/07/2009 (H1N1)pdm у мышей Balb/C (ДТ) и Fcer1g$^{-/-}$ (KO) (см. Таблицу 212), предполагая, что защита конъюгата 45a не зависит от Fc-опосредованного иммунного вклада.

Таблица 212: Эффективность конъюгата 45a у мышей Balb/C (ДТ) или мышей Fcer1g$^{-/-}$ (KO) против гриппа A/CA/07/2009 (H1N1)pdm.

Исследуемый препарат [мг/кг]	**Путь введения**	**Мышиный фон**	**% выживаемости**
Fc hIgG1 [1]	ВМ	ДТ	0
конъюгат 45a [0,03]	ВМ	ДТ	100
конъюгат 45a [0,1]	ВМ	ДТ	100
конъюгат 45a [0,3]	ВМ	ДТ	100
конъюгат 45a [1]	ВМ	ДТ	100
Fc hIgG1 [1]	ВМ	KO	0
конъюгат 45a [0,03]	ВМ	KO	100
конъюгат 45a [0,1]	ВМ	KO	100
конъюгат 45a [0,3]	ВМ	KO	100
конъюгат 45a [1]	ВМ	KO	100

Конъюгат 45a в дозе 0,1 мг/кг или выше полностью защищал от летального заражения гриппом A/PR/8/1934 (H1N1) у мышей Balb/C (см. таблицу 213). Чтобы определить иммунный вклад у мышей Balb/c ДТ, вариант конъюгата 45a на агликозилированном мутанте Fc (N297A), конъюгат 49 (например, Fc, содержащий SEQ ID NO: 72, дополнительно содержащий мутацию N297A). Известно, что этот мутант Fc приводит к значительному снижению иммунной эффекторной функции. конъюгат 49 также проявлял защитный эффект при дозе 0,1 мг/кг, указывая на то, что защита, обеспечиваемая конъюгатом 45a, не зависит от Fc-опосредованного иммунного вклада. Чтобы определить, можно ли повысить эффективность конъюгата 45a за счет усиления опосредованной Fc иммунной эффекторной функции, версию конъюгата 45a конъюгировали с Fc, содержащим мутацию DE (S239D/I332E) (например, Fc, содержащий SEQ ID NO: 72, дополнительно содержащий мутацию S239D/I332E), конъюгата 50. Конъюгат 50 был полностью защитным при дозе 0,1 мг/кг или выше, что сравнимо с активностью конъюгата 45a. Однако после лечения конъюгатом 50 в дозе 0,03 мг/кг выжила одна мышь. Таким образом, активность конъюгата 45a при DAR 4,5 не зависит от Fc-опосредованного вклада в иммунную систему.

Таблица 213: Эффективность AVC против гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) у мышей Balb/C (ДТ).

Исследуемый препарат [мг/кг]	**Путь введения**	**Fc**	**% выживаемости**
Fc hIgG1 [1]	ВМ	ДТ	0
конъюгат 45a [0,01]	ВМ	ДТ	0

Исследуемый препарат [мг/кг]	**Путь введения**	**Fc**	**% выживаемости**
конъюгат 45a [0,03]	ВМ	ДТ	0
конъюгат 45a [0,1]	ВМ	ДТ	100
конъюгат 45a [0,3]	ВМ	ДТ	100
конъюгат 49 [0,01]	ВМ	N297A	0
конъюгат 49 [0,03]	ВМ	N297A	0
конъюгат 49 [0,1]	ВМ	N297A	100
конъюгат 49 [0,3]	ВМ	N297A	100
конъюгат 49 [1]	ВМ	N297A	100
конъюгат 50 [0,01]	ВМ	S239D/I332E	0
конъюгат 50 [0,03]	ВМ	S239D/I332E	20
конъюгат 50 [0,1]	ВМ	S239D/I332E	100
конъюгат 50 [0,3]	ВМ	S239D/I332E	100

После летального заражения гриппом на мышиной модели на 4-й день после заражения определяли легочную БОЕ и уровни легочных цитокинов. Конъюгат 45a и конъюгат 49 продемонстрировали дозозависимое логарифмическое снижение вирусной нагрузки до сопоставимых уровней (см. таблицу 214). Конъюгат 50 продемонстрировал более высокое снижение вирусной нагрузки при дозе 0,1 мг/кг на 0,96 или 0,83 log выше, чем для конъюгата 45a или конъюгата 49, соответственно. Как и ожидалось, не наблюдалось биологически значимой разницы между отрицательными контролями, ФСБ и Fc hIgG1.

Таблица 214: Снижение вирусной нагрузки с помощью конъюгатов на 4-й день после заражения гриппом A/PR/8/1934 (H1N1) на мышиной модели.

Исследуемый препарат [мг/кг]	**Путь введения**	**БОЕ/г**	**Логарифмическое уменьшение**
ФСБ	п/к	2.19E+07	0,00
Fc hIgG1 [3]	п/к	2.85E+07	-0,11
конъюгат 45a [0,03]	п/к	1.84E+07	0,07
конъюгат 45a [0,1]	п/к	6.34E+06	0,54
конъюгат 45a [0,3]	п/к	2.63E+05	1,92
конъюгат 45a [1]	п/к	9.99E+03	3,34
конъюгат 45a [3]	п/к	1.53E+03	4,16
конъюгат 49 [0,03]	п/к	9.06E+06	0,38
конъюгат 49 [0,1]	п/к	4.68E+06	0,67
конъюгат 49 [0,3]	п/к	1.36E+05	2,21
конъюгат 49 [1]	п/к	4.57E+04	2,68
конъюгат 49 [3]	п/к	5.89E+03	3,57
конъюгат 50 [0,1]	п/к	6.40E+05	1,53

Аналогично, конъюгат 45a и конъюгат 49 снижали цитокины, IL-6, MIP-1a, MCP-1, в зависимости от

дозы до аналогичных уровней (см. таблицу 215). Что касается конъюгата 50, то при 0,1 мг/кг наблюдались несколько более низкие уровни IL-6 и MIP-1a, но сопоставимые уровни. конъюгат 50 в дозе 0,1 мг/кг продемонстрировал заметно повышенные уровни MCP-1 по сравнению с конъюгатом 45a и конъюгатом 49. Как и ожидалось, не наблюдалось биологически значимой разницы между отрицательными контролями, ФСБ и Fc hIgG1.

Таблица 215: Уровни цитокинов в кратном изменении по сравнению с неинфицированным контролем для IL-6, MIP-1α и MCP-1 на 4-й день после заражения гриппом A в мышиной модели.

Исследуемый препарат [мг/кг]	**IL-6**	**MCP-1**	**MIP-1α**
ФСБ	4,4	30,0	13,7
Fc hIgG1 [3]	4,6	31,9	15,4
конъюгат 45a [0,03]	3,1	14,8	14,3
конъюгат 45a [0,1]	2,5	10,2	7,1
конъюгат 45a [0,3]	2,1	3,2	3,7
конъюгат 45a [1]	2,0	1,2	2,2
конъюгат 45a [3]	2,0	1,2	2,1
конъюгат 49 [0,03]	2,3	19,4	10,6
конъюгат 49 [0,1]	2,4	11,1	5,7
конъюгат 49 [0,3]	2,9	10,7	5,0
конъюгат 49 [1]	2,5	4,7	2,4
конъюгат 49 [3]	2,3	4,5	2,2
конъюгат 50 [0,1]	1,9	25,6	4,9
Неинфицированные	1,0	1,0	1,0

Пример 214. Эффективность конъюгата 45a против вакцинных штаммов гриппа 2020-2021 годов

Ингибирование нейраминидазы (NAI).

Активность NAI определяли с помощью коммерческого набора NA-Fluor. Вкратце, живые вирусы доводили до 1e5 БОЕ/мл и добавляли в соответствующие лунки 96-луночного планшета (черный). Исследуемые препараты добавляли в концентрации от 0,001 до 1000 нМ в соответствующие лунки. Вирус и исследуемый препарат инкубировали 20-30 мин при 37 °C, 5% CO_2. Затем в каждую лунку добавляли субстрат NA и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, 5% CO_2. NAI определяли путем считывания флуоресценции при возбуждении 355 нм/испускании 460 нм. IC_{50} рассчитывали с помощью GraphPad Prism версии 8 с использованием нелинейного регрессионного анализа (зависимость доза-ответ (ингибирование)).

Конъюгат 45a продемонстрировал сравнимую активность по IC_{50} по сравнению с осельтамивиром или занамивиром в NAI против штаммов вакцины против гриппа 2020-21 для Северного полушария (таблица 216).

Таблица 216: Активность конъюгата 45a в анализе ингибирования нейраминидазы (NAI) против вакцинных штаммов гриппа 2020-21 для Северного полушария (IC_{50})

штамм гриппа	подтип/линия	конъюгат 45a [нМ]	Осельтамивир [нМ]	Занамивир [нМ]
A/Hawaii/70/2019	H1N1pdm09	0,21	0,32	0,26
A/Hong Kong/2671/2019	H3N2	4,8	0,76	1,05
B/Phuket/3073/2013	Yamagata	4,58	24,44	2,78
B/Washington/02/2019	Victoria	3,11	16,71	2,3

Лектин-ферментный анализ (ELLA).

96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (ThermoFisher) покрывали 2,5 мкг фетуина (Sigma-Aldrich) в 1x покрывающего буфера KPL (SeraCare) в течение ночи при 4 °C. На следующий день планшеты промывали ФСБ при pH 7,4 с добавлением 0,05% Tween-20 (PBST). Исследуемые препараты тестировали при 0,001–1000 нМ и добавляли по 50 мкл/лунку. Вирус гриппа добавляли в количестве 5e4 – 5e5 БОЕ/мл по 50 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 16-18 ч при 37 °C, 5% CO_2. После промывки планшетов агглютинин арахиса, конъюгированный с ПХ (PNA-HRP), добавляли в количестве 0,13 мкг в 100 мкл буфера на 2 часа, снова промывали и проявляли 100 мкл/лунку субстрата TMB (BD) в течение 3-5 минут. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл/лунку 1 н. H_2SO_4. Поглощение измеряли при 450 нм с помощью многорежимного планшет-ридера EnSpire. IC_{50} рассчитывали с помощью GraphPad Prism версии 8 с использованием нелинейного регрессионного анализа (зависимость доза-ответ (ингибирование)).

Конъюгат 45a продемонстрировал повышенную активность по IC_{50} по сравнению с осельтамивиром или занамивиром в NAI против вакцинных штаммов гриппа 2020-21 для Северного полушария (таблица 217).

Таблица 217: Активность конъюгата 45a в лектин-ферментном анализе (ELLA) против вакцинных штаммов гриппа 2020-21 для Северного полушария (IC_{50})

штамм гриппа	подтип/линия	конъюгат 45a [нМ]	Fc hIgG1 [нМ]	Осельтамивир [нМ]	Занамивир [нМ]
A/Hawaii/70/2019	H1N1pdm09	0,2	>1000	5,9	2,7
A/Hong Kong/2671/2019	H3N2	0,1	>1000	0,3	0,4
B/Phuket/3073/2013	Yamagata	2,8	>1000	28,8	9
B/Washington/02/2019	Victoria	3,9	>1000	47,9	6,6

Анализы уменьшения количества бляшек (PRA).

Исследуемые образцы в диапазоне концентраций от 0,3 до 100 нМ инкубировали с вирусом и предварительно инкубировали в буфере, содержащем 0,28% альбумина бычьей сыворотки и Ca^{2+}/Mg^{2+} в ФСБ, в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ). Конфлюэнтные монослои клеток Madin Darby Canine Kidney (MDCK) в 24-луночном планшете один раз промывали ФСБ. После инкубации исследуемого препарата и вируса их обоих добавляли к клеткам MDCK. MOI для каждой комбинации лекарственное средство-вирус выбирали так, чтобы нацеливаться на 30 бляшек в контрольной лунке с ФСБ. Вирус и исследуемый препарат удаляли через 1 ч, а инфицированные клетки инкубировали в течение 48 ч при 35 °C в присутствии исследуемого препарата, разведенного в смеси 1,25% Avicel, DMEM, 0,01% DEAE-декстрана и 2 мкг/мл трипсина TPCK. Через 48 ч Avicel удаляли, клетки фиксировали параформальдегидом и окрашивали

1% кристаллическим фиолетовым для подсчета бляшек. EC_{50} рассчитывали с помощью GraphPad Prism версии 8 с использованием нелинейного регрессионного анализа (зависимость доза-ответ (ингибирование)).

Конъюгат 45a продемонстрировал повышенную активность по EC_{50} по сравнению с осельтамивиром, занамивиром или балоксавиром в PRA против вакцинных штаммов гриппа 2020-21 для Северного полушария (таблица 218).

Таблица 218: Активность конъюгата 45a в анализе снижения количества бляшек (PRA) против вакцинных штаммов гриппа 2020-21 для Северного полушария (EC_{50})

штамм гриппа	**подтип/линия**	**конъюгат 45a [нМ]**	**Осельтамивир [нМ]**	**Занамивир [нМ]**	**Балоксавир [нМ]**
A/Hawaii/70/2019	H1N1pdm09	0,14	7,08	3,69	10,3
B/Phuket/3073/2013	Yamagata	2,61	28,5	13,9	30,96
B/Washington/02/2019	Victoria	7,46	28,72	9,77	18,27

Цитопатический эффект (CPE).

Сливающийся монослой клеток MDCK Siat1 в 96-луночном планшете инкубировали с исследуемом препаратом в диапазоне концентраций от 0,01 до 10 000 нМ. После 1 ч инкубации при комнатной температуре добавляли вирус гриппа с MOI 0,01. После дополнительной 1-часовой инкубации при комнатной температуре планшеты инкубировали в течение 3 дней для гриппа A или 5 дней для гриппа B при 37°C, 5% CO_2. CPE определяли окрашиванием кристаллическим фиолетовым путем измерения поглощения при 595 нм. EC_{50} рассчитывали с помощью GraphPad Prism версии 8 с использованием нелинейного регрессионного анализа (зависимость доза-ответ (ингибирование)).

Конъюгат 45a продемонстрировал повышенную активность по EC_{50} по сравнению с осельтамивиром, занамивиром или балоксавиром в PRA против вакцинных штаммов гриппа 2020-21 для Северного полушария (таблица 219).

Таблица 219: Активность конъюгата 45a в анализе цитопатического эффекта (CPE) против вакцинных штаммов гриппа 2020-21 для Северного полушария (EC_{50})

штамм гриппа	**подтип/линия**	**конъюгат 45a [нМ]**	**Осельтамивир [нМ]**	**Занамивир [нМ]**	**Балоксавир [нМ]**
A/Hawaii/70/2019	H1N1pdm09	1,65	326,6	686,2	11,1
A/Hong Kong/2671/2019	H3N2	0,38	7,7	170	1
B/Phuket/3073/2013	Yamagata	0,33	27,6	5,2	10,01
B/Washington/02/2019	Victoria	1,06	1028	1,93	9,98

Пример 215. Эффективность конъюгата 45a (*очищенный колонкой с белком A и *элюат из колонки с белком A) против гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) на летальной мышиной модели

Конъюгат 45a (очищенный белком A) и *конъюгат 45a (элюат из колонки с белком A) оценивали в отношении летальной формы гриппа H1N1 IAV у самок мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус провокационного заражения (A/Puerto Rico/8/1934) представляет собой адаптированный для

мышей изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте участвовали 13 групп по 5 мышей, и его целью было оценить относительную эффективность трех исследуемых агентов. На 0 день всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 (5E2 БОЕ) путем интраназальной (IN) инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Группа 1 состояла из контрольных мышей, получавших только носитель, остальные группы получали один из конъюгатов в дозах от 0,01 до 0,3 мг/кг. Смертность и массу тела (МТ) регистрировали ежедневно в течение 14 дней, и любое животное с кумулятивной 20%-ной потерей массы в течение 2 дней подряд засчитывалось как умершее.

Исследуемые группы получали однократную внутримышечную (в/м) инъекцию через 2 часа после вирусного заражения тестируемого препарата (схема исследования подробно представлена в таблице 220). Инъекции производили в мышцу бедра правой задней конечности в объеме дозы 5 мл/кг.

Таблица 220. План исследования для исследования разработки процесса конъюгата 45a

Группа	Линия гриппа А (интраназальное заражение)	Исследуемый препарат	Путь/Схема	Доза (мг/кг)	N
1	A/PR/8/34 (H1N1) 5E2 БОЕ/мышь	Носитель (ФСБ)	в/м, однократно, Т+2 ч	---	5
2		Конъюгат 45a (колонка с белком А, очищенный)	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5
3			в/м, однократно, Т+2 ч	0,1	5
4			в/м, однократно, Т+2 ч	0,03	5
5			в/м, однократно, Т+2 ч	0,01	5
6		*Конъюгат 45a (элюат из колонки с белком А)	в/м, однократно, Т+2 ч	0,3	5
7			в/м, однократно, Т+2 ч	0,1	5
8			в/м, однократно, Т+2 ч	0,03	5
9			в/м, однократно, Т+2 ч	0,01	5

Животные, получавшие носитель, начинали гибнуть только на 6-й день, при этом смертность достигала 100% к 8 дню (Фиг. 121 и таблица 221). Напротив, оба конъюгата (например, очищенный колонкой с белком А конъюгат 45a и *конъюгат 45a из элюата колонки с белком А) были полностью защитными при 0,1 и 0,3 мг/кг до конца исследования (14 день). При двух самых низких исследуемых концентрациях (0,03 и 0,01 мг/кг) защиты не наблюдалось или наблюдалась частичная (40 и 0% для конъюгата 45a, соответственно;

80 и 40% для *конъюгата 45a). Однако различия между конъюгатами при 0,03 и 0,01 мг/кг не были статистически значимыми (логарифмический критерий Мантеля-Кокса) и, вероятно, представляют собой нормальные экспериментальные отклонения от очень низких исследуемых концентраций.

Таблица 221. % выживаемости по группам и дням (мг/кг)

День	Носитель (ФСБ)	Конъюгат 45a (0,3)	Конъюгат 45a (0,1)	Конъюгат 45a (0,03)	Конъюгат 45a (0,01)	*Конъюгат 45a (0,3)	*Конъюгат 45a (0,1)	*Конъюгат 45a (0,03)	*Конъюгат 45a (0,01)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	80	100	100	100	100	100	100	100	100
7	20	100	100	100	100	100	100	100	100
8	0	100	100	100	40	100	100	100	80
9		100	100	40	0	100	100	80	40
10		100	100	40		100	100	80	40
11		100	100	40		100	100	80	40
12		100	100	40		100	100	80	40
13		100	100	40		100	100	80	40
14		100	100	40		100	100	80	40

Конъюгат 45a очищен с использованием колонки с белком A;

*Конъюгат 45a из элюата колонки с белком A (например, конъюгат, который не связывался с белком A)

Данные о массе тела (МТ) (Таблица 222) также оценивали для всех дозовых групп. Как и ожидалось, данные о массе тела в значительной степени отражали данные о выживаемости со всеми полностью защитными дозами, при этом любой конъюгат демонстрировал временную потерю до восстановления к концу исследования. В этих дозовых группах средняя масса тела на 14-й день составляла 100% или выше. В совокупности эти данные демонстрируют эффективность всех 3 конъюгатов против летального заражения гриппом A (H1N1). Примечательно, что защита была достигнута однократной внутримышечной инъекцией 0,1 мг/кг. В условиях, оцениваемых в этом исследовании, конъюгат 45a и *конъюгат 45a (например, конъюгат, который не связывался с колонкой с белком A) продемонстрировали сравнимую активность.

Таблица 222. % МТ животных по группам и дням (мг/кг) (данные показаны до первой гибели в группе)

День	Носитель (ФСБ)	Конъюгат 45a (0,3)	Конъюгат 45a (0,1)	Конъюгат 45a (0,03)	Конъюгат 45a (0,01)	*Конъюгат 45a (0,3)	*Конъюгат 45a (0,1)	*Конъюгат 45a (0,03)	*Конъюгат 45a (0,01)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,5	100,5	99	100,1	99,2	99	98	99,3	99,3

2	98,4	101,8	99,8	98,6	101	101,4	97,1	100,7	99
3	93,3	103,1	99,4	98	98,6	101,9	98,3	100,8	99,2
4	87,7	101,5	94,4	94,1	92,7	103	97,9	98,8	93,5
5	82,2	97,8	96	92,3	90	99,6	95,2	97	89,4
6	78,6	101,6	99,2	91,8	86,5	99,8	97,7	99,1	91,9
7		102,7	99,6	86,7	81,1	102,1	98,7	93,3	84
8		104,3	103,1	83,9	76,4	104,6	101,7	92,4	79,9
9		102,2	100,3	80,4		102,4	97,7	93,1	
10		99,2	100,8			102,5	98,4		
11		105	103,2			104,8	100,1		
12		105,1	101,8			103,8	101,1		
13		103,8	102			102,9	100,8		
14		105,1	103,8			102,4	101,1		

Конъюгат 45a очищен с использованием колонки с белком A;

*Конъюгат 45a из элюата колонки с белком A (например, конъюгат, который не связывался с белком A)

Пример 216. Сравнение конъюгатов 45a и 46 в модели гуманизированных мышей (FcRn) против гриппа A/California/07/2009pdm (H1N1) в исследовании летальных инфекций

Конъюгаты 45a и 46 оценивали в отношении летальной инфекции гриппа H1N1 IAV у самок мышей B6.Cg-Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ (возраст 6–8 недель; Jackson Labs, №014565). Эти мыши экспрессируют человеческий неонатальный рецептор (FcRn), который является важным фактором продления периода полужизни антител или терапевтических средств, содержащих Fc. Конъюгат 46 содержит мутацию YTE Fc, которая, как было показано, увеличивает время полужизни у людей и яванских макаков. Хотя мутация YTE не проявляется у мышей дикого типа, она допустима у трансгенных видов мышей, экспрессирующих FcRn. Поэтому мы оценили относительную эффективность конъюгатов 45a и 46, которые идентичны, за исключением наличия мутации YTE в последнем, чтобы определить, дает ли удлиненный период полужизни преимущество в силе в модели профилактики на -7 день.

Вирус провокационного заражения (A/California/07/2009) представляет собой пандемический изолят H1N1, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте участвовали 10 групп по 5 мышей (таблица 223). За семь дней до вирусного заражения мышам вводили разовую дозу испытуемого препарата путем внутримышечной (в/м) инъекции в мышцу бедра правой задней конечности в объеме дозы 5 мл/кг. На 0 день всех мышей заражали вирусом при 3-кратном превышении LD95 (3E4 БОЕ) путем интраназальной (IN) инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Группа 1 состояла из контрольных мышей, которым вводили только носитель, а животным группы 2 вводили только Fc (hIgG1 Fc), остальные группы получали один из конъюгатов в дозах от 1 до 0,03 мг/кг. Смертность и массу тела (МТ) регистрировали ежедневно в течение 14 дней, и любое животное с кумулятивной 20%-ной потерей массы в течение 2 дней подряд засчитывалось как умершее.

Данные о выживаемости представлены в таблице 224 и демонстрируют, что контрольные животные (группы 1 и 2) достигли полной смертности на 6 день, как и ожидалось. Напротив, мыши, получавшие конъюгат в дозе 1,0 или 0,3 мг/кг, были полностью защищены до конца исследования (21 день). При самой низкой концентрации дозы (0,03 мг/кг) ни для одного из конъюгатов не наблюдали значительной защиты.

Однако при 0,1 мг/кг относительная разница в эффективности между конъюгатами 45a и 46 была очевидной. Конъюгат 45a, содержащий последовательность Fc дикого типа, не был значительно более эффективным, чем животные, которым вводили носитель или только Fc, в то время как животные, получавшие конъюгат 46, были (выживаемость 80%; P=0,0016 относительно носителя) (Фиг. 122). Эти данные свидетельствуют о том, что мутация YTE конъюгата 46 дает преимущество в эффективности по сравнению с конъюгатом 45a, вероятно, из-за более длительного периода полужизни. Данные о массе тела для всех исследуемых групп перечислены в таблице 225 и подтверждают данные о выживаемости.

В совокупности это исследование демонстрирует увеличение активности конъюгата 46 по сравнению с конъюгатом 45a. Поскольку оба конъюгата имеют идентичные нацеливающие фрагменты, из этого следует, что повышение эффективности конъюгата 46 обусловлено мутацией YTE. Этот вывод подтверждается уровнями обоих конъюгатов в плазме, взятыми у исследуемых животных (группы с дозой 0,1 мг/кг) за день до заражения вирусом (конъюгат 45a, 0,09 мкг/мл; конъюгат 46, 0,48 мкг/мл). Более высокие уровни конъюгата 46 в плазме во время заражения вирусом приводили к превосходной защите по сравнению с конъюгатом 45a.

Таблица 223. Общая схема протокола исследования FcRn на мышах

Группа	Линия гриппа A (интраназальное заражение)	Исследуемый препарат	Путь/Схема	Доза (мг/кг)	Время между введением доз	N
1	A/CA/-7/09 ~3E4 БОЕ/мышь	Носитель (ФСБ)	в/м, однократная доза	---	T-7 дней	5
2		Fc hIgG1		1		
3		Конъюгат 45a		1		
4		Конъюгат 45a		0,3		
5		Конъюгат 45a		0,1		
6		Конъюгат 45a		0,03		
7		Конъюгат 46		1		
8		Конъюгат 46		0,3		
9		Конъюгат 46		0,1		
10		Конъюгат 46		0,03		

Таблица 224. % выживаемости по группам и дням (мг/кг)

День	Носитель (ФСБ)	Fc hIgG1	Конъюгат 45a (1)	Конъюгат 45a (0,3)	Конъюгат 45a (0,1)	Конъюгат 45a (0,03)	Конъюгат 46 (1)	Конъюгат 46 (0,3)	Конъюгат 46 (0,1)	Конъюгат 46 (0,03)

0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	80	100	100	100	100	100	100	100	100
5	20	60	100	100	100	100	100	100	100	100
6	0	0	100	100	80	80	100	100	100	20
7			100	100	60	20	100	100	100	0
8			100	100	20	20	100	100	80	
9			100	100	20	20	100	100	80	
10			100	100	20	20	100	100	80	
11			100	100	20	20	100	100	80	
12			100	100	20	20	100	100	80	
13			100	100	20	20	100	100	80	
14			100	100	20	20	100	100	80	
15			100	100	20	20	100	100	80	
16			100	100	20	20	100	100	80	
17			100	100	20	20	100	100	80	
18			100	100	20	20	100	100	80	
19			100	100	20	20	100	100	80	
20			100	100	20	20	100	100	80	
21			100	100	20	20	100	100	80	

Таблица 225. % МТ животных по группам и дням (мг/кг). *Данные показаны до первой смерти в группе

Дней после инфицирования	Носитель (ФСБ)	Fc hIg G1	Конъюгат 45a (1)	Конъюгат 45a (0,3)	Конъюгат 45a (0,1)	Конъюгат 45a (0,03)	Конъюгат 46 (1)	Конъюгат 46 (0,3)	Конъюгат 46 (0,1)	Конъюгат 46 (0,03)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	97,2	97,7	97,8	100,4	99,4	98	96,9	100,8	99,4	98,6
2	89,5	90,7	96,7	95,6	94	92,8	96,3	100,7	94,3	91,8
3	82,9	83,8	98,7	91,9	86,8	88,3	97,8	95,2	86,5	85,4
4	79	80,1	100,9	93,3	84,4	85,3	97,7	97,1	86,5	83,5
5	75,1		98,5	91,9	81,8	84	96,7	97,3	84,6	79,3
6			102	93,7	80,4	82,2	97,8	101,4	84,4	76,7
7			99,5	94,1			97,2	99,9	82,5	
8			99,8	94,5			98,3	100,8	84,8	
9			98,8				98,3	102,4		
10			99,3				97,2	103,1		
11			103,9				101,4	103,5		
12			103,8				99,8	103,2		

13			102,1				100,2	102,8		
14			103,8				104,3	104,9		
15			103,8				102,1	106,2		
16			101,9				100	101,9		
17			101,2				102,3	103,6		
18			101,9				103,6	104,5		
19			102,3				104,3	104		
20			102,4				102,3	105,5		
21			104,2				102	106,9		

Пример 217. Эффективность конъюгата 45a на мышиной модели гриппа A (H1N1), предназначенной для имитации патогенов на ранних стадиях инфекций человека

В предыдущих примерах, представленных в этом патенте, использовалась модель, в которой мышей подвергали глубокой седации кетамином/ксилазином (150 и 10 мг/кг, соответственно) во время заражения вирусом. После интраназального (IN) вирусного заражения (3x LD_{95} в 30 мкл) мышей держат на спине до выздоровления (примерно 30 мин). Это усиливает дренаж вируса в легкие (нижние дыхательные пути или НДП), создавая надежную и очень воспроизводимую модель скрининга противогриппозных терапевтических средств. Однако он не воспроизводит естественный процесс заражения, при котором обычно меньшее количество вирусных частиц попадает в верхние дыхательные пути (ВДП) человека. Это исследование было разработано, чтобы более точно имитировать естественный процесс инфекции путем посева вируса в ВДП и изучения двух различных посевных материалов для заражения.

В этом исследовании использовались самки мышей BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель), которых заражали гриппом A/California/07/2009 (H1N1), пандемическим изолятом, способным вызывать летальные инфекции у мышей, в 3E4 (в 3 раза больше, чем LD_{95}) и 3E3 БОЕ/мышь. Вирусное заражение проводили на мышах, которых подвергали анестезии изофлураном (3%), путем инъекционной инокуляции объемом 30 мкл. Эксперимент включал 13 групп по 5 мышей, и общий дизайн исследования показан в Таблице 226. За три дня до вирусного заражения мышам вводили однократно внутримышечно (в мышцу бедра) дозу конъюгата 45a от 0,001 до 0,3 мг/кг. Животных отрицательного контроля лечили только ФСБ. Одну группу также «ложно инфицировали» с использованием ФСБ вместо вируса. Смертность и МТ регистрировали ежедневно в течение 14 дней, и любое животное с кумулятивной 20%-ной потерей массы в течение 2 дней подряд засчитывалось как умершее.

Результаты исследования по выживаемости обобщены в таблице 227. При обеих концентрациях вируса (3E3 и 3E4 БОЕ/мышь) мыши, получавшие носитель, не были полностью защищены от смертности, как ожидалось. Группа 3E3 ФСБ достигла 100% смертности по сравнению с 60% в группе 3E4. Хотя это и противоречит здравому смыслу, это, вероятно, результат обычных экспериментальных вариаций в моделях ВДП. Важно отметить, что конъюгат 45a полностью защищал от заражения 3E4 БОЕ вплоть до однократной внутримышечной дозы 0,03 мг/кг. В группе 3E3 конъюгат 45a обеспечивал полную защиту при однократной дозе 0,01 мг/кг (P=0,0031 по отношению к носителю). Замечательная защита, обеспечиваемая конъюгатом 45a, основанная на конечной точке выживаемости, указывает на превосходную фармакокинетику и активность в НДП мышей.

Данные МТ для исследуемых животных приведены в таблице 228 и отражают результаты данных по

выживаемости. В группе с самой низкой полностью защитной дозой (0,03 мг/кг) наблюдалась только временная потеря веса по сравнению с мышами, инфицированными плацебо (ФСБ), и терминальные МТ (14 день) были в пределах 1,5% друг от друга в группе заражения 3E4. Для группы 3E3 самая низкая защитная доза (0,01 мг/кг) была в пределах ~5% от ложно инфицированных животных в конце исследования.

В совокупности это исследование демонстрирует, что конъюгат 45a обладает исключительным воздействием на ВДП мышей и чрезвычайно эффективен для предотвращения распространения вируса в НДП, где происходят летальные инфекции. Кроме того, сохранение МТ у обработанных мышей и отсутствие явных клинических симптомов указывает на то, что конъюгат 45a может действовать как превосходное профилактическое средство против гриппа А.

Таблица 226: Общая схема исследования

Группа	Штамм гриппа А	Исследуемый препарат	Заражение вирусом (интраназально)	Путь/Схема	Доза (мг/кг)	Объем дозы (мг/кг)	N
1	**Ложная инфекция**	Носитель (ФСБ)	ФСБ	в/м, однократно, Т-72ч	---	---	5
2	A/CA/07/09 (H1N1)	Носитель (ФСБ)	3.00E+04	в/м, однократно, Т-72ч	---	5	
3		Конъюгат 45a		в/м, однократно, Т-72ч	0,3		
4				в/м, однократно, Т-72ч	0,1		
5				в/м, однократно, Т-72ч	0,03		
6				в/м, однократно, Т-72ч	0,01		
7				в/м, однократно, Т-72ч	0,003		
8		Носитель (ФСБ)	3.00E+03	в/м, однократно, Т-72ч	---		
9		Конъюгат 45a		в/м, однократно, Т-72ч	0,1		

10				в/м, однократно, Т-72ч	0,03		
11				в/м, однократно, Т-72ч	0,01		
12				в/м, однократно, Т-72ч	0,003		
13				в/м, однократно, Т-72ч	0,001		

Таблица 227: Процент выживаемости групп по дням

		Конъюгат 45а (мг/кг). Группы заражения 3E4 БОЕ/мышь						Конъюгат 45а (мг/кг). Группы заражения 3E3 БОЕ/мышь					
Дней после инфицирования	Ложная инфекция (ФСБ)	Носитель (ФСБ)	0,3 мг/кг	0,1 мг/кг	0,03 мг/кг	0,01 мг/кг	0,003 мг/кг	Носитель (ФСБ)	0,1 мг/кг	0,03 мг/кг	0,01 мг/кг	0,003 мг/кг	0,001 мг/кг
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	100	60	100	100	100	60	60	100	100	100	100	100	100
7	100	60	100	100	100	60	20	60	100	100	100	100	80
8	100	60	100	100	100	60	20	0	100	100	100	80	80
9	100	60	100	100	100	60	20		100	100	100	80	80
10	100	60	100	100	100	60	20		100	100	100	80	80

Таблица 228: Процент начальной массы тела животных по группам и дням. *Данные показаны до первой смерти в группе

	Конъюгат 45а (мг/кг). Группы заражения **3E4** БОЕ/мышь	Конъюгат 45а (мг/кг). Группы заражения **3E3** БОЕ/мышь

Дней после инфицирования	Ложная инфекция (ФСБ)	Носитель (ФСБ) (3E4)	0,3 мг/кг	0,1 мг/кг	0,03 мг/кг	0,01 мг/кг	0,003 мг/кг	Носитель (ФСБ) (3E3)	0,1 мг/кг	0,03 мг/кг	0,01 мг/кг	0,003 мг/кг	0,001 мг/кг
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	101,5	103,4	103,2	102,2	104,6	101,3	102,3	104,7	100,7	102,8	103,9	99,8	101,9
2	98,6	99,1	100,5	100,6	102,3	97,2	100	100,8	98,5	100,9	101,7	96,8	99,4
3	101,1	92,4	99,5	98,9	97,4	92,3	92,6	95,4	99,1	99,8	97,7	94,6	97,2
4	104,2	89	100,3	99,2	96,2	88,1	87,3	89,6	101,6	97,9	97,9	88,8	94
5	104,2	87,3	102,1	101,6	95,7	86	82,4	84,7	101,7	98,2	96,2	86,4	90,9
6	104,6	85,2	104,3	103,9	94,6	83		81	102,5	97,1	92,9	84	84,3
7	105,1	82,1	103,5	104,7	97,2			76,1	102,7	94,5	87,4	79,5	81,8
8	105,2		106,9	100,8	98,7				102,7	99,2	90	83	
9	103,9		104,3	104,1	99,8				101,2	98,8	93,3		
10	105,4		106,6	105,9	103,9				104,8	100,9	99,8		

Пример 218. Эффективность конъюгата 45a против гриппа A/California/07/2009 (H1N1) в зависимости от пути введения дозы на модели мышей с отсроченным лечением

Конъюгат 45a оценивали против летальной инфекции гриппа A (H1N1) у самок мышей линии BALB/c (Charles River Laboratories, 6-8 недель). Вирус для провокационного заражения (A/California/07/2009) представляет собой пандемический изолят, способный вызывать летальные инфекции у мышей. В эксперименте было задействовано 7 групп по 5 мышей. Общий дизайн исследования кратко приведен в таблице 229: На 0 день всех мышей заражали вирусом при 2-3-кратном превышении LD95 путем интраназальной (IN) инокуляции в объеме 30 мкл, после проведения анестезии смесью кетамина/ксилазина (150 и 10 мг/кг, соответственно). Исследуемые группы получали однократную внутримышечную (в/м) или внутривенную (в/в) инъекцию через 24 часа после заражения вирусом конъюгата 45a (от 0,03 до 0,3 мг/кг) или введения носителя (ФСБ). В/м инъекции производили в мышцу бедра правой задней конечности в объеме дозы 10 мл/кг. В/в инъекции вводили в хвостовую вену в том же объеме дозы. Смертность и МТ регистрировали ежедневно в течение 14 дней, и любое животное с кумулятивной 20%-ной потерей массы в течение 2 дней подряд засчитывалось как умершее.

Результаты исследования по выживаемости обобщены в таблице 230. Мыши, получавшие носитель (ФСБ), быстро начали терять МТ после заражения, достигнув 100% смертности на 5-й день. Животные, получавшие конъюгат 45a в дозе 0,3 мг/кг внутривенно (группа 2) или внутримышечно (группа 5), были полностью защищены до конца исследования (14 день). В обеих группах также наблюдалась схожая динамика в изменении МТ, с временной потерей веса до восстановления и, в конечном итоге, превышением исходной МТ к концу исследования (таблица 231).

При самой низкой протестированной дозе конъюгата 45a (0,03 мг/кг) все мыши погибли от инфекции на 6-й день независимо от способа введения дозы. Промежуточная доза (0,1 мг/кг) продемонстрировала 40% выживаемость при внутривенном введении и не защитила (0% выживаемости) при внутривенном введении. Однако эта разница не была статистически значимой (P=0,0993). В совокупности это исследование продемонстрировало эффективность конъюгата 45a против важного пандемического изолята гриппа A (H1N1) при однократном в/в или в/м введении дозы менее 1 мг/кг. Важно отметить, что эффективность была сравнима между двумя путями дозирования, что указывает на возможность использования конъюгата 45a в амбулаторных условиях (в/м введение дозы). Наконец, конъюгат 45a был полностью защитным, даже несмотря на то, что введение дозы было отложено на 24 часа, что позволяло первоначальному вирусному инокуляту установиться/размножиться. Это предполагает, что конъюгат 45a может иметь терапевтическое применение как в качестве профилактического, так и терапевтического средства.

Таблица 229: Общая схема исследования

Группа	**Штамм гриппа A**	**Исследуемый препарат**	**Путь/Схема (T+24 часа)**	**Доза (мг/кг)**	**мл/кг**	**N**
1	A/CA/07/09 (3E4 БОЕ/мышь)	Носитель (ФСБ)	в/в, однократно, T+24	---	10	5
2		Конъюгат 45a	в/в, однократно, T+24	0,3	10	5
3			в/в, однократно, T+24	0,1	10	5
4			в/в, однократно, T+24	0,03	10	5
5			в/м, однократно, T+24	0,3	10	5
6			в/м, однократно, T+24	0,1	10	5
7			в/м, однократно, T+24	0,03	10	5

Таблица 230: Процент выживаемости по группам и дням (мг/кг) (путь введения дозы)

День	Носитель (ФСБ)	Конъюгат 45a (0,3)	Конъюгат 45a (0,1)	Конъюгат 45a (0,03)	Конъюгат 45a (0,3)	Конъюгат 45a (0,1)	Конъюгат 45a (0,03)

		(в/в)	(в/в)	(в/в)	(в/м)	(в/м)	(в/м)
0	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100
5	0	100	80	20	100	40	60
6		100	40	0	100	0	0
7		100	40		100		
8		100	40		100		
9		100	40		100		
10		100	40		100		
11		100	40		100		
12		100	40		100		
13		100	40		100		
14		100	40		100		

Таблица 231: Процент начальной массы тела животных по группам и дням (мг/кг) (путь введения дозы). *Данные показаны до первой смерти в группе.

День после заражения	Носитель (ФСБ)	Конъюгат 45a (0,3) (в/в)	Конъюгат 45a (0,1) (в/в)	Конъюгат 45a (0,03) (в/в)	Конъюгат 45a (0,3) (в/м)	Конъюгат 45a (0,1) (в/м)	Конъюгат 45a (0,03) (в/м)
0	100	100	100	100	100	100	100
1	97,5	99,5	96,9	99,1	98,6	97,2	97,6
2	95,1	99,4	96	94	97,1	95,5	95
3	86,6	94,5	89,9	86,8	89,7	88,8	89,1
4	79,9	93	82,6	79,2	89,1	80,8	81,2
5	74,6	94,7	81	74,6	92,1	76,4	75,7
6		97,4			94,3		
7		99,3			97,1		
8		101,9			98,7		
9		102			101,7		
10		105			103,6		
11		103,3			100,9		
12		102,4			101,2		
13		105,9			102,8		

14		104,2			101,6		

Пример 219. Исследование дальности однократного подкожного введения и исследование токсичности и токсикокинетики однократного введения (2-недельная экспозиция) конъюгата 45a на крысах линии Спрег-Доули

Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить переносимость у самцов и самок крыс, а затем токсичность и токсикокинетику (ТК) конъюгата 45a при введении в виде однократной подкожной (п/к) дозы самцам крыс Спрег-Доули.

Это исследование состояло из двух фаз; переносимость в фазе 1 (группы 1–3) и токсикология (группы 4–7) и сателлитной ТК (группы 8–10) в фазе 2. Каждая группа лечения в фазе 1 состояла из одной самки и одного самца крыс линии Спрег-Доули. Крысам фазы 1 вводили 100 мг/кг конъюгата 45a (группа 1), 200 мг/кг конъюгата 45a (группа 2) или 400 мг/кг конъюгата 45a (группа 3) в один день путем подкожной инъекции в объеме дозы 5 мл/кг (5 мл X 2 места для группы 3, средне-лопаточная и дорсальная поясничная области). Каждая токсикологическая группа фазы 2 (группы 4–7) состояла из пяти самцов крыс линии Спрег-Доули. Каждая группа фазы 2 сателлитной ТК (группы 8–10) состояла из четырех самцов крыс Спрег-Доули. В зависимости от переносимости в фазе 1 крысам из фазы 2 вводили либо ФСБ (группа 4), 50 мг/кг конъюгата 45a (группы 5 и 8), либо 150 мг/кг конъюгата 45a (группы 6 и 9), либо 400 мг/кг конъюгата 45a (группы 7 и 10) в один день путем подкожной инъекции в объеме дозы 5 мл/кг (5 мл X 2 места для группы 3, средне-лопаточная и дорсальная поясничная области для групп 7 и 10).

Клинические наблюдения для фазы 1 регистрировали два раза в день в 1–3 дни, а подробные наблюдения регистрировали при рандомизации. Клинические наблюдения для фазы 2 регистрировали два раза в день в 1–15 дни, а подробные наблюдения регистрировали в 1 день (до введения дозы) и на 14 день. Измерения массы тела регистрировали при рандомизации и до введения дозы для фазы 1. Измерения массы тела для фазы 2 регистрировали при рандомизации, на 1 день, 3 день, 7 день, 14 день и 15 день перед некропсии. Измерения потребления пищи для фазы 2 регистрировали в 1, 4, 7, 10, 12 и 14 дни. Образцы плазмы собирали у крыс из сателлитной ТК (группы 8–10) через 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 72, 120, 168, 240 и 336 часов после введения дозы для анализа системной экспозиции конъюгата 45a. Образцы мочи собирали у крыс из исследования токсикологии (группы 4–7) в течение 24 часов с 14 по 15 день. Образцы крови для оценки гематологических, биохимических показателей и конечных точек свертывания крови собирали на 15 день у крыс из исследования токсикологии (группы 4–7). После сбора образцов крови была проведена некропсия крыс из исследования токсикологии (группы 4–7). Ткани, указанные в протоколе, собирали и оценивали грубо, выбранные органы взвешивали, а ткани фиксировали для микроскопического исследования. Ткани впоследствии обрабатывали и оценивали при помощи микроскопа.

Переносимость:

На основании отсутствия аномальных явлений, связанных с исследуемым препаратом, введение конъюгата 45aat <400 мг/кг в виде однократной подкожной инъекции (в одно или два места в каждый день дозирования) хорошо переносилось самками и самцами крыс линии Спрег-Доули в течение 3 дней.

Токсикокинетика:

Уровни конъюгата 45a в плазме поддерживались в течение 2-недельного периода экспозиции и были сопоставимы между анализами захвата нейраминидазой (NA) и захватом Fc. Это наблюдение свидетельствует о том, что интактная молекула (содержащая по меньшей мере 1 молекулу-мишень, связанную с группой Fc) остается стабильной после введения дозы in vivo. Средняя экспозиция в плазме увеличилась

приблизительно пропорционально дозе с 50 до 400 мг/кг.

Токсикология:

На основании отсутствия связанных с исследуемым препаратом изменений массы тела, потребления пищи, клинических наблюдений, массы органов, гематологических показателей, биохимии, макроскопических и микроскопических данных, введение конъюгата 45a в дозе <400 мг/кг в виде однократной подкожной инъекции (высокая доза, введенная в два места) хорошо переносилась самцами крыс линии Спрег-Доули в течение 14 дней. Эта доза соответствовала средним значениям AUC0-inf 312000 и 319000 мкг·ч/мл и средним значениям Cmax 1150 и 974 мкг/мл для анализов захвата NA и Fc, соответственно.

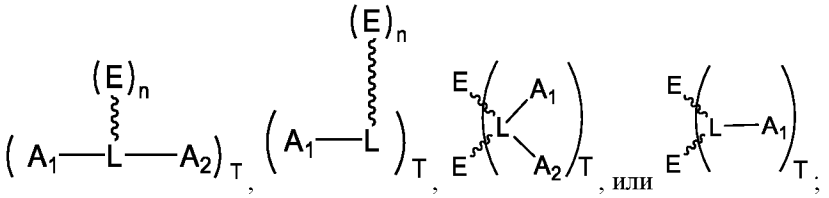
Пример 220. Исследование дальности однократного подкожного введения и исследование токсичности и токсикокинетики однократного введения (2-недельная экспозиция) конъюгата 45a на крысах линии Спрег-Доули

Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить переносимость у самцов и самок крыс, а затем токсичность и токсикокинетику конъюгата 45a при введении однократной подкожной (п/к) дозы самцам крыс Спрег-Доули. Самцам животных в фазе 2 вводили 50, 150 или 400 мг/кг/доза конъюгата 45a.

Все исследуемые животные дожили до запланированного умерщвления. Не было никаких изменений массы органов, гематологических показателей, клинической химии, макроскопических и микроскопических данных, связанных с исследуемым препаратом. Зарегистрированные микроскопические данные присутствовали при аналогичной частоте у контрольных животных и групп, подвергшихся воздействию исследуемого препарата, или считались случайными «фоновыми» результатами, которые обычно наблюдаются у крыс этой линии и возраста.

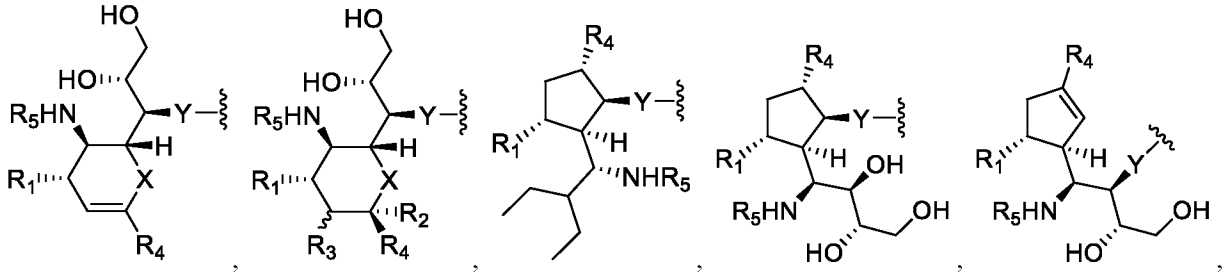
ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, описываемый любой из формул (D-I), (M-I), (1) или (2):

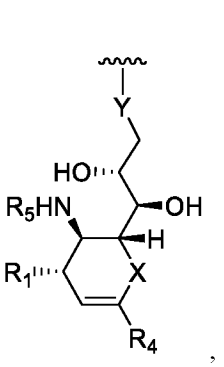


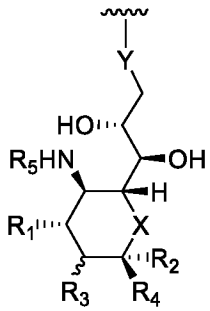
(D-I) (M-I) (1) (2)

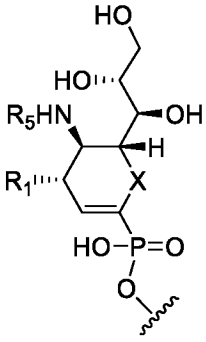
где каждый A_1 и каждый A_2 независимо описан формулой (A-I)-(A-XII):

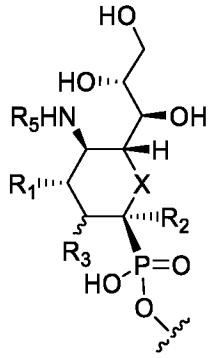


(A-I) (A-II) (A-III) (A-IV) (A-V)



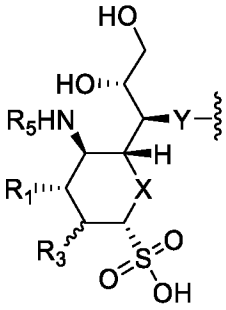
,


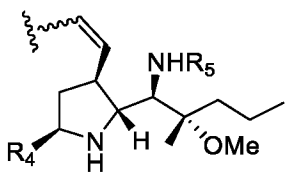
,


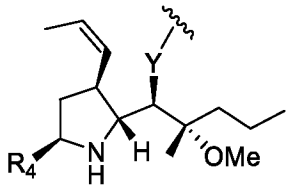
,


,

(A-VI) (A-VII) (A-VIII) (A-IX)



,


,


;

(A-X) (A-XI) (A-XII)

где R_1 выбран из -OH, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$ и $-NHC(=NH)NHR_6$;

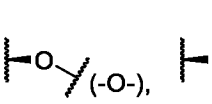
R_2 и R_3, каждый независимо, выбраны из -H, -OH, -F, -Cl и -Br;

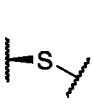
R_4 выбран из $-CO_2H$, $-P(=O)(OH)_2$, $-SO_3H$;

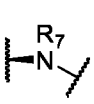
R_5 выбран из $-COCH_3$, $-COCF_3$, $-SO_2CH_3$;

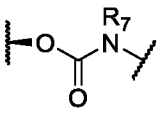
X выбран из -O- и -S-;

Y выбран из:

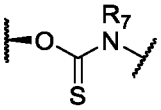


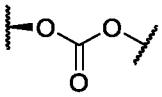
(-O-),


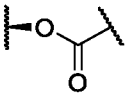
(-S-),


(-NR7-),


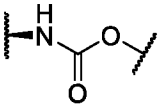
(-O(C=O)NR7-),

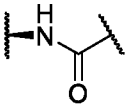


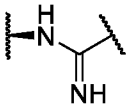
(-O(C=S)NR7-),


(-O(C=O)O-),


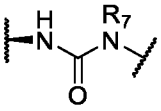
(-O(C=O)-),

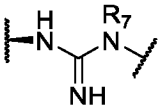


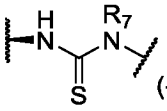
(-NH(C=O)O-),


(-NH(C=O)-),


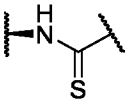
(-NH(C=NH)-),

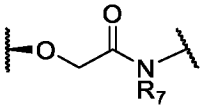


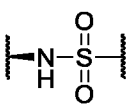
(-NH(C=O)NR7-),


(-NH(C=NH)NR7-),


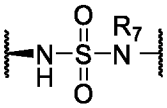
(-NH(C=S)NR7-),

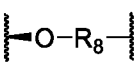


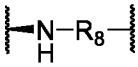
(-NH(C=S)-),


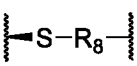
(-OCH2(C=O)NR7-),


(-NH(SO2)-),

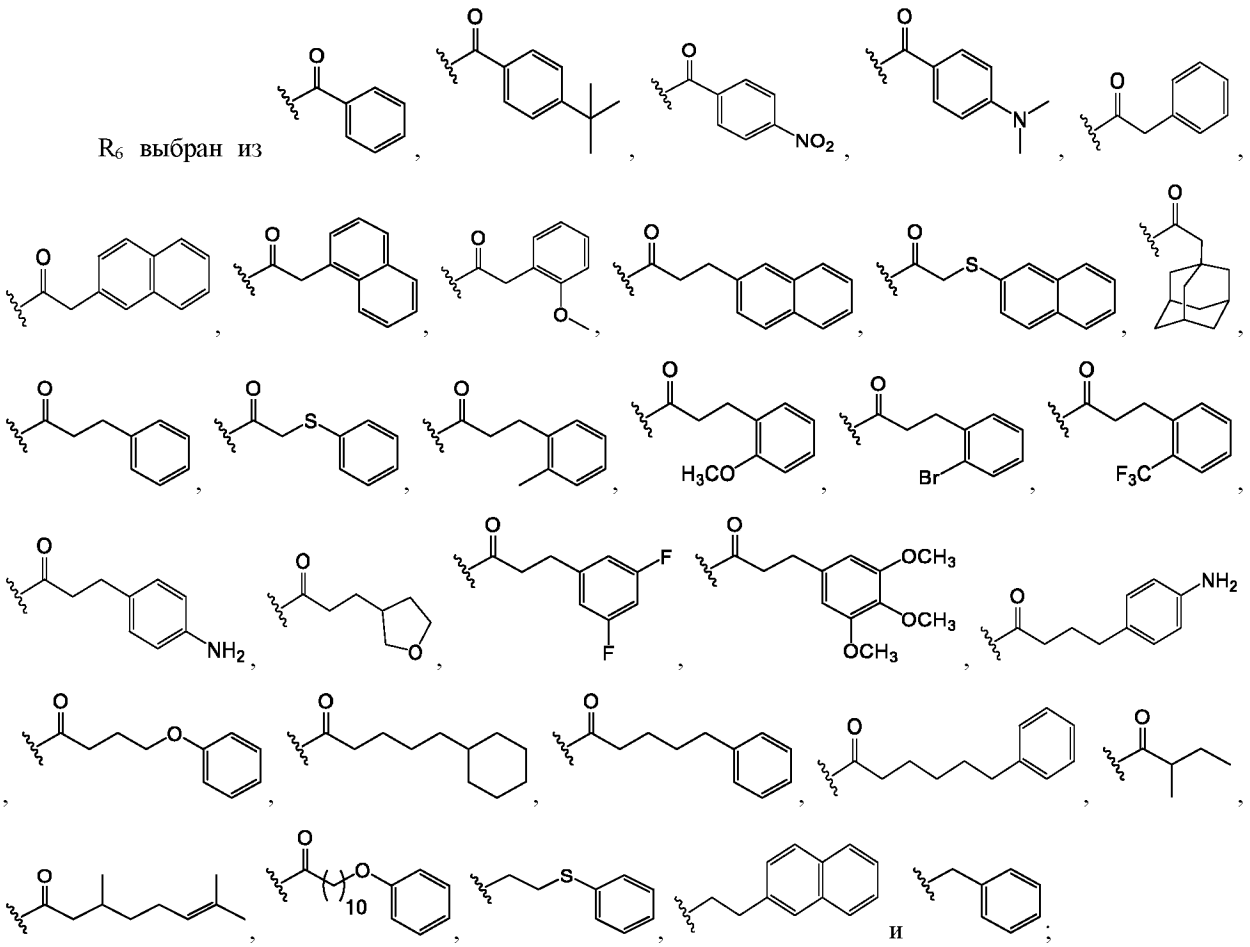


(-NH(SO2)NR7-),


(-OR8-),


(-NR8-), and


(-SR8-);

R_6 выбран из 

R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

R_8 выбран из C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

n равно 1 или 2;

каждый E содержит мономер Fc-домена, белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид;

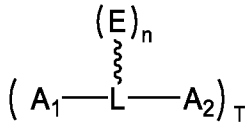
L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к E и к каждому Y каждого A_1 или каждого A_1 и A_2;

T является целым числом от 1 до 20, и

каждая волнистая линия в формулах (D-I), (M-I), (1) или (2) указывает, что L ковалентно присоединен к каждому E;

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Конъюгат по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-I):



(D-I)

где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII);

каждый E содержит мономер Fc-домена, белок альбумин,

связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид;

n равно 1 или 2;

T является целым числом от 1 до 20; и

волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что каждый A_1-L-A_2 ковалентно присоединен к E,

или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Конъюгат по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбраны из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), или (A-VII);

каждый E содержит мономер Fc-домена, белок альбумин,

связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид;

n равно 1 или 2;

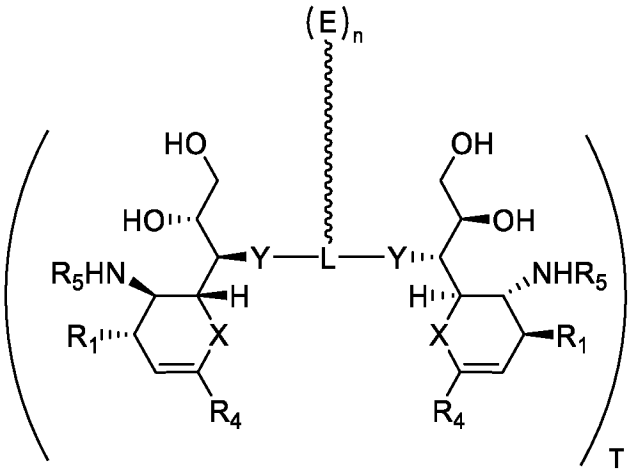
T является целым числом от 1 до 20; и

волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что каждый A_1-L-A_2 ковалентно присоединен к E,

или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Конъюгат по варианту осуществления 3, отличающийся тем, что каждый A_1 и каждый A_2 описан формулой (A-I), или его фармацевтически приемлемая соль.

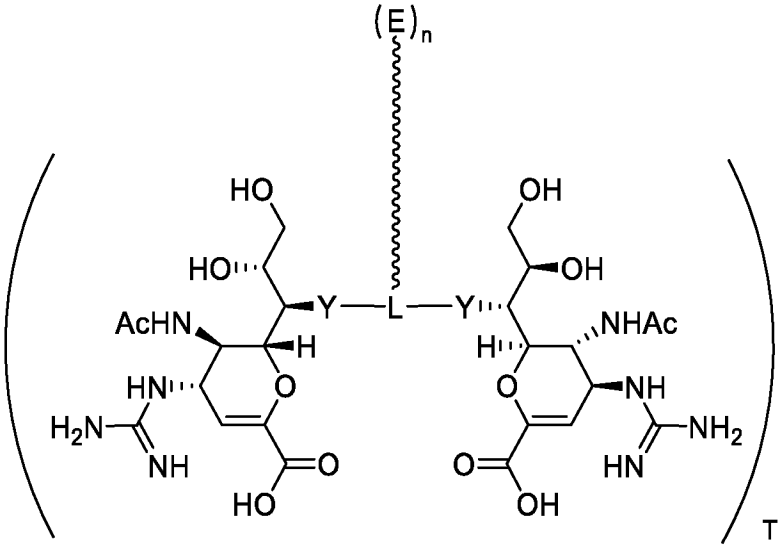
5. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-4, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II):



(D-II)

или его фармацевтически приемлемая соль.

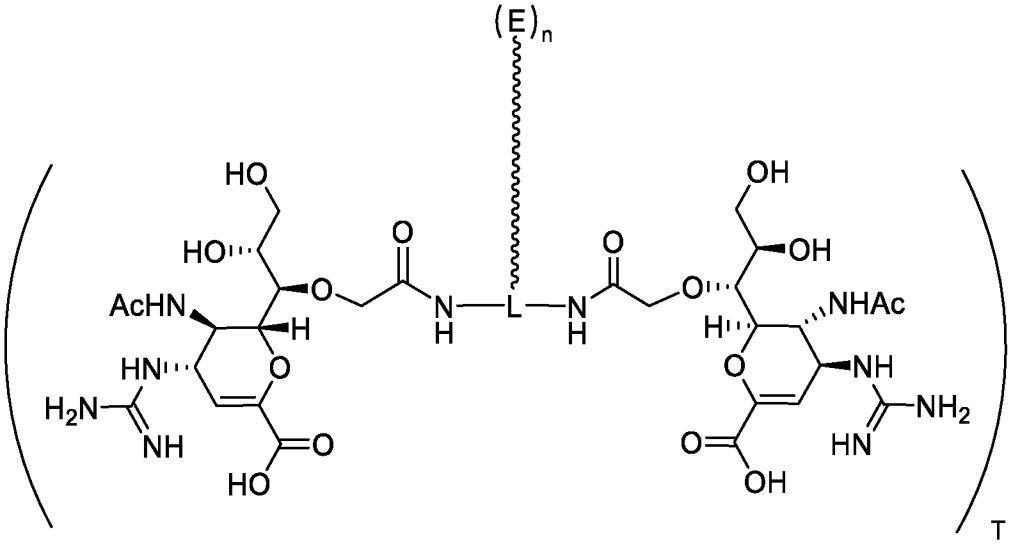
6. Конъюгат по варианту осуществления 5, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II-1):



(D-II-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

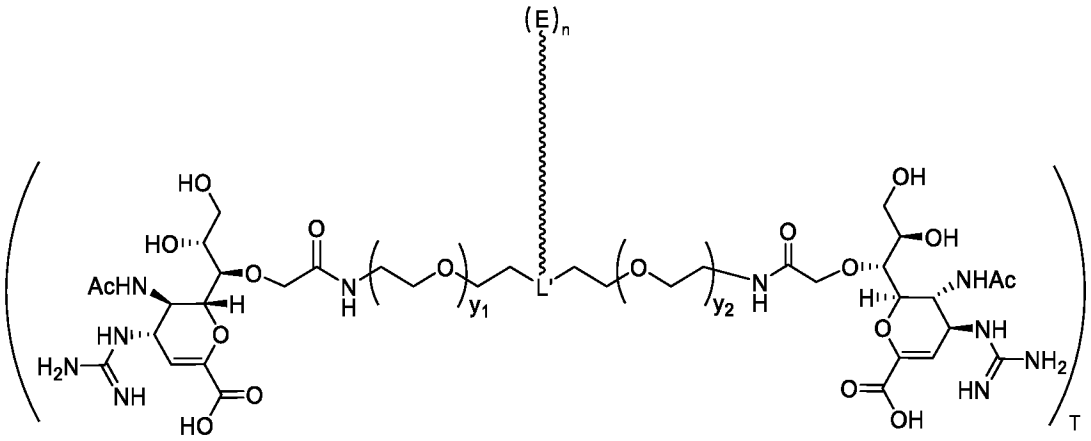
7. Конъюгат по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II-2):



(D-II-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

8. Конъюгат по варианту осуществления 7, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II-3):



(D-II-3)

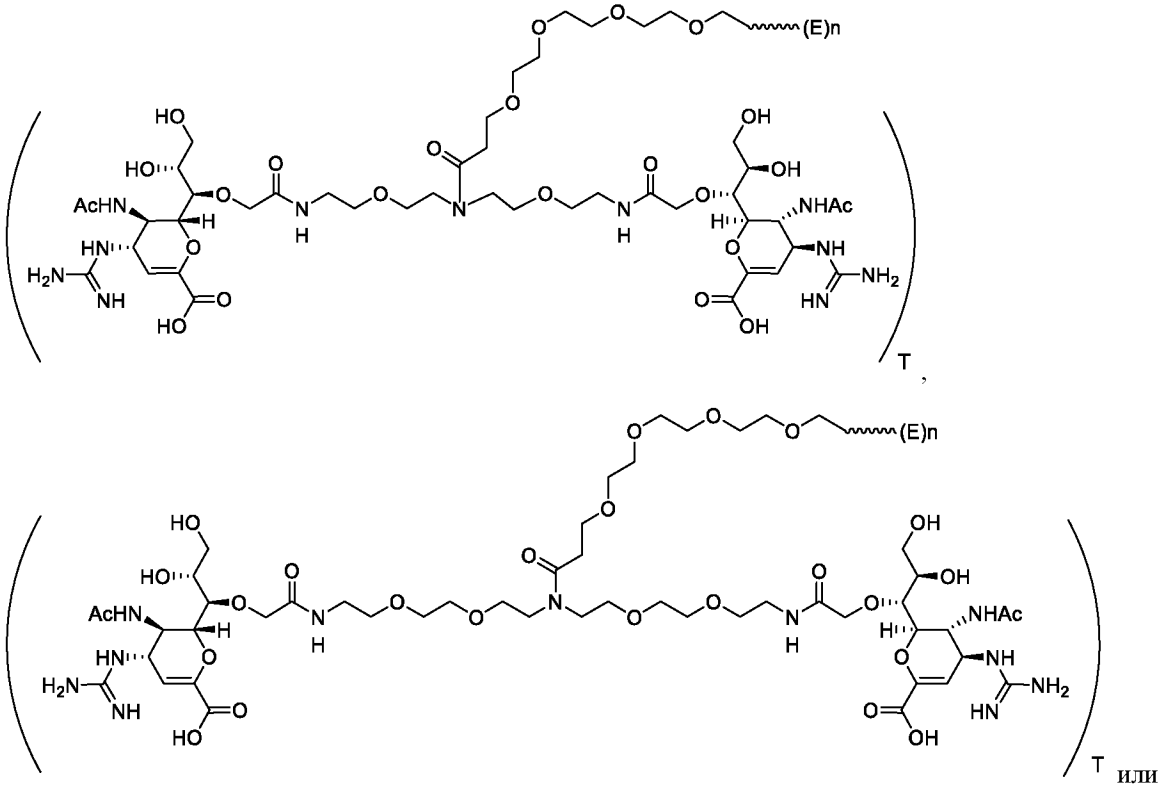
где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

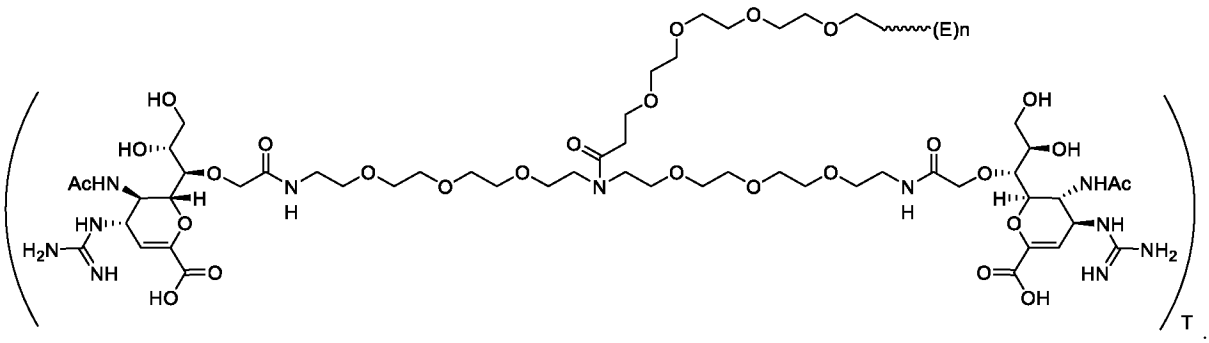
или его фармацевтически приемлемая соль.

9. Конъюгат по варианту осуществления 8, отличающийся тем, что L' представляет собой атом азота.

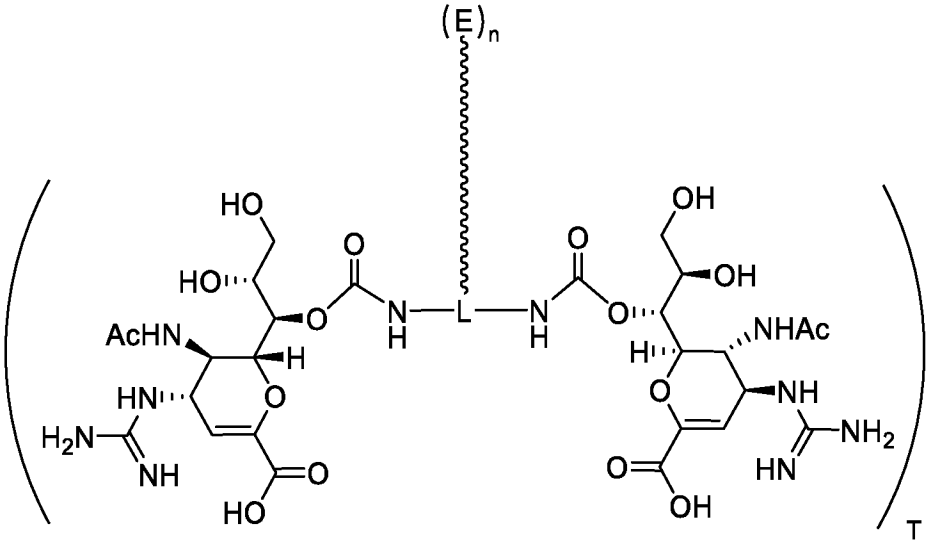
10. Конъюгат по варианту осуществления 9, отличающийся тем, что конъюгат имеет структуру, выбранную из



или



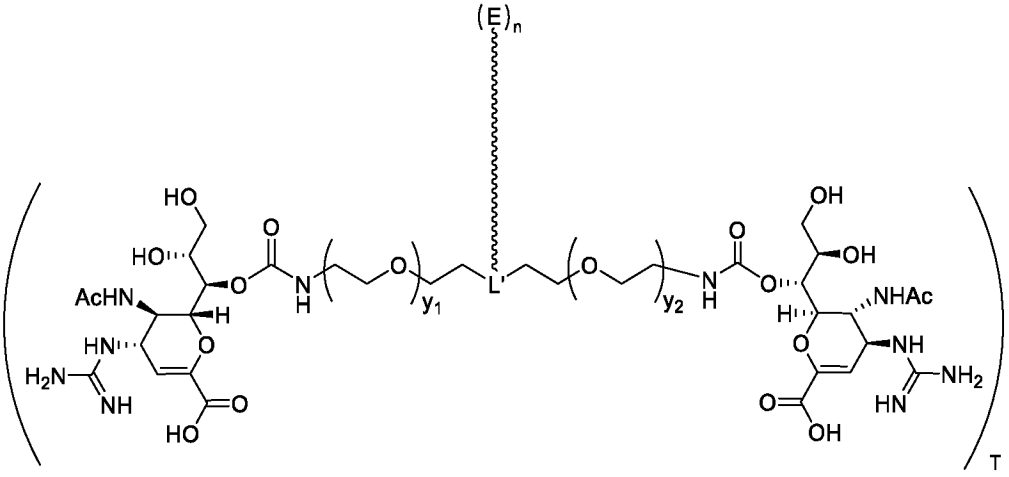
11. Конъюгат по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II-4):



(D-II-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

12. Конъюгат по варианту осуществления 11, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II-5):



(D-II-5)

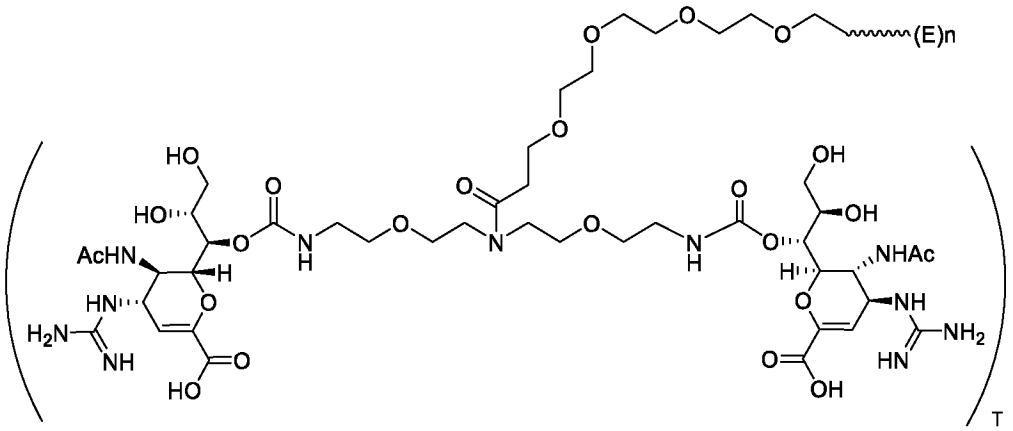
где L' представляет собой остаток от L, и

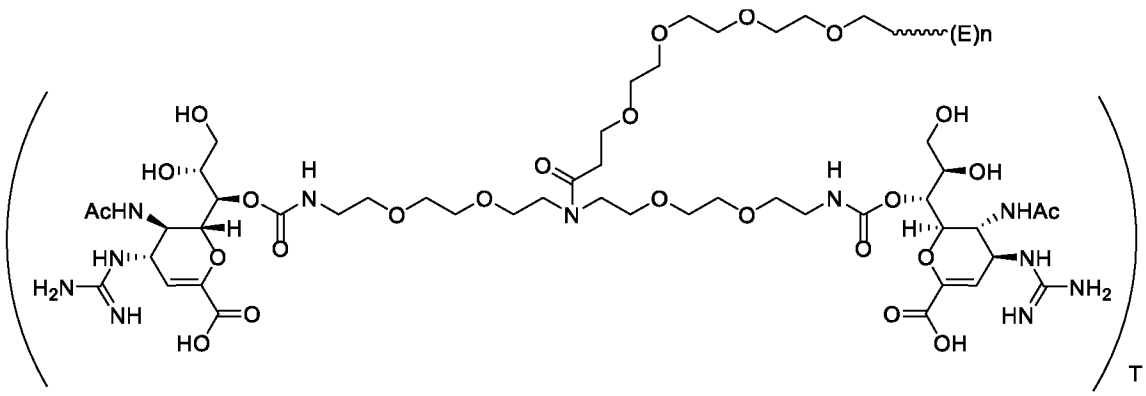
y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

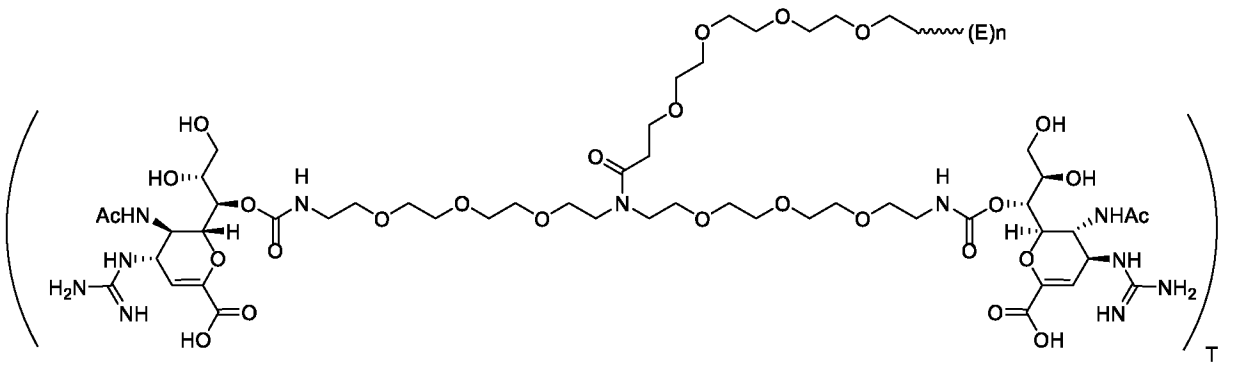
13. Конъюгат по варианту осуществления 12, отличающийся тем, что L' представляет собой атом азота.

14. Конъюгат по варианту осуществления 13, отличающийся тем, что конъюгат имеет структуру, выбранную из

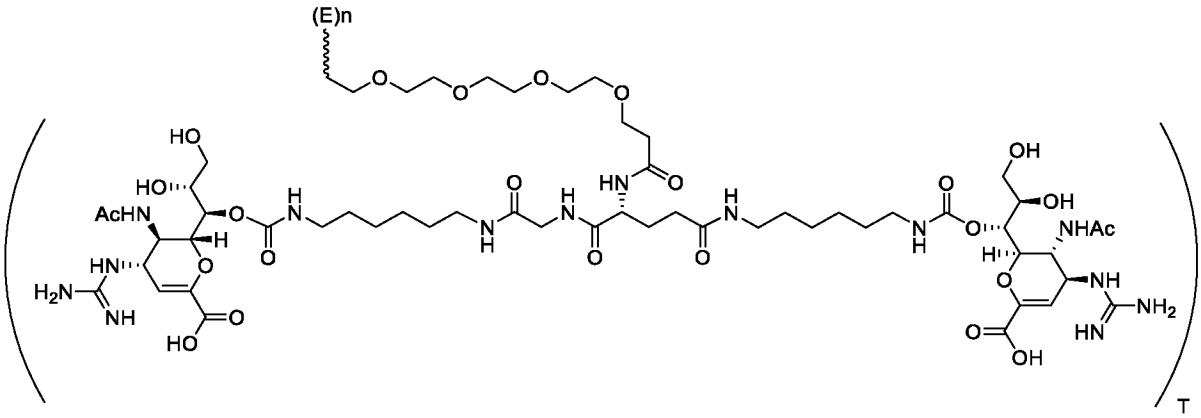




или

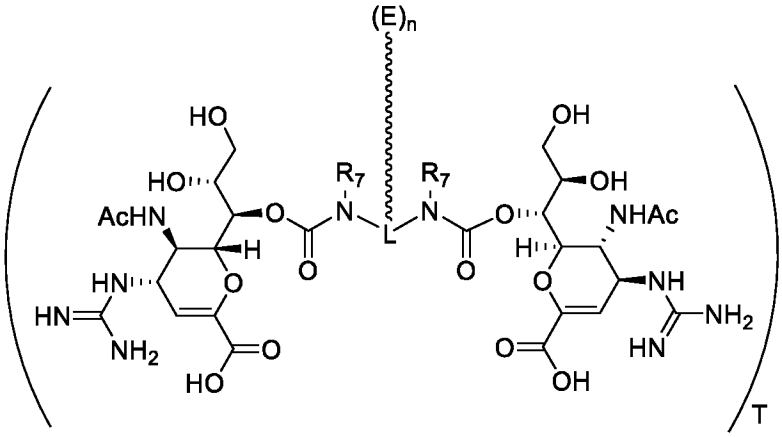


15. Конъюгат по варианту осуществления 11, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

16. Конъюгат по варианту осуществления 6, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II-6):



(D-II-6)

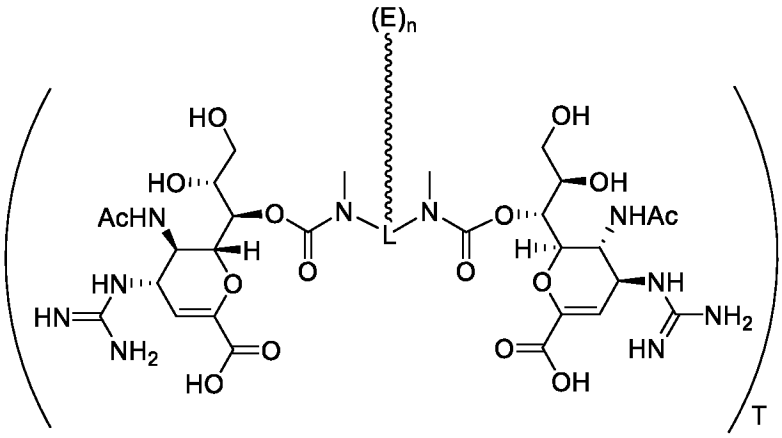
где R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

или его фармацевтически приемлемая соль.

17. Конъюгат по варианту осуществления 16, где R_7 выбран из C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арил и C2-C15 гетероарила.

18. Конъюгат по варианту осуществления 16 или 17, отличающийся тем, что R_7 выбран из метила, этила, пропила или бутила.

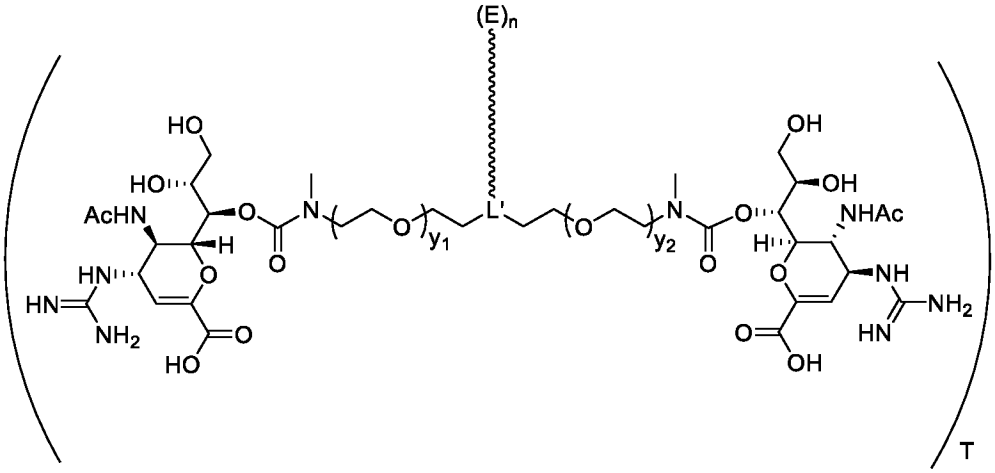
19. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-18, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-II-7):



(D-II-7)

или его фармацевтически приемлемая соль.

20. Конъюгат по варианту осуществления 19, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II-8):



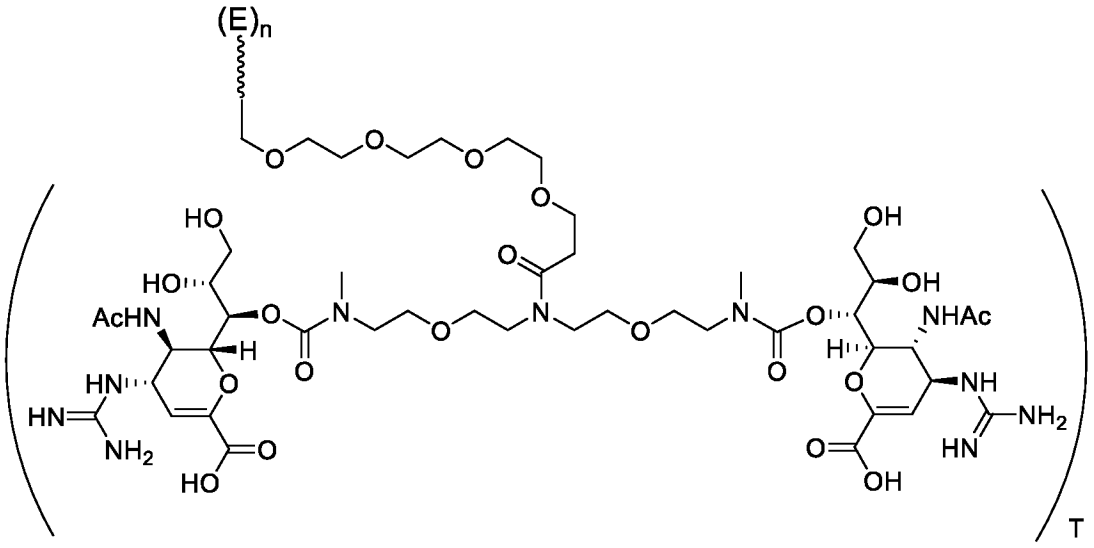
(D-II-8)

где L' представляет собой остаток от L, и

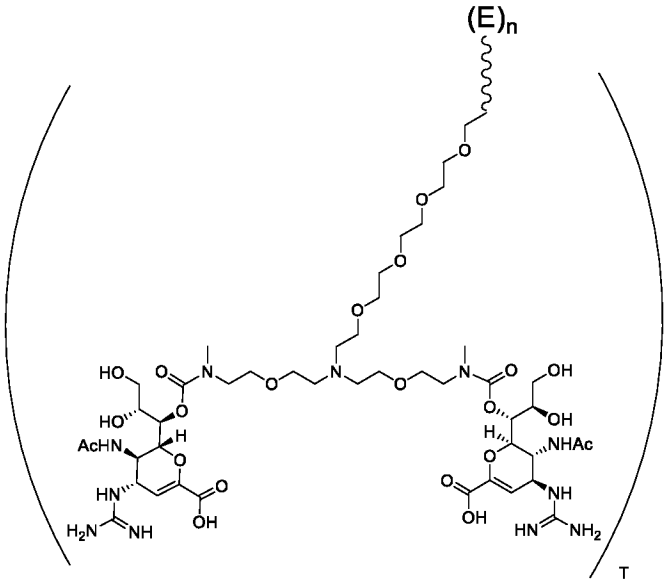
y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

21. Конъюгат по варианту осуществления 20, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет структуру:



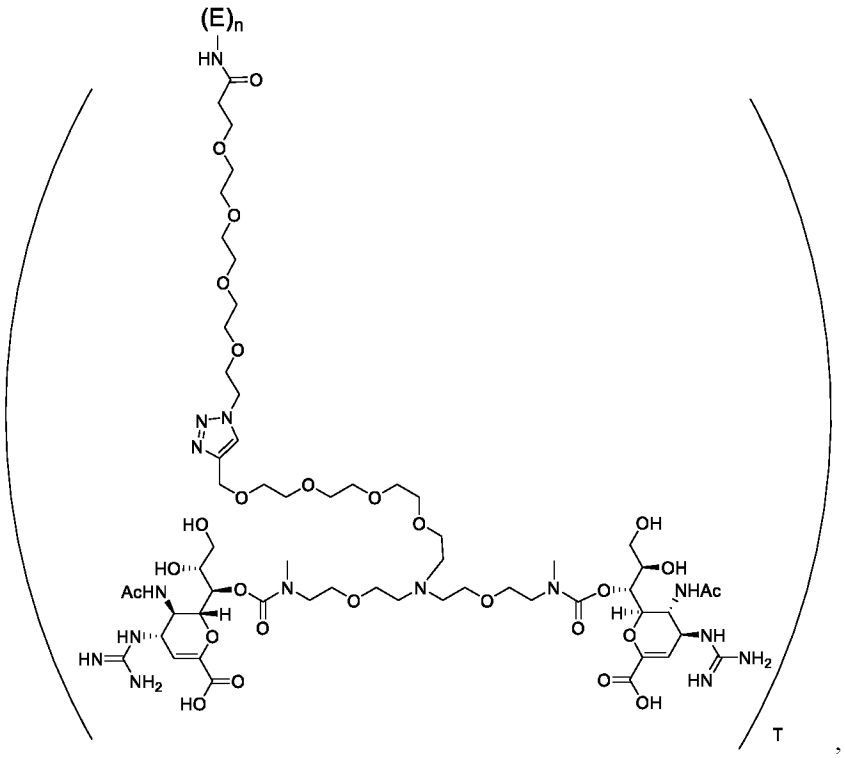
или



,

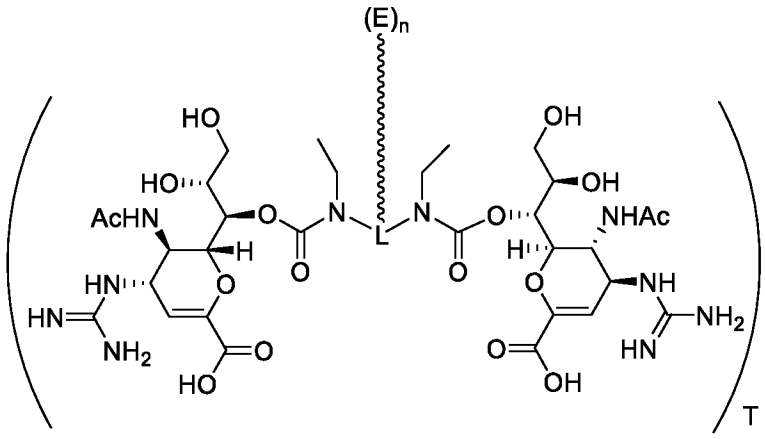
или его фармацевтически приемлемая соль.

22. Конъюгат по варианту осуществления 21, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан



или его фармацевтически приемлемая соль.

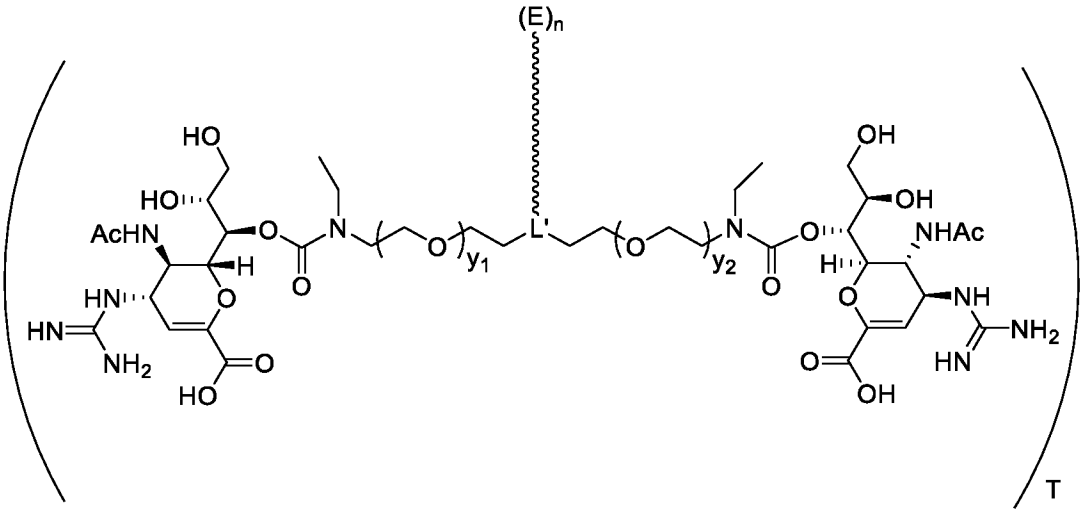
23. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-18, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II-9):



(D-II-9)

или его фармацевтически приемлемая соль.

24. Конъюгат по варианту осуществления 23, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II-10):



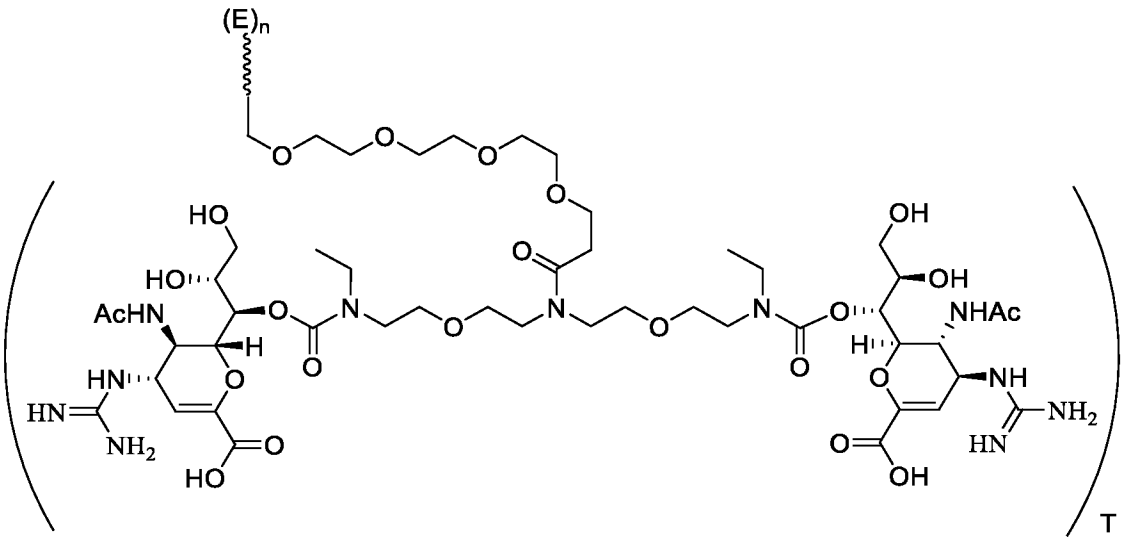
(D-II-10)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

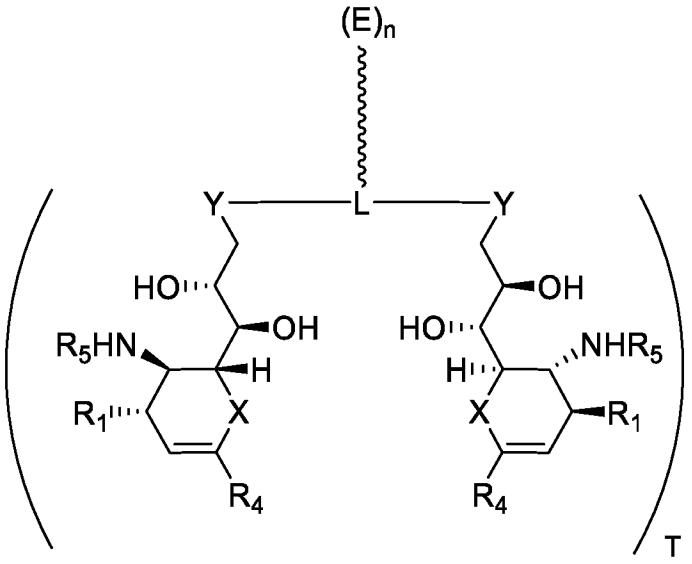
или его фармацевтически приемлемая соль.

25. Конъюгат по варианту осуществления 24, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

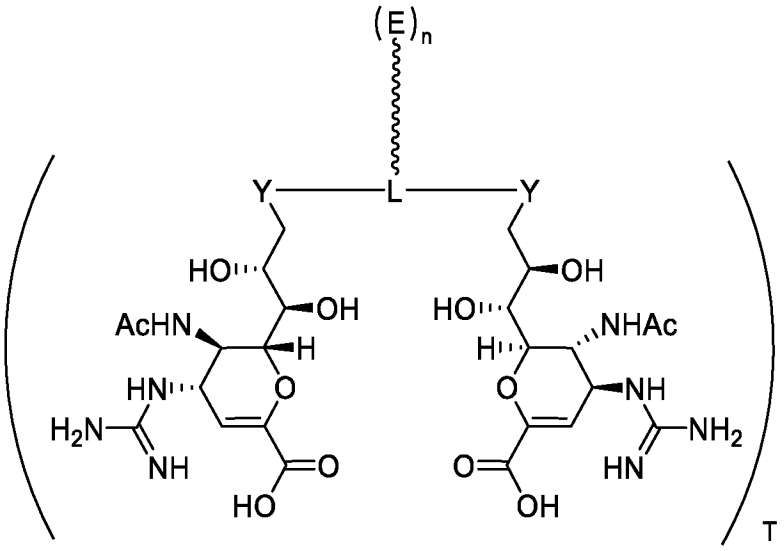
26. Конъюгат по варианту осуществления 2 или 3, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-III):



(D-III)

или его фармацевтически приемлемая соль.

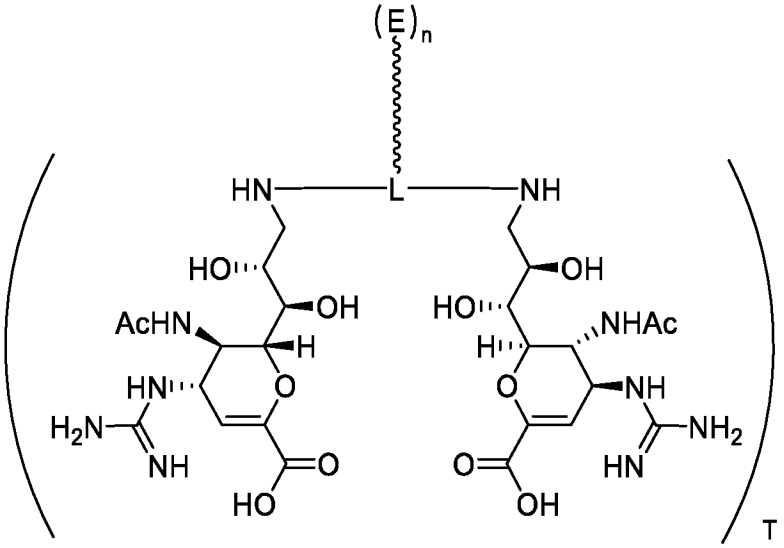
27. Конъюгат по варианту осуществления 26, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-III-1):



(D-III-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

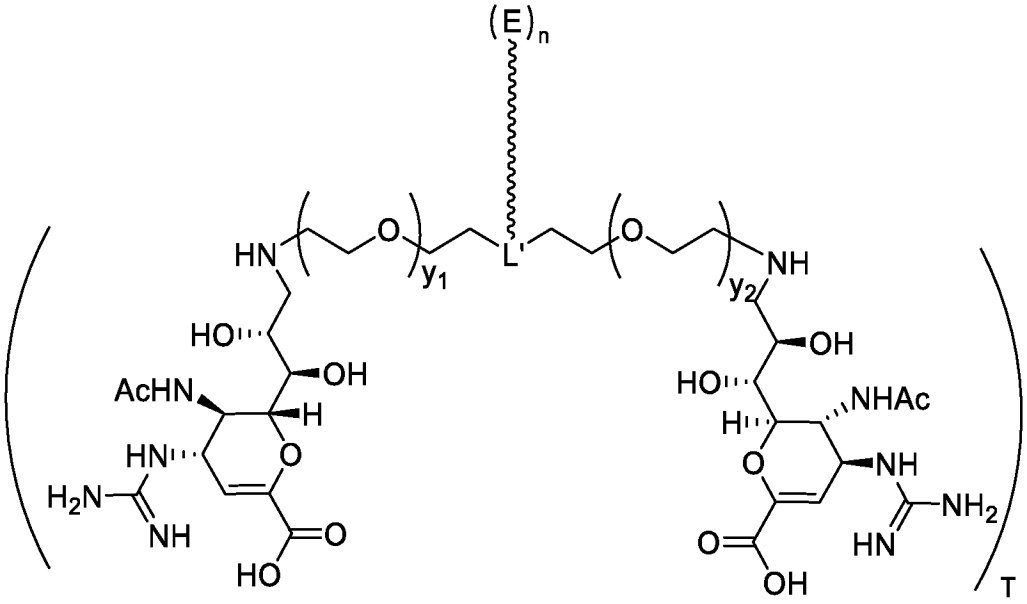
28. Конъюгат по варианту осуществления 27, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-III-2):



(D-III-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

29. Конъюгат по варианту осуществления 28, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-III-3):



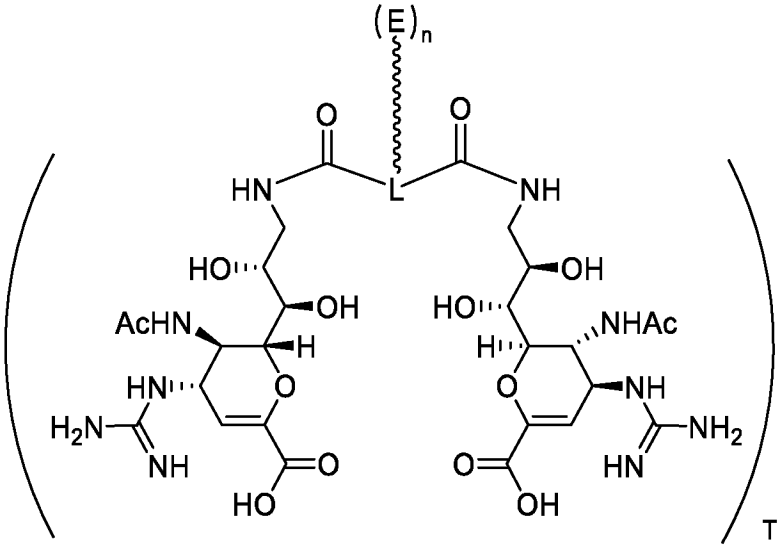
(D-III-3)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

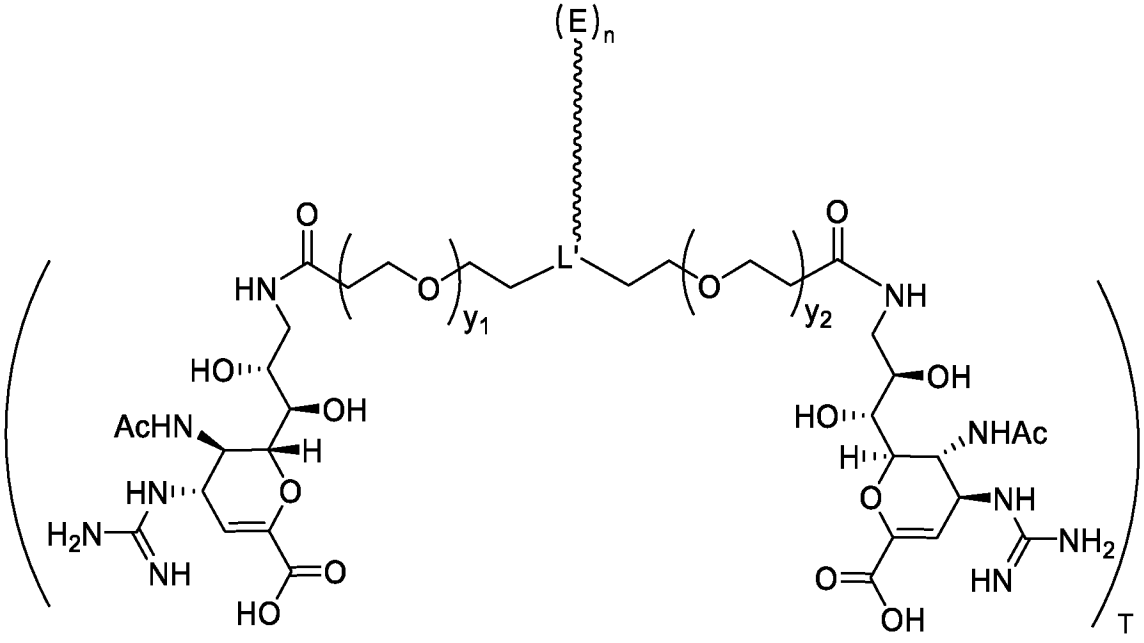
30. Конъюгат по варианту осуществления 27, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-III-4):



(D-III-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

31. Конъюгат по варианту осуществления 30, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-III-5):



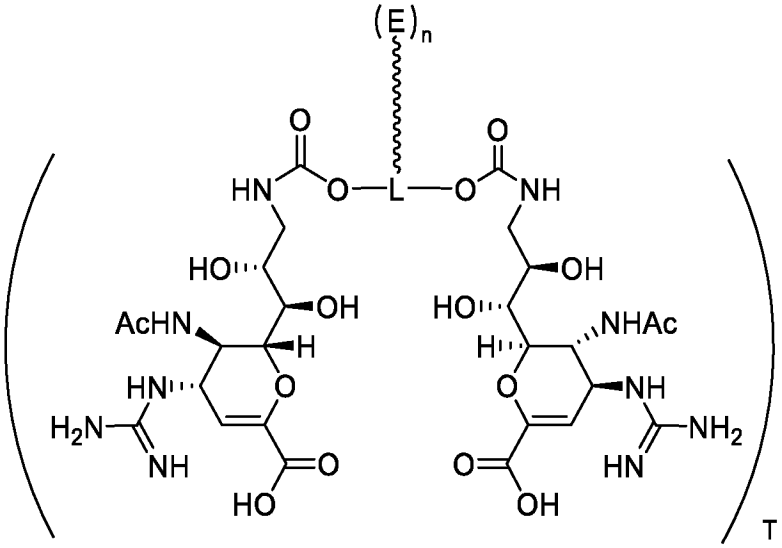
(D-III-5)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

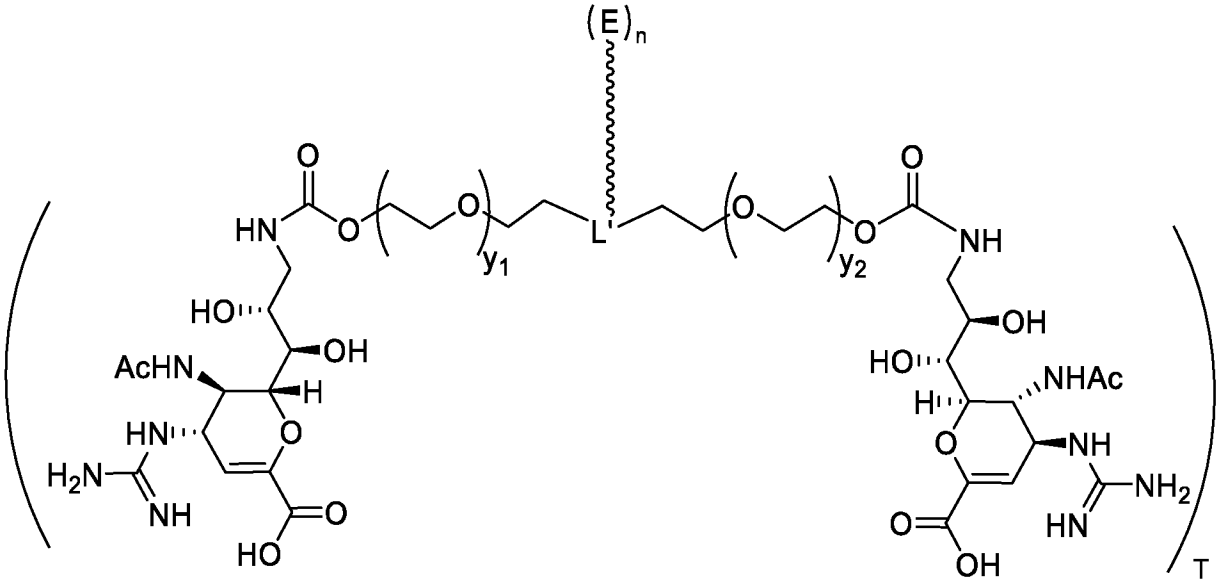
32. Конъюгат по варианту осуществления 27, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-III-6):



(D-III-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

33. Конъюгат по варианту осуществления 32, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-III-7):



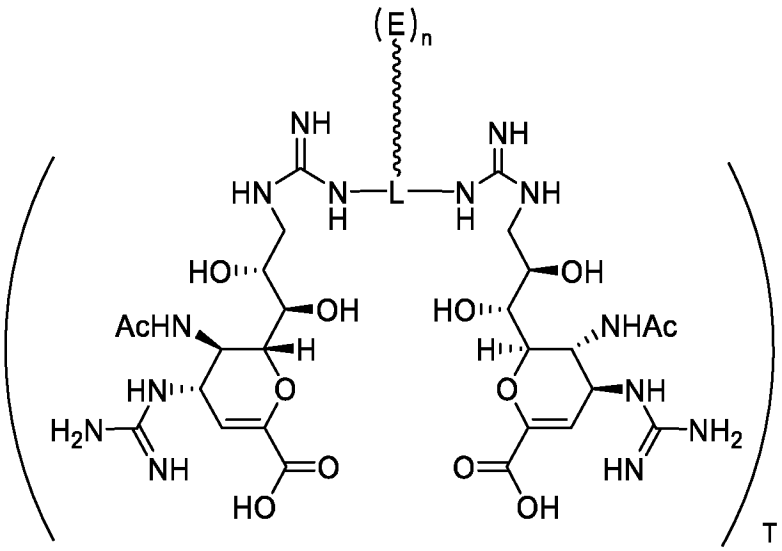
(D-III-7)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

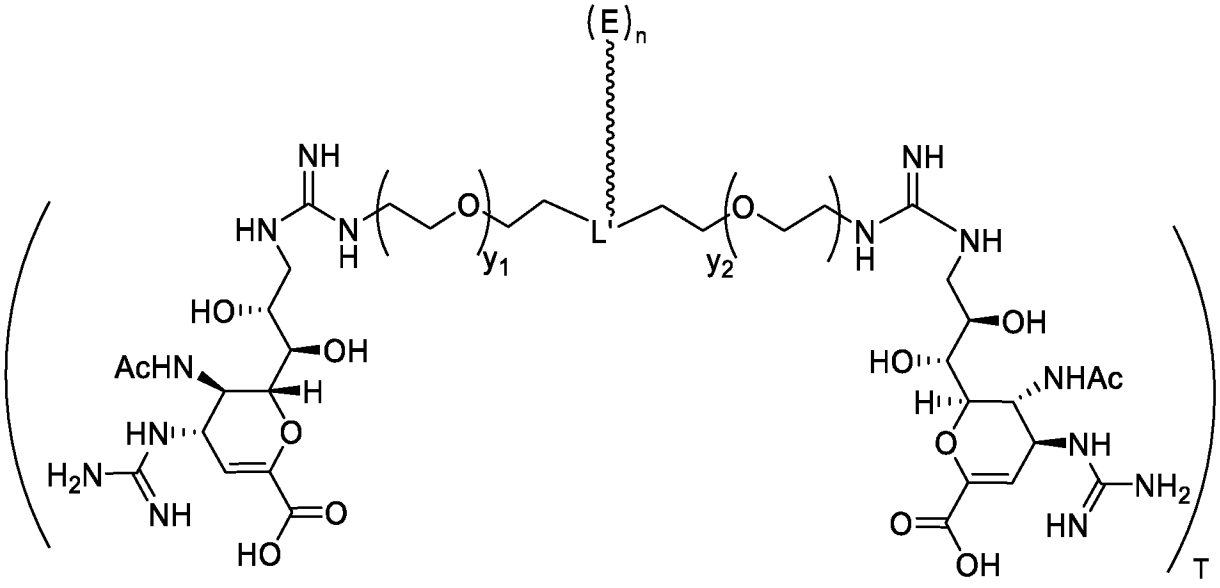
34. Конъюгат по варианту осуществления 27, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-III-8):



(D-III-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

35. Конъюгат по варианту осуществления 34, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-III-9):



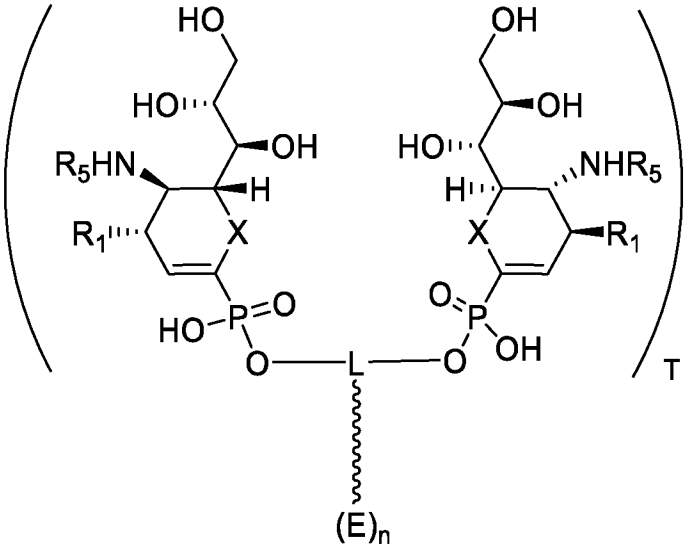
(D-III-9)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

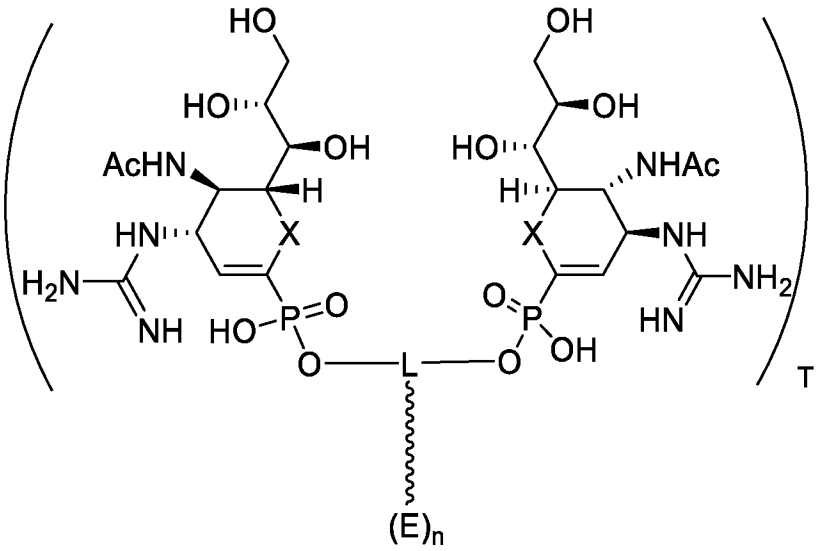
36. Конъюгат по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-IV):



(D-IV)

или его фармацевтически приемлемая соль.

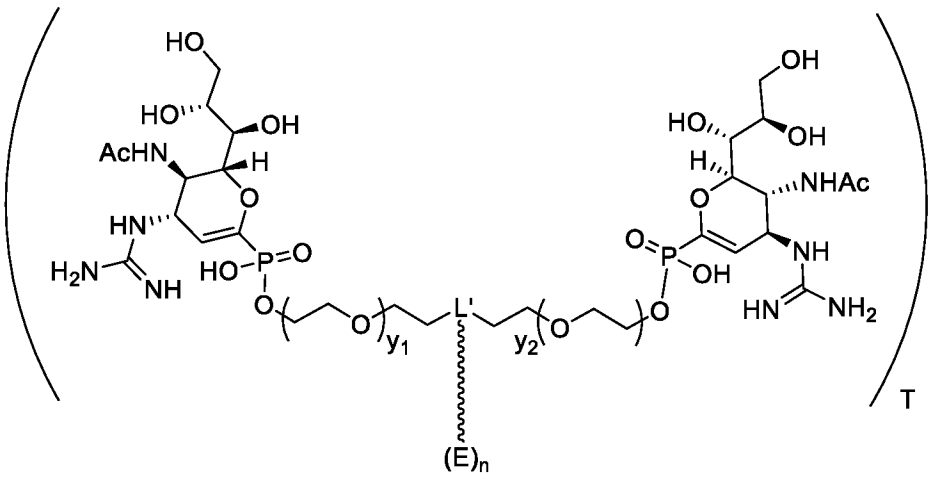
37. Конъюгат по варианту осуществления 36, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-IV-1):



(D-IV-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

38. Конъюгат по варианту осуществления 37, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-IV-2):



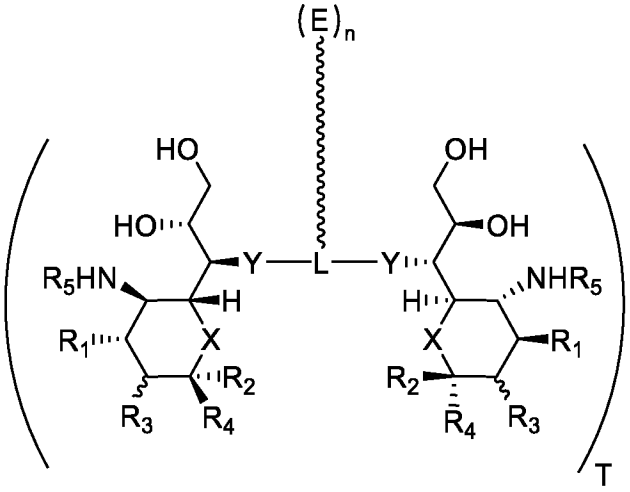
(D-IV-2)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

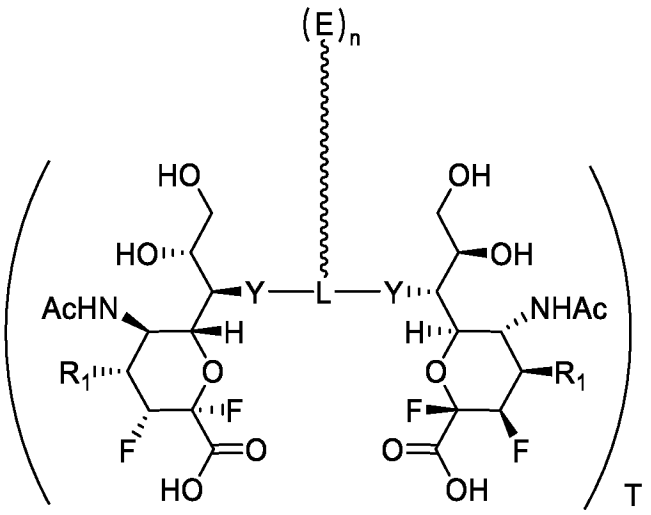
39. Конъюгат по варианту осуществления 2 или 3, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-V):



(D-V)

или его фармацевтически приемлемая соль.

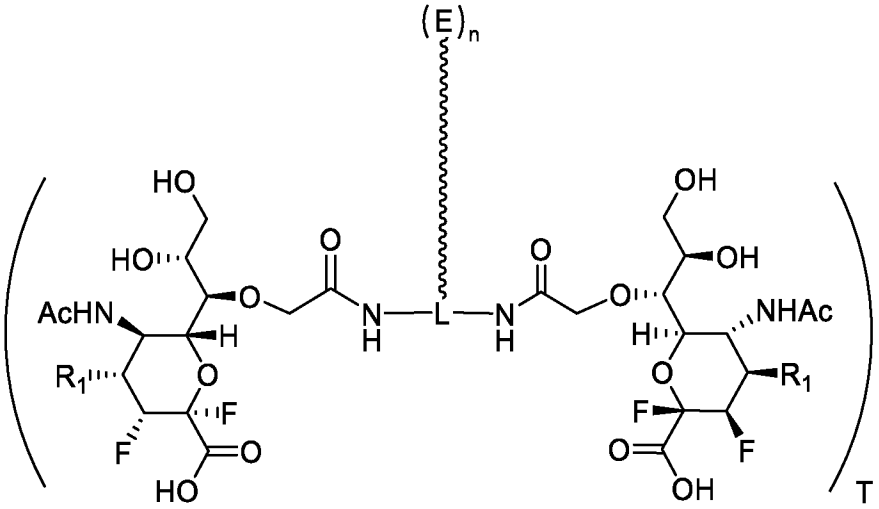
40. Конъюгат по варианту осуществления 39, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-V-1):



(D-V-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

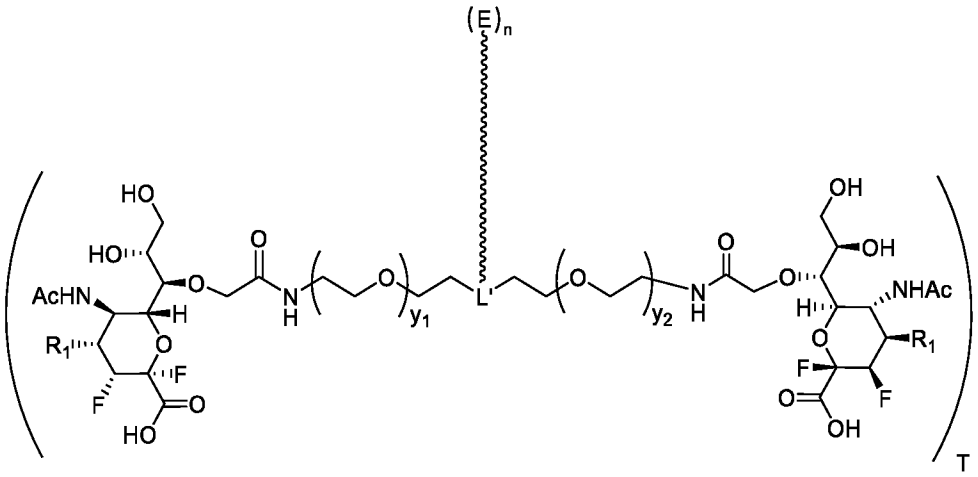
41. Конъюгат по варианту осуществления 40, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-V-2):



(D-V-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

42. Конъюгат по варианту осуществления 41, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-V-3):



(D-V-3)

где L' представляет собой остаток от L, и

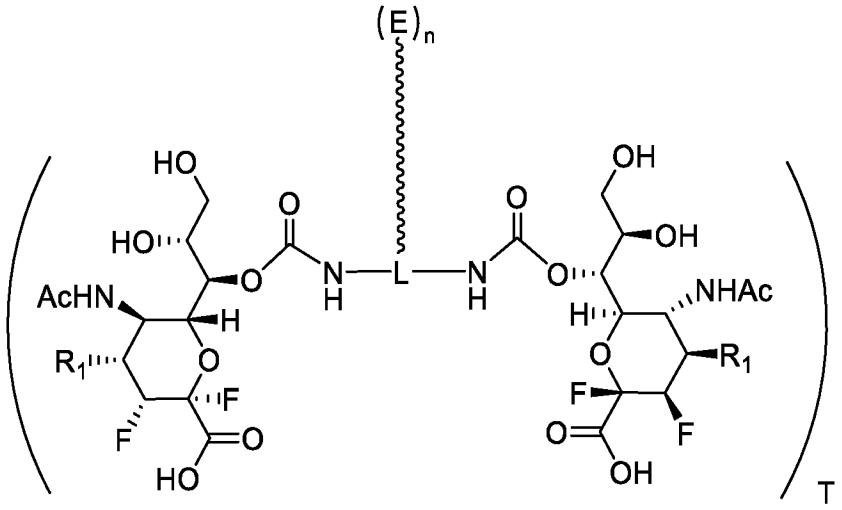
y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

43. Конъюгат по варианту осуществления 42, отличающийся тем, что L' представляет собой атом азота.

44. Конъюгат по варианту осуществления 42, отличающийся тем, что каждый из y_1 и y_2 равен 1, каждый из y_1 и y_2 равен 2 или каждый из y_1 и y_2 равен 3.

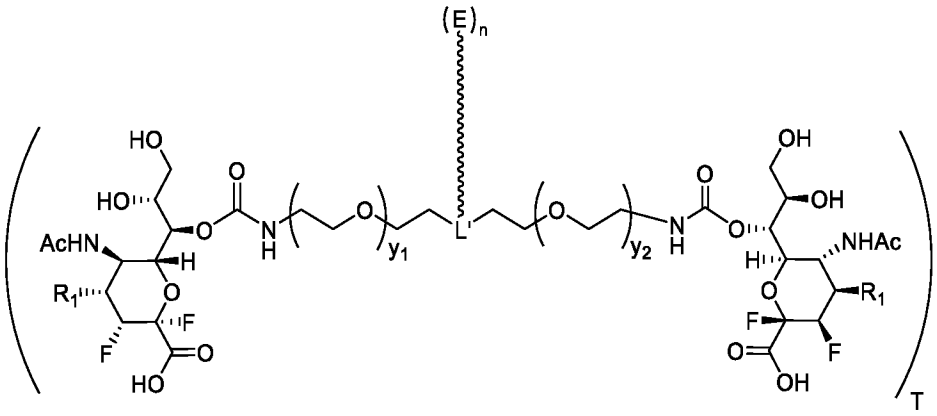
45. Конъюгат по варианту осуществления 40, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-V-4):



(D-V-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

46. Конъюгат по варианту осуществления 45, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-V-5):



(D-V-5)

где L' представляет собой остаток от L, и

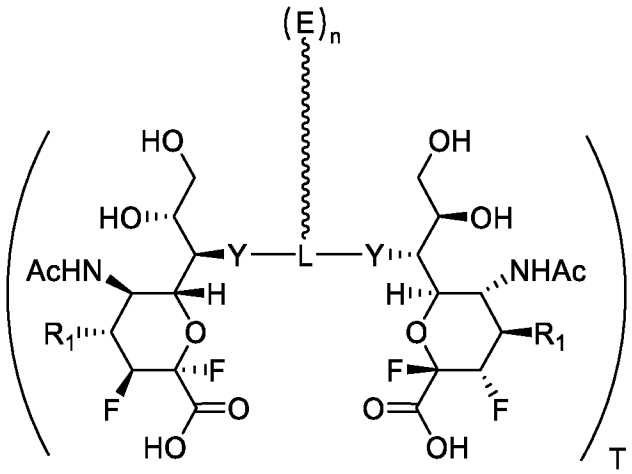
y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

47. Конъюгат по варианту осуществления 46, отличающийся тем, что L' представляет собой атом азота.

48. Конъюгат по варианту осуществления 46, отличающийся тем, что каждый из y_1 и y_2 равен 1, каждый из y_1 и y_2 равен 2 или каждый из y_1 и y_2 равен 3.

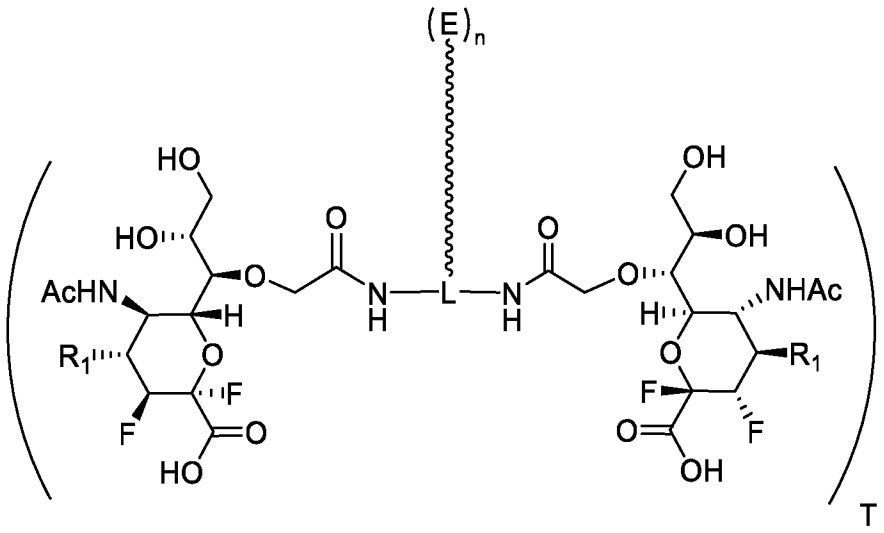
49. Конъюгат по варианту осуществления 39, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-V-6):



(D-V-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

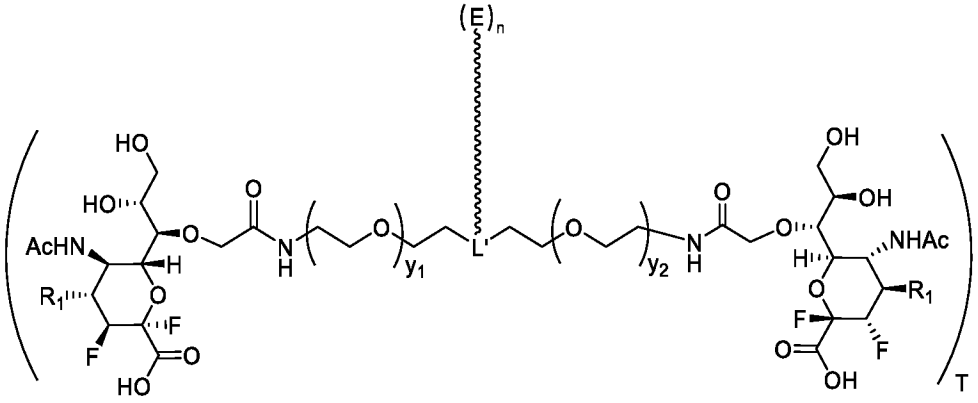
50. Конъюгат по варианту осуществления 49, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-V-7):



(D-V-7)

или его фармацевтически приемлемая соль.

51. Конъюгат по варианту осуществления 50, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-V-8):



(D-V-8)

где L' представляет собой остаток от L, и

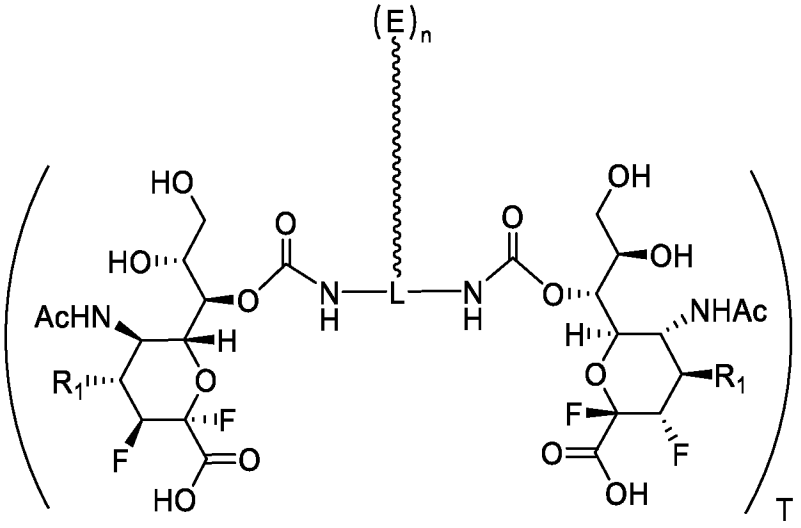
y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

52. Конъюгат по варианту осуществления 51, отличающийся тем, что L' представляет собой атом азота.

53. Конъюгат по варианту осуществления 51, отличающийся тем, что каждый из y_1 и y_2 равен 1, каждый из y_1 и y_2 равен 2 или каждый из y_1 и y_2 равен 3.

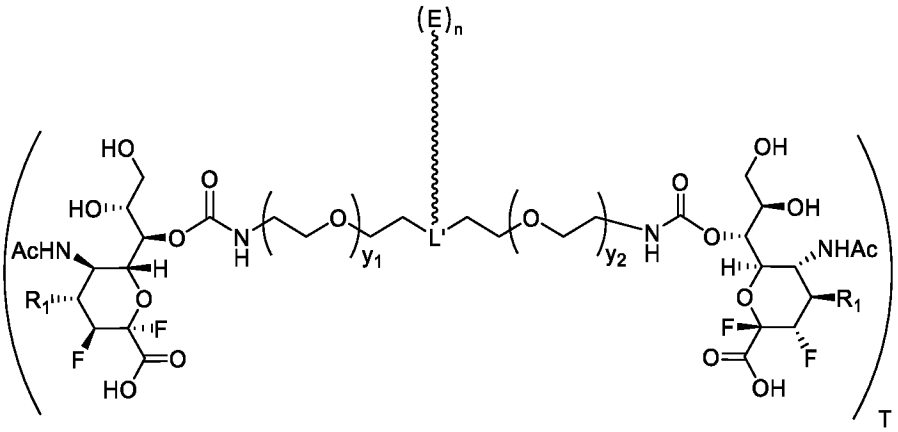
54. Конъюгат по варианту осуществления 49, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-V-9):



(D-V-9)

или его фармацевтически приемлемая соль.

55. Конъюгат по варианту осуществления 51, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-V-10):



(D-V-10)

где L' представляет собой остаток от L, и

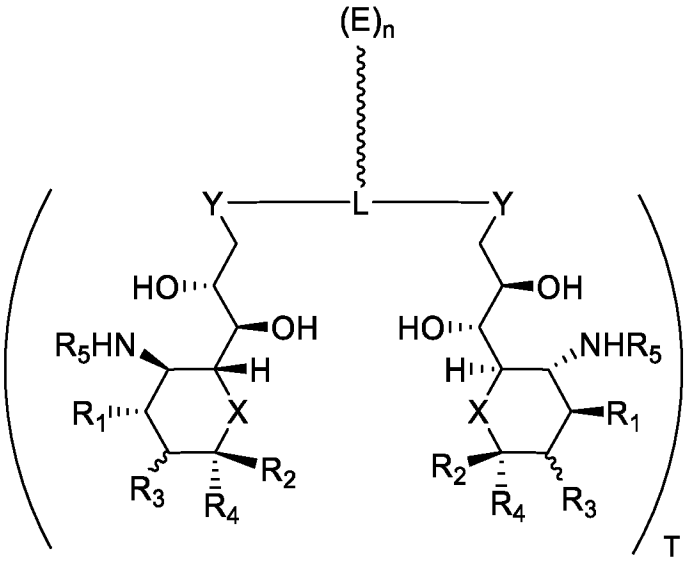
y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

56. Конъюгат по варианту осуществления 55, отличающийся тем, что L' представляет собой атом азота.

57. Конъюгат по варианту осуществления 56, отличающийся тем, что каждый из y_1 и y_2 равен 1, каждый из y_1 и y_2 равен 2 или каждый из y_1 и y_2 равен 3.

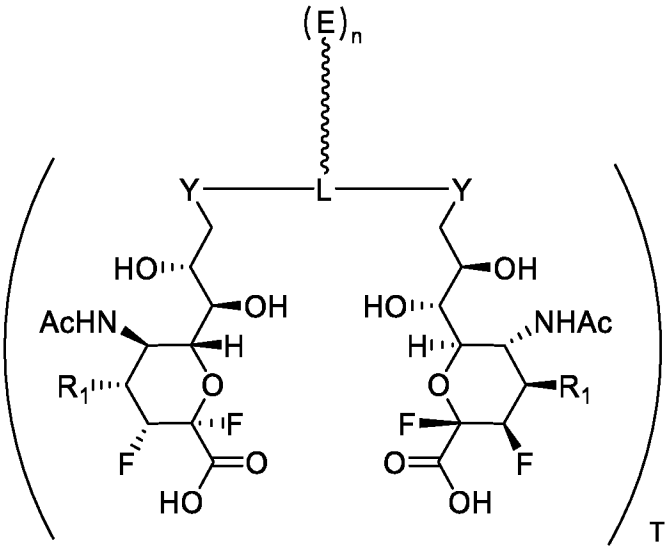
58. Конъюгат по варианту осуществления 2 или 3, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-VI):



(D-VI)

или его фармацевтически приемлемая соль.

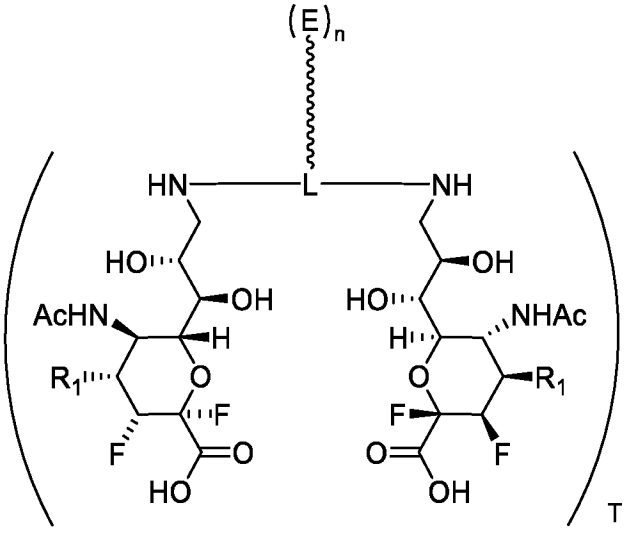
59. Конъюгат по варианту осуществления 58, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VI-1):



(D-VI-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

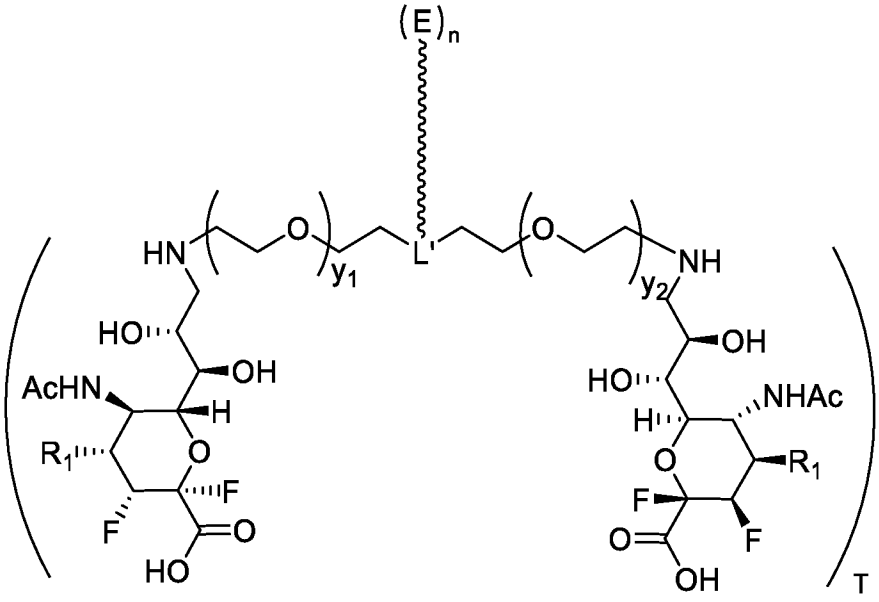
60. Конъюгат по варианту осуществления 59, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VI-2):



(D-VI-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

61. Конъюгат по варианту осуществления 60, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VI-3):



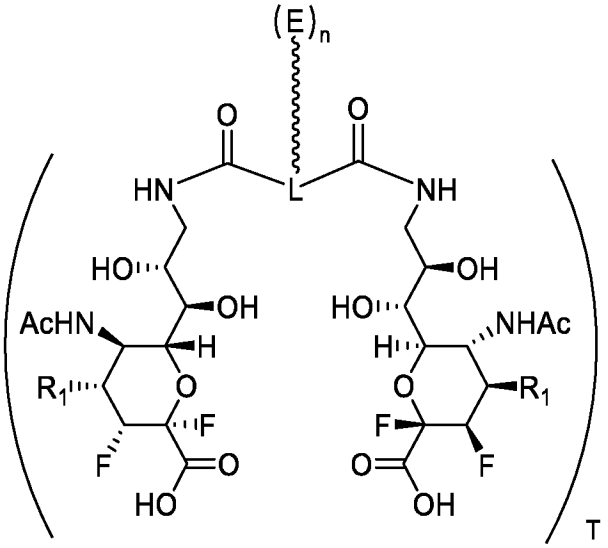
(D-VI-3)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

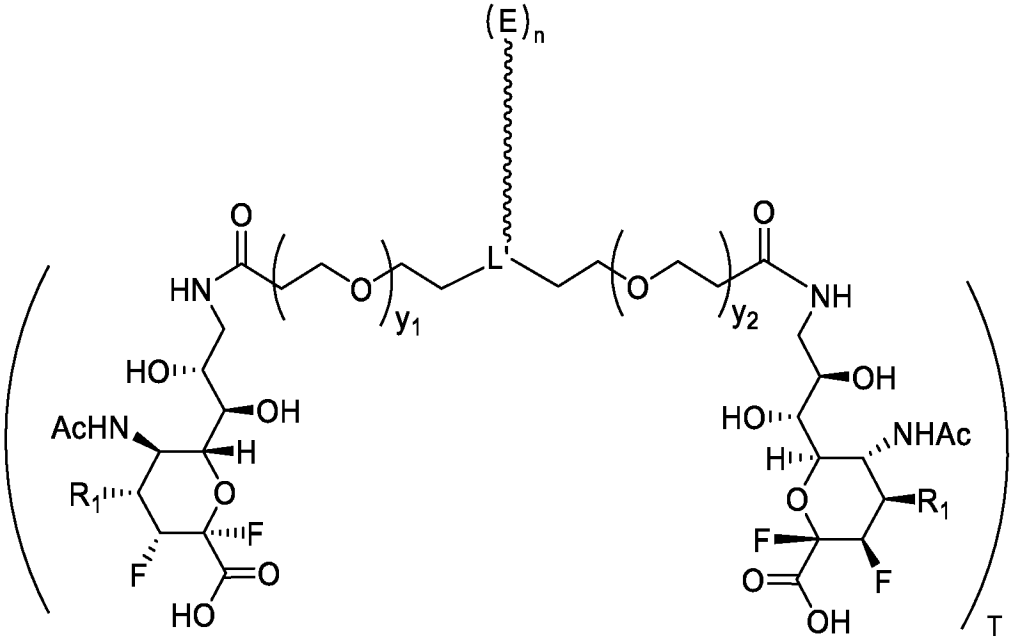
62. Конъюгат по варианту осуществления 59, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VI-4):



(D-VI-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

63. Конъюгат по варианту осуществления 62, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VI-5):



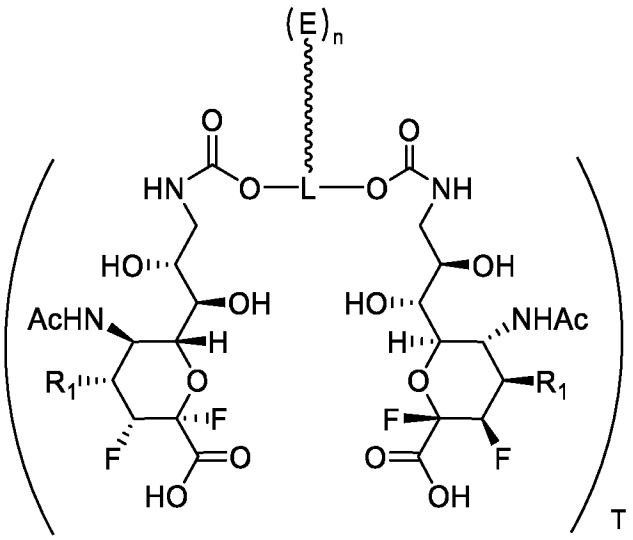
(D-VI-5)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

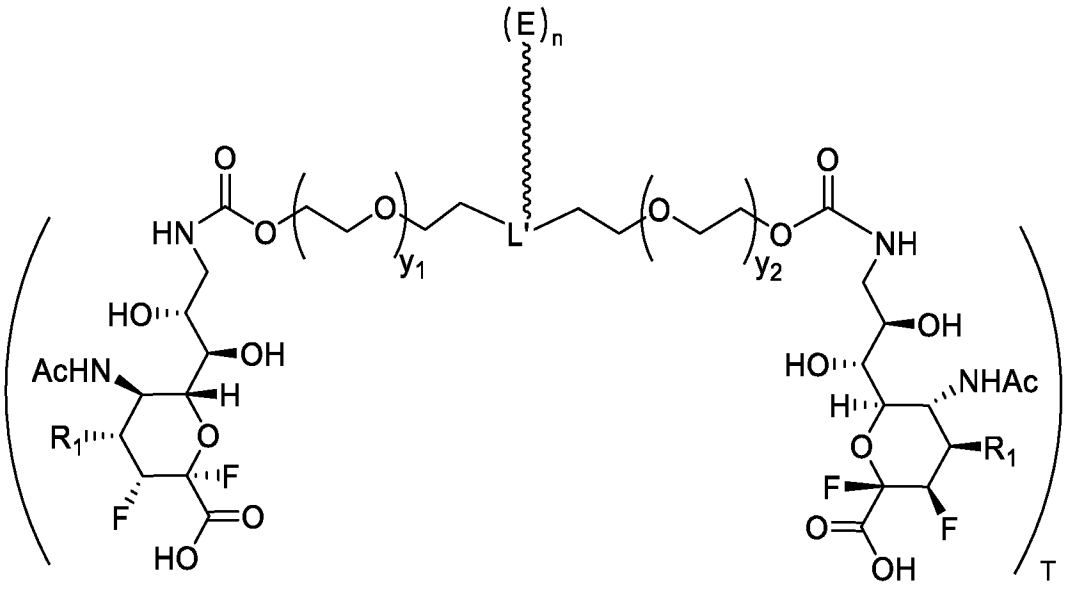
64. Конъюгат по варианту осуществления 59, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VI-6):



(D-VI-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

65. Конъюгат по варианту осуществления 64, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VI-7):



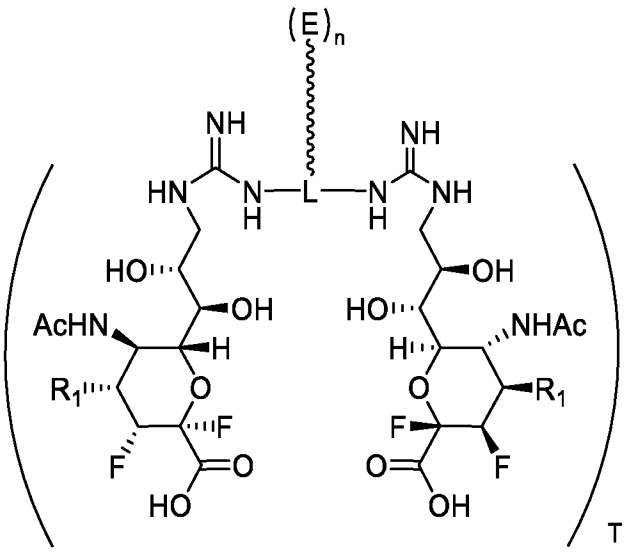
(D-VI-7)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

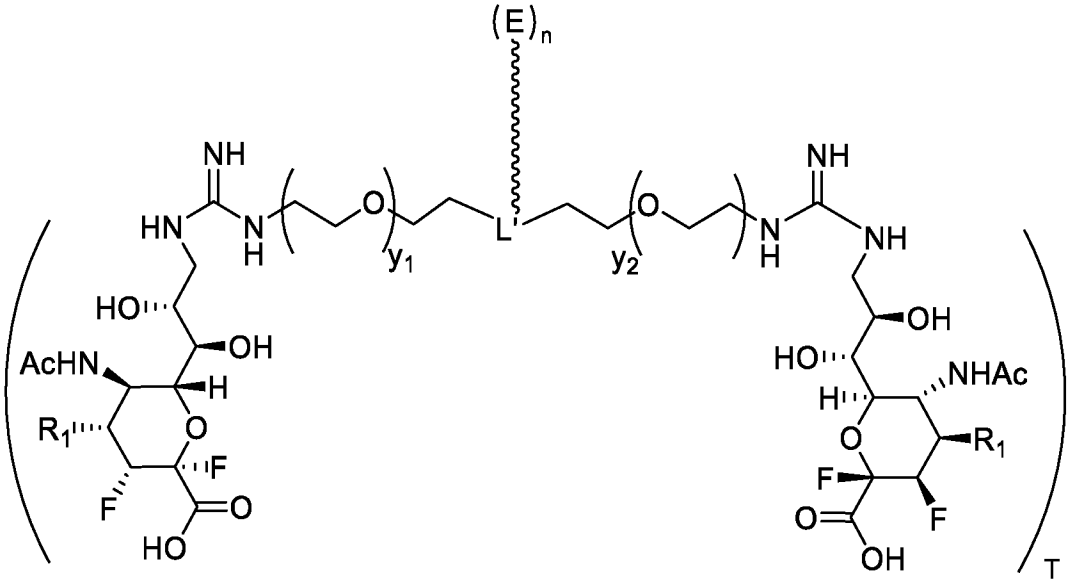
66. Конъюгат по варианту осуществления 59, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VI-8):



(D-VI-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

67. Конъюгат по варианту осуществления 66, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VI-9):



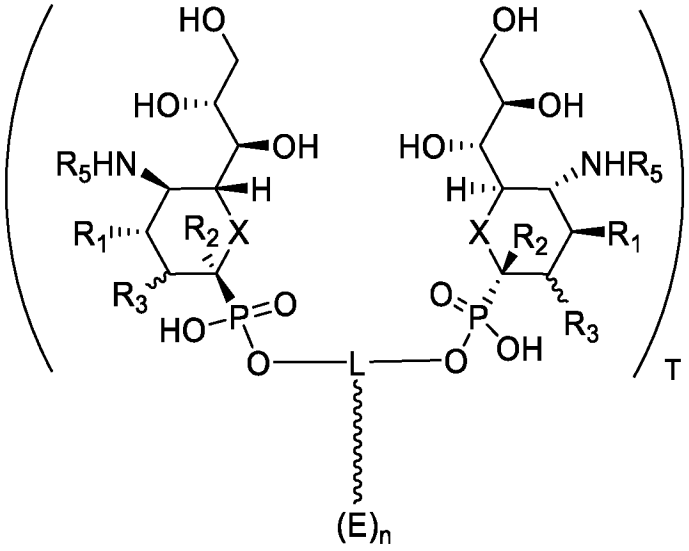
(D-VI-9)

где L' представляет собой остаток от L, и 3

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

68. Конъюгат по варианту осуществления 2 или 3, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-VII):



(D-VII)

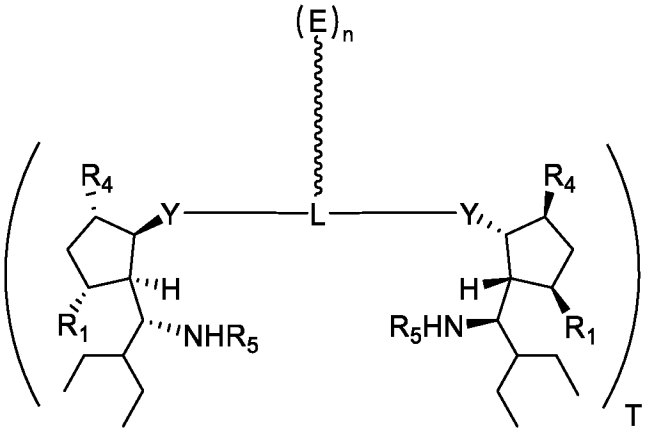
или его фармацевтически приемлемая соль.

69. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 39-68, отличающийся тем, что R_1 представляет собой -OH.

70. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 39-68, отличающийся тем, что R_1 представляет собой $-NH_2$.

71. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 39-68, где R_1 представляет собой $-NHC(=NH)NH_2$.

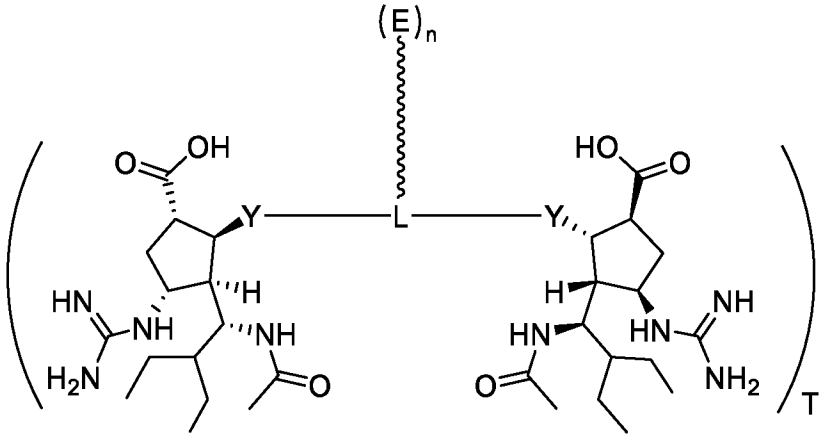
72. Конъюгат по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-VIII):



(D-VIII)

или его фармацевтически приемлемая соль.

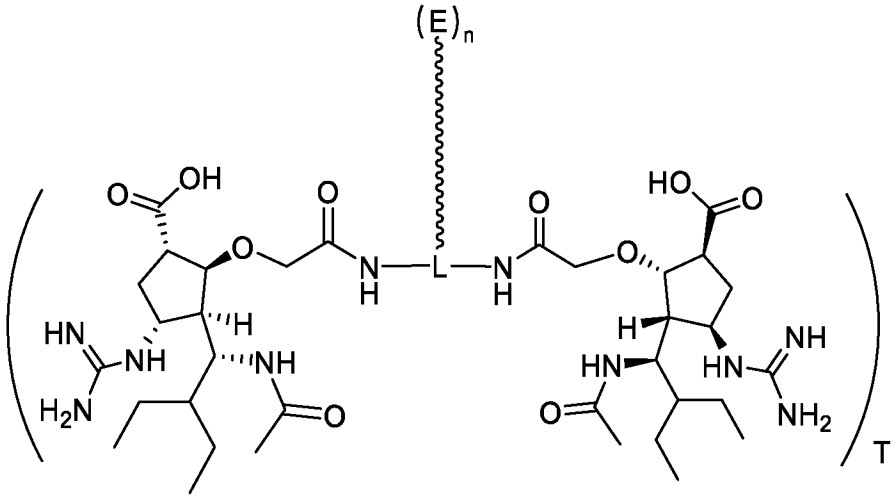
73. Конъюгат по варианту осуществления 72, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-1):



(D-VIII-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

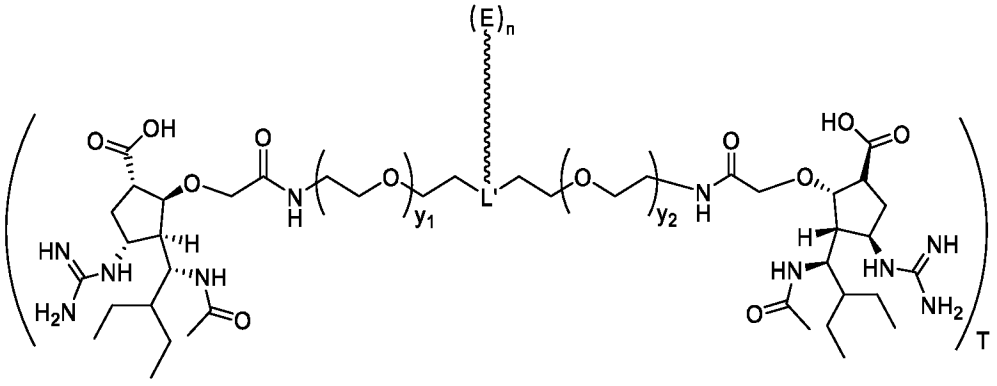
74. Конъюгат по варианту осуществления 73, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-2):



(D-VIII-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

75. Конъюгат по варианту осуществления 74, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-3):



(D-VIII-3)

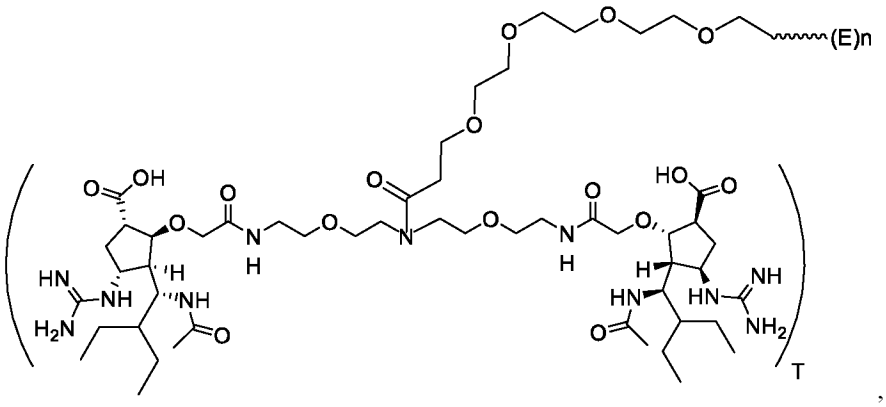
где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

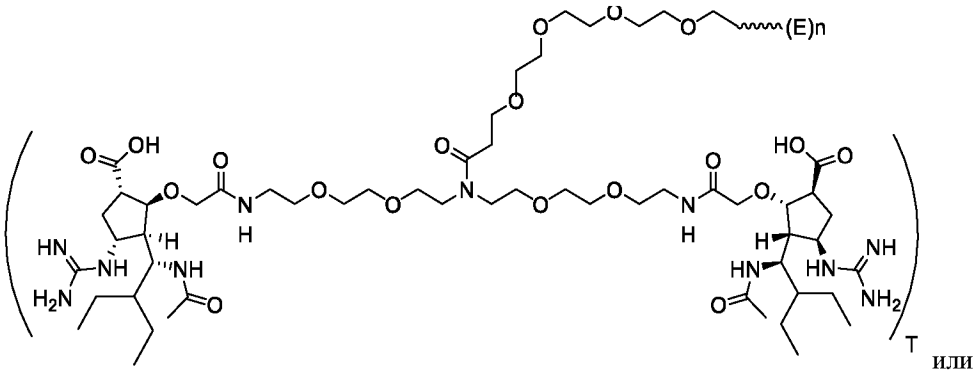
или его фармацевтически приемлемая соль.

76. Конъюгат по варианту осуществления 75, отличающийся тем, что L' представляет собой атом азота.

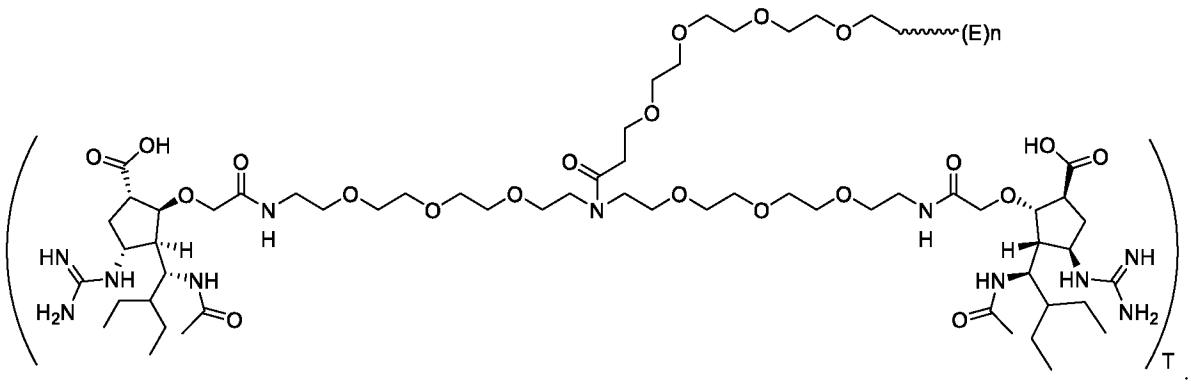
77. Конъюгат по варианту осуществления 75, отличающийся тем, что конъюгат имеет структуру, выбранную из



,

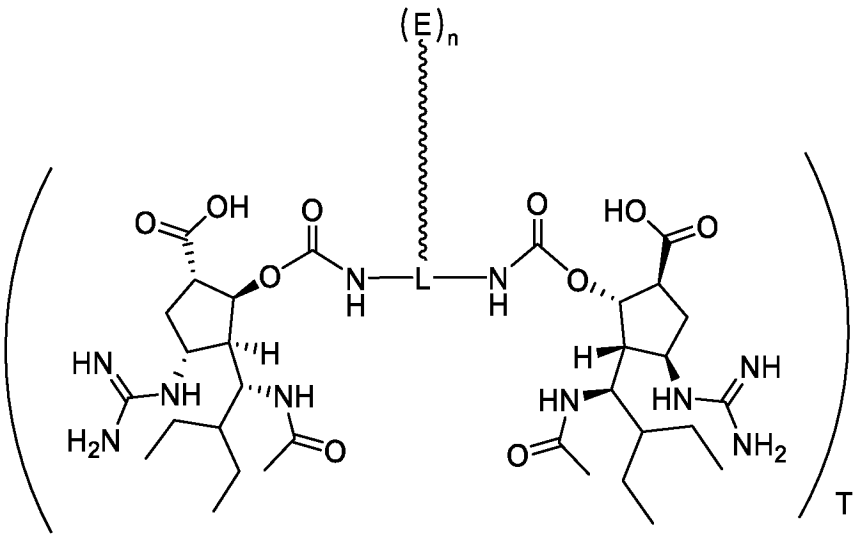


или



.

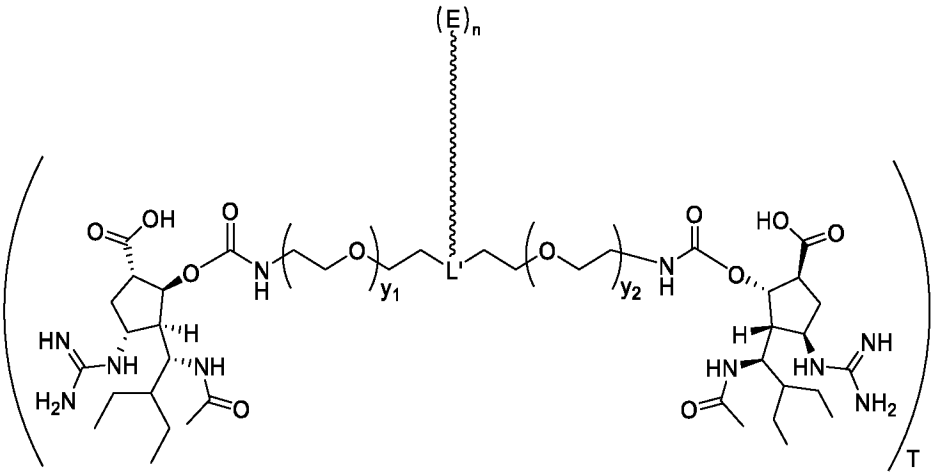
78. Конъюгат по варианту осуществления 73, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-4):



(D-VIII-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

79. Конъюгат по варианту осуществления 78, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-5):



(D-VIII-5)

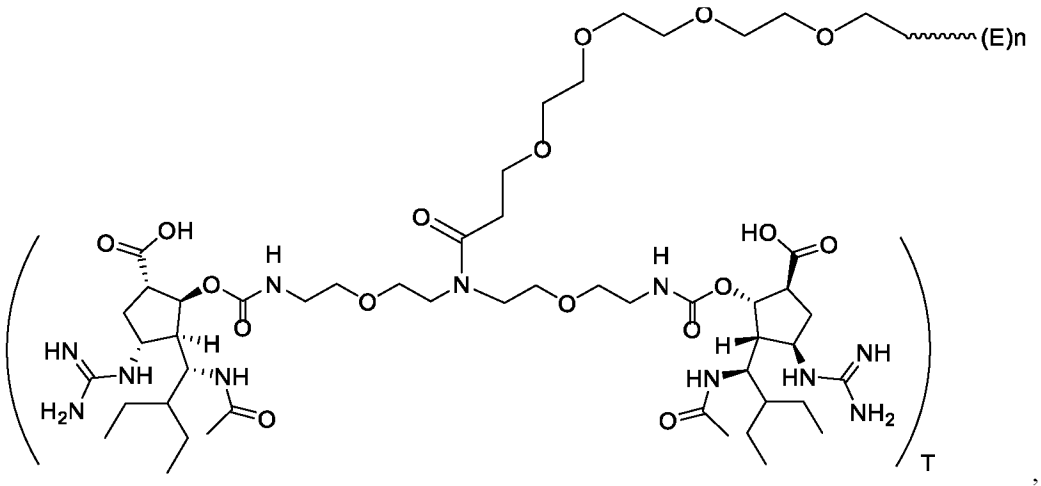
где L' представляет собой остаток от L, и

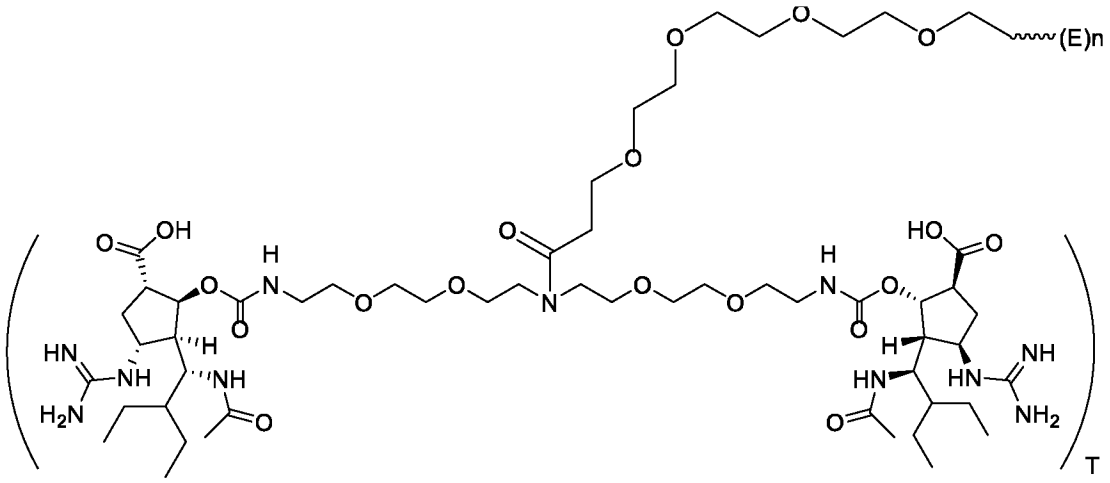
y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

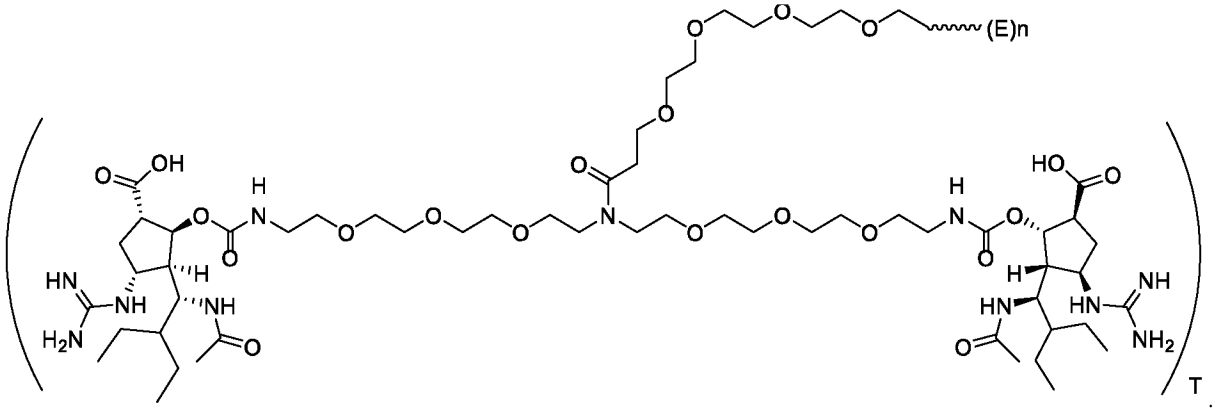
80. Конъюгат по варианту осуществления 79, отличающийся тем, что L' представляет собой атом азота.

81. Конъюгат по варианту осуществления 79, отличающийся тем, что конъюгат имеет структуру, выбранную из

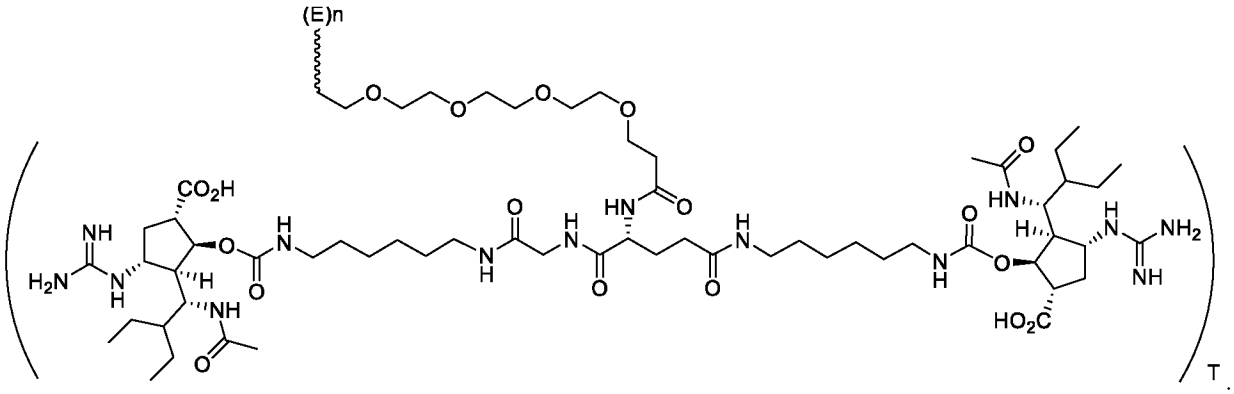




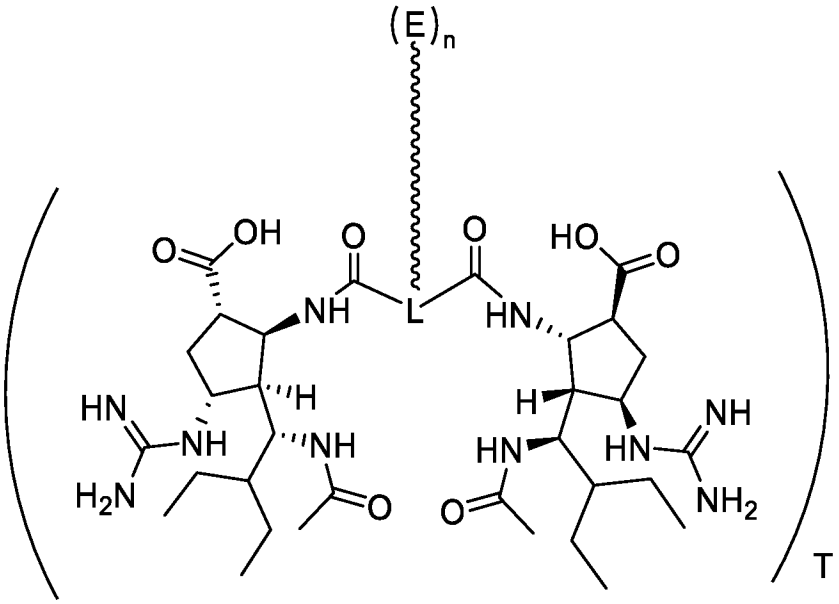
или



82. Конъюгат по варианту осуществления 78, отличающийся тем, что конъюгат описан структурой



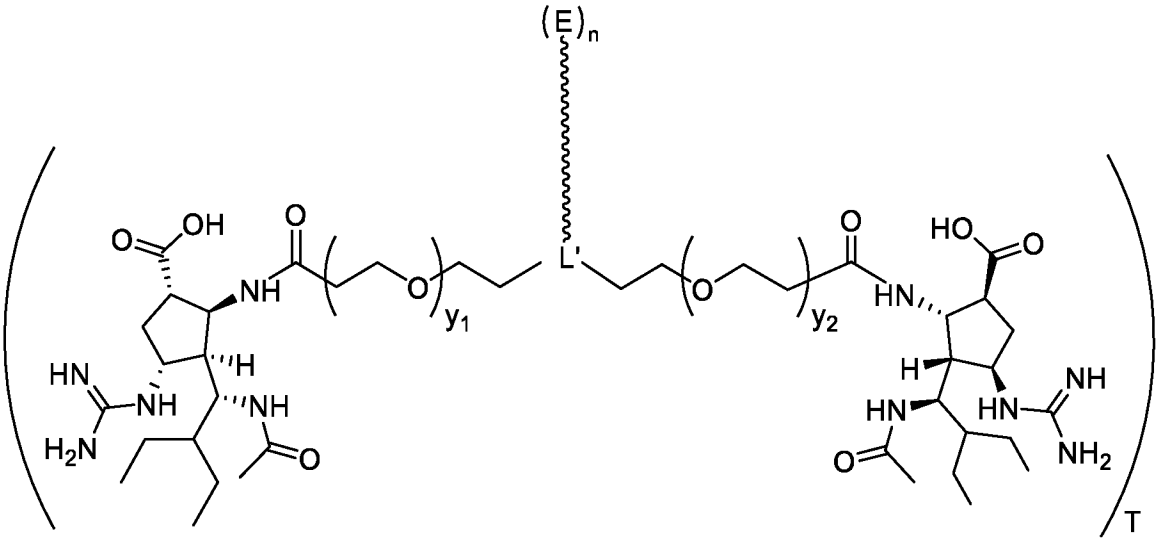
83. Конъюгат по варианту осуществления 73, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-6):



(D-VIII-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

84. Конъюгат по варианту осуществления 83, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-7):



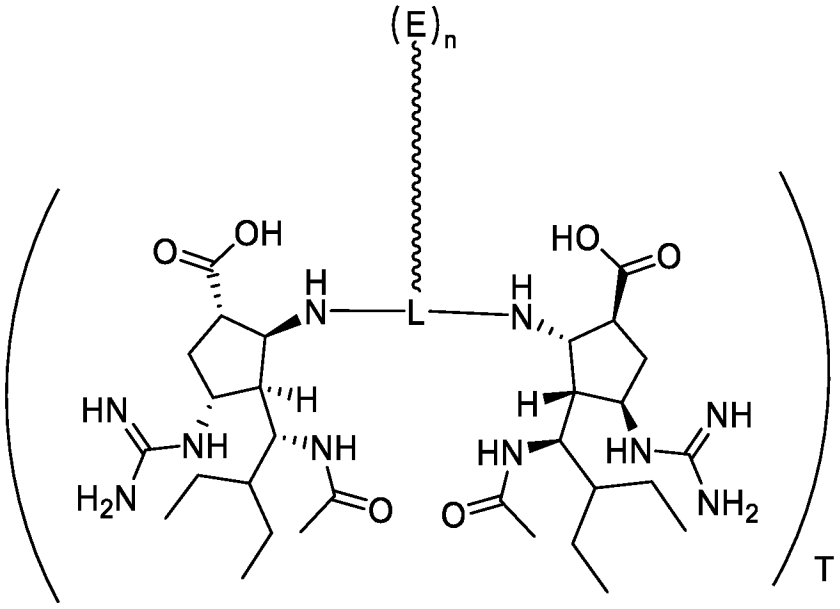
(D-VIII-7)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

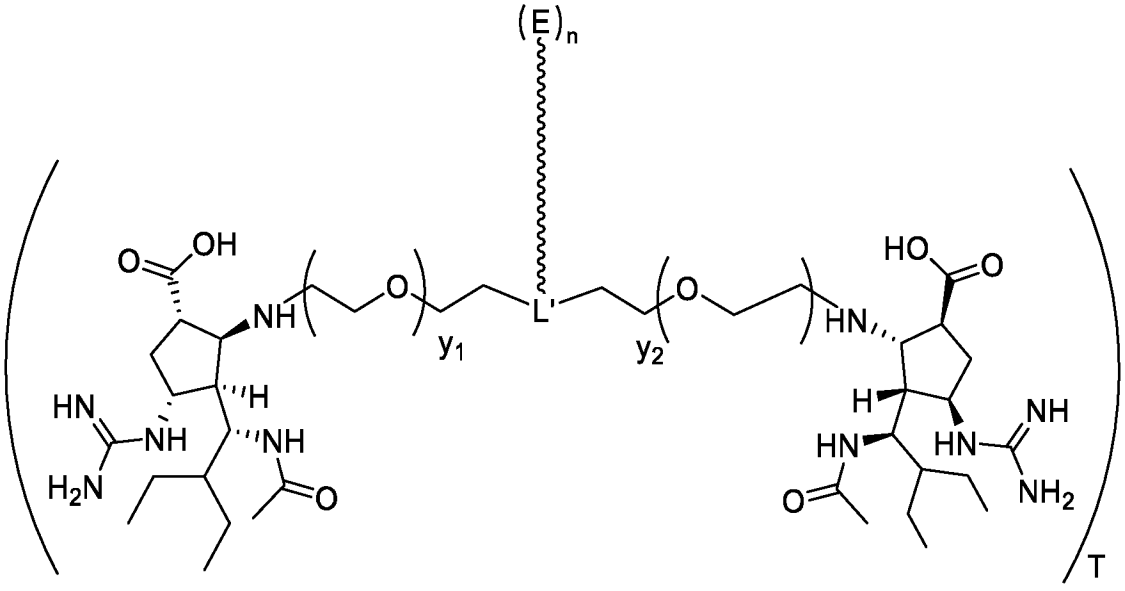
85. Конъюгат по варианту осуществления 73, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-8):



(D-VIII-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

86. Конъюгат по варианту осуществления 85, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-9):



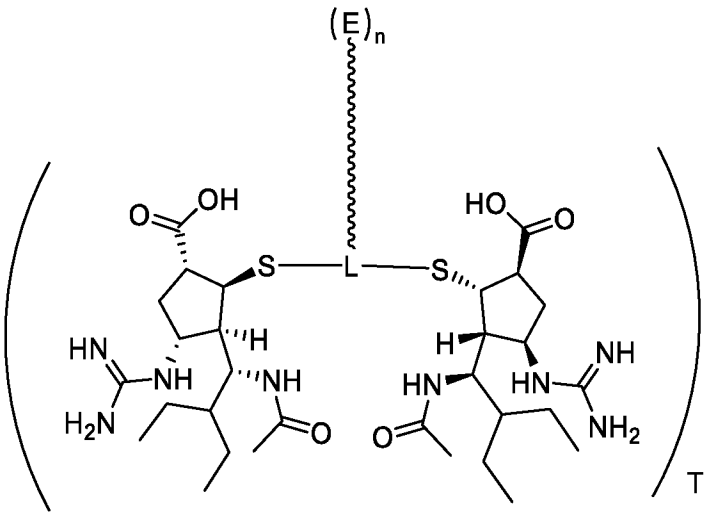
(D-VIII-9)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

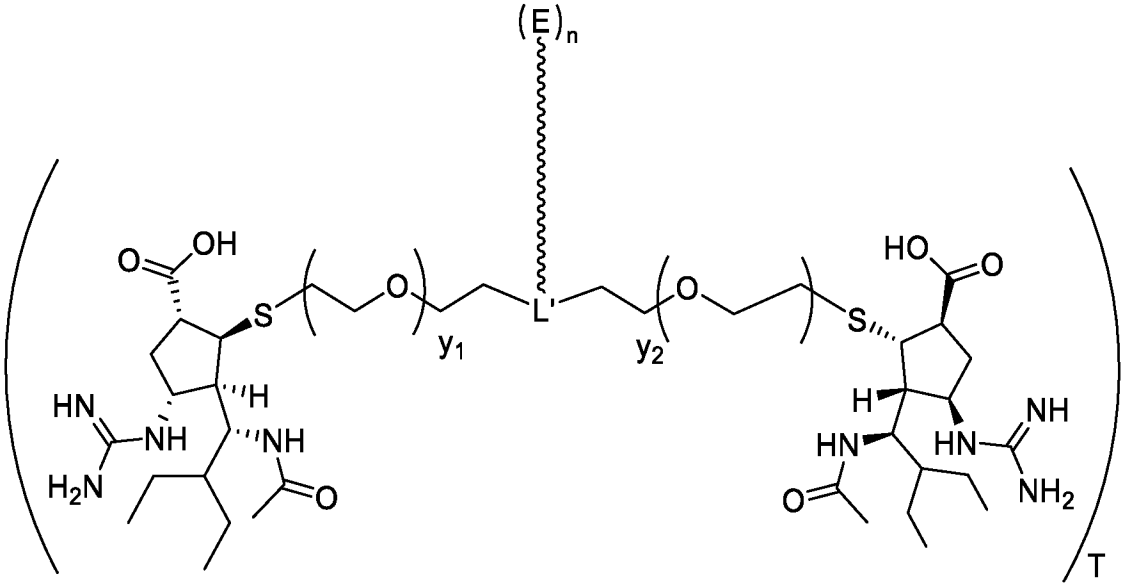
87. Конъюгат по варианту осуществления 72, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-10):



(D-VIII-10)

или его фармацевтически приемлемая соль.

88. Конъюгат по варианту осуществления 87, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-VIII-11):



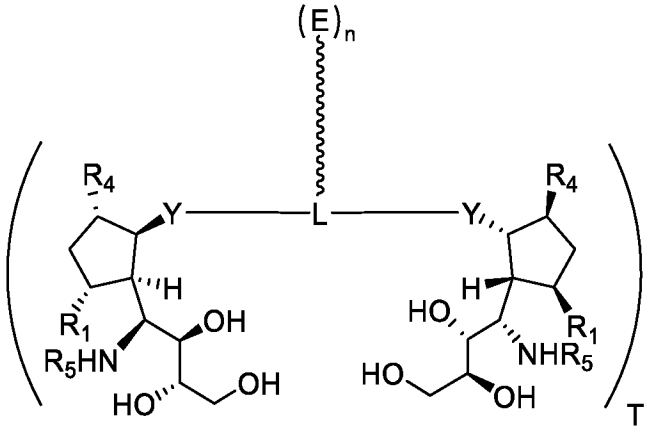
(D-VIII-11)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

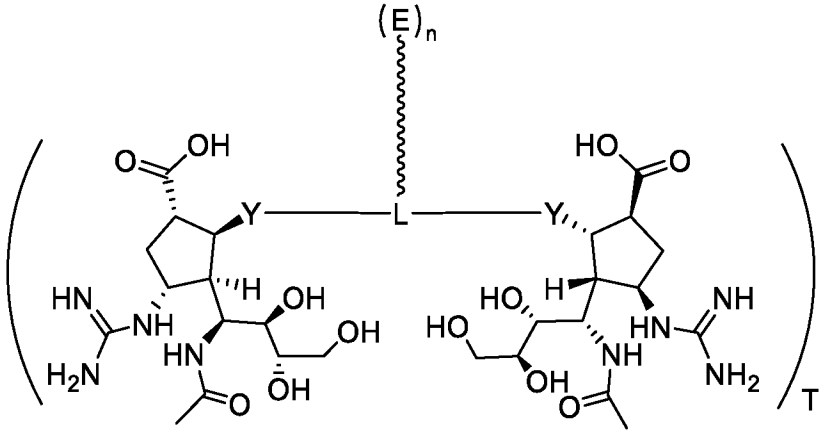
89. Конъюгат по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-IX):



(D-IX)

или его фармацевтически приемлемая соль.

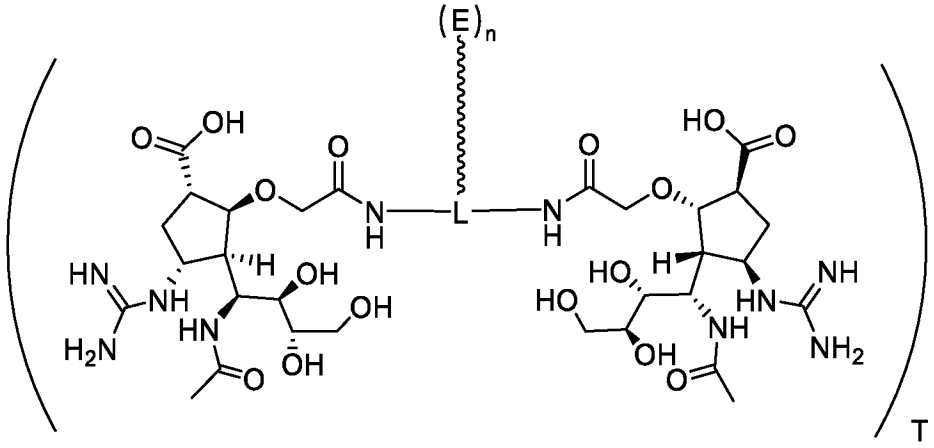
90. Конъюгат по варианту осуществления 89, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-IX-1):



(D-IX-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

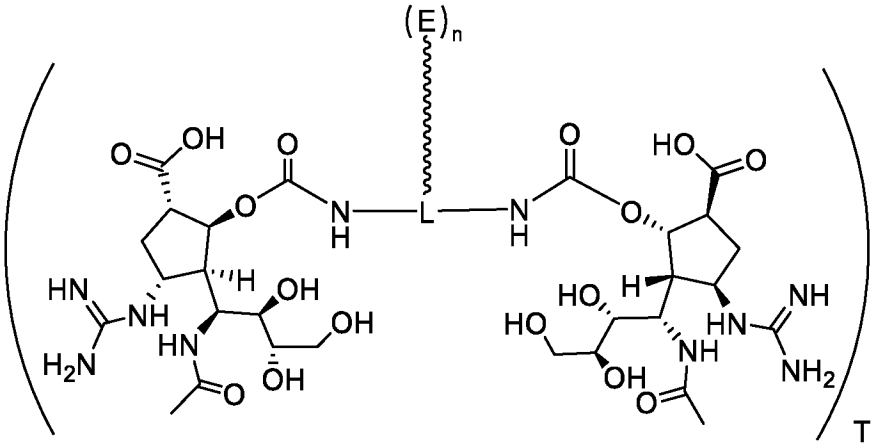
91. Конъюгат по варианту осуществления 90, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-IX-2):



(D-IX-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

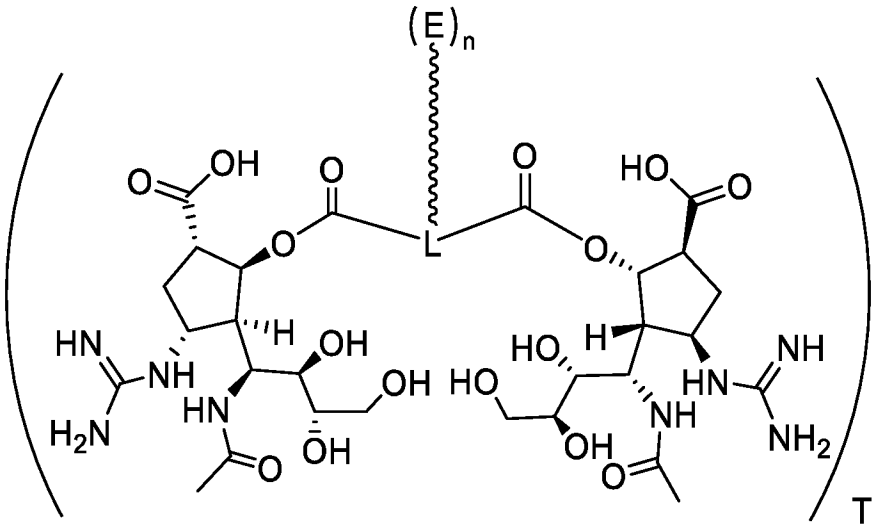
92. Конъюгат по варианту осуществления 90, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-IX-3):



(D-IX-3)

или его фармацевтически приемлемая соль.

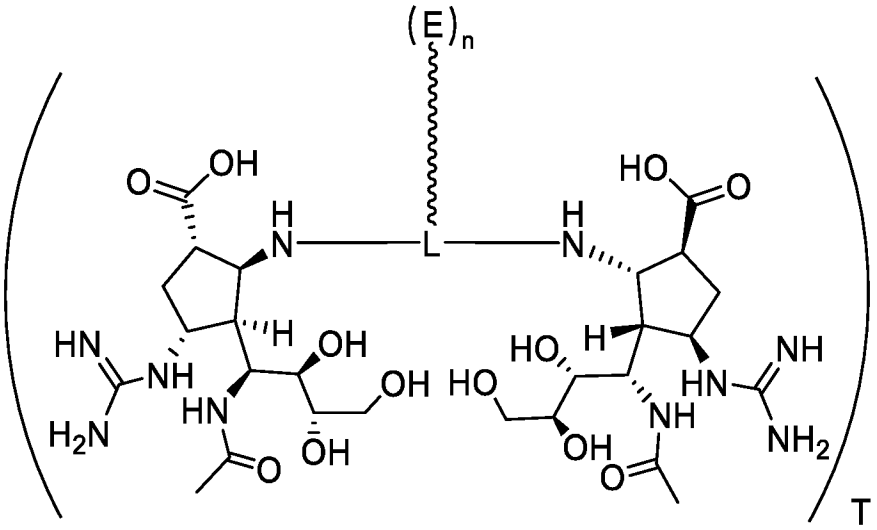
93. Конъюгат по варианту осуществления 90, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-IX-4):



(D-IX-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

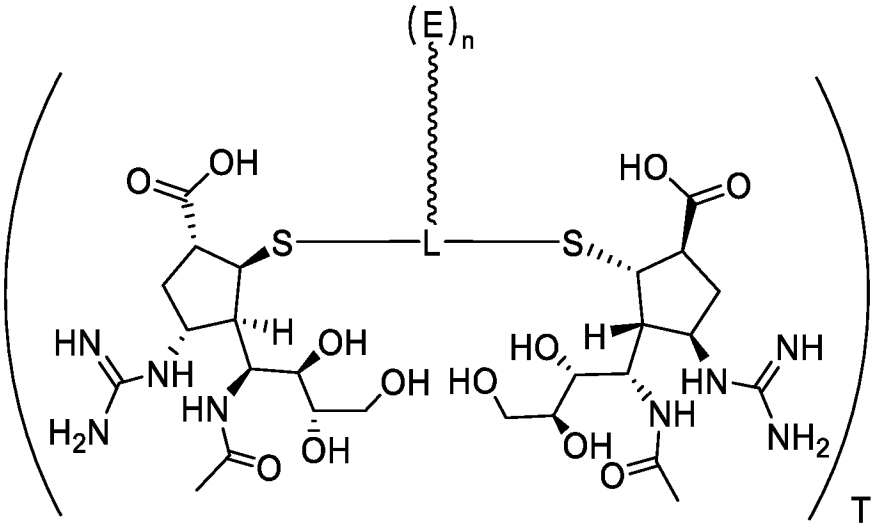
94. Конъюгат по варианту осуществления 90, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-IX-5):



(D-IX-5)

или его фармацевтически приемлемая соль.

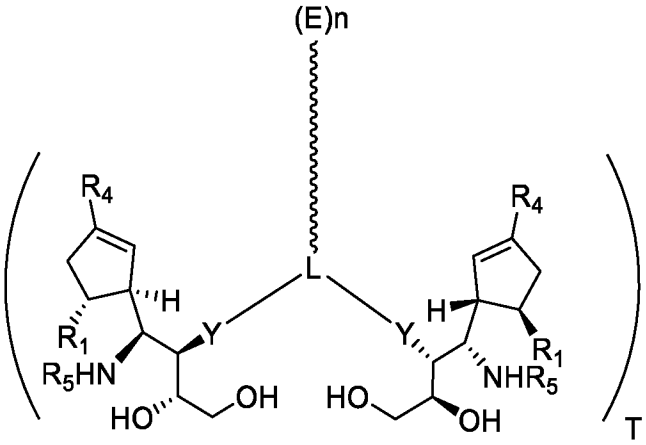
95. Конъюгат по варианту осуществления 90, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-IX-6):



(D-IX-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

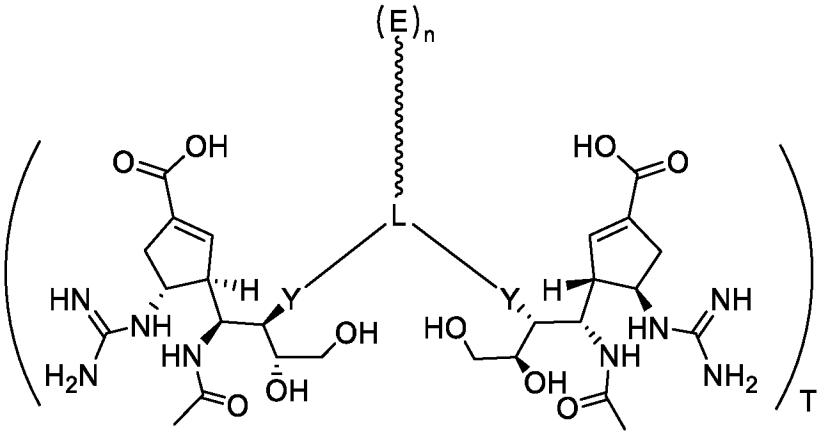
96. Конъюгат по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-X):



(D-X)

или его фармацевтически приемлемая соль.

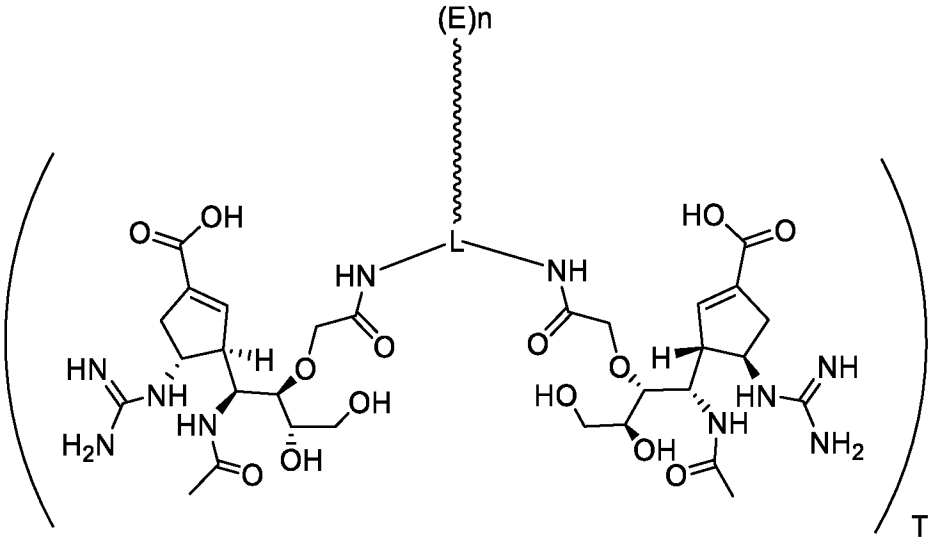
97. Конъюгат по варианту осуществления 96, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-X-1):



(D-X-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

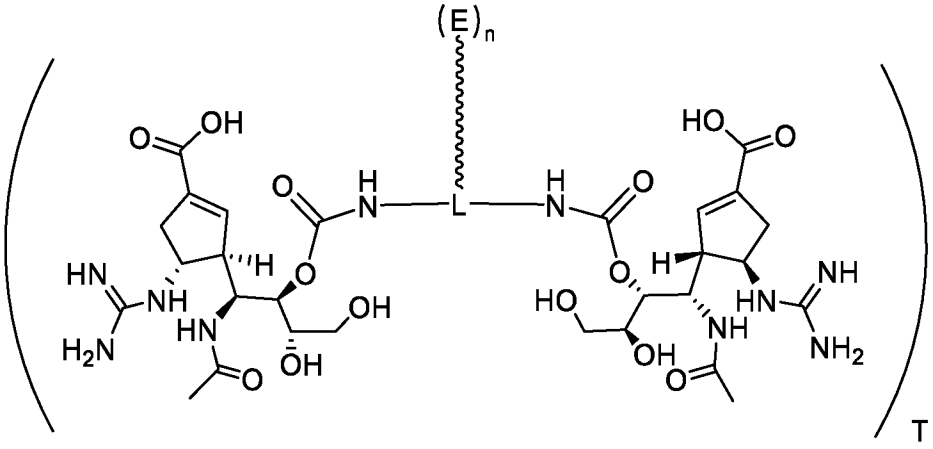
98. Конъюгат по варианту осуществления 97, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-X-2):



(D-X-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

99. Конъюгат по варианту осуществления 97, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-X-3):



(D-X-3)

или его фармацевтически приемлемая соль.

100. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-99, в котором L или L' содержит один или более необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен, необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен, O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино,

где R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил,

необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил.

101. Конъюгат по варианту осуществления 100, отличающийся тем, что остов L или L' состоит из одного или более необязательно замещенного C1-C20 алкилена, необязательно замещенного C1-C20 гетероалкилена, необязательно замещенного C2-C20 алкенилена, необязательно замещенного C2-C20 гетероалкенилена, необязательно замещенного C2-C20 алкинилена, необязательно замещенного C2-C20 гетероалкинилена, необязательно замещенного C3-C20 циклоалкилена, необязательно замещенного C3-C20 гетероциклоалкилена, необязательно замещенного C4-C20 циклоалкенилена, необязательно замещенного C4-C20 гетероциклоалкенилена, необязательно замещенного C8-C20 циклоалкинилена, необязательно замещенного C8-C20 гетероциклоалкилена, необязательно замещенного C5-C15 арилена, необязательно замещенного C2-C15 гетероарилена, O, S, NR^i, P, карбонила, тиокарбонила, сульфонила, фосфата, фосфорила или имино,
где R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил.

102. Конъюгат по варианту осуществления 100 или 101, отличающийся тем, что L или L' является оксозамещенным.

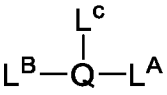
103. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-102, отличающийся тем, что остов L или L' содержит не более 250 атомов.

104. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-103, отличающийся тем, что L или L' способен образовывать амидную, карбаматную, сульфонильную или мочевинную связь.

105. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-99, отличающийся тем, что L или L' представляет собой связь.

106. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-99, отличающийся тем, что L или L' представляет собой атом.

107. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-106, отличающийся тем, что каждый L описан формулой (D-L-I):



(D-L-I)

где L^A описывается формулой G^{A1}-$(Z^{A1})_{g1}$-$(Y^{A1})_{h1}$-$(Z^{A2})_{i1}$-$(Y^{A2})_{j1}$-$(Z^{A3})_{k1}$-$(Y^{A3})_{l1}$-$(Z^{A4})_{m1}$-$(Y^{A4})_{n1}$-$(Z^{A5})_{o1}$-G^{A2};

L^B описан формулой G^{B1}-$(Z^{B1})_{g2}$-$(Y^{B1})_{h2}$-$(Z^{B2})_{i2}$-$(Y^{B2})_{j2}$-$(Z^{B3})_{k2}$-$(Y^{B3})_{l2}$-$(Z^{B4})_{m2}$-$(Y^{B4})_{n2}$-$(Z^{B5})_{o2}$-G^{B2};

L^C описан формулой G^{C1}-$(Z^{C1})_{g3}$-$(Y^{C1})_{h3}$-$(Z^{C2})_{i3}$-$(Y^{C2})_{j3}$-$(Z^{C3})_{k3}$-$(Y^{C3})_{l3}$-$(Z^{C4})_{m3}$-$(Y^{C4})_{n3}$-$(Z^{C5})_{o3}$-G^{C2};

G^{A1} представляет собой связь, присоединенную к Q;

G^{A2} представляет собой связь, присоединенную к A1;

G^{B1} представляет собой связь, присоединенную к Q;

G^{B2} представляет собой связь, присоединенную к A2;

G^{C1} представляет собой связь, присоединенную к Q;

G^{C2} представляет собой связь, присоединенную к E, или функциональную группу, способную вступать в реакцию с функциональной группой, конъюгированной с E (например, малеимид и цистеин, амин и активированная карбоновая кислота, тиол и малеимид, активированная сульфоновая кислота и амин, изоцианат и амин, азид и алкин и алкен и тетразин);

каждый из Z^{A1}, Z^{A2}, Z^{A3}, Z^{A4}, Z^{A5}, Z^{B1}, Z^{B2}, Z^{B3}, Z^{B4}, Z^{B5}, Z^{C1}, Z^{C2}, Z^{C3}, Z^{C4} и Z^{C5} независимо представляет собой необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен или необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен;

каждый из Y^{A1}, Y^{A2}, Y^{A3}, Y^{A4}, Y^{B1}, Y^{B2}, Y^{B3}, Y^{B4}, Y^{C1}, Y^{C2}, Y^{C3} и Y^{C4} независимо представляет собой O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино;

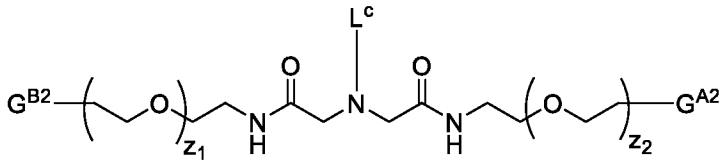
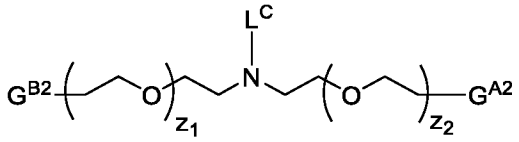
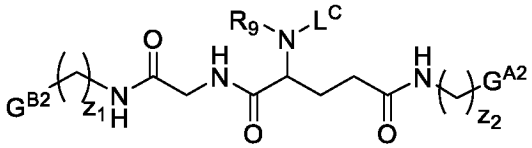
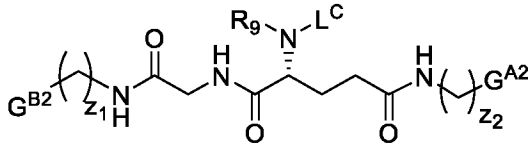
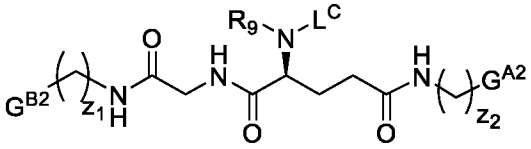
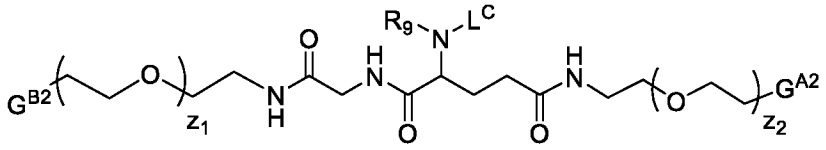
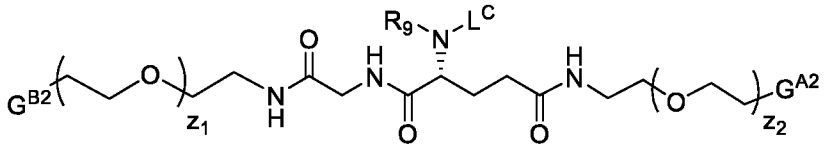
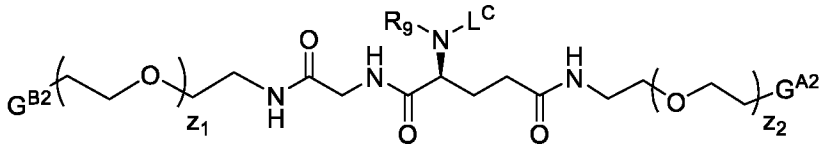
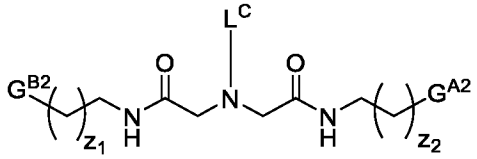
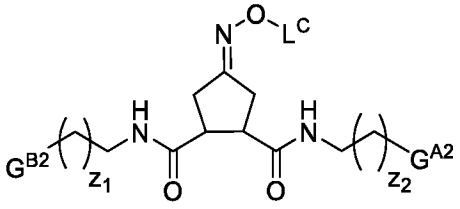
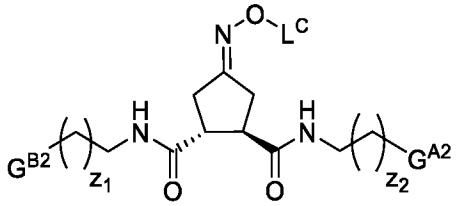
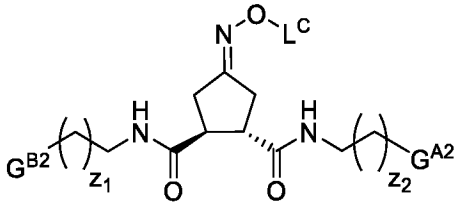
R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил;

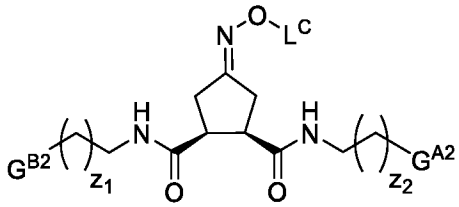
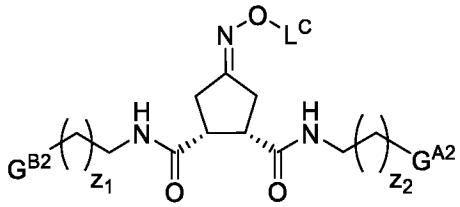
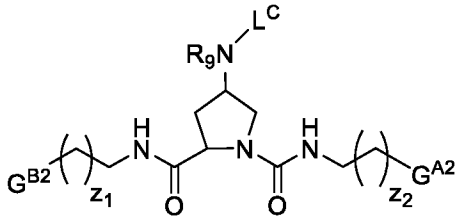
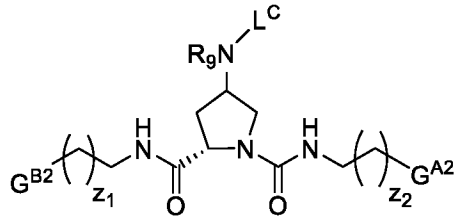
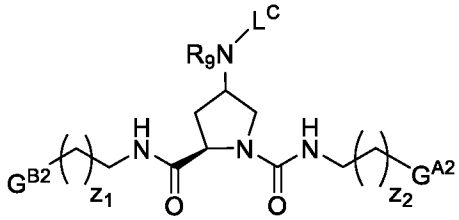
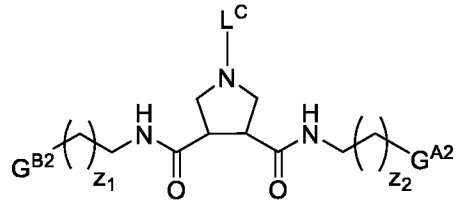
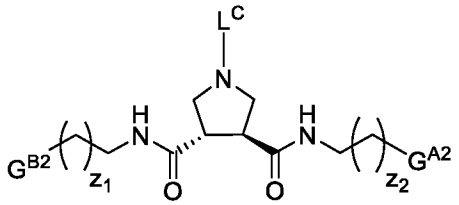
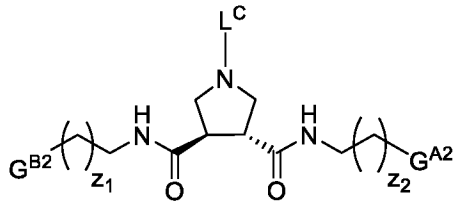
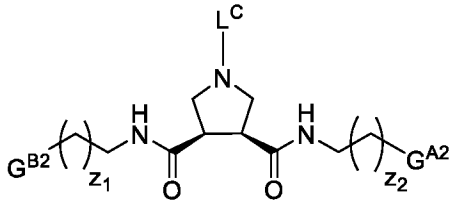
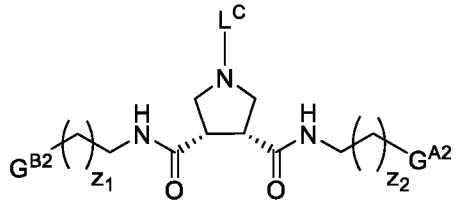
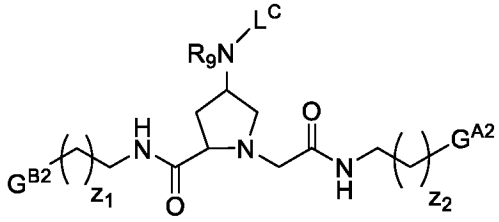
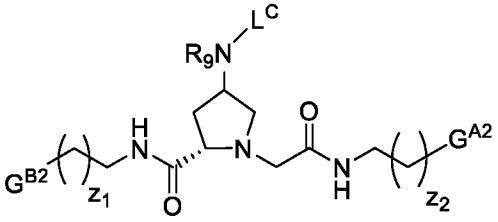
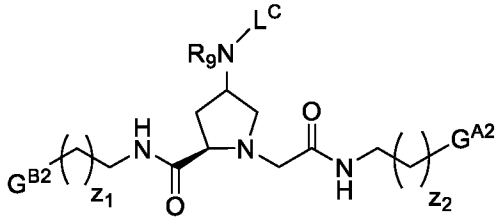
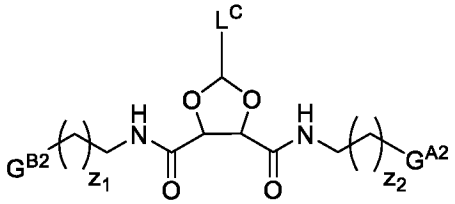
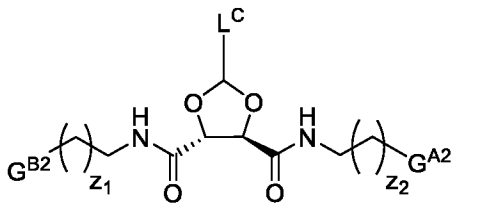
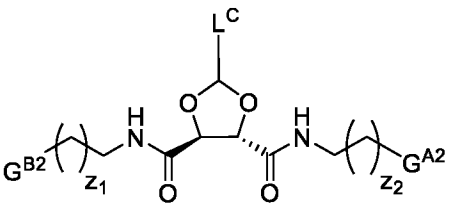
каждое из g1, h1, i1, j1, k1, l1, m1, n1, o1, g2, h2, i2, j2, k2, l2, m2, n2, o2, g3, h3, i3, j3, k3, l3, m3, n3 и o3 независимо равно 0 или 1;

Q представляет собой атом азота, необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен,

необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен или необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен.

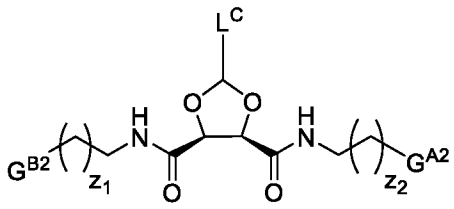
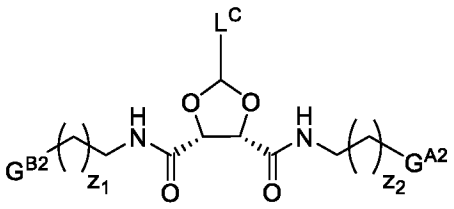
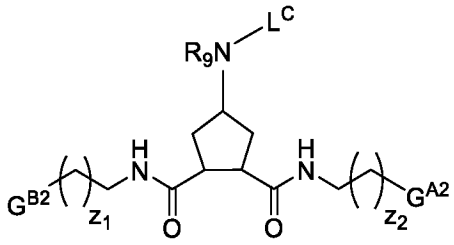
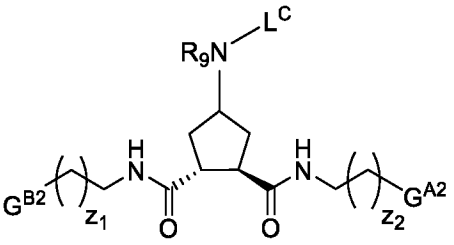
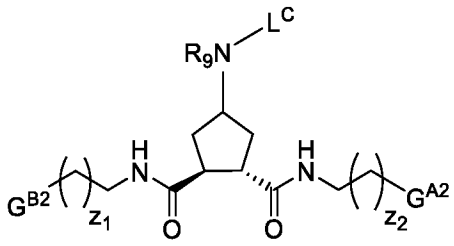
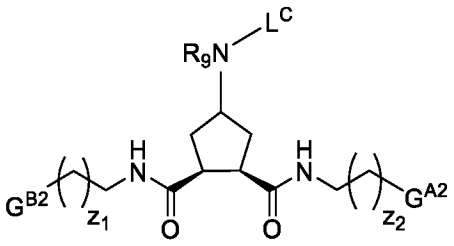
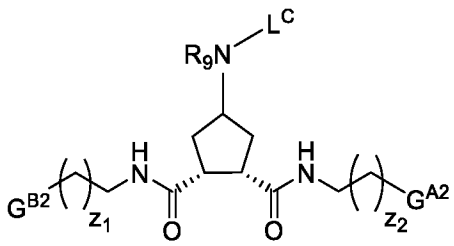
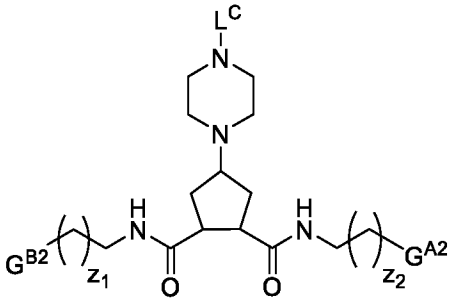
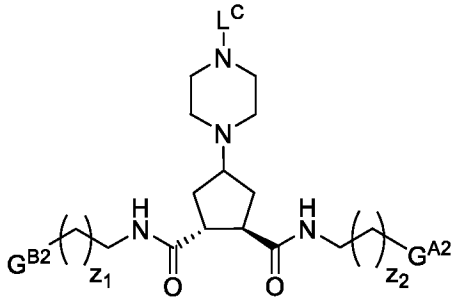
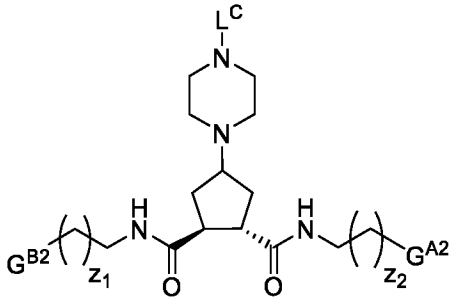
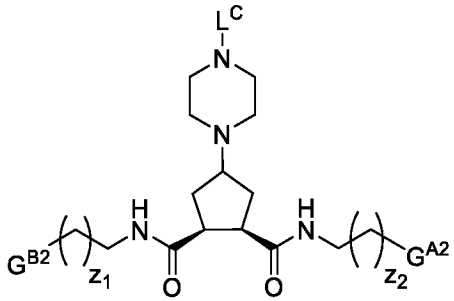
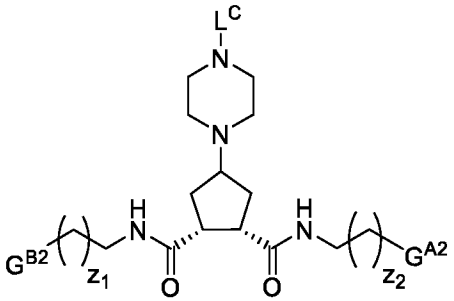
108. Конъюгат по варианту осуществления 107, отличающийся тем, что L выбран из

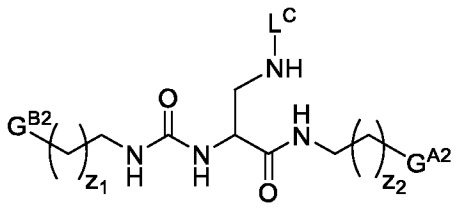
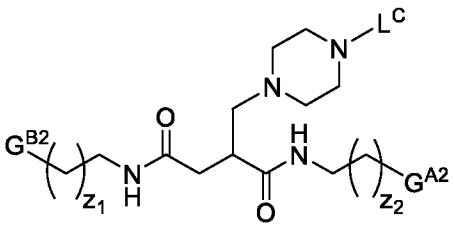
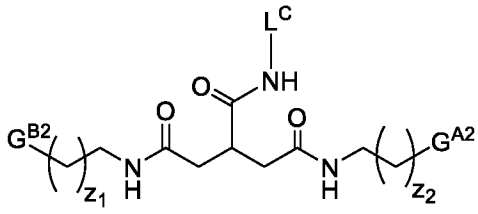
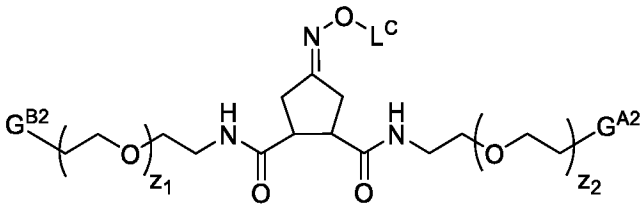
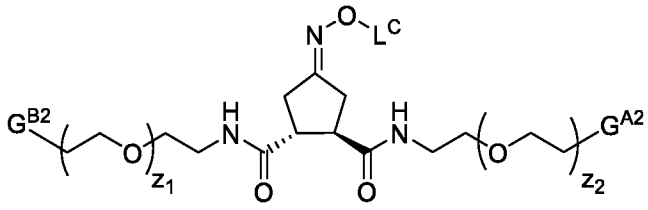
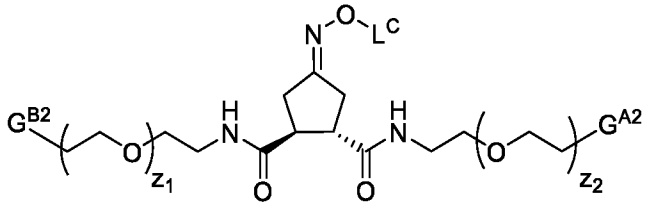
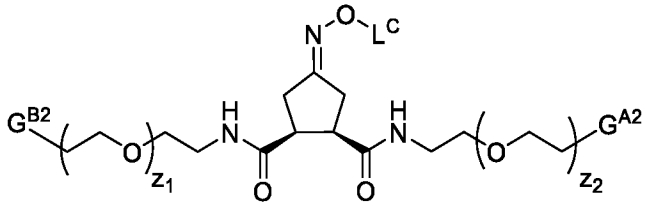
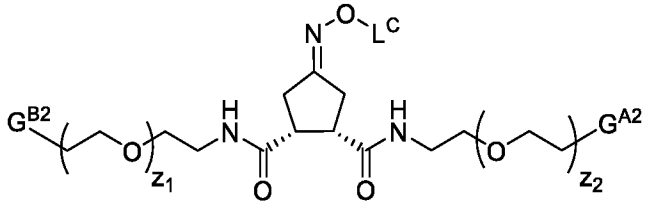
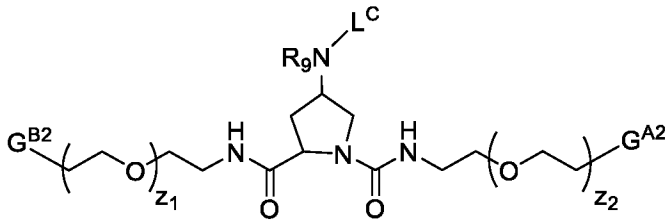
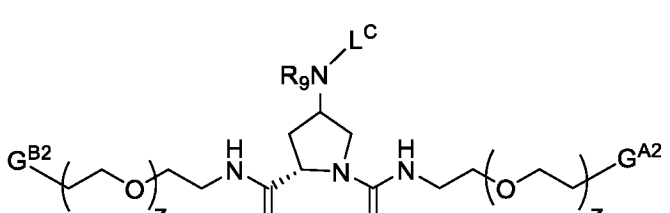

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

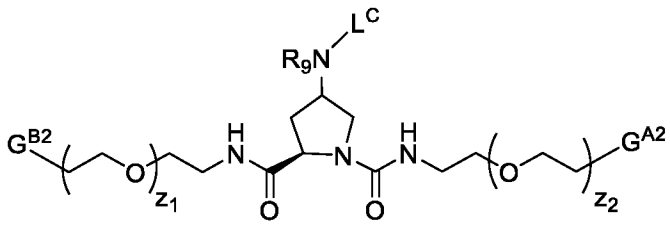

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

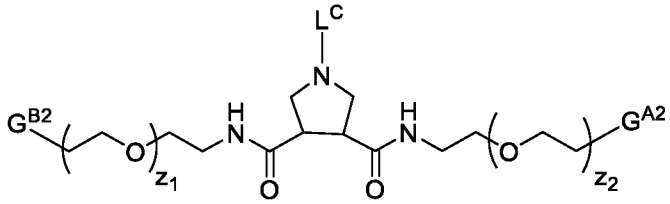
,

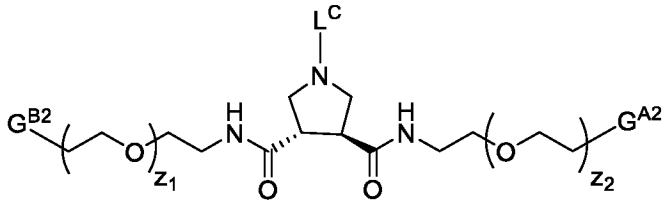
,

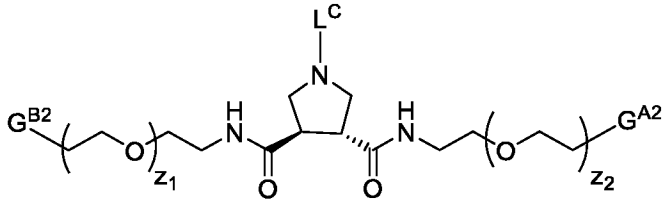

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

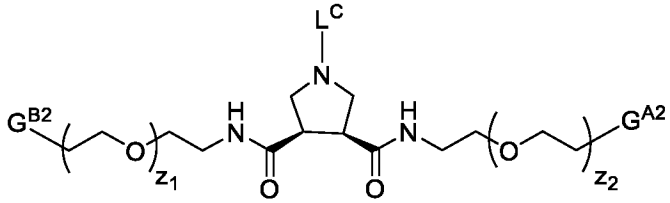

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

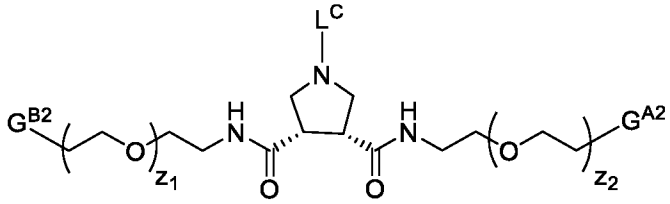

,

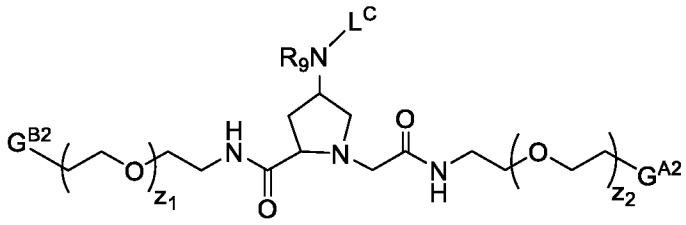

,

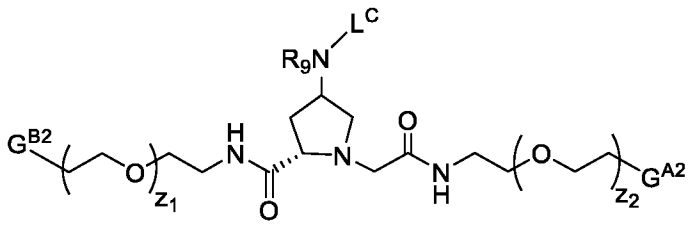
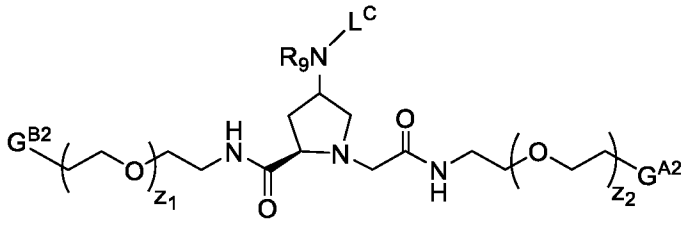
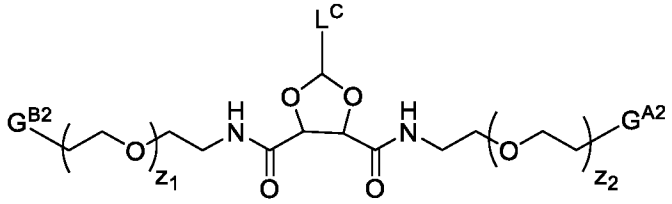
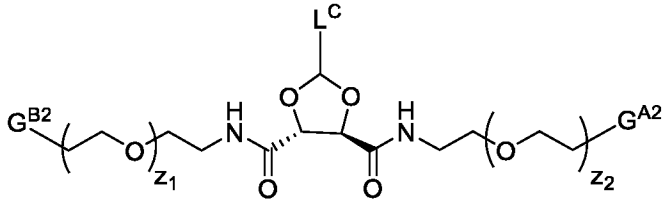
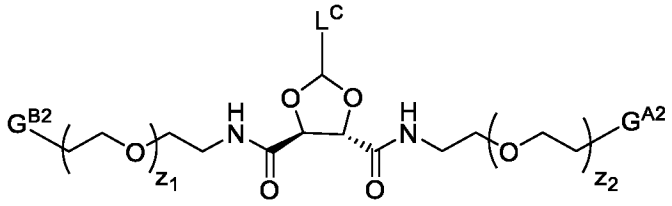
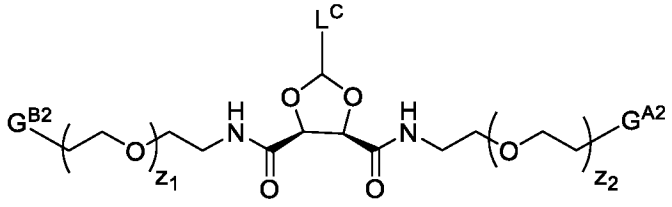
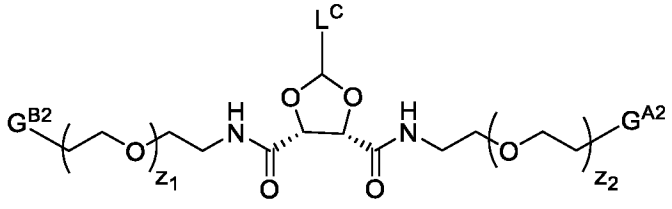
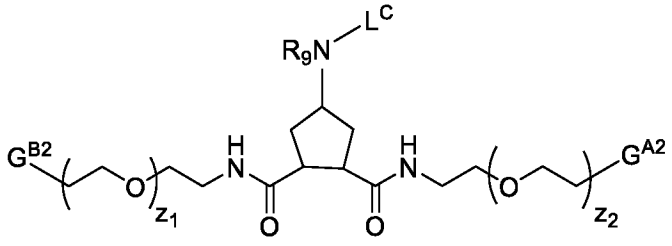

,

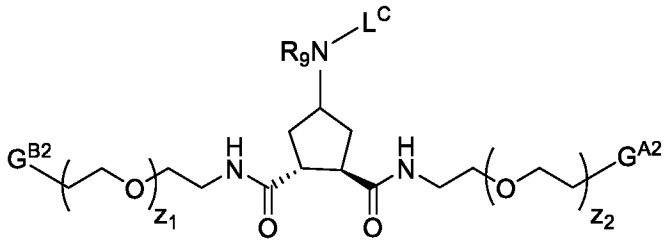

,

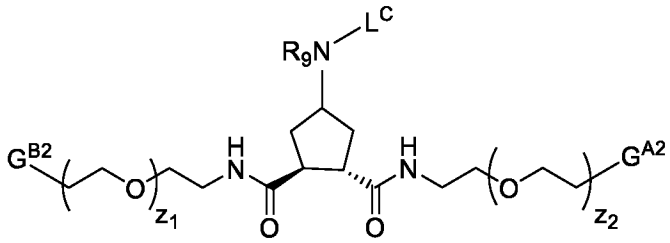

,

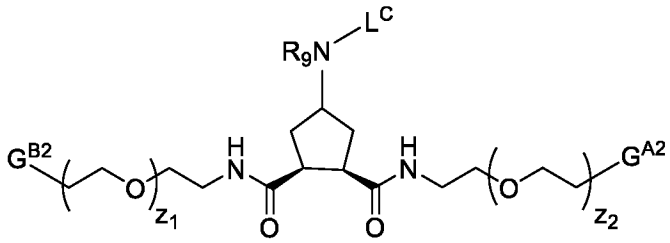

,

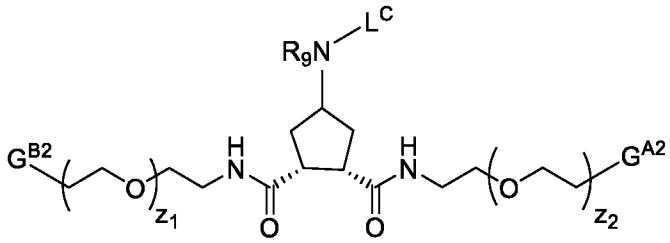

,

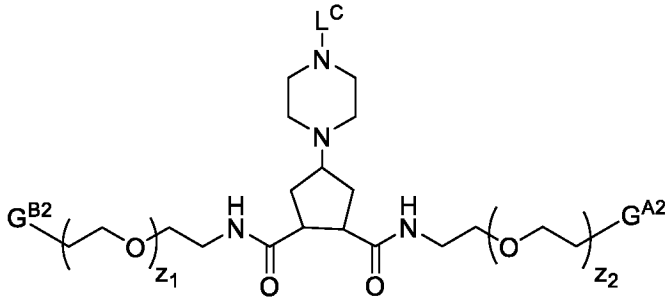

,

,

,

,

,

,

,

,

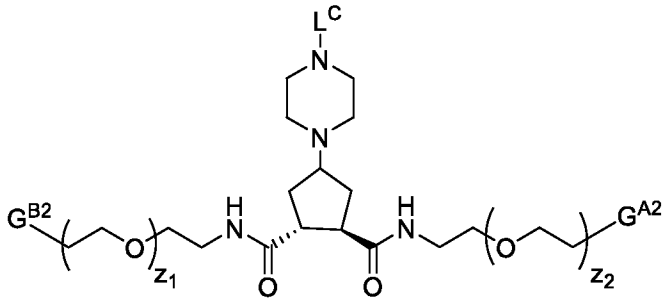

,

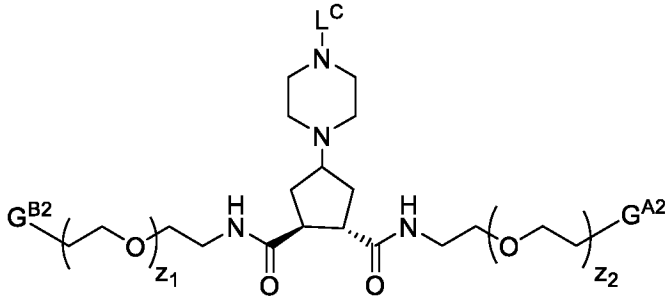

,

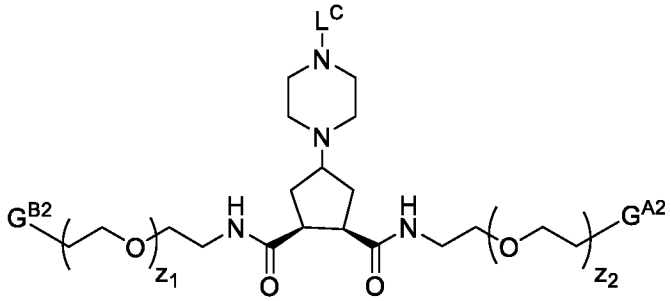

,

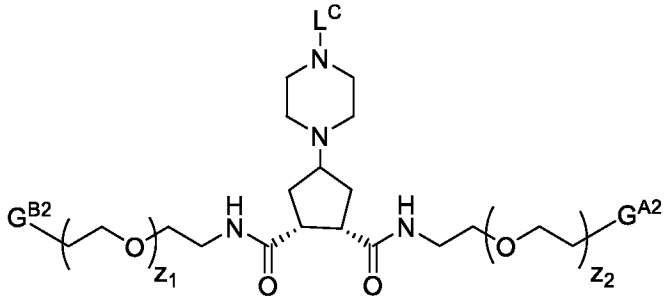

,

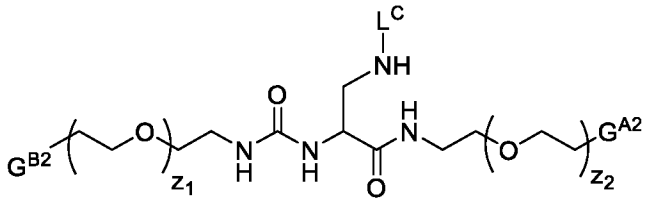

,

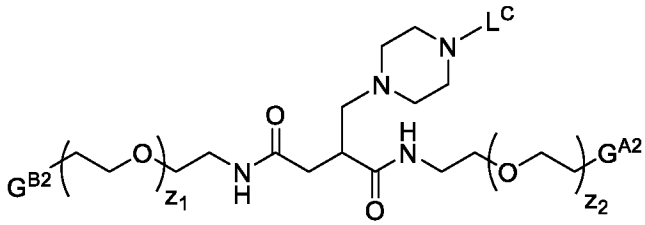

,

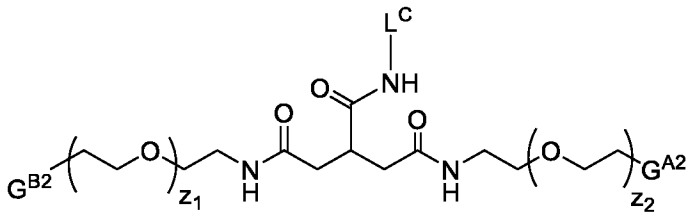

,

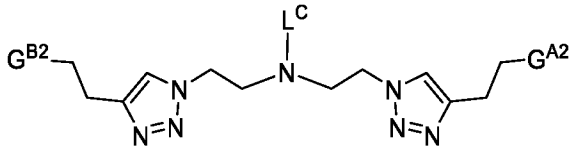

,

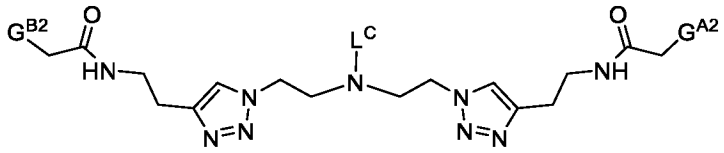

,


,

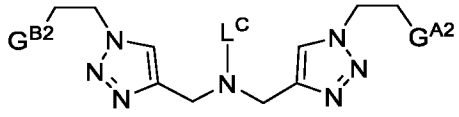

,


,

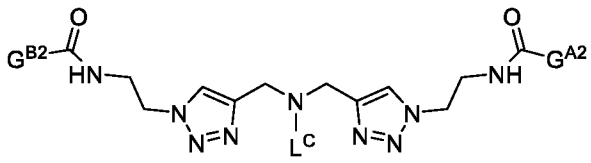

,



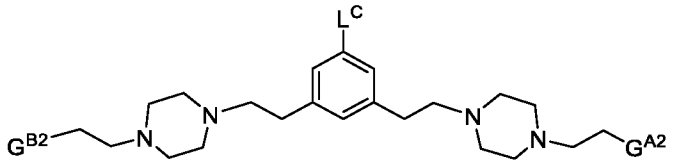
,



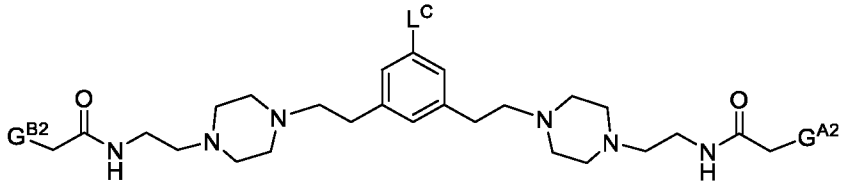
,



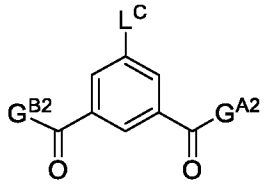
,



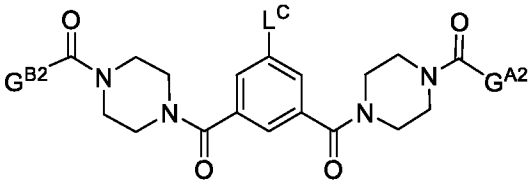
,



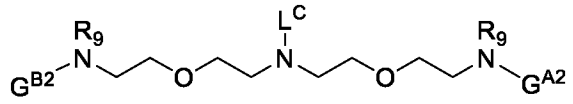
,



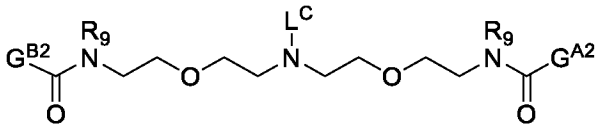
,



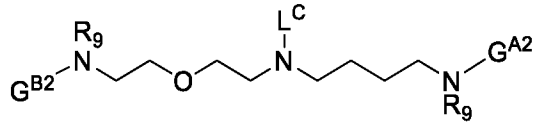
,



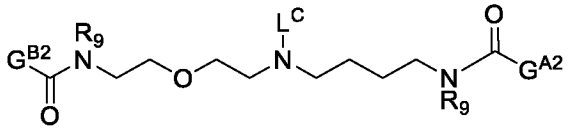
,



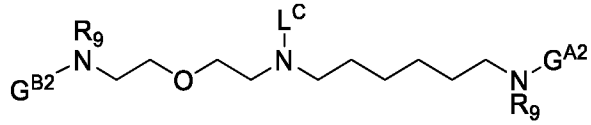
;



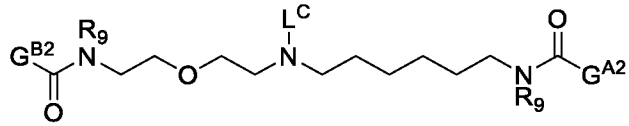
;



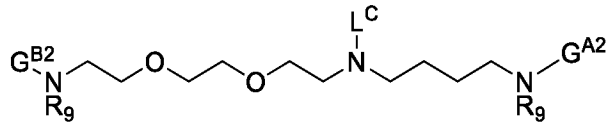
;



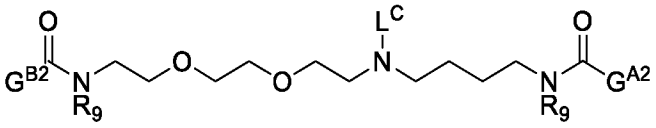
;

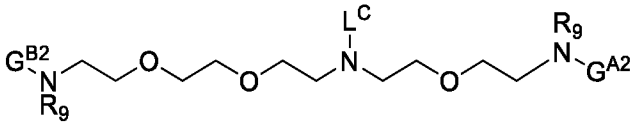


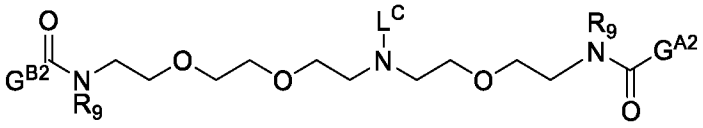
;

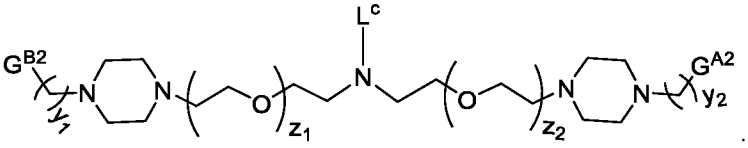


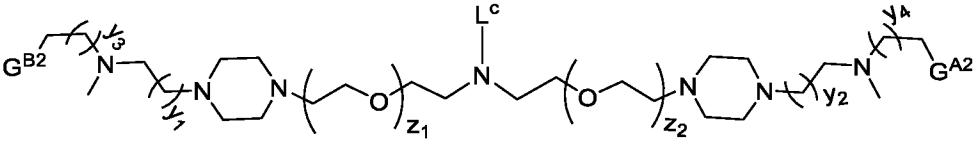
;

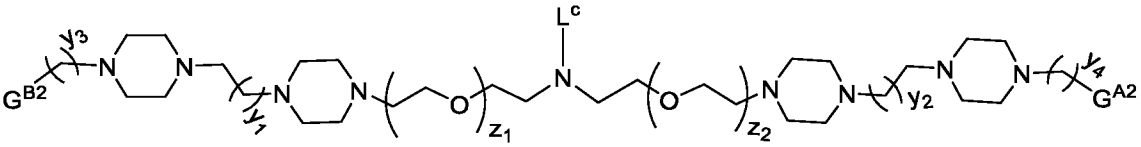

;


;


;

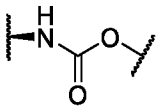

;


; или

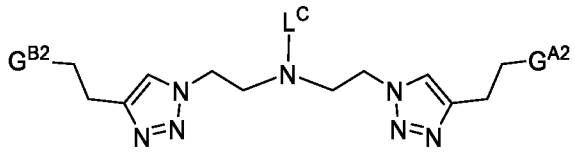

;

где z_1 и z_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20; и

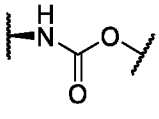
R_9 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила.



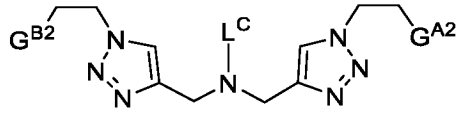
109. Конъюгат по варианту осуществления 108, отличающийся тем, что Y представляет собой:



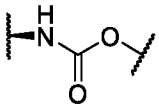
(-NH(C=O)O-) и L представляет собой: .

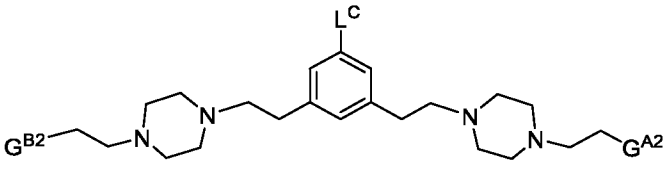


110. Конъюгат по варианту осуществления 108, отличающийся тем, что Y представляет собой:

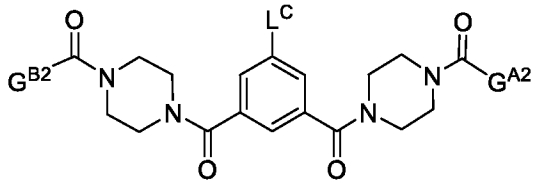


(-NH(C=O)O-) и L представляет собой: .

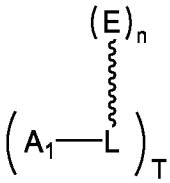
111. Конъюгат по варианту осуществления 108, отличающийся тем, что Y представляет собой: 

(-NH(C=O)O-) и L представляет собой:  .

112. Конъюгат по варианту осуществления 108, отличающийся тем, что Y представляет собой: (-O-)

и L представляет собой:  .

113. Конъюгат по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (M-I):



(M-I)

где каждый A_1 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII);

каждый E содержит мономер Fc-домена, белок альбумин,

связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид;

n равно 1 или 2;

T является целым числом от 1 до 20; и

L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к каждому из E и A_1,

волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что каждый A_1-L ковалентно присоединен к E;

или его фармацевтически приемлемая соль.

114. Конъюгат по варианту осуществления 113, отличающийся тем, что каждый A_1 независимо выбран из любой из формул (A-I), (A-II), (A-VI), или (A-VII);

каждый E содержит мономер Fc-домена, белок альбумин,

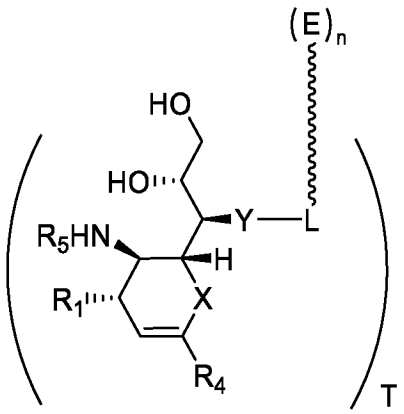
связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид, и

волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что каждый A_1-L ковалентно присоединен к E;

или его фармацевтически приемлемая соль.

115. Конъюгат по варианту осуществления 114, где каждый A_1 независимо выбран из формулы (A-I).

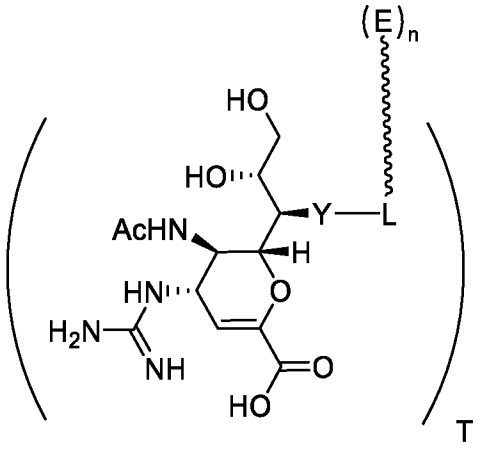
116. Конъюгат по варианту осуществления 115, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (M-II):



(M-II)

или его фармацевтически приемлемая соль.

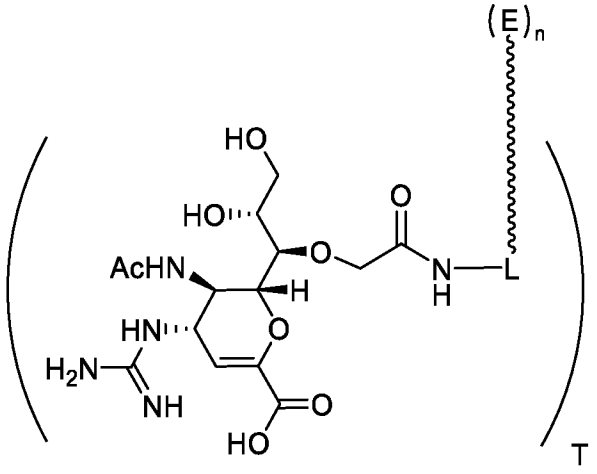
117. Конъюгат по варианту осуществления 116, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-II-1):



(M-II-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

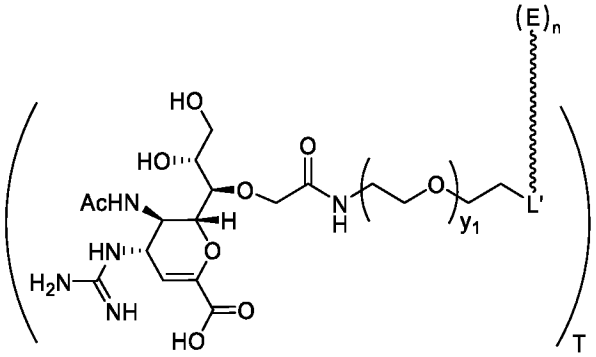
118. Конъюгат по варианту осуществления 117, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-II-2):



(M-II-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

119. Конъюгат по варианту осуществления 118, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-II-3):



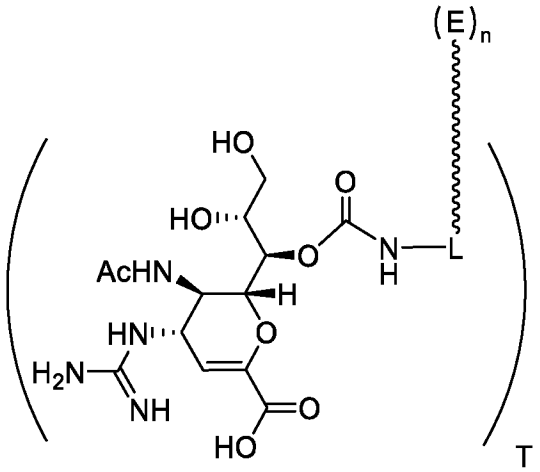
(M-II-3)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 является целым числом от 1 до 20.

или его фармацевтически приемлемая соль.

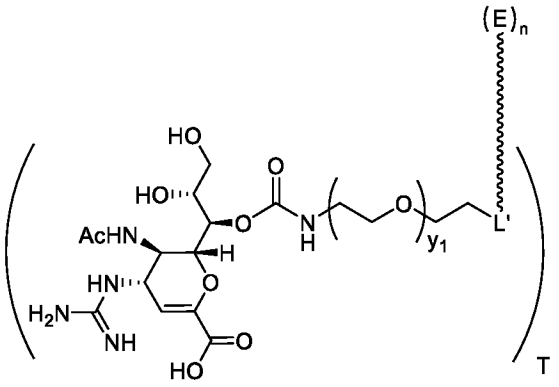
120. Конъюгат по варианту осуществления 119, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-II-4):



(M-II-4)

или его фармацевтически приемлемой соль.

121. Конъюгат по варианту осуществления 120, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-II-5):



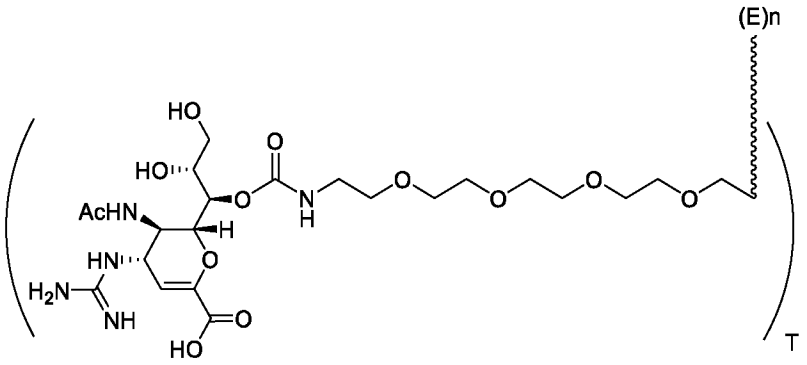
(M-II-5)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 является целым числом от 1 до 20.

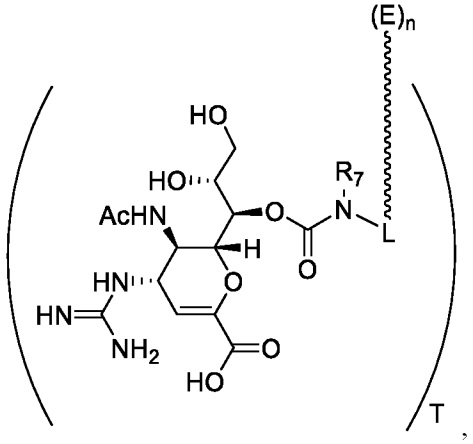
или его фармацевтически приемлемая соль.

122. Конъюгат по варианту осуществления 121, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

123. Конъюгат по варианту осуществления 116, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-II-6):



(M-II-6)

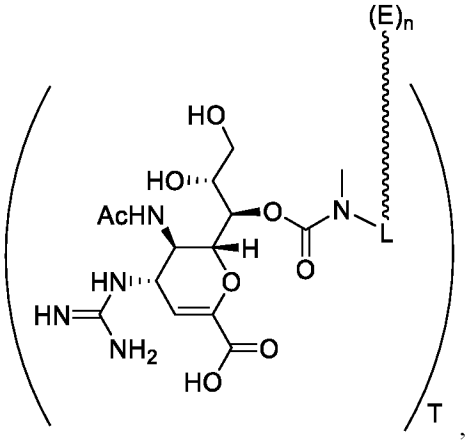
где R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

или его фармацевтически приемлемая соль.

124. Конъюгат по варианту осуществления 123, где R_7 выбран из C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арил и C2-C15 гетероарила.

125. Конъюгат по варианту осуществления 123 или 124, отличающийся тем, что R_7 выбран из метила, этила, пропила или бутила.

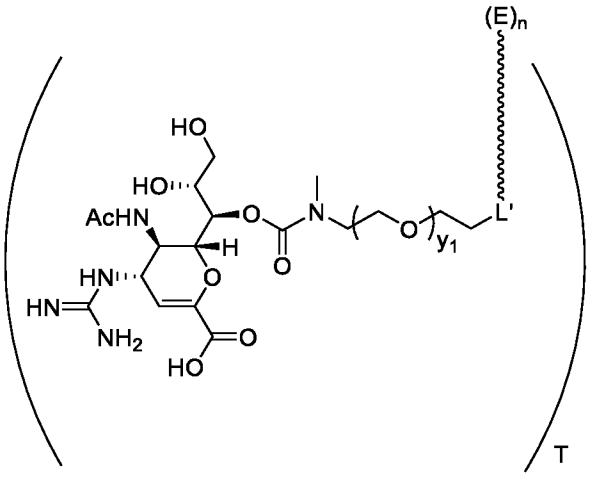
126. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 123-125, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-II-7):



(M-II-7)

или его фармацевтически приемлемая соль.

127. Конъюгат по варианту осуществления 126, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-II-8):



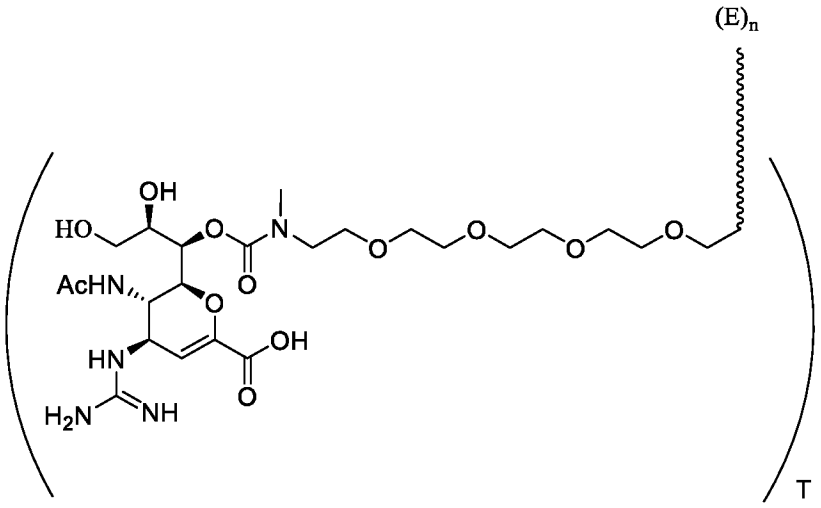
(M-II-8)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 является целым числом от 1 до 20.

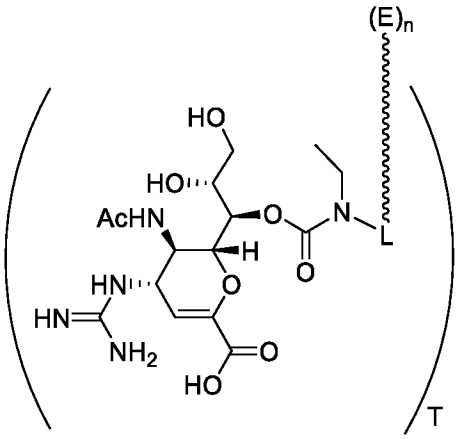
или его фармацевтически приемлемая соль.

128. Конъюгат по варианту осуществления 127, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

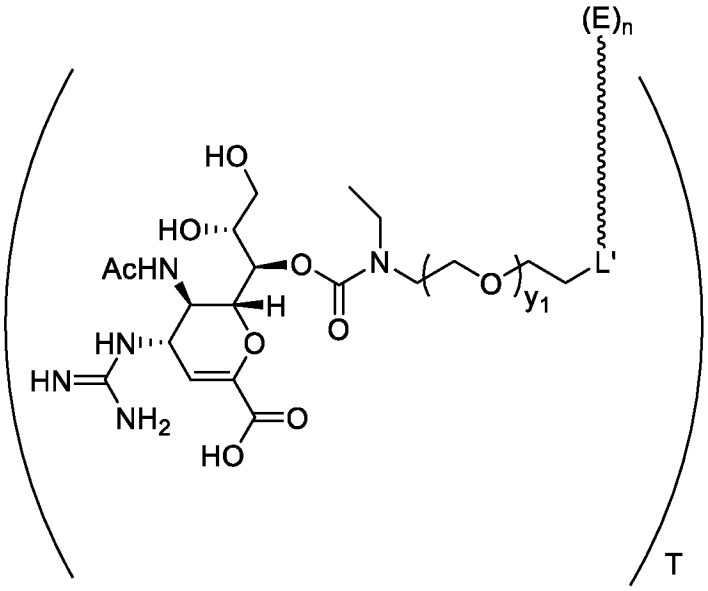
129. Конъюгат по варианту осуществления 127, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (M-II-9):



(M-II-9)

или его фармацевтически приемлемая соль.

130. Конъюгат по варианту осуществления 129, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (M-II-10):



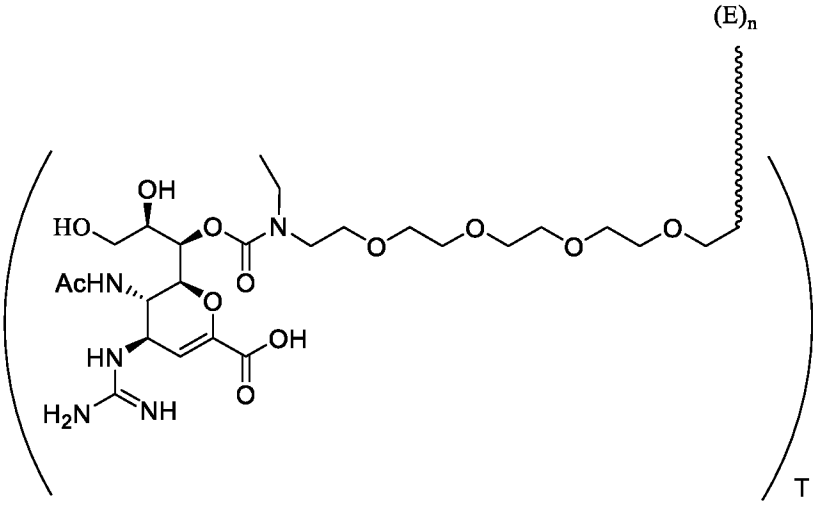
(M-II-10)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 является целым числом от 1 до 20.

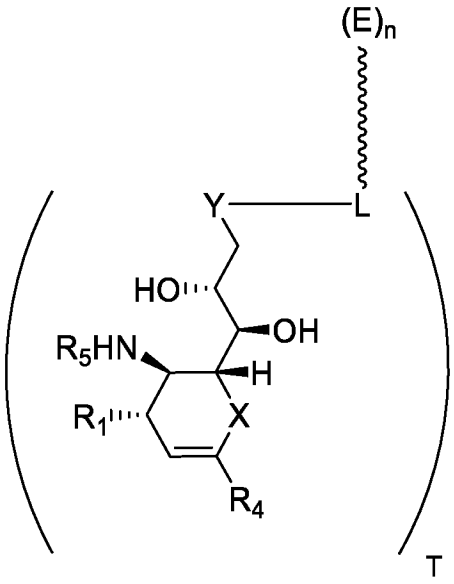
или его фармацевтически приемлемая соль.

131. Конъюгат по варианту осуществления 130, отличающийся тем, что конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

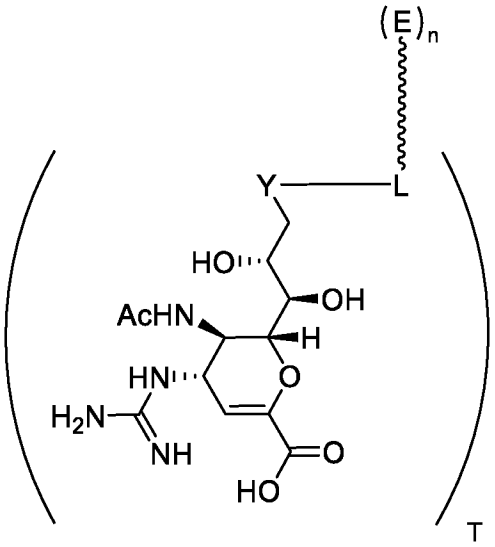
132. Конъюгат по варианту осуществления 113 или 114, отличающейся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-III):



(M-III)

или его фармацевтически приемлемая соль.

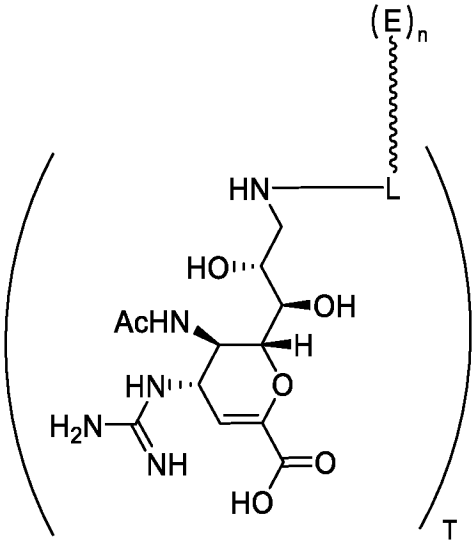
133. Конъюгат по варианту осуществления 132, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-III-1):



(M-III-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

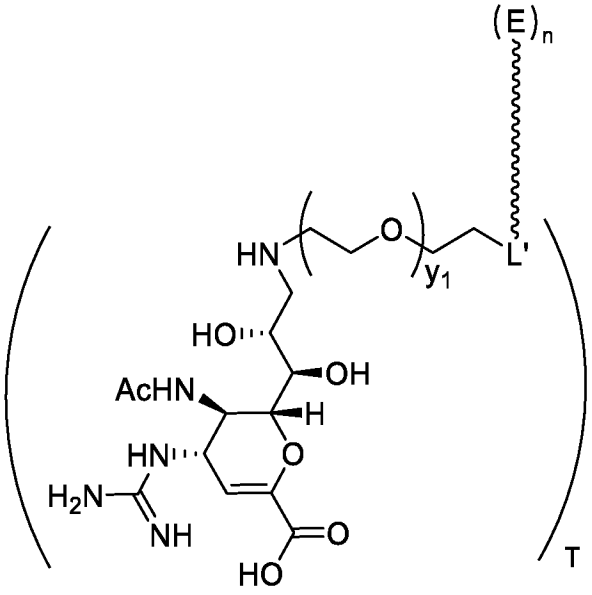
134. Конъюгат по варианту осуществления 133, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-III-2):



(M-III-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

135. Конъюгат по варианту осуществления 134, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-III-3):



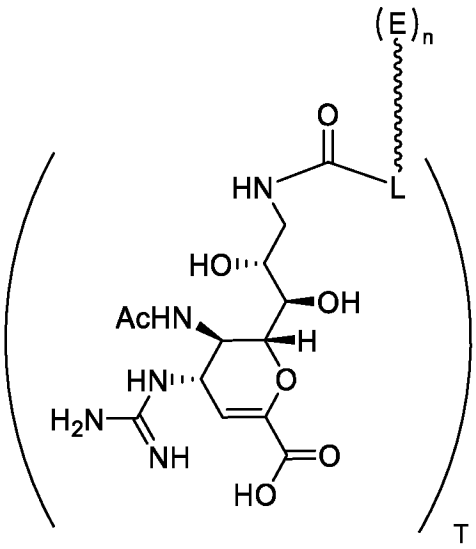
(M-III-3)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

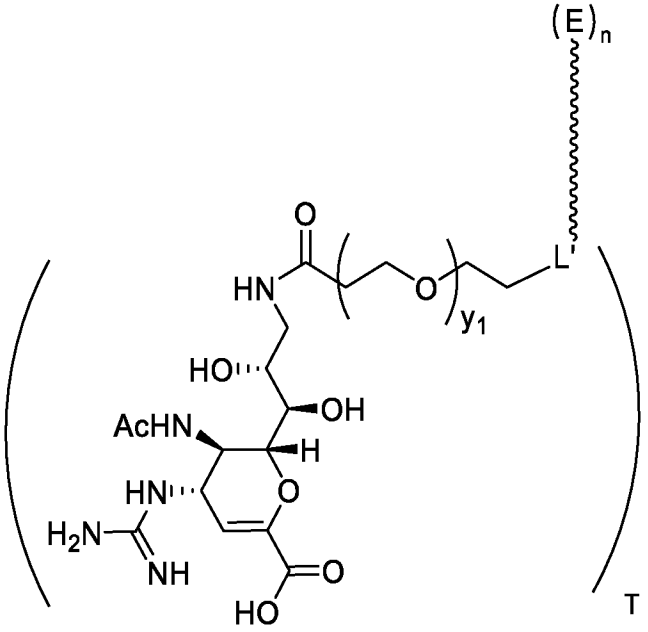
136. Конъюгат по варианту осуществления 133, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-III-4):



(M-III-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

137. Конъюгат по варианту осуществления 136, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-III-5):



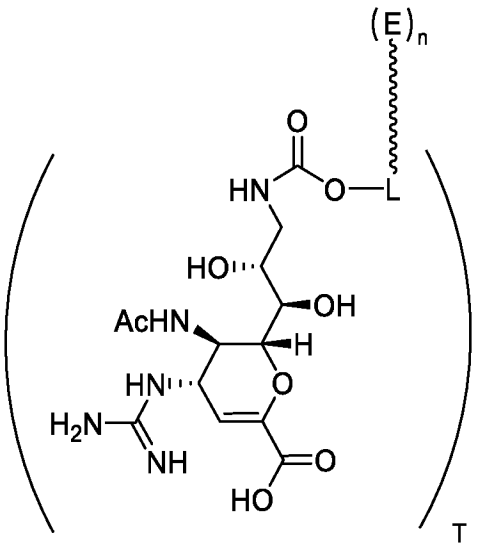
(M-III-5)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

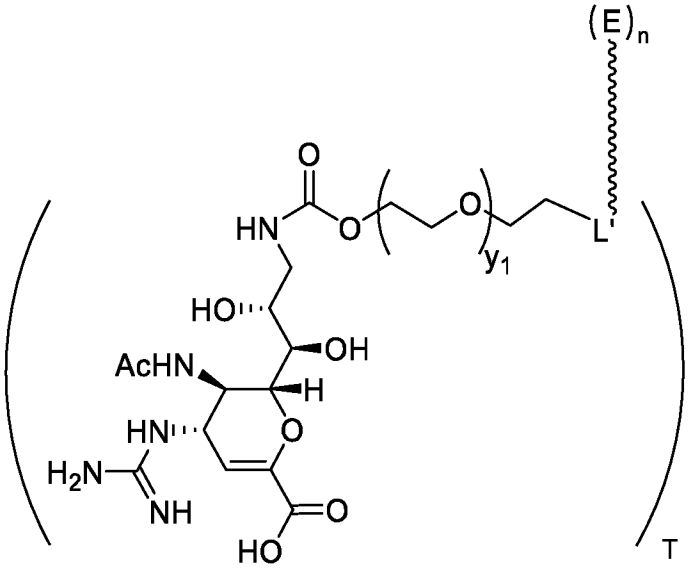
138. Конъюгат по варианту осуществления 133, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-III-6):



(M-III-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

139. Конъюгат по варианту осуществления 138, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-III-7):



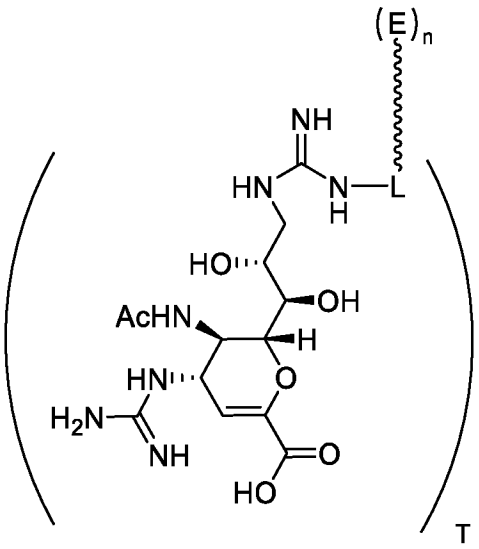
(M-III-7)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

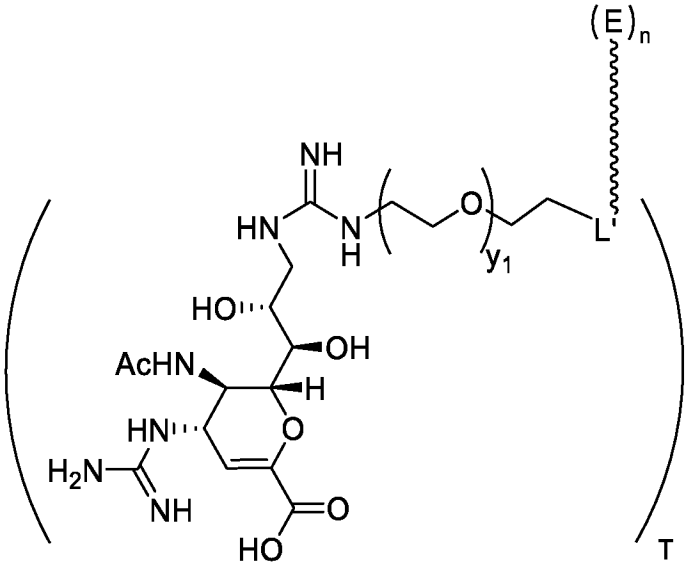
140. Конъюгат по варианту осуществления 133, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-III-8):



(M-III-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

141. Конъюгат по варианту осуществления 140, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-III-9):



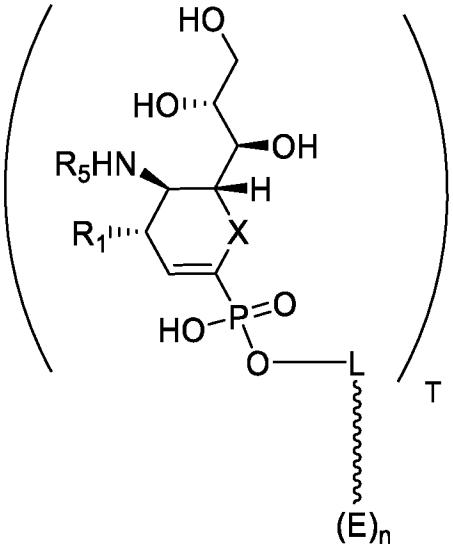
(M-III-9)

где L' представляет собой остаток от L, и 3

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

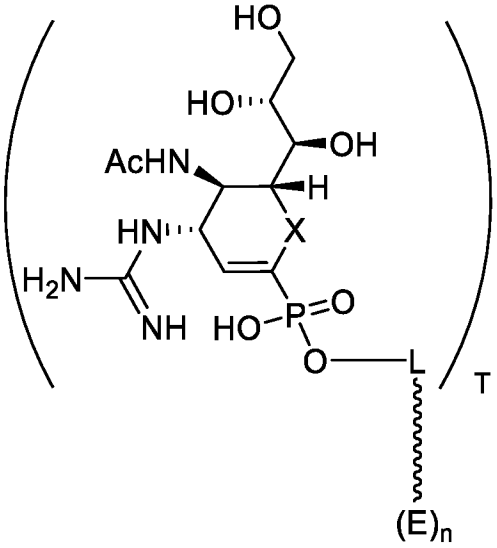
142. Конъюгат по варианту осуществления 113, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (M-IV):



(M-IV)

или его фармацевтически приемлемая соль.

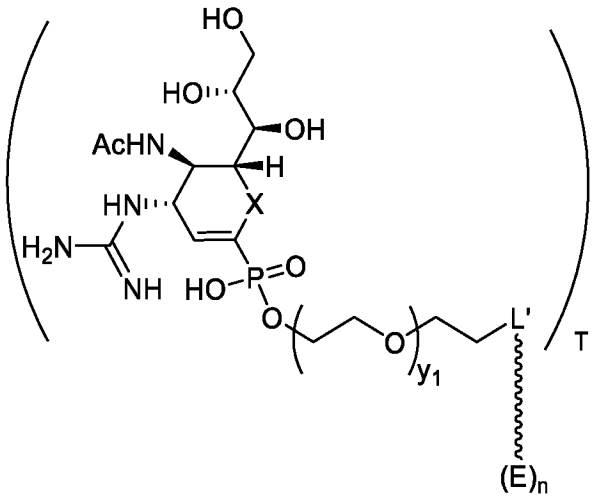
143. Конъюгат по варианту осуществления 142, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-IV-1):



(M-IV-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

144. Конъюгат по варианту осуществления 143, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-IV-2):



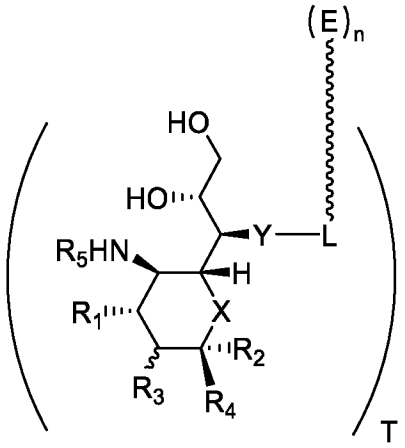
(M-IV-2)

где L’ представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

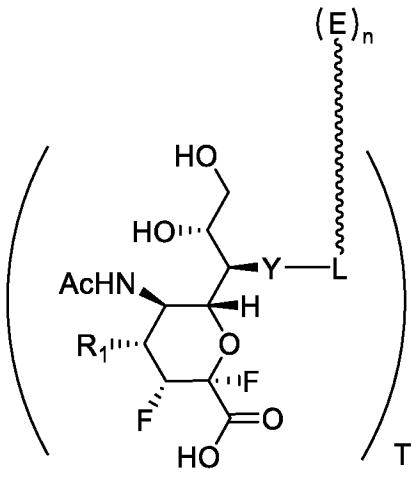
145. Конъюгат по варианту осуществления 113 или 114, отличающейся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V):



(M-V)

или его фармацевтически приемлемая соль.

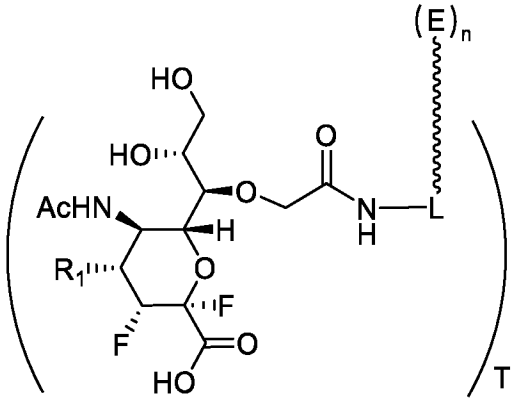
146. Конъюгат по варианту осуществления 145, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V-1):



(M-V-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

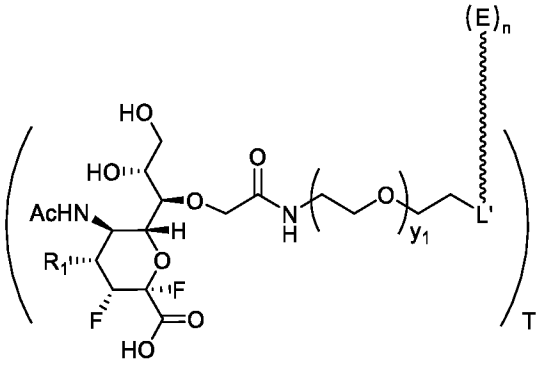
147. Конъюгат по варианту осуществления 146, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V-2):



(M-V-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

148. Конъюгат по варианту осуществления 147, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V-3):



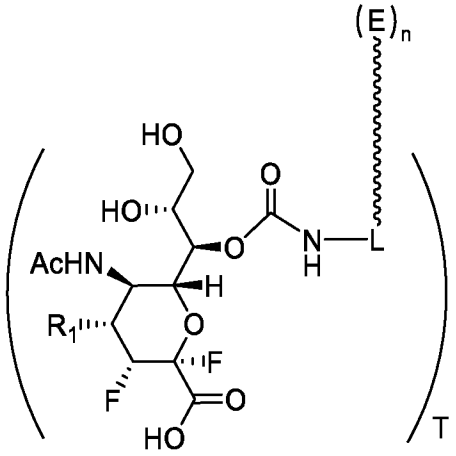
(M-V-3)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 является целым числом от 1 до 20.

или его фармацевтически приемлемая соль.

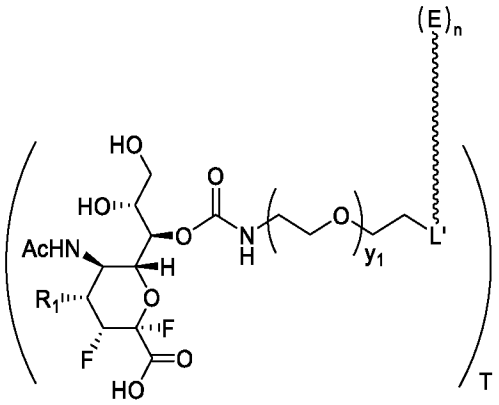
149. Конъюгат по варианту осуществления 148, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V-4):



(M-V-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

150. Конъюгат по варианту осуществления 149, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V-5):



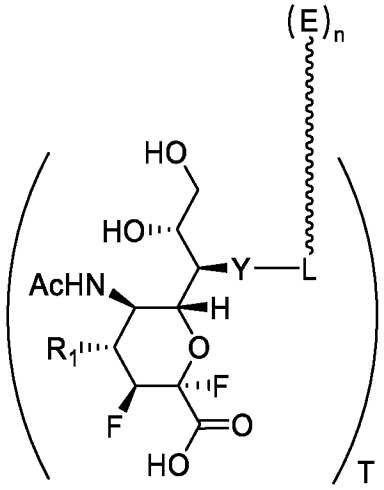
(M-V-5)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 является целым числом от 1 до 20.

или его фармацевтически приемлемая соль.

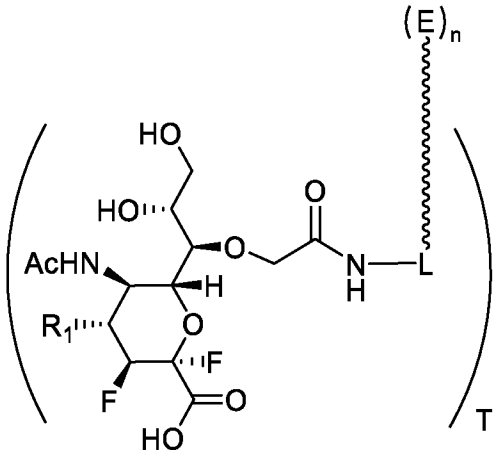
151. Конъюгат по варианту осуществления 145, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V-6):



(M-V-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

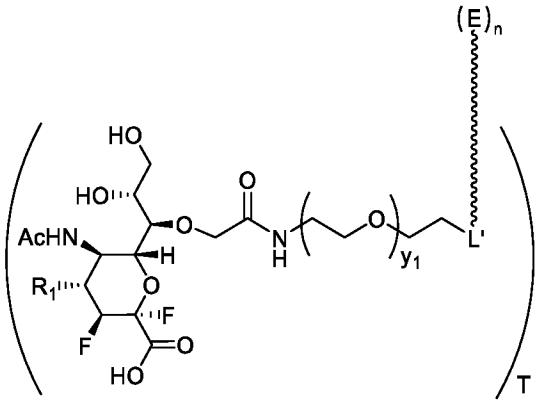
152. Конъюгат по варианту осуществления 151, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V-7):



(M-V-7)

или его фармацевтически приемлемая соль.

153. Конъюгат по варианту осуществления 152, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V-8):



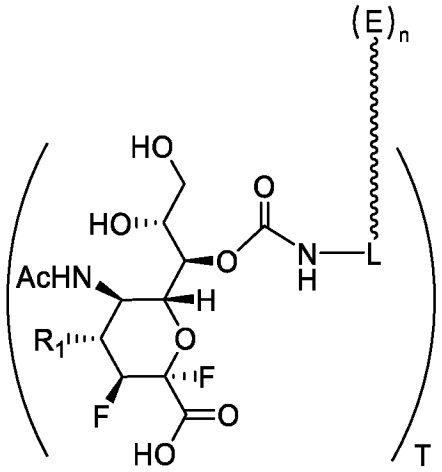
(M-V-8)

где L’ представляет собой остаток от L, и

y_1 является целым числом от 1 до 20.

или его фармацевтически приемлемая соль.

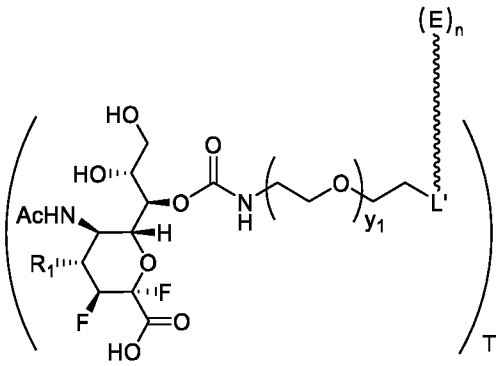
154. Конъюгат по варианту осуществления 151, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V-9):



(M-V-9)

или его фармацевтически приемлемая соль.

155. Конъюгат по варианту осуществления 154, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-V-10):



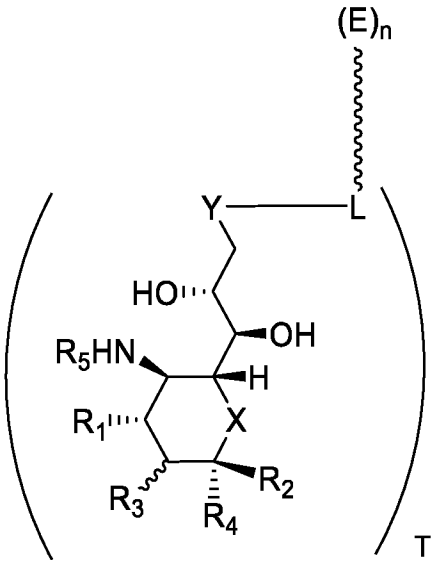
(M-V-10)

где L’ представляет собой остаток от L, и

y_1 является целым числом от 1 до 20.

или его фармацевтически приемлемая соль.

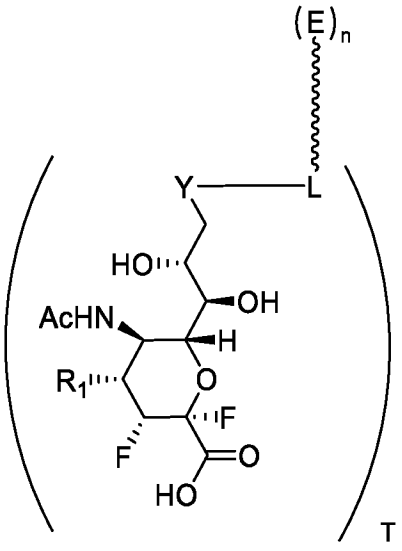
156. Конъюгат по варианту осуществления 113 или 114, отличающейся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VI):



(M-VI)

или его фармацевтически приемлемая соль.

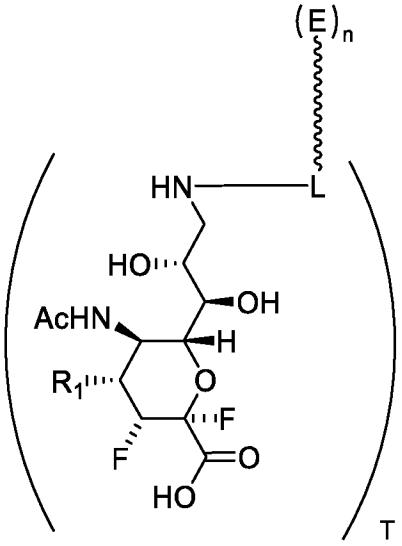
157. Конъюгат по варианту осуществления 156, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VI-1):



(M-VI-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

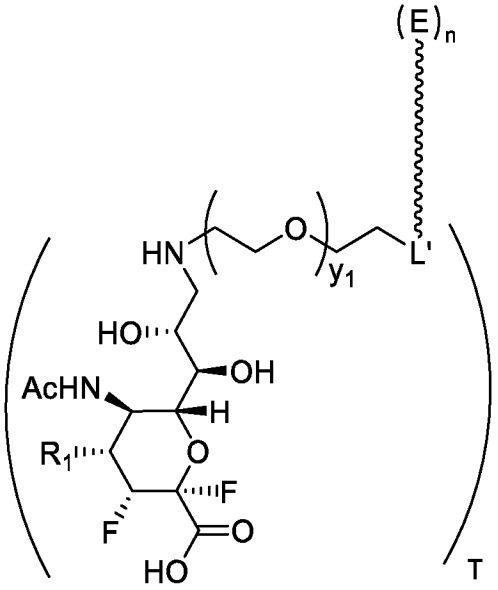
158. Конъюгат по варианту осуществления 157, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VI-2):



(M-VI-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

159. Конъюгат по варианту осуществления 158, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VI-3):



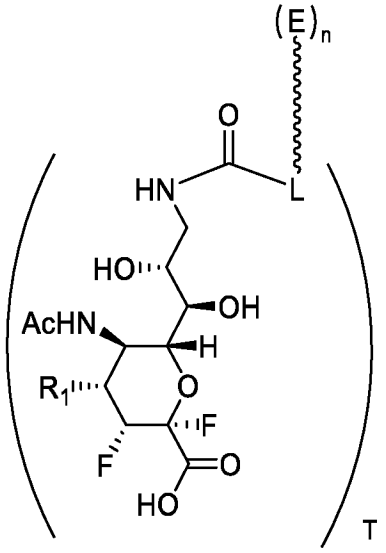
(M-VI-3)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

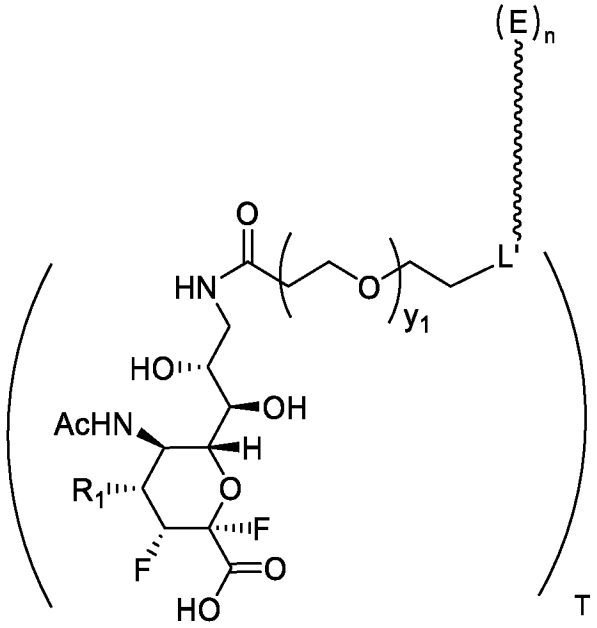
160. Конъюгат по варианту осуществления 157, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VI-4):



(M-VI-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

161. Конъюгат по варианту осуществления 160, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VI-5):



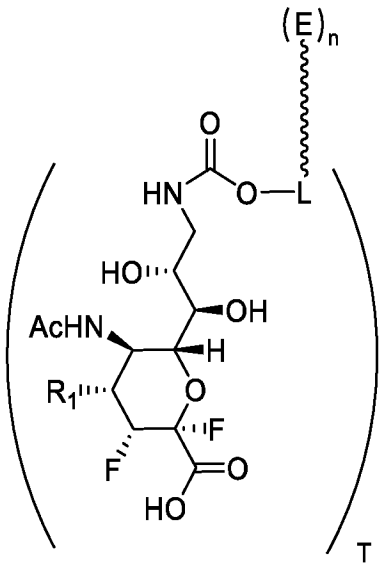
(M-VI-5)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

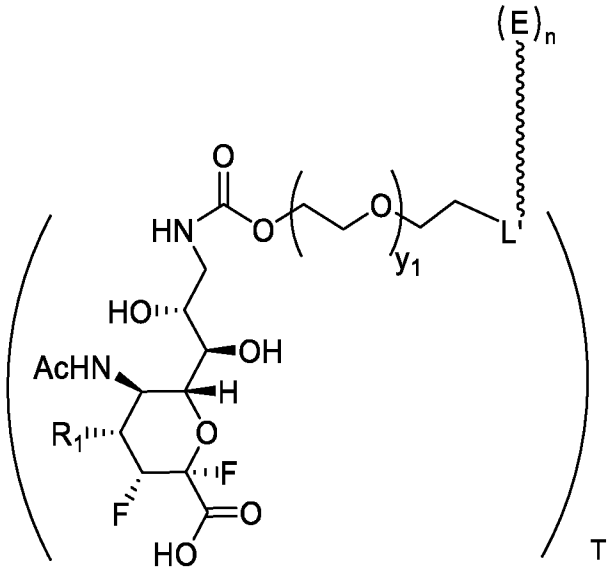
162. Конъюгат по варианту осуществления 157, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VI-6):



(M-VI-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

163. Конъюгат по варианту осуществления 162, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VI-7):



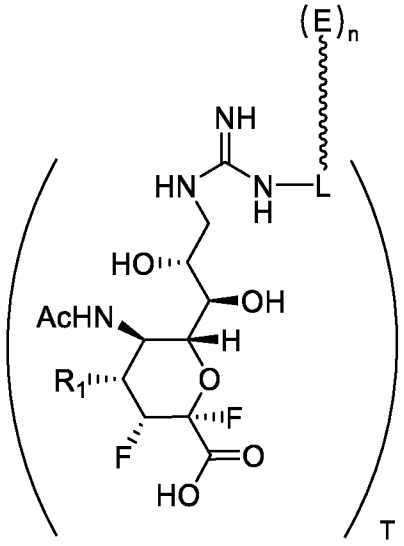
(M-VI-7)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

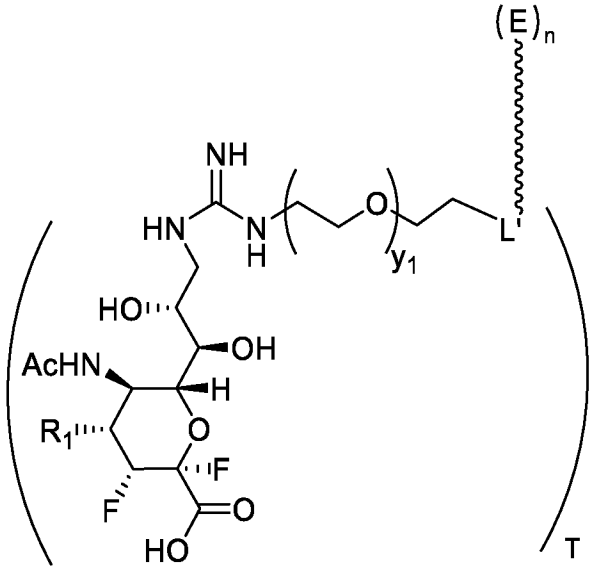
164. Конъюгат по варианту осуществления 157, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VI-8):



(M-VI-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

165. Конъюгат по варианту осуществления 164, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VI-9):



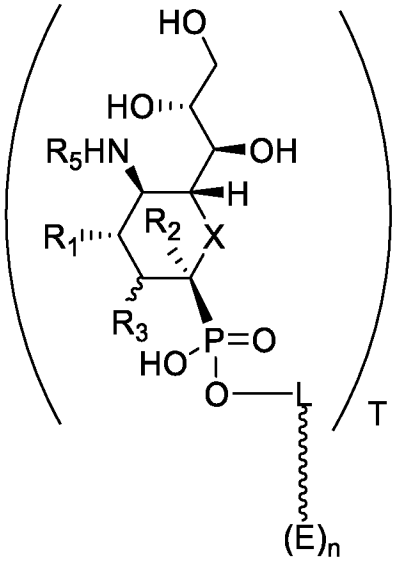
(M-VI-9)

где L' представляет собой остаток от L, и 3

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

166. Конъюгат по варианту осуществления 113, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (M-VII):



(M-VII)

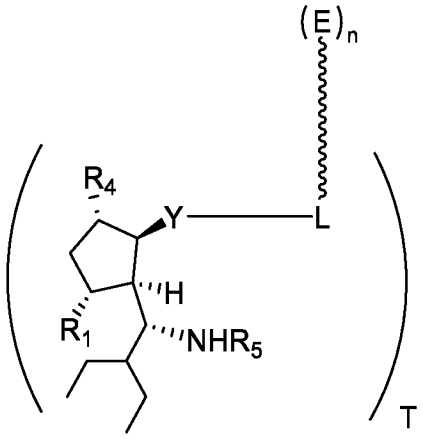
или его фармацевтически приемлемая соль.

167. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 113-166, отличающийся тем, что R_1 представляет собой -OH.

168. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 113-166, отличающийся тем, что R_1 представляет собой NH_2.

169. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 113-166, где R_1 представляет собой $-NHC(=NH)NH_2$.

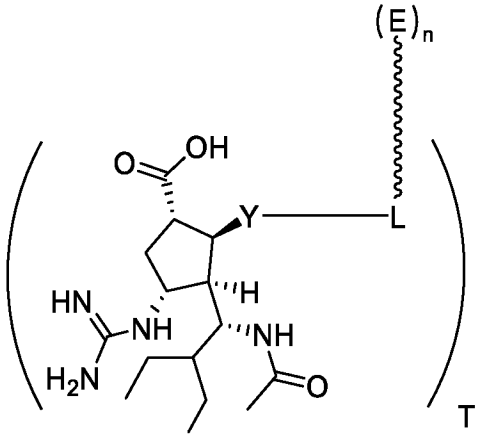
170. Конъюгат по варианту осуществления 113, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (M-VIII):



(M-VIII)

или его фармацевтически приемлемая соль.

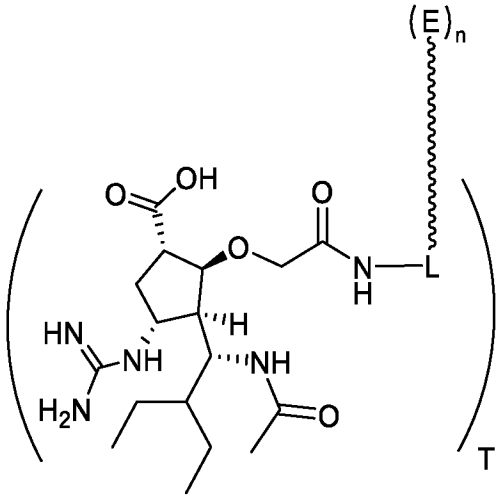
171. Конъюгат по варианту осуществления 170, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-1):



(M-VIII-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

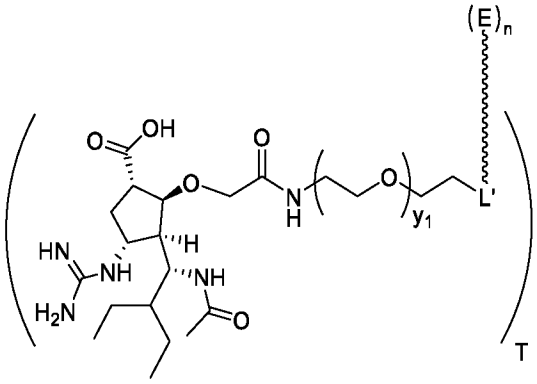
172. Конъюгат по варианту осуществления 171, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-2):



(M-VIII-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

173. Конъюгат по варианту осуществления 172, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-3):



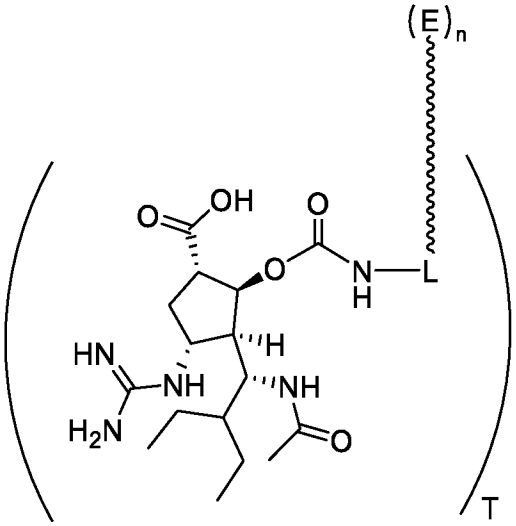
(M-VIII-3)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 является целым числом от 1 до 20.

или его фармацевтически приемлемая соль.

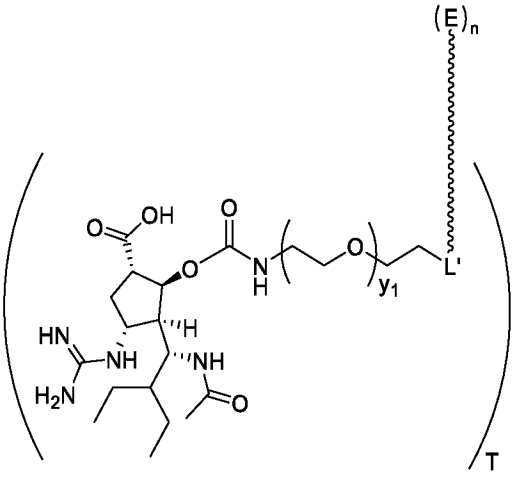
174. Конъюгат по варианту осуществления 173, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-4):



(M-VIII-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

175. Конъюгат по варианту осуществления 174, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-5):



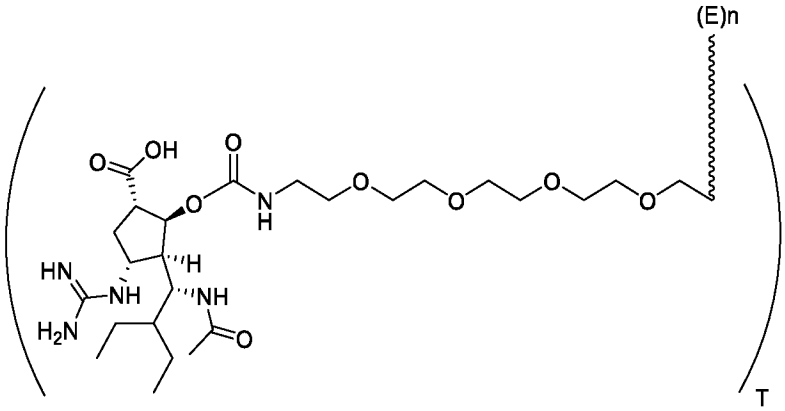
(M-VIII-5)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 является целым числом от 1 до 20.

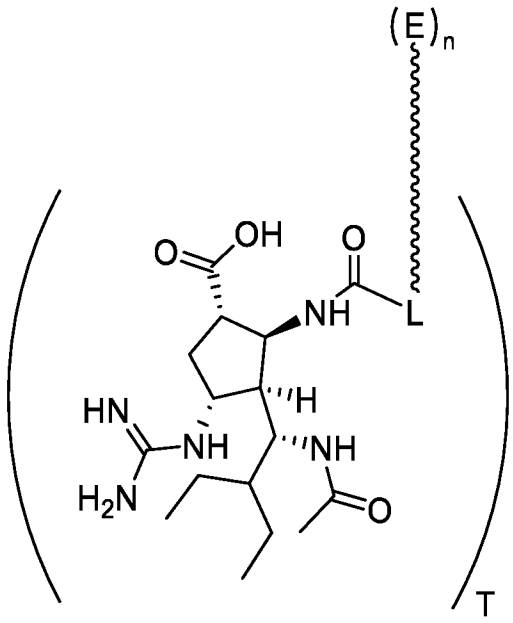
или его фармацевтически приемлемая соль.

176. Конъюгат по варианту осуществления 175, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

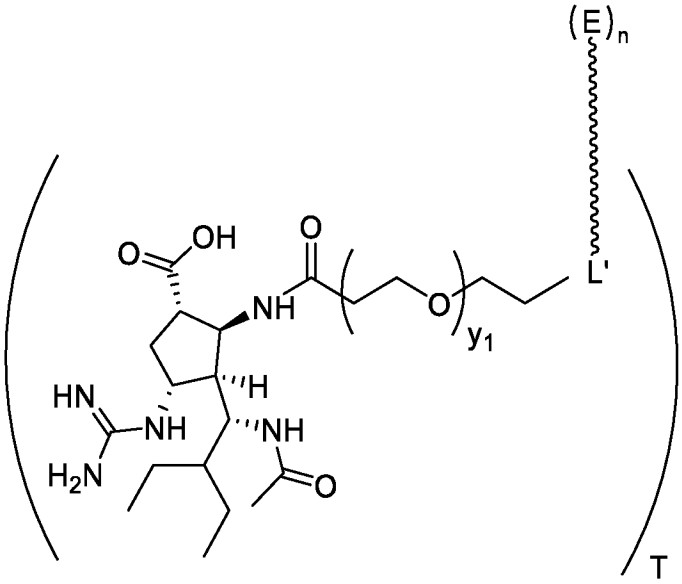
177. Конъюгат по варианту осуществления 171, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-6):



(M-VIII-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

178. Конъюгат по варианту осуществления 177, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-7):



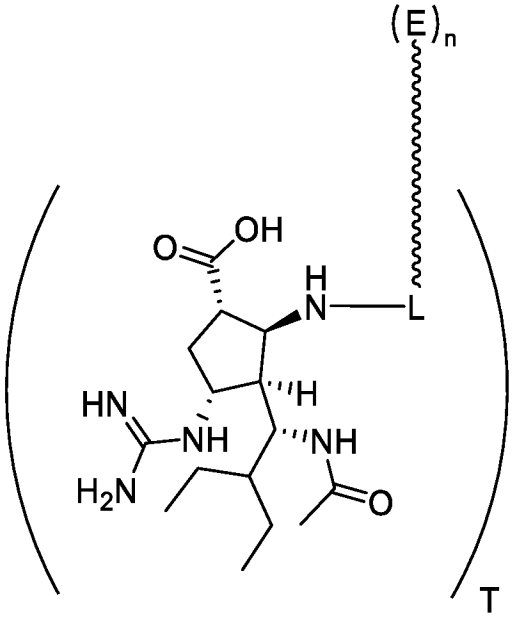
(M-VIII-7)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

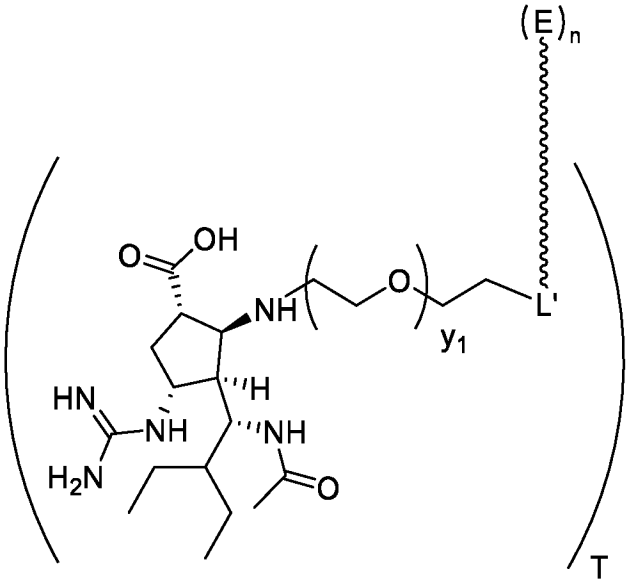
179. Конъюгат по варианту осуществления 171, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-8):



(M-VIII-8)

или его фармацевтически приемлемая соль.

180. Конъюгат по варианту осуществления 179, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-9):



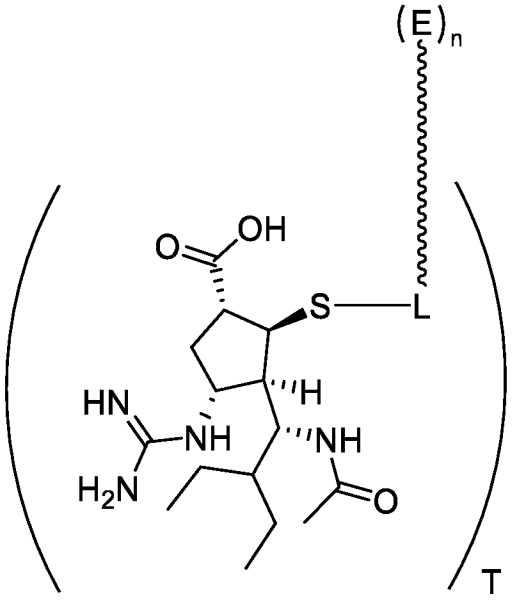
(M-VIII-9)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

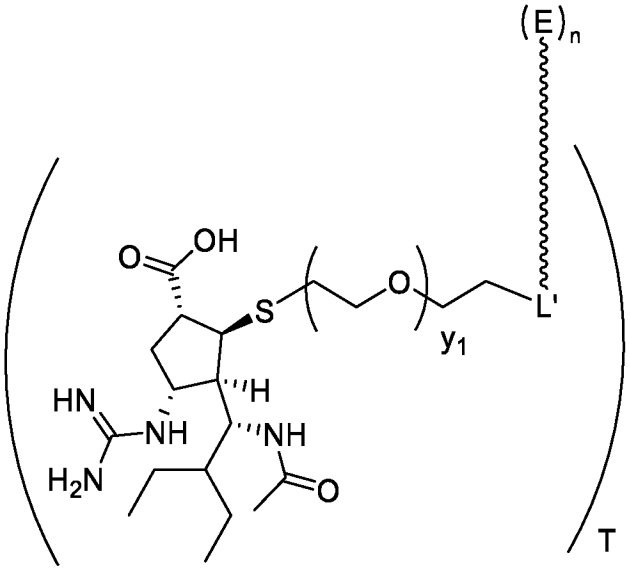
181. Конъюгат по варианту осуществления 180, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-10):



(M-VIII-10)

или его фармацевтически приемлемая соль.

182. Конъюгат по варианту осуществления 181, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-VIII-11):



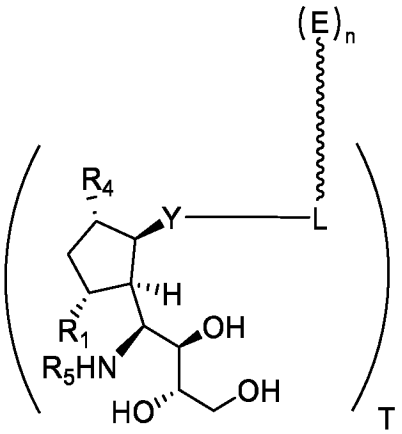
(M-VIII-11)

где L' представляет собой остаток от L, и

y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

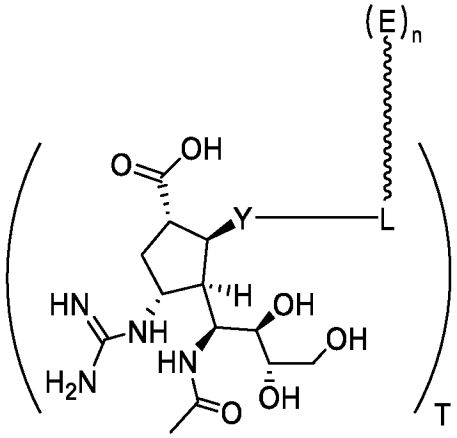
183. Конъюгат по варианту осуществления 113, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (M-IX):



(M-IX)

или его фармацевтически приемлемая соль.

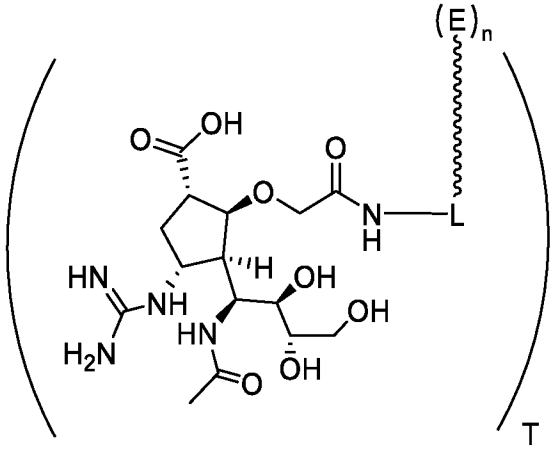
184. Конъюгат по варианту осуществления 183, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-IX-1):



(M-IX-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

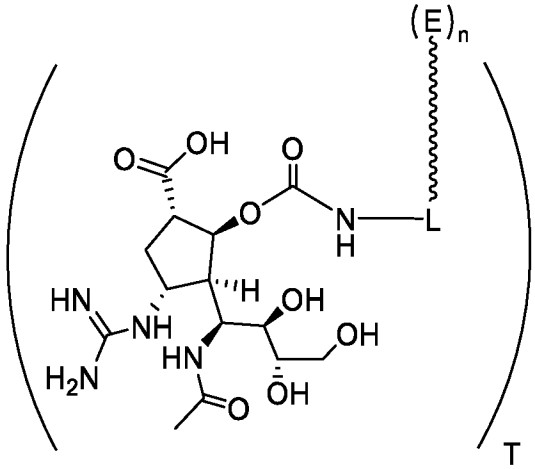
185. Конъюгат по варианту осуществления 184, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-IX-2):



(M-IX-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

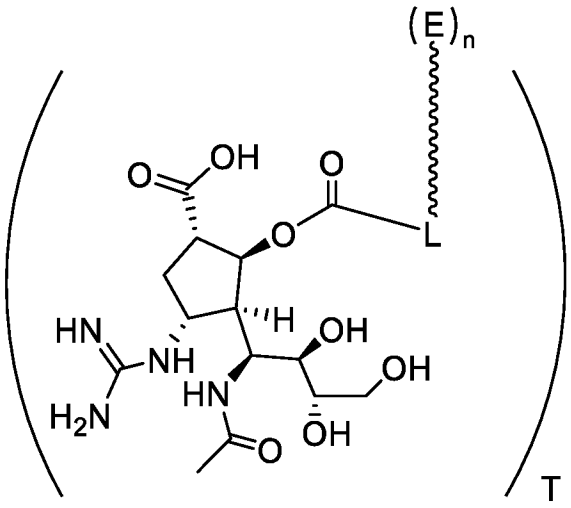
186. Конъюгат по варианту осуществления 184, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-IX-3):



(M-IX-3)

или его фармацевтически приемлемая соль.

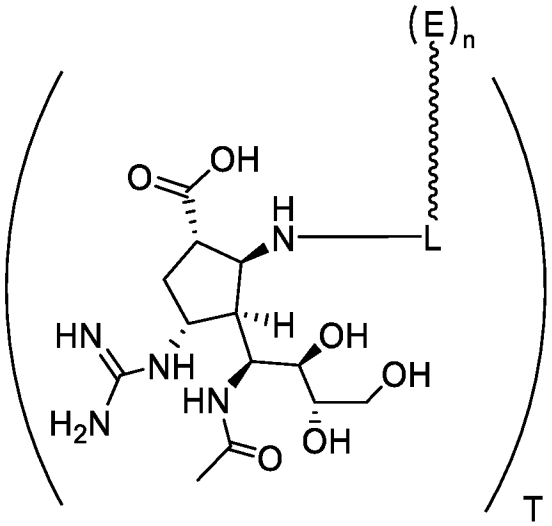
187. Конъюгат по варианту осуществления 184, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-IX-4):



(M-IX-4)

или его фармацевтически приемлемая соль.

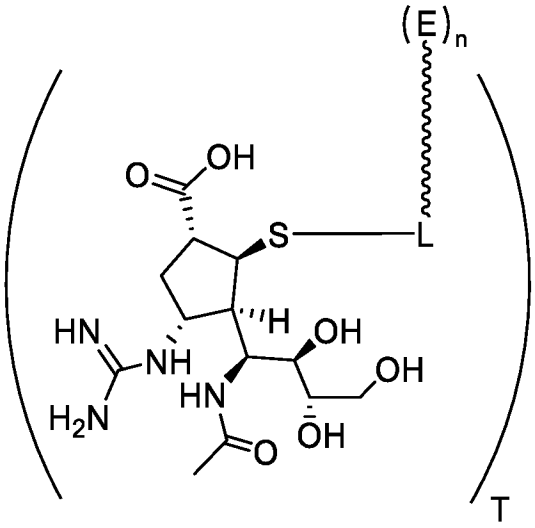
188. Конъюгат по варианту осуществления 184, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-IX-5):



(M-IX-5)

или его фармацевтически приемлемая соль.

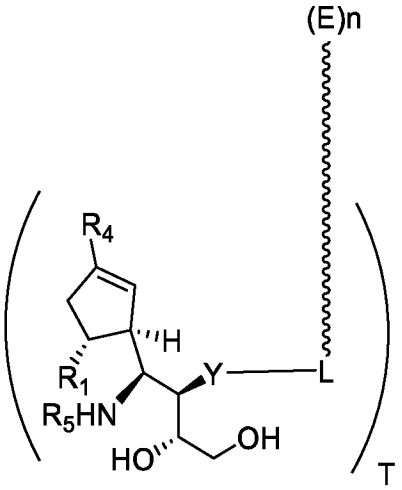
189. Конъюгат по варианту осуществления 184, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-IX-6):



(M-IX-6)

или его фармацевтически приемлемая соль.

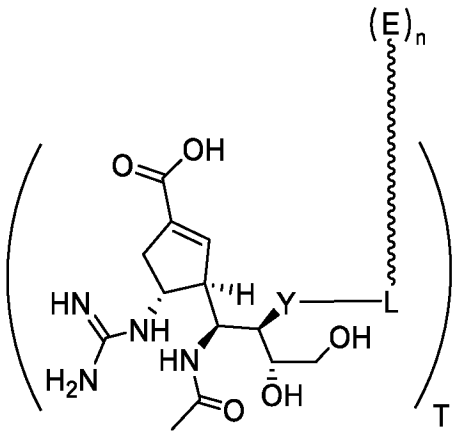
190. Конъюгат по варианту осуществления 113, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-X):



(M-X)

или его фармацевтически приемлемая соль.

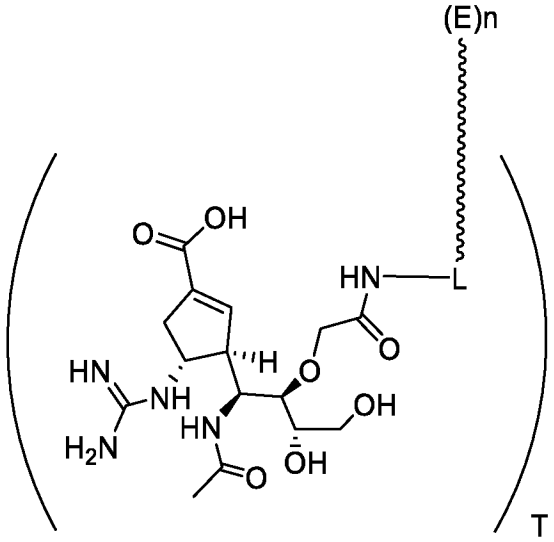
191. Конъюгат по варианту осуществления 190, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-X-1):



(M-X-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

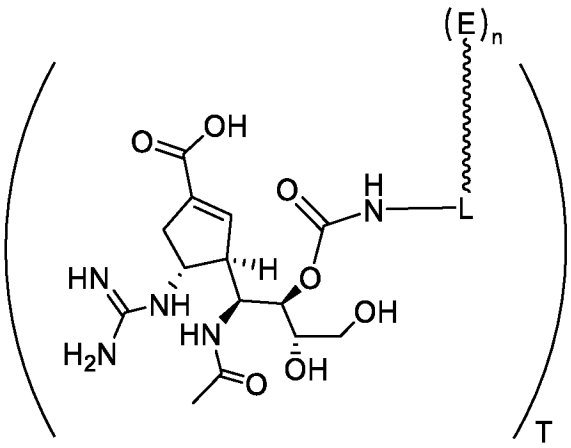
192. Конъюгат по варианту осуществления 191, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-X-2):



(M-X-2)

или его фармацевтически приемлемая соль.

193. Конъюгат по варианту осуществления 190, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-X-3):



(M-X-3)

или его фармацевтически приемлемая соль.

194. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 113-193, в котором L или L' содержит один или более необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен, необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен, O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино,

где R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил.

195. Конъюгат по варианту осуществления 194, отличающийся тем, что остов L или L' состоит из одного или более необязательно замещенного C1-C20 алкилена, необязательно замещенного C1-C20 гетероалкилена, необязательно замещенного C2-C20 алкенилена, необязательно замещенного C2-C20 гетероалкенилена, необязательно замещенного C2-C20 алкинилена, необязательно замещенного C2-C20 гетероалкинилена, необязательно замещенного C3-C20 циклоалкилена, необязательно замещенного C3-C20 гетероциклоалкилена, необязательно замещенного C4-C20 циклоалкенилена, необязательно замещенного C4-C20 гетероциклоалкенилена, необязательно замещенного C8-C20 циклоалкинилена, необязательно замещенного C8-C20 гетероциклоалкилена, необязательно замещенного C5-C15 арилена, необязательно замещенного C2-C15 гетероарилена, O, S, NR^i, P, карбонила, тиокарбонила, сульфонила, фосфата, фосфорила или имино,

где R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный

C1-C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил.

196. Конъюгат по варианту осуществления 194 или 195, отличающийся тем, что L или L' является оксозамещенным.

197. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 113-196, отличающийся тем, что остов L или L' содержит не более 250 атомов.

198. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 113-197, отличающийся тем, что L или L' способен образовывать амидную, карбаматную, сульфонильную или мочевинную связь.

199. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 113-193, отличающийся тем, что L или L' представляет собой связь.

200. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 113-193, отличающийся тем, что L или L' представляет собой атом.

201. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 113-200, отличающийся тем, что каждый L описан формулой (M-L-I):

J^1-$(Q^1)_g$-$(T^1)_h$-$(Q^2)_i$-$(T^2)_j$-$(Q^3)_k$-$(T^3)_l$-$(Q^4)_m$-$(T^4)_n$-$(Q^5)_o$-J^2

где J^1 представляет собой связь, присоединенную к A_1;

J^2 представляет собой связь, присоединенную к E, или функциональную группу, способную вступать в реакцию с функциональной группой, конъюгированной с E (например, малеимид и цистеин, амин и активированная карбоновая кислота, тиол и малеимид, активированная сульфоновая кислота и амин, изоцианат и амин, азид и алкин и алкен и тетразин);

каждый из Q^1, Q^2, Q^3, Q^4 и Q^5 независимо представляет собой необязательно замещенный C1-C20 алкилен, необязательно замещенный C1-C20 гетероалкилен, необязательно замещенный C2-C20 алкенилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенилен, необязательно замещенный C2-C20 алкинилен, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинилен, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкилен, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкилен, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенилен, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенилен, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинилен, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинилен, необязательно замещенный C5-C15 арилен или необязательно замещенный C2-C15 гетероарилен;

каждый T^1, T^2, T^3, T^4 независимо представляет собой O, S, NR^i, P, карбонил, тиокарбонил, сульфонил, фосфат, фосфорил или имино;

R^i представляет собой H, необязательно замещенный C1-C20 алкил, необязательно замещенный C1-

C20 гетероалкил, необязательно замещенный C2-C20 алкенил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкенил, необязательно замещенный C2-C20 алкинил, необязательно замещенный C2-C20 гетероалкинил, необязательно замещенный C3-C20 циклоалкил, необязательно замещенный C3-C20 гетероциклоалкил, необязательно замещенный C4-C20 циклоалкенил, необязательно замещенный C4-C20 гетероциклоалкенил, необязательно замещенный C8-C20 циклоалкинил, необязательно замещенный C8-C20 гетероциклоалкинил, необязательно замещенный C5-C15 арил или необязательно замещенный C2-C15 гетероарил; и каждое g, h, i, j, k, l, m, n и o независимо равно 0 или 1.

202. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-201, где R_1 представляет собой -NHC(=NH)NH_2.

203. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-202, отличающийся тем, что R_2 представляет собой -F.

204. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-203, отличающийся тем, что R_3 представляет собой -F.

205. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-204, отличающийся тем, что R_4 представляет собой $–CO_2H$.

206. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-205, отличающийся тем, что R_5 представляет собой $–COCH_3$.

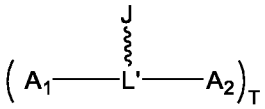
207. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-206, отличающийся тем, что волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что L каждого A_1-L или каждого A_1-L-A_2 ковалентно присоединен к атому азота подвергнутого воздействию растворителя лизина E.

208. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-206, отличающийся тем, что волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что L каждого A_1-L или каждого A_1-L-A_2 L ковалентно присоединен к атому серы подвергнутого воздействию растворителя цистеина E.

209. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-208, отличающийся тем, что каждый E представляет собой мономер домена Fc.

210. Конъюгат по варианту осуществления 209, отличающийся тем, что n равен 2, и каждый E димеризуется с образованием домена Fc.

211. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 2-4, отличающийся тем, что n равен 2, каждый E представляет собой мономер домена Fc, каждый E димеризуется с образованием домена Fc, а конъюгат описан формулой (D-I-1):



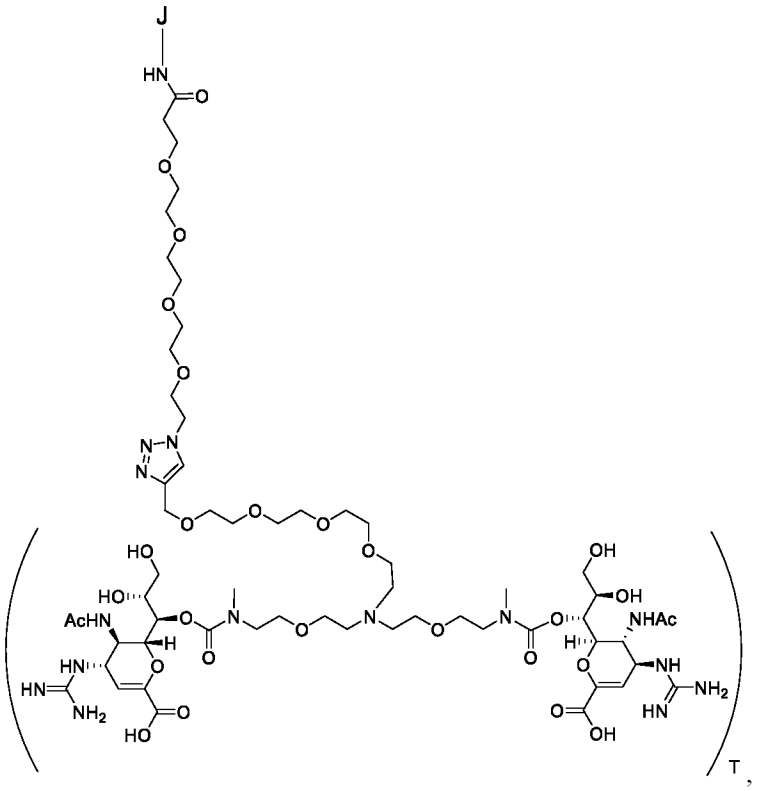
(D-I-1)

где J представляет собой Fc-домен; и

T является целым числом от 1 до 20,

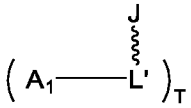
или его фармацевтически приемлемая соль.

212. Конъюгат по варианту осуществления 211, отличающийся тем, что указанный конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

213. Конъюгат по любому одному из вариантов осуществления 113-115, отличающийся тем, что n равен 2, каждый E представляет собой мономер домена Fc, каждый E димеризуется с образованием домена Fc, а конъюгат описан формулой (M-I-1):



(M-I-1)

где J представляет собой Fc-домен; и

T является целым числом от 1 до 20,

или его фармацевтически приемлемая соль.

214. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 209-213, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 1-138.

215. Конъюгат по варианту осуществления 214, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности любой из SEQ ID NO:

62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95.

216. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62.

217. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

218. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

219. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

220. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

221. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72.

222. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

223. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

224. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

225. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

226. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81.

227. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 82.

228. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

229. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86.

230. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

231. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91.

232. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94.

233. Конъюгат по варианту осуществления 215, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

234. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 209-233, отличающийся тем, что T равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

235. Совокупность конъюгатов по любому из вариантов осуществления 209-233, в которой среднее значение T составляет от 1 до 10.

236. Совокупность конъюгатов по варианту осуществления 235, отличающаяся тем, что среднее значение T составляет от 1 до 5.

237. Совокупность конъюгатов по варианту осуществления 235, отличающаяся тем, что среднее значение T составляет от 3 до 7.

238. Совокупность конъюгатов по варианту осуществления 236 или 237, отличающаяся тем, что среднее значение T составляет от 3,5 до 5,5.

239. Совокупность конъюгатов по варианту осуществления 236 или 237, отличающаяся тем, что среднее значение T составляет около 4,5.

240. Совокупность конъюгатов по варианту осуществления 235, отличающаяся тем, что среднее значение T составляет от 5 до 10.

241. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из вариантов осуществления 1-234, или совокупность конъюгатов по любому из вариантов осуществления 235-240, или их фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый эксципиент.

242. Способ лечения субъекта, имеющего вирусную инфекцию или предположительно имеющего вирусную

инфекцию, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества конъюгата или композиции по любому из вариантов осуществления 1-241.

243. Способ профилактического лечения вирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества конъюгата или композиции по любому из вариантов осуществления 1-241.

244. Способ по варианту осуществления 242 или 243, отличающийся тем, что вирусная инфекция вызвана вирусом гриппа или вирусом парагриппа.

245. Способ по любому из вариантов осуществления 242-244, отличающийся тем, что вирусная инфекция представляет собой вирус гриппа A, B или C или вирус парагриппа.

246. Способ по любому из вариантов осуществления 242-245, отличающийся тем, что субъект имеет ослабленный иммунитет.

247. Способ по любому из вариантов осуществления 242-246, отличающийся тем, что у субъекта диагностирован дефицит гуморального иммунитета, дефицит Т-клеток, нейтропения, аспления или дефицит комплемента.

248. Способ по любому из вариантов осуществления 242-247, отличающийся тем, что субъекта лечат или собираются лечить с применением иммуносупрессивной терапии.

249. Способ по любому из вариантов осуществления 242-248, отличающийся тем, что у указанного субъекта было диагностировано заболевание, вызывающее иммуносупрессию.

250. Способ по варианту осуществления 249, отличающийся тем, что заболевание представляет собой злокачественное новообразование или синдром приобретенного иммунодефицита.

251. Способ по варианту осуществления 250, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой лейкемию, лимфому или множественную миелому.

252. Способ по любому из вариантов осуществления 242-251, отличающийся тем, что субъекту была проведена или планируется проведение трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

253. Способ по любому из вариантов 242-252, отличающийся тем, что субъекту была проведена или планируется проведение трансплантации органа.

254. Способ по любому из вариантов осуществления 242-253, отличающийся тем, что у субъекта имеется вторичная инфекция или существует риск ее развития.

255. Способ предотвращения вторичной инфекции у субъекта, у которого диагностирована инфекция гриппа,

включающий введение субъекту конъюгата или композиции по любому из вариантов осуществления 1-241.

256. Способ по варианту осуществления 254 или 255, отличающийся тем, что вторичная инфекция представляет собой респираторную инфекцию.

257. Способ по любому из вариантов осуществления 254-256, отличающийся тем, что вторичная инфекция ассоциирована с пневмонией.

258. Способ по любому из вариантов осуществления 254-257, отличающийся тем, что вторичная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию или грибковую инфекцию.

259. Способ по варианту осуществления 258, отличающийся тем, что вторичная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию.

260. Способ по варианту осуществления 259, отличающийся тем, что бактериальная инфекция представляет собой инфекцию, вызванную метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, или*Haemophilus influenzae*.

261. Способ по варианту осуществления 260, отличающийся тем, что бактериальная инфекция представляет собой MRSA.

262. Способ по варианту осуществления 260, отличающийся тем, что бактериальной инфекция представляет собой *S. pneumoniae*.

263. Способ по любому из вариантов осуществления 242-262, отличающийся тем, что конъюгат композиции вводят внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутриочагово, внутричерепно, внутрисуставно, интрапростатически, внутриплеврально, интратрахеально, интраназально, интравитреально, интравагинально, интраректально, наружно, внутриопухолево, перитонеально, подкожно, субконъюнктивально, интравезикулярно, через слизистую оболочку, интраперикардиально, внутрипуповинно, внутриглазно, перорально, местно, путем ингаляции, инъекции или инфузии.

264. Способ по любому из вариантов осуществления 242-263, отличающийся тем, что субъекта лечат вторым терапевтическим агентом.

265. Способ по варианту осуществления 264, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой противовирусный агент.

266. Способ по варианту осуществления 264, отличающийся тем, что противовирусный агент выбран из пимовидира, осельтамивира, занамивира, перамивира, ланинамивира, амантадина или римантадина.

267. Способ согласно варианту осуществления 266, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой противовирусную вакцину.

268. Способ по варианту осуществления 267, отличающийся тем, что противовирусная вакцина вызывает у субъекта иммунный ответ против вируса гриппа A, B или C или вируса парагриппа.

269. Способ по варианту осуществления 265, отличающийся тем, что противовирусный агент представляет собой балоксавир.

270. Способ по варианту осуществления 265, отличающийся тем, что конъюгат и балоксавир вводят последовательно.

271. Способ согласно варианту осуществления 265, отличающийся тем, что конъюгат и балоксавир вводят одновременно.

272. Способ по любому из вариантов осуществления 242-271, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-II-6).

273. Способ по варианту осуществления 272, отличающийся тем, что R_7 выбран из C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила.

274. Способ по варианту осуществления 272 или 273, отличающийся тем, что R_7 выбран из метила, этила, пропила или бутила.

275. Способ по варианту осуществления 272-274, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-II-7).

276. Способ по любому из вариантов осуществления 242-275, отличающийся тем, что каждый E имеет последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 63-68.

277. Способ по любому из вариантов осуществления 242-275, отличающийся тем, что каждый E имеет последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73.

278. Способ по любому из вариантов осуществления 242-275, отличающийся тем, что каждый E имеет последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 77.

279. Способ по любому из вариантов осуществления 242–275, отличающийся тем, что конъюгат представляет собой конъюгат 45 или конъюгат 46.

280. Способ лечения или профилактики вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту:

a) конъюгата или композиции по любому из вариантов осуществления 1-241; и

b) второго терапевтического агента.

281. Способ по варианту осуществления 280, отличающийся тем, что конъюгат вводят субъекту после того, как субъект перенес вирусную инфекцию, предположительно имеет вирусную инфекцию или он подвергся воздействию вируса.

282. Способ по варианту осуществления 280, отличающийся тем, что конъюгат вводят субъекту профилактически.

283. Способ по любому из вариантов осуществления 278-282, отличающийся тем, что второй терапевтический агент вводят субъекту после того, как субъект перенес вирусную инфекцию, предположительно имеет вирусную инфекцию или подвергся воздействию вируса.

284. Способ по любому из вариантов осуществления 278-283, отличающийся тем, что второй терапевтический агент вводят субъекту профилактически.

285. Способ по любому из вариантов осуществления 278-284, отличающийся тем, что второй терапевтический агент вводят в течение 2 дней после введения конъюгата.

286. Способ по любому из вариантов осуществления 278-285, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой противовирусной агент.

287. Способ по варианту осуществления 286, отличающийся тем, что противовирусный агент представляет собой пимовидир, осельтамивир, занамивир, перамивир, ланинамивир, амантадин, балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту, римантадин или их фармацевтически приемлемую соль.

288. Способ по варианту осуществления 287, отличающийся тем, что противовирусный агент представляет собой балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

289. Способ по любому из вариантов осуществления 288, отличающийся тем, что балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их фармацевтически приемлемую соль вводят в количестве от 20 мг до 90 мг.

290. Способ по варианту осуществления 286, отличающийся тем, что балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их фармацевтически приемлемую соль вводят перорально.

291. Способ по варианту осуществления 289 или 290, отличающийся тем, что балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их фармацевтически приемлемую соль вводят в виде однократной дозы.

292. Способ по варианту осуществления 289 или 290, отличающийся тем, что балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их фармацевтически приемлемую соль вводят в виде более чем одной дозы.

293. Способ по любому из вариантов осуществления 289-292, отличающийся тем, что балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их фармацевтически приемлемую соль вводят в количестве от 20 мг до 40 мг.

294. Способ по любому из вариантов осуществления 289- 292, отличающийся тем, что балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту или их фармацевтически приемлемую соль вводят в количестве от 30 до 80 мг.

295. Способ по любому из вариантов осуществления 278-294, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-II-6).

296. Способ по варианту осуществления 295, отличающийся тем, что R_7 выбран из C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила.

297. Способ по варианту осуществления 295 или 296, отличающийся тем, что R_7 выбран из метила, этила, пропила или бутила.

298. Способ по любому из вариантов осуществления 295-297, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-II-7).

299. Способ по любому из вариантов осуществления 280-298, отличающийся тем, что каждый E имеет последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 63-68.

300. Способ по варианту осуществления 299, отличающийся тем, что каждый E имеет последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73.

301. Способ по варианту осуществления 300, отличающийся тем, что каждый E имеет последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 77.

302. Способ по любому из вариантов осуществления 280–298, отличающийся тем, что конъюгат представляет собой конъюгат 45 или конъюгат 46.

303. Способ по любому из вариантов осуществления 280-302, отличающийся тем, что конъюгат вводят внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутриочагово, внутричерепно, внутрисуставно, интрапростатически, внутриплеврально, интратрахеально, интраназально, интравитреально, интравагинально, интраректально, наружно, внутриопухолево, перитонеально, подкожно, субконъюнктивально, интравезикулярно, через слизистую оболочку, интраперикардиально, внутрипуповинно, внутриглазно, перорально, местно, путем ингаляции, инъекции или инфузии.

304. Способ по варианту осуществления 303, отличающийся тем, что конъюгат вводят внутривенно.

305. Способ по варианту осуществления 303, отличающийся тем, что конъюгат вводят подкожно.

306. Способ по варианту осуществления 303, отличающийся тем, что конъюгат вводят внутримышечно.

307. Способ по любому из вариантов осуществления 280-306, отличающийся тем, что вирусная инфекция вызвана вирусом гриппа или вирусом парагриппа.

308. Способ по варианту осуществления 307, отличающийся тем, что вирус представляет собой вирус гриппа A, B или C или вирус парагриппа.

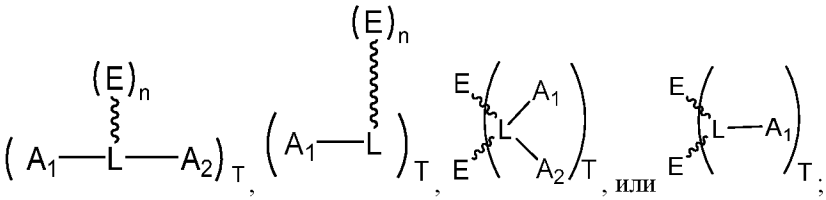
ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Хотя изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами реализации, понятно, что возможны дополнительные модификации и предполагается, что данная заявка включает любые вариации, применения или адаптации изобретения, согласующиеся, в общем случае, с принципами изобретения и включающие такие отклонения от изобретения, которые относятся к компетенции известной или общепринятой практики в области техники, к которой относится изобретение и которое может быть применено к существенным признакам, изложенным выше, и вытекающим из объема формулы изобретения. Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые выше в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки во всей их полноте.

В данном документе представлены подробные описания одного или более предпочтительных вариантов осуществления. Однако следует понимать, что настоящее изобретение может быть воплощено в различных формах. Таким образом, конкретные подробности, описанные в данном документе, не следует интерпретировать как ограничивающие, а скорее как основу для формулы изобретения и как репрезентативную основу для обучения специалиста в данной области применению настоящего изобретения любым подходящим способом.

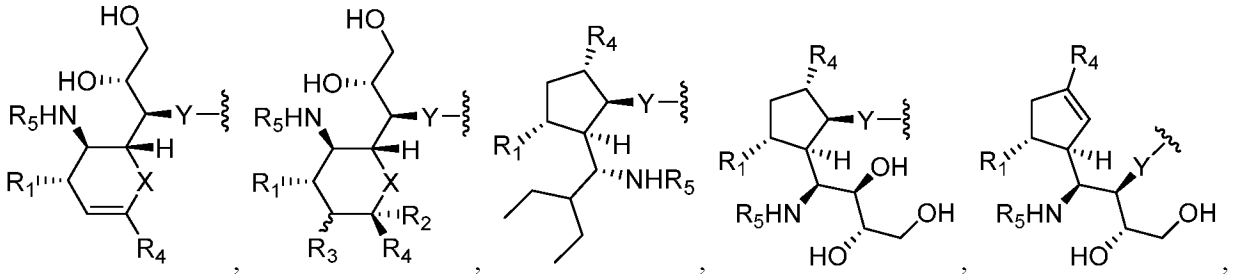
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, описываемый любой из формул (D-I), (M-I), (1) или (2):

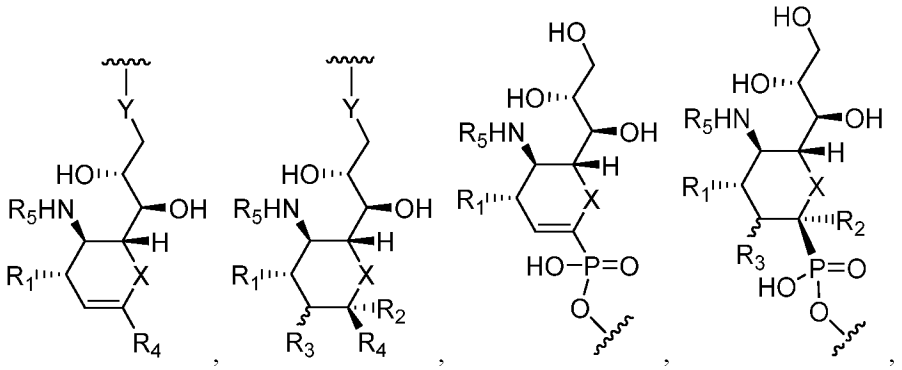


(D-I) (M-I) (1) (2)

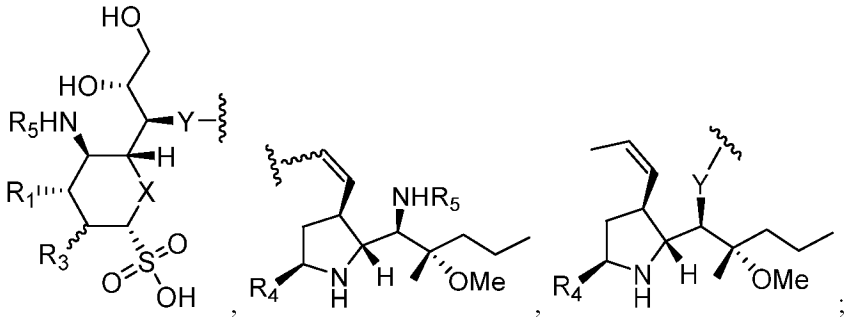
где каждый A_1 и каждый A_2 независимо описан формулой (A-I)-(A-XII):



(A-I) (A-II) (A-III) (A-IV) (A-V)



(A-VI) (A-VII) (A-VIII) (A-IX)



(A-X) (A-XI) (A-XII)

где R_1 выбран из -OH, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$ и $-NHC(=NH)NHR_6$;

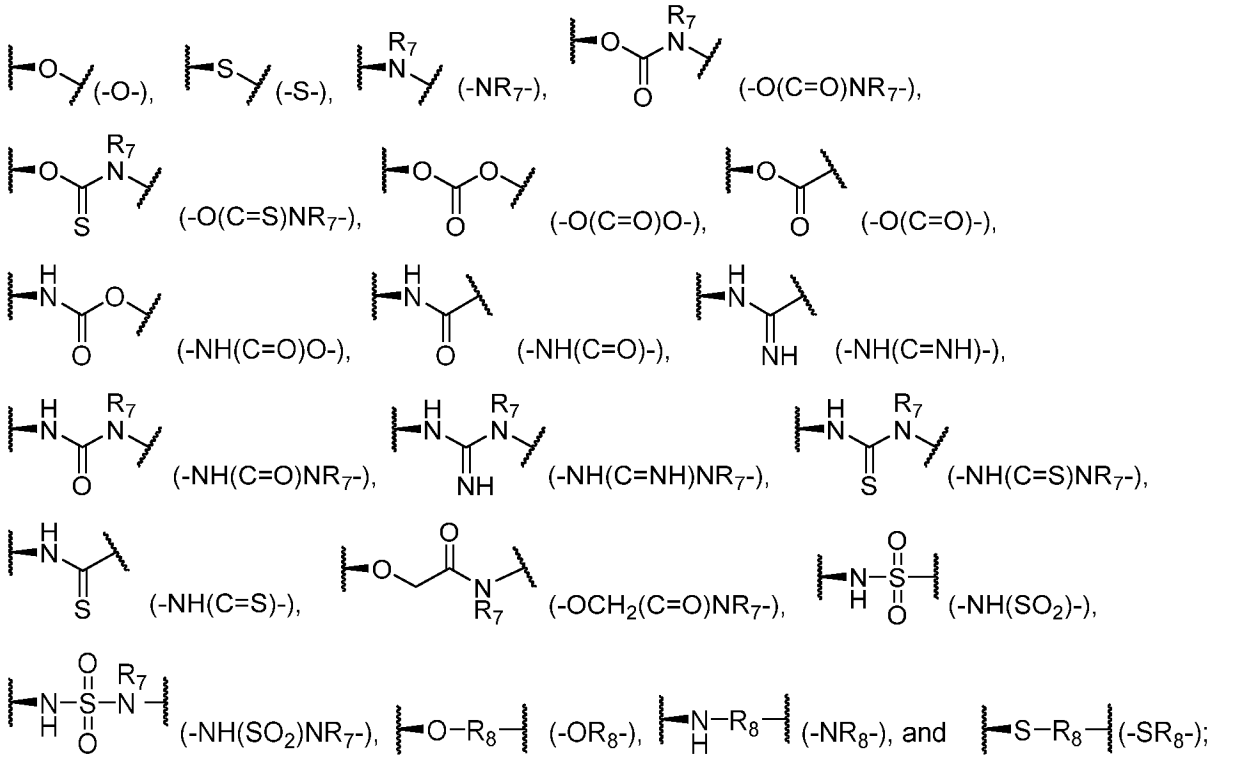
R_2 и R_3, каждый независимо, выбраны из -H, -OH, -F, -Cl и -Br;

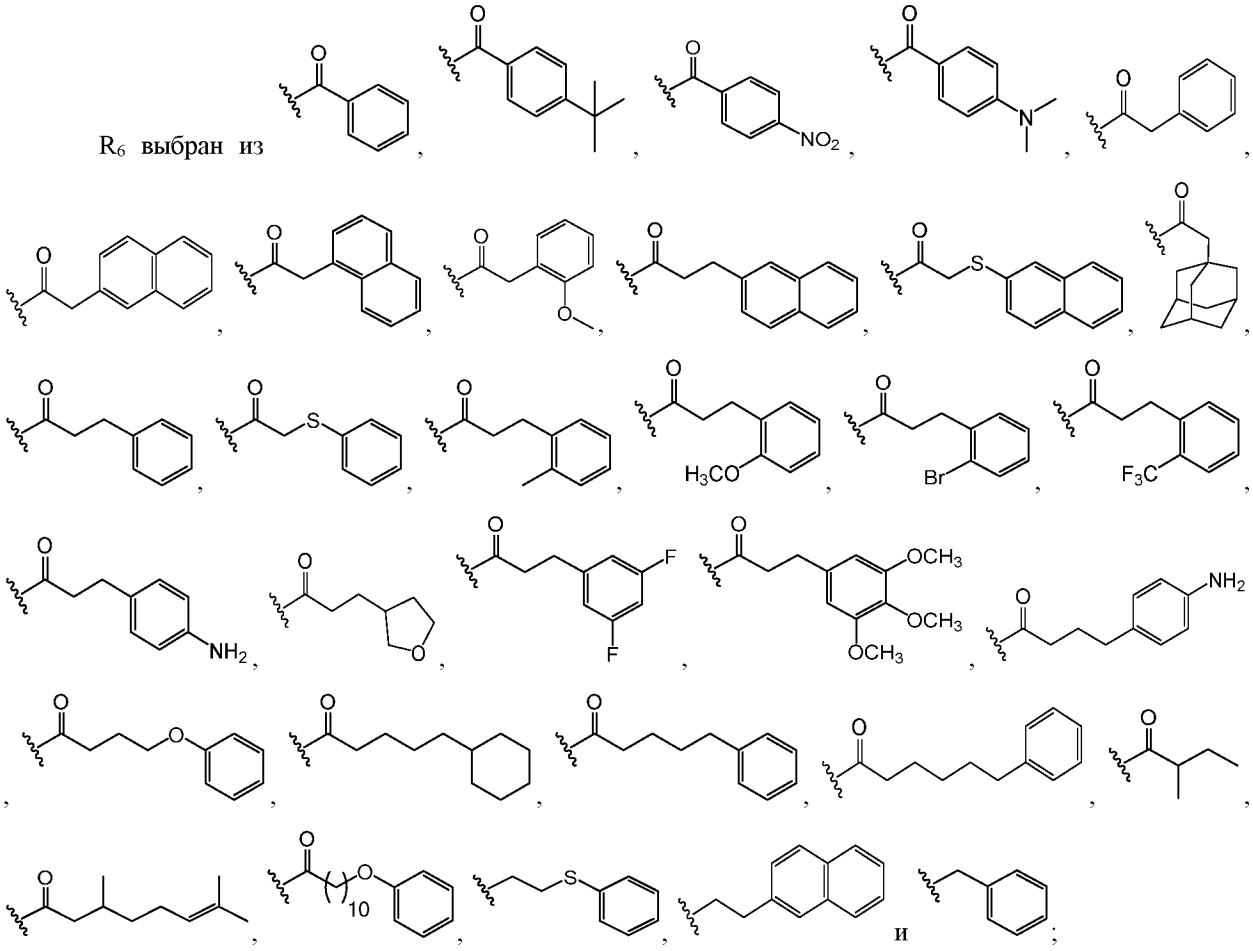
R_4 выбран из $-CO_2H$, $-P(=O)(OH)_2$, $-SO_3H$;

R_5 выбран из $-COCH_3$, $-COCF_3$, $-SO_2CH_3$;

X выбран из -O- и -S-;

Y выбран из:



R_6 выбран из 

R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

R_8 выбран из C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

n равно 1 или 2;

каждый E содержит мономер Fc-домена, белок альбумин, связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид;

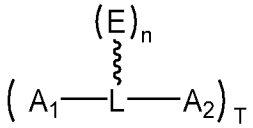
L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к E и к каждому Y каждого A_1 или каждого A_1 и A_2;

T является целым числом от 1 до 20, и

каждая волнистая линия в формулах (D-I), (M-I), (1) или (2) указывает, что L ковалентно присоединен к каждому E;

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-I):



(D-I)

где каждый A_1 и каждый A_2 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII);

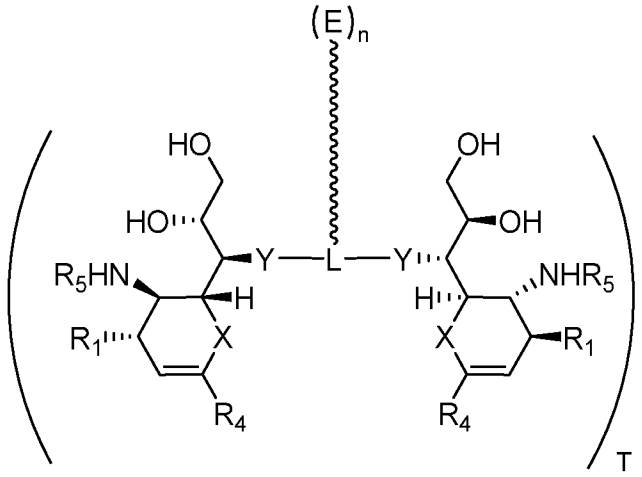
каждый E содержит мономер Fc-домена, белок альбумин,
связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид;

n равно 1 или 2;

T является целым числом от 1 до 20; и

волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что L каждого A_1-L-A_2 ковалентно присоединен к E,
или его фармацевтически приемлемая соль.

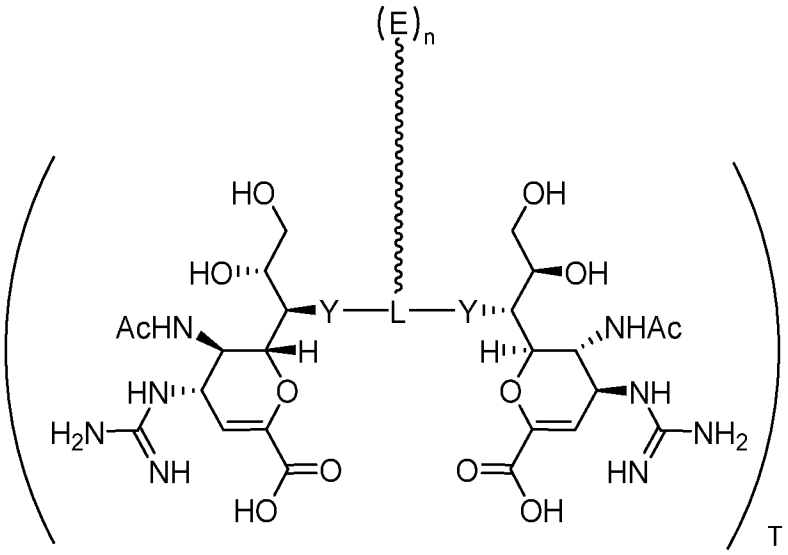
3. Конъюгат по любому из пп. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (D-II):



(D-II)

или его фармацевтически приемлемая соль.

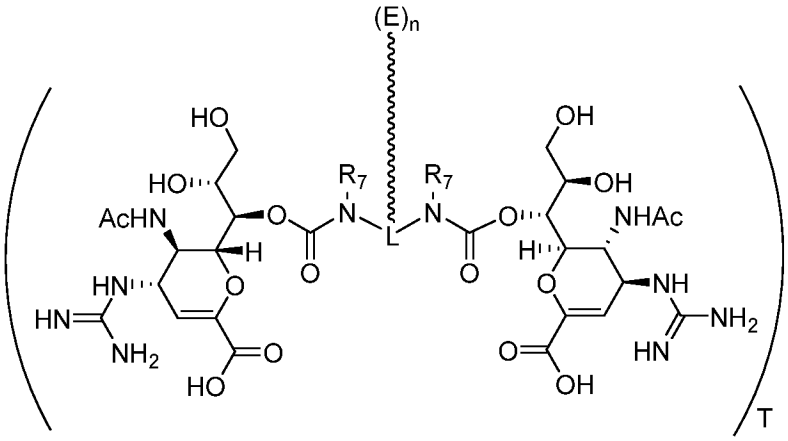
4. Конъюгат по п. 3, причем конъюгат описан формулой (D-II-1):



(D-II-1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Конъюгат по п. 4, причем конъюгат описан формулой (D-II-6):



(D-II-6)

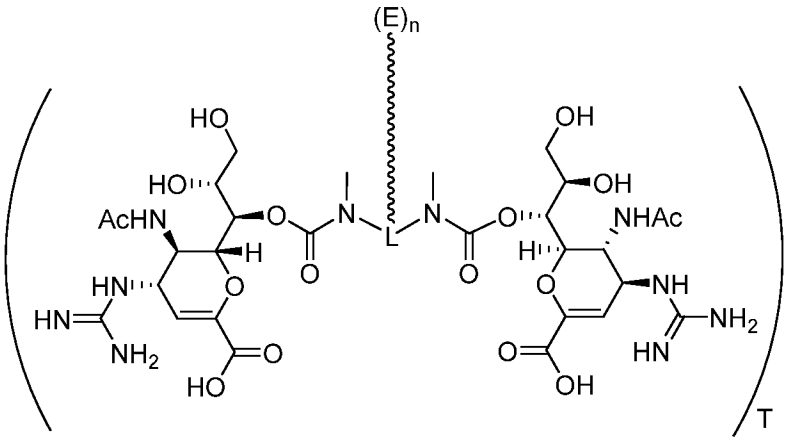
где R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

или его фармацевтически приемлемая соль.

6. Конъюгат по п. 5, где R_7 выбран из C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арил и C2-C15 гетероарила.

7. Конъюгат по п. 5 или п. 6, отличающийся тем, что R_7 выбран из метила, этила, пропила или бутила.

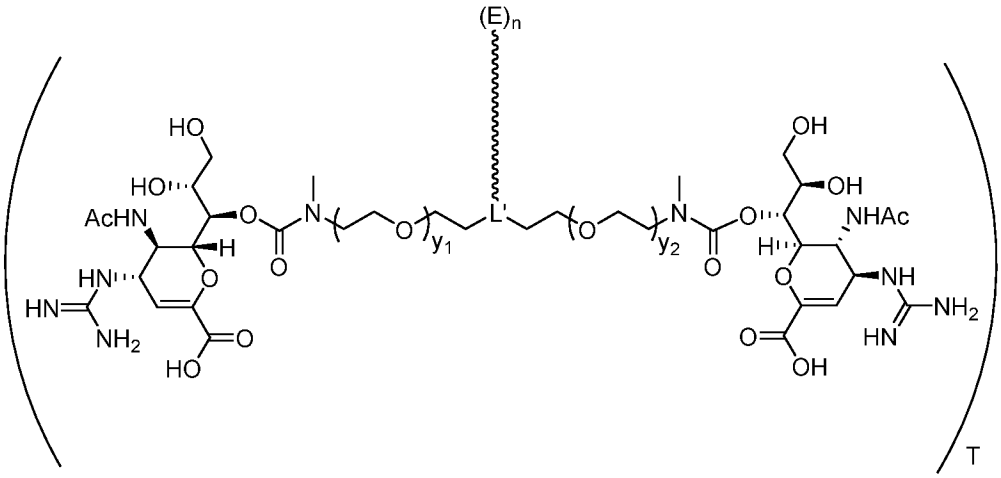
8. Конъюгат по любому из пп. 5-7, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-II-7):



(D-II-7)

или его фармацевтически приемлемая соль.

9. Конъюгат по п. 8, причем конъюгат описан формулой (D-II-8):



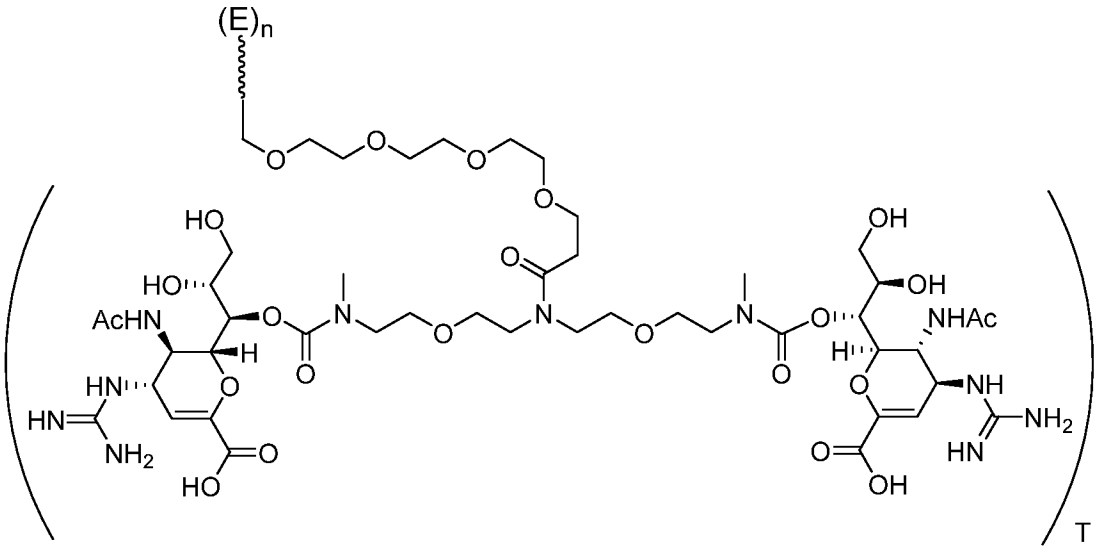
(D-II-8)

где L' представляет собой остаток от L, и

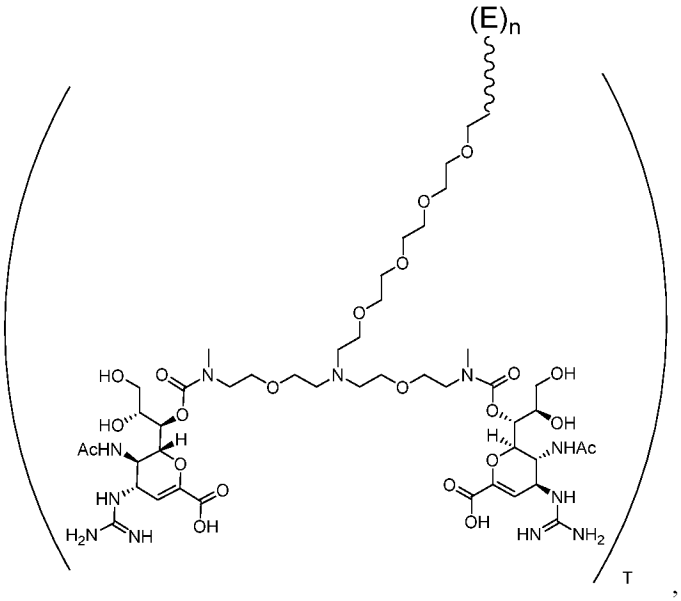
y_1 и y_2, каждый независимо, являются целыми числами от 1 до 20;

или его фармацевтически приемлемая соль.

10. Конъюгат по п. 9, причем конъюгат имеет структуру



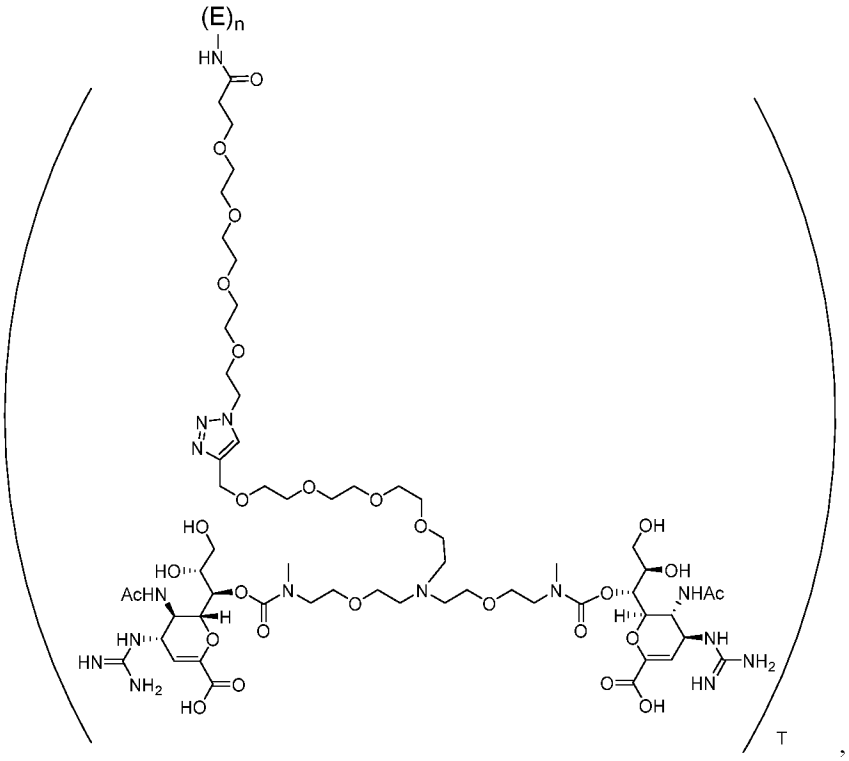
или



,

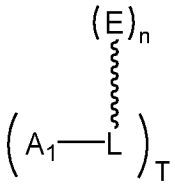
или его фармацевтически приемлемая соль.

11. Конъюгат по п. 10, причем конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

12. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-I):



(M-I)

где каждый A_1 независимо выбран из любой из формул (A-I)-(A-XII);

каждый E содержит мономер Fc-домена, белок альбумин,

связывающий белок альбумин пептид или Fc-связывающий пептид;

n равно 1 или 2;

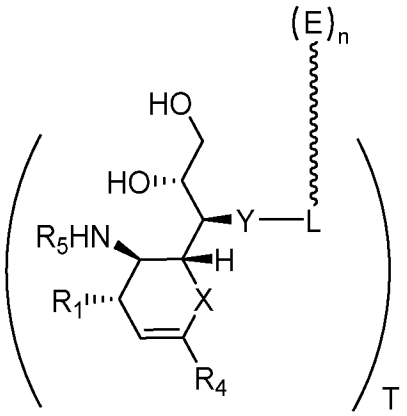
T является целым числом от 1 до 20; и

L представляет собой линкер, ковалентно присоединенный к каждому из E и A_1,

волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что L каждого A_1-L ковалентно присоединен к E;

или его фармацевтически приемлемая соль.

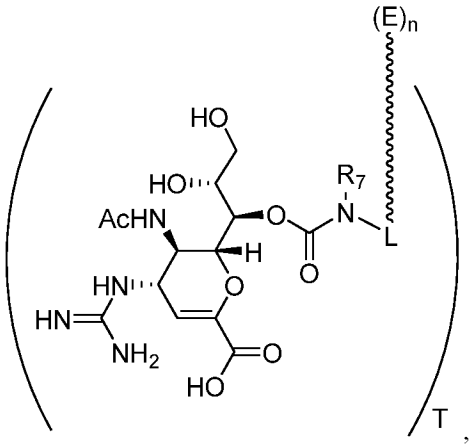
13. Конъюгат по п. 12, отличающийся тем, что указанный конъюгат описан формулой (M-II):



(M-II)

или его фармацевтически приемлемая соль.

14. Конъюгат по п. 13, причем конъюгат описан формулой (M-II-6):



(M-II-6)

где R_7 выбран из H, C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила;

или его фармацевтически приемлемая соль.

15. Конъюгат по п. 14, где R_7 выбран из C1-C20 алкила, C3-C20 циклоалкила, C3-C20 гетероциклоалкила; C5-C15 арила и C2-C15 гетероарила.

16. Конъюгат по п. 14 или п. 15, отличающийся тем, что R_7 выбран из метила, этила, пропила или бутила.

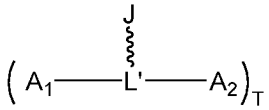
17. Конъюгат по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что L каждого A_1-L или каждого A_1-L-A_2 ковалентно присоединен к атому азота подвергнутого воздействию растворителя лизина E.

18. Конъюгат по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что волнистая линия, соединенная с E, указывает на то, что L каждого A_1-L или каждого A_1-L-A_2 L ковалентно присоединен к атому серы подвергнутого воздействию растворителя цистеина E.

19. Конъюгат по любому из пп. 1-18, в котором каждый E представляет собой мономер Fc-домена.

20. Конъюгат по п. 19, в котором n равно 2, и каждый E димеризуется с образованием Fc-домена.

21. Конъюгат по п. 2, отличающийся тем, что n равен 2, каждый E представляет собой мономер домена Fc, каждый E димеризуется с образованием домена Fc, а конъюгат описан формулой (D-I-1):



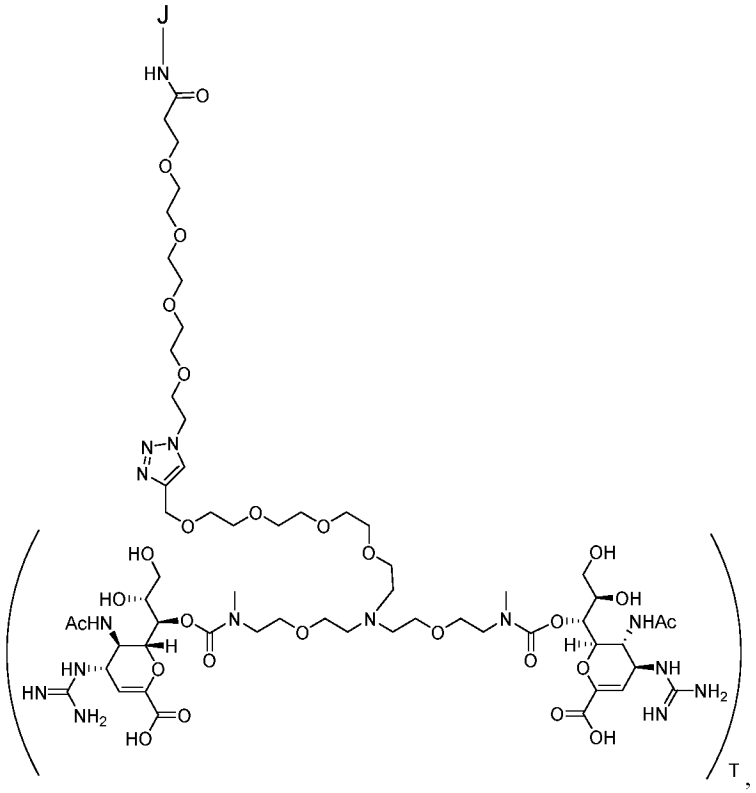
(D-I-1)

где J представляет собой Fc-домен; и

T является целым числом от 1 до 20,

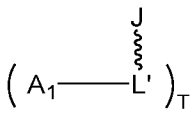
или его фармацевтически приемлемая соль.

22. Конъюгат по п. 21, причем конъюгат имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

23. Конъюгат по п. 12, отличающийся тем, что n равен 2, каждый E представляет собой мономер домена Fc, каждый E димеризуется с образованием домена Fc, а конъюгат описан формулой (M-I-1):



(M-I-1)

где J представляет собой Fc-домен; и

T является целым числом от 1 до 20,

или его фармацевтически приемлемая соль.

24. Конъюгат по любому из пп. 19-23, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 1-138.

25. Конъюгат по п. 24, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности любой из SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95.

26. Конъюгат по п. 25, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72.

27. Конъюгат по п. 25, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73.

28. Конъюгат по п. 25, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

29. Конъюгат по п. 25, отличающийся тем, что каждый E содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

30. Конъюгат по любому из пп. 19-29, в котором T равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10.

31. Совокупность конъюгатов по любому из пп. 19-29, отличающаяся тем, что среднее значение T составляет от 1 до 10, от 5 до 10, от 1 до 5, от 3 до 7 или от 3,5 до 5,5.

32. Совокупность конъюгатов по любому из пп. 19-29, отличающаяся тем, что среднее значение T составляет около 4,5.

33. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат или совокупность конъюгатов по любому из пп. 1-32, или их фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый эксципиент.

34. Способ лечения субъекта, имеющего вирусную инфекцию или предположительно имеющего вирусную инфекцию, включающий введение субъекту эффективного количества конъюгата, популяции конъюгатов или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-33.

35. Способ профилактического лечения вирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества конъюгата, совокупности конъюгатов или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-33.

36. Способ по п. 34 или п. 35, отличающийся тем, что вирусная инфекция вызвана вирусом гриппа или вирусом парагриппа.

37. Способ профилактики вторичной инфекции у субъекта, у которого диагностирована инфекция гриппа, включающий введение субъекту конъюгата, популяции конъюгатов или фармацевтической композиции по любому из пп. 1-33.

38. Способ по любому из пп. 34-37, в котором что субъекта лечат вторым терапевтическим средством.

39. Способ лечения или профилактики вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту:

a) конъюгата, совокупности конъюгатов или композиции по любому из пп. 1-33; и

b) второго терапевтического агента.

40. Способ по любому из пп. 38 или 39, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой противовирусный агент.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что противовирусный агент представляет собой пимовидир, осельтамивир, занамивир, перамивир, ланинамивир, амантадин, балоксавир марбоксил, балоксавировую кислоту, римантадин или их фармацевтически приемлемую соль.

42. Способ по любому из пп. 39-41, отличающийся тем, что вирусная инфекция вызвана вирусом гриппа или вирусом парагриппа.

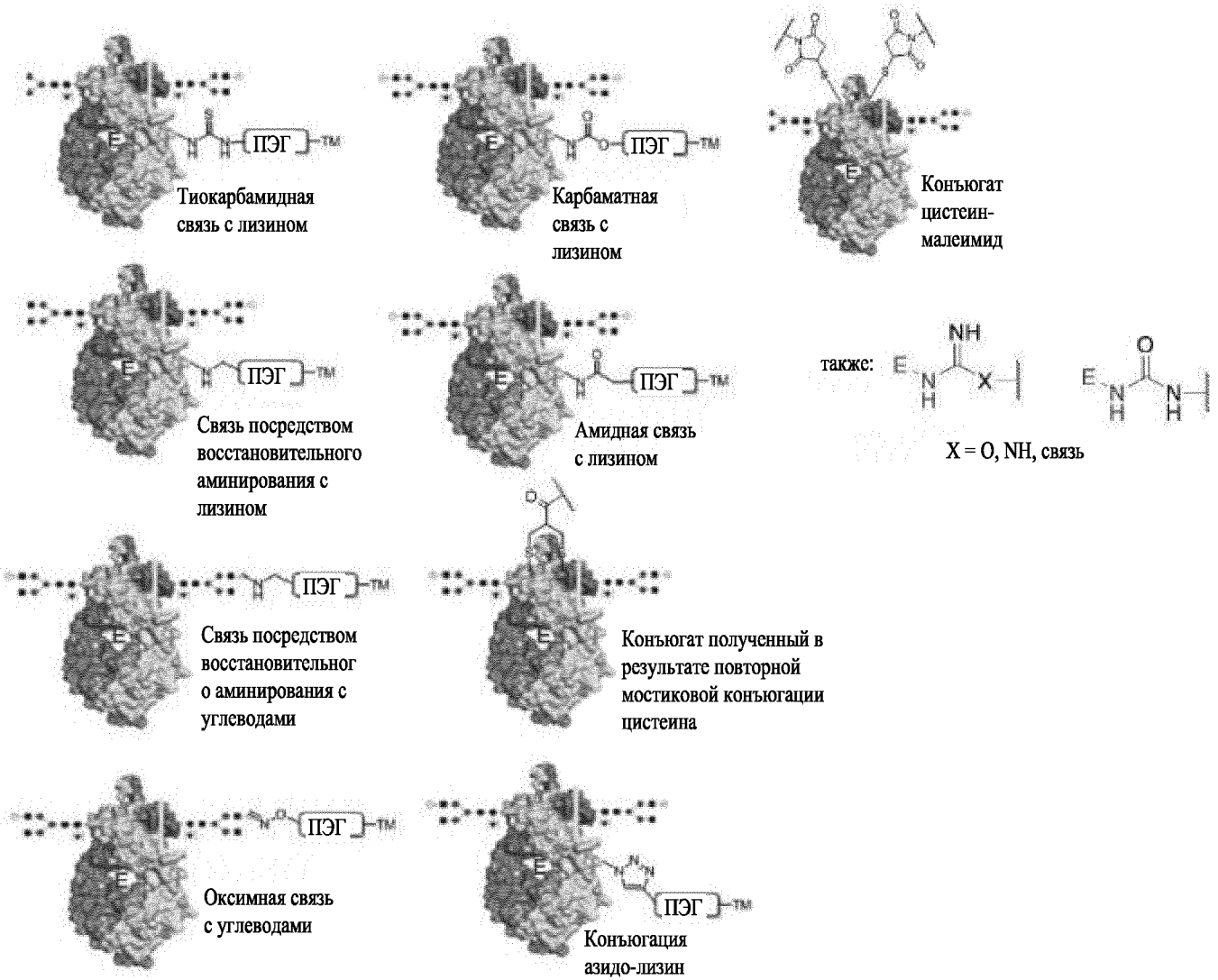
43. Способ по любому из пп. 34-42, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-II-6).

44. Способ по пп. 34-43, отличающийся тем, что конъюгат описан формулой (D-II-7).

45. Способ по любому из пп. 34-44, отличающийся тем, что каждый E имеет последовательность на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 72 или SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 77.

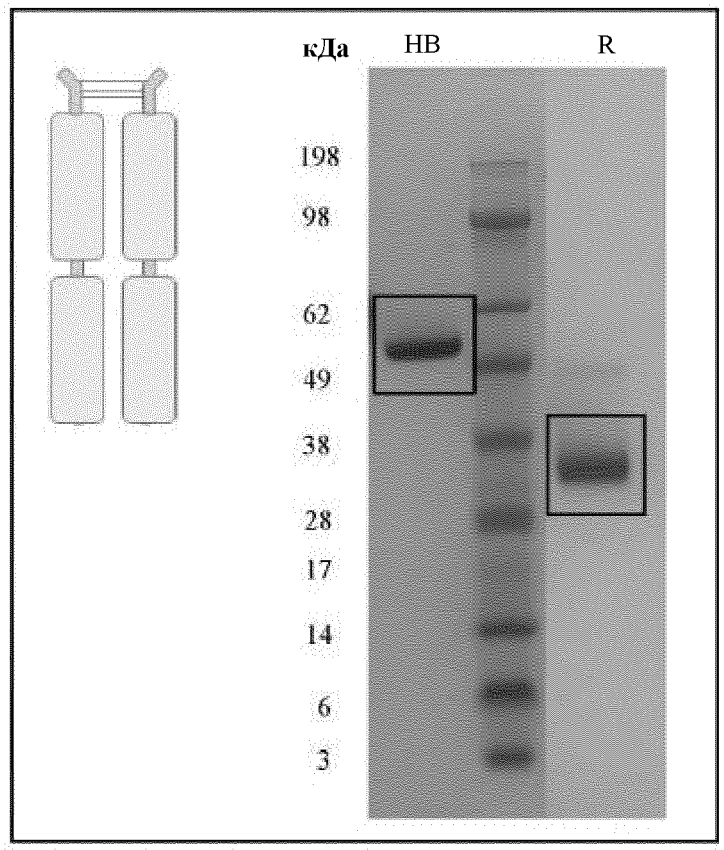
46. Способ по любому из пп. 34–45, отличающийся тем, что конъюгат представляет собой конъюгат 45 или конъюгат 46.

Фиг. 1


ПЭГ
Тиокарбамидная связь с лизином
Карбаматная связь с лизином
Конъюгат цистеин-малеимид
Связь посредством восстановительного аминирования с лизином
Амидная связь с лизином
также:
NH
X = O, NH, связь
Связь посредством восстановительного аминирования с углеводами
Конъюгат полученный в результате повторной мостиковой конъюгации цистеина
Оксимная связь с углеводами
Конъюгация азидо-лизин

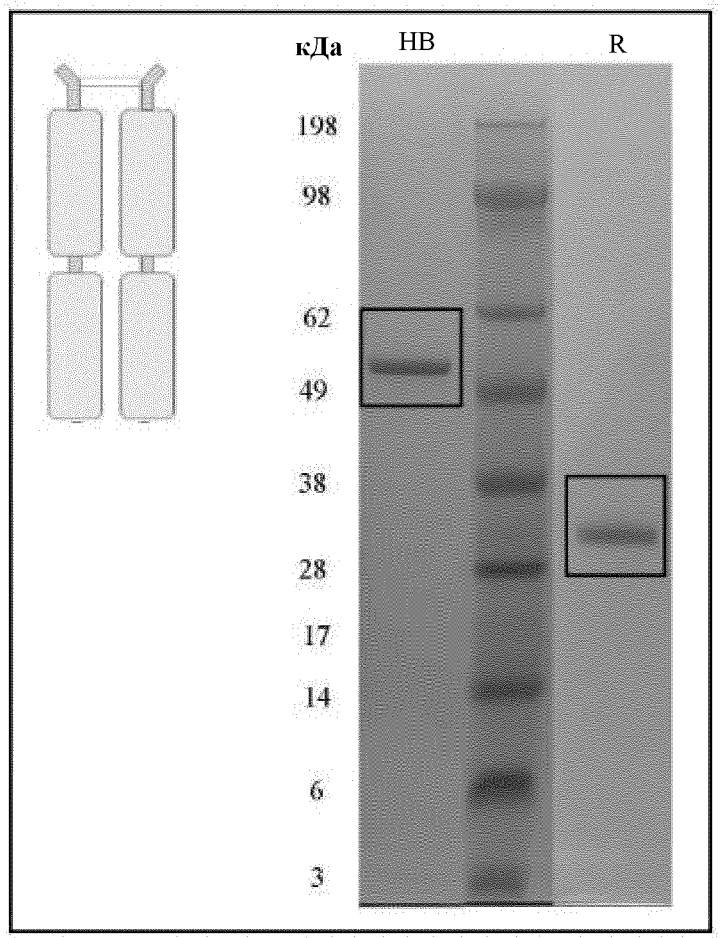
Фиг. 2

(SEQ ID NO: 1: мышиный Fc-lgG2a с сигнальной последовательностью IL2 на N-конце)



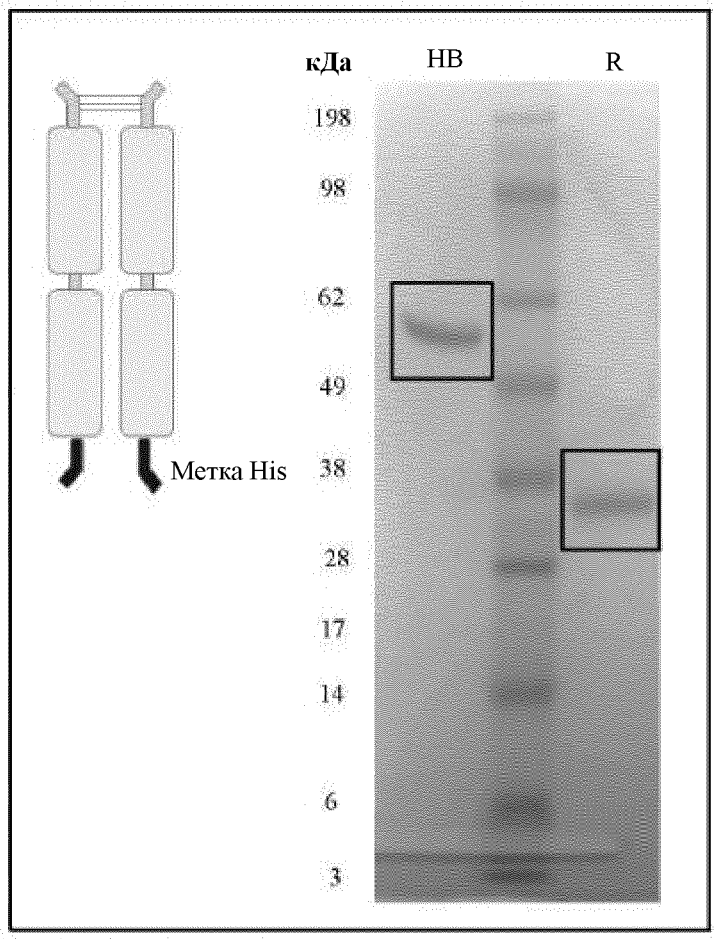
Фиг. 3

(SEQ ID NO: 3: человеческий Fc-lgG1 с сигнальной последовательностью IL2 на N-конце)



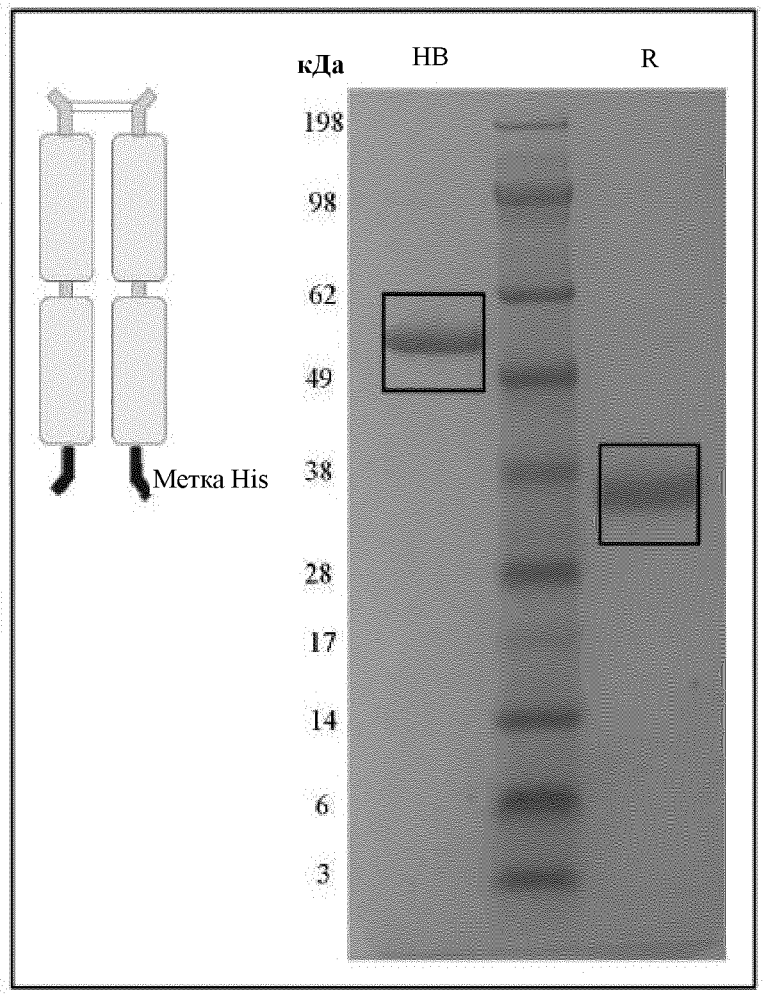
Фиг. 4

(SEQ ID NO: 5: мышиный Fc-lgG2a с сигнальной последовательностью IL2 на N-конце и гексагистидиновым пептидом на С-конце)



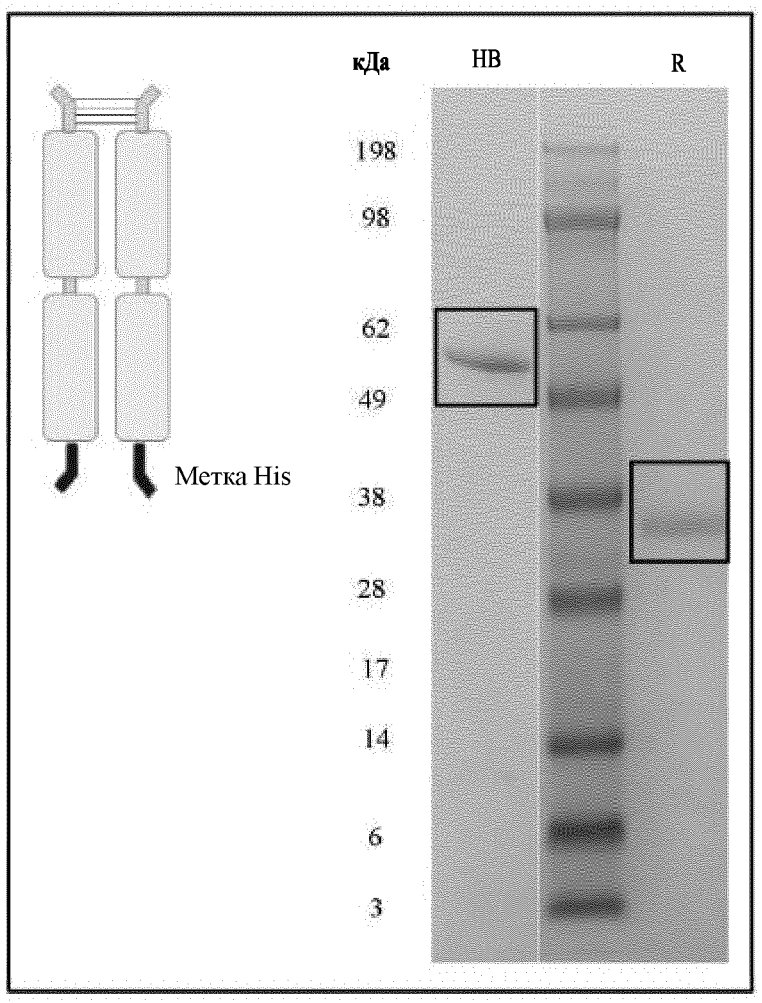
Фиг. 5

(SEQ ID NO: 7: человеческий Fc-lgG1 с сигнальной последовательностью IL2 на N-конце и гексагистидиновым пептидом на С-конце)



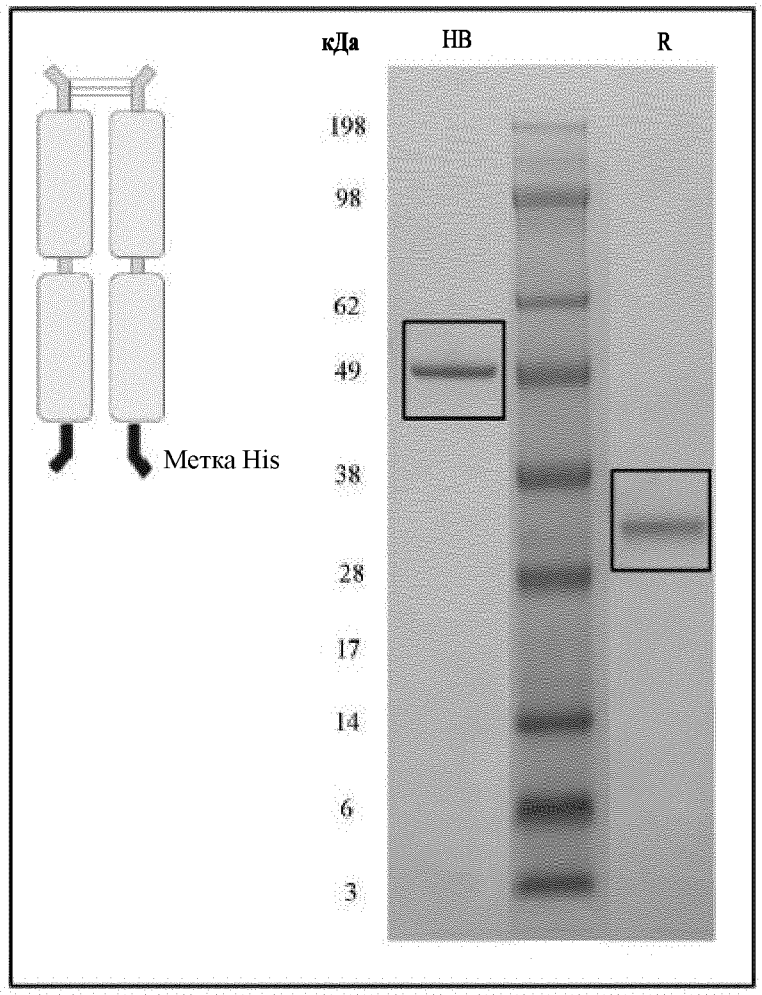
Фиг. 6

(SEQ ID NO: 9: человеческий Fc-lgG1 человека с сигнальной последовательностью IL2 на N-конце, двумя дополнительными цистеинами в шарнирной области и гексагистидиновым пептидом на С-конце)



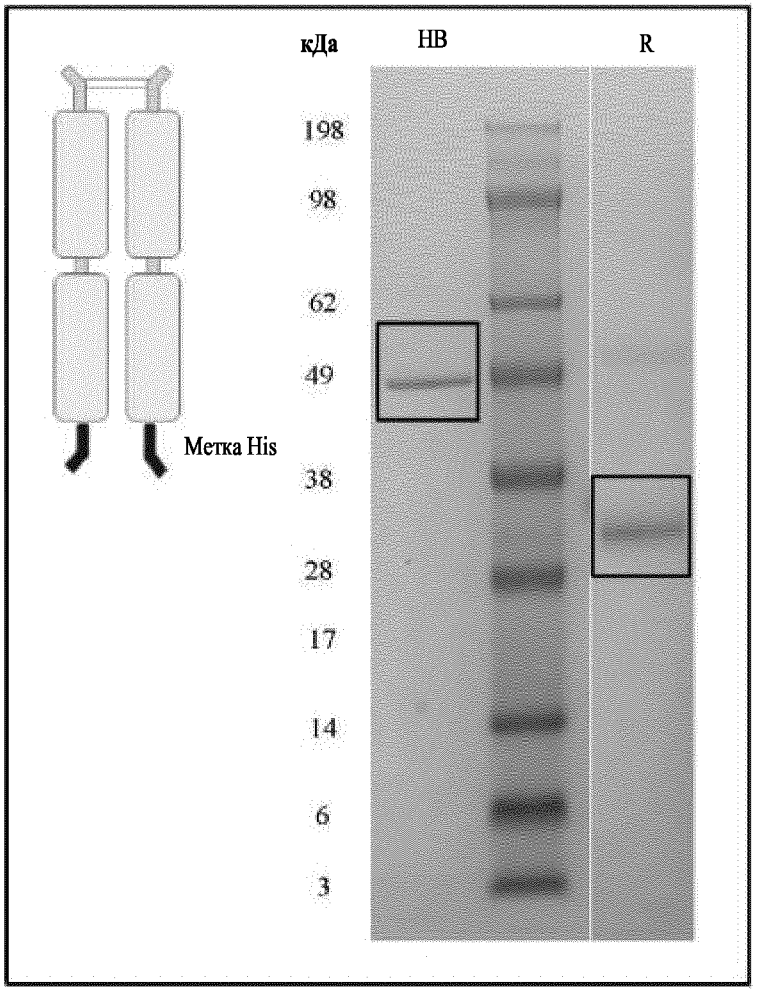
Фиг. 7

(SEQ ID NO: 12: мышиный Fc-lgG2a с сигнальной последовательностью IL2 на N-конце, заменой Asn на Ala и гексагистидиновым пептидом на С-конце)



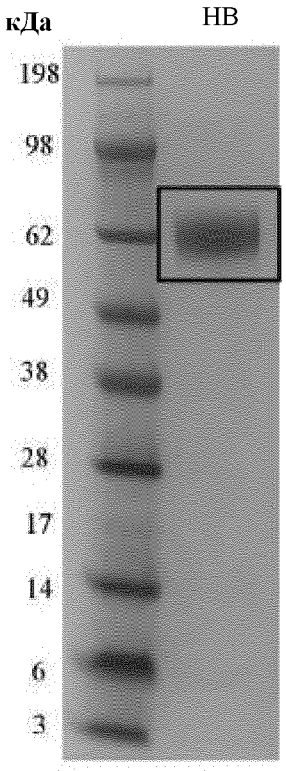
Фиг. 8

(SEQ ID NO: 14: человеческий Fc-IgG1 с сигнальной последовательностью IL2 на N-конце, заменой Asn на Ala и гексагистидиновым пептидом на С-конце)



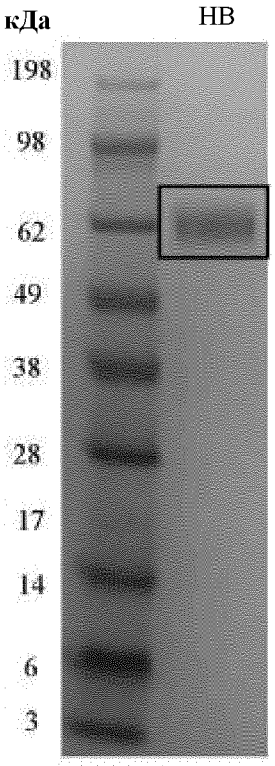
Фиг. 9

Конъюгат 1



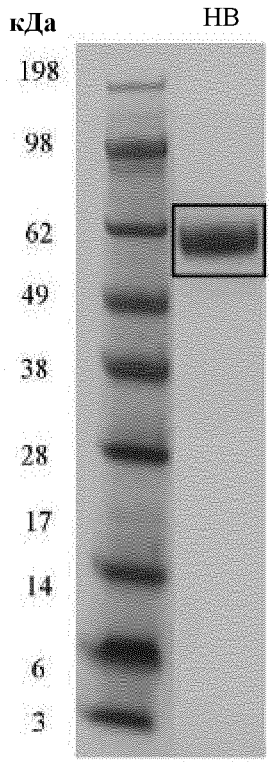
Фиг. 10

Конъюгат 2



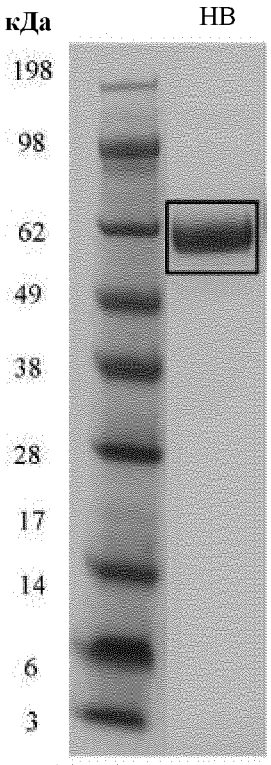
Фиг. 11

Конъюгат 3



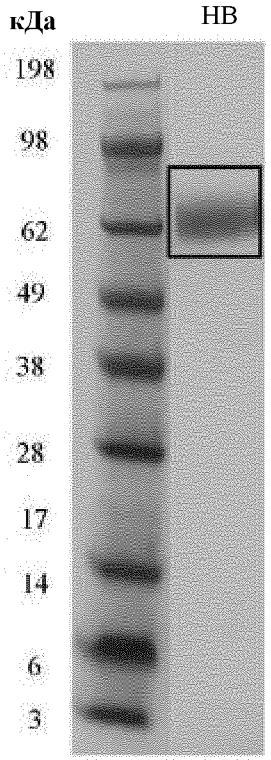
Фиг. 12

Конъюгат 4



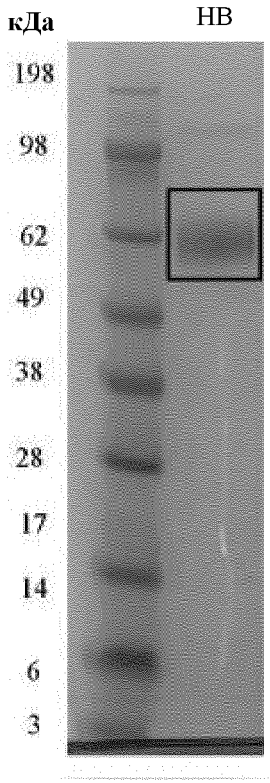
Фиг. 13

Конъюгат 5

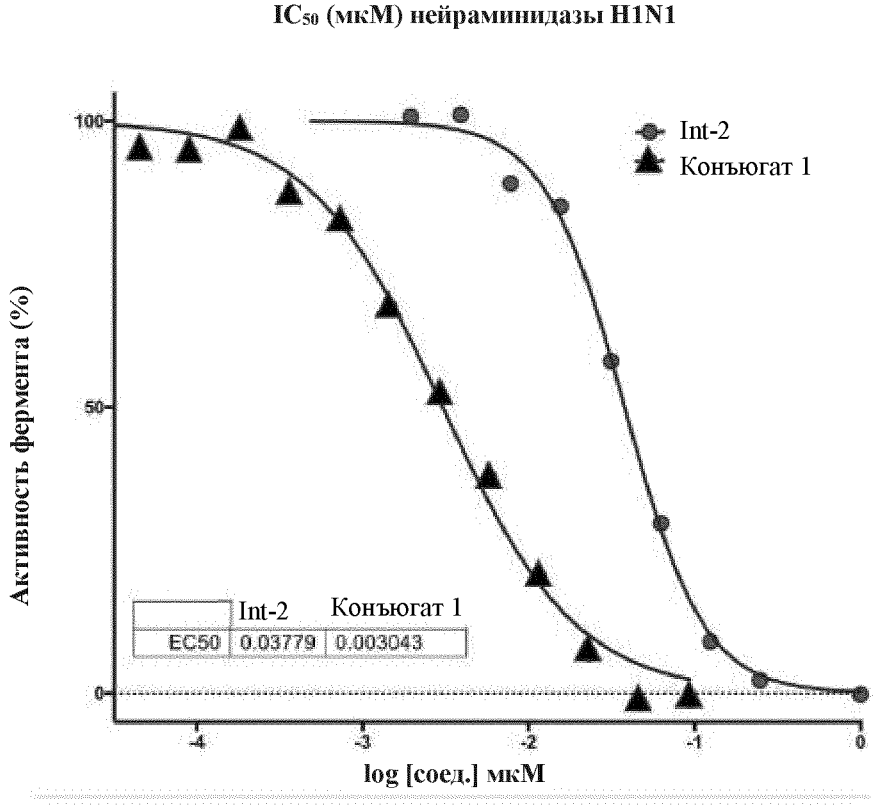


Фиг. 14

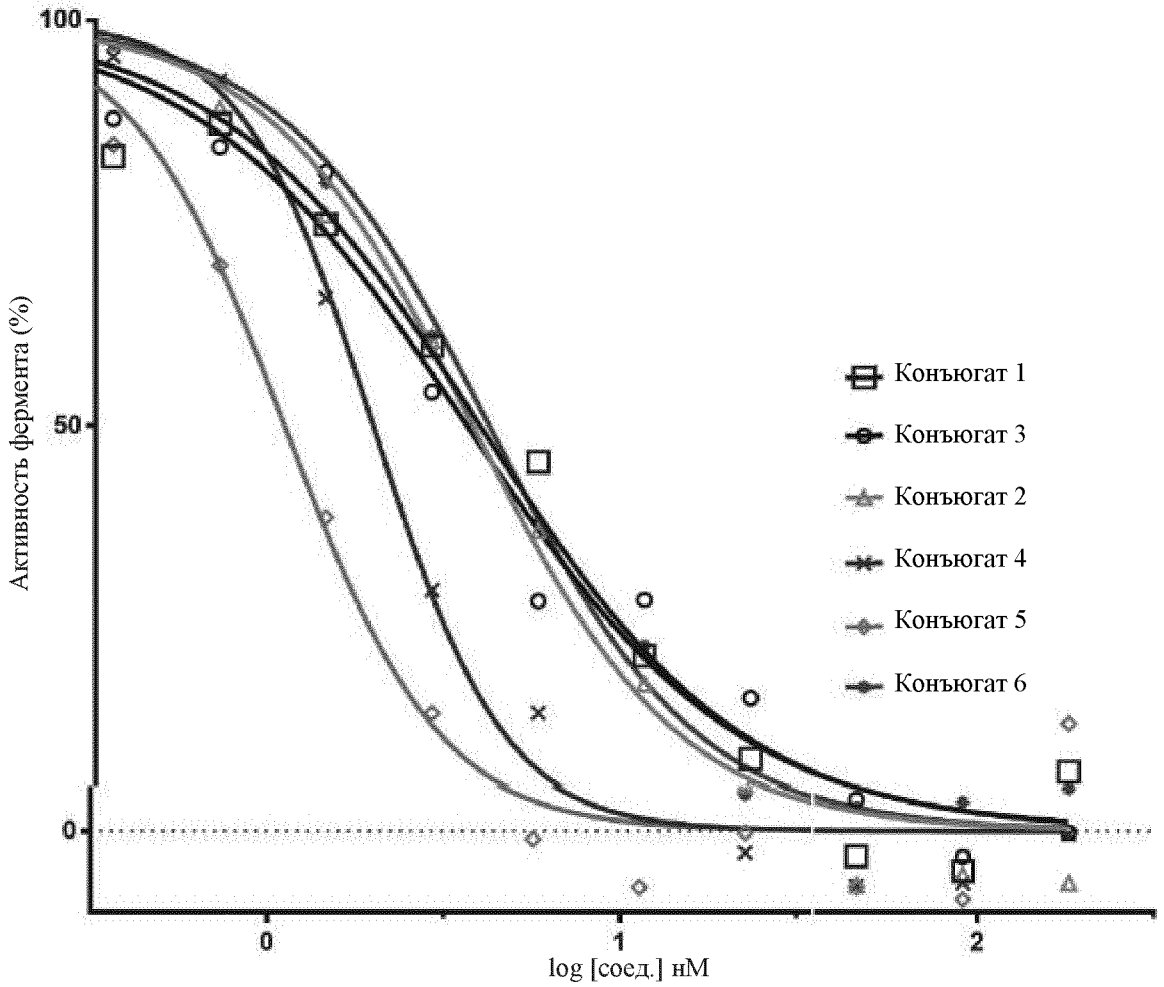
Конъюгат 6



Фиг. 15

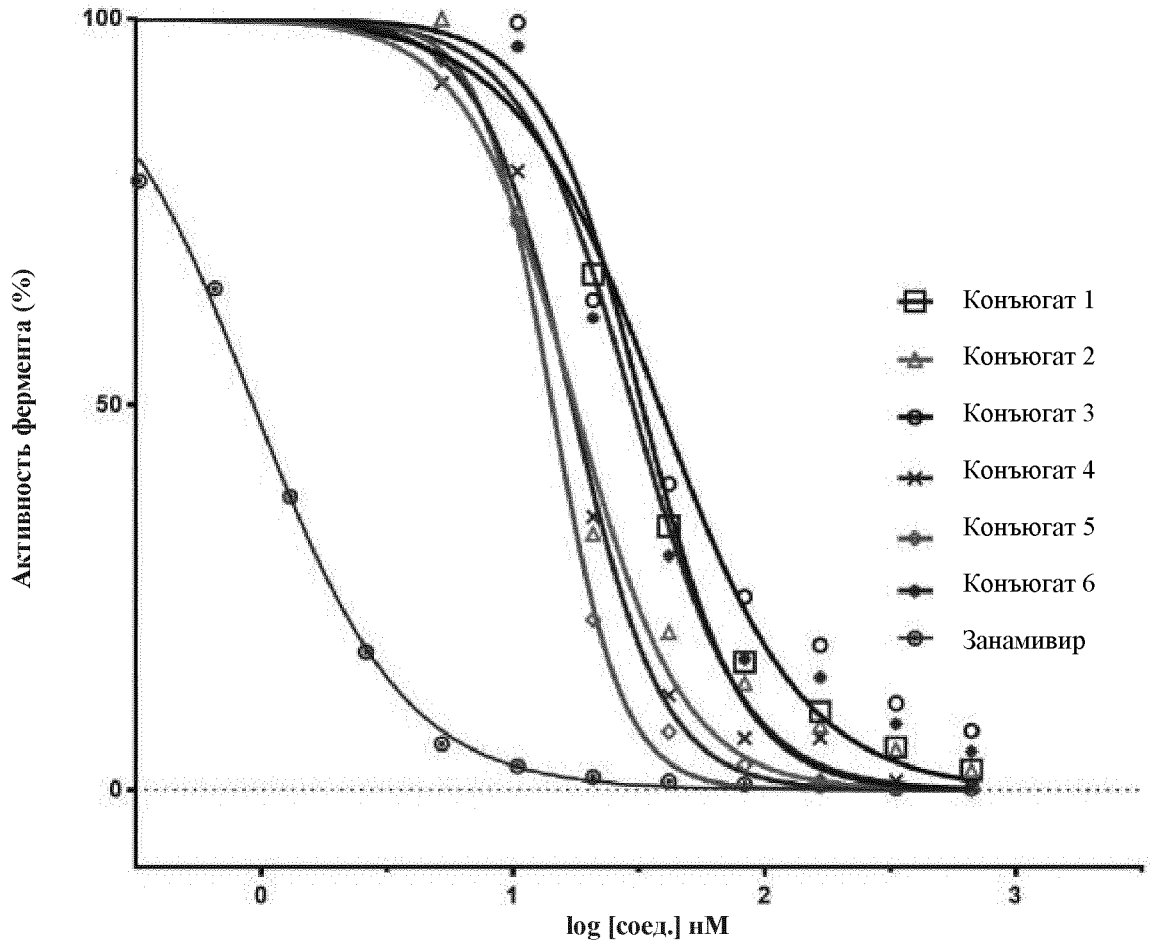

IC50 (мкМ) нейраминидазы H1N1
Активность фермента (%)
100
50
0
-4
-3
-2
-1
0
log [соед.] мкМ
Int-2
Конъюгат 1
Int-2
Конъюгат 1
EC50
0.03779
0.003043

Фиг. 16
IC_{50} (нМ) нейраминидазы H1N1

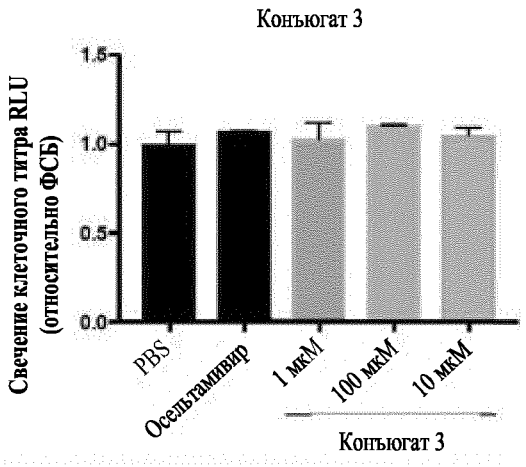


Фиг. 17

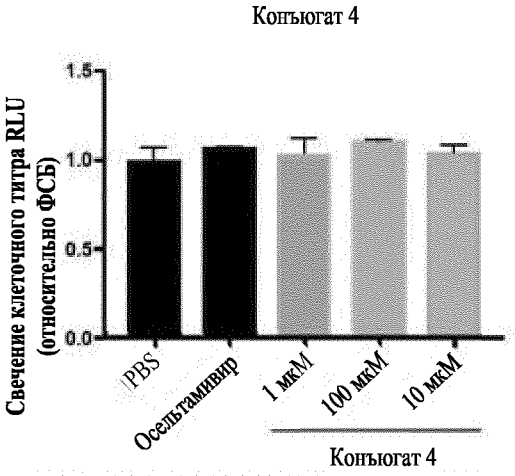
IC_{50} нейраминидазы H3N2 (нМ)



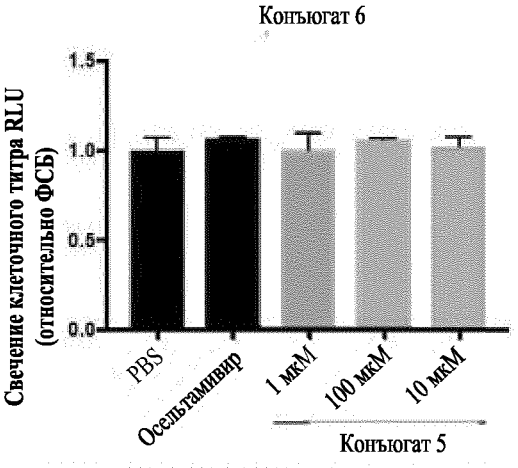
Фиг. 18A



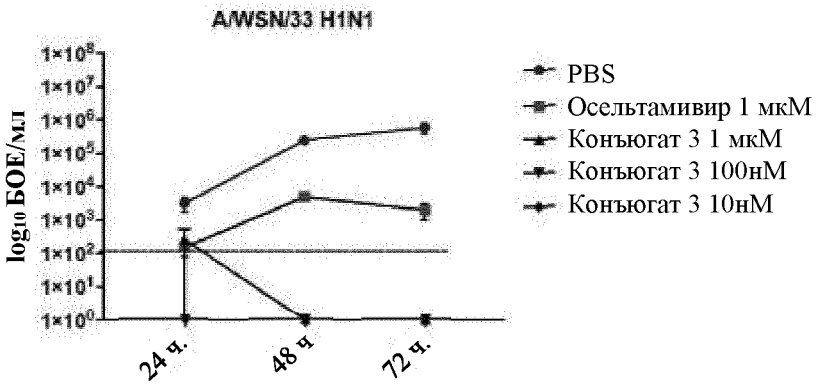
Фиг. 18B



Фиг. 18C

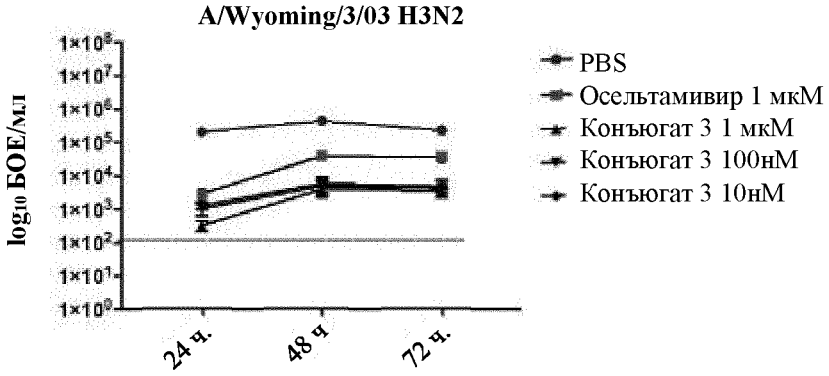


Фиг. 19A



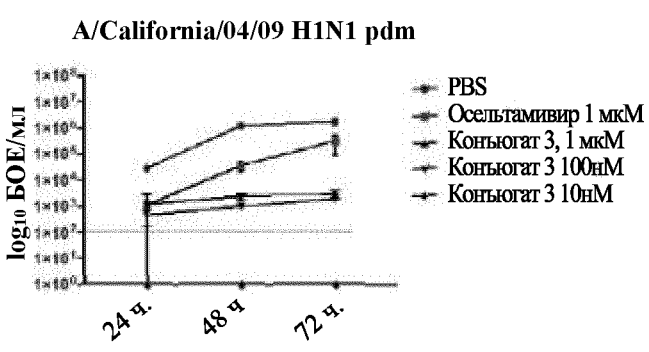
Часов после инфицирования

Фиг. 19B

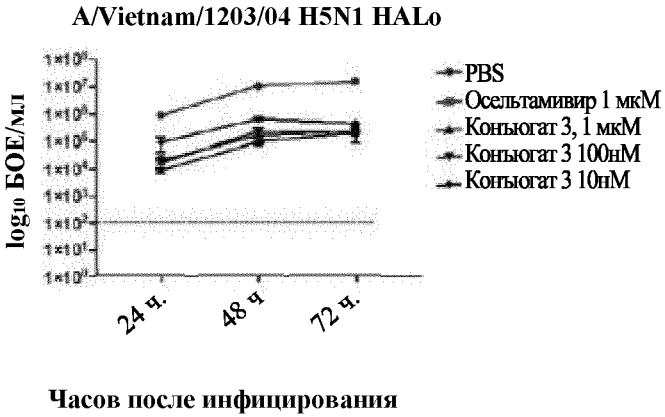


Часов после инфицирования

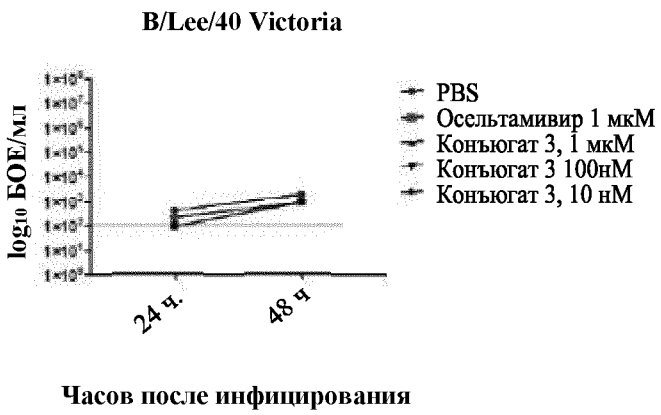
Фиг. 19C



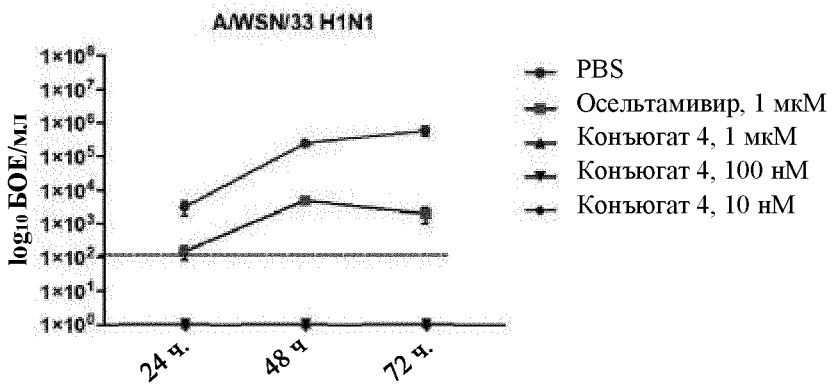
Фиг. 19D



Фиг. 19E

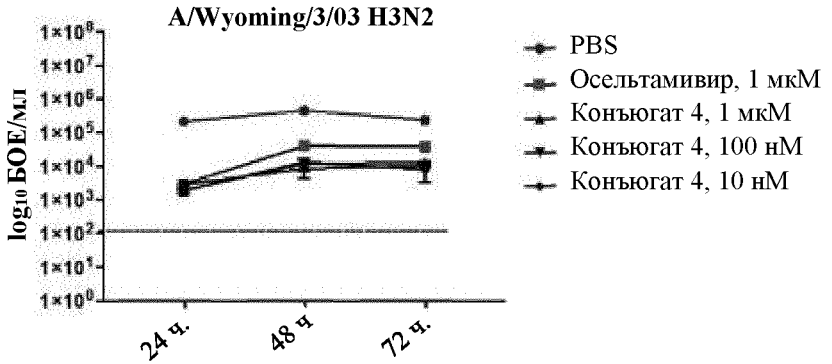


Фиг. 20A



Часов после инфицирования

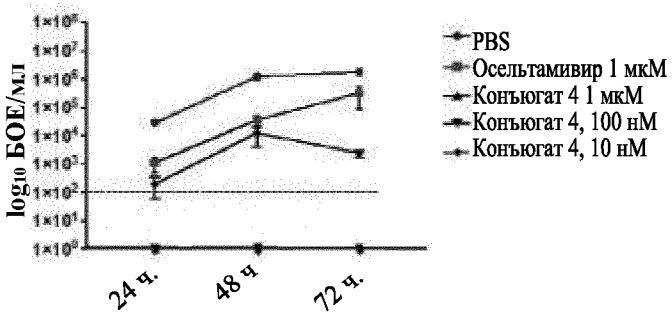
Фиг. 20B



Часов после инфицирования

Фиг. 20C

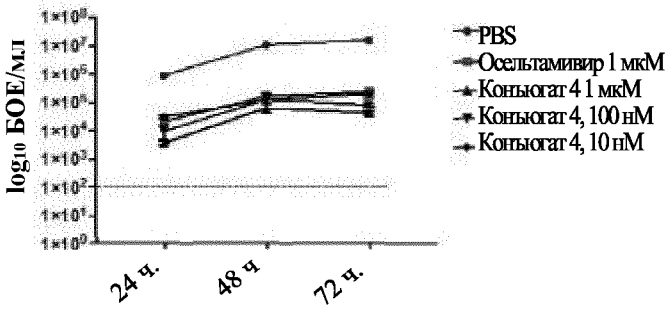
A/California/04/09 H1N1 pdm



Часов после инфицирования

Фиг. 20D

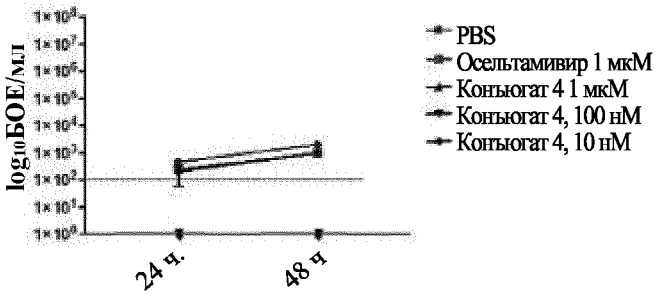
A/Vietnam/1203/04 H5N1 HALo



Часов после инфицирования

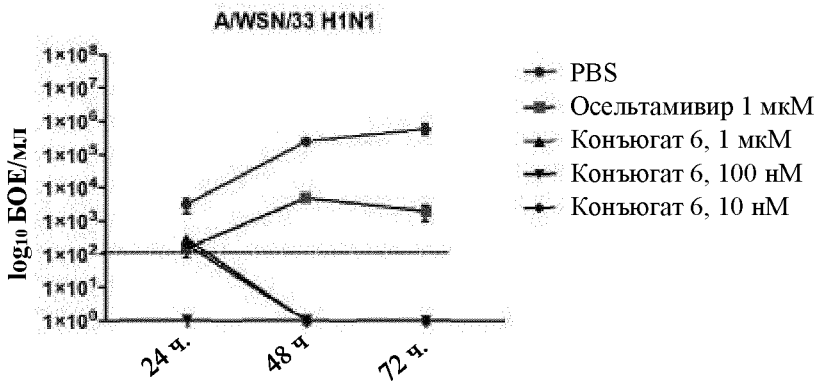
Фиг. 20E

B/Lee/40 Victoria



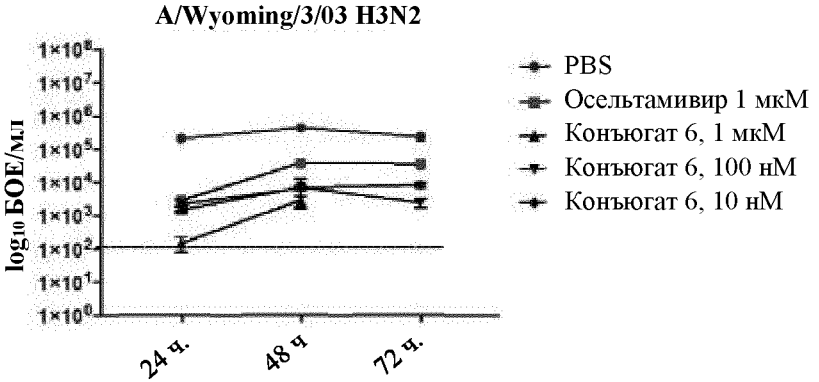
Часов после инфицирования

Фиг. 21A



Часов после инфицирования

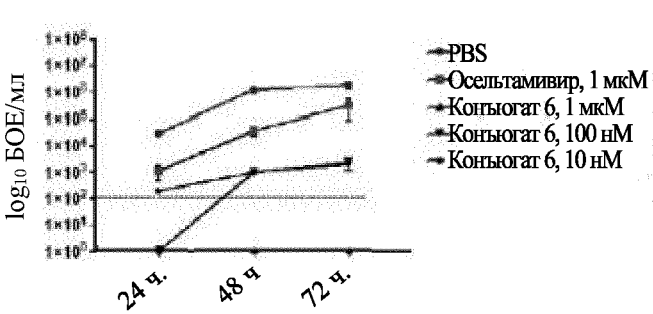
Фиг. 21B



Часов после инфицирования

Фиг. 21C

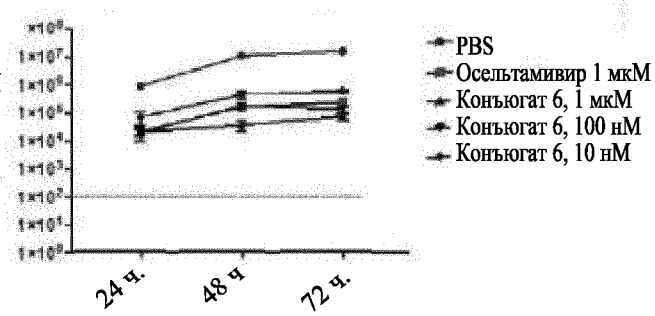
A/Califomia/04/09 H1N1 pdm



Часов после инфицирования

Фиг. 21D

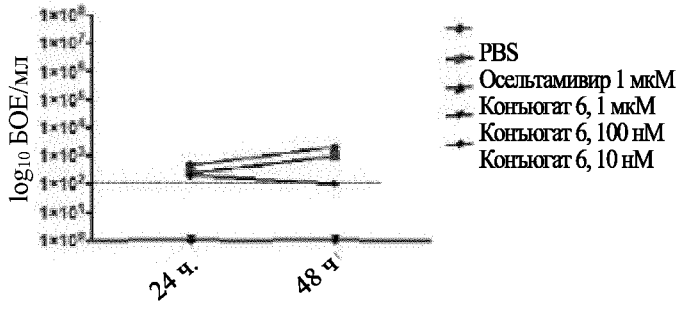
A/Vietnam/1203/04 H5N1 HALo



Часов после инфицирования

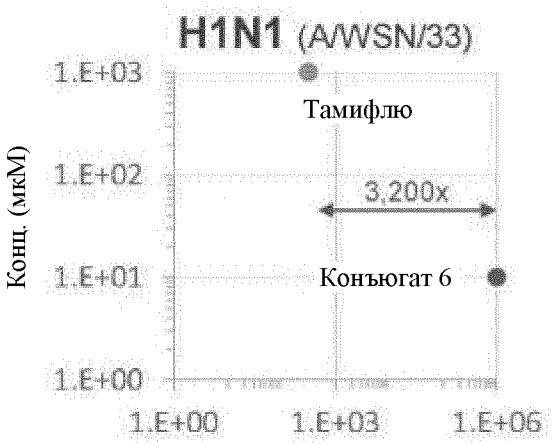
Фиг. 21E

B/Lee/40 Victoria



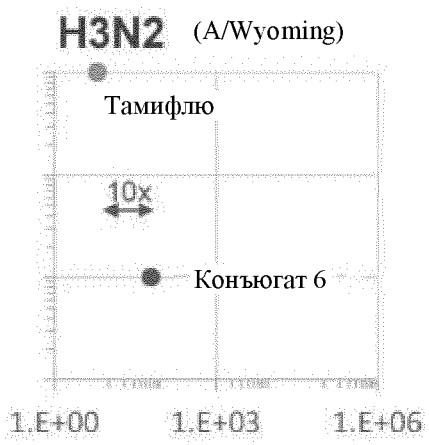
Часов после инфицирования

Фиг. 22A



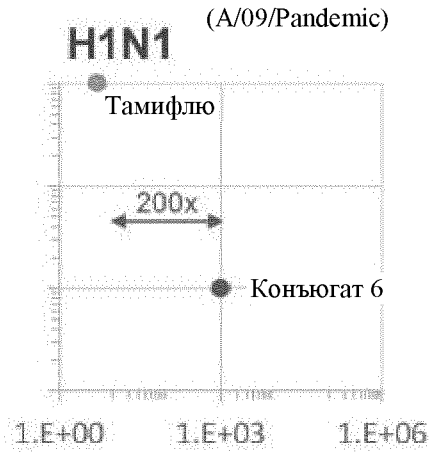
Снижения вирусной нагрузки

Фиг. 22B



Снижения вирусной нагрузки

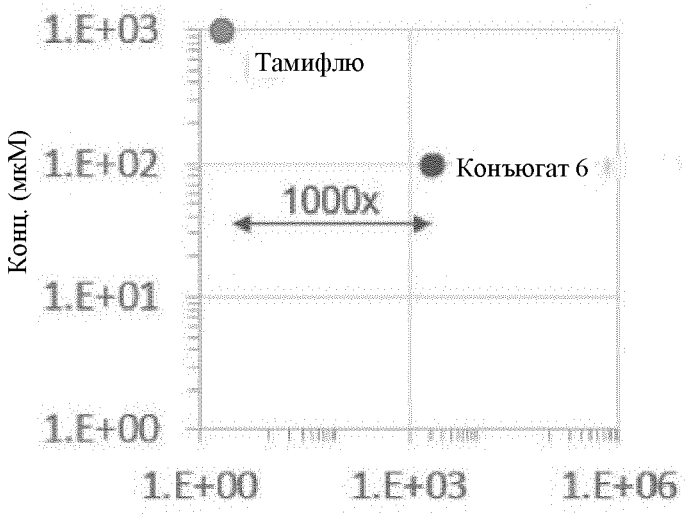
Фиг. 22C



Снижения вирусной нагрузки

Фиг. 22D

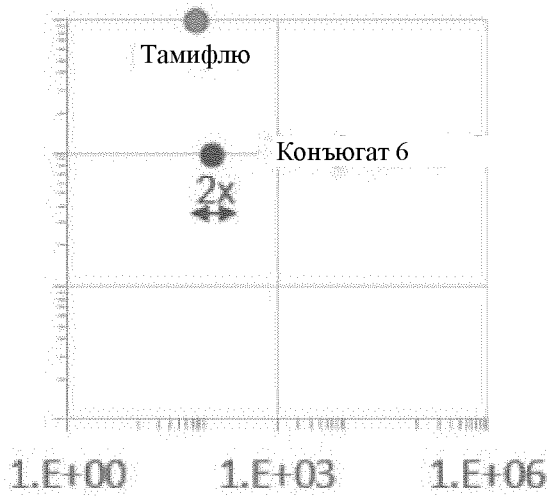
B (B/Lee/40 Victoria)



Снижения вирусной нагрузки

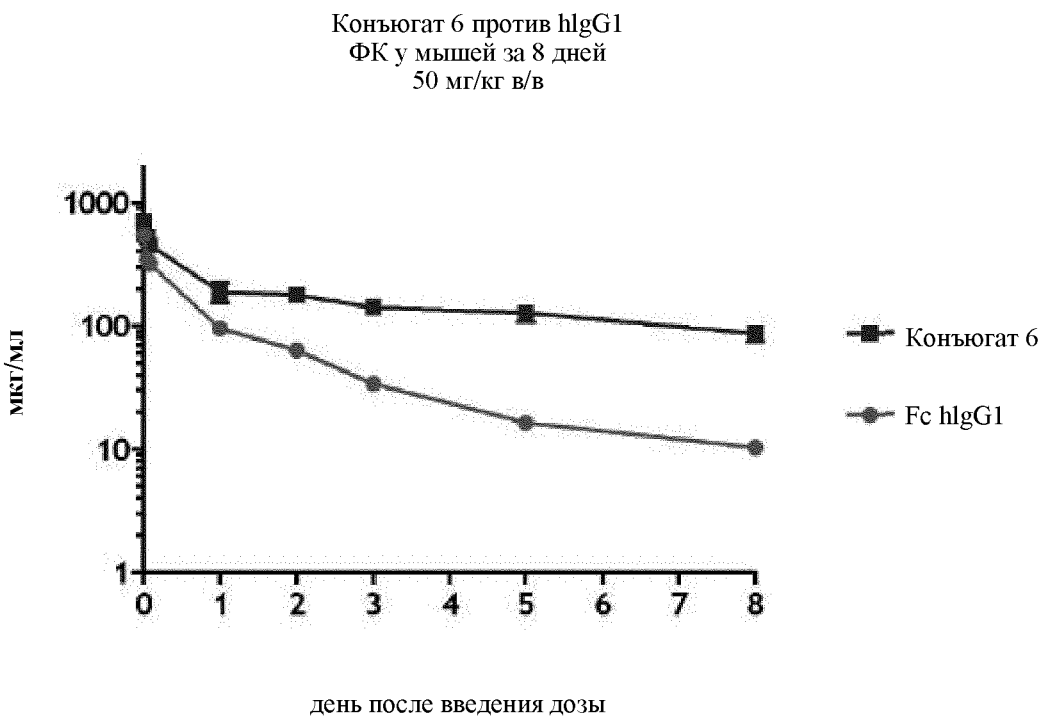
Фиг. 22E

H5N1 (A/Vietnam/1203/04)



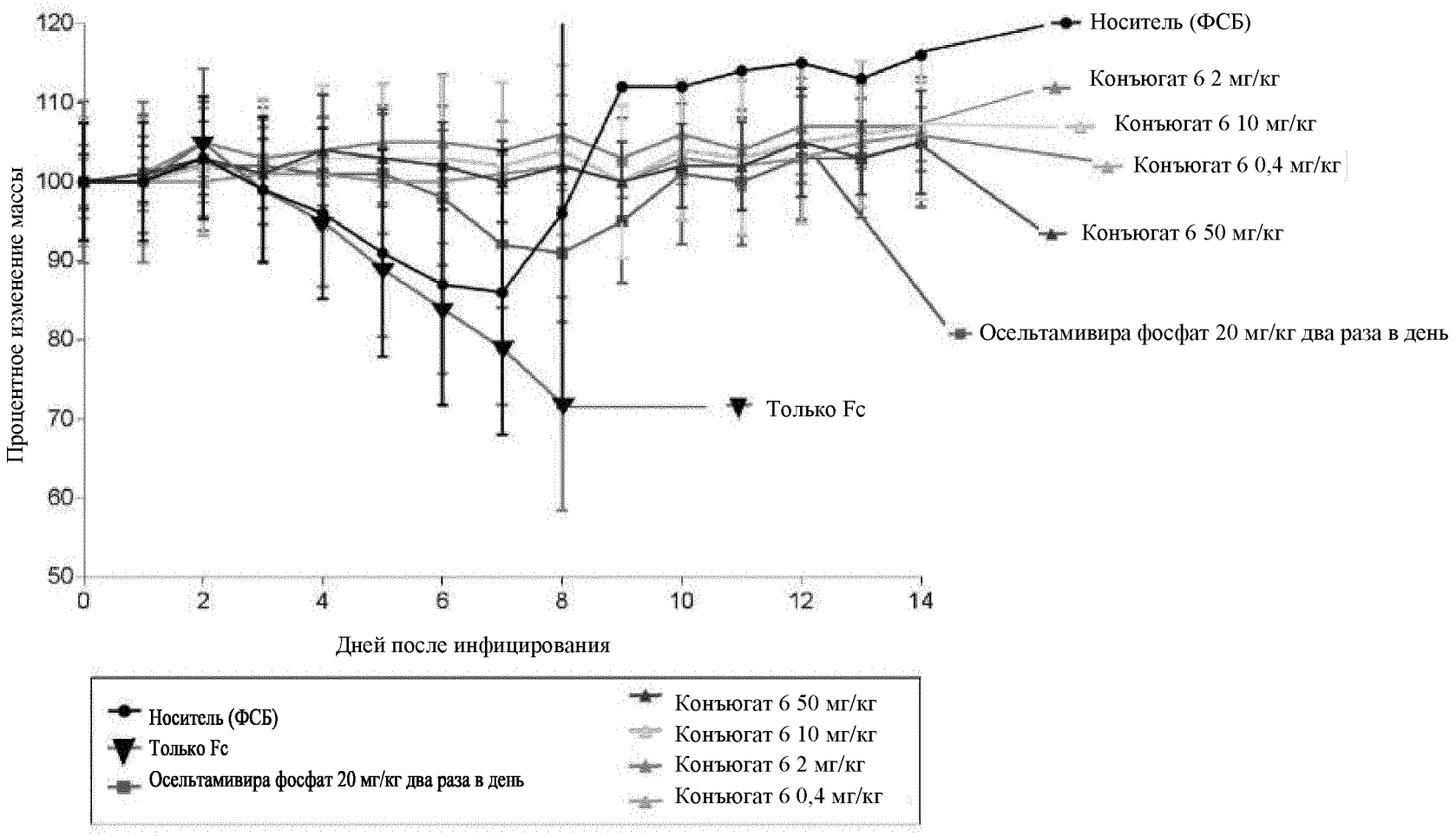
Снижения вирусной нагрузки

Фиг. 23

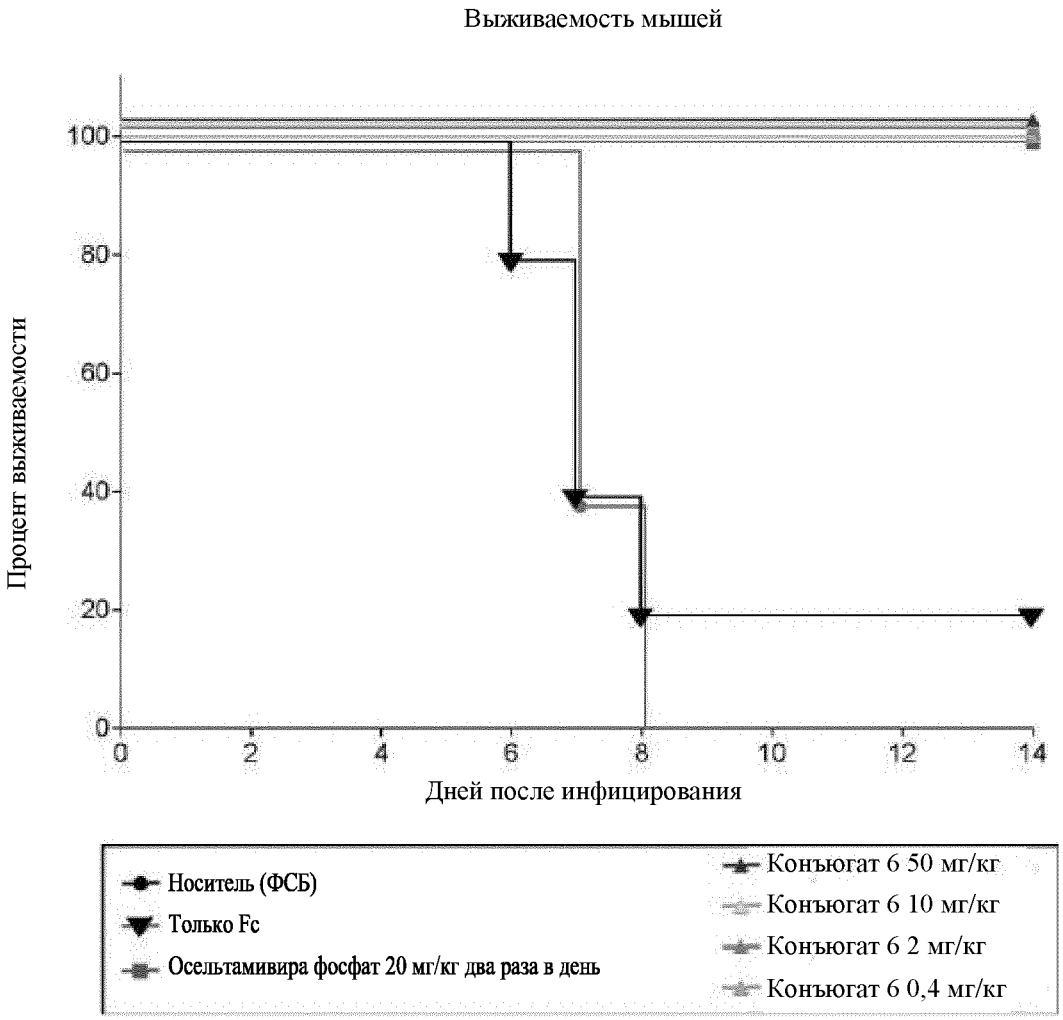

Конъюгат 6 против hlgG1
ФК у мышей за 8 дней
50 мг/кг в/в
мкг/мл
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
день после введения дозы
Конъюгат 6
Fc hlgG1

Фиг. 24

Масса тела мышей

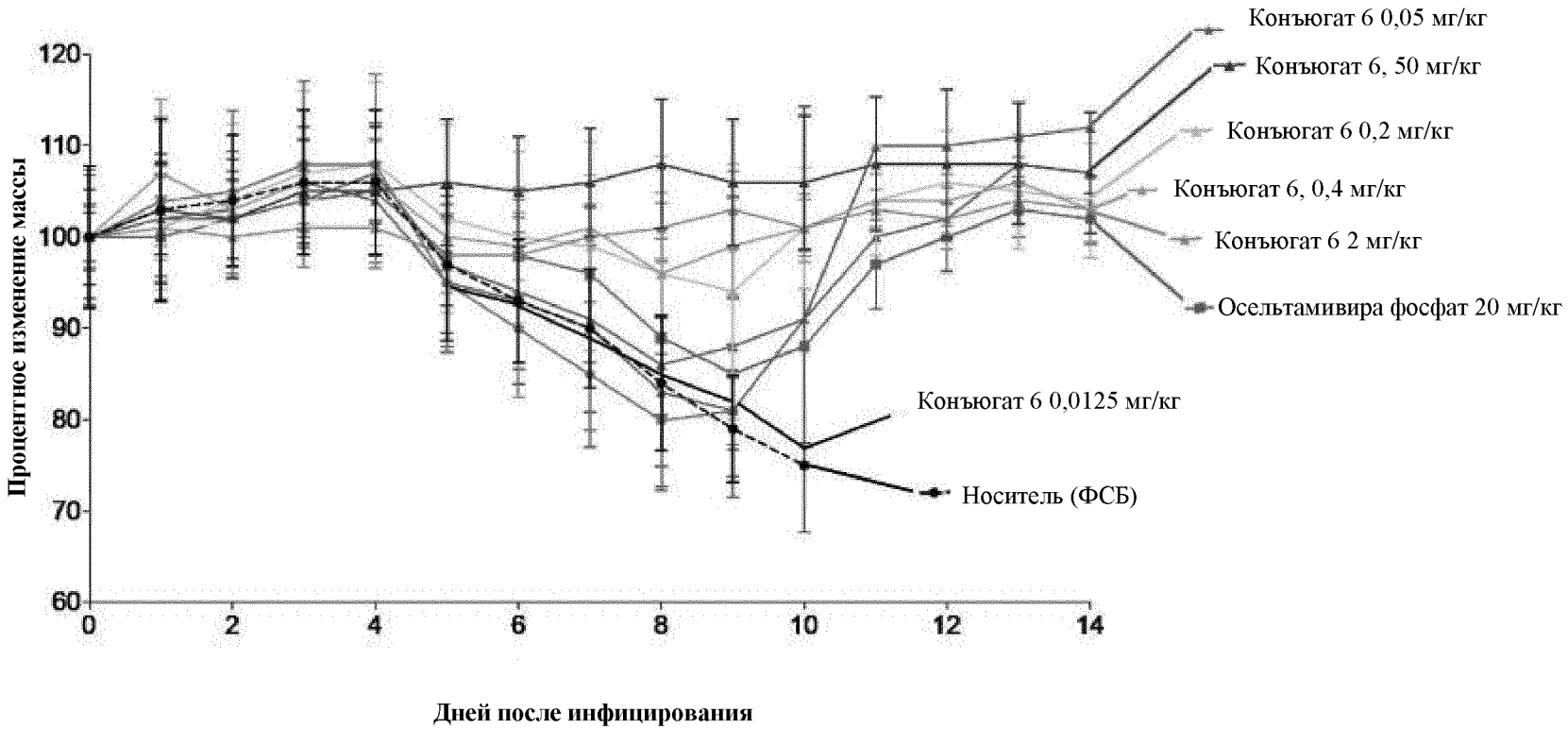


Фиг. 25

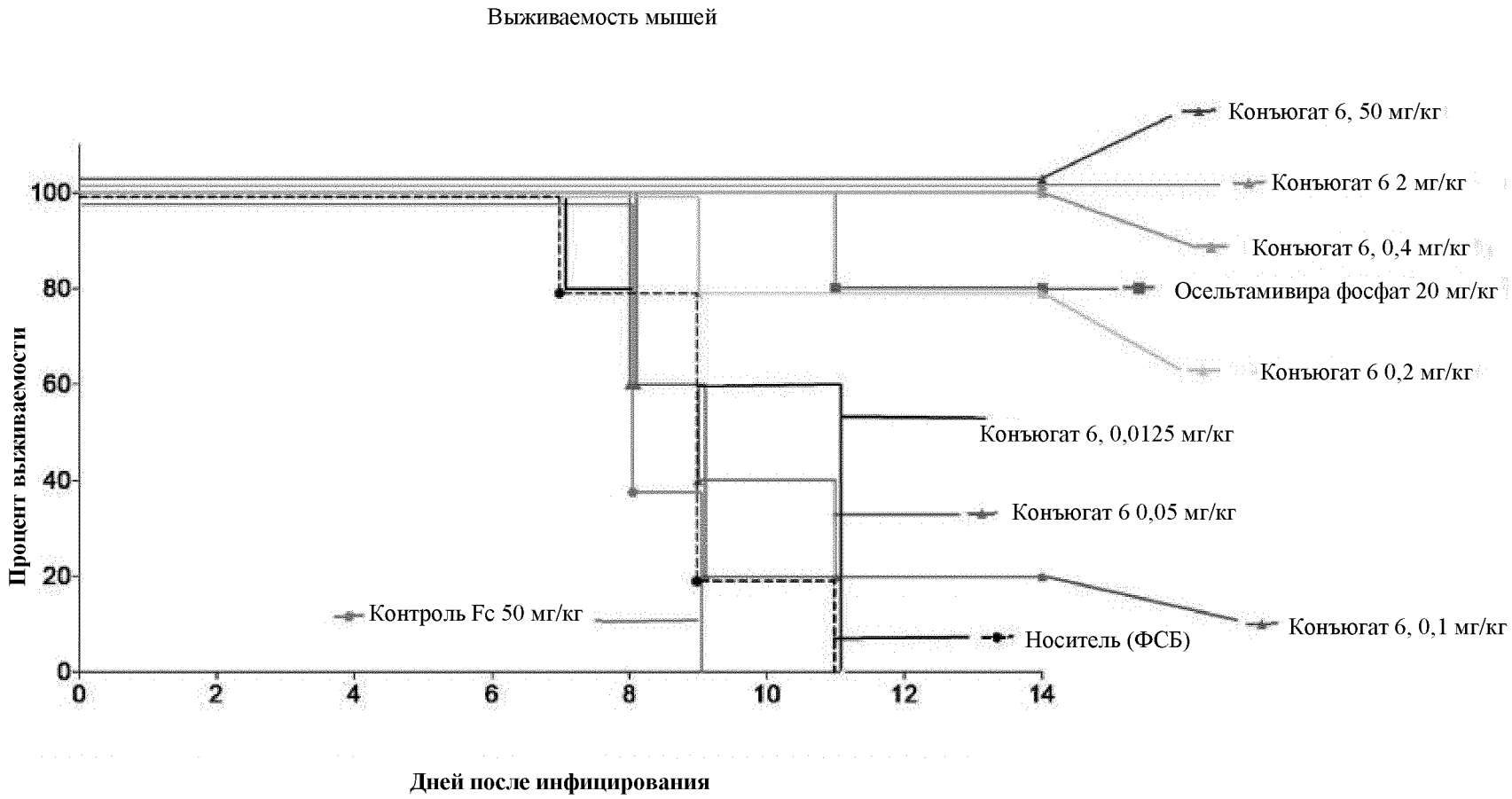

Выживаемость мышей
Процент выживаемости
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Дней после инфицирования
Носитель (ФСБ)
Только Fc
Осельтамивира фосфат 20 мг/кг два раза в день
Конъюгат 6 50 мг/кг
Конъюгат 6 10 мг/кг
Конъюгат 6 2 мг/кг
Конъюгат 6 0,4 мг/кг

Фиг. 26

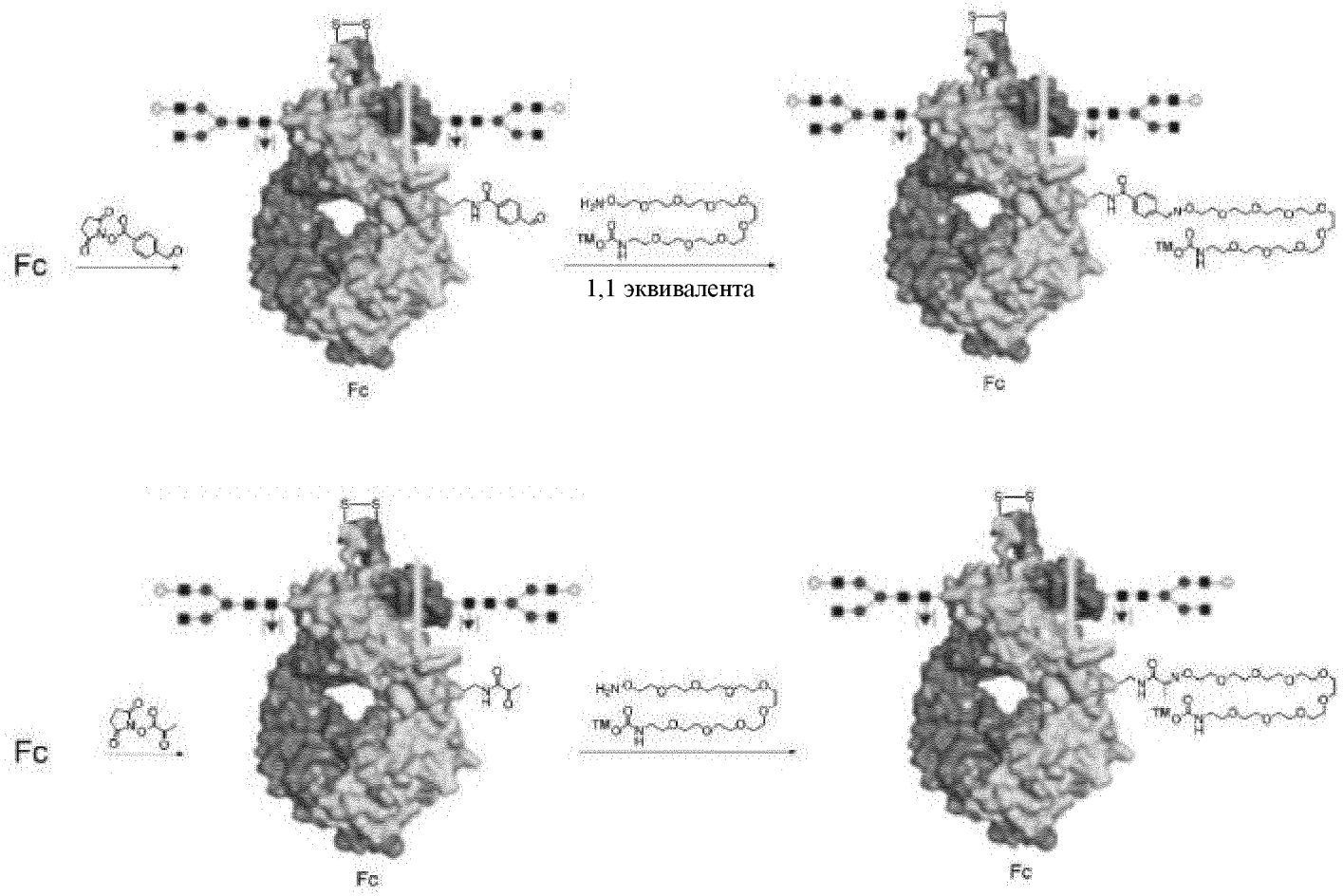
Масса тела мышей



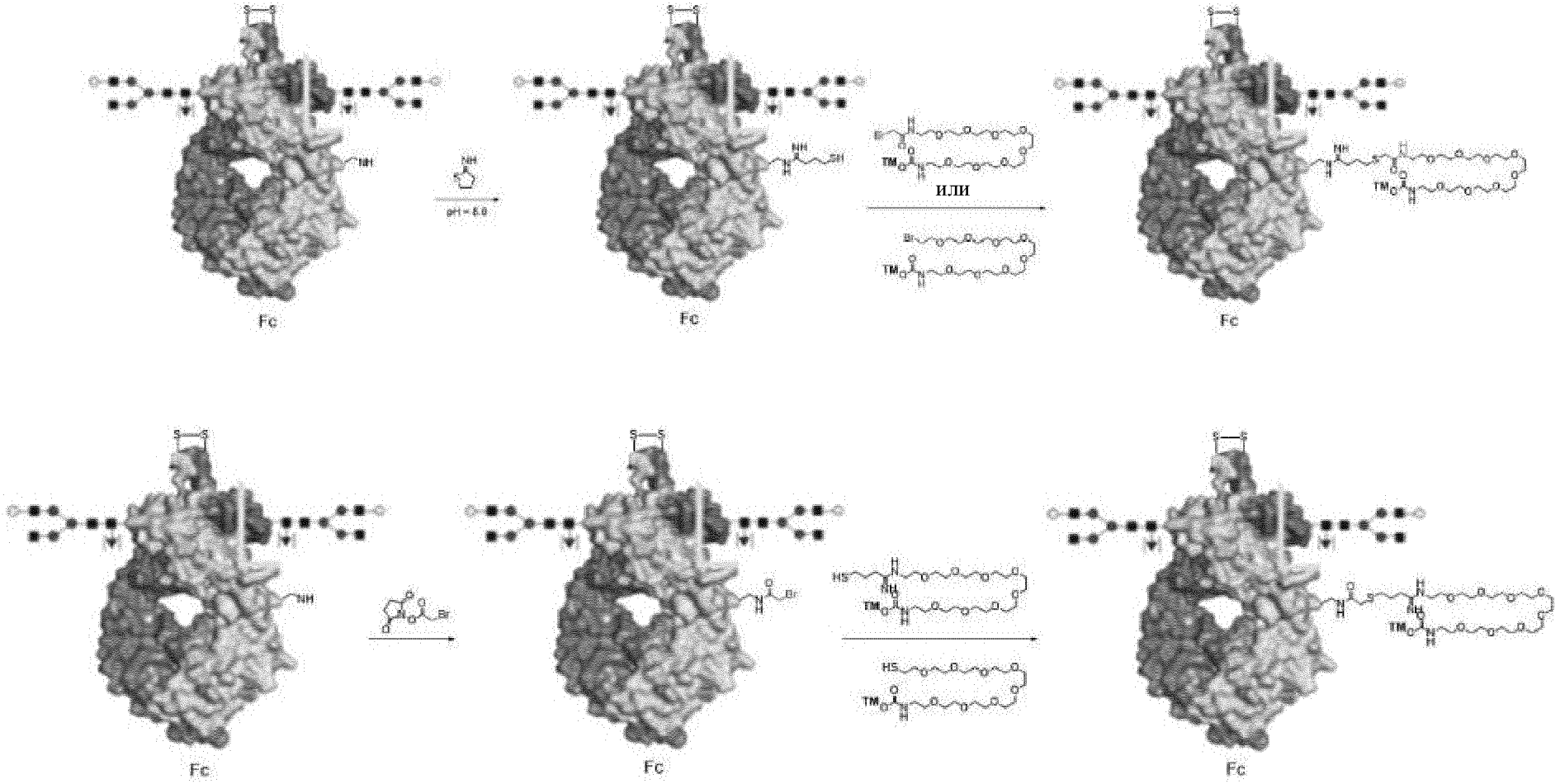
Фиг. 27


Выживаемость мышей
Конъюгат 6, 50 мг/кг
Конъюгат 6 2 мг/кг
Конъюгат 6, 0,4 мг/кг
Осельтамивира фосфат 20 мг/кг
Конъюгат 6 0,2 мг/кг
Конъюгат 6, 0,0125 мг/кг
Конъюгат 6 0,05 мг/кг
Конъюгат 6, 0,1 мг/кг
Носитель (ФСБ)
Контроль Fc 50 мг/кг
Процент выживаемости
Дней после инфицирования
0
20
40
60
80
100
0
2
4
6
8
10
12
14

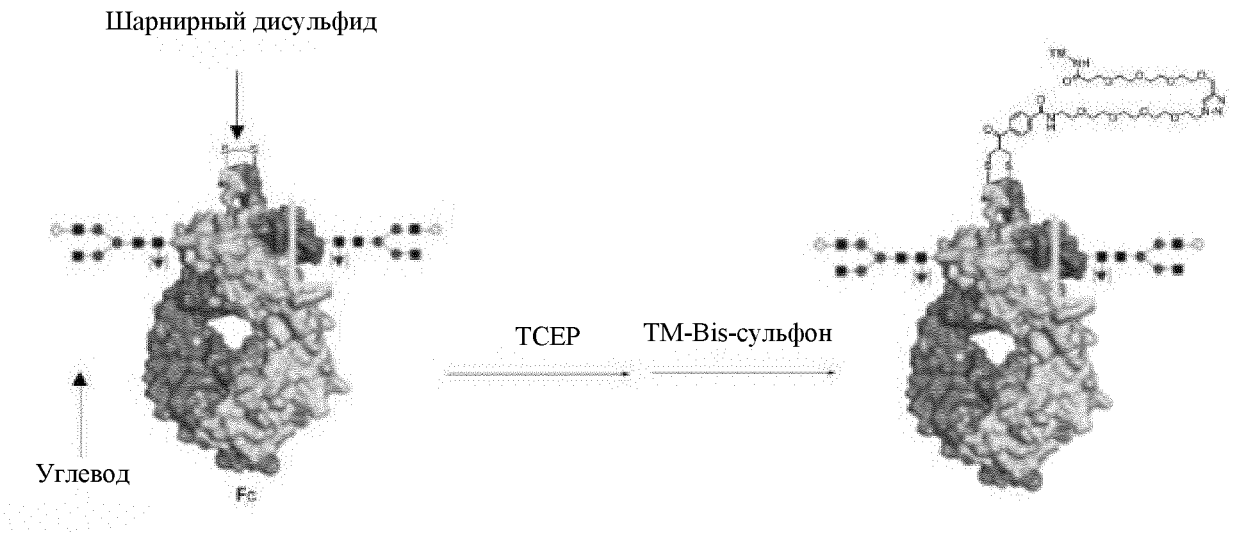
Фиг. 28



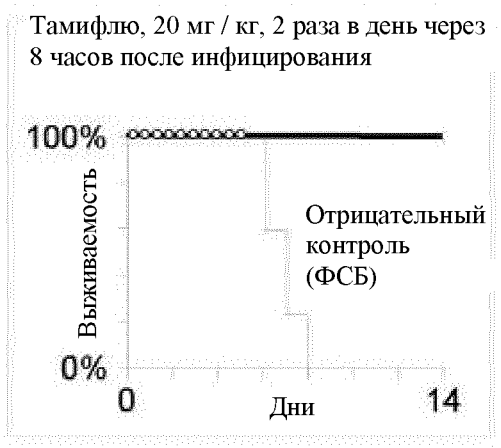
Фиг. 29



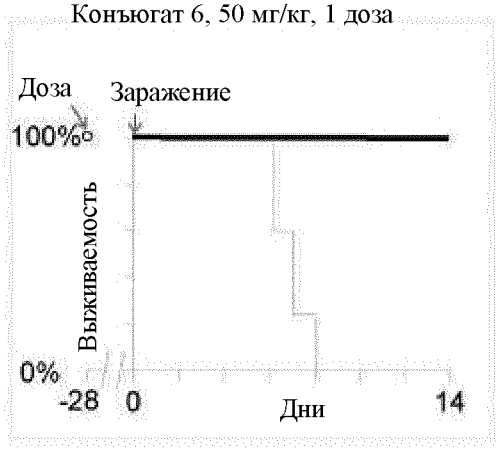
Фиг. 30



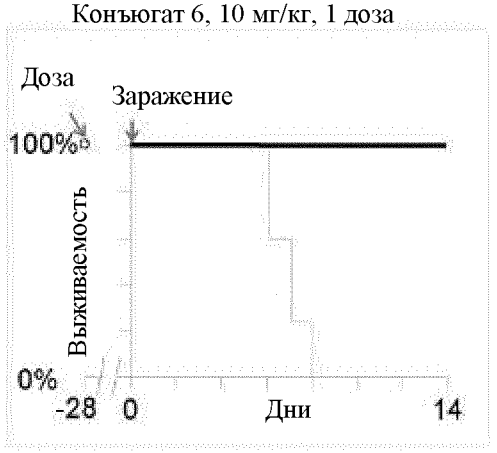
Фиг. 31A



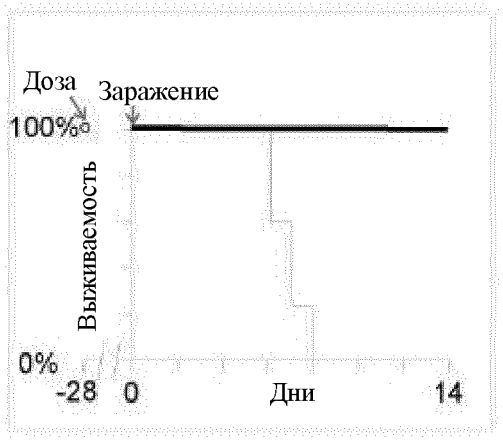
Фиг. 31B



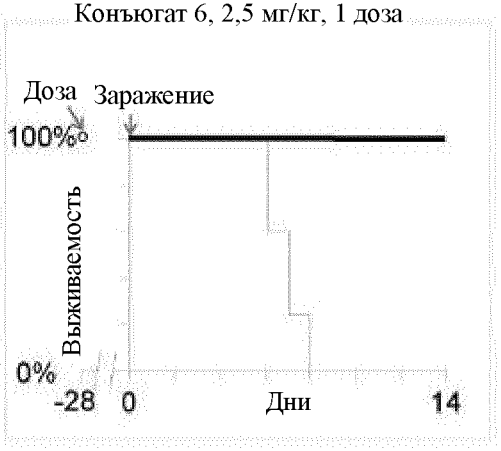
Фиг. 31C



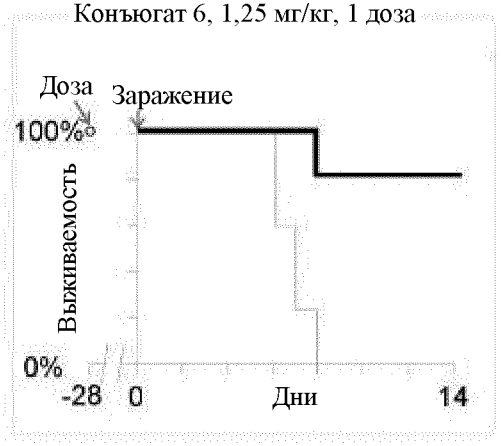
Фиг. 31D



Фиг. 31E

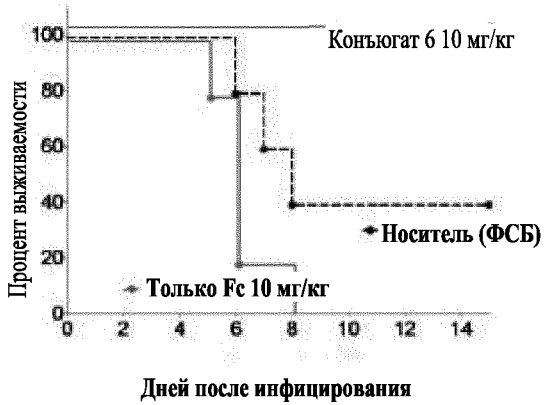


Фиг. 31F



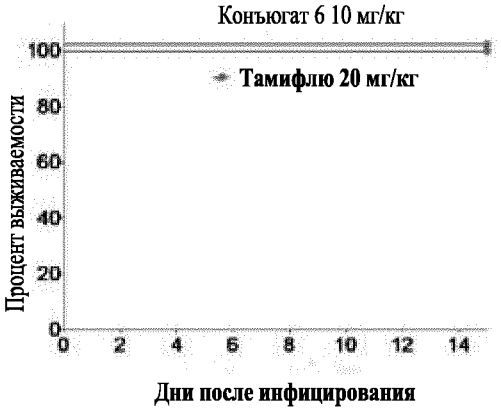
Фиг. 32A

Контроли (вводили за 4 часа до инфицирования)



Фиг. 32B

Вводимая доза через 8 часа после инфицирования

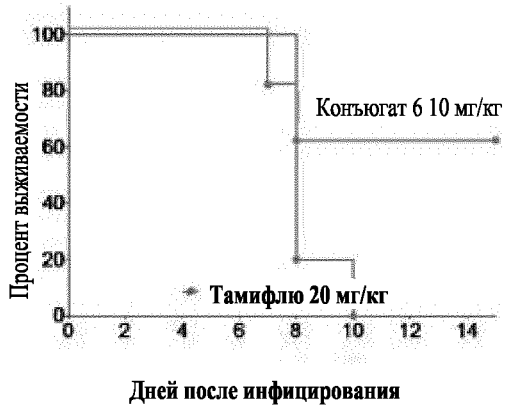


Фиг. 32C

Вводили через 24 часа после инфицирования

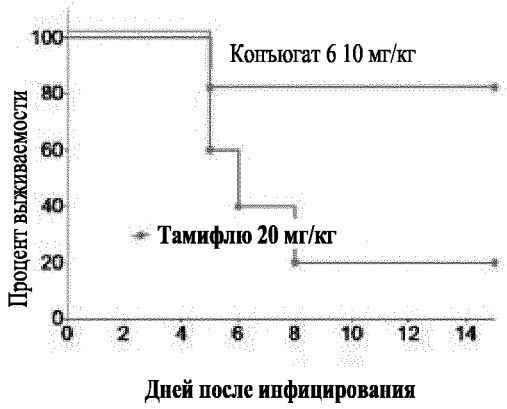
Фиг. 32D

Вводимая доза через 48 часа после инфицирования



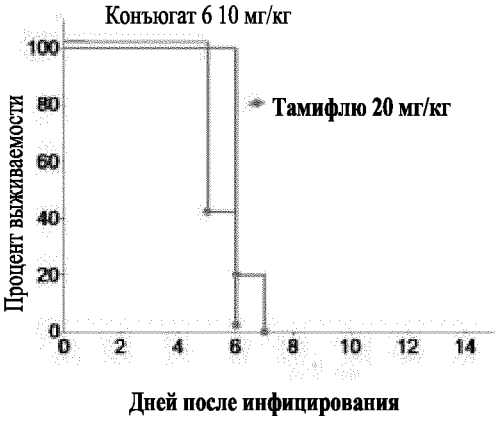
Фиг. 32E

Вводимая доза через 72 часа после инфицирования



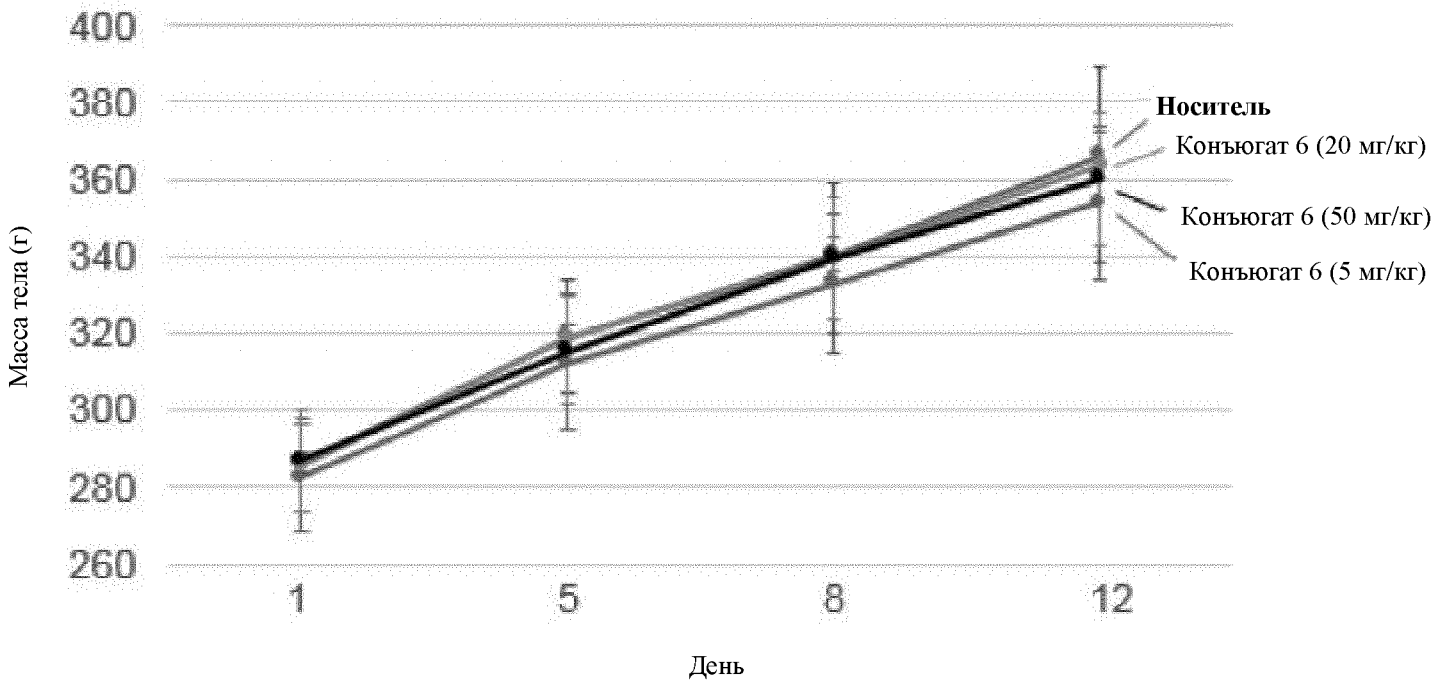
Фиг. 32F

Вводимая доза через 96 часа после инфицирования

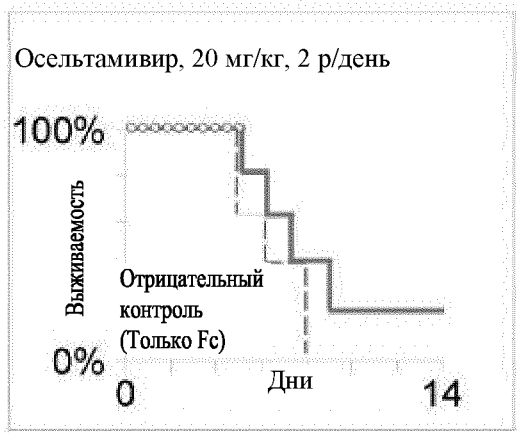


Фиг. 33

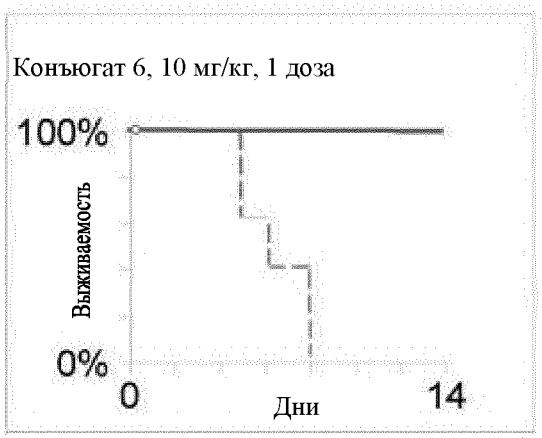
Средние показатели массы тела (5 крыс/группа)



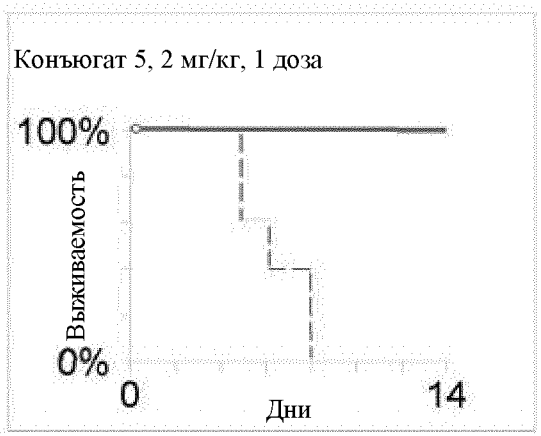
Фиг. 34A



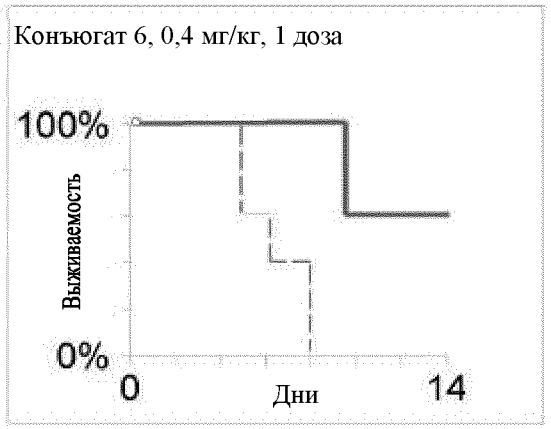
Фиг. 34B



Фиг. 34C

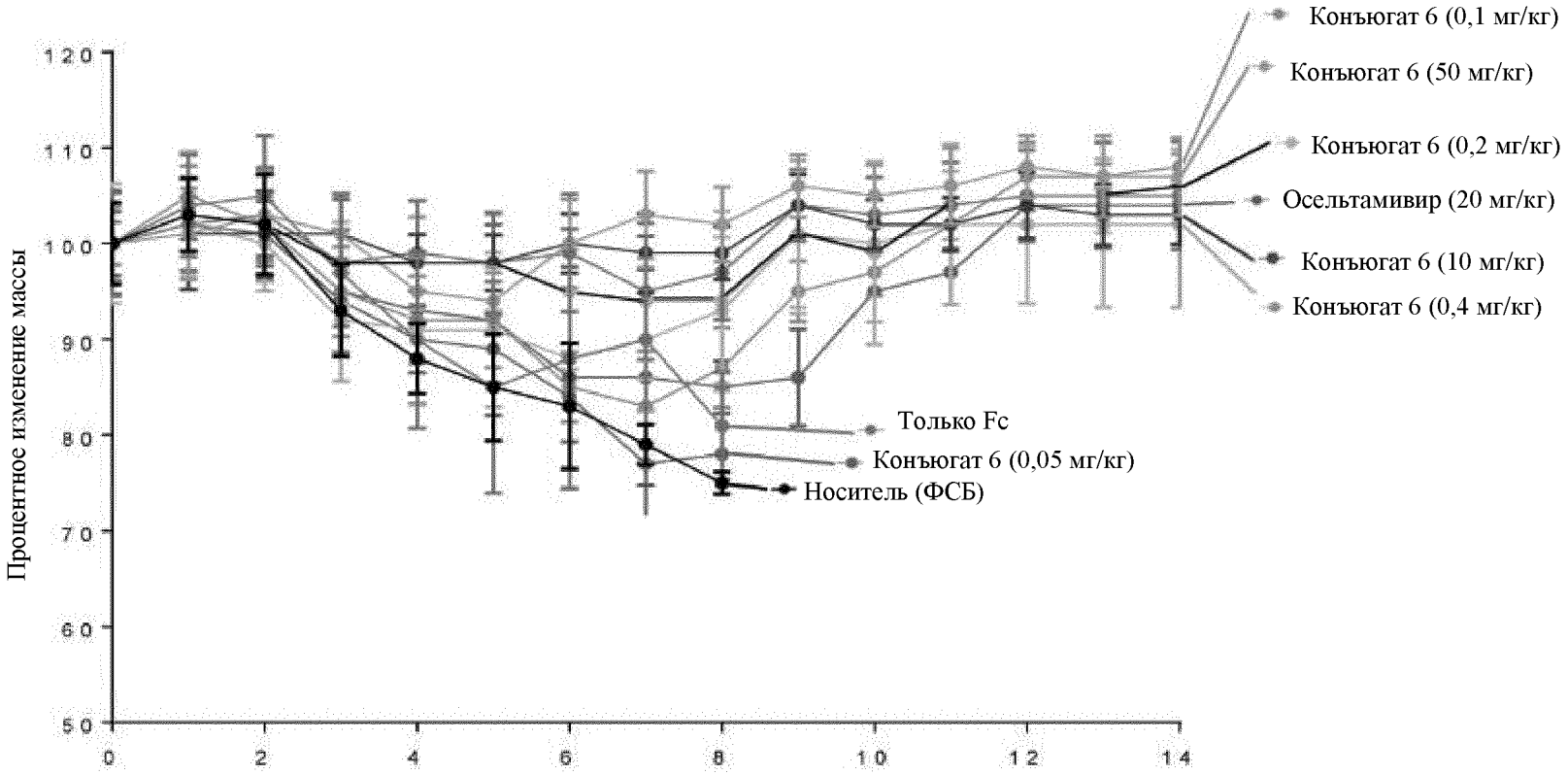


Фиг. 34D

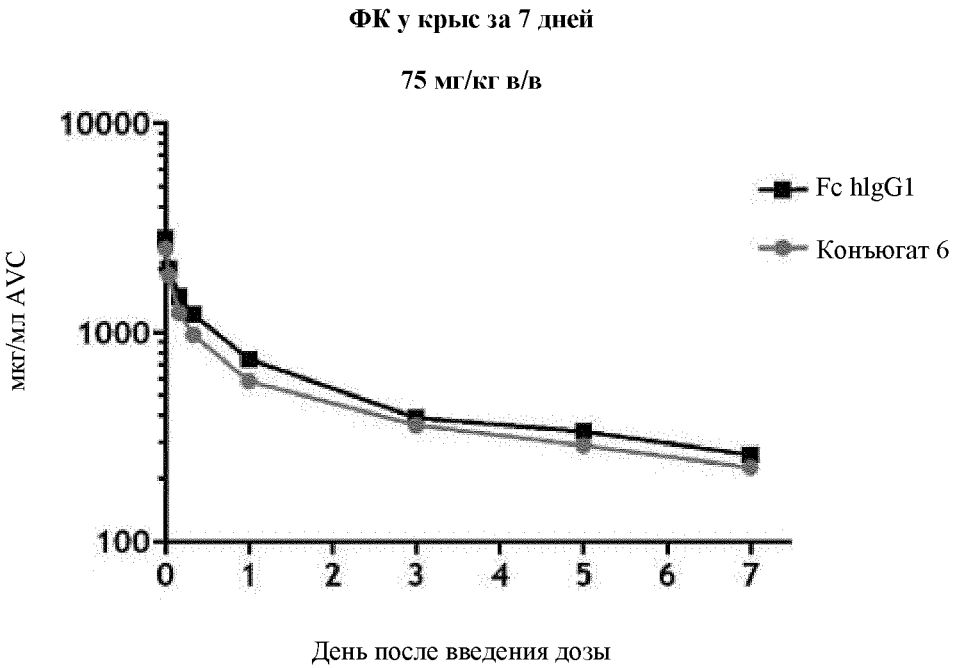


Фиг. 35

Масса тела мышей

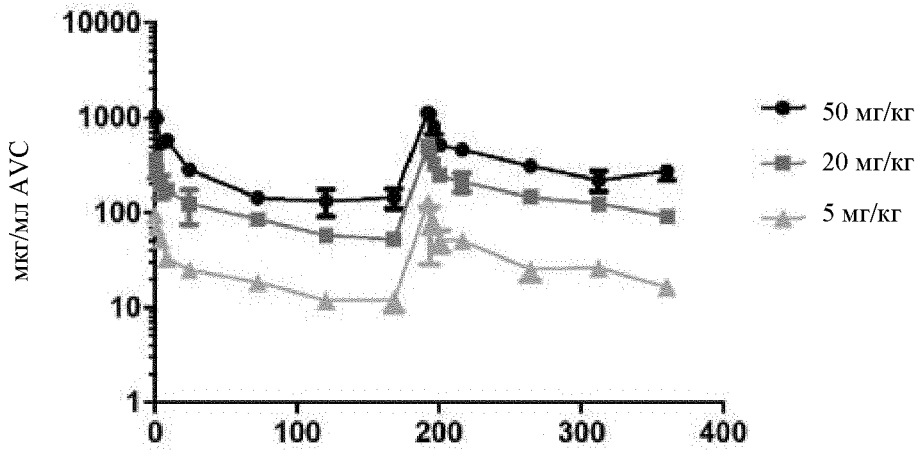


Фиг. 36

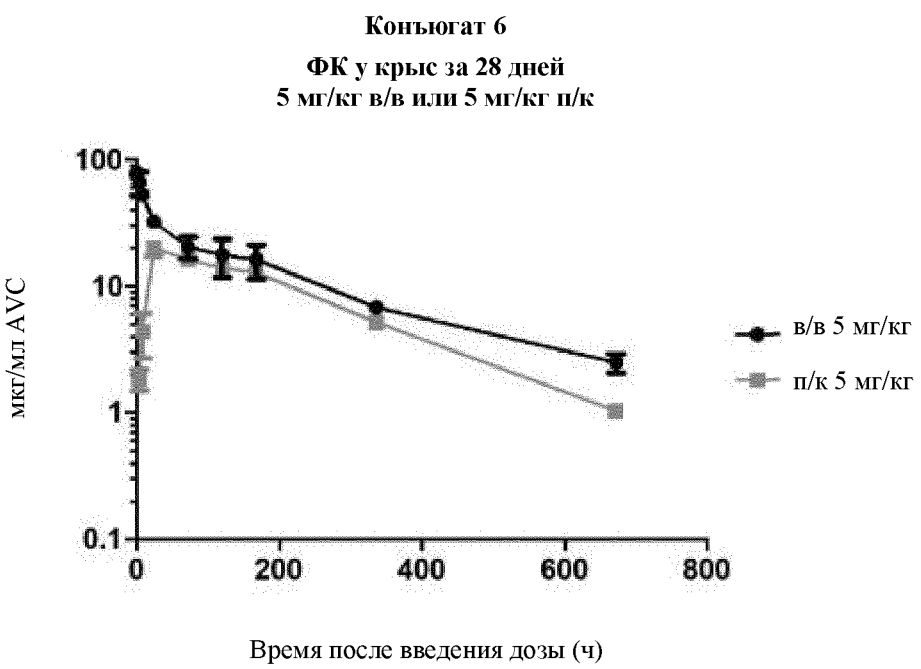

ФК у крыс за 7 дней
75 мг/кг в/в
10000
1000
100
мкг/мл AVC
0
1
2
3
4
5
6
7
День после введения дозы
Fc hlgG1
Конъюгат 6

Фиг. 37

Конъюгат 6
ФК у крыс за 14 дней
5, 20, 50 мг/кг в/в

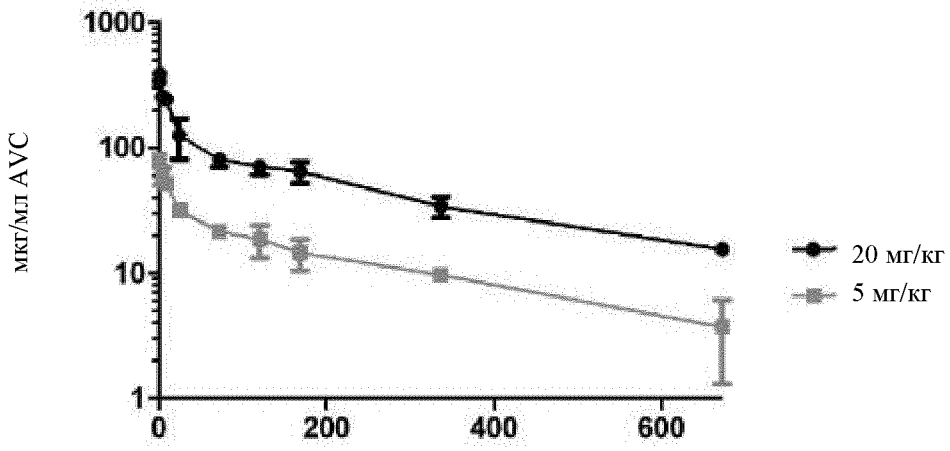


Фиг. 38


Конъюгат 6
ФК у крыс за 28 дней
5 мг/кг в/в или 5 мг/кг п/к
мкг/мл AVC
100
10
1
0.1
0
200
400
600
800
Время после введения дозы (ч)
в/в 5 мг/кг
п/к 5 мг/кг

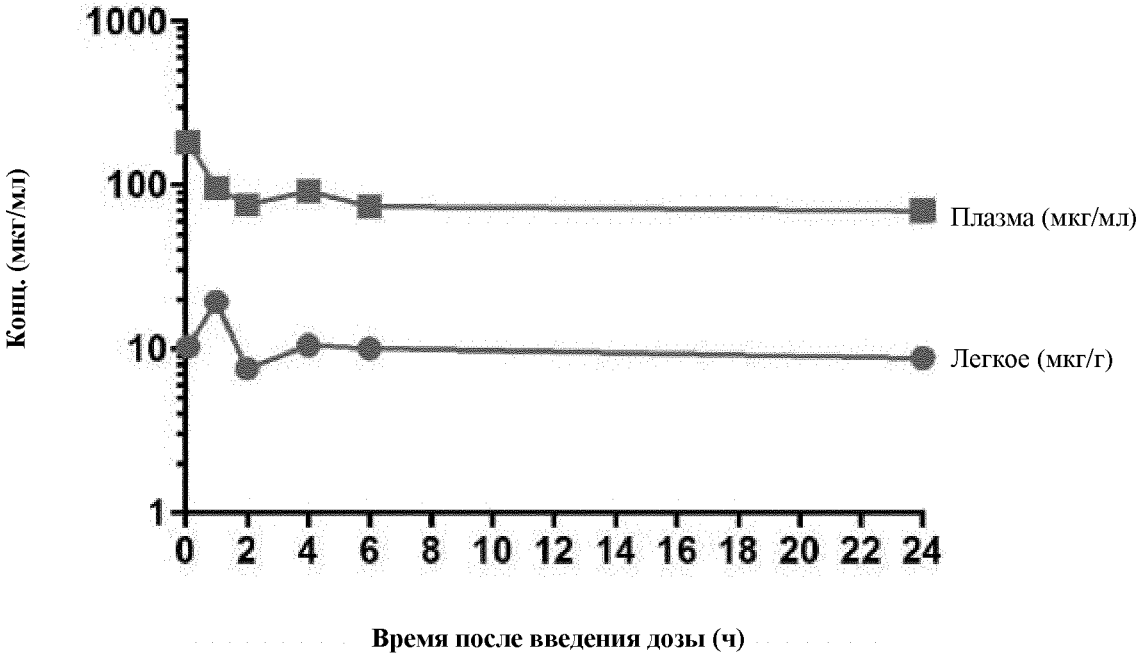
Фиг. 39

Конъюгат 6
ФК у яванского макака за 28 дней
5 и 20 мг/кг в/в



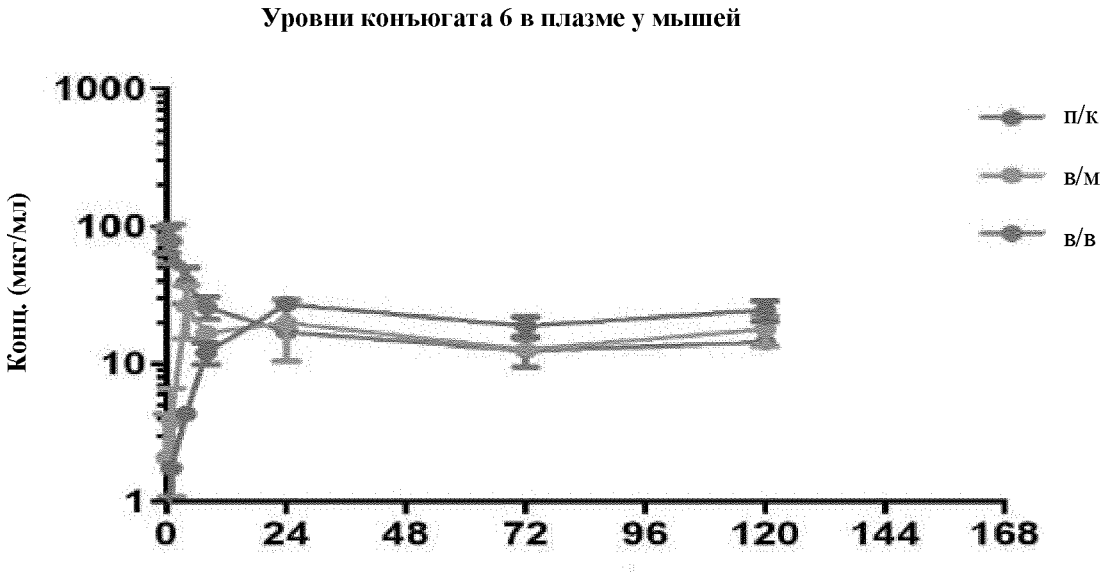
Фиг. 40

Уровни конъюгата 6 в плазме и легких



Фиг. 41

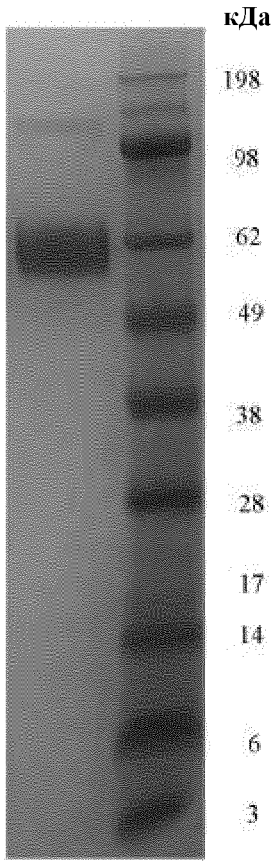
в/в, п/к и в/м введение конъюгата 6



Время до достижения Cmax:
п/к - 24 ч
в/м - 4 ч

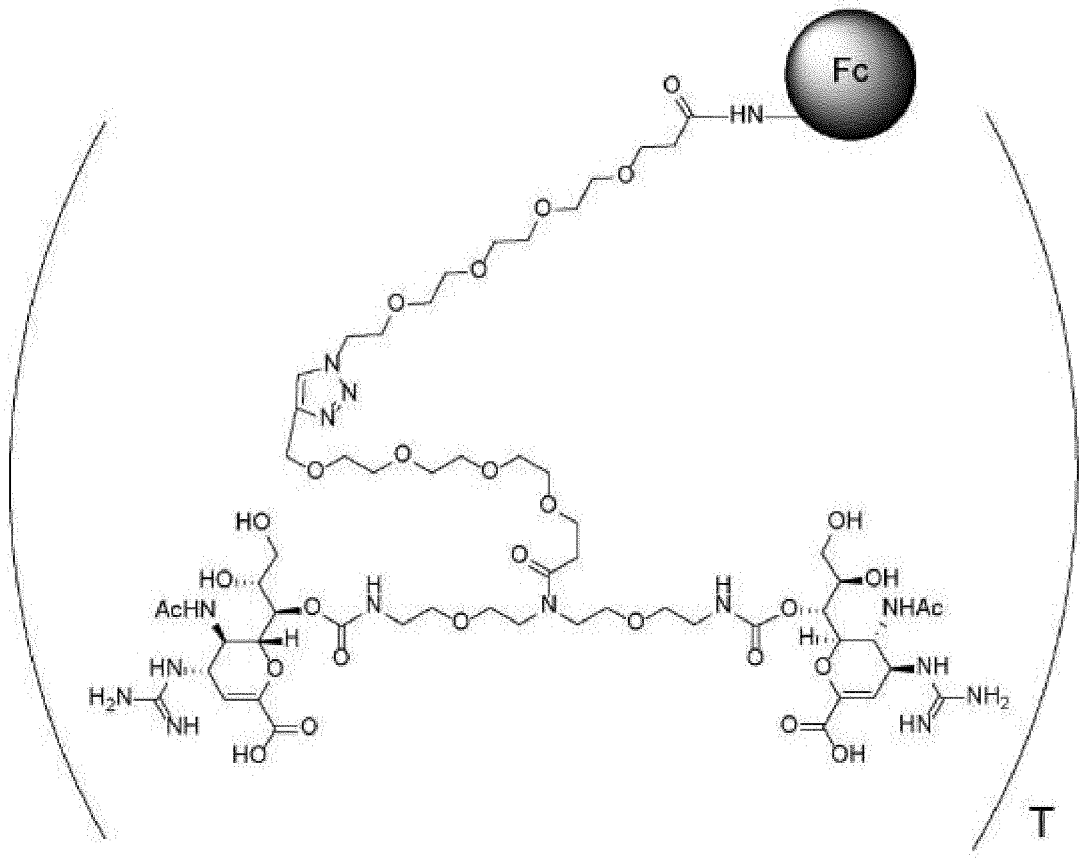
Фиг. 42

Конъюгат 8



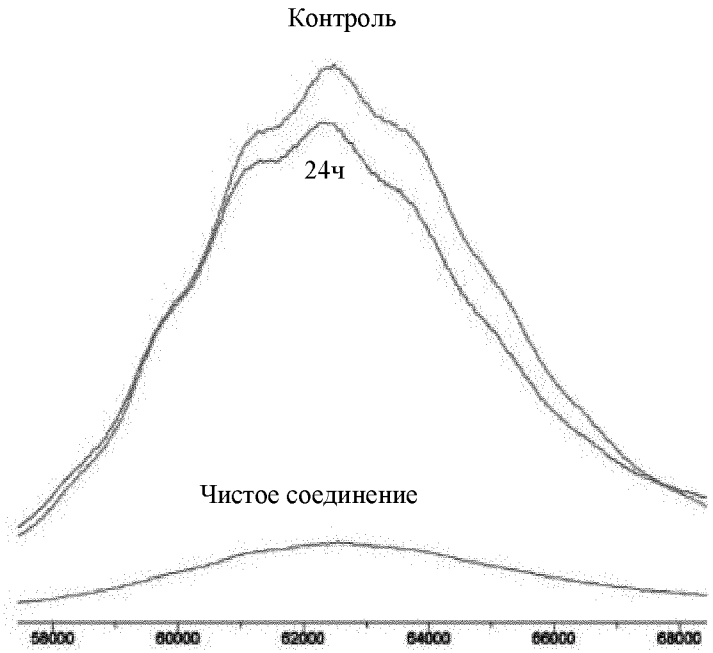
Фиг. 43

Конъюгат 6



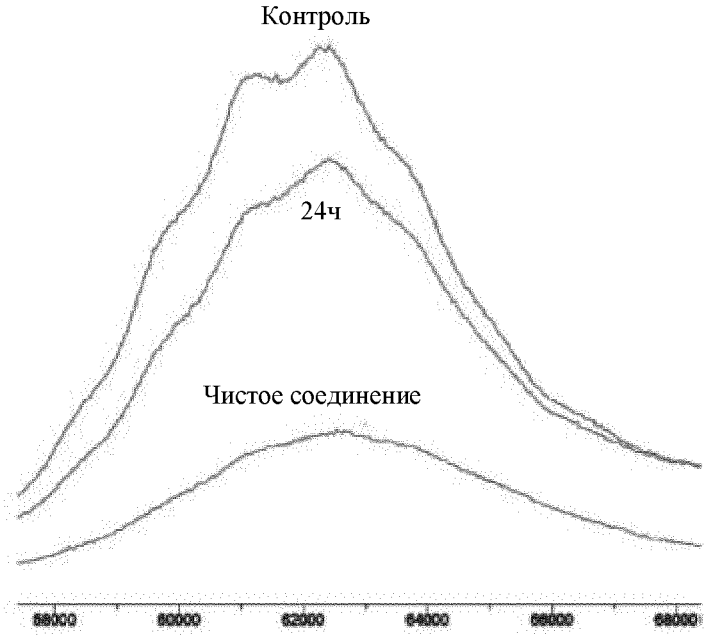
Фиг. 44

Уровень конъюгата 6 в плазме мышей in vitro



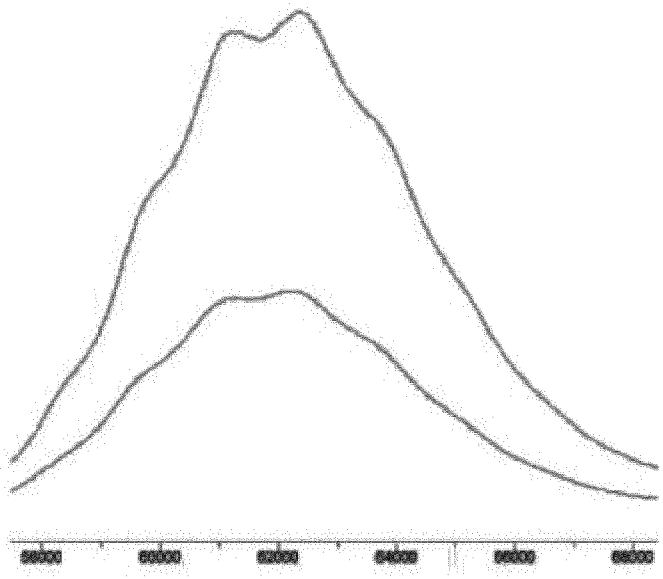
Фиг. 45

Уровень конъюгата 6 в плазме человека in vitro



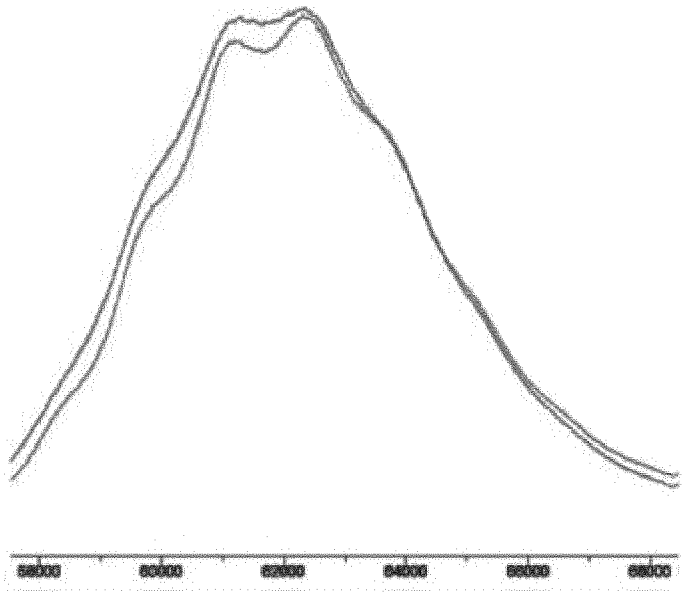
Фиг. 46

Стабильность микросом конъюгата 6 в печени у мышей



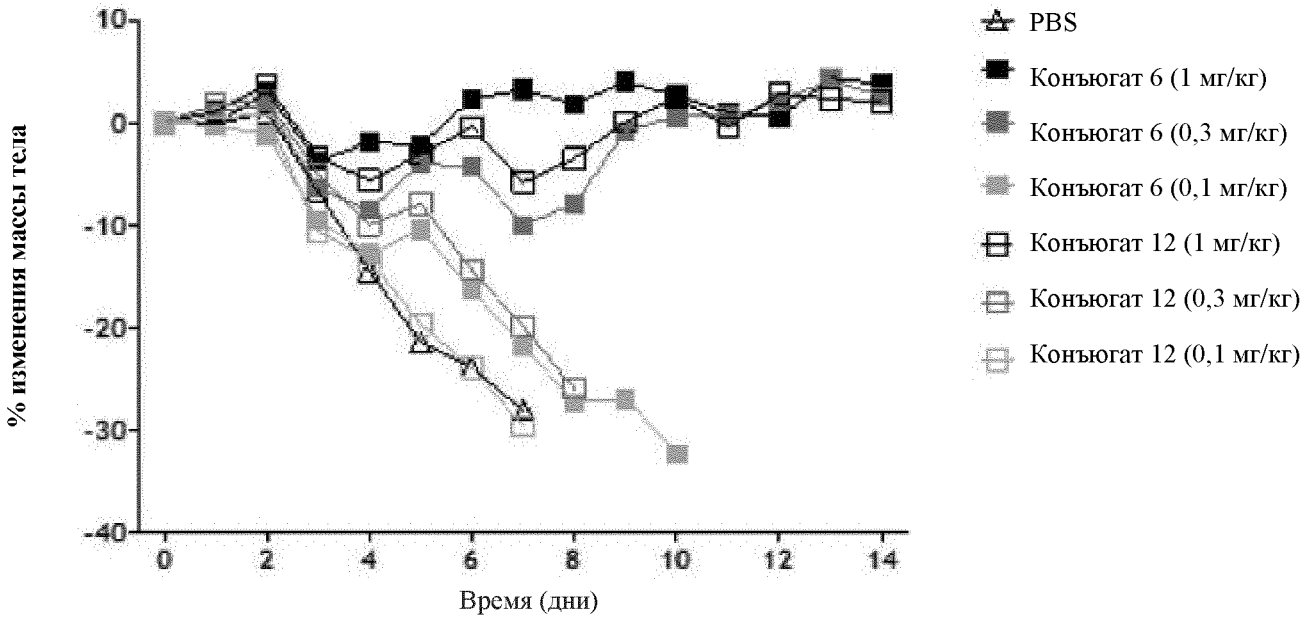
Фиг. 47

Стабильность микросом конъюгата 6 в печени у человека



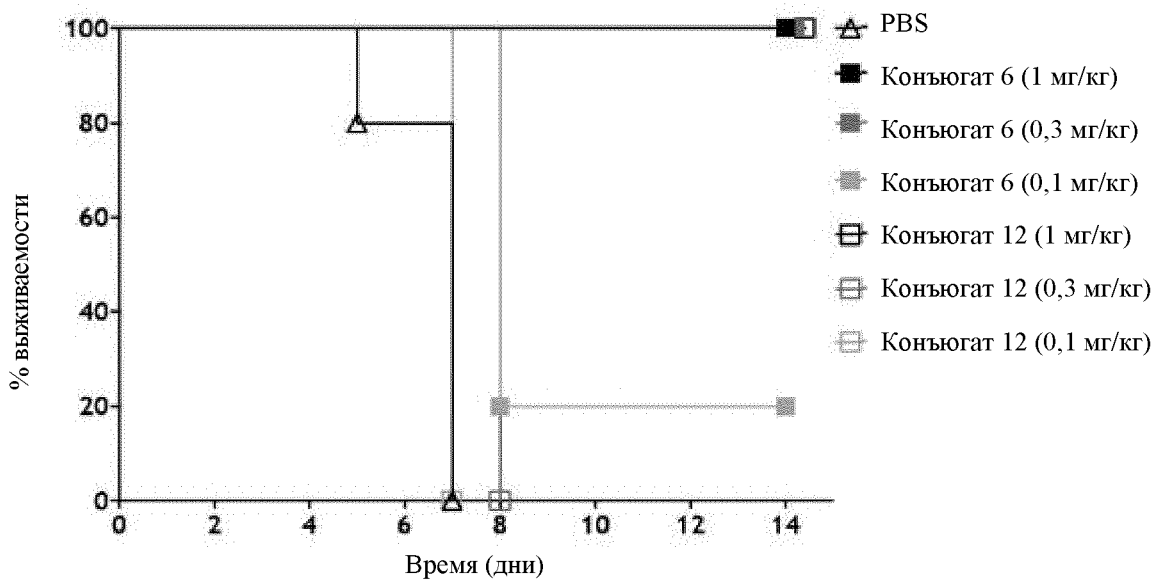
Фиг. 48

Эффективность конъюгата 6 и конъюгата 12 *in vivo*



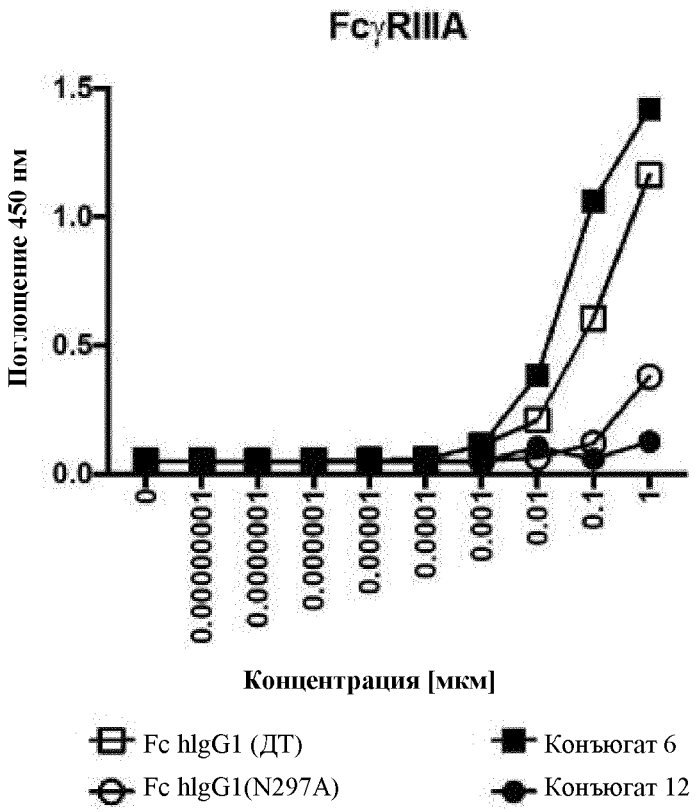
Фиг. 49

Эффективность конъюгата 6 и конъюгата 12 *in vivo*



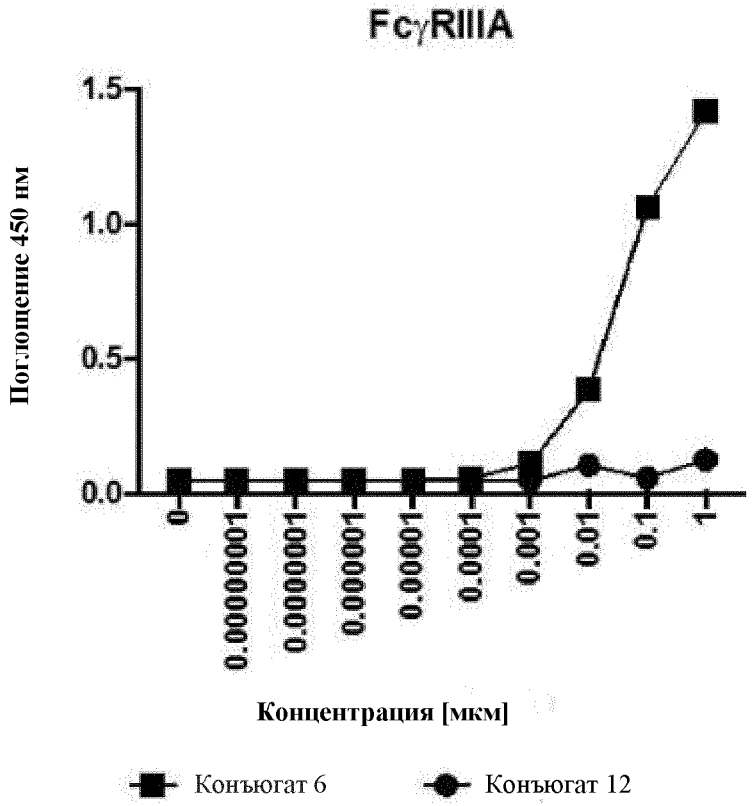
Фиг. 50

Связывание конъюгата 6 и конъюгата 12 с Fcγ-рецептором IIIA *in vitro*



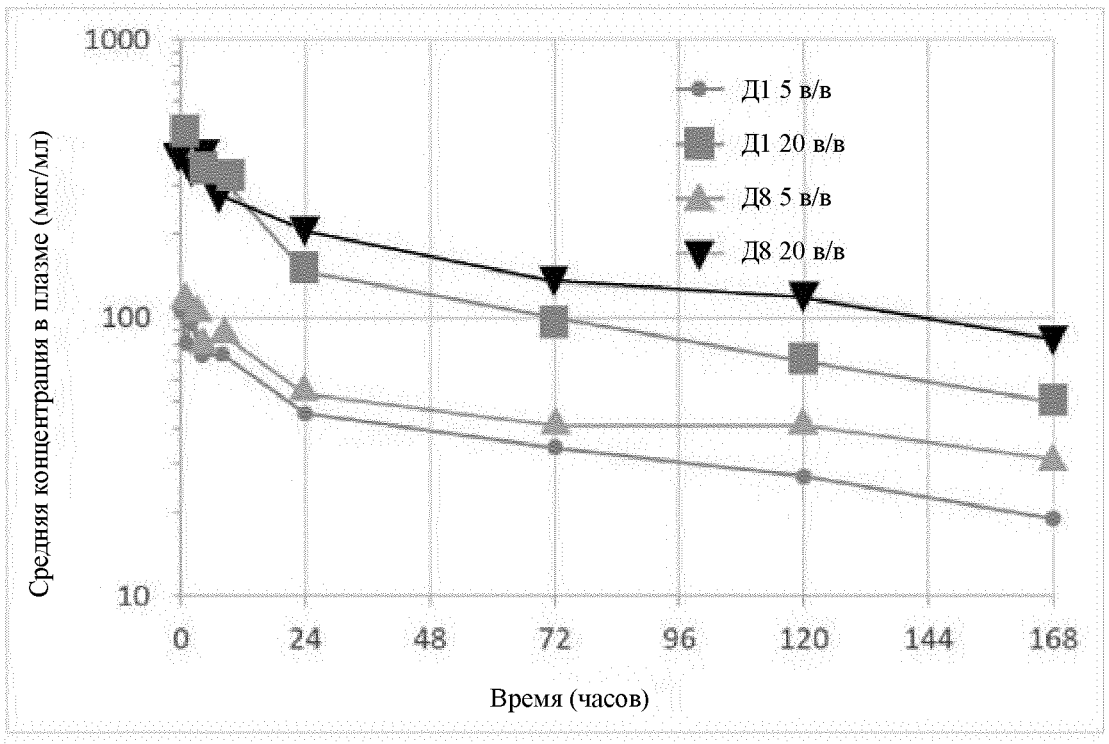
Фиг. 51

Связывание конъюгата 6 и конъюгата 12 с Fcγ-рецептором IIIA *in vitro*



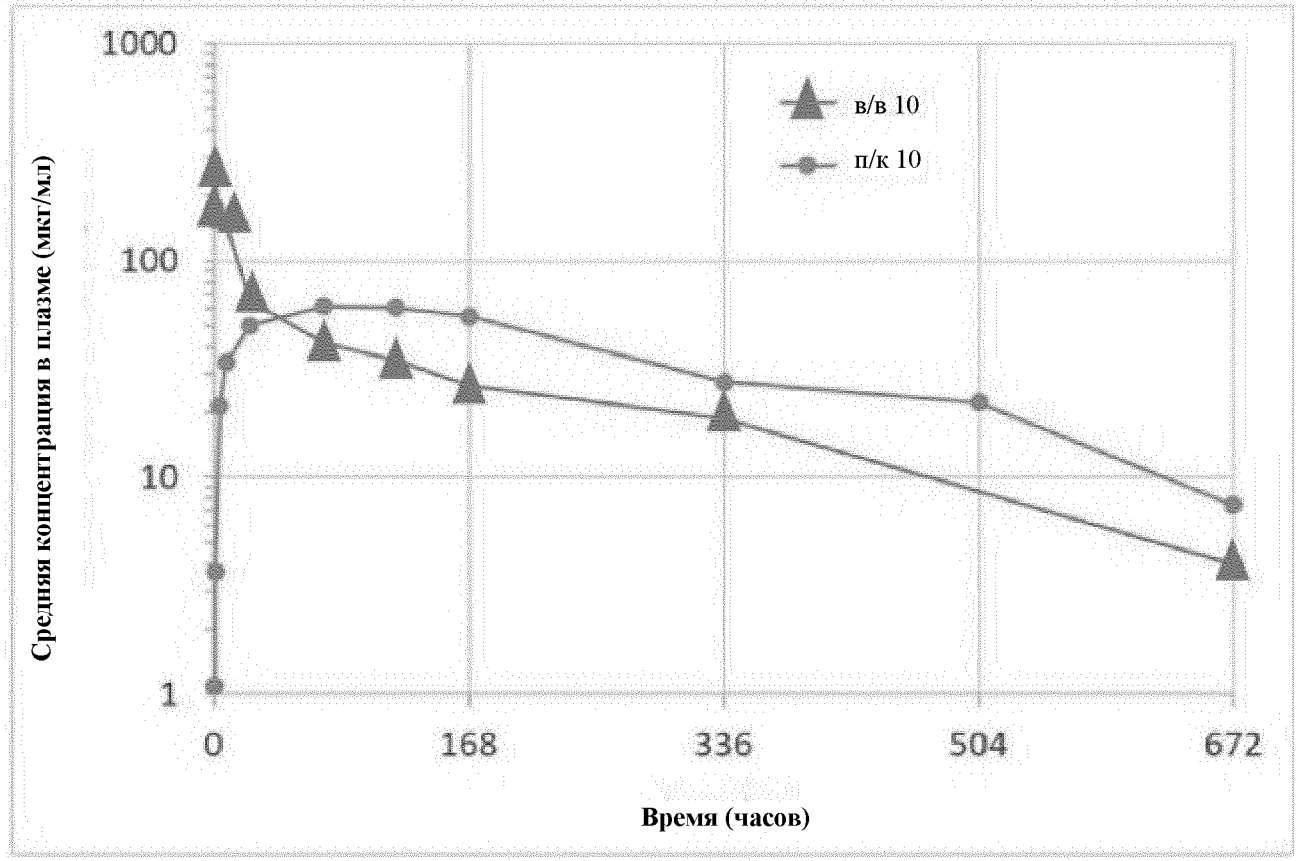
Фиг. 52

Токсикокинетика в дни 1 и 8

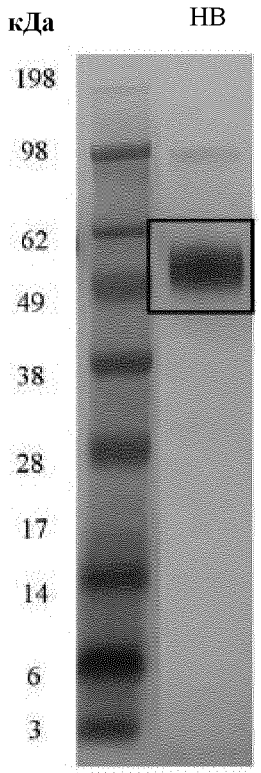


Фиг. 53

Средние концентрации в плазме после введения 5 мг/кг в/в или п/к

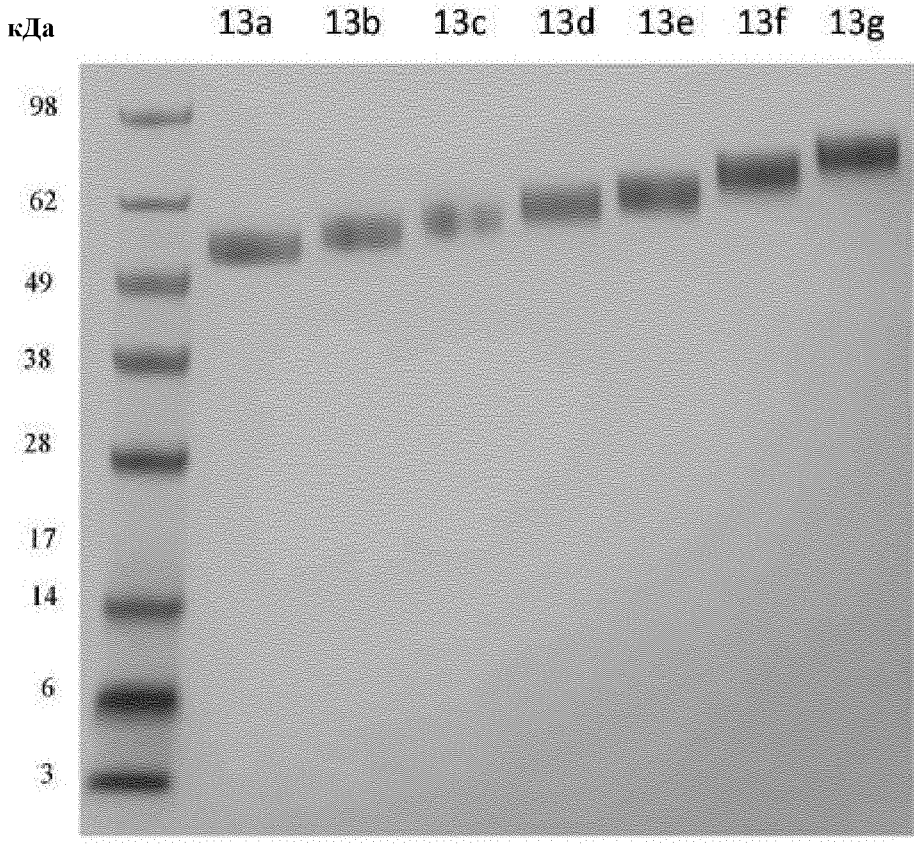


Фиг. 54
Конъюгат 12



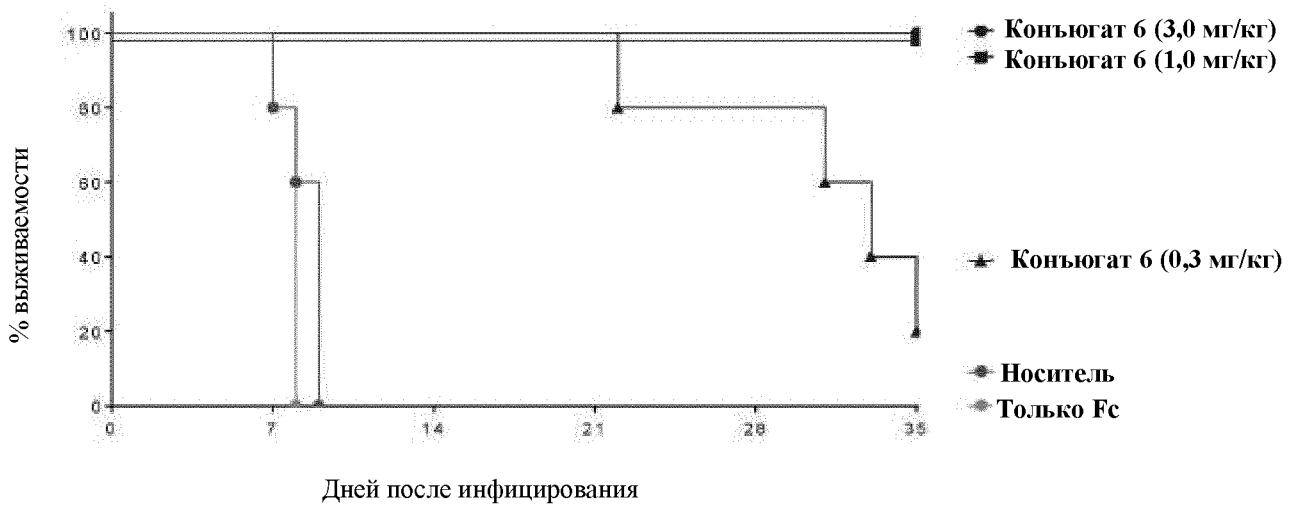
Фиг. 55

Конъюгаты 13a-13g



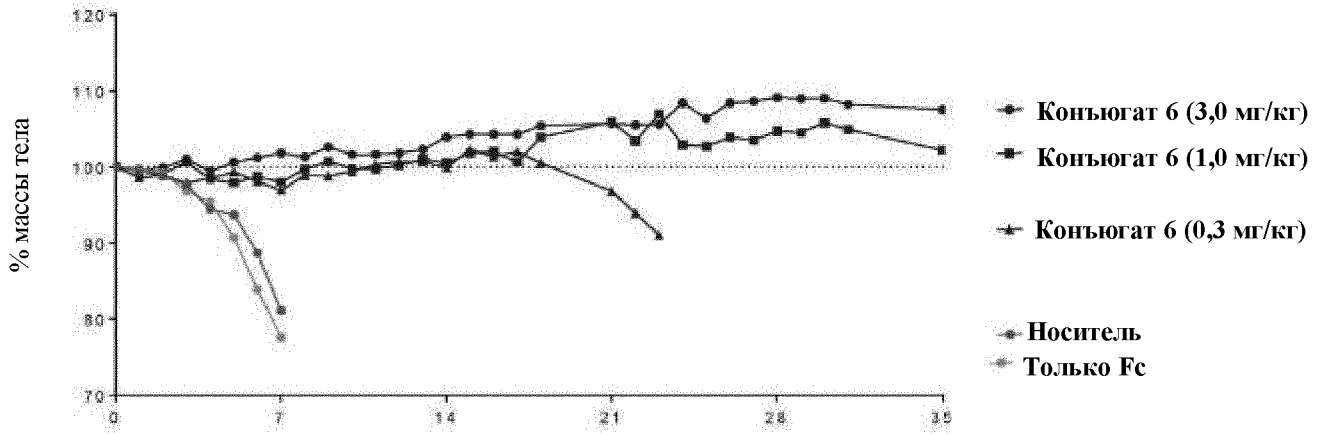
Фиг. 56

Эффективность конъюгата 6 *in vivo* у мышей с ослабленным иммунитетом

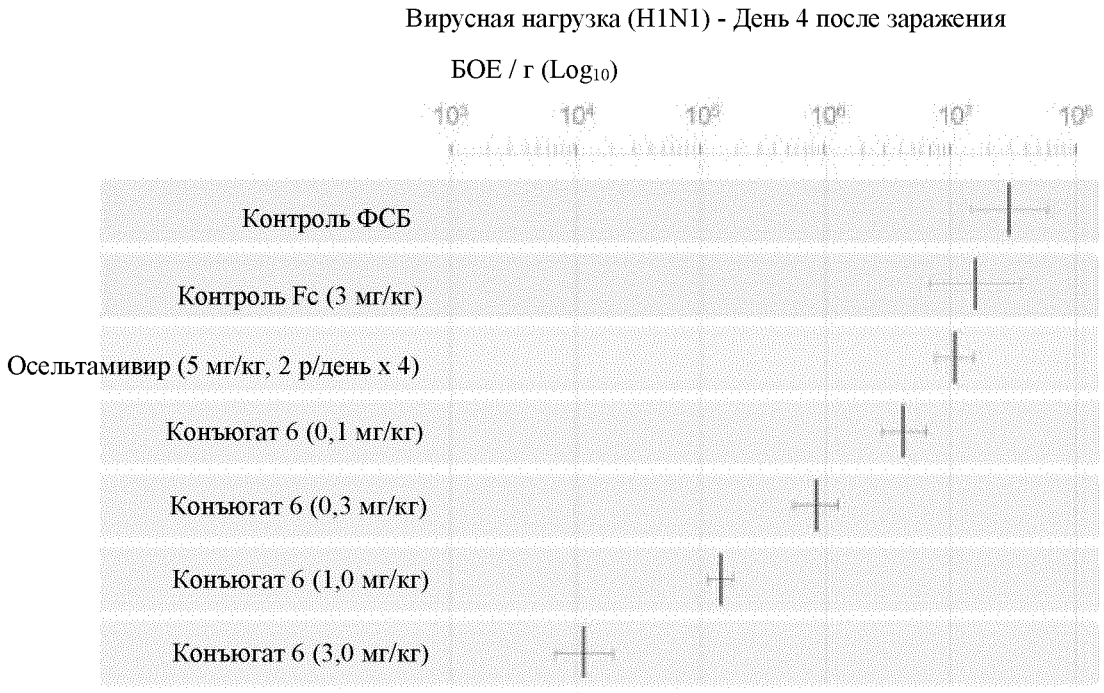


Фиг. 57

Эффективность конъюгата 6 *in vivo* у мышей с ослабленным иммунитетом

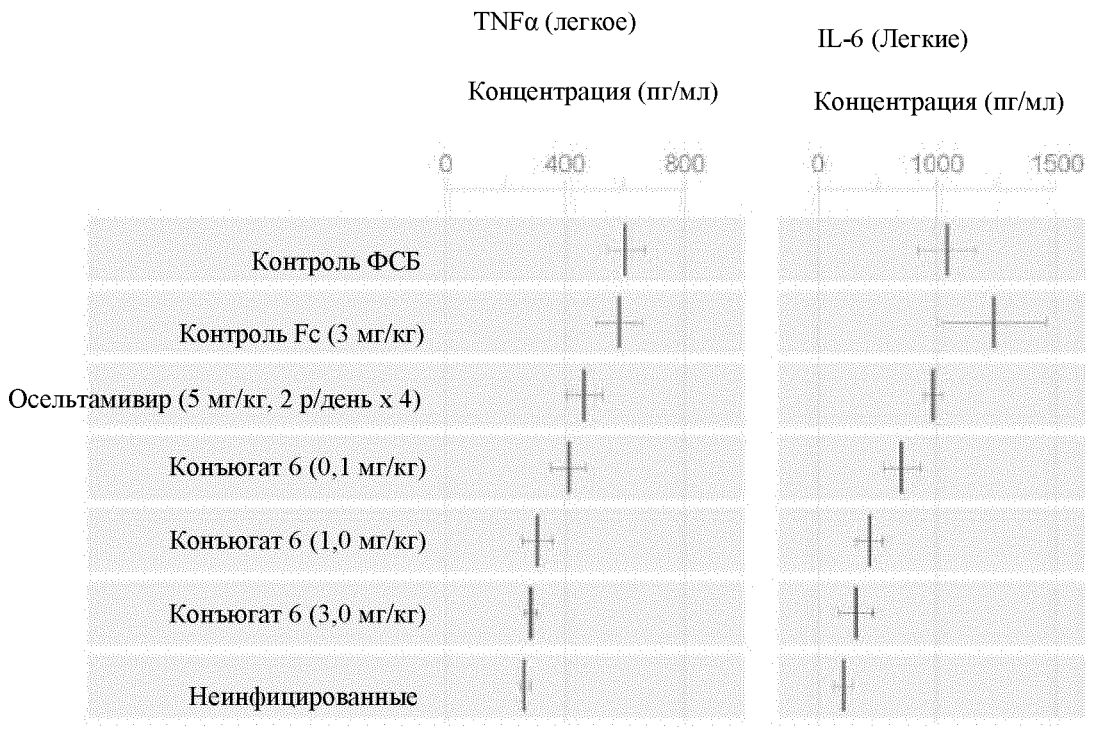


Фиг. 58
Вирусный клиренс в легких в зависимости от дозы конъюгата 6



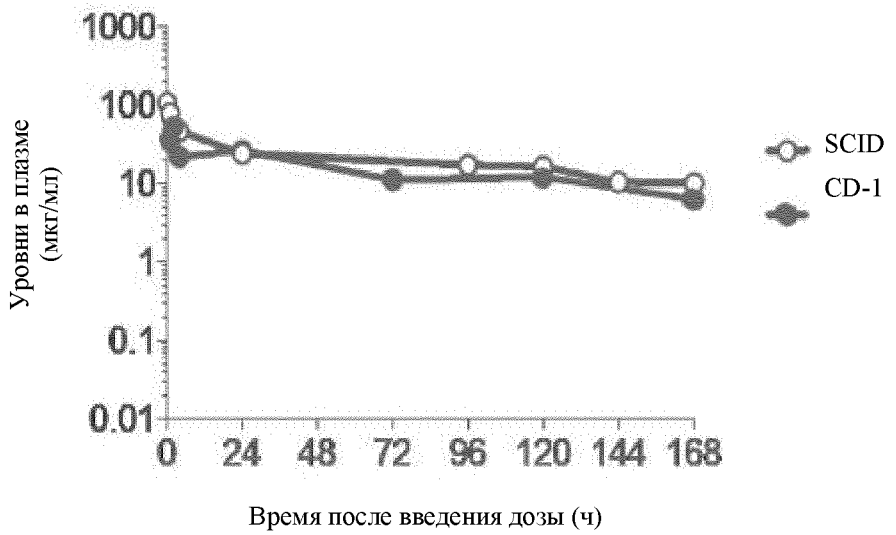
Фиг. 59

Снижение воспалительных цитокинов в легких в зависимости от дозы конъюгата 6

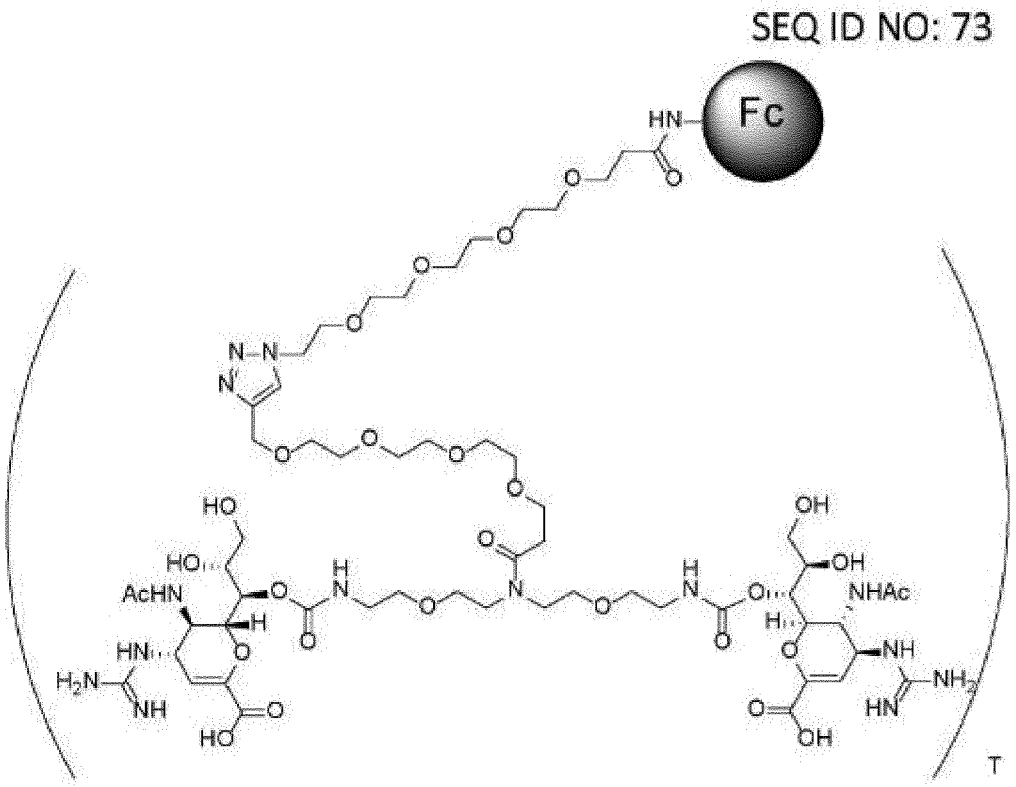


Фиг. 60

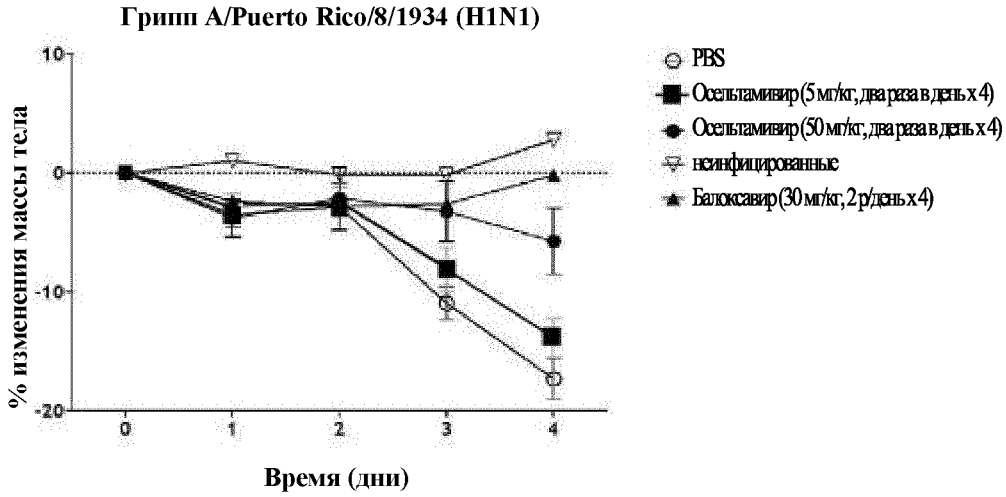
Фармакокинетика конъюгата 6 у мышей линии BALB/c с SCID и мышей CD-1
5 мг/кг в/в, однократная доза



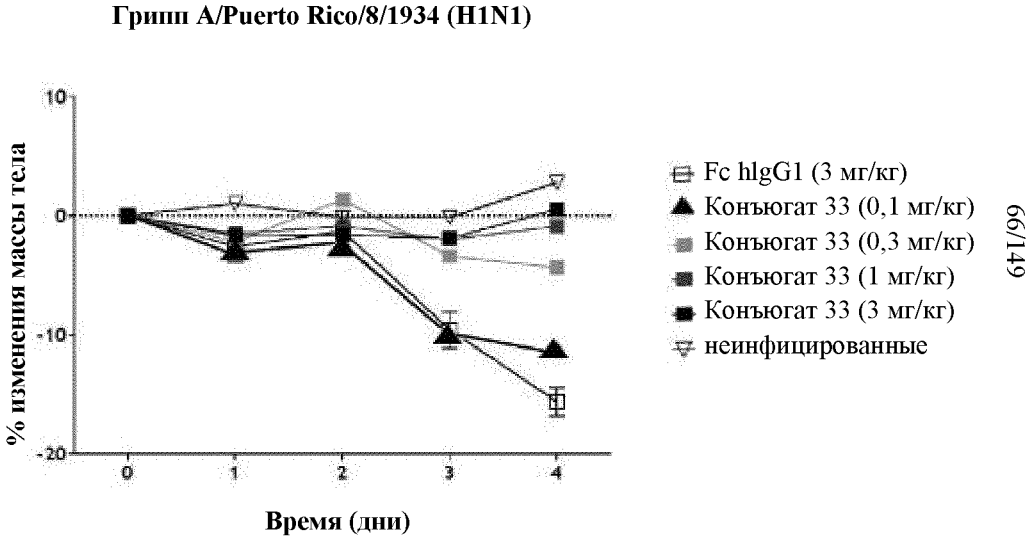
Фиг. 61
Конъюгат 33



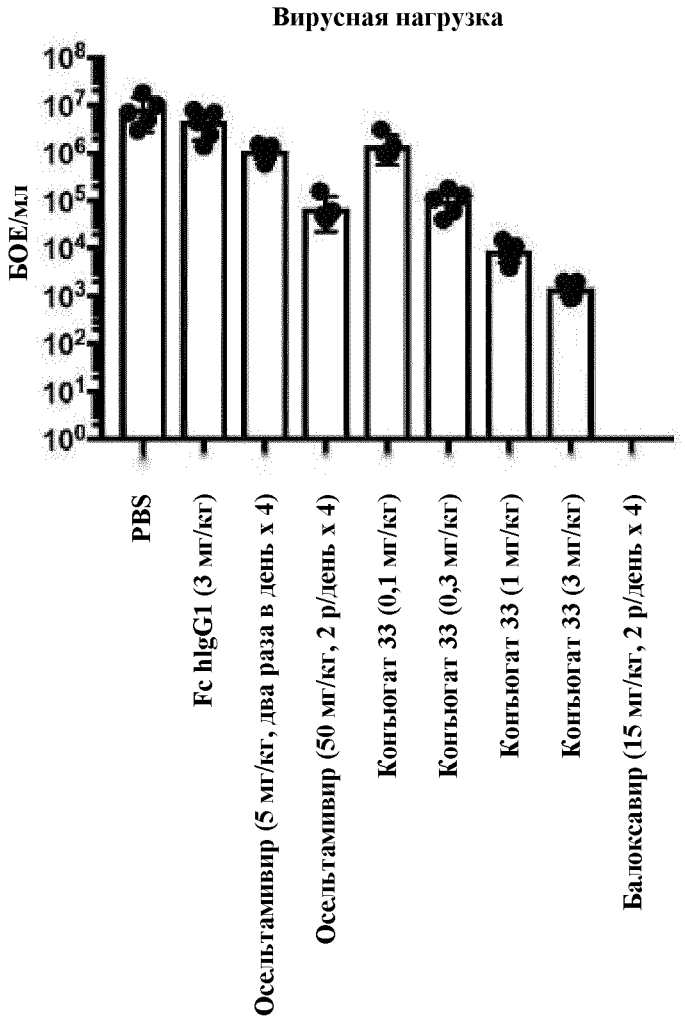
Фиг. 62A



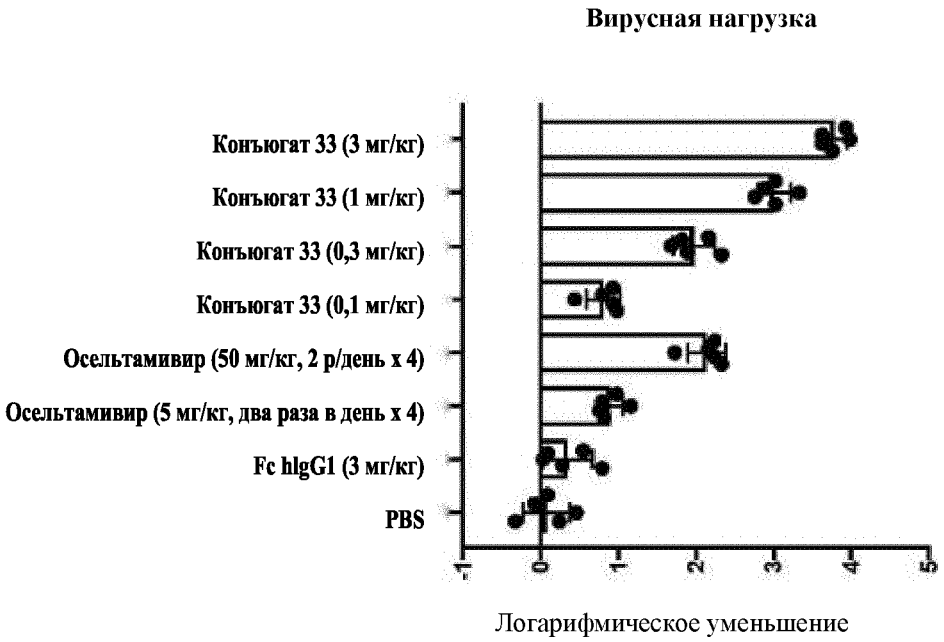
Фиг. 62B



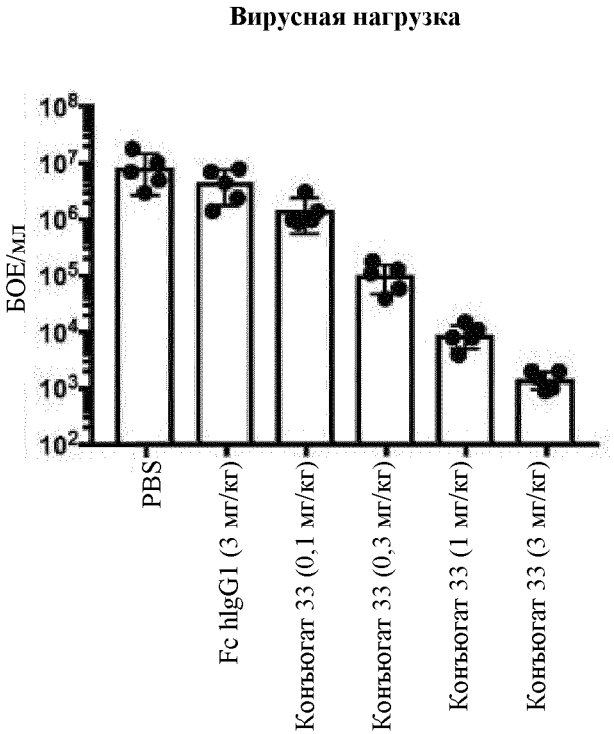
Фиг. 63A



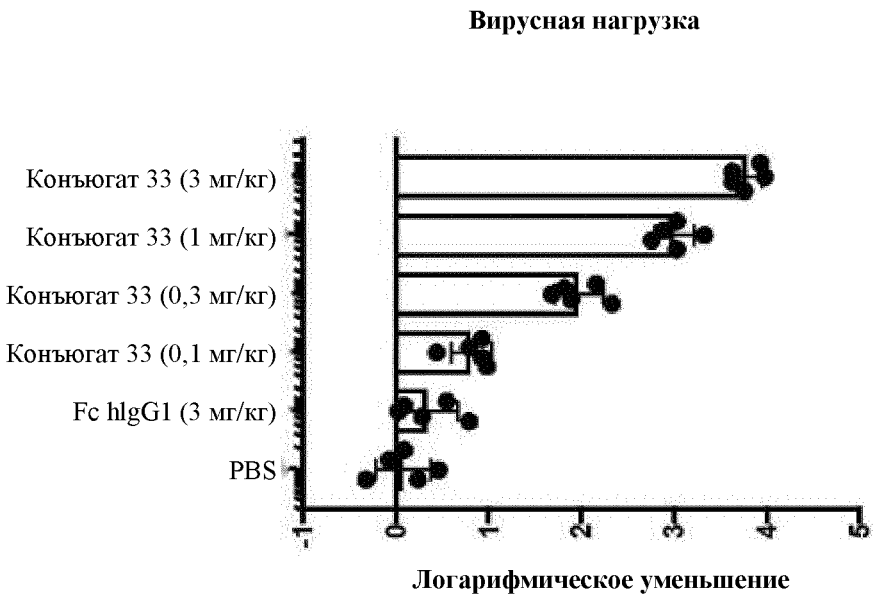
Фиг. 63B



Фиг. 64A



Фиг. 64B



Фиг. 65A

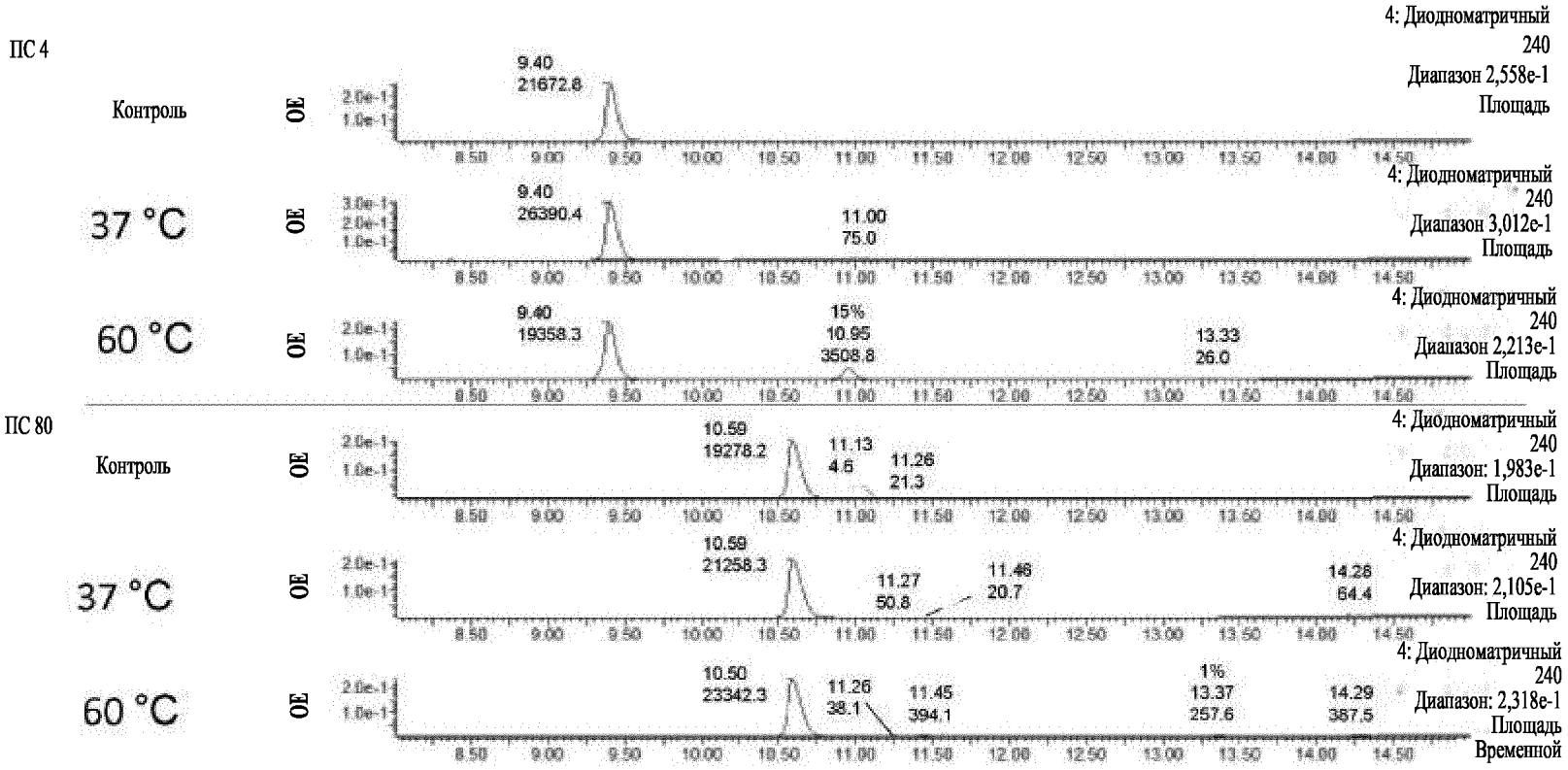
Фиг. 65B

Фиг. 65C

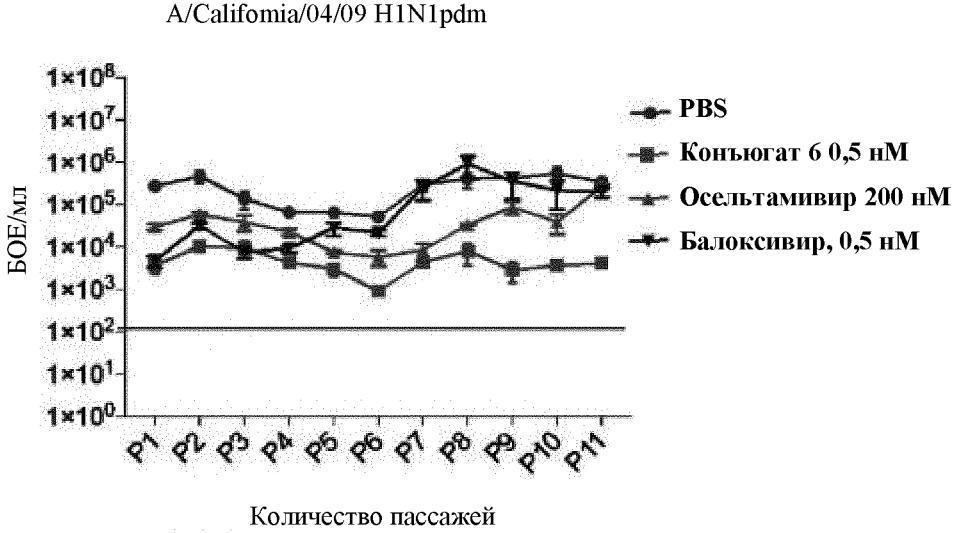
Фиг. 65D

Фиг. 65E

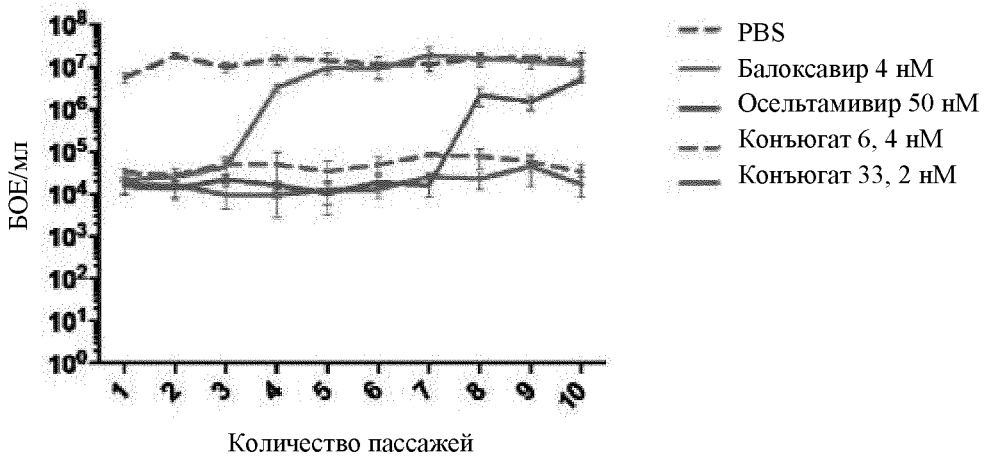
Фиг. 66


ПС 4
Контроль
37 °C
60 °C
ПС 80
Контроль
37 °C
60 °C
OE
4: Диодноматричный
240
Диапазон 2,558e-1
Площадь
9.40
21672.8
4: Диодноматричный
240
Диапазон 3,012e-1
Площадь
9.40
26390.4
11.00
75.0
4: Диодноматричный
240
Диапазон 2,213e-1
Площадь
9.40
19358.3
15%
10.95
3508.8
13.33
26.0
4: Диодноматричный
240
Диапазон: 1,983e-1
Площадь
10.59
19278.2
11.13
4.6
11.26
21.3
4: Диодноматричный
240
Диапазон: 2,105e-1
Площадь
10.59
21258.3
11.27
50.8
11.46
20.7
14.28
64.4
4: Диодноматричный
240
Диапазон: 2,318e-1
Площадь
Временной
10.50
23342.3
11.26
38.1
11.45
394.1
1%
13.37
257.6
14.29
387.5

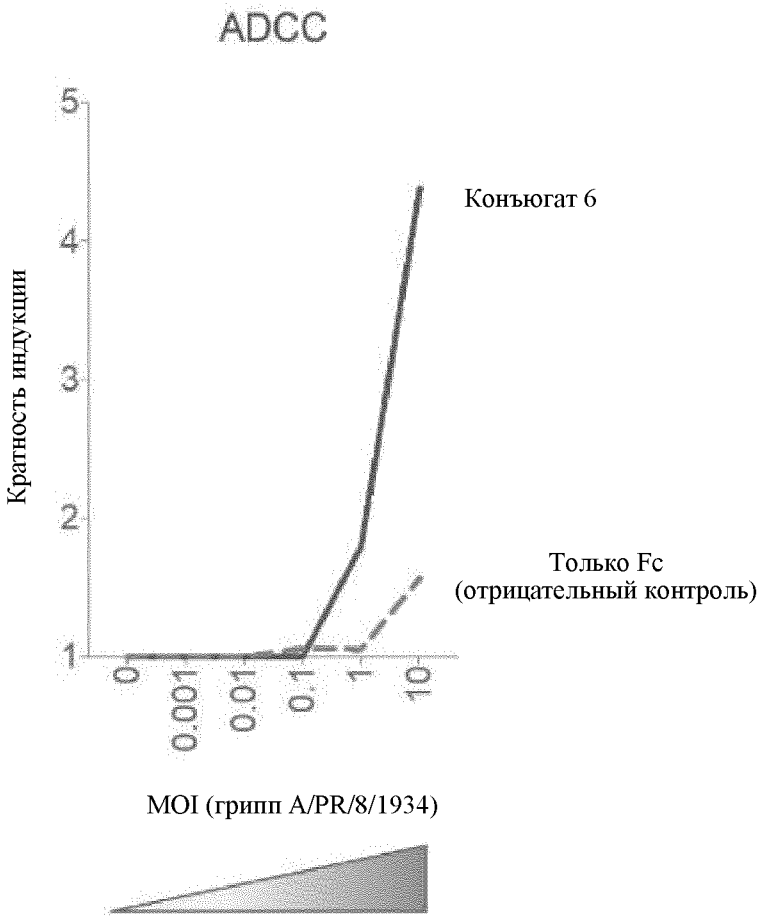
Фиг. 67


A/Califomia/04/09 H1N1pdm
БОЕ/мл
1×10^8
1×10^7
1×10^6
1×10^5
1×10^4
1×10^3
1×10^2
1×10^1
1×10^0
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P9
P10
P11
Количество пассажей
PBS
Конъюгат 6 0,5 нМ
Осельтамивир 200 нМ
Балоксивир, 0,5 нМ

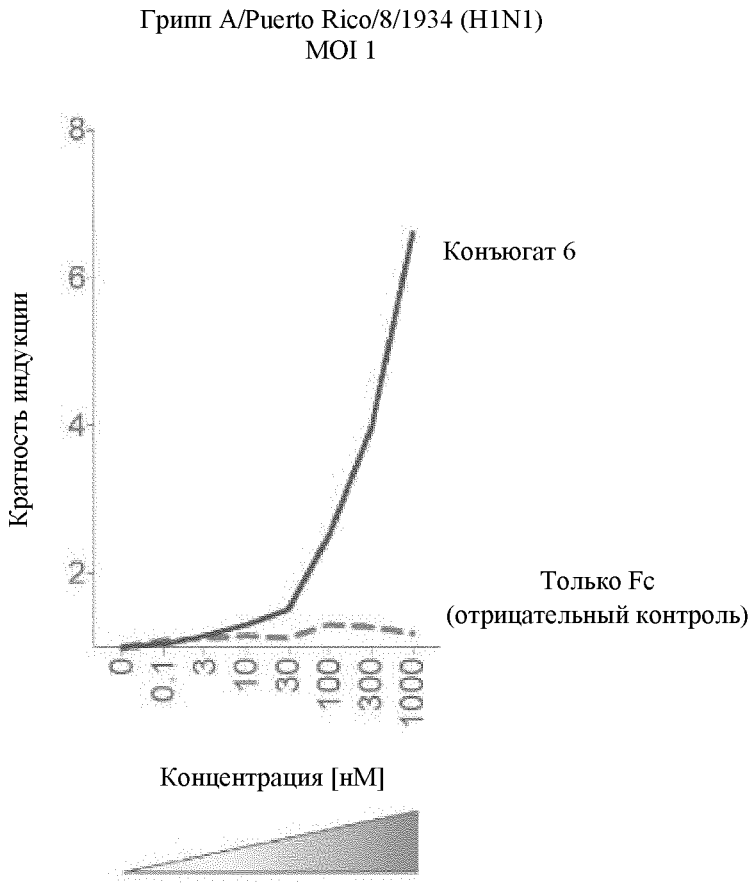
Фиг. 68


БОЕ/мл
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Количество пассажей
PBS
Балоксавир 4 нМ
Осельтамивир 50 нМ
Конъюгат 6, 4 нМ
Конъюгат 33, 2 нМ

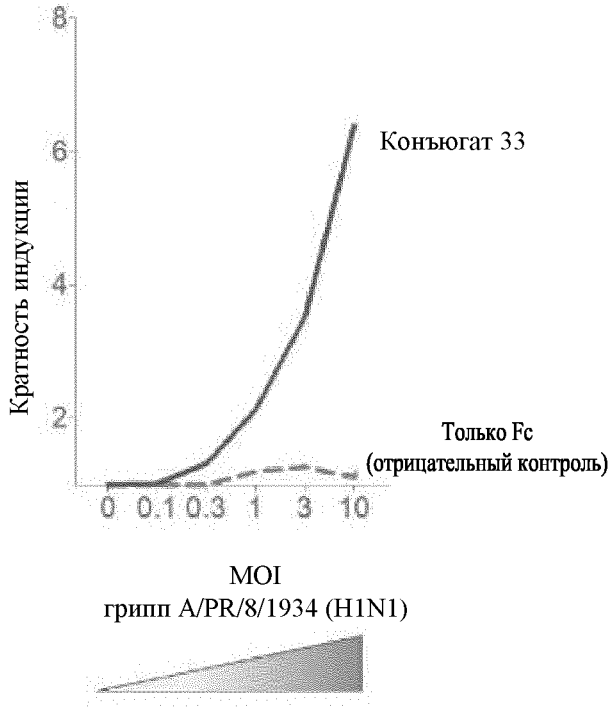
Фиг. 69


ADCC
Кратность индукции
5
4
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Конъюгат 6
Только Fc
(отрицательный контроль)
MOI (грипп A/PR/8/1934)

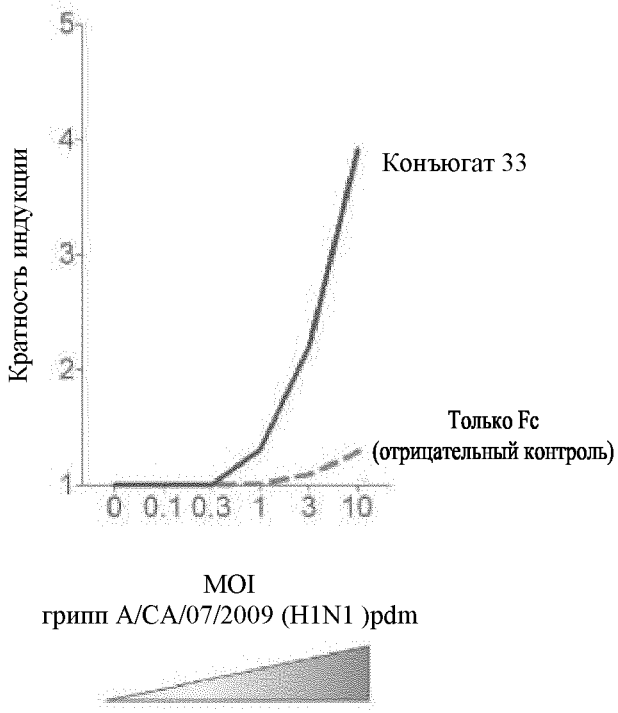
Фиг. 70


Грипп A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)
MOI 1
Кратность индукции
8
6
4
2
Конъюгат 6
Только Fc
(отрицательный контроль)
0
0,1
3
10
30
100
300
1000
Концентрация [нМ]

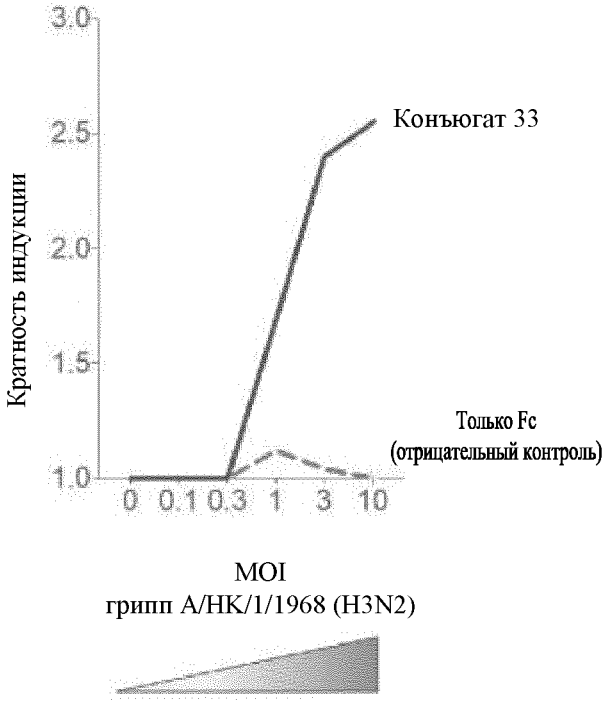
Фиг. 71A



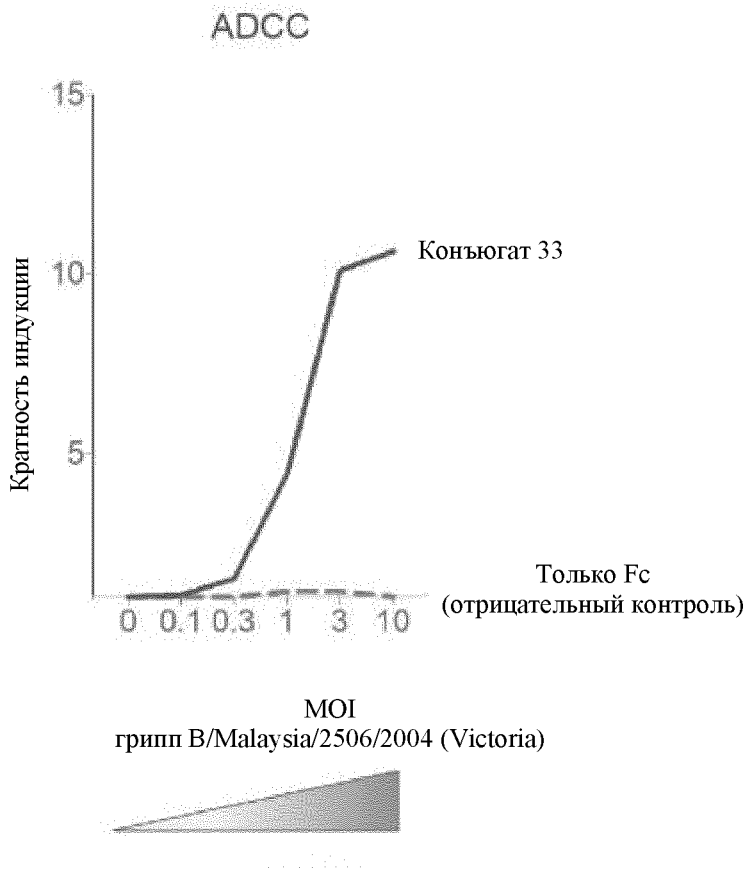
Фиг. 71B



Фиг. 71C

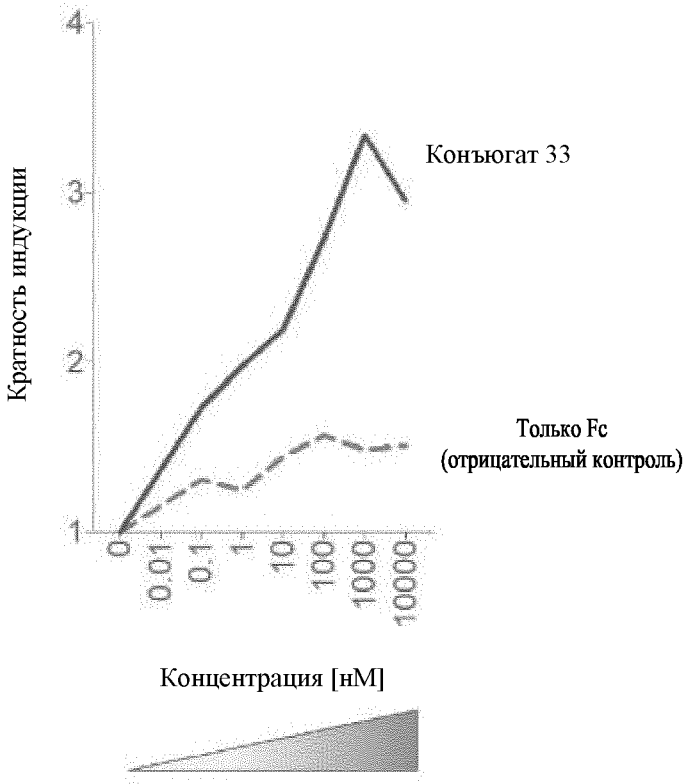


Фиг. 72


ADCC
15
10
5
Кратность индукции
Конъюгат 33
Только Fc
(отрицательный контроль)
0 0.1 0.3 1 3 10
MOI
грипп B/Malaysia/2506/2004 (Victoria)

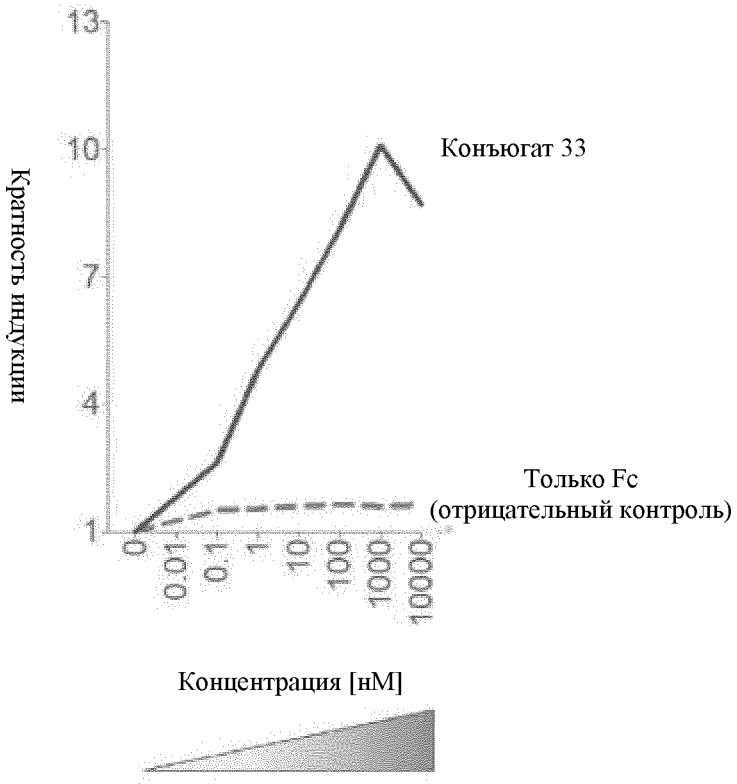
Фиг. 73A

Грипп A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)
MOI 1

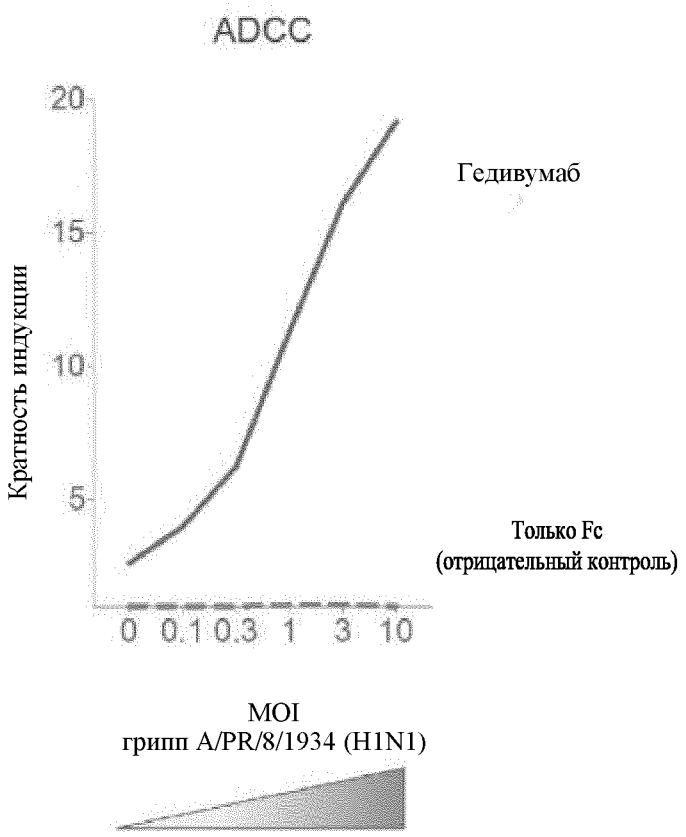


Фиг. 73B

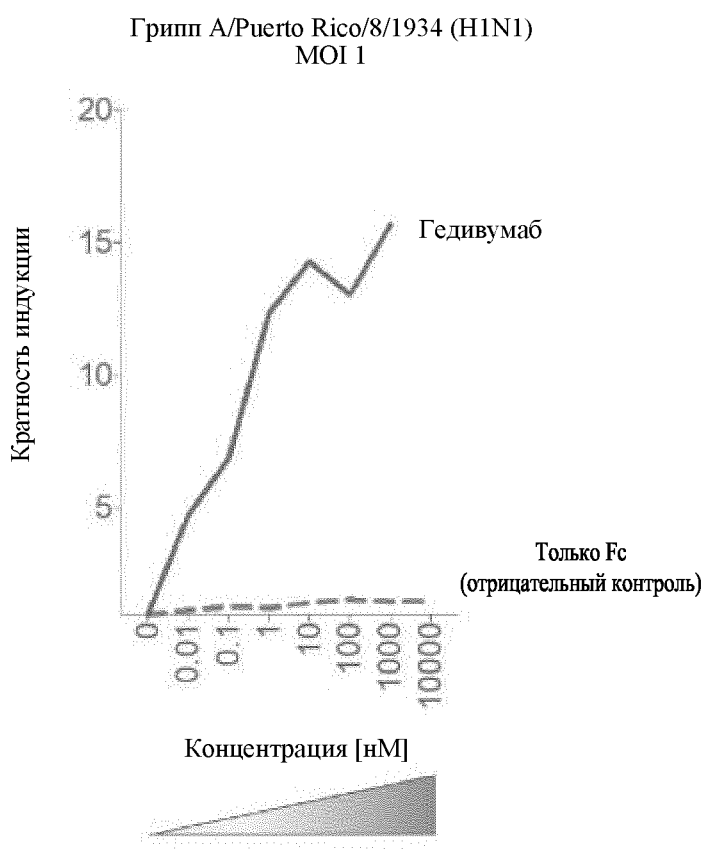
Грипп A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)
MOI 10



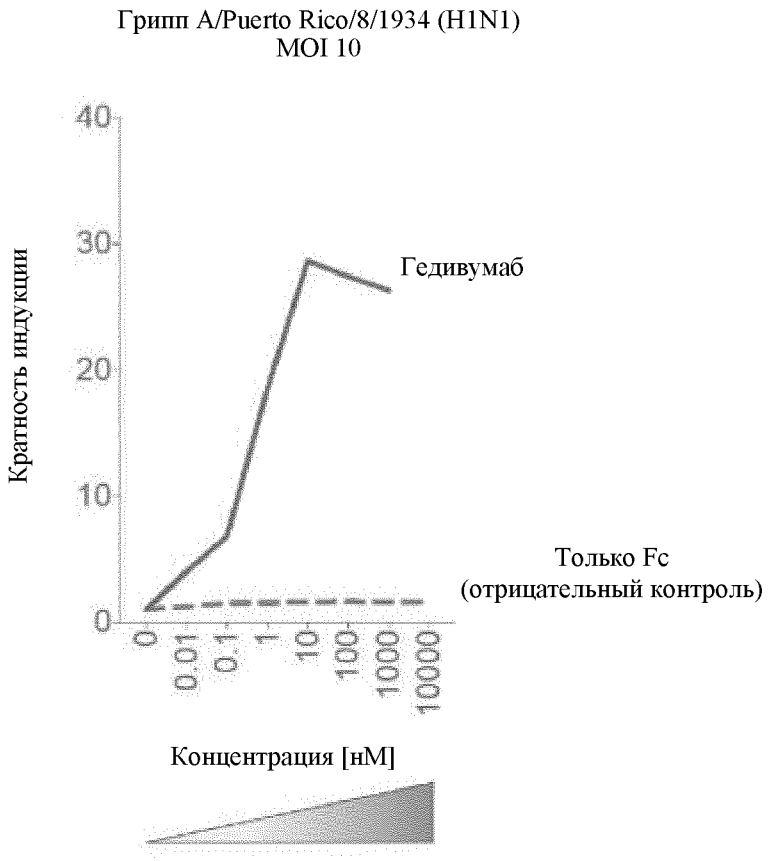
Фиг. 74


ADCC
20
15
10
5
Кратность индукции
Гедивумаб
Только Fc
(отрицательный контроль)
0 0.1 0.3 1 3 10
MOI
грипп A/PR/8/1934 (H1N1)

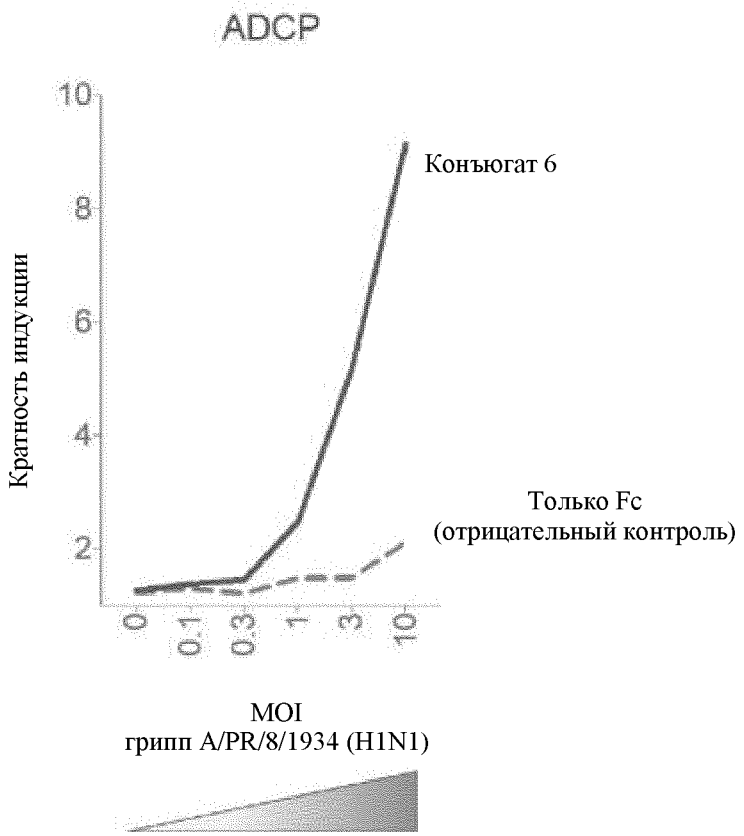
Фиг. 75A



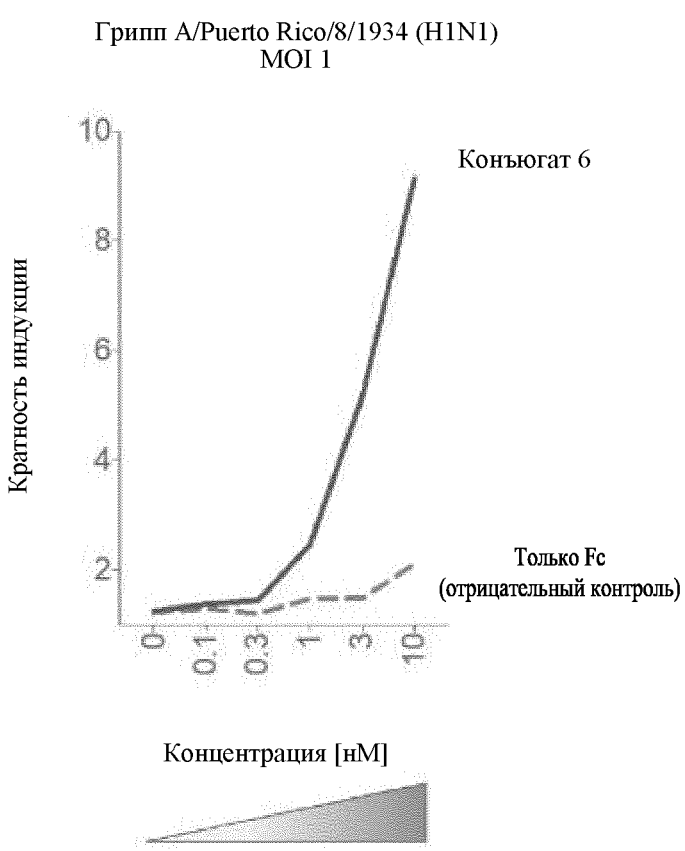
Фиг. 75B



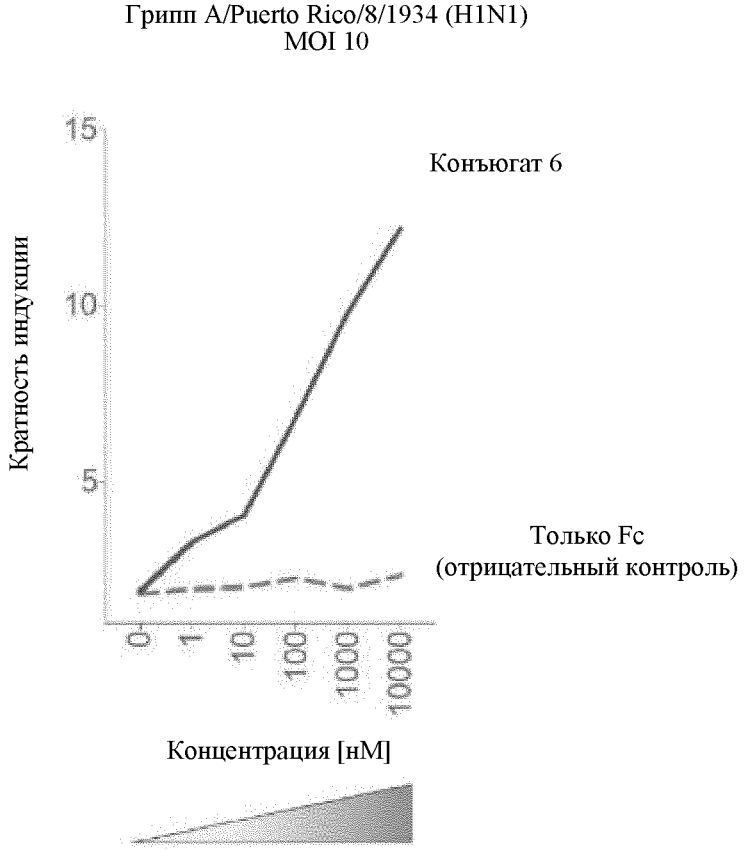
Фиг. 76


ADCP
Кратность индукции
10
8
6
4
2
0
0.1
0.3
1
3
10
Конъюгат 6
Только Fc
(отрицательный контроль)
MOI
грипп A/PR/8/1934 (H1N1)

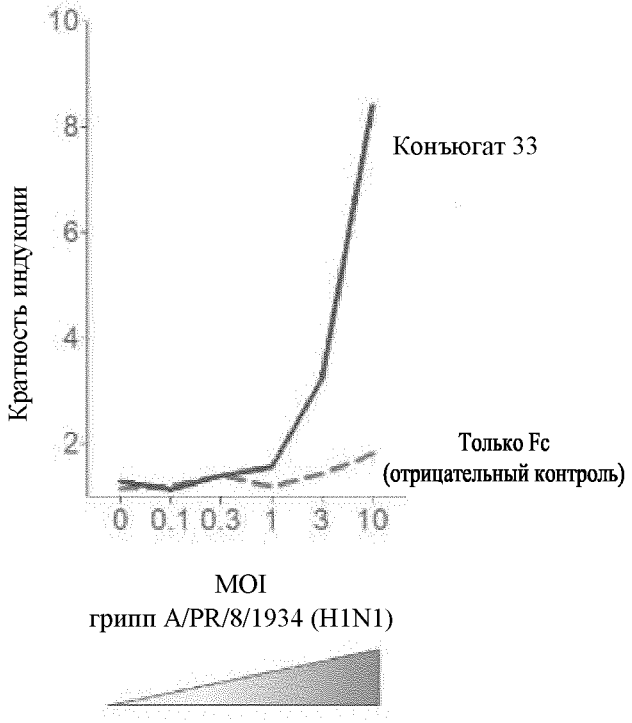
Фиг. 77A



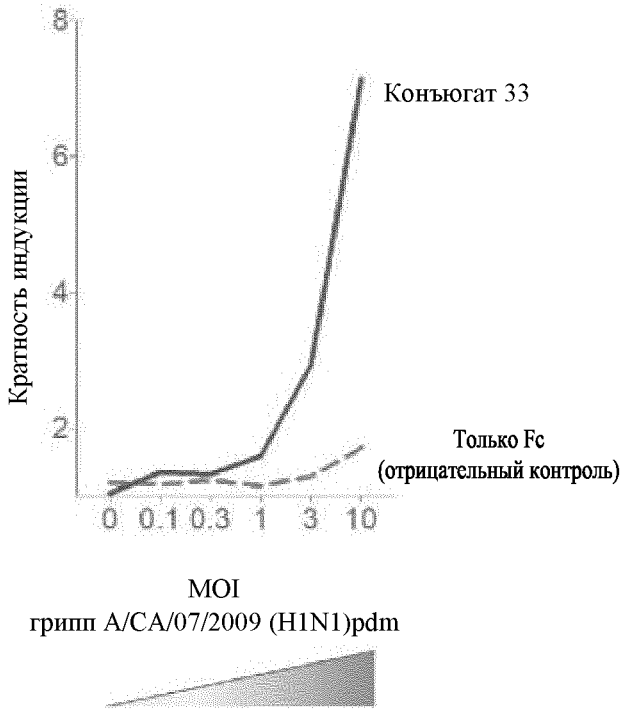
Фиг. 77B



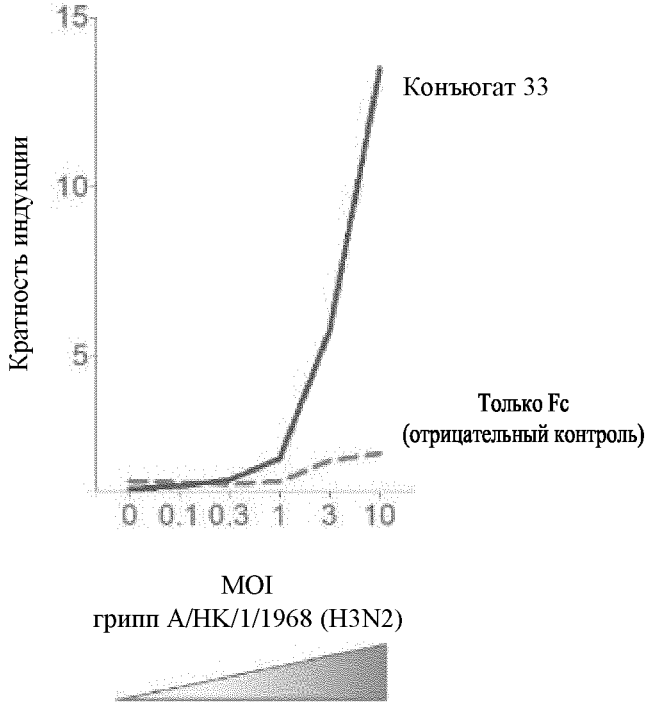
Фиг. 78A



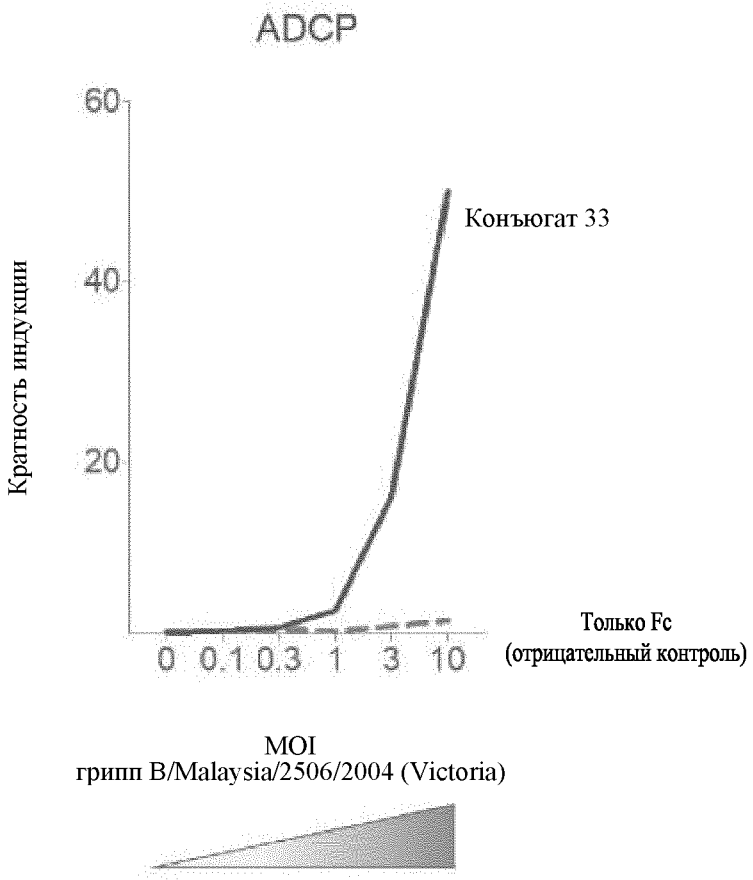
Фиг. 78B



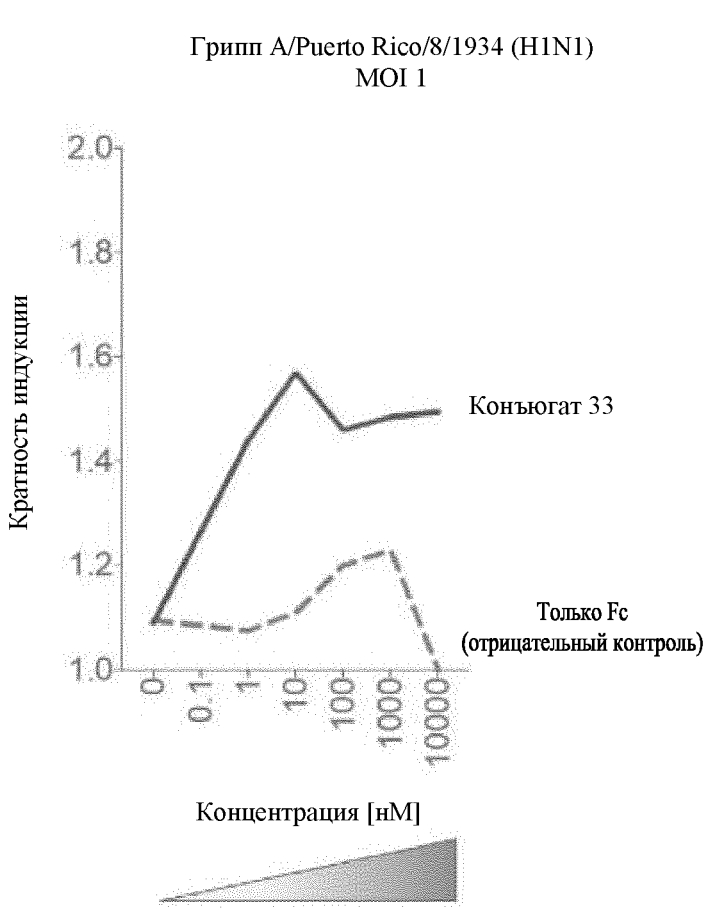
Фиг. 78C



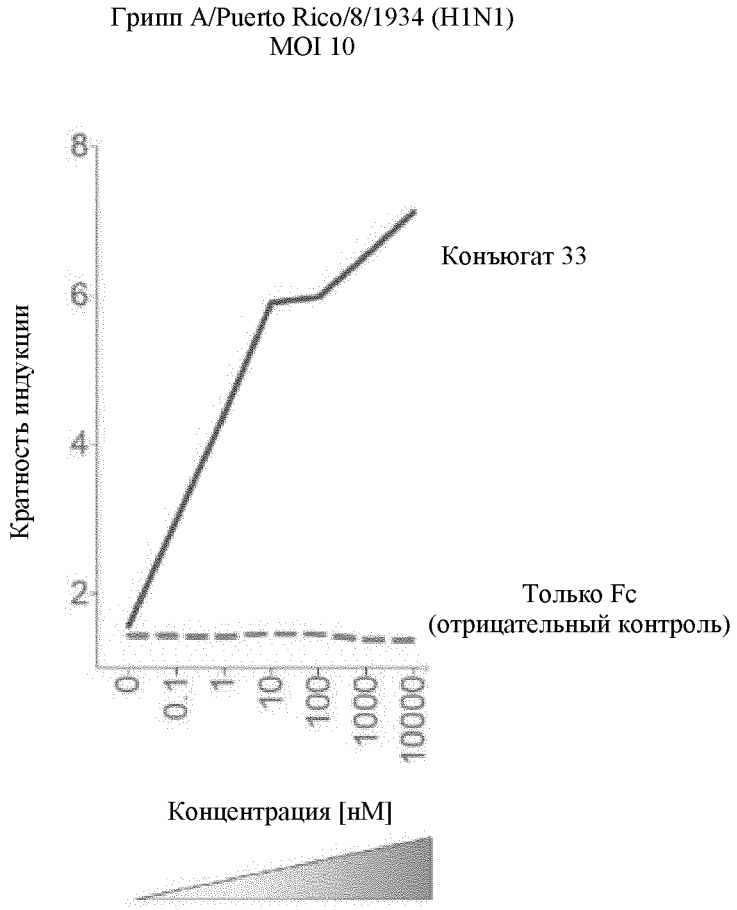
Фиг. 79


ADCP
60
40
20
Кратность индукции
Конъюгат 33
Только Fc
(отрицательный контроль)
0 0.1 0.3 1 3 10
MOI
грипп B/Malaysia/2506/2004 (Victoria)

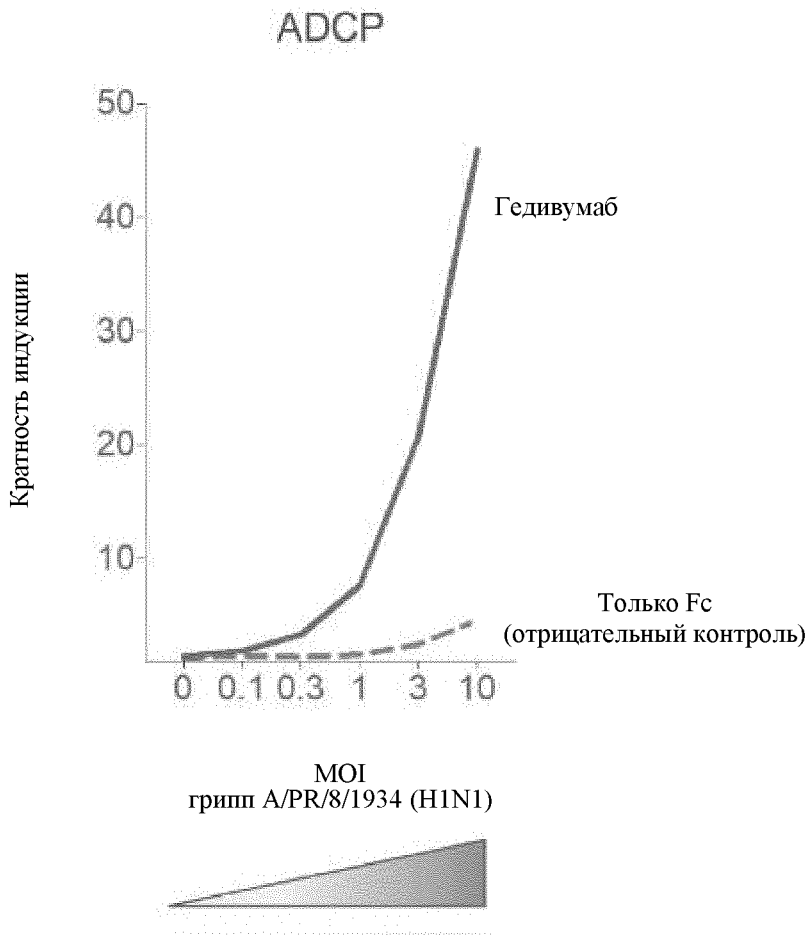
Фиг. 80A



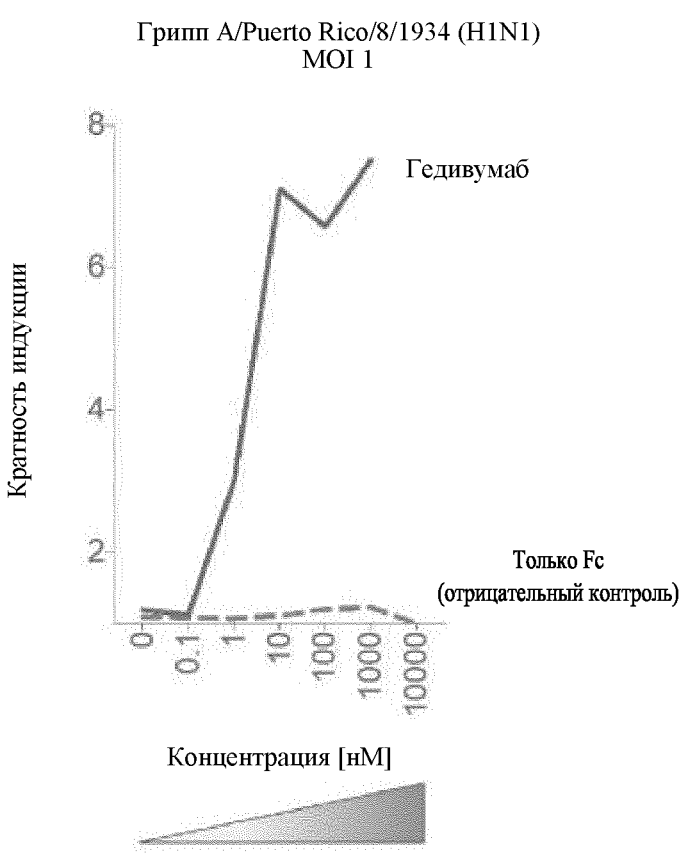
Фиг. 80B



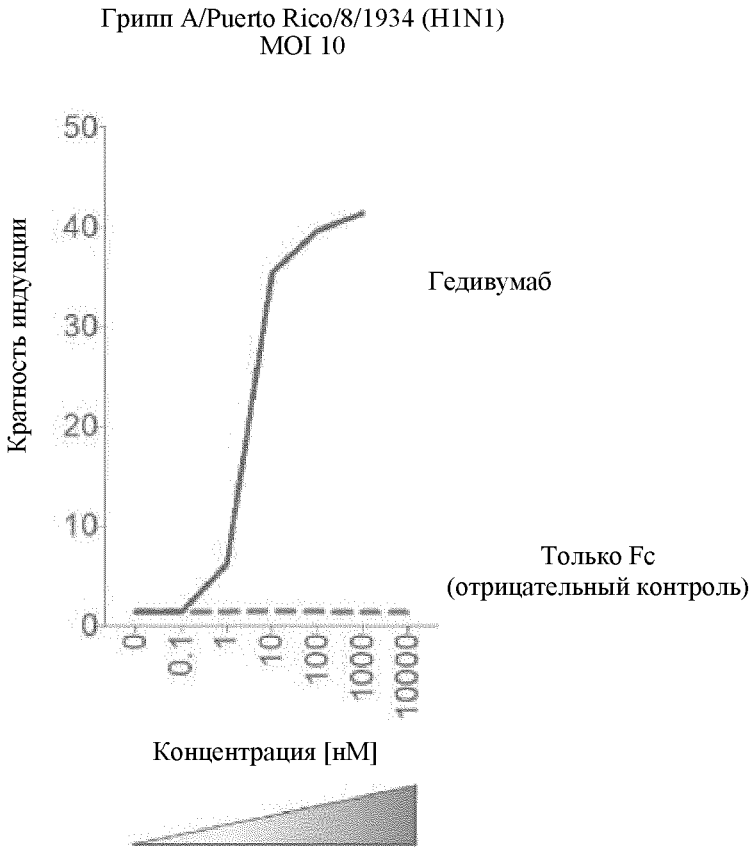
Фиг. 81


ADCP
Кратность индукции
50
40
30
20
10
Гедивумаб
Только Fc
(отрицательный контроль)
0 0.1 0.3 1 3 10
MOI
грипп A/PR/8/1934 (H1N1)

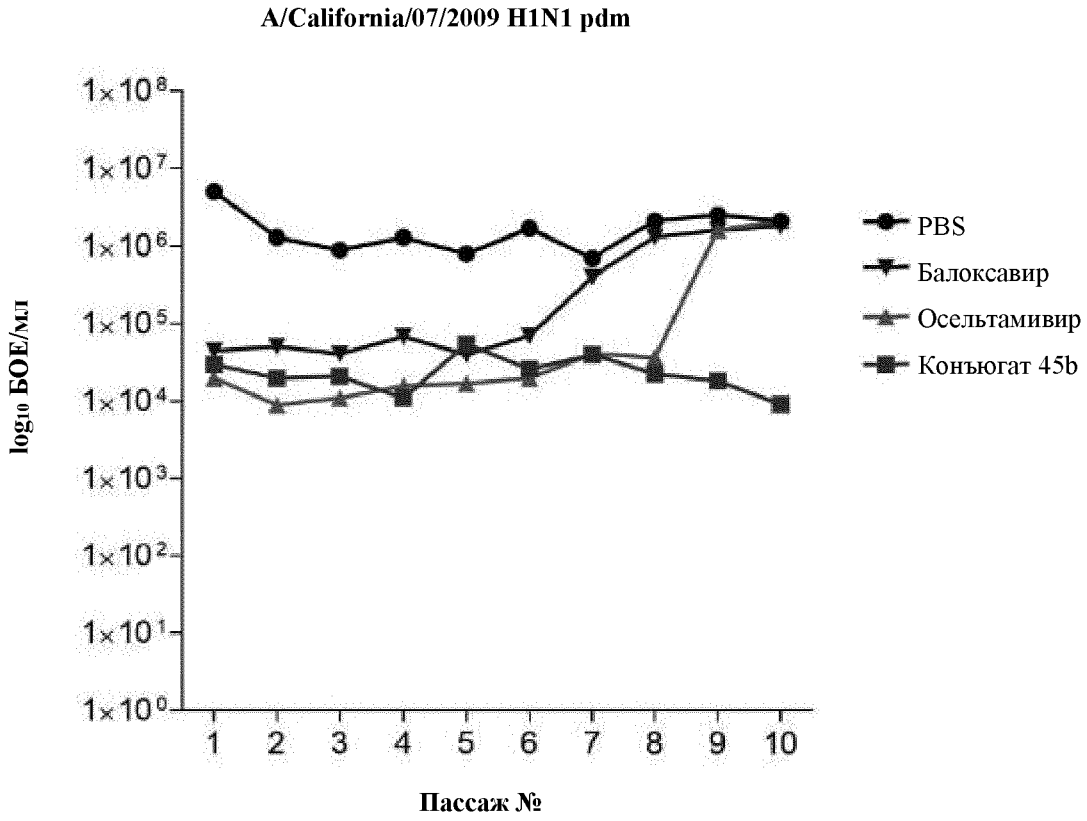
Фиг. 82A



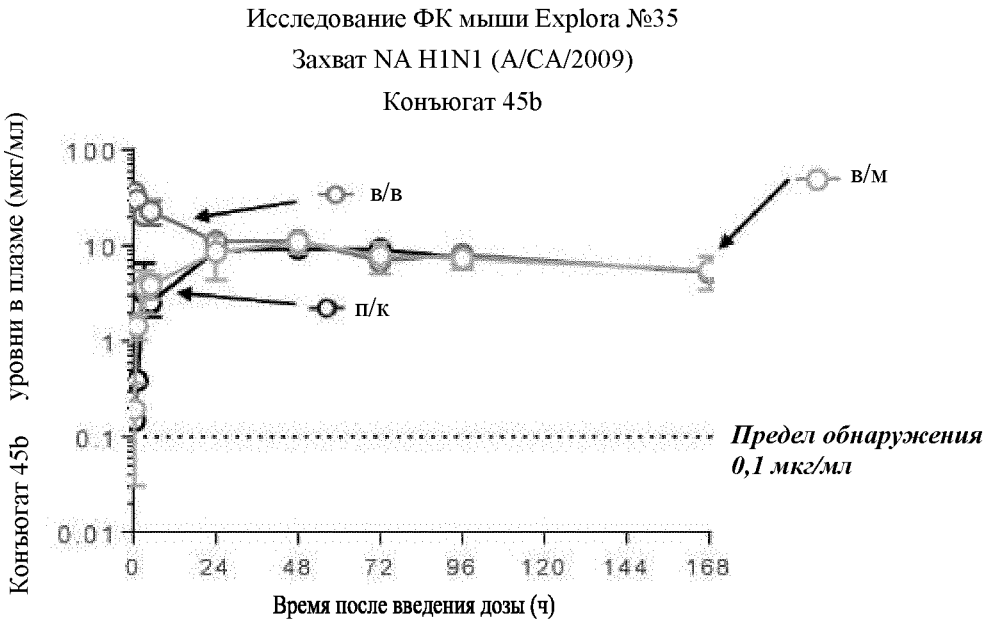
Фиг. 82B



Фиг. 83


A/California/07/2009 H1N1 pdm
log10 БОЕ/мл
1×10^8
1×10^7
1×10^6
1×10^5
1×10^4
1×10^3
1×10^2
1×10^1
1×10^0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Пассаж №
PBS
Балоксавир
Осельтамивир
Конъюгат 45b

Фиг. 84



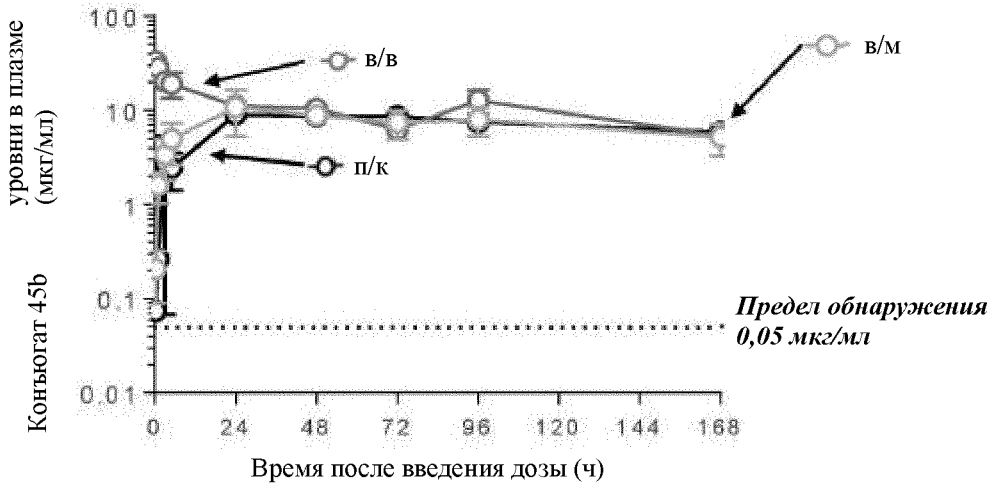
	в/м	в/в	п/к
Общая площадь пика	1238	1590	1223

Фиг. 85

Исследование ФК мыши Explora №35

Захват Fc hIgG

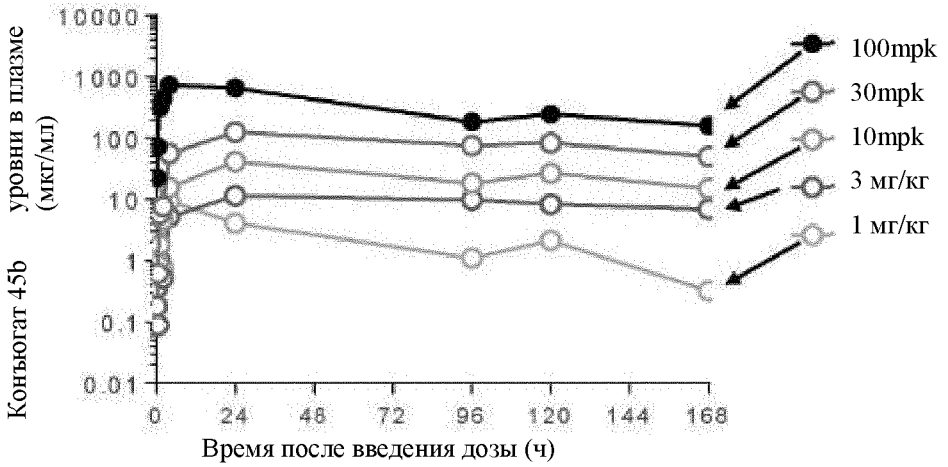
Конъюгат 45b



	в/м	в/в	п/к
Общая площадь пика	1262	1748	1222

Фиг. 86

Линейность дозы ФК №36
Захват NA H1N1 (A/CA/2009)
Конъюгат 45b



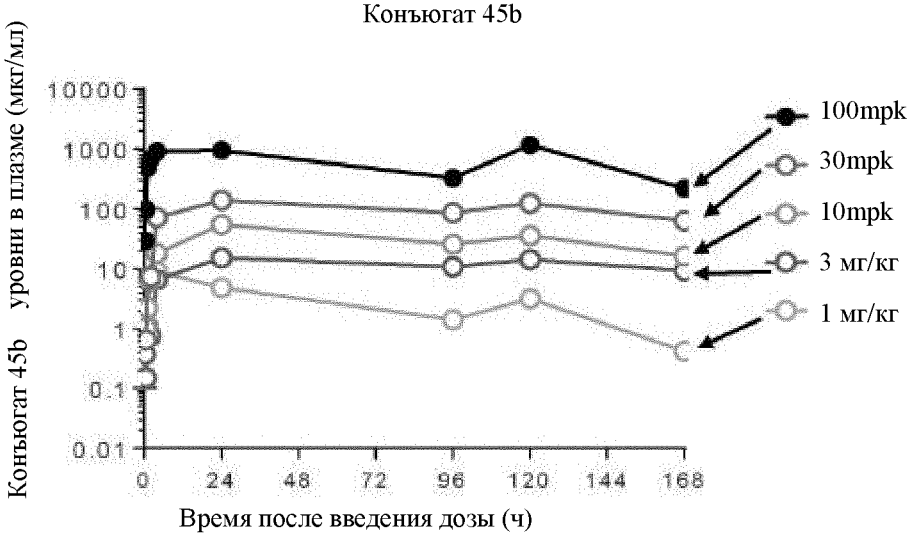
	1 мг/кг	3 мг/кг	10mpk	30mpk	100mpk
Общая площадь пика	435.9	1519	4281	14187	60701

Фиг. 87

Линейность дозы ФК №36

Захват hIgG

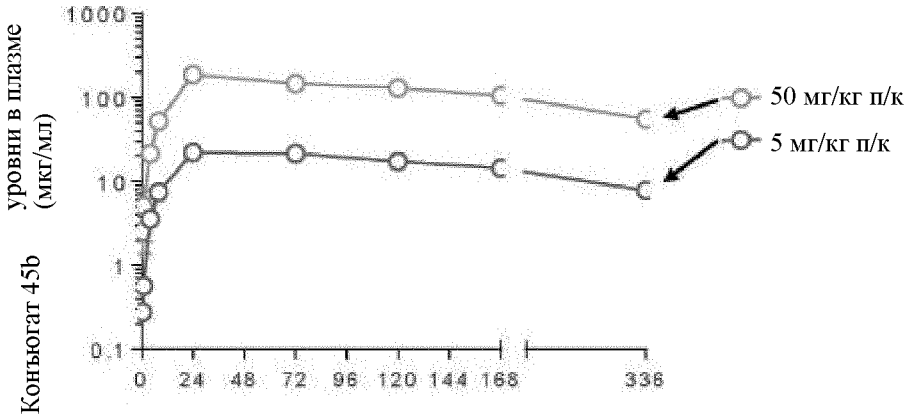
Конъюгат 45b



	1 мг/кг	3 мг/кг	10mpk	30mpk	100mpk
Общая площадь пика	520.5	2023	5615	17270	118165

Фиг. 88

ФК крысы
Захват NA H1N1
Конъюгат 45b



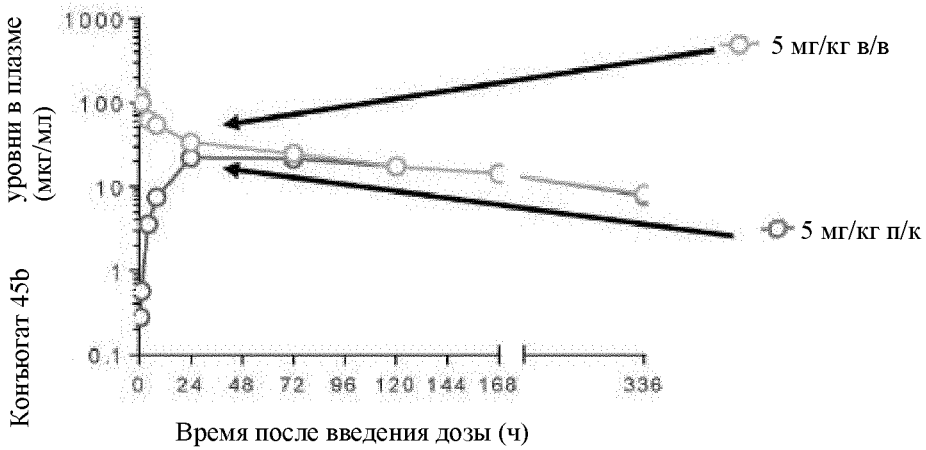
	5 мг/кг п/к	50 мг/кг п/к
Общая площадь пика	4864	35809

Фиг. 89

ФК крысы

Захват NA H1N1

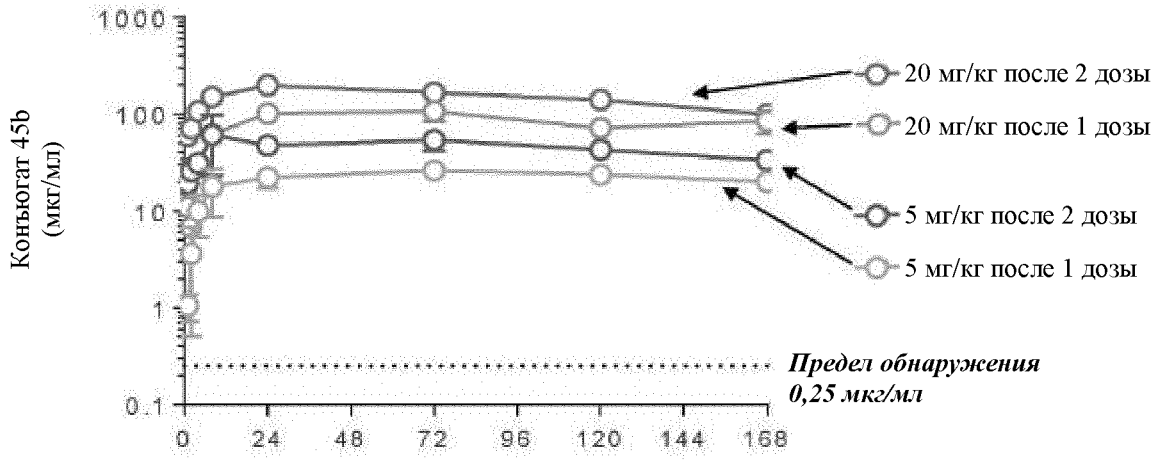
Конъюгат 45b



	5 мг/кг в/в	5 мг/кг п/к
Общая площадь пика	6324	4864

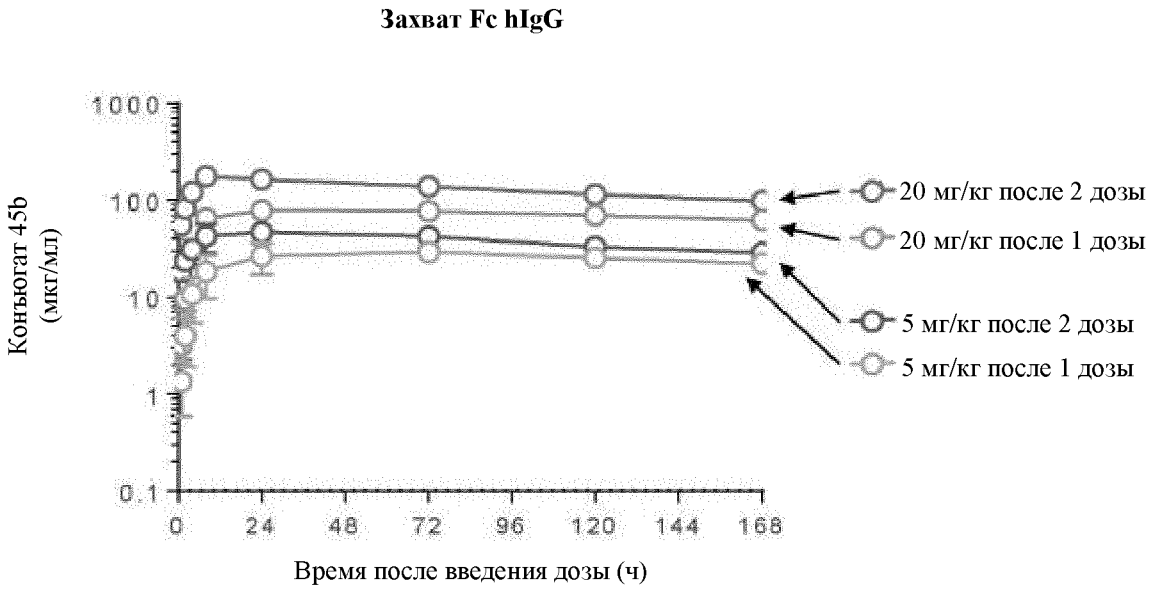
Фиг. 90

Захват NA H1N1 (A/CA/04/09)



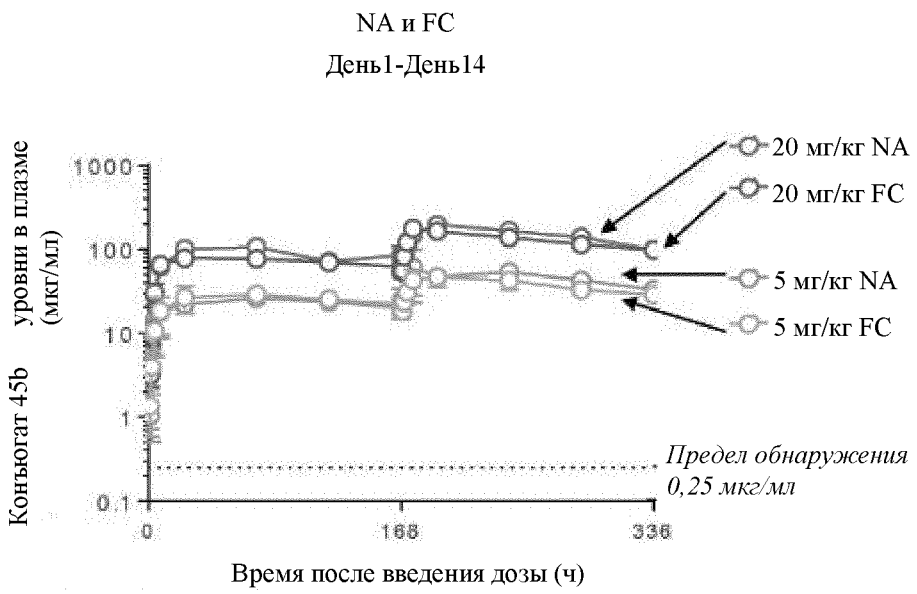
	5 мг/кг после 1 дозы	5 мг/кг после 2 дозы	20 мг/кг после 1 дозы	20 мг/кг после 2 дозы
Общая площадь пика	3800	7738	14583	25363

Фиг. 91



	5 мг/кг после 1 дозы	5 мг/кг после 2 дозы	20 мг/кг после 1 дозы	20 мг/кг после 2 дозы
Общая площадь пика	4240	6394	11853	22089

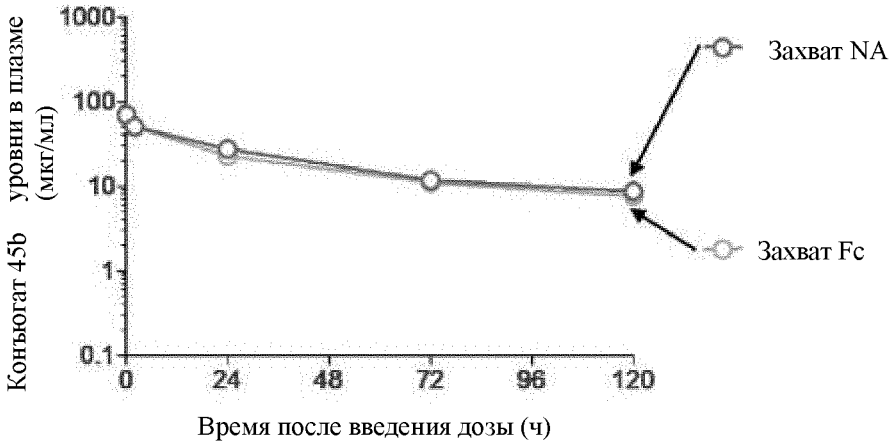
Фиг. 92



	5 мг/кг FC	20 мг/кг FC	5 мг/кг NA	20 мг/кг NA
Общая площадь пика	10636	33946	11540	39952

Фиг. 93

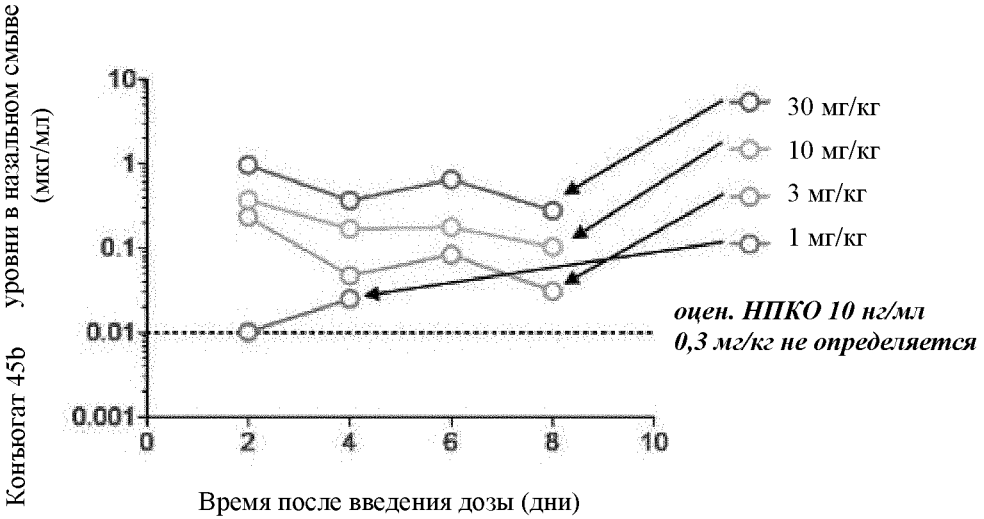
Исследование ФК хорьков
Уровни конъюгата 45b в плазме
3 мг/кг в/в



	Захват NA	Захват Fc
Общая площадь	2394	2165

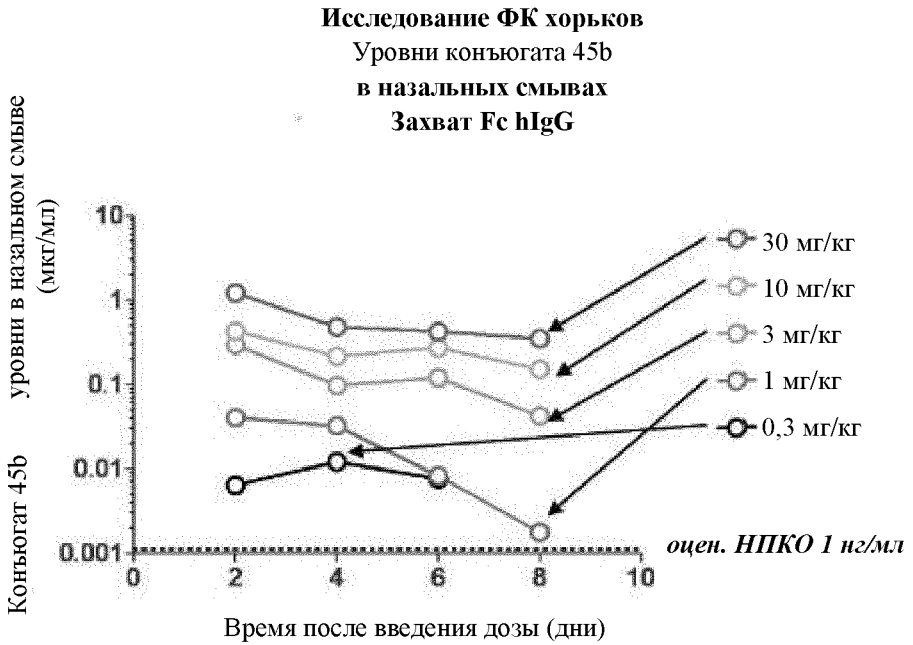
Фиг. 94

Исследование ФК хорьков
Уровни конъюгата 45b
в назальных смывах
Захват NA H1N1 (A/CA/4/09)



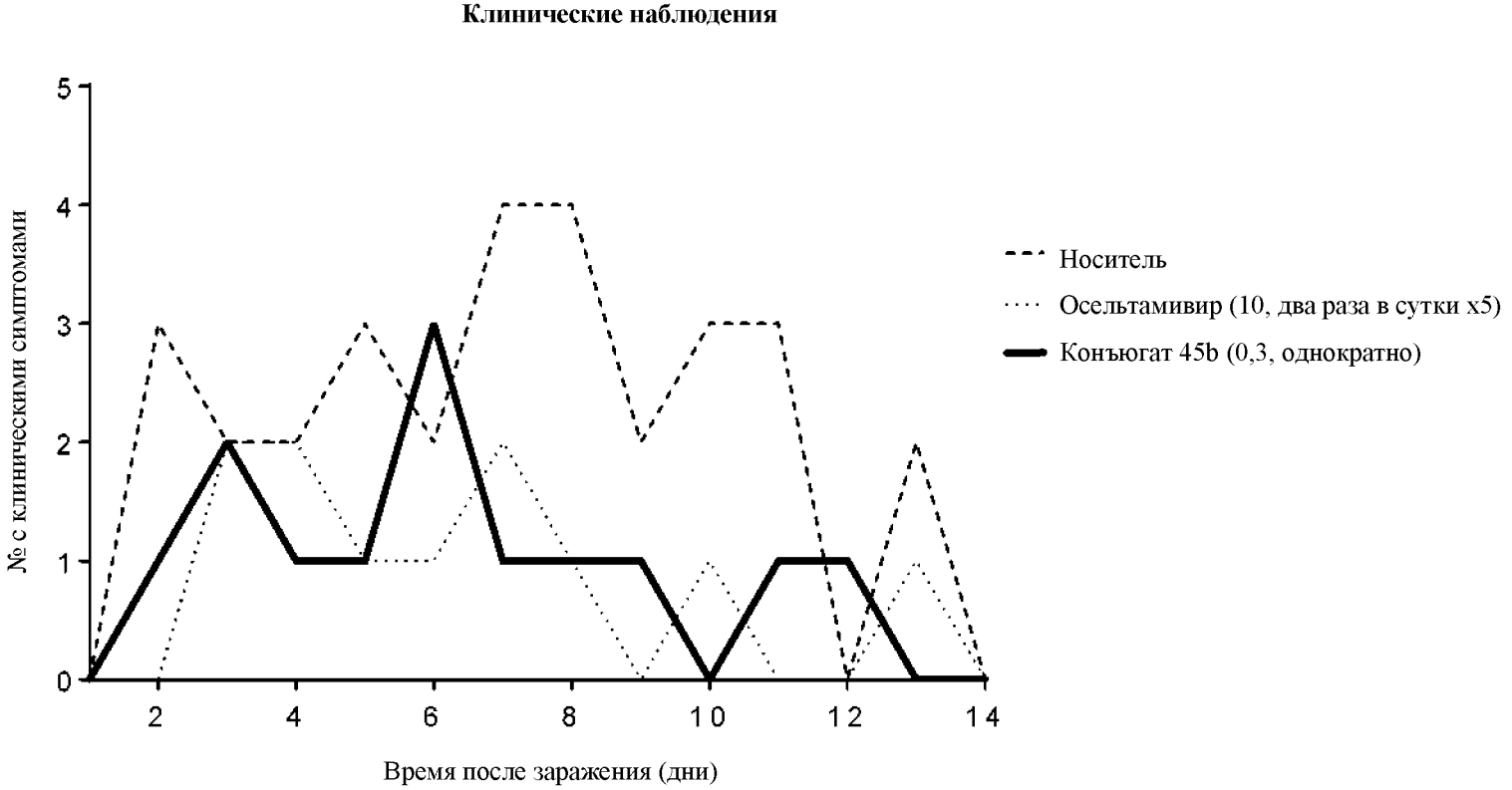
	30 мг/кг	10 мг/кг	3 мг/кг	1 мг/кг	0,3 мг/кг
Общая площадь	3.260	1.167	0.5265	0.03521	

Фиг. 95

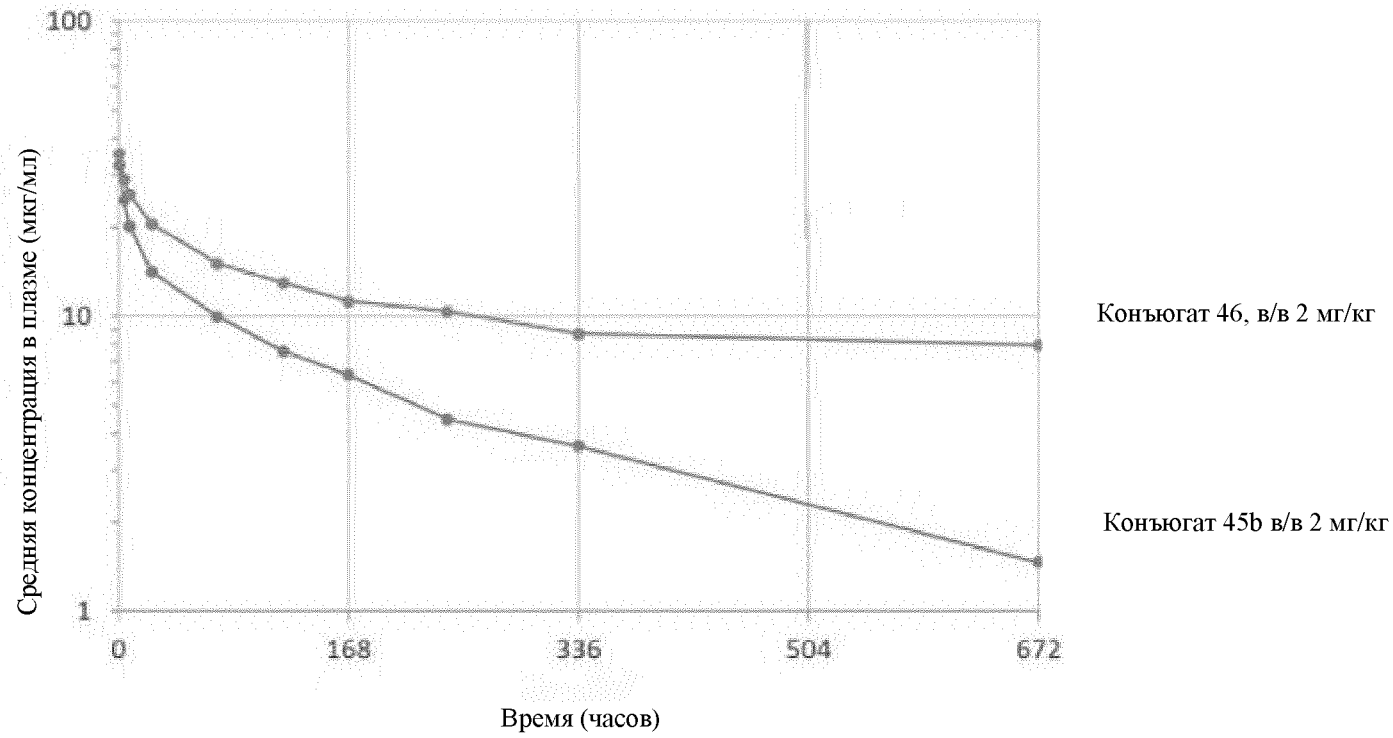


	30 мг/кг	10 мг/кг	3 мг/кг	1 мг/кг	0,3 мг/кг
Общая площадь пика	3.375	1.559	0.7713	0.1233	0.03827

Фиг. 96


Клинические наблюдения
№ с клиническими симптомами
0
1
2
3
4
5
2
4
6
8
10
12
14
Время после заражения (дни)
Носитель
Осельтамивир (10, два раза в сутки x5)
Конъюгат 45b (0,3, однократно)

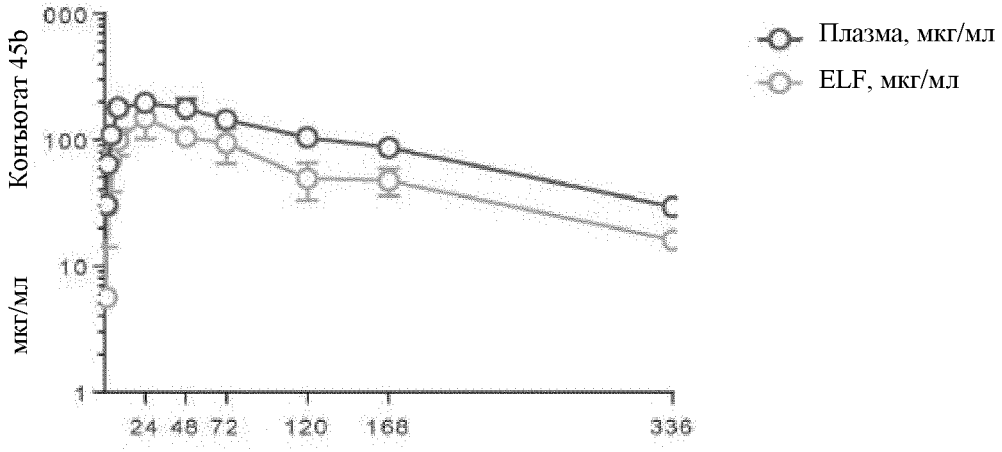
Фиг. 97


100
10
1
Средняя концентрация в плазме (мкг/мл)
0
168
336
504
672
Время (часов)
Конъюгат 46, в/в 2 мг/кг
Конъюгат 45b в/в 2 мг/кг

Фиг. 98

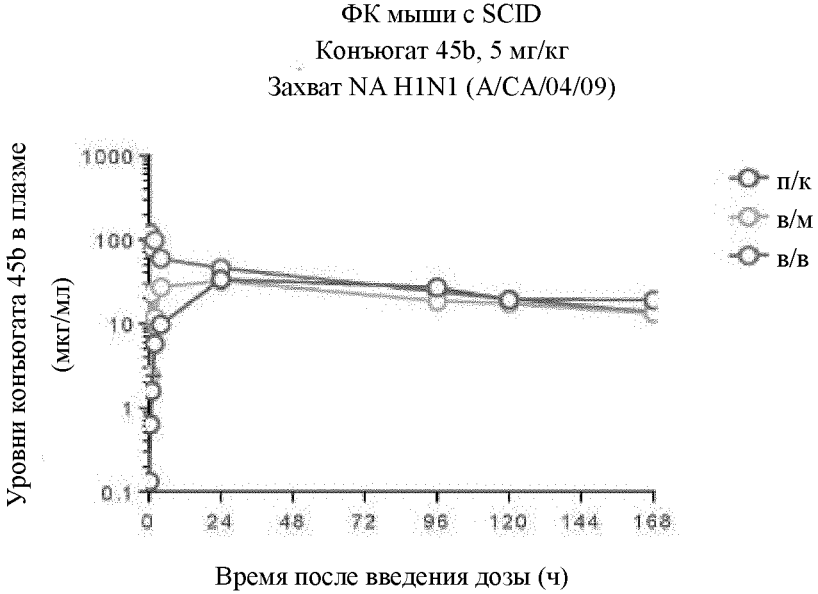
Конъюгат 45 b

20 мг/кг SC



	Плазма, мкг/мл	ELF, мкг/мл
Общая площадь пика	32493	19002

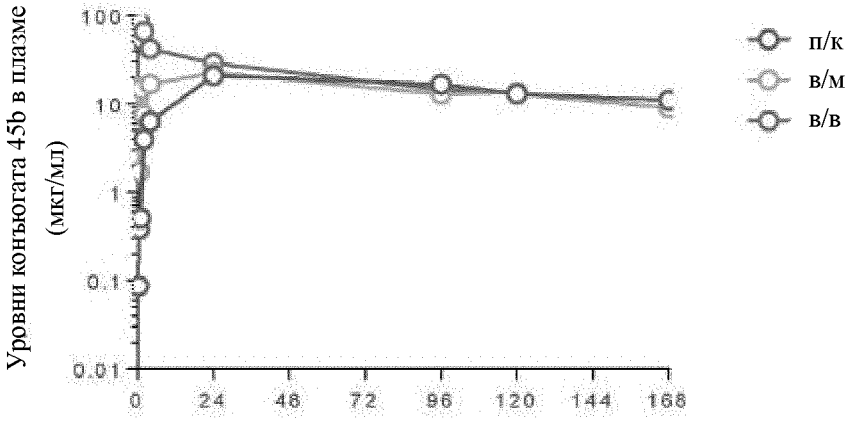
Фиг. 99



	п/к	в/м	в/в
Общая площадь пика	4123	3658	5226

Фиг. 100

ФК мыши с SCID
Конъюгат 45b, 5 мг/кг
Захват hIgG

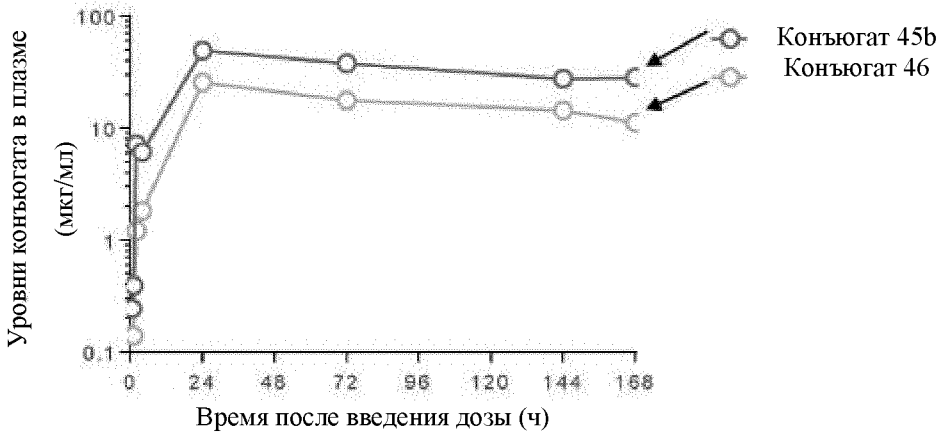


	п/к	в/м	в/в
Общая площадь пика	2576	2576	3362

Фиг. 101

Конъюгат 45b по сравнению с конъюгатом 46

Захват NA H1N1 (A/CA/04/09)



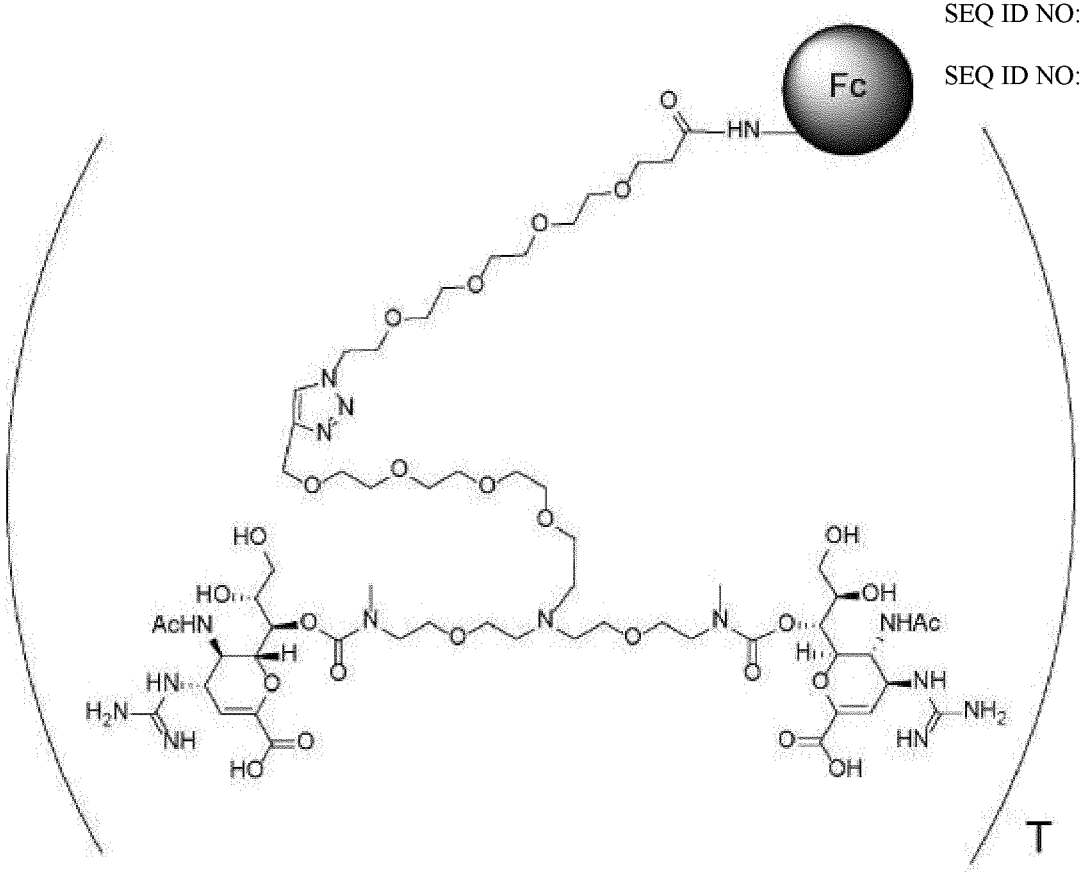
	Конъюгат 45	Конъюгат 46
Общая площадь пика	5663	2768

Фиг. 102
Конъюгаты 45 и 46

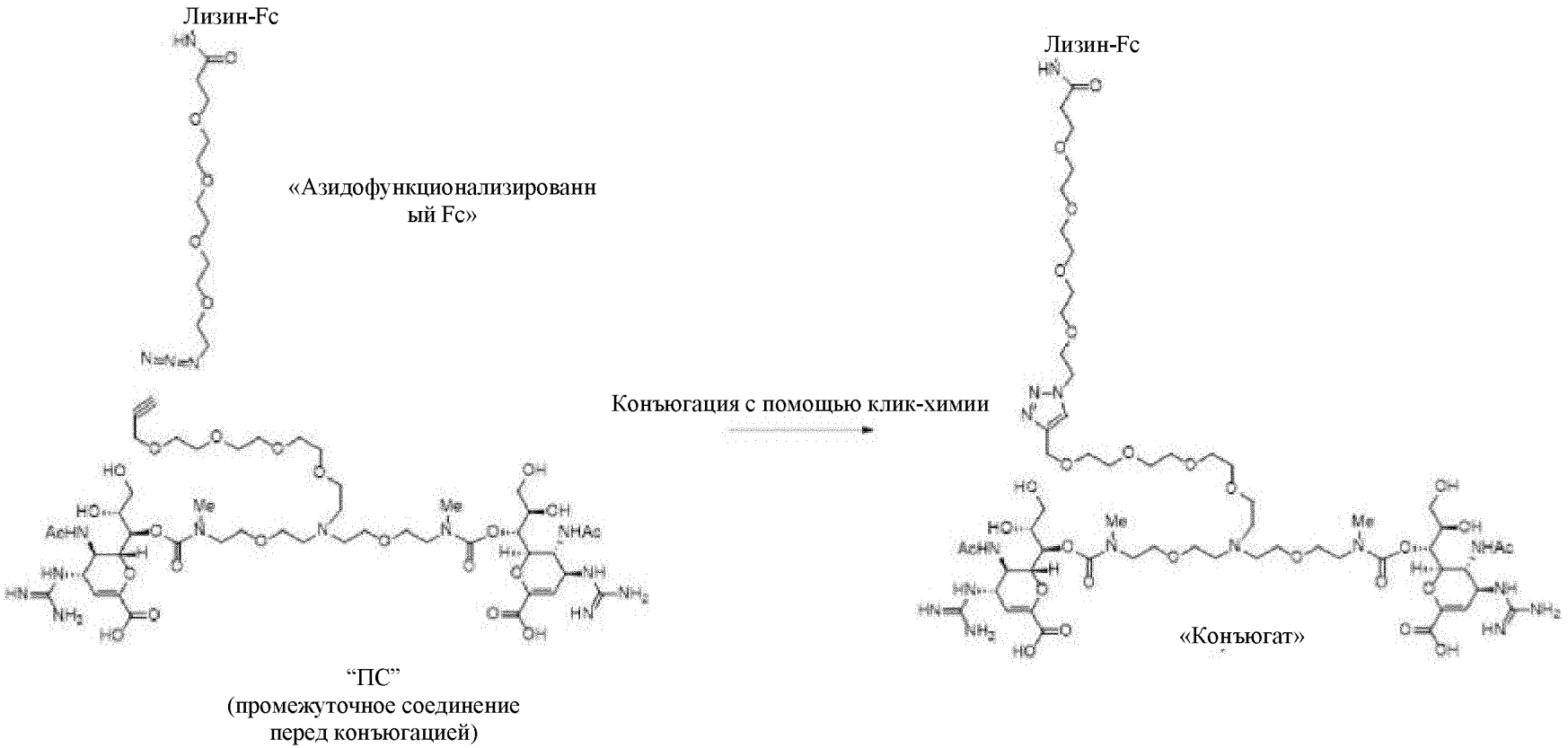
SEQ ID NO: 72 (Конъюгат 45a)

SEQ ID NO: 73 (Конъюгат 45b)

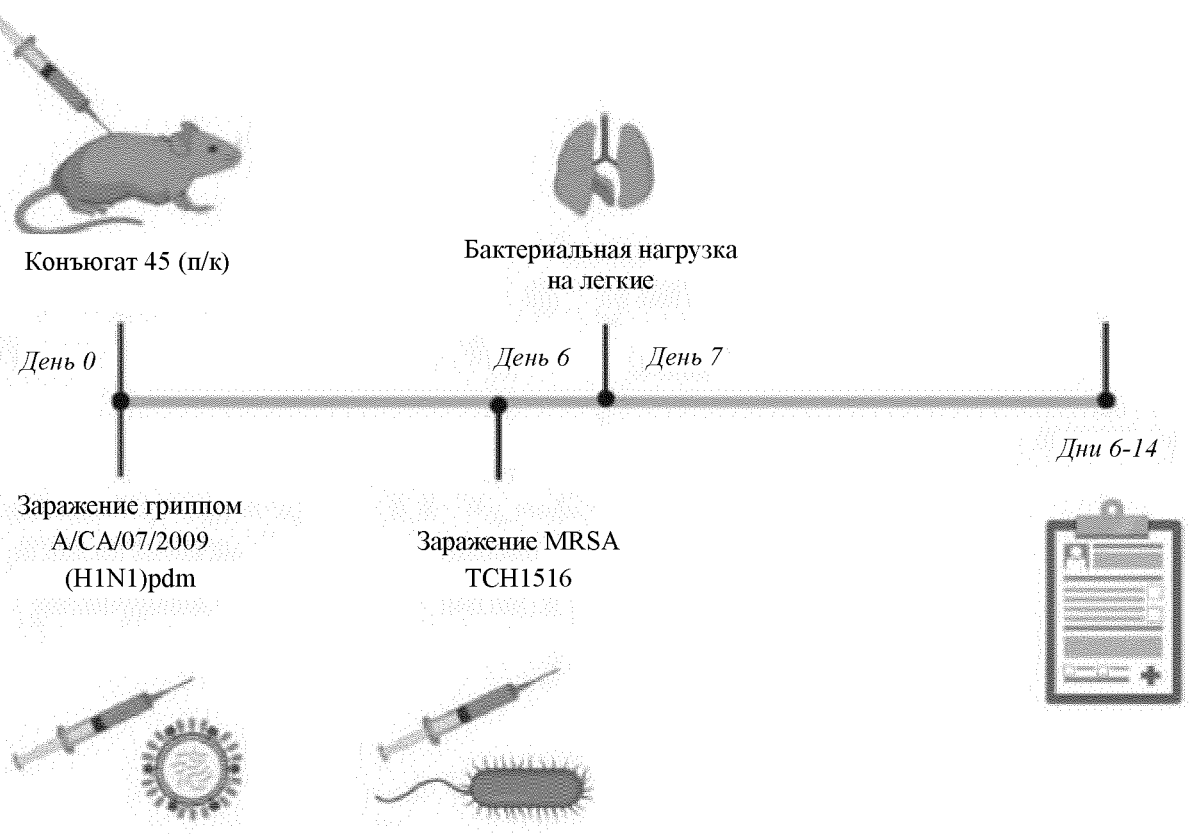
SEQ ID NO: 76 (Конъюгат 46)



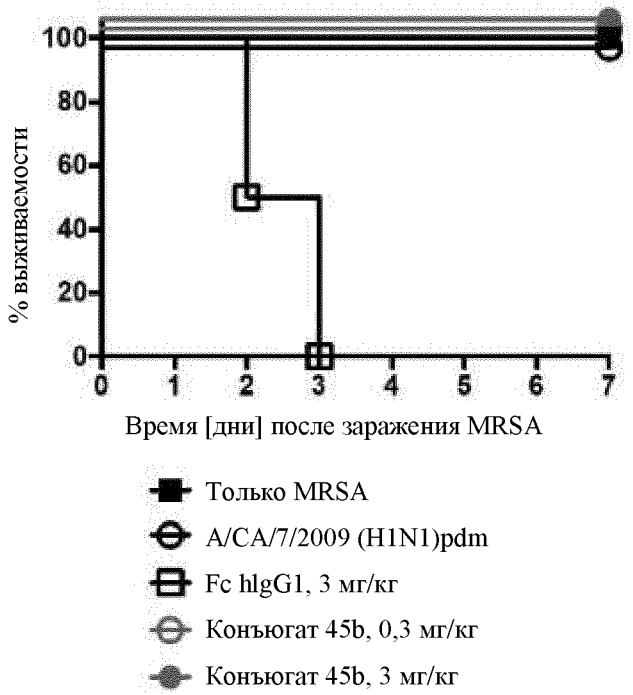
Фиг. 103


Лизин-Fc
«Азидофункционализированный Fc»
Конъюгация с помощью клик-химии
Лизин-Fc
“ПС”
(промежуточное соединение перед конъюгацией)
«Конъюгат»

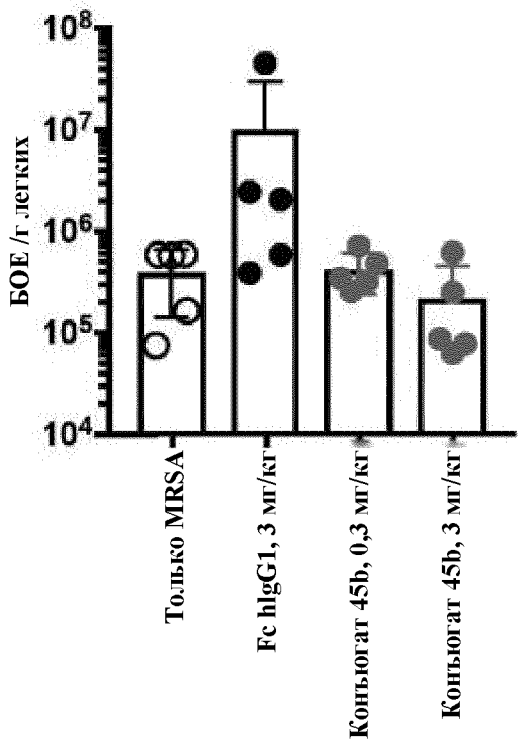
Фиг. 104


Конъюгат 45 (п/к)
Бактериальная нагрузка
на легкие
День 0
День 6
День 7
Дни 6-14
Заражение гриппом
A/CA/07/2009
(H1N1)pdm
Заражение MRSA
TCH1516

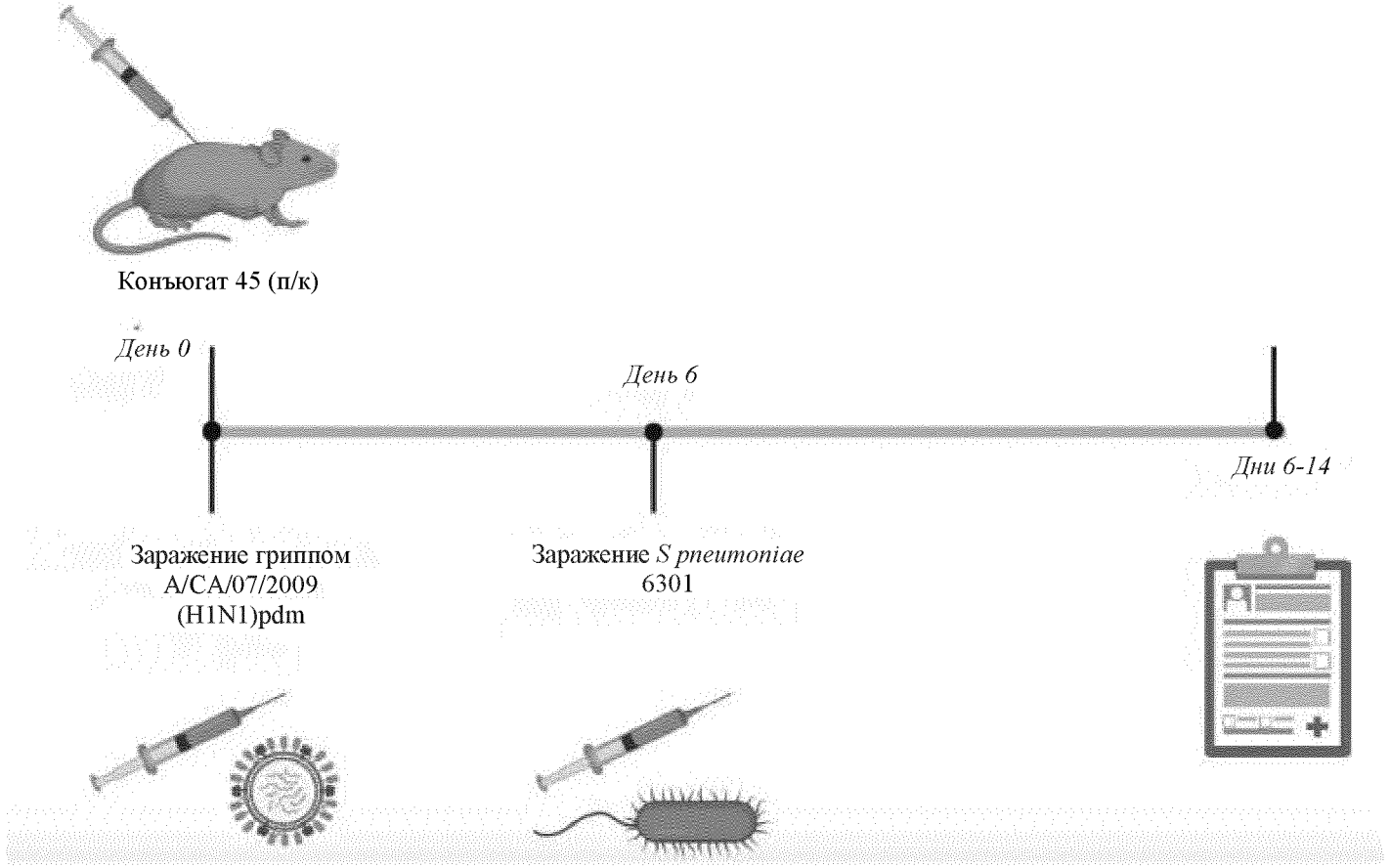
Фиг. 105A



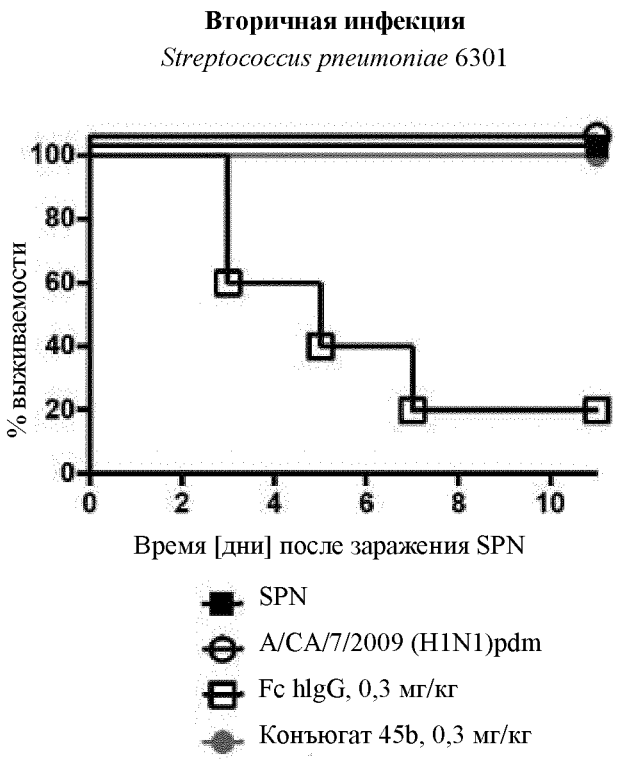
Фиг. 105B



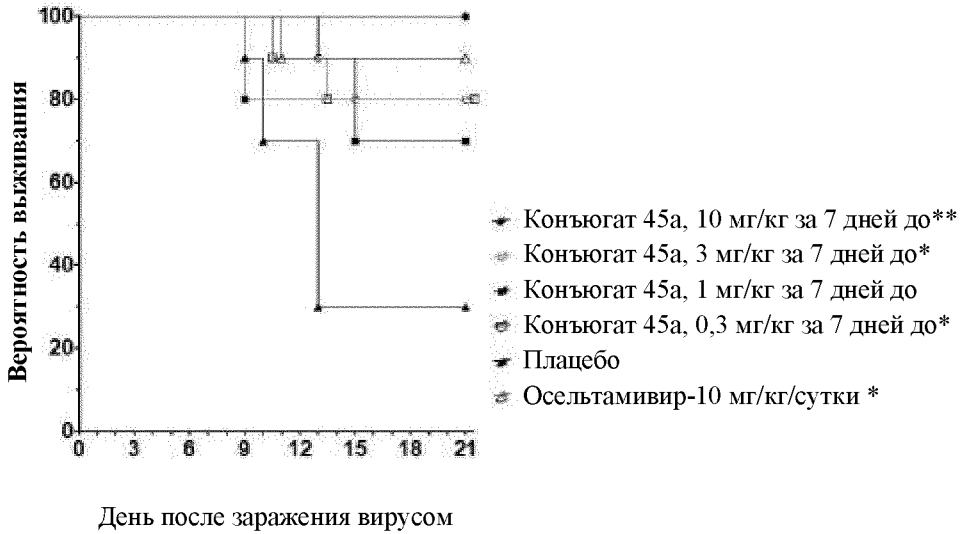
Фиг. 106


Конъюгат 45 (п/к)
День 0
День 6
Дни 6-14
Заражение гриппом
A/CA/07/2009
(H1N1)pdm
Заражение *S pneumoniae*
6301

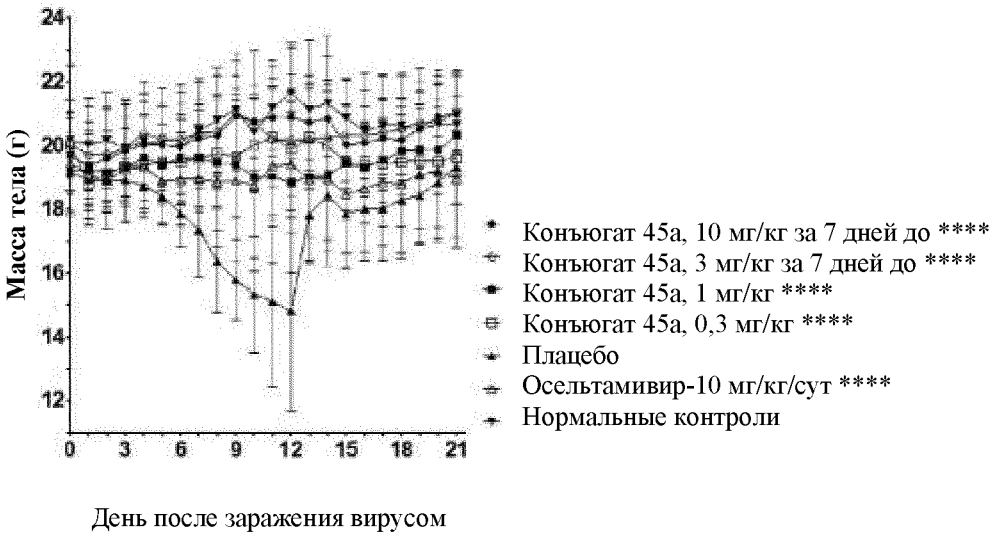
Фиг. 107


Вторичная инфекция
Streptococcus pneumoniae 6301
% выживаемости
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
Время [дни] после заражения SPN
SPN
A/CA/7/2009 (H1N1)pdm
Fc hlgG, 0,3 мг/кг
Конъюгат 45b, 0,3 мг/кг

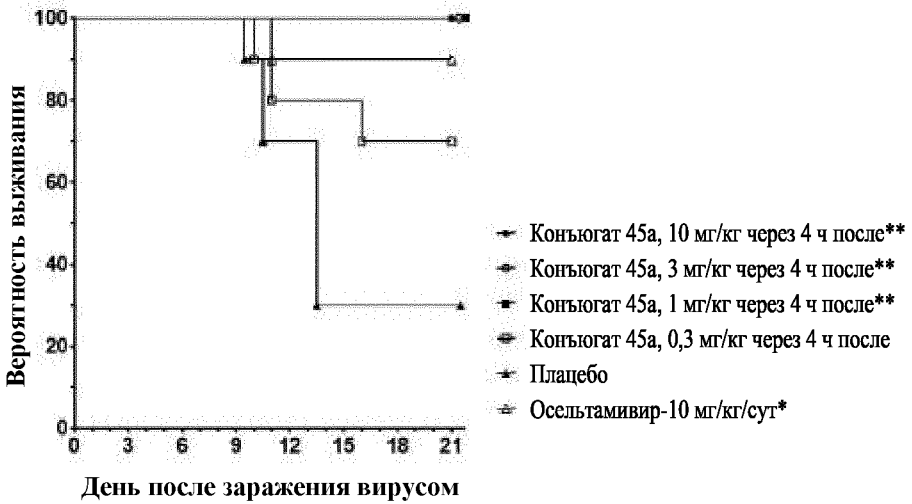
Фиг. 108A



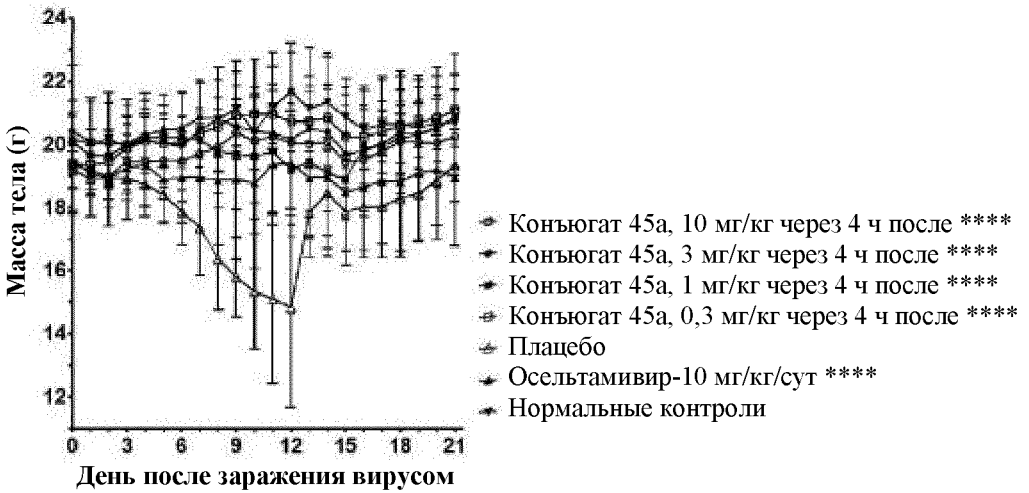
Фиг. 108B



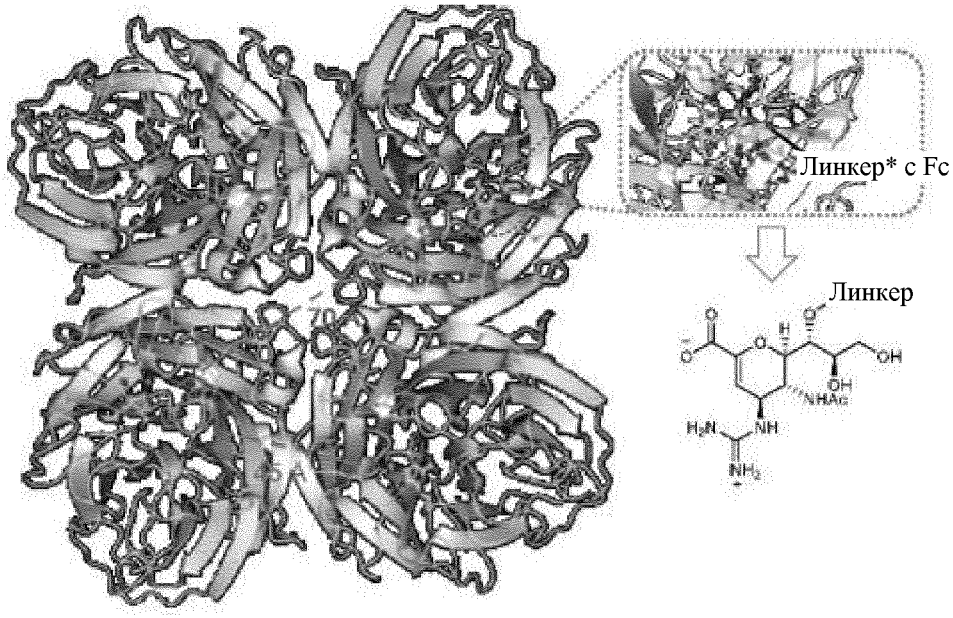
Фиг. 109A



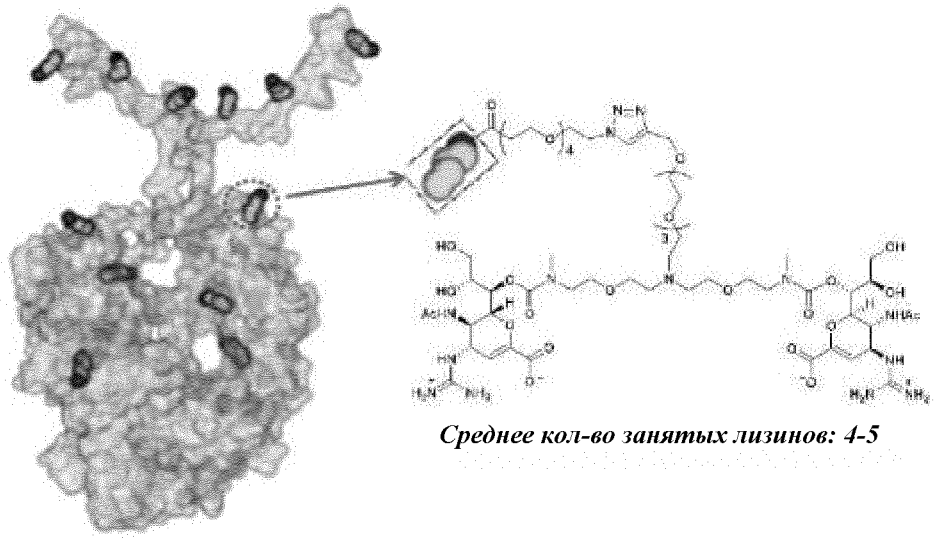
Фиг. 109B



Фиг. 110A

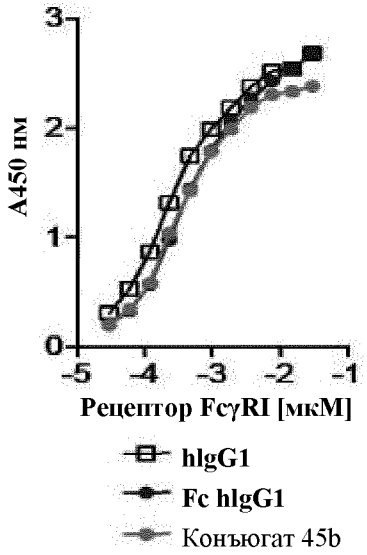


Фиг. 110B

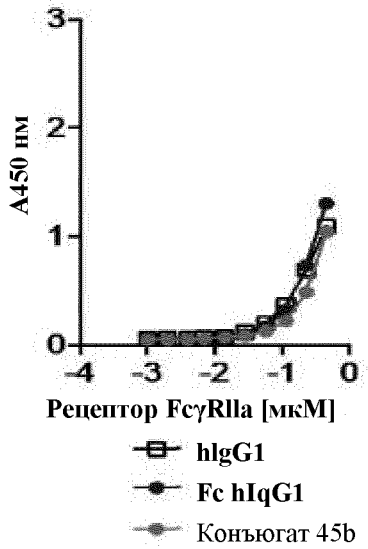


Среднее кол-во занятых лизинов: 4-5

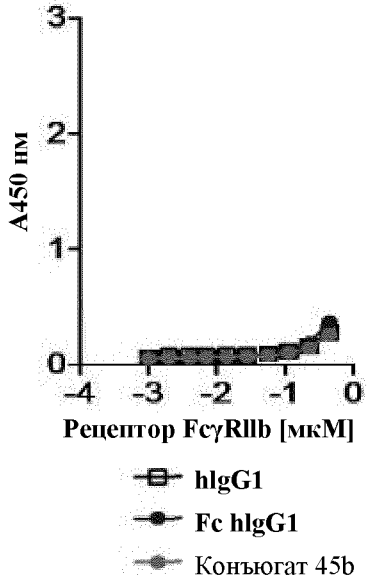
Фиг. 111A



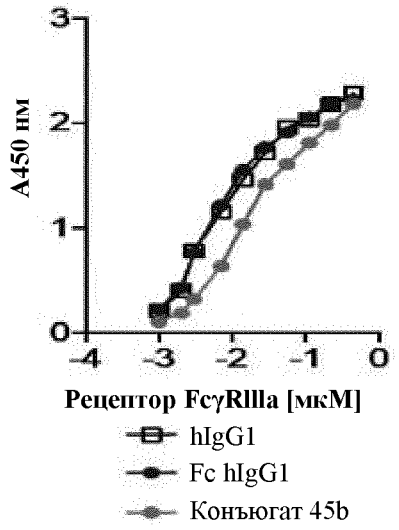
Фиг. 111B



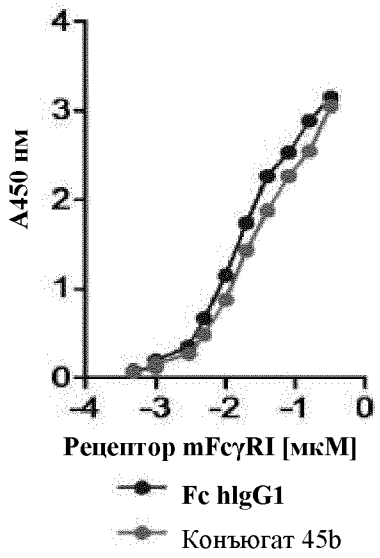
Фиг. 111C



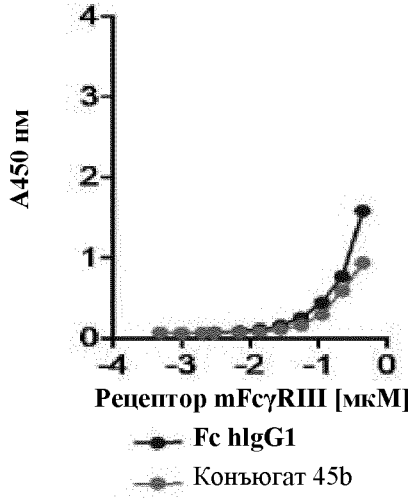
Фиг. 111D



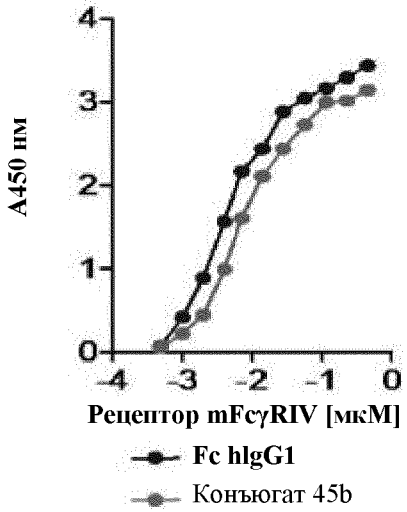
Фиг. 111E



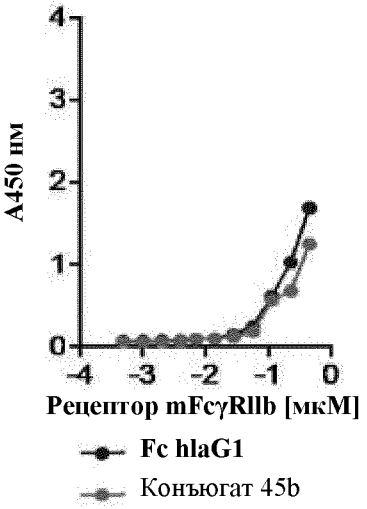
Фиг. 111F



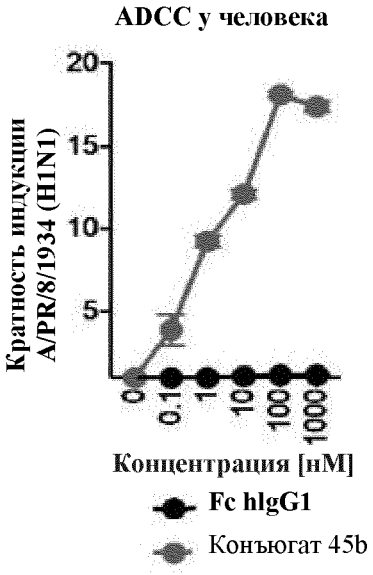
Фиг. 111G



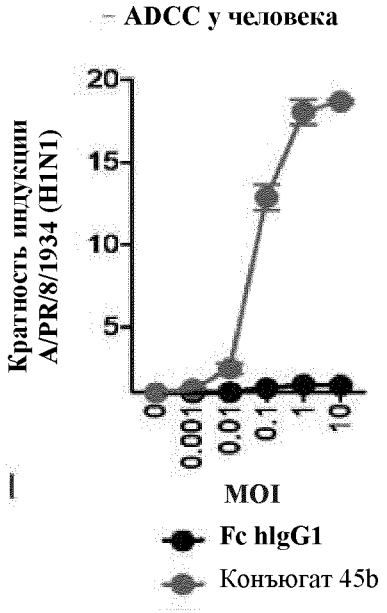
Фиг. 111H



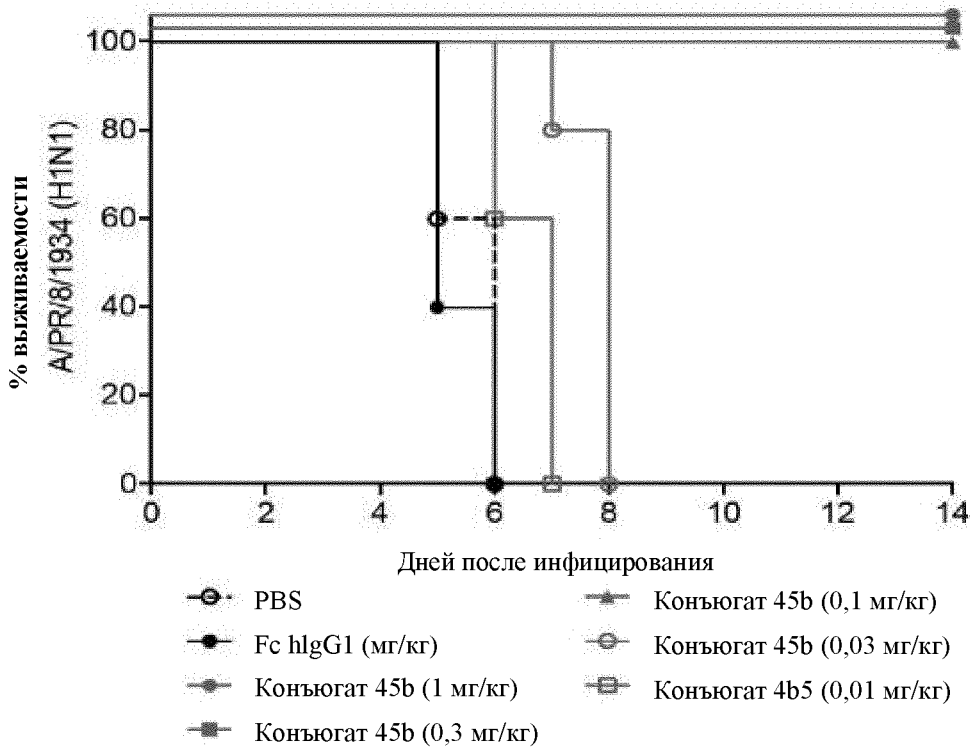
Фиг. 111I



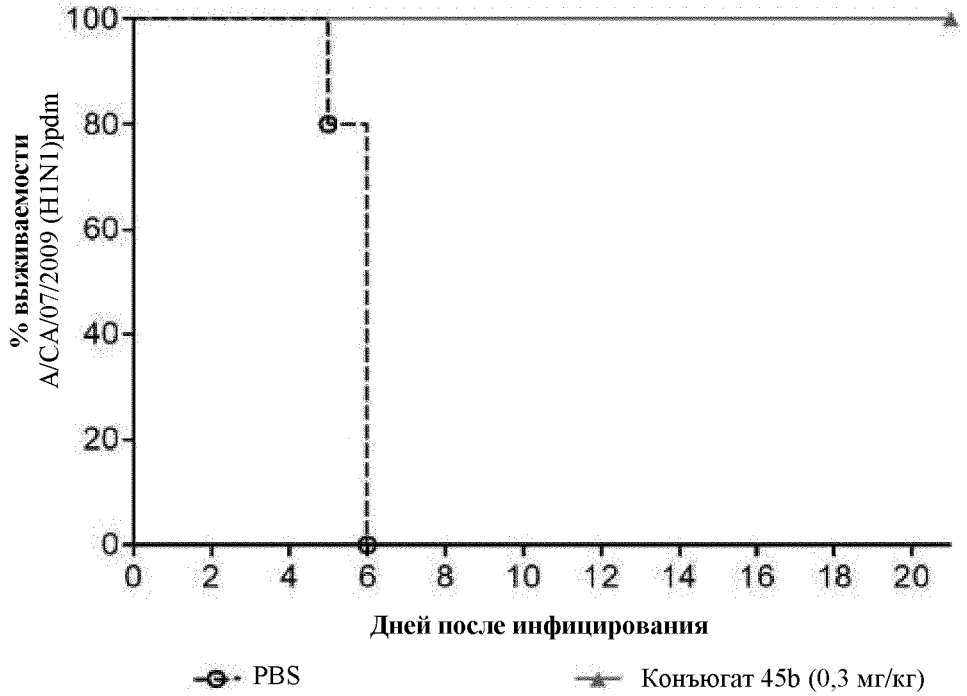
Фиг. 111J



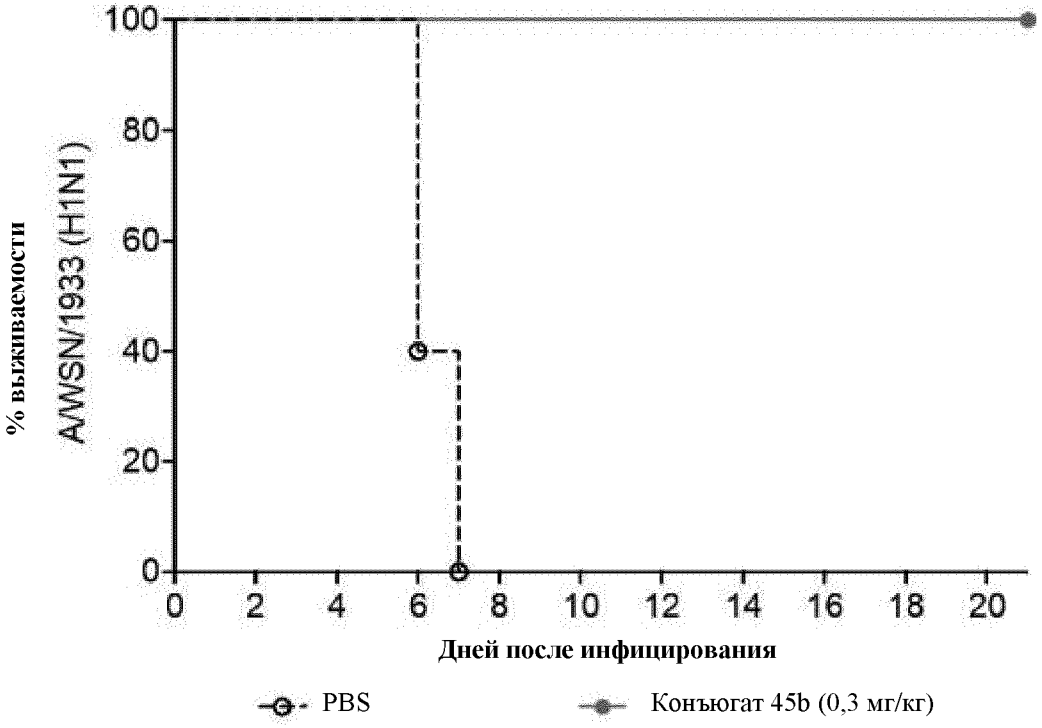
Фиг. 112A


% выживаемости
A/PR/8/1934 (H1N1)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Дней после инфицирования
PBS
Fc hIgG1 (мг/кг)
Конъюгат 45b (1 мг/кг)
Конъюгат 45b (0,3 мг/кг)
Конъюгат 45b (0,1 мг/кг)
Конъюгат 45b (0,03 мг/кг)
Конъюгат 4b5 (0,01 мг/кг)

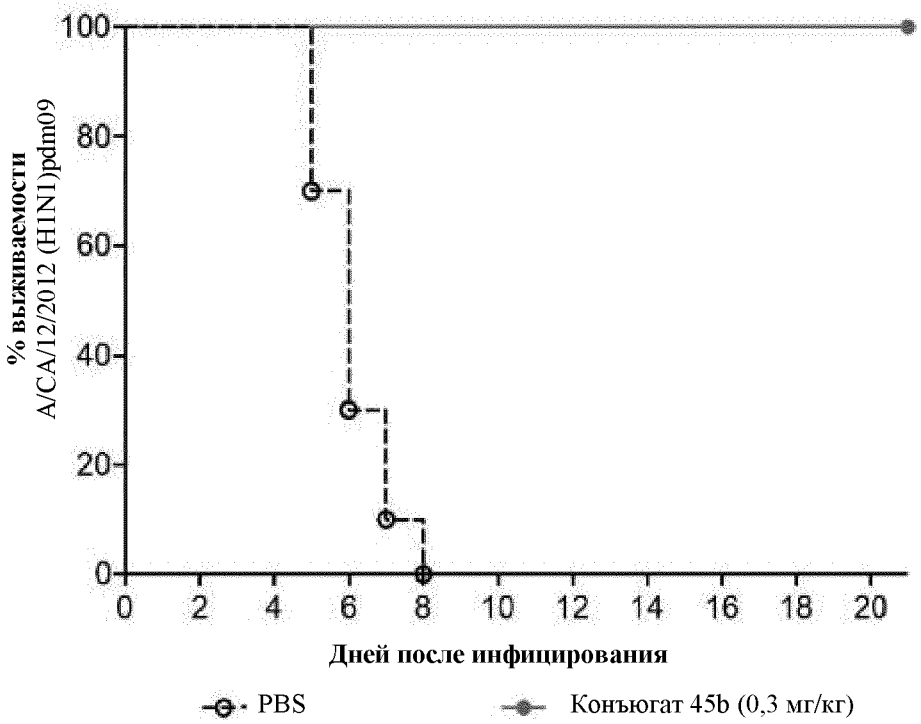
Фиг. 112B


% выживаемости
A/CA/07/2009 (H1N1)pdm
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Дней после инфицирования
PBS
Конъюгат 45b (0,3 мг/кг)

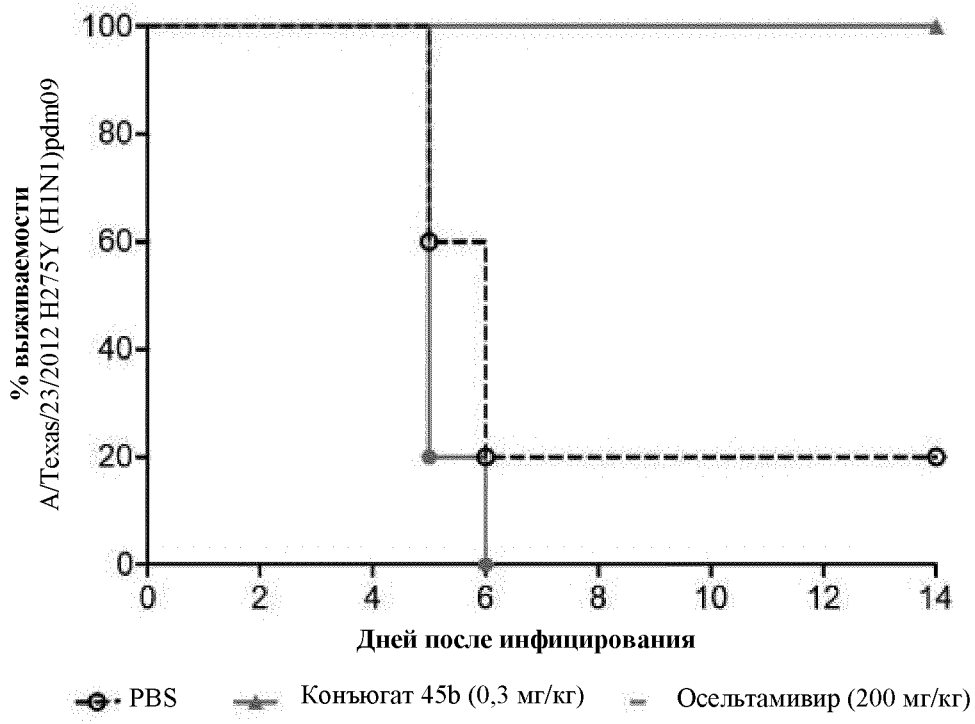
Фиг. 112C


% выживаемости
A/WSN/1933 (H1N1)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Дней после инфицирования
PBS
Конъюгат 45b (0,3 мг/кг)

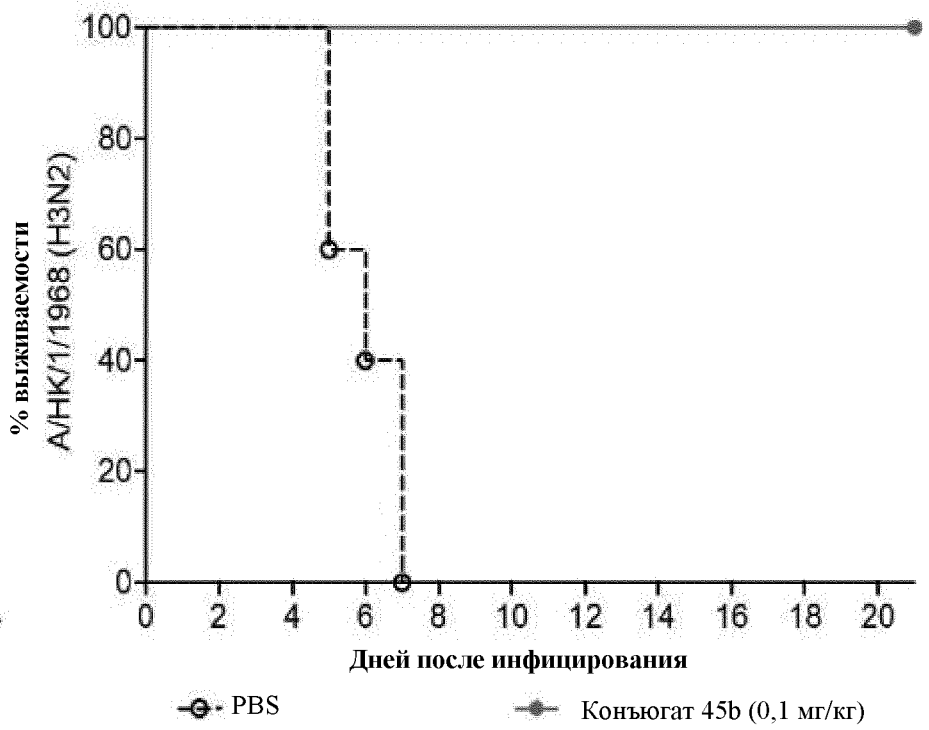
Фиг. 112D


% выживаемости
A/CA/12/2012 (H1N1)pdm09
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Дней после инфицирования
PBS
Конъюгат 45b (0,3 мг/кг)

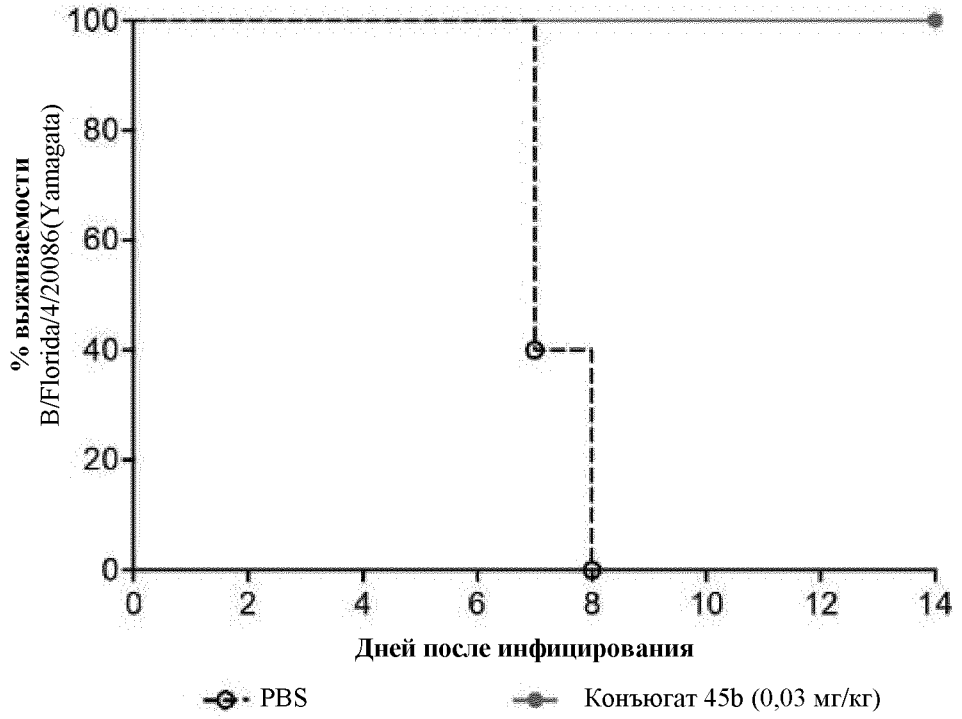
Фиг. 112E


% выживаемости
A/Texas/23/2012 H275Y (H1N1)pdm09
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Дней после инфицирования
PBS
Конъюгат 45b (0,3 мг/кг)
Осельтамивир (200 мг/кг)

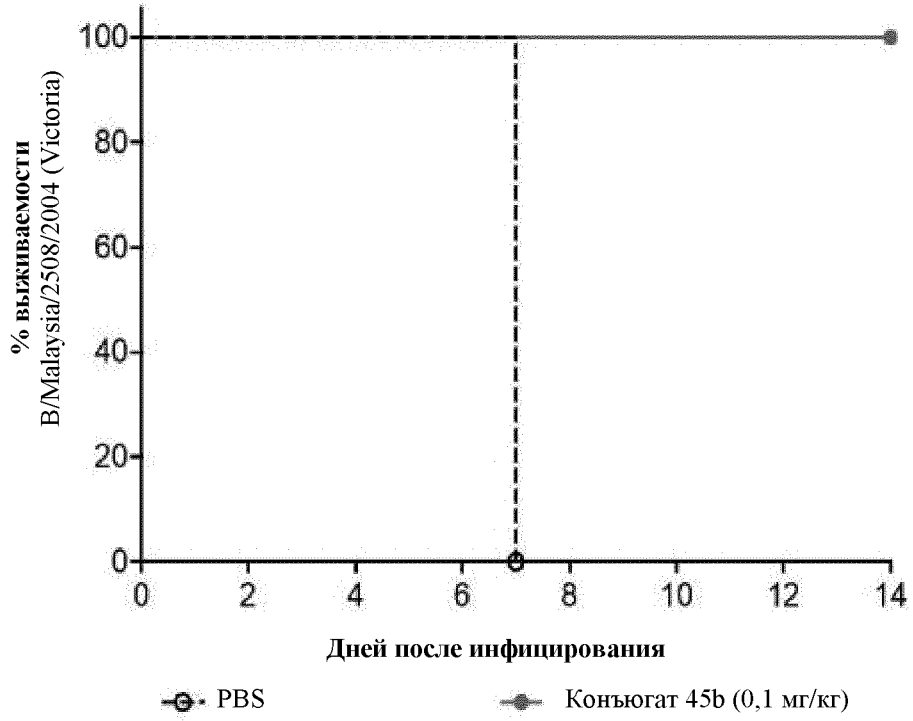
Фиг. 112F


% выживаемости A/HK/1/1968 (H3N2)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Дней после инфицирования
PBS
Конъюгат 45b (0,1 мг/кг)

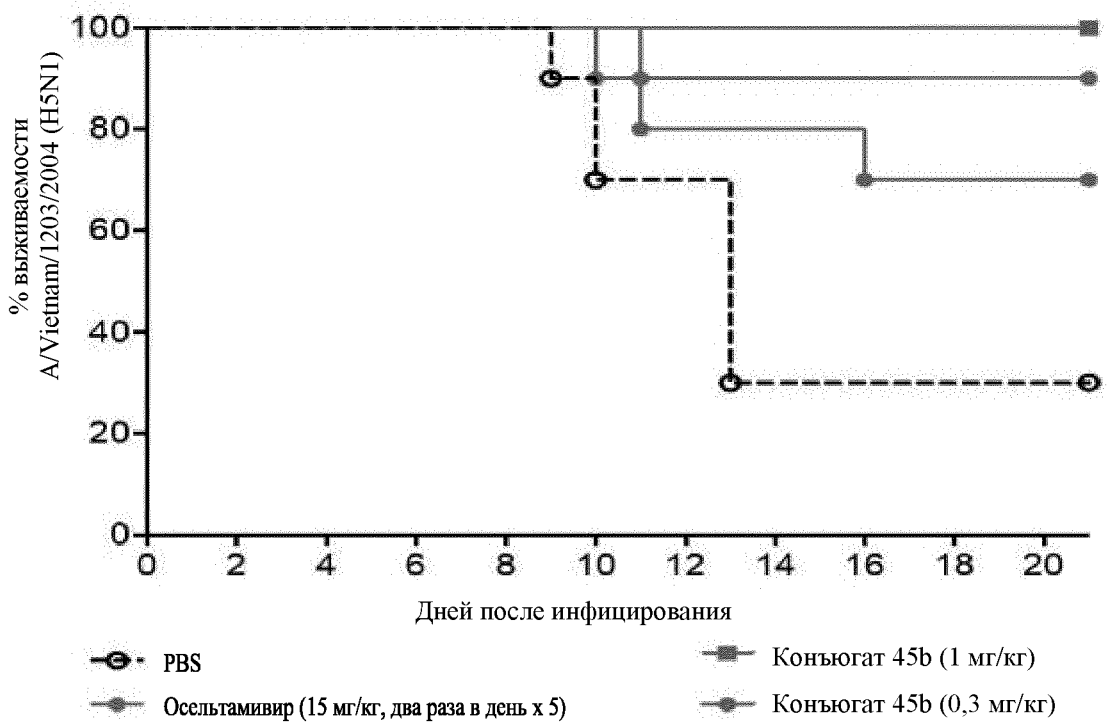
Фиг. 112G

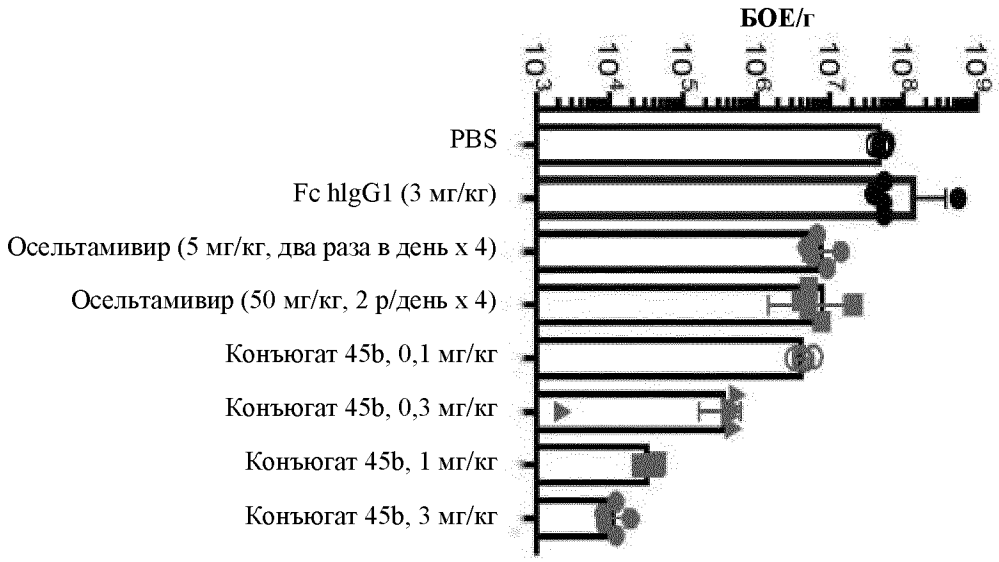

% выживаемости
B/Florida/4/20086(Yamagata)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Дней после инфицирования
PBS
Конъюгат 45b (0,03 мг/кг)

Фиг. 112H

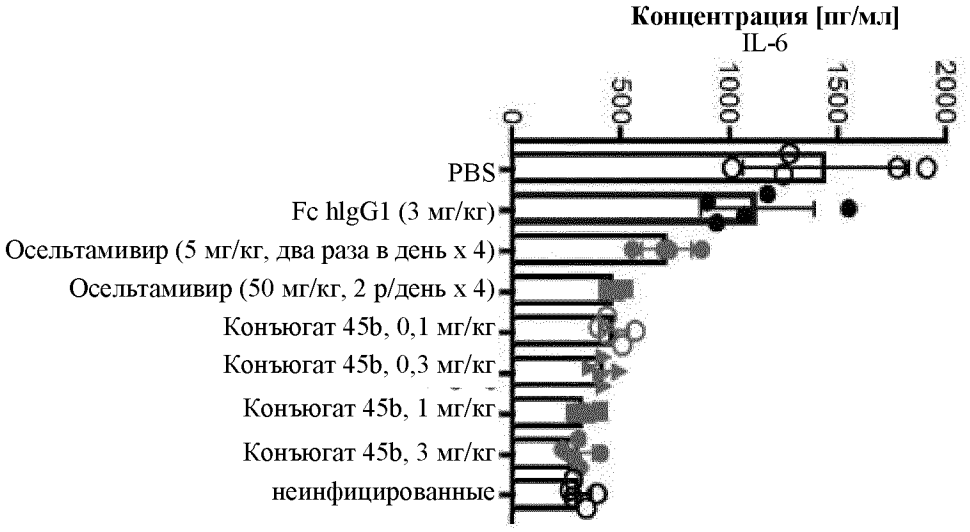

% выживаемости
B/Malaysia/2508/2004 (Victoria)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Дней после инфицирования
PBS
Конъюгат 45b (0,1 мг/кг)

Фиг. 112I


% выживаемости A/Vietnam/1203/2004 (H5N1)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Дней после инфицирования
PBS
Осельтамивир (15 мг/кг, два раза в день x 5)
Конъюгат 45b (1 мг/кг)
Конъюгат 45b (0,3 мг/кг)

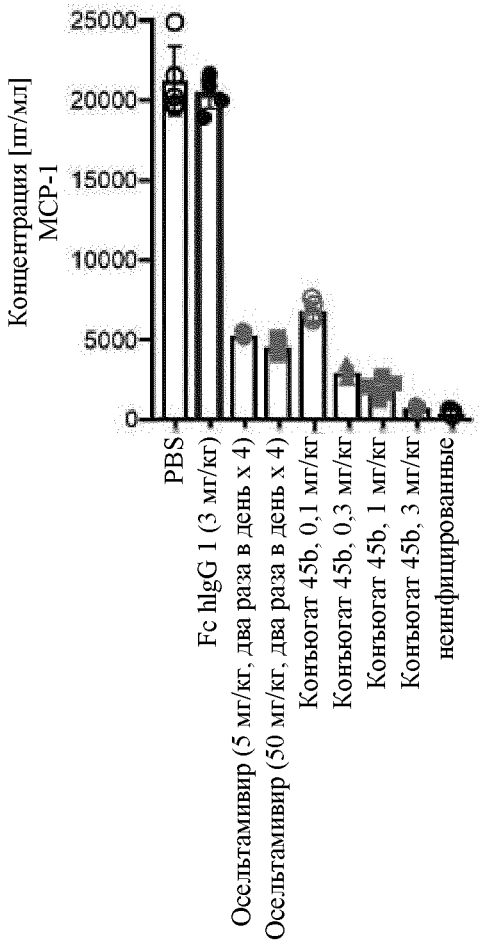


Фиг. 112J

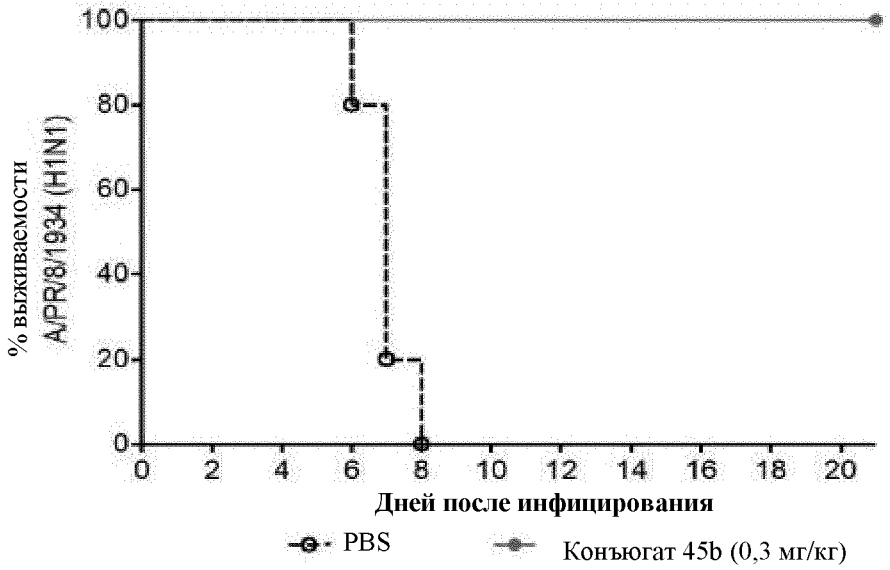


Фиг. 112K

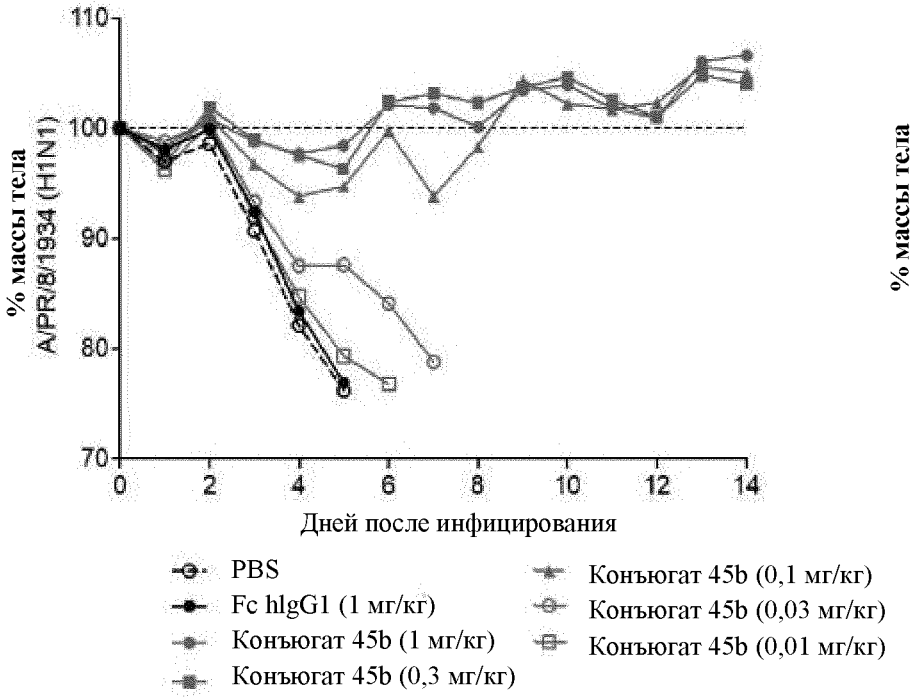
Фиг. 112L



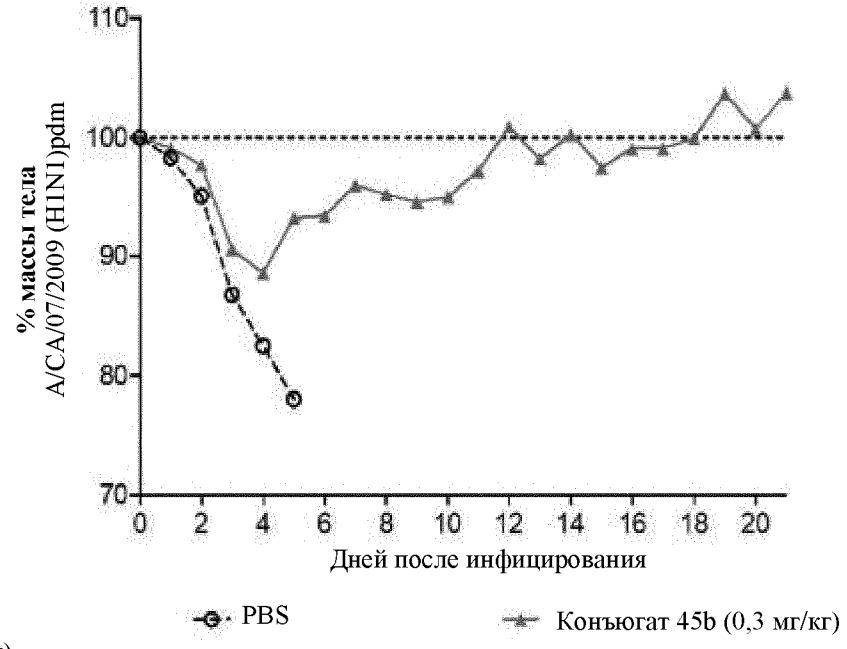
Фиг. 112M



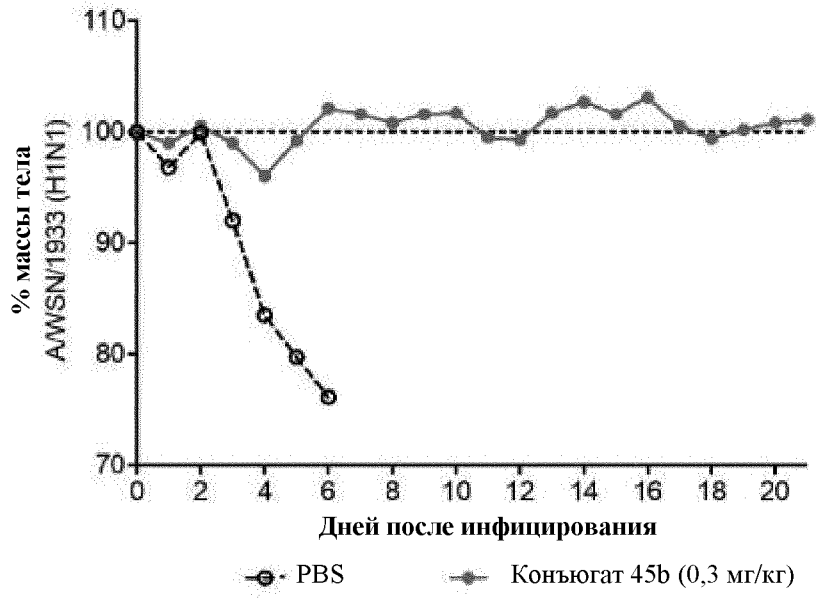
Фиг. 113A



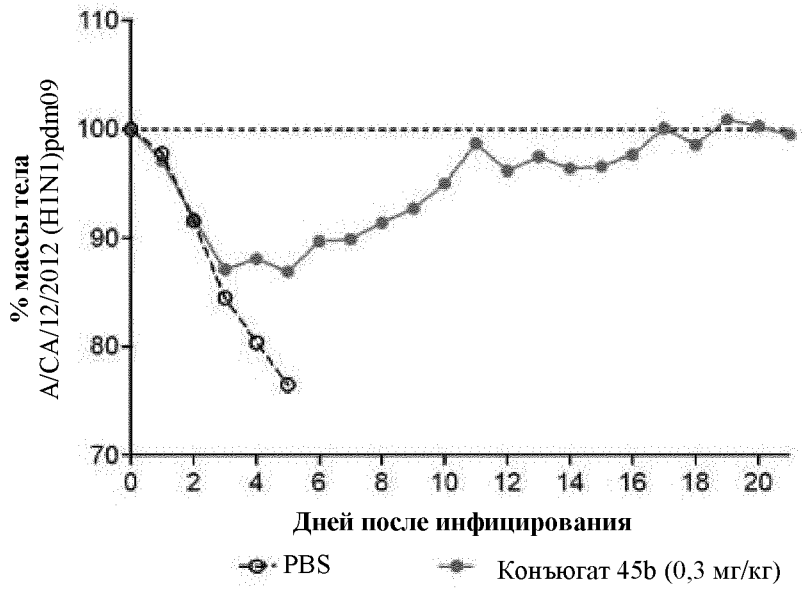
Фиг. 113B



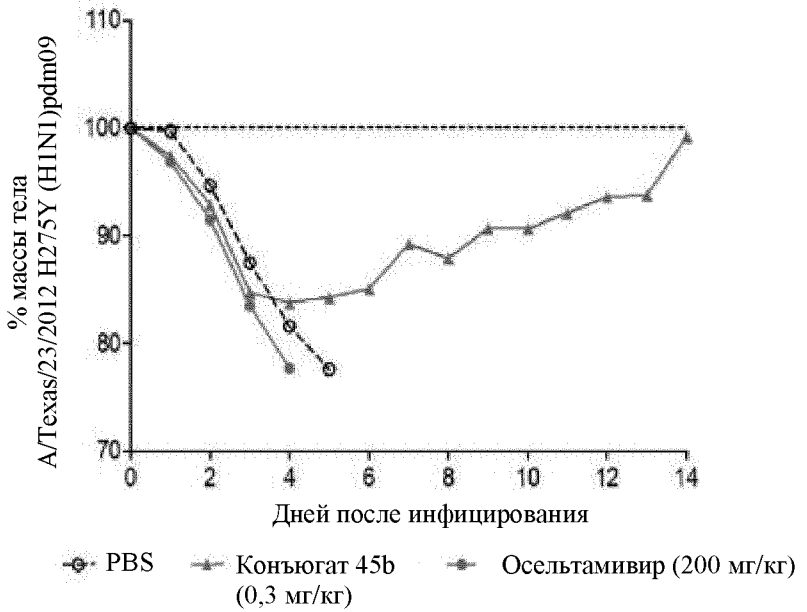
Фиг. 113C


% массы тела A/WSN/1933 (H1N1)
110
100
90
80
70
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Дней после инфицирования
PBS
Конъюгат 45b (0,3 мг/кг)

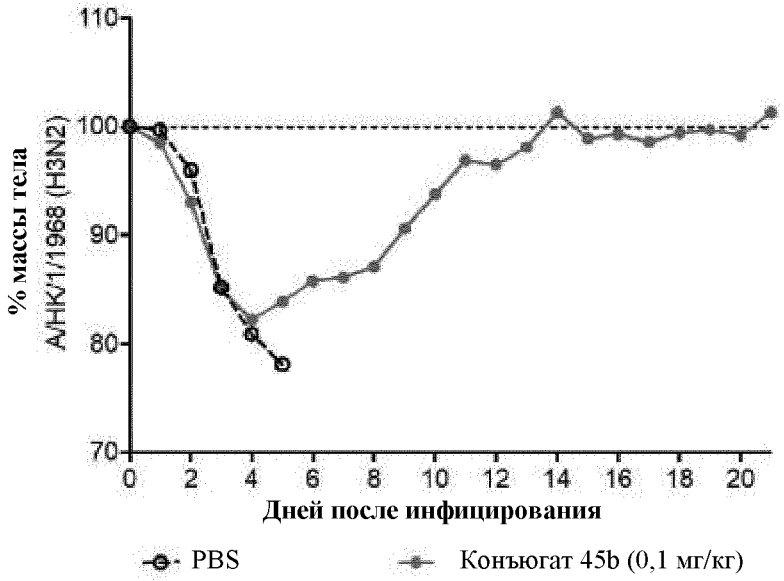
Фиг. 113D



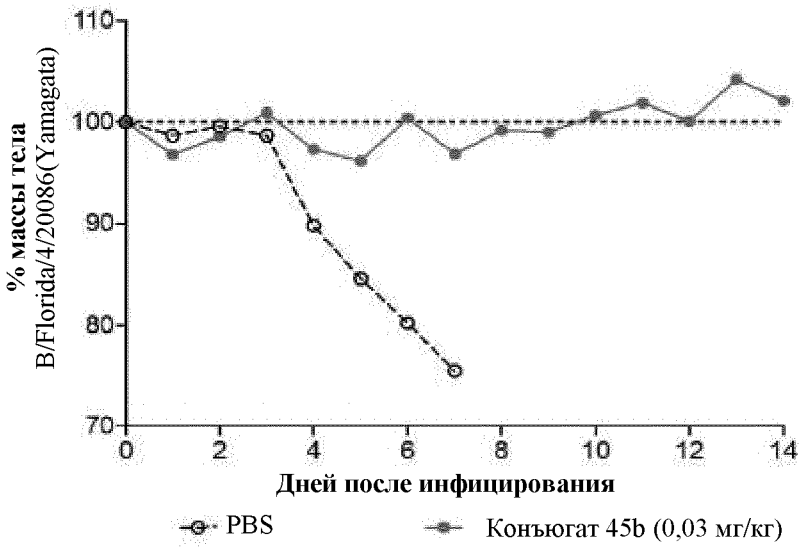
Фиг. 113E



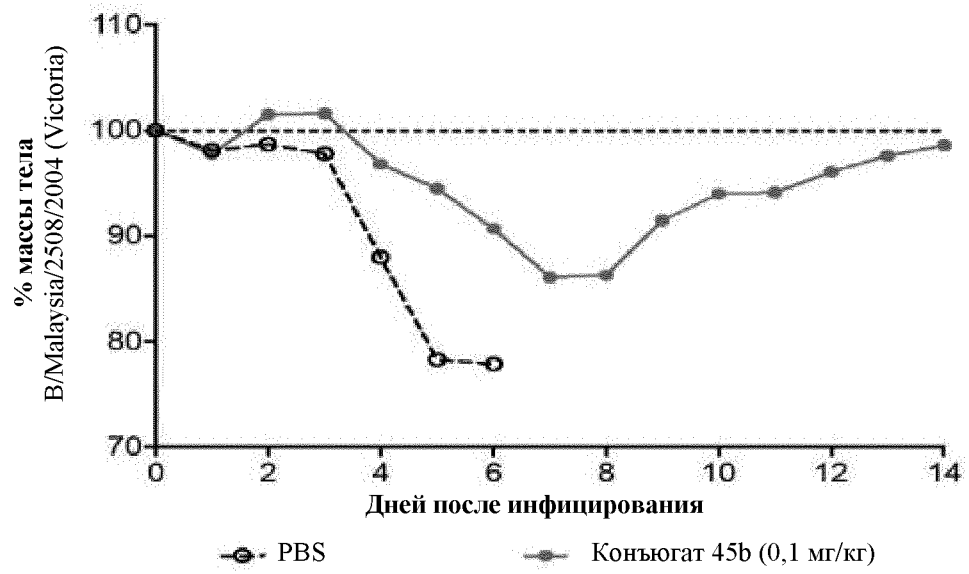
Фиг. 113F



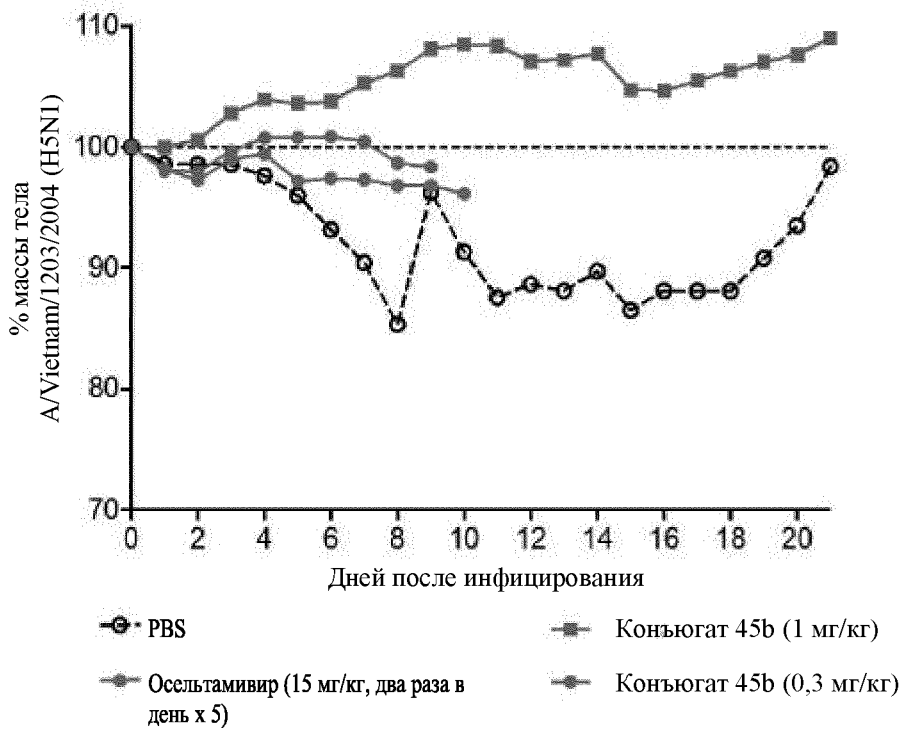
Фиг. 113G



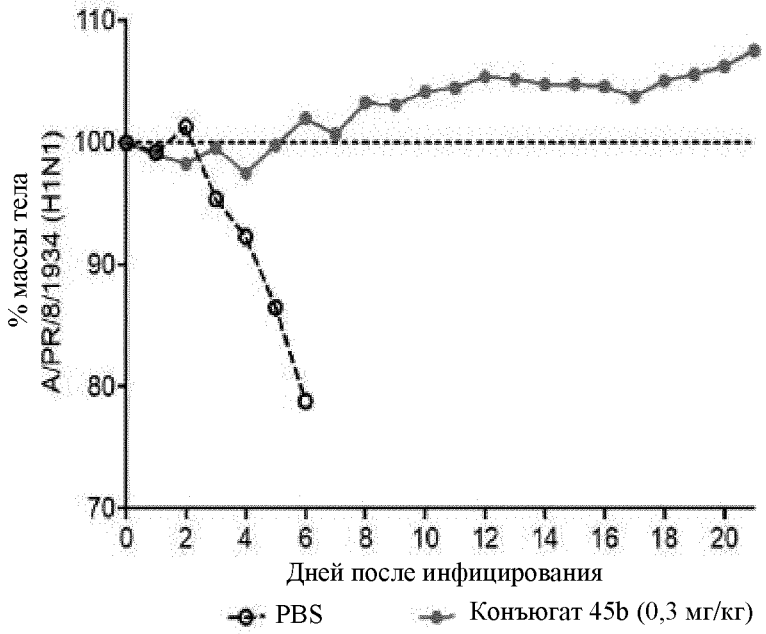
Фиг. 113H


% массы тела
B/Malaysia/2508/2004 (Victoria)
110
100
90
80
70
0
2
4
6
8
10
12
14
Дней после инфицирования
PBS
Конъюгат 45b (0,1 мг/кг)

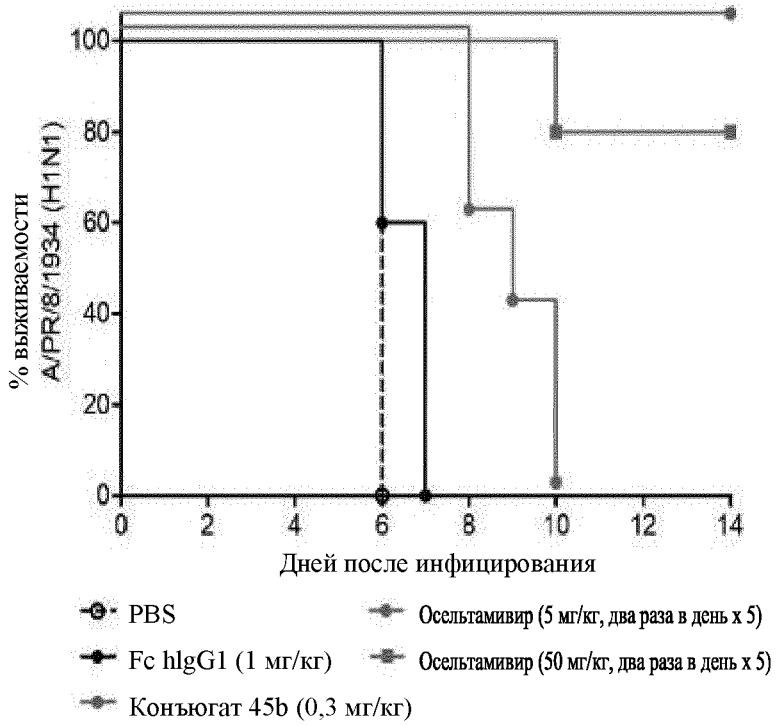
Фиг. 113I



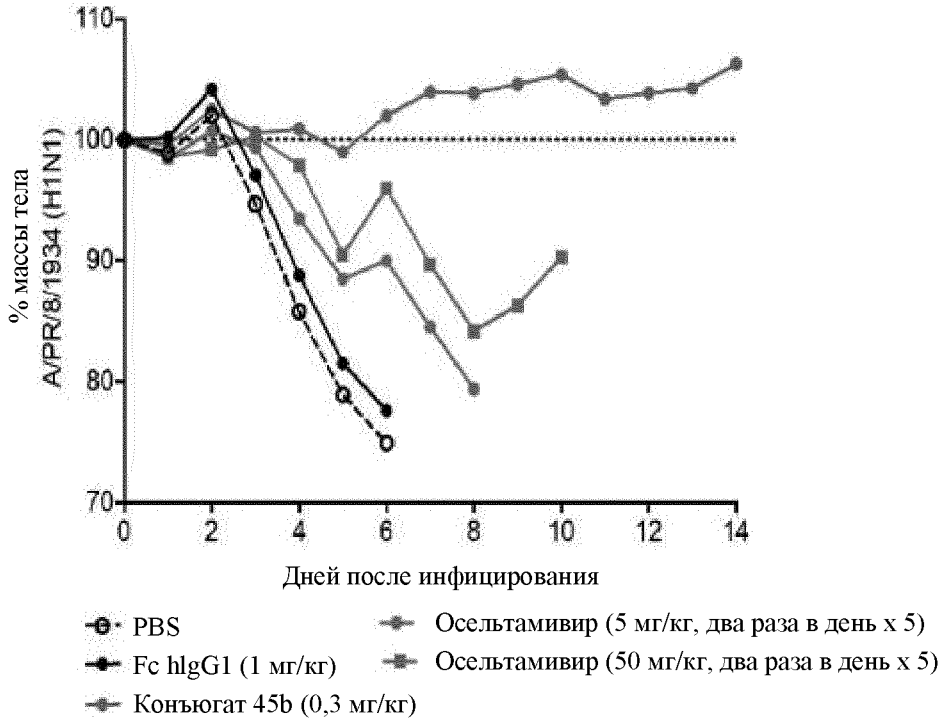
Фиг. 113J

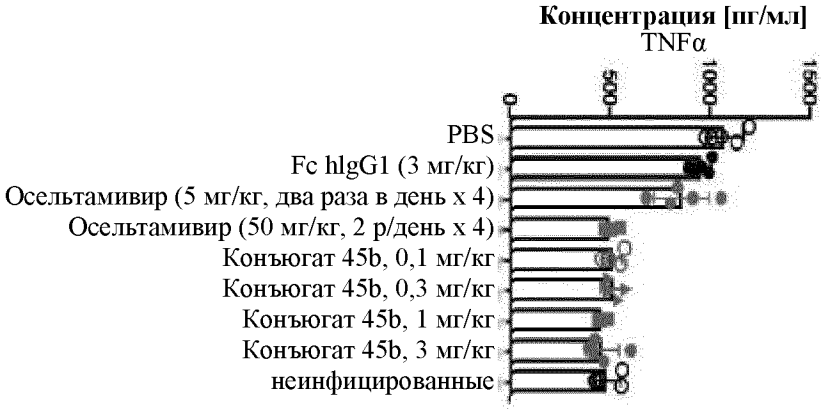


Фиг. 114A

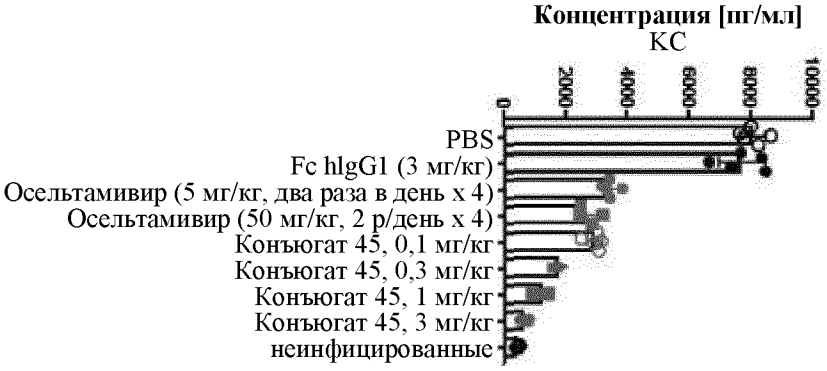


Фиг. 114B

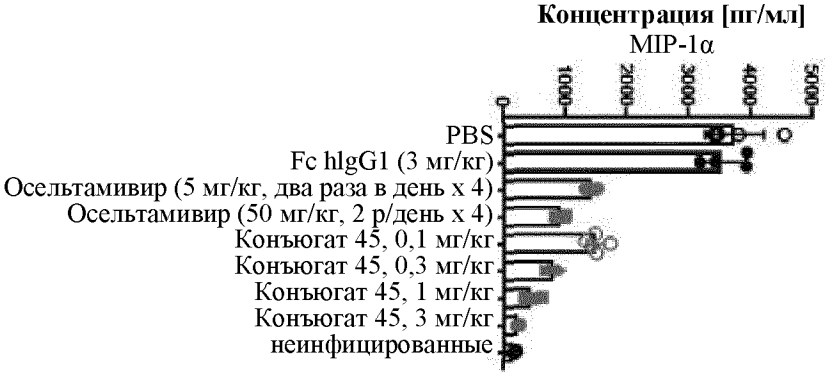




Фиг. 115A

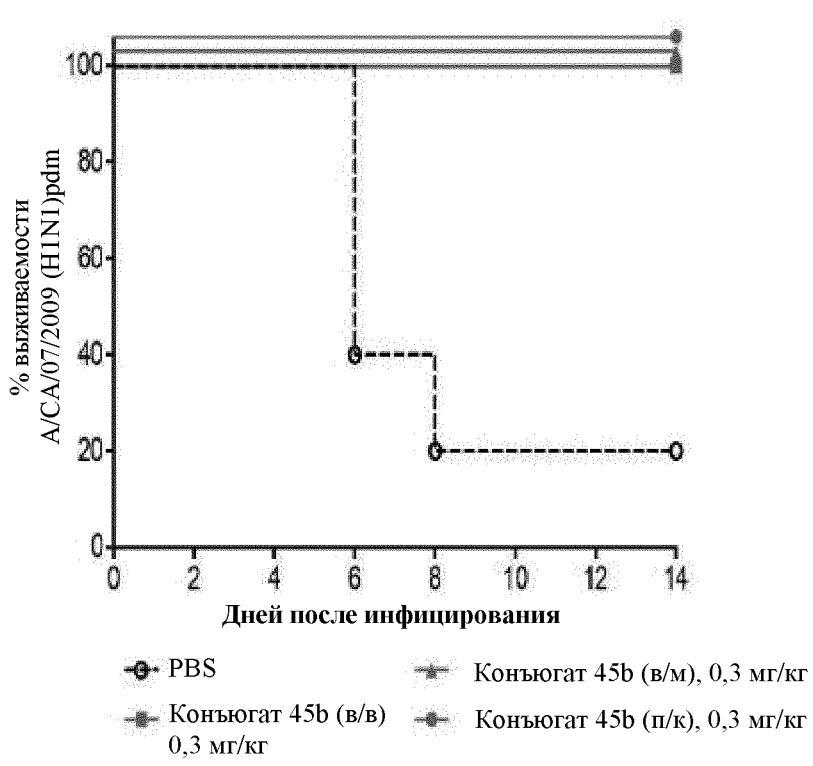


Фиг. 115B

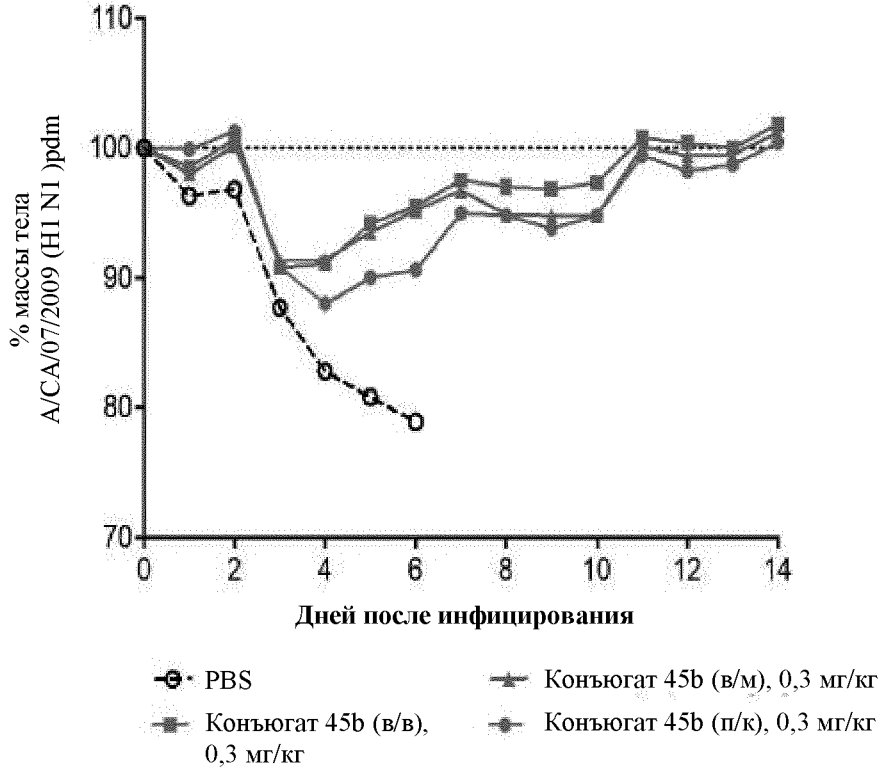


Фиг. 115C

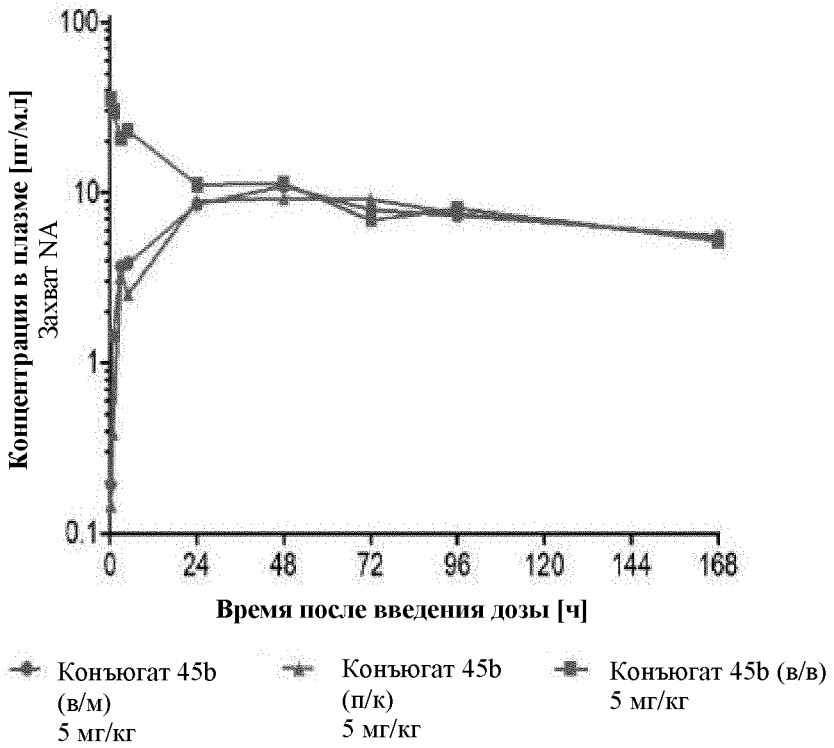
Фиг. 116A



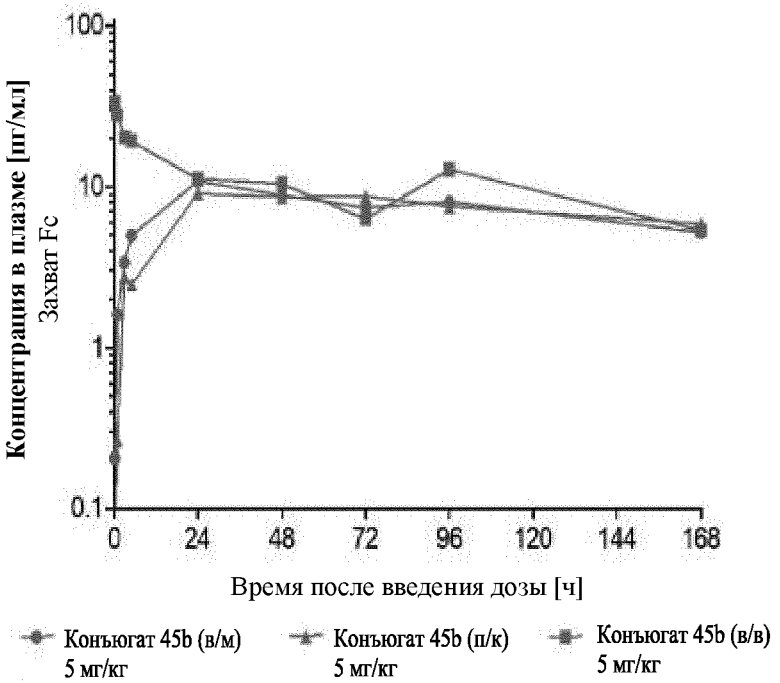
Фиг. 116B



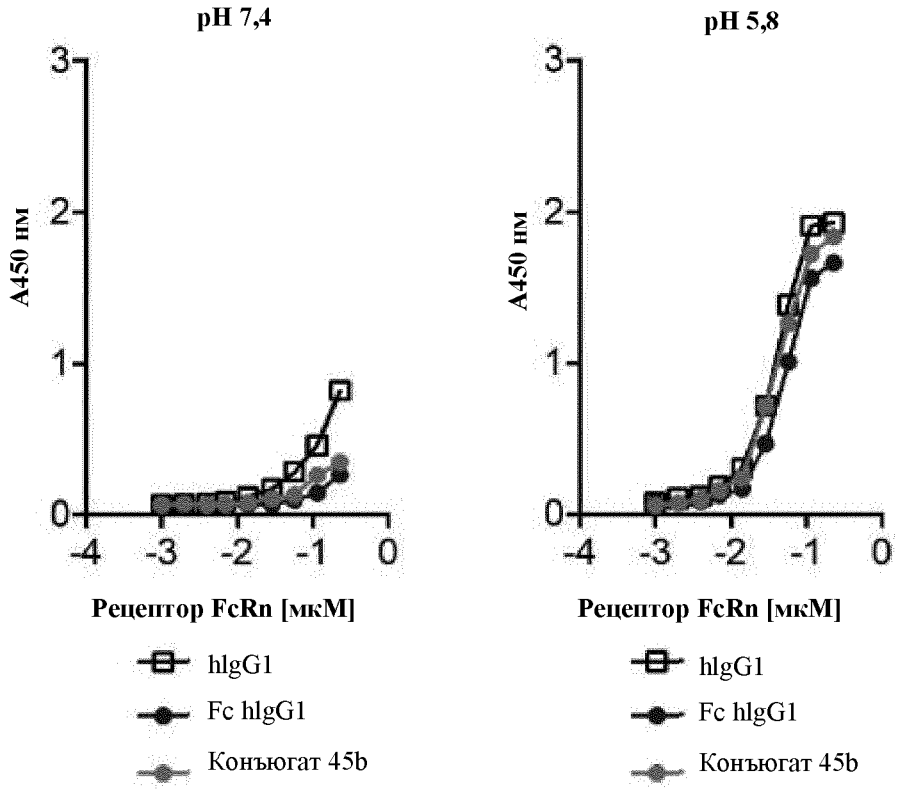
Фиг. 116C



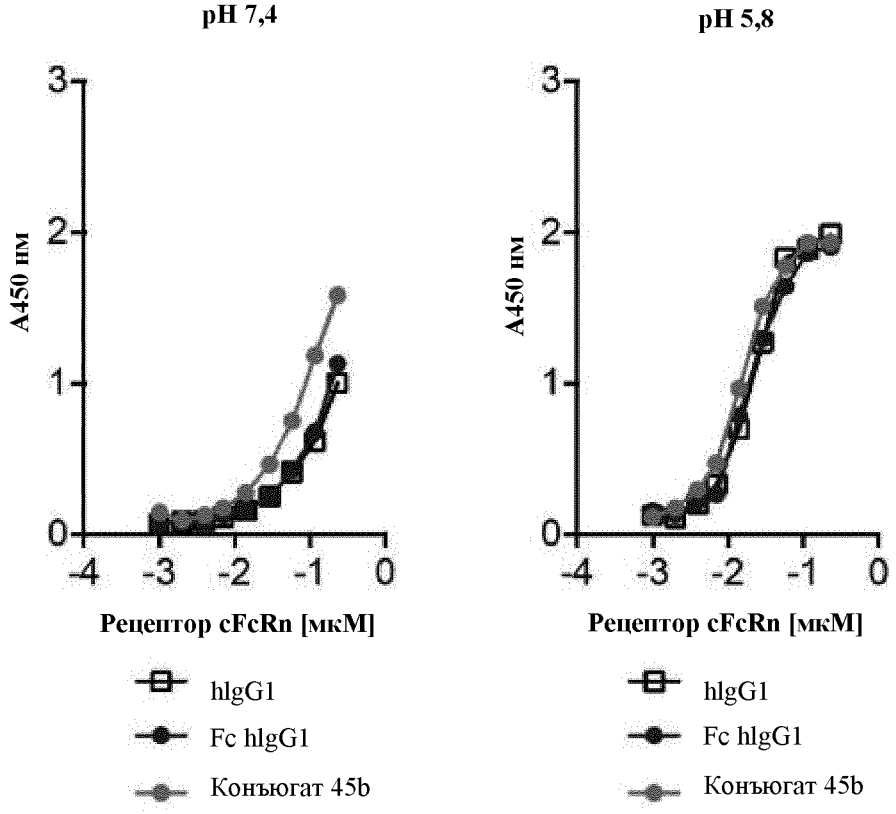
Фиг. 116D



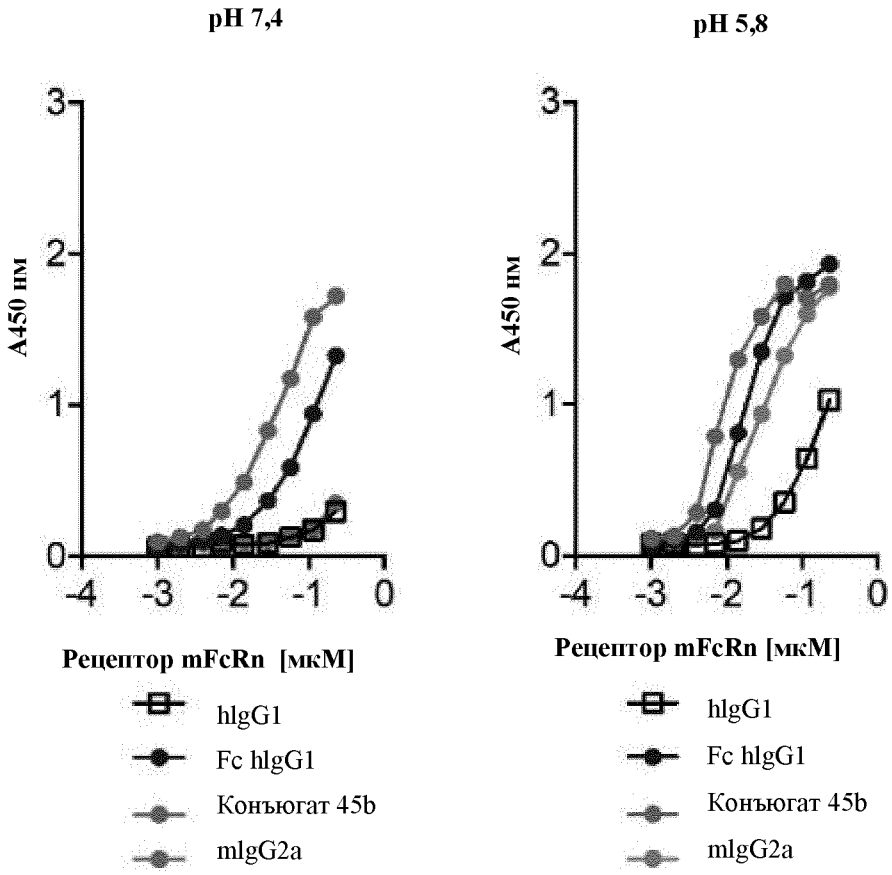
Фиг. 117A


pH 7,4
pH 5,8
A450 нм
3
2
1
0
-4
-3
-2
-1
0
Рецептор FcRn [мкМ]
hIgG1
Fc hIgG1
Конъюгат 45b

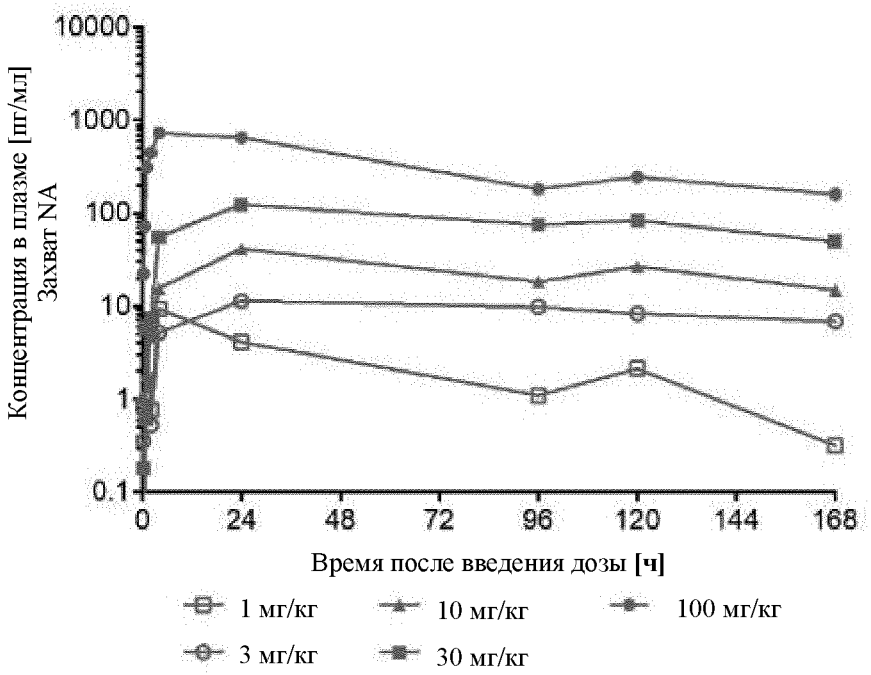
Фиг. 117B


pH 7,4
pH 5,8
A450 нм
3
2
1
0
-4
-3
-2
-1
0
Рецептор cFcRn [мкМ]
hIgG1
Fc hIgG1
Конъюгат 45b

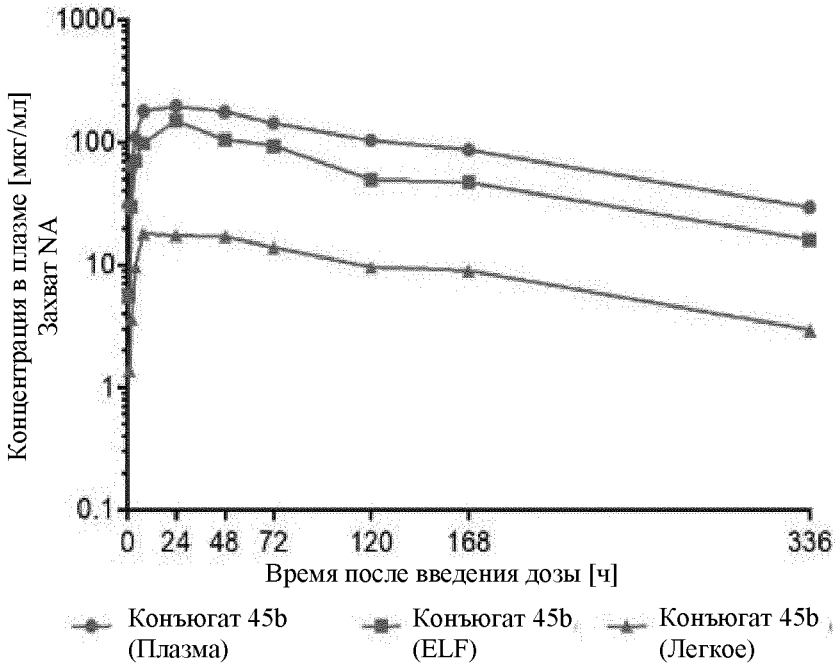
Фиг. 117C


pH 7,4
pH 5,8
A450 нм
3
2
1
0
-4
-3
-2
-1
0
Рецептор mFcRn [мкМ]
hIgG1
Fc hIgG1
Конъюгат 45b
mIgG2a

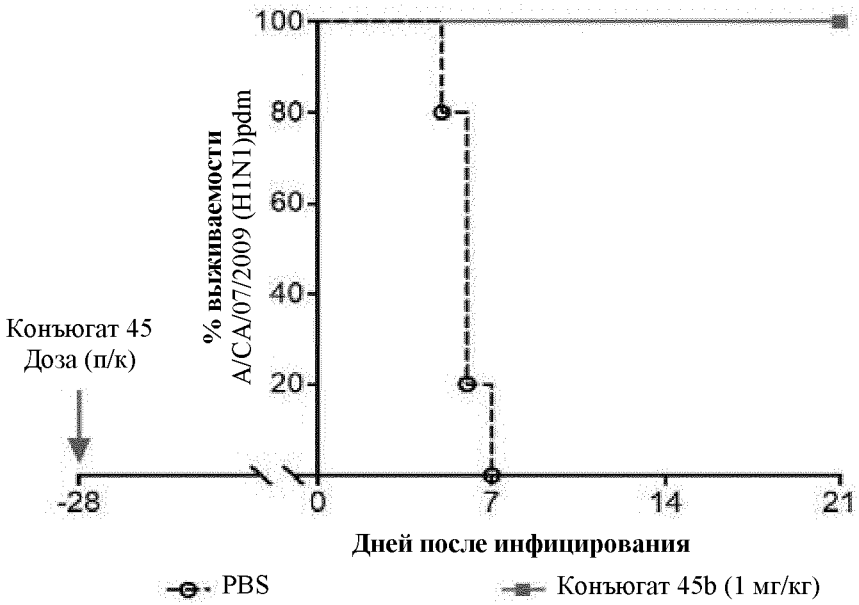
Фиг. 118A



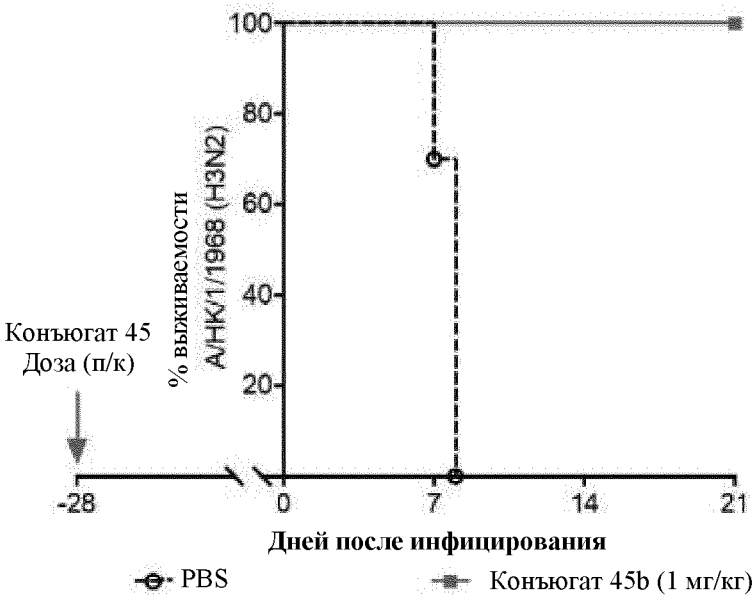
Фиг. 118B



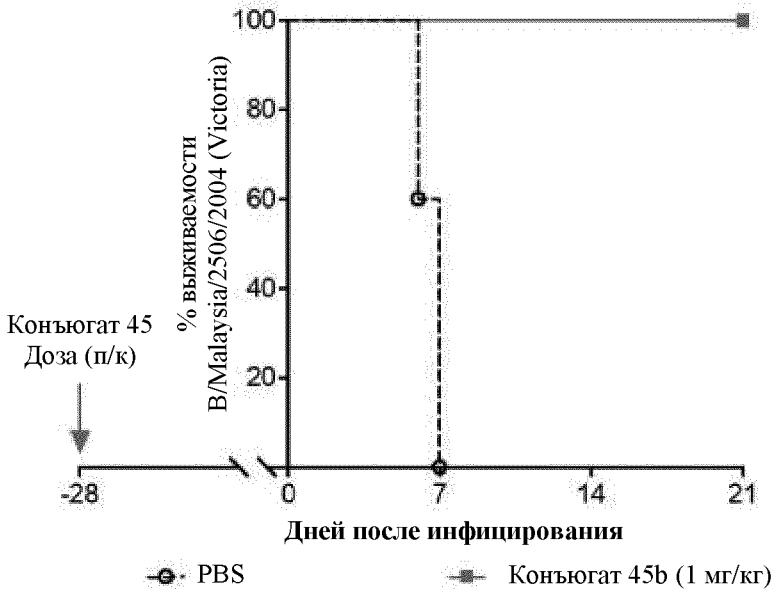
Фиг. 118C



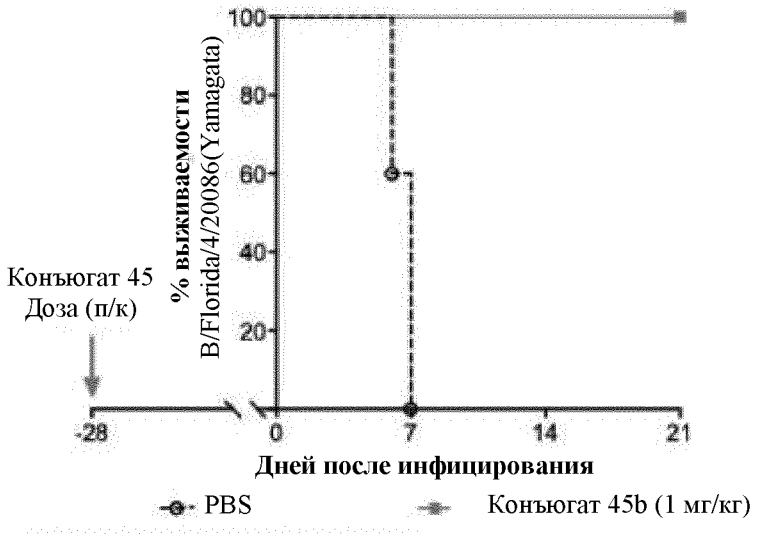
Фиг. 118D



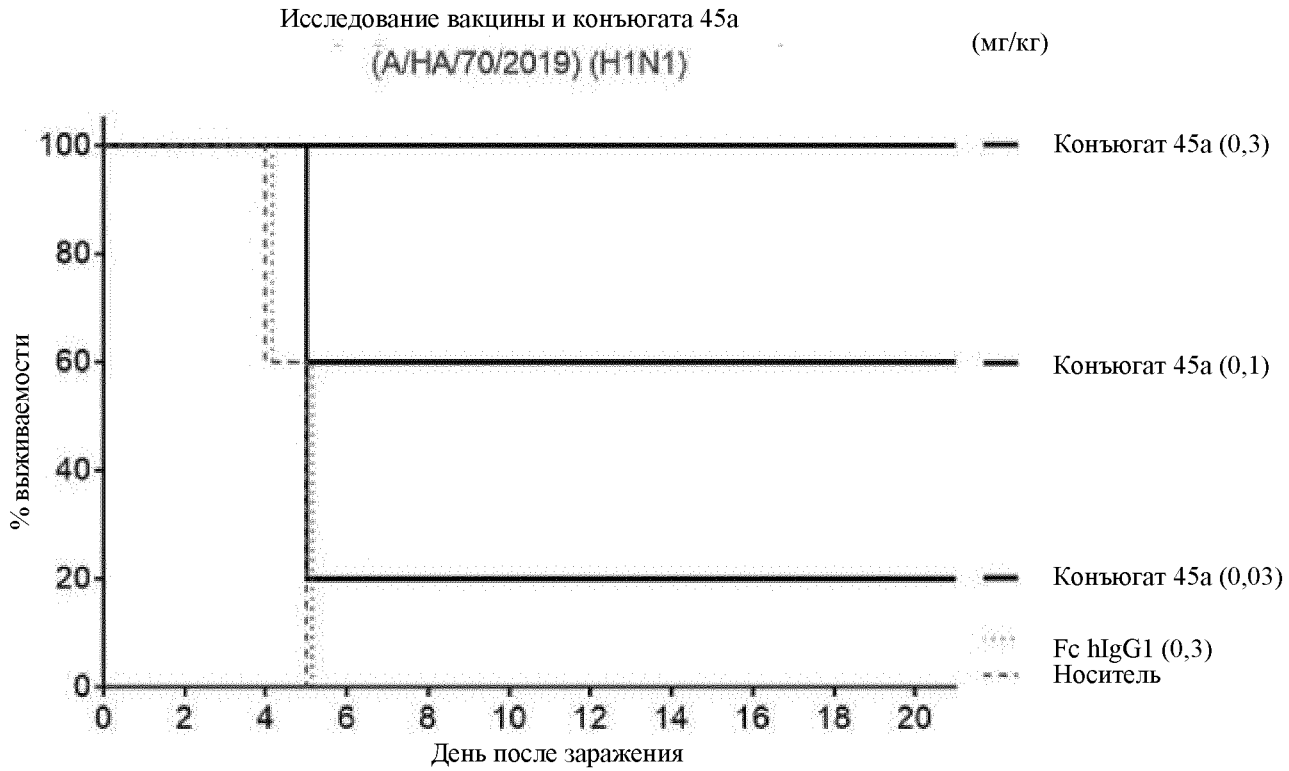
Фиг. 118E



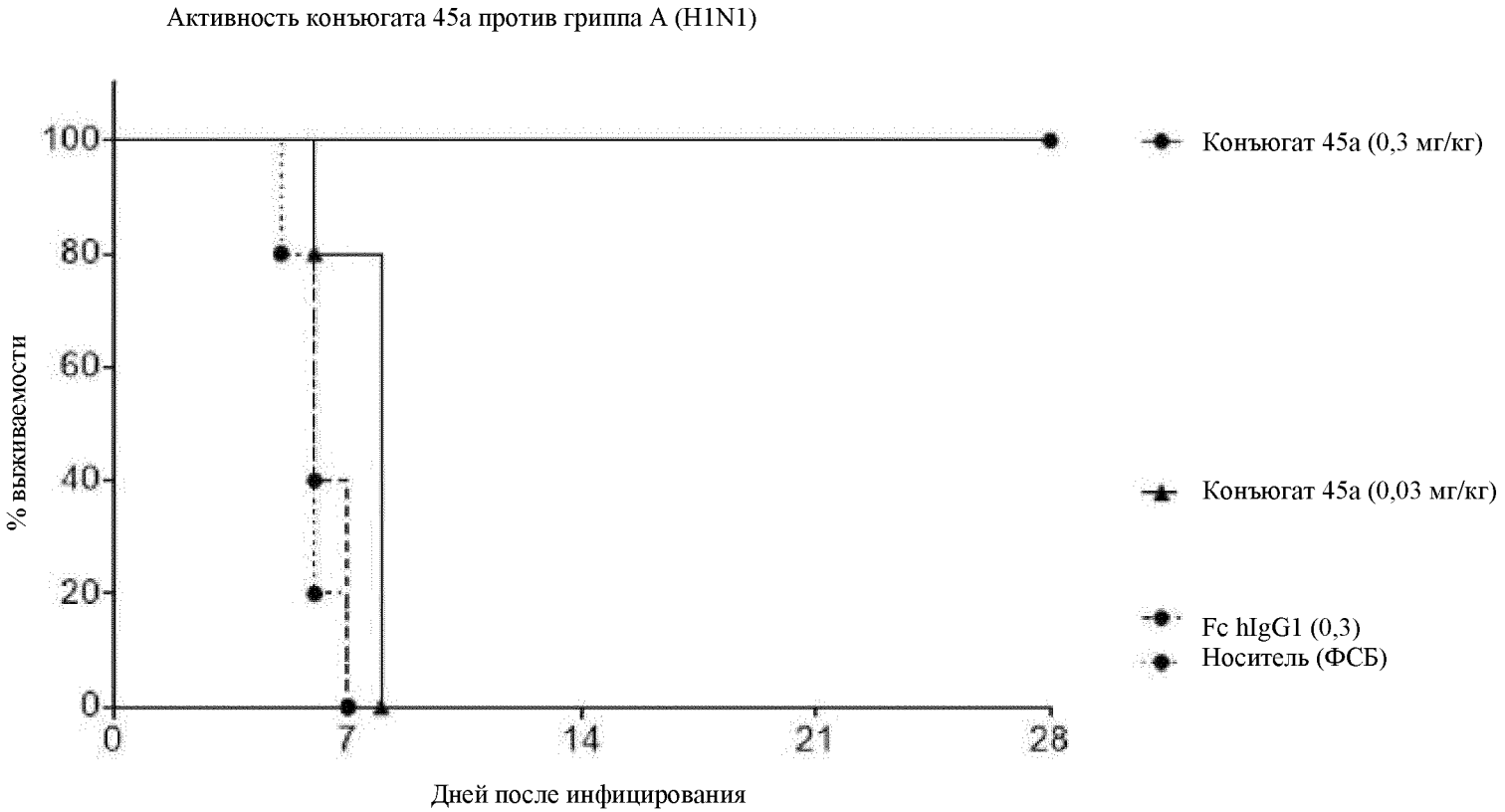
Фиг. 118F



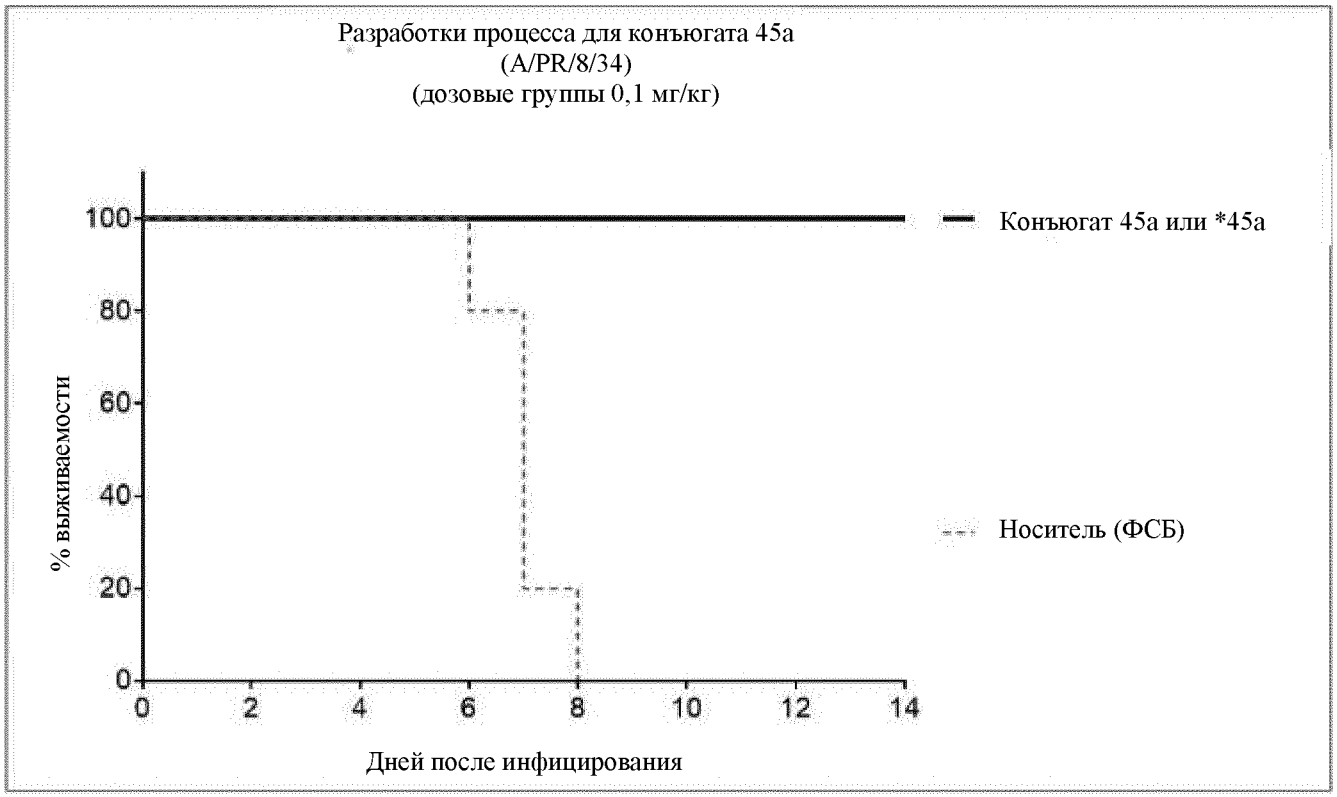
Фиг. 119


Исследование вакцины и конъюгата 45a
(A/HA/70/2019) (H1N1)
(мг/кг)
% выживаемости
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
День после заражения
Конъюгат 45a (0,3)
Конъюгат 45a (0,1)
Конъюгат 45a (0,03)
Fc hIgG1 (0,3)
Носитель

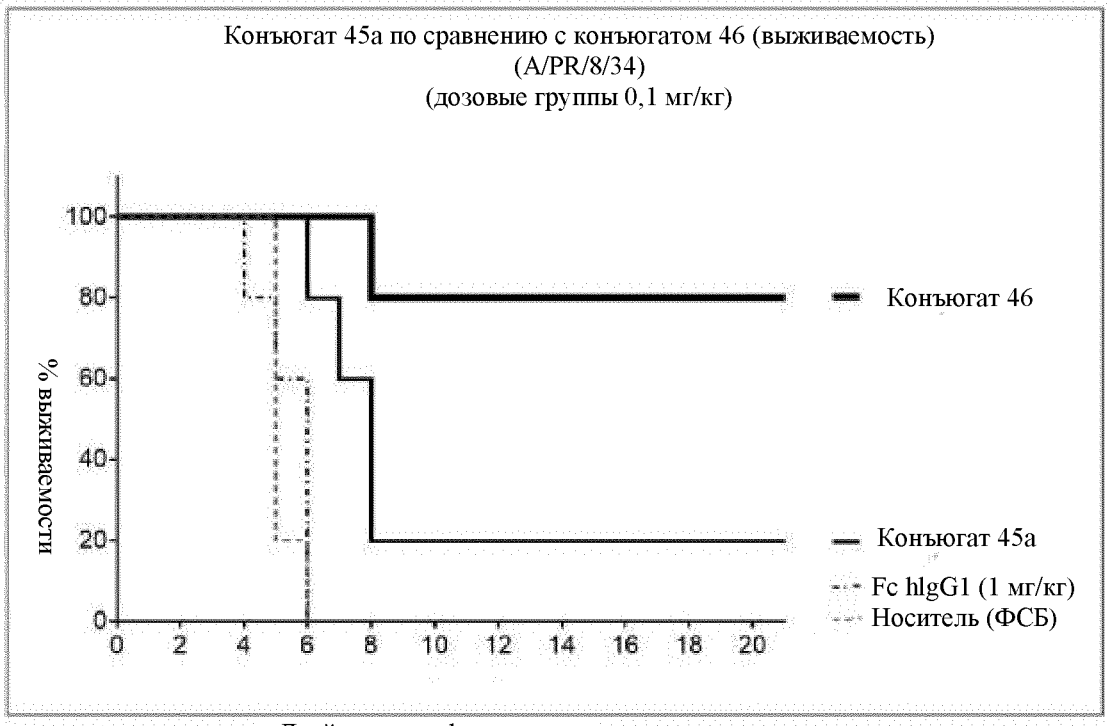
Фиг. 120


Активность конъюгата 45a против гриппа A (H1N1)
% выживаемости
100
80
60
40
20
0
0
7
14
21
28
Дней после инфицирования
Конъюгат 45a (0,3 мг/кг)
Конъюгат 45a (0,03 мг/кг)
Fc hIgG1 (0,3)
Носитель (ФСБ)

Фиг. 121


Разработки процесса для конъюгата 45a
(A/PR/8/34)
(дозовые группы 0,1 мг/кг)
% выживаемости
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Дней после инфицирования
Конъюгат 45a или *45a
Носитель (ФСБ)

Фиг. 122


Конъюгат 45a по сравнению с конъюгатом 46 (выживаемость)
(A/PR/8/34)
(дозовые группы 0,1 мг/кг)
% выживаемости
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Дней после инфицирования
Конъюгат 46
Конъюгат 45a
Fc hlgG1 (1 мг/кг)
Носитель (ФСБ)