

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292192** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.02.10

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

(22) Дата подачи заявки
2021.01.23

(54) **КОНЬЮГАТЫ БЕЛКОВ С АНТИВИРУСНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

(31) **62/965,735; 63/094,285**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.01.24; 2020.10.20**

Баум Алина, Ниттоли Томас (US)

(33) **US**

(74) Представитель:

(86) **PCT/US2021/014802**

Безрукова О.М. (RU)

(87) **WO 2021/151031 2021.07.29**

(71) Заявитель:

**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(57) В изобретении описаны соединения, композиции и способы лечения заболеваний и нарушений, ассоциированных с гриппом, включающие VX-787 и его производные, балоксавир и его производные, и балоксавира марбоксил и его производные, и образованные этими соединениями конъюгаты белок (например, антитело)-лекарственное средство.

202292192
A1

202292192

A1

КОНЬЮГАТЫ БЕЛКОВ С АНТИВИРУСНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

ЛИЦЕНЗИОННЫЕ ПРАВА ПРАВИТЕЛЬСТВА

[0001] Настоящее изобретение было создано при правительственной поддержке и в соответствии с Соглашением HNSO100201700020C, предоставленным Министерством здравоохранения и социальных служб США. Правительство имеет определенные права на изобретение.

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0002] По настоящей заявке на основании §119 раздела 35 Свода законов США испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/965,735, поданной 24 января 2020 года, и предварительной заявки США №63/094,285, поданной 20 октября 2020 года, содержание которых включено в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] В настоящей заявке предложены противовирусные соединения и образованные ими белковые конъюгаты, и способы лечения разнообразных заболеваний, нарушений и состояний, включающие введение противовирусных соединений и образованных ими конъюгатов.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Грипп – высококонтагиозное заболевание, имеющее длительную историю, которая характеризуется волнами пандемий, эпидемий, новых волн и вспышек. Несмотря на усилия, заключающиеся в ежегодных вакцинациях, инфекции гриппа приводят к существенной заболеваемости и смертности.

[0005] Вирусы гриппа включают 3 основных типа, А, В, и С. Вирусы гриппа А могут быть подразделены на подтипы на основании аллельных вариантов в антигенных областях двух генов, которые кодируют поверхностные

гликопротеины, гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (NA), которые требуются для прикрепления и проникновения вируса в клетку хозяина.

[0006] Гемагглютинин представляет собой трехмерный гликопротеин, состоящий из двух структурных доменов, округлого домена, образующего головку, который состоит из участка связывания рецептора (подверженного частой антигенной изменчивости), и стволовой части (более консервативной у разнообразных штаммов вируса гриппа). Белок НА синтезируется в виде предшественника (НА0), который подвергается протеолитическому процессингу с образованием двух субъединиц (НА1 и НА2), которые объединяются с образованием структуры, состоящей из стволовой части/округлой головки. Пептид НА1 обеспечивает присоединение вирус к поверхности клетки. Пептид НА2 образует стволовую структуру, которой опосредовано слияние вирусной и клеточной мембран в эндосомах, делающее возможным высвобождение рибонуклеопротеинового комплекса в цитоплазму.

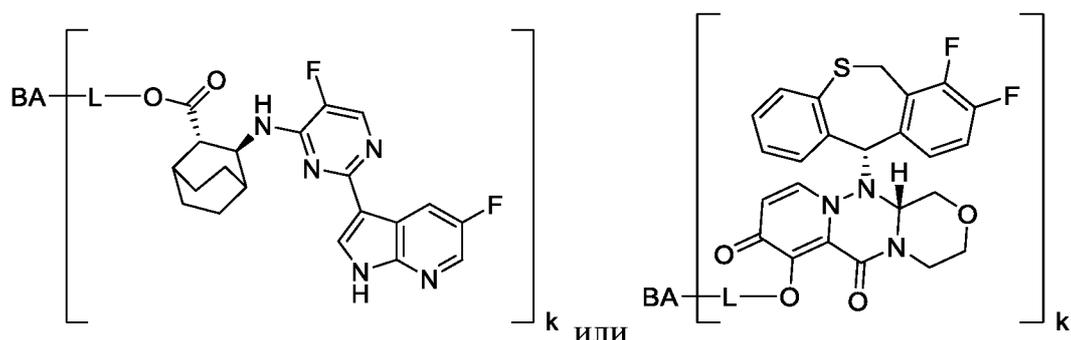
[0007] На данный момент на основании белков гемагглютинина определены восемнадцать подтипов (Н1 -Н18). Восемнадцать НА могут быть разделены на две группы. Группа 1 включает подтипы Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13, Н16, Н17, и Н18, и группа 2 включает подтипы Н3, Н4, Н7, Н10, Н14 и Н15.

[0008] Несмотря на продолжающиеся в течение многих десятилетий исследования, отсутствуют зарегистрированные для продажи антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), которые, обладая широким спектром действия, нейтрализуют или подавляют инфекцию, вызванную вирусом гриппа А и уменьшают тяжесть заболевания, вызванного вирусом гриппа А. Поэтому существует потребность в идентификации новых антител и ADC, которые будут нейтрализовать активность многочисленных подтипов вируса гриппа А и могут быть использованы в качестве медикаментов для профилактики или терапии инфекции гриппа А.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

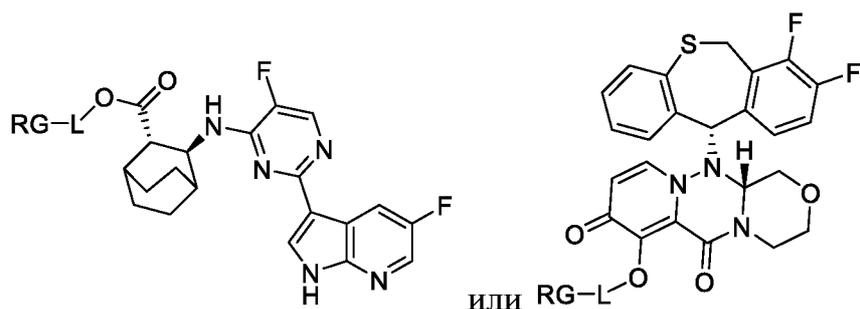
[0009] В настоящей заявке предложены соединения, которые могут быть использованы, например, для антивирусного лечения. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения включают VX-787 и его производные, балоксавир и его производные, и/или балоксавира марбоксил и его производные. В одном варианте осуществления изобретения предложен конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с полезной нагрузкой (например, с антивирусным соединением), линкером-полезной нагрузкой (например, линкером-антивирусным соединением), и/или соединением, описанное в настоящей заявке.

[0010] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены соединения, имеющие следующую структуру:



где **L** представляет собой линкер; **BA** представляет собой связующий агент; и **k** равен целому числу от одного до тридцати.

[0011] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены линкер-полезные нагрузки (например, линкер-антивирусные соединения), имеющие следующую структуру



или их фармацевтически приемлемая соль, где **L** представляет собой линкер; и **RG** представляет собой реакционноспособную группу.

[0012] В другом варианте осуществления изобретения, изложенном в настоящей заявке, описаны способы получения полезных нагрузок или соединений, линкер-полезных нагрузок или конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению.

[0013] В другом варианте осуществления изобретения предложены способы лечения, профилактики, уменьшения тяжести или подавления заболевания, нарушения или состояния, ассоциированного с инфекцией, описанной в настоящей заявке, у субъекта, включающие введение субъекту в эффективном количестве полезной нагрузки (например, противовирусного соединения), линкера-полезной нагрузки (например, линкера-противовирусного соединения), конъюгата антитело-лекарственное средство, или фармацевтической композиции, описанных в настоящей заявке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАЦИЙ

[0014] На ФИГ. 1А показаны взвешенные по интенсивности средние загрузки полезной нагрузки (например, линкер-противовирусного соединения) при измерении методом ЖХ-МС для 11729-Q295-11. На ФИГ. 1В показаны взвешенные по интенсивности средние загрузки полезной нагрузки (например, линкер-противовирусного соединения) при измерении методом ЖХ-МС для конъюгата Изотипический контроль-Q295-11.

[0015] На ФИГ. 2А показаны взвешенные по интенсивности средние загрузки полезной нагрузки (например, линкер-противовирусного соединения) при измерении методом ЖХ-МС для 11729-НС-Cterm-11. На ФИГ. 2В показаны взвешенные по интенсивности средние загрузки полезной нагрузки (например, линкер-противовирусного соединения) при измерении методом ЖХ-МС для конъюгата Изотипический контроль-НС-Cterm-11.

[0016] На ФИГ. 3 показаны полученные методом ИФА данные субнанолярного специфичного связывания 11729-НС-Cterm-11, 11729-НС-

Nterm-11, 11729-LC-Cterm-11, и 11729-LC-Nterm-11 с клетками, инфицированными вирусом гриппа А.

[0017] На ФИГ. 4 показана сравнительная противовирусная эффективность 11729-НС-Cterm-11, 11729-LC-Cterm-11, 11729-LC-Nterm-11, mAb11729, и изотипического контрольного антитела и конъюгата, и Изотипический контроль-НС-Cterm-11 в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А.

[0018] На ФИГ. 5 показана *in vitro* стабильность (т.е. сохранение линкер-полезной нагрузки (например, линкер-противовирусного соединения); или отсутствие снижения DAR) 11729-НС-Cterm-11 в плазме человека и обезьяны после 72-часовой инкубации.

[0019] На ФИГ. 6 показана сравнительная противовирусная эффективность 11729-НС-Cterm-11, Изотипического контрольного антитела и конъюгата Изотипический контроль-НС-Cterm-11 в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А.

[0020] На ФИГ. 7 показана сравнительная противовирусная эффективность 11729-НС-Cterm-6, 11729-LC-Cterm-6, mAb11729, Изотипического контрольного антитела, конъюгата Изотипический контроль-НС-Cterm-6 антитело и конъюгата Изотипический контроль-LC-Cter-6 антитело в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А.

[0021] На ФИГ. 8 показана сравнительная противовирусная эффективность 11729-НС-Cterm-45a, 11729-LC-Cterm-45a, 11729-НС-Cterm-34, 11729-LC-Cterm-34, mAb11729, Изотипического контрольного антитела и конъюгатов Изотипическое контрольное антитело-лекарственное средство в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А.

[0022] На ФИГ. 9 показана сравнительная противовирусная эффективность 5385-НС-Cterm-11, 5385-LC-Cterm-11, mAb11729, Изотипического контрольного антитела и конъюгатов Изотипическое контрольное антитело-лекарственное средство в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А.

[0023] На ФИГ. 10 показана сравнительная антивирусная эффективность конъюгата 11729-НС-Cterm-45d, mAb11729, Изотипического контрольного антитела и конъюгата Изотипический контроль-НС-Cterm-45d в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А.

[0024] На ФИГ. 11 показано специфичное связывание конъюгата 11729-НС-Cterm-45d с клетками, инфицированными вирусом гриппа А.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0025] В настоящей заявке предложены соединения, композиции и способы, используемые для лечения, например, инфекций гриппа у субъекта.

Определения

[0026] При упоминании соединений в настоящем документе следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют общепринятые значения, понятные специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение, если не указано иное. В случаях, когда представленный в настоящем изобретении термин имеет несколько определений, приведенное здесь определение имеет преимущественную силу, если не указано иное.

[0027] Фраза «гемагглютинин вируса гриппа», также называемый «НА вируса гриппа» относится к трехмерному гликопротеину, присутствующему на поверхности вирионов гриппа, которым опосредовано прикрепление (посредством связывания НА1 с α -2,3- и α -2,6-сиаловыми кислотами) и проникновение (посредством конформационных изменений) вируса в клетки хозяина. НА состоит из двух структурных доменов: округлого домена, образующего головку, который состоит из участка связывания рецептора (подверженного частой антигенной изменчивости), и стволовой части (более консервативной у разнообразных штаммов вируса гриппа). НА синтезируется в виде предшественника (НА0), который подвергается протеолитическому процессингу с образованием двух субъединиц (НА1 и НА2), которые

объединяются с образованием структуры, состоящей из стволовой части/округлой головки. Вирусный НА является наиболее вариабельным антигеном на поверхности вируса (восемнадцать подтипов НА могут быть подразделены на две группы), но стволовой домен (НА2) является высококонсервативным в каждой группе.

[0028] Примером аминокислотной последовательности полноразмерного НА вируса гриппа является аминокислотная последовательности изолята вируса гриппа H1 N1 A/Калифорния/04/2009, которой в базе данных GenBank присвоен учетный номер FJ966082.1. Фраза «НА вируса гриппа» включает также белковые варианты НА вируса гриппа, выделенные из различных изолятов вируса гриппа, например, GQ149237.1, NC_002017, KM972981.1, и т.д. Фраза «НА вируса гриппа» включает также рекомбинантный НА вируса гриппа или его фрагмент. Фраза также охватывает НА вируса гриппа или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, мышинным или человеческим Fc или с сигнальной последовательностью.

[0029] Фраза «инфекция гриппа» в настоящем изобретении, также охарактеризованная, как «грипп», относится к тяжелому острому респираторному заболеванию, вызываемому вирусом гриппа. Фраза включает инфекцию дыхательных путей и симптомы, включающие высокую температуру тела, головную боль, боль и ломоту во всем теле, усталость и слабость, в некоторых случаях, крайнее изнурение, заложенность носа, чихание, воспаленное горло, дискомфорт в грудной клетке, кашель, одышку, бронхит, пневмонию и в тяжелых случаях смерть.

[0030] В настоящем документе термин «алкил» относится к одновалентному и насыщенному углеводородному радикалу. Алкил необязательно замещен, и может быть линейным, разветвленным или циклическим, *т.е.* циклоалкилом. Алкилы включают, не ограничиваясь перечисленным, радикалы, содержащие от 1 до 20 атомов углерода, *т.е.* C₁₋₂₀ алкил; от 1 до 12 атомов углерода, *т.е.*, C₁₋₁₂ алкил; от 1 до 8 атомов углерода, *т.е.*, C₁₋₈ алкил; от 1 до 6 атомов углерода, *т.е.*, C₁₋₆ алкил; и от 1 до 3 атомов углерода, *т.е.*, C₁₋₃ алкил. Примеры алкильных групп

включают, не ограничиваясь перечисленным метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, втор-бутил, трет-бутил, изобутил, пентильную группу, гексильную группу, циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил. Пентильная группа включает, не ограничиваясь перечисленным, n-пентил и изопентил. Гексильная группа включает, не ограничиваясь перечисленным, n-гексил.

[0031] В настоящем документе термин «алкилен» относится к двухвалентной алкильной группе. Если не указано иное, алкилен включает, не ограничиваясь перечисленным, от 1 до 20 атомов углерода. Алкиленовая группа может быть необязательно замещена, как описано в настоящем документе для алкила. В некоторых вариантах осуществления изобретения алкилен не замещен.

[0032] Обозначение аминокислоты или аминокислотного остатка без указания ее стереохимии включает L-форму и D-форму аминокислоты, или их рацемическую смесь.

[0033] В настоящем документе, термин «галоалкил» относится к алкилу, согласно приведенному выше определению, где алкил включает, по меньшей мере, один заместитель, выбранный из галогена, например, фтора (F), хлора (Cl), брома (Br) или йода (I). Примеры галоалкилов включают, не ограничиваясь перечисленным, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CCl}_2\text{F}$, и $-\text{CCl}_3$.

[0034] В настоящем документе, термин «алкенил» относится к одновалентному углеводородному радикалу, содержащему, по меньшей мере, два атома углерода и одну или более неароматических углерод-углеродных двойных связей. Алкенил необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкенилы включают, не ограничиваясь перечисленным, радикалы, содержащие от 2 до 20 атомов углерода, *т.е.*, C_{2-20} алкенил; от 2 до 12 атомов углерода, *т.е.*, C_{2-12} алкенил; от 2 до 8 атомов углерода, *т.е.*, C_{2-8} алкенил; от 2 до 6 атомов углерода, *т.е.*, C_{2-6} алкенил; и от 2 до 4 атомов углерода, *т.е.*, C_{2-4} алкенил. Примеры алкенильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, винил, пропенил, бутенил и циклогексенил.

[0035] В настоящем документе, термин «алкинил» относится к одновалентному углеводородному радикалу, содержащему, по меньшей мере, два

атома углерода и одну или более углерод-углеродных связей. Алкинил необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкинил включает, не ограничиваясь перечисленным, радикалы, содержащие от 2 до 20 атомов углерода, *т.е.*, C₂₋₂₀ алкинил; от 2 до 12 атомов углерода, *т.е.*, C₂₋₁₂ алкинил; от 2 до 8 атомов углерода, *т.е.*, C₂₋₈ алкинил; от 2 до 6 атомов углерода, *т.е.*, C₂₋₆ алкинил; и от 2 до 4 атомов углерода, *т.е.*, C₂₋₄ алкинил. Примеры алкинильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, этинил, пропинил и бутинил.

[0036] В настоящем документе термин «алкокси» относится к одновалентному и насыщенному углеводородному радикалу, в котором углеводород включает одинарную связь с атомом кислорода, и радикал локализован на атоме кислорода, *например*, CH₃CH₂-O· в случае этокси. Замещающие алкокси-группы связаны с соединением, в котором они являются заместителями, через атом кислорода замещающей алкокси-группы. Радикал алкокси не обязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим, *т.е.*, циклоалкокси. Алкоксигруппы включают, не ограничиваясь перечисленным, группы, содержащие от 1 до 20 атомов углерода, *т.е.*, C₁₋₂₀ алкокси; от 1 до 12 атомов углерода, *т.е.*, C₁₋₁₂ алкокси; от 1 до 8 атомов углерода, *т.е.*, C₁₋₈ алкокси; от 1 до 6 атомов углерода, *т.е.*, C₁₋₆ алкокси; и от 1 до 3 атомов углерода, *т.е.*, C₁₋₃ алкокси. Примеры алкоксигрупп включают, не ограничиваясь перечисленным, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси, *n*-бутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, изобутокси, пентокси, гексокси, циклопропокси, циклобутокси, циклопентокси и циклогексокси группы.

[0037] В настоящем документе термин «галоалкокси» относится к группе алкокси, согласно вышеприведенному определению, в которой алкокси включает, по меньшей мере, один заместитель, выбранный из галогенов, *например*, F, Cl, Br, или I.

[0038] В настоящем документе термин «арил» относится к одновалентной группе, являющейся радикалом ароматического соединения, в которой кольцевые атомы представлены атомами углерода. Арил необязательно замещен,

и может быть моноциклическим или полициклическим, *например*, бициклическим или трициклическим. Примеры арильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, группы, содержащие от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C₆₋₂₀ арил; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C₆₋₁₅ арил, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C₆₋₁₀ арил. Примеры арильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, фенил, нафтил, флуоренил, азуленил, антрил, фенантрил и пиренил

[0039] В настоящем термин «арилалкил» относится к одновалентной группе, являющейся радикалом или алкильным соединением, где алкил замещен ароматическим заместителем, *т.е.*, ароматическое соединение включает одинарную связь с алкильной группой, и где радикал локализован на алкильной группе. Арилалкильная группа соединяется с проиллюстрированной химической структурой через алкильную группу. Арилалкил может быть представлен,

например, следующими структурами, *например*, $\text{B}-\dot{\text{C}}\text{H}_2$, $\text{B}-\text{CH}_2-\dot{\text{C}}\text{H}_2$, $\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\dot{\text{C}}\text{H}$,

$\text{B}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\dot{\text{C}}\text{H}_2$, или $\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\dot{\text{C}}\text{H}_2$, в которой В представляет собой ароматическую

группу, *например*, арил или фенил. Арилалкил необязательно замещен, *т.е.*, арильная группа и/или алкильная группа может быть замещена, как показано в настоящем документе. Примеры арилалкилов включают, не ограничиваясь перечисленным, бензил.

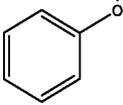
[0040] В настоящем документе термин «алкиларил» относится к одновалентной группе, представляющей собой радикал или арил, в котором арильное соединение замещено алкильным заместителем, *т.е.*, арильное соединение включает одинарную связь к алкильной группе, и радикал локализован на арильной группе. Алкиларильная группа соединяется с проиллюстрированной химической структурой через арильную группу. Алкиларил может быть представлен следующей структурой, *например*, $\dot{\text{B}}/$,

$\dot{\text{B}}-\text{CH}_2$, $\dot{\text{B}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $\dot{\text{B}}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2$, или $\dot{\text{B}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, где В представляет собой ароматическую

группу, *например*, фенил. Алкиларил необязательно замещен, *т.е.* арильная

группа и/или алкильная группа может быть замещена, как показано в настоящем документе. Примеры алкиларила, не ограничиваясь перечисленным, толуил.

[0041] В настоящем документе термин «арилокси» относится к одновалентной группе, представляющей собой радикал или ароматическое соединение, в котором кольцевые атомы представлены атомами углерода, и в кольце имеется заместитель - кислородный радикал, *т.е.* ароматическое соединение включает одинарную связь с атомом кислорода, и радикал локализован на атоме кислорода,

например,  в случае фенокси. Заместители арилокси соединяются с соединением, которое они замещают, через атом кислорода. Группа арилокси необязательно замещена. Группа арилокси включает, не ограничиваясь перечисленным, радикалы, содержащие от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C₆₋₂₀ арилокси; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C₆₋₁₅ арилокси, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C₆₋₁₀ арилокси. Примеры группы арилокси включают, не ограничиваясь перечисленным, фенокси, нафтокси, и антрокси.

[0042] В настоящем документе термин «арилен» относится к двухвалентной группе ароматического соединения, в котором кольцевые атомы представлены только атомами углерода. Арилен необязательно замещен, и может быть моноциклическим или полициклическим соединением, *например*, бициклическим или трициклическим. Примеры ариленовых групп включают, не ограничиваясь перечисленным, группы, содержащие от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C₆₋₂₀ арилен; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C₆₋₁₅ арилен, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C₆₋₁₀ арилен.

[0043] В настоящем документе термин «гетероалкил» относится к алкилам, в молекуле которых один или несколько атомов углерода замещены гетероатомами. В настоящем документе термин «гетероалкенил» относится к алкенилам, в молекуле которых один или более атомов углерода замещены гетероатомами. В настоящем документе термин «гетероалкинил» относится к алкинилам, в молекуле которых один или более атомов углерода замещены гетероатомами.

Подходящими атомами являются, не ограничиваясь перечисленным, атомы азота, кислорода и серы. Гетероалкил, гетероалкенил и гетероалкинил необязательно замещены. Примеры гетероалкильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, аминоалкил, сульфонилалкил и сульфинилалкил. Примеры гетероалкильных групп включают также, не ограничиваясь перечисленным, метиламино, метилсульфонил, и метилсульфинил.

[0044] В настоящем документе термин «гетероарил» относится к одновалентной группе, являющейся радикалом или ароматическим соединением, в которой кольцевые атомы содержат атомы углерода и, по меньшей мере, один атом кислорода, серы, азота или фосфора. Примеры гетероарильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, группы, содержащие от 5 до 20 кольцевых атомов, от 5 до 15 кольцевых атомов, и от 5 до 10 кольцевых атомов. Гетероарил необязательно замещен.

[0045] В настоящем документе термин «гетероарилен» относится к двухвалентному гетероарили, в молекуле которого вместо одного или нескольких кольцевых атомов ароматического кольца присутствует атом кислорода, серы, азота или фосфора. Гетероарилен необязательно замещен.

[0046] В настоящем документе термин «гетероциклоалкил» относится к молекуле циклоалкила, в которой один или более атомов углерода замещены гетероатомами. Подходящие гетероатомы включают, не ограничиваясь перечисленным, атомы азота, кислорода и серы. Гетероциклоалкил необязательно замещен. Примеры гетероциклоалкильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, морфолинил, пиперидинил, тетрагидропиранил, пирролидинил, имидозолидинил, оксазолидинил, тиазолидинил, диоксоланил, дитиоланил, оксанил или тианил.

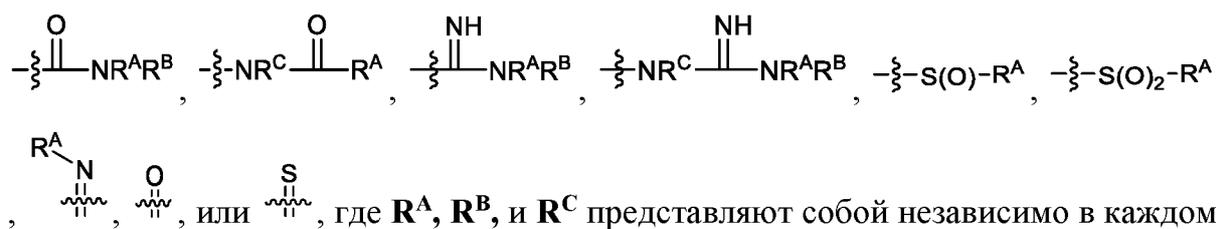
[0047] В настоящем документе термин «кислота Льюиса» относится к молекуле или йону, которые акцептируют неподеленную пару электронов. В описанных в настоящем изобретении способах используются кислоты Льюиса, не являющиеся протоном. Кислоты Льюиса включают, не ограничиваясь перечисленным, кислоты, образованные металлами, кислоты, образованные

неметаллами, жесткие кислоты Льюиса и мягкие кислоты Льюиса. Кислоты Льюиса включают, не ограничиваясь перечисленным, кислоты Льюиса, образованные алюминием, бором, железом, оловом, титаном, магнием, медью, сурьмой, фосфором, серебром, иттербием, скандием, никелем и цинком. Иллюстративные кислоты Льюиса включают, не ограничиваясь перечисленным, $AlBr_3$, $AlCl_3$, BCl_3 , бора трихлорид метилсульфид, BF_3 , бора трифторид метилэфират, бора трифторид метилсульфид, бора трифторид тетрагидрофуран, дициклогексилбора трифторметансульфонат, железа (III) бромид, железа (III) хлорид, олова (IV) хлорид, титана (IV) хлорид, титана (IV) изопропоксид, $Cu(OTf)_2$, $CuCl_2$, $CuBr_2$, цинка хлорид, алкилалюминия галогениды (R_nAlX_{3-n} , где R является гидрокарбиллом), $Zn(OTf)_2$, $ZnCl_2$, $Yb(OTf)_3$, $Sc(OTf)_3$, $MgBr_2$, $NiCl_2$, $Sn(OTf)_2$, $Ni(OTf)_2$, и $Mg(OTf)_2$.

[0048] В настоящем документе термин «N-содержащий гетероциклоалкил» относится к циклоалкилу, у которого у которого один или более атомов углерода замещены гетероатомами, и, по меньшей мере, один замещающий гетероатом представляет собой атом азота. Помимо азота подходящие гетероатомы включают, не ограничиваясь перечисленным, атомы кислорода и серы. N-содержащий гетероциклоалкил необязательно замещен. Примеры N-содержащих гетероциклоалкильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, морфолинил, пиперидинил, пирролидинил, имидазолидинил, оксазолидинил, или тиазолидинил.

[0049] В настоящем документе термин «необязательно замещенный» при использовании для описания радикала, например, необязательно замещенный алкил, означает, что такая группа необязательно связана с одним или несколькими заместителями. Примеры таких заместителей включают, не ограничиваясь перечисленным, гало, циано, нитро, необязательно замещенный галоалкил, азидо, эпокси, необязательно замещенный гетероарил, необязательно

замещенный гетероциклоалкил, $-\xi-OR^A$, $-\xi-SR^A$, $-\xi-NR^A R^B$, $-\xi-\overset{O}{\parallel}-R^A$, $-\xi-\overset{O}{\parallel}-OR^A$,



[0050] В настоящем документе термин «связующий агент» относится к любой молекуле, *например*, белка, способной к специфичному связыванию с определенным партнером по связыванию, *например*, антигеном.

[0051] В настоящем документе термин «линкер» относится к двухвалентной, трехвалентной или поливалентной группе, которая образует ковалентную связь или способна образовывать ковалентную связь (например, посредством реакционноспособной группы) между связующим агентом и одним или несколькими соединениями, описанными в настоящем документе, например, с соединениями, являющимися полезной нагрузкой, противовирусными соединениями и усиливающими эффект агентами.

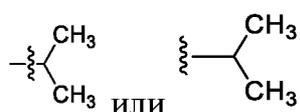
[0052] В настоящем документе термин «условия синтеза амидов» относится к условиям проведения реакции, подходящим для образования амида, *например*, посредством взаимодействия с карбоновой кислотой, активированной карбоновой кислотой или ацилгалогенида с амином. В некоторых примерах термин «условия синтеза амидов» относится к условиям проведения реакции, подходящих для образования амидной связи между карбоновой кислотой и амином. В некоторых из этих примеров карбоновая кислота вначале превращается в активированную карбоновую кислоту, перед тем как активированная кислота вступит во взаимодействие с амином с образованием амида. Подходящие условия для образования амида включают, не ограничиваясь перечисленным, использование реагентов, влияющих на протекание реакции между карбоновой кислотой и амином, включая, но не ограничиваясь перечисленным, дициклогексилкарбодиимид (DCC), диизопропилкарбодиимид (DIC), (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (BOP), (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyBOP), (7-азабензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyAOP), бромтрипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyBrOP), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат (HBTU), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония тетрафторборат (TBTU), 1-[Бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиния 3-оксид гексафторфосфат (HATU), N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохиолин (EEDQ), N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), 2-хлор-1,3-диметилимидазолидиния гексафторфосфат (CIP), 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (CDMT), карбонилдиимдазол (CDI) и 1-Циано-2-этокси-2-оксоэтилиденаминоокси)диметиламино-морфолино-карбения гексафторфосфат (COMU). В некоторых примерах карбоновую кислоту вначале превращают в активированный сложный эфир карбоновой кислоты с последующей обработкой сложного эфира карбоновой кислоты амином с образованием амидной связи. В определенных вариантах осуществления изобретения карбоновую кислоту обрабатывают реагентом. Реагент активирует карбоновую кислоту посредством депротонирования карбоновой кислоты с

последующим образованием комплекса продукта с депротонированной карбоновой кислотой в результате нуклеофильной атаки депротонированной карбоновой кислоты на протонированный реагент. Активированные сложные эфиры некоторых карбоновых кислот впоследствии становятся более чувствительными к атаке амина по сравнению с карбоновой кислотой до активации. Это приводит к образованию амидной связи. По существу, карбоновая кислота описана, как уже активированная. Примерами реагентов являются DCC и DIC.

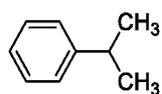
[0053] В настоящем документе термин «остаток» относится к химическому фрагменту в составе соединения, который остается после химической реакции. Например, термин «аминокислотный остаток» или «*N*-алкил-аминокислотный остаток» относится к продукту связывания амида или продукту связывания пептида аминокислоты или *N*-алкил-аминокислоты с подходящим партнером; где, например, после связывания амида или пептида аминокислоты или *N*-алкил-аминокислоты выделяется молекула воды, что приводит к образованию продукта, содержащего аминокислотный остаток или *N*-алкил-аминокислотный остаток, включенный в результате связывания.

[0054] В настоящем документе термин «конституциональные изомеры» относится к соединениям с одинаковой молекулярной формулой, которые имеют разные химические структуры из-за различного расположения атома. Примеры конституциональных изомеров включают *n*-пропил и изопропил; *n*-бутил, втор-бутил и *трет*-бутил; и *n*-пентил, изопентил и неопентил, и т.п.

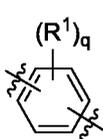
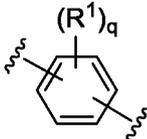
[0055] Определенные группы, фрагменты, заместители и атомы отображены с волнистой линией, которая пересекает связь или связи, чтобы указать на атом, через который эти группы, фрагменты, заместители или атомы связаны. Например, фенильная группа, замещенная пропильной группой, показанная следующим образом:

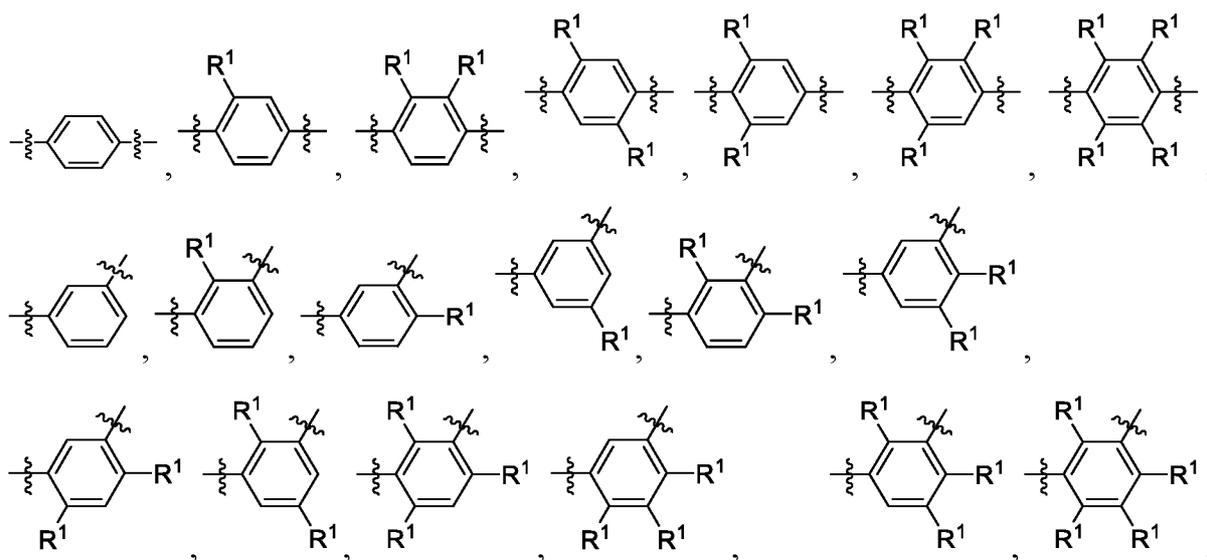


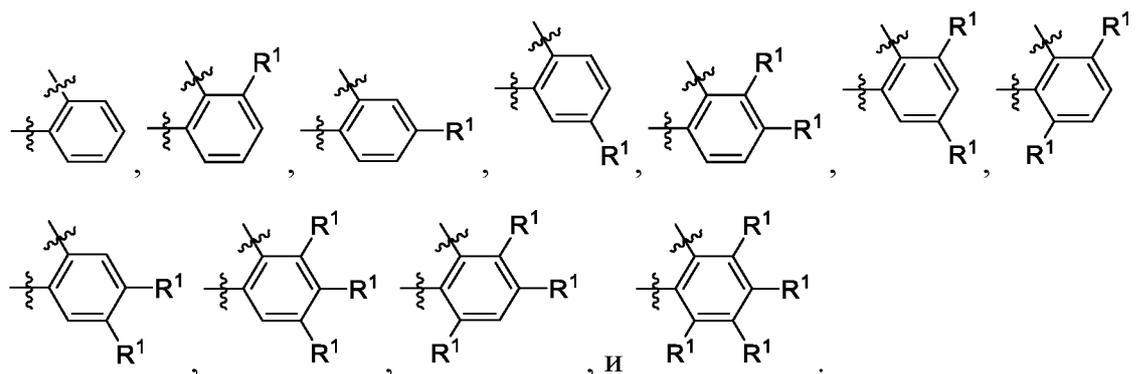
имеет следующую структуру:



В настоящем документе, иллюстрации, показывающие заместители, связанные с циклической группой (например, ароматическим, гетероароматическим, конденсированным кольцом и насыщенным или ненасыщенным циклоалкилом или гетероциклоалкилом) через связь между атомами кольца, подразумевают, если не указано иное, что циклическая группа может быть замещена заместителем в любом положении кольца в циклической группе или на кольце конденсированной кольцевой группы, в соответствии с описанными в настоящем документе методиками или как известно специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например,

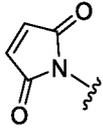
группа,  или , где подстрочный индекс **q** является целым числом от 0 до 4, и в которой положения заместителя **R¹** описаны для общего случая, *т.е.*, не связаны прямо с вершиной структуры линии соединения, *т.е.*, определенным атомом углерода, включает следующие неограничивающие примеры групп, в которых заместитель **R¹** связан с определенным кольцевым атомом углерода:

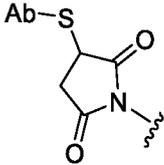


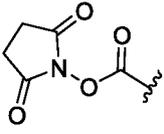


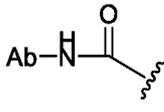
[0056] В настоящем документе фраза «реакционноспособный линкер», или аббревиатура RL, относится к одновалентной группе, которая включает реакционноспособную группу (RG) и спейсерную группу (SP), показанные, например, как $RG-SP-\text{---}$, где RG является реакционноспособной группой и SP является спейсерной группой. В соответствии с описанием в настоящем документе, реакционноспособный линкер может включать больше одной реакционноспособной группы или больше одной спейсерной группы. Спейсерная группа представляет собой двухвалентный или трехвалентный фрагмент, который образует мостик между реакционноспособной группой и другой группой, такой как полезная нагрузка (например, антивирусным соединением). Реакционноспособные линкеры (RL) совместно с полезными нагрузками, с которыми они соединены (например, антивирусными соединениями), создают промежуточные продукты («линкер-полезная нагрузка», LP) (например, линкер-антивирусные соединения), которые используются в качестве синтезированных предшественников для получения описанных в настоящем документе конъюгированных антител. В настоящем изобретении полезными нагрузками могут являться антивирусные соединения, и линкер-полезные нагрузки, включающие такие антивирусные соединения, могут быть описаны, как «линкер-антивирусные соединения». Реакционноспособный линкер содержит реакционноспособную группу, которая является функциональной группой или фрагментом, то есть способна взаимодействовать с реакционноспособными участками другой группы, например, антитела, модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента антитела. Фрагмент, образованный в

результате взаимодействия реакционноспособной группы с антителом, модифицированным антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, совместно с линкерной группой, включает описанную в настоящем документе часть конъюгата, называемую «линкер связывающего агента» (BL). В определенных вариантах осуществления изобретения «реакционноспособная группа» является функциональной группой или фрагментом (*например*, малеимидом или сложным эфиром N-гидроксисукцинимидом (NHS)) который взаимодействует с остатком лизина или цистеина в молекуле антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых примерах реакционноспособной группой является

функциональная группа, *например*, , которая взаимодействует с остатком цистеина на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте с образованием

углерод-серной связи с ним, *например*, , где **Ab** относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, и S относится к атому S на остатке цистеина, через который функциональная группа связана с **Ab**. В некоторых примерах реакционноспособной группой является функциональная группа,

например, , которая взаимодействует с остатком лизина на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте с образованием амидной связи с ним,

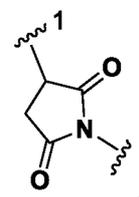
например, , где **Ab** относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, и NH относится к атомам на боковой цепи остатка лизина, через который функциональная группа связана с **Ab**.

[0057] В настоящем документе фраза «биоразлагаемый фрагмент» относится к фрагменту, который разлагается *in vivo* до нетоксичных, биосовместимых компонентов, которые могут быть выведены из организма посредством обычных

биологических процессов. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоразлагаемый фрагмент полностью или существенно разлагается *in vivo* в течение приблизительно 90 суток или менее, приблизительно 60 суток или менее или приблизительно 30 суток или менее, где степень разложения основана на выраженной в процентах потере массы биоразлагаемого фрагмента, и где полному разложению соответствует потеря массы, равная 100%. Примеры биоразлагаемых фрагментов включают, не ограничиваясь перечисленным, алифатические полиэфиры, такие как поли(ϵ -капролактон) (PCL), поли(3-гидроксибутират) (PHB), поли(гликолевая кислота) (PGA), поли(молочная кислота) (PLA) и их сополимеры с гликолевой кислотой (т.е. поли(D,L-лактид-когликолид) (PLGA) (Vert M, Schwach G., Engel R и Coudane J (1998) *J Control Release* 53(1-3):85-92; Jain R A (2000) *Biomaterials* 21(23):2475-2490; Uhrich K E, Cannizzaro S M, Langer R S и Shakesheff K M (1999) *Chemical Reviews* 99(11): 3181-3198; и Park T G (1995) *Biomaterials* 16(15):1123-1130, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки).

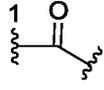
[0058] В настоящем документе фраза «линкер связующего агента» или «BL» относится к любой двухвалентной, трехвалентной или поливалентной группе или фрагменту, который связывает, сопрягает или соединяет связующий агент (*например*, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) с соединением-полезной нагрузкой, описанным в настоящем документе (*например*, VX-787 и его производными, и/или балоксавиром и его производными (такими как балоксавира марбоксил)) и, необязательно, с соединениями с одной или несколькими боковыми цепями. Как правило, подходящие линкеры связующих агентов, описанных в настоящем документе, достаточно стабильны для того чтобы служить в течение периода полувыведения конъюгатов антитела из циркулирующей крови и, в то же время, способны высвободить полезную нагрузку после опосредованной антигеном интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры расщепляются в результате внутриклеточного метаболизма после интернализации, *например*, расщепление происходит в процессе гидролиза, восстановления или ферментативной реакции. Нерасщепляемые линкеры

высвобождают соединенную с ними полезную нагрузку посредством осуществляемого лизосомами разложения антитела после интернализации. Подходящие линкеры включают, не ограничиваясь перечисленным, линкеры, не стойкие в кислой среде, линкеры, подверженные гидролизу, линкеры, расщепляемые ферментами, линкеры, расщепляемые при восстановлении, саморасщепляющиеся линкеры и нерасщепляющиеся линкеры. Подходящие линкеры включают также, не ограничиваясь перечисленным, линкеры, представляющие собой или содержащие пептиды, глюкурониды, сукцинимид-тиоэфиры, субъединицы полиэтиленгликоля (ПЭГ), гидразоны, субъединицы мал-капроил, субъединицы дипептидов, субъединицы валин-цитруллин и субъединицы пара-аминобензила (PAB). В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер связующего агента (BL) включает фрагмент, образующийся в результате взаимодействия между реакционноспособной группой (RG) реакционноспособного линкера (RL) и реакционноспособной областью связующего агента, *например*, антитела, модифицированного антитела или их антигенсвязывающего фрагмента.



[0059] В некоторых примерах BL включает следующий фрагмент:

где  представляет собой связь с цистеином в молекуле антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых примерах BL включает

следующий фрагмент: , где  представляет собой связь с лизином в молекуле антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0060] В некоторых вариантах осуществления изобретения связующим агентом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитело может быть в любой форме, известной специалисту в данной области техники.

[0061] В настоящем документе термин «антитело» означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий, по

меньшей мере, одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфично связывается или взаимодействует с определенным антигеном. Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), соединенные между собой дисульфидными связями (т.е. полные молекулы антитела), и также их мультимеры (*например*, IgM), или их антигенсвязывающие фрагменты. В каждой тяжелой цепи имеется переменная область тяжелой цепи (обозначенная в настоящем документе в сокращенном виде, как HCVR или V_H) и константная область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . В каждой легкой цепи имеется переменная область легкой цепи (обозначенная в настоящем документе в сокращенном виде, как LCVR или V_L) и константная область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть далее разделены на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными участками, называемыми каркасными областями (FR). Каждая область V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминного конца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В других вариантах осуществления изобретения области FR области антител, подходящих для описанных в настоящем документе соединений (или их антигенсвязывающих фрагментов), могут быть идентичными последовательностям зародышевых линий человека, либо могут быть природными или искусственно модифицированными. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основании параллельного анализа двух или более CDR. Термин «антитело» в настоящем документе включает также антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п. в настоящем документе включают любую природный, получаемый ферментативными методами, синтезированный или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфично связывается с антигеном с образованием комплекса. В

определенных вариантах осуществления изобретения термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы. В настоящем документе термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела или «фрагмент антитела» относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с антигеном, таким как HA вируса гриппа. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, *например*, из полноразмерных молекул антитела при использовании стандартных приемов, например, протеолитического расщепления или рекомбинантных методов генетической инженерии, включая манипуляции с и экспрессию ДНК, кодирующей переменный и необязательно константный домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко может быть приобретена, например, *например*, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, *например*, библиотеки антител фагов) или может быть синтезирована. ДНК может быть подвержена секвенированию и манипуляциям с использованием химических или молекулярно-биологических методов. Например, для создания подходящей конфигурации из одного или нескольких переменных и/или константных доменов, или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих участок гипервариабельности антитела (*например*, фрагмент, содержащий CDR или изолированная определяющая комплементарная область (CDR), такая как пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. В настоящем документе выражение «антигенсвязывающий фрагмент», используемое в настоящем документе, включает также другие молекулы, созданные инженерными методами, такие как домен-специфичные антитела, антитела, состоящие из одного домена, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитой областью CDR, диатела, триотела,

тетратела, минитела, нанотела (*например*, одновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), низкомолекулярные модульные иммунофармацевтические средства (SMIP), и акульи переменные домены IgNAR. Антигенсвязывающий фрагмент антитела в типичном случае содержит, по меньшей мере, один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и будет включать, как правило, по меньшей мере, один CDR, смежный с одной или несколькими каркасными последовательностями или в составе такой последовательности. В антигенсвязывающих фрагментах с доменом V_H , ассоциированным с доменом V_L , где домены V_H и V_L могут иметь любое удобное расположение относительно друг друга. Например, переменная область может быть димерной и может содержать димеры V_H-V_H , V_H-V_L или V_L-V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L . В определенных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать, по меньшей мере, один переменный домен, ковалентно связанный, по меньшей мере, с одним константным доменом. Неограничивающие, типичные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из приведенных выше типичных конфигураций, переменные и константные домены могут быть либо прямо соединены друг с другом, либо соединены посредством полной или частичной шарнирной области или линкерной области. Шарнирная область может состоять, по меньшей мере, из 2 (*например*, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приведет к гибкому или полугибкому соединению между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или

гетеродимер (или другой мультимер) с любой конфигурацией вышеописанных переменных и константных доменов в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (осуществляемой, например, дисульфидной связью/связями). Как и в случае полноразмерных молекул антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (*например*, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела в типичном случае состоит, по меньшей мере, из двух разных переменных доменов, где каждый переменный домен способен к специфичному связыванию с отдельным антигеном или с разными эпитопами одного и того же антигена. Любой формат мультиспецифичного антитела, включая иллюстративные форматы диспецифичных антител, предложенных в настоящем документе, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению при использовании стандартных приемов в данной области техники. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела по изобретению являются человеческими антителами.

[0062] Также возможны замещение одного или нескольких остатков CDR или пропуск одного или нескольких CDR. В научной литературе описаны антитела, в которых связывание возможно без участия одной или двух областей CDR. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали области контакта между антителами и соответствующими антигенами, основываясь на опубликованных кристаллических структурах, и заключили, что в действительности с антигеном контактируют от приблизительно одной пятой до одной трети остатков CDR. Padlan *et al.* обнаружили также большое количество антител, в которых одна или две области CDR не содержат аминокислот в контакте с антигеном (*см. также*, Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[0063] Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, могут быть идентифицированы на основании данных предыдущих исследований (*например*, в CDRH2 часто не требуются остатки H60-H65), они могут находиться в областях CDR по номенклатуре Кэбот, расположенных вне CDR по номенклатуре Чотиа,

могут быть идентифицированы методом молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или ее остаток(и) пропущен, эта область обычно замещена аминокислотой, занимающей соответствующее положение в последовательности другого человеческого антитела или в типичном элементе таких последовательностей. Положения для замещения в пределах CDR и аминокислот могут быть также выбраны эмпирически. Эмпирические замещения могут быть консервативными или неконсервативными.

[0064] Полностью человеческие моноклональные антитела к HA вируса гриппа, раскрытые в настоящем изобретении, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной области и/или области CDR переменных доменов легких и тяжелых цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевых линий, из которых антитела были получены. Можно легко установить наличие таких мутаций, сравнивая аминокислотные последовательности, предложенные в настоящем документе, с последовательностями зародышевых линий, которые доступны, например, в открытых базах данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые получают из любой аминокислотной последовательности, предложенной в настоящем документе, где одна или более аминокислот с одной или более каркасными областями и/или CDR мутируют с появлением соответствующего остатка (остатков) последовательности зародышевой линии, из которой антитело было получено, или соответствующего остатка (остатков) последовательности другой человеческой зародышевой линии, или консервативной аминокислотной замены другой последовательности соответствующего остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности в настоящем документе собирательно названы «мутациями зародышевой линии»). Специалист средней квалификации в данной области техники, начиная с предложенных в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелых и легких цепей, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В

определенных вариантах осуществления изобретения все остатки каркасной области и/или области CDR в доменах V_H и/или V_L подвергаются обратным мутациям с образованием остатков, присутствующих в первоначальных последовательностях зародышевых линий, из которых было получено антитело. В других вариантах осуществления изобретения лишь определенные остатки подвергаются обратным мутациям с образованием первоначальной последовательности зародышевой линии, *например*, только мутировавшие остатки, расположенные в первых 8 аминокислотах области FR1 или в последних 8 аминокислотах области FR4, или только мутировавшие остатки, расположенные в областях CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления изобретения один или более остатков, расположенных в каркасной области и/или области CDR, мутируют в соответствующий остаток(остатки) другой последовательности зародышевой линии (*т.е.*, последовательность зародышевой линии, отличающуюся от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было первоначально получено). Более того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в каркасной области и/или области CDR, *например*, где определенные отдельные остатки мутируют в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, отличающиеся от первоначальной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируют в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, содержащие одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на наличие одного или нескольких желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от ситуации), сниженной иммуногенности т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные по такому общему алгоритму, включены в настоящее изобретение.

[0065] Настоящее изобретение включает также полностью человеческие моноклональные антитела к HA вируса гриппа, содержащие варианты аминокислотных последовательностей любой из раскрытых в настоящей заявке областей HCVR, LCVR, и/или CDR, имеющие одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела к HA вируса гриппа, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR, и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее, и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой предложенной в настоящем документе аминокислотной последовательности HCVR, LCVR, и/или CDR.

[0066] Термин «человеческое антитело» в настоящем документе включает антитела с переменными и константными областями, полученными из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие моноклональные антитела (mAb) согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностью иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, появившиеся в результате случайного или сайт-специфичного мутагенеза *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*), например в областях CDR, в частности, в CDR3. Однако термин «человеческое антитело» в настоящем документе не подразумевает включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, например, мыши, привиты на каркасные последовательности (FR) человека. Термин включает антитела, полученные в результате рекомбинации в организме других млекопитающих, отличных от человека, или в клетках млекопитающих, отличных от человека. Термин не включает антитела, выделенные из или полученные в организме человека. Термин не включает природные антитела, которые в норме существуют без модификации или вмешательства/манипуляции человека в природном немодифицированном живом организме.

[0067] В настоящем документе термин «рекомбинантный» относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые были созданы,

экспрессированы, выделены или получены при использовании технологий и методов, называемых генно-инженерными технологиями, которые включают, например, сплайсинг ДНК и трансгенную экспрессию ДНК. Термин относится к антителам, экспрессируемым млекопитающим, отличным от человека (включая трансгенных млекопитающих, отличных от человека, например, трансгенных мышей), или клеточной системой экспрессии (например, клетками СНО), или выделенных из библиотеки рекомбинантных комбинаторных человеческих антител. В настоящем документе фраза «рекомбинантное человеческое антитело» включает все человеческие антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными методами, такие как антитела, экспрессированные при использовании рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку хозяина, антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных человеческих антител, выделенные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным для человеческих генов иммуноглобулина (см например, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные другими средствами, включая сплайсинг последовательностей человеческих генов иммуноглобулинов с образованием других последовательностей ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевых линий человека. Однако в определенных вариантах осуществления изобретения такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, в случае использования животного, трансгенного в отношении последовательностей человеческого Ig, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L в рекомбинантных антителах являются последовательностями, которые, несмотря на получение из последовательностей V_H и V_L зародышевых клеток человека и родство с ними, могут не встречаться в естественных условиях в репертуаре человеческих антител из зародышевых линий *in vivo*. Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые ассоциированы с неоднородностью шарнирной области. В одной форме молекула

иммуноглобулина содержит стабильную четырех-цепочечную конструкцию размером приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью в тяжелой цепи. Во второй форме димеры не соединены межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула размером приблизительно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных тяжелой и легкой цепи (полу-антитело). Эти формы было исключительно сложно разделить, даже после аффинной очистки. Частота появления второй формы в разнообразных интактных изоформах IgG, определяется, в частности, структурными различиями, ассоциированными с изоформами антител в шарнирной области. Замена одной аминокислоты в шарнирной области человеческого IgG4 может значительно снизить частоту появления второй формы (Angal *et al.* (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнирной области человеческого IgG1. Настоящее изобретение включает антитела с мутациями в шарнирной области, в области C_H2 или C_H3, что может быть желательным, например, в производстве, для того чтобы повысить выход желаемой формы антитела.

[0068] В настоящем документе термин «изолированное антитело» относится к антителу, которое, по существу, свободно от других антител (**Ab**), имеющих иную антигенную специфичность (например, изолированное антитело, которое специфично связывает НА вируса гриппа, или его фрагмент, по существу, свободно от **Ab**, которые специфично связывают антителы, отличные от НА вируса гриппа). Описанные в настоящем документе антитела могут быть изолированными антителами. В настоящем документе термин «изолированное антитело» относится к антителу, которое было идентифицировано и выделено и/или извлечено из, по меньшей мере, одного компонента его естественного окружения. Например, в целях настоящего изобретения «изолированным антителом» является антитело, которое было выделено или извлечено из, по меньшей мере, одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которых антитело встречается в природе или может быть получено. Термин «изолированное антитело» включает также антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Изолированные антитела – это антитела, подвергнутые, по меньшей мере,

одной стадии очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами осуществления изобретения изолированное антитело может быть, по существу, свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ. Антитела, используемые в настоящем изобретении, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной области и/или области CDR переменных доменов легких и тяжелых цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевых линий, из которых антитела были получены. Можно легко установить наличие таких мутаций, сравнивая аминокислотные последовательности, предложенные в настоящем документе, с последовательностями зародышевых линий, которые доступны, например, в открытых базах данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые получают из любой аминокислотной последовательности, предложенной в настоящем документе, где одна или более аминокислот с одной или более каркасными областями и/или CDR мутируют с появлением соответствующего остатка (остатков) последовательности зародышевой линии, из которой антитело было получено, или соответствующего остатка (остатков) последовательности другой человеческой зародышевой линии, или консервативной аминокислотной замены другой последовательности соответствующего остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности в настоящем документе собирательно названы «мутациями зародышевой линии»). Специалист средней квалификации в данной области техники, начиная с предложенных в настоящем документе последовательностей переменных областей тяжелых и легких цепей, сможет легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации.

[0069] В настоящем документе термины «блокирующее антитело», «нейтрализующее антитело» или «антагонистическое антитело» относятся к антителу, связывание которого с антигеном приводит к ингибированию, по меньшей мере одной биологической активности, ассоциированной с антигеном. Например, антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство по

настоящему изобретению могут предотвратить или блокировать присоединение или проникновение вируса гриппа в клетку хозяина. Дополнительно, «нейтрализующее антитело» - это антитело, способное нейтрализовать, т.е. предотвратить, ингибировать, уменьшить, осложнить или интерферировать со способностью патогена инициировать и/или сохранить инфекцию у хозяина. Такое антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство, когда оно обладает нейтрализующей способностью при связывании с НА вируса гриппа, может быть названо «антителом, которое нейтрализует активность НА вируса гриппа». Термины «нейтрализующее антитело» и «антитело, которое нейтрализует» или «антитела, которые нейтрализуют» являются взаимозаменяемыми в настоящей заявке. Эти антитела могут быть использованы по одному или в комбинации в качестве профилактических или терапевтических агентов с другими противовирусными средствами в составе надлежащей рецептуры или в ассоциации с активной вакцинацией, или в качестве диагностического средства. В настоящем документе термин «антитело к вирусу гриппа» может относиться к антителу, связывание которого с антигеном (например, НА) приводит к ингибированию по меньшей мере, одной биологической активности, ассоциированной с вирусом гриппа.

[0070] Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфичным антигенсвязывающим участком в вариабельной области молекулы антитела, называемой паратопом. У одного антигена может быть более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными областями антигена и могут вызывать разные биологические эффекты. Термин «эпитоп» относится также к участку на антигене, на который реагируют В- и/или Т-лимфоциты. Этот термин относится также к области антигена, которая связывается с антителом. Эпитопы для В-лимфоцитов могут образоваться из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, которые оказываются сближенными в результате укладки третичной структуры белка. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные при формировании третичной

структуры белка, обычно утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Типичный эпитоп включает, по меньшей мере, 3, и чаще, по меньшей мере, 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Эпитопы могут быть определены, как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, в целом, представляют собой подгруппу структурных эпитопов и имеют остатки, которые вносят непосредственный вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы могут быть также конформационными, т.е. состоящими из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах осуществления изобретения эпитопы могут включать детерминанты, представляющие собой расположенные на поверхности клетки химически активные группы молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и, в определенных вариантах осуществления изобретения, могут иметь специфичные трехмерные структурные характеристики и/или специфические зарядные характеристики.

[0071] Термин «поверхностный плазмонный резонанс» относится к оптическому феномену, который позволяет выполнить анализ биомолекулярных взаимодействий в реальном времени посредством детекции изменений концентраций белка в биосенсорной матрице, например используя систему BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция, и Пискатауэй, Нью-Джерси).

[0072] Интерферометрия на биослое представляет собой безмаркерную технологию для измерения биомолекулярных взаимодействий. Это оптическая аналитическая методика, которая анализирует интерференционную картину белого света, отраженного от двух поверхностей: слоя иммобилизованного белка на кончике биосенсора, и от внутреннего референтного слоя. Любое изменение количества молекул, связанных с кончиком биосенсора, вызывает смещение интерференционной картины, которое может быть измерено в реальном времени (Abdiche, Y.N., et al. Analytical Biochemistry, (2008), 377(2), 209-217). В определенных вариантах осуществления изобретения для оценки характеристик связывания определенных антител к НА вируса гриппа использовали «биосенсор,

основанный на интерферометрии биослоя в реальном времени» (метод Octet HTX)».

[0073] В настоящем документе термин «K_D» относится к равновесной константе диссоциации, характеризующей частный случай взаимодействия антитело-антиген.

[0074] В настоящем документе фраза «перекрестная конкуренция» относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с антигеном и ингибирует или блокирует связывание другого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Фраза включает также конкуренцию между двумя антителами в обоих ориентациях, т.е. первого антитела, которое связывается и блокирует связывание второго антитела и наоборот. В определенных вариантах осуществления изобретения первое антитело и второе антитело могут связываться с одним и тем же эпитопом. Альтернативно, первое и второе антитела могут связываться с разными, но частично совпадающими эпитопами, таким образом, что связывание одного антитела ингибирует или блокирует связывание второго антитела, например, из-за пространственных препятствий. Перекрестную конкуренцию между антителами можно измерить методами, известными специалисту, например, с помощью метода безмаркерной интерферометрии биослоя в реальном времени. Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена, как связывание второго антитела, которое меньше фонового сигнала из-за самосвязывания (где первое и второе антитела являются одним и тем же антителом). Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена, например, как выраженное в процентах связывание второго антитела, меньшее по величине по сравнению с исходным фоновым самосвязыванием (где первое и второе антитела являются одним и тем же антителом).

[0075] Термин «существенная идентичность» или «по существу, идентичный» по отношению к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает, что при оптимальном выравнивании с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) с надлежащими вставками или делециями нуклеотидов

идентичность нуклеотидной последовательности составляет, по меньшей мере, приблизительно 90%, и более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% нуклеотидных оснований, измеренная с помощью хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST, или GAP, как обсуждается в публикациях патентов WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность по отношению к референтной последовательности нуклеиновой кислоты, может в определенных случаях кодировать полипептид, имеющий такую же аминокислотную последовательность или существенное сходство с полипептидом, кодируемым молекулой референтной нуклеиновой кислоты.

[0076] Применительно к полипептидам фраза «существенное сходство» или «существенно сходный» означает, что две пептидные последовательности, когда они оптимально выровнены, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, использующих штраф за делецию по умолчанию, демонстрируют идентичность нуклеотидной последовательности, по меньшей мере, примерно 90%, более предпочтительно, по меньшей мере, примерно 95, 98 или 99%. В предпочтительном варианте положения остатков, которые не являются идентичными, различаются консервативными аминокислотными заменами. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой такую замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (группу **R**) со сходными химическими свойствами (такими как, заряд или гидрофобность). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменит функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотные последовательности отличаются друг от друга консервативными заменами, чтобы скорректировать консервативный характер замены, процентную идентичность последовательности или степень сходства можно скорректированы в сторону увеличения. Средства для осуществления этой регулировки хорошо известны специалисту в данной области. (См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.*

24: 307- 331). Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами для консервативной аминокислотной замены являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в работе Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-45. «Умеренно консервативная» замена - это любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0077] Для измерения сходства полипептидных последовательностей обычно используют программное обеспечение для анализа последовательности. Программное обеспечение для анализа белка сопоставляет сходные последовательности, используя показатели сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близко родственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов, или между белком дикого типа и соответствующим мутантным белком. См. например, GCG, версию 6.1. Для сравнения полипептидных последовательностей может применяться также программное обеспечение FASTA с применением рекомендуемых параметров или параметров по умолчанию, использующая GCG версии 6.1. (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и определение выраженной в процентах

идентичности последовательности в областях наибольшего частичного совпадения искомой последовательности и последовательности, используемой для поиска (Pearson (2000) *supra*). Для сравнения последовательностей можно использовать также алгоритм поиска гомологии Смита-Ватермана (Smith-Waterman) с аффинным поиском гэпа и штрафом за открытие гэпа, равным 12, и штрафом за продолжение гэпа, равным 2, и матрицей BLOSUM 62. Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по изобретению с базой данных, содержащей многочисленные последовательности из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в особенности BLASTP или TBLASTN, с использованием стандартных параметров. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

[0078] Фраза «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое вызывает желаемый эффект, для достижения которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и будет установлено специалистом при использовании известных приемов (см. например, Lloyd (1999) *The Art, Science и Technology of Pharmaceutical Compounding* (Искусство, наука и технология компаундирования лекарственных средств)).

[0079] В настоящем документе термин «субъект» относится к животному, предпочтительно, млекопитающему, более предпочтительно к человеку, нуждающемуся в улучшении состояния, профилактике и/или лечении заболевания или нарушения, такого как вирусная инфекция. Субъект может иметь инфекцию гриппа или быть предрасположенным к развитию вирусной инфекции гриппа. Субъекты «предрасположенные к развитию вирусной инфекции гриппа» или субъекты, «для которых может быть повышен риск заражения вирусной инфекцией гриппа» - это субъекты с ослабленной иммунной системой по причине аутоиммунного заболевания, лица, получающие иммуносупрессивную терапию (например, после трансплантации органа), лица-носители вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) или с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД), с определенными формами анемии, при которых

происходит истощение или разрушение белых кровяных клеток, лица, которым проводится лучевая терапия или химиотерапия, или лица с воспалительным нарушением. Дополнительно повышенному риску подвержены субъекты экстремально молодого или преклонного возраста. Любое лицо, которое входит в физический контакт или физически находится вблизи инфицированного индивидуума, подвержено повышенному риску развития вирусной инфекции гриппа. Кроме того, для субъекта существует риск заражения инфекцией гриппа при нахождении вблизи вспышки заболевания, например, для субъекта, проживающего в плотно населенном городе или в непосредственной близости от субъектов с подтвержденной или предполагаемой вирусной инфекцией гриппа, или риск заражения, обусловленный трудовой занятостью, например, для сотрудников больницы, исследователей в области фармацевтических средств, лиц, посещающих районы с высоким уровнем заражения, или часто летающих пассажиров.

[0080] В настоящем документе термины «лечить», «проведение лечения» или «лечение» относятся к уменьшению или облегчению тяжести, по меньшей мере, одного симптома или указания на инфекцию гриппа благодаря введению терапевтического средства, такого как предложенного антитела, нуждающемуся в таком воздействии субъекту. Эти термины включают подавление прогрессирования заболевания или ухудшения инфекции. Эти термины включают также благоприятный прогноз заболевания, т.е. после введения терапевтического средства, такого как предложенное антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство, может быть свободен от инфекции, либо у него могут быть снижены или не обнаруживаться титры вируса. Терапевтической средство может вводиться субъекту в терапевтической дозе.

[0081] Термины «предотвращать», «предотвращение» или «профилактика» относятся к подавлению проявлений инфекции гриппа или любых симптомов или указаний на инфекцию гриппа после введения предложенного антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство. Термин включает профилактику

распространения инфекции субъектам, которые контактировали с вирусом или подвержены риску заражения инфекцией гриппа.

[0082] В настоящем изобретении «защитное действие» может быть продемонстрировано с помощью любой стандартной процедуры, известной из уровня техники, чтобы определить, может ли агент, такой как противовирусное средство, или антитело, такое как антитело к НА вируса гриппа, или конъюгат антитело-лекарственное средство, предложенный в настоящей заявке, продемонстрировать один или более из следующих эффектов: например, повышение выживаемости после контакта с возбудителем инфекции, уменьшение вирусной нагрузки или улучшение, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с возбудителем инфекции.

[0083] В настоящем документе фразы «противовирусное лекарственное средство», «противовирусный», «противовирусное соединение» и «анти-вирусное соединение» применяются к антиинфекционному лекарственному средству или терапии, используемым для лечения, профилактики или облегчения течения вирусной инфекции (например, инфекции гриппа). Термин «противовирусное лекарственное средство» (или его синонимы «противовирусное лекарственное средство», «анти-вирусное соединение» и «противовирусное соединение») включает, не ограничиваясь перечисленным, препараты, ТАМИФЛЮ® (Осельтамивир), РЕЛЕНЗА® (Занамивир), рибавирин и интерферон-альфа2b. Противовирусные лекарственные средства включают ингибиторов вируса гриппа. В настоящем документе термин «ингибитор вируса гриппа» относится к лекарственному средству, используемому для подавления инфекции, вызванной вирусом гриппа, и включает осельтамивир, но не ограничивается этим препаратом. В настоящем документе термин «ингибитор полимеразы» может относиться к ингибитору полимеразы нуклеиновой кислоты, такой как полимеразы вируса гриппа. Примером ингибитора полимеразы является VX-787. Без ограничения каким-либо определенным принципом действия, противовирусные соединения включают, функция ингибиторов вируса гриппа может заключаться в направленном воздействии на вирус гриппа как таковой или направленного действия на клетку

хозяина, которую атакует вирус гриппа. Например, ингибитор вируса гриппа, действие которого направлены на клетку хозяина, может ингибировать трансляцию в клетке, тем самым снижая уровень вирусной репликации.

[0084] Фраза «специфично связывается» или «связывается специфично с» и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Специфичное связывание может характеризоваться равновесной константой диссоциации, равной, по меньшей мере, приблизительно 1×10^{-8} М или менее (например, уменьшение K_D указывает на более прочное связывание). Методы определения, являются ли две молекулы специфично связанными, хорошо известны из уровня техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс, и т.п. Как описано в настоящей заявке, для идентификации антител, которые специфично связываются с НА вируса гриппа, использовали метод безмаркерной интерферометрии биослоя в реальном времени на биосенсоре Octet® НТХ. Кроме того, мультиспецифичные антитела, которые связываются с одним доменом НА вируса гриппа и одним или более дополнительными антигенами, или биспецифичное антитело, которое связывается с двумя разными областями НА вируса гриппа, тем не менее, признаются антителами, которые в контексте настоящей заявки «связывают специфично». В дополнение к нейтрализующим антителам, антитела, которые специфично связываются с НА, но не являются нейтрализующими, тоже могут быть использованы в объеме настоящего изобретения для создания конъюгатов антитело-лекарственное средство. Такие антитела могут выполнять свою функцию, заключающуюся, например, в доставке полезной нагрузки в инфицированные вирусом гриппа клетки.

[0085] Термин «высокоаффинное» антитело относится к моноклональным антителам, для которых аффинность связывания с НА вируса гриппа, выраженная через K_D , составляет, по меньшей мере, 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, еще более предпочтительно 10^{-11} М, еще более предпочтительно 10^{-12} М, при измерении методом безмаркерной

интерферометрии биослоя в реальном времени, например, с помощью биосенсора Octet® НТХ, или методом поверхностного плазмонного резонанса, например, на приборе, BIACORE™, или при определении аффинности в растворе методом твердофазного ИФА.

[0086] Фраза или термин «скорость диссоциации», “K_{off},” или “k_d” относится к антителу, которое диссоциирует из комплекса с НА вируса гриппа при константе скорости $1 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$ или менее, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$ или менее, определенной методом безмаркерной интерферометрии биослоя в реальном времени, например, с помощью биосенсора Octet® НТХ, или методом поверхностного плазмонного резонанса, например, на приборе BIACORE™.

[0087] Фраза «антигенсвязывающий домен», или «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, и т.п. в настоящем документе включает любой природный, полученный ферментативными методами, синтезированный или генноинженерный полипептид или гликопротеид, который специфично связывает антиген с образованием комплекса.

[0088] В определенных вариантах осуществления изобретения антитело или фрагменты антитела по настоящему изобретению, могут быть конъюгированы с компонентом, таким как лиганд или терапевтический компонент («конъюгат антитело-лекарственное средство» или «иммуноконъюгат»), таким как противовирусное лекарственное средства, линкер-полезная нагрузка, включая противовирусное лекарственное средство, второе антитело к вирусу гриппа, или любой другой терапевтический компонент, полезный для лечения инфекции, вызванной НА вируса гриппа.

[0089] В настоящем документе «последовательное введение» означает, что каждую дозу соединения вводят субъекту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные predetermined интервалом (*например*, выраженным в часах, днях, неделях или месяцах).

[0090] Фразы «начальная доза», «дозы второй очереди» и «дозы третьей очереди» относятся к временной последовательности введения соединений,

описанных в настоящем документе. Так, «начальная доза» — это доза, которую вводят в начале схемы лечения (называемая также «исходной дозой»); «дозы второй очереди» вводят после начальной дозы, и «дозы третьей очереди» вводят после доз второй очереди. Начальная доза, доз второй очереди и дозы третьей очереди могут содержать одинаковое количество описанного в настоящем документе соединения, но, как правило, частота введения может различаться.

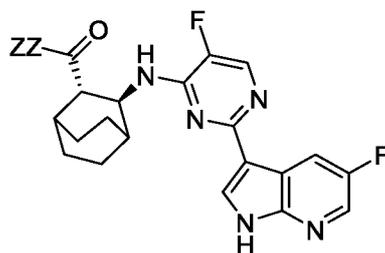
[0091] В настоящем документе фраза «непосредственно предшествовавшая доза» означает в последовательности многократного введения доз дозу соединения, которая была введена пациенту перед введением следующей дозы при отсутствии промежуточных доз.

[0092] В настоящем документе термин «полезная нагрузка» относится к низкомолекулярному активному ингредиенту (например, противовирусному соединению), необязательно конъюгированному с антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, непосредственно или через линкер, который обеспечивает желаемый биологический эффект (например, подавление инфекции, вызванной вирусом гриппа, или репликации вируса гриппа). Полезная нагрузка может иметь молекулярную массу менее или равно 2000 Да, менее или равно 1500 Да или менее или равно 900 Да.

Соединения или полезные нагрузки

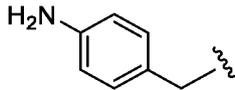
[0093] В настоящем изобретении предложены противовирусные соединения или полезные нагрузки. Без ограничения каким-либо определенным принципом действия, противовирусные соединения включают (1) VX-787 и его производные; и (2) балоксавир и его производные (например, балоксавира марбоксил). В определенных вариантах осуществления изобретения противовирусные соединения могут быть доставлены в клетки как часть конъюгата. В определенных вариантах осуществления изобретения противовирусные соединения способны осуществлять какую-либо активность VX-787, балоксавира и/или балоксавира марбоксил и каждого производного этих соединений на или внутри мишени, например, клетки-мишени. Определенные противовирусные соединения могут иметь одну или более дополнительных активностей.

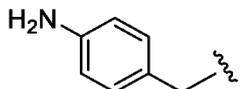
[0094] В определенных вариантах осуществления предложенного в настоящей заявке соединение имеет структуру по Формуле I:

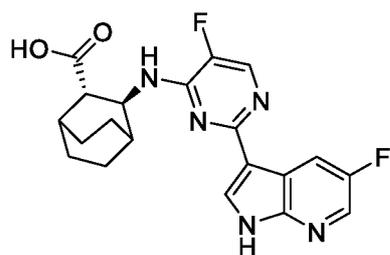


Формула I

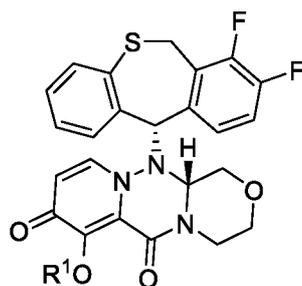
или является его фармацевтически приемлемой солью. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления изобретения, **ZZ** представляет собой $-OR^1$ или $-NHOH$. В одном варианте осуществления изобретения **ZZ** представляет собой $-NHOH$. В одном варианте осуществления изобретения **ZZ** представляет собой $-OR^1$. В Формуле I когда **ZZ** представляет собой $-OR^1$,

полезные группы **R¹** включают водород и . В одном варианте осуществления изобретения **R¹** - водород. В одном варианте осуществления

изобретения **R¹** представляет собой . В одном варианте осуществления изобретения соединением является VX-787 или



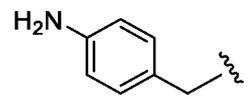
[0095] В определенных вариантах осуществления изобретения по настоящей заявке соединение имеет структуру, описываемую Формулой II:



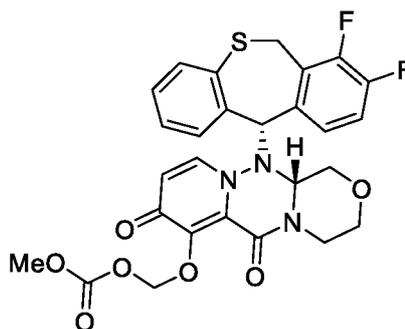
Формула II

или является его фармацевтически приемлемой солью. В одном варианте осуществления изобретения R^1 представляет собой водород. В одном варианте осуществления изобретения R^1 представляет собой $-CH_2OC(O)OCH_3$. В одном

варианте осуществления изобретения R^1 представляет собой

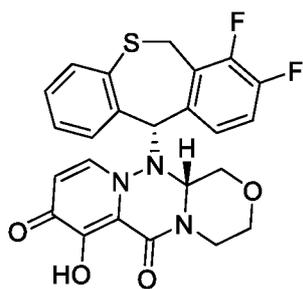


В одном варианте осуществления изобретения соединением является



балоксавира марбоксил или

осуществления изобретения соединением является балоксавир или



Связующие агенты

[0096] Подходящие связующие агенты для любого конъюгата, предложенного в настоящей заявке, включают, не ограничиваясь перечисленным, антитела, рецепторы вирусов и любые другие связывающиеся с клеткой или связывающиеся с пептидом молекулы или вещества. Примером является

полноразмерная аминокислотная последовательность НА вируса гриппа, которой в базе данных GenBank присвоен учетный номер ACP44150,1.

[0097] Подходящие связующие агенты включают антитела (например, полностью гуманизированные антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфично связываются с белками вируса гриппа, такие как поверхностные белки гемагглютинин (НА), нейраминидаза (НА), и матриксный белок Matrix-2 (M2). В некоторых вариантах осуществления изобретения эти связующие агенты модулируют вируса гриппа с клетками хозяина. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются со зрелым гемагглютинином. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с белком-предшественником гемагглютинина НА0. Антитела к НА вируса гриппа могут с высокой степенью аффинности связываться с НА вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела по настоящему изобретению являются блокирующими антителами, отличающимися тем, что антитела могут связываться с НА вируса гриппа и блокировать прикрепление вируса к клетке-хозяина и/или проникновение его в клетку хозяина. В некоторых вариантах осуществления изобретения блокирующие антитела по настоящему изобретению могут блокировать связывание вируса гриппа с клетками и таким образом подавлять или нейтрализовать вирусную инфективность клеток хозяина. В некоторых вариантах осуществления изобретения блокирующие антитела могут быть использованы для лечения субъекта с вирусной инфекцией гриппа. Антитела, введенные нуждающемуся в них субъекту, могут уменьшать вирусную инфекцию, такую как грипп, у субъекта. Они могут быть использованы для снижения вирусной нагрузки у субъекта. Они могут быть использованы отдельно или в качестве вспомогательной терапии вместе с другими терапевтическими компонентами или методами, известными из уровня техники для лечения вирусной инфекции. В определенных вариантах осуществления изобретения эти антитела могут связываться с эпитопом на стволовой части вирусного НА, на головке вирусного НА, или с обоими эпитопами. Более того, идентифицированные антитела могут

быть использованы в профилактических целях (до инфекции), чтобы защитить млекопитающего от инфекции, либо могут быть использованы в терапевтических целях (после развития инфекции), чтобы облегчить течение уже развившейся инфекции или облегчить, по меньшей мере, один симптом, ассоциированный с инфекцией.

[0098] В определенных вариантах осуществления изобретения источником получения антител являются мыши, иммунизированные первичным иммуногеном, таким как полноразмерный НА вируса гриппа, или рекомбинантной формой НА вируса гриппа, или его фрагментами, с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном, или обладающим иммуногенной активностью фрагментом НА вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления изобретения источником получения антител являются мыши, иммунизированные вакцинной композицией против гриппа с последующей бустерной иммунизацией одним или несколькими пептидами НА, полученными генноинженерными методами. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела источником получения антител являются люди. В определенных вариантах осуществления изобретения источником получения антител являются млекопитающие (например, млекопитающие, отличные от человека). В определенных вариантах осуществления изобретения источником получения антител являются нечеловекообразные приматы.

[0099] Иммуноген может представлять собой биологически активный и/или иммуногенный фрагмент НА вируса гриппа или ДНК, кодирующую его активный фрагмент. Фрагмент может быть получен из стволовой части белка НА (*См. Sui et al. Nature Struct, и Mol. Biol. Опубликовано в интернете 22 февраля 2009 года. Стр. 1-9*), из головки белка НА, или из их комбинации.

[00100] Пептиды могут быть модифицированы с целью добавления или замены определенных остатков с целью внесения метки или с целью конъюгации с молекулами носителя, такими как гемоцианин фисуреллы (ГЦФ). Например, в целях иммунизации может быть добавлен цистеин в N-терминальной или C-

терминальной области пептида или линкерная последовательность для получения пептида для конъюгации, например, с ГЦФ.

[00101] Определенные антитела к вирусу гриппа, антитела к НА вируса гриппа или ADC по настоящему изобретению обладают антивирусной активностью, такой как способность связывания и нейтрализации активности НА вируса гриппа, как было определено в анализах *in vitro* или *in vivo*. Определенные антитела к вирусу гриппа, антитела к НА вируса гриппа или ADC по настоящему изобретению способны связываться с НА, но не обладают нейтрализующей активностью, как было определено в *in vitro* или *in vivo* анализах. Способность антител или ADC по настоящему изобретению связываться и нейтрализовать активность НА вируса гриппа и, таким образом, способность вируса к прикреплению и/или проникновению в клетку хозяина с последующим развитием вирусной инфекции может быть измерена при использовании любого стандартного метода, известного специалисту, включая количественное измерение связывания или количественное измерение активности, описанные в настоящем документе.

[00102] Антитела или ADC, специфичные в отношении НА вируса гриппа, могут не содержать дополнительных меток или групп, или могут содержать метку или группу в N-концевой или C-концевой области. В одном варианте осуществления изобретения меткой или группой является биотин. При количественном определении связывания расположение метки (при наличии) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой пептид связан. Например, если поверхность покрыта авидином, то пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентирован таким образом, что C-концевая область пептида будет дистальной по отношению к поверхности. В одном варианте осуществления изобретения меткой может быть радионуклид, флуоресцентный краситель, или детектируемая при МРТ метка. В определенных вариантах осуществления изобретения такие меченые антитела могут быть использованы для диагностических анализов, включая анализы, основанные на методах визуализации. В одном варианте осуществления изобретения

дополнительной группой является пептидная метка. В одном варианте осуществления изобретения ADC включает тяжелую цепь антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения ADC включает тяжелую цепь антитела и дополнительно включает пептидную метку (например, пентапептид) в С-терминальной области тяжелой цепи антитела, причем пептидная метка представляет собой пентапептидную последовательность LLQGA (SEQ ID NO: 297) (например, для применения при конъюгировании линкера-полезной нагрузки, опосредованного трансглутаминазой). В одном варианте осуществления изобретения ADC включает две тяжелые цепи антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области каждой из тяжелых цепей антитела. В одном варианте осуществления изобретения ADC включает две тяжелые цепи антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области каждой из тяжелых цепей антитела, причем пептидная метка представляет собой пентапептидную последовательность LLQGA (SEQ ID NO: 297).

[00103] В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит легкую цепь. В определенных вариантах осуществления изобретения легкая цепь представляет собой легкую цепь каппа. В определенных вариантах осуществления изобретения легкая цепь представляет собой легкую цепь лямбда. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь представляет собой IgA. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь представляет собой IgD. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь представляет собой IgE. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь представляет собой IgG. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь представляет собой IgM. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь представляет собой IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь представляет собой IgG2. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь представляет собой IgG3. В некоторых вариантах осуществления

изобретения тяжелая цепь представляет собой IgG4. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь представляет собой IgA1. В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь представляет собой IgA2.

[00104] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fv. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент антитела представляет собой фрагмент F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab'. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv (sFv). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv-Fc.

[00105] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело является моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело является поликлональным антителом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело является биспецифичным антителом, включающим первый антигенсвязывающий домен, и второй антигенсвязывающий домен.

[00106] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело является химерным антителом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело является гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело является человеческим антителом.

[00107] В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит остаток глутамина в одном или более положениях тяжелой цепи под номером 295 по нумерации ЕС. В настоящей заявке это положение обозначено, как глутамин 295, или Gln295, или Q295. Специалист отметит, что этот остаток является консервативным остатком глутамина в последовательности дикого типа многих антител. Идентификация остатка Q295 может быть легко выполнена с помощью стандартных способов выравнивания последовательностей, включая

описанные в настоящей заявке. В других полезных вариантах осуществления изобретения может быть сконструировано антитело, содержащее остаток глутамина. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит одну или более мутаций N297Q. Приемы модификации последовательности антитела для включения в нее остатка глутамина известны специалистам (см., например, Ausubel *et al.* *Current Protoc. Mol. Biol.*). В одном варианте осуществления изобретения антитело включает тяжелую цепь и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения антитело включает тяжелую цепь и дополнительно включает пептидную метку, например, последовательность распознавания трансглутаминазой или пентапептидную метку, в С-терминальной области тяжелой цепи антитела, причем пептидная метка представляет собой пентапептидную последовательность LLQGA (SEQ ID NO: 297).

Получение человеческих антител

[00108] Способы получения человеческих антител в организме трансгенных мышей известны из уровня техники. В контексте настоящего изобретения могут быть использованы любые такие известные методы для того чтобы создать человеческие антитела, которые специфично связываются с НА вируса гриппа. Для создания антител к НА вируса гриппа может быть использован иммуноген с любым из следующих составляющих. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела по настоящему изобретению получают в организме мышей, иммунизированных полноразмерным, нативным НА вируса гриппа (см., например, последовательность с учетным номером FJ966082.1 в базе данных GenBank), или живым аттенуированным или инактивированным вирусом, или ДНК, кодирующей белок или его фрагмент. Альтернативно, белок НА вируса гриппа или его фрагмент могут быть получены при использовании стандартных биохимических методик, модифицированы и использованы в качестве иммуногена. В одном варианте осуществления изобретения иммуногеном является белок НА вируса гриппа, полученный методом рекомбинантных ДНК

или его фрагмент. В определенных вариантах осуществления изобретения по настоящей заявке иммуногеном может являться противогриппозная вакцина. В определенных вариантах осуществления изобретения может быть введена одна или более бустерная инъекция. В определенных вариантах осуществления изобретения бустерные инъекции могут содержать один или более штаммов вируса гриппа или гемагглютининов, полученных из этих штаммов, например, см. Protein Sciences H1 A/Новая Каледония/20/1999, H5 A/Индонезия/05/2005, H3 A/Виктория/361/2011, H7 A/Нидерланды/219/2003, или H9 A/Гонконг /1073/1988, или штаммы вируса гриппа В В/Виктория/2/87, В/Няньчан/3451/93, В/Сингапур/11/1994, В/Флорида/4/2006, или В/Ямагата/16/88. В определенных вариантах осуществления изобретения бустерные инъекции могут содержать смесь штаммов вируса гриппа в соотношении 1:1 или смесь гемагглютининов, полученных из этих штаммов в соотношении 1:1. В определенных вариантах осуществления изобретения иммуногеном может являться рекомбинантный пептид НА вируса гриппа, экспрессированный в *E. coli* или любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO), или собственно вирус гриппа.

[00109] При использовании технологии VELOCIMMUNE® (см., например, заявку US 6,596,541 компании Регенерон Фармастьютикалз (Regeneron Pharmaceuticals), VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител вначале изолируют высокоаффинные химерные антитела к НА вируса гриппа, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, геном которой содержит переменные области человеческих тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинной константной области, таким образом, что в ответ на антигенную стимуляцию у мыши образуются антитела, содержащие человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующие переменные области на тяжелой и легкой цепях антитела, изолируют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные

области тяжелой и легкой цепей. После этого ДНК экспрессируется в клетке, способность экспрессировать полностью человеческое антитело.

[00110] В общих чертах, мышь, полученную по технологии VELOCIMMUNE®, подвергают провоцирующей стимуляции интересующим антигеном, и у мыши получают лимфатические клетки (такие как В-лимфоциты), экспрессирующие антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с линией миеломных клеток для получения бессмертных гибридных клеточных линий, и такие гибридные клеточные линии подвергают скринингу и отбору, чтобы идентифицировать гибридные клеточные линии, которые образуют антитела, специфичные по отношению к представляющему интерес антигену. ДНК, кодирующие переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, могут быть изолированы и соединены с желаемыми изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок, являющийся антителом, может быть получен в клетке, например, в клетке СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующая антиген-специфичные химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антиген-специфичных лимфоцитов.

[00111] Вначале выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как описано в публикациях патентов WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки, определяют характеристики антител и проводится отбор антител, имеющих желаемые характеристики, включающие аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Мышиные константные области заменяют на желаемую человеческую константную область, создавая полностью человеческое антитело по настоящему изобретению, например, иммуноглобулины IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированные. Выбранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного применения, тогда как характеристики высокоаффинного связывания с антителом и специфичности в отношении мишеней находятся в переменной области.

Биоэквиваленты

[00112] Антитела к НА вируса гриппа и фрагменты таких антител в настоящем документе включают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от аминокислотных последовательностей описанных антител, но сохраняют способность связывать НА вируса гриппа. Такие варианты антитела и фрагменты антител содержат одну или более дополнительных аминокислот, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но демонстрируют биологическую активность, по существу, эквивалентную активности описанных антител. Аналогично, последовательности ДНК, кодирующие антитело по настоящему изобретению, включают последовательности, которые содержат один или более дополнительных нуклеотидов, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с предложенной последовательностью, но кодируют антитело или фрагмент антитела, которое, по существу, биоэквивалентно антителу или фрагменту антителу по настоящему изобретению. Другие биоэквиваленты антител и фрагментов антител к НА вируса гриппа описаны в публикациях патентов WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки.

Биологические характеристики антител

[00113] В целом, антитела по данному изобретению функционируют, связываясь с НА вируса гриппа. Например, предложены антитела и антигесвязывающие фрагменты антител, которые связывают НА вируса гриппа (например, при 25°C или при 37°C), при K_D менее 10 нМ, согласно измерениям с использованием биосенсора, основанного на интерферометрии биослоя в реальном времени (анализ Octet HTX), или методом поверхностного плазмонного резонанса. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител связывают НА вируса гриппа с K_D менее приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 2 нМ, менее чем приблизительно 1 нМ, менее чем приблизительно 500 пМ, менее 250 пМ, или менее 100 пМ, согласно измерениям методом поверхностного плазмонного

резонанса, например, при использовании формата анализа, описанного в публикациях патентов WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки, или, по существу, аналогичного анализа.

[00114] Не имеющие граничительного характера примеры анализов *in vitro*, применяемых для измерения связывающей активности, проиллюстрированы в Примере 3 в публикациях патентов WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки. В Примере 3 в публикациях патентов WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1 аффинность связывания и константы диссоциации антител к HA вируса гриппа для HA вируса гриппа определяли с помощью биосенсора, основанного на интерферометрии биослоя в реальном времени (анализ Octet HTX). В Примерах 4 и 5, приведенных в WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, для того, чтобы определить инфективность разнообразных штаммов вируса гриппа группа 1, использовали анализы на нейтрализацию. В Примере 6 в WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, показано, что комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ) инфицированных вирусом клеток *in vitro* опосредована определенными антителами. Примеры 7 и 10 в WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1 демонстрируют, что определенные антитела по изобретению при профилактическом и терапевтическом применении способны нейтрализовать инфекцию гриппа A *in vivo*.

[00115] Также предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают HA вируса гриппа при диссоциационном периоде полувыведения ($t_{1/2}$), превышающем приблизительно 100 минут при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, при использовании формата анализа, определенного в публикациях патентов WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки, или по существу, аналогичного анализа. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител по настоящему

изобретению связывают НА вируса гриппа при $t^{1/2}$, превышающем приблизительно 200 минут, превышающем приблизительно 300 минут, превышающем приблизительно 400 минут, превышающем приблизительно 500 минут, превышающем приблизительно 600 минут, превышающем приблизительно 700 минут, превышающем приблизительно 800 минут, превышающем приблизительно 900 минут, или превышающем приблизительно 1000 минут при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, при использовании формата анализа, определенного в WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки (например, формате иммобилизованного антитела (imAb-capture) или формате антигенной ловушки), или по существу, аналогичного анализа. В одном варианте осуществления изобретения антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящей заявке связываются с НА вируса гриппа при диссоциационном периоде полувыведения ($t^{1/2}$) более 300 минут. В одном варианте осуществления изобретения антитело по настоящей заявке обеспечивает приблизительно 1,5-2-кратное увеличение диссоциационного периода полувыведения по сравнению с антителом сравнения, обозначенным Контрольное I mAb, при тестировании на обезьянах и мышах.

[00116] Также предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые нейтрализуют инфективность вируса гриппа для клеток хозяина. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела проявляют нейтрализующую активность против разнообразных типичных вирусов гриппа группы 1 (H1N1 A/Пуэрто-Рико/08/1934; H5N1 A/Вьетнам/1203/2004; H1N1 A Калифорния/07/2009; H1N1 A/Висконсин/1933; H1N1 A/Брисбен/59/1997, H9N2 A Гонконг /33982/2009, H13N6 A/птичий грипп/Мэриленд/704/1977 и H16N3 A/птичий грипп/Делавэр/172/2006) при IC₅₀ в диапазоне от приблизительно 1.6 нМ до приблизительно 130 нМ при измерении методом микронейтрализации, как показано, например, в Примерах 4 и 5 в WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки, или при использовании, по существу, аналогичного анализа. В одном варианте осуществления изобретения антитела или

антигенсвязывающие фрагменты антител, которые нейтрализуют инфективность вируса гриппа в отношении его клеток хозяев, достигают этого при IC₅₀ менее 130 нМ.

[00117] Также в настоящей заявке предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которыми опосредована комплемент-зависимая цитокисичность инфицированных клеток, характеризующаяся EC₅₀ в диапазоне от приблизительно 20 нМ до приблизительно 66 нМ (см. Пример 6 в WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки). В одном варианте осуществления изобретения антителами или антигенсвязывающими фрагментами антител опосредована комплемент-зависимая цитокисичность инфицированных клеток, характеризующаяся EC₅₀ менее 66 нМ.

[00118] В настоящей заявке описаны антитела к НА вируса гриппа А, которые демонстрируют усиление защиты или нейтрализации инфекции гриппа А *in vivo*, по сравнению с контрольным антителом. Определенные антитела демонстрируют нейтрализацию при профилактическом (до инфекции) или терапевтическом (после инфекции) введении; см. Пример 7 в WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки.

[00119] В одном варианте осуществления изобретения, предложенном в настоящей заявке, изолированное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывается с НА вируса гриппа, при этом антитело или его фрагмент проявляет одну или более из следующих характеристик: (а) является полностью человеческим моноклональным антителом; (b) связывается с НА вируса гриппа, демонстрируя константу диссоциации (K_D) менее 10⁻⁹ М, при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса; (с) демонстрирует диссоциационный период полувыведения (t^{1/2}) в диапазоне от приблизительно 370 минут до более чем 1000 минут; (d) демонстрирует нейтрализацию вирусов гриппа А группы 1, которые выбирают из H1N1, H5N1, H9N2, H13N6, и H16N3, при IC₅₀ в диапазоне

от приблизительно 1,6 нМ до приблизительно 130 нМ; (е) демонстрирует опосредованный комплементом лизис клеток, инфицированных вирусом гриппа, при EC₅₀ от приблизительно 20 нМ до приблизительно 66 нМ; или (f) в животной модели инфекции вируса гриппа демонстрирует защиту, характеризовавшуюся повышенной выживаемостью, в случае введения до или после экспериментального заражения вирусом.

[00120] Антитела по настоящей заявке могут обладать двумя или более вышеупомянутыми биологическими характеристиками или их комбинацией. Другие биологические характеристики антител по настоящей заявке будут очевидны специалисту средней квалификации после рассмотрения настоящей заявки, включая представленные в ней иллюстративные примеры.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей

[00121] В некоторых вариантах осуществления изобретения антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, конъюгированным с линкер-полезной нагрузкой, может быть антитело, для которого мишенью является HA вируса гриппа. Примеры антител к HA вируса гриппа можно найти, например, в WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к HA вируса гриппа содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 20; HCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 22; HCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 24; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 28; LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 30; и LCDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления изобретения ан HA вируса гриппа содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую последовательность SEQ ID NO: 18 и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую последовательность SEQ ID NO: 26. В

любом из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения антитело к НА вируса гриппа может быть получено посредством сайт-направленного мутагенеза, который проводится, чтобы вставить в определенный участок остаток глутамина, не нарушая функцию антитела или его способность к связыванию. Например, в любом из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, антитело к НА вируса гриппа может содержать мутацию Asn297Gln (N297Q). Такие антитела с мутацией N297Q могут содержать также один или более природных остатков глутамина в своих вариабельных областях, которые могут быть доступными для трансглутаминазы и, следовательно, способными к конъюгации с полезной нагрузкой или линкер-полезной нагрузкой. В одном варианте осуществления изобретения антитело включает HCVR и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области HCVR. В одном варианте осуществления изобретения антитело включает HCVR и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области HCVR, причем пептидная метка представляет собой пентапептидную последовательность LLQGA (SEQ ID NO: 297). В одном варианте осуществления изобретения антитело включает две области HCVR и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области каждой области HCVR. В одном варианте осуществления изобретения антитело включает две HCVR и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области областей HCVR, причем пептидная метка представляет собой пентапептидную последовательность LLQGA (SEQ ID NO: 297).

[00122] В Таблице 1 показаны идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи и CDR отдельных антител к НА вируса гриппа. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты показаны в Таблице 2.

Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Идентификаторы последовательностей:								
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb11723	2	4	6	8	10	12	14	16
mAb11729	18	20	22	24	26	28	30	32
mAb11820	34	36	38	40	42	44	46	48

Идентификаторы последовательностей:								
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb11829	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb11829*	50	52	54	56	66	68	70	72
mAb11829	50	52	54	56	58	60	62	64
mAb11830	74	76	78	80	82	84	86	88
mAb11830*	74	76	78	80	66	68	70	72
mAb11903	90	92	94	96	98	100	102	104
mAb14571	106	108	110	112	114	116	118	120
mAb14571	106	108	110	112	114	116	118	120
mAb11704	122	124	126	128	130	132	134	136
mAb11711	138	140	142	144	146	148	150	152
mAb11714	154	156	158	160	162	164	166	168
mAb11717	170	172	174	176	178	180	182	184
mAb11724	186	188	190	192	194	196	198	200
mAb11727	202	204	206	208	210	212	214	216
mAb11730*	218	220	222	224	226	228	230	232
mAb11731*	234	236	238	240	66	68	70	72
mAb11734*	242	244	246	248	66	68	70	72
mAb11736*	250	252	254	256	66	68	70	72
mAb11742*	258	260	262	264	66	68	70	72
mAb11744*	266	268	270	272	66	68	70	72
mAb11745*	274	276	278	280	66	68	70	72
mAb11747*	282	284	286	288	66	68	70	72
mAb11748*	290	292	294	296	66	68	70	72
mAb5385	298	299	300	301	302	303	304	305

* mAb содержит одну или более мутаций в константном домене.

Таблица 2: Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Номера SEQ ID:								
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb11723	1	3	5	7	9	11	13	15
mAb11729	17	19	21	23	25	27	29	31
mAb11820	33	35	37	39	41	43	45	47
mAb11829	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb11829*	49	51	53	55	65	67	69	71
mAb11829	49	51	53	55	57	59	61	63
mAb11830	73	75	77	79	81	83	85	87
mAb11830*	73	75	77	79	65	67	69	71
mAb11903	89	91	93	95	97	99	101	103
mAb14571	105	107	109	111	113	115	117	119

Номера SEQ ID:								
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb14571	105	107	109	111	113	115	117	119
mAb11704	121	123	125	127	129	131	133	135
mAb11711	137	139	141	143	145	147	149	151
mAb11714	153	155	157	159	161	163	165	167
mAb11717	169	171	173	175	177	179	181	183
mAb11724	185	187	189	191	193	195	197	199
mAb11727	201	203	205	207	209	211	213	215
mAb11730*	217	219	221	223	225	227	229	231
mAb11731*	233	235	237	239	65	67	69	71
mAb11734*	241	243	245	247	65	67	69	71
mAb11736*	249	251	253	255	65	67	69	71
mAb11742*	257	259	261	263	65	67	69	71
mAb11744*	265	267	269	271	65	67	69	71
mAb11745*	273	275	277	279	65	67	69	71
mAb11747*	281	283	285	287	65	67	69	71
mAb11748*	289	291	293	295	65	67	69	71

* mAb содержит одну или более мутаций в константном домене.

[00123] Линкеры связующего агента могут образовывать связь со связующим агентом, *например*, антителом или антигенсвязывающей молекулой, посредством присоединения к определенной аминокислоте антитела или антигенсвязывающей молекулы. Примеры аминокислот, присоединение которых может быть использовано в контексте этого варианта осуществления изобретения, включают, *например*, лизин (*см.*, *например*, публикации US 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5,714,586; US 2013/0101546; и US 2012/0585592), цистеин (*см.*, *например*, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; и US 7,750,116), селеноцистеин (*см.*, *например*, WO 2008/122039; и Hofer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105:12451-12456), формилглицин (*см.*, *например*, Carrico *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46-51, и Rabuka *et al.*, *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), неприродные аминокислоты (*см.*, *например*, WO 2013/068874, и WO 2012/166559), и кислые аминокислоты (*см.*, *например*, WO 2012/05982). Линкеры могут также образовывать конъюгаты

с антигенсвязывающим белком посредством присоединения к углеводам (см., например, US 2008/0305497, WO 2014/065661, Ryan *et al.*, *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130, и Jeger *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2010, 49:9995-9997).

[00124] В некоторых примерах связующим агентом является антитело или антигенсвязывающая молекула, и антитело образует связь с линкером через остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающая молекула образует связь с линкером через остаток цистеина.

[00125] Линкеры могут также образовывать конъюгаты с одним или несколькими остатков глутамина посредством хемоферментативной конъюгации, опосредованной трансглутаминазой (см., например, Jeger *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2010, 49:9995-9997 и Dennler *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2014, 25:569-578). Например, в присутствии трансглутаминазы один или более остатков глутамина в молекуле антитела могут взаимодействовать с первичным амином. Соединения-первичные амины включают, например, полезные нагрузки или линкер-полезные нагрузки, которые непосредственно обеспечивают получение конъюгатов антитело-лекарственное средство посредством опосредованного трансглутаминазой присоединения. Соединения первичные амины могут включать также линкеры и спейсеры, функционализированные реакционноспособными группами, которые могут в последующем взаимодействовать с другими соединениями в направлении синтеза конъюгатов антитело-лекарственное средство. Антитела, содержащие остатки глутамина, могут быть выделены из природных источников или сконструированы таким образом, чтобы содержать один или более остатков глутамина. Приемы встраивания остатков глутамина в полипептидную цепь антитела (при конструировании глутаминил-модифицированных антител или антигенсвязывающих молекул) известны специалистам-практикам. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело является агликозильированным.

[00126] В определенных вариантах осуществления изобретения антитело, или глутаминил-модифицированное антитело, или антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере, один остаток глутамина, по меньшей мере, в последовательности одной полипептидной цепи. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело, или глутаминил-модифицированное антитело, или антигенсвязывающая молекула содержит полипептиды в двух тяжелых цепях, каждая из которых содержит один остаток Gln295 или Q295. В других вариантах осуществления изобретения антитело, или глутаминил-модифицированное антитело, или антигенсвязывающая молекула содержит один или более остатков глутамина в других участках, отличных от положения 295 в тяжелой цепи. В эту группу включены антитела, предложенные в этом разделе и несущие описанную в настоящем документе мутацию(и) N297Q.

[00127] В одном варианте осуществления изобретения антитело, или глутаминил-модифицированное антитело, или антигенсвязывающая молекула включает тяжелую цепь антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения антитело, или глутаминил-модифицированное антитело, или антигенсвязывающая молекула включает тяжелую цепь антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области тяжелой цепи антитела, причем пептидная метка представляет собой пентапептидную последовательность LLQGA (SEQ ID NO: 297). В одном варианте осуществления изобретения антитело, или глутаминил-модифицированное антитело, или антигенсвязывающая молекула включает две тяжелые цепи антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области каждой тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения антитело, или глутаминил-модифицированное антитело, или антигенсвязывающая молекула включает две тяжелые цепи антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области каждой тяжелой цепи антитела, причем пептидная метка представляет собой пентапептидную последовательность LLQGA (SEQ ID NO: 297).

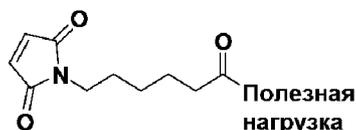
Линкеры

[00128] В определенных вариантах осуществления изобретения линкерная часть **L** конъюгатов по настоящему изобретению представляет собой фрагмент, например, двухвалентный фрагмент, который соединяет ковалентной связью связующий агент с соединением-полезной нагрузкой, описанным в настоящей заявке, в других случаях линкер **L** является трехвалентным или мультивалентным фрагментом, который соединяет ковалентной связью связующий агент с соединением-полезной нагрузкой, описанным в настоящей заявке. Подходящие линкеры можно найти, например, в публикациях *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins* (Конъюгаты антитело-лекарственное средство и иммунотоксины); Phillips, G. L., Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; *Antibody-Drug Conjugates* (Конъюгаты антитело-лекарственное средство); Ducry, L., Ed.; Humana Press, 2013; *Antibody-Drug Conjugates* (Конъюгаты антитело-лекарственное средство); Wang, J., Shen, W.-C., и Zaro, J. L., Eds.; Springer International Publishing, 2015, содержание каждой из которых включено в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления изобретения линкерная часть **L** линкер-полезных нагрузок, описанных в настоящей заявке, представляет собой фрагмент, например, ковалентно связанный со соединением-полезной нагрузкой, описанным в настоящей заявке, способный соединять двухвалентной и ковалентной связью связующий агент с соединением-полезной нагрузкой, описанным в настоящей заявке. В других случаях линкерная часть **L** линкер-полезных нагрузок, описанных в настоящей заявке, представляет собой фрагмент, ковалентно связанный со соединением-полезной нагрузкой, описанным в настоящей заявке, способный ковалентно соединять, будучи трехвалентным или мультивалентным фрагментом, связующий агент с соединением-полезной нагрузкой, описанным в настоящей заявке. Соединения-полезные нагрузки включают соединения по представленным выше Формулам I и II, и их остатки после связывания с линкером **L** или включения линкера **L** являются линкер-полезными нагрузками. Линкер-полезные нагрузки могут дополнительно

соединяться со связующими агентами, такими как антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство. Специалистам понятно, что определенные функциональные группы во фрагментах полезной нагрузки удобно связать с линкерами и/или связующими агентами. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения линкер отсутствует и полезные нагрузки непосредственно соединены со связующими агентами. В другом варианте осуществления изобретения полезные нагрузки включают карбоновые кислоты, и связующие агенты включают лизины, где каждая карбоновая кислота и каждый лизин участвуют в образовании амидной связи, соединяющей остатки полезной нагрузки непосредственно с остатками связующего агента. Функциональные группы полезной нагрузки дополнительно включают гидроксильные группы (например, балоксавир, и его производные, такие как производное балоксавира марбоксил) и карбоновые кислоты (например, в форме сложных эфиров, в результате соединения с L, как в случае VX-787 и его производных).

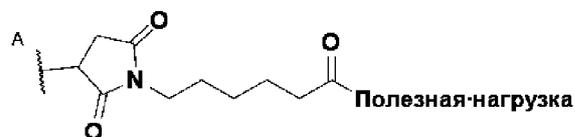
[00129] В определенных вариантах осуществления изобретения линкеры являются стабильными в физиологических условиях. В определенных вариантах осуществления изобретения линкеры являются расщепляемыми, например, способными к высвобождению, по меньшей мере, полезной нагрузки в присутствии фермента или в определенном диапазоне или при определенном значении pH. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер содержит расщепляемый ферментом фрагмент. Типичные фермент-расщепляемые фрагменты включают, не ограничиваясь перечисленным, пептидные связи, сложноэфирные связи, гидразоны и дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер содержит отщепляемый катепсином линкер.

[00130] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер содержит нерасщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения

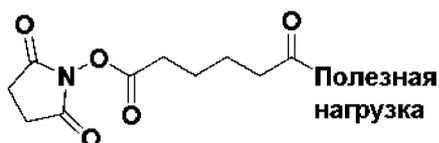


нерасщепляемый линкер получают из или его остатка.

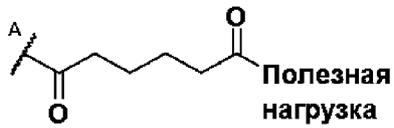
В некоторых вариантах осуществления изобретения нерасщепляемый остаток линкер-полезная нагрузка представляет собой



, или его региоизомер. В некоторых вариантах осуществления изобретения нерасщепляемый линкер получают из



или его остатка. В некоторых вариантах осуществления изобретения нерасщепляемый остаток линкер-полезной нагрузки

представляет собой , или его региоизомер. В одном

варианте осуществления изобретения линкер представляет собой малеимид циклогексан карбоксилат или 4-(*N*-малеимидометил)циклогексанкарбоновую

кислоту (МСС). В структурных формулах  указывает на связь со связующим

агентом. В некоторых примерах в структурных формулах  указывает на остаток, являющийся продуктом клик-реакции, который образуется в результате

взаимодействия, например, между связующим агентом, имеющим в составе азидную или алкинную функциональную группу, и линкер-полезную нагрузку, имеющую комплементарную алкинную или азидную функциональную группу. В

других примерах обозначение  в структурных формулах указывает на двухвалентную сульфидную группу, которая образуется в результате взаимодействия, например, между одним или более цистеинов в составе связующего агента, с одним или более линкерами или линкер-полезными нагрузками, имеющими малеимидную функциональную группу, посредством

реакций присоединения Михаэля. В других примерах, обозначение  в структурных формулах указывает на амидную связь, которая возникает в результате взаимодействия, например, между одним или более лизинов в составе связующего агента с одним или более линкерами или линкер-полезными

нагрузками, имеющими активированную или неактивированную карбоксильную функциональную группу, как должно быть понятно специалисту. В одном варианте осуществления изобретения $\overset{A}{-}\underset{B}{-}$ указывает на амидную связь, которая образуется в результате взаимодействия, например, между одним или более лизинов в составе связующего агента с одним или более линкерами или линкер-полезными нагрузками, имеющими активированную карбоксильную функциональную группу, как должно быть понятно специалисту.

[00131] В некоторых вариантах осуществления изобретения подходящие линкеры включают, не ограничиваясь перечисленным, линкеры, химически связанные с двумя цистеинами в составе одного связующего агента, *например*, антитела. Такие линкеры могут быть использованы для того чтобы имитировать дисульфидные связи антитела, которые разрушаются в результате процесса конъюгации.

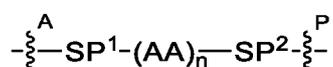
[00132] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер содержит одну или более аминокислот. Подходящие аминокислоты включают природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные, и L-, или D- α -аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер содержит аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, производное такой аминокислоты или их комбинацию (например, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, полипептиды и т.п.). В определенных вариантах осуществления изобретения одна или более боковых кислот аминокислоты связаны с описанной ниже группой боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты валин и цитруллин (например, двухвалентный –Val-Cit– или двухвалентный –VCit–). В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты аланин и аланин, или двухвалентный –AA–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид,

состоящий из или содержащий аминокислоты глутаминовую кислоту и аланин, или –EA–. В некоторых вариантах осуществления линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты глутаминовую кислоту и глицин, или –EG–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты глицин и глицин, или –GG–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты глутамин, валин, и цитруллин, или –Q-V-Cit– или –QVCit–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты глутаминовую кислоту, валин, и цитруллин, или –E-V-Cit–, или –EVCit–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты –GGGGS– (SEQ ID NO: 306). В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты –GGGGG– (SEQ ID NO: 307). В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты –GGGGK– (SEQ ID NO: 308). В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты –GFGG– (SEQ ID NO: 309). В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой пептид состоящий из или содержащий аминокислоты лизин, валин, и цитруллин, или –KVCit–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты –KVA–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты –VA–. В любом из вариантов осуществления изобретения, перечисленных в этом абзаце и по всему тексту заявки используются стандартные трехбуквенные или однобуквенные обозначения аминокислот. Примеры однобуквенных обозначений включают G для глицина, K для лизина, S для серина, V для валина, A для аланина и F для фенилаланина.

[00133] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер содержит саморасщепляющуюся группу. Саморасщепляющейся группой может быть

любая такая группа, известная специалистам. В частных вариантах осуществления изобретения саморасщепляющейся группой является *para*-аминобензил (РАВ), или его производное. Полезные производные включают *para*-аминобензилоксикарбонил (РАВС). Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что саморасщепляющаяся группа способна к осуществлению химической реакции, которая приводит к высвобождению остальных атомов линкера от полезной нагрузки.

[00134] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой:



где:

SP¹ представляет собой спейсер;

SP² представляет собой спейсер;

$\overset{\text{A}}{\underset{\sim}{\zeta}}$ это одна или более связей со связующим агентом;

$\overset{\text{P}}{\underset{\sim}{\zeta}}$ это одна или более связей с полезной нагрузкой;

каждый **AA** представляет собой остаток аминокислоты; и

n равен целому числу от нуля до десяти.

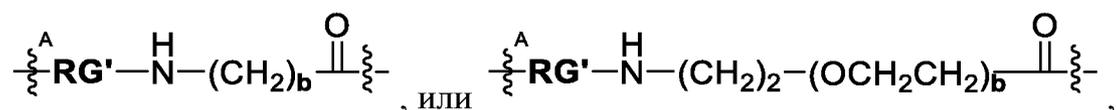
[00135] Спейсер **SP¹** представляет собой фрагмент, который соединяет фрагмент **(AA)_n** или его остаток с связующим агентом (**BA**) или с остатком реакционноспособной группы, который связан с **BA**. Подходящие спейсеры **SP¹** включают, не ограничиваясь перечисленным, спейсеры, содержащие алкилен или простой полиэфир, или оба этих соединения. Концы спейсеров, например, часть, связанная с **BA** или **AA**, могут представлять собой фрагменты, полученные из реакционноспособных групп, которые используются с целью присоединения антитела или **AA** к спейсеру в время химического синтеза конъюгата. В определенных вариантах осуществления изобретения **n** равно 0, 1, 2, 3, или 4 (т.е. когда **n** равно 0, **AA** отсутствует). В частных случаях изобретения, **n** равно 2.

В частных случаях изобретения, n равно 3. В частных случаях изобретения, n равно 4.

[00136] В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер SP^1 содержит алкилен. В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер SP^1 содержит C_{5-7} алкилен. В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер SP^1 содержит простой полиэфир. В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер SP^1 содержит полимер этиленоксида, такой как полиэтиленгликоль (PEG). Звенья полимера полиэтиленгликоля обычно представляют, как $-(OCH_2CH_2)_p-$, где p может быть целым числом от одного до ста. Например, $-(OCH_2CH_2)_2-$ можно представить также, как $-OCH_2CH_2-OCH_2CH_2-$ или PEG₂. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₁. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₂. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₃. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₄. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₅. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₆. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₇. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₈. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₉. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₁₀. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₁₁. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₁₂. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₁₃. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₁₄. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой

осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₈₂. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₈₃. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₈₄. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₈₅. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₈₆. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₈₇. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₈₈. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₈₉. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₉₀. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₉₁. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG₉₂.

[00137] В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер **SP**¹ представляет собой:



где:

RG' представляет собой остаток реакционноспособной группы после взаимодействия реакционноспособной группы **RG** со связывающим агентом;

$\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \end{array}$ представляет собой связь со связующим агентом;

$\begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ представляет собой связь с **(AA)_n**;

n равен целому числу от нуля до десяти; и

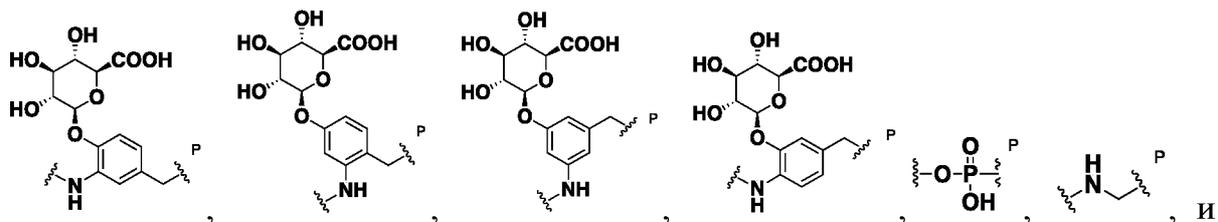
b является независимо целым числом от 1 до 92.

[00138] Реакционноспособная группа **RG** может быть любой реакционноспособной группой, известной специалисту, способной к образованию одной или более связей со связующим агентом.

Реакционноспособная группа **RG** представляет собой группу, которая содержит в своей структуре участок, способный взаимодействовать со связующим агентом (*например*, взаимодействовать с остатками цистеином или лизином в молекуле антитела, или с азиной группой в молекуле антитела, например, с одним или более остатков глутамина в молекуле PEG-N₃ функционализированного антитела; или с аминогруппой, например, с одним или более остатков глутамина в молекуле PEG-NH₂) с образованием описанных в настоящей заявке конъюгатов антитело-лекарственное средство. После конъюгации со связующим агентом реакционноспособная группа становится остатком реакционноспособной группы (**RG'**). Иллюстративные реакционноспособные группы включают, не ограничиваясь перечисленным, группы, содержащие галоацетил, изотиоцианат, сукцинимид, N-гидросукцинимид или малеимид, способные взаимодействовать со связующим агентом.

[00139] Спейсер **SP²**, если присутствует, является фрагментом, который соединяет фрагмент (**AA**)_n с полезной нагрузкой. Подходящие спейсеры включают, не ограничиваясь перечисленным, описанные выше, как спейсеры **SP¹**. Другие подходящие спейсеры **SP²** включают, не ограничиваясь перечисленным, спейсеры, содержащие алкилен или простой полиэфир, или оба этих соединения. Концы спейсеров **SP²**, например, часть спейсера, непосредственно связанная с полезной нагрузкой или с **AA**, может представлять собой фрагменты, полученные из реакционноспособных групп, которые применяются с целью присоединения полезной нагрузки или **AA** к спейсеру **SP²** во время химического синтеза конъюгата. В некоторых примерах, концы спейсеров **SP²**, например, часть спейсера **SP²**, непосредственно связанная с полезной нагрузкой или с **AA**, могут быть остатками реакционноспособных групп, которые применяются для присоединения полезной нагрузки или **AA** к спейсеру во время химического синтеза конъюгата.

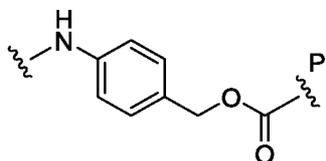
[00140] В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер **SP²**, если он присутствует, выбирают из группы, включающей $-\text{NH}-(p\text{-C}_6\text{H}_4)\text{-CH}_2-$, $-\text{NH}-(p\text{-C}_6\text{H}_4)\text{-CH}_2\text{OC(O)-}$, аминокислоту, дипептид, трипептид, олигопептид



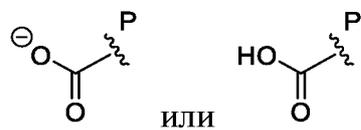
любые комбинации этих соединений. В определенных вариантах осуществления изобретения каждый $\text{---}\overset{\text{P}}{\text{---}}$ представляет собой связь с полезной нагрузкой, и каждый $\text{---}\overset{\text{AA}}{\text{---}}$ представляет собой связь с $(\text{AA})_n$ или отсутствует, если $n = 0$.

[00141] В представленных выше формулах каждый $(\text{AA})_n$ представляет собой аминокислоту или, необязательно, остаток *p*-аминобензилоксикарбонила (РАВС). n может быть равен 0; в этом случае $(\text{AA})_n$ отсутствует. Если РАВС присутствует, то предпочтительно присутствие лишь одного РАВС. Предпочтительным является остаток РАВС, в случае его присутствия, связанный с концевым АА в группе $(\text{AA})_n$, проксимальной к полезной нагрузке. Подходящие аминокислоты для каждого АА включают природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные, и L-, или D- α -аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения АА содержит аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, производное такой аминокислоты или их комбинацию (например, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, полипептиды и т.п.). В определенных вариантах осуществления изобретения одна или более боковых цепей аминокислот соединяется с группой боковой цепи, описанной ниже. В некоторых вариантах осуществления изобретения n равен двум. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\text{AA})_n$ представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\text{AA})_n$ представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\text{AA})_n$ представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\text{AA})_n$ представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\text{AA})_n$ представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах

осуществления изобретения (AA)_n представляет собой глицин-валин. В некоторых вариантах осуществления изобретения the (AA)_n представляет собой валин-цитруллин-РАВС. В некоторых вариантах осуществления изобретения (AA)_n представляет собой цитруллин-валин-РАВС. В некоторых вариантах осуществления изобретения n равен трем. В некоторых вариантах осуществления изобретения (AA)_n представляет собой глютамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения (AA)_n представляет собой глютамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения (AA)_n представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления изобретения (AA)_n представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения n равен четырем. В некоторых вариантах осуществления изобретения (AA)_n представляет собой глютамат-валин-цитруллин-РАВ. В некоторых вариантах осуществления изобретения (AA)_n представляет собой глютамин-валин-цитруллин-РАВС. Специалистам должно быть известно, что РАВС, являющийся остатком пара-аминобензилоксикарбонила, имеет следующую структуру:

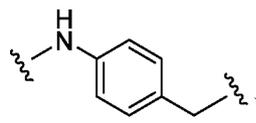


Показано, что остаток РАВС облегчает расщепление определенных линкеров *in vitro* и *in vivo*. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения после отщепления РАВС карбоксилат или группа карбоновой кислоты (т.е.

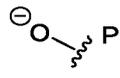
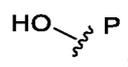


, соответственно) остаются интактными с оставшимся антивирусным соединением или полезной нагрузкой. В определенных вариантах

осуществления изобретения каждый $\frac{P}{-}$ представляет собой связь с оставшимся антивирусным соединением (например, полезной нагрузкой). Специалистам должно быть известно, что РАВ является двухвалентным остатком пара-

аминобензила (т.е. $-\text{NH}-(p\text{-C}_6\text{H}_4)\text{-CH}_2-$ или ). Показано, что в определенных вариантах осуществления изобретения остаток РАВ облегчает расщепление определенных линкеров *in vitro* и *in vivo*. Например, в определенных

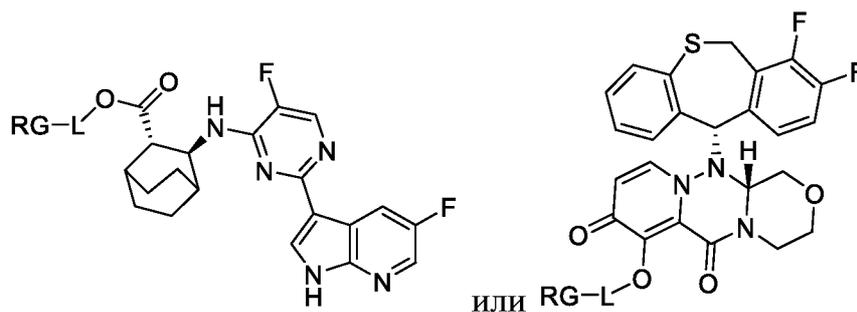
вариантах осуществления изобретения после отщепления

алкоксидная или гидроксильная группа (т.е.  или , соответственно) остаются интактными с оставшимся антивирусным соединением (например, полезной нагрузкой). В определенных вариантах осуществления

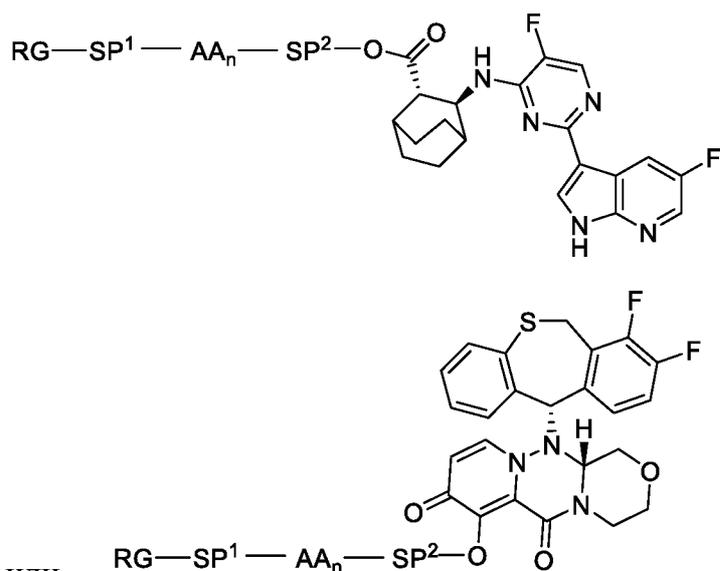
изобретения каждый  представляет собой связь с оставшимся антивирусным соединением или полезной нагрузкой).

Линкер-полезные нагрузки

[00142] В определенных вариантах осуществления изобретения линкер-полезные нагрузки включают специфичное соединение или полезную нагрузку по одной или более приведенным выше Формулам I и II, связанные с линкером, где линкер(ы), писанные в настоящей заявке, включают группу, взаимодействующую с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящей заявке. В частных случаях изобретения, линкер связан с карбоксильной или гидроксильной группой в одной или более структурах по приведенным выше Формулам I и II. В одном варианте осуществления изобретения линкер-полезная нагрузка имеет следующую структуру

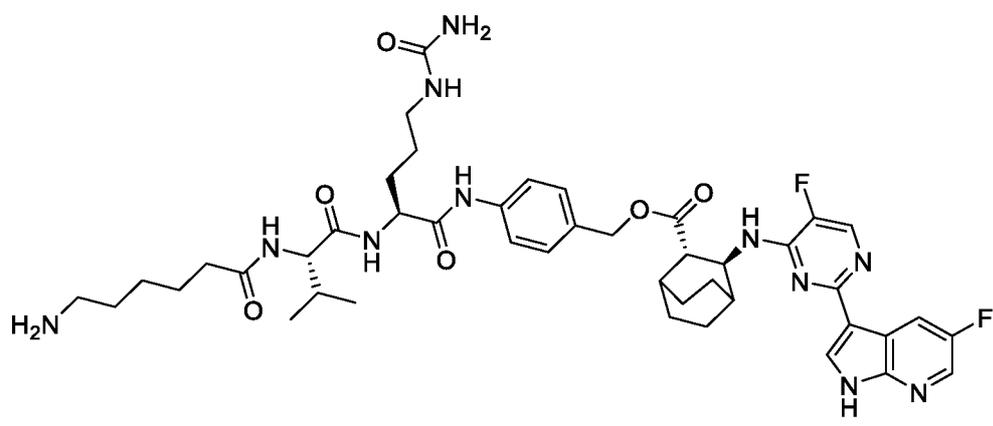
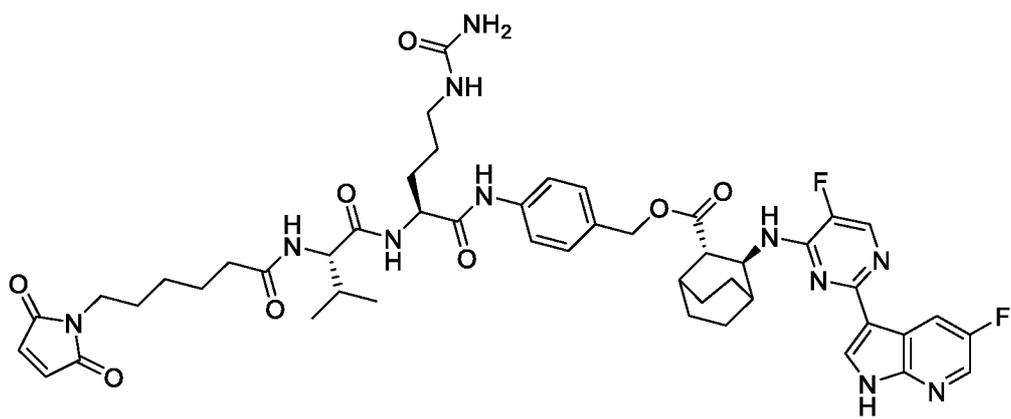


или является его фармацевтически приемлемой солью, где **L** представляет собой линкер, согласно описанию в любом варианте осуществления изобретения по настоящей заявке; и **RG** это реакционноспособная группа, согласно описанию в любом варианте осуществления изобретения по настоящей заявке. В одном варианте осуществления изобретения линкер-полезная нагрузка представляет собой:

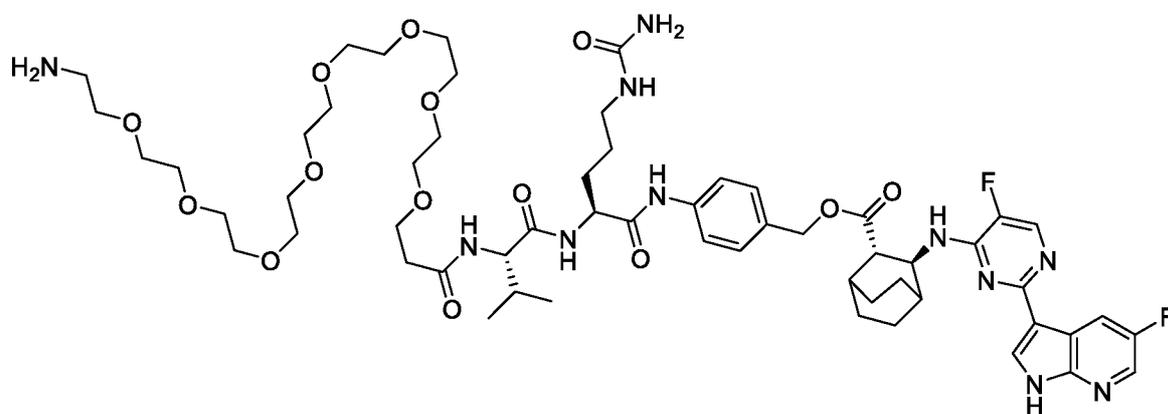


или его фармацевтически приемлемую соль, где SP^1 и SP^2 , если присутствуют, являются спейсерными группами согласно описанию в любом варианте осуществления изобретения по настоящей заявке; **RG** представляет собой группу, взаимодействующую с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом согласно описанию в любом варианте осуществления изобретения по настоящей заявке; каждый **AA** представляет собой аминокислоту согласно описанию в любом варианте осуществления изобретения по настоящей заявке; и **n** равен целому числу от одного до десяти.

[00143] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены соединения (т.е., линкер-полезные нагрузки), которые выбирают из группы, включающей:



и

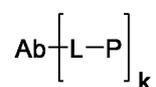


Конъюгаты/Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

[00144] Предложены человеческие моноклональные антитела к НА вируса гриппа, конъюгированные с терапевтическим компонентом, таким как анатоксин или противовирусное лекарственное средство, для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа (т.е., ADC). Антитело может быть связано с терапевтическим средством на любом участке молекулы антитела при условии, что антитело способно связываться со своей мишенью. В одном варианте осуществления

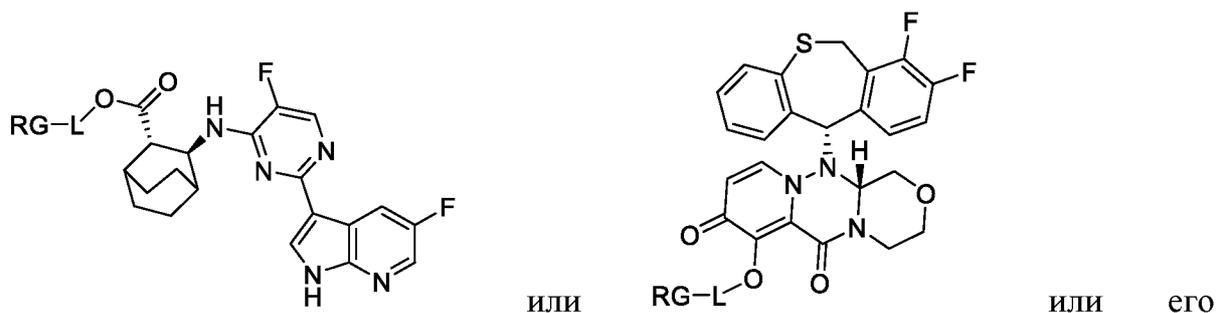
изобретения терапевтическим средством может являться второе другое антитело к НА вируса гриппа или включающий его ADC. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело может быть конъюгировано со средством, специфичным для инфицированной вирусом клетки. Тип терапевтического компонента, который может быть конъюгирован с антителом к НА вируса гриппа будет учитывать состояние, подлежащее лечению, и желаемый терапевтический эффект, который должен быть достигнут. В определенных вариантах осуществления изобретения предложены антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, где антитело конъюгировано с одним или более соединениями по Формуле I и/или II, описанными в настоящей заявке. В одном варианте осуществления изобретения антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с полезной нагрузкой через линкер, каждый из которых описан в соответствующих вариантах осуществления изобретения в настоящей заявке.

[00145] В одном варианте осуществления изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру



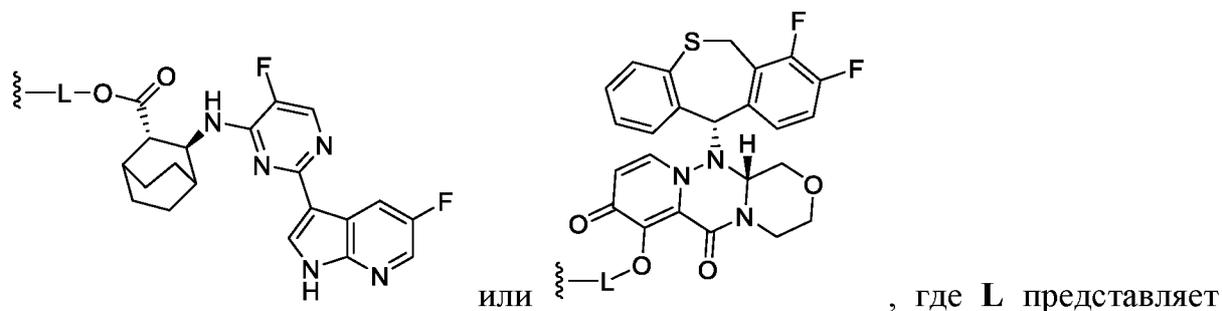
где **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент; **L** представляет собой линкер; и **P** представляет собой противовирусное соединение или полезная нагрузка. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент; и **P** представляет собой ингибитор вируса гриппа. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент; и **P** представляет собой ингибитор полимеразы. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент; и **P** представляет собой VX-787, его производное, или его остаток. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий

фрагмент; и **P** представляет собой балоксавир, его производное, или его остаток. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к гемагглютинину или его антигенсвязывающий фрагмент; и **P** представляет собой антивирусное соединение. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент; и **P** представляет собой антивирусное соединение. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к гемагглютинину или его антигенсвязывающий фрагмент; и **P** представляет собой ингибитор вируса гриппа. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к гемагглютинину или его антигенсвязывающий фрагмент; и **P** представляет собой ингибитор полимеразы. В любом варианте осуществления изобретения, предложенном в данном абзаце, **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент либо антитело к гемагглютинину или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением по Формуле I, описанной выше. В любом варианте осуществления изобретения, предложенном в данном абзаце, **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент либо антитело к гемагглютинину или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением по Формуле II, описанной выше. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к гемагглютинину или его антигенсвязывающий фрагмент; и **P** представляет собой VX-787, его производное, или его остаток. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к гемагглютинину или его антигенсвязывающий фрагмент; и **P** представляет собой балоксавир, его производное, или его остаток. В любом варианте осуществления изобретения, предложенном в данном абзаце, **k** равен целому числу от одного до тридцати. В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC, отличающиеся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с соединением



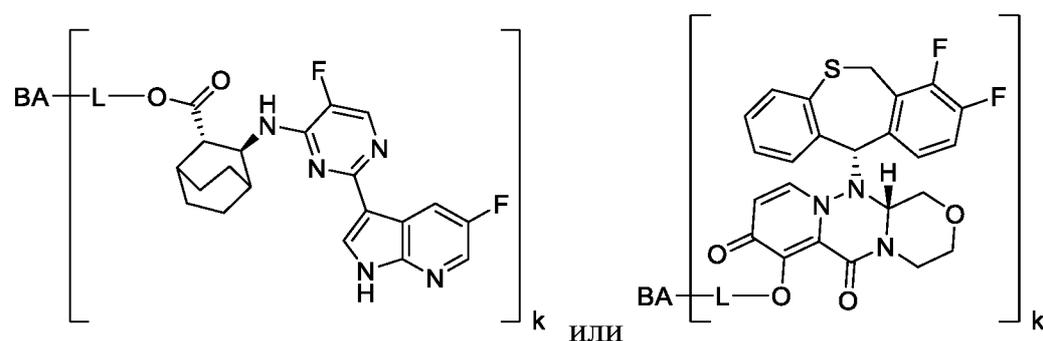
фармацевтически приемлемой солью, где

L представляет собой линкер, описанный в настоящей заявке; и **RG** представляет собой реакционноспособную группу, описанную в настоящей заявке. В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC, отличающиеся тем, что конъюгированное соединение выбирают из



собой линкер, описанный в настоящей заявке.

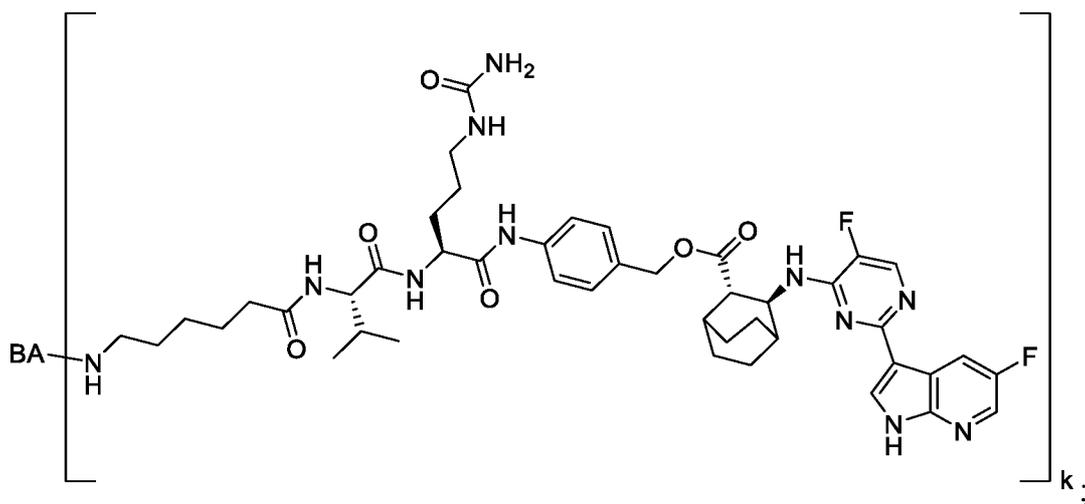
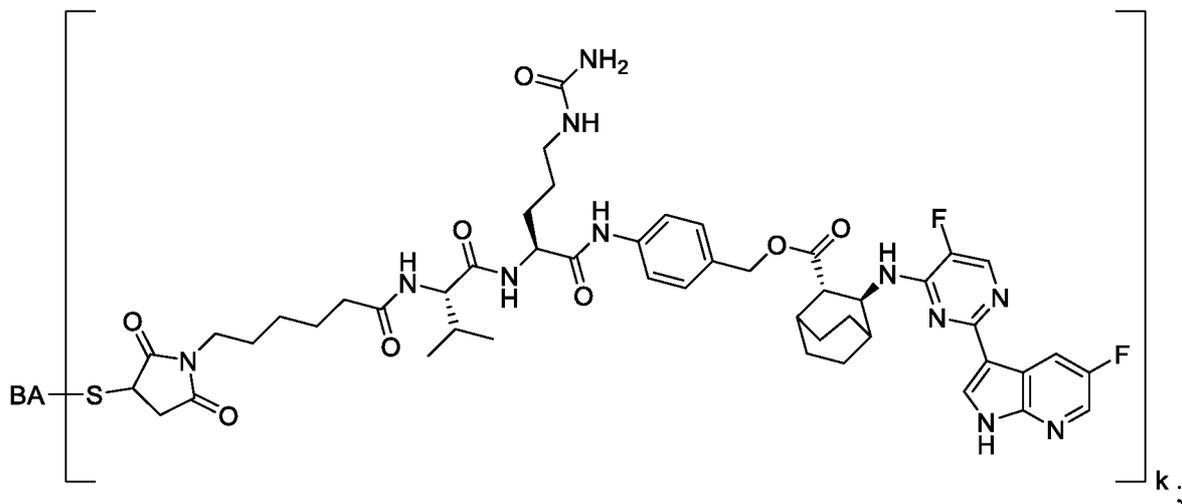
[00146] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены соединения ADC, имеющие следующую структуру:

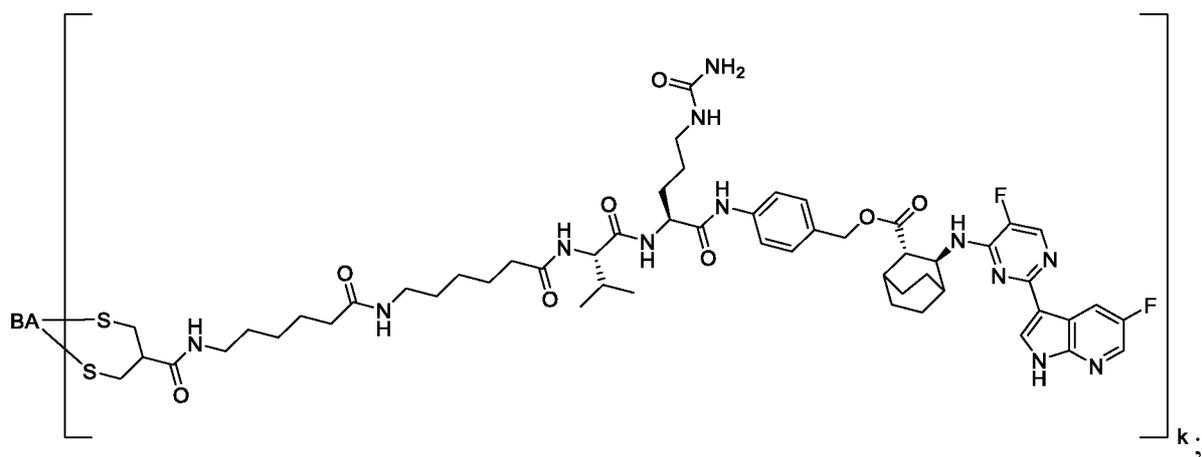
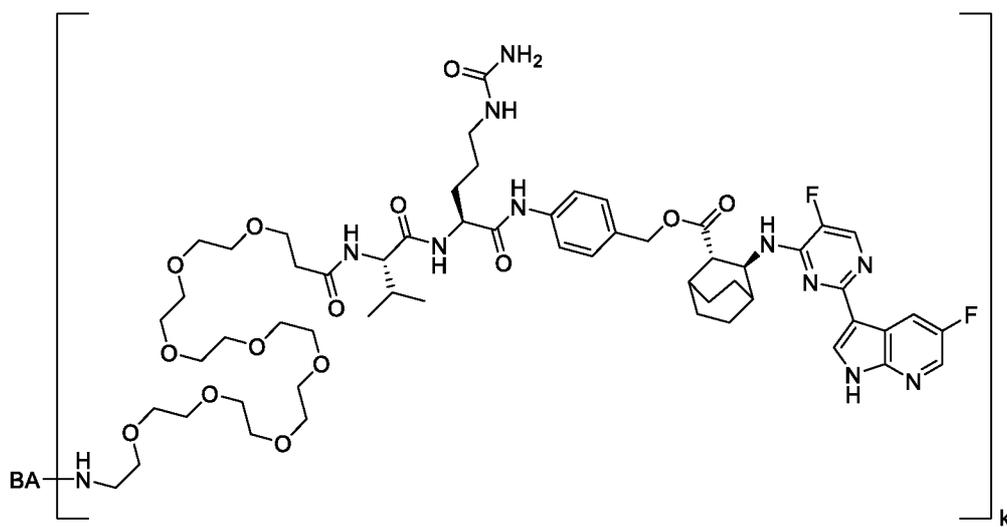


где **L** и **BA** описаны в других абзацах настоящей заявки, и **k** равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10. В определенных вариантах осуществления изобретения **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4, или 1-4. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, конъюгированные с показанными выше

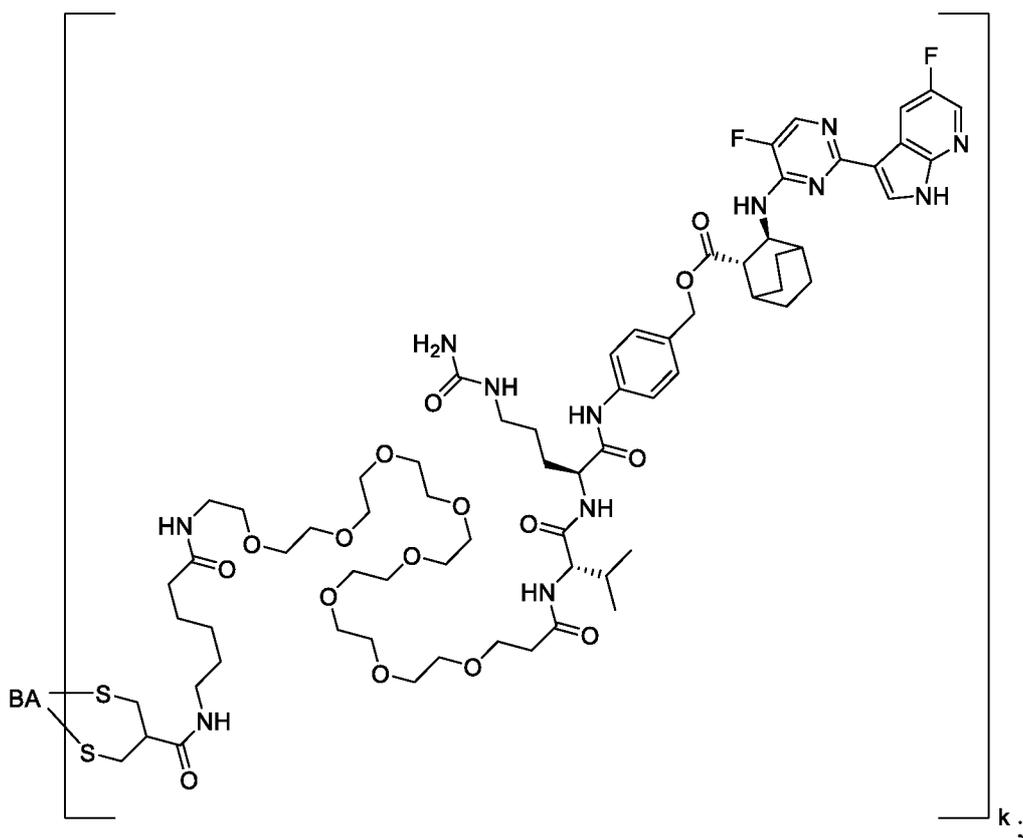
—**L**—**BA**, включают одно или более соединений по описанным выше Формулам I и/или II, где **BA** представляет собой связующий агент; **L** представляет собой линкер; и **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4, или 1-4.

[00147] В одном варианте осуществления изобретения предложены соединения ADC, которые выбирают из группы, включающей





И



где **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и **k** равен целому числу от одного до тридцати. В определенных вариантах осуществления изобретения **k** равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10. В определенных вариантах осуществления изобретения **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 5-6, 5-7, 5-8, 5-9, 5-10, 6-7, 6-8, 6-9, 6-10, 7-8, 7-9, 7-10, 8-9, 8-10, или 9-10. В любом варианте осуществления изобретения, предложенном в данном абзаце, **BA** предусматривает включение одного или более остатков цистеина, лизина и/или глутамина для конъюгации с полезной нагрузкой и/или линкер-полезной нагрузкой, когда $k > 1$. Например, приведенное выше описание ADC предусматривает соотношение лекарственное средство:антитело (DAR), равное ≥ 1 , где один или более остатков цистеина,

лизина и/или глутамина в **ВА** создают условия для взаимодействия с полезной нагрузкой и/или линкер-полезной нагрузкой (например, когда $k \geq 1$). Связи от **ВА** к $-S-$ и/или от **ВА** к $-NH-$ указывают на связи от связующего агента (**ВА**) к цистеину или трансглутаминированному остатку глутамина в **ВА**, соответственно. И, связи от **ВА**- $S-$ и/или от **ВА**- $NH-$ к углероду указывают на соединение с линкером(линкерами), которые показаны или описаны в других абзацах настоящей заявки. Таким образом, сера из остатка цистеина в молекуле **ВА**, и/или азот из трансглутаминированного остатка глутамина в молекуле **ВА**, находятся в квадратных скобках, чтобы показать, что **ВА** может быть конъюгирован с более чем одной полезной нагрузкой и/или линкер-полезной нагрузкой (например, **ВА**, для которого $DAR \geq 1$). В одном варианте осуществления изобретения **ВА** является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом согласно описанию в данной заявке.

[00148] В определенных вариантах ADC, описанных в настоящей заявке, **Ab** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере, один остаток глутамина, используемый для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, два остатка глутамина, используемые для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **ВА**

представляет собой антитело, модифицированное транsgлyтаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, три остатка глyтамина, используемые для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное транsgлyтаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, четыре остатка глyтамина, используемые для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное транsgлyтаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, один остаток глyтамина, доступный для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное транsgлyтаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, два остатка глyтамина, доступных для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное транsgлyтаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, три остатка глyтамина, доступных для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное транsgлyтаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, четыре остатка глyтамина, доступных для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное транsgлyтаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295; и k равен 2. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или

ВА представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 по нумерации ЕС; и **k** равен 2. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется в С-терминальной области тяжелой цепи; и **k** равен 2. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глутамин. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глутамин; и **k** равен 2. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глутамин в последовательности LLQGA (SEQ ID NO: 297) в С-терминальной области тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глутамин в последовательности LLQGA (SEQ ID NO: 297) в С-терминальной области тяжелой цепи антитела; и **k** равен 2. В одном варианте осуществления

изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 и двум остаткам N297Q; и **k** равен 4. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 по нумерации ЕС и двум остаткам N297Q; и **k** равен 4. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой mAb11729, описанное в настоящей заявке.

[00149] В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295; и **DAR** равно а) приблизительно 2,0; б) более 0 и до приблизительно 12,0; в) от приблизительно 0,5 до приблизительно 8,0; г) от приблизительно 0,5 до приблизительно 6,0; е) от приблизительно 1,0 до приблизительно 4,0; ф) от приблизительно 1,0 или приблизительно 2,0; г) приблизительно 1,0; или з) приблизительно 2,0. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 по нумерации ЕС; и **DAR** равно а) приблизительно 2,0; б) > 0 до приблизительно 12,0; в) от приблизительно 0,5 до приблизительно 8,0; г) от приблизительно 0,5 до приблизительно 6,0; е) от приблизительно 1,0 до приблизительно 4,0; ф) приблизительно 1,0 или

приблизительно 2,0; g) от приблизительно 1,0; или h) приблизительно 2,0.

В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется в С-терминальной области тяжелой цепи антитела; и **DAR** равно а) приблизительно 2,0; b) > 0 и до приблизительно 12,0; c) от приблизительно 0,5 до приблизительно 8,0; d) от приблизительно 0,5 до приблизительно 6,0; e) от приблизительно 1,0 до приблизительно 4,0; f) приблизительно 1,0 или приблизительно 2,0; g) приблизительно 1,0; или h) приблизительно 2,0.

В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глутамин. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глутамин; и **DAR** равно а) приблизительно 2,0; b) > 0 и до приблизительно 12,0; c) от приблизительно 0,5 до приблизительно 8,0; d) от приблизительно 0,5 до приблизительно 6,0; e) от приблизительно 1,0 до приблизительно 4,0; f) приблизительно 1,0 или приблизительно 2,0; g) приблизительно 1,0; или h) приблизительно 2,0.

В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через

глутамин в последовательности LLQGA (SEQ ID NO: 297) в С-терминальной области тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глутамин в последовательности LLQGA (SEQ ID NO: 297) в С-терминальной области тяжелой цепи антитела; и **DAR** равно а) приблизительно 2,0; б) > 0 и до приблизительно 12,0; в) от приблизительно 0,5 до приблизительно 8,0; г) от приблизительно 0,5 до приблизительно 6,0; е) от приблизительно 1,0 до приблизительно 4,0; ф) приблизительно 1,0 или приблизительно 2,0; г) приблизительно 1,0; или h) приблизительно 2,0. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 и двум остаткам N297Q; и **DAR** равно а) приблизительно 2,0; б) > 0 и до приблизительно 12,0; в) от приблизительно 0,5 до приблизительно 8,0; г) от приблизительно 0,5 до приблизительно 6,0; е) от приблизительно 1,0 до приблизительно 4,0; ф) приблизительно 1,0, или приблизительно 2,0, или приблизительно 3,0, или приблизительно 4,0; г) приблизительно 1,0; h) приблизительно 2,0; и) приблизительно 3,0; или j) приблизительно 4,0. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 по нумерации ЕС и двум остаткам N297Q; и **DAR** равно

a) приблизительно 2,0; b) > 0 и до приблизительно 12,0; c) от приблизительно 0,5 до приблизительно 8,0; d) от приблизительно 0,5 до приблизительно 6,0; e) от приблизительно 1,0 до приблизительно 4,0; f) приблизительно 1,0 или приблизительно 2,0; g) приблизительно 1,0; или h) приблизительно 2,0. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансклютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 и двум остаткам N297Q; и **DAR** равно a) приблизительно 2,0; b) > 0 и до приблизительно 12,0; c) от приблизительно 0,5 до приблизительно 8,0; d) от приблизительно 0,5 до приблизительно 6,0; e) от приблизительно 1,0 до приблизительно 4,0; f) приблизительно 1,0, или приблизительно 2,0, или приблизительно 3,0, или приблизительно 4,0; g) приблизительно 1,0; h) приблизительно 2,0; i) приблизительно 3,0; или j) приблизительно 4,0. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой mAb11729, описанное в настоящей заявке.

[00150] В определенных вариантах ADC, описанных в настоящей заявке, **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа А или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа А, группы 1, или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело к H1 вируса гриппа или его

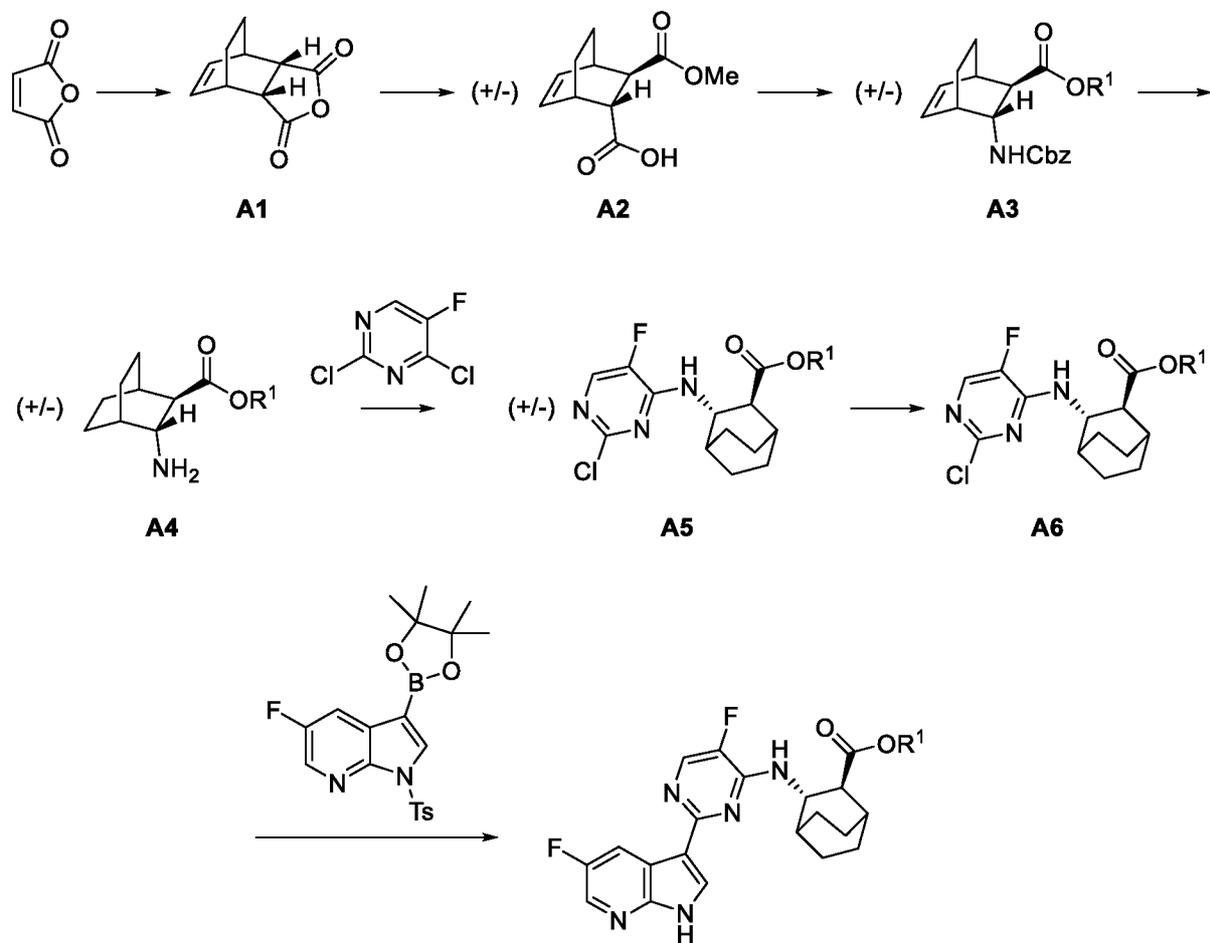
антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа А, группы 2, или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело к H3 вируса гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа В или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения ADC включает антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированны с полезной нагрузкой через линкер, где конъюгат антитело-лекарственное средство связывается с и/или ингибирует основной белок полимеразы 2 (PB2) (VX-787), кислый белок полимеразы (PA) (балоксавир и/или балоксавира марбоксил), и/или основной белок полимеразы 1 (PB1). В одном варианте осуществления изобретения ADC включает антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с полезной нагрузкой через линкер, где конъюгат антитело-лекарственное средство связывается с и/или ингибирует основной белок полимеразы 2 (PB2) (VX-787) при аффинности связывания, по меньшей мере, $4,0 \times 10^{-9}$ М, по меньшей мере, $3,5 \times 10^{-9}$ М или, по меньшей мере, $3,0 \times 10^{-9}$ М, измеренной методом твердофазного ИФА (ELISA). В одном варианте осуществления изобретения ADC включает антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с полезной нагрузкой через линкер, где конъюгат антитело-лекарственное средство связывается с и/или ингибирует основной белок полимеразы 1 (PB1) при аффинности связывания, по меньшей мере, $4,0 \times 10^{-9}$ М, по меньшей мере,

$3,5 \times 10^{-9}$ M, или по меньшей мере, $3,0 \times 10^{-9}$ M, измеренной методом твердофазного ИФА. В одном варианте осуществления изобретения ADC включает антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с полезной нагрузкой через линкер, где конъюгат антитело-лекарственное средство связывается с и/или ингибирует основной белок полимеразы 2 (PB2) (VX-787) при IC_{50} , по меньшей мере, $2,5 \times 10^{-9}$ M, по меньшей мере, $2,0 \times 10^{-9}$ M, или по меньшей мере, $1,5 \times 10^{-9}$ M, измеренной методом ImmunoSpot®. В одном варианте осуществления изобретения ADC включает антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с полезной нагрузкой через линкер, где конъюгат антитело-лекарственное средство связывается с и/или ингибирует основной белок полимеразы 1 (PB1) при IC_{50} , по меньшей мере, $2,5 \times 10^{-9}$ M, по меньшей мере, $2,0 \times 10^{-9}$ M, или по меньшей мере, $1,5 \times 10^{-9}$ M, измеренной методом ImmunoSpot®.

Способы получения соединения или полезных нагрузок и линкер-полезных нагрузок

[00151] Предложенные в настоящей заявке соединения могут быть приготовлены, получены, выделены или получены с помощью любого метода, очевидных для специалистов. Иллюстративные способы получения подробно описаны в представленных ниже Примерах. Определенные варианты осуществления соединений, предложенных в настоящей заявке, могут быть приобретены из коммерческих источников или могут быть в общем случае получены в соответствии со Схемами А-С:

Схема А. Иллюстративная схема получения



Соединение VX-787 и его производные

Схема В1. Иллюстративная схема получения

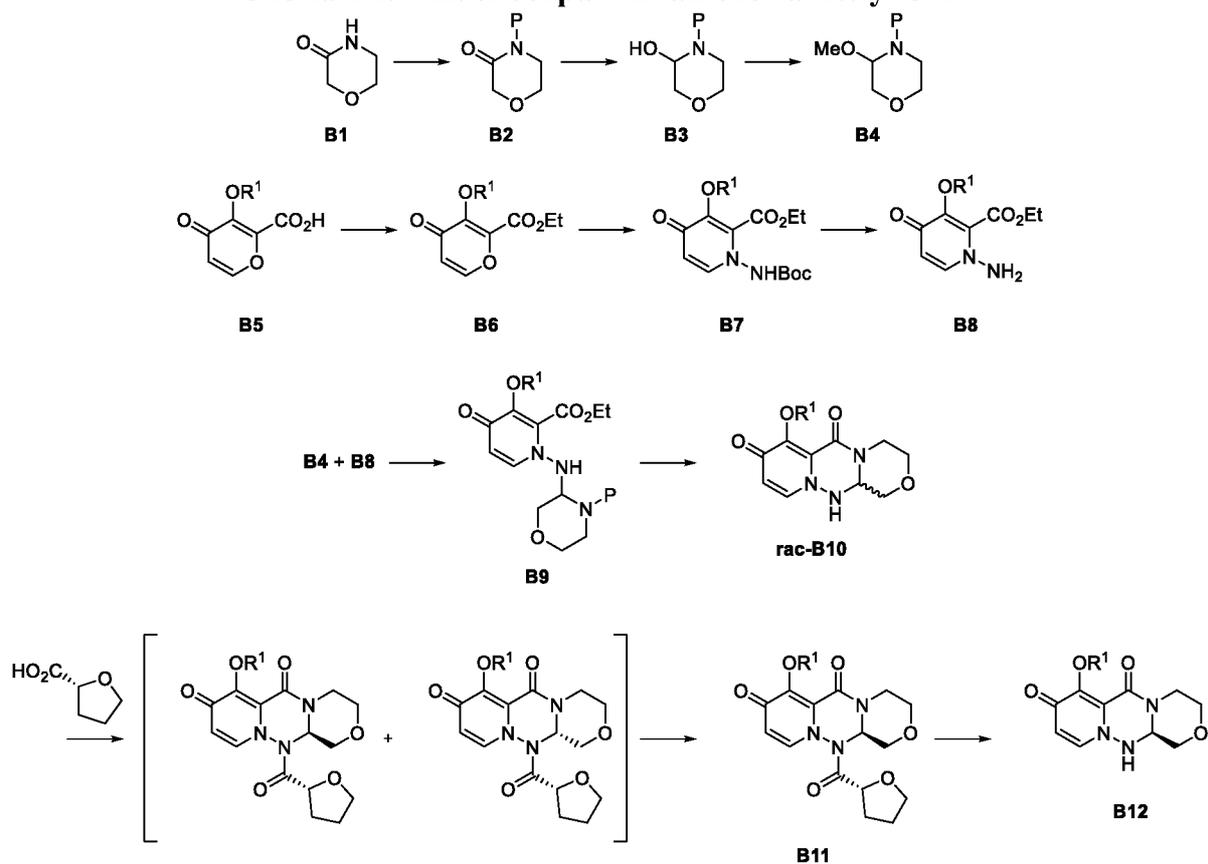


Схема В2. Иллюстративная схема получения

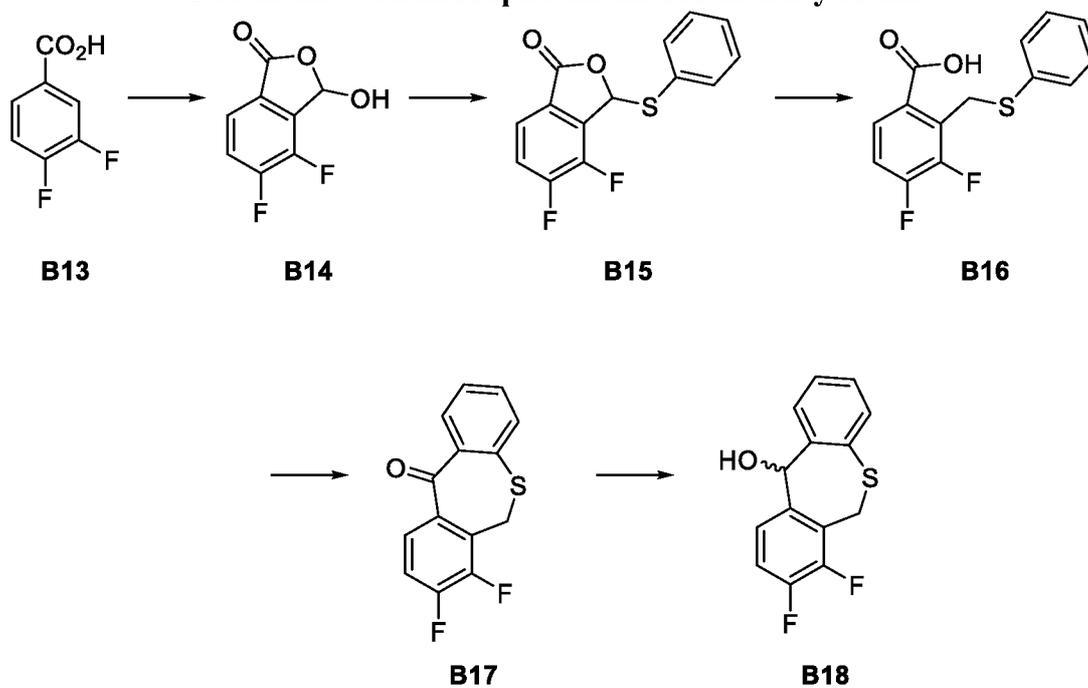
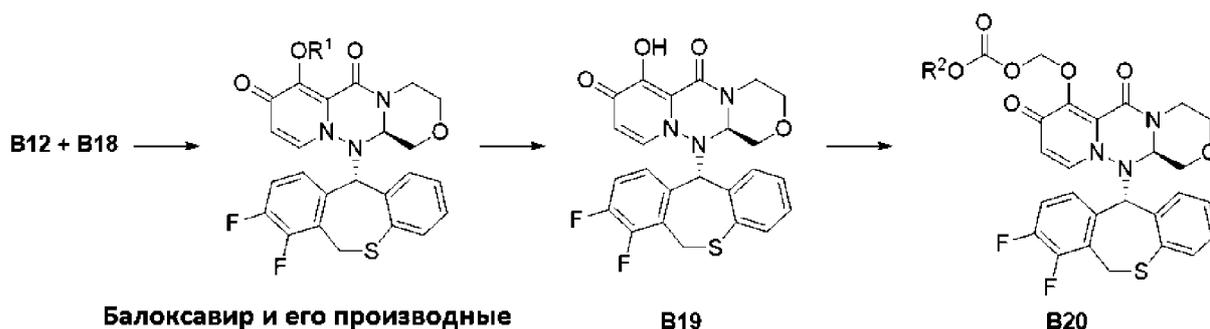


Схема В3. Иллюстративная схема получения



[00152] На приведенной выше Иллюстративной схеме получения А (см., *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6668), R^1 описан в контексте Формулы I. На Схеме А после циклоприсоединения малеинового ангидрида и 1,3-циклогексадиена по реакции Дiels-Альдера, эндо-А1 может быть перемешан в щелочной среде, что приводит к получению эпимеризованного транс-А2. Перегруппировка Курциуса и извлечение с помощью бензилового спирта приводит к получению А3. Гидрогенизация приводит к получению А4. В результате обработки 2,4-дихлорпиримидинами и хирального разделения получают А6, при этом промежуточным продуктом является А5. Реакция сочетания Сузуки с замещенными сложными боронатными эфирами азаиндола с последующим удалением защитных групп приводит к получению соединений по Формуле I, включая VX-787 и его производные.

[00153] На приведенных выше Иллюстративных схемах получения В1-В3 (см., *OPRD* **2019**, *23*, 1298), R^1 описан в контексте Формулы II. На Схеме В1 в В1 могут быть введены защитные группы и, таким образом получено соединение В2. Затем В2 восстанавливают, получая В3, с последующим замещением метоксигруппы на гидроксильную группу, чтобы получить В4. В5 может быть подвергнут реакции

этерификации, в результате которой получают **B6**. **B6** может быть обработан трет-бутоксикарбонилгидразином для получения пиридона **B7**, с последующим удалением защитной группы в кислых условиях и получением в результате **B8**. Реакция соединения **B4** и **B8** в присутствии кислоты Льюиса позволяет получить двузамещенный гидразин **B9**. Удаление защиты с азота и Pd-опосредованная циклизация приводят к получению рацемата **B10**. Разделение рацемической смеси **B10** через образование диастереомеров гидразида с последующим гидролизом приводит к получению **B12**.

[00154] На Схеме В2 **B13** подвергают орто-ориентированному металлированию и останавливают реакцию диметилформамидом, чтобы получить альдегид; внутримолекулярная циклизация этого альдегида приводит к получению **B14**. **B14** может быть обработан тиофенолом, что приводит к получению **B15**. После восстановления **B15** получают **B16**. Трициклический сульфид **B17** получают в результате обработки **B16** в кислой среде. При восстановлении **B17** получают **B18**.

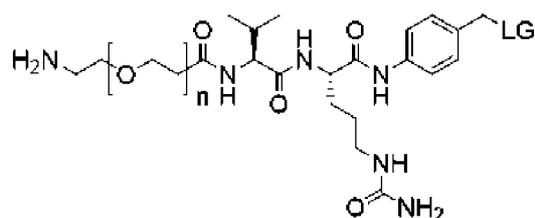
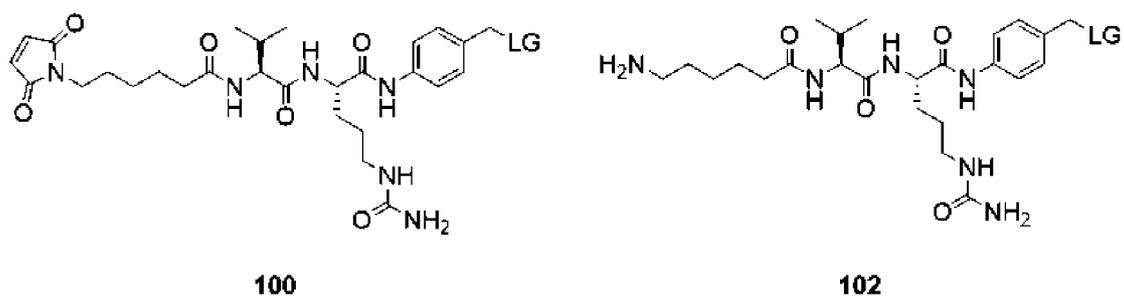
[00155] На Схеме В3 показано, что соединение **B12** с **B18** позволяет получить балоксавир и его производные. Удаление защитной группы приводит к получению балоксавира в форме-кислоты **B19**. Балоксавир в форме кислоты **B19** может быть реалкилирован, в результате чего получают **B20**.

[00156] Линкер-полезные нагрузки, описанные в настоящей заявке, в общем случае, могут быть синтезированы посредством серии последовательных стадий, как показано на Схеме С:

Схема С. Иллюстративная схема получения



VX-787 и его производные



[00157] На приведенной выше Иллюстративной схеме получения С R^1 описан в контексте Формулы I. На Схеме С VX-787 и его производные обрабатывают линкерами, несущими уходящую группу (LG), получая в результате линкер-полезные нагрузки (например, линкер-(VX-787)).

[00158] Описанные в настоящей заявке конъюгаты могут быть синтезированы посредством соединения линкер-полезных нагрузок, описанных в настоящей заявке, со связующим агентом, например, антителом, описанным в настоящей заявке, в стандартных условиях конъюгации (см., например, Doronina *et al. Nature Biotechnology* 2003, 21, 778, содержание включено в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки). Когда связующим агентом является антитело, антитело может быть соединено с линкер-полезной нагрузкой через один или более остатков цистеина или лизина в молекуле антитела. Линкер-полезные

нагрузки могут быть соединены с остатками цистеина, например, посредством обработки антитела восстанавливающим агентом, например, дитиотреитола, чтобы расщепить дисульфидные связи антитела, очистки восстановленного антитела, например, методом гель-фильтрации, с последующей обработкой антитела линкер-полезной нагрузкой, содержащей подходящую реакционноспособную группу, например, малеимидогруппу (см., например, Иллюстративную схему получения С). Подходящие растворители включают, не ограничиваясь перечисленным, воду, ДМА, ДМФ и ДМСО. Линкер-полезные нагрузки, содержащие реакционноспособную группу, например, активированный сложный эфир или галоидангидрид, могут быть соединены с остатками лизина в молекуле антитела. Подходящие растворители включают, не ограничиваясь перечисленным, воду, ДМА, ДМФ и ДМСО. Конъюгаты могут быть очищены с помощью известных методик очистки белков, включая, например, эксклюзионную хроматографию, диализ и ультрафильтрацию/диафильтрацию.

[00159] Связующие агенты, например антитела, могут быть также конъюгированы посредством химической клик-реакции. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанных химических клик-реакций линкер-полезная нагрузка включает реакционноспособную группу, например, алкин, которая способна подвергаться реакции 1,3-циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реакционноспособные группы описаны выше. Антитело содержит одну или более азидных групп. Такие антитела включают антитела, функционализированные, например, азидо-полиэтиленгликолевыми группами. В определенных вариантах осуществления изобретения такое функционализированное антитело получают посредством обработки антитела, имеющего, по меньшей мере, один остаток глутамина, например, Gln295 в тяжелой цепи, первичным амином в присутствии фермента трансглутаминазы. В определенных вариантах осуществления изобретения такое функционализированное антитело получают посредством обработки антитела, имеющего, по меньшей мере, один остаток глутамина, например, Gln297 в тяжелой цепи, первичным амином в присутствии фермента трансглутаминазы. В число таких антител входят мутанты Asn297Gln (N297Q). В определенных

вариантах осуществления изобретения такое функционализированное антитело получают посредством обработки антитела, имеющего, по меньшей мере, два остатка глутамина, например, Gln295 в тяжелой цепи и Gln297 в тяжелой цепи, первичным амином в присутствии фермента трансглутаминазы. В число таких антител входят мутанты Asn297Gln (N297Q). В определенных вариантах осуществления изобретения антитело имеет две тяжелые цепи, согласно описанию в данном абзаце, чтобы суммарно иметь два или четыре остатка глутамина.

[00160] В определенных вариантах осуществления изобретения такое функционализированное антитело получают посредством обработки антитела, имеющего, по меньшей мере, один остаток глутамина, например, Gln295 в тяжелой цепи, первичным амином или пептидной меткой в присутствии фермента трансглутаминазы. В определенных вариантах осуществления изобретения такое функционализированное антитело получают посредством обработки антитела, имеющего, по меньшей мере, один остаток глутамина, например, Gln297 в тяжелой цепи, первичным амином или пептидной меткой в присутствии фермента трансглутаминазы. В число таких антител входят мутанты Asn297Gln (N297Q). В определенных вариантах осуществления изобретения такое функционализированное антитело получают посредством обработки антитела, имеющего, по меньшей мере, два остатка глутамина, например, Gln295 в тяжелой цепи и Gln297 в тяжелой цепи, первичным амином или пептидной меткой в присутствии фермента трансглутаминазы. В число таких антител входят мутанты Asn297Gln (N297Q). В определенных вариантах осуществления изобретения антитело имеет две тяжелые цепи, согласно описанию в данном абзаце, чтобы суммарно иметь два или четыре остатка глутамина.

[00161] В одном варианте осуществления изобретения функционализированное антитело или антигенсвязывающая молекула включает тяжелая цепь антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения

функционализированное антитело или антигенсвязывающая молекула включает тяжелая цепь антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области тяжелой цепи антитела, причем пептидная метка представляет собой пентапептидную последовательность LLQGA (SEQ ID NO: 297). В варианте осуществления изобретения функционализированное антитело или антигенсвязывающая молекула включает две тяжелые цепи антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области каждой тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения функционализированное антитело или антигенсвязывающая молекула включает две тяжелые цепи антитела и дополнительно включает пептидную метку в С-терминальной области каждой тяжелой цепи антитела, причем пептидная метка представляет собой пентапептидную последовательность LLQGA (SEQ ID NO: 297).

[00162] В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит два остатка глутамина, по одному в каждой тяжелой цепи. В частных случаях изобретения, антитело содержит остаток Q295 в каждой тяжелой цепи. В других вариантах осуществления изобретения антитело содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более остатков глутамина. Эти остатки глутамина могут находиться в тяжелых цепях, легких цепях или и в тяжелых, и в легких цепях. These остаток глутамина могут представлять собой остатки дикого типа или или сконструированные остатки. Антитела могут быть получены по стандартным методикам.

[00163] Специалистам должно быть понятно, что антитела часто являются гликозилированными по остатку N297, рядом с остатком Q295 в последовательности тяжелой цепи. Гликозилирование остатка N297 может создавать препятствия для трансглутаминазы возле остатка Q295 (Dennler *et al.*, *supra*). Соответственно, желательными являются варианты осуществления изобретения, в которых антитело не гликозилировано. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело дегликозилировано или агликозилировано. В частных случаях осуществления изобретения в тяжелой цепи антитела имеется

мутация в положении N297Q. Другими словами, в результате мутации антитело утрачивает остаток аспарагина в положении 297. В частных случаях осуществления изобретения в тяжелой цепи антитела имеется мутация N297Q. Такое антитело может быть получено методом сайт-специфичного мутагенеза, который проводится для удаления или отключения последовательности гликозилирования, либо методом сайт-специфичного мутагенеза, который приводит к вставке остатка глутамина несмотря на интерферирующий участок гликозилирования или другую интерферирующую структуру. Такое антитело может быть также выделено из природных или искусственных источников.

[00164] Затем антитело, в котором отсутствует интерферирующее гликозилирование, вводят во взаимодействие с или обрабатывают первичным амином. В определенных вариантах осуществления изобретения агликозилированное антитело вводят во взаимодействие с или обрабатывают первичным амином, чтобы получить глутаминил-модифицированное антитело. В определенных вариантах осуществления изобретения дегликозилированное антитело вводят во взаимодействие с или обрабатывают первичным амином, чтобы получить глутаминил-модифицированное антитело.

[00165] В качестве первичного амина может применяться любой первичный амин, способный образовать ковалентную связь с остатком глутамина в присутствии трансглутаминазы. В настоящей заявке описаны полезные первичные амины (см. например, Иллюстративную схему получения С). В качестве трансглутаминазы может быть использована любая трансглутаминаза, представляющая собой подходящую специалисту. В определенных вариантах осуществления изобретения трансглутаминазой является фермент, который катализирует образование изопептидной связи между свободной аминной группой первичного амина и ацильной группой на боковой цепи остатка глутамина. Трансглутаминазу называют также протеин-глутамин- γ -глутамилтрансферазой. В частных случаях изобретения трансглутаминаза классифицирована, как ЕС 2.3.2.13. Может быть использована трансглутаминаза из любого источника, представляющего собой подходящим. В определенных

вариантах осуществления изобретения транsgлутаминаза имеет микробное происхождение. Полезные транsgлутаминазы были выделены из *Streptomyces tobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum*, *Streptomyces griseo-carneum*, *Streptomyces lavendulae*, и *Bacillus subtilis*. Могут быть использованы также немикробные транsgлутаминазы, включая транsgлутаминазы млекопитающих, например, немикробная транsgлутаминаза в комбинации с кофактором. В определенных вариантах осуществления изобретения транsgлутаминаза может быть получена любым способом или из любого источника, представляющегося подходящим специалисту. В частных случаях осуществления изобретения приобретают коммерческую транsgлутаминазу.

[00166] В определенных вариантах осуществления изобретения глутаминил-модифицированное антитело вводят во взаимодействие или обрабатывают реакционноспособным соединением линкер-полезная нагрузка с образованием конъюгата антитело-линкер-полезная нагрузка. Реакция может проводиться в условиях, представляющихся подходящими специалисту. В определенных вариантах осуществления изобретения глутаминил-модифицированное антитело приводят в контакт с реакционноспособным соединением линкер-полезная нагрузка в условиях, подходящих для образования связи между глутаминил-модифицированным антителом и соединением линкер-полезная нагрузка. Подходящие условия реакции хорошо известны специалистам.

Фармацевтические композиции и способы лечения

[00167] Предложены способы лечения и профилактики заболеваний, состояний или нарушений, заключающиеся во введении в терапевтически или профилактически эффективном количестве одного или более соединений, предложенных в настоящем изобретении, например, одного или более соединений по формуле, предложенной в настоящей заявке. Заболевания, нарушения и/или состояния включают, не ограничиваясь перечисленным, те их них, которые ассоциированы с описанными в настоящем документе инфекциями.

[00168] Описанные в настоящей заявке соединения могут быть введены отдельно или совместно с одним или более дополнительными

(вспомогательными) терапевтическими средствами. Одно или более дополнительное терапевтическое средство может быть введено непосредственно до, одновременно с, или вскоре после введения соединений, описанных в настоящей заявке. Настоящее изобретение включает также фармацевтические композиции, содержащие любое из описанных в настоящем документе соединений, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, и способы лечения, заключающиеся во введении таких комбинаций нуждающимся в них субъектам.

[00169] Подходящие дополнительные терапевтические средства включают, не ограничиваясь перечисленным: противовирусное лекарственное средство, такое как второе противовирусное соединение или полезную нагрузку, аутоиммунное терапевтическое средство, гормон, биологическое или моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения вспомогательное терапевтическое средство может быть выбрано из группы, включающей: противовирусное лекарственное средство, противовоспалительное лекарственное средство (например, кортикостероид или нестероидное противовоспалительное лекарственное средство), антитело, которое специфично связывается с НА вируса гриппа, вакцину против гриппа, пищевую добавку (например, антиоксидант), и паллиативную терапию для лечения инфекции гриппа. В одном варианте осуществления изобретения противовоспалительное лекарственное средство выбирают из группы, включающей кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства. В одном варианте осуществления изобретения пищевой добавкой является антиоксидант. Подходящие терапевтические средства включают также, не ограничиваясь перечисленным, любые фармацевтически приемлемые соли или производные противовирусного соединения или полезной нагрузки, перечисленных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения для введения вспомогательного терапевтического средства используют способ введения, отличный от способа введения конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции, описанных в настоящей заявке. Например, вспомогательное терапевтическое средство может быть введено

перорально. Примером антивирусного лекарственного средства, которое может быть введено в качестве дополнительного терапевтического средства, является осельтамивир. В некоторых вариантах осуществления изобретения осельтамивир вводят до введения конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения осельтамивир вводят одновременно с конъюгатом антитело-лекарственное средство, соединением или фармацевтической композицией. В некоторых вариантах осуществления изобретения осельтамивир вводят после введения конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения антивирусным лекарственным средством является лекарственное средство для лечения вирусного гриппа А или лекарственное средство для лечения вирусного гриппа В (например, антитело или антигенсвязывающая часть антитела), такое как антитело, которое специфично связывается с НА вируса гриппа А, или антитело, которое специфично связывается с НА вируса гриппа В.

[00170] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящей заявке, субъекту в течение определенного периода времени могут многократно вводиться дозы соединения, описанного в настоящей заявке (или фармацевтической композиция, содержащей комбинацию описанного в настоящей заявке соединения с любым дополнительными терапевтическим средством, упоминаемым в настоящей заявке). Способы согласно данному варианту осуществления изобретения включают последовательное введение субъекту повторных доз описанного в настоящей заявке соединения. Настоящее изобретение включает способы, заключающиеся в последовательном введении пациенту одной начальной дозы соединения, описанного в настоящей заявке, с последующим введением одной или более доз второй очереди этого соединения с последующим необязательным введением одной или более доз третьей очереди соединения. Иллюстративные дозы соединения по настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, 50 мг/кг, 49 мг/кг, 48 мг/кг, 47 мг/кг, 46 мг/кг, 45 мг/кг, 44 мг/кг, 43 мг/кг, 42 мг/кг, 41 мг/кг, 40 мг/кг, 39 мг/кг, 38 мг/кг, 37 мг/кг, 36 мг/кг, 35 мг/кг, 34 мг/кг, 33 мг/кг, 32 мг/кг, 31 мг/кг, 30 мг/кг, 29 мг/кг,

28 мг/кг, 27 мг/кг, 26 мг/кг, 25 мг/кг, 24 мг/кг, 23 мг/кг, 22 мг/кг, 21 мг/кг, 20 мг/кг, 19 мг/кг, 18 мг/кг, 17 мг/кг, 16 мг/кг, 15 мг/кг, 14 мг/кг, 13 мг/кг, 12 мг/кг, 11 мг/кг, 10 мг/кг, 9 мг/кг, 8 мг/кг, 7 мг/кг, 6 мг/кг, 5 мг/кг, 4 мг/кг, 3 мг/кг, 2 мг/кг, 1 мг/кг, 0,9 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,1 мг/кг, и 0,05 мг/кг.

[00171] В определенных вариантах осуществления изобретения количество соединения, содержащегося в начальной дозе, дозах второй очереди и/или третьей очереди варьирует в ходе лечения (например, корректируется в сторону повышения или снижения, в зависимости от ситуации). В определенных вариантах осуществления изобретения в начале схемы лечения вводят две или более (*например*, 2, 3, 4, или 5) «насыщающие дозы» с последующим менее частым введением доз (*например*, «поддерживающих доз»).

[00172] В определенных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения каждую дозу второй и/или третьей очереди вводят через 1-26 (*например*, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, или более) недели после непосредственно предшествовавшей дозы.

[00173] Способы по этому варианту осуществления изобретения могут включать в введение пациенту любого количества доз соединения второй и/или третьей очереди. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения пациенту вводят только одну дозу второй очереди. В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или более (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, или более) дозы второй очереди. Аналогично, в определенных вариантах осуществления изобретения пациенту вводят только одну дозу третьей очереди. В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или более (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, или более) дозы третьей очереди. Схема введения может применяться в течение неопределенного времени в ходе жизни определенного субъекта или до тех пор, пока лечение не перестанет быть необходимым или полезным.

[00174] В вариантах осуществления изобретения, предусматривающих многократное введения доз второй очереди, частота введения может быть одинаковой для всех доз второй очереди. Например, каждая доза второй очереди может быть введена пациенту через 1-2 недели или через 1-2 месяца после непосредственно предшествовавшей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления изобретения, предусматривающих многократное введение доз третьей очереди, частота введения может быть одинаковой для всех доз третьей очереди. Например, каждая доза третьей очереди может быть введена пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествовавшей дозы. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения частота введения пациенту доз второй и/или третьей очереди может варьировать в схеме лечения. Частота введения может быть также скорректирована врачом в ходе лечения после клинического обследования в зависимости от индивидуальных потребностей пациента.

[00175] Настоящее изобретение включает схемы введения, в соответствии с которыми пациенту вводят от 2 до 6 насыщающих доз с первой частотой введения (*например*, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца и т.д.) с последующим введением пациенту двух или более поддерживающих доз с меньшей частотой. Например, согласно данному варианту настоящего изобретения, если насыщающие дозы вводят с частотой один раз в месяц, то поддерживающие дозы могут вводиться пациенту один раз в шесть недель, один раз в два месяца, один раз в три месяца и т.д.

[00176] Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие соединения и/или конъюгаты, описанные в настоящей заявке, *например*, конъюгаты антитело-лекарственное средство соединений по Формулам I и II, *например*, композиции, содержащие описанное в настоящей заявке соединение, его соль, стереоизомер, региоизомер, полиморф, и фармацевтические приемлемый носитель, разбавитель и/или вспомогательное вещество. Примеры подходящих носителей, разбавителей и вспомогательных веществ включают, не ограничиваясь перечисленным, буферы для поддержания

надлежащего рН композиции (*например*, цитратные буферы, сукцинатные буферы, ацетатные буферы, фосфонатные буферы, лактатные буферы, оксалатные буферы и т.п.), белки-носители (*например*, человеческий сывороточный альбумин), солевой раствор, полиолы (*например*, трегалозу, сахарозу, ксилитол, сорбитол и т.п.), поверхностно-активные вещества (*например*, полисорбат 20, полисорбат 80, полиоксалат и т.п.), антибактериальные средства и антиоксиданты.

[00177] В определенных вариантах осуществления изобретения соединения или полезные нагрузки, линкер-полезные нагрузки, ADC, или содержащие их композиции, могут быть обеспечены с помощью альтернативных способов введения. В определенных вариантах осуществления изобретения способ введения композиции(ий) выбирают из группы, включающей подкожный, внутрикожный, внутримышечный, пероральный, внутривенный, внутривенный, ингаляционный и интраназальный способы введения. В одном варианте осуществления изобретения для введения композиции(ий) используется пероральный способ введения. В одном варианте осуществления изобретения для введения композиции(ий) используется внутривенный способ введения. В одном варианте осуществления для введения композиции(ий) используется внутривенный способ введения. В одном варианте осуществления для введения композиции(ий) используется ингаляционный способ введения. В одном варианте осуществления для введения композиции(ий) используется интраназальный способ введения.

[00178] В некоторых примерах изложены способы лечения, профилактики, уменьшения тяжести или подавления заболевания, нарушения или состояния, ассоциированного с инфекцией, у субъекта, заключающийся во введении субъекту в эффективном количестве соединения по Формуле I и/или II, линкер-полезной нагрузки, описанной в настоящей заявке, и/или ADC, описанного в настоящей заявке, включающих их комбинаций или содержащих их фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция представляет собой вирусную инфекцию. В некоторых

вариантах осуществления изобретения инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция вызвана вирусом гриппа А. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция вызвана вирусом гриппа В. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция вызвана вирусом гриппа А и вирусом гриппа В. В определенных вариантах осуществления изобретения побочные эффекты, ассоциированные с введением субъекту конъюгированной полезной нагрузки, уменьшаются, когда сопоставимому субъекту вводят конъюгированную полезную нагрузку или ADC.

[00179] Предложенные в настоящем изобретении соединения могут быть использованы также для лечения, профилактики, уменьшения тяжести или подавления инфекции гриппа у субъекта, заключающегося во введении субъекту в эффективном количестве конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А группы 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А Н1. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А группы 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А Н3. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана неизвестным или не определенным вирусом гриппа. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа В. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А и вирусом гриппа В. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А, вирусом гриппа А группы 1, вирусом гриппа А Н1, вирусом гриппа А группы 2, вирусом гриппа А Н3, неизвестным или не определенным вирусом гриппа, вирусом гриппа В, или любой комбинацией этих вирусов.

ПРИМЕРЫ

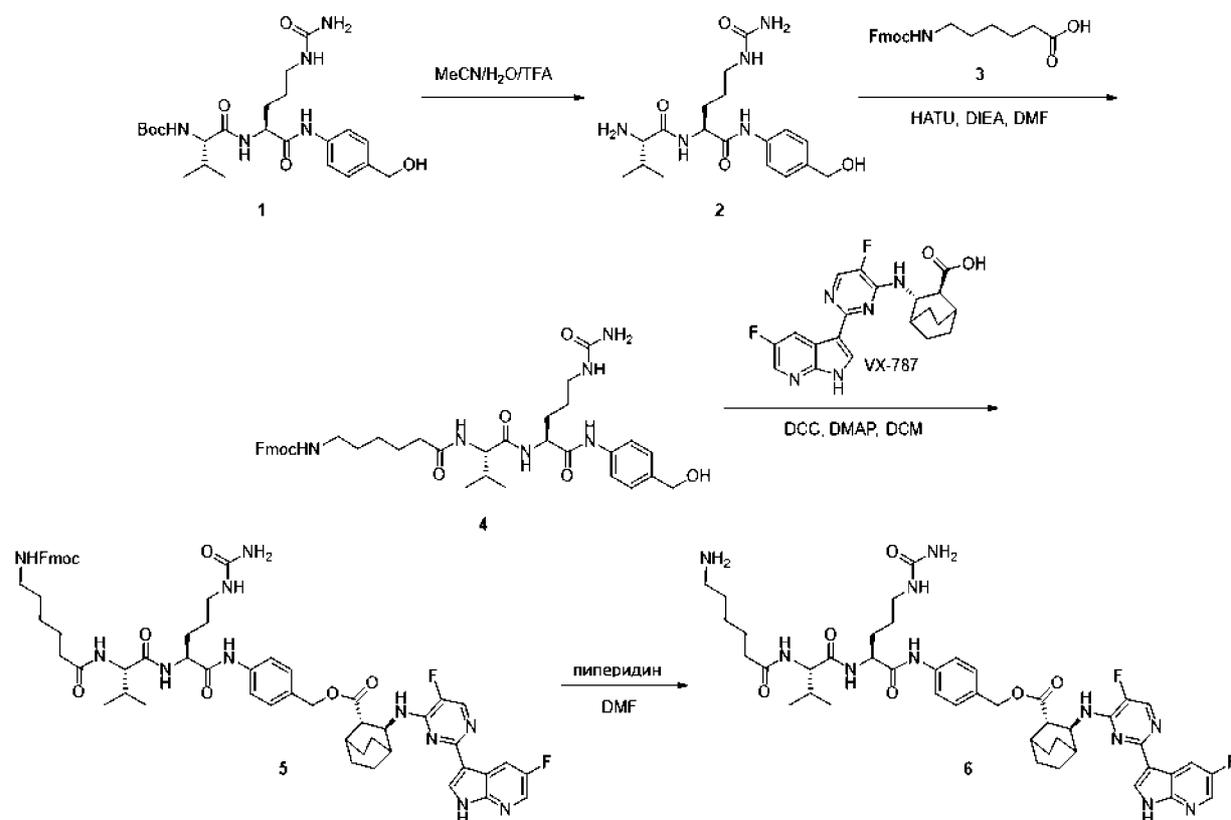
[00180] Предложены VX-787 и его производные, балоксавир и его производные, балоксавира марбоксил и его производные, конъюгаты этих соединений с белком и способы лечения заболеваний, нарушений и состояний, включающие введение VX-787, балоксавира, и балоксавира марбоксила и образованных этими соединениями конъюгатов.

Пример 1: Синтез линкер-полезной нагрузки

[00181] В качестве полезных нагрузок для доставки антитела к гемагглютинуину использовали VX-787 и балоксавир. Для того чтобы проверить эффекты различных линкеров в комбинации с VX-787 или балоксавиром, были синтезированы линкер-полезные нагрузки, как указано ниже (линкер-(VX-787)): Соединение **6** и Соединение **11**; линкер-балоксавир: Соединение **15**). Все применявшиеся растворители были приобретены у поставщиков Sigma Aldrich или Fisher Scientific и использованы «как есть». Для регистрации ¹H-спектров использовали ЯМР-спектрометры Varian Inova 300 МГц и 500 МГц. Химические сдвиги (δ) выражены в ppm по отношению к использованному для анализа растворителем для ЯМР, и представлены следующим образом: s — синглет, d — дублет, t — триплет, q — квартет, dd — двойной дублет, dt — двойной триплет, dq — двойной квартет и m — мультиплет. Константы взаимодействия (J) выражены в герцах (Гц). Для определения хроматографической числоты использовали системы для ЖХ/МС Agilent 1100, 1260 Infinity, оснащенные 6130 Quadrupole ЖХ/МС, или 1200 Series ЖХ/МС с аналитическими колонками Chromolith® FastGradient RP-18e (50×2 мм, Merck KGaA, P/N 1,52007,0001) и следующую аналитическую методику ВЭЖХ: объем пробы 2-10 мкл; скорость потока элюента 1 мл/мин; 5-95% смесь ацетонитрила в воде в течение 4 мин; диодно-матричный детектор Agilent при длине волны $\lambda=254$ нм; при комнатной температуре. Для масс-спектрометрии низкого разрешения на системах Agilent использовали источники ионизации электрораспылением, и для анализа данных — одиночный квадрупольный детектор или масс-спектрометрический детектор с ионной ловушкой.

[00182] Соединение **6** было синтезировано из VX-787, как показано ниже на Схеме 1.

Схема 1



[00183] Соединение 2: Соединение 2 было получено при использовании международной заявки согласно РСТ 2014145090, *tert*-бутил((*S*)-1-(((*S*)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат 1 (700 мг, 1,46 ммоль) растворяли в смеси $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (3:1:1 = v/v/v, 6 мл/2 мл/2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 19 ч, и контролировали с помощью ЖХ/МС. После концентрирования в вакууме неочищенный продукт 2 (соль, 0,5 г) сразу же использовали на следующей стадии без очистки. МС (ионизация электрораспылением, (ИЭР), положительный ион (пол. ион)): рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_4$, 379,2; обнаружено 380,2 ($\text{M}+\text{H}$).

[00184] Соединение 4: Соединение 2 (100 мг, 0,263 ммоль), 6-(флуоренилметоксикарбонил)-амино) капроновую кислоту 3 (93 мг, 0,263 ммоль), 1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний 3-оксид гексафторфосфат (HATU, 200 мг, 0,526 ммоль), и 1-гидрокси-7-

азабензотриазол (HOAt, 35 мг, 0,263 ммоль) вносили в высушенную в термостате 2 мензурку. Затем добавляли безводный DMF (2 мл), и реакционную смесь выдерживали в течение 5 мин при температуре окружающей среды, после чего добавляли по каплям из шприца *N,N*-диизолпропилэтиламин (DIEA, 137 мкл, 0,789 ммоль). Гомогенный раствор желтого цвета перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре в атмосфере азота, и завершение реакции контролировали методом ЖХ/МС. Реакционную смесь очищали на колонке C18 Aq Gold (50 г) (градиентное элюирование смесью 10-95% MeCN в воде, оба растворителя содержали 0,05% уксусной кислоты) в течение 20 мин. Чистые фракции объединяли, замораживали в сухом льду и лиофилизировали, получая указанное в заголовке Соединение 4, представлявшее собой твердое белое вещество (120 мг, 65%). МС: рассчитано для $C_{39}H_{50}N_6O_7$, 714,3; обнаружено 715,3 (M+H), 737,3 (M+Na).

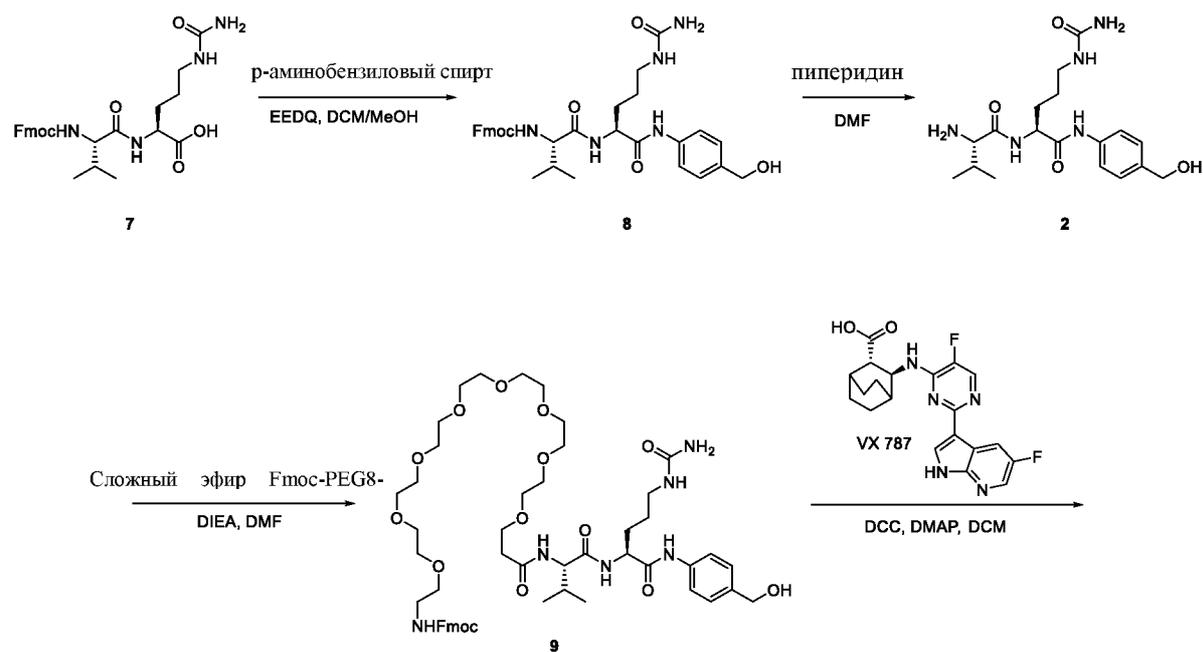
[00185] Соединение 5: Соединение 4 (39,4 мг, 0,055 ммоль) и 4-диметиламинопиридин (DMAP, 5 мг, 0,039 ммоль) добавляли в атмосфере аргона в перемешиваемую суспензию VX-787 (22 мг, 0,055 ммоль) в безводном THF (6 мл) при комнатной температуре. Затем в реакционную смесь по каплям добавляли раствор *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида (DCC, 17 мг, 0,083 ммоль) в безводном THF (2 мл). После перемешивания в течение 16 ч смесь выпаривали досуха, и остаток растворяли в 3 мл DMSO. Неочищенный материал очищали на колонке C18 Aq Gold (50 г) (градиентное элюирование смесью 10-95% MeCN в воде, оба растворителя содержали 0,05% уксусной кислоты). Фракции продукта объединяли, замораживали в сухом льду и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение 5, представлявшее собой твердое белое вещество (38 мг, 63%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{59}H_{67}F_2N_{11}O_8$, 1095,5; обнаружено 1096,4 (M+H).

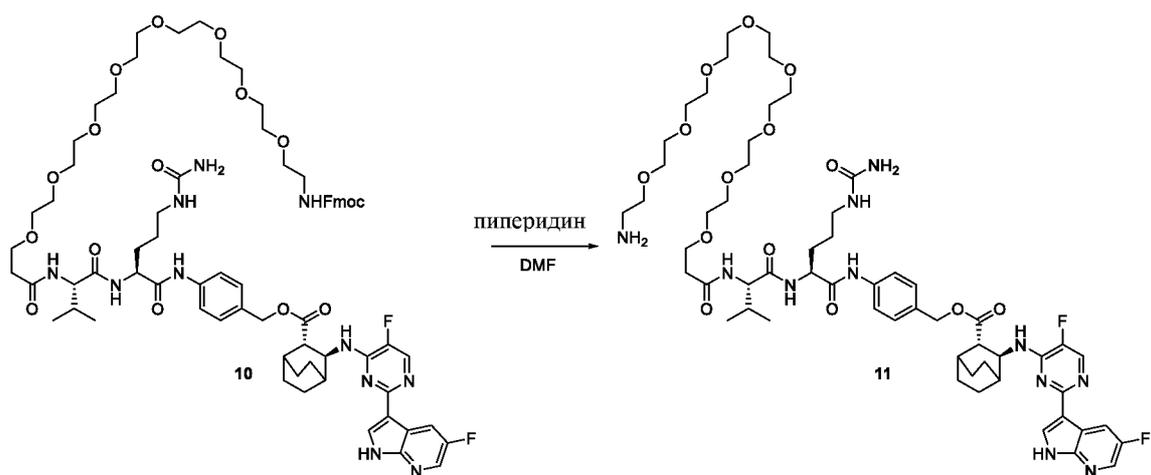
[00186] Соединение 6: 5% раствор пиперидина (0,8 мл) в DMF добавляли к перемешиваемому раствору Соединения 5 (33 мг, 0,0301 ммоль) в *N,N*-диметилформамиде (DMF, 1 мл) в атмосфере аргона при температуре окружающей среды в течение 30 мин, и полученный раствор перемешивали.

Завершение реакции подтверждали методом ЖХ/МС. Реакционную смесь сразу очищали на колонке C18 Aq Gold (30 г) с помощью системы ISCO (градиентное элюирование смесью 10-95% MeCN в воде, оба растворителя содержали 0,05% уксусной кислоты, в течение 30 мин). Содержащие продукт фракции объединяли, замораживали в сухом льду, и лиофилизировали в течение ночи, чтобы получить указанное в заголовке Соединение 6, представлявшее собой твердое вещество серовато-желтоватого цвета (22 мг, 85%). МС: рассчитано для C₄₄H₅₇F₂N₁₁O₆, 873,4; обнаружено 874,4 (M+H). ¹H-ЯМР (500 МГц; DMSO-*d*₆): δ 9,97 (s, 1H), 8,50 (dd, *J* = 9,8, 2,8 Гц, 1H), 8,28 (dd, *J* = 2,5, 1,2 Гц, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,16 (d, *J* = 3,9 Гц, 1H), 8,11-8,09 (m, 1H), 7,84 (dd, *J* = 1,6, 0,9 Гц, 1H), 7,62 (d, *J* = 6,9 Гц, 1H), 7,54 (d, *J* = 8,5 Гц, 2H), 7,23 (d, *J* = 8,5 Гц, 2H), 6,02-6,00 (m, 1H), 5,43 (d, *J* = 0,3 Гц, 2H), 5,09 (d, *J* = 12,5 Гц, 1H), 5,00 (d, *J* = 12,5 Гц, 1H), 4,77-4,74 (m, 1H), 4,38-4,36 (m, 1H), 4,19 (dd, *J* = 8,5, 7,2 Гц, 1H), 3,03-2,94 (m, 4H), 2,17 (d, *J* = 11,5 Гц, 2H), 1,99-1,95 (m, 3H), 1,85 (s, 2H), 1,81-1,78 (m, 2H), 1,73-1,71 (m, 4H), 1,50-1,47 (m, 8H), 1,39-1,34 (m, 4H), 1,26-1,23 (m, 2H), 0,85 (dd, *J* = 12,7, 6,8 Гц, 6H).

[00187] Соединение 11 было синтезировано из VX-787, как описано ниже на Схеме 2.

Схема 2





[00188] Соединение **8**: *N*-Этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин (EEDQ, 1,99 г, 8,05 ммоль) добавляли к раствору *p*-аминобензилового спирта (0,99 г, 8,05 ммоль) в дихлорметане (19 мл) и метаноле (7,6 мл) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 5 мин в одну порцию добавляли Fmoc-валин-цитруллин **7** (2,0 г, 4,03 ммоль), и полученный раствор перемешивали в течение 18 часов. Летучие компоненты удаляли в вакууме, и остаток растирали с простым эфиром (20 мл) и последовательно промывали простым эфиром (20 мл), этиловым эфиром уксусной кислоты (20 мл), и простым эфиром (20 мл), чтобы получить указанное в заголовке Соединение **8** (2,2 г, выход 98%), в виде твердого светло-желтого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₃₃H₃₉N₅O₆, 601,29; обнаружено 602,3 (M+H).

[00189] Соединение **2**: Во флаконе вместимостью 20 мл Fmoc-валин-цитруллин-РАВ(ОН) **8** (2,0 г, 3,33 ммоль) растворяли в 5% растворе пиперидина в DMF (10 мл) и перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Осадок удаляли с помощью фильтрования, и фильтрат очищали на колонке C18 Aq 100 г, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% TFA). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали. Лيوфилизированное твердое вещество повторно очищали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **2** (0,98 г, выход 61%), представлявшее собой рыхлое твердое серовато-желтоватое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₁₈H₂₉N₅O₄, 379,22; обнаружено 380,2 (M+H).

[00190] Соединение **9**: DIEA (40 мкл, 0,22 ммоль) добавляли к раствору валин-цитруллин-РАВ(ОН)*ТФА соли **2** (100 мг, 0,2 ммоль) и сложного эфира Fmoc-PEG8-NHS (167 мг, 0,22 ммоль) в безводном DMF (2 мл), и перемешивали в течение 45 мин. Реакционную смесь контролировали с помощью ЖХ/МС и очищали на колонке С18 Аq 100 г, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **8** (145 мг, 71%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₅₂H₇₆N₆O₁₅, 1024,54; обнаружено 1025,5 (M+H).

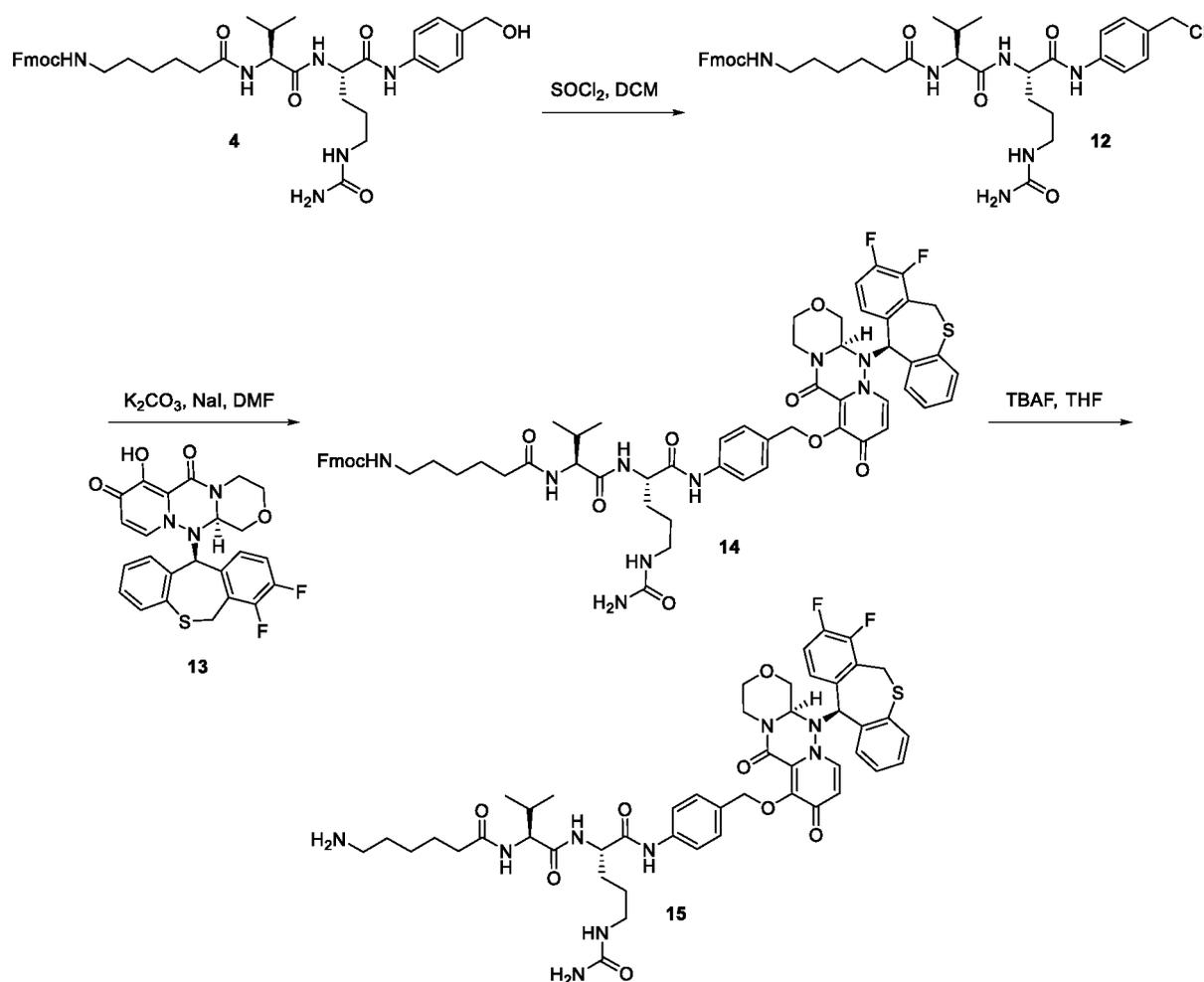
[00191] Соединение **10**: Раствор DCC (18,6 мг, 0,09 ммоль) в дихлорметане (3 мл) при комнатной температуре добавляли по каплям в суспензию Fmoc-PEG8-валин-цитруллин-РАВ(ОН) **9** (61,8 мг, 0,06 ммоль), VX-787 (24 мг, 0,06 ммоль) и DMAP (7,2 мг, 0,06 ммоль) в безводном дихлорметане (12 мл) при комнатной температуре, и перемешивали в течение 16 ч. Летучие вещества удаляли в вакууме, и остаток очищали на колонке С18 Аq 50 г, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали чтобы получить указанное в заголовке Соединение **10** представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета (50 мг, выход 51%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₇₂H₉₃F₂N₁₁O₁₆, 1405,68; обнаружено 1406,6 (M+H).

[00192] Соединение **11**: 5% раствор пиперидина в DMF (0,8 мл) добавляли к раствору Соединения **10** (50 мг, 0,035 ммоль) в безводном DMF (1,6 мл) и перемешивали в течение 40 мин перед очисткой на колонке С18 Аq 50 г, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **11** (43 мг, выход 95%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₅₇H₈₃F₂N₁₁O₁₄, 1183,61; обнаружено 1184,6 (M+H). ¹H-ЯМР (500 МГц; DMSO-*d*₆): δ 9,95 (s, 1H), 8,48 (dd,

$J = 9,6, 2,1$ Гц, 1H), 8,27 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,15 (d, $J = 3,6$ Гц, 1H), 8,10 (d, $J = 7,9$ Гц, 1H), 7,86 (d, $J = 8,3$ Гц, 1H), 7,60 (dd, $J = 6,7, 0,5$ Гц, 1H), 7,52 (d, $J = 8,3$ Гц, 2H), 7,22 (d, $J = 8,4$ Гц, 2H), 5,97 (t, $J = 4,8$ Гц, 1H), 5,40 (s, 2H), 5,08 (d, $J = 12,7$ Гц, 1H), 4,99 (d, $J = 12,5$ Гц, 1H), 4,75 (t, $J = 6,1$ Гц, 1H), 4,36 (q, $J = 6,7$ Гц, 1H), 4,22 (t, $J = 7,9$ Гц, 1H), δ 3,59 (q, $J = 5,6$ Гц, 2H), 3,5 (s, 30H), 3,35 (t, $J = 5,7$ Гц, 3H), 3,01-3,00 (m, 1H), 2,96-2,92 (m, 2H), 2,64 (dt, $J = 9,4, 4,4$ Гц, 2H), 2,39-2,35 (m, 1H), 1,97-1,94 (m, 2H), 1,88 (s, 1H), 1,81-1,57 (m, 6H), 1,50-1,35 (m, 6H), 0,84 (dd, $J = 15,4, 6,7$ Гц, 6H).

[00193] Синтез Соединения **15** из (R)-12-((S)-7,8-дифтор-6,11-дигидродibenzo[b,e]тиепин-11-ил)-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-диона **13** описан ниже на Схеме 3.

Схема 3



[00194] Соединение **12**: Тионилхлорид (11,8 мг, 0,1 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору Fmoc-Car-валин-цитруллин-PAВ(OH) **4** (61,2 мг, 0,086 ммоль) в безводном дихлорметане (1 мл), при комнатной температуре и перемешивали в течение 1 ч. После того как исходный материал был израсходован, летучие вещества удаляли в вакууме, и остаток очищали на колонке C18 Aq 30 г, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **12**, представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета (38 мг, выход 60%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₃₉H₄₉ClN₆O₆, 732,3; обнаружено 733,3 (M+H).

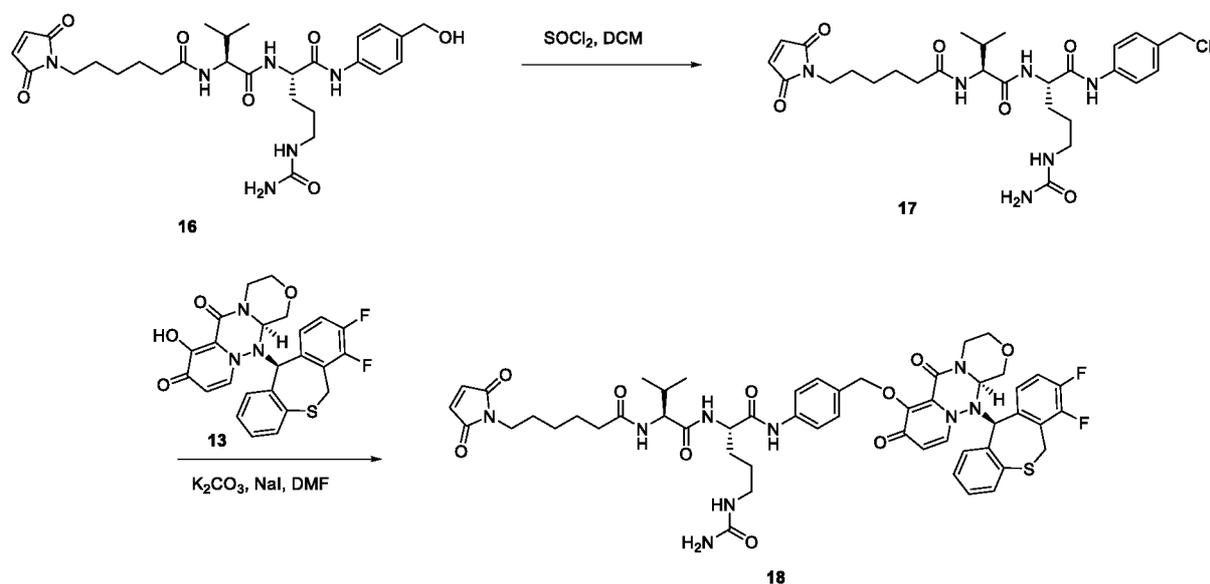
[00195] Соединение **14**: K₂CO₃ (28 мг, 0,20 ммоль) и NaI (6 мг, 0,041 ммоль) добавляли к раствору (1 мл) (R)-12-((S)-7,8-дифтор-6,11-дигидродibenzo[b,e]тиепин-11-ил)-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-диона **13** (20 мг, 0,041 ммоль) и Fmoc-Car-валин-цитруллин-PAВ-Cl (40 мг, 0,052 ммоль) в DMF, и смесь нагревали до 65°C в течение 40 минут. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и очищали на колонке C18 Aq 30 г, используя смесь 5-60% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% уксусной кислоты). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали чтобы получить указанное в заголовке Соединение **14** представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета (40 мг, выход 83%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₆₃H₆₇F₂N₉O₁₀S, 1179,5; обнаружено 1180,3 (M+H).

[00196] Соединение **15**: 1 М раствор TBAF в THF (21 мкл, 0,021 ммоль) добавляли по каплям к раствору соединения **14** (25 мг, 0,021 ммоль) в THF (1,5 мл) и перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Летучие вещества удаляли в вакууме, и остаток очищали колонке C18 Aq 30 г, используя смесь 5-60% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% уксусную кислоту). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали чтобы получить

указанное в заголовке Соединение **15** (14 мг, 70%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{48}H_{57}F_2N_9O_8S$, 957,4; обнаружено 958,3 (M+H). 1H -ЯМР (500 МГц; $DMSO-d_6$): δ 10,04 (s, 1H), 8,14 (d, $J = 7,5$ Гц, 1H), 7,85 (d, $J = 8,0$ Гц, 1H), 7,61 (d, $J = 8,5$ Гц, 2H), 7,48 (d, $J = 8,5$ Гц, 2H), 7,41 (d, $J = 6,6$ Гц, 2H), 7,20 (d, $J = 7,7$ Гц, 1H), 7,14-7,12 (t, $J = 7,5$ Гц, 1H), 7,07 (d, $J = 7,4$ Гц, 1H), 6,86 (d, $J = 7,7$ Гц, 1H), 6,75 (t, $J = 7,0$ Гц, 1H), 6,02 (t, $J = 4,5$ Гц, 1H), 5,71 (s, 1H), 5,67 (d, $J = 7,7$ Гц, 1H), 5,46-5,40 (m, 3H), 5,23 (d, $J = 10,7$ Гц, 1H), 5,05 (d, $J = 10,7$ Гц, 1H), 4,47-4,37 (m, 3H), 4,20-4,17 (m, 1H), 4,05 (d, $J = 14,4$ Гц, 1H), 3,96-3,94 (m, 1H), 3,66-3,63 (m, 1H), 3,21-3,15 (m, 2H), 3,03-2,88 (m, 4H), 2,20-2,09 (m, 2H), 2,00-1,96 (m, 1H), 1,72 (s, 3H), 1,62-1,54 (m, 3H), 1,51-1,41 (m, 3H), 1,38-1,27 (m, 5H), 1,26-1,21 (m, 3H), 0,94 (t, $J = 7,4$ Гц, 2H), 0,84 (dd, $J = 14,1, 6,7$ Гц, 6H).

[00197] Синтез Соединения **18** из (*R*)-12-((*S*)-7,8-дифтор-6,11-дигидродibenzo[b,e]тиепин-11-ил)-7-гидрокси-3,4,12,12а-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-диона (**13**) описан ниже на Схеме 4.

Схема 4



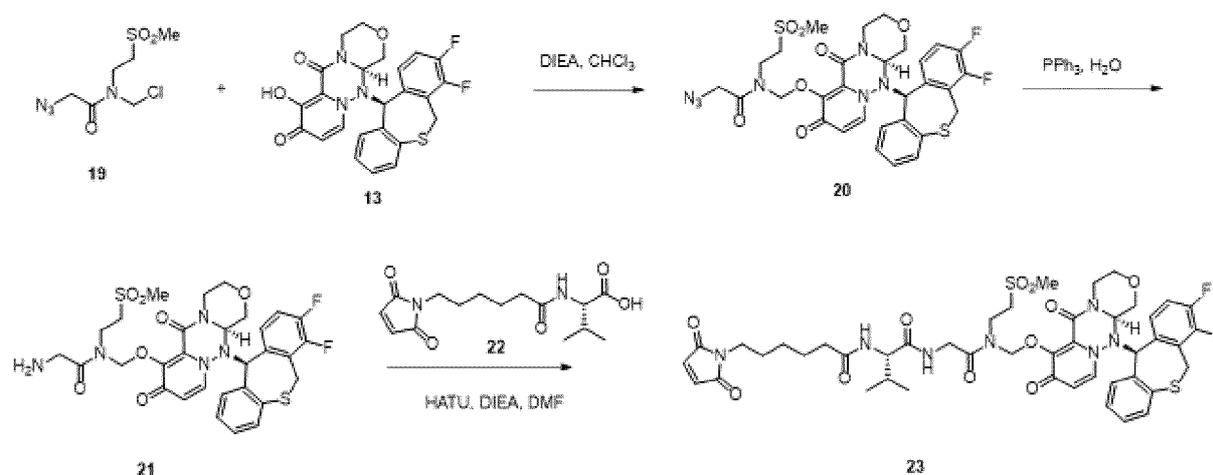
[00198] Соединение **17**: Тионилхлорид (9 мкл, 0,122 ммоль) добавляли к суспензии Mal-car-Val-Cit-PAВ-ОН (**16**) (35 мг, 0,061 ммоль) в безводном DCM (3 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и азеотропно сушили

в присутствии толуола (4 мл), затем использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{26}H_{39}ClN_6O_6$, 590,3; обнаружено 591,3 М+Н).

[00199] Соединение **18**: K_2CO_3 (41,5 мг, 0,3 ммоль) и иодид натрия (9 мг, 0,06 ммоль) добавляли к раствору (*R*)-12-((*S*)-7,8-дифтор-6,11-дигидродibenzo[*b,e*]тиепин-11-ил)-7-гидрокси-3,4,12,12а-тетрагидро-1Н-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-*f*][1,2,4]триазин-6,8-диона (**13**) (23 мг, 0,048 ммоль) и Mal-car-Val-Cit-PAВ-Cl (**17**) (35 мг, 0,06 ммоль) в DMF (2 мл). Реакционную смесь нагревали до 60°C в течение 1 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и очищали на колонке С18 Аq 30г, используя смесь 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **18** (28 мг, 57%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{52}H_{57}F_2N_9O_{10}S$, 1037,4; обнаружено 1038,3 (М+Н). ¹Н-ЯМР (300 МГц; DMSO-*d*₆): δ 10,00 (s, 1H), 8,08 (d, *J* = 7,7 Гц, 1H), 7,80 (d, *J* = 8,7 Гц, 1H), 7,61 (d, *J* = 8,6 Гц, 2H), 7,49 (d, *J* = 8,6 Гц, 2H), 7,43-7,39 (m, 2H), 7,21 (d, *J* = 7,8 Гц, 1H), 7,13-7,06 (m, 2H), 7,01 (s, 2H), 6,87 (dd, *J* = 7,8, 1,0 Гц, 1H), 6,76 (td, *J* = 7,2, 1,5 Гц, 1H), 5,97 (t, *J* = 5,6 Гц, 1H), 5,72 (s, 1H), 5,68 (d, *J* = 7,7 Гц, 1H), 5,45-5,42 (m, 3H), 5,24 (d, *J* = 10,8 Гц, 1H), 5,06 (d, *J* = 10,8 Гц, 1H), 4,49-4,39 (m, 3H), 4,20 (dd, *J* = 8,5, 6,8 Гц, 1H), 4,06 (d, *J* = 14,3 Гц, 1H), 3,96 (dd, *J* = 10,7, 2,5 Гц, 1H), 3,66 (dd, *J* = 11,3, 2,6 Гц, 1H), 3,04-2,89 (m, 3H), 2,15 (dt, *J* = 10,1, 7,3 Гц, 2H), 1,97 (q, *J* = 6,8 Гц, 1H), 1,70-1,58 (m, 2H), 1,53-1,44 (m, 5H), 1,22 (m, 3H), 0,87-0,81 (m, 6H).

[00200] Синтез Соединения **23** из (*R*)-12-((*S*)-7,8-дифтор-6,11-дигидродibenzo[*b,e*]тиепин-11-ил)-7-гидрокси-3,4,12,12а-тетрагидро-1Н-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-*f*][1,2,4]триазин-6,8-диона (**13**) показан ниже на Схеме 5.

Схема 5



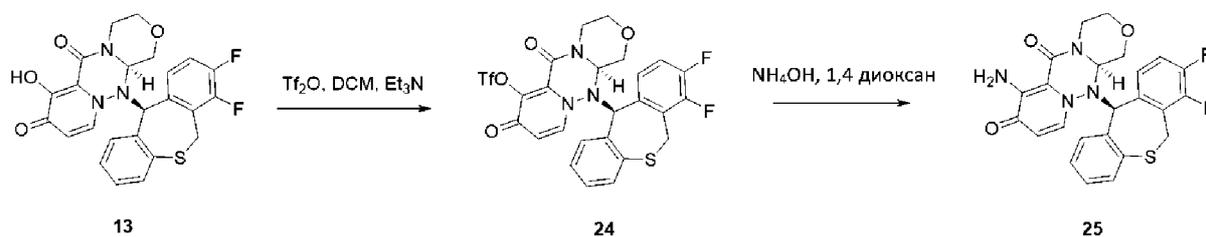
[00201] Соединение **20**: DIEA (41 мкл, 0,236 ммоль) добавляли к раствору (0,5 мл) (R)-12-((S)-7,8-дифтор-6,11-дигидродибензо[b,e]тиепин-11-ил)-7-гидрокси-3,4,12,12а-тетрагидро-1Н-[1,4]оксаино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-диона (**13**) (30 мг, 0,044 ммоль) в хлороформе и соединению **19** (28,5 мг, 0,059 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 ч, затем очищали на колонке с кварцевым золотом 4 г, используя 0-5% смесь MeOH/DCM, чтобы получить Соединение **20** (31 мг, 75%), представлявшее собой бесцветное твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₃₀H₂₉F₂N₇O₇S₂, 701,2; обнаружено 702,1 (M+H).

[00202] Соединение **21**: Трифенилфосфин (28,8 мг, 0,11 ммоль) добавляли к раствору Соединения **20** (31 мг, 0,044 ммоль) в соотношении 10:1 THF/H₂O (0,88 мл). После перемешивания в течение 24 ч при комнатной температуре реакционную смесь концентрировали досуха и очищали на колонке C18 Aq 5,5 г, используя смесь 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH), чтобы получить Соединение **21** (20 мг, 68%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₃₀H₃₁F₂N₅O₇S₂, 675,2; обнаружено 676,1 (M+H).

Соединение **23**: HATU (28,5 мг, 0,075 ммоль) и DIEA (13 мкл, 0,075 ммоль) добавляли к раствору (1,0 мл) Соединения **21** (20 мг, 0,030 ммоль) и Mal-car-Val-OH (**22**) (27,5 мг, 0,089 ммоль) в DMF. После перемешивания в течение 1 ч реакционную смесь очищали на колонке C18 Aq 30 г, используя смесь 5-95%

MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **23** (4,5 мг, 16%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₄₅H₅₁F₂N₇O₁₁S₂, 967,3; обнаружено 968,2 (M+H). ¹H-ЯМР (500 МГц; acetone-d₆): δ 7,63 (d, *J* = 5,0 Гц, 1H), 7,53-7,51 (m, 1H), 7,40 (d, *J* = 7,8 Гц, 1H), 7,32 (dd, *J* = 8,9, 8,5 Гц, 1H), 7,19 (t, *J* = 7,3 Гц, 1H), 7,14 (t, *J* = 7,6 Гц, 2H), 7,07 (d, *J* = 4,6 Гц, 1H), 6,94 (t, *J* = 7,1 Гц, 1H), 6,86 (s, 2H), 5,88 (s, 1H), 5,79 (d, *J* = 7,7 Гц, 1H), 5,67-5,64 (m, 1H), 5,58 (d, *J* = 10,2 Гц, 1H), 5,36 (d, *J* = 10,3 Гц, 1H), 4,70 (dd, *J* = 9,5, 1,8 Гц, 1H), 4,63-4,61 (m, 1H), 4,52 (dd, *J* = 14,5, 5,1 Гц, 2H), 4,42-4,41 (m, 1H), 4,17-4,12 (m, 2H), 4,08-4,06 (m, 2H), 3,71 (t, *J* = 10,2 Гц, 2H), 3,61-3,59 (m, 1H), 3,54-3,42 (m, 5H), 3,05 (s, 3H), 3,02-3,01 (m, 1H), 2,29 (q, *J* = 6,7 Гц, 3H), 2,19 (m, *J* = 6,3 Гц, 1H), 1,67-1,57 (m, 4H), 1,31 (m, 5H), 0,97 (dd, *J* = 14,5, 6,7 Гц, 6H).

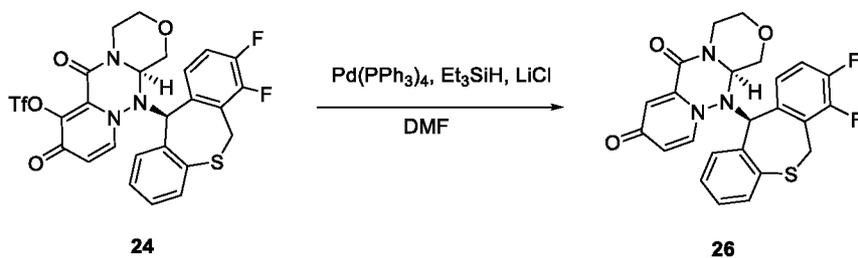
Схема 6



[00203] Соединение **24**: Триэтиламин (17 мкл, 0,12 ммоль), трифторметансульфоновый ангидрид (20 мкл, 0,12 ммоль) и DMAP (0,7 мг, 0,006 ммоль) добавляли к раствору DCM (2 мл) (R)-12-((S)-7,8-дифтор-6,11-дигидродибензо[*b,e*]тиепин-11-ил)-7-гидрокси-3,4,12,12а-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-*c*]пиридо[2,1-*f*][1,2,4]триазин-6,8-диона (**13**) (29 мг, 0,06 ммоль) в DCM при 0°C. После перемешивания в течение 1 ч реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали на колонке с кварцевым золотом 4 г, используя этиловый эфир уксусной кислоты/гексаны, чтобы получить Соединение **24** (24 мг, 66%), представлявшее собой твердое вещество желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₂₅H₁₈F₅N₃O₆S₂, 615,1; обнаружено 616,0 (M+H).

[00204] Соединение **25**: В лампу СВЧ вносили трифлат **24** (24 мг, 0,04 ммоль) в безводном 1,4-диоксане (1 мл) и добавляли водный раствор гидроксида аммония (0,4 мл). Реакционную смесь нагревали до 80 °С в течение 48 ч. Затем растворители удаляли при сниженном давлении, и остаток очищали на колонке С18 Аq 15,5 г, используя смесь 5-95% MeCN/вода (оба растворителя содержали 0,05% АсОН). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **25** (18,3 мг, 75%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₂₄H₂₀F₂N₄O₃S, 482,1, обнаружено 483,1 (M+H). ¹H-ЯМР (500 МГц; CDCl₃): δ 7,82-7,80 (m, 1H), 7,12-7,07 (m, 3H), 7,03-7,00 (m, 2H), 6,82 (td, *J* = 7,1, 2,1 Гц, 1H), 6,70 (d, *J* = 7,3 Гц, 1H), 6,06-6,03 (m, 1H), 5,57 (d, *J* = 7,5 Гц, 1H), 5,38-5,35 (m, 2H), 4,68 (dd, *J* = 13,5, 2,4 Гц, 1H), 4,52 (dd, *J* = 10,0, 3,0 Гц, 1H), 4,07 (d, *J* = 13,8 Гц, 1H), 3,92 (dd, *J* = 11,0, 3,0 Гц, 1H), 3,76 (dd, *J* = 11,7, 3,2 Гц, 1H), 3,55 (t, *J* = 10,5 Гц, 1H), 3,44 (td, *J* = 11,9, 2,6 Гц, 1H), 2,96-2,90 (m, 1H).

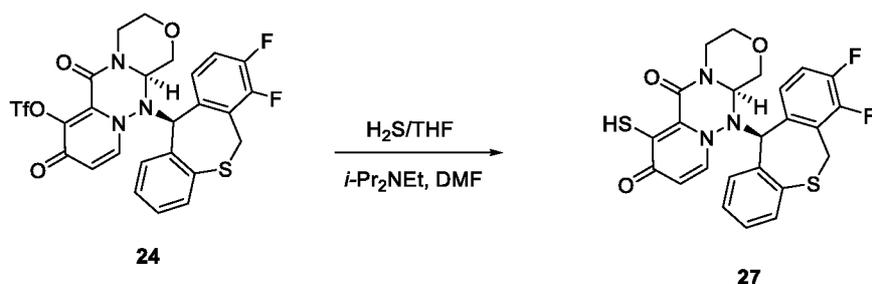
Схема 7



[00205] Соединение **26**: В атмосфере аргона во флакон вносили трифлат **24** (24,4 мг, 0,04 ммоль) в безводном DMF (1 мл) и добавляли LiCl (5,2 мг, 0,12 ммоль), Pd(PPh₃)₄ (2,3 мг, 0,002 ммоль), и Et₃SiH (19 мкл, 0,12 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 65 °С в течение 2 ч. После очистки на колонке С18 Аq 15,5 г с использованием смеси 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% АсОН) получали указанное в заголовке Соединение **26** (4,6 мг, 25%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₂₄H₁₉F₂N₃O₃S, 467,1; обнаружено 468,1 (M+H). ¹H-ЯМР (500 МГц; CDCl₃): δ 7,30 (d, *J* = 3,1 Гц, 1H), 7,18-7,10 (m, 3H), 7,06 (d, *J* = 7,8 Гц, 1H), 7,02 (dd, *J* = 7,6, 4,5 Гц, 1H), 6,89 (t, *J* = 7,3 Гц, 1H), 6,71-6,69 (m, 1H),

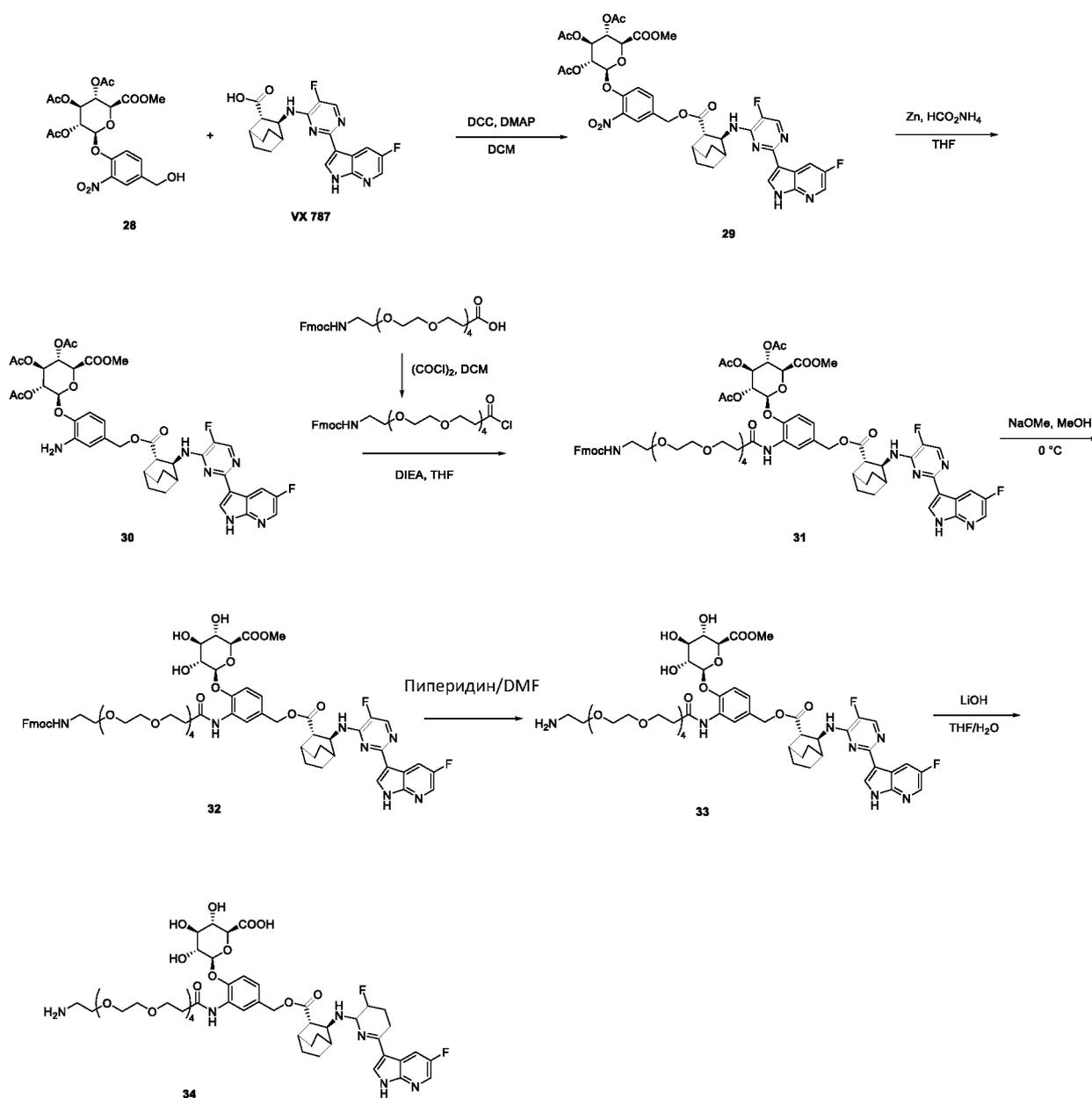
5,83 (dd, $J = 7,8, 3,0$ Гц, 1H), 5,34-5,30 (m, 2H), 4,68 (dd, $J = 13,5, 2,1$ Гц, 1H), 4,62 (dd, $J = 10,0, 3,0$ Гц, 1H), 4,09 (d, $J = 13,9$ Гц, 1H), 3,98 (dd, $J = 11,0, 2,9$ Гц, 1H), 3,81 (dd, $J = 12,0, 3,2$ Гц, 1H), 3,56 (t, $J = 10,6$ Гц, 1H), 3,44 (td, $J = 11,9, 2,6$ Гц, 1H), 3,01 (ddd, $J = 13,4, 12,0, 3,4$ Гц, 1H).

Схема 8



[00206] Соединение **27**: DIEA и 0,8 М раствор H_2S в THF (90 мкл, 0,072 ммоль) добавляли к раствору трифлата **24** (15 мг, 0,024 ммоль) в DMF (1 мл). После перемешивания в течение 1 ч, летучие вещества удаляли в вакууме, и остаток очищали на колонке с C18 Aq 5,5 г, используя смесь 5-95% MeCN/ H_2O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **27** (7,0 мг, 58%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$, 499,1; обнаружено 500,1 (M+H). ^1H -ЯМР (500 МГц; CDCl_3): δ 7,17-7,11 (m, 4H), 7,01 (d, $J = 6,9$ Гц, 1H), 6,88-6,83 (m, 1H), 6,65 (dd, $J = 28,7, 7,9$ Гц, 1H), 6,28 (s, 1H), 5,81 (d, $J = 7,5$ Гц, 1H), 5,36 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H), 5,29 (dd, $J = 28,4, 14,0$ Гц, 1H), 4,74 (dd, $J = 12,8, 6,9$ Гц, 1H), 4,65-4,60 (m, 1H), 4,11 (dd, $J = 13,9, 7,8$ Гц, 1H), 3,99-3,96 (m, 1H), 3,81 (t, $J = 11,2$ Гц, 1H), 3,56 (td, $J = 10,7, 4,4$ Гц, 1H), 3,50-3,44 (m, 1H), 3,01 (t, $J = 12,7$ Гц, 1H).

Схема 9



[00207] Соединение **28** получали по описанной в литературе методике, см. *Bioconjugate Chemistry* (2016), 27(10), 2549-2557.

[00208] Соединение **29**: DCC (57 мг, 0,227 ммоль) добавляли к раствору Соединения **28** (90 мг, 0,185 ммоль), VX-787 (74 мг, 0,185 ммоль) и DMAP (22 мг, 0,185 ммоль) в безводном DCM (8 мл). Смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. Твердый материал отфильтровывали, и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали в системе Teledyne ISCO на колонке C18 Aq 100 г, используя смесь 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя

содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **29** (120 мг, 75%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{40}H_{40}F_2N_6O_{14}$, 866,3; обнаружено 867,3 (M+H).

[00209] Соединение **30**: Из раствора (10 мл) Соединения **29** (120 мг, 0,138 ммоль) в THF удаляли свободный кислород посредством барботажа азота через раствор в течение 10 мин. В этот раствор добавили порошкообразный цинк (180 мг, 2,76 ммоль) и формиат аммония (26 мг, 0,414 ммоль). Из реакционной смеси повторно удаляли свободный кислород в течение 5 мин с последующим нагреванием до 60 °C в течение 3,5 ч. Реакционную смесь охладили до температуры окружающей среды, твердый материал удалили с помощью фильтрования, и фильтрат сконцентрировали в вакууме, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **30** (110 мг, 100%), которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{40}H_{42}F_2N_6O_{12}$, 836,3; обнаружено 837,3 (M+H).

[00210] Соединение **31**: Оксалилхлорид (26 мкл, 0,304 ммоль) и DMF (2 мкл) добавили к раствору Fmoc-N-амидо-PEG8-кислоты (100 мг, 0,152 ммоль) в безводном DCM (5 мл). После перемешивания в течение 30 мин летучие вещества удаляли в вакууме, чтобы получить Fmoc-N-амидо-PEG8-COCl. В отдельном флаконе растворили Соединение **30** (110 мг, 0,138 ммоль) в безводном THF (3 мл), и добавили DIEA (53 мкл, 0,304 ммоль), и затем раствор (4 мл) Fmoc-N-амидо-PEG8-COCl в THF. Через 1 ч удалили растворители при низком давлении, и остаток очищали в системе Teledyne ISCO на колонке C18 Aq 100 г, используя смесь 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **31** (86 мг, выход 53% при расчете по извлеченному исходному материалу), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{74}H_{89}F_2N_7O_{23}$, 1481,6; обнаружено 1482,6 (M+H).

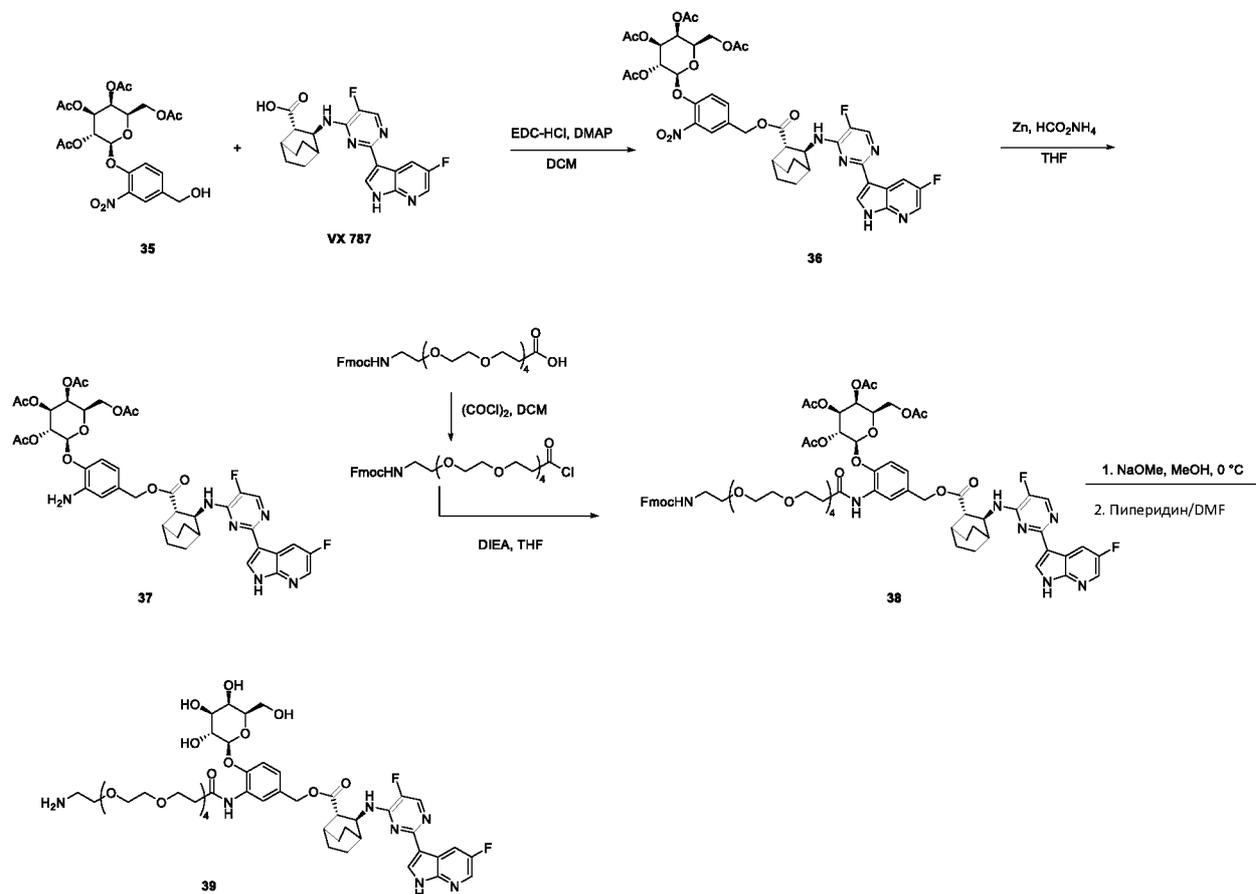
[00211] Соединение **32**: К раствору Соединения **31** (86 мг, 0,058 ммоль) в MeOH (12 мл) при температуре 0 °С добавляли 0,1 М раствор NaOMe в MeOH (1,16 мл, 0,116 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при 0 °С. Реакцию останавливали, добавляя смолу Dowex® Resin. Смолу отфильтровывали, и фильтрат концентрировали, чтобы получить Соединение **32**, которое использовали на следующей стадии без очистки.

[00212] Соединение **33**: К раствору Соединения **32** (0,058 ммоль) в DMF (3 мл) добавляли 5% раствор пиперидина в DMF (1,5 мл), и реакционную смесь перемешивали в течение 45 мин, затем наносили на колонку C18 Aq 50 г в системе Teledyne ISCO и элюировали смесью 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH в качестве модификатора). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **33** (32 мг, 49% после 2 стадий), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. MS (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₅₃H₇₃F₂N₇O₁₈, 1133,5; обнаружено 1134,4 (M+H).

[00213] Соединение **34**: К раствору Соединения **33** (32 мг, 0,028 ммоль) в THF (2 мл) и воде (1 мл) при комнатной температуре добавляли 0,025 мМ раствор LiOH в воде (1,1 мл, 0,028 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. Летучие вещества удаляли при низком давлении, остаток очищали в системе Teledyne ISCO на колонке Gemini 30 x 150 мм, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH в качестве модификатора). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **34** (26 мг, 82%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. MS (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₅₂H₇₁F₂N₇O₁₈, 1119,5; обнаружено 1120,4 (M+H). ¹H-ЯМР (500 МГц; DMSO-d₆): δ 9,19 (s, 1H), 8,47 (dd, J = 9,8, 2,8 Гц, 1H), 8,26 (m, 1H), 8,16-8,13 (m, 2H), 8,07 (s, 1H), 7,60 (d, J = 6,8 Гц, 1H), 7,02 (d, J = 8,3 Гц, 1H), 6,93 (dd, J = 8,3, 1,4 Гц, 1H), 5,60 (s, 1H), 5,02 (q, J = 17,4 Гц, 3H), 4,75 (t, J = 6,9 Гц, 1H), 4,60 (d, J = 6,9 Гц, 1H), 3,68 (m, 2H), 3,51-3,46 (m, 32H),

2,98 (d, $J = 6,6$ Гц, 1H), 2,89 (t, $J = 5,3$ Гц, 2H), 2,68-2,61 (m, 2H), 2,00 (s, 1H), 1,92 (s, 1H), 1,80-1,72 (m, 4H), 1,63-1,61 (m, 1H), 1,53-1,43 (m, 5H).

Схема 10



[00214] Соединение **35** получали по описанной в литературе методике, см. *Bioconjugate Chemistry* (2016), 27(10), 2549-2557.

[00215] Соединение **36**: EDC-HCl (67 мг, 0,350 ммоль) и DMAP (34 мг, 0,278 ммоль) добавляли к смеси VX-787 (100 мг, 0,250 ммоль) и спирта **37** (125 мг, 0,250 ммоль) в CH_2Cl_2 (16 мл). После перемешивания в течение 22 ч при температуре окружающей среды реакционную смесь разбавляли этиловым эфиром уксусной кислоты (20 мл) и промывали H_2O (20 мл). Водный слой экстрагировали тремя порциями (по 20 мл) этилового эфира уксусной кислоты. Объединенные органические слои промывали 0,5 N водным раствором HCl (20 мл), затем затем

насыщенным водным раствором NaHCO_3 ((20 мл) и в конце рассолом (20 мл), затем сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. В результате очистки методом хроматографии на 12 г силикагеля 45-100% раствором этилового эфира уксусной кислоты в гексанах получали Соединение **58b** (149 мг, выход 67%, степень чистоты 82%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{14}$, 880,27; обнаружено 881,30 (M+H).

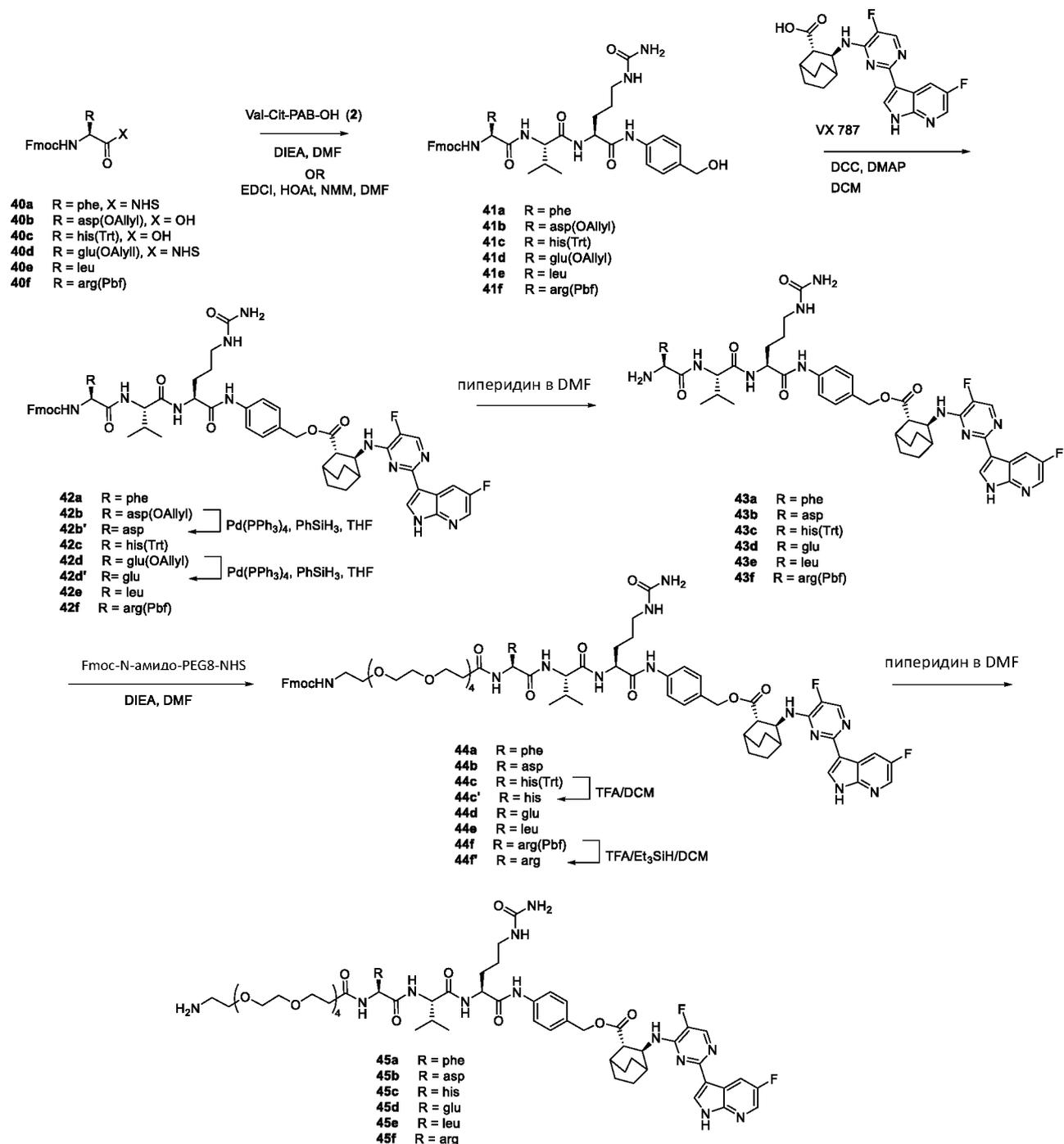
[00216] Соединение **37**: Из раствора Соединения **36** (35 мг, 0,0397 ммоль) в THF (1,5 мл) удаляли свободный кислород посредством барботажа аргона через раствор в течение 5 мин. В этот раствор добавили порошкообразный цинк (102 мг, 1,56 ммоль), затем аммония формиат (12 мг, 0,190 ммоль). Барботаж аргоном продолжали в течение дополнительных 3 мин, затем реакционную смесь нагревали в блоке в атмосфере аргона при 60°C в течение 24 ч. Реакционную смесь фильтровали, и твердый материал промывали несколькими порциями THF. Фильтрат концентрировали в вакууме, затем очищали методом хроматографии на 4 г силикагеля, элюировали 40-100% раствором этилового эфира уксусной кислоты в гексанах, чтобы получить Соединение **37** (14 мг, 42%), представлявшее собой твердое вещество бледно-желтого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{12}$, 850,30; обнаружено 851,30 (M+H).

[00217] Соединение **38**: Оксалилхлорид (8 мкл, 0,0933 моль) и DMF (2 мкл) добавляли к раствору Fmoc-N-амидо-PEG8-кислоты (30 мг, 0,0452 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (1 мл). Полученный ярко-желтый раствор перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 ч, затем концентрировали в вакууме. К полученному остатку добавляли три порции по 1 мл CH_2Cl_2 , концентрируя смесь после каждого добавления. В отдельном флаконе $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (16 мкл, 0,0918 ммоль) добавляли к суспензии Соединения **37** (20 мг, 0,0235 ммоль) в CH_2Cl_2 (200

мкл). К этой смеси добавляли по каплям раствор хлорангидрида (0,0452 ммоль) в CH_2Cl_2 (400 мкл). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 1 ч смесь концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт растворяли в DMSO и наносили на колонку C18 Aq 5,% г и элюировали смесью 20-100% MeCN в H_2O , оба растворителя содержали 0,05% уксусной кислоты. Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли и лиофилизировали чтобы получить Соединение **38** (7,3 мг, выход 21%) твердое белое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $\text{C}_{75}\text{H}_{91}\text{F}_2\text{N}_7\text{O}_{23}$, 1495,61; обнаружено 1496,60 (M+H).

[00218] Соединение **39**: 0,1 М раствор NaOMe/MeOH (13 мкл, 0,0013 ммоль) добавляли к раствору Соединения **38** (2,0 мг, 0,00134 ммоль) в безводном метаноле (400 мкл) с температурой 0°C . После перемешивания в ледяной бане в течение 4 ч реакцию смесь нейтрализовали 0,2 М раствором HCl/MeOH (6,5 мкл, 0,0013 ммоль) и концентрировали в вакууме. Добавляли три порции CH_2Cl_2 (по 0,5 мл), концентрируя смесь после каждого добавления. Полученный остаток растворяли в безводном DMF (0,2 мл) и обрабатывали 10% раствором пиперидина в DMF (0,2 мл). Через 30 мин после начала взаимодействия реакцию смесь наносили на колонку C18 Aq 5,5 г и элюировали смесью 0-100% MeCN и H_2O , при этом каждый растворитель содержал 0,1% TFA. Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли и лиофилизировали, чтобы получить соль, образованную Соединением **39** и TFA (1,1 мг, 71%), представлявшую собой твердое белое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $\text{C}_{52}\text{H}_{73}\text{F}_2\text{N}_7\text{O}_{17}$, 1105,50; обнаружено 1106,50 (M+H). ^1H ЯМР (500 МГц; CD_3OD) δ 8,57 (dd, $J = 9,5, 2,8$ Гц, 1H), 8,17 (s, 2H), 8,08 (d, $J = 1,8$ Гц, 1H), 8,00 (d, $J = 4,0$ Гц, 1H), 7,01 (d, $J = 8,4$ Гц, 1H), 6,90-6,88 (m, 1H), 5,04 (s, 2H), 4,92 (d, $J = 1,9$ Гц, 2H), 4,63 (d, $J = 7,9$ Гц, 1H), 3,91 (d, $J = 3,2$ Гц, 1H), 3,83-3,74 (m, 6H), 3,66-3,53 (m, 30H), 2,92 (dd, $J = 6,6, 3,7$ Гц, 2H), 2,83 (d, $J = 7,0$ Гц, 1H), 2,64 (td, $J = 6,4, 3,4$ Гц, 2H), 2,10 (t, $J = 1,4$ Гц, 1H), 1,96-1,81 (m, 4H), 1,74-1,64 (m, 2H), 1,55-1,50 (m, 2H).

Схема 11



[00219] Соединение **41a**: Общая методика А: К раствору Fmoc-Phe-OSu (**40a**) (107 мг, 0,22 ммоль) в DMF (1,5 мл) и соли, образованной Val-Cit-PABA и TFA (**2**) (99 мг, 0,2 ммоль), добавляли N,N-диизопропилэтиламин (105 мкл, 0,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин,

затем наносили на колонку C18 Aq. 50 г и элюировали в градиенте смеси 5-95% MeCN:H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **41a** (23 мг, 14%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₄₂H₄₈N₆O₇, 748,4; обнаружено 749,3 (M+H).

[00220] Соединение **41b**: Общая методика В: К раствору Fmoc-Asp(O-аллил)-ОН (**40b**) (83 мг, 0,21 ммоль), соли, образованной Val-Cit-PAVA и TFA (**2**) (99 мг, 0,2 ммоль), и HOAt (41 мг, 0,3 ммоль) в DMF (1,5 мл) добавляли NMM (66 мкл, 0,6 ммоль) и EDCI (48 мг, 0,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, затем в системе Teledyne ISCO наносили на колонку C18 Aq. 30 г и элюировали смесью 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **41b** (85 мг, 56%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₄₀H₄₈N₆O₉, 756,3; обнаружено 757,4 (M+H).

[00221] Соединение **41c**: Получали по общей методике В, используя Fmoc-His(Trt)-ОН (**40c**) (130 мг, 0,21 ммоль). Выход = 146 мг (74%), соединение представляло собой рыхлое твердое вещество желтовато-сероватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₅₈H₆₀N₈O₇, 980,5; обнаружено 981,4 (M+H).

[00222] Соединение **41d**: Получали по общей методике А, используя Fmoc-Glu(OАллил)-OSu (**40d**) (51 мг, 0,1 ммоль). Выход = 25 мг (33%), соединение представляло собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₂₇H₂₆N₂O₈, 506,2; обнаружено 507,2 (M+H).

[00223] Соединение **41e**: К раствору Val-Cit-PAVA (380 мг, 1,0 ммоль) в безводном DMA (5 мл) при температуре 0 °С добавляли FmocLeuOH (**40e**) (424 мг, 1,2 ммоль), HOAt (170 мг, 1,2 ммоль), EDC-HCl (240 мг, 1,2 ммоль) и N-метилморфолин (220 мкл, 2,0 ммоль). После перемешивания в ледяной бане в течение 2,5 ч реакционную смесь разбавляли H₂O (35 мл). Для получения

продукта проводилось вакуумное фильтрование, после которого продукт трижды промывали H₂O (порциями по 5 мл) затем 6 порциями по 10-20 мл этилового эфира уксусной кислоты, до тех пор, пока анализ методом ЖХ/МС не показывал, что остаточное содержание FmocLeuOH составляет <5%. После сушки в вакууме в течение ночи полученное твердое вещество белого цвета измельчали до порошкообразного состояния и вновь сушили в вакууме, чтобы получить Соединение **41e** (616 мг, 86%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₃₉H₅₀N₆O₇, 714,4; обнаружено 715,4 (M+H).

[00224] Соединение **41f**: К смеси Val-Cit-PABA (200 мг, 0,527 ммоль), FmocArg(Pbf)OH (**40f**) (410 мг, 0,632 ммоль) и HOAt (86 мг, 0,632 ммоль) в безводном DMF (5 мл) при 0 °С добавляли *N*-метилморфолин (90 мкл, 0,818 ммоль) и EDC-HCl (120 мг, 0,626 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в ледяной бане в течение 3 ч, затем наносили на колонку C18 100 г и элюировали 10-60% MeCN in H₂O, при этом каждый раствор содержал 0,05% HOAc. Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **41f** (345 мг, 65%), представлявший собой твердое белое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₅₂H₆₇N₉O₁₀S, 1009,47; обнаружено 1010,40 (M+H).

[00225] Соединение **42a**: Общая методика А: VX-787 (11 мг, 0,026 ммоль), DMAP (3,2 мг, 0,026 ммоль) и DCC (8 мг, 0,039 ммоль) добавляли к раствору Fmoc-Phe-Val-Cit-PAB-OH (**41a**) (20 мг, 0,026 ммоль) в DCM (3 мл). После перемешивания в течение 5 ч добавляли дополнительно VX-787 (4 мг), и реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч, затем концентрировали в вакууме. Остаток растворяли в DMSO (1 мл) и очищали с помощью системы Teledyne ISCO на колонке C18 Aq. 15,5 г, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **42a** (10 мг, выход 50% при расчете по извлеченному исходному материалу), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для

$C_{62}H_{65}F_2N_{11}O_8$, 1129,5; обнаружено 1130,4 (M+H). Также было получено непрореагировавшее Соединение **41a** (7 мг).

[00226] Соединение **42b**: Общая методика В: EDCI (13,2 мг, 0,069 ммоль) добавляли к раствору Соединения **41b** (35 мг, 0,046 ммоль), VX-787 (18,5 мг, 0,046 ммоль) и DMAP (5,6 мг, 0,046 ммоль) в DCM (6 мл), реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Добавляли дополнительно VX-787 (6 мг), и реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Растворители удаляли при низком давлении, и остаток растворяли в DMF (1,5 мл) с последующей очисткой в системе Teledyne ISCO на колонке C18 Aq 30 г, используя смесь 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% TFA). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **42b** (23 мг, 44%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{60}H_{65}F_2N_{11}O_{10}$, 1137,5; обнаружено 1138,4 (M+H).

[00227] Соединение **42b'**: Pd(PPh₃)₄ (2,4 мг, 0,002 ммоль) и фенилсилан (1 каплю) добавляли к раствору Соединения **42b** (23 мг, 0,020 ммоль) в THF (0,8 мл):DMF (0,4 мл), и реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин. Летучие вещества удаляли в вакууме, чтобы получить Соединение **42b'**, который использовали на следующей стадии без очистки.

[00228] Соединение **42c**: Было синтезировано по общей методике В при использовании Соединения **41c** (39 мг, 0,04 ммоль), чтобы получить указанное в заголовке Соединение **42c** (30 мг, 55%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{78}H_{77}F_2N_{13}O_8$, 1361,6; обнаружено 1362,4 (M+H).

[00229] Соединение **42d**: Было синтезировано по общей методике А при использовании Соединения **41d** (15,4 мг, 0,02 ммоль), чтобы получить указанное в заголовке Соединение **42d** (13 мг, 57%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{61}H_{67}F_2N_{11}O_{10}$, 1151,5; обнаружено 1152,4 (M+H).

[00230] Соединение **42d'**: Pd(PPh₃)₄ (1,3 мг, 0,001 ммоль) и фенилсилан (2 мкл, 0,0165 ммоль) добавляли к раствору Соединения **42d** (13 мг, 0,011 ммоль) в смеси THF (1,5 мл)/DMF (0,5 мл), затем реакцию смесь перемешивали в течение 20 мин. Летучие вещества удаляли в вакууме, чтобы получить Соединение **42d'**, которое использовали на следующей стадии без очистки.

[00231] Соединение **42e**: Fmoc-Leu-Val-Cit-PABA (**41e**) (89 мг, 0,125 ммоль), DMAP (30 мг, 0,245 ммоль) и EDC-HCl (48 мг, 0,250 ммоль) добавляли к раствору VX-787 (100 мг, 0,250 ммоль) в смеси 3:1 THF:DMA (3 мл). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 ч, затем концентрировали в вакууме, чтобы удалить THF. Оставшийся раствор в DMA наносили на колонку C18 Aq 50 г и элюировали смесью 5-100% MeCN и H₂O, при этом оба растворителя содержали 0,05% HOAc. Содержащие продукт фракции лиофилизировали, затем повторно очищали посредством хроматографии на колонке C18 Aq 30 г, элюируя смесью 50-100% MeCN и H₂O, оба растворителя содержали 0,05% HOAc. После лиофилизации получали указанное в заголовке Соединение **42e** (37 мг, 24%), представлявшее собой твердое белое вещество, степень чистоты которого, определенная методом ЖХ/МС, составляла ~90%. Продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₅₉H₆₇F₂N₁₁O₈, 1095,51; обнаружено 1096,50 (M+H).

[00232] Соединение **42f**: DMAP (8 мг, 0,0655 ммоль) и EDC-HCl (12 мг, 0,0626 ммоль) добавляли к раствору Соединения **41f** (31 мг, 0,0307 ммоль) и VX-787 (25 мг, 0,0626 ммоль) в смеси 3:1 THF:DMA (760 мкл). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 4 ч реакцию смесь концентрировали в вакууме, чтобы удалить THF. Оставшийся раствор в DMA наносили на колонку C18 Aq 15,5 г и элюировали смесью 0-100% MeCN в H₂O, оба растворителя содержали 0,05% HOAc. Содержавшие чистый продукт фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **42f** (7 мг, 16%), представлявшее собой твердое белое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₇₂H₈₄F₂N₁₄O₁₁S, 1390,61; обнаружено 1391,45 (M+H).

[00233] Общая методика удаления Fmoc: Смесь Соединения **43a**: 5% раствора пиперидина в DMF (1 мл) добавляли к раствору Соединения **42a** (10 мг, 0,01 ммоль) в DMF (1 мл), и реакционную смесь перемешивали в течение 45 мин. Реакционную смесь вносили в систему Teledyne ISCO на колонку C18 Aq 15,5 г и элюировали смесью 5-95% MeCN:H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **43a** (7 мг, 63%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₄₇H₅₅F₂N₁₁O₆, 907,4; обнаружено 908,4 (M+H).

[00234] Соединение **43b**: Следовали общей методике удаления Fmoc. Выход = 78% из неочищенного Соединения **42b'**, рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₄₂H₅₁F₂N₁₁O₈, 875,4; обнаружено 876,4 (M+H).

[00235] Соединение **43c**: Следовали общей методике удаления Fmoc. Выход = 53% из Соединения **42c**, рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₆₆H₆₇F₂N₁₃O₈, 1139,5; обнаружено 1140,4 (M+H).

[00236] Соединение **43d**: Следовали общей методике удаления Fmoc. Выход = 59% из Соединения **42d'**, рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₄₃H₅₃F₂N₁₁O₈, 889,4; обнаружено 890,4 (M+H).

[00237] Соединение **43e**: 10% раствор пиперидина в DMF (400 мкл) добавляли к раствору Соединения **42e** (20 мг, 0,0182 ммоль) в безводном DMF (400 мкл). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 30 мин реакционную смесь наносили на колонку C18 Aq 5,5 г и элюировали 5-25% MeCN в H₂O, причем оба растворителя содержали 0,1% TFA. Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить соль, образованную TFA и Соединением **43e** (13 мг, 72%), представлявшую собой твердое белое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₄₄H₅₇F₂N₁₁O₆, 873,45; обнаружено 874,40 (M+H).

[00238] Соединение **43f** : 10% раствор пиперидина в DMF (100 мкл) добавляли к раствору Соединения **42f** (6,8 мг, 0,00489 ммоль) в DMF (100 мкл). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 1 ч раствор наносили на колонку C18 Aq 5,5 г и элюировали 0-100% MeCN в H₂O, причем оба растворителя содержали 0,05% HOAc. Содержащие продукт фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **43f** (5,2 мг, 91%), представлявшее собой твердое белое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₅₇H₇₄F₂N₁₄O₉S, 1168,55; обнаружено 1169,40 (M+H).

[00239] Общая методика включения Fmoc-N-амидо-PEG8: Соединение **44a**: К раствору Соединения **43a** (7 мг, 0,008 ммоль) в DMF (1 мл) добавляли сложный эфир Fmoc-N-амидо-PEG8-NHS (7 мг, 0,009 ммоль) и затем *N,N*-диизопропилэтиламин (4 мкл, 0,023 ммоль), и реакцию перемешивали в течение 2 ч. Продукт очищали в системе Teledyne ISCO на колонке C18 Aq 15,5 г, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H₂O (оба растворителя содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **44a** (5 мг, 42%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₈₁H₁₀₂F₂N₁₂O₁₇, 1552,7; обнаружено 1553,7 (M+H).

[00240] Соединение **44b**: Следовали общей методике включения Fmoc-N-амидо-PEG8. Выход = 61% из **43b**, продукт представлял собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₇₆H₉₈F₂N₁₂O₁₉, 1520,7; обнаружено 1521,4 (M+H).

[00241] Соединение **44c**: Следовали общей методике включения Fmoc-N-амидо-PEG8. Выход = 83% из **43c**, продукт представлял собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₉₇H₁₁₄F₂N₁₄O₁₇, 1784,4; обнаружено 1785,6 (M+H).

[00242] Соединение **44c'**: К раствору Соединения **44c** (17 мг, 0,0073 ммоль) в DCM (2 мл) добавляли TFA (0,2 мл). После перемешивания в течение 3 ч реакцию смесь разбавляли MeOH (3 мл), и летучие вещества удаляли в

вакууме. Остаток растворяли в смеси 1:1 MeCN:H₂O (1,5 мл) и DMSO (0,2 мл), и вносили в систему Teledyne ISCO на колонку C18 Aq 15,5 г, после чего проводилось градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN:H₂O (оба растворителя содержали 10 ммоль ацетата аммония в качестве модификатора). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **44c'** (12 мг, 82%), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₇₈H₁₀₀F₂N₁₄O₁₇, 1542,7; обнаружено 1543,8 (M+H).

[00243] Соединение **44d**: Получали, следуя общей методике, используя **43d**. Продукт **44d** использовали на следующей стадии без очистки.

[00244] Соединение **44e**: iPr₂NEt (15 мкл, 0,0861 ммоль) добавляли к раствору соли, образованной Соединением **43e** и TFA (20 мг, 0,0206 ммоль), и сложного эфира Fmoc-N-амидо-PEG8-NHS (20 мг, 0,0263 ммоль) в безводном DMA (400 мкл). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 2 ч реакцию наносили на колонку C18 Aq 15,5 г и элюировали 10-100% MeCN в H₂O, причем оба растворителя содержали 0,1% TFA. Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **44e** (13 мг, 42%), представлявшее собой твердое белое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для C₇₈H₁₀₄F₂N₁₂O₁₇, 1518,76; обнаружено 1519,70 (M+H).

[00245] Соединение **44f**: К раствору Соединения **43f** (7 мг, 0,00599 ммоль) в безводном DMF (100 мкл) добавляли 10% раствор iPr₂NEt в DMF (33 мкл) и затем сложный эфир Fmoc-N-амидо-PEG8-NHS (6 мг, 0,00789 ммоль) в безводном DMF (100 мкл). Через 1 ч анализ методом ЖХ/МС показал неполное завершение реакции. Была добавлена дополнительная порция сложного эфира Fmoc-N-амидо-PEG8-NHS (25 мкл 6% раствора в DMF), и реакцию перемешивали дополнительно, течение 2 часов для завершения реакции. После очистки методом хроматографии на колонке C18 Aq ISCO 5,5 г при использовании смеси 0-100% MeCN в H₂O (оба растворителя содержали 0,05% HOAc) с последующей лиофилизацией чистых фракций было получено Соединение **44f** (9 мг, 82%), представлявшее собой твердое белое вещество. МС

(ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{91}H_{121}F_2N_{15}O_{20}S$, 1814,0; обнаружено 1815,7 (М+Н).

[00246] Соединение **45a**: Следуя общей методике удаления Fмос, из **44a** получали указанное в заголовке Соединение **45a**, выход которого составлял 93%, представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{66}H_{92}F_2N_{12}O_{15}$, 1330,7; обнаружено 1331,6 (М+Н). 1H -ЯМР (500 МГц; DMSO- d_6): δ 10,02 (d, $J = 0,7$ Гц, 1H), 8,48 (dd, $J = 9,8$, 2,8 Гц, 1H), 8,26 (d, $J = 1,3$ Гц, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,14 (d, $J = 3,8$ Гц, 1H), 8,08 (s, 1H), 7,85 (s, 1H), 7,60 (d, $J = 6,8$ Гц, 1H), 7,52 (d, $J = 8,4$ Гц, 2H), 7,23-7,18 (m, 6H), 7,18-7,14 (m, 1H), 5,99 (s, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,07 (d, $J = 12,4$ Гц, 1H), 4,98 (d, $J = 12,4$ Гц, 1H), 4,74 (t, $J = 6,5$ Гц, 1H), 4,60-4,56 (m, 1H), 4,38-4,35 (m, 1H), 4,20 (t, $J = 7,5$ Гц, 1H), 3,48-3,47 (m, 25H), 3,41 (m, 2H), 3,39-3,34 (m, 4H), 3,02-2,96 (m, 6H), 2,77-2,74 (m, 1H), 2,65-2,62 (m, 3H), 2,37-2,33 (m, 1H), 2,28 (t, $J = 6,1$ Гц, 2H), 1,97-1,94 (m, 3H), 1,80-1,60 (m, 6H), 1,50-1,36 (m, 6H), 0,84 (dd, $J = 15,0$, 6,7 Гц, 6H).

[00247] Соединение **45b**: Следуя общей методике удаления Fмос, из **44b** получали указанное в заголовке Соединение **45b**, выход которого составлял 69%, представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{61}H_{88}F_2N_{12}O_{17}$, 1298,6; обнаружено 1299,5 (М+Н). 1H -ЯМР (500 МГц; DMSO- d_6): δ 9,33 (s, 1H), 9,16 (dd, $J = 6,3$, 0,8 Гц, 1H), 8,48 (dd, $J = 9,8$, 2,8 Гц, 1H), 8,42-8,41 (m, 1H), 8,26 (d, $J = 1,3$ Гц, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,14 (d, $J = 3,9$ Гц, 1H), 7,92 (d, $J = 7,6$ Гц, 1H), 7,71-7,70 (m, 2H), 7,61-7,60 (m, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,21 (d, $J = 8,5$ Гц, 2H), 5,03 (m, 2H), 4,74-4,70 (m, 2H), 4,02 (d, $J = 1,0$ Гц, 1H), 3,93-3,91 (m, 1H), 3,60-3,53 (m, 3H), 3,53-3,42 (m, 35H), 2,99-2,95 (m, 3H), 2,81-2,79 (m, 2H), 2,37-2,34 (m, 2H), 2,26-2,23 (m, 2H), 1,97-1,92 (m, 3H), 1,80-1,71 (m, 3H), 1,65-1,61 (m, 2H), 1,52-1,42 (m, 6H), 1,22 (d, $J = 0,3$ Гц, 1H), 0,92 (dd, $J = 9,6$, 7,1 Гц, 6H).

[00248] Соединение **45c**: Следуя общей методике удаления Fмос, из **44c'** получали указанное в заголовке Соединение **45c**, выход которого составлял 89%, представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $C_{63}H_{90}F_2N_{14}O_{15}$, 1320,7; обнаружено 1322,0

(M+H). ^1H -ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6): δ 12,35 (d, $J = 0,9$ Гц, 1H), 10,03 (s, 1H), 8,95 (s, 1H), 8,47 (dd, $J = 9,7, 2,8$ Гц, 1H), 8,29 (d, $J = 7,6$ Гц, 2H), 8,24 (dd, $J = 5,3, 2,3$ Гц, 2H), 8,20 (d, $J = 4,0$ Гц, 1H), 7,83 (d, $J = 8,3$ Гц, 2H), 7,75-7,69 (m, 2H), 7,51 (d, $J = 8,5$ Гц, 2H), 7,32 (s, 1H), 7,22 (d, $J = 8,6$ Гц, 2H), 6,09-6,07 (m, 1H), 5,03 (m, 2H), 4,78-4,75 (m, 1H), 4,69 (q, $J = 7,1$ Гц, 1H), 4,40-4,37 (m, 1H), 4,22-4,19 (m, 2H), 3,50 (s, 16H), 3,50 (s, 5H), 3,48 (d, $J = 4,2$ Гц, 7H), 3,46-3,41 (m, 5H), 3,07-2,90 (m, 8H), 2,37-2,34 (m, 2H), 2,00-1,94 (m, 3H), 1,80-1,70 (m, 3H), 1,70-1,56 (m, 3H), 1,51-1,35 (m, 6H), 0,84 (dd, $J = 17,7, 6,8$ Гц, 6H).

[00249] Соединение **45d**: Следуя общей методике удаления Fmoc, из неочищенного Соединения **44** получали указанное в заголовке Соединение **45d**, выход которого составлял 47% (после двухстадийного получения), представлявшее собой рыхлое твердое вещество серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $\text{C}_{62}\text{H}_{90}\text{F}_2\text{N}_{12}\text{O}_{17}$, 1312,7; обнаружено 1313,6 (M+H). ^1H -ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6): δ 10,01 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,49-8,47 (m, 1H), 8,30-8,26 (m, 2H), 8,18-8,14 (m, 2H), 7,90 (d, $J = 8,7$ Гц, 1H), 7,60 (d, $J = 6,7$ Гц, 1H), 7,53 (d, $J = 8,0$ Гц, 2H), 7,21 (d, $J = 8,0$ Гц, 2H), 6,65 (s, 1H), 5,68 (s, 2H), 5,02 (m, 2H), 4,74 (t, $J = 5,7$ Гц, 1H), 4,28 (t, $J = 6,8$ Гц, 2H), 4,18 (dd, $J = 8,1, 5,6$ Гц, 1H), 3,51 (m, 32H), 2,95 (d, $J = 5,7$ Гц, 4H), 2,75-2,74 (m, 2H), 2,42-2,29 (m, 3H), 2,11-2,04 (m, 3H), 1,97-1,93 (m, 2H), 1,82-1,61 (m, 8H), 1,49-1,37 (m, 6H), 1,22 (s, 3H), 0,82 (dd, $J = 12,6, 6,6$ Гц, 6H).

[00250] Соединение **45e**: 10% раствор пиперидина в DMF (100 мкл) добавляли к раствору Соединения **44e** (16 мг, 0,0153 ммоль) в DMF (100 мкл). После перемешивания при температуре окружающей среды в течении 30 мин реакционную смесь наносили на колонку C18 Aq 5,5 г элюировали смесью 5-100% MeCN в H_2O , при этом каждый растворитель содержал 0,1% TFA. Чистые фракции лиофилизировали, чтобы получить соль, образованную TFA и соединением **45e** (7 мг, 47%), представлявшую собой твердое белое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $\text{C}_{63}\text{H}_{94}\text{F}_2\text{N}_{12}\text{O}_{15}$, 1296,69; обнаружено 1297,60 (M+H). ^1H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 10,00 (br s, 1H), 8,48 (dd, $J = 9,8, 2,6$ Гц, 1H), 8,27 (m, 1H), 8,20 (s, 1H), 8,16-8,14 (m, 1H), 8,11-8,04 (m, 2H), 7,71-7,69 (m,

1H), 7,63-7,61 (m, 1H), 7,52 (d, $J = 8,2$ Гц, 2H), 7,22 (d, $J = 8,9$ Гц, 2H), 6,55 (br s, 1H), 5,98-5,96 (m, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,07 (d, $J = 12,3$ Гц, 1H), 4,98 (d, 1H), 4,75-4,72 (d, $J = 12,5$ Гц, 1H), 4,37-4,32 (m, 2H), 4,16 (t, $J = 7,7$ Гц, 1H), 3,58-3,43 (m, 32H), 3,04-2,93 (m, 4H), 2,69 (t, $J = 5,6$ Гц, 2H), 2,43-2,29 (m, 2H), 1,97-1,92 (m, 3H), 1,83-1,31 (m, 16H), 0,86-0,78 (m, 12H).

[00251] Соединение **45f**: К суспензии Соединения **44f** (4 мг, 0,0022 ммоль) в CH_2Cl_2 (50 мкл) добавляли триизопротилсилан (5 мкл), затем TFA (50 мкл). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 90 мин реакционную смесь концентрировали в вакууме. Остаток разбавляли CH_2Cl_2 (200 мкл) и концентрировали. Продукт разбавляли 3 дополнительными порциями CH_2Cl_2 (по 200 мкл), концентрируя смесь после каждого добавления. Полученную желтую пену (Соединение **44f'**) обрабатывали 5% раствором пиперидина в DMF (100 мкл). После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 1 ч, реакционную смесь наносили на колонку C18 Aq 5,5 г и элюировали смесью 0-100% MeCN и H_2O , при этом оба растворителя содержали 0,1% TFA. Фракции, содержащие чистый продукт, объединяли и лиофилизировали, чтобы получить соль, образованную соединением **45f** и TFA (1 мг, 47%) и представляющую собой твердое белое вещество. MS (ИЭР, пол. ион): рассчитано для $\text{C}_{63}\text{H}_{95}\text{F}_2\text{N}_{15}\text{O}_{15}$, 1339,7; обнаружено 1340,5(M+H). ^1H ЯМР (500 МГц; DMSO-d_6) δ 12,25 (br s, 1H), 10,00 (br s, 1H), 8,48 (dd, $J = 9,7, 2,8$ Гц, 1H), 8,27 (dd, $J = 2,6, 1,3$ Гц, 1H), 8,19 (d, $J = 2,7$ Гц, 1H), 8,14 (d, $J = 3,4$ Гц, 1H), 8,13 (br d, $J = 7$ Гц, 1H), 8,09 (br d, $J = 7$ Гц, 1H), 7,76 (br s, 2H), 7,74 (br d, $J = 9$ Гц, 1H), 7,61 (br d, $J = 7$ Гц, 1H), 7,55-7,50 (m, 2H), 7,22 (d, $J = 8,5$ Гц, 2H), 6,05 (br s, 1H), 5,47 (br s, 2H), 5,08 (d, $J = 12,5$ Гц, 1H), 4,99 (d, $J = 12,3$ Гц, 1H), 4,76-4,73 (m, 1H), 4,38-4,33 (m, 2H), 4,21-4,18 (m, 1H), 3,59-3,54 (m, 12H), 3,49 (t, $J = 10,5$ Гц, 30H), 3,10-3,03 (m, 3H), 2,96-2,95 (m, 6H), 2,41-2,34 (m, 2H), 2,00-1,94 (m, 3H), 1,80-1,62 (m, 2H), 1,53-1,28 (m, 6H), 0,85-0,81 (m, 6H).

Пример 2: Синтез нецитотоксических конъюгатов антител к гемагглютнину - лекарственное средство.

[00252] Нецитотоксические конъюгаты антитело к гемагглютинину-лекарственное средство синтезировали, как описано ниже:

[00253] Моноклональное антитело к гемагглютинину (anti-НА) mAb11729 подвергали мутированию, чтобы включить консенсусную пентапептидную последовательность LLQGA (SEQ ID NO: 297) в С-терминальной области тяжелой и легкой цепи. Мутация позволяла антителам ферментативно конъюгировать с максимальной загрузкой 2 антителами в тяжелых цепях (по одному в каждой тяжелой цепи). В качестве несвязывающего изотипического контроля использовали mAb, не связывающее НА (полученное из иммунологического антитела, не имеющего отношения к инфекционным заболеваниям), содержащее такие же консенсусные последовательности в С-терминальной области тяжелой цепи.

[00254] Нативное mAb11729 и антитело-изотипический контроль подвергали гликозилированию, используя mAb PNGaseF (NEB P0704L) в количестве 400 Е/мг в фосфатно-солевом буфере (PBS) pH 7,4 при 37°C в течение ночи. После этого производили замену буфера в реакционной смеси на PBS pH 7,4, используя центробежные фильтры (Amicon, с порогом отсечения 30 кДа). Эта методика позволяет выполнить ферментативную конъюгацию антител при максимальной загрузке 2 антителами в положении Q295 тяжелых цепей.

[00255] Моноклональное антитело к гемагглютинину (N3H2) mAb5385 (описанное в J Virology 2014, том 88, 7130-7144) подвергали мутированию, чтобы включить в него консенсусную пентапептидную последовательность ELQGP (SEQ ID NO: 310) в С-терминальной области тяжелой цепи или GGGGSGELQRP (SEQ ID NO: 311) в С-терминальной области легкой цепи. Мутация позволяет выполнить ферментативную конъюгацию антител при максимальной загрузке 2 антителами. В качестве несвязывающего изотипического контроля использовали mAb, не связывающее НА (полученное из иммунологического антитела, не имеющего отношения к инфекционным заболеваниям), содержащее такие же консенсусные последовательности в С-терминальной области тяжелой цепи или в С-терминальной области легкой цепи.

[00256] Проводилась конъюгация антител с участком конъюгации в С-терминальной области тяжелой цепи или в положении Q295 при концентрации 1 мг/мл в буфере PBS pH 7,4. Соединение 6 или 11 (оба соединения содержат VX-787, но имеют разные линкеры) добавляли при 10-40-кратном молярном избытке по сравнению с антителом, и ферментативную реакцию инициировали добавлением 14 единиц бактериальной трансглутаминазы (Zedira, T1001) из расчета на 1 мг антитела, и инкубировали при 37 °С в течение 16 часов. Конъюгаты очищали методом хроматографии, основанным на связывании с Белком А (колонки Pierce Protein A, ThermoScientific, № продукта 20356). Конъюгаты анализировали методом ИЭР-МС для определения отношения полезной нагрузки к антителу (DAR), используя прибор для сверхпроизводительной жидкостной хроматографии Waters Acquity UPLC. Хроматографическое разделение достигалось на колонке C4 (2,1 X 50 мм, ACQUITY UPLC BEH с белком C4, 1,7 мкм, 300 А) в 10-минутном градиенте (минута:процент подвижной фазы В; 0:10%, 1:10%, 5:90%, 7:90%, 7,2:10%, 10:10%). В качестве подвижной фазы А использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде, в качестве подвижной фазы В использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Скорость потока элюента составляла 0,3 мл/мин. Детектор TOF scan был настроен от m/z 500-4500 со следующими основными параметрами (Напряжение на капилляре 3,0 кВ; Пробоотборный конус 80 В; Смещение источника при 100 В; Температуры источника 150 °С; Температура десольватации 450 °С; Газовый поток в конусе 0 л/ч; Газовый поток десольватации 800 л/ч). Для спектральной деконволюции использовали функцию MaxEnt программного обеспечения MassLynx. Полученные молекулярные ионы, которые при взвешивании в соответствии со значениями интенсивности, соответствовали загрузкам, перечислены в Таблицах 3 и 4. Фактические масс-спектры показаны на ФИГ. 1 и ФИГ. 2. Альтернативно, чтобы определить загрузку полезной нагрузки на антитело, конъюгаты исследовали на анализаторе Agilent 1260 при использовании колонки TSK-NPR Butyl HIC (хроматография с гидрофобным взаимодействием) и линейного градиента от 1М раствора фосфата калия pH 8,5 до воды в течение 60 мин. Загрузки полезной нагрузки определяли

посредством интеграции площадей пиков, соответствующих видам конъюгированных и неконъюгированных антител. Отношения полезная нагрузка:антитело показаны в Таблице 5. С помощью эксклюзионной ВЭЖХ было установлено, что все конъюгаты являлись более чем на 92% мономерными (Таблица 5). При использовании этой методики были получены: нецитотоксический конъюгат антитело-лекарственное средство (ncADC), содержащий mAb11729-VX-787, в котором mAb11729 конъюгировано с Соединением 11 через пентапептид LLQGA (SEQ ID NO: 297) в С-терминальной области тяжелой цепи антитела («11729-НС-Cterm-11»); mAb11729-VX-787 ncADC, в котором mAb11729 конъюгировано с Соединением 11 через пентапептид LLQGA (SEQ ID NO: 297) в N-терминальной области тяжелой цепи антитела («11729-НС-Nterm-11»), mAb11729-VX-787 ncADC, в котором mAb11729 конъюгировано с Соединением 11 через пентапептид LLQGA (SEQ ID NO: 297) в С-терминальной области легкой цепи антитела («11729-LC-Cterm-11»), mAb11729-VX-787 ncADC, в котором mAb11729 конъюгировано с Соединением 11 через пентапептид LLQGA (SEQ ID NO: 297) в N-терминальной области легкой цепи антитела, («11729-LC-Nterm-11»), mAb11729-VX-787 ncADC, в котором Соединение 11 конъюгировано с остатком Q295 («11729-Q295-11»), Изотипическое контрольное антитело, в котором соединение 11 конъюгировано через пентапептид LLQGA (SEQ ID NO: 297) в С-терминальной области тяжелой цепи антитела («Изотипический контроль-НС-Cterm-11»), Изотипическое контрольное антитело, в котором соединение 11 конъюгировано с остатком Q295 («Изотипический контроль-Q295-11»), mAb11729-VX-787 ncADC, в котором Соединение 6 конъюгировано с остатком Q295 («11729-Q295-6»), Изотипическое контрольное антитело, в котором Соединение 6 конъюгировано через пентапептид LLQGA (SEQ ID NO: 297) в С-терминальной области тяжелой цепи антитела («Изотипический контроль-НС-Cterm-6»), Изотипическое контрольное антитело, в котором Соединение 6 конъюгировано с остатком Q295 («Изотипический контроль-Q295-6»), mAb11729-балоксавир ncADC, в котором Соединение 15 конъюгировано с mAb11729 через пентапептид LLQGA (SEQ ID NO: 297) в С-терминальной области тяжелой цепи антитела

(«11729-НС-Сterm-15»), и Изотипическое контрольное антитело, где Соединение 15 конъюгировано в С-терминальной области тяжелой цепи антитела («Изотипический контроль-НС-Сterm-15”).

[00257] Нативное mAb11729 и Изотипические контрольные антитела (1-10 мг/мл) в 50 mM буфера HEPES с 150 mM NaCl, pH 7,5, обрабатывали 1 mM раствором дитиотреитола при 37 °C в течение 30 мин. После гель-фильтрации (G-25, pH 4,5 натрия ацетат) к восстановленному антителу добавляли Соединение 18, являющееся производным с линкер-полезной нагрузкой, содержащей малеимидо-группу (1,2 эквиваленты/SH-группа) в DMSO (10 мг/мл), и pH смеси корректировали до pH 7,0 1 М буфером HEPES (pH 7,4). Конъюгаты очищали, используя PBS с 5% глицеролом, методом эксклюзионной хроматографии, с последующим стерилизующим фильтрованием. Концентрацию белка и отношение полезная нагрузка:антитело определяли с помощью УФ-спектрального анализа. Эксклюзионная ВЭЖХ показала, что все конъюгаты являлись более чем на 95% мономерными. Все конъюгированные антитела были проанализированы методом масс-спектрографии для определения значений загрузки линкер-полезной нагрузки. В Таблице 6 показаны отношения полезная нагрузка:антитело.

[00258] В Таблице 3, Таблице 4, и Таблице 5 представлены данные о загрузке (DAR, измеренные методом ИЭР-МС) для определенных конъюгатов. Для соединений 11 и 15, конъюгированные при участии транскляминазы, DAR приближаются к теоретическому значению 2. В Таблице 6 показана степень чистоты и значения DAR для конъюгатов psADC.

Таблица 3. Резюме взвешенных по интенсивности средних нагрузок полезной нагрузки в конъюгатах 11729-Q295-11 и Изотипический контроль-Q295-11.

11729-Q295-11				Изотипический контроль-Q295-11			
Молекулярная масса	Соответствующая загрузка	Относительная	Взвешенная по интенсивности	Молекулярная масса	Соответствующая загрузка	Относительная	Взвешенная по интенсивности

молекул ярного иона (Da))	полезной нагрузки	интенсивность	средняя загрузка (DAR)	молекул ярного иона (Da))	полезной нагрузки	интенсивность	средняя загрузка (DAR)
146213	1	1189372	1,8	146576	1	481468	1,8
147389	2	4359378		147751	2	2082263	

Таблица 4. Резюме взвешенных по интенсивности средних загрузок полезной нагрузки в конъюгатах 11729-НС-Cterm-11 и Изотипический контроль-НС-Cterm-11.

11729-НС-Cterm-11				Изотипический контроль-НС-Cterm-11			
Молекулярная масса молекул ярного иона (Da)	Соответствующая загрузка полезной нагрузки	Относительная интенсивность	Взвешенная по интенсивности средняя загрузка (DAR)	Молекулярная масса молекул ярного иона (Da)	Соответствующая загрузка полезной нагрузки	Относительная интенсивность	Взвешенная по интенсивности средняя загрузка (DAR)
149921	1	149921	2,1	150436	1	70561	2,0
151216	2	1469952		151600	2	1104199	
152381	3	460892		152765	3	91528	

Таблица 5. Резюме взвешенных по интенсивности средних загрузок полезной нагрузки в конъюгатах 11729-НС-Cterm-15 и Изотипический контроль-НС-Cterm-15.

11729-НС-Cterm-15				Изотипический контроль-НС-Cterm-15			
Молекулярная масса молекул ярного	Соответствующая загрузка полезной нагрузки	Относительная интенсивность	Взвешенная по интенсивности средняя	Молекулярная масса молекул ярного	Соответствующая загрузка полезной нагрузки	Относительная интенсивность	Взвешенная по интенсивности средняя

иона (Да)			загрузка (DAR)	иона (Да)			загрузка (DAR)
150062	1	66018	1,9	150206	1	160152	1,9
151013	2	217666		151146	2	265624	
151952	3	38052		152088	3	99316	

Таблица 6. Степень чистоты (определенная методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ) и DAR конъюгатов, содержащих Соединения **6, 11, и 15**.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство	Отношение лекарственное средство: антитело (DAR, ИЭР-МС)	Отношение лекарственное средство: антитело (DAR, хроматография с гидрофобным взаимодействием, ХГВ)	Чистота (ЭХ)
11729-Q295-6	-	0,7	>95%
Изотипический контроль-Q295-6	-	1,1	>95%
11729-Q295-11	1,8	-	92,6%
Изотипический контроль-Q295-11	1,8	-	96,4%
11729-НС-Cterm-11	2,1	-	95,8%
Изотипический контроль-НС-Cterm-11	2,0	-	97,1%
11729-НС-Cterm-15	1,9	-	97,8%
Изотипический контроль-НС-Cterm-15	1,9	-	94,7%
11729-18	6,1	-	98%
Изотипический контроль-18	7,5	-	97%
11729-НС-Cterm-34	2,1	-	97%
Изотипический контроль-НС-Cterm-34	1,3	-	99%
11729-НС-Cterm-39	1,5	-	98%
Изотипический контроль-НС-Cterm-39	1,0	-	98%
11729-НС-Cterm-45a	1,4	-	98%

Конъюгаты антитело-лекарственное средство	Отношение лекарственное средство: антитело (DAR, ИЭР-МС)	Отношение лекарственное средство: антитело (DAR, хроматография с гидрофобным взаимодействием, ХГВ)	Чистота (ЭХ)
Изотипический контроль-НС-Cterm-45a	1,7	-	94%
11729-НС-Cterm-45b	1,4	-	96%
Изотипический контроль-НС-Cterm-45b	1,4	-	95%
11729-НС-Cterm-45c	1,4	-	99%
Изотипический контроль-НС-Cterm-45c	2,0	-	95%
11729-НС-Cterm-45d	1,1	-	96%
Изотипический контроль-НС-Cterm-45d	1,0	-	95%
F005-126-НС-Cterm-11	1,6	-	>97%
Изотипический контроль-НС-Cterm-11	1,7	-	>95%
F005-126-LC-Cterm-11	1,6	-	>98%
Изотипический контроль-LC-Cterm-11	1,7	-	>98%

Пример 3: Твердофазный ИФА для определения связывания антител к НА с инфицированными клетками и количественное определение антивирусной эффективности лекарственного средства

[00259] Клетки MDCK London вносили в 96-луночный планшет при плотности 40 000 клеток/луночка в 50 мкл среды для инокуляции (DMEM (Life Technologies), содержащей 1% пирувата натрия (Life Technologies), 0,21% раствор БСА с низким содержанием IgG (Low IgG BSA) (Sigma Aldrich), и 0,5% гентамицина (Life Technologies)). Клетки инкубировали при 37°C при содержании 5% CO₂ в атмосфере в течение 4 часов. Затем планшеты инокулировали 50 мкл вируса гриппа H1N1 А/Пуэрто-Рико/08/1934 при множественности заражения 1,2, планшет осторожно встряхивали и помещали на 20 часов в термостат при 37°C при содержании 5% CO₂ в атмосфере. Затем планшеты однократно промывали

забуференным фосфатно соевым раствором (PBS, Life Technologies), фиксировали 200 мкл 4% параформальдегида (PFA, Alfa Aesar) в PBS и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Планшеты 3-кратно промывали PBS и блокировали добавлением блокирующего буфера StartingBlock (ThermoFisher) в течение 1 часа при комнатной температуре. Контрольные антитела тестировали в отношении 11729-НС-Cterm-11, 11729-НС-Nterm-11, 11729-LC-Cterm-11, и 11729-LC-Nterm-11. В качестве контрольных антител использовали неконъюгированное mAb11729, неконъюгированное Изотипическое контрольное антитело, Изотипический контроль-НС-Cterm-6, Изотипический контроль-LC-Cterm-6, Изотипический контроль-НС-Cterm-45a, Изотипический контроль-LC-Cterm-45a, Изотипический контроль-НС-Cterm-34, Изотипический контроль-LC-Cterm-34, Изотипический контроль-НС-Cterm-45d, и Изотипический контроль-НС-Cterm-11.

[00260] Антитела разбавляли до начальной концентрации 100 мкг/мл блокирующим буфером StartingBlock и титровали каждое антитело 1:4 до конечной концентрации $6,1 \times 10^{-3}$ мкг/мл. После инкубации планшетов блокирующий буфер StartingBlock удаляли, и к клеткам добавляли разведенные антитела в количестве 75 мкл/лунка. Планшеты инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. После инкубации планшеты 3-кратно промывали Промывочным буфером (забуференный имидазолом солевой раствор и Твин® 20, разбавленные до 1X в воде Milli-Q; KPL) и вносили верхний слой вторичных антител в количестве 75 мкл/лунка (антитела осла к человеческим IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена; Jackson ImmunoResearch), разбавленных 1:2000 Блокирующим буфером StartingBlock. Этот раствор вторичных антител инкубировали на планшетах в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее планшеты 3-кратно промывали Промывочным буфером с последующим добавлением хемилюминесцентного субстрата для ИФА ELISA Pico Chemiluminescent Substrate в количестве 75 мкл/лунка в соотношении 1:1. Сразу после этого измеряли люминесценцию на спектрофотометре для планшетов Molecular Devices Spectramax i3x.

[00261] В Таблице 7 и на ФИГ. 3 показаны конъюгаты 11729-НС-Cterm-11, 11729-LC-Cterm-11 и 11729-LC-Nterm-11, связанные с инфицированными вирусом гриппа А клетками в субнаномолекулярных концентрациях, которые демонстрируют специфичное связывание. Примечательно, что уровень такого специфичного связывания находился в таком же диапазоне, как уровень связывания неконъюгированного антитела mAb11729, это указывает на то, что добавление полезной нагрузки не нарушает связывание в чрезмерной степени. Как показано на ФИГ. 11, конъюгация линкер-полезной нагрузки с N-терминальной областью тяжелой цепи приводила к ухудшению связывания с клетками, инфицированными вирусом гриппа А/Н1N1/PR8, но при конъюгации линкер-полезной нагрузки с С-терминальной областью тяжелой цепи связывание с клетками, инфицированными вирусом гриппа А/Н1N1/PR8, сохранялось.

Таблица 7. Количественное определения связывания антител к НА с клетками, инфицированными вирусом гриппа А, методом ИФА

Антитело	IC ₅₀ log[M]
Неконъюгированное изотипическое контрольное антитело	Связывание не обнаружено
mAb11729	1,817x10 ⁻⁹
Изотипический контроль-НС-Cterm-11	Связывание не обнаружено
11729-НС-Cterm-11	3,756x10 ⁻⁹

[00262] Для проверки противовирусной эффективности измеряли способность конъюгата 11729-НС-Cterm-11 подавлять инфекцию клеток вирусом гриппа. Клетки MDCK London вносили в 96-луночный планшет при плотности 20 000 клеток/лунка в 100 мкл ростовой среды (DMEM, содержащей 1% пируват натрия, 10% фетальной телячьей сыворотки 0,5% гентамицина). Клетки инкубировали при 37°C при содержании 5% CO₂ в атмосфере в течение 18 часов. На следующий день готовили разведение антител средой для инокуляции с трипсином (DMEM, содержащей 1% пирувата натрия, 0,21% раствор БСА с низким содержанием IgG, трипсин, обработанный ТРСК, 1 мг/мл и 0,5% гентамицина) до начальной

концентрации 500 мкг/мл, и титровали 1:3 до конечной концентрации $1,143 \times 10^{-1}$ мкг/мл. Вирус гриппа H1N1 А/Пуэрто-Рико/08/1934, который был сконструирован для экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) в инфицированных им клетках (H1N1 А/Пуэрто-Рико/08/1934-GFP) разбавляли одной из трипсин-содержащих сред для инокуляции (Life Technologies) при множественности заражения 1, и смешивали в соотношении 1:1 с разведением антитела или ADC. Из 96-луночных планшетов удаляли ростовую среду, и на клетки наносили смесь вирус-антитело или вирус-ADC в количестве 100 мкл в каждую лунку. Планшеты осторожно встряхивали и помещали на 20 часов в термостат при 37 °С при содержании 5% CO₂ в атмосфере. Затем планшеты однократно промывали PBS и фиксировали 50 мкл 4% параформальдегида в PBS и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Планшеты 2-кратно промывали PBS и наслаивали в каждую лунку 50 мкл PBS. Сразу после наслаивания регистрировали сигнал GFP на анализаторе ImmunoSpot (Cellular Technology Limited).

[00263] Как показано в Таблице 8 и на ФИГ. 4, конъюгация линкер-полезной нагрузки 11 с С-терминальной областью тяжелой цепи и легкой цепи и N-терминальной областью легкой цепи антитела приводила к 3-163-кратному повышению антивирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство к вирусу гриппа А/H1N1/Pr8 по сравнению с исходным антителом. В Таблице 9 и на ФИГ. 6 показано, что конъюгация линкер-полезной нагрузки 11 с С-терминальной областью тяжелой цепи приводила к 10-кратному повышению антивирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство против вируса гриппа А/H1N1/Cal09 по сравнению с активностью исходного антитела. Как видно из Таблицы 8 и ФИГ. 7, конъюгация линкер-полезной нагрузки 6 с С-терминальной областью тяжелой цепи приводила к 51-кратному повышению антивирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство против вируса гриппа А/H1N1/PR8 по сравнению с исходным антителом, однако конъюгация линкер-полезной нагрузки 6 с С-терминальной областью легкой цепи не сопровождалась повышением антивирусной активности по сравнению с исходным антителом. Как показано в Таблице 8 и на ФИГ. 8, конъюгация линкер-

полезных нагрузок с С-терминальной областью тяжелой цепи приводила к 7-кратному повышению антивирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство к вирусу гриппа А/Н1N1/PR8 в случае соединения 11729-НС-Сterm-34 и к 35-кратному повышению антивирусной активности в случае соединения 1129-НС-Сterm-45a, но конъюгация линкер-полезных нагрузок с С-терминальной области легкой цепи не приводила к повышению антивируной активности по сравнению с активностью исходного антитела. Как показано в Таблице 9 и на ФИГ. 9, конъюгация линкер-полезных нагрузок с С-терминальной областью легкой цепи и тяжелой цепи приводила к 3-10-кратному повышению антивирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство против вируса гриппа А/Н3N2/НК68Х31 по сравнению с исходным антителом. Как видно в Таблице 8 и ФИГ. 10, конъюгация линкер-полезной нагрузки с С-терминальной областью тяжелой цепи 71-кратно повышала антивирусную активность конъюгатов антитело-лекарственное средство против вируса гриппа А/Н1N1/PR8 по сравнению с исходным антителом .

Таблица 8. Антивирусная активность антител против вируса гриппа А/Н1N1/PR8

Антитело	IC₅₀ log[M]	Кратность повышения активности по сравнению с исходным антителом
Опыт 1		
Изотипическое контрольное антитело	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
mAb11729	3,136x10 ⁻⁸	1,00
Изотипический контроль-НС-Сterm-11	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
11729-НС-Сterm-11	1,914x10 ⁻¹⁰	163,85
11729-LC-Сterm-11	9,457x10 ⁻⁹	3,32

Антитело	IC₅₀ log[M]	Кратность повышения активности по сравнению с исходным антителом
11279-НС-Nterm-11	Lost binding	N/A
11729-LC-Nterm-11	1,027x10 ⁻⁸	3,05
Опыт 2		
mAb11729	1,773x10 ⁻⁸	1,00
11729-НС-Cterm-6	3,471x10 ⁻¹⁰	51,08
11729-LC-Cterm-6	1,028x10 ⁻⁸	1,72
Изотипический контроль-НС-Cterm-6	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
Изотипический контроль-LC-Cterm-6	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
Опыт 3		
mAb11729	2,623x10 ⁻⁸	1,00
11729-НС-Cterm-45a	7,439x10 ⁻¹⁰	35,26
11729-LC-Cterm-45a	9,91 x10 ⁻⁹	0,08
Изотипический контроль-НС-Cterm-45a	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
Изотипический контроль-LC-Cterm-45a	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
11729-НС-Cterm-34	3,629x10 ⁻⁹	7,23
11729-LC-Nterm-34	1,305x10 ⁻⁸	2,01
Изотипический контроль-НС-Cterm-34	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
Изотипический контроль-LC-Cterm-34	Эффективность не обнаружена	Неприменимо

Опыт 4		
mAb11729	$2,141 \times 10^{-8}$	1,00
11729-НС-Cterm-45d	$2,984 \times 10^{-10}$	71,75
Изотипический контроль-НС-Cterm-45d	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
Изотипическое контрольное антитело	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
VX-787	$9,457 \times 10^{-9}$	3,32

Таблица 9. Антивирусная активность антител против вируса гриппа А/Н1N1/Cal09

Антитело	IC₅₀ log[M]	Кратность повышения активности по сравнению с исходным антителом
mAb11729	$7,022 \times 10^{-10}$	1,00
11729-НС-Cterm-11	$6,528 \times 10^{-11}$	10,76
Изотипический контроль-НС-Cterm-11	Эффективность не обнаружена	Неприменимо

Таблица 10. Антивирусная активность антител против вируса гриппа А/Н3N2/НК68х31

Антитело	IC ₅₀ log[M]	Кратность повышения активности по сравнению с исходным антителом
mAb5385	5,15x10 ⁻¹⁰	1,00
5385-НС-Cterm-11	5,262x10 ⁻¹¹	9,78
5385-LC-Cterm-11	1,802x10 ⁻¹⁰	2,86
Изотипический контроль-НС-Cterm-11	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
Изотипический контроль-LC-Cterm-11	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
Изотипическое контрольное антитело	Эффективность не обнаружена	Неприменимо
VX-787	7,045x10 ⁻⁹	Неприменимо

Пример 4: *In vitro* стабильность конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего антитело mAb11729 к НА вируса гриппа, в плазме обезьяны или обедненной IgG человеческой плазме

[00264] Конъюгат 11729-НС-Cterm-11 инкубировали *in vitro* совместно с плазмой разных видов животных и оценивали DAR.

[00265] Образец псADC добавляли к свежей объединенной плазме яванских макаков (BioReclamation, серия CYN260056-CYN260057), или обедненной IgG человеческой плазме (BioIVT, lot#BRH1097869), независимо, до конечной концентрации 50 мкг/мл, в пробирках Eppendorf (Eppendorf, Cat# 022363514), и затем инкубировали при 37°C в водяной бане в течение 0-72 часов. После этого образцы извлекали через 0, 24, 48, и 72 часа и хранили в замороженном состоянии при -80°C до проведения анализа.

[00266] Для анализа DAR конъюгат псADC очищали от образцов плазмы методом аффинного захвата, используя процессор для магнитных частиц DynaMag-2 (Life Technologies, № по каталогу 12321D). На первой стадии биотинилированное антитело к человеческой цепи каппа (реактив, созданный компанией Regeneron) был иммобилизовано на покрытых стрептавидином парамагнитных гранулах (Invitrogen, № по каталогу 605602). Каждый образец плазмы, содержащий псADC перемешивали при скорости вращения 1850 об/мин с 1 мг гранул при комнатной температуре в течение 2 часов в приборе ThermoMixer C (Eppendorf, № по каталогу 2231000574). Затем гранулы отмывали 3 порциями по 600 мкл 50 мМ буфера Трис-HCl, pH 7,5 (использовали разбавленный 1М буфер Трис-HCl pH 7,5, Invitrogen, № по каталогу 15567-027) и затем одной порцией 600 мкл 10% раствора ацетонитрила (VWR Chemicals, № по каталогу BDH83640,100E) в воде. После отмывания выполняли элюцию псADC, инкубируя гранулы совместно с 50 мкл 1% муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил:вода (25:75, v/v) в течение 15 минут при комнатной температуре. Элюированные образцы далее восстанавливали, добавляя к каждому образцу по 2 мкл 0,5 М TCEP (Sigma, № по каталогу 646547-10X1ML) (в конечном растворе концентрация TCEP составляла 19,2 мМ) и инкубировали в приборе ThermoMixer C при 50°C в течение 30 мин.

[00267] Образцы восстановленного псADC наносили на колонку 1,7 мкм ВЕН300 С4 (Waters Corporation, № по каталогу 186007567), сопряженную с масс-спектрометром Synapt G2-Si (Waters). Скорость потока элюента составляла 8 мкл/мин (подвижная фаза А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде; подвижная фаза В: 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле); градиентная ЖХ-хроматография проводилась в течение 10 минут; псADC элюировал в течение 2,1-6,5 минут, что соответствует 26-40% подвижной фазы В.

[00268] Для деконволюции полученных спектров использовали программное обеспечение MaxEnt1 (Waters Corporation) со следующими параметрами: диапазон массы: 20-60 кДа; диапазон m/z: 700 Да-4000 Да; Разрешение: 1,0

Да/канал; Ширина на половине высоты пика: 1,0 Да; Отношения к минимальной интенсивности: 33%; Максимальное число итераций: 15.

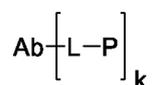
[00269] После 72-часовой инкубации с плазмой яванского макака или человеческой IgG-обедненной плазмой значимой потери линкер-полезных нагрузок из состава psADC не наблюдалось (ФИГ. 5).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с антивирусным соединением.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, отличающийся тем, что антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент соединяется с антивирусным соединением с помощью линкера.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, имеющий следующую структуру



где **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент;

L представляет собой линкер;

P представляет собой антивирусное вещество; и

k равен целому числу от одного до тридцати.

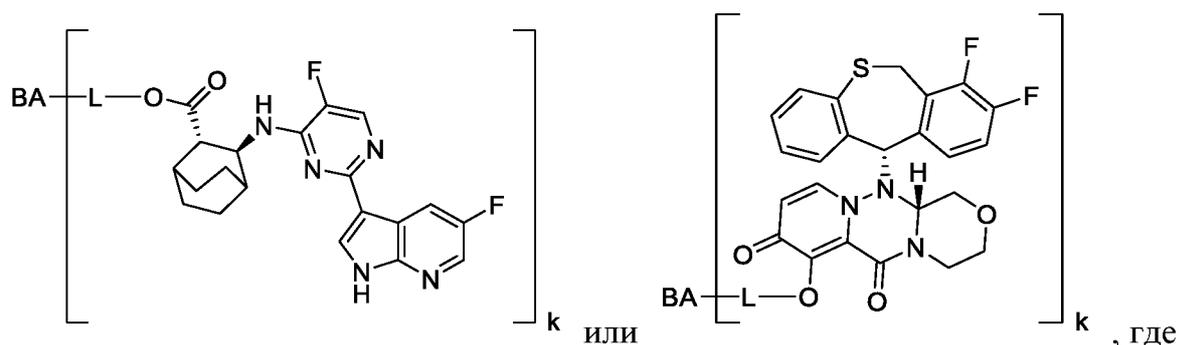
4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 3, где **P** представляет собой ингибитор вируса гриппа.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 3, где **P** представляет собой ингибитор полимеразы.

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 3, где **P** представляет собой VX-787, его производное или его остаток.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 3, где **P** представляет собой балоксавир, его производное, или его остаток.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 3, где **Ab** представляет собой антитело к гемагглютинуину или его антигенсвязывающий фрагмент.
9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 8, где **P** представляет собой ингибитор вируса гриппа.
10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 8, где **P** представляет собой ингибитор полимеразы.
11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 8, где **P** представляет собой VX-787, его производное, или его остаток.
12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 8, где **P** представляет собой балоксавир, его производное, или его остаток.
13. Соединение, имеющее следующую структуру

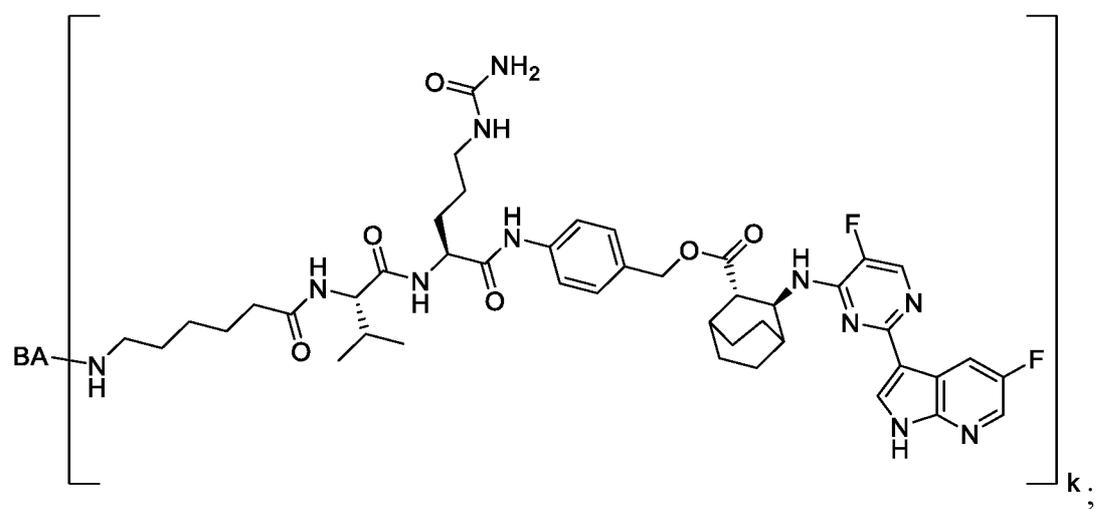
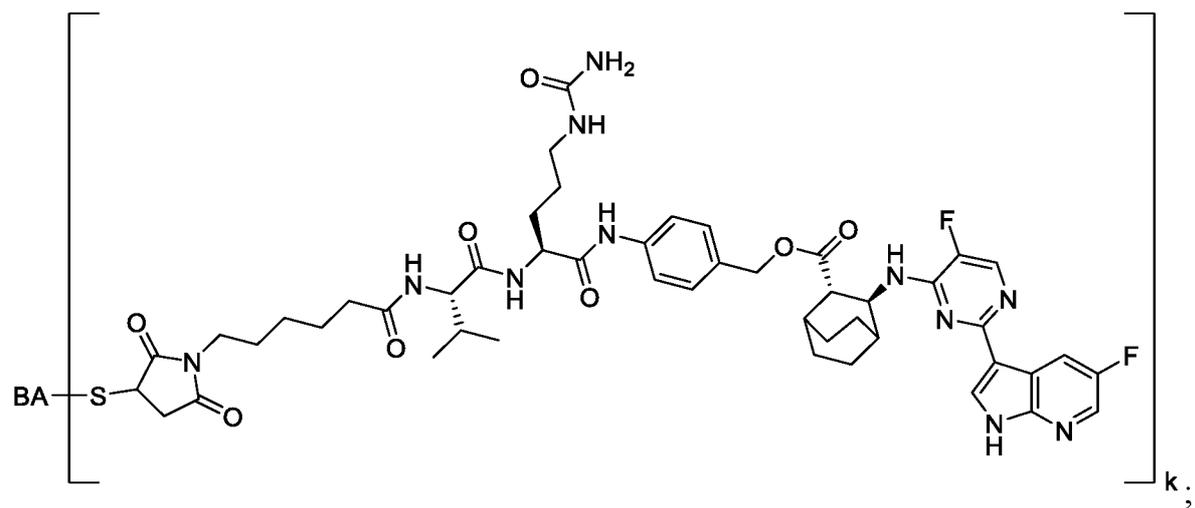


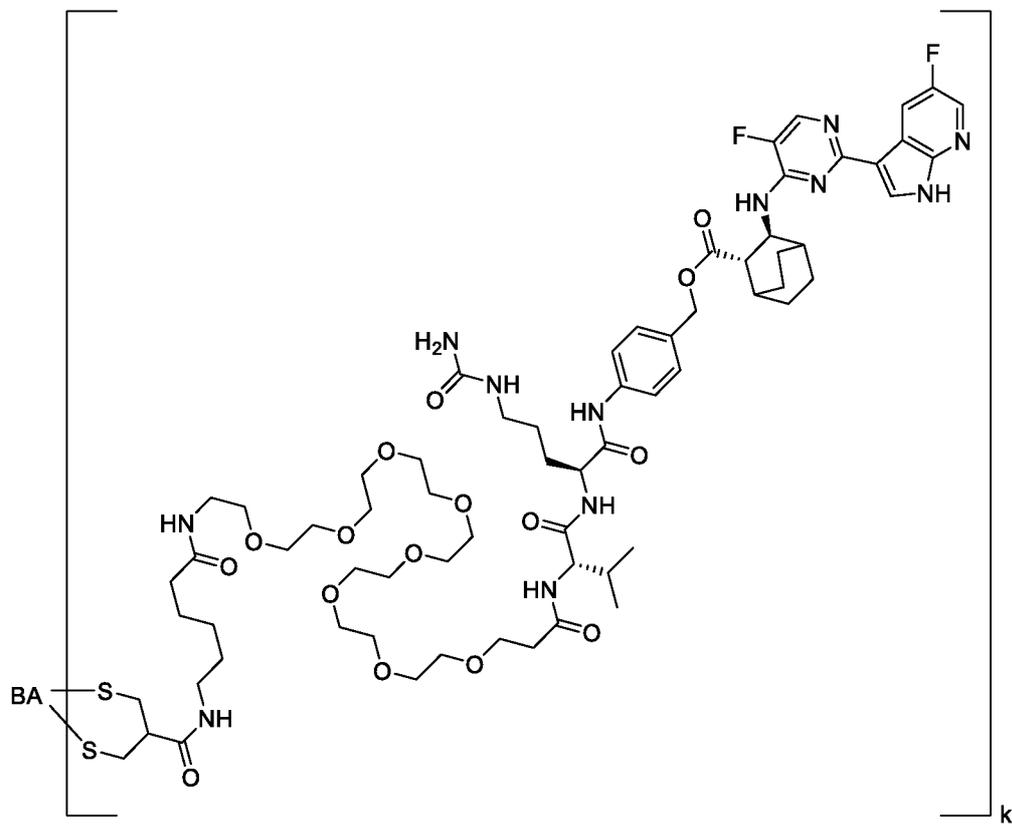
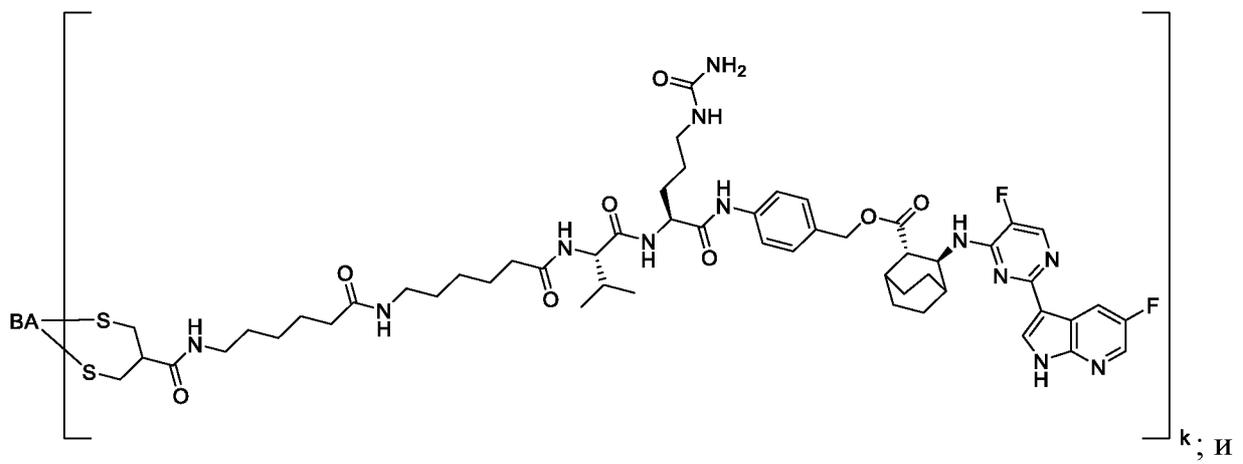
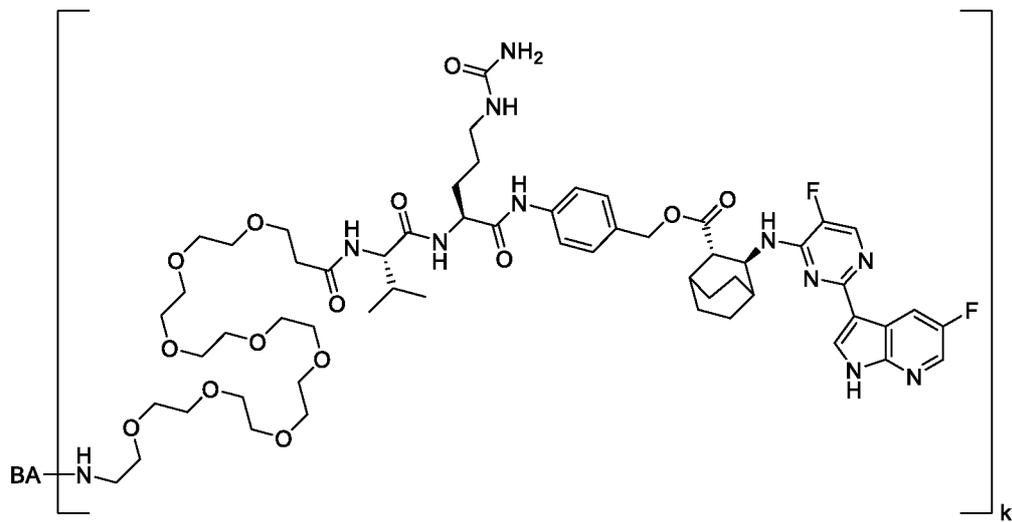
L представляет собой линкер;

BA представляет собой связующий агент; и

k равен целому числу от одного до тридцати.

14. Соединение по п. 13, выбранное из группы, включающей





где

ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и **к** равен целому числу от одного до тридцати.

15. Соединение по п. 13, отличающееся тем, что **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов формулы изобретения, где **Аb** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное транsgлутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, остаток глутамина, используемый для конъюгации.

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **Аb** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное транsgлутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, два остатка глутамина, используемых для конъюгации.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **Аb** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное транsgлутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, три остатка глутамина, используемых для конъюгации.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов формулы изобретения, где **Аb** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное транsgлутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, четыре остатка глутамина, используемых для конъюгации.

20. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по п. 19, где **Аb** или **ВА** представляет собой антитело, модифицированное транsgлутаминазой, или

его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 по нумерации ЕС; и k равен 2.

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по п. 19, где **Ab** или **BA** представляет собой антитело, модифицированное транsgлутаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется в С-терминальной области тяжелой цепи; и k равен 2.

22. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по п. 21, где конъюгация осуществляется через глутамин.

23. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по п. 21, где конъюгация осуществляется через глутамин в последовательности LLQGA в С-терминальной области тяжелой цепи антитела.

24. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по п. 19, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 и двум остаткам N297Q; и k равен 4.

25. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **Ab** или **BA** представляет собой mAb11729.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

27. Фармацевтическая композиция по п. 26, где фармацевтическая композиция имеет состав, предназначенный для введения, которое выбирают из группы, включающей: пероральный, внутривенный, внутривентрикулярный, ингаляционный и интраназальный способы введения.

28. Способ лечения, профилактики, уменьшения тяжести или подавления заболевания, нарушения или состояния, ассоциированного с инфекцией у субъекта, заключающийся во введении субъекту эффективного количества конъюгата

антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции по любому из предшествующих пунктов.

29. Способ по п. 28, где инфекция представляет собой вирусную инфекцию.

30. Способ по п. 29, где инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом гриппа.

31. Способ по п. 29, где инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом гриппа А.

32. Способ по п. 29, где инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом гриппа В.

33. Способ по п. 29, где инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом гриппа А и инфекцию, вызванную вирусом гриппа В.

34. Способ по любому из пп. 28-33, где побочные эффекты соединения при введении субъекту менее выражены по сравнению с введением сопоставимому субъекту неконъюгированного антивирусного соединения.

35. Способ лечения, профилактики, уменьшения тяжести или подавления инфекции гриппа у субъекта, заключающийся во введении субъекту в эффективном количестве конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции по любому из предшествующих пунктов.

36. Способ по п. 35, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А.

37. Способ по п. 35, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А группы 1.

38. Способ по п. 35, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А Н1.

39. Способ по п. 35, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А группы 2.

40. Способ по п. 35, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А Н3.

41. Способ по п. 35, где инфекция гриппа вызвана неизвестным или не определенным вирусом гриппа.

42. Способ по п. 35, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа В.
43. Способ по п. 35, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А и вирусом гриппа В.
44. Способ по любому из пп. 28-43, где конъюгат антитело-лекарственное средство, соединение или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с вспомогательным терапевтическим средством.
45. Способ по п. 44, где вспомогательное терапевтическое средство выбирают из группы, включающей: антивирусное лекарственное средство, противовоспалительное лекарственное средство, антитело, специфично связывающееся с НА вируса гриппа, вирусную вакцину, пищевую добавку и паллиативную терапию для лечения инфекции гриппа.
46. Способ по п. 45, где противовоспалительное лекарственное средство выбирают из группы, включающей кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства.
47. Способ по п. 46, где пищевая добавка является антиоксидантом.
48. Способ по любому из пп. 44-47, где для введения вспомогательного терапевтического средства используется способ введения, отличающийся от способа введения конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции.
49. Способ по любому из пп. 44-48, где вспомогательное терапевтическое средство вводят перорально.
50. Способ по п. 45, где антивирусным лекарственным средством является осельтамивир.
51. Способ по п. 50, где осельтамивир вводят до введения конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции.

52. Способ по п. 50, где осельтамивир вводят одновременно с введением конъюгата антитело-лекарственное средство, соединением или фармацевтической композицией.

53. Способ по п. 50, где осельтамивир вводят после введения конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции.

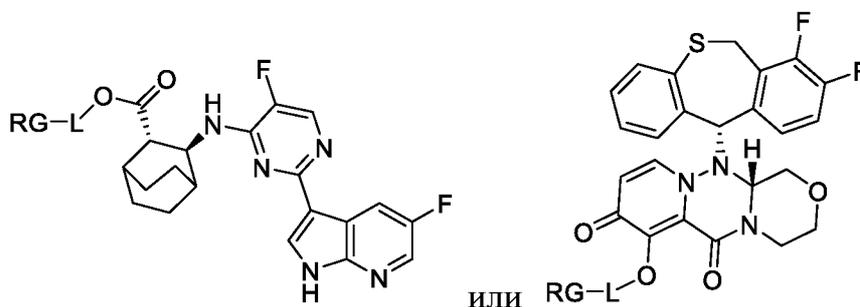
54. Способ по п. 45, где антивирусным лекарственным средством является лекарственное средство против вируса гриппа А или лекарственное средство против вируса гриппа В.

55. Способ по п. 54, где лекарственным средством против вируса гриппа А или лекарственным средством против вируса гриппа В является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

56. Способ по п. 55, где антитело специфично связывается с НА вируса гриппа А или НА вируса гриппа В.

57. Способ по любому из пп. 28-56, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство, соединение или фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, внутрикожно, внутримышечно, интраназально или перорально.

58. Линкер-антивирусное соединение, имеющее следующую структуру

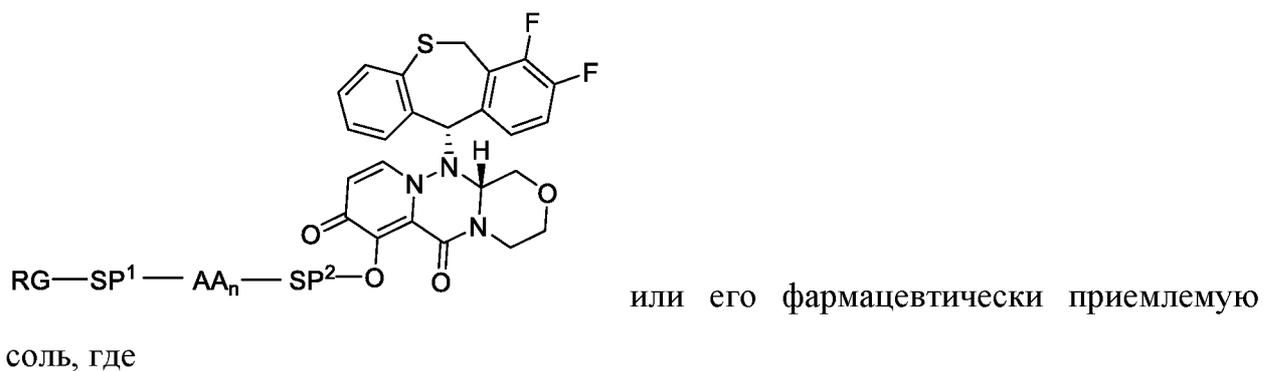
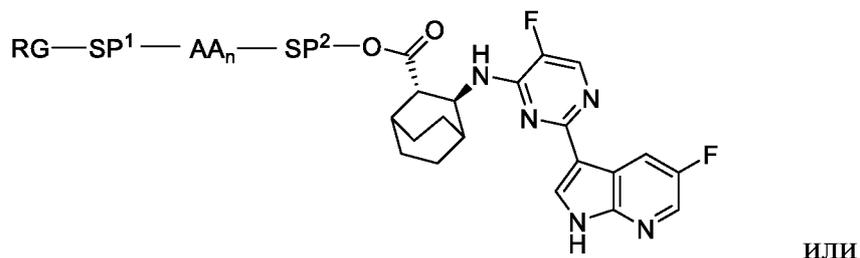


или его фармацевтически приемлемая соль, где

L представляет собой линкер; и

RG представляет собой реакционноспособную группу.

59. Линкер-антивирусное соединение по п. 58, где линкер-полезная нагрузка представляет собой



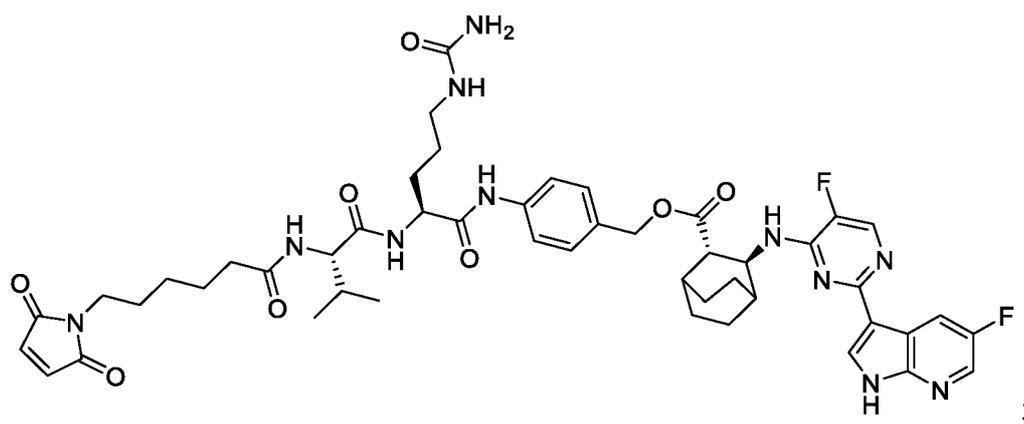
SP¹ и SP², при наличии представляют собой спейсерные группы;

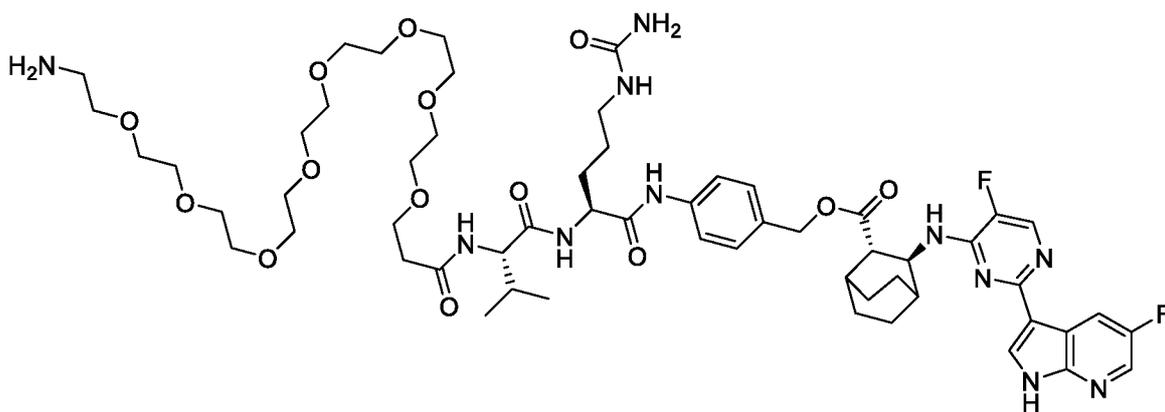
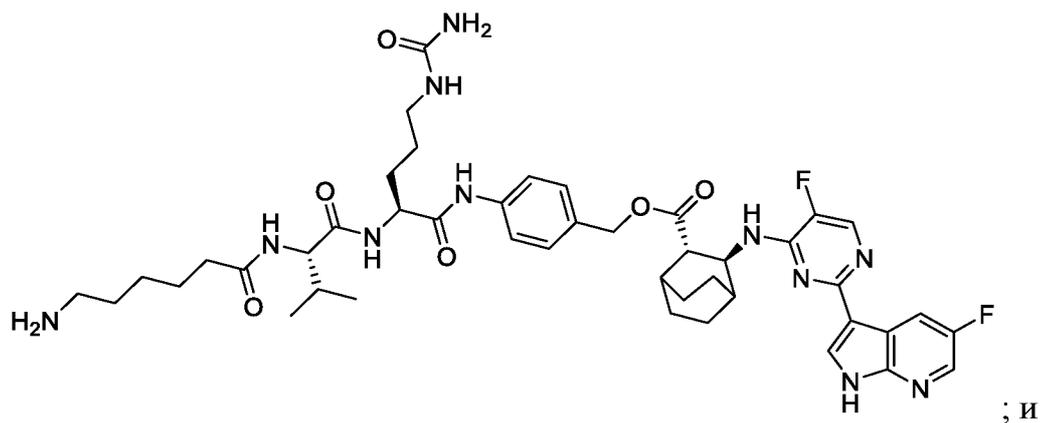
RG представляет собой группу, взаимодействующую с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом;

каждый фрагмент AA представляет собой аминокислоту; и

n равен целому числу от 1 до 10.

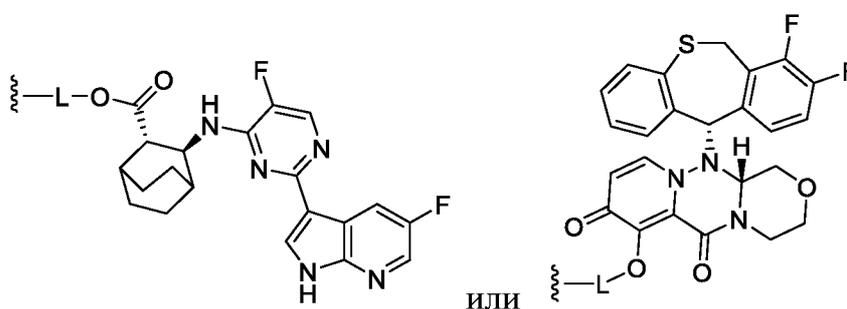
60. Линкер-антивирусное соединение по п. 59, выбранное из группы, включающей





61. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с соединением по п. 58.

62. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 61, где конъюгированное соединение выбирается из



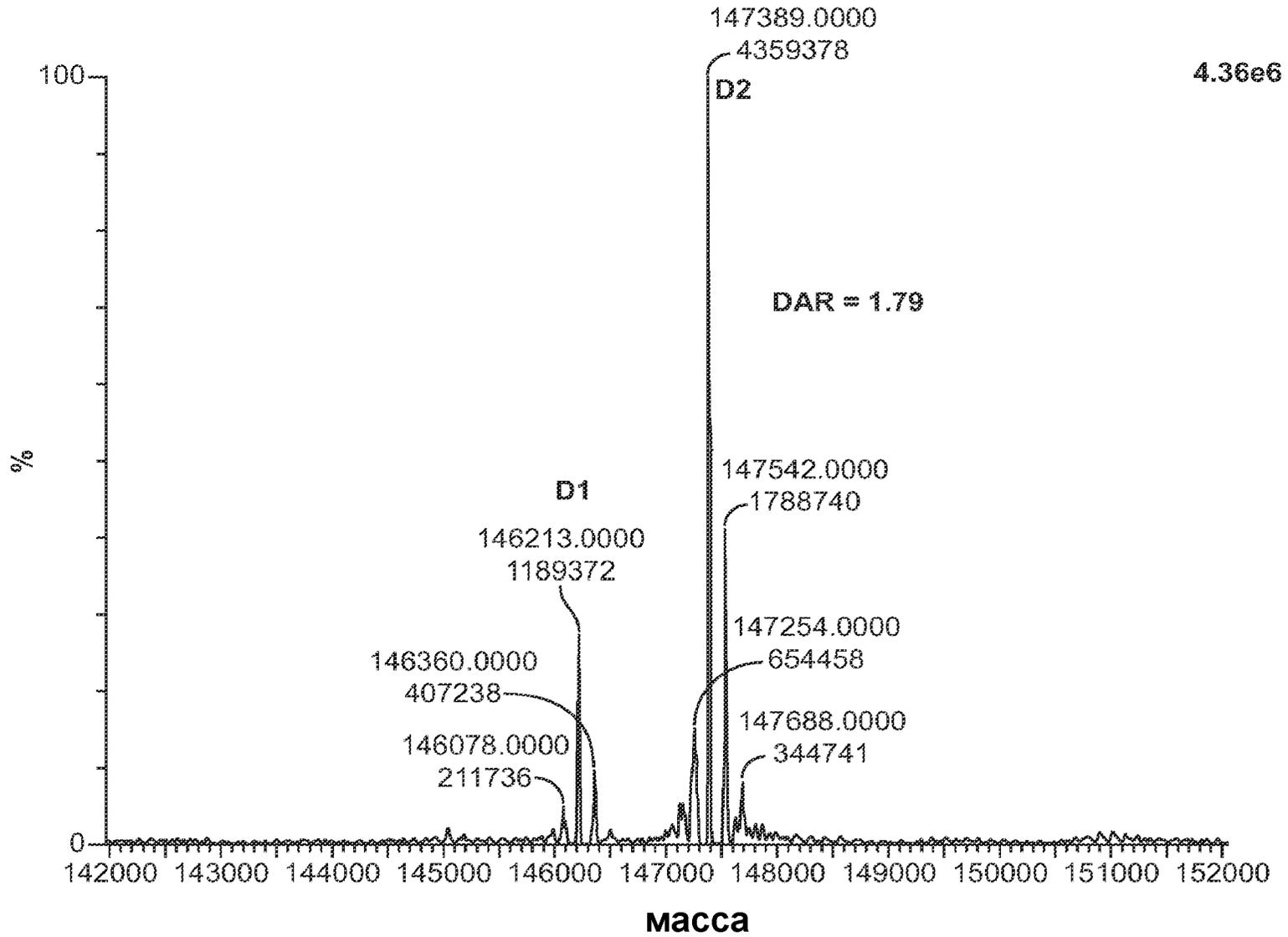
где **L** представляет собой линкер.

63. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий приведение в контакт связующего агента с линкером-антивирусным соединением по п. 58.

64. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа А или его антигенсвязывающий фрагмент.
65. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа А, группа 1, или его антигенсвязывающий фрагмент.
66. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа H1, или его антигенсвязывающий фрагмент.
67. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа А, группа 2, или его антигенсвязывающий фрагмент.
68. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа H3 или его антигенсвязывающий фрагмент.
69. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **Ab** или **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа В антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
70. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, содержащий антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированный с противовирусным соединением через линкер, где конъюгат антитело-лекарственное средство связывается с и/или ингибирует основной белок полимеразы 2 (PB2) (VX-787), кислый белок полимеразы (PA) (балоксавира марбоксил), и/или основной белок полимеразы 1 (PB1).
71. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение содержит тяжелую цепь антитела и дополнительно содержит пентапептид в С-терминальной области тяжелой цепи антитела.

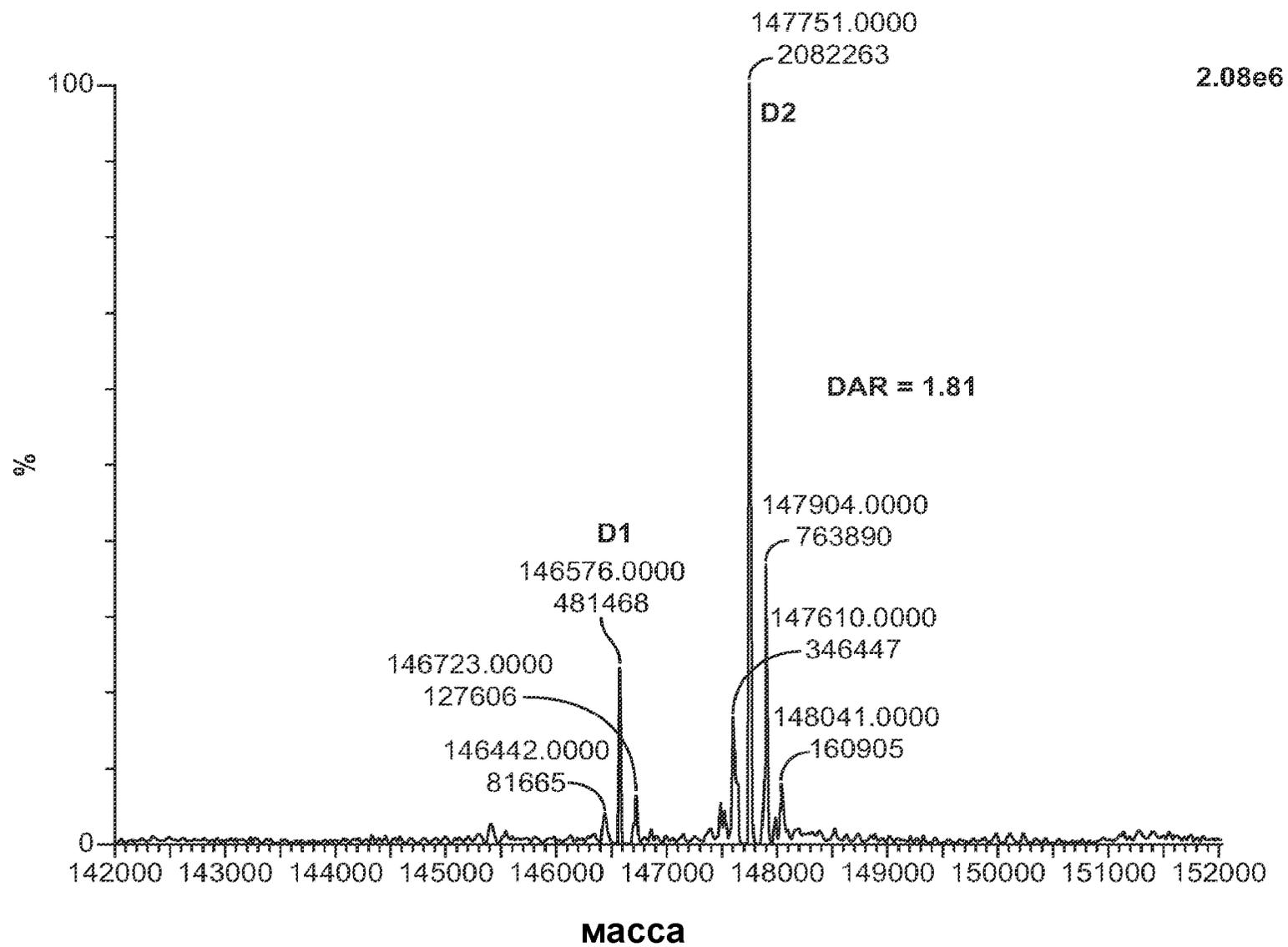
72. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по п. 71, где пентапептид содержит аминокислотную последовательность LLQGA.
73. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область LCVR, дополнительно содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 26; и область HCVR, дополнительно содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 18.
74. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой mAb11729.
75. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит
- (a) область HCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 20;
 - (b) область HCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22;
 - (c) область HCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 24;
 - (d) область LCDR1, которая содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 28;
 - (e) область LCDR2, которая содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30; и
 - (f) область LCDR3, которая содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 32.

1/9



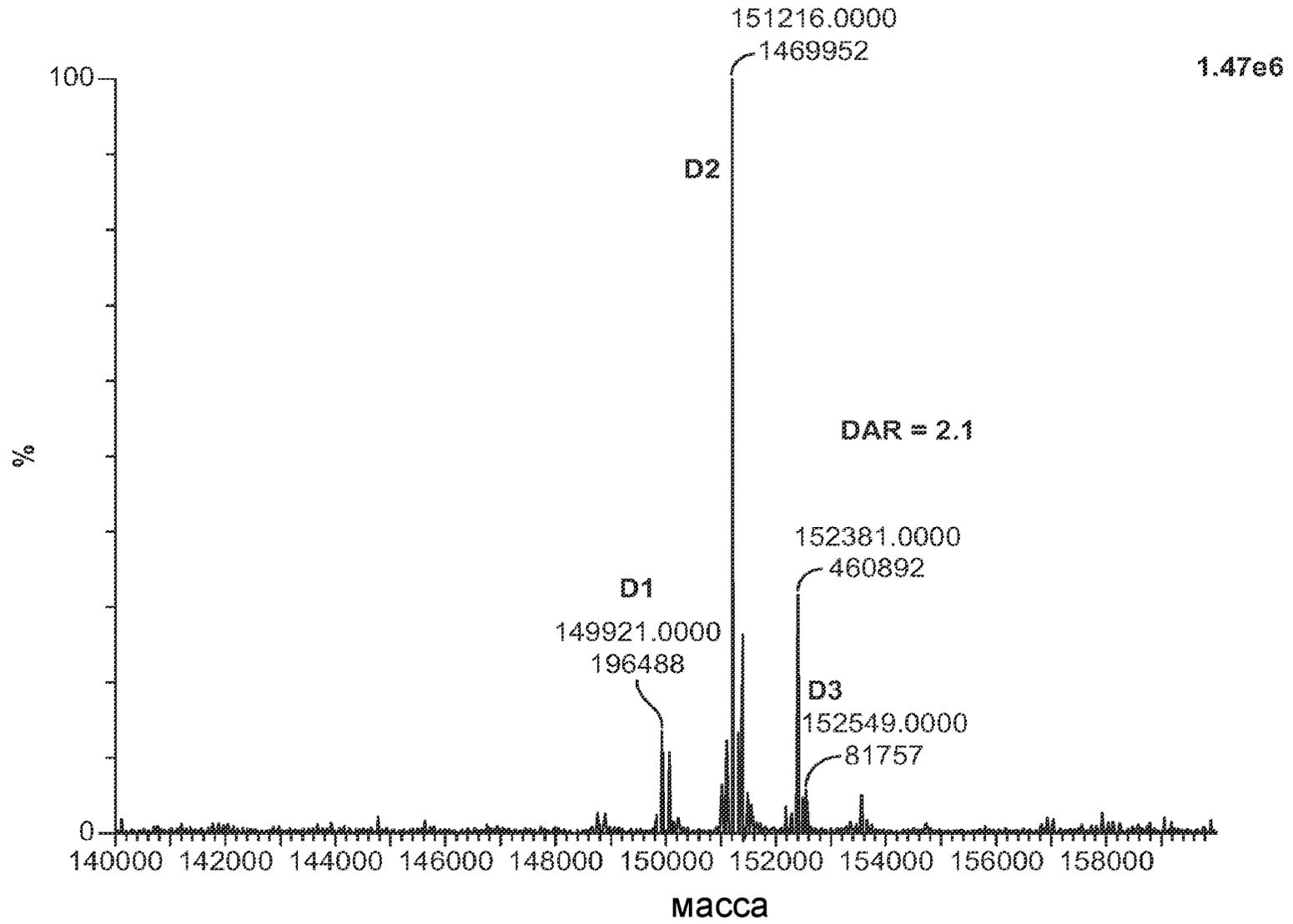
ФИГ. 1А

2/9



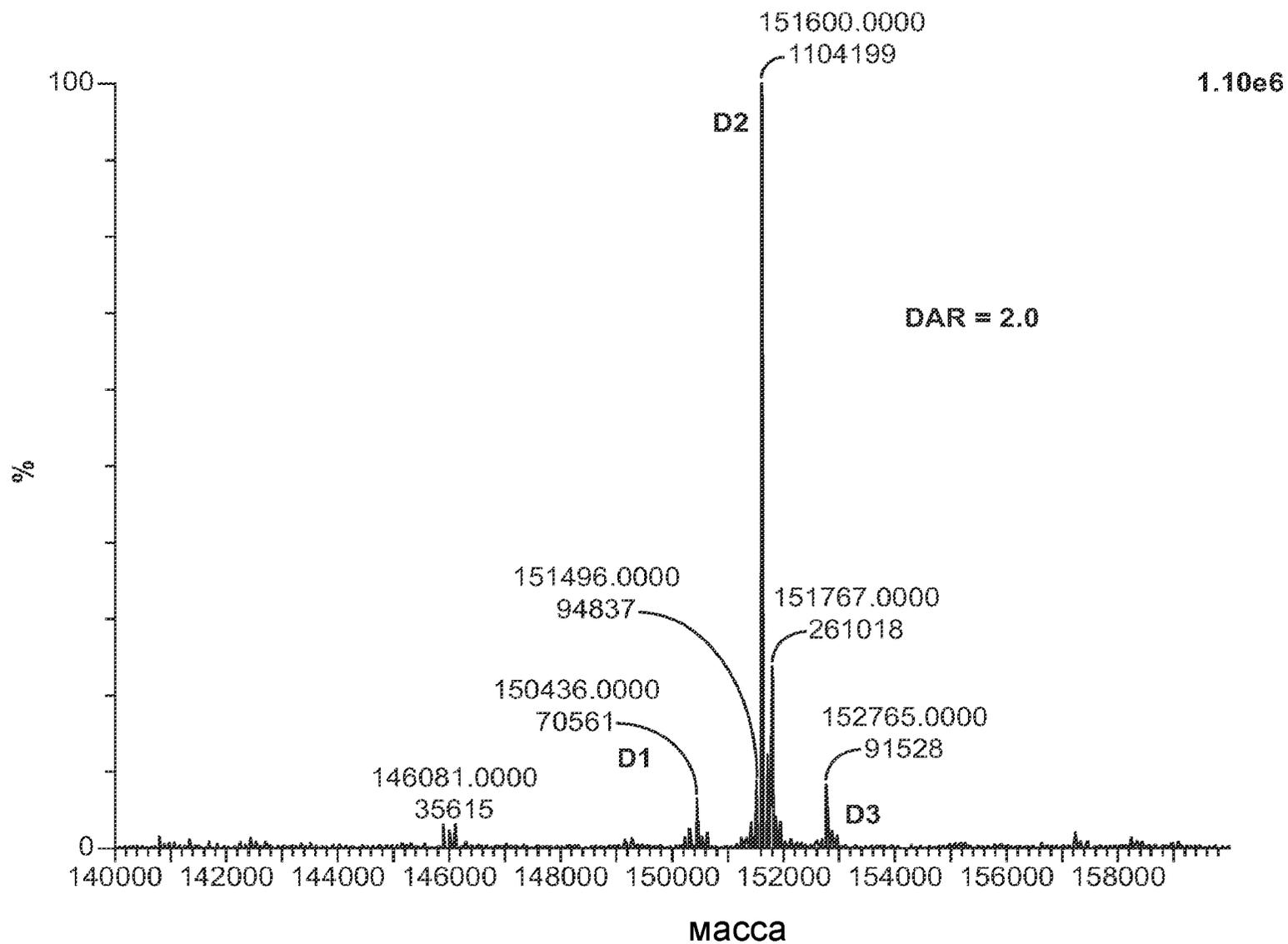
ФИГ. 1В

3/9



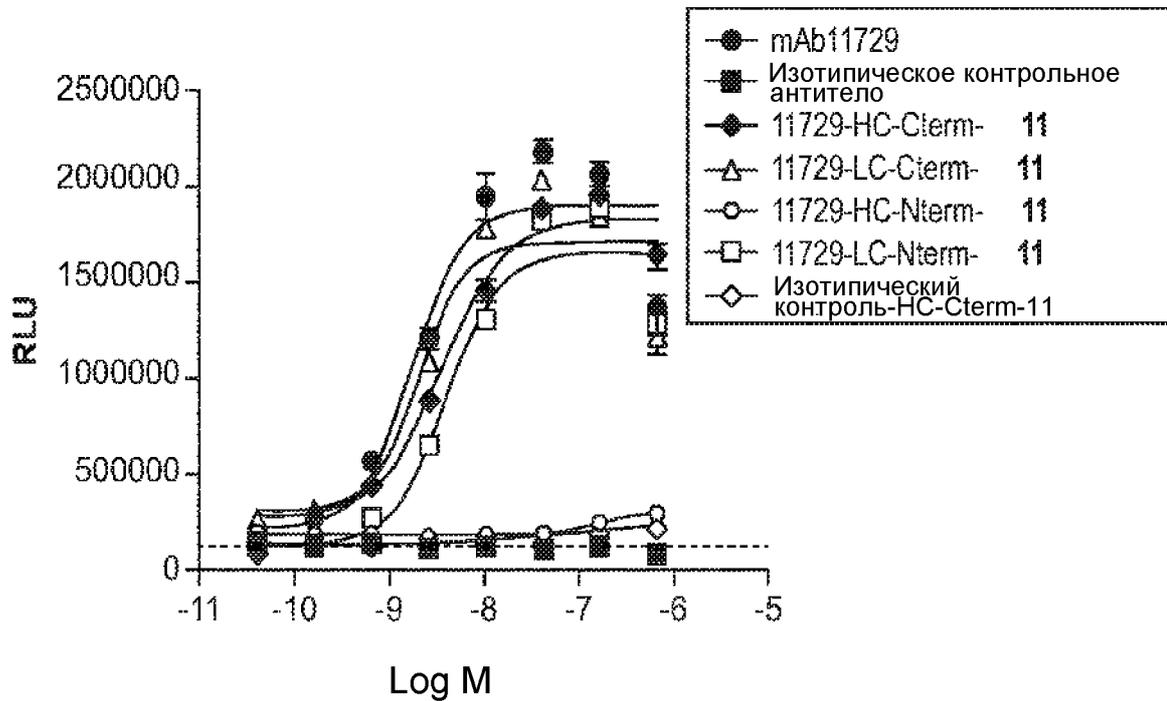
ФИГ. 2А

4/9



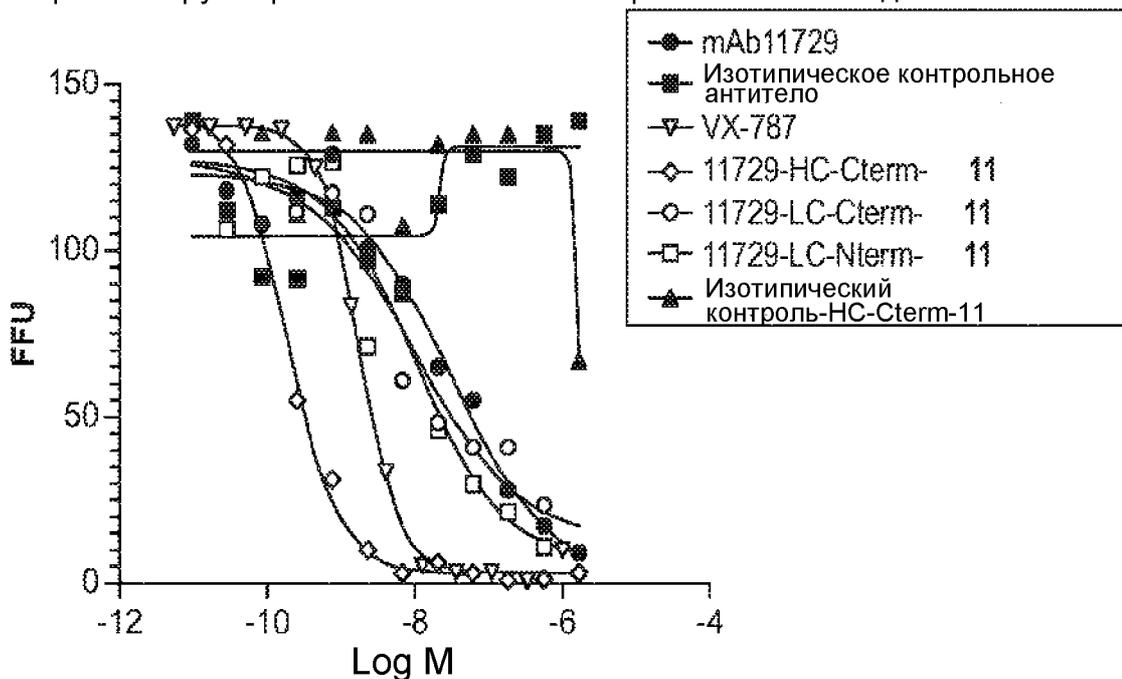
ФИГ. 2В

Конъюгация линкер-полезной нагрузки с С-терминальной областью тяжелой цепи и легкой цепи и N-терминальной областью легкой цепи сохраняет связывание с клетками, инфицированными вирусом гриппа A/H1N1/PR8. Конъюгация линкер-полезной нагрузки с N-терминальной областью тяжелой цепи приводит к потере связывания с клетками, инфицированными вирусом гриппа A/H1N1/PR8



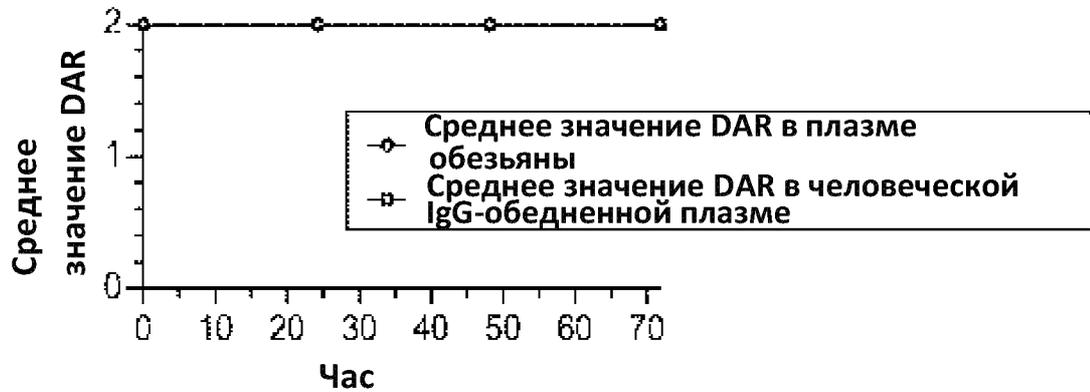
ФИГ. 3

Конъюгация линкер-полезной нагрузки с С-терминальной областью тяжелой цепи и легкой цепи и с N-терминальной областью легких цепей приводит к 3- 163-кратному повышению противовирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство против вируса гриппа A/H1N1/PR8 по сравнению с исходным антителом.



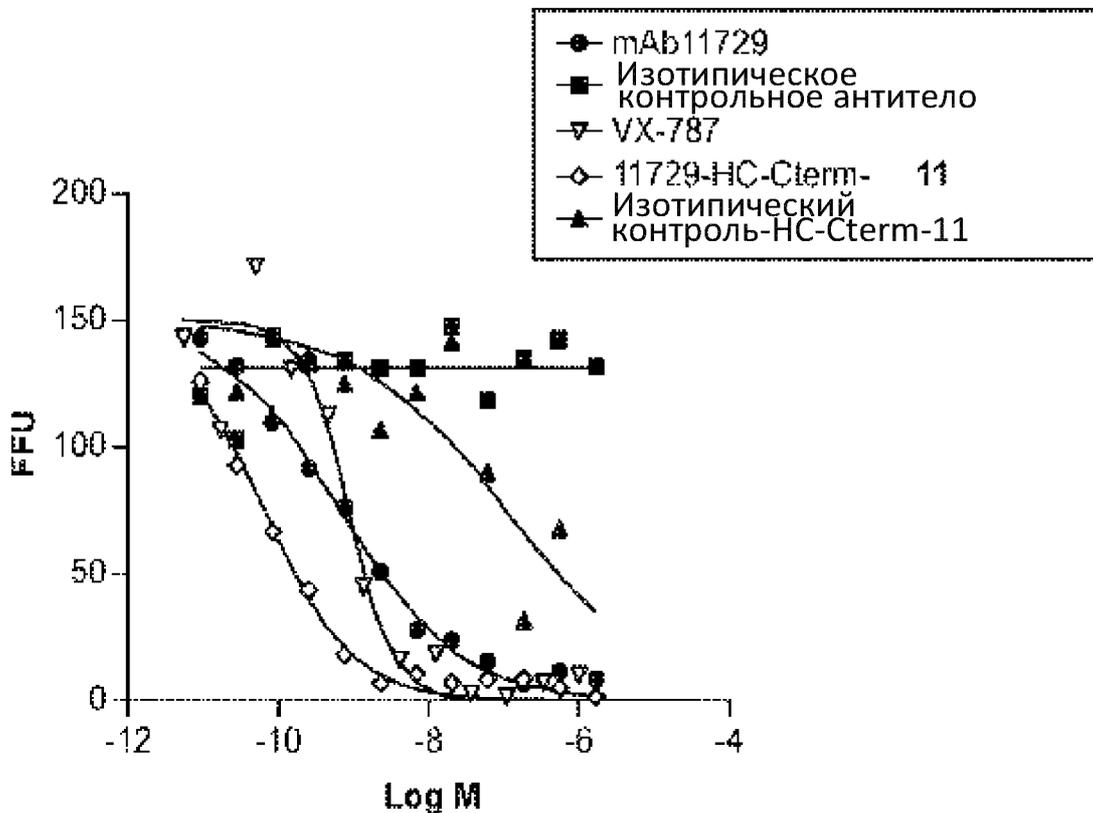
ФИГ. 4

11729-НС-Cterm-11 среднее значение DAR



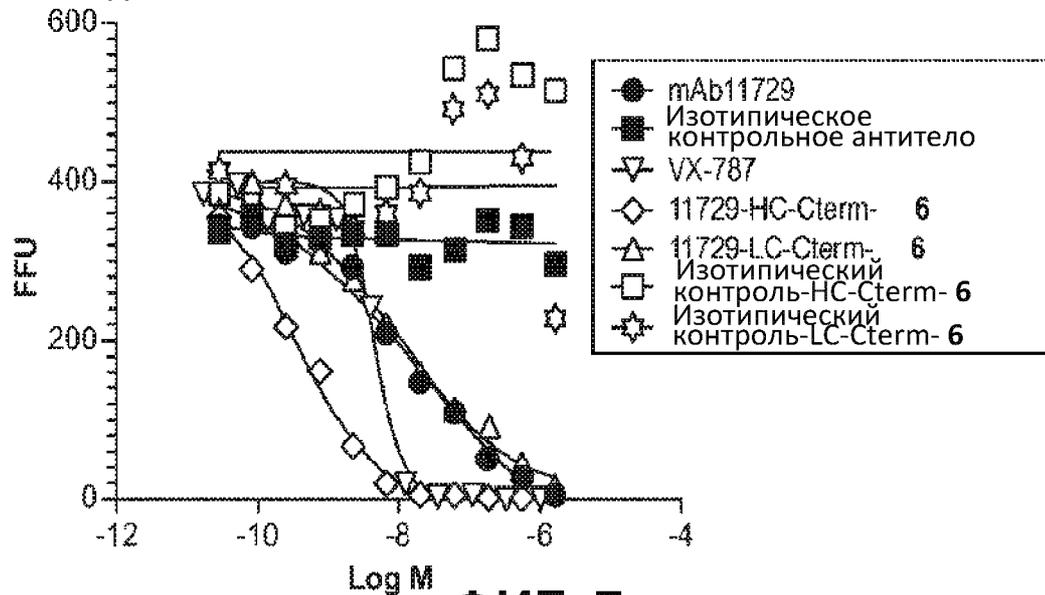
ФИГ. 5

Конъюгация линкер-полезной нагрузки с С-терминальной областью тяжелой цепи приводит к 10-кратному повышению антивирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство против вируса гриппа A/H1/N1/Cal09 по сравнению с активностью исходного антитела



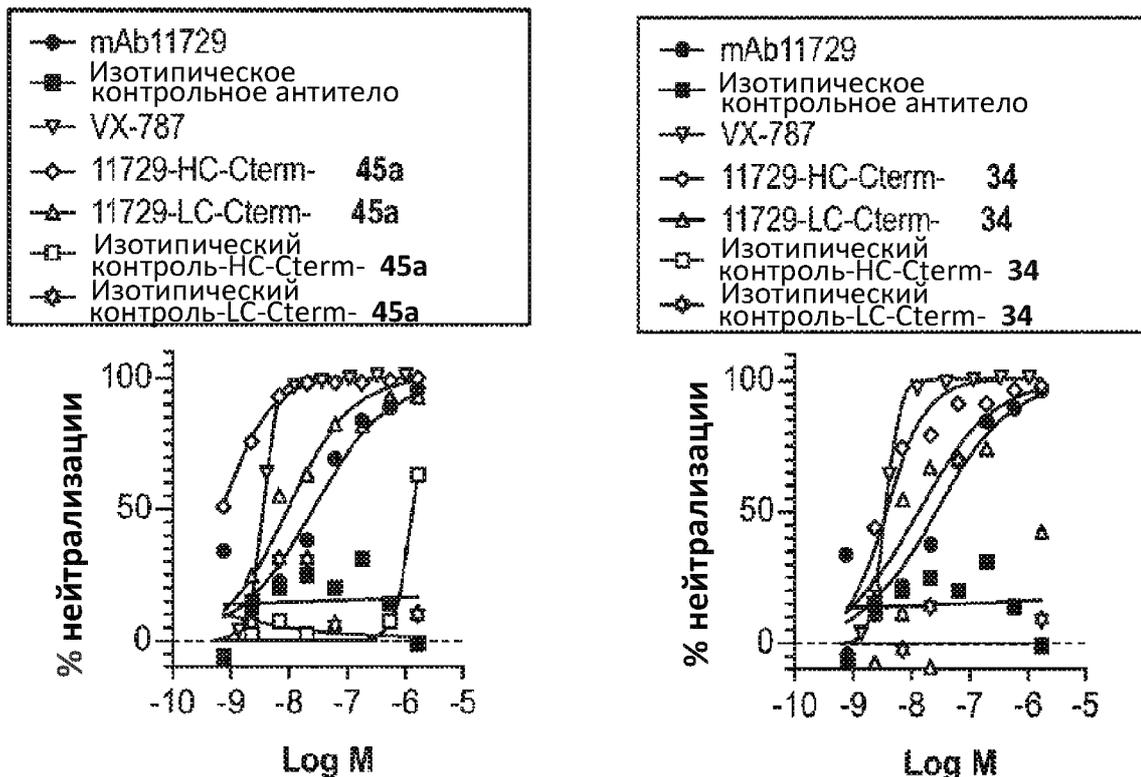
ФИГ. 6

Конъюгация линкер-полезной нагрузки с С-терминальной областью тяжелой цепи приводит к 51-кратному повышению противовирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство против вируса гриппа А/Н1/Н1/PR8 по сравнению с исходным антителом. Конъюгация линкер-полезной нагрузки с С-терминальной областью легкой цепи не приводит к увеличению противовирусной активности по сравнению с исходным моноклональным антителом.



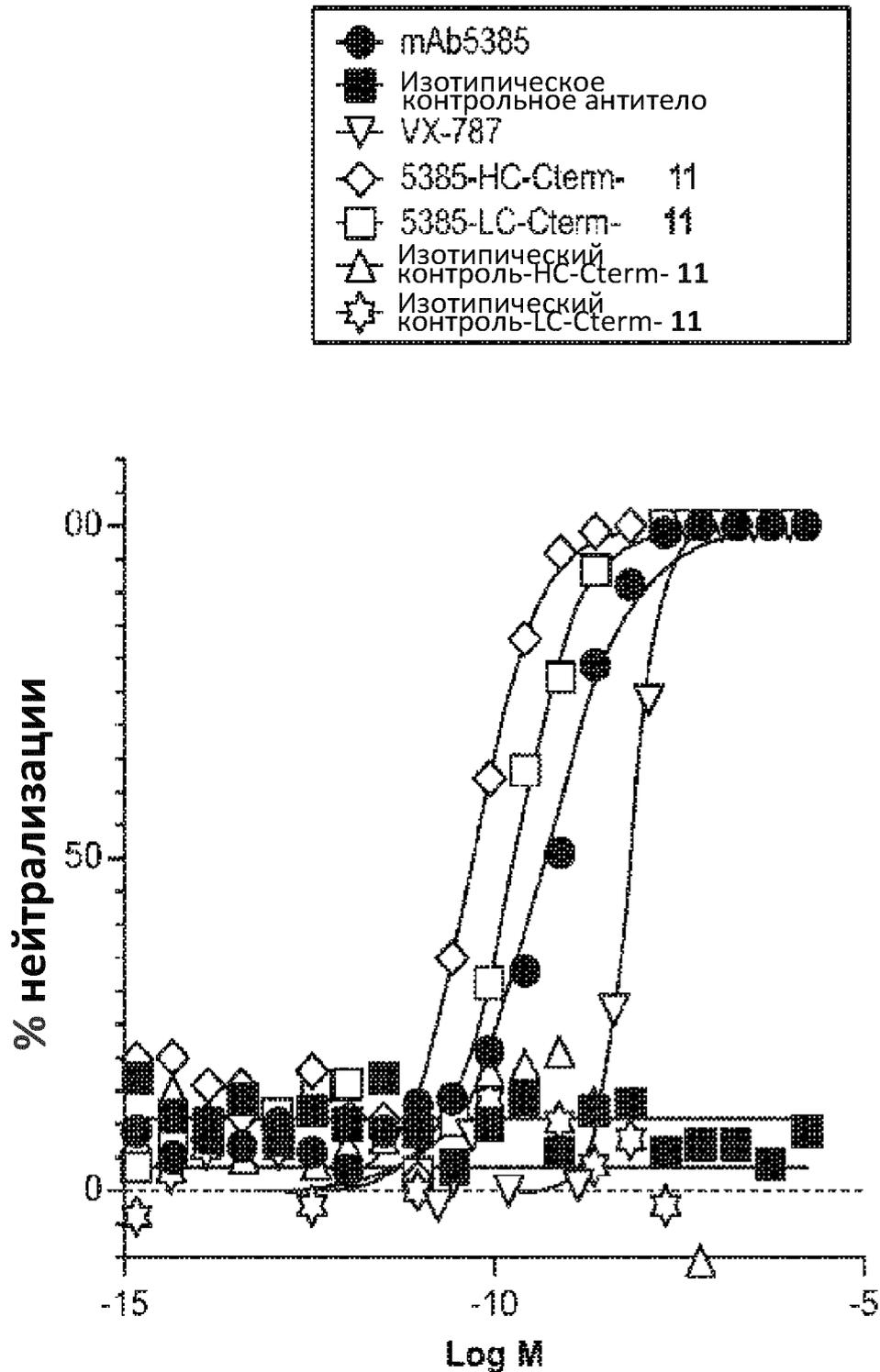
ФИГ. 7

Конъюгация линкер-полезных нагрузок с С-терминальной областью тяжелой цепи приводит к 7- и 31-кратному повышению противовирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство к вирусу гриппа А/Н1/Н1/PR8. Конъюгация линкер-полезных нагрузок с С-терминальной областью легкой цепи не приводит к повышению противовирусной активности в сравнении с исходным моноклональным антителом.



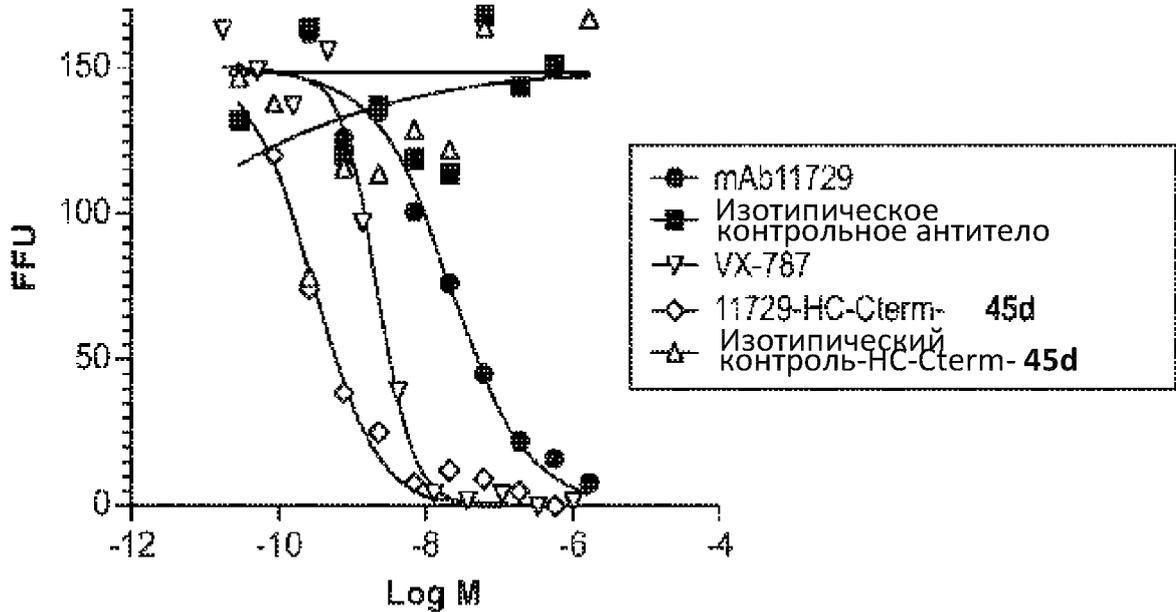
ФИГ. 8

Конъюгация линкер-полезных наг рузок с С-терминальной областью легкой цепи и тяжелой цепи приводит к 3 - 10-кратному повышению антивирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство против вируса гриппа А/Н3/Н2/НК68Х31 по сравнению с активностью исходного антитела.



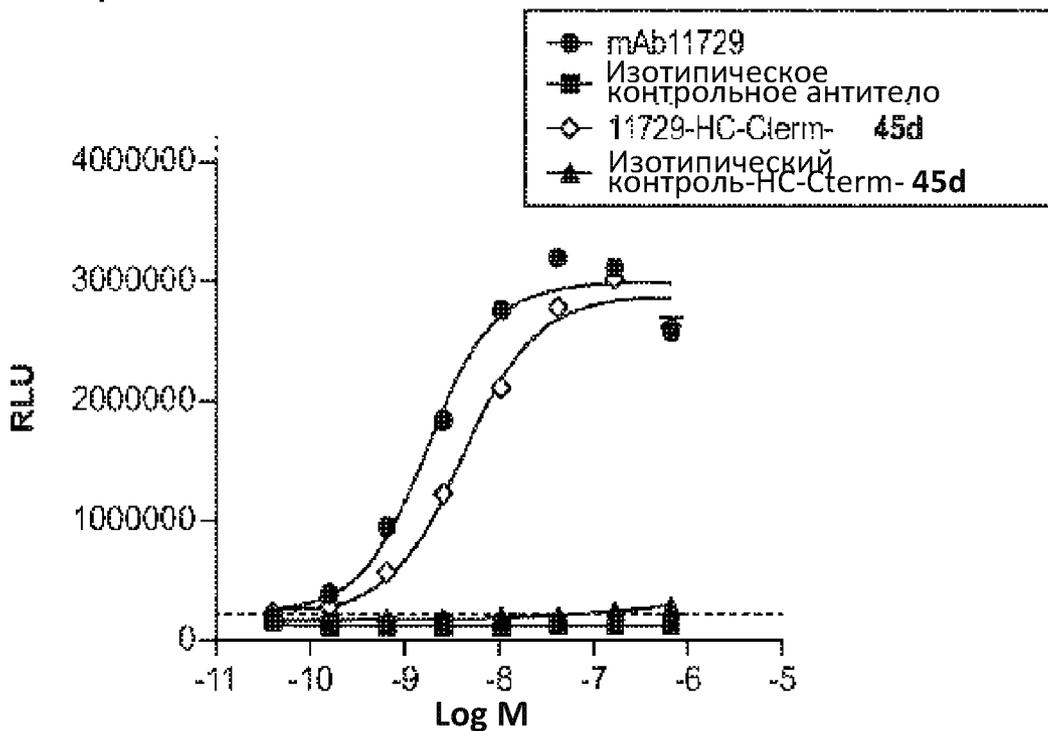
ФИГ. 9

Конъюгация линкер-полезной нагрузки с С-терминальной областью тяжелой цепи приводит к 71-кратному усилению противовирусной активности конъюгатов антитело-лекарственное средство против вируса гриппа А/Н1/Н1/PR8 по сравнению с активностью исходного антитела.



ФИГ. 10

Конъюгация линкер-полезной нагрузки с С-терминальной областью тяжелой цепи сохраняет связывание с клетками, инфицированными вирусом гриппа А/Н1Н1/PR8.



ФИГ. 11