(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202490343 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.03

(22) Дата подачи заявки
2022.07.28

(51) Int. Cl. ***A61K 47/68*** (2017.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)

(54) КОНЪЮГАТЫ БЕЛКОВ С АНТИВИРУСНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

(31) **63/226,713**
(32) **2021.07.28**
(33) **US**
(86) **PCT/US2022/038723**
(87) **WO 2023/009754 2023.02.02**
(88) **2023.03.02**

(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ниттоли Томас (US)

(74) Представитель:
Безрукова О.М. (RU)

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

202490343 A1

202490343 A1

КОНЪЮГАТЫ БЕЛКОВ С АНТИВИРУСНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

ЛИЦЕНЗИОННЫЕ ПРАВА ГОСУДАРСТВА

[001] Настоящее изобретение был создано при государственной поддержке и в соответствии с Соглашением HHSO100201700020C, предоставленным Министерством здравоохранения и социальных служб США. Государство имеет определенные права на изобретение.

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[002] Для настоящей заявки испрашивается приоритет относительно предварительной заявки США № 63/226,713, поданной 28 июля 2021 года, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[003] В настоящей заявке предложены антивирусные соединения и образованные ими белковые конъюгаты, и способы лечения разнообразных заболевании, нарушений и состояний, включающие введение антивирусных соединений и образованных ими конъюгатов.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

[005] Вирусы гриппа включают 3 основных типа, A, B, и C. Вирусы гриппа A могут быть подразделены на подтипы на основании аллельных вариантов в антигенных областях двух генов, которые кодируют поверхностные гликопротеины, гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA), которые требуются для прикрепления и проникновения вируса в клетку хозяина.

[006] 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.

[007] На данный момент определено 18 подтипов гемагглютинина (H1 - H18). Восемнадцать НА могут быть разделены на две группы. Группа 1 включает подтипы H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17, и H18, и группа 2 включает подтипы H3, H4, H7, H10, H14 и H15.

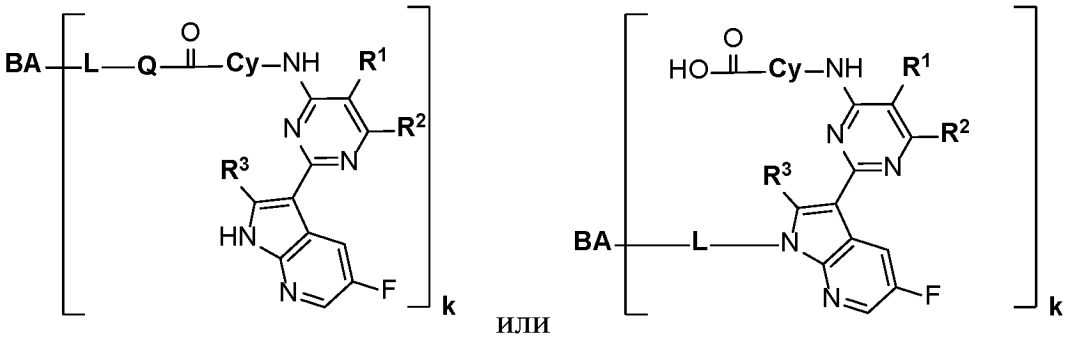
[008] Несмотря на продолжающиеся в течение много десятилетий исследования, отсутствуют зарегистрированные антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), которые нейтрализуют или подавляют заражение вирусом гриппа А или уменьшают тяжесть вызваного этим вирусом заболевания. Поэтому существует потребность в идентификации новых антител и ADC, которые будут нейтрализовать активность многочисленных подтипов вируса гриппа А и могут быть использованы в качестве лекарственных средств для профилактики или терапии заболевания гриппом А.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[009] 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 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 соединение, описанное в настоящей заявке.

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

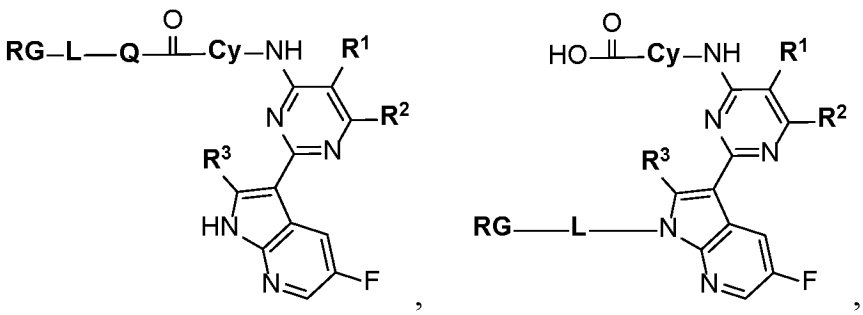


или

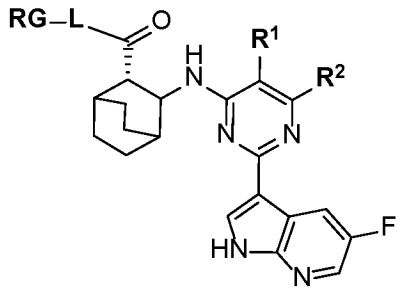
(**101**) (**201**)

где **L** представляет собой линкер; **BA** представляет собой связующий агент; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен; **Q** предствляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-; и **k** представляет собой целое число от 1 до 30.

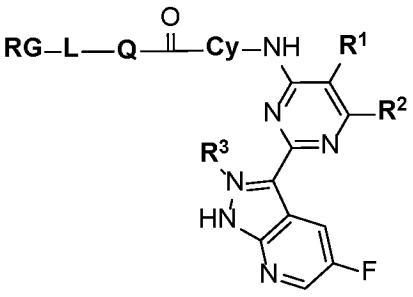
[0011] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены линкер-полезные нагрузки (например, линкер-антивирусные соединения), имеющие следующую структуру:



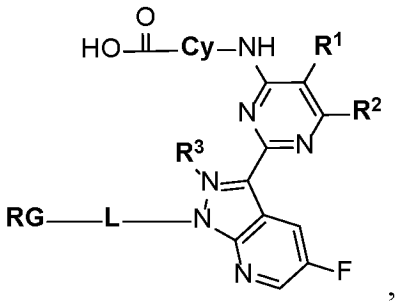
(**401**) (**402**)



(**403**)



, или

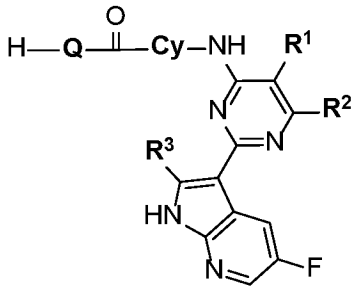


,

(**404**) (**405**)

или их фармацевтически приемлемая соль, где **L** представляет собой линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен; **Q** представляет собой -O- или -O-NH-; и **RG** представляет собой реакционноспособную группу.

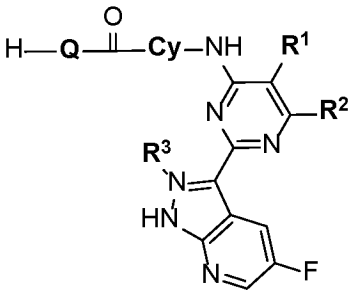
[0012] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены соединения, имеющие следующую структуру



(**301**)

где $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-.

[0013] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены соединения, имеющие следующую структуру



(**311**)

где $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-.

[0014] В другом варианте осуществления изобретения, изложенном в настоящей заявке, описаны способы получения полезных нагрузок или соединений, линкер-полезных нагрузок или конъюгатов антитело-лекарственное средство и композиций по настоящему изобретению.

[0015] 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, антивирусного соединения), линкера-полезной

нагрузки (например, линкера-антивирусного соединения), конъюгата антитело-лекарственное средство, или фармацевтической композиции, описанных в настоящей заявке. В определенных вариантах осуществления изобретения предложены соединения или композиции, описанные в настоящей заявке, для применения в лечении. В определенных вариантах осуществления изобретения предложены соединения или композиции, описанные в настоящей заявке, для применения в лечении инфекции, вызванной вирусом гриппа, у нуждающегося в таком лечении субъекта. В определенных вариантах осуществления изобретения предложено применение соединения или композиции, описанных в настоящей заявке, для получения лекарственного средства. В определенных вариантах осуществления изобретения предложено применение соединения или композиции, описанных в настоящей заявке, для получения лекарственного средства для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа, у нуждающегося в таком лечении субъекта.

ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0016] В настоящей заявке предложены соединения, композиции и способы, используемые для лечения, например, инфекций, вызванных вирусами гриппа, у субъекта.

[0017] Хотя при применении на практике или проверке настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, сходные или равноценные описанным в настоящей заявке, здесь описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упоминаемые в настоящем описании изобретения, включены в него во всей полноте посредством ссылки.

Определения

[0018] 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.

[0019] Фраза «гемагглютинин вируса гриппа», также называемый «HA вируса гриппа» относится к трехмерному гликопротеину, присутствующему на поверхности вирионов гриппа, которым опосредовано прикрепление (посредством связывания HA1 с α-2,3- и α-2,6-сиаловыми кислотами) и проникновение (посредством конформационных изменений) вируса в клетки хозяина. HA 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). HA синтезируется в виде предшественника (HA0), который подвергается протеолитическому процессингу с образованием двух субъединиц (HA1 и HA2), которые объединяются с образованием структуры, состоящей из стволовой части/округлой головки. Вирусный HA является наиболее вариабельным антигеном на поверхности вируса (восемнадцать подтипов HA могут быть подразделены на две группы), но стволовой домен (HA2) является высококонсервативным в каждой группе.

[0020] Примером аминокислотной последовательности полноразмерного HA вируса гриппа является аминокислотная последовательности изолята вируса гриппа H1N1 A/Калифорния/04/2009, которой в базе данных GenBank присвоен учетный номер FJ966082.1. Фраза «HA вируса гриппа» включает также белковые варианты HA вируса гриппа, выделенные из различных изолятов вируса гриппа, например, GQ149237.1, NC_002017, KM972981.1, и т.д. Фраза «HA вируса гриппа» включает также рекомбинантный HA вируса гриппа или его фрагмент. Фраза также охватывает HA вируса гриппа или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, мышиным или человеческим Fc или с сигнальной последовательностью.

[0021] Фраза «инфекция гриппа» в настоящем изобретении, также охарактеризованная, как «грипп», относится к тяжелому остром 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.

[0022] 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.* C_{1-20} алкил; от 1 до 12 атомов углерода, *т.е.*, C_{1-12} алкил; от 1 до 8 атомов углерода, *т.е.*, C_{1-8} алкил; от 1 до 6 атомов углерода, *т.е.*, C_{1-6} алкил; и от 1 до 3 атомов углерода, *т.е.*, C_{1-3} алкил. Примеры алкильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным метил, этил, н-пропил, изопропил, *н*-бутил, втор-бутил, трет-бутил, изобутил, пентил, гексил, циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил. Пентильная группа включает, не ограничиваясь перечисленным, н-пентил и изопентил. Гексильная группа включает, не ограничиваясь перечисленным, н-гексил.

[0023] 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 документа для алкила. В некоторых вариантах осуществления изобретения алкилен не замещен.

[0024] Обозначение аминокислоты или аминокислотного остатка без указания ее стереохимии включает L-форму и D-форму аминокислоты, или их рацемическую смесь.

[0025] 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, $–CF_3$, $–CH_2CF_3$, $–CCl_2F$, и $–CCl_3$.

[0026] 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 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.

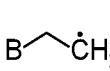
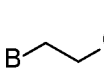
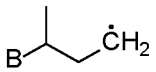
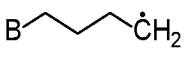
[0027] В настоящем документе, термин «алкинил» относится к одновалентному углеводородному радикалу, содержащему, по меньшей мере, два атома углерода и одну или более углерод-углеродных связей. Алкинил необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкинил включает, не ограничиваясь перечисленным, радикалы, содержащие от 2 до 20 атомов углерода, *т.е.*, C_{2-20} алкинил; от 2 до 12 атомов углерода, *т.е.*, C_{2-12} алкинил; от 2 до 8 атомов углерода, *т.е.*, C_{2-8} алкинил; от 2 до 6 атомов углерода, *т.е.*, C_{2-6} алкинил; и от 2 до 4 атомов углерода, *т.е.*, C_{2-4} алкинил. Примеры алкинильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, этинил, пропинил и бутинил.

[0028] 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*, CH_3CH_2-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 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.*, C_{1-20} алкокси; от 1 до 12 атомов углерода, *т.е.*, C_{1-12} алкокси; от 1 до 8 атомов углерода, *т.е.*, C_{1-8} алкокси; от 1 до 6 атомов углерода, *т.е.*, C_{1-6} алкокси; и от 1 до 3 атомов углерода, *т.е.*, C_{1-3} алкокси. Примеры алкоксигрупп включают, не ограничиваясь перечисленным, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, изобутокси,

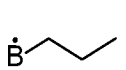
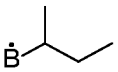
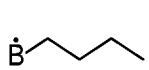
пентокси, гексокси, циклопропокси, циклобутокси, циклопентокси и циклогексокси группы.

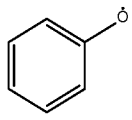
[0029] В настоящем документе термин «галоалкокси» относится к группе алкокси, согласно вышеприведенному определению, в которой алкокси включает, по меньшей мере, один заместитель, выбранный из галогенов, *например,* F, Cl, Br, или I.

[0030] 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.*, C_{6-20} арил; от 5 до 15 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C_{6-15} арил, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C_{6-10} арил. Примеры арильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, фенил, нафтил, флуоренил, азуленил, антрил, фенантрил и пиренил.

[0031] 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*, ,  ,  ,  , или  , в которой B – ароматическая группа, *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.

[0032] 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*, , ,  ,  , или  , где B 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.

[0033] 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.*, C_{6-20} арилокси; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C_{6-15} арилокси, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C_{6-10} арилокси. Примеры группы арилокси включают, не ограничиваясь перечисленным, фенокси, нафтокси, и антрокси.

[0034] 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.*, C_{6-20} арилен; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C_{6-15} арилен, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, *т.е.*, C_{6-10} арилен.

[0035] В настоящем документе термин «гетероалкил» относится к алкилам, в молекуле которых один или нескольк 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.

[0036] 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.

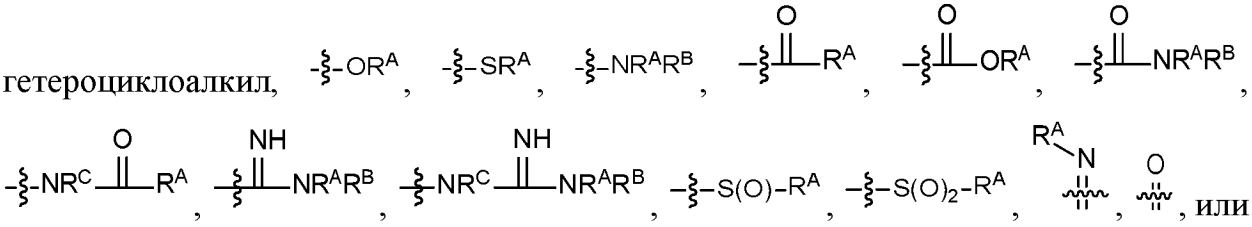
[0037] В настоящем документе термин «гетероарилен» относится к двухвалентному гетероарилу, в молекуле которого вместо одного ил нескольких кольцевых атомов ароматического кольца присутствует атом кислорода, серы, азота или фосфора. Гетероарилен необязательно замещен.

[0038] 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.

[0039] 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 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 гидрокарбилом), $Zn(OTf)_2$, $ZnCl_2$, $Yb(OTf)_3$, $Sc(OTf)_3$, $MgBr_2$, $NiCl_2$, $Sn(OTf)_2$, $Ni(OTf)_2$, и $Mg(OTf)_2$.

[0040] 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, имидозолидинил, оксазолидинил, или тиазолидинил.

[0041] 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,  , где $\mathbf{R}^A$, $\mathbf{R}^B$, и $\mathbf{R}^C$ представляют собой независимо в каждом случае атом водорода, алкил, алкенил, алкинил, арил, алкиларил, арилалкил, гетероалкил, гетероарил, или гетероциклоалкил, или $\mathbf{R}^A$ и $\mathbf{R}^B$ совместно с атомами, с которыми они соединены, образуют насыщенное или ненасыщенное карбоциклическое кольцо, где кольцо необязательно замещено, и где один или более кольцевых атомов необязательно замещены гетероатомом. В определенных вариантах осуществления изобретения когда радикал необязательно замещен необязательно замещенным гетероарилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом или необязательно замещенным насыщенным или ненасыщенным карбоциклическим кольцом, заместители на необязательно замещенном гетероариле, необязательно замещенном гетероциклоалкиле или необязательно замещенном насыщенном или ненасыщенном карбоциклическом кольце, если они замещены, то они не замещены заместителями, которые дополнительно необязательно замещены дополнительными заместителями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда описанная в настоящем документе группа необязательно замещена, соединенный с группой заместитель не является замещенным, если не указано иное.

[0042] Если не указано иное, то подразумевается, что отраженные в настоящем документе структуры включают все изомерные (например, энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные)) формы структуры; например, (*R*)- и (*S*)-конфигурации дя каждого центра асимметрии, (Z)- и (E)-изомеры по положению двойной связи, и (Z)- и (E)-конформационные изомеры. Таким образом, в объем настоящего описания входят простые стереохимические изомеры и также смеси энантиомеров, диастереомеров и геометрических (или конформационных) изомеров настоящих соединений. Альтернативно, в контексте настоящего изобретения термин «энантиомерный избыток (эи)» относится к безразмерному молярному отношению, описывающему чистоту хиральных веществ, которые содержат, например, один стереоцентр. Например,

энантиомерный избыток, равный нулю, описывает рацемат (например, смесь энантиомеров 50:50 или отсутствие избытка одного энантиомера относительно другого). В другом примере, энантиомерный избыток, равный 99, указывает на почти стереочистое энантиомерное соединение (т.е. большой избыток одного энантиомера по сравнению с другим). Процент энантиомерного избытка, % эи = ([(*R*)-соединение]-[(*S*)-соединение])/([(*R*)-соединение]+[(*S*)-соединение]) x 100, где содержание (*R*)-соединения > содержания (*S*)-соединения; или % эи = ([(*S*)-соединение]-[(*R*)-соединение])/([(*S*)-соединение]+[(*R*)-соединение]) x 100, где содержание (*S*)-соединения > содержания (*R*)-соединения. Кроме того, в настоящем документе термин «дистереомерный избыток (ди)» относится к безразмерному молярному отношению, описывающему чистоту хиральных веществ, которые содержат более одного стереоцентра. Например, диастереомерный избыток, равный нулю, означает эквимолярную смесь диастереомеров. В другом примере, диастереомерный избыток, равный 99, указывает на почти стереочистое диастереомерное соединение (т.е. большой избыток одного диастереомера по сравнению с другим). Для расчета диастереомерного избытка может применяться метод, аналогичный методу расчете эи. Специалистам следует иметь в виду, что ди обычно указывают в процентах (% ди). Метода расчета % ди аналогичен методу расчета % эи.

[0043] В настоящем документе термин «связующий агент» относится к любой молекуле, *например*, белка, способной к специфичному связыванию с определенным партнером по связыванию, *например*, с антигеном.

[0044] 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, антивирусными соединениями и усиливающими эффект агентами.

[0045] В настоящем документе термин «условия синтеза амидов» относится к условиям проведения реакции, подходящим для образования амида, *например*,

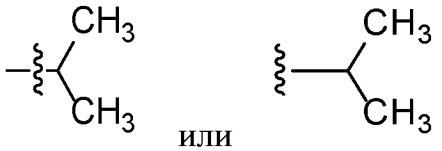
посредством взаимодействия с карбоновой кислотой, активированной карбоновой кислотой или ацилгалогенида с амином. В некоторых примерах термин «условия синтеза амидов» относится к условиям проведения реакции, подходящих для образования амидной связи между карбоновой кислотой и амином. В некоторых из этих 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, дициклогексилкарбодимид (DCC), диизопропилкарбодимид (DIC), ((бензотиазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (BOP), (бензотиазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyBOP), (7-азабензотиазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyAOP), бромтрипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyBrOP), O-(бензотиазол-1-ил)-N,N,N′,N′-тетраметилурония гексафторфосфат (HBTU), O-(бензотиазол-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-дигидрохинолин (EEDQ), N-этил-N′-(3-диметиламинопропил)карбодимид (EDC), 2-хлор-1,3-диметилимидазолидиния гексафторфосфат (CIP), 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (CDMT), карбонилдиимидазол (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.

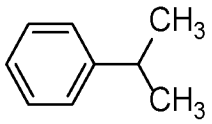
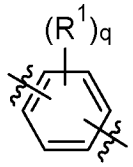
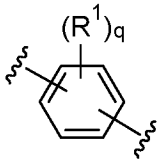
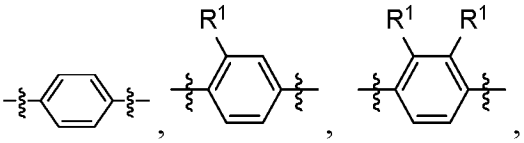
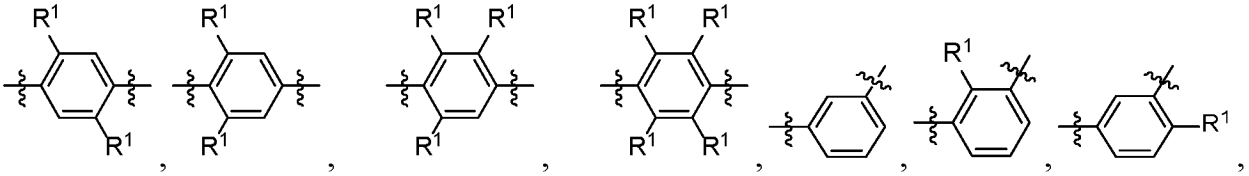
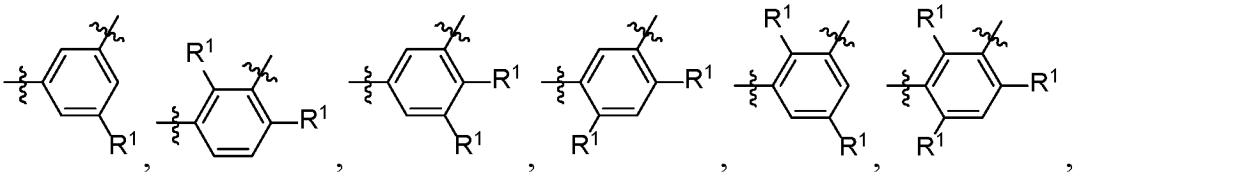
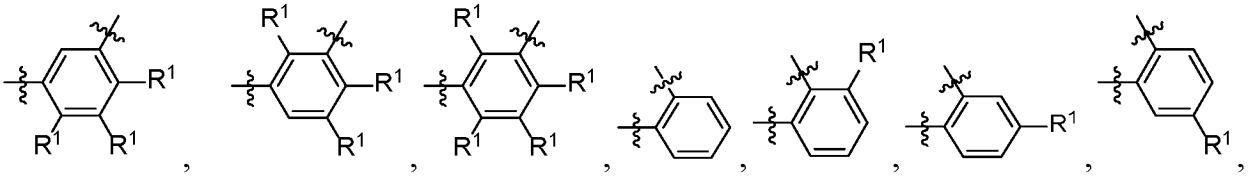
[0046] В настоящем документе термин «остаток» относится к химическому фрагменту в составе соединения, который остается после химической реакции. Например, термин «аминокислотный остаток» или «*N*-алкил-аминокислотный остаток» относится к продукту связывания амида или продукту связывания пептида аминокислоты 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

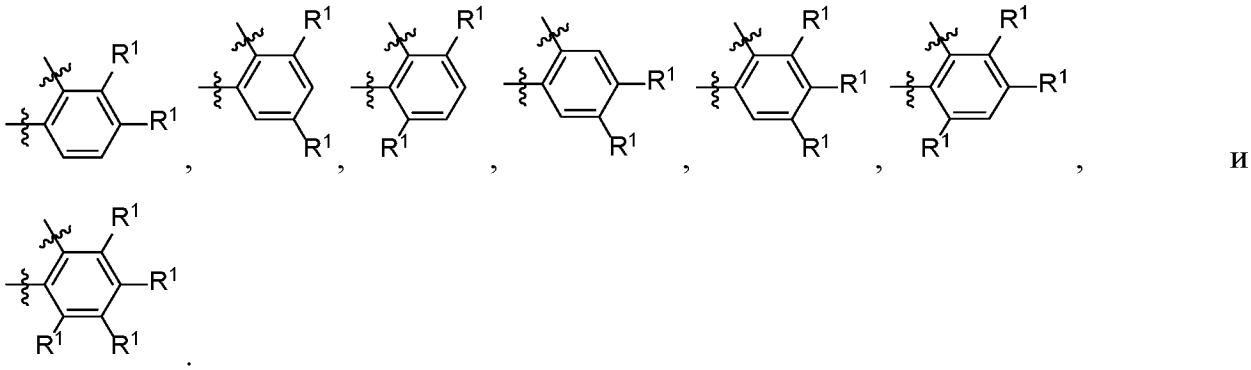
[0047] В настоящем документе термин «конституциональные изомеры» относится к соединениям с одинаковой молекулярной формулой, которые имеют разные химические структуры из-за различного расположения атома. Примеры конституциональных изомеров включают *н*-пропил и изопропил; *н*-бутил, втор-бутил и трет-бутил; и *н*-пентил, изопентил и неопентил, и т.п.

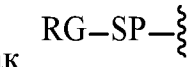
[0048] Определенные группы, фрагменты, заместители и атомы отображены с волнистой линией, которая пересекает связь или связи, чтобы указать на атом, через который эти группы, фрагменты, заместители или атомы связаны. Например, фенильная группа, замещенная пропильной группой, показанная следующим образом:

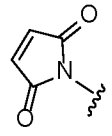
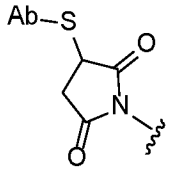
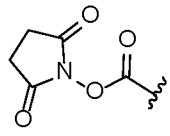
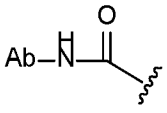


имеет следующую структуру:


. 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 $\mathbf{R^1}$ описаны для общего случая, *m.e.*, не связаны прямо с вершиной структуры линии соединения, *m.e.*, определенным атомом углерода, включает следующие неограничивающие примеры групп, в которых заместитель $\mathbf{R^1}$ связан с определенным кольцевым атомом углерода:  ,  ,  ,  .



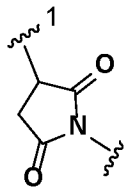
[0049] В настоящем документе фраза «реакционноспособный линкер», или аббревиатура RL, относится к одновалентной группе, которая включает реакционноспособную группу (RG) и спейсерную группу (SP), показанные, например, как  , где RG является реакционноспособной группой, и SP является спейсерной группой. 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 являются функциональной группой или фрагментом, то есть способна взаимодействовать с реакционноспособными участками другой группы, например, антитела, модифицированного антитела или 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 связующего 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 атому NH на боковой цепи остатка лизина, через который функциональная группа связана с **Ab**. В некоторых примерах «реакционноспособная группа» является функциональной группой, *например*, -NH_2, которая взаимодействует с остатком лизина на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте с образованием аминосвязи(?) с ним, *например*, -NH-, где **Ab** относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, и NH относится к атому NH на боковой цепи остатка лизина, через который функциональная группа связана с **Ab**. В определенных вариантах осуществления изобретения реакцию катализирует фермент. В определенных вариантах осуществления изобретения реакцию катализирует фермент трансглютаминаза.

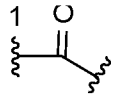
[0050] В настоящем документе фраза «биоразлагаемый фрагмент» относится к фрагменту, который разлагается in vivo до нетоксичных, биосовместимых компонентов, которые могут быть выведены из организма посредством обычных биологических процессов. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоразлагаемый 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 Г, 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 Г (1995) Biomaterials 16(15):1123-1130, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки).

[0051] 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, 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 высвобождать 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.

[0052] 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.

[0053] 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.

[0054] 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 вариабельная область тяжелой цепи (обозначеннвая 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 вариабельная 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 фрамент» 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» относится 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 вариабельный 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 вариабельных 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 комплементарность 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 иммунофармацетические средства (SMIP), и акульи вариабельные домены IgNAR. Антигенсвязывающий фрагмент антитела в типичном случае содержит, по меньшей мере, один вариабельный домен. Вариабельный 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, вариабельная 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 вариабельный домен, ковалентно связанный, по меньшей мере, с одним константным доменом. Неограничивающие, типичные конфигурации вариабельных 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 вариабельных и константных доментов, включая любую из приведенных выше типичных конфигураций, вариабельные 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 вариабельными 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 вариабельных 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 полноразменых 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 вариабельных доменов, где каждый вариабельный 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.

[0055] 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).

[0056] 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.

[0057] 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 вариабельных 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 вариабельных 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 остатках 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

(*m.e.*, 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 2 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.

[0058] 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 по отношению к любой предложенной в настоящем документе аминокислотной последовательности HCVR, LCVR, и/или CDR.

[0059] Термин «человеческое антитело» в настоящем документе включает антитела с вариабельными 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 включает 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 немофидицированном живом организме.

[0060] 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 CHO), 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, экспресированные при использовании рекомбинантного вектора экспрессии, трансфецированного в клетку хозяина, антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных человеческих антитела, 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 вариабельные 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 изотипах IgG, определяется, в частности, структурными различиями, ассоциированными с изотипами антител в шарнирной области. Замена одной аминокислоты в шарнирной области человеческого IgG4 может значимо 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.

[0061] 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 антитены, 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 вариабельных 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 вариабельных 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.

[0062] 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 антивирусными 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.

[0063] 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.

[0064] 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).

[0065] 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).

[0066] В настоящем документе термин «K_D» относится к равновесной константе диссоциации, характеризующей частный случай взаимодействия антитело-антиген.

[0067] 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 антитела 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 ниже фонового сигнала из-за самосвязывания (когда первое и второе антитела являются одним и тем же антителом). Перекрестная конкуренция между двумя антителами может быть выражена, например, как процент связывания второго антитела, меньший по величине по сравнению с исходным фоновым самосвязыванием (где первое и второе антитела являются одним и тем же антителом).

[0068] 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 коплементарной 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.

[0069] Применительно к полипептидам фраза «существенное сходство» или «существенно сходный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT, 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 96, 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 глютамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глютамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными группами для консервативной аминокислотной замены являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глютамат-аспартат и аспарагин-глютамин. 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.

[0070] 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 сответствующим 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 Smith-Waterman с аффинным поиском гэпа и штрафом за открытие гэпа, раным 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.

[0071] 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).

[0072] В настоящем документе термин «субъект» относится к животному, предпочтительно, млекопитающему, более предпочтительно к человеку, нуждающемуся в улучшении состояния, профилактике и/или лечени 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 синдром 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.

[0073] 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.

[0074] 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.

[0075] В настоящем изобретении «защитное действие» может быть продемонстрировано с помощью любой стандартной процедуры, известной из уровня техники, чтобы определить, может ли агент, такой как антивирусное

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.

[0076] В настоящем документе фразы «антивирусное лекарственное средство», «антивирусный», «антивирусное 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 «антивирусное лекарственное средство» (или его синонимы «антивирусное лекарственное средство», «анти-вирусное соединение» и «антивирусное соединение») включает, не ограничиваясь перечисленным, препараты, ТАМИФЛЮ® (Осельтамивир), РЕЛЕНЗА® (Занамивир), рибавирин и интерферон-альфа2b. Антивирусные 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 полимераза вируса гриппа. Примером ингибитора полимеразы является VX-787. Без ограничения каким-либо определенным принципом действия, 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 направлено на клетку хозяина, может ингибировать трансляцию в клетке, тем самым снижая уровень вирусной репликации.

[0077] 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 $1x10^{-8}$ М или менее (например, уменьшение K_D указывает на более прочное связывание). Методы определения специфичности связывания двух молекул 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® HTX. 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 клетки, инфицированные вирусом гриппа.

[0078] 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 на биослое в реальном времени, например, с помощью биосенсора Octet® HTX, или методом поверхностного плазмонного резонанса, например, на приборе, BIACORE™, или при определении аффинности в растворе методом твердофазного ИФА.

[0079] Фраза или термин «скорость диссоциации», «K_{off}», или «k_d» относится к антителу, которое диссоцирует из комплекса с НА вируса гриппа при константе скорости $1x10^{-3}$ сек$^{-1}$ или менее, предпочтительно $1x10^{-4}$ сек$^{-1}$ или менее, определенной методом безмаркерной интерферометрии на биослое в реальном

времени, например, с помощью биосенсора Octet® HTX, или методом поверхностного плазмонного резонанса, например, на приборе BIACORE™.

[0080] 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.

[0081] 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»), которым может являться антивирусное лекарственное средство; линкер-полезная нагрузка, включающая антивирусное лекарственное средство; второе антитело к вирусу гриппа, или любой другой терапевтический компонент, полезный для лечения инфекции, вызванной HA вируса гриппа.

[0082] В настоящем документе «последовательное введение» означает, что каждую дозу соединения вводят субъекту в разные моменты времени, например, в разные дни, разделенные предопределенным интервалом (*например*, выраженным в часах, днях, неделях или месяцах).

[0083] 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.

[0084] В настоящем документе фраза «непосредственно предшествовавшая доза» означает в последовательности многократного введения доз дозу соединения,

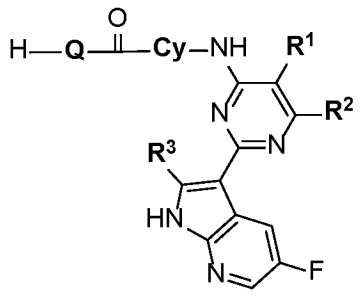
которая была введена пациенту перед введением следующей дозы при отсутствии промежуточных доз.

[0085] В настоящем документе термин «полезная нагрузка» относится к низкомолекулярному активному ингредиенту (например, антивирусному 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 не более 2000 Да, не более 1500 Да или не более 900 Да.

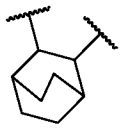
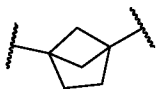
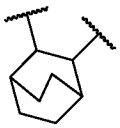
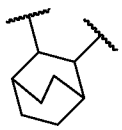
Соединения или полезные нагрузки

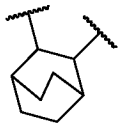
[0086] В настоящем изобретении предложены антивирусные соединения или полезные нагрузки. Без ограничения каким-либо определенным принципом действия, антивирусные соединения включают VX-787 и его производные. В определенных вариантах осуществления изобретения антивирусные соединения могут быть доставлены в клетки как часть конъюгата. В определенных вариантах осуществления изобретения антивирусные соединения способны осуществлять любую активность VX-787 и каждого из его производных на или внутри мишени, например, клетки-мишени. Определенные антивирусные соединения могут иметь одну или более дополнительных активностей.

[0087] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 301:

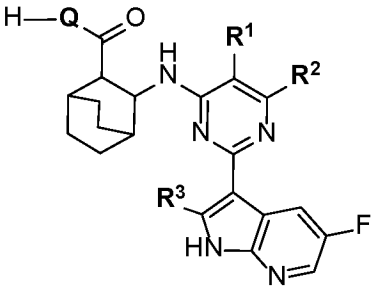


(**301**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 301 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой связанный через мостик 6-членный циклоалкил. В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; и **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-; и **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет

собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-; и **Cy** представляет собой  .

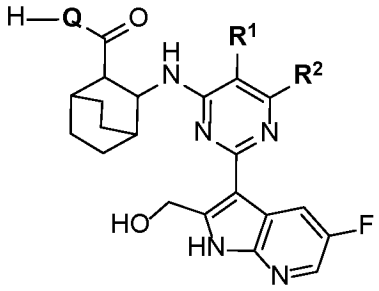
[0088] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 302:



(**302**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 302 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

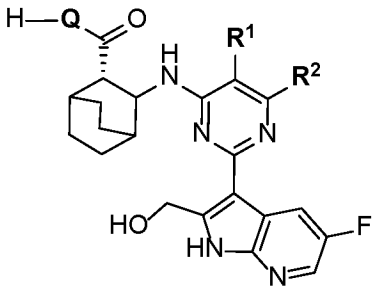
[0089] В определенных вариантах осуществления изобретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 303:



(**303**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 303 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

[0090] В определенных вариантах осуществления изобретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 304:

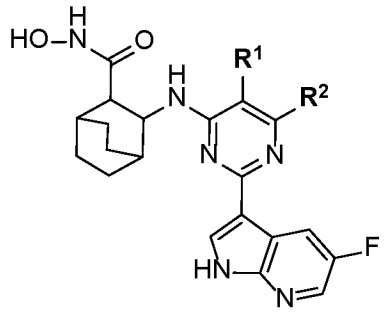


(**304**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 304 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет

собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

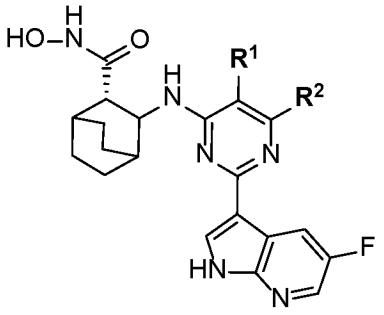
[0091] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 305:



(**305**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 305 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

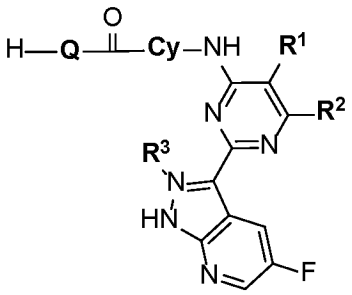
[0092] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 306:



(**306**)

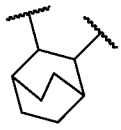
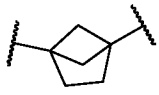
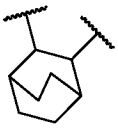
или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 306 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

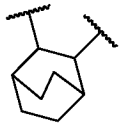
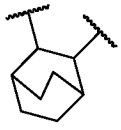
[0093] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 311:



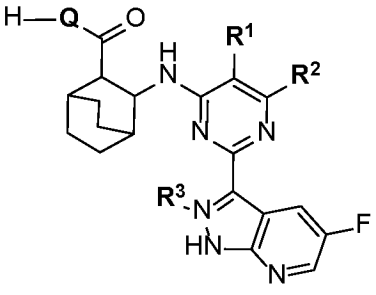
(**311**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 311 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения, когда $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -

C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой связанный через мостик 6-членный циклоалкил. В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; и **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой

-O-NH-; $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-; и **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-; и **Cy** представляет собой  .

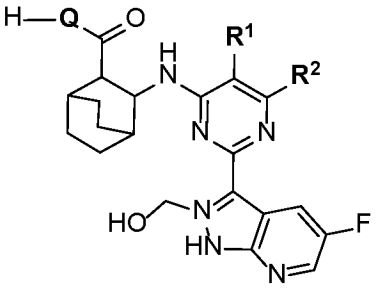
[0094] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 312:



(**312**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 312 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения, когда $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

[0095] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 313:

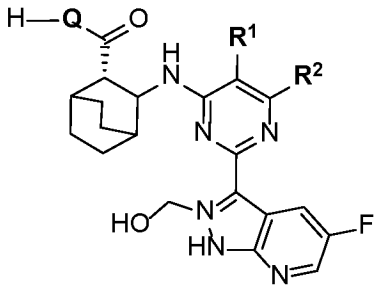


(**313**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 313 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно

замещенного метильной группой; и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

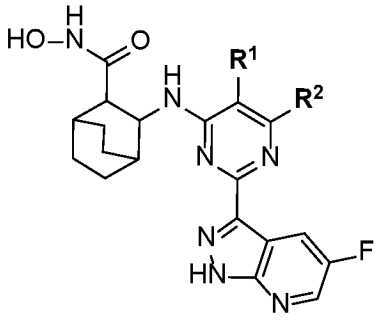
[0096] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 314:



(**314**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 314 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

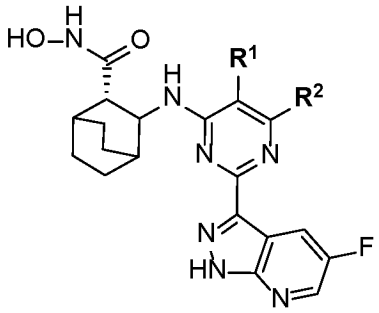
[0097] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 315:



(**315**)

или его фармацевтически приемлемая соль или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 315 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

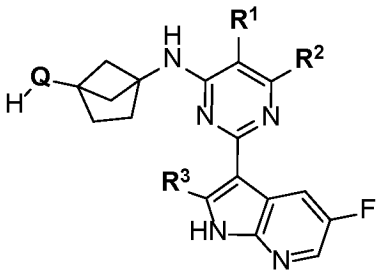
[0098] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 316:



(**316**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 316 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

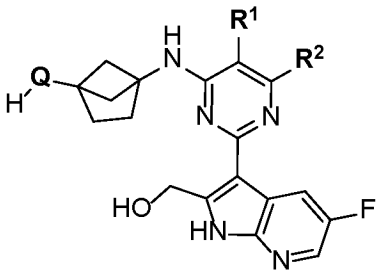
[0099] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 321:



(**321**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 321 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2- и **Q** представляет собой -O-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H и **Q** представляет собой -O-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

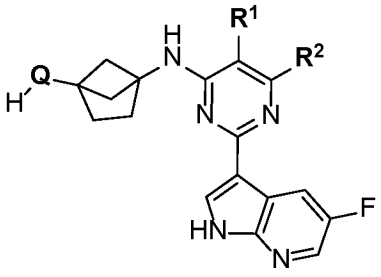
[00100] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 322:



(**322**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 322 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

[00101] В определенных вариантах осуществления избретения, изложенных в настоящей заявке, предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 323:

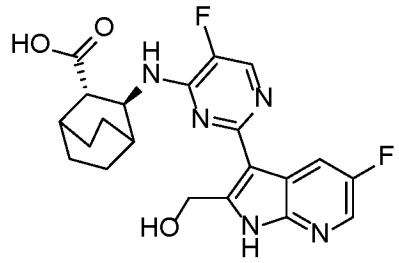


(**323**)

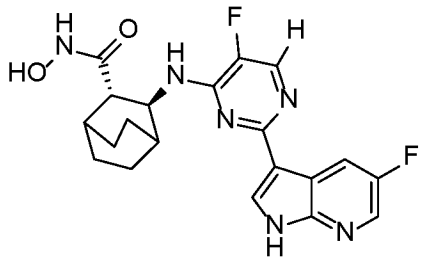
или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 323 $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -

C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

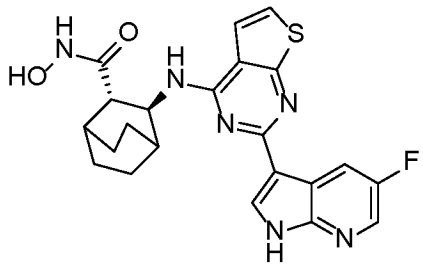
[00102] В определенных вариантах осуществления изобретения предложено соединение, выбранное из группы, включающей:



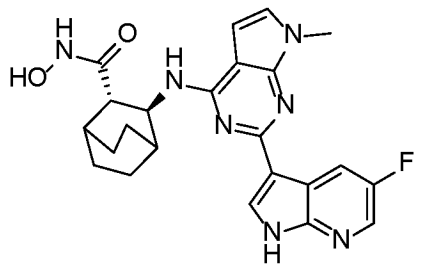
15



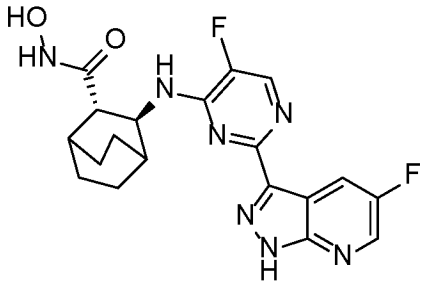
20a



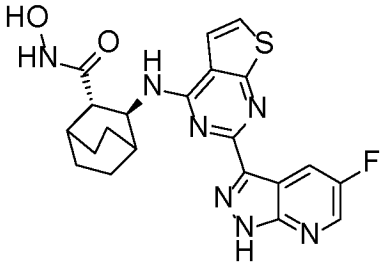
20b



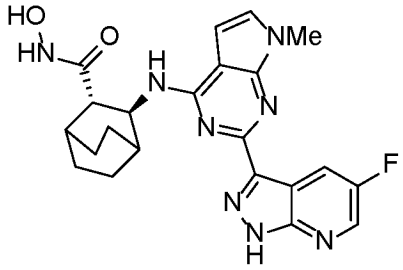
20c



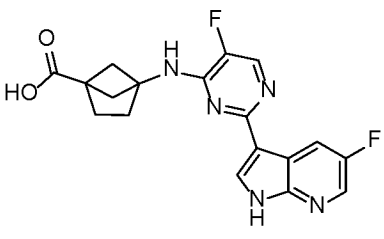
57



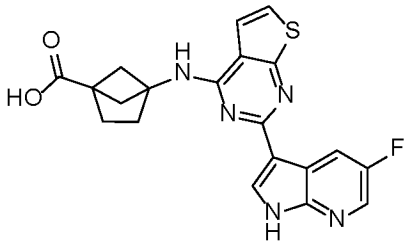
62



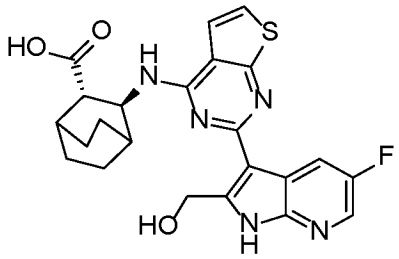
99



113



117



120

и их фармацевтически приемлемые соли.

Связующие агенты

[00103] Подходящие связующие агенты для любого конъюгата, предложенного в настоящей заявке, включают, не ограничиваясь перечисленным, антитела, рецепторы вирусов или любые другие связывающиеся с клеткой либо связывающиеся с пептидом молекулы или вещества. Примером является полноразмерная аминокислотная последовательность HA вируса гриппа, которой в базе данных GenBank присвоен учетный номер ACP44150.1.

[00104] 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 (HA), нейраминидаза (NA), и матриксный белок Matrix-2 (M2). В некоторых вариантах осуществления изобретения эти связующие агенты модулируют взиамодействие 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 HA0. Антитела к HA вируса гриппа могут с высокой степенью аффинности связываться с HA вируса гриппа. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела по настоящему изобретению являются блокирующими антителами, отличающимися тем, что антитела могут связываться с HA 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 HA, на головке вирусного HA, 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.

[00105] В определенных вариантах осуществления изобретения источником получения антител являются мыши, иммунизированные первичным иммуногеном, таким как полноразмерный HA вируса гриппа, или рекомбинантной формой HA вируса гриппа, или его фрагментами, с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном, или обладающим иммуногенной активностью фрагментом HA 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 HA, 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, нечеловекообразные млекопитающие). В определенных вариантах осуществления изобретения источником получения антител являются нечеловекообразные приматы.

[00106] Иммуноген может представлять собой биологически активный и/или иммуногенный фрагмент HA вируса гриппа или ДНК, кодирующую его активный фрагмент. Фрагмент может быть получен из стволовой части белка HA (*См.* Sui *et al.* Nature Struct, и Mol. Biol. Опубликовано в интернете 22 февраля 2009 года;. Стр. 1-9), из головки белка HA, или из их комбинации.

[00107] Пептиды могут быть модифицированы для того чтобы добавить или заменить определенные остатки 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 с целью иммунизации.

[00108] Определенные антитела к вирусу гриппа, антитела к HA вируса гриппа или ADC по настоящему изобретению обладают антивирусной активностью, такой как способность связывания и нейтрализации активности HA вируса гриппа, как было определено в анализах in vitro или in vivo. Определенные антитела к вирусу гриппа, антитела к HA вируса гриппа или ADC по настоящему изобретению способны связываться с HA, 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 HA 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 настоящей заявке.

[00109] Антитела или ADC, специфичные в отношении HA 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 групой 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.

[00110] 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.

[00111] 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.

[00112] 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.

[00113] 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.

[00114] В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит остаток глютамина в одном или более положениях тяжелой цепи под номером 295 по нумерации EU. В настоящей заявке это положение обозначено, как глютамин 295, или Gln295, или Q295. Специалист отметит, что этот остаток является консервативным остаток глютамина 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 глютамина. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит одну или более мутаций N297Q. Приемы модификации последовательности антитела для включения в нее

остатка глютамина 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 трансглютаминазой или пентапептидную метку, в С-терминальной области тяжелой цепи антитела, причем пептидная метка представляет собой пентапептидную последовательность LLQGA.

Получение человеческих антител

[00115] 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 B B/Виктория/2/87, B/Няньчан/3451/93, B/Сингапур/11/1994, B/Флорида/4/2006, или B/Ямагата/16/88. В определенных вариантах осуществления изобретения бустерные инъекции могут содержать смесь штаммов вируса гриппа в соотношении 1:1 или смесь гемагглютининов, полученых из этих штаммов в соотношении 1:1. В определенных вариантах осуществления изобретения иммуногеном может являться рекомбинантный пептид HA 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.

[00116] При использовании технологии VELOCIMMUNE® (*см.*, например, заявку US 6,596,541 компании Редженерон ФармастьютикалзVELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител вначале изолируют высокоаффинные химерные антитела к HA вируса гриппа, имеющие человеческую вариабельную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, геном которой содержит вариабельные области человеческих тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышиной константной области, таким образом, что в ответ на антигенную стимуляцию у мыши образуются антитела, содержащие человеческую вариабельную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующие вариабельные 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.

[00117] В общих чертах, мышь, полученную по технологии VELOCIMMUNE®, подвергают провоцирующей стимуляции интересующим антигеном, и у мыши получают лимфатические клетки (такие как B-лимфоциты), экспрессирующие антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с линией миеломных клеток для получения бессмертных гибридомных клеточных линий, и такие гибридомные клеточные линии подвергают скринингу и отбору, чтобы идентифицировать гибридомные клеточные линии, которые образуют антитела, специфичные по отношению к представляющему интерес антителу. ДНК, кодирующие вариабельные

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 CHO. Альтернативно, ДНК, кодирующая антиген-специфичные химерные антитела или вариабельные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антиген-специфичных лимфоцитов.

[00118] Вначале выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую вариабельную 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 вариабельной области.

Биоэквиваленты

[00119] Антитела к HA вируса гриппа и фрагменты таких антител в настоящей заявке включают белки, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от аминокислотных последовательностей описанных антител, но сохраняют способность связывать HA вируса гриппа. Такие вариантные 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 HA 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

[00120] В целом, антитела по данному изобретению осуществляют свою функцию, связываясь с HA вируса гриппа. Например, предложены антитела и антигесвязыющие фрагменты антител, которые связывают HA вируса гриппа (например, при 25 °C или при 37 °C), при K_D менее 10 нМ, при измерении с использованием биосенсора, основанного на интерферометрии на биослое в реальном времени (анализ Octet HTX), или методом поверхностного плазмонного резонанса. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител связывают HA 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 50 рМ, 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.

[00121] Не имещие ограничительного 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 на биослое в реальном времени (анализ Octet HTX). В Примерах 4 и 5, приведенных в публикациях патентов WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, для того, чтобы определить инфективность разнообразных штаммов вируса гриппа группа 1, использовали тесты на нейтрализацию. В Примере 6, приведенном

в публикациях патентов 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, приведенные в публикациях патентов 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.

[00122] Также предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают HA вируса гриппа при диссоциационном периоде полувыведения (t½), 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 антигенсвязыващие фрагменты антител по настоящему изобретению связывают HA вируса гриппа при t½, 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 публикациях патентов WO 2016/100807 или US 2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки (например, с использованием иммобилизованного моноконального антитела или иммобиизованного антигена), или по существу, аналогичного анализа. В одном варианте осуществления изобретения антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящей заявке связываются с HA вируса гриппа при диссоциационном периоде полувыведения (t½) 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 Control I mAb (Контрольное МАТ I), при тестировании на обезьянах и мышах.

[00123] 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 IC_{50} в диапазоне от приблизительно 1,6 нМ до приблизительно 130 нМ при измерении методом микронейтрализации, как показано, например, в Примерах 4 и 5 в публикациях патентов 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 IC_{50} менее 130 нМ.

[00124] Также в настоящей заявке предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которыми опосредована комплемент-зависимая цитокисичность инфицированных клеток, характеризующаяся EC_{50} в диапазоне от приблизительно 20 нМ до приблизительно 66 нМ (см. Пример 6 в публикациях патентов 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 EC_{50} менее 66 нМ.

[00125] В настоящей заявке описаны антитела к HA вируса гриппа A, которые демонстрируют усиление защиты или нейтрализации инфекции гриппа A *in vivo*, по сравнению с контрольным антителом. Определенные антитела демонстрируют нейтрализацию при профилактическом (до инфекции) или терапевтическом (после инфекции) введении; см. Пример 7 в публикациях патентов WO 2016/100807 или US

2016/0176953 A1, каждый из которых включен в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки.

[00126] В одном варианте осуществления изобретения, предложенном в настоящей заявке, изолированное рекомбинантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывается с HA вируса гриппа, при этом антитело или его фрагмент проявляет одну или более из следующих характеристик: (a) является полностью человеческим моноклональным антителом; (b) связывается с HA вируса гриппа, демонстрируя константу диссоциации (K_D) менее 10^{-9} M, при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса; (c) демонстрирует диссоциационный период полувыведения ($t½$) в диапазоне от приблизительно 370 минут до более чем 1000 минут; (d) демонстрирует нейтрализацию вирусов гриппа A группы 1, которые выбирают из H1N1, H5N1, H9N2, H13N6, и H16N3, при IC_{50} в диапазоне от приблизительно 1,6 нМ до приблизительно 130 нМ; (e) демонстрирует опосредованный комплементом лизис клеток, инфицированных вирусом гриппа, при EC_{50} 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.

[00127] Антитела по настоящей заявке могут обладать двумя или более вышеупомянутыми биологическими характеристиками или их комбинацией. Другие биологические харктеристики антител по настоящей заявке будут очевидны специалисту средней квалификации после рассмотрения настоящей заявки, включая представленные в ней иллюстративные примеры.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей

[00128] 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 1 (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 1 (LCDR)-1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 28; LCDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 30; и CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления изобретения HA вируса гриппа содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую последовательность SEQ ID NO: 18 и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую последовательность SEQ ID NO: 26. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения антитело к HA вируса гриппа может быть получено посредством сайт-направленного мутагенеза, который проводится, чтобы вставить в определенный участок остаток глютамина, не нарушая функцию антитела или его способность к связыванию. Например, в любом из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, антитело к HA вируса гриппа может содержать мутацию Asn297Gln (N297Q). Такие антитела с мутацией N297Q могут содержать также один или более природных остатков глютамина в своих вариабельных областях, которые могут быть доступными для трансглютаминазы 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. 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.

[00129] В Таблице 1 показаны идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи и CDR отдельных антител к HA 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
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

Идентификаторы последовательностей:								
Обозначение антитела	**HCVR**	**HCDR1**	**HCDR2**	**HCDR3**	**LCVR**	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
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

* МАТ (mAb) содержит одну или более мутаций в константном домене

Таблица 2: Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Идентификаторы поледовательностей:								
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
mAb14571	105	107	109	111	113	115	117	119

Идентификаторы поледовательностей:								
Обозначение антитела	**HCVR**	**HCDR1**	**HCDR2**	**HCDR3**	**LCVR**	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
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

* МАТ (mAb) содержит одну или более мутаций в константном домене.

[00130] 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).

[00131] 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, остаток лизина или остаток глютамина. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающая молекула образует связь с линкером через остаток цистеина. В определенных вариантах осуществления изобретения малеимидная группа линкера образует связь с остатком цистеина в молекуле антитела. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающая молекула образует связь с линкером через остаток лизина. В определенных вариантах осуществления изобретения N-гидроксисукцинимидная группа линкера взаимодействует с остатком лизина в молекуле антитела с образованием амидной связи.

[00132] В определенных вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающая молекула образует связь с линкером через остаток глютамина (*см. например,* Jeger *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2010, *49*:9995-9997 и Dennler *et al., Bioconjugate Chem.* 2014, *25*:569-578). Антитела, содержащие остатки глютамина, могут быть выделены из природных источников или сконструированы таким образом, чтобы включать один или несколько остатков глютамина. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела или антигенсвязывающие молекулы

сконструированы посредством мутаций, например, инсерций или делеций, для облегчения реакции, опосредованной трансглютаминазой. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела или антигенсвязывающие молекулы подвергнуты модификации, заключающейся в удалении одного или нескольких участков гликозилирования. В определенных вариантах осуществления изобретения подвергнуты модификации, заключающейся в добавлении одного или нескольких остатков глютамина. В определенных вариантах осуществления изобретения остатки глютамина добавлены в последовательность распознавания трансглютаминазой, описанную в настоящей заявке. Приемы включения остатков глютамина в полипептидную цепь антител (глютаминил-модифицированных антител или антиген-связывающих молекул) известны специалистам-практикам. В определенных вариантах осуществления изобретения используют агликозированное антитело.

[00133] В определенных вариантах осуществления изобретения антитело или глютаминил-модифицированное антитело, или антиген-связывающая молекула содержит, по меньшей мере, один остаток глютамина в последовательности, по меньшей мере, одной полипептидной цепи. В определенных вариантах осуществления изобретения антитело, или глютаминил-модифицированное антитело, или антиген-связывающая молекула содержит два полипептида тяжелой цепи, в каждой из которых находится один остаток Gln295 или Q295. В других вариантах осуществления изобретения антитело, или глютаминил-модифицированное антитело, или антиген-связывающая молекула содержит один или несколько остатков глютамина на другом участке, отличающемся от положения 295 в тяжелой цепи. К ним относятся антитела, описанные в данном разделе, несущие мутацию(-ии) N297Q, описанную в настоящей заявке. В определенных вариантах осуществления изобретения остаток глютамина добавлен на С-терминальном конце тяжелой цепи.

[00134] В определенных вариантах осуществления изобретения глютамин представлен полипептидом, модифицированным глютамин-содержащей меткой (например, глютамин-содержащими пептидными метками, Q-метками или последовательностью, распознаваемой трансглютаминазой). Термин

«последовательность, распознаваемая трансглютаминазой» или «Q-метка» относится к аминокислотной последовательности, содержащей остаток глютамина, который при включении (например, присоединении) в полипептидную последовательность в подходящих условиях распознается трансглютаминазой (ТГ-азой), что приводит к опосредованному трансглютаминазой образованию поперечных связей в результате взаимодействия боковой цепи аминокислоты, находящейся в аминокислотной последовательности, с реакционноспособной группой. Распознаваемая метка может быть представлена пептидной последовательностью, которая в природных условиях не присутствует в полипептиде. В определенных вариантах осуществления изобретения распознаваемая трасглютаминазой метка содержит, по меньшей мере, один гютамин. В определенных вариантах осуществления изобретения распознаваемая трасглютаминазой метка содержит аминокислотную последовательность XXQX, где X может быть любой аминокислотой (например, стандартной аминокислотой Leu, Ala, Gly, Ser, Val, Phe, Tyr, His, Arg, Asn, Glu, Asp, Cys, Gin, He, Met, Pro, Thr, Lys, или Trp или нестандартной аминокислотой). В определенных вариантах осуществления изобретения область распознавания трансглютаминазой содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей LLQGG, LLQG, LSLSQG, GGGLLQGG, GLLQG, LLQ, GSPLAQSHGG, GLLQGGG, GLLQGG, GLLQ, LLQLLQGA, LLQGA, LLQYQGA, LLQGSG, LLQYQG, LLQLLQG, SLLQG, LLQLQ, LLQLLQ, и LLQGR. См., например, патент WO2012059882, содержание которго полностью включено в настоящую заявку.

[00135] В одном варианте осуществления изобретения антитело или антиген-связыващая молекула включает тяжелую цепь антитела и дополнительно включает последовательность (метку) распознавания трансглютаминазой в С-терминальной области тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения антитело или антиген-связыващая молекула включает тяжелую цепь антитела и дополнительно включает последовательность (метку) распознавания трансглютаминазой в С-терминальной области тяжелой цепи антитела, где последовательностью, распознаваемой трамнглютаминазой, является пентапептидная последовательность LLQGA. В одном варианте осуществления изобретения изобретения антитело или антиген-связыващая молекула включает две

тяжелые цепи антитела и дополнительно включает последовательность распознавания трансглютаминазой в С-терминальной области каждой тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения антитело или антиген-связывающая молекула включает две тяжелых цепи антитела и дополнительно включает последовательность распознавания трансглютаминазой в С-терминальной области каждой тяжелой цепи антитела, где последовательностью, распознаваемой трамнглютаминазой, является пентапептидная последовательность LLQGA.

[00136] Антитела или антиген-связывающие молекулы могут быть также модифицированы по одному или нескольким остатком глютамина при участии трансглютаминазы (*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 трансглютаминазы один или более остатков глютамина в молекуле антитела могут взаимодействовать с первичным амином с образованием фрагмента, способного взаимодействовать с реакционноспособной группой на линкере-полезной нагрузке. В определенных вариантах осуществления изобретения первичный амин обеспечивает диен или диенофил. В определенных вариантах осуществления изобретения первичный амин обеспечивает диен или диенофил, и линкер-полезная нагрузка обеспечивает комплементарный диенофил или диен, соответственно, для конъюгации по реакции Дильса-Альдера. В определенных вариантах осуществления изобретения первичный амин обеспечивает азидогруппу. В определенных вариантах осуществления изобретения первичный амин обеспечивает азидогруппу, и линкер-полезная нагрузка обеспечивает комплементарный алкин для конъюгации, осуществляемой посредством клик-реакции.

Линкеры

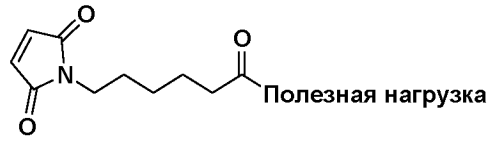
[00137] В определенных вариантах осуществления изобретения линкерная часть **L** конъюгатов по настоящему изобретению представляет собой фрагмент, например, двухвалентный фрагмент, который соединяет ковалентной связью связующий агент с соединением-полезной нагрузкой, описанным в настоящей заявке, в других 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, Г. 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., and 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 301-306, 15, 20a, 2b и 20c, 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 непосредство 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

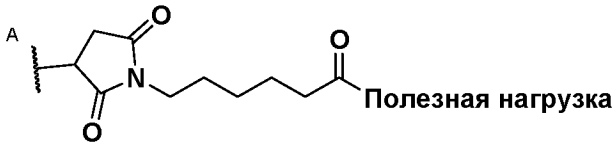
полезной нагрузки дополнительно включают карбоновые кислоты (например, в форме сложных эфиров после соединения с **L**, как в случае VX-787 и его производных), гидроксамовыt кислоты и атомы азота в гетероцикле.

[00138] 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.

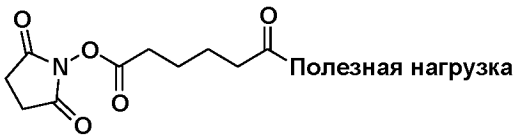
[00139] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер содержит нерасщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения



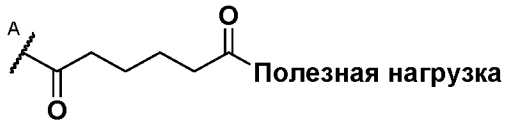
нерасщепляемый линкер получают из или его остатка. В некоторых вариантах осуществления изобретения нерасщепляемый остаток линкер-полезная нагрузка представляет собой



, 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 (MCC). В структурных формулах показывает связь со связующим агентом. В некоторых примерах в структурных формулах показывает амидную связь, которая образовалась в результате взаимодействия, например, одного или нескольких глютаминов в составе связующего агента с одним или несколькими линкерами или линкерами-полезными нагрузками, содержащими аминную группу. В некоторых примерах в структурных формулах показывает остаток, образовавший в результате реакции Дильса-Альдера, например, в результате взаимодействия между связующим агентом, имеющим диеновую или диенофильную функциональную группу, и линкером-полезной нагрузкой, имеющей комплементарную диенофильную или диеновую функциональную группу, соответственно. 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 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.

[00140] . В некоторых вариантах осуществления изобретения подходящие линкеры включают, не ограничиваясь перечисленным, линкеры, химически связанные с двумя остатками цистеина 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

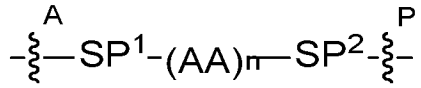
[00141] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер содержит одну или более аминокислот. Подходящие аминокислоты включают природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные, и L-, или D- α-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер содержит аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глютамин, аспарагиновую кислоту, глютаминовую 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 двухвалентныйt –VCit–). В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты глютаминовую кислоту и аланин, или –EA–. В некоторых вариантах осуществления линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты глютаминовую 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 глютамин, валин, и цитруллин, или –Q-V-Cit– или –QVCit–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты глютаминовую кислоту, валин, и цитруллин, или –E-V-Cit–, или –EVCit–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты –GGGGS–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты–GGGGG–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты –GGGGK–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты –GFGG–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером является пептид, состоящий из или содержащий аминокислоты –GGFG–. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкером 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 - глицин, K - лизин, S - серин, V - валин, A - аланин и F - фенилаланин.

[00142] 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 *пара*-аминобензил (PAB), или его производное. Полезные производные включают *пара*-аминобензилоксикарбонил (PABC). 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.

[00143] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой:



где:

SP^{1} представляет собой спейсер;

SP^{2} представляет собой спейсер;

одна или более связей со связующим агентом;

одна или более связей с полезной нагрузкой;

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

n представляет собой целое число от 0 до 10.

[00144] Спейсер **SP**^{1} 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 **SP**^{1} 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** = 0, 1, 2, 3, или 4 (т.е. когда **n** = 0, AA отсутствует). В частных случаях изобретения, **n** = 2. В частных случаях изобретения, **n** = 3. В частных случаях изобретения, **n** = 4. В определенных вариантах осуществления изобретения **SP**^{1} отсутствует. В определенных вариантах осуществления изобретения **SP**^{2} отсутствует. В определенных вариантах осуществления изобретения (**AA**)$_{n}$ отсутствует.

[00145] В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер **SP**^{1} содержит алкилен. В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер **SP**^{1} содержит

$C_{5\text{-}7}$ 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 $–(OCH_2CH_2)_{\mathbf{p}}–$, где **p** может быть целым числом от 1 до 100. Например, $–(OCH_2CH_2)_2–$ можно представить также, как $–OCH_2CH_2–OCH_2CH_2–$ или PEG_2. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_1. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_2. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_3. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_4. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_5. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_6. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_7. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_8. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_9. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{10}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{11}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{12}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{13}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{14}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{15}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{16}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{17}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{18}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{19}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль

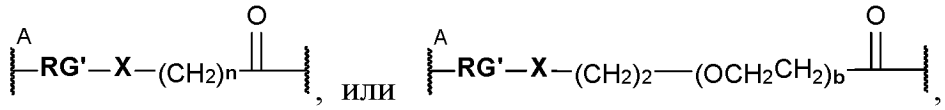
представляет собой $PEG_{20,}$ В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{21}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{22}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{23}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{24}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{25}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{26}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{27}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{28}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{29}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой $PEG_{30,}$ В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{31}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{32}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{33}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{34}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{35}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{36}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{37}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{38}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{39}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой $PEG_{40,}$ В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{41}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{42}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{43}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль

представляет собой PEG_{44}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{45}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{46}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{47}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{48}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{49}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой $PEG_{50,}$ В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{51}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{52}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{53}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{54}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{55}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{56}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{57}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{58}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{59}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой $PEG_{60,}$ В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{61}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{62}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{63}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{64}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{65}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{66}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{67}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль

представляет собой PEG_{68}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{69}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{70}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{71}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{72}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{73}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{74}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{75}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{76}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{77}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{78}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{79}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{80}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{81}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{82}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{83}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{84}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{85}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{86}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{87}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{88}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{89}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{90}. В определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{91}. В

определенных вариантах осуществления изобретения полиэтиленгликоль представляет собой PEG_{92}.

[00146] В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер **SP**[1] представляет собой:



где:

X отсутствует или представляет собой -N(H)-;

RG' представляет собой остаток реакционноспособной группы, полученный после взаимодействия реакционноспособной группы **RG** со связующим агентом;

это связь со связующим агентом;

 это связь с $(\mathbf{AA})_{\mathbf{n}}$;

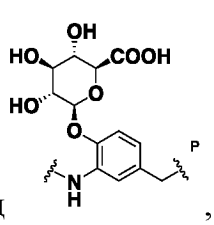
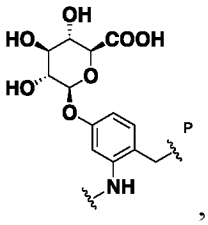
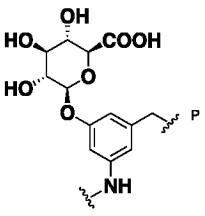
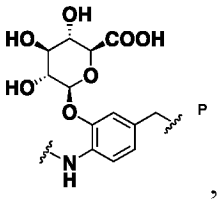
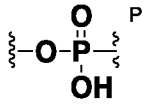
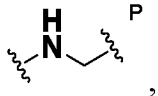
n представляет собой целое число от 0 до 10; и

b независимо представляет собой целое число от 1 до 92.

[00147] Реакционноспособная группа **RG** может быть любой реакционноспособной группой, известной специалисту, способной к образованию одной или более связей со связующим агентом. Реакционноспособная группа **RG** – это группа, содержащая в своей структуре участок, способный взаимодействовать со связующим агентом (*например*, взаимодействовать с остатками глютамина, цистеина или лизина в молекуле антитела, или с диеном или диенофильной группой, или с азидной группой в молекуле антитела, например, с одним или более остатками глютамина в молекуле $PEG\text{-}N_3$ функционализированного антитела; или с аминогруппой, например, с одним или более остатками глютамина в молекуле антитела, функционализированного $PEG\text{-}NH_2$) 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

фрагменты амин, галоацетил, изтиоцианат, сукцинимид, N-гидроксукцинимид или малеимид, способные взаимодействовать со связующим агентом.

[00148] Спейсер $\mathbf{SP^2}$, если присутствует, является фрагментом, который соединяет фрагмент$(\mathbf{AA})_n$ с полезной нагрузкой. Подходящие спейсеры включают, не ограничиваясь перечисленным, описанные выше спейсеры $\mathbf{SP^1}$. Другие подходящие спейсеры $\mathbf{SP^2}$ включают, не ограничиваясь перечисленным, спейсеры, содержащие алкилен или простой полиэфир, или оба этих соединения. Концы спейсеров $\mathbf{SP^2}$, 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 $\mathbf{SP^2}$ во время химического синтеза конъюгата. В некоторых примерах, концами спейсеров $\mathbf{SP^2}$, например, частью спейсера $\mathbf{SP^2}$, непосредственно связанной с полезной нагрузкой или с **AA**, могут быть остатки реакционноспособных групп, которые применяются для присоединения полезной нагрузки или **AA** к спейсеру во время химического синтеза конъюгата.

[00149] В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер $\mathbf{SP^2}$, если он присутствует, выбирают из группы, включающей –NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2–, –NH-(*p*-C_6H_4)-$CH_2OC(O)$–, NH-(*p*-C_6H_4)-$CH(CH_3)O$–, аминокислоту, дипептид, трипептид, олигопептид  ,  ,  ,  ,  ,  , и любые комбинации этих соединений. В определенных вариантах осуществления изобретения каждый представляет собой связь с полезной нагрузкой, и каждый представляет собой связь с $(\mathbf{AA})_n$ или отсутствует, если n = 0.

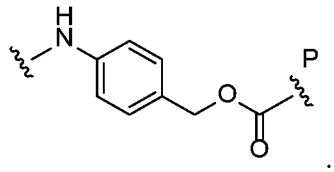
[00150] В представленных выше формулах каждый $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой аминокислоту или, необязательно, остаток *n*-аминобензилоксикарбонила (PABC). **n** может быть равен 0; в этом случае $(\mathbf{AA})_n$ отсутствует. Если PABC присутствует, то

предпочтительно присутствие лишь одного PABC. Предпочтительным является остаток PABC, в случае его присутствия, связанный с концевым **AA** в группе $(\mathbf{AA})_n$, проксимальной к полезной нагрузке. Подходящие аминокислоты для каждого **AA** включают природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные, и L-, или D- α-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения **AA** содержит аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глютамин, аспарагиновую кислоту, глютаминовую 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 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глицин-валин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глицин-глицин-фенилаланин-глицин В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой валин-цитруллин-PABC. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой цитруллин-валин-PABC. В некоторых вариантах осуществления изобретения **n** равен 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах

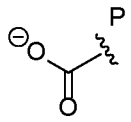
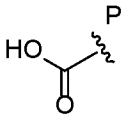
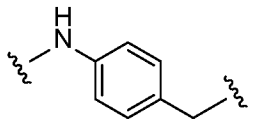
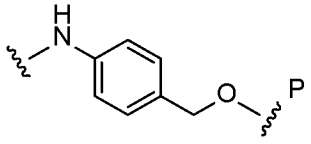
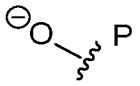
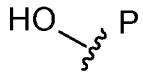
осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения **n** равен 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамат-валин-цитруллин-PABC. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамин-валин-цитруллин-PABC.

[00151] В определенных вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ представляет собой валин-цитруллин-PABC. В определенных вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ представляет собой цитруллин-валин-PABC. В определенных вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ представляет собой глютамат-валин-цитруллин-PABC. В определенных вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ представляет собой глютамин-валин-цитруллин-PABC. В определенных вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ представляет собой глицин-глицин-фенилаланин-глицин-N(H)-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ представляет собой валин-аланин-PABC. В определенных вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ представляет собой валин-цитруллин-NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2–. В определенных вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ представляет собой валин-цитруллин-NH-(*p*-C_6H_4)-$CH(CH_3)$O–. В определенных вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ представляет собой валин-аланин-NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2–. В определенных вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ представляет собой валин-аланин-NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2OC(O)–.

[00152] Специалистам должно быть известно, что PABC, являющийся остатком *napa*-аминобензилоксикарбонила, имеет следующую структуру:



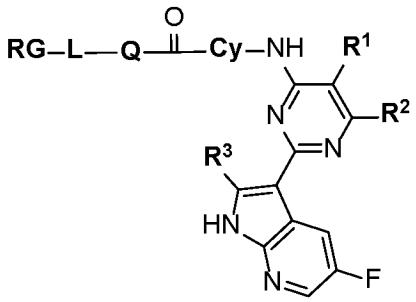
Показано, что остаток PABC облегчает расщепление определенных линкеров *in vitro* и *in vivo*. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения после

отщепления PABC карбоксилат или группа карбоновой кислоты (т.е.  или  , соответственно) остаются интактными с оставшимся антивирусным соединением или полезной нагрузкой. В определенных вариантах осуществления изобретения каждый — это связь с оставшимся антивирусным соединением или полезной нагрузкой). Специалистам должно быть известно, что PAB является двухвалентным остатком *пара*-аминобензила (т.е. –NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2– или ). Показано,что в определенных вариантах осуществления изобретения остаток PAB 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.

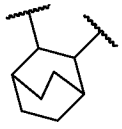
Линкер-полезные нагрузки

[00153] В определенных вариантах осуществления изобретения линкер-полезные нагрузки включают специфичное соединение или полезную нагрузку по одной или более приведенным выше формулам 301-306, 15, 20a, 20b и 20c, 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 301-306, 15, 20a, 20b и 20c.

[00154] В определенных вариантах осуществления изобретения по настоящей заявке предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 401:

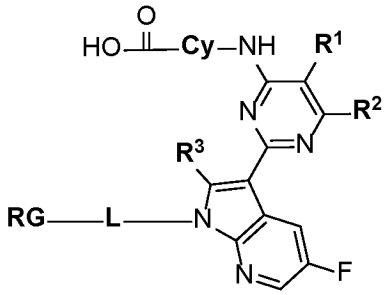


(**401**)

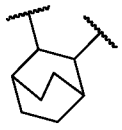
или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 401, **L** представляет собой линкер; **RG** представляет собой реакционноспособную группу; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения, когда $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения **L** представляет собой любой из линкеров, описанных в настоящей заявке. В определенных вариантах осуществления изобретения **RG** представляет собой любую реакционноспособную группу, описанную в настоящей заявке. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения **RG** выбрана из группы, включающей -NH_2, малеимид, сложный эфир N-гидроксисукцинимида, алкин, напряженный алкин,

диен и диенофил. В определенных вариантах осуществления изобретения **RG** представляет собой -NH_2.

[00155] В определенных вариантах осуществления изобретения по настоящей заявке предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 402:

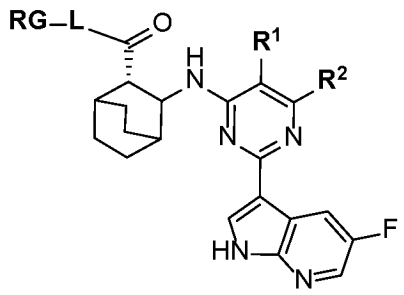


(**402**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 402, **L** представляет собой линкер; **RG** представляет собой реакционноспособную группу; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; и **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен. В определенных вариантах осуществления изобретения **L** представляет собой любой из линкеров, описанных в настоящей заявке. В определенных вариантах осуществления изобретения **RG** представляет собой любую реакционноспособную группу, описанную в настоящей заявке. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H и Cy представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения **RG** выбрана из группы, включающей -NH_2, малеимид, сложный эфир N-гидроксисукцинимида, алкин, напряженный алкин,

диен и диенофил. В определенных вариантах осуществления изобретения **RG** представляет собой -NH_2.

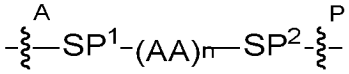
[00156] В определенных вариантах осуществления изобретения по настоящей заявке предложено соединение, имеющее структуру по Формуле 403:



(**403**)

или его фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 403, **L** представляет собой линкер; **RG** представляет собой реакционноспособная группа; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен. В определенных вариантах осуществления изобретения **RG** выбрана из группы, включающей -NH_2, малеимид, сложный эфир N-гидроксисукцинимида, алкин, напряженный алкин, диен и диенофил. В определенных вариантах осуществления изобретения **RG** представляет собой -NH_2.

[00157] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер **L** представляет собой:



где:

$\mathbf{SP^1}$ представляет собой спейсер;

$\mathbf{SP^2}$ представляет собой спейсер;

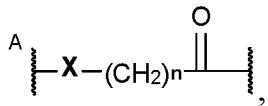
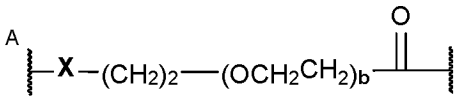
одна или более связей со связующим агентом;

одна или более связей с полезной нагрузкой;

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

n представляет собой целое число от 0 до 10.

[00158] Спейсер **SP**^{1} описан выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер **SP**^{1} представляет собой:

 , или 

где:

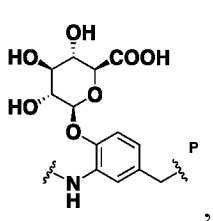
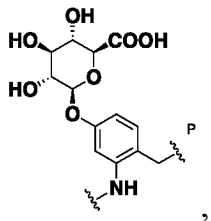
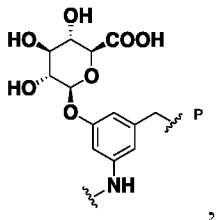
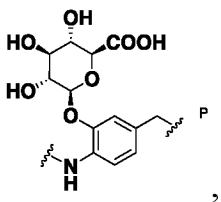
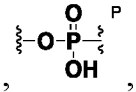
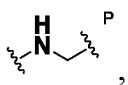
X отсутствует или -N(H)-;

это связь со связующим агентом;

это связь с $(\mathbf{AA})_n$;

n представляет собой целое число от 0 до 10; и

b независимо представляет собой целое число от 1 до 92.

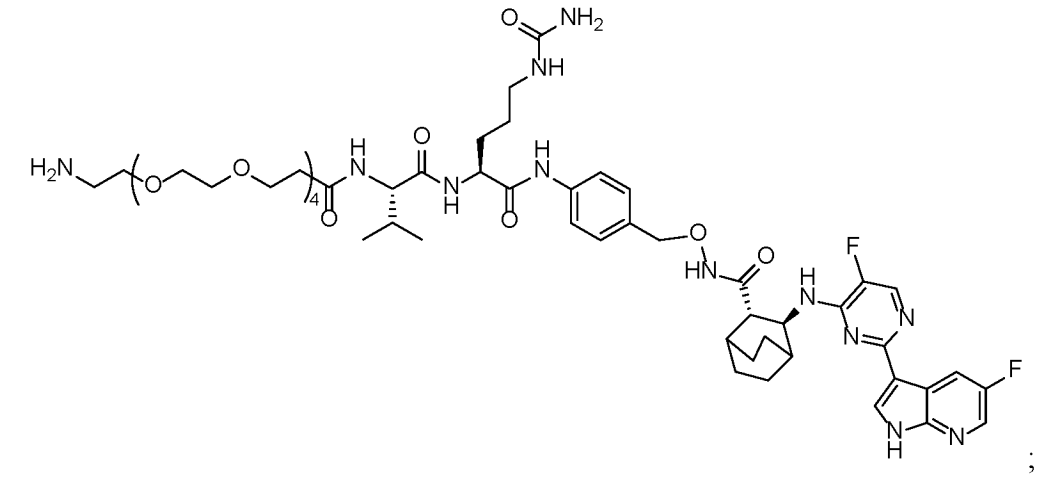
[00159] Спейсер **SP**^{2} описан выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер **SP**^{2}, когда он присутствует, выбран из группы, включающей –NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2–, –NH-(*p*-C_6H_4)-$CH_2OC(O)$–, NH-(*p*-C_6H_4)-$CH(CH_3)O$–, аминокислоту, дипептид, трипептид, олигопептид  ,  ,  ,  ,  ,  , и их любую комбинацию. В определенных вариантах осуществления изобретения each это связь с полезной нагрузкой, и каждый это связь с $(\mathbf{AA})_n$ или отсутствует, если n = 0.

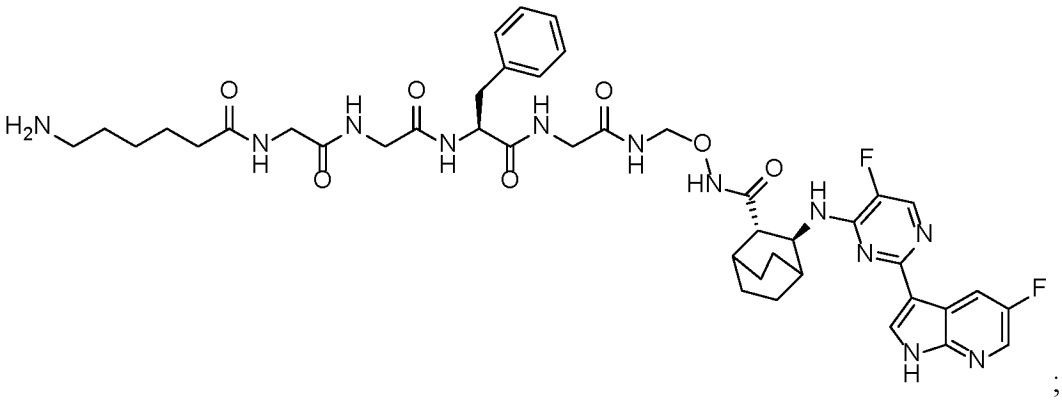
[00160] В показанных выше формулах каждый $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой аминокислоту или, необязательно, остаток *napa*-аминобензилоксикарбонила

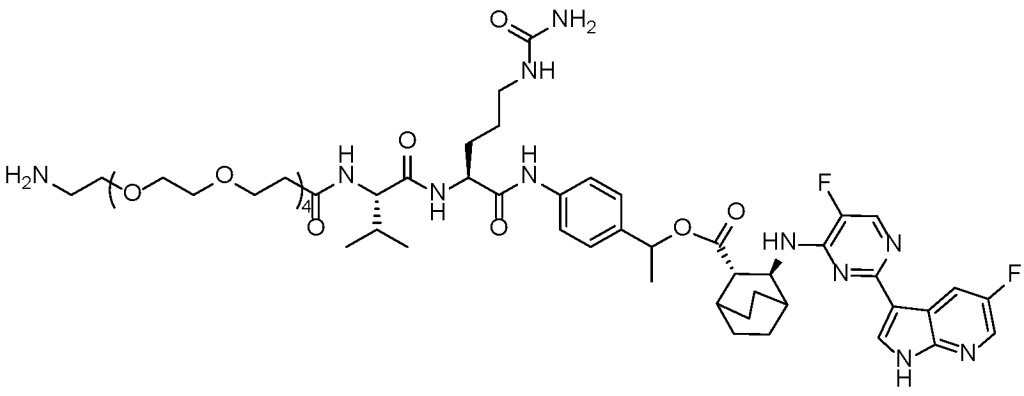
(PABC). **n** может быть равен 0; в этом случае $(\mathbf{AA})_n$ отсутствует. Если PABC присутствует, то предпочтительно присутствует лишь один остаток PABC. Предпочтительно, остаток PABC, если он присутствует, связан с концевым **AA** в группе $(\mathbf{AA})_n$, проксимальным к полезной нагрузке. Подходящие аминокислоты для каждого **AA** включают природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные, и L-, или D- α-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения **AA** содержит аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глютамин, аспарагиновую кислоту, глютаминовую кислоту, лизин, агинин, гистидин или цитруллин, любое из производное или комбинацию (например, дипептиды, трипептиды и олигопептиды и т.п.). В определенных вариантах осуществления изобретения одна или несколько боковых цепей аминокислот связана с описанной ниже группой боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения **n** равен 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ i представляет собой глицин-валин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глицин-глицин-фенилаланин-глицин В некоторых вариантах осуществления изобретения the $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой валин-цитруллин-PABC. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой цитруллин-валин-PABC. В некоторых вариантах осуществления изобретения **n** равен 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения

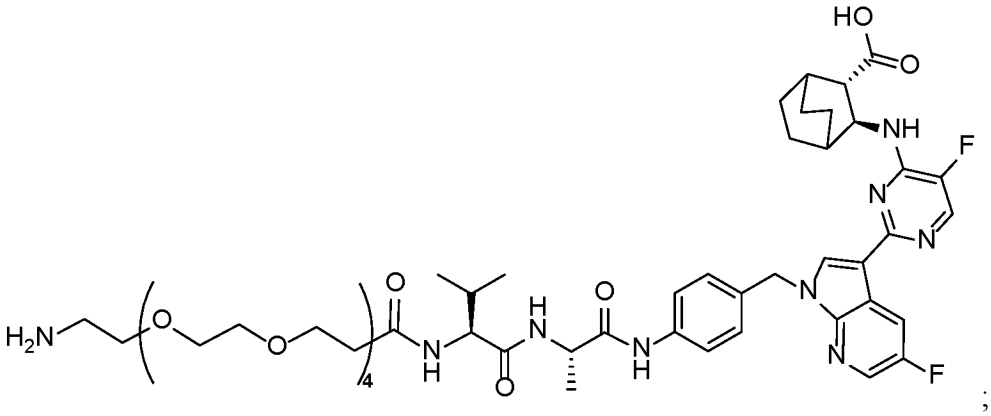
$(\mathbf{AA})_n$ представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения **n** равен 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамат-валин-цитруллин-PABC. В некоторых вариантах осуществления изобретения $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой глютамин-валин-цитруллин-PABC.

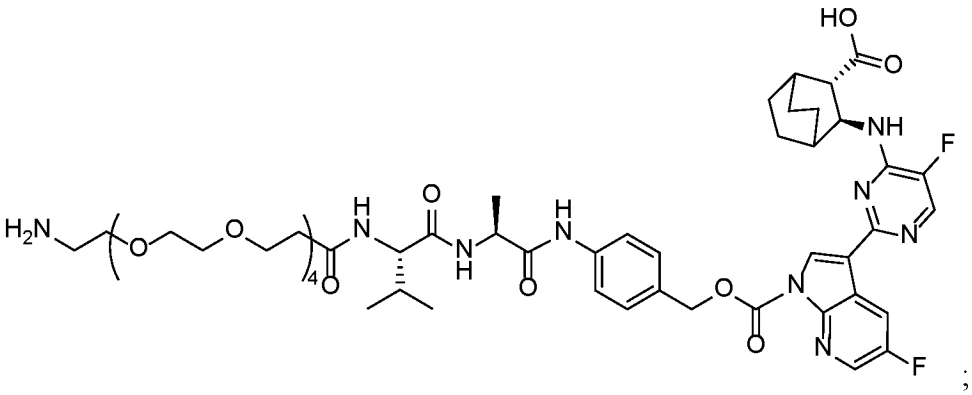
[00161] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены соединения (т.е., линкер-полезные нагрузки), выбранные из группы, включающей:

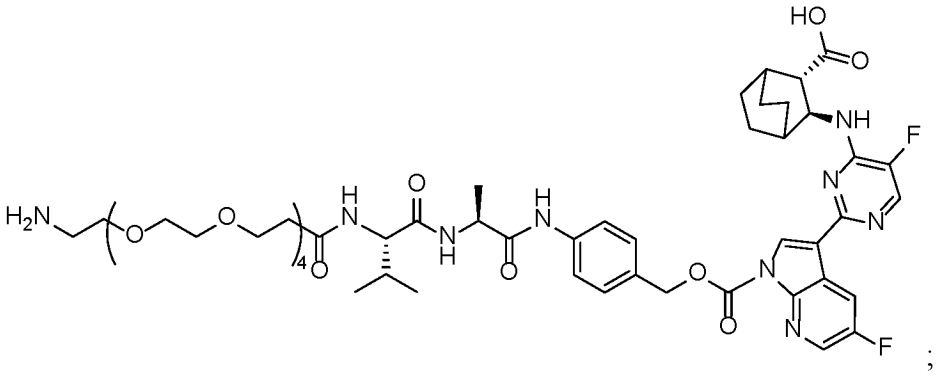

;

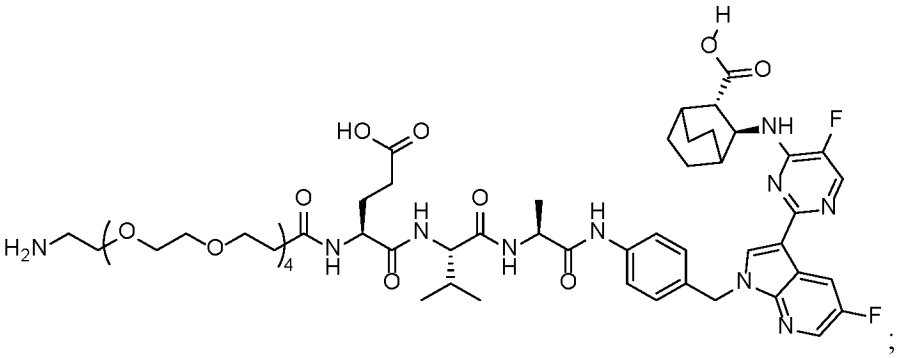

;


;

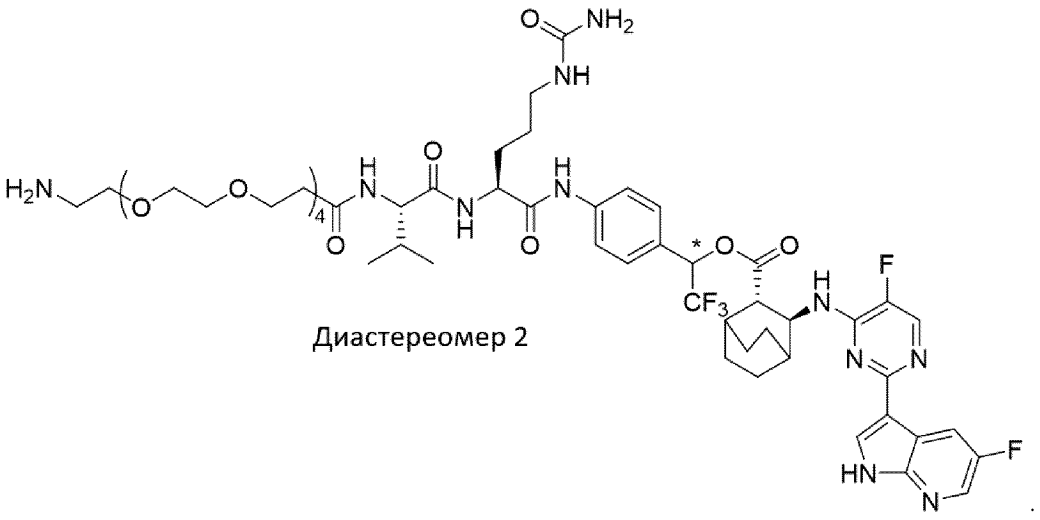

;


;


;

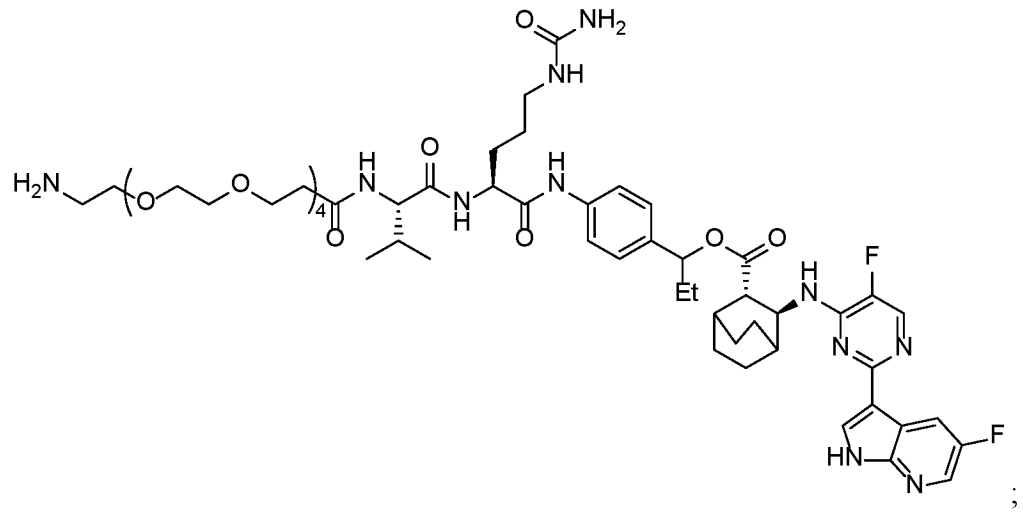

;

Диастереомер 1

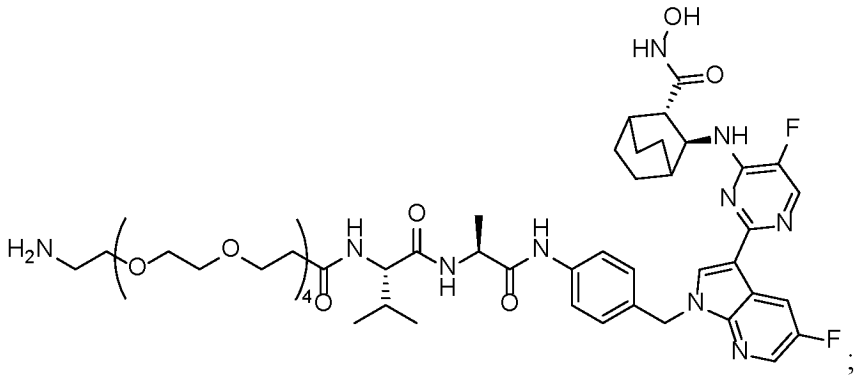


Диастереомер 2

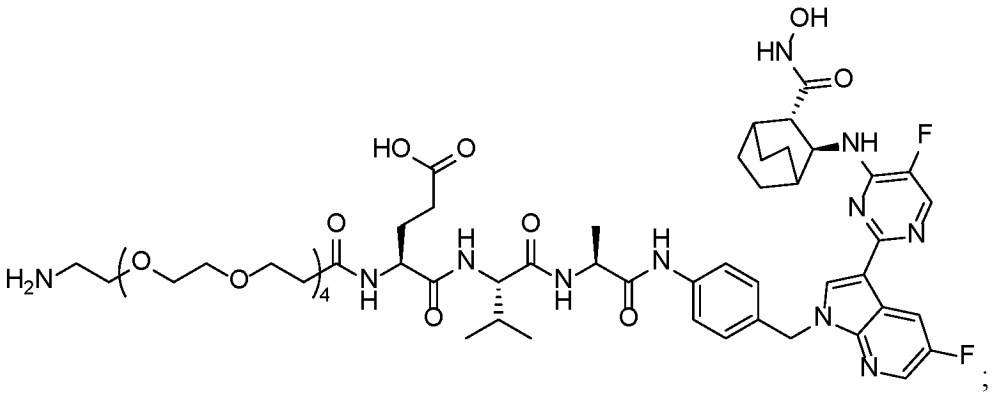
;



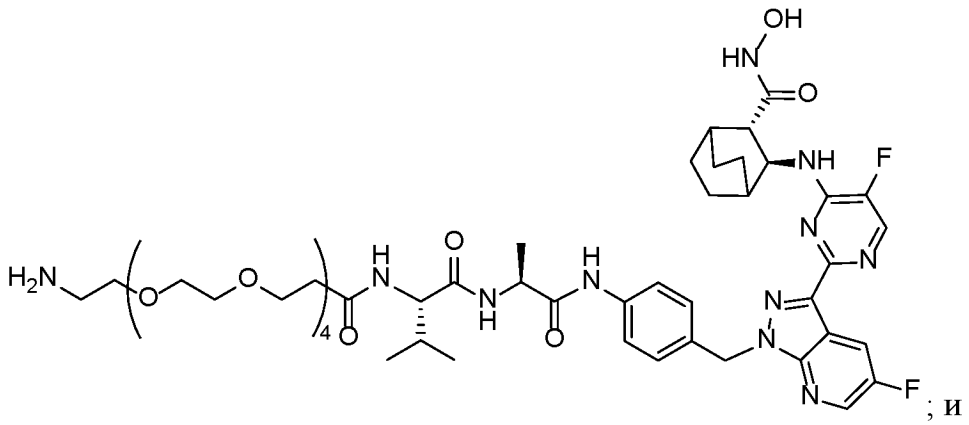
;



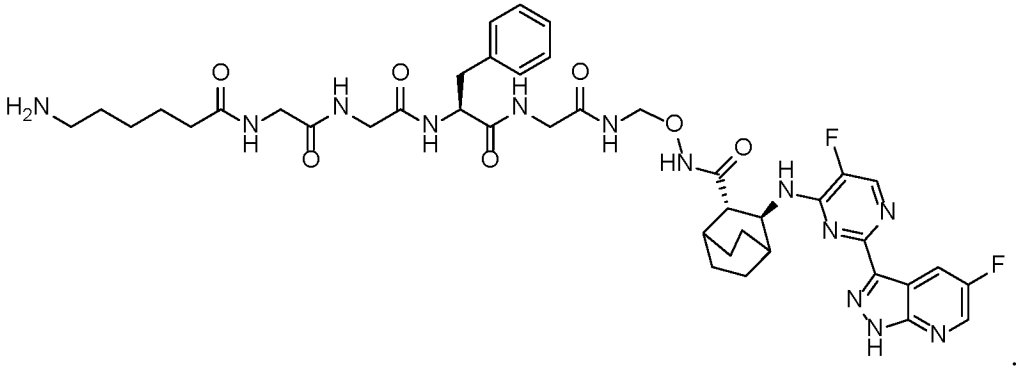
;



;



; и

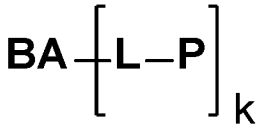


.

Конъюгаты/Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

[00162] Предложены человеческие моноклональные антитела к HA вируса гриппа, конъюгированные с терапевтическим компонентом, таким как анатоксин или антивирусное лекарственное средство, для лечения инфекции, вызванной вирусом гриипа (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 HA 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 антителм к HA 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, 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.

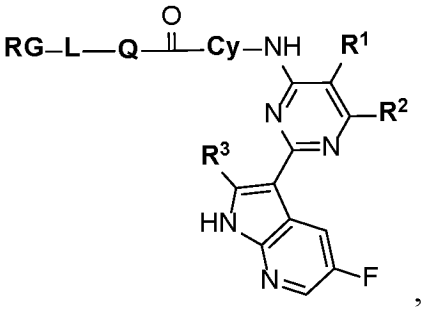
[00163] В одном варианте осуществления изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру



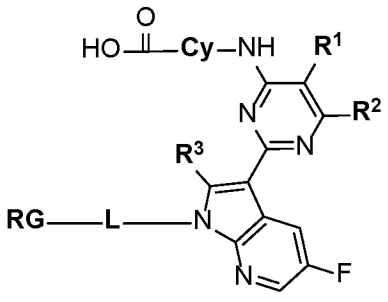
где **BA** представляет собой связующий агент, связывающийся с белками вируса гриппа; **L** представляет собой линкер, описанный в настоящей заявке; и **P** представляет собой антивирусное соединение или полезные нагрузки, описанные в настоящей заявке. В определенных вариантах осуществления изобретения **BA** представляет собой **Ab**, антитело к вирусу гриппа или его антиген-связывающий

фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антиген-связывающий фрагмент; и **P** представляет собой ингибитор вируса гриппа. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антиген-связывающий фрагмент; и **P** представляет собой ингибитор полимеразы. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антиген-связывающий фрагмент; и **P** представляет собой VX-787, его производное или остаток. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к гемагглютинину или его антиген-связывающий фрагмент; и **P** представляет собой антивирусное соединение. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антиген-связывающий фрагмент; и **P** представляет собой антивирусное соединение. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к гемагглютинину или его антиген-связывающий фрагмент; и **P** представляет собой ингибитор вируса гриппа. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к гемагглютинину или его антиген-связывающий фрагмент; и **P** представляет собой ингибитор полимеразы. В любом варианте осуществления изобретения, описанном в данном абзаце, **Ab** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антиген-связывающий фрагмент или антитело к гемагглютинину или его антиген-связывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением по описанным выше Формулам 301, 401, 402, или 403. В одном варианте осуществления изобретения **Ab** представляет собой антитело к гемагглютинину или его антиген-связывающий фрагмент; и **P** представляет собой VX-787, его производное или его остаток В любом варианте осуществления изобретения, описанном в данном абзаце, **k** равно целому числу от 1 до 30.

[00164] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены соединения ADC, в которых антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгировано с соединением линкер-полезная нагрузка по любой из следующих формул, описанных в настоящей заявке:

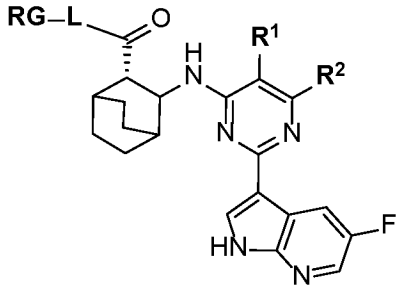


,



, или

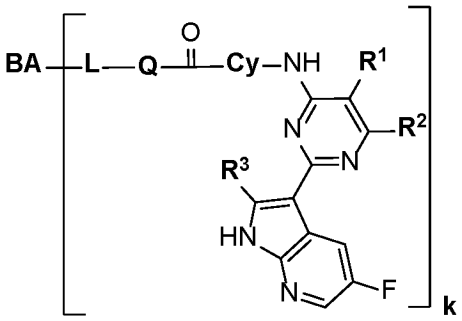
(**401**) (**402**)



(**403**)

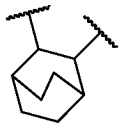
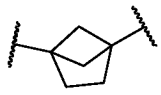
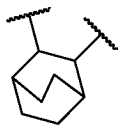
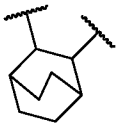
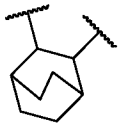
или или его солью.

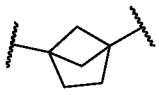
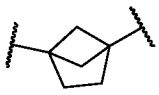
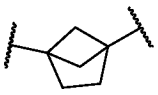
[00165] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены соединения ADC по Формуле 101:



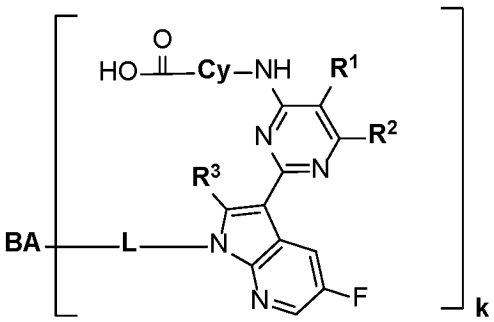
(**101**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 101 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$

представляет собой H или HO-CH_2-; **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой связанный через мостик 6-членный циклоалкил. В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; и **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-; и **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-; и **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-; $\mathbf{R^1}$ представляет

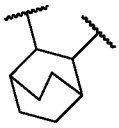
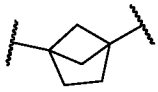
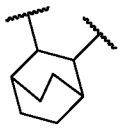
собой F; $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; и **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-; $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-; и **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-; $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-; и **Cy** представляет собой  .

[00166] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 201:

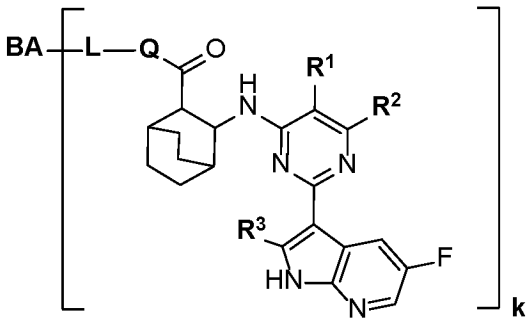


(**201**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 201 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; **Cy** представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой связанный через мостик 6-членный циклоалкил.

В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения **Cy** представляет собой  . В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; и **Cy** представляет собой  .

[00167] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 102:

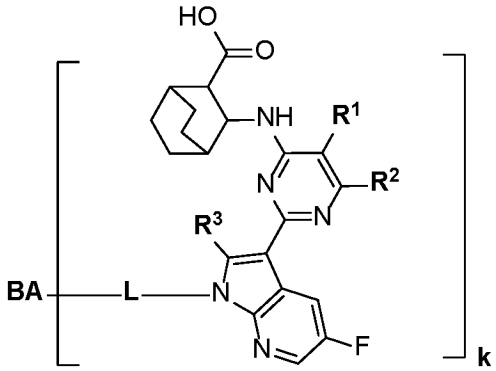


(**102**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 102, **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных

вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

[00168] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 202:

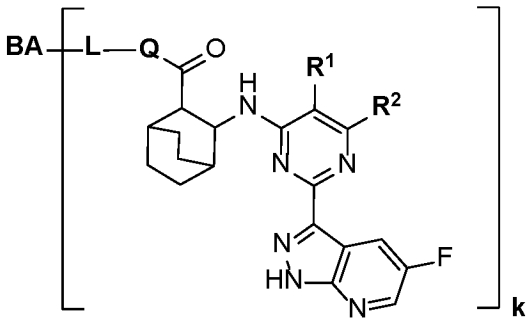


(**202**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 202 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; $\mathbf{R^1}$

представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

[00169] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 112:

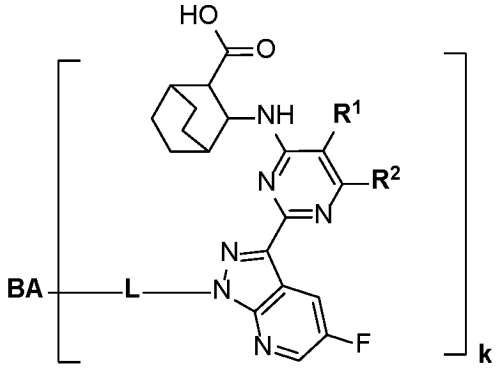


(**112**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 112, **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных

вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

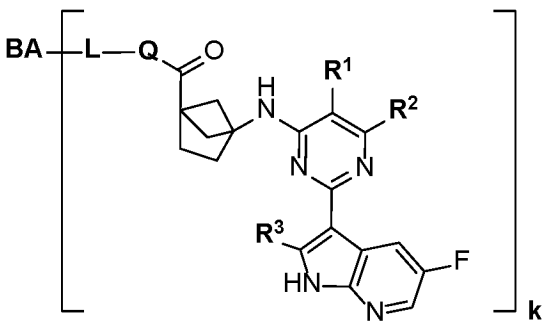
[00170] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 202:



(**212**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 212 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

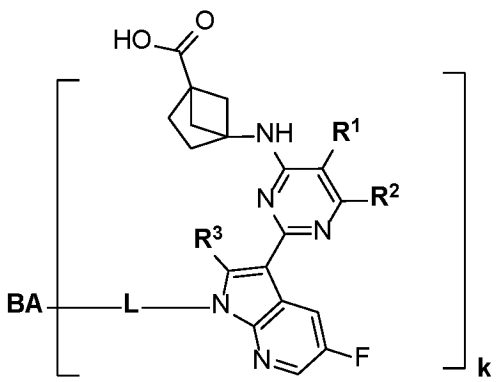
[00171] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 102:



(**122**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 122, **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

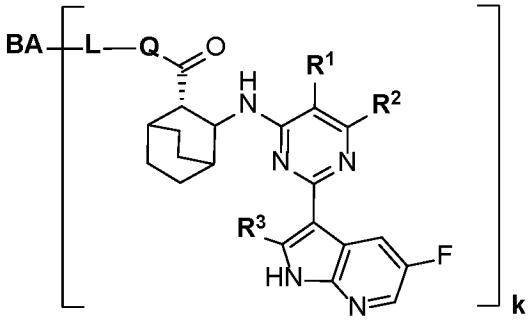
[00172] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 202:



(**222**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 222 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

[00173] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 103:

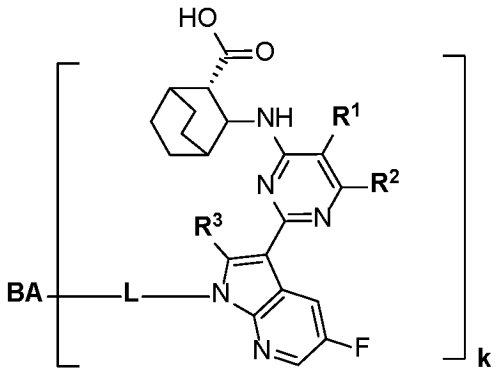


(**103**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 103 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных

вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H и **Q** представляет собой -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

[00174] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 203:

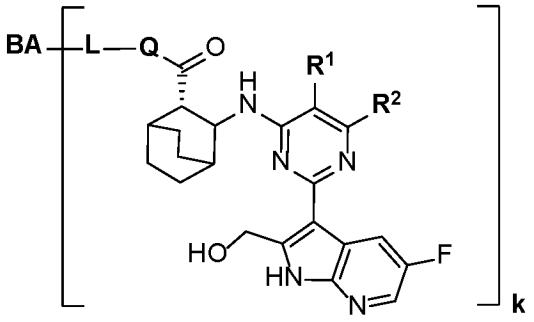


(**203**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 203 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и $\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления

изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^3}$ представляет собой H; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

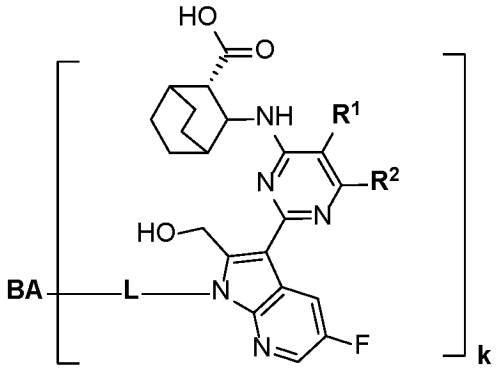
[00175] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 103:



(**104**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 104, **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F; и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения **Q** представляет собой -O-NH-; и $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

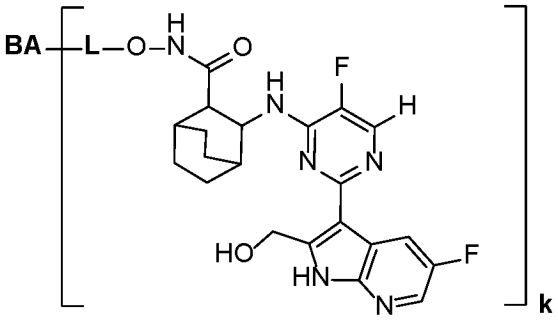
[00176] В определенных вариантах осуществления предложены ADC по Формуле 204:



(**204**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 204 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; и $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H, или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

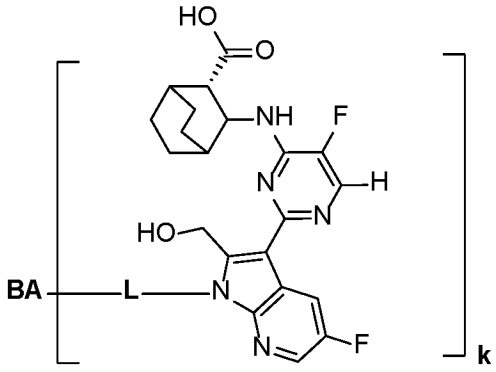
[00177] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 105:



(**105**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 105 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер.

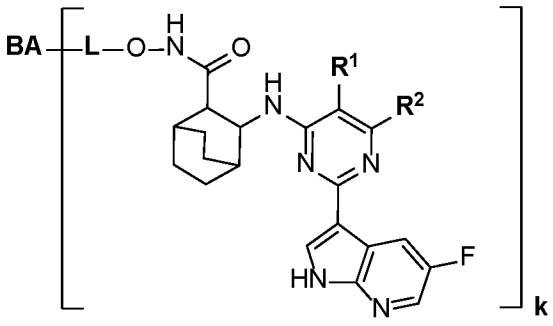
[00178] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 205:



(**205**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 205, **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; и **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер.

[00179] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 106:

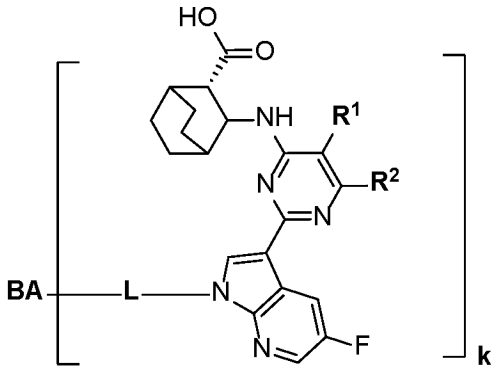


(**106**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 106 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; и $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$

и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

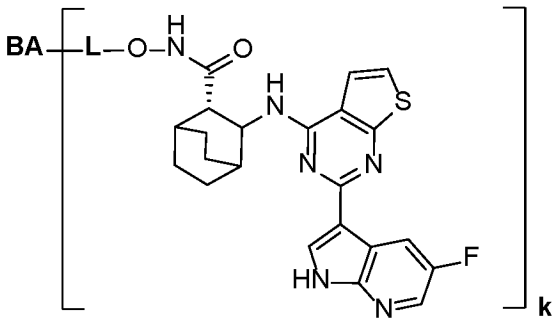
[00180] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 206:



(**206**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 206 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; и $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H, или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

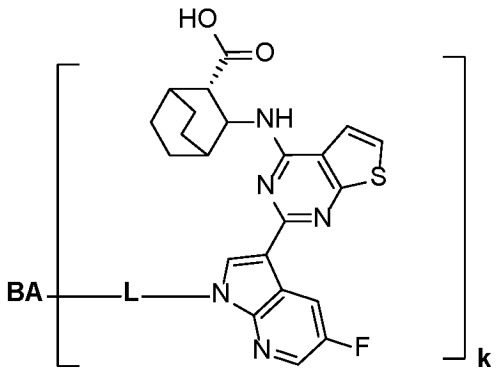
[00181] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 107:



(**107**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 107 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер.

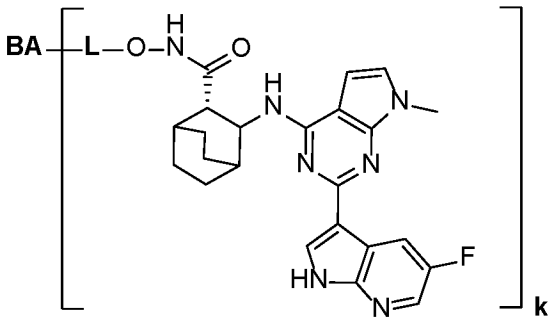
[00182] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 207:



(**207**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 207, **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; и **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер.

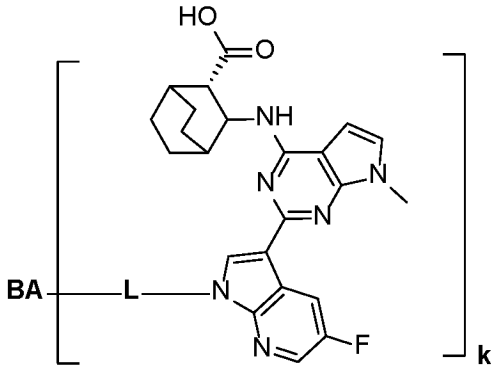
[00183] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 108:



(**108**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 105 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер.

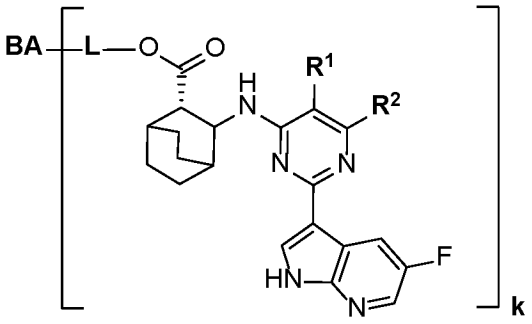
[00184] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 208:



(**208**)

или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 208 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; и **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер.

[00185] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC по Формуле 110:

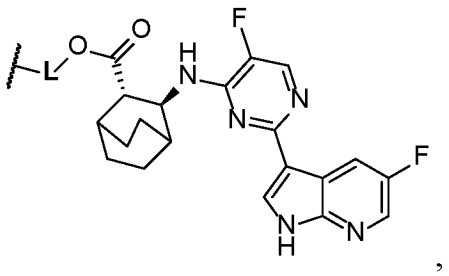


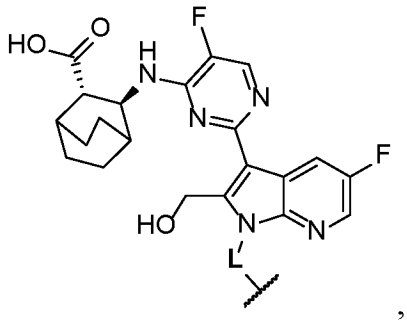
(**110**)

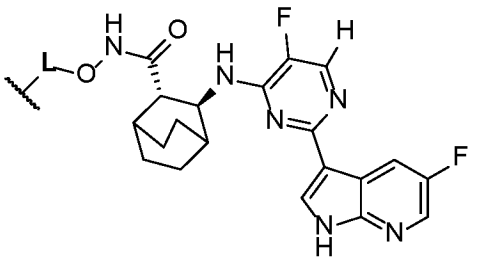
или их фармацевтически приемлемая соль. В Формуле 110 **BA** представляет собой описанный в настоящей заявке связующий агент; **L** представляет собой описанный в настоящей заявке линкер; $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой; и **Q** представляет собой -O- или -O-NH-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H. В определенных

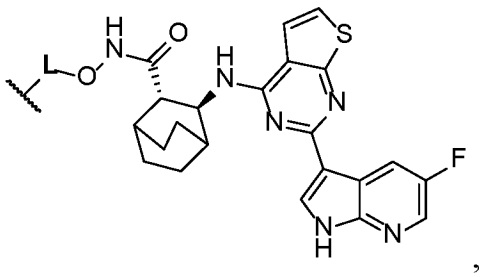
вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-S-. В определенных вариантах осуществления изобретения $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием -C=CH-NMe-.

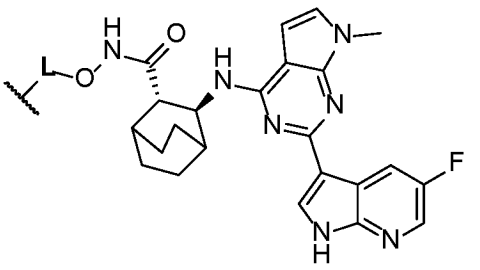
[00186] В определенных вариантах осуществления изобретения предложены ADC, имеющие следующую структуру:


,

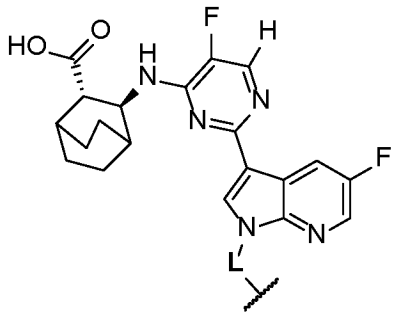

,


,

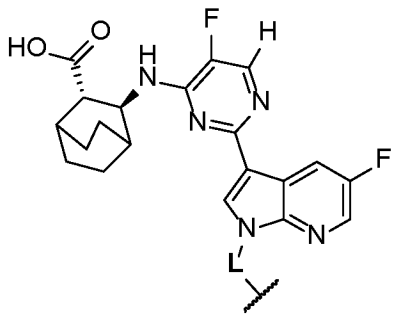

,



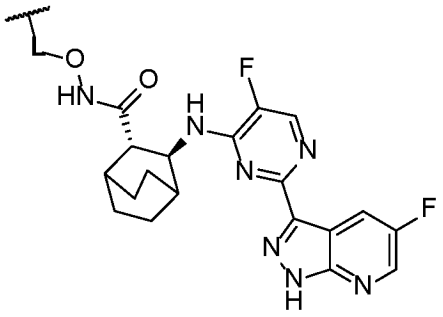
,



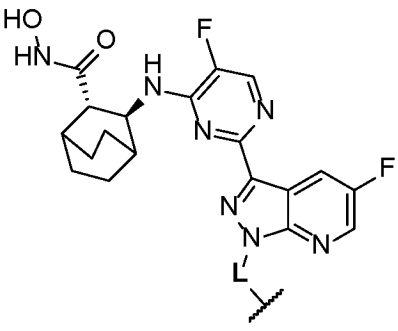
,



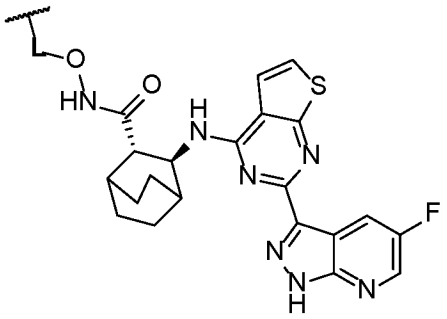
,



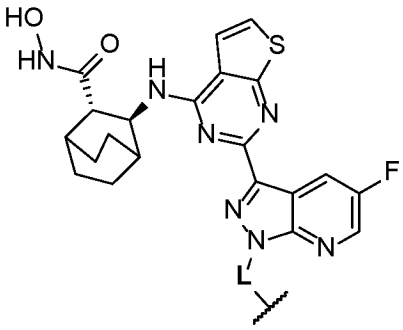
,



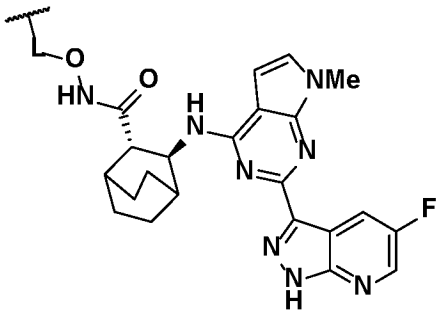
,



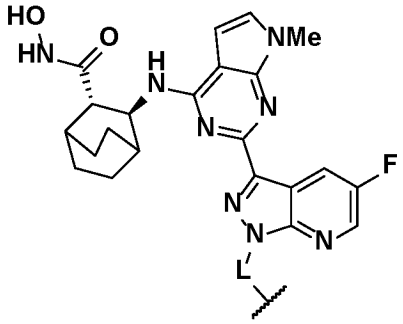
,



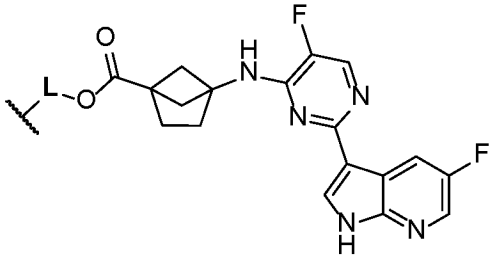
,



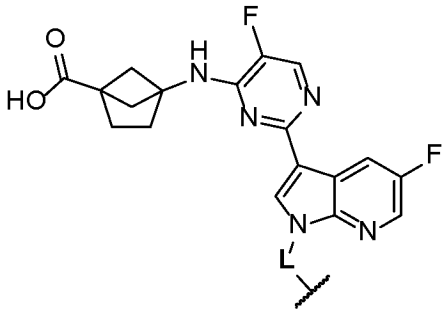
,

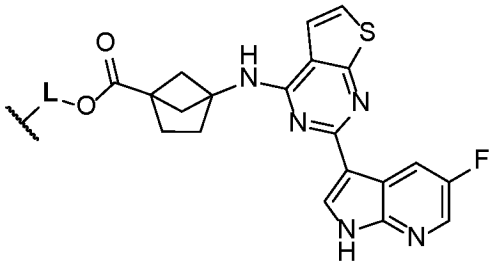


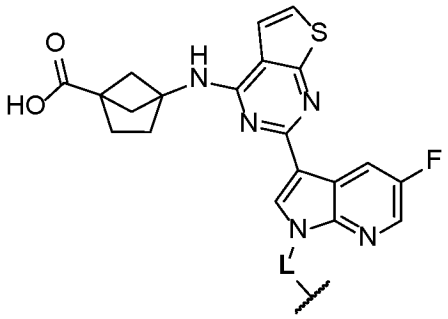
,

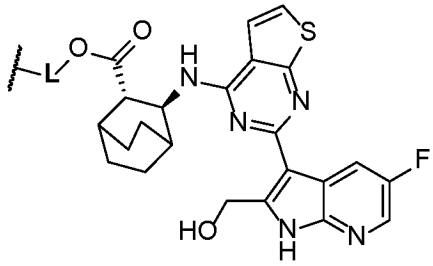


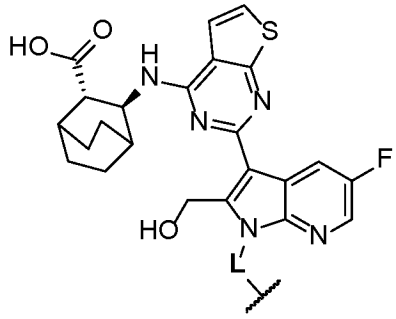
,


,


,


,

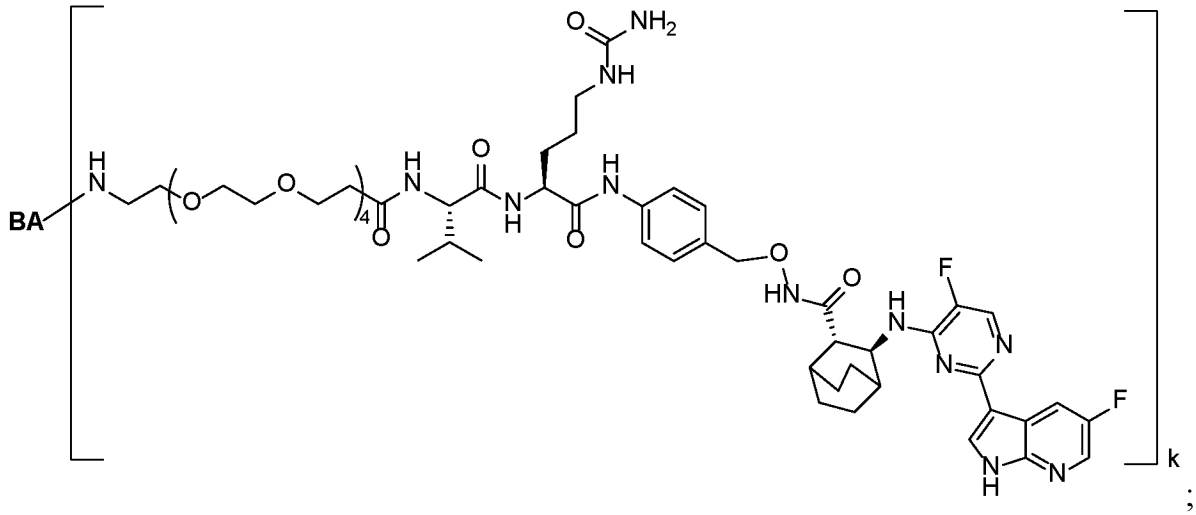

, и


,

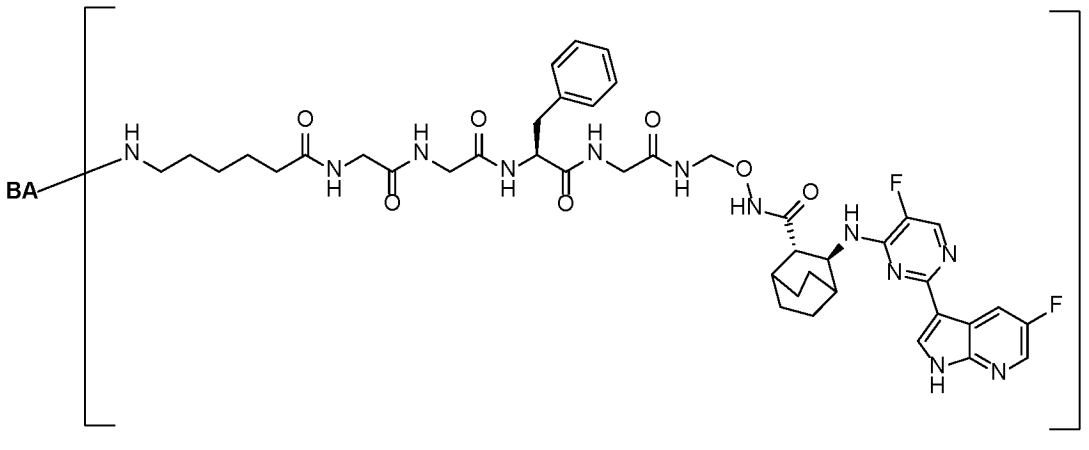
где указывает на соединение с **BA.**

[00187] В определенныхвариантах осуществления изобретения по Формулам 101-108, **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 **—L—BA,** как показано выше, включают одно или несколько описанных выше соединений по Формулам 301-306, 15, 20a, 20b, и 20c, где **BA** представляет собой связующий агент; **L** представляет собой линкер; и **k** равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10. В определенных вариантах осуществления изобретения соединения, конъюгированные с **—L—BA**, как показано выше, включают одно или несколько описанных выше соединений по Формулам 301-306, 15, 20a, 20b, и 20c, где **BA** представляет собой связующий агент и **L** представляет собой линкер, **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4, или 1-4.

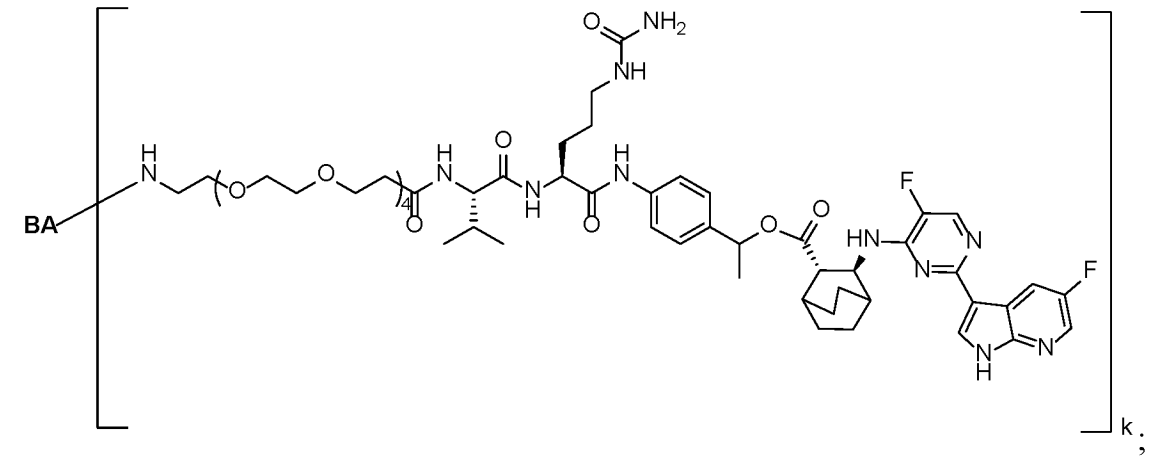
[00188] В одном варианте осуществления изобретения соединения ADC выбраны из группы, включающей

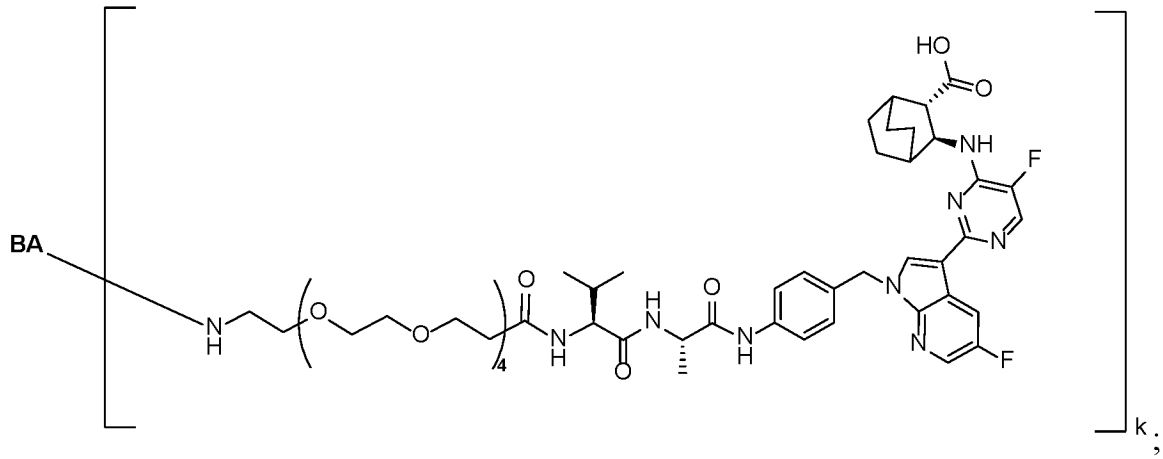


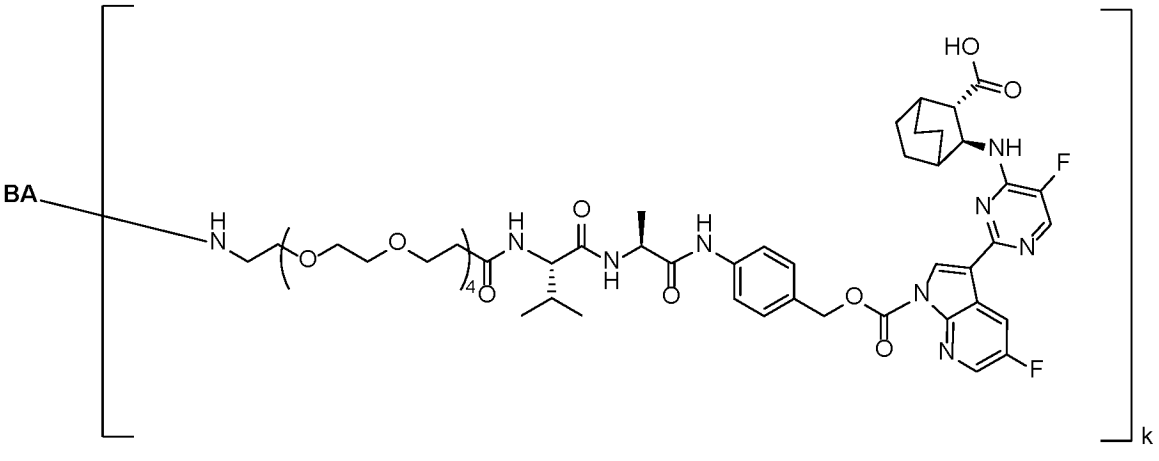
;

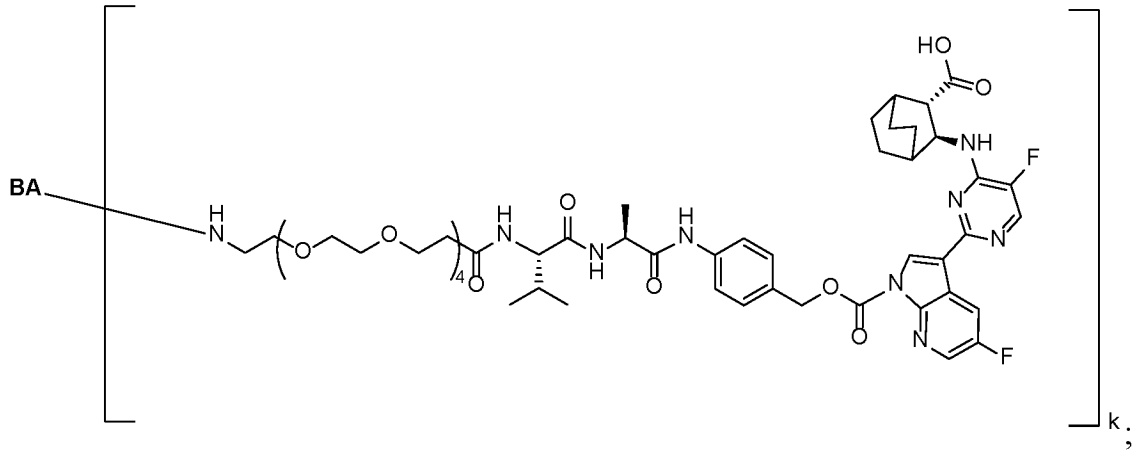


;

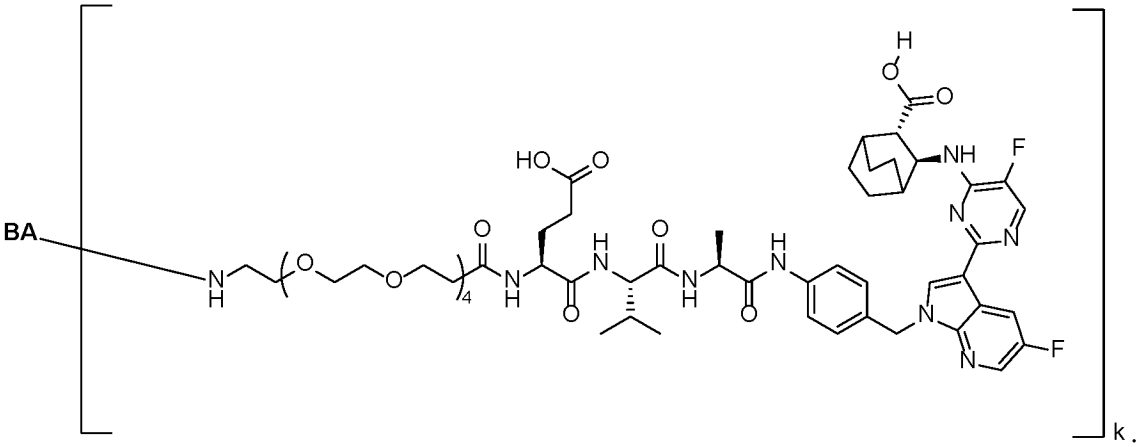

BA
O
NH2
NH
H
N
O
F
HN
N
F
N
H
k


BA
HO
O
NH
F
N
N
O
H
N
F
k

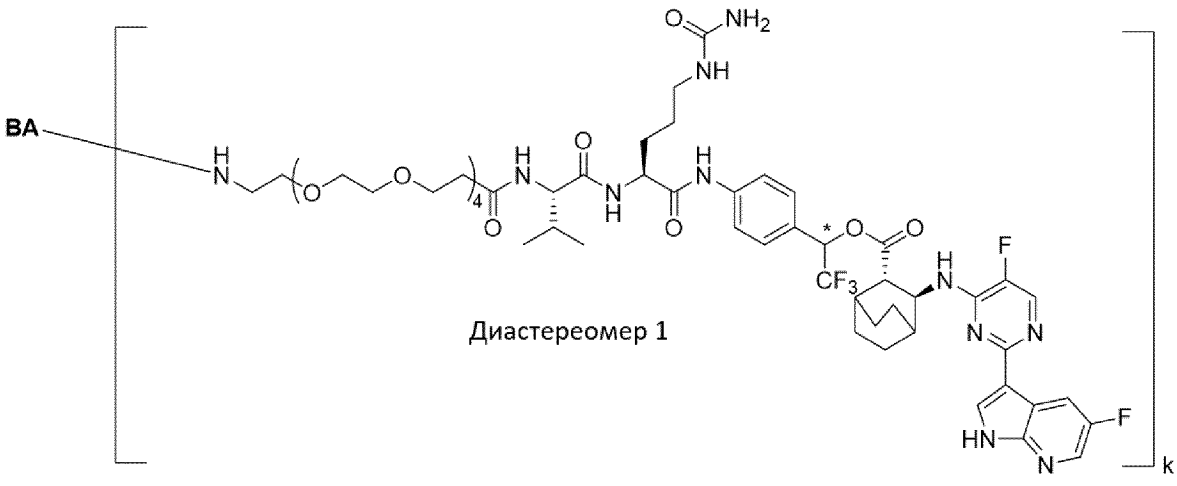

BA
HO
O
NH
F
N
N
H
N
O
O
F
k



;

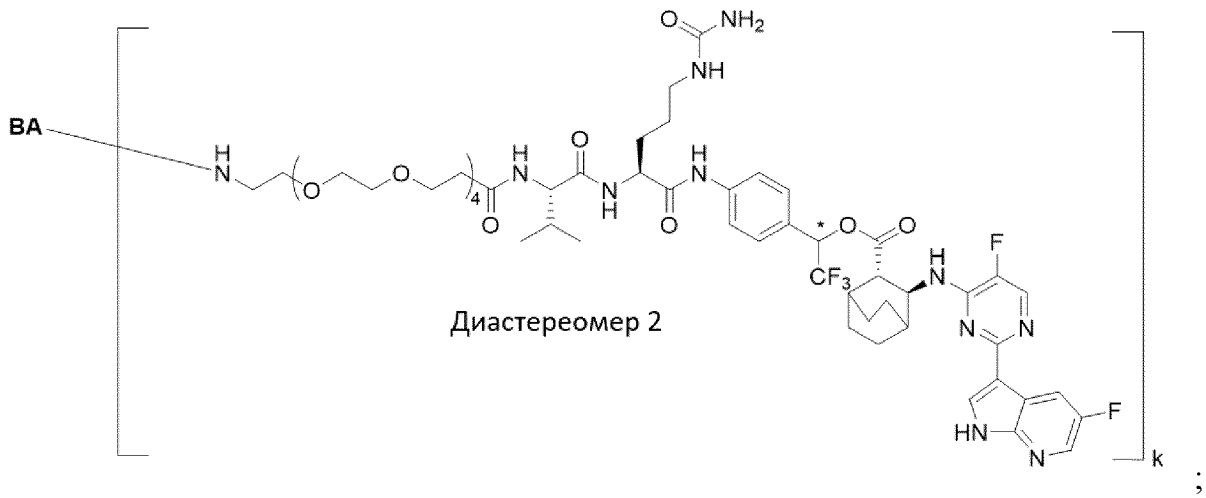


;

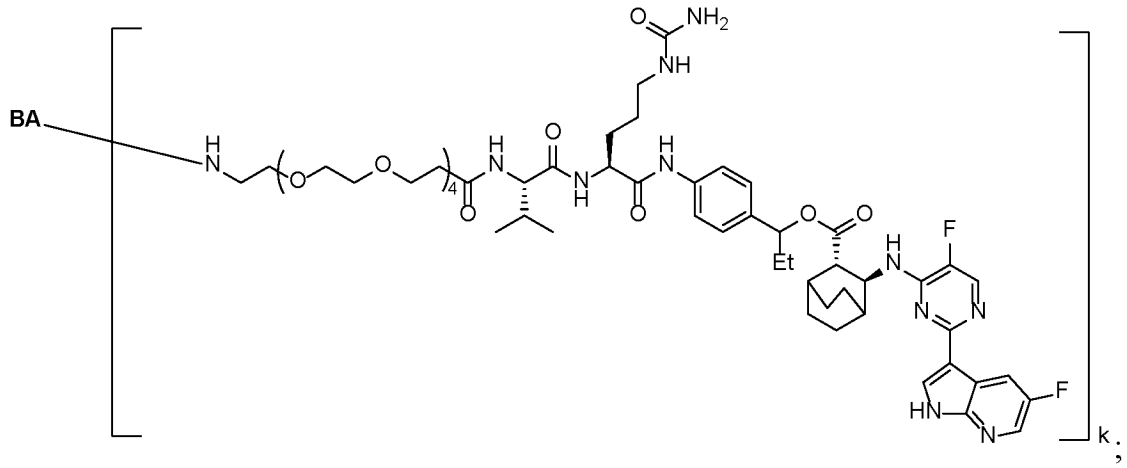


Диастереомер 1

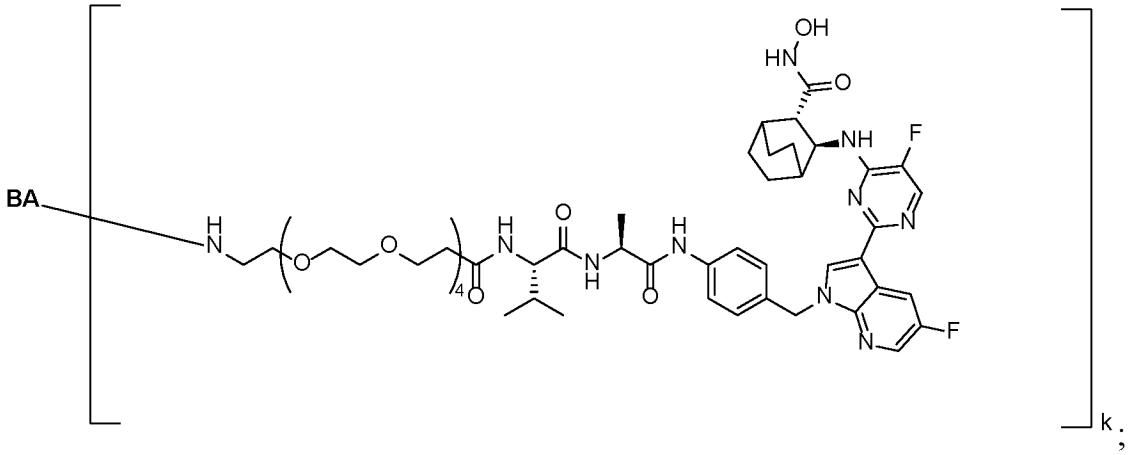
;


BA
Диастереомер 2
k

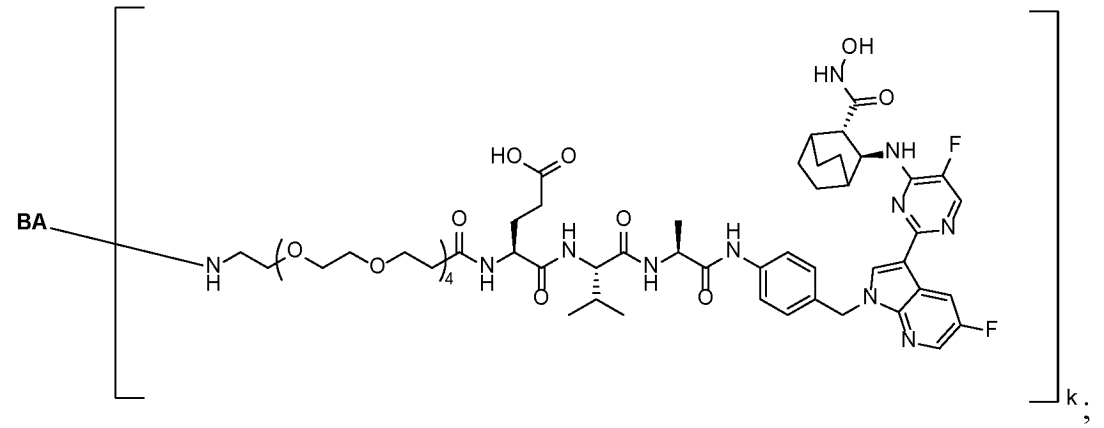
;

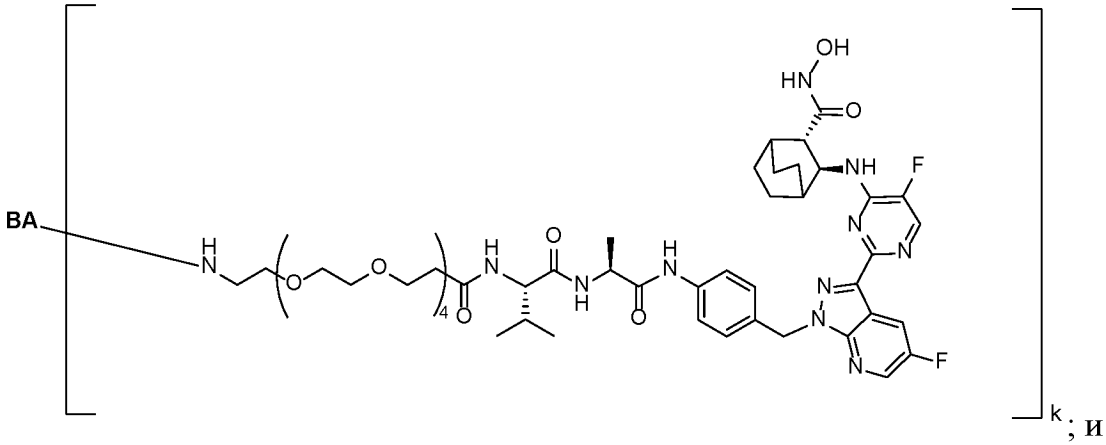

BA
k

;

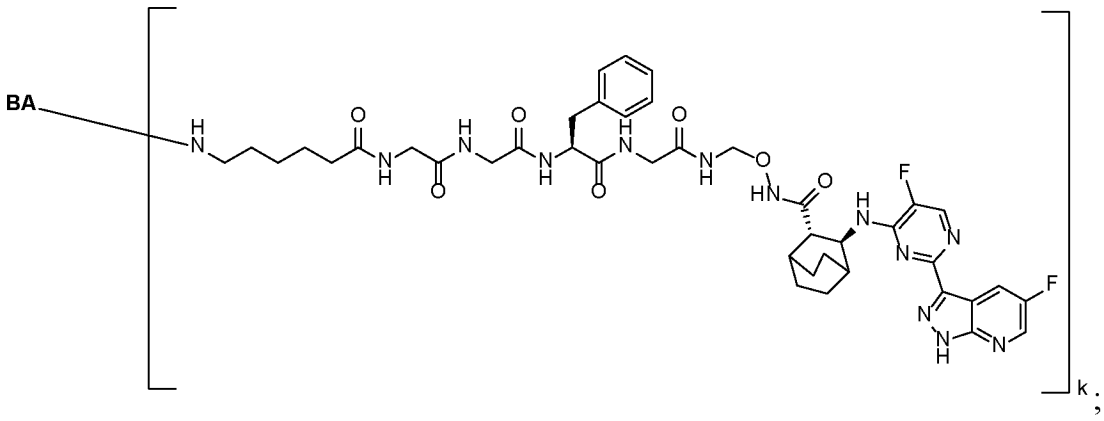

BA
k

;





; и



или их фармацевтически приемлемую соль, где **BA** представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент; и **k** равно целому числу от 1 до 30. 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, описанном в данном абзаце, предполагается, что **BA** включает один

или несколько остатков глютамина для конъюгации с полезной нагрузкой и/или линкером-полезной нагрузкой, когда **k** >1. Например, приведенное выше описание ADC предусматривает соотношение лекарственное средство:антитело (DAR), равное ≥ 1, где один или более остатков глютамина в **BA** создают условия для взаимодействия с полезной нагрузкой и/или линкер-полезной нагрузкой (например, когда **k** ≥ 1). Связи от **BA** к –NH– указывают на связи от линкера-полезной нагрузки (**L-P**) к трансглютаминированному остатку глютамина в **BA**, соответственно. Таким образом, азот из трансглютаминированного остатка глютамина в молекуле **BA** находятся в квадратных скобках, чтобы показать, что **BA** может быть конъюгирован с более чем одной полезной нагрузкой и/или линкер-полезной нагрузкой (например, **BA,** для которого DAR ≥ 1). В одном варианте осуществления изобретения **BA** является антителом или его антигенсвязывающим фрагментом согласно описанию в данной заявке.

[00189] В определенных вариантах ADC, описанных в настоящей заявке, **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере, один остаток глютамина, используемый для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, два остатка глютамина, используемые для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, три остатка глютамина, используемые для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, четыре остатка глютамина, используемые для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, один остаток глютамина, доступный для конъюгации. В одном варианте осуществления

изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, два остатка глютамина, доступных для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, три остатка глютамина, доступных для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, четыре остатка глютамина, доступных для конъюгации. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295; и **k** равен 2. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 по нумерации EU; и **k** равен 2. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, 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 **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глютамин. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глютамин; и **k** равен 2. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глютамин в последовательности LLQGA в С-терминальной области тяжелой цепи антитела. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется

через глютамин в последовательности LLQGA в С-терминальной области тяжелой цепи антитела; и **k** равен 2. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 и двум остаткам N297Q; и **k** равен 4. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 по нумерации EU и двум остаткам N297Q; и **k** равен 4. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой mAb11729 (MAT11729), описанное в настоящей заявке.

[00190] В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется в С-терминальной области тяжелой цепи антитела; 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 трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глютамин. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глютамин; 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 **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глютамин в последовательности LLQGA в С-терминальной области тяжелой цепи

антитела. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело, модифицированное трансглютаминазой, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется через глютамин в последовательности LLQGA в С-терминальной области тяжелой цепи антитела; 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 **BA** представляет собой mAb11729, описанное в настоящей заявке.

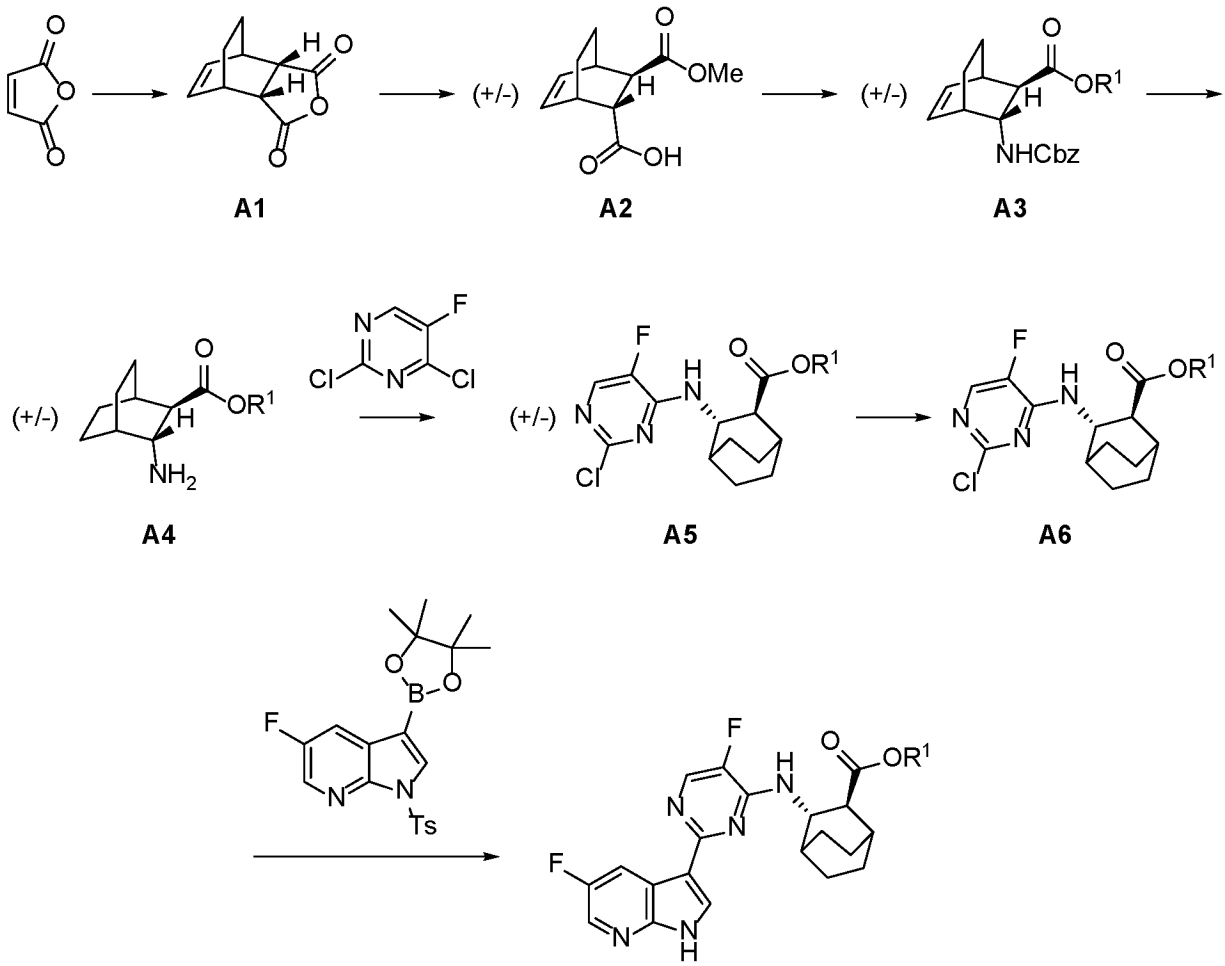
[00191] В определенных вариантах ADC, описанных в настоящей заявке, **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа А или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа А, группы 1, или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело к H1 вируса гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа А, группы 2, или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **BA** представляет собой антитело к H3 вируса гриппа или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления изобретения **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, конъюгированный с полезной нагрузкой через линкер, где конъюгат антитело-лекарственное средство связывается с и/или ингибирует щелочной белок полимеразы 2 (PB2) и/или щелочной 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 щелочной белок полимеразы 2 (PB2) (VX-787) при аффинности связывания, по меньшей мере, $4,0x10^{-9}$ M, по меньшей мере, $3,5x10^{-9}$ M

или, по меньшей мере, $3,0x10^{-9}$ М, по меньшей мере, $4,0x10^{-9}$ М, по меньшей мере, $3,5x10^{-9}$ М или, по меньшей мере, $3,0x10^{-9}$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 щелочной белок полимеразы 1 (PB1) при аффинности связывания, по меньшей мере, $4,0x10^{-9}$ М, по меньшей мере, $3,5x10^{-9}$ М, или по меньшей мере, $3,0x10^{-9}$ М, 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 щелочной белок полимеразы 2 (PB2) (VX-787) при IC_{50}, по меньшей мере, $2,5x10^{-9}$ М, по меньшей мере, $2,0x10^{-9}$ М, или по меньшей мере, $1,5x10^{-9}$ М, 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 щелочной белок полимеразы 1 (PB1) при IC_{50}, по меньшей мере, $2,5x10^{-9}$ М, по меньшей мере, $2,0x10^{-9}$ М, или по меньшей мере, $1,5x10^{-9}$ М, измеренной методом ImmunoSpot®.

Способы получения соединения или полезных нагрузок и линкер-полезных нагрузок

[00192] 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 A-C:

Схема А. Иллюстративная схема получения



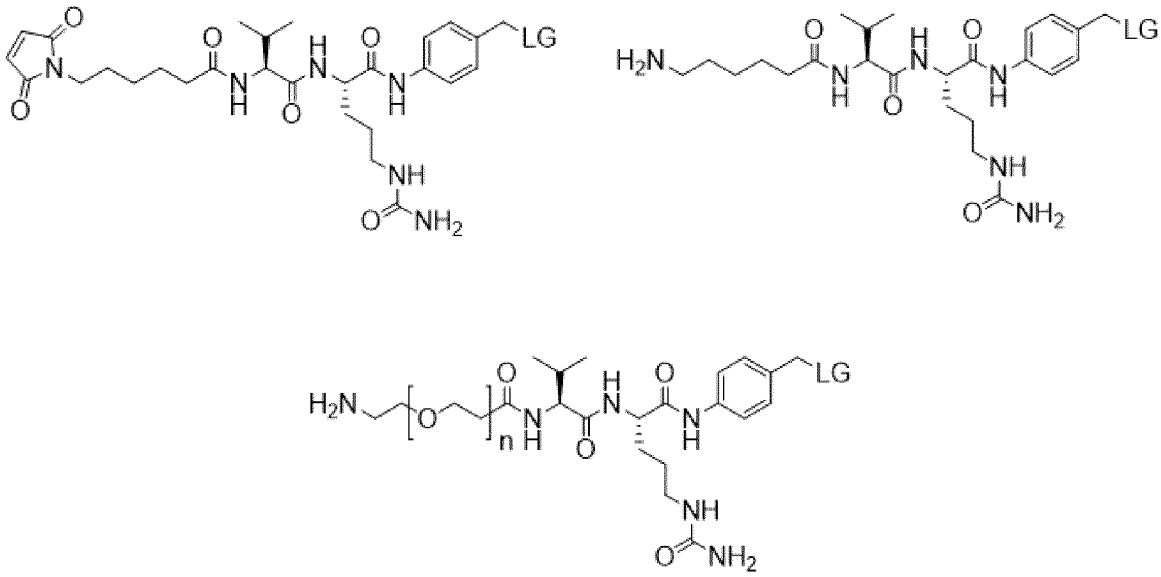
Соединение VX-787 и его производные

[00193] На приведенной выше Иллюстративной схеме получения А (*см.*, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6668), **R**^{1} описан применительно к формулам 101-108, 301-306, и 401-403. На Схеме А после циклоприсоединения малеинового анигидрида и 1,3 циклогексадиена по реакции Диельса-Альдера эндо-**A1** может быть перемешан в щелочной среде, что приводит к получению эпимеризованного транс-**A2**. Перегруппировка Курциуса и извлечение с помощью бензилового спирта приводит к получению **A3**. Гидрогенизация приводит к получению **A4**. В результате обработки 2,4-дихлорпиримидинами и хирального разделения получают **A6,** при это промежуточнным продуктом является **A5**. Реакция сочетания Сузуки с замещенными сложными боронатными эфирами азаиндола с последующим удалением защитных грпп приводит к получению соединений по формулам 301-306, включая VX-787 и его производные.

[00194] Линкер-полезные нагрузки, описанные в настоящей заявке, в общем случае, мгут быть синтезированы посредством серии последовательных стадий присоединения, как показано на Схеме С:

Схема С. Иллюстративная схема получения

VX-787 и его производные



где n= 1-92

[00195] На приведенной выше Иллюстративной схеме получения С **R** 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 п формулам 401-403 (например, линкер-(VX-787)).

[00196] Т Описанные в настоящей заявке конъюгаты могут быть синтезированы посредством соединения линкеров-полезных нагрузок, описанных в настоящей заявке, со связующим агентом, например, антителом, описанным в настоящей

заявке, в стандартных условиях конъюгации (см., *например*, публикацию Doronina *et al. Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 778, содержание которой 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 глютамина, цистеина или лизина в молекуле антитела. Для соединения линкер-полезных нагрузок с остатками глютамина антитело может быть, например, обработано линкер-полезной нагрузкой, содержащей подходящую реакционноспособную группу, например, аминогруппу, в присутствии фермента трансглютаминазы в подходящих условиях реакции (*см. например*, Примеры в настоящей заявке). Линкер-полезные нагрузки могут быть соединены с остатками цистеина, например, посредством обработки антитела восстанавливающим агентом, например, дитиотреитола, чтобы расщепить дисульфидные связи антитела, очистки восстанвленного антитела, например, методом гель-фильтрации, с последующей обработкой антитела линкер-полезной нагрузкой, содержащей подходящую реакционноспособную группу, например, малеимидогруппу. 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.

[00197] Связующие агенты, например антитела, могут образовывать конъюгаты посредством химических реакций Дильса-Альдера. В некоторых вариантах реакций Дильса-Альдера линкер-полезная нагрузка включает реакционноспособную группу, например, диенофильную группу, способную вступать в реакцию Дильса-Альдера с диеном. В некоторых вариантах реакций Дильса-Альдера линкер-полезная нагрузка включает реакционноспособную группу, например, диен, способный вступать в реакцию Дильса-Альдера с диенофилом. 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.

[00198] В определенных вариантах осуществления изобретения антитело функционализировано, например, группами диен-полиэтиленгликоля или азидо-полиэтиленгликоля. В определенных вариантах осуществления изобретения такое функционализированное антитело получают посредством обработки антитела, содержащего, по меньшей мере, один остаток глютамина, например, область распознавания трансглютаминазой в С-терминальной области, первичным амином в присутствии фермента трансглютаминазы. В определенных вариантах осуществления изобретения такое функционализированное антитело получают посредством обработки антитела, содержащего, по меньшей мере, один остаток глютамина, например, Gln295 в тяжелой цепи, первичным амином в присутствии фермента трансглютаминазы. В определенных вариантах осуществления изобретения такое функционализированное антитело получают посредством обработки антитела, имеющего, по меньшей мере, один остаток глютамина, например, Gln297 в тяжелой цепи, первичным амином в присутствии фермента трансглютаминазы. 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 глютамина, например, Gln295 в тяжелой цепи и Gln297 в тяжелой цепи, первичным амином в присутствии фермента трансглютаминазы. В число таких антител входят мутанты Asn297Gln (N297Q). В определенных вариантах осуществления изобретения антитело имеет две тяжелые цепи, согласно описанию в данном абзаце, и суммарно содержит два или четыре остатка глютамина.

[00199] 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. В варианте осуществления изобретения функционализированное антитело или антиген-связывающая 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.

[00200] В определенных вариантах осуществления изобретения антитело содержит два остатка глютамина, 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 глютамина. Эти остатки глютамина могут находиться в тяжелых цепях, легких цепях или и в тяжелых, и в легких цепях. Эти остатки глютамина могут представлять собой остатки дикого типа или сконструированные остатки. Антитела могут быть получены по стандартным методикам.

[00201] Специалистам должно быть понятно, что антитела часто являются гликозилированными по остатку N297, рядом с остатком Q295 в последовательности тяжелой цепи. Гликозилирование остатка N297 может может создавать препятствия для трансглутаминазы возле остатка Q295 (Dennler *et al.*, *выше*). 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 N297. 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..

[00202] В качестве трансглутаминазы может быть использована любая трансглутаминаза, представляющаяся подходящей специалисту. В определенных вариантах осуществления изобретения трансглутаминазой является фермент, который катализирует образование изопептидной связи между свободной аминной группой линкера-полезной нагрузки и ацильной группой на боковой цепи остатка глютамина. Трансглютаминазу называют также протеин-глютамин-γ-глютамилтрансферазой. В частных случаях изобретения трансглютаминаза имеет обозначение по классификации ферментов EC 2.3.2.13. Может быть использована трансглютаминаза из любого источника, представляющегося подходящим. В определенных вариантах осуществления изобретения трансглутаминаза имеет микробное происхождение. Полезные трансглутаминазы были выделены из *Streptomyces mobaraense, Streptomyces cinnamoneum*, *Streptomyces griseo-carneum*, *Streptomyces lavendulae*, и *Bacillus subtilis.* Могут быть использованы также немикробные трансглутаминазы, включая трансглутаминазы млекопитающих, *например*, немикробная трансглютаминаза в комбинации с кофактором. В определенных вариантах осуществления изобретения трансглутаминаза может быть получена любым способом или из любого источника, представляющегося подходящим специалисту. В частных случаях осуществления изобретения приобретают коммерческую трансглутаминазу.

Фармацевтические композиции и способы лечения

[00203] 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.

[00204] 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.

[00205] Подходящие дополнительные терапевтические средства включают, не ограничиваясь перечисленным: антивирусное лекарственное средство, такое как второе антивирусное 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: антивирусное лекарственное средство, противовоспалительное лекарственное средство (например, кортикостероид или нестероидное противовоспалительное лекарственное средство), антитело, которое специфично свзывается с НА вируса гриппа, вакцину против гриппа, пищевую добавку (например, антиоксидант), и паллиативную терапию для лечения инфекции грппа. В одном варианте осуществления изобретения противовоспалительное лекарственное средство выбирают из группы, включащей кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средствы. В одном варианте осуществления изобретения пищевой добавкой является антиоксидант. Подходящие терапевтические средства включают также, не ограничиваясь перечисленным, любые фармацевтически приемлемые соли ли производные антивирусного 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 вязывается с НА вируса гриппа А, или антитело, которое специфично связывается с НА вируса гриппа В.

[00206] 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 композициия, содержащей комбинацию описанного в настоящей заявке соединения с любым дополнительные 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 включают 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 избретению 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.

[00207] 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»).

[00208] В определенных иллюстративных вариантых осуществления настоящего изобретения каждую дозу второй и/или третьей очерди 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.

[00209] 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.

[00210] 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.

[00211] 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 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в месяц, один раз в 2 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.

[00212] Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие соединения и/или конъюгаты, описанные в настоящей заявке, *например*, конъюгаты антитело-лекарственное средство соединений по Формулам 101-403, *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 pH 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.

[00213] 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, внутрибрюшинный, 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 внутрибрюшинный 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.

[00214] 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 Формулам 101-403, линкера-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 неконъюгированной полезной нагрузки, уменьшаются, когда сопоставимому субъекту вводят конъюгированную полезную нагрузку или ADC.

[00215] 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 H1. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана вирусом гриипа А группы 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А H3. 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 H1, вирусом гриппа А группы 2, вирусом гриппа А H3, неизвестным или не определенным вирусом гриппа, вирусом гриппа В, или любой комбинацией этих вирусов.

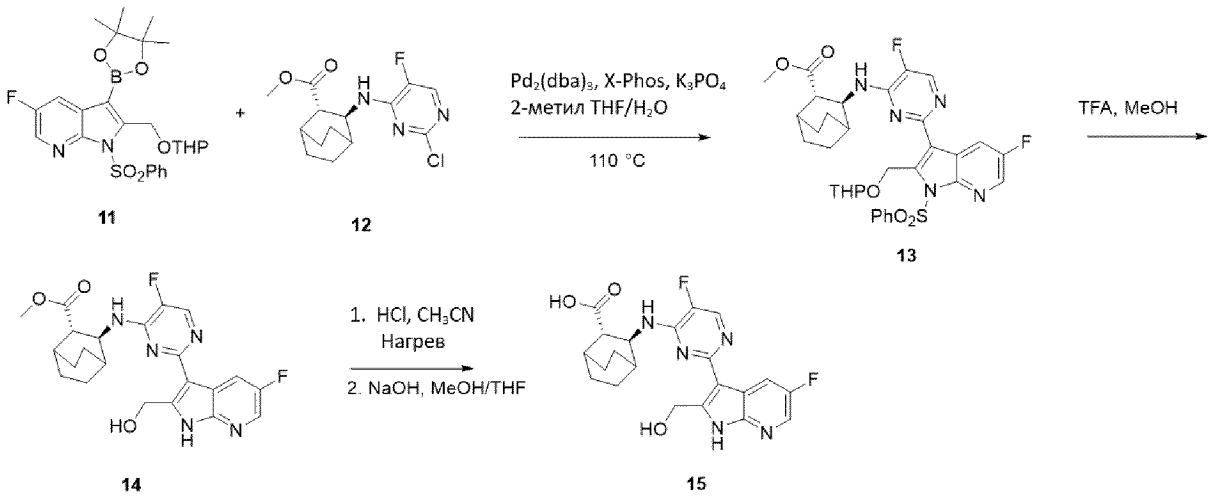
ПРИМЕРЫ

[00216] Предложены производные VX-787, образованные этими соединениями конъюгаты с белком и способы лечения заболеваний, нарушений и состояний, включающие введение производных VX-787 и образованных этими соединебиями конъюгатов.

Пример 1: Синтез линкера-полезной нагрузки

[00217] Полезные нагрузки, линкер-полезные нагрузки и конъюгаты были синтезированы, как показано ниже. Все применявшиеся растворители были приобретены у поставщиков Sigma Aldrich или Fisher Scientific и использованы «как есть». Для регистрации ^{1}H-спектров использовали ЯМР-спектрометры Varian Inova 300 МГц и 500 МГц. Химические сдвиги (δ) выражены в ppm по отношению к использованным для анализа растворителям 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 выражены в герцах (Гц). Для определения хроматографической чистоты использовали системы для ЖХ/МС Agilent 1100, 1260 Infinity с масс-6130 Quadrupole LC/MS или систему 1200 Series LC/MS 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 ацетонитила в воде в течение 4 мин; диодно-матричный детектор Agilent при длине волны λ = 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.

1.1 Схема 1

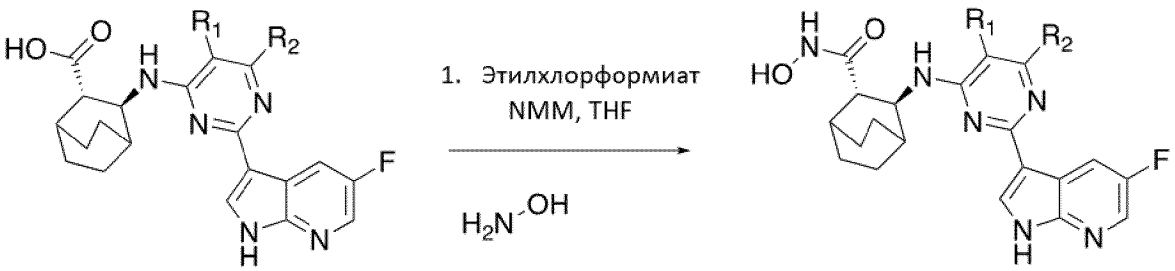


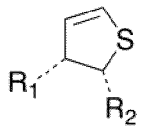
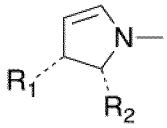
[00218] Для получения Соединения **11** использовали описанную в литературе методику, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *8*, 261−265.

[00219] Соединение **13**: К раствору соединения **11** (50 мг, 0,096 ммоль) и соединения **12** (25 мг, 0,08 ммоль) в 2-метил-тетрагидрофуране (THF) (1 мл) и воде (0,2 мл) добавляли K_3PO_4 (3 мг, 0,0144 ммоль). Смесь продували аргоном в течение 10 мин, затем добавляли реактив X-phos (2-дициклогексилфосфино-2,4,6-триизопропилбифенил) (4,5 мг, 0,0096 ммоль) и $Pd_2(dba)_3$ (трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0)) (1,8 мг, 0,002 ммоль), и реакционную смесь нагревали до 110 °C в течение 9 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (2 мл) и фильтровали через слой целита, затем концентрировали. Остаток очищали на колонке Silica Gold с 24 г наполнителя, используя смесь гексанов/этилацетата. Чистые фракции объединяли и концентрировали, чтобы получить соединение **13**, представляющее собой серовато-желтоватое твердое вещество (10 мг, 20%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{33}H_{35}F_2N_5O_6S$, 667,2; обнаружено 668,2 (M+H).

[00220] Compound **15**: К раствору соединения **13** (10 мг, 0,015 ммоль) в MeOH (2 мл), добавляли TFA (трифторуксусную кислоту) (1,5 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Летучие компоненты удаляли под вакуумом, чтобы получить Соединение **14**, которое растворяли в ацетонитриле (1 мл). К полученному раствору добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (22,5 мкл, 0,09 ммоль) и смесь нагревали до 70 °C в течение 30 мин. Летучие компоненты повторно удаляли при сниженном давлении, и остаток растворяли в смеси THF/MeOH (1:1) (1 мл). К этому раствору добавляли 2 N водный раствор NaOH (0,2 мл), и реакционную смесь нагревали до 30 °C в течение 4 ч. Реакционную смесь подкисляли до pH 4-5, используя 2 N раствор HCl. Водный слой отбрасывали, и органический слой концентрировали до сухости, затем очищали на колонке C18 Aq, заполненной 30 г носителя, используя 5-95% смесь $MeCN/H_2O$ (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **15** (3,5 мг, 54%), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{21}H_{21}F_2N_5O_3$, 429,2; обнаружено 430,1 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 12,15 (s, 1H), 8,51 (dd, J = 10,1, 2,9 Гц, 1H), 8,19-8,17 (m, 2H), 7,55-7,54 (m, 1H), 5,05 (q, J = 15,5 Гц, 2H), 4,72-4,70 (m, 1H), 2,76 (s, 1H), 2,00 (d, J = 0,9 Гц, 1H), 1,90-1,86 (m, 1H), 1,81-1,78 (m, 1H), 1,78-1,73 (m, 2H), 1,59-1,46 (m, 3H), 1,43-1,33 (m, 2H).

1.2 Схема 2



R_1/R_2	Карбоновая кислота	Гидроксамовая кислота
R_1 = F, R_2 = H	VX-787	20a
	19b	20b
	19c	20c

[00221] Для получения Соединений **19b** и **19c** использовали следующие методики, описанные в *European Journal of Medicinal Chemistry,* **2019**, *162,* 249-265. Перед использованием гидроксиламина гидрохлорид превращали в свободное основание, используя раствор KOH в MeOH.

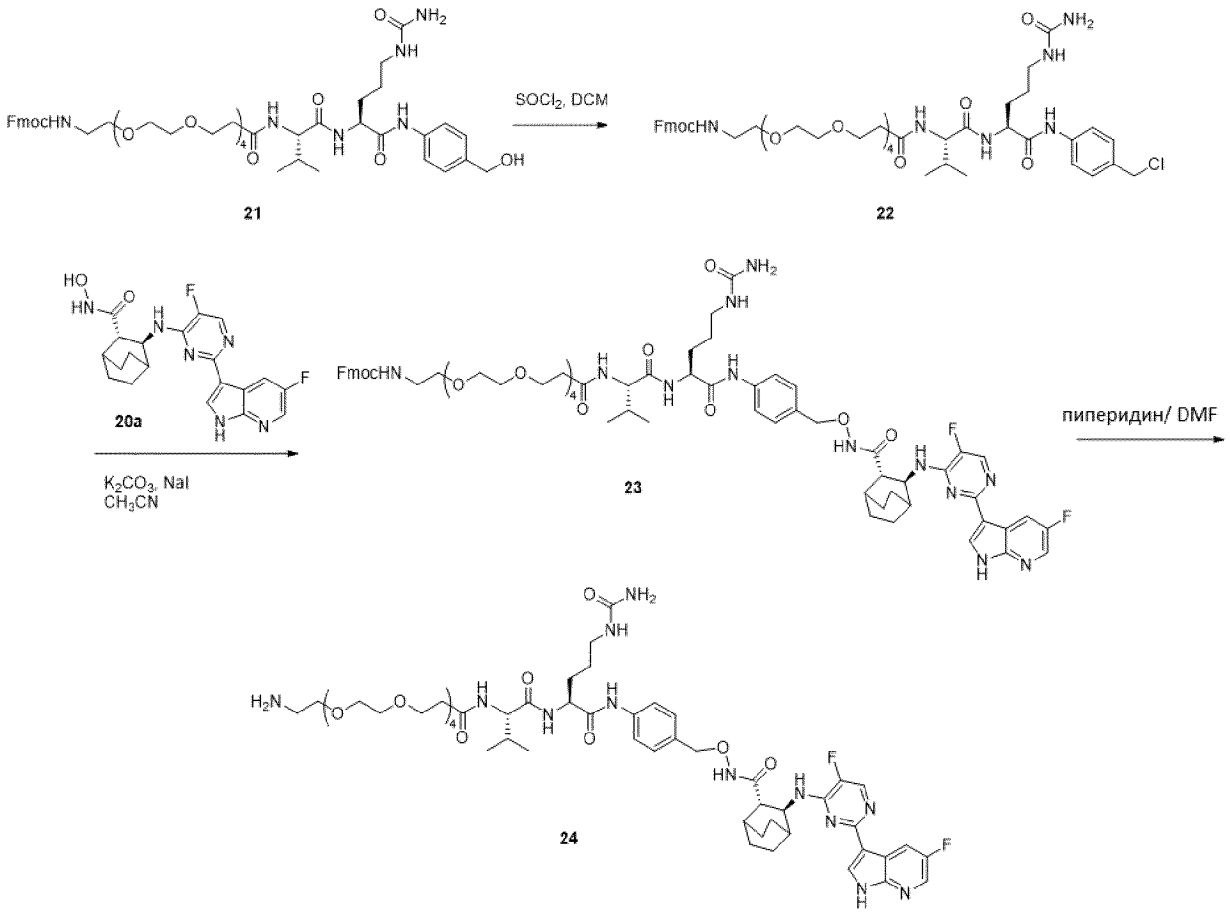
[00222] Общая методика получения производных гидроксамовой кислоты из соответствующих карбоновых кислот: Соединение **20a**: К смеси VX-787 (**19a**, 10 мг, 0,025 ммоль) в безводном THF при 0 °C добавляли N-метилморфолин (NMM) (8 мкл, 0,075 ммоль) и этилхлорформиат (3 мкл, 0,03 ммоль). После перемешивания при 0°C в течение 10 мин добавляли свежеприготовленный раствор гидроксиламина в MeOH (20 мкл, в большом избытке) добавляли. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 5 мин, затем нагревали до температуры окружающей среды, и летучие компоненты удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке C18

Aq 15,5 г, используя смесь растворителей 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% HOAc). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **20a** (6,2 мг, 60%) представляющее собой рыхлое белое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{20}H_{20}F_2N_6O_2$, 414,2; обнаружено 415,2 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 12,22 (s, 1H), 10,40 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,54 (dd, *J* = 9,8, 2,8 Гц, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,12 (d, *J* = 4,0 Гц, 1H), 7,47 (d, *J* = 7,3 Гц, 1H), 4,82 (t, *J* = 7,1 Гц, 1H), 1,88-1,68 (m, 7H), 1,60-1,54 (m, 1H), 1,48-1,43 (m, 1H), 1,35 (t, *J* = 11,6 Гц, 2H).

[00223] Соединение **20b** было получено из Соединения **19b** при использовании этой же общей методики. Выход = 28%, в виде рыхлого серовато-желтоватого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{22}H_{21}FN_6O_2S$, 452,1; обнаружено 453,2 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 12,24 (s, 1H), 10,44 (s, 1H), 8,69-8,66 (m, 2H), 8,32 (d, *J* = 1,7 Гц, 1H), 8,26 (d, *J* = 1,4 Гц, 1H), 7,71 (d, *J* = 6,0 Гц, 1H), 7,54 (d, *J* = 7,2 Гц, 1H), 7,41 (d, *J* = 5,9 Гц, 1H), 5,01 (t, *J* = 6,9 Гц, 1H), 1,96-1,73 (m, 7H), 1,60-1,59 (m, 1H), 1,51 (d, *J* = 6,0 Гц, 1H), 1,41-1,37 (m, 2H).

[00224] Соединение **20c** было получено из Соединения **19c** при использовании этой же общей методики. Выход = 44% в виде светло-желтого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{23}H_{24}FN_7O_2$, 449,20; обнаружено 450,15 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; CD_3OD): δ 8,82 (dd, *J* = 9,6, 2,6 Гц, 1H), 8,82 (dd, *J* = 9,6, 2,6 Гц, 1H), 8,33 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 6,97 (d, *J* = 3,1 Гц, 1H), 6,60 (d, *J* = 3,0 Гц, 1H), 4,99-4,97 (m, 1H), 3,84 (s, 3H), 2,45 (d, *J* = 6,5 Гц, 1H), 2,05-1,78 (m, 6H), 1,72-1,61 (m, 2H), 1,56-1,45 (m, 2H).

1.3 Схема 3



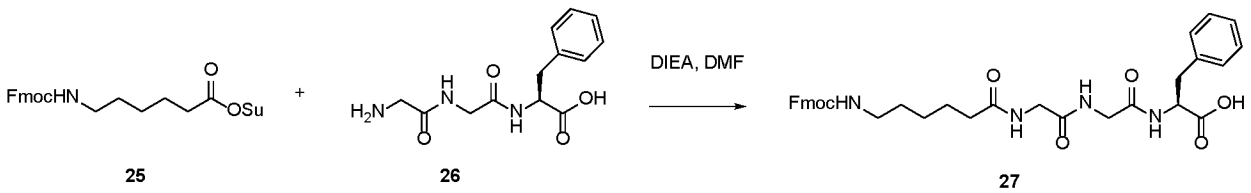
[00225] Соединение **22**: К раствору Fmoc-PEG-8-Val-Cit-PAB-OH (**21**, 120 мг, 0,117 ммоль) в безводном DCM (5 мл), добавляли хлорид тионила (10 мкл, 0,128 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин. Реакционную смесь концентрировали, растворяли в ДМСО (1 мл) и очищали на колонке Teledyne ISCO C18 Aq 30 г и смесь растворителей 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **22** (90 мг, 74%), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{52}H_{75}ClN_6O_{14}$, 1042,5; обнаружено 1043,4 (M+H).

[00226] Соединение **23**: К раствору соединения **20a** (8 мг, 0,019 ммоль) и Соединения **22** (20 мг, 0,019 ммоль) в безводном ацетонитрил (4 мл), добавляли иодид натрия (5,8 мг, 0,038 ммоль) и карбонат калия (5,2 мг, 0,038 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 50 °C в течение 4 ч затем охлаждали до комнатной температуры и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали на

колонке Teledyne ISCO C18 Aq 50 г, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **23** (10 мг, 37%), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{22}H_{94}F_2N_{12}O_{16}$, 1420,7; обнаружено 1421,6 (M+H).

[00227] Соединение **24**: К раствору соединения **23** (10 мг, 0,007 ммоль) в DMF (0,6 мл) добавляли а 5% раствор пиперидина в DMF (0,3 мл), реакционную смесь перемешивали в течение 45 мин и очищали на колонке Gemini 30 x 150 мм, используя градиентное элюирование смесью растворителей 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **24** (5,3 мг, 63%) представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{57}H_{84}F_2N_{12}O_{14}$, 1198,6; обнаружено 1199,6 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 10,98 (s, 1H), 9,97 (s, 1H), 8,53 (dd, *J* = 9,8, 2,8 Гц, 1H), 8,27-8,23 (m, 2H), 8,12 (dd, *J* = 15,1, 5,7 Гц, 2H), 7,85 (d, *J* = 8,6 Гц, 1H), 7,55 (d, *J* = 8,4 Гц, 2H), 7,46 (d, *J* = 7,5 Гц, 1H), 7,22 (d, *J* = 8,4 Гц, 2H), 5,97 (t, *J* = 5,7 Гц, 1H), 5,39 (s, 2H), 4,82 (t, *J* = 7,0 Гц, 1H), 4,65 (q, *J* = 8,4 Гц, 2H), 4,36 (q, *J* = 6,8 Гц, 1H), 4,22 (dd, *J* = 8,7, 6,8 Гц, 1H), 3,61-3,44 (m, 32H), 3,06-2,86 (m, 6H), 1,96-1,90 (m, 4H), 1,87-1,77 (m, 3H), 1,72-1,67 (m, 4H), 1,58-1,57 (m, 3H), 1,47-1,34 (m, 5H), 0,83 (dd, *J* = 16,1, 6,8 Гц, 6H).

1.4 Схема 4

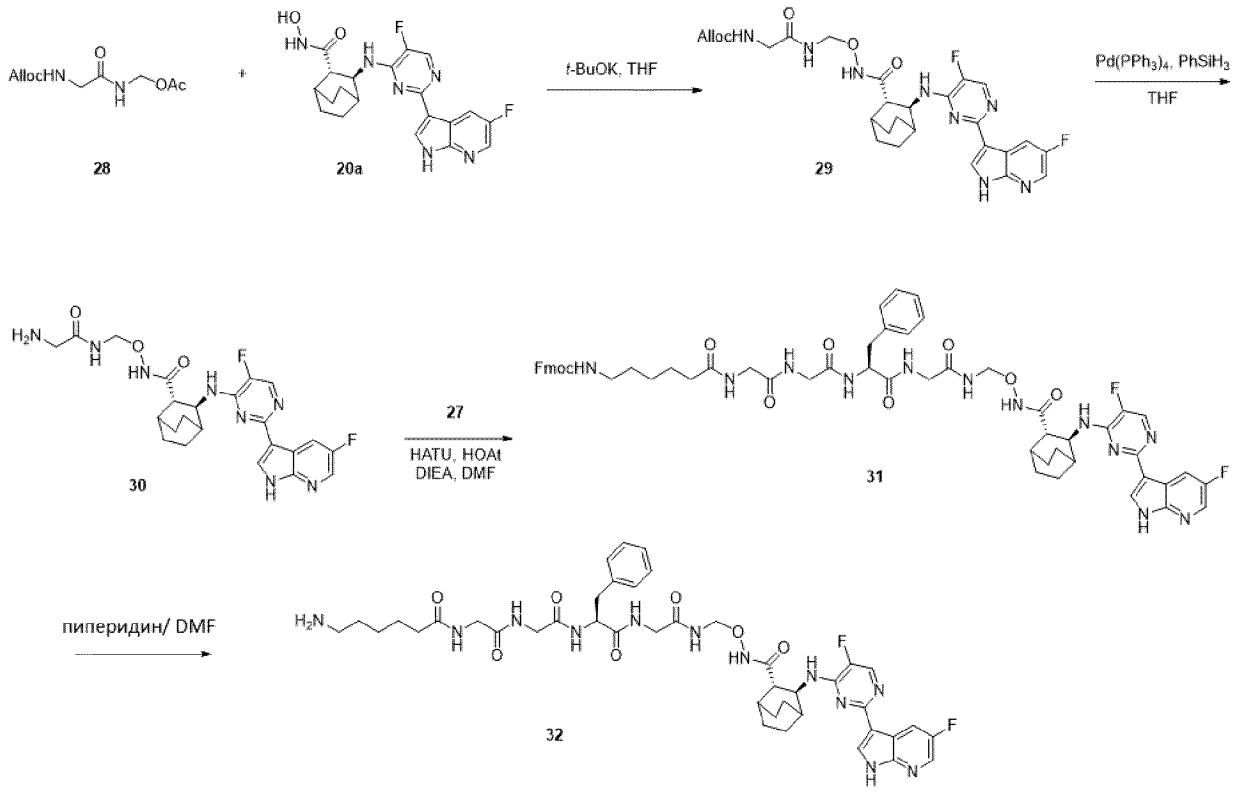


25 26 27

[00228] Соединение **27**: К раствору Fmoc-Cap-NHS (**25**, 91 мг, 0,2 ммоль) и Gly-Gly-Phe-OH (**26**, 56 мг, 0,2 ммоль) в DMF (1 мл), добавляли DIEA (диизопропилэтиламин) (70 мкл, 0,4 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин реакционную смесь наносили на колонку Teledyne ISCO C18 Aq 50 г и выполняли градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали,

чтобы получить Соединение **27** (93 мг, 76%) представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{34}H_{38}N_4O_7$, 614,3; обнаружено 615,3 (M+H).

1.5 Схема 5



[00229] Для получения (2-(((аллилокси)карбонил)амино)ацетамидо)метил ацетата (**30**) использовали следующую методику, описанную в *Tetrahedron* **2018**, *74*, 1951−1956.

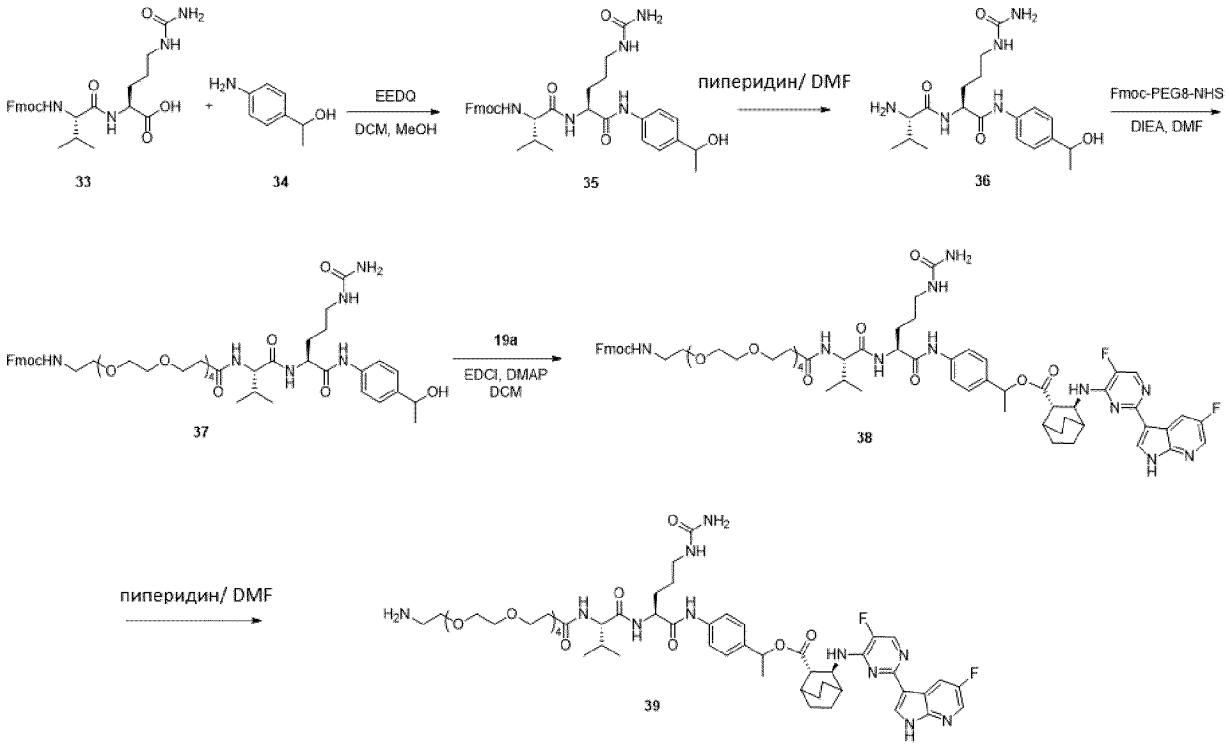
[00230] Соединение **29**: К раствору соединения **20a** (4,2 мг, 0,01 ммоль) и (2-(((аллилокси)карбонил)амино)ацетамидо)метил ацетата (**30**, 2,3 мг, 0,01 ммоль) в безводном THF (0,5 мл) при 0°C, добавляли *t*-BuOK (10 мкл, 0,01 ммоль, 1 M раствор в THF), и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали насыщенным водным раствором хлорида аммония (0,5 мл). Летучие компоненты удаляли под вакуумом, и остаток очищали на колонке Teledyne ISCO C18 Aq 30 г, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции, содержащие искомый продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **29** (3 мг, 51%) представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое

твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{27}H_{30}F_2N_8O_5$, 584,2; обнаружено 585,2 (M+H).

[00231] Соединение **31**: К раствору соединения **29** (3 мг, 0,005 ммоль) в THF (1 мл), добавляли $Pd(PPh_3)_4$ (0,6 мг, 0,0005 ммоль) и фенилсилан (1 мкл, 0,0076 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре, затем фильтровали через слой целита. Фильтрат концентрировали, и полученное Соединение **30** объединяли с Fmoc-Cap-Gly-Gly-Phe-OH (**27**, 4 мг, 0,0055 ммоль), HATU (3 мг, 0,0076 ммоль) и HOAt (0,7 мг, 0,005 ммоль) в THF (1 мл) и DMF (0,2 мл). К этой смеси добавляли DIEA (3 мкл, 0,015 ммоль) и полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Летучие компоненты удаляли при пониженном давлении, и остаток очищали на колонке Teledyne ISCO C18 Aq 30 г, используя градиентное элюирование смесью растворителей 5-95% $MeCN/H_2O$ (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **31** (2 мг, 37% после двух этапов) представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{57}H_{62}F_2N_{12}O_9$, 1096,5; обнаружено 1097,4 (M+H).

[00232] Соединение **32**: К раствору соединения **31** (6 мг, 0,005 ммоль) в DMF (0,6 мл), добавляли 5% раствор пиперидина в DMF (0,3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 45 мин при комнатной температуре, затем наносили на колонку Gemini 30 x150 мм и элюировали смесью растворителей 5-95% $MeCN/H_2O$ (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **32** (2,6 мг, 54%), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{42}H_{52}F_2N_{12}O_7$, 874,4; обнаружено 875,4 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 8,53-8,50 (m, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,19 (d, *J* = 7,0 Гц, 1H), 8,11 (d, *J* = 4,0 Гц, 1H), 7,25-7,20 (m, 4H), 7,18-7,15 (m, 1H), 4,75-4,71 (m, 2H), 4,50-4,48 (m, 1H), 3,74 (dt, *J* = 17,9, 9,5 Гц, 3H), 3,68-3,63 (m, 2H), 3,09-2,94 (m, 3H), 279-2,74 (m, 1H), 2,12 (t, *J* = 8,9 Гц, 2H), 1,92 (d, *J* = 5,4 Гц, 1H), 1,83-1,70 (m, 9H), 1,57 (t, *J* = 10,5 Гц, 1H), 1,48-1,45 (m, 3H), 1,34 (t, *J* = 8,8 Гц, 4H), 1,24 (dd, *J* = 14,2, 8,2 Гц, 2H).

1.6 Схема 6



[00233] Соединение **35**: К раствору Fmoc-Val-Cit-OH (**33**, 497 мг, 1,0 ммоль) и 1-(4-аминофенил)этан-1-ола (**34**, 274 мг, 2,0 ммоль) в DCM (4,5 мл) и MeOH (2 мл), добавляли EEDQ (2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин) (495 мг, 2,0 ммоль), и смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. После того как реакционная смесь становилась вязкой, в нее добавляли DCM (4,5 мл) и MeOH (2 мл). Полученную смесь перемешивали в течение ночи, затем удаляли растворители при пониженном давлении. Остаток последовательно промывали диэтиловым эфиром (5 мл), этилацетатом (5 мл) и диэтиловым эфиром (5 мл), затем сушии в глубоком вакууме, чтобы получить Соединение **35** (585 мг, 95%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{34}H_{41}N_5O_6$, 615,3; обнаружено 616,3 (M+H).

[00234] Соединение **36**: К раствору соединения **35** (150 мг, 0,244 ммоль) в DMF (1 мл), добавляли 5% раствор пиперидина в DMF (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 45 мин при комнатной температуре затем наносили на колонку Teledyne ISCO C18 Aq 50 г и элюировали смесью растворителей% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **36** (103 мг, 94%) в

форме уксунокислой соли. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{19}H_{31}N_5O_4$, 393,2; обнаружено 394,3.

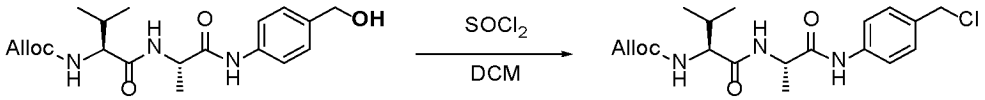
[00235] Соединение **37**: К раствору соединения **36** (45 мг, 0,1 ммоль) и сложного эфира Fmoc-амидо PEG8-NHS (91 мг, 0,12 ммоль) в DMF добавляли DIEA (диизопропилэтиламин) (21 мкл, 0,12 ммоль), реакционную смесь перемешивали в течение 40 мин при комнатной температуре. Смесь наносили на колонку Teledyne ISCO C18 Aq 50 г и элюировали смесью растворителей 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **37** (103 мг, 99%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{53}H_{78}N_6O_{15}$, 1038,6; обнаружено 1039,5 (M+H).

[00236] Соединение **38**: К раствору Соединения **37** (25 мг, 0,024 ммоль) в DCM (дихлорметане) (4 мл) добавляли VX-787 (**19a**, 11,5 мг, 0,028 ммоль), EDCI (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид) (7,0 мг, 0,036 ммоль) и DMAP (4-диметиламинопиридин) (1,2 мг, 0,009 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали, наносили на колонку Teledyne ISCO C18 Aq 50 г и элюировали смесью растворителей 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **38** (9,8 мг, 29%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{73}H_{95}F_2N_{11}O_{16}$, 1419,7; обнаружено 1420,7 (M+H).

[00237] Соединение **39**: К раствору соединения **38** (9,8 мг, 0,007 ммоль) в DMF (0,8 мл) добавляли 5% раствор пиперидина в DMF (0,5 мл), и реакционную смесь перемешивали в течение 40 мин при комнатной температуре. Продукт очищали на колонке Gemini 30 x 150 мм, используя градиентное элюирование смесью 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить смесь диастереомеров Соединения **39** (2,6 мг, 54%), представляющую собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{58}H_{85}F_2N_{11}O_{14}$, 1197,6; обнаружено 1198,6 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 9,95 (d, J = 9,9 Гц, 1H), 8,49-8,46 (m, 1H), 8,26-8,25 (m, 1H), 8,18-8,12 (m, 3H), 7,89 (d, J = 8,6 Гц, 1H), 7,61 (t, J = 7,7 Гц, 1H), 7,48 (dd, J = 12,1, 8,7 Гц, 2H), 7,20 (t, J = 9,3 Гц, 1H), 6,02 (dt, J = 1,2, 0,6 Гц, 1H), 5,77-5,73 (m, 1H), 5,41 (s, 2H), 4,75 (q, J = 6,8 Гц, 1H), 4,36-4,31 (m, 1H),

4,20 (m, 1H), 3,57 (m, 3H), 3,48 (m, 30H), 2,63 (t, *J* = 5,8 Гц, 4H), 2,37 (m, 4H), 1,97-1,89 (m, 4H), 1,72 (m, 6H), 1,59-1,48 (m, 4H), 1,35 (dd, *J* = 25,5, 6,5 Гц, 6H), 0,83 (ddd, *J* = 14,4, 6,7, 3,5 Гц, 6H).

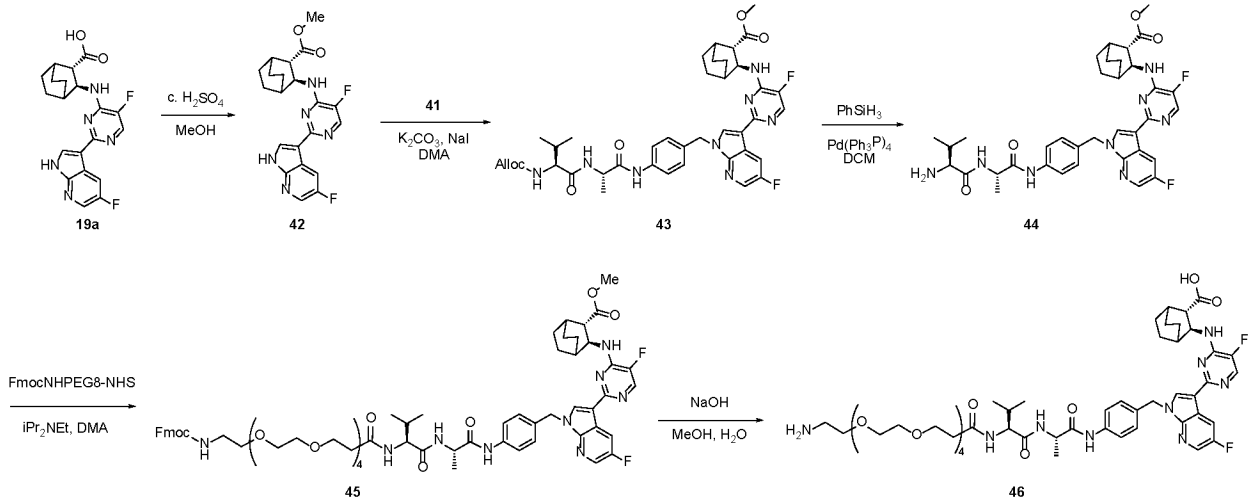
1.7 Схема 7



40 41

[00238] Соединение **41**: К суспензии Alloc-Val-Ala-PAB-OH (**40**, 50 мг, 0,132 ммоль) в безводном DCM (1,5 мл) в атмосфере аргона добавляли хлорид тионила (85 мкл, 1,17 ммоль). Полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 3,5 ч затем концентрировали в условиях вакуума. К остатку добавляли безводный DCM (1 мл), и смесь повторно концентрировали в условиях вакуума, чтобы получить Соединение **41,** представляющее собой белое твердое вещество, которое использовали без очистки. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{19}H_{26}ClN_3O_4$, 395,2; обнаружено 396,2 (M+H).

1.8 Схема 8



19a 42 43 44 45 46

[00239] Соединение **42**: Суспензию Соединения **19a** (30 мг, 0,075 ммоль) в безводном MeOH (0,5 мл) обрабатывали концентрированной H_2SO_4 (2 мкл) и перемешивали в течение 2 суток, за которые реакция не завершалась. Добавляли дополнительные порции MeOH (0,3 мл) и H_2SO_4 (10 мкл), реакционную смесь

нагревали до 50 °C в течение 2 суток, за которые реакционная смесь превращалась в раствор, и ЖХ-МС показывала полное расходование добавленной в начале кислоты. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и распределяли между этилацетатом (10 мл) и разбавленным водным раствором $NaHCO_3$ (5 мл). Водный слой экстрагировали двумя порциями этилацетата по 5 мл. Объединенные органические слои промывали рассолом (5 мл), затем сушили над Na_2SO_4, фильтровали, и концентрировали, чтобы получить Соединение **42** (31 мг, количественно) в виде светло-желтого твердого вещества, которое использовали без очистки. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{21}H_{21}F_2N_5O_2$, 413,2; обнаружено 414,5 (M+H).

[00240] Соединение **43**: К смеси Соединения **41** (4 мг, 0,0109 ммоль) и Соединения **42** (5 мг, 0,0121 ммоль) в безводном DMA (0,1 мл) добавили размолотые K_2CO_3 (5 мг, 0,0362 ммоль) и NaI (2 мг, 0,0133 ммоль). Полученную смес желтого цвета перемешивали при комнатной температуре в течение ночи затем хроматографировали на колонке C18Aq 5,5 г, используя для элюирования смесь 5-100% $MeCN/H_2O$ (оба компонента содержали 0,05% HOAc). Фракции, содержащии чистый продукт, объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **43** (4 мг, 48%) в виде рыхлого белого твердого вещества. MS рассчитан для $C_{40}H_{46}F_2N_8O_6$, 772,4; обнаружено 773,4 (M+H).

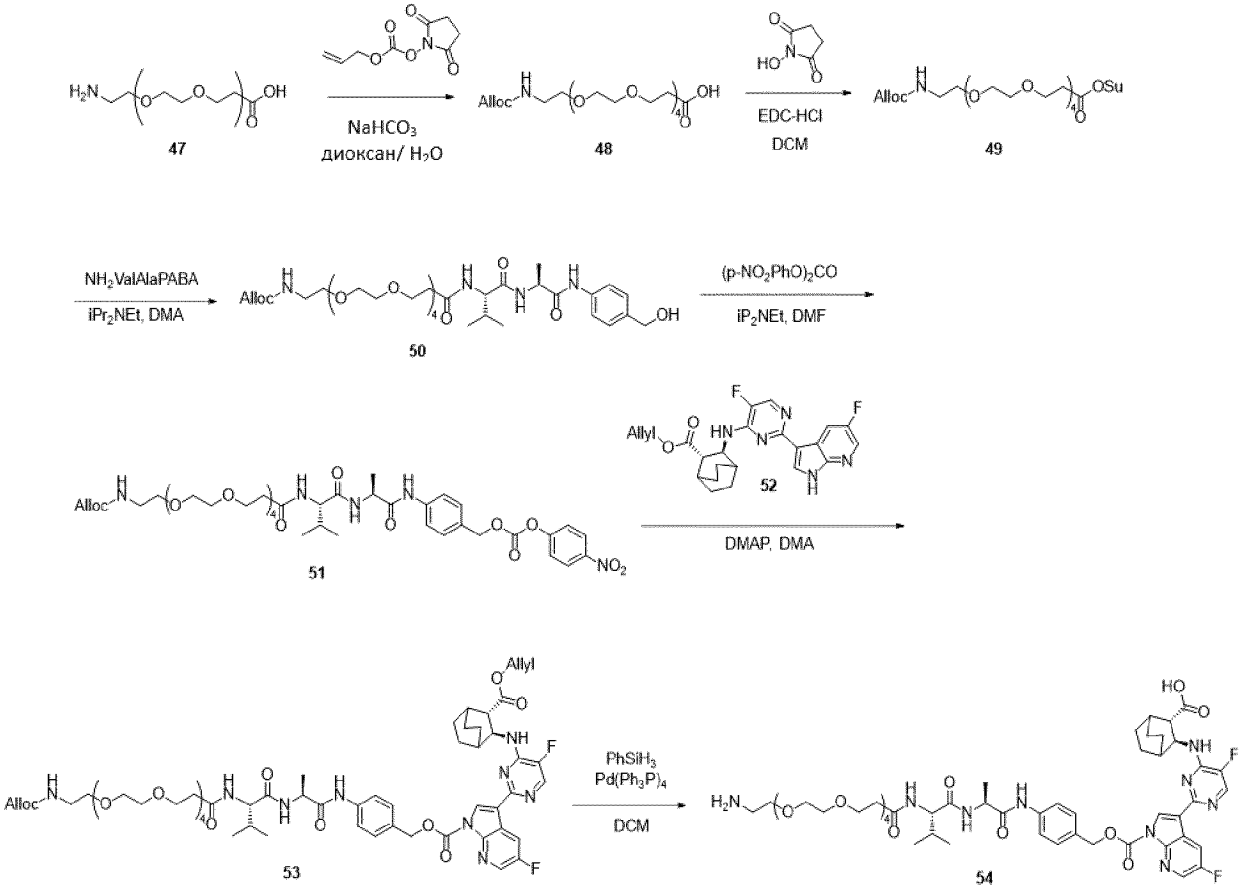
[00241] Соединение **45**: К раствору соединения **43** (14 мг, 0,0181 ммоль) в безводном DCM (1,5 мл) в атмосфере аргона добавляли $Pd(Ph_3P)_4$ (7 мг, 0,00606 ммоль) и $PhSiH_3$ (4,5 мкл, 0,0362 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 30 мин реакционную смесь концентрировали под вакуумом. Остаток растворяли в безводном DMA (200 мкл), и добавляли раствор сложного

эфира Fmoc-амидо-PEG8-NHS (20 мг, 0,063 ммоль) в DMA (400 мкл). К полученному раствору добавляли DIEA, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем хроматографировали на колонке C18Aq 5,5 г, используя для элюирования смесь MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% HOAc). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **45** (11 мг, 47% после 2 этапов) в виде рыхлого белого твердого вещества. MS рассчитан для $C_{70}H_{89}F_2N_9O_{15}$, 1333,6; обнаружено 1334,6 (M+H).

[00242] Соединение **46**: Смесь Соединения **45** (13 мг, 0,00974 ммоль) в 0,3 M растворе NaOH в 80% MeOH-H_2O (0,65 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Кислотность реакционной смеси доводили до pH 6, используя 0,2 N раствор HCl. Летучие компоненты удаляли при пониженном давлении, остаток растворяли в ДМСО и очищали методом хроматографирования на колонке C18Aq 5,5 г, используя для элюирования смесь растворителей 10-60% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% HOAc). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **46** (4 мг, 38%) в виде рыхлого белого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{54}H_{77}F_2N_9O_{13}$, 1097,6; обнаружено 1098,5 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d_6) δ 9,91 (s, 1H), 8,53 (dd, J = 9,5, 2,5 Гц, 1H), 8,32-8,30 (m, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,19 (br d, J = 6,5 Гц, 1H), 8,08 (d, J = 3,5 Гц, 1H), 7,88 (d, J = 8,5 Гц, 1H), 7,53 (d, J = 8,5 Гц, 2H), 7,41 (d, J = 8,5 Гц, 1H), 7,24 (d, J = 8,5 Гц, 2H), 5,49 (d, J = 15 Гц, 1H), 4,43 (d, J = 15 Гц, 1H), 4,72-4,68 (m, 1H), 4,38-4,30 (m, 1H), 4,22-4,11 (m, 2H), 3,58-3,44 (m, 28H, partially obscured by residual H_2O), 2,68 (t, J = 5,5 Гц, 2H), 2,61-2,57 (m, 2H), 2,46-2,33 (m, 2H) 2,02-1,86 (m, 4H), 1,80-1,74 (m, 1H), 1,73-1,64 (m, 2H), 1,60-1,51 (m, 2H), 1,50-1,42 (m, 1H), 1,41-

1,29 (m, 3H), 1,26 (d, *J* = 7 Гц, 3H), 1,24-1,19 (m, 1H), 0,84 (d, *J* = 7 Гц, 3H), 0,80 (d, *J* = 7 Гц, 3H).

1.9 Схема 9



[00243] Соединение **48:** К смеси амино-PEG8-кислоты (**47**, 53 мг, 0,120 ммоль) и $NaHCO_3$ (20 мг, 0,328 ммоль) в смеси THF / H_2O 1:1 (0,60 мл) добавляли раствор сложного эфира Alloc-NHS (32 мг, 0,161 ммоль) в THF (0,20 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем разбавляли этилацетатом (5 мл) и насыщенным водным раствором $NaHCO_3$ (2 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали трем порциями (по 3 мл) этилацетата. Объединенные органические слои сушили над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали под вакуумом, чтобы получить Соединение **48** в виде бесцевтного масла, которое использовали на следующей стадии без очистки. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{23}H_{43}NO_{12}$, 525,3; обнаружено 526,3 (M+H).

[00244] Соединение **49:** К раствору Соединения **48** (0,12 ммоль) и N-гидроксисукцинимида (16 мг, 0,14 ммоль) в безводном DCM (1 мл) добавляли EDC-

HCl (34 мг, 0,177 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч, после чего результаты ЖХ-МС показывали присутствие некоторого количества оставшейся кислоты. Добавляли дополнительные порции *N*-гидроксисукцинимида (5 мг, 0,043 ммоль) и EDC-HCl (4 мг, 0,021 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 1 ч реакционную смесь концентрировали под вакуумом. Остаток хроматографировали на колонке C18Aq 15,5 г, используя элюирование сместью 5-100% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% HOAc). Фракции, содержащие искомый продукт, объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **49** (55 мг, 73% после 2 этапов). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{27}H_{46}N_2O_{14}$, 622,3; обнаружено 623,3 (M+H).

[00245] Соединение **50:** В стеклянный флакон вместимостью 8 мл вносили Val-Ala-PAB-OH (10 мг, 0,0303 ммоль). Добавляли раствор Соединения **49** (25 мг, 0,0401) в безводном DMA (0,50 мл) и DIEA (7,5 мкл, 0,043 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2,25 ч, затем наносили на колонку C18Aq 15,5 г и элюировали смесью 0-100% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% HOAc). Фракции, содержащие искомый продукт, лиофилизировали, чтобы получить Соединение 50 (18 мг, 75%), представляющее собой рыхлое белое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{38}H_{64}N_4O_{14}$, 800,4; обнаружено 801,3 (M+H).

[00246] Соединение **51:** К раствору **50** (14 мг, 0,0175 ммоль) в безводном DMF (175 мкл) добавляли DIEA (4,6 мкл, 0,0264 ммоль), затем бис-PNP карбонат (10,6 мг, 0,0348 ммоль). Раствор ярко-желтого цвета перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (5 мл) и промывали насыщенным водным раствором $KHSO_4$ (3 мл). Водный слой экстрагировали двумя порциями (по 3 мл) этилацетата. Объединенные органические слои промывали смесью H_2O/рассола (1:1) (3 мл) затем рассолом (3 мл), после чего сушили над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали под вакуумом, чтобы получить бесцветное масло. Масло хроматографировали на SiO_2 4 г, используя для элюэлюирование этилацетатом/гексанами (0-100%) и получая Соединение **51** (13 мг, 76%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{45}H_{67}N_5O_{18}$, 965,5; обнаружено 966,3 (M+H).

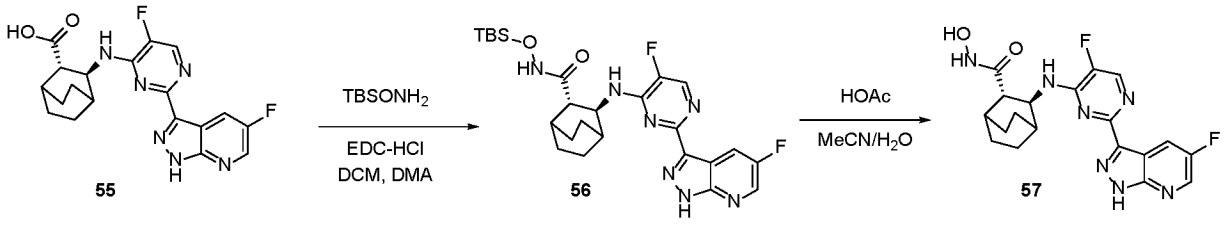
[00247] Соединение **52:** К смеси VX-787 (**19a**, 50 мг, 0,125 ммоль) в аллиловом спирте (1,5 мл) добавляли концентрированную H_2SO_4 (25 мкл, 0,45 ммоль). Полученную суспензию нагревали при температурре 65 □C в течение 6,5 ч, затем перемешивали н мешалке при комнатной температуре в течение ночи. Полученный раствор концентрировали в условиях вакуума до ~0,5 мл и обрабатывали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$, чтобы довести кислотность до pH 7-8. Смесь концентрировали в условиях вакуума, получая на выходе вязкое твердое вещество. После хроматографирования на колонке C18Aq 50 г с использованием для элюирования смеси 0-100% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% HOAc) и лиофилизации фракций, содержащих продукт, получали Соединение **52** (41 мг, 75%), представляющее собой желтое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{23}H_{23}F_2N_5O_2$, 439,18; обнаружено 440,1 (M+H).

[00248] Соединение **53**: Во флакон вместимостью 8 мл вносили Соединение **51** (13 мг, 0,0134 ммоль) и Соединение **52** (6,5 мг, 0,0148 ммоль). Добавляли безводный DMA (150 мкл), затем DMAP (2 мг, 0,0164 ммоль). Раствор ярко-желтого цвета перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч, затем хроматографировали на колонке C18Aq 15,5 г, используя для элюирования смесь 5-100% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% HOAc). Фракции, содержащие продукт, объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **53** (12 мг, 71%) представляющее собой рыхлое белое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{62}H_{85}F_2N_9O_{17}$, 1265; обнаружено 1266,6 (M+H).

[00249] Соединение **54:** К раствору Соединения **53** (9,4 мг, 0,0074 ммоль) в сухом DCM (0,74 мл) в атмосфере аргона добавляли $Pd(Ph_3P)_4$ (4,1 мг, 0,0036 ммоль) и $PhSiH_3$ (2,8 мкл, 0,022 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 30 мин реакционную смесь концентрировали. После очистки на препаративной колонке для ВЭЖХ Gemini 30 x 150 мм в условиях элюирования смесью 5-95% MeCN/H_2O (каждый растворитель содержал 10 мМ NH_4OAc) получали 2 мг (23%) Соединения **54** в виде уксуснокислой соли. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{55}H_{77}F_2N_9O_{15}$, 1141,6; обнаружено 1142,5 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц, CD_3OD) □ 8,98 (dd, *J* = 9,7, 2,9 Гц, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,36 (d, *J* = Гц, 1H), 8,02 (d, *J* = 3,4 Гц, 1H), 7,70 (d, *J* = 8,3 Гц, 2H), 7,56 (d, *J* = 8,3 Гц, 2H), 5,53 (d, *J* = 11,2 Гц, 1H),

5,49 (d, *J* = 12,2 Гц, 1H), 4,48 (q, *J* = 7,3 Гц, 1H), 4,21 (d, *J* = 6,3 Гц, 1H), 3,72-3,77 (m, 2H), 3,69-3,57 (m, 30H), 3,07 (t, *J* = 4,88 Гц, 2H), 2,56-2,58 (m, 2H), 2,50 (d, J = 6,3 Гц, 1H), 2,12-2,16 (m, 1H), 2,12 (br s, 1H). 2,03 (br s, 1H), 1,9 (s, 5H) 1,74-1,84 (m, 3H), 1,56-1,64 (m, 2H), 1,40-1,48 (m, 2H) наложение с 1,45 (d, *J* = 6,8 Гц, 3H), 1,00 (d, *J* = 6,4 Гц, 3H), 0,98 (d, *J* = 6,8 Гц, 3H).

1.10 Схема 10

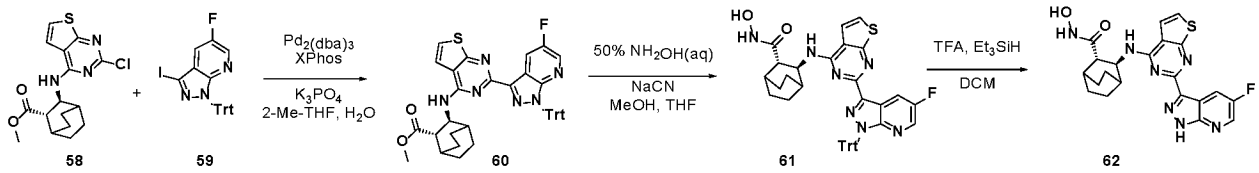


[00250] Для получения Соединения **55** использовали следующие методы, описанные в *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 261−265.

[00251] Соединение **57**: При температуре 0 °C к суспензии Соединения **55** (13 мг, 0,032 ммоль), O-[трет-бутил(диметил)силил]гидроксиламина ($TBSONH_2$, 8,3 мг, 0,056 ммоль), и DMAP (0,90 мг, 0,0074 ммоль) in DCM (650 □L) добавляли EDC-HCl (7,4 мг, 0,039 ммоль). Полученную белую суспензию подогревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. За это время реакция не завершалась.В реакционную смесь добавляли дополнительно 3 мг $TBSONH_2$ и дополнительно 2 мг EDC-HCl и продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 1 ч 20 мин, после чего данные ЖХ-МС указывали на завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом. К полученной смеси Соединения **56** и Соединения **57** добавляли MeCN (300 мкл, воду (300 мкл), и уксусную кислоту (60 мкл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока данные ЖХ-МС не указывали на полного превращения промежуточного Соединения **56** в желаемую гидроксамовую кислоту (**57**). Реакционную смесь концентрировали под вакуумом, чтобы удалить MeCN. Полученную суспензию растворяли в DMF и вносили на колонку C18Aq ISCO RediSep 15,5 г. После элюции в градиенте смеси, содержащей 5-40% $MeCN/H_2O$, в которой оба компонента содержали 0,05% HOAc, и лиофилизации чистых фракций получали Соединение **57** (5,0 мг, 36%), представлявшее собой белое хлопьевидное твердое вещество. МС

(ИЭР, пол. ион) рассчитан для $C_{19}H_{19}F_2N_7O_2$, 415,16; обнаружено, 416,2 (M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; CD_3OD) показал присутствие смеси трех ротамеров или таутомеров в соотношении 92/6/2 при 25 °C: δ 8,68 (dd, J = 2,1, 8,4, 1H), 8,52 (br s, 1H), 8,11 (d, J = 3,8 Гц, 0,94H), 8,08 (d, J = 3,9, 0,06H), 5,13 (d, J = 5,8, 0,06H), 5,05 (d, J = 6,9 Гц, 0,92H), 4,90 (d, J = 8,1, 0,02H), 2,76 (d, J = 7,8, 0,06H) 2,54 (d, J = 6,8 Гц, 0,94H), 2,05—1,94 (m, 3H), 1,92—1,81 (m, 3H), 1,74—1,67 (m, 1H), 1,66—1,60 (m, 1H), 1,56—1,48 (m, 2H).

1.11 Схема 11



[00252] Для получения Соединения **58** использовали методы, описанные в публикации *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *162,* 249−265.

[00253] Соединение **59** было получено по описанию в публикации *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 261−265.

[00254] Соединение **60:** Во флакон для микроволновой обработки вместимостью 10 мл, оснащенный магнитым мешальником, вносили Соединение **58** (22 мг, 0,0625 ммоль), Соединение **59** (50 мг, 0,0989 ммоль), трис(дибензилиденацетон)дипалладия (0) (3,0 мг, 0,00328 ммоль), и X-Phos (3,0 мг, 0,00629 ммоль). Флакон закрывали колпачком обжимным верхом и продували через него аргон в течение 5 мин. Добавляли 2-метил-THF (1 мл, после продувания через него аргона в течение 30 мин), затем раствор трикалий фсофата (40 мг, 0,188 ммоль) в воде (0,2 мл, после продувания через него аргона в течение 30 мин) добавляли, и начинали перемешивание. Баллон с аргоном отключали, и флакон помещали в масляную баню, предварительно нагретую до 100 □C. Реакционную смесь нагревали до указанной температуры в течение 3 ч, затем оставляли для охлаждения до комнатной температуры. Данные ЖХ-МС показали, что исходный материал (**58**) был полностью израсходован. Водный слой удаляли, и к оставшемуся органическому раствору добавляли Na_2SO_4. Раствор фильтровали через целит, промывая

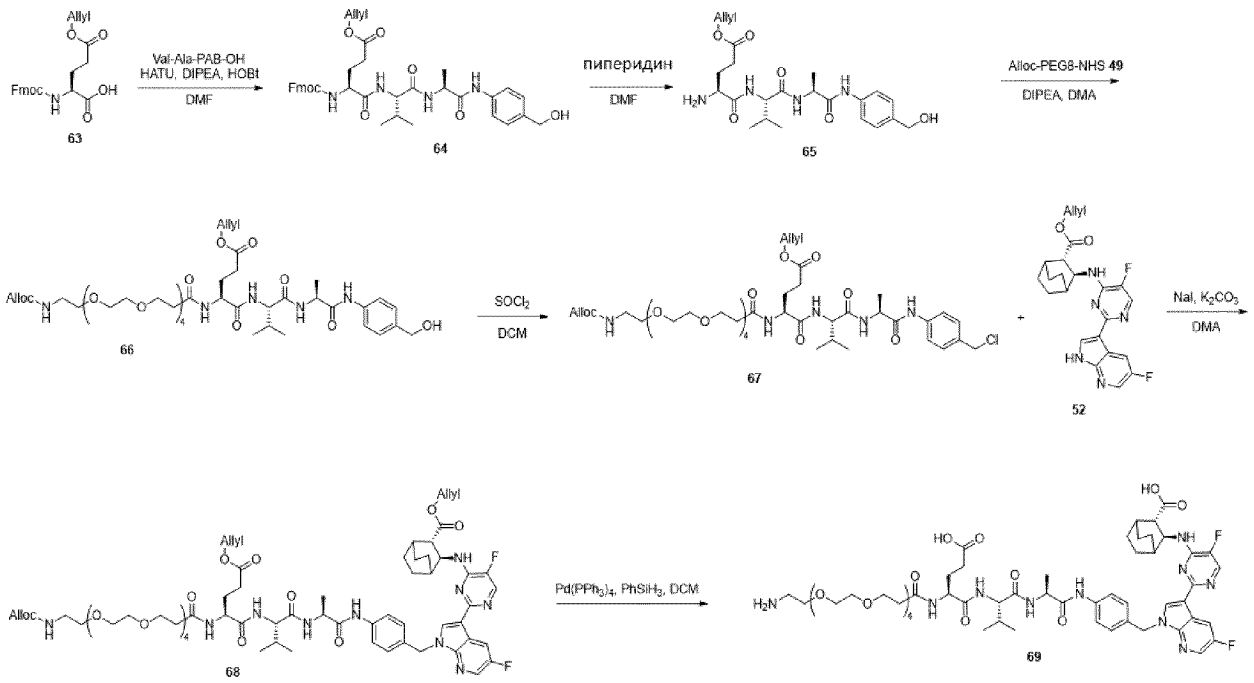
этилацетатом. Фильтрат концентрировали под вакуумом. Продукт хроматографировали на колонке Gold ISCO Redisep, заполненной 4 г SiO_2, используя для элюирования смесь 5-40% EtOAc-гексан, концентрацию которой поддерживали на уровне 40% до завершении элюции продукта. Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали, чтобы получить Соединение **60** (50 мг, 0,0720 ммоль, количественно) в виде желтой пены/стекловидного твердого вещества. Продукт использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{41}H_{35}FN_6O_2S$, 694,25; обнаружено, 695,60 (M+H).

[00255] Соединение **61**: К раствору Соединения **60** (15 мг, 0,0216 ммоль) в метаноле (300 мкл) добавляли 50% водный раствор гидроксиламина (300 мкл, 4,54 ммоль) и натрия цианид (1 мг, 0,0204 ммоль). К полученной суспензии добавляли THF (300 мкл). Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 4 суток, затем концентрировали для удаления органических веществ. Полученную суспензию растворяли в DMF и наносили на колонку C18Aq ISCO 15,5 г. Для элюирования использовали 50-90% MeCN/H_2O, содержащий 0,05% HOAc в качестве модификатора. Чистые фракции объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **61** (10,7 мг, 71%), представляющее собой белое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{40}H_{34}FN_7O_2S$, 695,25; обнаружено 696,20 (M+H).

[00256] Соединение **62:** К раствору Соединения **61** (10 мг, 0,0144 ммоль) в DCM (400 мкл) добавляли триэтилсилан (23 мкл, 0,144 ммоль) и трифторуксусную кислоту (22 мкл, 0,287 ммоль). Полученный желтый раствор перемешивали при комнатной температуре в течени 90 мин, затем концентрировали под вакуумом. К остатку добавляли 2 мл DCM и раствор повторно концентрировали. Обработку DCM дважды повторяли и получали белое твердое вещество. Продукт очищали посредством хроматографирования на колонке C18Aq ISCO RediSep 15,5 г, используя для элюирования смесь 10-45% MeCN/H_2O, каждый компонент которой содержал 0,05% HOAc. До завершения элюции продукта поддерживали концентрацию MeCN на уровне 45%. Фракции, содержащии чистый продукт, объединяли и лиофилизировали. Полученное твердое вещество суспендировали в MeCN, содержащем небольшое количество H_2O, замораживали и повторно

лиофилизировали, чтобы получить 5,0 мг (76%) Соединения **62** в виде рыхлого белого твердого вещества, степень чистоты которого по данным СВЭЖХ составляла >99%. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{21}H_{20}FN_7O_2S$, 453,14; обнаружено 454,81 (M+H). ^{1}H ЯМР (300 МГц, CD_3OD) показал присутствие смеси трех ротамеров или таутомеров в соотношении 45/40/15 при 25 °C: δ 8,92—8,80 (m, 1H), 8,58—8,52 (m, 1H), 7,73 (d, *J* = 6,0, 0,55H), 7,68 (d, *J* = 6,0, 0,45H) 7,47 (d, *J* = 6,4, 0,45H), 7,45 (d, *J* = 6,0, 0,40H), 7,43 (d, *J* = 6,4, 0,15H), 5,27 (br d, *J* = 5,9, 0,40H), 5,17 (br d, *J* = 7,3, 0,15H), 5,11 (br d, *J* = 6,7, 0,45H), 2,83 (br d, J = 7,8, 0,55H), 2,63 (br d, J = 6,4, 0,45h), 2,29—1,97 (m, 4H), 1,97—1,86 (m, 2H), 1,85—1,40 (m, 4H).

1.12 Схема 12



[00257] Соединение **64**: Fmoc-Glu(OAllyl)-OH **63** (3,5 г, 8,548 ммоль) объединяли с HATU (3,25 г, 8,548 ммоль) и HOBt (1,16 г, 8,548 ммоль) в DMF (37 мл). К этой смеси добавляли DIEA (3 мл, 17,097 ммоль). После перемешивания полученного раствора в течение 5 мин при комнатной температуре добавляли Val-Ala-PAB-OH (3 г, 10,258 ммоль), и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли EtOAc, промывали холодной деионизированной (ДИ) водой и затем рассолом. Органический сой сушили над $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали. Остаточное вязкое масло обрабатывали ультразвуком в присутствии Et_2O чтобы вызвать осаждение продукта. Смесь

перемешивали в течение ночи и фильтровали, чтобы получить Соединение **64** в виде бледного желтого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{38}H_{44}N_4O_8$, 684,32; обнаружено 685,35 (M+H).

[00258] Соединение **65**: Во флаконе вместимостью 20 мл растворяли Соединение **64** (266 мг, 0,388 ммоль) в 5% растворе пиперидина в DMF (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 75 мин и очищали на колонке C18 Aq 50 г при использовании для элюирования смеси 0-30% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали, и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **65** (145 мг, выход 81%), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{23}H_{34}N_4O_6$, 462,25; обнаружено 463,2 (M+H).

[00259] Соединение **66**: К раствору Соединения **65** (145 мг, 0,313 ммоль) и сложному эфиру Alloc-амидо-PEG8-NHS **49** (150 мг, 0,241 ммоль) в безводном DMA (5 мл) добавляли DIEA (63 мкл, 0,361 ммоль), и полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали на колонке C18 Aq 50 г и элюировали смесью 0-80% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали, и лиофилизировали чтобы получить Соединение **66** (130 мг, выход 56%), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{46}H_{75}N_5O_{17}$, 969,52; обнаружено 970,69 (M+H).

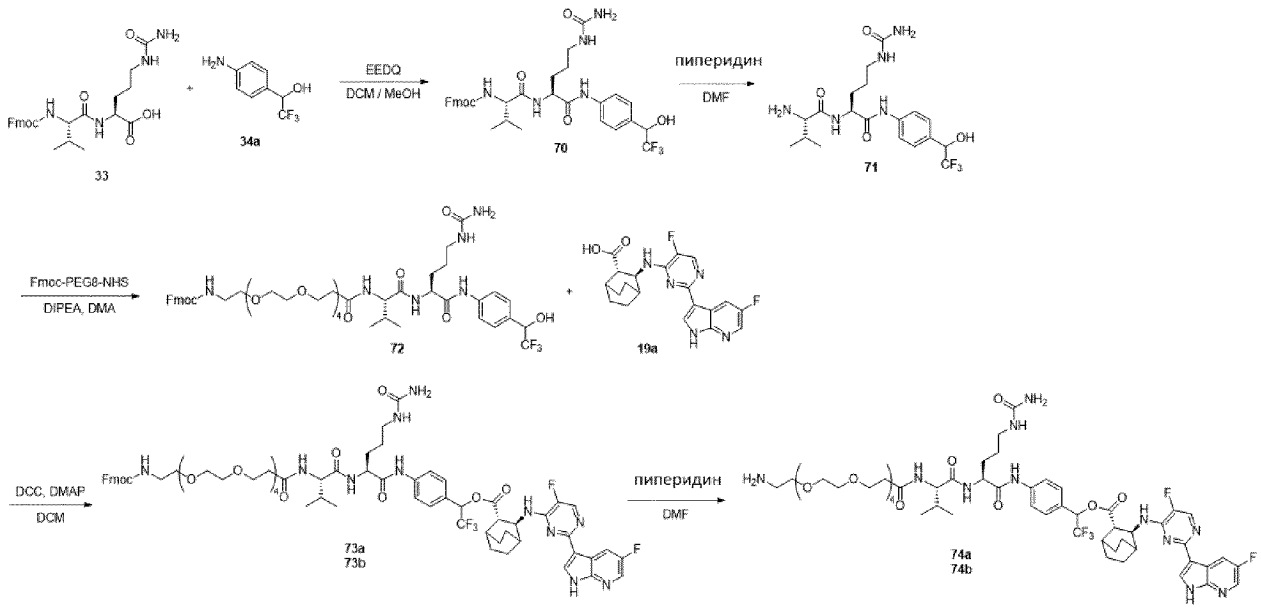
[00260] Соединение **67**: К раствору Соединения **66** (130 мг, 0,134 ммоль) в DCM (2,5 мл) добавляли хлорид тионила (29 мкл, 0,402 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Неочищенную реакционную смесь концентрировали и очищали на колонке GOLD с SiO_2 4 г посредством элюирования смесью MeOH в концентрации 0-20% в DCM, чтобы получить Соединение **67** (76 мг, выход 57%) в виде бесцветгного геля. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{46}H_{74}ClN_5O_{16}$, 987,48; обнаружено 989,46 (M+H).

[00261] Соединение **68**: Сложный аллиловый эфир соединения VX-787 **52** (30 мг, 0,068 ммоль), Соединение **67** (74,2 мг, 0,075 ммоль), K_2CO_3 (28,3 мг, 0,205 ммоль) и натрия иодид (8,9 мг, 0,075 ммоль) объединяли в DMA (1,5 мл). Полученный раствор

перемешивали при 50 □C в течение 4 часов. Неочищенную реакционную смесь наносили на колонку C18 Aq 15,5 г и элюировали смесью 0-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **68** (60 мг, выход 63%) представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{69}H_{96}F_2N_{10}O_{18}$, 1390,69; обнаружено 1391,5 (M+H).

[00262] Соединение **69**: К раствору соединения **68** (60 мг, 0,043 ммоль) в безводном DCM (4 мл) в атмосфере аргона добавляли $Pd(Ph_3P)_4$ (24,9 мг, 0,022 ммоль) и $PhSiH_3$ (16 мкл, 0,129 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Неочищенную реакционную смесь наносили на колонку C18 Aq 15,5 г и элюировали смесью 0-60% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали, и лиофилизировали чтобы получить указанное в названии соединение **697** (25 мг, 47% выход). Стадию очистки повторяли для лиофилизированного твердого вещества, которое наносили на колонку для препаративной ВЭЖХ Gemini 30 x 150 мм; для элюирования использовали смесь 0-60% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH), чтобы получить Соединение **69** (11,2 мг, 21%) представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{59}H_{84}F_2N_{10}O_{16}$, 1226,60; обнаружено 1227,5 (M+H). ^{1}H-ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 9,98 (s, 1H), 8,51 (dd, *J* = 9,5, 3,0 Гц, 1H), 8,39 (d, *J* = 6,5 Гц, 1H), 8,33 (d, *J* = 1,0 Гц, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,20 (d, *J* = 6,5 Гц, 1H), 8,11 (d, *J* = 4,0 Гц, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,5 Гц, 1H), 7,55 (d, *J* = 8,5 Гц, 2H), 7,50 (d, *J* = 7,0 Гц, 1H), 7,26 (d, *J* = 8,5 Гц, 2H), 5,48 (s, 2H), 4,69 (t, *J* = 5,5 Гц, 1H), 4,35-4,32 (m, 1H), 4,24 (q, *J* = 6,5 Гц, 1H), 4,14 (dd, *J* = 8,0, 6,5 Гц, 1H), 3,62-3,54 (m, 6H), 3,48-3,45 (m, 30H), 2,77 (t, *J* = 5,5 Гц, 2H), 2,74-2,73 (m, 1H), 2,42-2,35 (m, 1H), 2,34-2,28 (m, 1H), 2,18-2,07 (m, 2H), 2,00 (s, 1H), 1,91-1,88 (m, 1H), 1,84-1,69 (m, 4H), 1,62-1,32 (m, 5H), 1,28 (d, *J* = 7,0 Гц, 3H), 0,82 (dd, *J* = 19,0, 6,5 Гц, 6H).

1.13 Схема 13



[00263] Соединение **70**: Метод, использованный для получения Соединения **35,** в пересчете на массу продукта 100 мг, использовали для получения Соединения **70** из Fmoc-Val-Cit-OH **33** и 1-(4-аминофенил)-2,2,2-трифторэтан-1-ола **34a**. Было выделено 105 мг продукта (выход 78%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{34}H_{38}F_3N_5O_6$, 669,28; обнаружено 670,38 (M+H).

[00264] Соединение **71**: Метод, использованный для получения Соединения **36,** в пересчете на массу продукта 100 мг, использовали для получения Соединения **71** из Соединения **70.** Было выделено 55 мг продукта (выход 82%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{19}H_{28}F_3N_5O_4$, 447,21; обнаружено 448,24 (M+H).

[00265] Соединение **72**: Метод, использованный для получения Соединения **37,** в пересчете на массу продукта 125 мг, использовали для получения Соединения **72** из Соединения **71.** Было выделено 159 мг продукта (выход 89%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{53}H_{75}F_3N_6O_{15}$, 1092,52; обнаружено 1093,63 (M+H).

[00266] Соединение **73**: К раствору Соединения **72** (151 мг, 0,138 ммоль) в DCM добавляли VX-787 **19a** (50 мг, 0,125 ммоль) и DMAP (3,1 мг, 0,025 ммоль). По каплям добавляли 1 М раствор DCC в DCM (0,125 мл, 0,188 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали и очищали на колонке C18 Aq 100 г, используя для элюирования

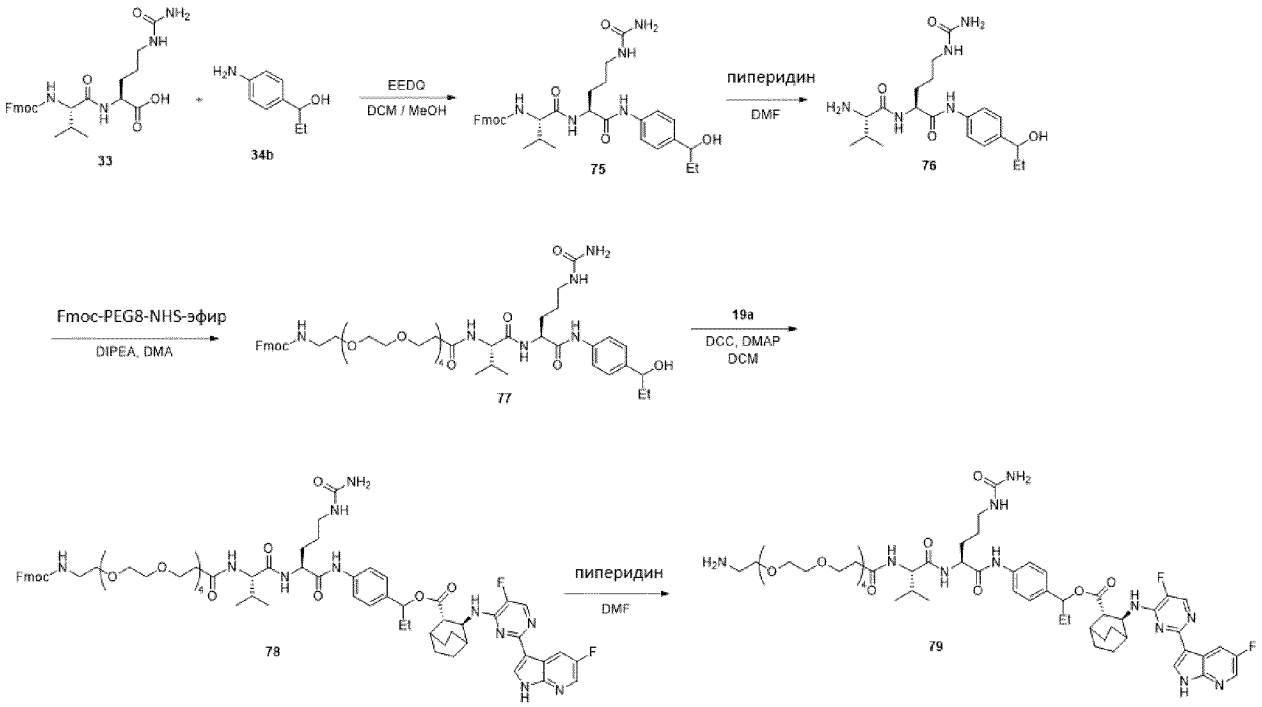
смесь 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH в качестве модификатора). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали чтобы получить Соединение **73** (102 мг, 50%) в виде рыхлого твердого вещества серовато-желтоватого цвета. Выделенный продукт дополнительно очищали на оборудовании Teledyne ISCO с колонкой Gemini 30x150 мм, используя для элюирования смесь 0-90% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH в качестве модификатора). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить два диастереомерно чистых соединения **73a** (25 мг, 25%, продукт, элюирующий первым) и **73b** (30 мг, 29%, продукт, элюирующий позднее) в виде рыхлого твердого вещества серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{73}H_{92}F_5N_{11}O_{16}$, 1473,66; обнаружено 1474,7 (M+H).

[00267] Соединение **74a**: Метод, использованный для получения Соединения **39,** в пересчете на массу продукта 25 мг, использовали для получения Соединения **74a** из Соединения **73a.** Было 16,0 мг продукта (выход 75%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{58}H_{82}F_5N_{11}O_{14}$, 1251,60; обнаружено 1252,5 (M+H). ^{1}H-ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 10,09 (s, 1H), 8,48 (dd, *J* = 10,0 Гц, 3,0 Гц, 1H), 8,26-8,24 (m, 1H), 8,18-8,17 (m, 2H), 8,14-8,13 (m, 1H), 7,86 (d, *J* = 8,0 Гц, 1H), 7,70 (d, *J* = 7,5 Гц, 1H), 7,59 (d, *J* = 8,5 Гц, 2H), 7,38 (d, *J* = 8,5 Гц, 2H), 6,34 (q, *J* = 7,0 Гц, 1H), 6,00-5,96 (m, 1H), 5,40 (s, 2H), 4,82-4,78 (m, 1H), 4,38-4,34 (m, 2H), 4,22 (t, *J* = 7,0 Гц, 1H), 3,61-3,57 (m, 4H), 3,50-3,47 (m, 30H), 3,37-3,35 (m, 2H), 3,15 (d, *J* = 7,5 Гц, 1H), 3,04-2,92 (m, 2H), 2,41-2,34 (m, 1H), 2,10-2,07 (m, 1H), 1,99-1,94 (m, 1H), 1,94-1,90 (m, 1H), 1,86-1,72 (m, 4H), 1,72-1,50 (m, 3H), 1,49-1,25 (m, 5H), 0,85 (dd, *J* = 15,5, 6,5 Гц, 6H).

[00268] Соединение **74b**: Метод, использованный для получения Соединения **39,** в пересчете на массу продукта 30 мг, использовали для получения Соединения **74b** из Соединения **73b.** Было выделено 17,3 мг продукта (выход 68%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{58}H_{82}F_5N_{11}O_{14}$, 1251,60; обнаружено 1252,5 (M+H). ^{1}H-ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 10,06 (s, 1H), 8,44 (dd, *J* = 10,0 Гц, 2,5 Гц, 1H), 8,26-8,24 (m, 1H), 8,18-8,12 (m, 3H), 7,86 (d, *J* = 8,0 Гц, 1H), 7,67 (d, *J* = 6,5 Гц, 1H), 7,54 (d, *J* = 8,5 Гц, 2H), 7,38 (d, *J* = 8,5 Гц, 2H), 6,40 (q, *J* = 7,0 Гц, 1H), 6,00-5,97 (m, 1H), 5,40 (s, 2H), 4,76-4,73 (m, 1H), 4,37-4,33 (m, 2H), 4,22 (t, *J* = 7,0 Гц, 1H), 3,62-3,55 (m, 4H), 3,53-

3,46 (m, 30H), 3,37-3,35 (m, 2H), 3,16 (d, *J* = 7,5 Гц, 1H), 3,04-2,91 (m, 2H), 2,39-2,37 (m, 1H), 2,12-2,07 (m, 1H), 1,99-1,93 (m, 1H), 1,87-1,78 (m, 5H), 1,71-1,63 (m, 3H), 1,61-1,33 (m, 5H), 0,83 (dd, *J* = 14,5, 6,5 Гц, 6H).

1.14 Схема 14



[00269] Соединение **75**: Метод, использованный для получения Соединения **35,** в пересчете на массу продукта 500 мг, использовали для получения Соединения **75** из Fmoc-Val-Cit-OH **33** и 1-(4-аминофенил)пропан-1-ола **34b.** Было выделено 489 мг продукта (выход 77%) в виде светло-желтого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{35}H_{43}N_5O_6$, 629,32; обнаружено 630,23 (M+H).

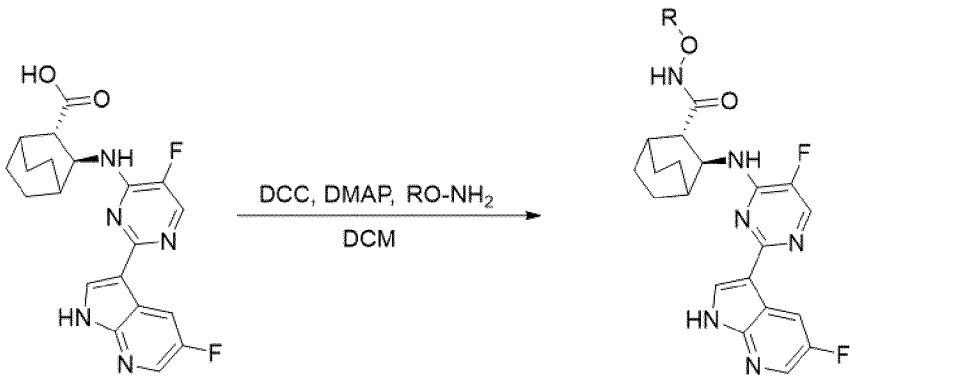
[00270] Соединение **76**: Метод, использованный для получения Соединения **36,** в пересчете на массу продукта 400 мг, использовали для получения Соединения **76** из Соединения **75.** Было выделено 147 мг продукта (выход 52%) в виде рыхлого твердого вещества серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{20}H_{33}N_5O_4$, 407,25; обнаружено 408,20 (M+H).

[00271] Соединение **77**: Метод, использованный для получения Соединения **37,** в пересчете на массу продукта 211 мг, использовали для получения Соединения **77** из Соединения **76.** Было выделено 217 мг продукта (выход 74%) в виде рыхлого твердого вещества серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{54}H_{80}N_6O_{15}$, 1052,57; обнаружено 1053,74 (M+H).

[00272] Соединение **78**: Метод, использованный для получения Соединения **73,** в пересчете на массу продукта 75 мг, использовали для получения Соединения **78** из Соединения **77.** Было выделено 112,5 мг продукта (выход 38%) в виде смеси диастереомеров. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{74}H_{97}F_2N_{11}O_{16}$, 1433,71; обнаружено 1435,56 (M+H).

[00273] Соединение **79**: Метод, использованный для получения Соединения **39,** в пересчете на массу продукта 25 мг, использовали для получения Соединения **79** из Соединения **78.** Было выделено 16,0 мг продукта (выход 75%). МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{59}H_{87}F_2N_{11}O_{14}$, 1211,64; обнаружено 1212,6 (M+H). ^{1}H-ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 9,95 (s, 1H), 8,49 (dd, *J* = 9,5 Гц, 2,5 Гц, 1H), 8,33-8,24 (m, 1H), 8,21-8,15 (m, 1H), 8,14-8,09 (m, 1H), 7,86 (d, *J* = 8,0 Гц, 1H), 7,65-7,59 (m, 1H), 7,47 (d, *J* = 8,0 Гц, 2H), 7,19 (d, *J* = 8,0 Гц, 2H), 7,15 (d, *J* = 8,5 Гц, 1H), 6,02-5,96 (m, 1H), 5,59-5,51 (m, 1H), 5,44 (d, *J* = 10,0 Гц, 1H), 5,39 (s, 2H), 4,84-4,76 (m, 1H), 4,37-4,31 (m, 2H), 4,21 (t, *J* = 7,0 Гц, 1H), 3,61-3,56 (m, 4H), 3,52-3,45 (m, 30H), 3,01-2,90 (m, 2H), 2,65-2,60 (m, 2H), 2,41-2,34 (m, 2H), 2,09-1,88 (m, 4H), 1,85-1,71 (m, 4H), 1,56-1,21 (m, 8H), 0,83 (dd, *J* = 14,5, 7,0 Гц, 6H), 0,73 (t, *J* = 7,5 Гц, 2H), 0,68 (t, *J* = 7,5 Гц, 1H).

1.15 Схема 15



19a

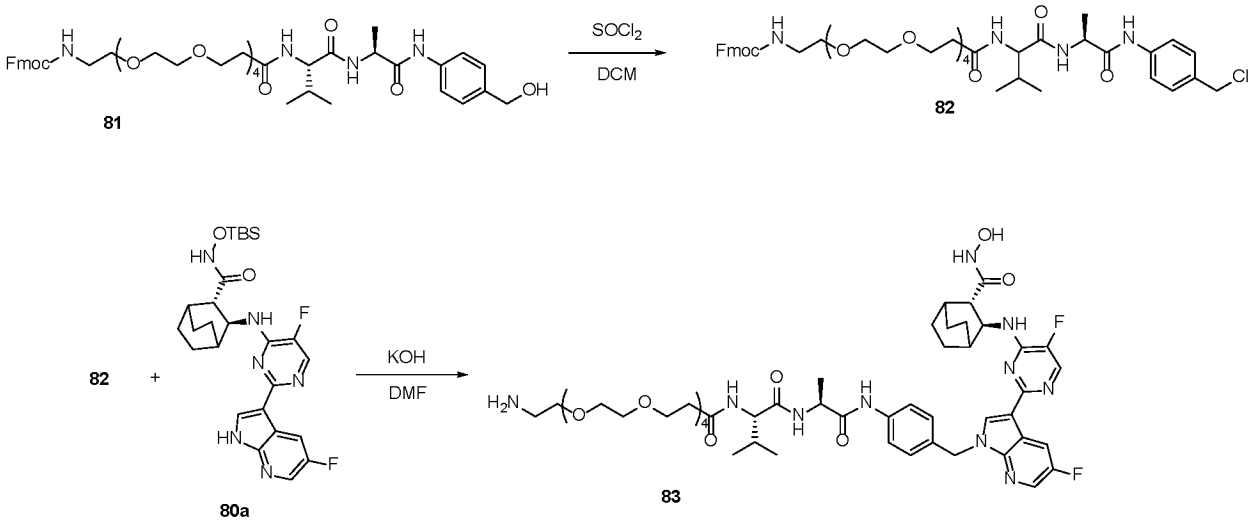
R	Защищенная гидроксамовая кислота
TBS	**80a**
THP	**80b**

[00274] Общая методика получения производных защищенной гидроксамовой кислоты из соотетствующих карбоновых кислот: Соединение **80a**: 1 М раствор DCC в дихлорметане (250 мкл, 0,376 ммоль) при комнатной температуре добавляли по каплям к суспензии, содержащей VX-787 (100 мг, 0,250 ммоль), *O*-(*трет-бутил*диметилсилил)гидроксиламин ($TBSONH_2$, 44,3 мг, 0,300 ммоль) и DMAP

(3 мг, 0,025 ммоль) в безводном дихлорметане (8 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Летучие компоненты удаляли под вакуумом и добавляли этилацетат. Раствор охладили до 0 □C и отфильтровали осадок. Фильтрат концентрировали и очищали на колонке C18 Aq 50 г, используя элюирование смесью MeCN/H_2O от 0% до 100% (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **80** (62 мг, 39%) в виде рыхлого серовато-желтоватого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{26}H_{34}F_2N_6O_2Si$, 528,25; обнаружено 529,80 (M+H).

[00275] Соединение **80b**: Общую методику, использованную для получения соединения **80a,** в пересчете на массу продукта 100 мг, использовали для получения Соединения **80b** из *O*-(тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)гидроксиламина ($THPONH_2$). Было выделено 111 мг (выход 89%) продукта в виде рыхлого твердого вещества серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{25}H_{28}F_2N_6O_3$, 498,22; обнаружено 499,75 (M+H).

1.16 Схема 16

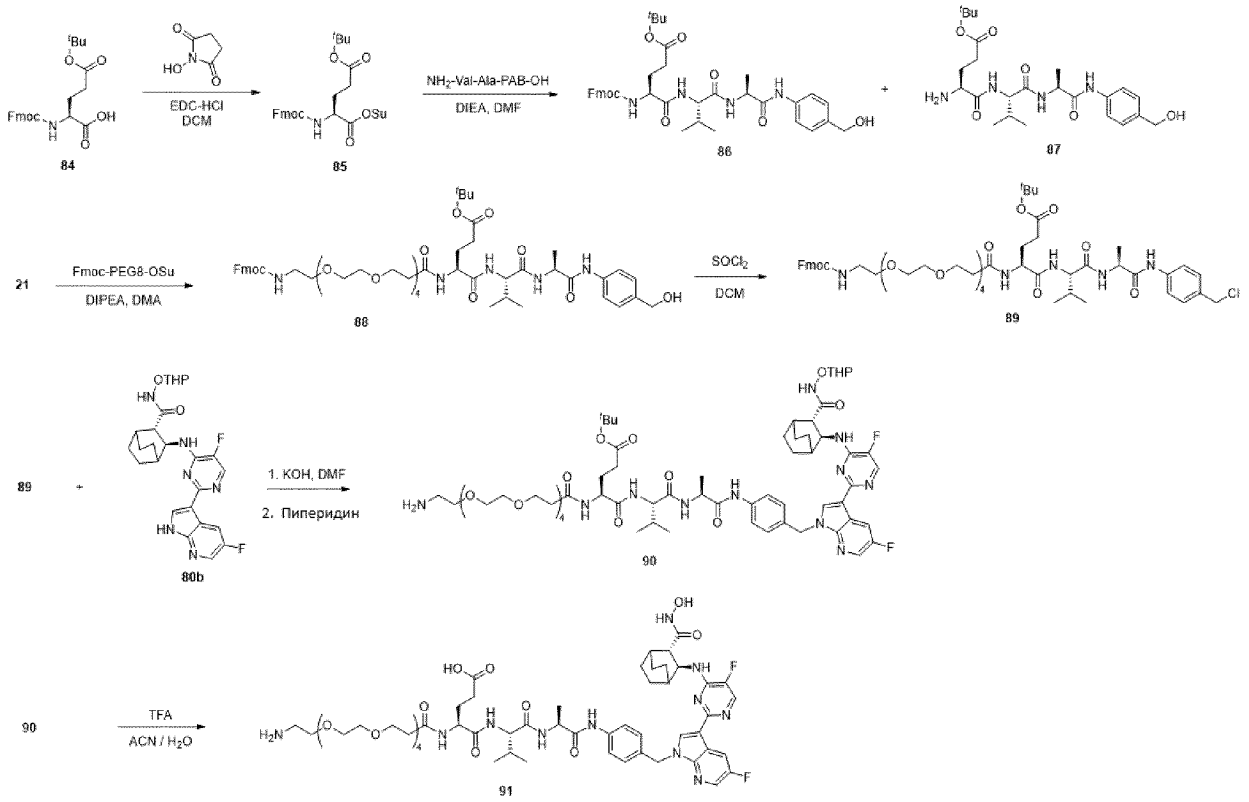


[00276] Соединение **82**: К раствору соединения **81** (91,5 мг, 0,097 ммоль) в DCM (1,9 мл) добавляли хлорид тионила (21 мкл, 0,292 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем концентрировали под вакуумом. Безводный DCM (2 мл) добавляли к остатку и смесь повторно

концентрировали в условиях вакуума, чтобы получить Соединение **82** (92 мг, 99% выход) в виде бледно-желтого геля, который использовали на следующей стадии без очистки. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{49}H_{69}ClN_4O_{13}$, 956,45; обнаружено 958,38 (M+H).

[00277] Соединение **83**: К раствору **80a** (30 мг, 0,057 ммоль) в DMF (1,1 мл) добавляли KOH (3,8 мг, 0,068 ммоль). После перемешивания полученного раствора при 0□C в течение 30 мин добавляли Соединение **82** (59,8 мг, 0,062 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 90 мин, пока данные ЖХ-МС не указывали на полное удаление защитных групп с алкилированного соединения. Неочищенную реакционную смесь очищали на клонке C18 Aq 50 г с использованием элюирования смесью 0-65% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали, и лиофилизировали чтобы получить Соединение **83** представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. Стадию очистки повторяли в отношении лиофилизированного твердого вещества, используя колонку для препаративной ВЭЖХ Gemini 30 x 150 мм и выполняя элюирование смесью 0-50% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH) , чтобы получить Соединение **83** (5,9 мг, 9%) в виде бесцветного геля. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{54}H_{78}F_2N_{10}O_{13}$, 1112,57; обнаружено 1113,5 (M+H). ^{1}H-ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 9,98-9,97 (m, 1H), 8,83-8,81 (m, 1H), 8,57-8,53 (m, 1H), 8,52-8,49 (m, 1H), 8,26-8,25 (m, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,08 (d, J = 4,0 Гц, 1H), 8,07-8,01 (m, 1H), 7,67-7,63 (m, 1H), 7,54-7,52 (m, 2H), 7,11-7,10 (m, 2H), 4,89-4,81 (m, 1H), 4,70-4,63 (m, 1H), 4,59-4,53 (m, 1H), 4,31-4,27 (m, 1H), 4,17-4,10 (m, 1H), 4,03-3,99 (m, 1H), 3,65-3,55 (m, 6 H), 3,53-3,34 (m, 33H), 2,63-2,62 (m, 2H), 2,35-2,32 (m, 2H), 2,03-1,92 (m, 3H), 1,48-1,22 (m, 14H), 0,85-0,82 (m, 6H).

1.17 Схема 17



[00278] Соединение **85**: К раствору Fmoc-Glu(O^{t}Bu)-OH **84** (1 г, 2,35 ммоль) и N-гидроксисукцинимида (324,6 мг, 2,82 ммоль) в безводном DCM (20 мл) добавляли EDC-HCl (675,8 мг, 0,177 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 19 часов, после чего данные ЖХ-МС указывали на присутствие небольшого остаточного количества кислоты. Добавляли дополнительные порции N-гидроксисукцинимида (324,6 мг, 2,82 ммоль) и EDC-HCl (675,8 мг, 0,177 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 3 ч реакционную смесь концентрировали под вакуумом. Остаток хроматографироваи на колонке GOLD с SiO_2 40 г, при использовании для элюирования 0-10% MeOH в DCM. Фракции, содержащие искомый продукт, объединяли и концентрировали, чтобы получить Соединение **85** (1,01 г, 82%) в виде серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{28}H_{30}N_2O_8$, 522,2; обнаружено 545,30 (M+Na).

[00279] Соединение **86** и **87**: К раствору соединения **85** (1 г, 1,914 ммоль) и Val-Ala-PAB-OH (673,7 мг, 2,296 ммоль) в безводном DMF (8,3 мл) добавляли DIEA

(0,67 мл, 3,827 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов и очищали на колонке C18 Aq 100 г при использовании для элюирования смеси 0-80% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% HOAc). Фракции, содержащие искомые продукты, лиофилизировали, чтобы получить Соединение **86** (262,5 мг, 20%) и Соединение **87** (441 мг, 48%), представляющее собой рыхлое белое твердое вещество. Соединение **86**: МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{39}H_{48}N_4O_8$, 700,35; обнаружено 701,53 (M+H). Соединение **87**: МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{24}H_{38}N_4O_6$, 478,28; обнаружено 479,43 (M+H).

[00280] Соединение **88**: К раствору Соединения **87** (119,4 мг, 0,249 ммоль) и сложного эфира Fmoc-amido-PEG8-NHS (146 мг, 0,192 ммоль) в безводном DMA (4 мл) добавляли DIEA (50 мкл, 0,288 ммоль), и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Неочищенную реакционную смесь очищали на колонке C18 Aq 150 г, с использованием для элюирования смеси 0-80% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли, замораживали, и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **88** (149 мг, выход 72%) представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{58}H_{85}N_5O_{17}$, 1123,59; обнаружено 1124,69 (M+H).

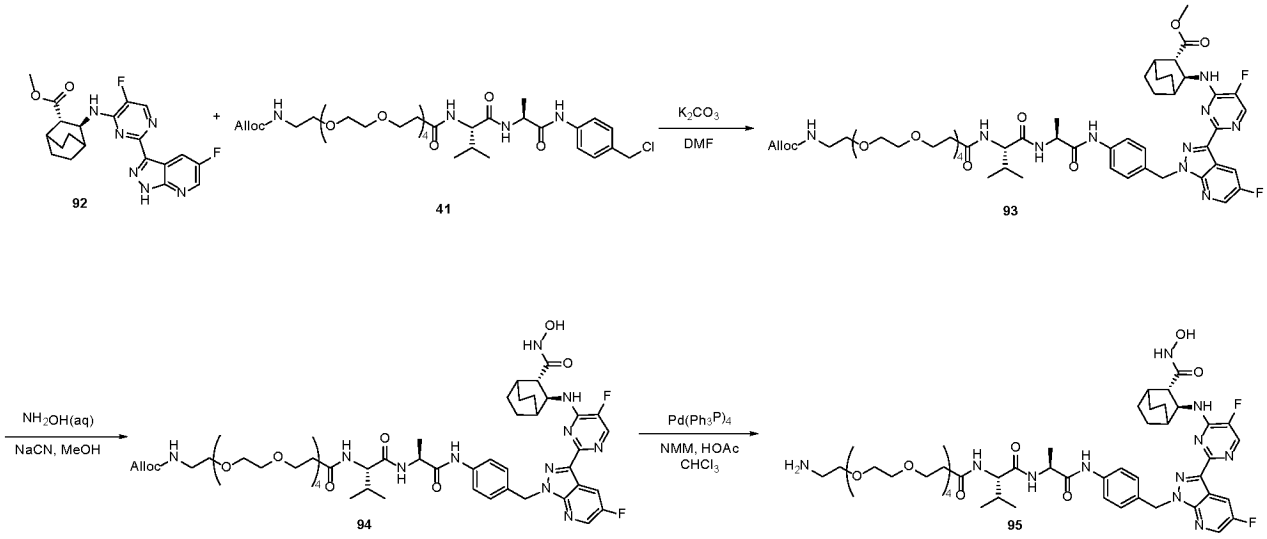
[00281] Соединение **89**: К раствору соединения **88** (149 мг, 0,133 ммоль) в DCM (2,7 мл) добавляли хлорид тионила (29 мкл, 0,398 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч и затем концентрировали под вакуумом. К остатку добавляли безводный DCM (2 мл), и смесь повторно концентрировали в условиях вакуума, чтобы получить Соединение **89** (143 мг, выход 94%) в виде бесцветного геля, который использовали на следующей стадии без очистки. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{58}H_{84}ClN_5O_{16}$, 1141,56; обнаружено 1142,66 (M+H).

[00282] Соединение **90**: К раствору **80b** (18 мг, 0,036 ммоль) в DMF (0,72 мл) добавляли KOH (6,1 мг, 0,108 ммоль). После перемешивания полученного раствора в течение 30 мин добавляли Соединение **89** (45 мг, 0,040 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 90 мин, пока данные ЖХ-МС не показывали, что алкилированный продукт является мажорным продуктом. После

этого добавляли пиперидин (9 мкл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Неочищенную реакционную смесь очищали на колонке C18 Aq 5,5 г при использовании для элюирования 0-80% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% TFA). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **90** (25 мг, выход 50%), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{68}H_{101}F_2N_{11}O_{17}$, 1381,73; обнаружено 1382,85 (M+H).

[00283] Соединение **91**: К раствору Соединения **90** (25 мг, 0,018 ммоль) в MeCN (0,181 мл) и H_2O (0,181 мл) добавляли TFA (0,138 мл, 1,809 ммоль), и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Неочищенную реакционную смесь очищали на колонке C18 Aq 5,5 г с использованием для элюирования смеси 0-80% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% TFA). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали чтобы получить Соединение **91,** представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. Лиофилизированное твердое вещество 2-кратно очищали на колонке для препаративной ВЭЖХ Gemini 30 x 150 мм с использованием для элюирования смеси 0-60% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% TFA), чтобы получить Соединение **91** (5,3 мг, выход 24%), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{59}H_{85}F_2N_{11}O_{16}$, 1241,61; обнаружено 1242,6 (M+H). ^{1}H-ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 9,89 (br, 1H), 8,58-8,52 (m, 1H), 8,28-8,24 (m, 1H), 8,17-8,10 (m, 1H), 7,86-7,84 (m, 1H), 7,76-7,65 (m, 2H), 7,55-7,53 (m, 1H), 7,50-7,48 (m, 1H), 7,25-7,22 (m, 1H), 7,15-7,13 (m, 1H), 6,55-6,46 (m, 1H), 4,86-4,81 (m, 1H), 4,69-4,64 (m, 1H), 4,41-4,35 (m, 1H), 4,22-4,18 (m, 1H), 3,60-3,39 (m, 35H), 2,99-2,96 (m, 2H), 2,44-2,33 (m, 1H), 2,00-1,31 (m, 13H), 1,29-1,26 (m, 3H), 0,88-0,83 (m, 6H).

1.18 Схема 18



[00284] Соединение **92** было получено при использовании адаптированных методов, описанных в публикации *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 261−265.

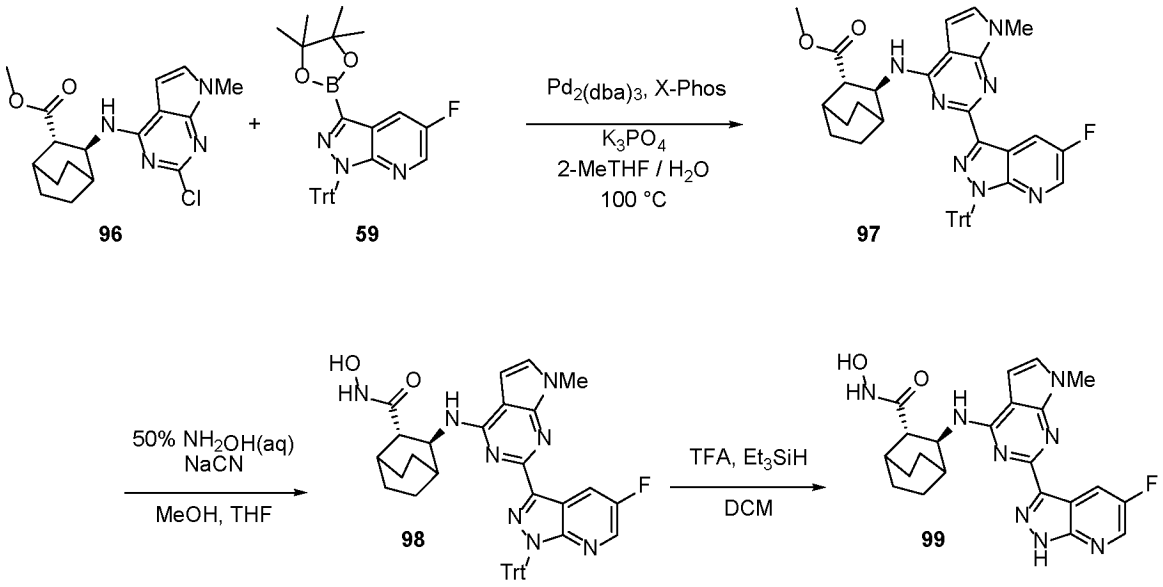
[00285] Соединение **93**: В сухой флакон вместимостью 4 мл вносили метилированное Соединение **92** (20 мг, 0,048 ммоль), AllocNHPEG8-Val-Ala-PAB-Cl (**41**, 48 мг, 0,059 ммоль), калия карбонта (20 мг, 0,145 ммоль), и натрия иодид (4,0 мг, 0,027 ммоль). Добавляли безводный DMA (0,5 мл). Полученную смесь оранжевого цвета перемешивали при комнатной температуре в течение 60 ч. Реакционную смесь вносили непосредственно в колонку C18Aq ISCO 50 г. Для элюирования использовали смесь 10-100% MeCN/H_2O, содержащую 0,05% HOAc в качестве модификатора. Самые чистые фракции, содержащие продукт, объединяли и лиофилизировали, чтобы получить 40 мг смеси N-алкилированных региоизомеров. Изомеры разделяли с помощью хроматографии на препаративной колонке для ВЭЖХ Gemini 30 x 150 мм при использовании для элюирования смеси 30-55% MeCN/H_2O, содержащей 10 мМ раствор NH_4OAc в качестве модификатора. Чистые фракции более позднего пика (мажорного изомера) объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **93** (11 мг, 19%) в виде рыхлого твердого вещества серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{58}H_{82}F_2N_{10}O_{15}$, 1196,59; обнаружено, 1197,5 (M+H).

[00286] Соединение **94**: К раствору Соединения **93** (10 мг, 0,00835 ммоль) в метаноле (110 мкл) добавляли 50% водный раствор гидроксиламина (110 мкл, 1,67

ммоль) и натрия цианид (1 мг, 0,0204 ммоль). Полученный немного мутный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Удаляли MeOH под вакуумом. Оставшийся водный раствор вносили в колонку C18Aq 5,5 г, ополаскивая флакон диметилформамидом. Для элюирования использовали смесь 10-60% MeCN/H_2O, содержащую 0,05% HOAc в качестве модификатора. Фракции со степенью чистоты >95% согласно данным ЖХ-МС, объединяли и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **94** (8,8 мг, 88%) в виде рыхлого твердого вещества серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{57}H_{81}F_2N_{11}O_{15}$, 1197,59; обнаружено, 1198,5 (M+H).

[00287] Соединение **95**: Через флакон с Соединением **94** (5,0 мг, 0,00417 ммоль) продували аргон. Аргон продували также через отдельный флакон, содержащий тетракис(трифенилфосфин)-)палладий(0) (5,0 мг, 0,00433 ммоль). В этот флакон добавили 200 мкл раствора $CHCl_3$/HOAc/NMM в соотношении 37/2/1, из которого предварительно струей аргона в течение 10 мин удаляли кислород. Смесь перемешивали, чтобы растворить катализатор. Раствор катализатора шприцом добавили во флакон, содержащий субстрат в атмосфере аргона. Флакон с катализатором ополоснули дополнительной порцией растворителя в количестве 100 мкл, и промывную жидкость добавили в реакционную смесь с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение 2 ч, после чего данные ЖХ-МС показали, что исходный материал полностью израсходован. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом, затем очищали методом хроматографии на колонке C18Aq ISCO RediSep 5,5 г, используя для элюирования смесь 5-40% MeCN/H_2O, причем оба компонента содержали 0,05% HOAc. Концентрацию MeCN поддерживали на уровне 40% до тех пор, пока продукт и Ph_3PO не элюировали полностью. Фракции, содержащие продукт, were лиофилизировали, чтобы получить 6 мг желтого твердого вещества, содежащего в качестве примеси Ph_3PO. Продукт очищали на колонке для препаративной ВЭЖХ Gemini 30 x 150 мм, используя для элюирования смесь 10-95% MeCN/H_2O, при этом оба компонента содержали 0,05% HOAc. Фракции, содержащие продукт, лиофилизировали, чтобы получить Соединение **95** (1,6 мг, 34%) в виде серовато-желтоватого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{53}H_{77}F_2N_{11}O_{13}$, 1113,57; обнаружено 1114,6 (M+H).

1.19 Схема 19

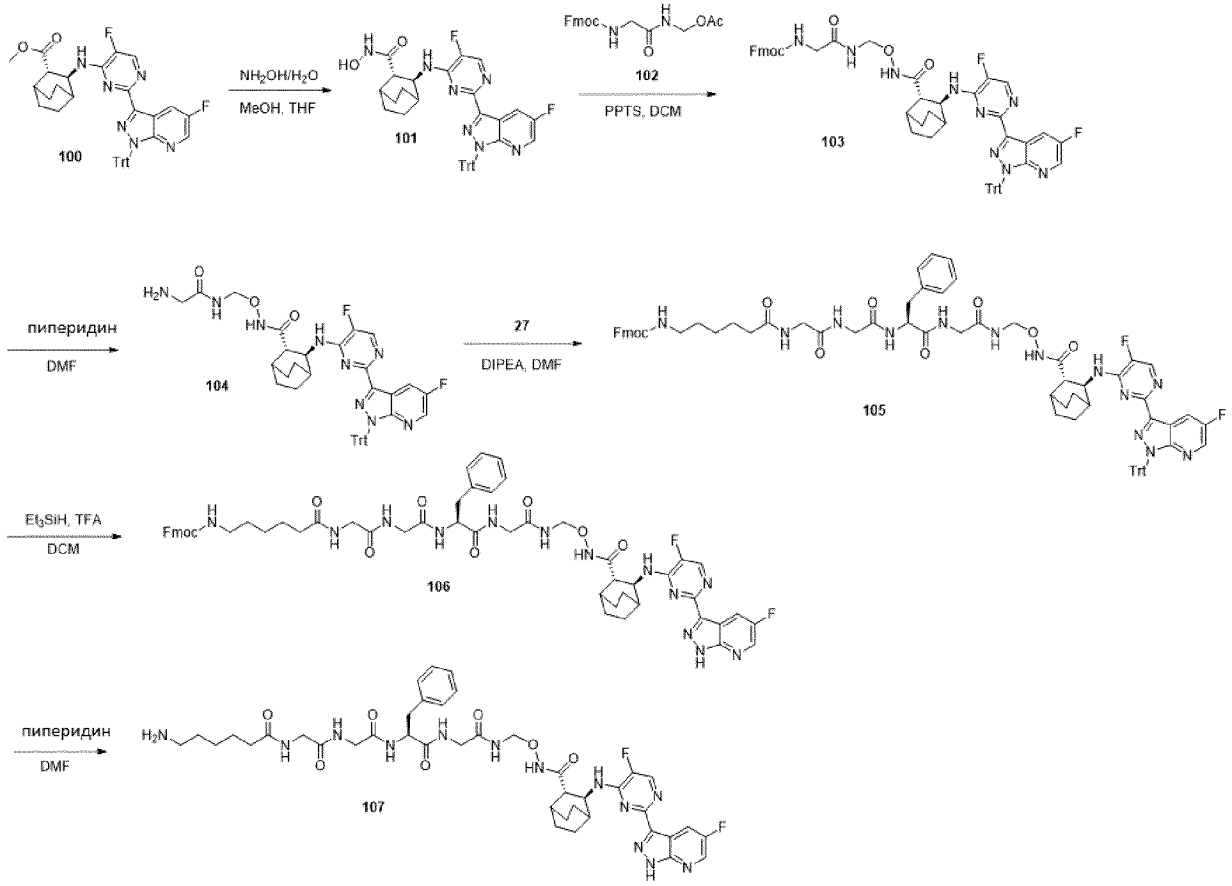


[00288] Для получения Соединения **97** использовали такой же метод, как для получения Соединения **60**. Из 46 мг Соединения **96** было получено 95 мг (количественно) Соединения **97**, представляющего собой желтое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{42}H_{38}FN_7O_2$, 691,31; обнаружено 692,30 (M+H).

[00289] Для получения Соединения **98** использовали такую же методику, как для получения Соединения **61**. Из 20 мг Соединения **97** было получено 12,3 мг (61%) Соединения **98,** представляющего собой желтое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{41}H_{37}FN_8O_2$, 692,30; обнаружено, 693,40 (M+H).

[00290] Для получения Соединения **99** использовали такую же методику, как для получения Соединения **62**. Из 11 мг Соединения **98** было получено 2 мг (28%) Соединения **99** в виде рыхлого твердого вещества желтого цвета. МС (ИЭР, пол. ион) рассчитан для $C_{22}H_{23}FN_8O$, 450,19; обнаружено 451,50 (M+H).

Схема 20



[00291] Для получения Соединения **101** использовали такую же методику, как для получения Соединения **61**. Из 100 мг Соединения **100** было получено 75 мг (75%) Соединения **101** в виде белого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{38}H_{33}F_2N_7O_2$, 657,27: Обнаружено, 658,47 (M+H), 680,42 (M+Na).

[00292] Для получения (2-((((9*H*-флюорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)ацетамидо)метил ацетате (**102**) использовали методику, описанную в публикации *Tetrahedron* **2018**, *74*, 1951−1956.

[00293] Соединение **103**: К раствору соединения **102** (24,6 мг, 0,067 ммоль) и Соединения **101** (22 мг, 0,033 ммоль) в безводном DCM (2,8 мл) добавляли пиридиния *пара*-толуолсульфонат (PPTS, 16,8 мг, 0,067 ммоль). Полученный раствор перемешивали при 40 □C в течение 16 часов, после чего данные ЖХ-МС указывали на присутствие небольшого количества остаточной гидроксамовой кислоты. Были добавлены дополнительные порции Соединения **102** (24,6 мг, 0,067 ммоль) и PPTS (16,8 мг, 0,067 ммоль) добавляли. После перемешивания at 40 □C в

течение 24 ч реакционную смесь концентрировали под вакуумом. Остаток хроматографировали на колонке C18 Aq 5,5 г с использованием для элюирования смеси 0-100% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 10 мМ NH_4OAc). Чистые фракции объединяли, замораживали, и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **103** (22 мг, выход 68%), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{56}H_{49}F_2N_9O_5$, 965,38; обнаружено 966,86 (M+H).

[00294] Соединение **104**: Во флаконе вместимостью 20 Соединение **103** (22 мг, 0,023 ммоль) растворяли в 5% растворе пиперидина в DMF (0,12 мл), и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь очищали на колонке C18 Aq 5,5 г с использованием для элюирования смеси 0-100% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 10 мМ NH_4OAc). Чистые фракции объединяли, замораживали, и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **104** (15 мг, выход 89%) представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{41}H_{39}F_2N_9O_3$, 743,82; обнаружено 744,65 (M+H).

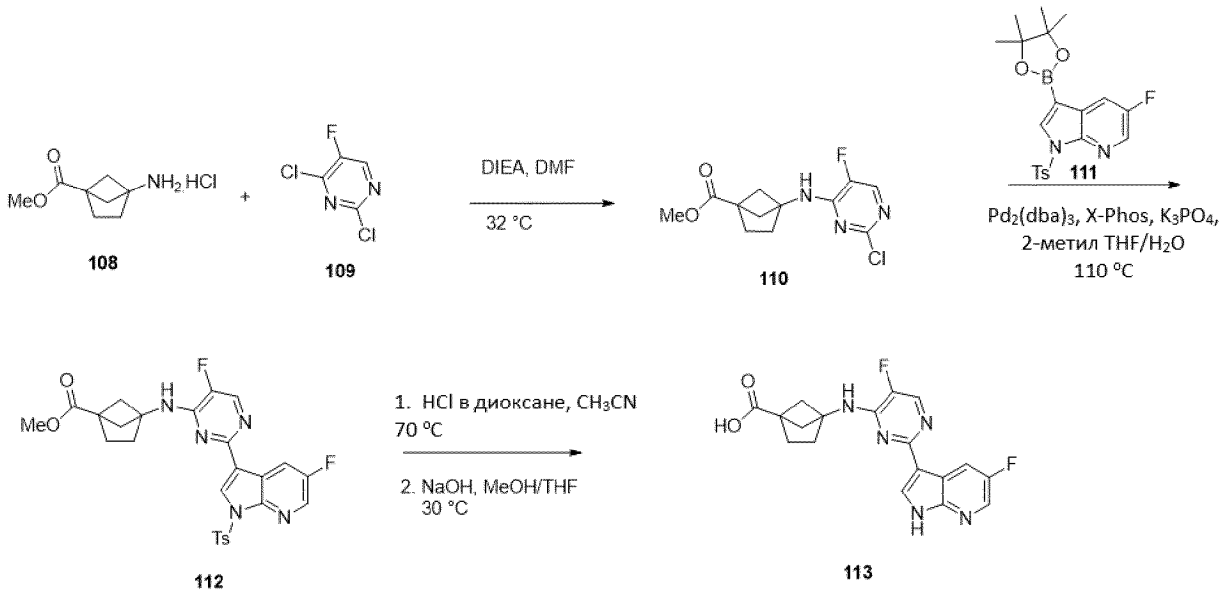
[00295] Соединение **105**: Соединение **104** (15 мг, 0,020 ммоль) объединяли с Fmoc-Cap-Gly-Gly-Phe-OH **27** (12,4 мг, 0,020 ммоль), HATU (7,7 мг, 0,020 ммоль) и HOAt (2,7 мг, 8,548 ммоль) в DMF (0,67 мл). К этой смеси добавляли DIEA (7 мкл, 0,040 ммоль), и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакционную смесь очищали на колонке C18 Aq 5,5 г с использованием для элюирования смеси 0-100% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 10 мМ NH_4OAc). Чистые фракции объединяли, замораживали, и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **105** (15 мг, выход 56%), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{75}H_{75}F_2N_{13}O_9$, 1339,58; обнаружено 1341,28 (M+H).

[00296] Соединение **106**: К раствору Соединения **105** (15 мг, 0,0111 ммоль) в DCM (1 мл) добавляли триэтилсилан (17,9 мкл, 0,112 ммоль) и трифторуксусную кислоту (22 мкл, 0,224 ммоль). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 ч и затем концентрировали под вакуумом. Реакционную смесь очищали на колонке C18 Aq 5,5 г с использованием для элюирования смеси 0-

95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 10 мМ NH_4OAc). Чистые фракции объединяли, замораживали, и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **106** (9 мг, 73% выход), представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{56}H_{61}F_2N_{13}O_9$, 1097,47; обнаружено 1099,24 (M+H).

[00297] Соединение **107**: Во флаконе вместимостью 20 мл Соединение **106** (9 мг, 0,008 ммоль) растворяли в 5% растворе пиперидина в DMF (0,82 мл), и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционную смесь очищали на колонке C18 Aq 5,5 г с использованием для элюирования смеси 0-50% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 10 мМ NH_4OAc). Чистые фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали, чтобы получить Соединение **107** (4 мг, выход 56%) в виде серовато-желтоватого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{41}H_{51}F_2N_{13}O_7$, 875,40; обнаружено 877,07 (M+H).

[00298] **Схема 21**



[00299] Соединение **110**: К раствору метил 4-аминобицикло[2,1,1]гексан-1-карбоксилата гидрохлорида (**108**, 19,1 мг, 0,1 ммоль) и 2,4-дихлор-5-фторпиримидина (**109**, 20 мг, 0,12 ммоль) в DCM (2 мл) добавляли DIEA (38 мкл, 0,22 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 32 °C в течение 16 ч, затем летучие компоненты удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке GOLD с силикагелем 4 г, с использованием для элюирования смеси

гексанов/этилацетата, чтобы получить Соединение **110** (22 мг, 77%) в виде серовато-желтоватого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{12}H_{13}ClFN_3O_2$, 285,1; обнаружено 286,1 (M+H).

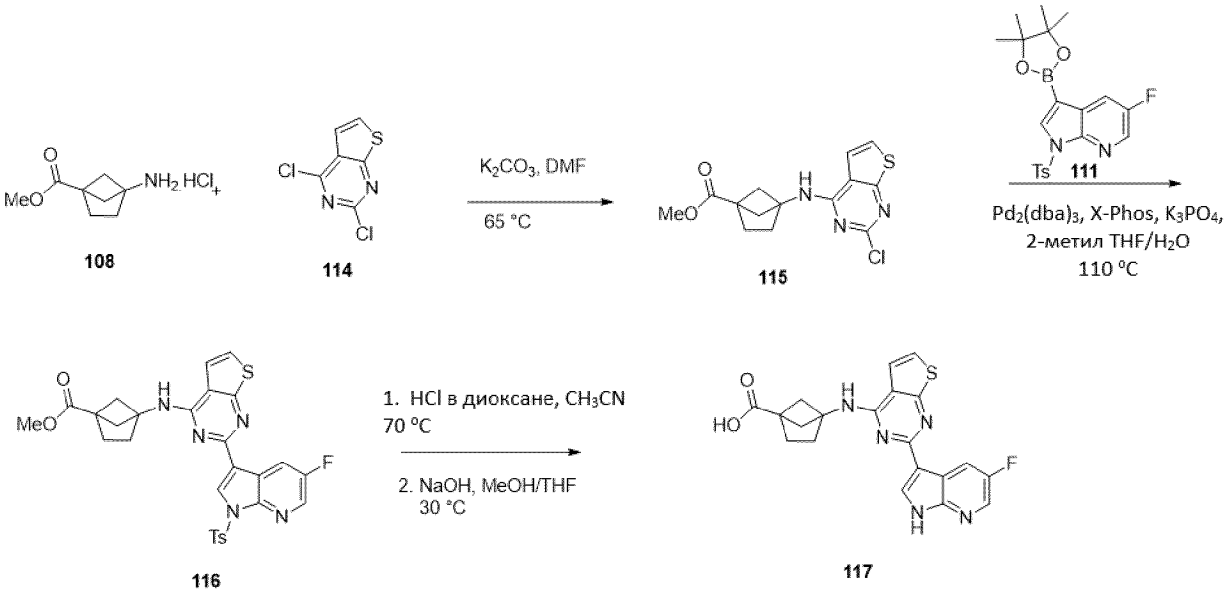
[00300] Соединение **111** было получено при использовании адаптированной методики, описанной в публикации *Journal of Medicinal Chemistry* (**2014**), 57(15), 6668-6678.

[00301] Соединение **112**: Смесь Соединения **110** (22 мг, 0,077 ммоль), Соединения **111** (38,5 мг, 0,092 ммоль) и K_3PO_4 (2,9 мг, 0,014 ммоль) в 2-метил-THF (1 мл) и воде (0,2 мл) продували аргоном в течение 10 mins. Добавляли X-Phos (4,4 мг, 0,009 ммоль) и $Pd_2(dba)_3$ (1,8 мг, 0,002 ммоль), и полученную смесь нагревали до 110 °C в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом (5 мл), и фильтровали через сой целита. Осадок на фильтре промывали этилацетатом (3 мл), и концентрировали объединенный фильтрат. После очистки на колонке GOLD с силикагелем 12 г с использованием для элюирования смеси гексанов/этилацетата получали Соединение **112** (30 мг, 72%) в виде твердого вещества желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{26}H_{23}F_2N_5O_4S$, 539,1; обнаружено 540,1 (M+H).

[00302] Соединение **113**: К раствору соединения **112** (30 мг, 0,056 ммоль) в ацетонитриле (0,5 мл) добавляли 4 M раствор HCl в диоксане (83 мкл, 0,344 ммоль). После нагревания до 70 °C в течение 18 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, и летучие компоненты удаляли под вакуумом. Остаток растворяли в смеси THF/MeOH, 1:1 (1 мл) и добавляли 2 N водный раствор гидроксида натрия (167 мкл, 0,344 ммоль) добавляли. После нагревания до 30 °C в течение 2 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли 1 N раствор HCl, чтоб подкислить до pH 4-5, и разбавляли 2-метил-тетрагидрофураном (5 мл). Добавляли рассол (1 мл), и водный слой отбрасывали. Органический слой концентрировали, и остаток очищали на колонке C18 Aq 30 г с использованием для элюирования смеси 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали чтобы получить Соединение **113** (11,2 мг, 54%) в виде рыхлого твердого вещества серовато-желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{18}H_{15}F_2N_5O_2$, 371,1;

обнаружено 372,1 M+H). ^{1}H ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 12,26 (d, *J* = 2,2 Гц, 2H), 8,43 (dd, *J* = 9,8, 2,9 Гц, 1H), 8,27 (dd, *J* = 2,8, 1,4 Гц, 1H), 8,19 (d, *J* = 3,8 Гц, 1H), 8,12 (d, *J* = 2,8 Гц, 1H), 8,07 (s, 1H), 2,20 (s, 2H), 2,10-2,06 (m, 2H), 1,94-1,91 (m, 4H).

1.20 Схема 22



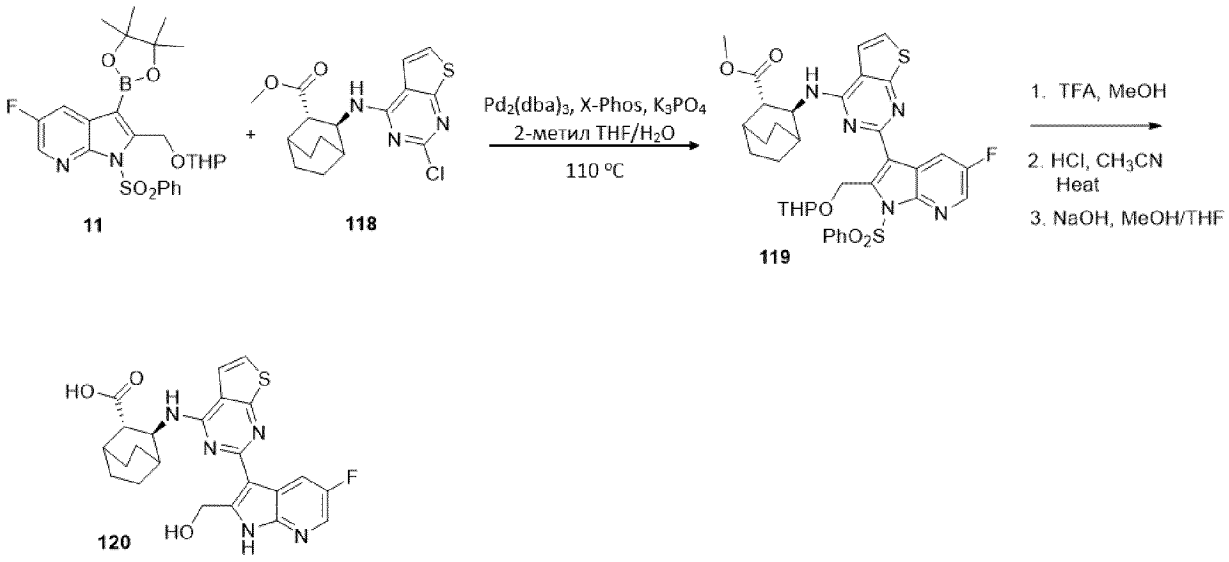
[00303] Соединение **115**: К раствору метил 4-аминобицикло[2,1,1]гексан-1-карбоксилата гидрохлорида (**108**, 19,1 мг, 0,1 ммоль) и 2,4-дихлортиено [2,3-d]пиримидина (**114**, 28,6 мг, 0,13 ммоль) в DMF (1 мл) добавляли карбонат калия (42 мг, 0,3 ммоль), и смесь нагревали до 65 °C в течение 1,5 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой (10 мл) и насыщенным водным раствором аммония хлорида (5 мл) и экстрагировали этилацетатом (3 x 5мл). Объединенную органическую фракцию сушили над безводным натрия сульфатом и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали на колонке GOLD с силикагелем 4 г, с использованием для элюирования смеси гексанов/этилацетата, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **115** (27,6 мг, 85%) в виде серовато-желтоватого твердого вещества. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{14}H_{14}ClFN_3O_2S$, 323,0; обнаружено 324,1 (M+H).

[00304] Соединение **116**: Через смесь Соединения **115** (27,5 мг, 0,085 ммоль), Соединения **111** (42,4 мг, 0,102 ммоль) и K_3PO_4 (3,3 мг, 0,015 ммоль) в 2-метил-THF (1 мл) и воде (0,2 мл) продували аргон в течение 10 мин. Добавляли X-Phos (4,9 мг, 0,0102 ммоль) и $Pd_2(dba)_3$ (2,0 мг, 0,0021 ммоль), и полученную смесь нагревали до

110 °C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом (5 мл) и фильтровали через слой целита. Осадок на фильтре промывали этилацетатом (3 мл). Фильтрат концентрировали и очищали на колонке GOLD с силикагелем 4 г, с использованием для элюирования смеси гексанов/этилацетата, чтобы получить указанное в заголовке Соединение **116** (20 мг, 45%) в виде твердго вещества желтоватого цвета. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{28}H_{24}FN_5O_4S_2$, 577,1; обнаружено 578,1 (M+H).

[00305] Соединение **117**: К раствору Соединения **116** (20 мг, 0,035 ммоль) в ацетонитриле (0,5 мл), добавляли 4 М раствор HCl в диоксане (53 мкл, 0,21 ммоль). Смесь нагревали до 70 °C в течение 8 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и удаляли летучие компоненты под вакуумом. Остаток растворяли в смеси THF/MeOH 1:1 (1 мл), и добавляли 2 N водный раствор гидроксида натрия (105 мкл, 0,21 ммоль). Смесь нагревали to 30 °C в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, подкисляли до pH 4-5, добавляя 1 N раствор HCl, и разбавляли 2-метил THF (5 мл). Добавляли рассол (1 мл), и водный слой отбрасывали. Органический слой концентрировали, и остаток очищали на колонке Gemini 30 x 150 мм, используя для элюирования смесь 5-95% MeCN/H_2O (оба компонента содержали 0,05% AcOH). Чистые фракции объединяли и лиофилизировали чтобы получить указанное в заголовке Соединение **117** (5 мг, 35%) представляющее собой рыхлое серовато-желтоватое твердое вещество. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{20}H_{16}FN_5O_2S$, 409,1; обнаружено 410,1 (M+H). 1H ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 12,29 (s, 1H), 8,55 (dd, *J* = 9,7, 2,9 Гц, 1H), 8,28 (dd, *J* = 2,8, 1,4 Гц, 1H), 8,23-8,22 (m, 2H), 7,63 (d, *J* = 6,0 Гц, 1H), 7,44 (d, *J* = 6,0 Гц, 1H), 2,24 (s, 2H), 2,14 (dd, *J* = 8,8, 4,3 Гц, 2H), 1,95-1,92 (m, 4H).

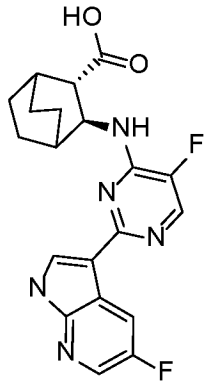
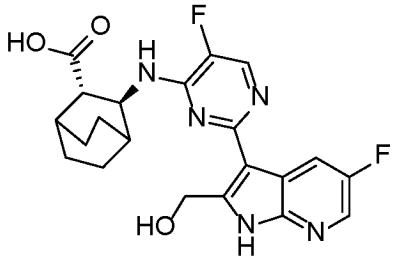
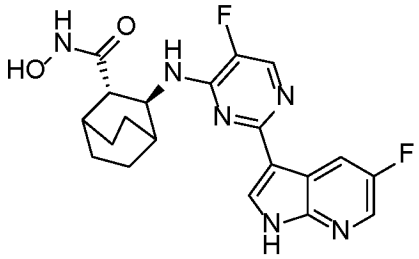
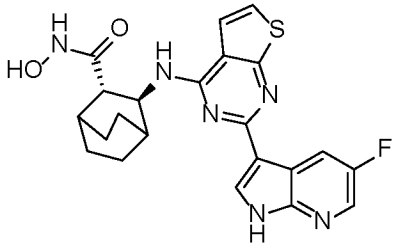
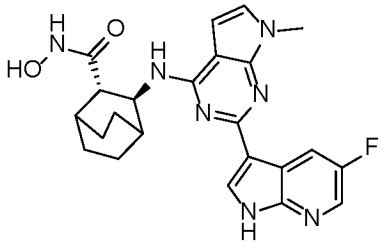
1.21 Схема 23

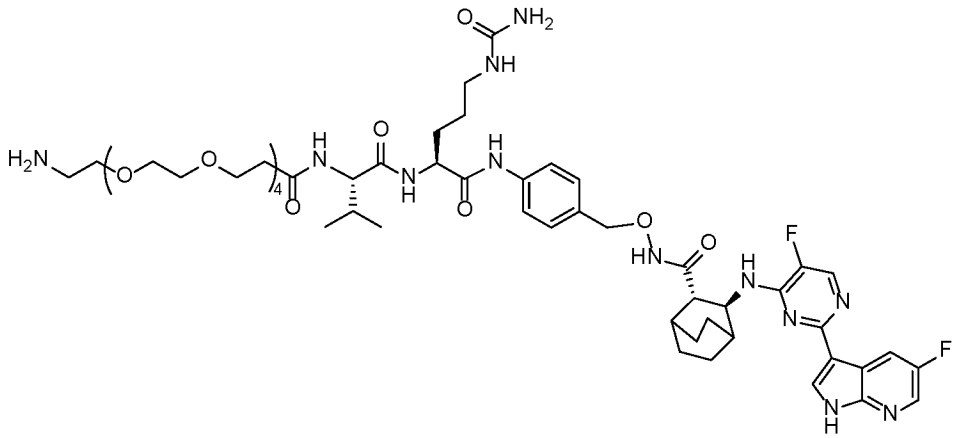
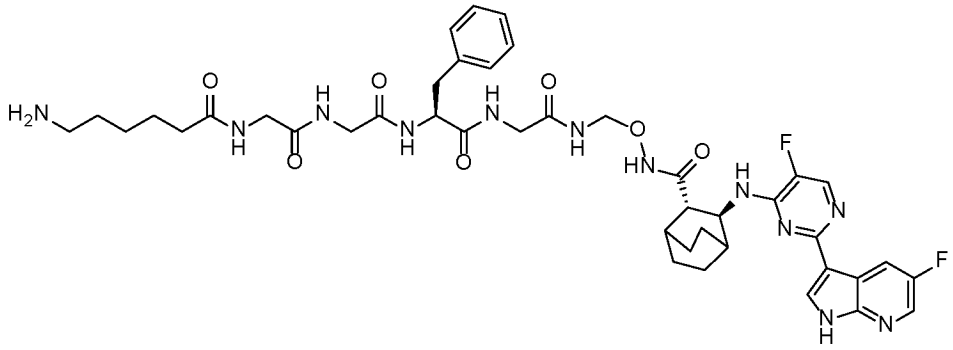
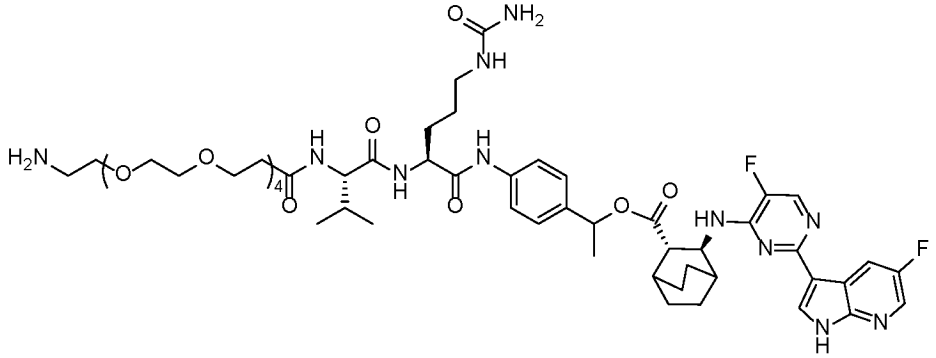
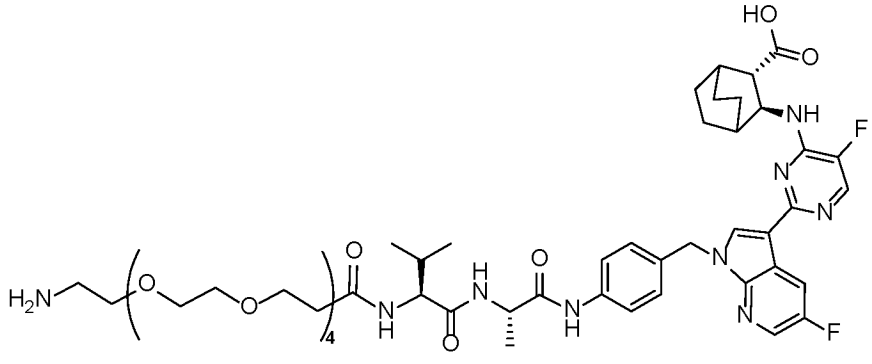


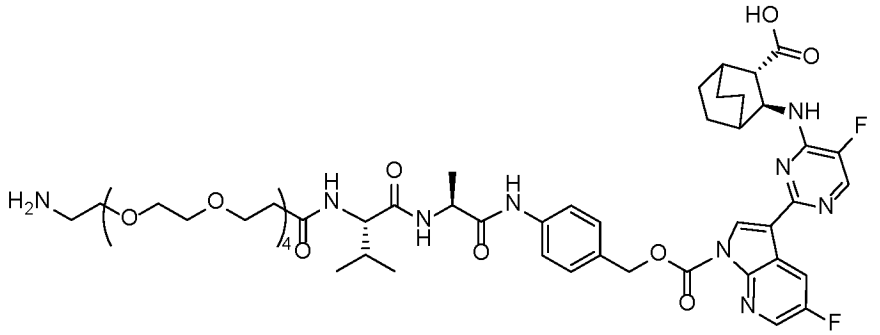
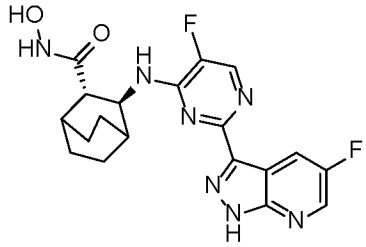
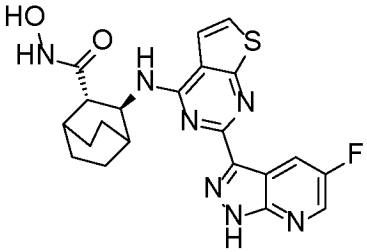
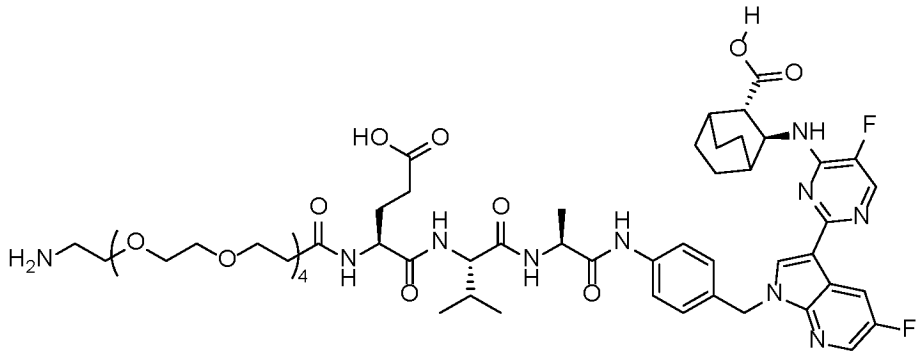
[00306] Для получения Соединения **119** использовали такую же общую методику, как для получения Соединения **13**. Выход = 30%. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{35}H_{36}FN_5O_6S_2$, 705,2; обнаружено 706,2 (M+H).

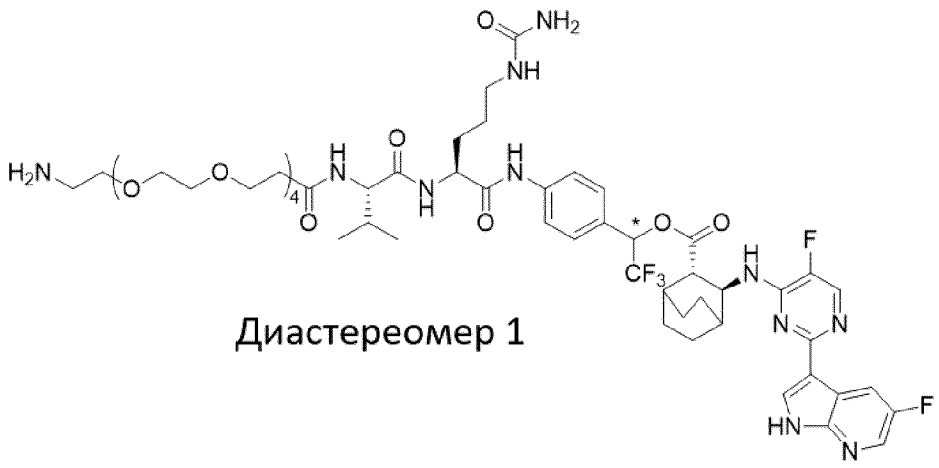
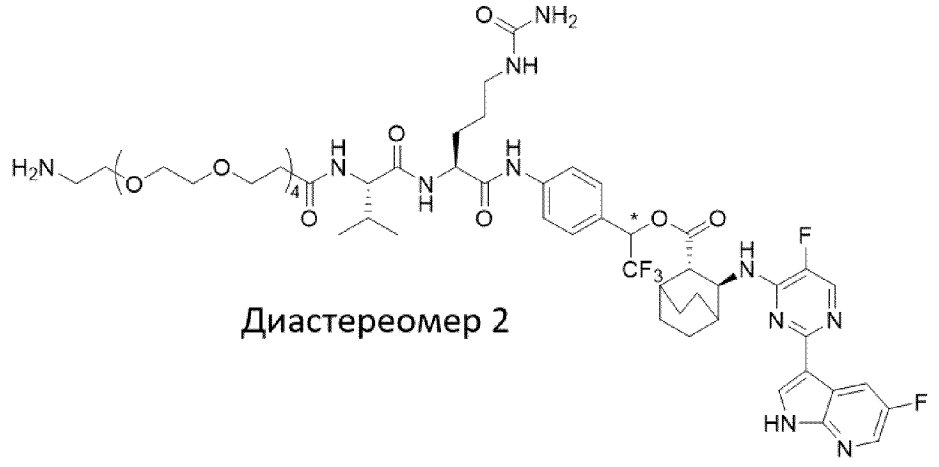
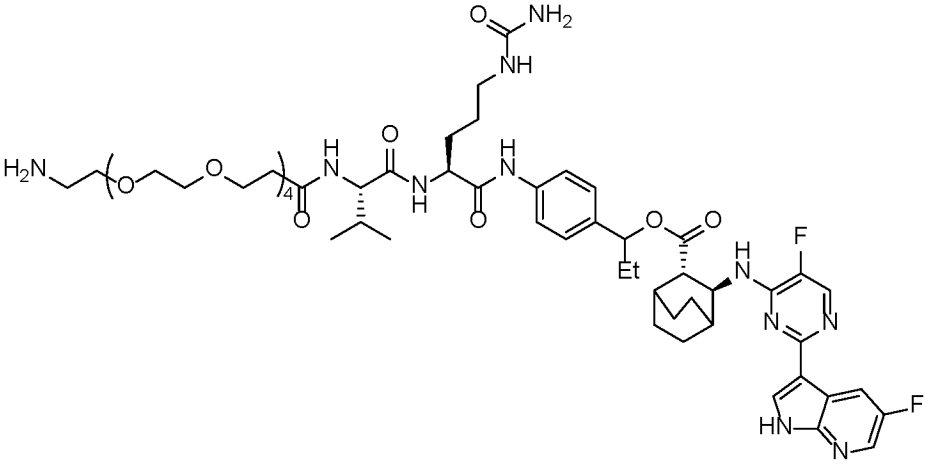
[00307] Для получения Соединения **120** использовали такую же общую методику, как для получения Соединения **15**. Выход = 38% после 3 этапов. МС (ИЭР, пол. ион): рассчитан для $C_{23}H_{22}FN_5O_3S$, 467,1; обнаружено 468,1 (M+H). ^{1}H-ЯМР (500 МГц; ДМСО-d_6): δ 12,14 (s, 1H), 8,62 (dd, *J* = 10,0, 2,9 Гц, 1H), 8,20 (dd, *J* = 2,8, 1,3 Гц, 1H), 7,69 (d, *J* = 6,0 Гц, 1H), 7,63 (d, *J* = 7,1 Гц, 1H), 7,45 (d, *J* = 5,9 Гц, 1H), 5,18 (q, *J* = 13,4 Гц, 2H), 4,86 (t, *J* = 7,0 Гц, 1H), 2,81 (d, *J* = 7,0 Гц, 1H), 2,05 (d, *J* = 0,7 Гц, 1H), 1,98 (t, *J* = 1,5 Гц, 1H), 1,90-1,86 (m, 1H), 1,77 (d, *J* = 9,0 Гц, 2H), 1,62-1,40 (m, 6H).

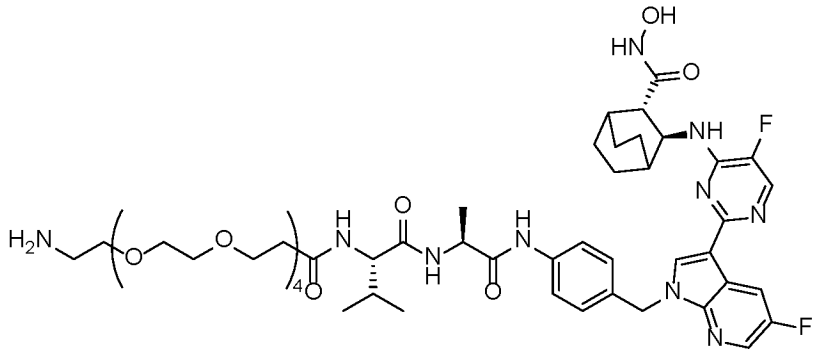
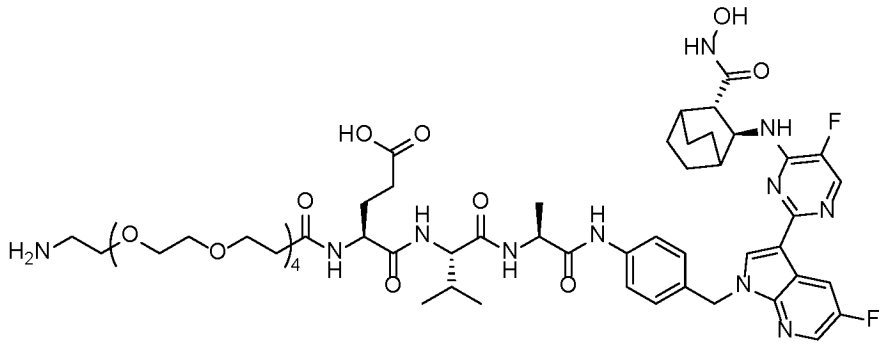
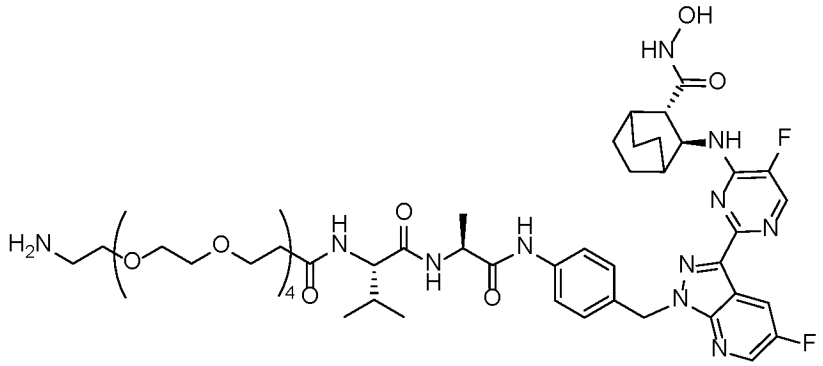
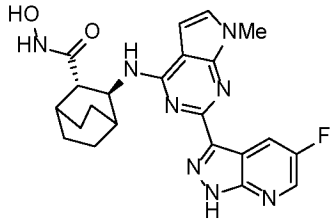
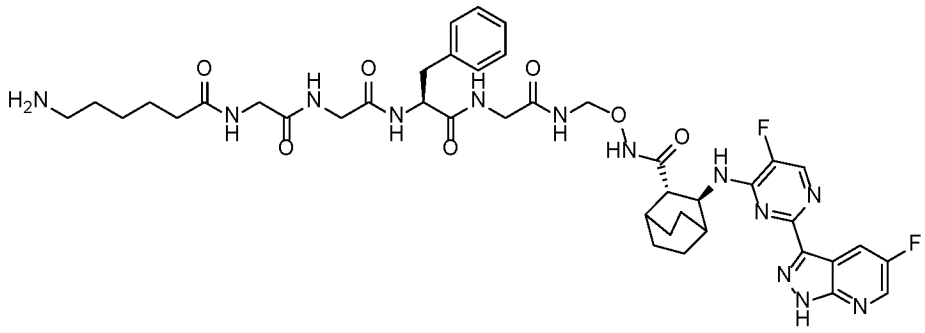
Таблица соединений

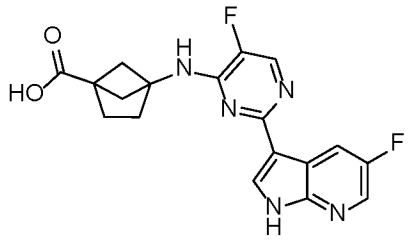
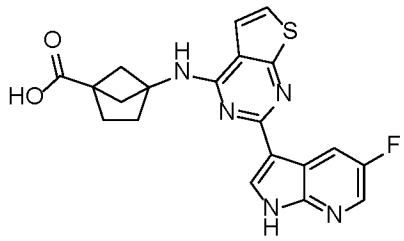
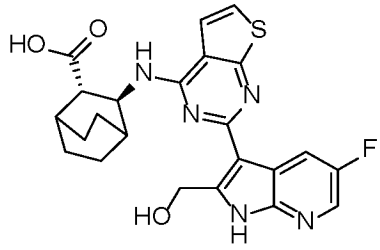
Соединение №	Структура
19a2	
15	
20a	
20b	
20c	

Соединение №	Структура
24	
32	
39	
46	

Соединение №	Структура
54	
57	
62	
69	

Соединение №	Структура
74a	 Диастереомер 1
74b	 Диастереомер 2
79	

Соединение №	Структура
83	
91	
95	
99	
107	

Соединение №	Структура
113	
117	
120	

Пример 2: Синтез нецитотоксических конъюгатов антитело к гемагглютинину -лекарственное средство

[00308] Нецитотоксические конъюгаты антитело к гемагглютинину-лекарственное средство синтезировали, как описано ниже.

[00309] Моноклональное антитело к гемагглютинину (anti-HA) mAb11729 подвергали мутированию, чтобы включить консенсусную пентапептидную последовательность LLQGA в С-терминальной области тяжелой цепи. В качестве несвязывающего изотипического контроля использовали mAb, не связывающее HA (полученное из иммунологического антитела, не имеющего отношения к инфекционным заболеваниям), содержащее такие же консенсусные последовательности в С-терминальной области тяжелой цепи. Мутация позволяла антителам ферментативно конъюгировать с максимальной загрузкой 2 антителами в тяжелых цепях (по одному в каждой тяжелой цепи).

[00310] Проводилась конъюгация антител с участком конъюгации в С-

терминальной области тяжелой цепи при концентрации 1 мг/мл в буфере PBS pH 7,4. Соединения, являющиеся линкером-полезной нагрузкой, добавляли при 10-40-кратном молярном избытке по сравнению с антителом, и ферментативную реакцию инициировали добавлением 14 единиц бактериальной трансглютаминазы (Zedira, T1001) из расчета на 1 мг антитела, и инкубировали при 37 °C в течение 16 часов. Конъюгаты очищали методом хроматографии, основанным на связывании с белком A (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 A) в 10-минутном градиенте (минута:процент подвижной фазы B; 0:10%, 1:10%, 5:90%, 7:90%, 7,2:10%, 10:10%). В качестве подвижной фазы A использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде, в качестве подвижной фазы B 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 °C; Температура десольватации 450 °C; Газовый поток в конусе 0 л/ч; Газовый поток десольватации 800 л/ч). Для спектральной деконволюции использовали функцию MaxEnt программного обеспечения. С помощью эксклюзионной ВЭЖХ было установлено, что все конъюгаты являлись более чем на 92% мономерными (Таблица 1). При использовании этой методики были получены: конъюгат mAb11729-HC-Cterm-линкер-полезная нагрузка и конъюгат Изотипический контроль-HC-Cterm-линкер-полезная нагрузка; отношения лекарственное средство: антитело показаны в следующей таблице:

Конъюгаты антитело-лекарственное средство	**Отношение лекарственное средство: антитело (DAR, ИЭР-МС)**	**Чистота (ЭХ)**
11729-HC-Cterm-**24**	1,6	>96%
Изотипический контроль-HC-Cterm-**24**	1,7	>95%

Конъюгаты антитело-лекарственное средство	**Отношение лекарственное средство: антитело (DAR, ИЭР-МС)**	**Чистота (ЭХ)**
11729-HC-Cterm-**32**	1,1	>96%
Изотипический контроль-HC-Cterm-**32**	1,2	>97%
11729-HC-Cterm-**39**	2,0	>97%
Изотипический контроль-HC-Cterm-**39**	2,0	>97%
11729-HC-Cterm-**46**	2,0	>99%
Изотипический контроль-HC-Cterm-**46**	2,0	>99%
11729-HC-Cterm-**69**	1,8	>99%
Изотипический контроль-HC-Cterm-**69**	1,9	>98%
11729-HC-Cterm-**79**	2,0	>96%
Изотипический контроль-HC-Cterm-**79**	2,0	>95%
11729-HC-Cterm-**74b**	2,0	>99%
Изотипический контроль-HC-Cterm- **74b**	2,0	>99%

Пример 2: Активность ADC в отношени гемогглютинина

[00311] mAb 11729 – это моноклональное антитело, которое связывается со стволовым доменом молекул HA вируса гриппа 1 группы и проявляется антивирусную активность против H1N1 *in vitro*. Были получены конъюгаты VX-787 и производныхэтого соединения с mAb 11729. Выполнено коилчественное определение аантивирусной активности этих конъюгатов и также свободных полезных нагрузок в отношении вируса гриппа.

[00312] Для тестирования антивирусной эффективности измеряли способность mAb 11729 и конъюгатов (ADC) mAb 11729-HC-Cterm-**24**, mAb 11729-HC-Cterm-**32**, mAb 11729-HC-Cterm-**39**, mAb 11729-HC-Cterm-**46**, mAb 11729-HC-Cterm-**69**, mAb 11729-HC-Cterm-**74b**, mAb 11729-HC-Cterm-**79** подавлять инфицирование клеток вирусом гриппа.

[00313] Клетки MDCK London (IRR) вносили в 96-луночный планшет при плотности посева 20 000 клеток/лунка в 100 мкл ростовой среды (DMEM, содержащей 1% пируват натрия, 10% фетальной телячьей сыворотки 0,5% гентамицина; Life Technologies). Клетки инкубировали при 37 °C при содержании 5% CO_2 в атмосфере в течение 24 часов. На следующий день готовили разведения всех антител средой для инокуляции с трипсином (DMEM, содержащей 1% пирувата натрия, 0,21% раствор БСА с низким содержанием IgG, трипсин, обработанный TPCK, 1 мг/мл и 0,5% гентамицина; Sigma, Life Technologies) до начальной концентрации 3440 нМ, и титровали 1:3 до конечной концентрации 0,02 нМ. Свободные полезные нагрузки разбавляли этой же средой для инокуляции до начальной концентрации 6880 нМ, и титровали 1:3 до конечной концентрации 0,04 нМ. Вирус гриппа H1N1 A/Пуэрто-Рико/08/1934, который был сконструирован для экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) в инфицированных им клетках (H1N1 A/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, или полезной нагрузкой. Из 96-луночных планшетов удаляли ростовую среду, и на клетки наносили смесь вирус-антитело, или вирус-ADC, или вирус-низкомолекулярное соединение в количестве 100 мкл в каждую лунку. Планшеты осторожно встряхивали и помещали на 20 часов в термостат при 37 °C при содержании 5% CO_2 в атмосфере. Затем планшеты промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и наслаивали PBS. Сразу после наслаивания регистрировали сигнал GFP на анализаторе для планшетов Molecular Devices Spectramax i3x.

[00314] Продемонстрирована антивирусная активность соединений **15**, **20a**, **20b**, и **20c,** являющихся производными VX-787. Антитела к HA, конъюгированные с линкерами-полезными нагрузками VX-787 **24**, **32**, **39**, и **46** проявляли повышенн антивирусной активностью в отношении вируса гриппа A по сравнению с неконъюгированным антителом.

Антивирусная активность ADC на основе VX-787:

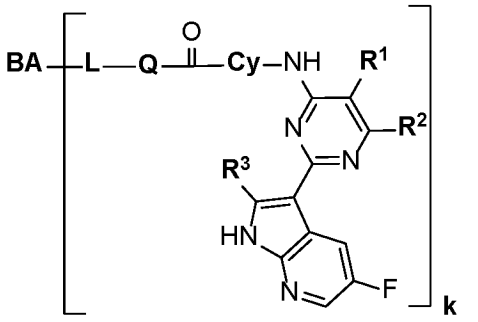
	IC50 (M)	
Соединение	**mAb11729**	**mAb11729-HC-CTAG-MX**
24	1,037E-08	2,531E-09
32	1,738E-08	4,41E-09
46	9,728E-08	3,001E-09
39	4,133E-08	1,4E-09
69	5,135E-08	3,189E-09
74b	5,135E-08	3,402E-10
79	5,135E-08	1,922E-10

Антивирусная активность свободных полезных нагрузок VX-787:

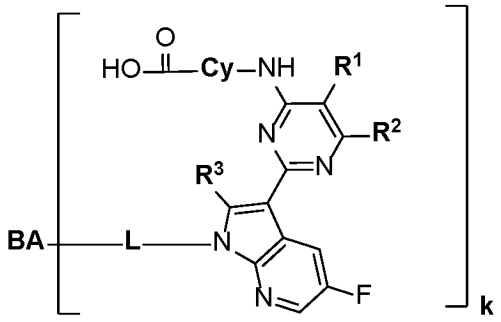
	IC50 (M)
15	2,397E-07
20a	3,77E-09
20b	9,64E-09
20c	1,38E-08
57	2E-09
62	2,19E-09

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Конъюгированное лекарственное средство по следующей формуле:



или



(101) **(201)**

где,

BA представляет собой связующий агент;

$\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой;

$\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-;

Cy представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен;

Q представляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-;

L представляет собой линкер; и

k представляет собой целое число от 1 до 30;

или или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Конъюгированное лекарственное средство по п. 1 описываемое формулой **101**.

3. Конъюгированное лекарственное средство по п. 2, где $\mathbf{R^3}$ представляет собой HO-CH_2-

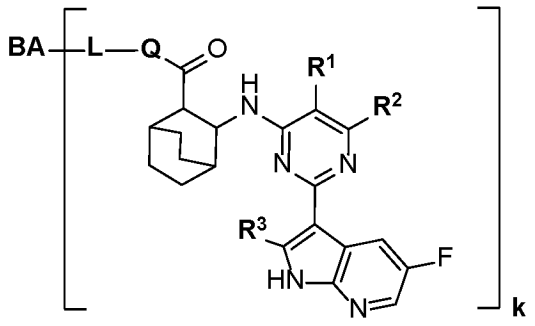
4. Конъюгированное лекарственное средство по п. 2, где $\mathbf{R^3}$ представляет собой H и **Q** представляет собой -O-NH-.

5. Конъюгированное лекарственное средство по п. 1, описываемое формулой **201.**

6. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

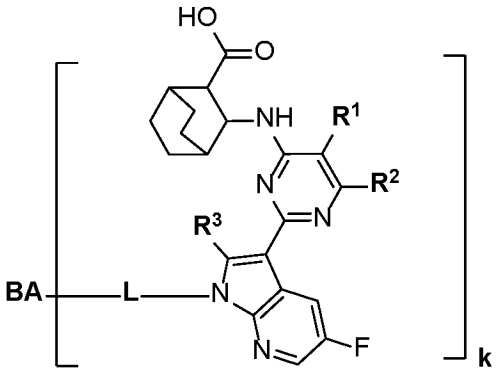
7. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов формулы изобретения, где Cy представляет собой связанный через мостик 6-членный циклоалкил.

8. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, описываемое следующей формулой:



(**102**)

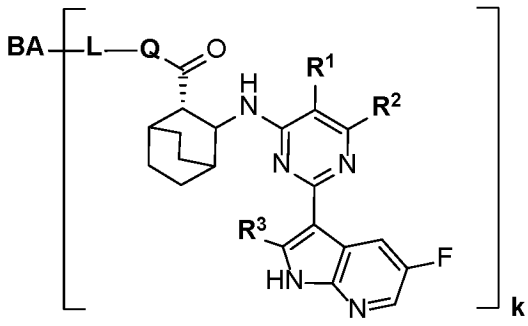
или



(**202**) ;

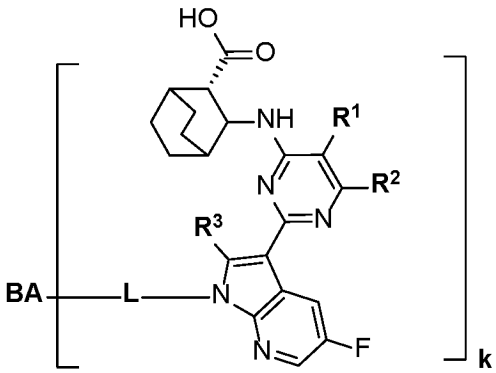
или его фармацевтически приемлемая соль.

9. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, описываемое следующей формулой:



(**103**)

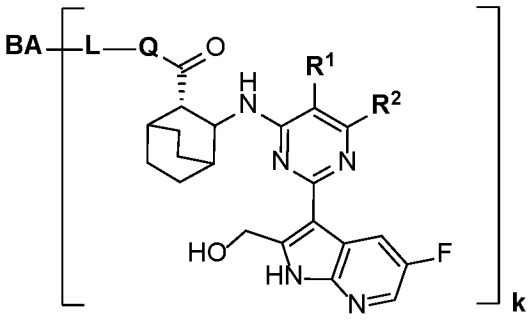
или



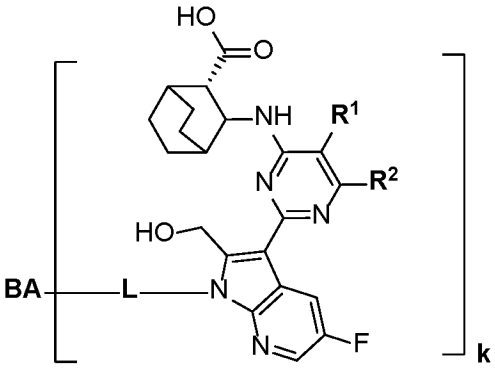
(**203**) ;

или его фармацевтически приемлемая соль.

10. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, описываемое следующей формулой:



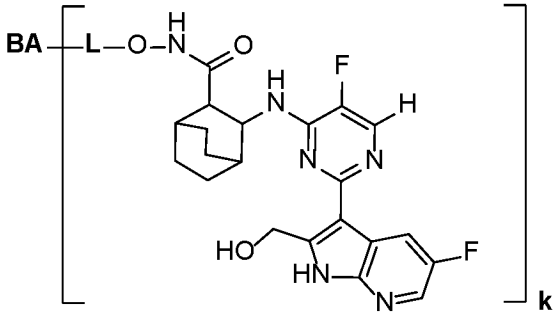
или



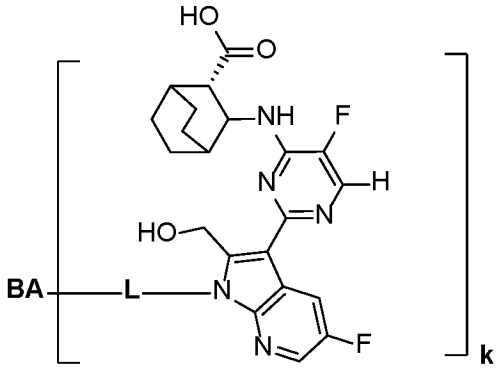
(104) **(204) ;**

или его фармацевтически приемлемая соль.

11. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, описываемое следующей формулой:



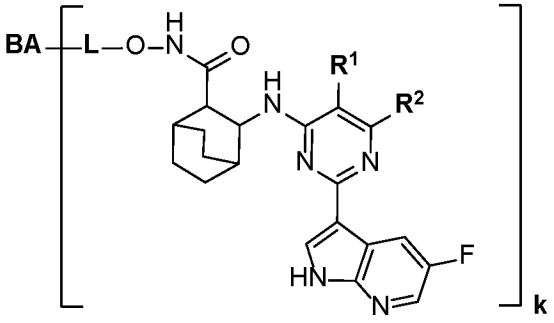
или



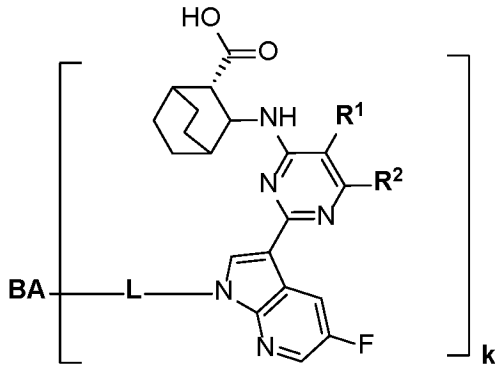
(105) **(205)** ;

или его фармацевтически приемлемая соль.

12. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, описываемое следующей формулой:



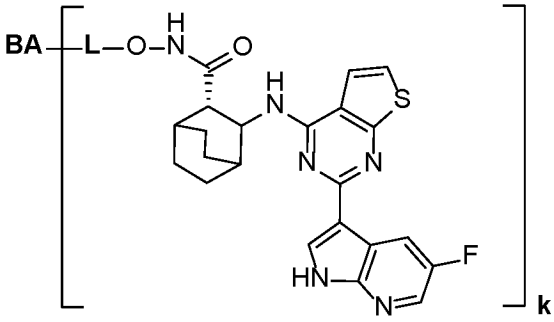
или



(106) **(206)** ;

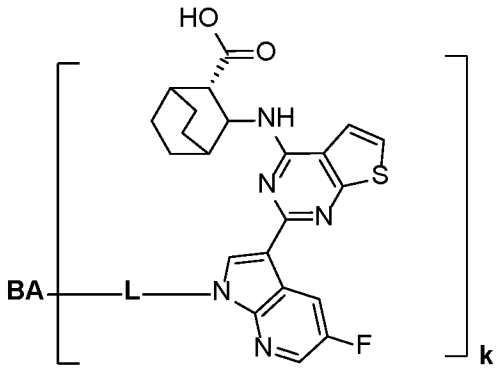
или его фармацевтически приемлемая соль.

13. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, описываемое следующей формулой :



(**107**)

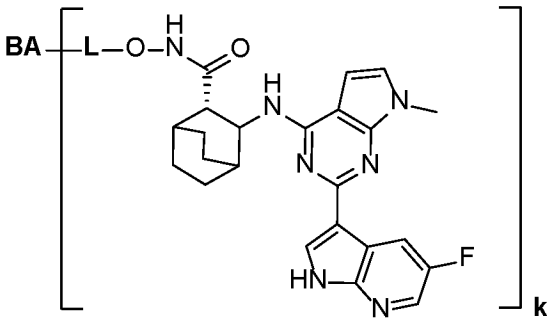
или



(**207**) ;

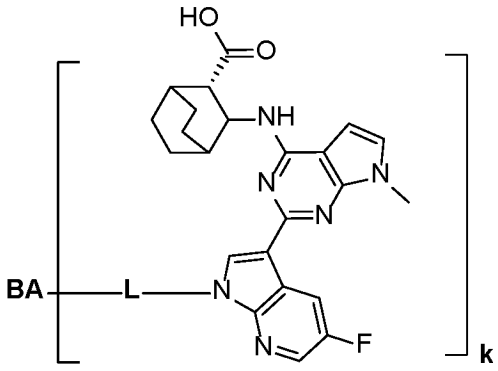
или его фармацевтически приемлемая соль.

14. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, описываемое следующей формулой :



(**108**)

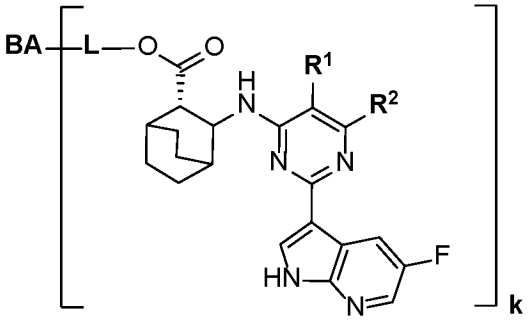
или



(**208**) ;

или его фармацевтически приемлемая соль.

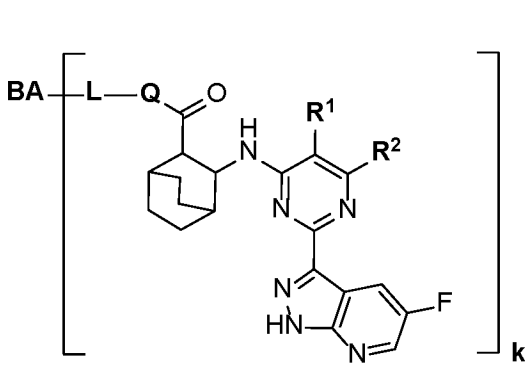
15. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, описываемое следующей формулой :



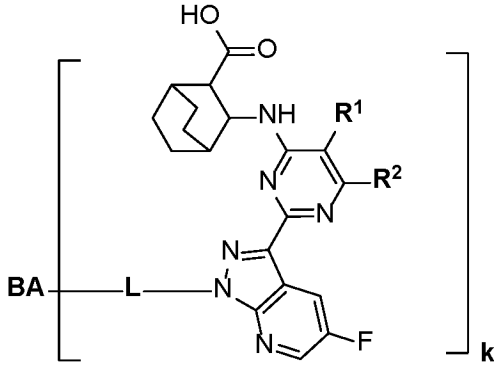
(**110**)

или его фармацевтически приемлемая соль.

16. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, описываемое следующей формулой :



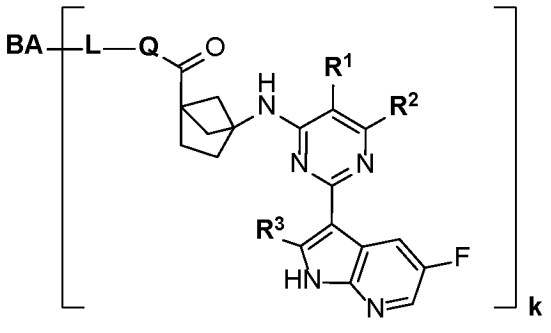
или



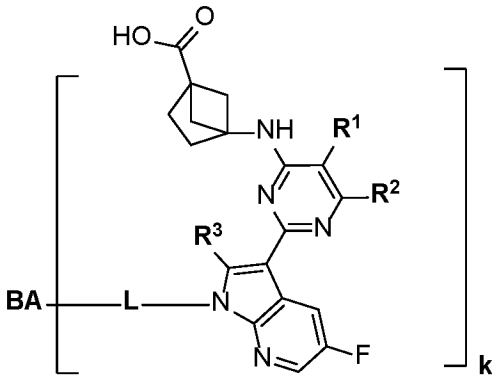
(**112**) (**212**)

или его фармацевтически приемлемая соль.

17. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, описываемое следующей формулой :

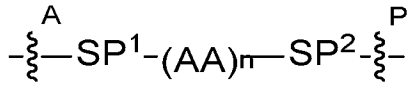


или



(**122**) (**222**).

18. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где **L** представляет собой:



где:

SP[1] представляет собой спейсер;

SP[2] представляет собой спейсер;

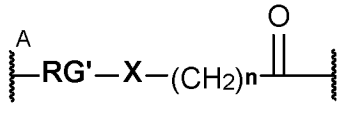
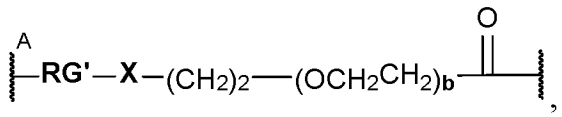
представляет собой однау или более связей со связующим агентом;

представляет собой одну или более связей с полезной нагрузкой;

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

n представляет собой целое число от 0 до 10.

19. Конъюгированное лекарственное средство по п.18, где спейсер **SP**[1] представляет собой:

 , или  ,

где:

X отсутствует или -N(H)-;

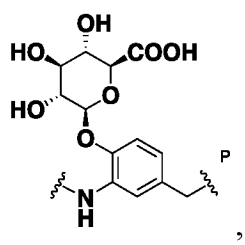
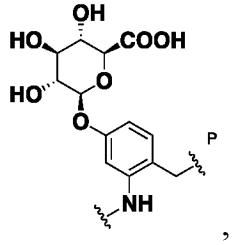
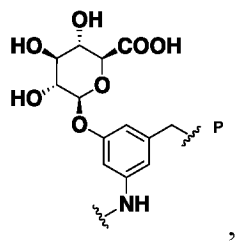
RG' представляет собой остаток реакционноспособной группы, полученный после взаимодействия реакционноспособной группы **RG** со связующим агентом, например, -NH-, -CONH-, остаток малеимида, остаток, являющийся продуктом клик-реакции, или остаток после реакции Дильса-Альдера;

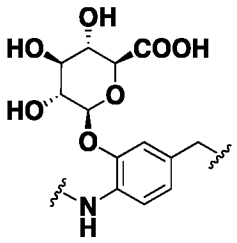
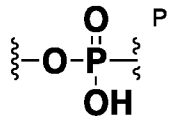
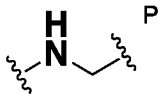
представляет собой связь со связующим агентом;

представляет собой связь с $(\mathbf{AA})_{\mathbf{n}}$;

n представляет собой целое число от 0 до 10; и

b независимо представляет собой целое число от 1 до 92.

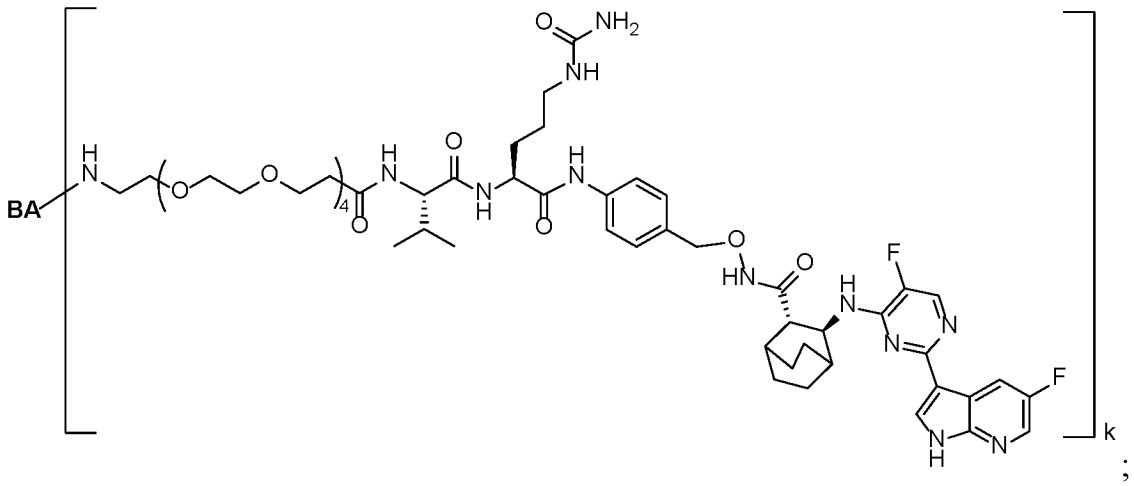
20. Конъюгированное лекарственное средство по п. 18 или п. 19, где спейсер **SP**[2] выбран из группы, включающей –NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2–, –NH-(*p*-C_6H_4)-$CH_2OC(O)$–, -NH-(*p*-C_6H_4)-$CH(CH_3)$-O-,  ,  ,  ,

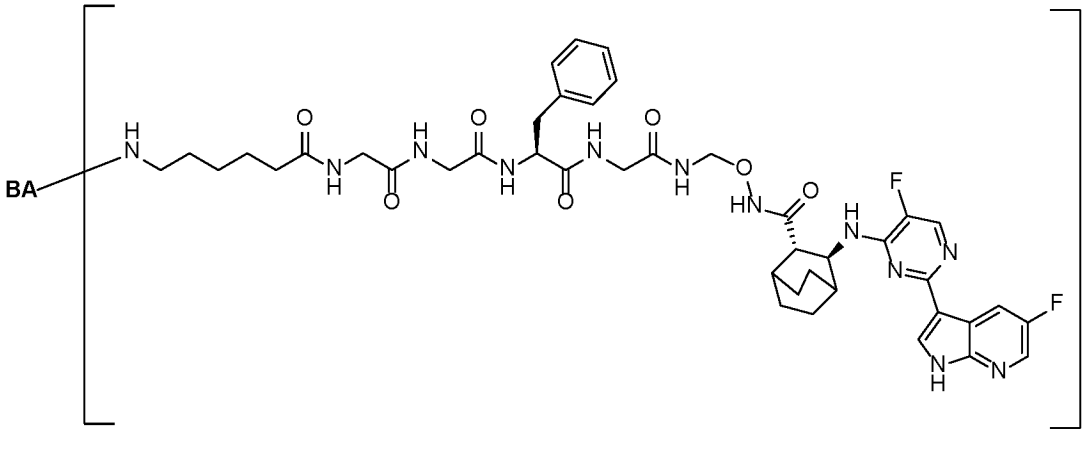



, и любую комбинацию этих групп.

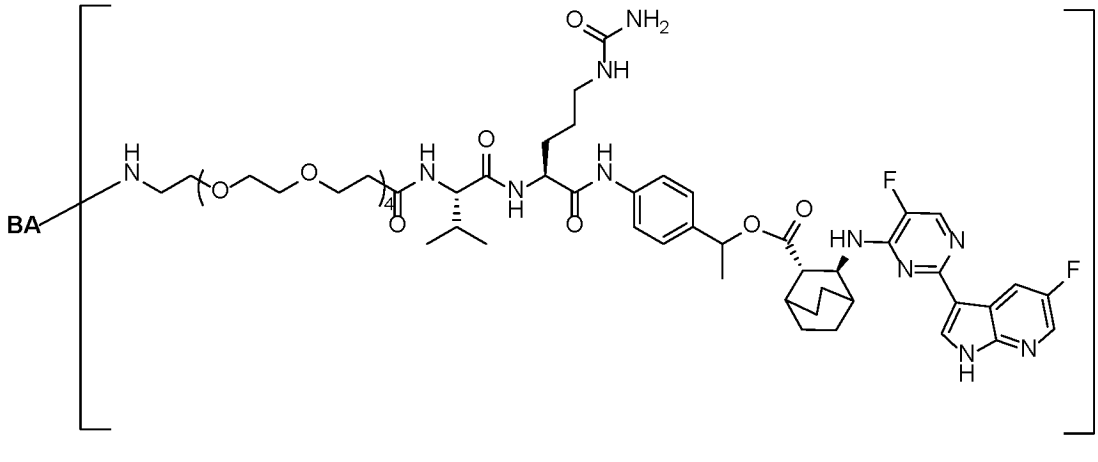
21. Конъюгированное лекарственное средство по любому из пунктов 18-20, где $(\mathbf{AA})_n$ представляет собой валин-цитруллин, цитруллин-валин, валин-аланин, аланин-валин, валин-глицин, глицин-валин, глютамат-валин-цитруллин, глютамин-валин-цитруллин, или глицин-глицин-фенилаланин-глицин.

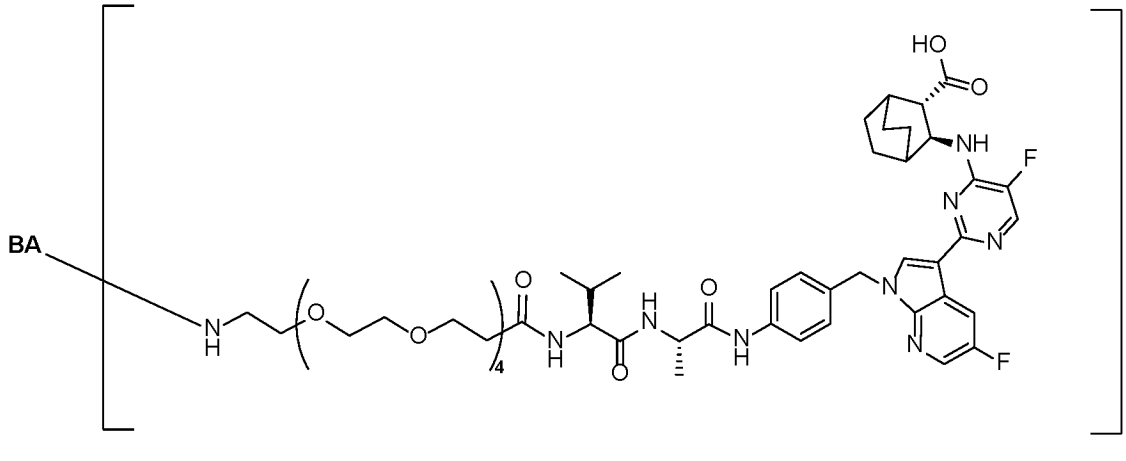
22. Конъюгированное лекарственное средство по любому из пунктов 18-21, где $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ выбрано из группы, включающей: валин-цитруллин-PABC, цитруллин-валин-PABC, глютамат-валин-цитруллин-PABC, глютамин-валин-цитруллин-PABC, глицин-глицин-фенилаланин-глицин-N(H)-CH_2-, валин-аланин-PABC, валин-цитруллин-NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2–, валин-цитруллин-NH-(*p*-C_6H_4)-$CH(CH_3)O$–, валин-аланин-NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2–, или валин-аланин-NH-(*p*-C_6H_4)-$CH_2OC(O)$–.

23. Соединение по любому из предшествующих пунктов, выбранное из группы, включающей

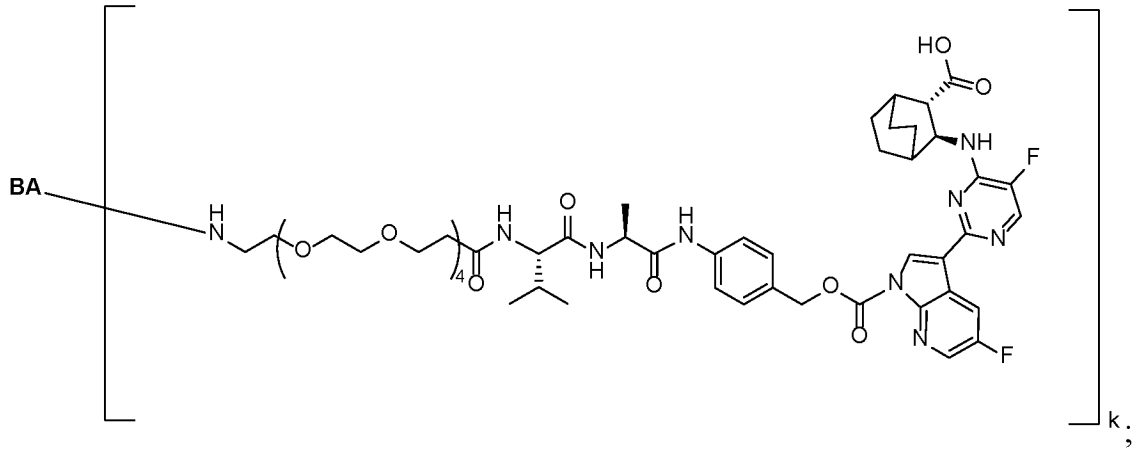

;

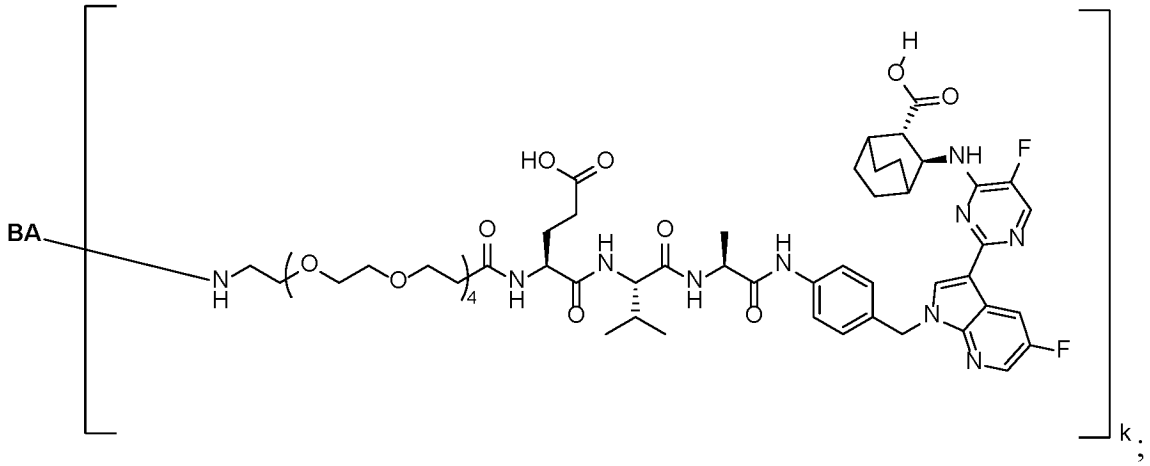


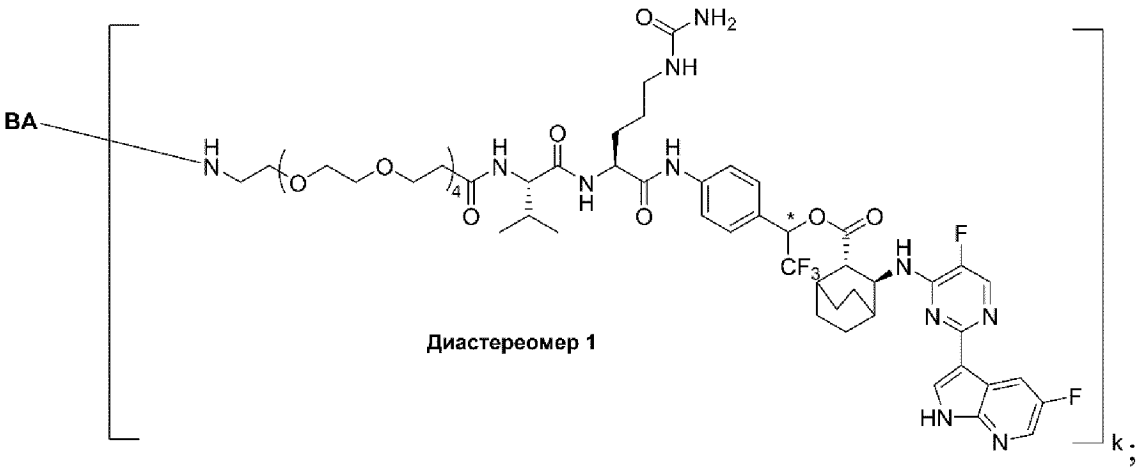




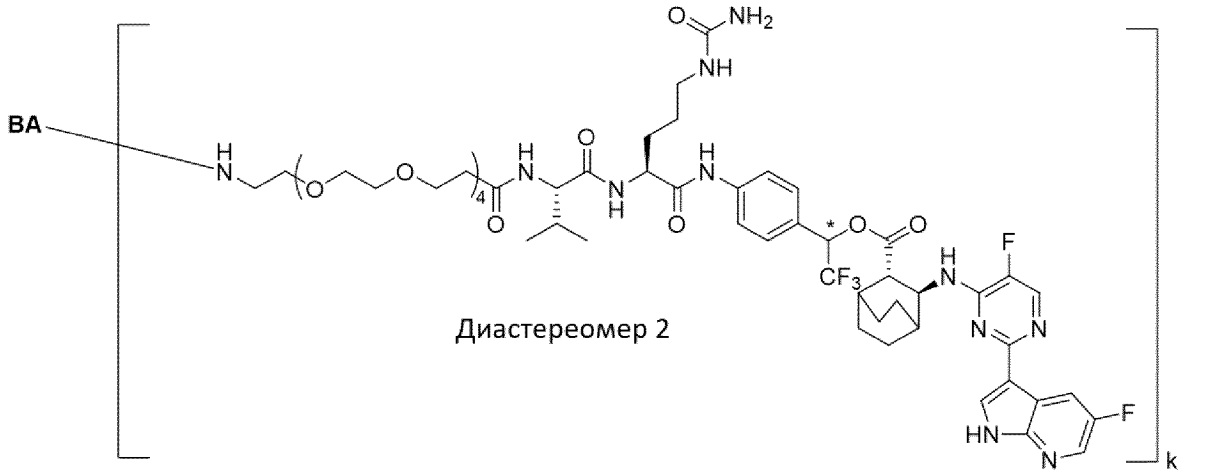
и



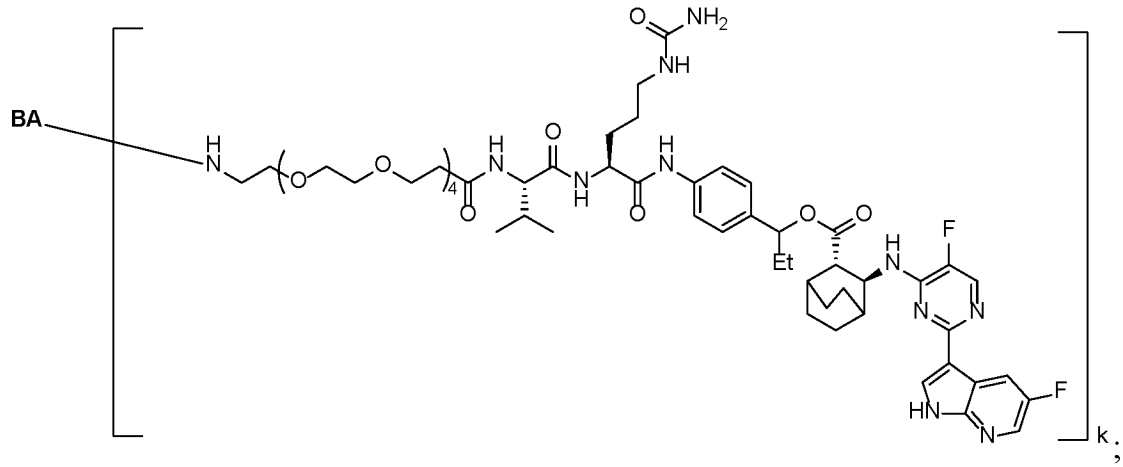




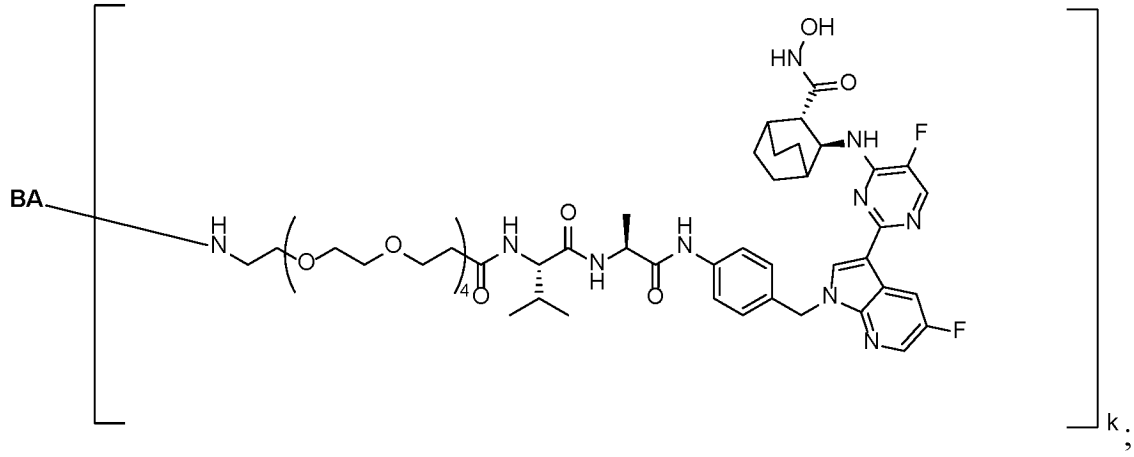
Диастереомер 1


BA
Диастереомер 2
k

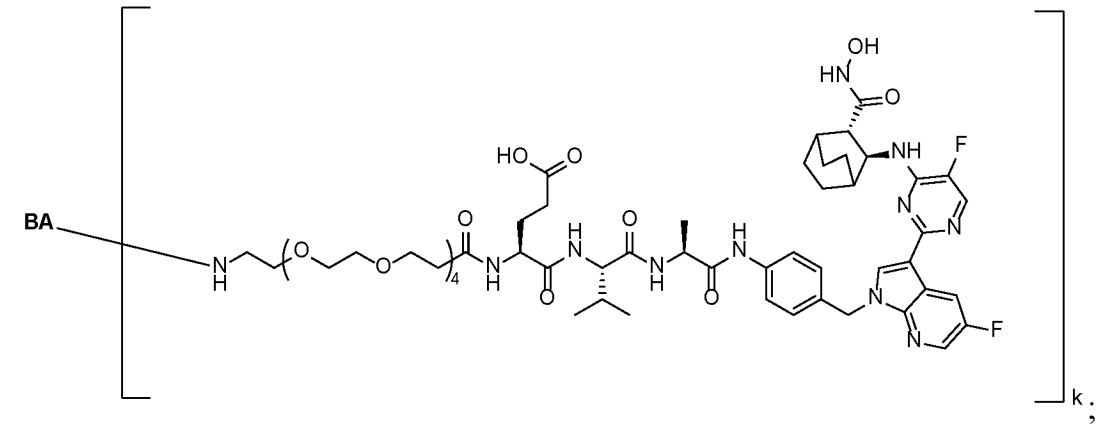
;

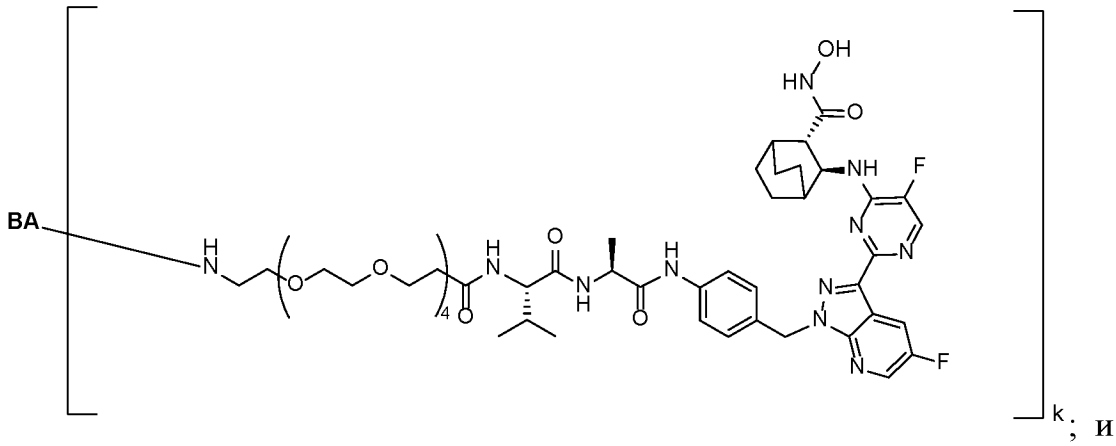

BA
k

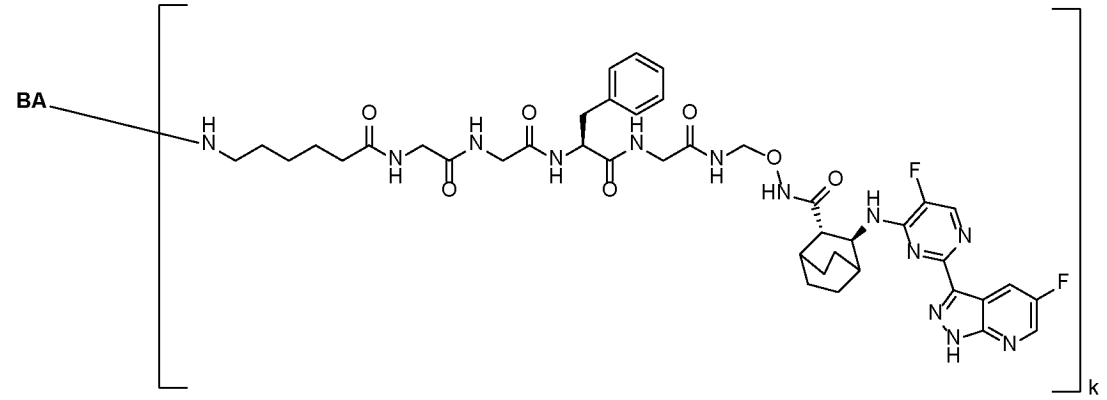
;


BA
k

;







или его фармацевтически приемлемая соль; где

BA представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент; и

k представляет собой целое число от 1 до 30.

24. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

25. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа или его антиген-связывающий фрагмент.

26. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело к гемагглютинину или его антиген-связывающий фрагмент.

27. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа A, группы 1, или его антиген-связывающий фрагмент.

28. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело к H1 вируса гриппа или его антиген-связывающий фрагмент.

29. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа A, группы 2, или его антиген-связывающий фрагмент.

30. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело к H3 вируса гриппа или его антиген-связывающий фрагмент.

31. Конъюгат антитело-лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело к вирусу гриппа B или его антиген-связывающий фрагмент.

32. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где конъюгат антитело-лекарственное средство связывается с и/или ингибирует щелочной белок полимеразы 2 (PB2) и/или щелочной белок полимеразы 1 (PB1).

33. Конъюгированное лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, один остаток глютамина для конъюгации.

34. Конъюгат или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, два, три или четыре остатка глютамина для конъюгации.

35. Конъюгат или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 по системе нумерации EU; и **k** равен 2.

36. Конъюгат или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, где конъюгация осуществляется по двум остаткам Q295 и по двум остаткам N297Q по системе нумерации EU; и **k** равен 4.

37. Конъюгированное лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь антитела, где конъюгация осуществляется в С-терминальной области тяжелой цепи; и **k** равен 2.

38. Конъюгированное лекарственное средство или соединение по п. 29, где конъюгация осуществляется через глютамин в С-терминальной области тяжелой цепи антитела.

39. Конъюгированное лекарственное средство или соединение по п. 29, где конъюгация осуществляется через глютамин в последовательности LLQGA в С-терминальной области тяжелой цепи антитела.

40. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит три области LCDR в LCVR, содержащие аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26; и три области HCDR в HCVR, содержащие аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18.

41. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит область LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26; и область HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18.

42. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, где антитело содержит:

a. область HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20;

b. область HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22;

c. область HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24;

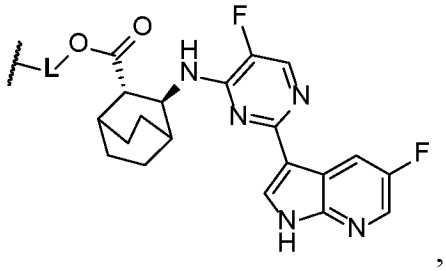
d. область LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28;

e. область LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30; и

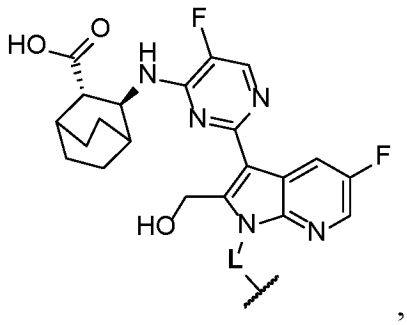
f. область LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 32.

43. Конъюгированное лекарственное средство или соединение по любому из предшествующих пунктов, где **BA** представляет собой mAb11729.

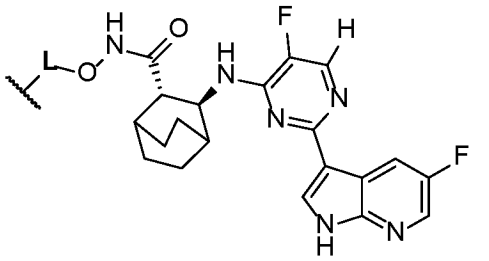
44. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов, имеющий структуру, выбранную из:



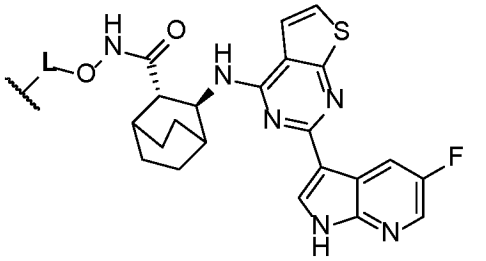
,



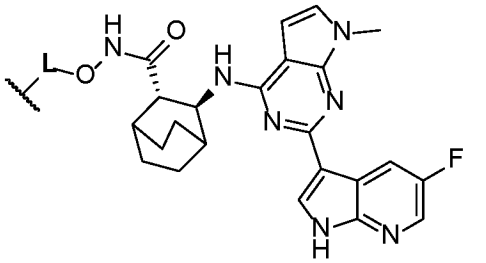
,



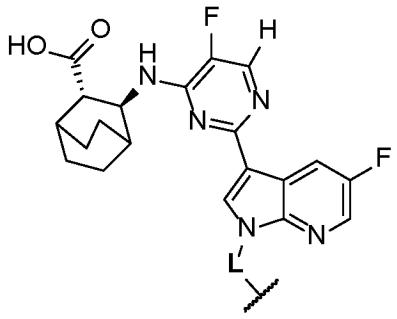
,



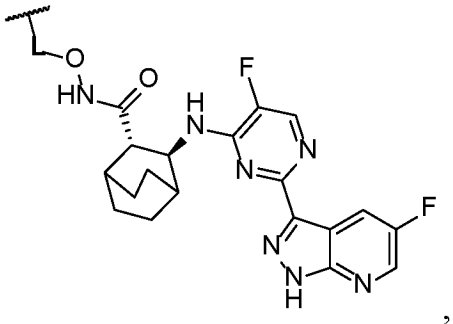
,



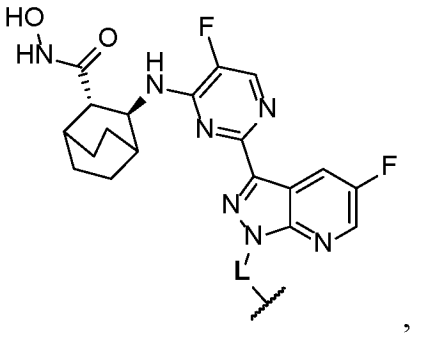
,



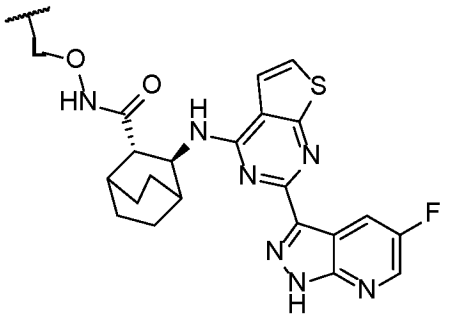
,



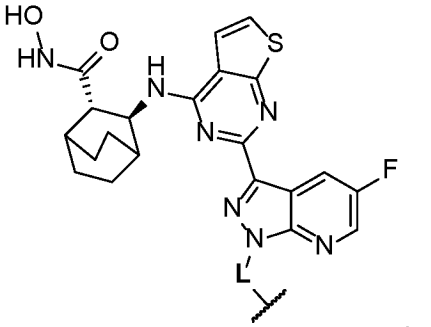
,



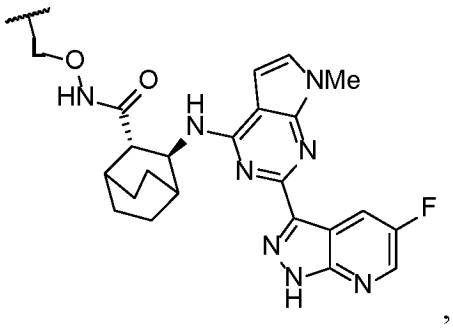
,



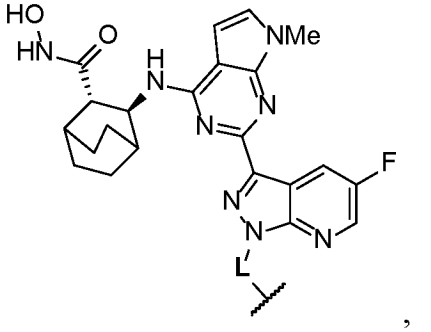
,



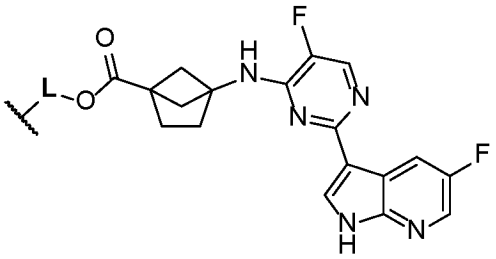
,

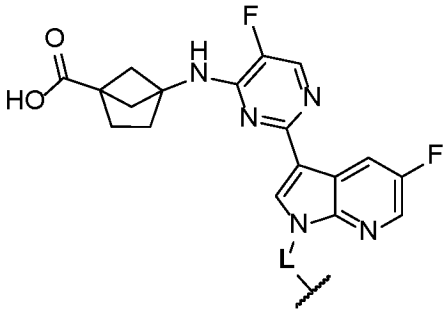


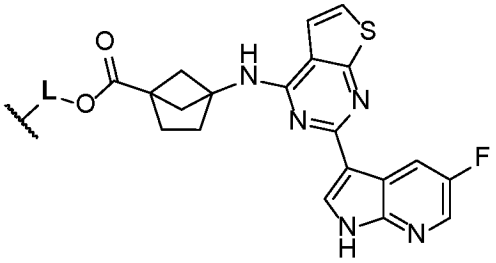
,

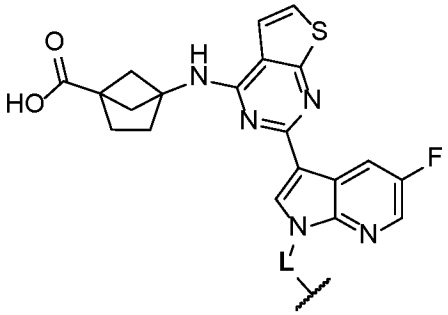


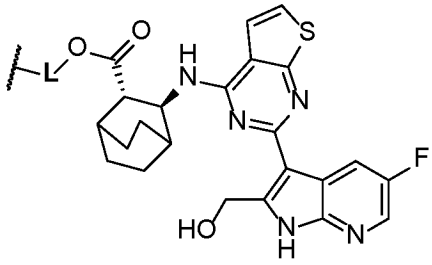
,

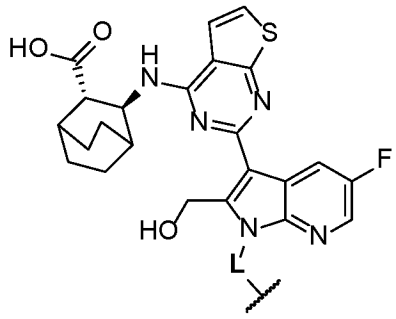

,


,


,


,


, и



,

где обозначение показывает связь с **BA**.

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

46. Фармацевтическая композиция по п. 45, где фармацевтическая композиция предназначена для введения, которое выбирают из группы, включающей: пероральное, внутривенное, внутрибрюшинное, ингаляционное и интраназальное введение.

47. 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.

48. Способ по п. 47, где инфекция представляет собой вирусную инфекцию.

49. Способ по п. 47, где инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом гриппа.

50. Способ по п. 47, где инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом гриппа А.

51. Способ по п. 47, где инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом гриппа В.

52. Способ по п. 47, где инфекция представляет собой инфекцию, вызванную вирусом гриппа А, и инфекцию, вызванную вирусом гриппа В.

53. Способ по любому из пунктов 47-52, где побочные эффекты соединения при введении субъекту менее выражены по сравнению с введением сопоставимому субъекту неконъюгированного антивирусного соединения.

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

55. Способ по п. 54, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А.

56. Способ по п. 54, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А, группы 1.

57. Способ по п. 54, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А H1.

58. Способ по п. 54, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А, группы 2.

59. Способ по п. 54, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А H3.

60. Способ по п. 54, где инфекция гриппа вызвана неизвестным или не определенным вирусом гриппа.

61. Способ по п. 54, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа В.

62. Способ по п. 54, где инфекция гриппа вызвана вирусом гриппа А и вирусом гриппа В.

63. Способ по любому из пунктов 54-62, где конъюгат антитело-лекарственное средство, соединение или фармацевтическую композицию вводят в комбинации с вспомогательным терапевтическим средством.

64. Способ по п. 63, где вспомогательное терапевтическое средство выбрано из группы, включающей: антивирусное лекарственное средство, противовоспалительное лекарственное средство, антитело, специфично связывающееся с НА вируса гриппа, вакцину от гриппа, пищевую добавку и паллиативную терапию для лечения инфекции гриппа.

65. Способ по п. 63, где противовоспалительное лекарственное средство выбрано из группы, включающей кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства.

66. Способ по п. 63, где пищевая добавка является антиоксидантом.

67. Способ по любому из пунктов 63-66, где вспомогательное терапевтическое средство вводится способом, отличным от способа введения конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции.

68. Способ по любому из пунктов 63-67, где вспомогательный терапветическое средство вводят перорально.

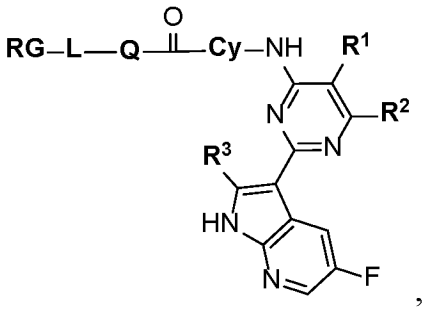
69. Способ по любому из пунктов 63-68, где антивирусным лекарственным средством является осельтамивир.

70. Способ по п. 69, где осельтамивир вводят до введения конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции.

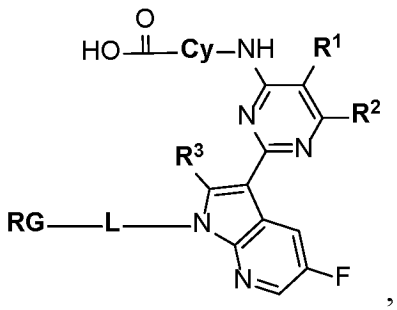
71. Способ по п. 69, где осельтамивир вводят одновременно с введением конъюгата антитело-лекарственное средство, соединением или фармацевтической композицией.

72. Способ по п. 67, где осельтамивир вводят после введения конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения или фармацевтической композиции.

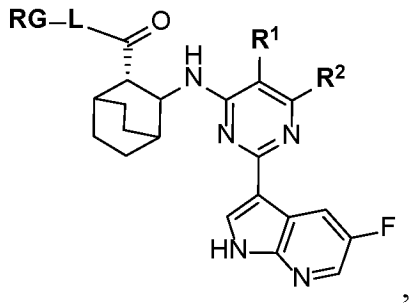
73. Линкер-антивирусное соединение имеющее следующую структуру:



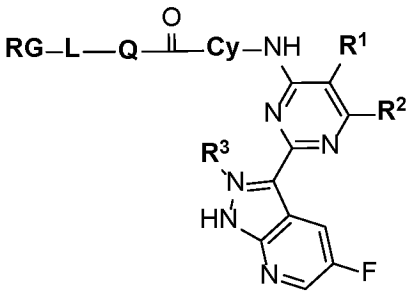
(**401**)



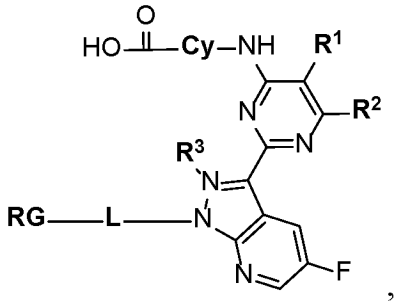
(**402**)



(**403**)



, или



,

(**404**) (**405**)

или его фармацевтически приемлемая соль, где

L представляет собой линкер;

RG представляет собой реакционноспособную группу, например, -NH_2, сложный эфир N-гидроксисукцинимида, остаток малеимида, азид, алкин, напряженный алкин, диен или диенофил;

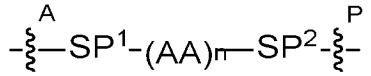
$\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H; или $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой;

$\mathbf{R^3}$ представляет собой H или HO-CH_2-;

Q представляет собой -O- или -O-NH-; где если $\mathbf{R^3}$ представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-; и

Cy представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен.

74. Линкер-полезная нагрузка по п. 73, где **L** представляет собой:



где:

$\mathbf{SP^1}$ представляет собой спейсер;

$\mathbf{SP^2}$ представляет собой спейсер;

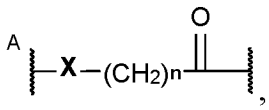
одна или более связей со связующим агентом;

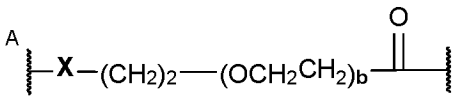
одна или более связей с полезной нагрузкой;

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

n представляет собой целое число от 0 до 10.

75. Линкер-полезная нагрузка по п. 73 или п. 74, где спейсер $\mathbf{SP^1}$ представляет собой:



, или


где:

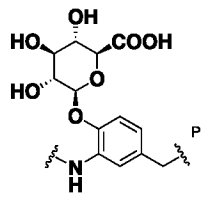
X отсутствует или представляет собой -N(H)-;

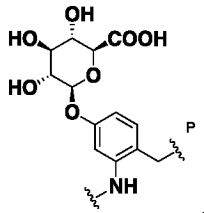
представляет собой связь со связующим агентом;

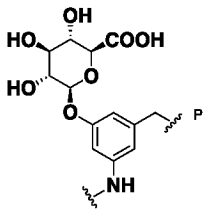
представляет собой связь с $(\mathbf{AA})_n$;

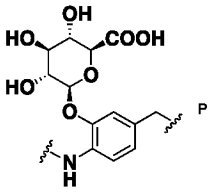
n представляет собой целое число от 0 до 10; и

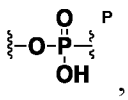
b независимо представляет собой целое число от 1 до 92.

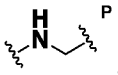
76. Линкер-полезная нагрузка по любому из пунктов 73-75, где спейсер $\mathbf{SP^2}$ выбран из группы, включающей: –NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2–, –NH-(*p*-C_6H_4)-$CH_2OC(O)$–, -NH-(*p*-C_6H_4)-$CH(CH_3)$-O-,


,


,


,


,


,


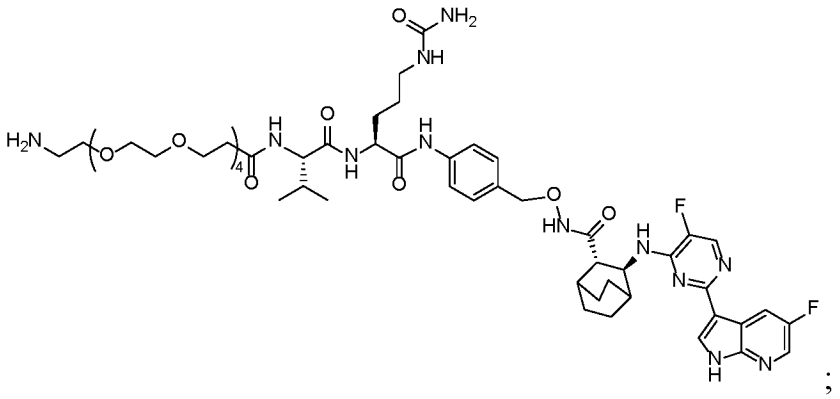
, и любую их комбинацию.

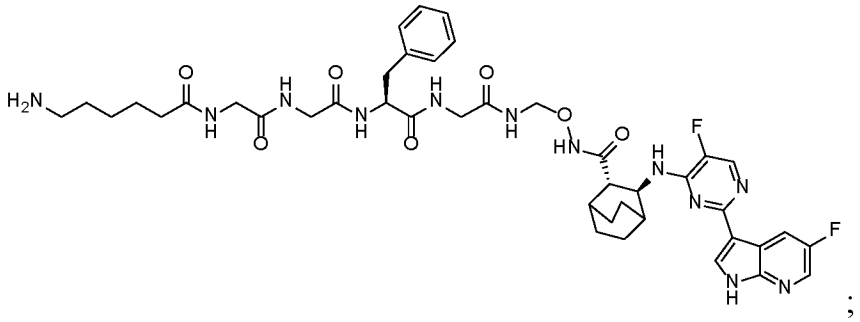
77. Линкер-полезная нагрузка по любому из пунктов 73-76, где $(\mathbf{AA})_n$ выбран из группы, включающей: валин-цитруллин, цитруллин-валин, валин-аланин, аланин-валин, валин-глицин, глицин-валин, глютамат-валин-цитруллин, глютамин-валин-цитруллин, и глицин-глицин-фенилаланин-глицин.

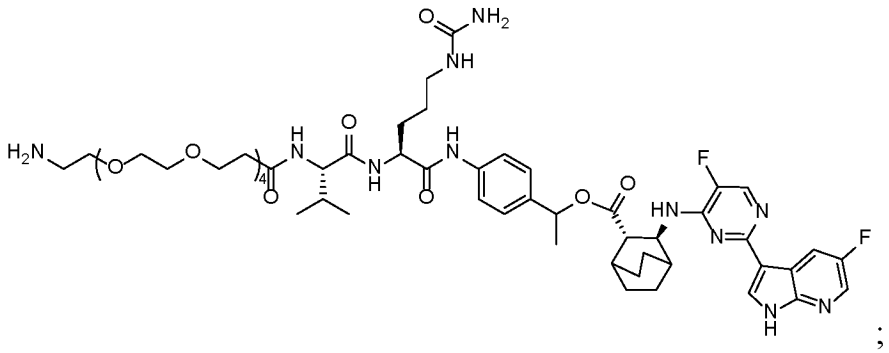
78. Линкер-полезная нагрузка по любому из пунктов 73-77, где $(\mathbf{AA})_n$-$\mathbf{SP^2}$ выбран из группы, включающей: валин-цитруллин-PABC, цитруллин-валин-PABC, глютамат-валин-цитруллин-PABC, глютамин-валин-цитруллин-PABC, глицин-

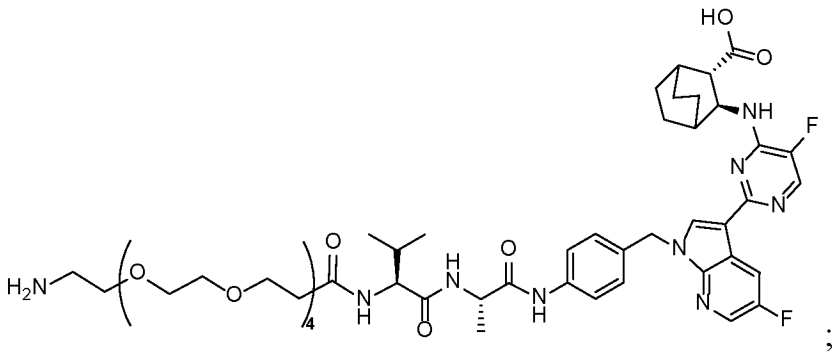
глицин-фенилаланин-глицин-N(H)-CH_2-, валин-аланин-PABC, валин-цитруллин-NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2–, валин-цитруллин-NH-(*p*-C_6H_4)-$CH(CH_3)O$–, валин-аланин-NH-(*p*-C_6H_4)-CH_2–, и валин-аланин-NH-(*p*-C_6H_4)-$CH_2OC(O)$–.

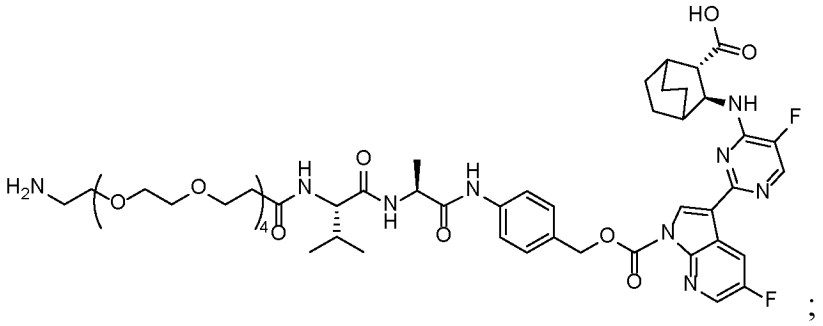
79. Линкер-полезная нагрузка по п. 73, выбранный из группы, включающей:

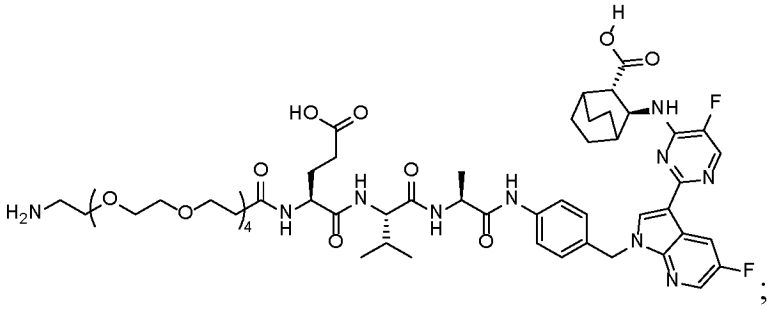

;

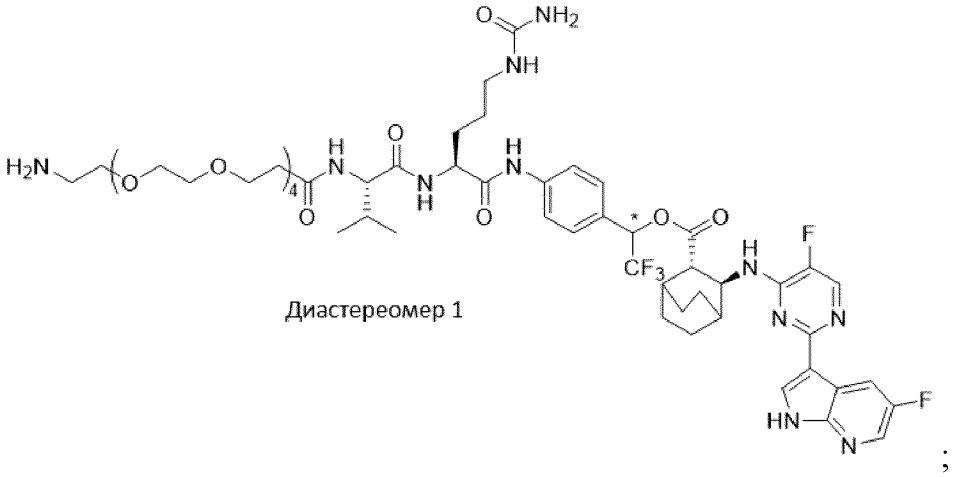

;

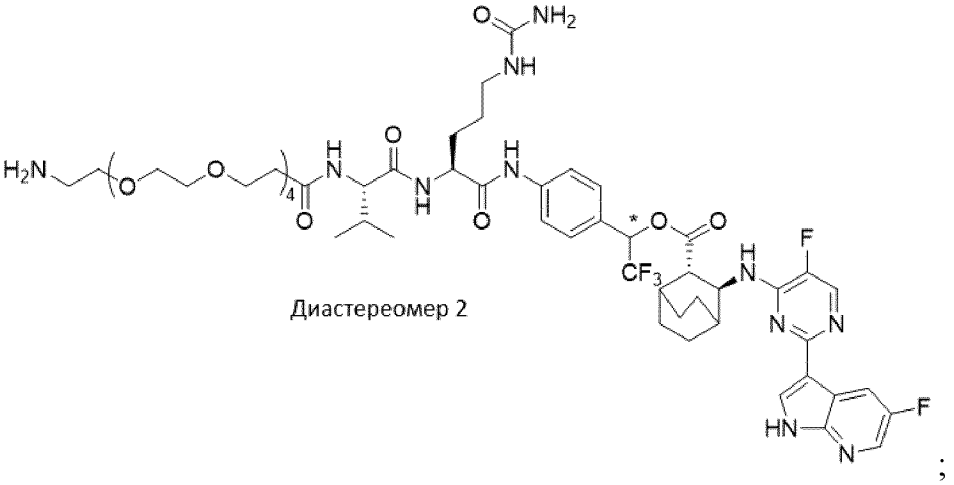

;

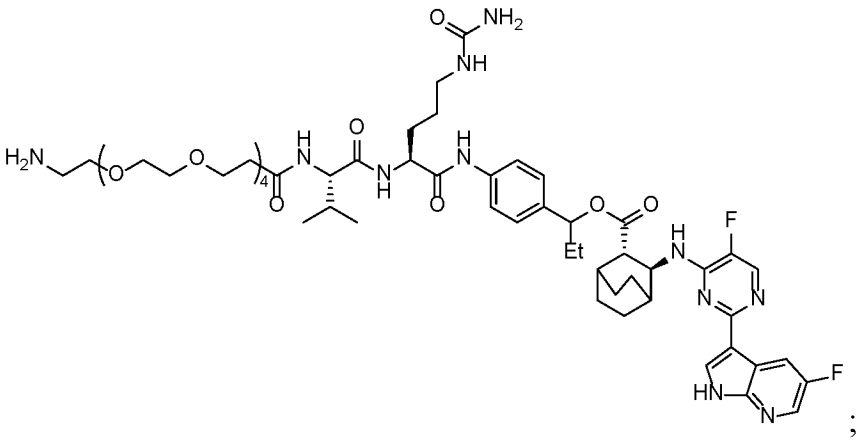

;

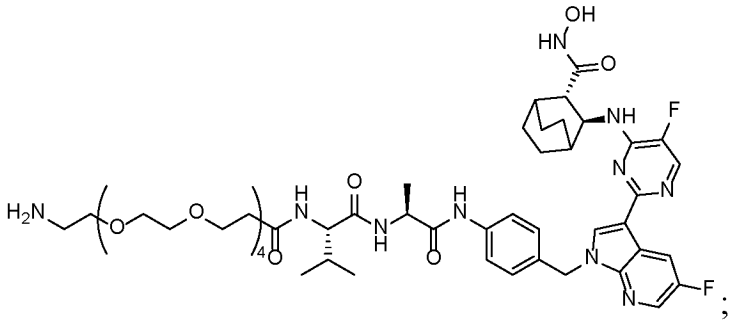

;

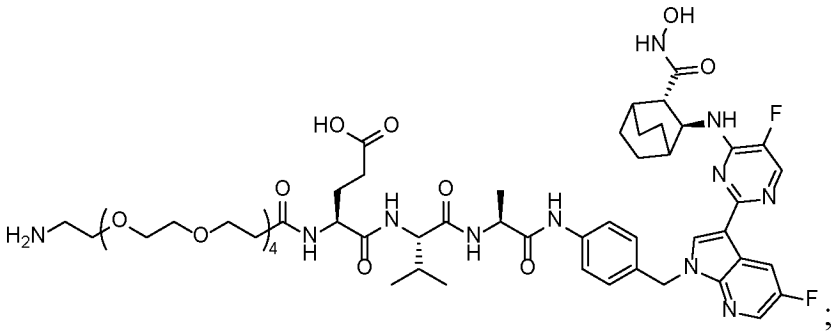

;

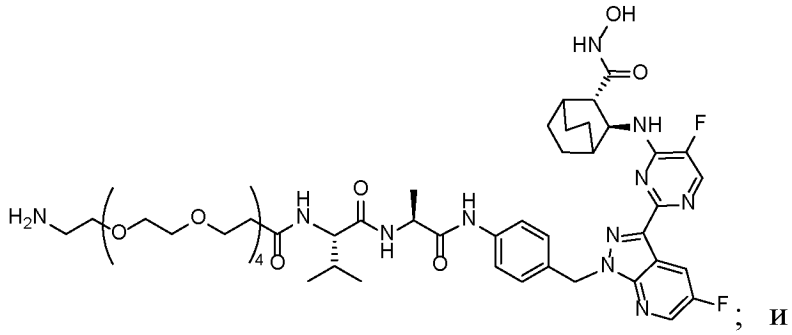

Диастереомер 1
;

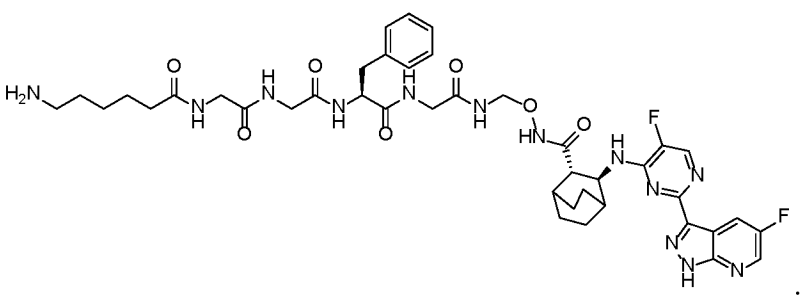

Диастереомер 2
;


;


;


;

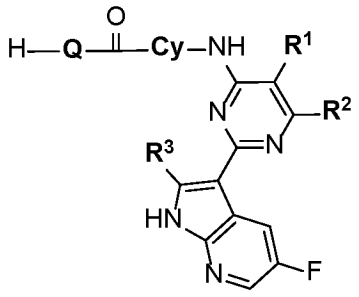

; и


.

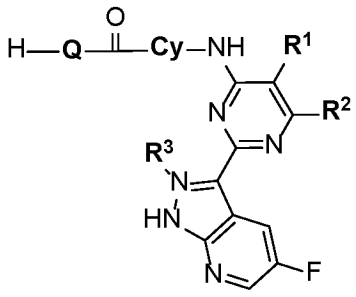
80. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или его антиген-связывающий фрагмент, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент конъюгировано с соединением по любому из пп. 73-79.

81. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий приведение в контакт связующего агента с линкером-антивирусным соединением по любому из пунктов 73-80.

82. Соединение, описываемое следующей формулой:



или



(**301**) (**311**)

где,

R^1 представляет собой F, и **R**^{2} представляет собой H; или **R**^{1} и **R**^{2} циклизируются с образованием конденсированного пятичленного гетероарильного кольца, необязательно замещенного метильной группой, например as -C=CH-S- или -C=CH-NMe-;

R^3 представляет собой H или HO-CH_2-;

Cy представляет собой связанный через мостик 5- или 6-членный циклоалкил, где мостиком является метилен или этилен;

Q представляет собой -O- или -O-NH-; где если **R**^{3} представляет собой H, то **Q** представляет собой -O-NH-;

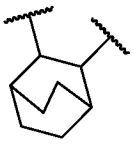
или его фармацевтически приемлемая соль.

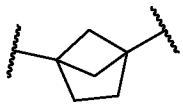
83. Соединение по п. 82, где **R**^{3} представляет собой HO-CH_2-.

84. Соединение по п. 82, где **R**^{3} представляет собой H и **Q** представляет собой -O-NH-.

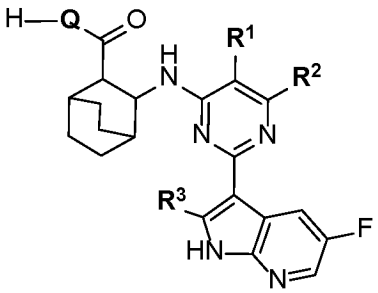
85. Соединение по любому из пунктов 82-84, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой F, и $\mathbf{R^2}$ представляет собой H.

86. Соединение по любому из пунктов 82-85, где **Cy** представляет собой связанный через мостик 6-членный циклоалкил.

87. Соединение по любому из пунктов 82-85, где **Cy** представляет собой  .

88. Соединение по любому из пунктов 82-85, где **Cy** представляет собой  и **Q** представляет собой -O-.

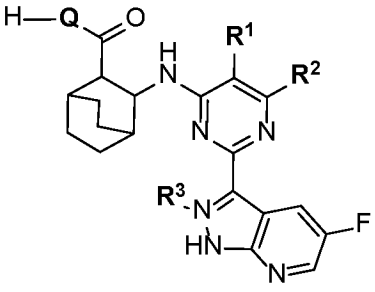
89. Соединение по любому из пунктов 82-85, описываемое следующей формулой:



(**302**);

или его фармацевтически приемлемая соль.

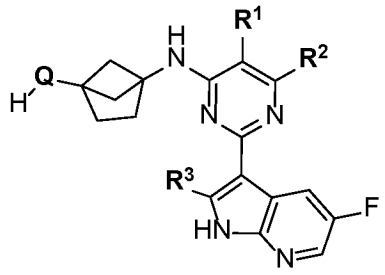
90. Соединение по любому из пунктов 82-85, описываемое следующей формулой:



(**312**);

или его фармацевтически приемлемая соль.

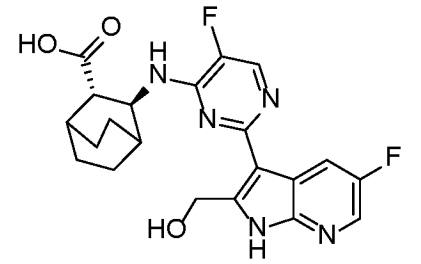
91. Соединение по любому из пунктов 82-85, описываемое следующей формулой:

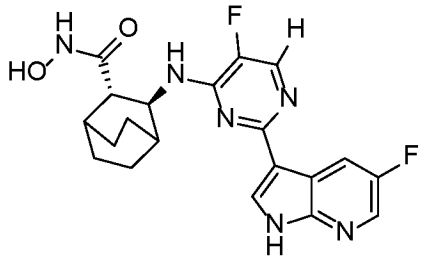


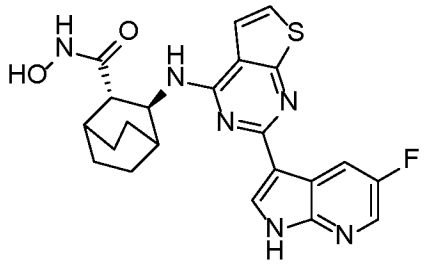
(**321**);

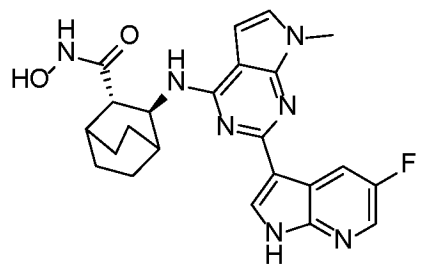
или его фармацевтически приемлемая соль.

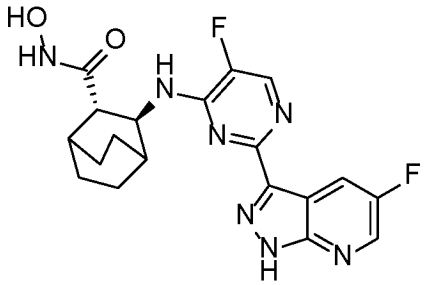
92. Соединение, выбранное из группы, включающей:

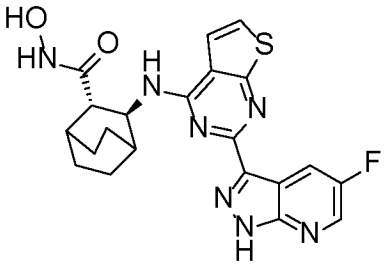


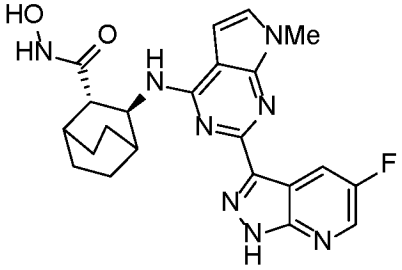


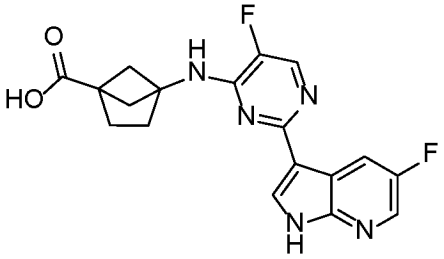


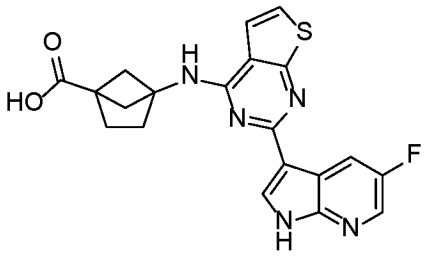


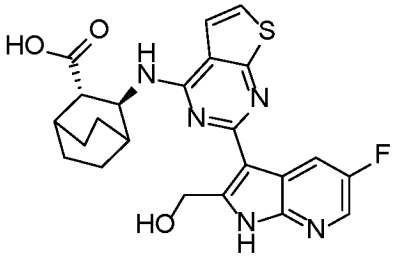












и его фармацевтически приемлемые соли.

93. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пунктов 82-92 и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или разбавителей.

94. Способ лечения по любому из предшествующих пунктов, включающий стадию введения нуждающемуся в таком лечении субъекту соединения по любому из пунктов 82-92 или фармацевтической композиции по п. 91.

95. Соединение или композиция по любому из предшествующих пунктов для применения в лечении.

96. Соединение или композиция по любому из предшествующих пунктов для применения в лечении инфекции гриппа у нуждающегося в таком лечении субъекта.

97. Применение соединения или композиции по любому из предшествующих пунктов для получения лекарственного средства.

98. Применение соединения или композиции по любому из предшествующих пунктов для получения лекарственного средства для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа, у нуждающегося в таком лечении субъекта.